

沉默 Bax Inhibitor-1 基因对子宫肌瘤细胞凋亡的影响及机制研究

苗润燕¹, 刘华^{2*}, 田源³

基金项目:延安市重点研发计划项目(项目编号:2019SF-144)

作者单位:716000 陕西 延安,1. 延安市人民医院妇产科;2. 延安大学附属医院产科;3. 延安大学基础医学院

作者简介:苗润燕,毕业于延安大学,本科,主治医师,主要研究方向为子宫肌瘤诊治

* 通信作者,E-mail:120082176@qq.com

【摘要】目的 在子宫平滑肌瘤中探究 Bax 抑制因子 1(Bax inhibitor-1, BI-1) 的表达及其对子宫平滑肌瘤细胞的作用与相关机制。**方法** 应用 RT-PCR 及 Western blot 实验检测 20 对子宫平滑肌瘤组织样本与瘤旁组织中 BI-1 的 mRNA 及蛋白表达;分离培养原代子宫平滑肌瘤细胞并应用 α -Actin 免疫细胞染色进行鉴定;应用 siRNA 技术将靶向沉默 BI-1 的 si-BI-1 及阴性对照序列 si-NC 转染入上述分离培养的子宫平滑肌瘤细胞中,并将细胞分为 3 组,Control 组、si-BI-1 组和 si-NC 组;分别应用 CCK-8、Annexin V-FITC 及 JC-1 与流式细胞术分析沉默 BI-1 对子宫肌瘤细胞增殖、凋亡、线粒体膜电位及细胞中 Ca^{2+} 浓度的影响,最后应用 Western blot 实验检测沉默 BI-1 对子宫肌瘤细胞中 Cyt-C 及凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 及 Cleaved caspase-3 表达的影响。**结果** 与瘤旁组织相比,BI-1 在子宫肌瘤中的 mRNA 及蛋白表达均显著增加($P < 0.05$);成功分离培养纯度较高的原代子宫肌瘤细胞;与 Control 组细胞相比,沉默 BI-1 基因表达不影响子宫平滑肌瘤细胞的增殖能力($P > 0.05$),但显著促进 si-BI-1 组细胞的凋亡率($P < 0.05$),并促进细胞线粒体膜电位降低且胞质及线粒体中 Ca^{2+} 浓度的增加($P < 0.05$);Western blot 实验检测结果显示,与 Control 组细胞相比,沉默 BI-1 基因表达使 si-BI-1 组细胞中的 Bcl-2 蛋白表达显著降低($P < 0.05$),Bax、Cleaved caspase-3 及 Cyt-C 蛋白表达明显增加($P < 0.05$),Bcl-2/Bax 比值明显降低($P < 0.05$)。**结论** 实验发现 BI-1 在子宫肌瘤组织中的表达显著增加,沉默子宫肌瘤细胞中 BI-1 基因可能通过改变 Bcl-2/Bax 比值,促进胞质及线粒体中 Ca^{2+} 浓度的增加,从而引起线粒体膜电位的下降及损伤所诱导细胞发生凋亡。

【关键词】 子宫平滑肌瘤;Bax 抑制因子 1(BI-1);线粒体膜电位;凋亡

【中图分类号】R 711.74

【文献标志码】A

【文章编号】1674-4020(2021)06-070-06

doi:10.3969/j.issn.1674-4020.2021.06.16

The effect and mechanism of Bax inhibitor-1 gene silencing on apoptosis of uterine leiomyoma cells

MIAO Runyan¹, LIU Hua^{2*}, TIAN Yuan³

1. Department of Obstetrics and Gynecology, Yan'an People's Hospital; 2. Department of Obstetrics, Affiliated Hospital of Yan'an University;

3. School of Basic Medicine, Yan'an University, Yan'an Shaanxi 716000, P. R. China

* Corresponding author, E-mail:120082176@qq.com

【Abstract】Objective To investigate the expression of Bax inhibitor-1 (BI-1) in uterine leiomyoma and its effect on uterine leiomyoma cells. **Methods** RT-PCR and Western blot were used to detect the expression of BI-1 mRNA and protein in 20 pairs of uterine leiomyoma samples and adjacent tissues; the primary uterine leiomyoma cells were isolated and identified by α -actin immunocytochemistry; the si-BI-1 and negative control sequence si-NC were transfected into the above-mentioned isolated and cultured

