

# 妊娠兔胎盘细胞凋亡及凋亡相关基因 Bcl-2 和 Bax 表达的动态变化\*

刘喆 陈云 杨颖 彭景樵\*\*

(中国科学院动物研究所, 计划生育生殖生物学国家重点实验室, 北京 100080)

**摘要** 以新西兰雌兔为动物模型, 研究妊娠期间胎盘细胞凋亡及其凋亡调控蛋白 Bcl-2 和 Bax 表达的动态变化. 基因组 DNA 凝胶电泳实验检测到妊娠中期和晚期胎盘基因组 DNA 中出现典型的凋亡特征——DNA 梯带, 而且 DNA 断裂值在妊娠早、中、晚期分别为: 0.14、0.49 和 1.43, 与妊娠早期相比, 妊娠中、晚期胎盘基因组 DNA 断裂值有显著性增加. TUNEL 实验和活化 caspase-3 的免疫定位实验表明, 在妊娠早期胎盘中存在细胞凋亡, 而且在各妊娠期中细胞凋亡主要发生于合体滋养层. 免疫印迹法分析表明, Bcl-2 和 Bax 随妊娠的进行其表达量明显增加, Bax: Bcl-2 比值在妊娠早、中、晚期分别为: 0.89, 0.91 和 1.25, 呈增加趋势. 实验结果说明, 在兔正常妊娠中, 胎盘合体滋养层细胞发生凋亡, 且随妊娠的进行, 凋亡细胞数量增多, 胎盘细胞凋亡主要与细胞中 Bax: Bcl-2 的比例相关.

**关键词** 兔, 胎盘, 细胞凋亡, Bcl-2, Bax

**学科分类号** Q26

细胞凋亡是多细胞生物更新正常细胞和清除异常细胞的重要手段, 参与机体生殖、胚胎发育、免疫等生理过程以及肿瘤、病毒感染等疾病发生过程. 细胞凋亡一个很明显的特征是细胞中染色体在核小体连接处 DNA 发生断裂, 在凝胶电泳图谱中出现 180~200 bp 及其整数倍的 DNA 梯带.

胎盘是母胎之间物质及气体的交换器官, 同时它还是分泌多种维持妊娠必需激素的临时内分泌器官. 近年有文献报道, 人正常妊娠胎盘中检测到有凋亡现象发生, 他们认为细胞凋亡是调控细胞增殖、保证胎盘组织结构与功能的重要调控机制之一<sup>[1]</sup>. 细胞凋亡调控异常会导致习惯性流产以及多种妊娠并发症的发生. 有实验证明: 在自发性流产和异位妊娠妇女胎盘中细胞凋亡的程度较正常妊娠胎盘细胞凋亡有显著性的增多<sup>[2,3]</sup>. 可见, 了解妊娠过程中细胞凋亡的特性及其调控机制对于某些妊娠疾病的治疗具有重要意义. 本文着重探讨兔妊娠过程中胎盘细胞凋亡的动态变化, 并对凋亡调控因子 Bcl-2、Bax 等的表达变化进行检测, 实验结果将有助于进一步阐明妊娠过程中的细胞调控分子机制.

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物:** 实验动物选取性成熟新西兰雌兔 9 只, 在动情期与雄兔 (1:1) 合笼交配, 交配

次日为妊娠第一天 (D1). 根据妊娠时期的不同将实验分为三部分: 早孕期 (D12,  $n=3$ )、妊娠中期 (D18,  $n=3$ ) 和分娩前期 (D26,  $n=3$ ). 动物处死后取其胎盘, 部分 ( $n=9$ ) 固定于 4% 多聚甲醛-磷酸缓冲液中用于 TUNEL 及免疫组化检测, 部分 ( $n=9$ ) 冷冻于  $-80^{\circ}\text{C}$  用于提取基因组 DNA 及蛋白质点杂交.

