

孕期地塞米松暴露可导致胎盘线粒体稳态失衡及发育障碍



冯 慧^{1, 2, 3}, 钟 雯^{1, 2, 3}, 汪 晖^{4, 5}, 张 铭^{1, 2, 3}

1. 武汉大学中南医院生殖医学中心 (武汉 430071)
2. 湖北省产前诊断与优生临床医学研究中心 (武汉 430071)
3. 武汉市生殖健康与优生临床医学研究中心 (武汉 430071)
4. 武汉大学基础医学院药理学系 (武汉430060)
5. 发育源性疾病湖北省重点实验室 (武汉 430060)

【摘要】目的 探讨孕期地塞米松暴露 (PDE) 对胎盘细胞线粒体功能稳态及胎盘发育的影响。**方法** 建立 PDE 大鼠模型, 干预组分别于孕 9~21 d 皮下注射 0.2、0.4、0.8 mg/kg/d 地塞米松, 对照组注射生理盐水。孕 22 d 处死孕鼠并收集胎盘组织。采用 qRT-PCR 检测胎盘细胞增殖和凋亡指标、线粒体动力学指标 mRNA 的表达。透射电镜观察胎盘组织细胞的超微结构变化。相关试剂盒检测 ATP 含量和活性氧 (ROS) 含量。qRT-PCR 及 Western blotting 法检测自噬相关基因 mRNA 及蛋白表达。**结果** 与对照组相比, 高剂量组仔鼠胎盘中增殖基因 *Ki67* 的 mRNA 表达减少, 凋亡基因 B 淋巴细胞瘤-2 基因相关 X 蛋白 (*Bax*) 的 mRNA 表达增加; 组织细胞线粒体形态异常伴结构破坏, 自噬小体增多; ROS 荧光染色强度增加。较雌性仔鼠, 雄性仔鼠胎盘组织存在更为明显的 ATP 含量降低, 自噬相关基因微管相关蛋白 1 轻链 3 (*LC3*) II/*LC3*I 和 苜蓿素 1 (*Beclin 1*) 表达在 mRNA 和蛋白水平均显著升高, 而 *P62* mRNA 和蛋白表达降低。**结论** PDE 可导致胎盘线粒体分裂增加, 线粒体稳态失衡 (ATP 含量减少、ROS 积累、结构破坏、自噬发生), 尤其在雄性改变更为显著, 可能是胎盘细胞增殖减少、凋亡增加的机制。

【关键词】 孕期地塞米松暴露; 线粒体; 自噬; 活性氧; 胎盘发育

【中图分类号】 Q344⁺.5

【文献标识码】 A

Prenatal dexamethasone exposure leads to mitochondrial homeostasis imbalance and developmental disorders in the placenta

FENG Hui^{1,2,3}, ZHONG Wen^{1,2,3}, WANG Hui^{4,5}, ZHANG Ming^{1,2,3}

1. Reproductive Medicine Center, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, China
 2. Hubei Clinical Medical Research Center for Prenatal Diagnosis and Eugenics, Wuhan 430071, China
 3. Wuhan Clinical Medical Research Center for Reproductive Health and Eugenics, Wuhan 430071, China
 4. Department of Pharmacology, Basic Medical School of Wuhan University, Wuhan 430060, China
 5. Hubei Provincial Key Laboratory of Developmentally Originated Diseases, Wuhan 430060, China
- Corresponding author: ZHANG Ming, Email: whu_mz@163.com

【Abstract】Objective To investigate the effects of prenatal dexamethasone exposure (PDE) on mitochondrial functional homeostasis of placental cells and placental development. **Methods**

DOI: 10.12173/j.issn.2097-4922.202502062

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (82071659); 国家科技部重点专项 (2020YFA0803900)