uterine leiomyoma cells by si-RNA technology, and the cells were divided into three groups: control group, si-BI-1 group and si-NC group; CCK-8, Annexin V-FITC, JC-1 and flow cytometry were used to analyze the effects of BI-1 silencing on the proliferation, apoptosis, mitochondrial membrane potential and Ca^{2+} concentration of myoma cells. Finally, Western blot was used to detect the effects of BI-1 silencing on the expression of Cyt-C, Bcl-2, Bax and cleaved Caspase-3 in myoma cells; **Results** Compared with the adjacent tissues, the expression of BI-1 mRNA and protein in uterine leiomyoma increased significantly ($P < 0.05$); high purity primary uterine myoma cells were successfully isolated and cultured. Compared with the control group, the silencing of BI-1 gene expression did not affect the proliferation ability of uterine leiomyoma cells ($P > 0.05$), but significantly promoted the apoptosis rate of si-BI-1 cells ($P < 0.05$), decreased the mitochondrial membrane potential, and increased the Ca^{2+} concentration in cytoplasm and mitochondria ($P < 0.05$). The results of Western blot showed that compared with the control group, the expression of Bcl-2 protein decreased significantly ($P < 0.05$), the expression of Bax, cleaved Caspase-3 and Cyt-C protein increased significantly ($P < 0.05$), and the ratio of Bcl-2/Bax decreased significantly ($P < 0.05$). **Conclusion** The expression of BI-1 increased significantly in uterine leiomyoma tissue. The silencing of BI-1 gene in uterine leiomyoma cells may promote the increase of Ca^{2+} concentration in cytoplasm and mitochondria by changing the ratio of Bcl-2/Bax, thus leading to the decrease of mitochondrial membrane potential and apoptosis induced by injury.

[Key words] uterine leiomyoma; Bax inhibitor-1; mitochondrial membrane potential; apoptosis

子宫肌瘤是一种子宫肌层的良性肿瘤,在临床上非常普遍,调查显示子宫肌瘤在 50 岁以下女性中的累积发病率高达 70% 左右,且有逐年上升的趋势^[1-5]。迄今为止,其病因及发病机制仍不清楚。既往大量研究证实子宫肌瘤组织中调控细胞凋亡的 B 细胞淋巴瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 家族存在异常高表达,如抗凋亡相关基因 Bcl-2 的表达显著增加,而促凋亡基因 Bax (Bcl-2 associated X protein) 表达明显减少,这导致子宫肌瘤细胞中 Bcl-2/Bax 比值异常升高,上述现象提示 Bcl-2/Bax 调控的细胞凋亡障碍可能参与子宫肌瘤的发生、发展^[6-8]。Bax 抑制因子 1 (Bax inhibitor-1, BI-1) 是近年来新发现的一种同时存在于动植物中的高度保守性细胞死亡抑制因子,广泛存在于肺、前列腺、心脏、胎盘等组织中^[9-10]。BI-1 是 Bcl-2 与 Bax 调控细胞凋亡通路上的重要调节蛋白,研究证实 BI-1 能够通过影响细胞内 Ca^{2+} 浓度而调控线粒体功能从而影响 Bcl-2/Bax 对凋亡调节作用,如在多种恶性肿瘤组织中的表达显著增加的 BI-1 能够通过上述作用调控肿瘤细胞的增殖、凋亡等生物学行为,而促进肿瘤的进展^[11-13]。然而在子宫肌瘤中 BI-1 的表达及其对子宫肌瘤细胞增殖及凋亡的影响尚无相关研究。本研究拟通过观察 BI-1 在子宫肌瘤组织中的表达,探讨其相关作用机制及在子宫肌瘤发生进展中的影响。

1 材料与方法

1.1 临床标本采集

选择 2018 年 4 月至 2019 年 4 月于延安市人民医院妇产科因子宫肌瘤行子宫切除术的患者 20 例,年龄 (47.3 ± 2.6) 岁,均未绝经。瘤旁组织为肌瘤旁 ≥ 5 cm 处正常子宫肌肉组织。术中待子宫离体后迅速采集新鲜组织约 15 ~ 25 g, 30 min 内运回实验室进行 -80°C 储藏备用。20 例患者中 14 例为多发性肌瘤 (70%), 6 例为单发肌瘤 (30%); 肌壁间肌瘤 12 例 (60%), 混合性肌

瘤 8 例 (40%)。所有患者均经病理 HE 及免疫组化染色证实为子宫平滑肌瘤。

纳入标准:① 满足子宫肌瘤的病理学诊断;② 标本具有足量的对应瘤旁组织;③ 患者 1 年内未经任何肿瘤相关治疗,如服用免疫抑制剂、放疗或化疗等;④ 患者及家属对本研究目的表示知晓理解,并签署知情同意书。本研究经本院伦理委员会审批。