**1.1.2 试剂:** 蛋白酶 K, 碘化丙啶购自 Sigma 公司; DNase free RNase 购自 QIAGEN 公司; TUNEL 检测试剂盒购自 Boehringer Mannheim 公司; caspase-3, Bcl-2, Bax 单克隆抗体, actin 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司; 硝酸纤维素膜, 蛋白质印迹显色液, 蛋白 A-HRP 为 BioRad 公司产品; 免疫组化试剂盒, DAB 显色试剂盒为中山生物技术公司分装.

### 1.2 方法

**1.2.1 胎盘基因组 DNA 的提取:** 组织块剪碎后在抽提液 (10 mmol/L Tris·HCl, 0.1 mol/L EDTA, 0.5% SDS) 中匀浆,  $37^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h, 加入蛋白酶 K 100 mg/L,  $50^{\circ}\text{C}$  孵育 3 h, 取出于室温冷却, 加入等体积 Tris 饱和酚 (pH 8.0), 混合两相

\* 中国科学院知识创新工程重要方向项目 (KSCX2-SW-201).

\*\* 通讯联系人.

Tel: 010-62571277, E-mail: pengjp@panda.ioz.ac.cn

收稿日期: 2001-04-17, 接受日期: 2001-07-10

后15 000 r/min离心15 min, 取上层液, 同样方法用酚: 氯仿: 异戊醇 (25: 24: 1) 抽提两次, 氯仿抽提一次, 以去除蛋白质和酚. 将上层液用2倍体积无水乙醇于-20℃沉淀1 h, 10 000 r/min离心10 min, 去上清, 沉淀加入70%乙醇, 8 000 r/min离心10 min, 去上清, 沉淀干燥后, TE (10 mmol/L Tris·HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0) 溶解. 加入Dnase-free RNase, 37℃孵育1 h, 产物于2.0%琼脂糖凝胶电泳检测. 用Fragment NT扫描软件对电泳结果进行定量分析.

**1.2.2 TUNEL 实验:** 胎盘组织于4%多聚甲醛固定5 h后置于15%蔗糖溶液中浸泡过夜, 用冰冻切片机进行冰冻切片, 厚度10 μm. 切片经通透液 (0.1% Triton X-100, 0.1% 柠檬酸钠) 通透处理5 min, PBS洗去通透液, 滴加50 μl TdT酶. 反应液孵育1 h, PBS洗后, 于50 mg/L 碘化丙啶负染5 min. 阴性对照中加入无TdT酶的反应液. 封片后于Confocal下观察、分析、扫描.

**1.2.3 免疫组化:** 活化caspase 3的免疫组织化学检测参考文献 [4]. 胎盘组织 ( $n=3$ ) 于4%多聚甲醛固定5 h后置于15%蔗糖溶液中浸泡过夜, 用冰冻切片机进行冰冻切片, 厚度10 μm. 切片于室温干燥30 min后, 10 mg/L 蛋白酶K 37℃消化20 min, PBS洗两次, 于5%脱脂奶粉封闭30 min, 然后加入4 mg/L 小鼠活化caspase 3单克隆抗体, 4℃下孵育过夜, 为了消除内源性过氧化物酶的干扰, 切片于3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 闭光孵育5 min, 然后滴入羊抗小鼠IgG-辣根过氧化物酶, 10 min后进行DAB显色. 用PBS代替一抗作为阴性对照以检测活化caspase 3抗体的特异性. 切片经0.5%苏木精染色, 逐级乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片后于Olympus IMT-2显微镜下观察.