通信作者: 张铭, 博士, 主任医师, 硕士研究生导师, Email: whu_mz@163.com

The PDE rat model was established. The different dose intervention groups were given subcutaneous injections of dexamethasone at 0.2, 0.4 and 0.8 mg/kg/d on days 9~21 of pregnancy, while a control group was established with saline injection. Pregnant rats were executed on the 22nd day of gestation and placental tissues were collected. The mRNA expression of placental cell proliferation and apoptosis indexes and mitochondrial dynamics indexes were detected by qRT-PCR. Transmission electron microscopy was used to observe the ultrastructural changes of placental tissue cells. Relevant kits were used to detect ATP content and reactive oxygen species (ROS) content. qRT-PCR and Western blotting were used to detect autophagy-related gene mRNA and protein expression. **Results** Compared with the control group, the mRNA expression of proliferation gene *Ki67* was decreased and the mRNA expression of apoptosis gene *Bax* was increased in the placenta of rat in the high-dose group. The morphology of mitochondria was abnormal with structure destruction and autophagosome increased. The fluorescence staining intensity of ROS increased. Compared with female offspring, ATP content decreased more significantly in the placenta tissue of male offspring, and the mRNA and protein levels of autophagy related genes *LC3III/LC3I* and *Beclin 1* were significantly increased, while the mRNA and protein expressions of *P62* were decreased. **Conclusion** PDE can lead to increased placental mitochondrial division and imbalance of mitochondrial homeostasis (reduction of ATP content, accumulation of ROS, structural disruption, and occurrence of autophagy), which is more pronounced especially in males, and may be the mechanisms of reduced placental cell proliferation and increased apoptosis.

【Keywords】 Prenatal dexamethasone exposure; Mitochondria; Autophagy; Reactive oxygen species; Placental development

地塞米松作为一种合成糖皮质激素,可促进胎儿肺成熟,临床上广泛用于先兆早产等妊娠相关疾病的治疗,以降低早产儿死亡率^[1]。然而,越来越多的研究证实地塞米松具有“双刃剑”效应。胎儿过度暴露于母体高水平糖皮质激素时可能会影响各脏器发育,降低胎儿出生体重^[2],并诱发成年后代各器官的发育毒性和多疾病易感^[3-4]。胎盘作为连接母体和胎儿的纽带,具有屏障、内分泌、营养转运和免疫等多种功能^[5],是妊娠得以建立和维持的重要器官。前期研究表明孕期地塞米松暴露 (prenatal dexamethasone exposure, PDE) 会导致胎盘重量和体积减少,胎盘迷路区增厚,进而影响氧扩散能力及营养物质转运面积^[6]。针对 PDE 时胎盘损伤机制的研究,对于深入解析地塞米松对胎儿发育过程的影响,以及发掘潜在的干预措施具有重要意义。滋养细胞作为胎盘的主要细胞成分,其增殖、凋亡及分化等生物学过程,是构建胎盘正常结构和功能的基础。当各种内外环境因素干扰了这些生物学过程的稳态调节时,即会引发胎盘功能的紊乱,甚至影响发育中的胎儿。如局部组织的缺氧和氧化应激损伤不但会影响滋养细胞的增殖、促进其凋亡,而且会抑制滋养细胞合体分化,干扰母胎间营养物转运和生物大分子合成,引发胎盘结构发育不良和功能障碍,甚至导致宫内生长受限 (intrauterine

growth retardation, IUGR) 和先兆子痫等妊娠期并发症的发生^[7-8]。线粒体作为细胞内的一种重要的细胞器,具有 ATP 合成、钙信号传导和类固醇生物发生等多种生物学功能,不仅是细胞物质能量代谢的中心,也是细胞内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的主要来源。低浓度 ROS 可激活胞浆内第二信使,参与细胞信号转导调控,保持机体氧化与抗氧化平衡^[9]。但 ROS 过度产生时可触发细胞内氧化应激,造成线粒体膜通透性改变,引发细胞凋亡^[10-11]。此外,线粒体呼吸链损伤会导致小鼠胎盘迷路层分化障碍,后者会影响母胎间的物质转运^[12-13]。但 PDE 对滋养细胞线粒体稳态的影响目前尚不明确。因此,本研究旨在基于大鼠模型评估 PDE 时胎盘线粒体结构及功能的改变,并探索其可能的效应机制。

1 材料与方法

1.1 主要仪器

JEM-F200 透射电镜 (日本电子); ABI Step One qRT-PCR 热循环仪、Nanodrop 3000C 紫外分光光度计、Multiskan™ FC 酶标仪和 Sorvall™ Legend™ Micro 17 微量离心机均购自美国 Thermo Fisher; Tanon 5200 Multi 全自动化学发光/荧光图像分析系统 (天能科技)。