1.2 主要试剂

0.25% 胰蛋白酶 (美国 Hyclone 公司); Trizol 试剂 (美国 Invitrogen 公司); 胎牛血清 (FBS)、青链霉素混合液 (均为 100 U/mL) (杭州四季青生物公司); PCR 试剂盒 (上海康为世纪); PCR 引物 (上海生工); Opti-MEM 培养基 (美国 Invitrogen 公司); 靶向沉默 BI-1 的小干扰 RNA (si-BI-1) 及其阴性对照序列 (si-negative control, si-NC) (上海吉玛生物); JC-1 线粒体膜电位检测盒、Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒 (江苏碧云天); 兔抗 Bcl-2、Bax、Cleaved-caspase-3、GAPDH 单克隆抗体 (美国 Abcam 公司); 大鼠抗 BI-1 单克隆抗体 (美国 Santa Cruz 公司); 大鼠抗 Cyt-C (美国 Affinity 公司); 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的山羊抗兔、抗大鼠 IgG (广州晶彩生物公司); 其他试剂均为国产分析纯。

1.3 方法

1.3.1 原代子宫肌瘤细胞的分离、培养及鉴定 取收集的肌瘤组织,胶原酶溶解法加差异贴壁法进行原代细胞的分离。使用含 10% FBS, 1% 双抗的 DMEM/F12 培养液中进行培养分离所得的肌瘤细胞,并置于 37°C 、5% CO_2 恒温培养箱进行培养,待细胞生长融合至 80% ~ 90% 以上时可使用胰酶进行消化传代。选取传代至第 3 代以后且生长状态良好的子宫肌瘤细胞,应用 α -Actin 进行免疫细胞染色进行纯度鉴定。

1.3.2 细胞转染及分组 转染前 24 h,取处于对数生长期的子宫肌瘤细胞进行常规消化后,细胞计数,按 1×10^6 个/mL 接种于 6 孔板中,待细胞生长融合至 80%

时,根据 Lipofectamine™ 3000 说明书方法将 si-BI-1、si-NC 转染入细胞中。将转染后的细胞置于培养箱中培养 8 h 后即可进行检测转染效率及后续相关实验。按细胞转染情况的不同将其分为 3 组:Control 组,即正常培养未转染的肌瘤细胞;si-BI-1 组,即转染 BI-1 的肌瘤细胞;si-NC 组,即转染 si-NC 组。上述各组细胞均使用 10% FBS,1% 双抗的 DMEM/F12 培养液中,并置于 37℃、5% CO₂ 恒温培养箱进行培养。

1.3.3 CCK-8 检测细胞增殖能力 收集生长状态良好的各组肌瘤细胞,进行常规消化后,接种至 96 孔板中,调整细胞密度至 1×10^3 个/孔,并向每孔加入 200 μ L 含 10% FBS 的 DMEM/F12 培养液,置于培养箱中进行培养,待细胞生长融合至 70%~80% 时,弃除原培养液,更换为用不含血清的 DMEM/F12 继续培养细胞。分别于培养 0 h、12 h、24 h、36 h、48 h 时向每孔加入 10 μ L 的 CCK-8 试剂,于培养箱中继续培养 2 h 后,用酶标仪于 490 nm 波长处检测每孔吸光度值(OD₄₉₀),每个时间点每组设置 5 个复孔,绘制细胞的生长曲线。

1.3.4 Annexin V-FITC 流式细胞术检测细胞凋亡

取生长状态良好的各组子宫肌瘤细胞,130 g 离心 5 min,弃上清,收集细胞沉淀,用 195 μ L Annexin V-FITC 结合液重悬细胞,并调整细胞至 7×10^5 个/mL,依次加入 5 μ L Annexin V-FITC 及 10 μ L 的碘化丙啶(PI)染色液,轻轻摇晃离心管以充分混匀后,室温下避光孵育半小时。300 目滤膜过滤细胞团块后,进行流式细胞仪检测。实验单独重复 3 次。

1.3.5 JC-1 法检测细胞线粒体膜电位水平 取生长状态良好的各组子宫肌瘤细胞进行常规消化后,PBS 重悬细胞后并将细胞调整至 5×10^5 个/mL,取 1 mL 的细胞悬液于 EP 管中并加入 0.5 mL 的 JC-1 染色工作液,于 37℃ 孵育 20 min,4℃ 下 800 g 离心 5 min,收集细胞沉淀,重悬于 1 mL 的 JC-1 染色缓冲液中后,进行流式细胞仪检测。实验单独重复 3 次。

1.3.6 细胞内钙离子浓度测量 取生长状态良好的各组子宫肌瘤细胞进行常规消化后,调整至 1×10^5 个/mL,取 100 μ L 的细胞悬液接种至 6 孔板中,待细胞生长融合至 70%~80% 时,在无血清培养基中孵育 24 h,胰酶消化贴壁的细胞后,130 g 离心 5 min,收集细胞沉淀。对于细胞内 Ca²⁺ 的测量,在上述细胞沉淀中加入 3 μ M Fluo-4 AM,并于培养箱中孵育 20 min;对于线粒体中的 Ca²⁺ 测量,在收集的细胞沉淀中加入 3 μ M Rhod-2 AM,并于 4℃ 中进行孵育 30 min。上述孵育后的细胞使用 Hank's 平衡液洗涤后,300 目滤膜过滤细胞团块后,进行流式细胞仪检测。实验单独重复 3 次。