**1.2.4 蛋白质点杂交:** 胎盘组织 ( $n=9$ ) 在500 μl蒸馏水中剪碎, 高速匀浆, 匀浆液于12 000 r/min, 4℃离心10 min, 取其上清作为蛋白质样品. 蛋白质点杂交实验参考文献 [5]. 利用点杂交仪, 将妊娠早、中、晚期胎盘蛋白溶液加入硝酸纤维素膜中, 将膜取出, 于5%明胶封闭1 h, TBS洗10 min, 加入0.5 mg/L Bcl-2 和 Bax 一抗 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), 孵育3 h, TBS洗10 min, 1:1000稀释的蛋白-A-HRP孵育2 h, 然后用蛋白质印迹显色液显色, 用Fragment NT Analysis扫描软件对实验结果进行定量分析. 选择actin作为内源参照物, 其各实验组

的蛋白质点样量同Bcl-2和Bax蛋白点杂交实验, 一抗的浓度为0.3 mg/L.

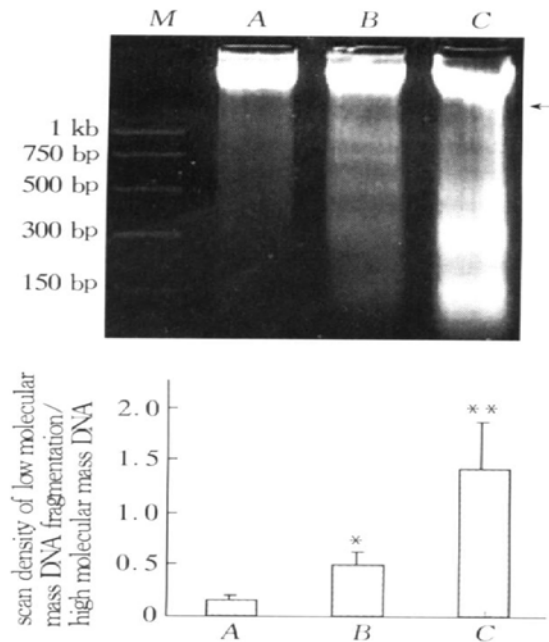
### 1.3 数据统计

本文所有扫描所得数据均进行Student's *t* 检验.

## 2 实验结果

### 2.1 胎盘的细胞凋亡

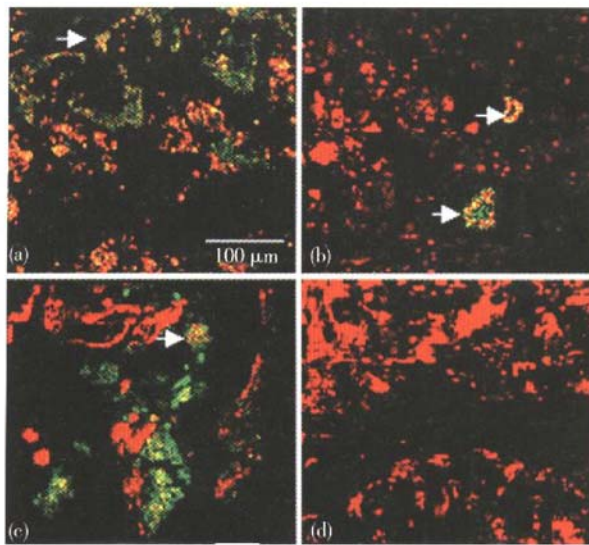
妊娠不同时期兔胎盘基因组DNA凝胶电泳图谱见图1a, D12孕兔胎盘基因组凝胶电泳图谱中无DNA梯带, 而D18和D26孕兔胎盘基因组中存在断裂成约180 bp及其整数倍的DNA梯带. 扫描定量结果见图1b, 以小分子质量DNA片段扫描密度之和与高分子质量DNA片段扫描密度的比值作为DNA断裂值, D18和D26孕兔胎盘DNA断裂值分别为0.49、1.43, 较妊娠早期胎盘DNA断裂值有显著性差异, 前者 $P < 0.05$ , 后者 $P < 0.01$ .