1.2 主要药品与试剂

地塞米松磷酸化注射液（华中药业股份有限公司，批号：C0750）；异氟烷（深圳市瑞沃德生命科技股份有限公司，批号：R510-22）；TRIzol™试剂（美国 Thermo Fisher，批号：AM9738）；实时定量聚合酶链反应（qRT-PCR）引物（武汉天一）；HiScript III RT SuperMix for qPCR（批号：R323-01）和 Cham Q™ Universal SYBR® qPCR（批号：Q712-02）购自南京诺维赞；冰冻切片 ROS 检测试剂盒（贝博生物，批号：BB-470538）；ATP 检测试剂盒（南京建成，批号：A095-1-1）；BCA 蛋白检测试剂盒（上海碧云天生物技术股份有限公司，批号：P0009）；自噬相关蛋白 LC3II/LC3I（批号：A19665）、Beclin 1（批号：A21695）、P62 抗体（批号：A19700）及二抗 HRP goat anti-rabbit IgG（批号：AS014）、HRP goat anti-mouse IgG（批号：AS003）均购自爱博泰克。

1.3 动物

SPF 级 Wistar 大鼠购自斯贝福（北京）生物技术有限公司，生产许可证号：SCXK（京）2019-0010，雌性大鼠体重（ 200 ± 20 ）g，雄性大鼠体重（ 260 ± 20 ）g。动物饲养及造模在武汉大学动物实验中心进行，相关实验方案通过武汉大学动物实验中心动物护理和使用机构委员会（IACUC）的审查和许可（许可证编号：ZN2023139）。

1.4 模型构建

Wistar 大鼠适应性喂养 1 周后于每晚 7 点按照雌雄比例 2 : 1 进行合笼，次日清晨阴道涂片显微镜下镜检。若观察到大量精子，则确认动物已受孕，将当天标记为孕 0 天（gestational day 0, GDO）。孕鼠随机分为对照组、低剂量地塞米松

组（PDE at low dose, PDL）、中剂量地塞米松组（PDE at medium dose, PDM）和高剂量地塞米松组（PDE at high dose, PDH），每组 12 只。PDL 组、PDM 组和 PDH 组分别于 GD9~21 上午 9 点皮下注射给予 0.2、0.4、0.8 mg/kg/d 药物，对照组孕鼠则给予等体积生理盐水处理。孕鼠于 GD21 麻醉处死，剖腹取出胎鼠并收集胎盘组织，通过观察胎鼠外生殖器形态以判断性别。判断依据主要包括：①肛门与生殖器之间的距离，雄性胎鼠该距离显著大于雌性；②雄性胎鼠的生殖结节呈明显凸起状，而雌性胎鼠相对平坦。一部分胎盘浸没于电镜固定液或 OCT 包埋液，分别用于透射电镜检测和荧光显微镜下 ROS 染色观察；其他胎盘组织冻存于 -80°C ，用于后续核酸或蛋白分析等。

1.5 RNA提取及qRT-PCR检测

在每个胎盘的相同位置剪取 50 mg 组织，加入 Trizol 试剂并以组织匀浆机高速研磨，其后向匀浆液中加入 200 μL 氯仿，颠倒混匀 30 s 后静置 15 min， $1340 \times g$ 离心 15 min；离心后吸取上层无色液体（400 μL ）至新的 EP 管，加入等体积异丙醇并充分颠倒混匀，静置 10 min 后 $1340 \times g$ 离心 10 min；弃上清，沉淀物加入 75% 乙醇 1 mL 清洗， $870 \times g$ 离心 5 min；重复 2 次后晾干，用无酶水溶解；采用 qRT-PCR 热循环仪，反应体积为 10 μL ，具体反应条件为： 95°C 预变性 2 min， 95°C 变性 15 s， 60°C 退火 30 s，共进行 40 个循环；应用 PrimerQuest™ Tool 设计引物，引物序列如表 1 所示；采用 SYBR Green 试剂盒进行 qRT-PCR 检测；以 GAPDH 作为管家基因对目标基因表达量进行归一化，采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算相对扩增表达量。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列

Table 1. PCR primer sequence

基因	正向引物	反向引物
<i>GAPDH</i>	GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG	ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA
<i>Ki67</i>	TCGAGGGGCCAAGAAAGATG	GTTACCTTCACACTGGAGA
<i>Bax</i>	AGGGGCCTTTTTGCTACAGG	ACTGGTAAGCCTCTTGAGACC
<i>Mfn1</i>	ACGCTGATGAACACGGAGAA	AAGCAGAAGCATCCCAACGA
<i>Mfn2</i>	AGAGGCGATTTGAGGACTGC	CGCTCTTCCCGCATTTCAAG
<i>Drp1</i>	GAAGTGGTGCAGTGAAATGAC	GTTTCTATTGGGAACCAGTCC
<i>LC3</i>	AAGAGTGGAAGATGTCCGGC	CATGTATGTAACAGCCAGTGTCT
<i>P62</i>	CACTACCGCATGAGGATGG	CCTAAAGCCAGTGCAAAACACC
<i>Beclin 1</i>	GTGGTGGCAGAAAACCTGGAGA	CTGCTACTCACTGAGCTTCTCTC