1.3.7 实时荧光定量 PCR(RT-PCR) 采用 Trizol 法提取待测组织或细胞中总 RNA,分光光度计检测浓度与纯度后,根据逆转录试剂说明书逆转录为 cDNA。再按照 RT-PCR 试剂说明书及预实验确定的反应时间与温度

进行实时定量,RT-PCR 反应条件为:95℃ (30s) 预变性后,变性 95℃ (7 s)→退火 60℃ (30 s)→72℃ (15 s),40 个循环周期。RT-PCR 引物为:BI-1 上游引物为 5'-CCTCTTCTGCTGGATGC-3',下游引物为 5'-GCCTCGCTCTGTTGATGTGA-3; GAPDH 上游为 5'-AGAAGCTGGGGCTCATTG-3',下游为 5'-AGGGGCCATCCACAGTCTTC-3'。以 GAPDH 为内参,采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 方法分析 BI-1 mRNA 的表达量。上述实验单独重复 3 次。

1.3.8 Western blot 实验 将子宫肌瘤组织及瘤旁组织在液氮中进行研磨,采用 RIPA 裂解液及蛋白酶抑制剂于冰上进行组织或细胞中总蛋白的提取。BCA 法进行蛋白定量,按照 1:4 向上清液中加入 5 \times 上样缓冲液,并于沸水中加热变性 10 min。取 35 μ g 的蛋白进行聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳进行蛋白分离,采用湿转法将分离的蛋白转至 PVDF 膜上,5% 的脱脂牛奶于室温下封闭 2 h 后,分别加入 BI-1(1:300)、Bcl-2(1:800)、Bax(1:1 000)、Cleaved caspase-3(1:1 000)、GAPDH(1:2 000)一抗,4℃ 摇床孵育过夜。TBST 溶液清洗 3 次,5 min/次,以 HRP 标记的二抗(1:5 000)室温孵育 1 h,以 TBST 溶液清洗 3 次,5 min/次,最后在载有蛋白条带的 PVDF 膜上均匀滴加 ECL 发光液后于凝胶成像仪进行曝光拍照。Image J 软件测定条带灰度值,以目标蛋白与内参 GAPDH 的比值作为其相对含量。以上实验单独重复 3 次。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 19.0 和 GraphPad Prism 5.0 进行统计分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)的 Dunnett's 或 Bonferroni's 多重比较进行分析;显著性检验水准 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BI-1 在子宫肌瘤及瘤旁组织中的表达

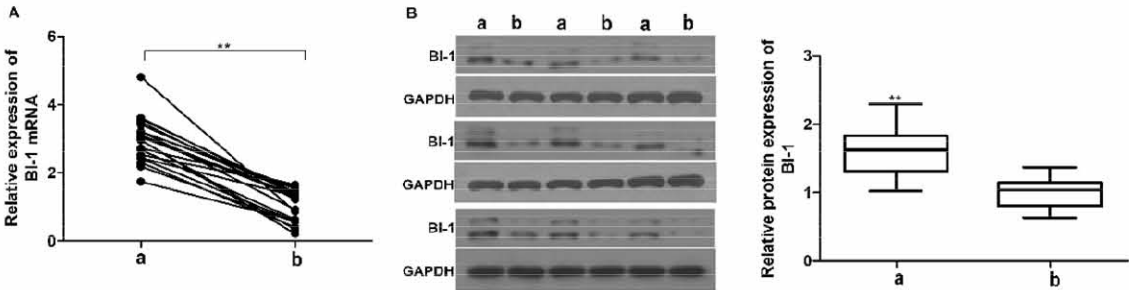
RT-PCR 及 Western blot 实验检测 20 对组织样本显示,BI-1 在子宫肌瘤中的 mRNA 及蛋白表达较瘤旁组织均显著增加($P < 0.05$)。见下页图 1A、B。

2.2 分离培养子宫肌瘤细胞的鉴定

体外分离培养的原代子宫肌瘤细胞经 α -Actin 免疫染色后,结果显示超过 90% 的细胞胞质内可见棕黄色阳性染色,提示分离培养的原代子宫肌瘤细胞纯度较高,可满足后续实验研究。见下页图 2。

2.3 转染 si-BI-1 后子宫肌瘤细胞中 BI-1 mRNA 与蛋白表达

RT-PCR 及 Western blot 实验检测转染后子宫肌瘤细胞中 BI-1 mRNA 的表达,结果显示与正常培养的 Control 组子宫肌瘤细胞相比,si-BI-1 组细胞中 BI-1 mRNA 的表达显著降低($P < 0.01$),而 si-NC 组细胞中 BI-1 mRNA 的表达无明显变化($P > 0.05$)。见下页图 3。