**Fig 1 Apoptotic fragmentation of DNA in placenta**

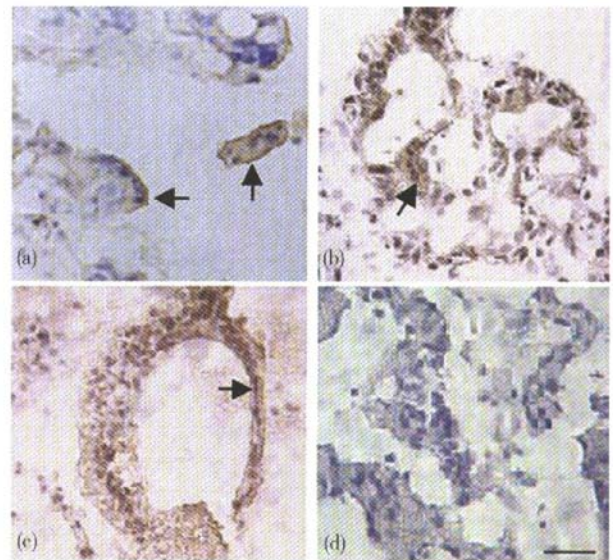
An arrow indicates the point at which gels were cut for quantitation of the high molecular mass and low molecular mass DNA<sup>[2]</sup>. \* means significant change compared with D12 groups ( $P < 0.05$ ), \*\* means significant change compared with D12 groups ( $P < 0.01$ ). A: DNA from D12 pregnant rabbit placenta; B: DNA from D18 pregnant rabbit placenta; C: DNA from D26 pregnant rabbit placenta.

利用3'端标记对胎盘组织进行凋亡细胞的原位检测, 结果见图2. 在妊娠早、中、晚期胎盘均检测到凋亡细胞. 凋亡细胞主要位于合体滋养层, 而细胞滋养层细胞较少被标记.



**Fig 2 In situ 3'-end labelling of DNA in the sections of placenta**  
The incorporation of fluorescein-conjugated dUTP is represented by the green coloration and such staining was the result of the apoptotic cleavage of DNA. The red fluorescence represented the nucleus of all cells in tissue. (a) D12 pregnant rabbit placenta tissue. Arrow indicated apoptotic syncytiotrophoblast; (b) D18 pregnant rabbit placenta tissue. Arrow indicated apoptotic syncytiotrophoblast; (c) D26 pregnant rabbit placenta tissue. Arrow indicated apoptotic syncytiotrophoblast; (d) In negative control section of placenta, deoxynucleotidyl transferase was not added. The bar applied to all figures.