注：*GAPDH*：甘油醛-3-磷酸脱氢酶（glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase）；*Ki67*：增殖标志物 *Ki67*（marker of proliferation *Ki67*）；*Bax*：B 淋巴细胞瘤-2 基因相关蛋白（B-cell lymphoma-2 associated X protein）；*Mfn1*：线粒体融合蛋白（mitofusin）；*Drp1*：动力蛋白相关蛋白 1（dynamitin-related protein 1）；*LC3*：微管相关蛋白 1 轻链 3（microtubule-associated protein 1 light chain 3）；*P62*：整合体 1（sequestosome 1）；*Beclin 1*：苜蓿素 1。

1.6 Western blotting检测

匀浆后的胎盘组织在含有磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解缓冲液中 4℃裂解 30 min, 然后 4℃、1 340 × g 离心 10 min, 吸取上清至新的 1.5 mL 离心管中, 使用 BCA 测定试剂盒进行蛋白定量; 将蛋白样品按比例与 5 × 上样缓冲液混合, 置于金属浴器中加热至 100℃, 持续 10 min; 根据目的蛋白分子量选择相应的分离胶浓度, 配制分离胶和浓缩胶, 使用电泳缓冲液在恒压条件下进行电泳, 60 V 跑完浓缩胶后改为 120 V 跑至凝胶底部; 将胶和 PVDF 膜叠成“三明治”装至夹板中, 恒温恒流 300 mA 电转数分钟(根据目的蛋白分子量调整); 转完的 PVDF 膜在 5% 脱脂牛奶中封闭 1 h, 在 4℃下置于 LC3II/LCI (稀释比例为 1 : 1 000)、Beclin1 (稀释比例为 1 : 1 000)、P62 (稀释比例为 1 : 1 000) 和 GAPDH (稀释比例为 1 : 10 000) 的一抗稀释液中孵育过夜。第 2 天用相应的二抗稀释液 (HRP-Mouse, 稀释比例为 1 : 10 000; HRP-Rabbit, 稀释比例为 1 : 10 000) 室温孵育 60 min, ECL 化学发光试剂盒处理后利用化学发光成像系统显像, 运用 Image J 软件对蛋白条带进行灰度分析。

1.7 ROS染色

按照试剂盒说明书, 用纯水将 ROS 荧光探针稀释后配成染色探针工作液, 同时配制 1 × 清洗液工作液; 将 OCT 包埋组织切成厚为 10~20 μm 的冰冻切片; 室温下, 在切片上滴加 200 μL 清洗液工作液, 静置 3~5 min 后小心吸除清洗液; 滴加 200 μL 染色探针工作液, 在 37℃培养箱中避光孵育 20~60 min, 去除染色液; 用 PBS 清洗切片 2~3 次, 滴加 DAPI 染色后封片, 在荧光显微镜下观察。

1.8 ATP检测

按照每 20 mg 组织加入 200 μL 的比例加入裂解液, 充分匀浆后于 4℃、1 340 × g 离心 15 min, 取上清; 先在检测孔内加入 100 μL 酶工作液, 室温放置 3~5 min 以消耗掉本底 ATP, 然后在检测孔中加 20 μL 样品或按浓度梯度稀释的 ATP 标准溶液, 迅速用枪混匀并用化学发光仪测定相对光单位 (relative light unit, RLU) 值, 根据标准曲线计算出样品中 ATP 的浓度后进行统计。

1.9 统计学分析

采用 GraphPad Prism 9 软件进行统计学分析和

作图, 计量资料符合正态分布以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析和 Tukey's 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PDE对仔鼠胎盘发育指标的影响