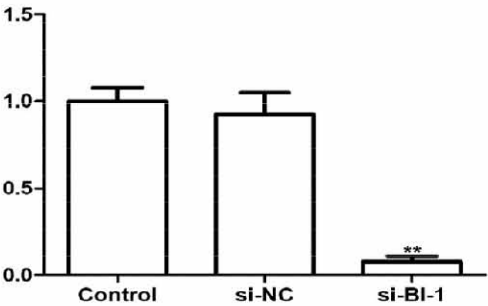


注:A 图为 RT-PCR 实验检测 BI-1 mRNA 在子宫肌瘤及瘤旁组织中的表达;B 为 Western blot 实验检测 BI-1 蛋白在子宫肌瘤及瘤旁组织中的表达;a 为肌瘤组织,b 为瘤旁组织;与肌瘤组织相比, ** $P < 0.01$ 。

图 1 BI-1 在子宫肌瘤及瘤旁正常组织中的表达



图 2 免疫组织化学鉴定分离培养的原代子宫肌瘤细胞($\times 40$)



注:与 Control 组细胞相比, ** $P < 0.01$ 。

图 3 转染 si-BI-1 后子宫肌瘤细胞中 BI-1 mRNA 表达显著降低

2.4 沉默 BI-1 对子宫肌瘤细胞增殖的影响

CCK-8 检测沉默 BI-1 基因对子宫肌瘤细胞增殖的影响,结果显示随培养时间的延长,3 组子宫肌瘤细胞的增殖能力无明显变化($P > 0.05$)。见图 4。

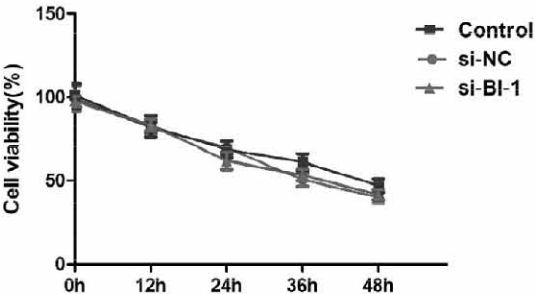


图 4 3 组子宫肌瘤细胞增殖能力变化图

2.5 沉默 BI-1 对子宫肌瘤细胞凋亡的影响

Annexin V-FITC 细胞流式检测沉默 BI-1 基因对子宫肌瘤细胞凋亡的影响,结果显示与 Control 组子宫肌瘤细胞相比,si-BI-1 组细胞的凋亡率明显增加($P < 0.01$),而 si-NC 组细胞凋亡率无明显变化($P > 0.05$)。见下页图 5。

2.6 沉默 BI-1 对子宫肌瘤细胞线粒体膜电位的影响

JC-1 流式检测沉默 BI-1 对子宫肌瘤细胞中线粒体膜电位的影响,结果显示与 Control 组相比,si-BI-1 组中细胞的线粒体膜电位显著降低($P < 0.05$),而 si-NC 组细胞凋亡率无明显变化($P > 0.05$),见下页图 6。

2.7 沉默 BI-1 对子宫肌瘤细胞线粒体钙离子浓度的影响

流式细胞术检测沉默 BI-1 对子宫肌瘤细胞线粒体 Ca^{2+} 浓度的影响,结果显示与 Control 组细胞相比,si-BI-1 组细胞的胞质及线粒体中的 Ca^{2+} 浓度均显著增加($P < 0.05$),其中以线粒体中的 Ca^{2+} 浓度升高更为显著;而 si-NC 组细胞的 Ca^{2+} 浓度无明显变化($P > 0.05$),见下页图 7A,B。

2.8 沉默 BI-1 对子宫肌瘤细胞中 Cyt-C 及凋亡相关蛋白表达的影响

Western blot 检测沉默 BI-1 对子宫肌瘤细胞中 Cyt-C 及凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 及 Cleaved caspase-3 表达的影响,结果显示与 Control 组相比,si-BI-1 组中细胞的 Bcl-2 蛋白表达显著降低($P < 0.05$),Bax、Cleaved caspase-3 及 Cyt-C 蛋白表达明显增加($P < 0.05$),Bcl-2/Bax 比值明显降低($P < 0.05$),si-NC 组细胞的上述蛋白均无明显变化($P > 0.05$)。见下页图 8。