妊娠不同时期胎盘活化 caspase-3 免疫组织化学分析见图 3, 妊娠早、中、晚期均有大部分合体滋养层被标记, 少量的细胞滋养层亦呈阳性反应。

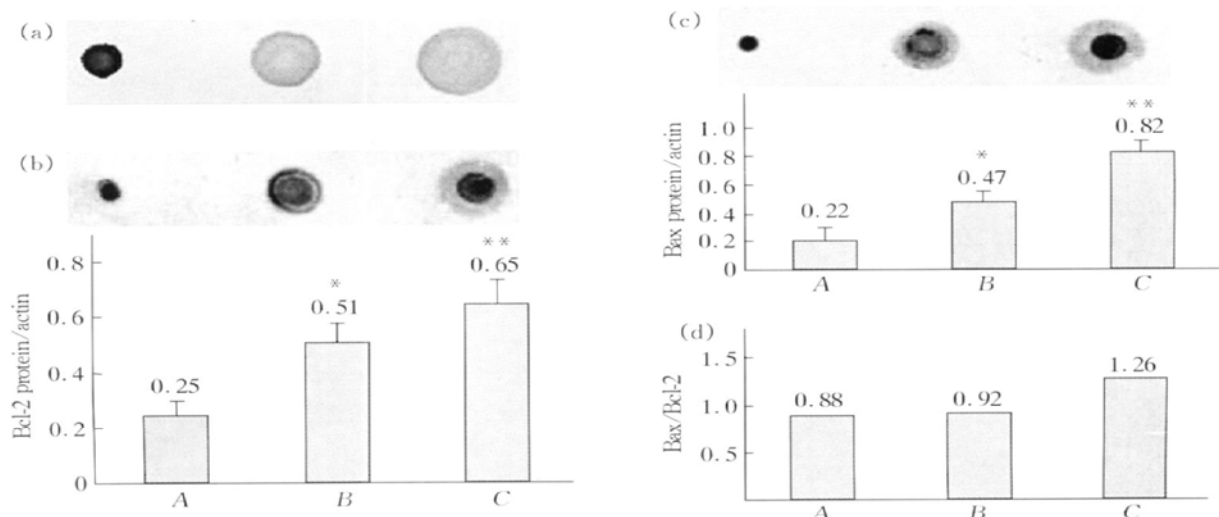


**Fig 3 Active caspase 3 localization**

(a) In D12 pregnant rabbit placenta, the arrow indicated the syncytiotrophoblast positive for active caspase-3; (b) In D18 pregnant rabbit placenta, the arrow indicated the syncytiotrophoblast positive for active caspase-3; (c) In D26 pregnant rabbit placenta, the arrow indicated the syncytiotrophoblast positive for active caspase-3; (d) In negative control section of placenta, the caspase-3 antibody was replaced by normal goat serum. Bar: 40 μm and applied to (a), (b) and (c).

## 2.2 Bcl-2 及 Bax 表达的变化

妊娠不同时期, actin、Bcl-2、Bax 点杂交结果见图 4a、b、c, 扫描分析显示, 妊娠早、中、晚期 Bcl-2 和 Bax 的表达均有显著性增加. Bax: Bcl-2



**Fig 4 Immunoblot analysis of Bcl-2 and Bax protein expression in placenta**

(a) The photos of immunoblot of actin; (b) The upper panel is a representative immunoblot of Bcl-2 expression in placenta from D12, D18 and D26 pregnant rabbit placenta. The lower panel summarizes the densitometric analysis of replicate experiments ( $n = 3$ ). \* means significant change compared with control groups ( $P < 0.05$ ), \*\* means  $P < 0.01$ . A: D12 pregnant placenta; B: D18 pregnant placenta; C: D26 pregnant placenta; (c) The upper panel is a representative immunoblot of Bax expression in D12, D18 and D26 pregnant rabbit placenta. The lower panel summarizes the densitometric analysis of replicate experiments ( $n = 3$ ). \* means significant change compared with control groups ( $P < 0.05$ ), \*\* means  $P < 0.01$ . A: D12 pregnant placenta; B: D18 pregnant placenta; C: D26 pregnant placenta; (d) The Bax to Bcl-2 ratio. A: D12 pregnant placenta; B: D18 pregnant placenta; C: D26 pregnant placenta.

比值在妊娠早、中、晚期分别为: 0.88, 0.92 和 1.25, 随妊娠的进行其比值增加 (图 4d)。

### 3 讨 论

胎盘形态与功能的维持依赖于胎盘细胞的增殖、分化以及死亡。细胞凋亡在控制胎盘生理性细胞动力学中具有极其重要的作用。

为了解正常妊娠中胎盘细胞凋亡的动态变化, 本文以兔为动物模型, 研究了妊娠过程中细胞凋亡的变化。基因组 DNA 凝胶电泳检测结果发现, 妊娠中期和分娩前期胎盘基因组 DNA 中有明显低分子质量 DNA 梯带出现, 表明妊娠中、晚期胎盘组织存在细胞凋亡, 早孕期胎盘基因组 DNA 中未检测到低分子质量的 DNA 梯度。然而采用 TUNEL 检测方法检测发现早孕期胎盘组织存在细胞凋亡, TUNEL 检测方法是目前公认的最为灵敏的检测细胞凋亡的手段, 它能够检测出其他方法如 DNA 凝胶电泳未能检测出的凋亡细胞<sup>[6]</sup>。活化 caspase 3 是半胱氨酸蛋白酶家族的一个十分重要的成员, 它是细胞凋亡过程最后的执行者, 换言之, 凋亡细胞表现出的一些典型的症状如: DNA 断裂、染色体凝集、细胞膜起泡、细胞皱缩等现象均与活化 caspase 3 相关, 因此, 许多学者将活化 caspase 3 蛋白酶的出现作为细胞凋亡的标志<sup>[7]</sup>。实验中早孕期胎盘部分合体滋养层表现为活化 caspase 3 阳性, 这进一步证实 TUNEL 实验结果: 早孕胎盘中存在凋亡细胞。由此推测, 在妊娠早期, 细胞凋亡是参与调控胎盘细胞增殖的机制之一。