3 讨论

尽管子宫肌瘤不是女性生殖系统的恶性肿瘤,但其能引起多种与妇科及生殖相关的棘手问题,如异常子宫出血、慢性盆腔疼痛、复发性流产,甚至不孕等^[2,4]。长期以来,临床上对子宫肌瘤的治疗方法多为子宫切除术或肌瘤切除/剔除术,但手术治疗不仅严重影响患者的生活质量,且肌瘤切术/剔除术后仍有不少患者会出现肌瘤的复发^[5],因此积极探究子宫肌瘤的分子机制有望从源头上阻遏疾病的发生及进展。

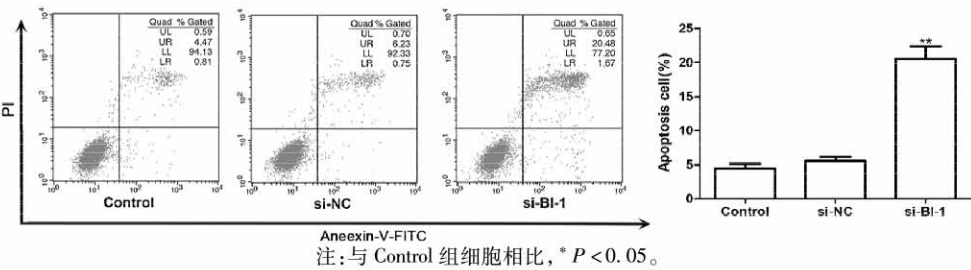


图 5 沉默 BI-1 促进子宫肌瘤细胞发生凋亡

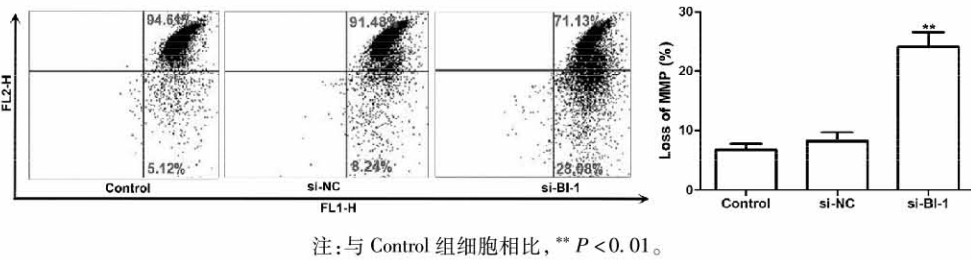


图 6 沉默 BI-1 诱导子宫肌瘤细胞线粒体膜电位下降

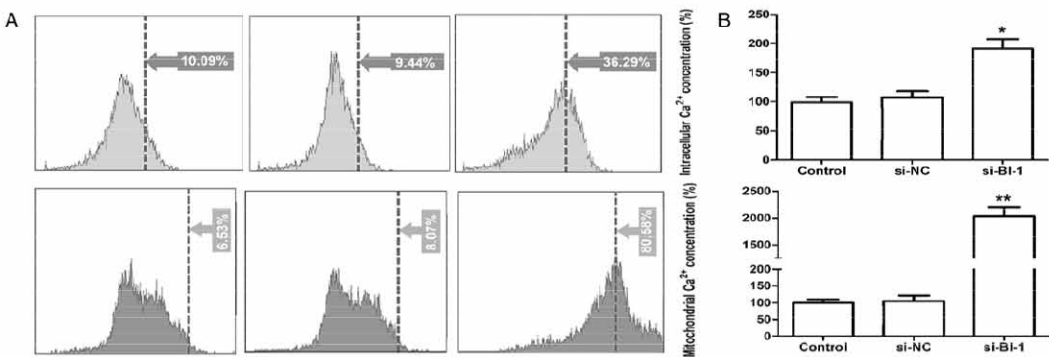


图 7 沉默 BI-1 促进子宫肌瘤细胞中钙离子超载

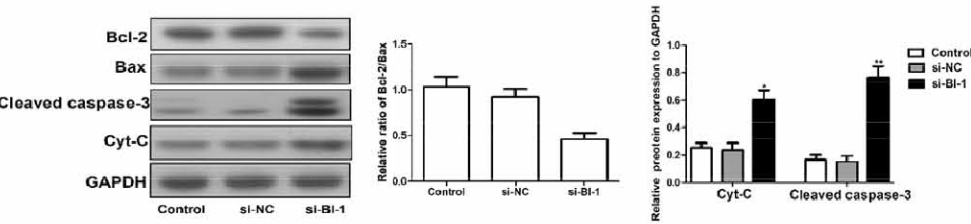


图 8 沉默 BI-1 表达对子宫肌瘤细胞中 Cyt-C 及凋亡相关蛋白表达的影响

既往大量数据证实,控制细胞凋亡基因的异常表达在子宫肌瘤的发生发展中起着重要的作用,其中最为重要的是 Bcl-2 基因家族。Bcl-2 家族主要分为两类,一类是以 Bcl-2 为代表的抗凋亡基因与一类以 Bax 为代表的促凋亡基因^[6-8]。在正常生理状态下, Bcl-2 家族基因根据不同上游信号传导的信息激活特定的下游基因,并诱导相应基因的表达与转录,从而调控细胞的凋亡与存活,从而维持细胞代谢的稳定^[14]。Bcl-2 基因广泛表达于多种细胞的线粒体、内质网以及细胞核膜等细胞器表面,通过调控细胞周期进展,并影响 Ca^{2+} 内流等多种机