TUNEL 实验和活化 Caspase 3 的免疫组化实验将各妊娠期凋亡细胞定位于合体滋养层, 这与 Nelson<sup>[8]</sup> 和 Smith 等<sup>[1]</sup> 的报道一致。他们在人类早孕胎盘合体滋养层中检测到细胞凋亡, 并观察到细胞滋养层细胞大量增殖, 部分细胞分化, 融合形成合体滋养层, 然后部分合体滋养层细胞凋亡, 从胎盘上脱落进入母体循环系统, 胎盘形态的维持依赖于胎盘细胞增殖与凋亡的动态平衡。

DNA 凝胶电泳扫描结果发现, 妊娠中期和分娩前期胎盘 DNA 断裂值较早孕期有显著性增高, 提示, 随妊娠的进行, 胎盘凋亡细胞增多。Mayhew 等<sup>[9]</sup> 曾推测, 妊娠中期滋养层细胞凋亡调节着胎盘滋养层的厚度, 以保证母体和胎儿之间营养及气体的交换顺利进行。分娩前期胎盘细胞大量凋亡的作用可能在于: a. 胎盘产生的大部分激素由合体滋养层分泌, 分娩前期合体滋养层的大量凋

亡必会引起相关激素 (如孕酮) 骤然降低, 有利于母体分娩; b. 合体滋养层与母体直接发生解剖学接触, 合体滋养层细胞凋亡导致胎儿与母体结合紧密度降低, 利于分娩。

Bcl-2 家族蛋白是细胞凋亡的重要调控因子, Bcl-2 是一种原癌基因, 它定位于细胞内膜系统, 主要存在于线粒体外膜、核膜和内质网。Bcl-2 与 Bax 是功能完全相反的两个蛋白质, Bcl-2 抑制细胞凋亡, 而 Bax 诱导细胞凋亡, 这两个蛋白质既能各自形成同源二聚体, 又能互相作用形成异源二聚体, 二者相互拮抗, 共同调节着细胞凋亡。

本文 Bcl-2 和 Bax 免疫印迹实验结果表明, 随妊娠的进行, Bcl-2 和 Bax 的表达均增加, 但 Bax: Bcl-2 的比例在妊娠后期较妊娠早期有增高趋势, 提示细胞凋亡在妊娠后期的增加有可能与 Bax: Bcl-2 比例的增加有相关性。Tilly<sup>[10]</sup> 报道, Bax: Bcl-2 的比例是卵巢颗粒细胞凋亡调控的重要因素。Dai 等<sup>[11]</sup> 实验证明, Bax: Bcl-2 的比例与蜕膜细胞凋亡密切相关。本文的实验结果证实, 在兔整个妊娠时期中, 胎盘细胞凋亡与 Bax: Bcl-2 的比例正相关, 此外, Bcl-2 和 Bax 虽单独具有调控细胞凋亡的功能, 但在二者共表达的细胞中, 其相互间的比例对细胞凋亡的影响更为重要。

### 参 考 文 献

- 1 Smith S C, Baker P N, Symonds E M. Placental apoptosis in normal human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, 1997, **177** (1): 57~ 65
- 2 Kokawa K, Shikone T, Nakano R. Apoptosis in human chorionic villi and decidua during normal embryonic development and spontaneous abortion in the first trimester. *Placenta*, 1998, **19** (1): 21~ 26
- 3 Kokawa K, Shikone T, Nakano R. Apoptosis in human chorionic villi and decidua in normal and ectopic pregnancy. *Molecular Hum Reprod*, 1998, **4** (1): 87~ 91
- 4 Qiao S, Nafasaka T, Harada T, *et al.* P53, Bax and Bcl-2 expression, and apoptosis in gestationa trophoblast of complete hydatidiform mole. *Placenta*, 1998, **19** (5~ 6): 361~ 369
- 5 Ishihara M, Ishida T, Isogai E, *et al.* Detection of antibodies to *Borrelia* species among patients with confirmed sarcoidosis in a region where Lyme disease is nonendemic. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 1996, **234** (12): 770~ 773
- 6 Labat-Moleur F, Guillermet C, Lorimier P, *et al.* TUNEL apoptotic cell detection in tissue sections: critical evaluation and improvement. *J Histochem Cytochem*, 1998, **46** (3): 327~ 334
- 7 Salvesen G S, Dixit V M. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell*, 1997, **91** (4): 443~ 446
- 8 Nelson D M. Apoptotic changes occur in syncytiotrophoblast of human placental villi where fibrin type fibrin type fibrinoid is deposited at discontinuities in the villous trophoblast. *Placenta*, 1996, **17** (7): 387~ 391
- 9 Mayhew T M, Burton G J. Stereology and its impact on our



- understanding of human placental functional morphology. *Microsc Res Techn*, 1997, **38** (1-2): 195~205
- 10 Tilly J L, Tilly K I, Kenton M I, *et al.* Expression of members of the bcl-2 gene family in immature rat ovary: equine chorionic gonadotropin mediated inhibition of granulosa cell apoptosis is associated with decrease bax and continuous bcl-2 and bcl-x long messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology*, 1995, **136** (1): 232~241
- 11 Dai D D, Moulton B C, Ogle T F, *et al.* Regression of the decidualized mesometrium and decidual cell apoptosis are associated with a shift in expression of Bcl-2 family members. *Bio Reprod*, 2000, **63** (1): 188~195

## Change of Apoptosis and Apoptotic Relative Gene Bcl-2 and Bax Expression in Pregnant Rabbit Placenta\*

LIU Zhe, CHEN Yun, YANG Ying, PENG Jing-Pian\*\*

(The State Key Laboratory of Reproductive Biology, Institute of Zoology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

**Abstract** The change of apoptosis and apoptotic regulatory gene Bcl-2 and Bax expression in pregnant rabbit placenta were investigated. Nuclear DNA fragmentation analysis indicated that DNA ladder, which is characteristic of apoptosis was detected in D18 and D26 pregnant rabbit placenta and the scan results showed that DNA fragmentation increased significantly in D18 and D26 pregnant rabbit placenta compared with that in D12 pregnant rabbit placenta. TUNEL test and immunolocalization of active caspase-3 demonstrated that apoptosis occurred in D12 pregnant rabbit placenta, and apoptotic cells localized predominantly in syncytiotrophoblast throughout pregnancy. Immunoblot analysis showed an increase of Bcl-2 and Bax expression throughout pregnancy, and the change of expression of these two proteins resulted in an increase in Bax to Bcl-2 ratio. The results demonstrated that apoptosis occurred in syncytiotrophoblast in rabbit pregnancy and apoptotic cell death increased from early to the end of gestation period, moreover Bax to Bcl-2 ratio may be related to apoptosis in placenta.

**Key words** rabbit, placenta, apoptosis, Bcl-2, Bax

\* This work was supported by a grant from the Key Innovation Research Programs of the Chinese Academy of Sciences (KSCX2-SW-201).

\*\* Corresponding author. Tel: 86-10-62571277, E-mail: pengjp@panda.ioz.ac.cn

Received: April 17, 2001 Accepted: July 10, 2001