制抑制细胞发生凋亡^[15]。而促凋亡基因 Bax 能够拮抗 Bcl-2 的抗凋亡作用,其主要通过结合线粒体膜上的糖蛋白,以形成 Bax/Bax 同源二聚体结构,进而导致线粒体膜损伤及膜电位的下降,最终导致细胞的凋亡^[16]。BI-1 是一种新发现的凋亡抑制基因,其蛋白产物能够抑制由 Bax、星形细胞素等引起的细胞凋亡^[9]。既往对其的研究发现, BI-1 并非与 Bax 直接作用,而是与抗凋亡蛋白 Bcl-2 和 Bcl-XL 相互结合,通过改变其自身的表达,以调节 BI-1/Bcl-XL/Bcl-2 和 Bax 比值,调控细胞的凋亡^[10]。同时 BI-1 还能有效抑制 Bax/Bax 同源二聚体的形成,从而

阻止其诱导的线粒体对 Cyt-C 的释放,抑制该途径引起细胞凋亡的发生^[17-18]。此外,有研究报道,BI-1/Bcl-2 二聚体能够与线粒体通透性转换孔(MPTP)的主要组成成分进行结合,从而通过维持线粒体膜电位的稳定,以保护线粒体结构及功能的完整,进而发挥抗凋亡作用^[19]。基于 BI-1 的上述抗凋亡作用机制,既往大量研究证实多种肿瘤组织中异常增加的 BI-1 能够通过上述机制促进肿瘤细胞的增殖并抑制其发生凋亡^[12-13]。

本研究首先通过检测子宫肌瘤组织与瘤旁组织中 BI-1 的表达,证实 BI-1 在子宫肌瘤组织中同样表现为异常高表达。利用 siRNA 干扰技术,沉默原代分离培养的子宫肌瘤细胞中 BI-1 基因,采用相关实验检测发现沉默肌瘤细胞中 BI-1 基因表达不影响细胞的增殖能力,但能够促进细胞发生凋亡。鉴于 Bcl-2、Bax 及 BI-1 均能影响线粒体功能且主要通过线粒体途径影响细胞凋亡,我们进一步通过实验检测沉默 BI-1 基因对子宫肌瘤细胞线粒体膜电位及细胞中 Ca^{2+} 浓度的影响,结果显示沉默 BI-1 基因能够通过促进线粒体及胞质中的 Ca^{2+} 浓度的增加,以诱导子宫肌瘤细胞线粒体膜电位的下降。而线粒体膜电位是离子在跨膜转运时所产生的膜外正电位,而线粒体基质能够产生大量负电荷,这导致线粒体内外膜两侧形成电位差。在细胞受到持续性有害刺激时,线粒体通透性增加,膜电位下降从而启动线粒体途径的细胞凋亡事件^[17]。这与 Lee 等^[20]研究发现的 BI-1 能够通过影响 Ca^{2+} 浓度,以调控线粒体功能的结果相似。最后我们通过 Western blot 实验证实沉默 BI-1 基因能够通过促进细胞中 Cyt-C、Bax 及 Cleaved caspase-3 蛋白表达的增加,而降低 Bcl-2 蛋白水平。Cyt-C 一般存在于线粒体的内外膜间隙之间,生理条件下其不能穿过线粒体外膜到达胞质,而线粒体膜电位的变化及结构损伤时,Cyt-C 从线粒体内释放到胞浆中,并作为重要的促凋亡因子,在三磷酸脱氧腺苷的协同作用下与凋亡蛋白酶活化因子-1 相互结合,激活 Caspase-3,启动 Caspases 的级联反应,最终导致细胞凋亡的发生。其中 Caspases 的活化是凋亡的中心环节,而 Caspase-3 是细胞凋亡过程中的关键执行者,它的活化是凋亡进入不可逆阶段的标志^[21]。

综上,本研究发现 BI-1 在子宫肌瘤组织中的表达显著增加,沉默子宫肌瘤细胞中 BI-1 基因可能通过改变 Bcl-2/Bax 比值,促进胞质及线粒体中 Ca^{2+} 浓度的增加,进而引起线粒体膜电位的下降,最终诱导细胞发生凋亡。本研究首次探究并报道了 BI-1 在子宫肌瘤中的表达及相关作用,为进一步阐明子宫肌瘤发生发展的分子机制提供了一定的理论基础及实验室依据。

【参考文献】

- [1] De La Cruz MS, Buchanan EM. Uterine fibroids: diagnosis and treatment [J]. Am Fam Physician, 2017, 95(2):100-107.
- [2] Vilos GA, Allaire C, Laberge PY, et al. The management of uterine leiomyomas [J]. J Obstet Gynaecol Can, 2015, 37(2):157-178.
- [3] 李佳. 3939 例子宫肌瘤患者的临床病例分析 [D]. 长春: 吉林大学, 2015.
- [4] Milazzo GN, Catalano A, Badia V, et al. Myoma and myomectomy: Poor evidence concern in pregnancy [J]. J Obstet Gynaecol Res, 2017, 43(12):1789-1804.
- [5] Kotani Y, Tobiume T, Fujishima R, et al. Recurrence of uterine myoma after myomectomy: Open myomectomy versus laparoscopic myomectomy [J]. J Obstet Gynaecol Res, 2018, 44(2):298-302.
- [6] Csatlós É, Máté S, Laky M, et al. Role of apoptosis in the development of uterine leiomyoma; analysis of expression patterns of Bcl-2 and Bax in human leiomyoma tissue with clinical correlations [J]. Int J Gynecol Pathol, 2015, 34(4):334-339.
- [7] Kovács P, Joó JG, Tamás V, et al. The role of apoptosis in the complex pathogenesis of the most common obstetrics and gynaecology diseases [J]. Physiol Int, 2020, 107(1):106-119.
- [8] 李卫平, 严隽鸿, 林其德, 等. 凋亡调控基因 Bcl2/Bax mRNA 在子宫平滑肌瘤中的表达 [J]. 上海第二医科大学学报, 2004, 20(6):514-517.
- [9] Xu Q, Reed J C. Bax inhibitor-1, a mammalian apoptosis suppressor identified by functional screening in yeast [J]. Mol Cell, 1998, 1(3):337-346.
- [10] Lebeaupin C, Blanc M, Vallee D, et al. BAX inhibitor-1: between stress and survival [J]. FEBS J, 2020, 287(9):1722-1736.
- [11] Henke N, Lisak DA, Schneider L, et al. The ancient cell death suppressor BAX inhibitor-1 [J]. Cell Calcium, 2011, 50(3):251-260.
- [12] Lu B, Li Y, Li H, et al. Bax inhibitor-1 is overexpressed in non-small cell lung cancer and promotes its progression and metastasis [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(2):1411-1418.
- [13] Tsai CH, Shen YC, Chen HW, et al. Docosahexaenoic acid increases the expression of oxidative stress-induced growth inhibitor 1 through the PI3K/Akt/Nrf2 signaling pathway in breast cancer cells [J]. Food Chem Toxicol, 2017, 108(Pt A):276-288.
- [14] Schenk RL, Strasser A, Dewson G. BCL-2: Long and winding path from discovery to therapeutic target [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 482(3):459-469.
- [15] O'Neill KL, Huang K, Zhang J, et al. Inactivation of prosurvival Bcl-2 proteins activates Bax/Bak through the outer mitochondrial membrane [J]. Genes Dev, 2016, 30(8):973-988.
- [16] Peña-Blanco A, García-Sáez AJ. Bax, Bak and beyond-mitochondrial performance in apoptosis [J]. FEBS J, 2018, 285(3):416-431.
- [17] Zhou H, Toan S, Zhu P, et al. DNA-PKcs promotes cardiac ischemia reperfusion injury through mitigating BI-1-governed mitochondrial homeostasis [J]. Basic Res Cardiol, 2020, 115(2):11.
- [18] Pihón P, Carreras-Sureda A, Hetz C. BCL-2 family: integrating stress responses at the ER to control cell demise [J]. Cell Death Differ, 2017, 24(9):1478-1487.
- [19] Lindsay J, Esposti M D, Gilmore A P. Bcl-2 proteins and mitochondria—specificity in membrane targeting for death [J]. Biochim Biophys Acta, 2011, 1813(4):532-539.
- [20] Lee GH, Lee HY, Li B, et al. Bax inhibitor-1-mediated inhibition of mitochondrial Ca^{2+} intake regulates mitochondrial permeability transition pore opening and cell death [J]. Sci Rep, 2014, 4:5194.
- [21] Kalpage HA, Bazylianska V, Recanatani MA, et al. Tissue-specific regulation of cytochrome c by post-translational modifications: respiration, the mitochondrial membrane potential, ROS, and apoptosis [J]. FASEB J, 2019, 33(2):1540-1553.

(收稿日期:2020-07-29 编辑:杨叶)