本研究评估了不同剂量 PDE (对胎盘细胞增殖基因 *Ki67*、凋亡相关基因 *Bax* mRNA 表达的影响。qRT-PCR 结果显示: 与对照组相比, PDH 组雌性仔鼠胎盘中 *Ki67* mRNA 表达降低 (P < 0.05) (图 1A), 而雄性仔鼠在 PDM 及 PDH 组均呈现胎盘组织 *Ki67* mRNA 表达的显著下调 (P < 0.05) (图 1B), 雌、雄仔鼠胎盘中 *Bax* mRNA 表达则均在 PDH 组显著升高 P < 0.05 (图 1C 和 1D)。提示 PDE 可抑制仔鼠胎盘细胞增殖而促进凋亡, 不同性别仔鼠的变化趋势相同, 但在高剂量组尤其雄性仔鼠中更为显著。

2.2 PDE对仔鼠胎盘细胞超微结构的影响

运用透射电镜观察 PDE 时仔鼠胎盘组织细胞超微结构的变化。结果显示: 对照组胎盘细胞中线粒体形态呈类圆形, 边缘整齐, 内部嵴清晰 (图 2A, 白色箭头), 胞浆内散在少量的自噬小体 (图 2C, 黑色箭头)。而 PDE 时胎盘细胞出现多量线粒体肿胀, 膜破裂, 内部结构破坏, 线粒体内嵴变形, 呈透亮空泡状 (图 2B, 白色箭头), 且自噬小体数量明显增多 (图 2D, 黑色箭头)。提示 PDE 可导致仔鼠胎盘组织细胞中线粒体结构破坏, 并伴有自噬过程的激活。

2.3 PDE对仔鼠胎盘细胞线粒体动力学指标及ATP含量的影响

线粒体动力学控制着线粒体的分布、形态和数量, 从而调控细胞内 ATP 产生、代谢平衡、应激反应和细胞凋亡等过程^[14]。为了进一步评估 PDE 对仔鼠胎盘线粒体功能的影响, 采用 qRT-PCR 法检测不同剂量 PDE 时的线粒体动力学指标, 包括融合相关基因 *Mfn* (*Mfn1* 和 *Mfn2*) 和分裂相关基因 *Drp1* mRNA 的表达。结果显示: 与对照组相比, 各剂量组雄性仔鼠胎盘 *Drp1* mRNA 表达呈剂量依赖性升高 (P < 0.05), 而雌性仔鼠胎盘则主要表现为 PDL 组 *Mfn2* mRNA 表达降低 (P < 0.05); 整体上呈现线粒体动力学向分裂偏离的状态 (图 3)。另外, 使用 ATP 检测试剂盒检测 PDE 对胎盘组织中 ATP 含量的影响。结果表明:

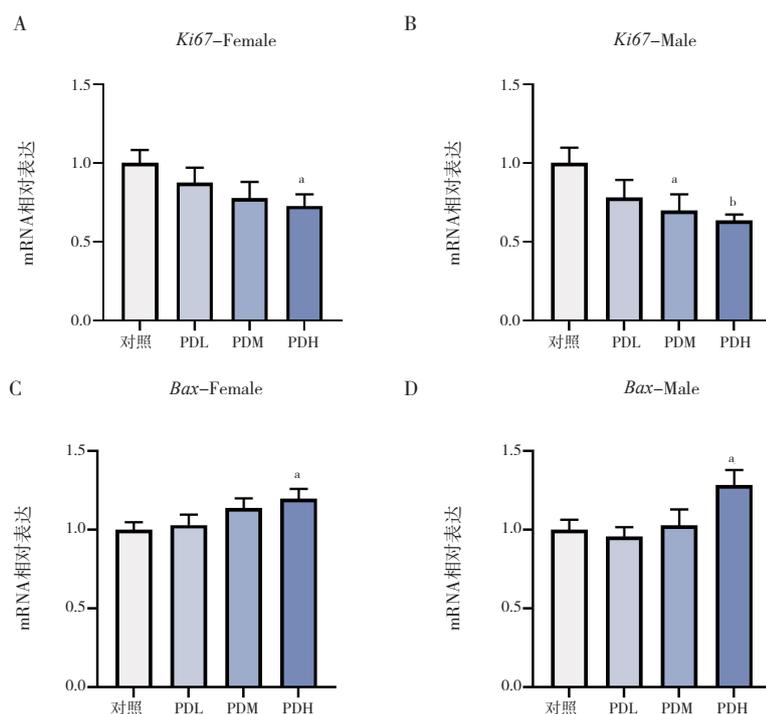


图1 PDE对雌/雄性仔鼠胎盘增殖和凋亡相关基因表达的影响 ($n=12$)

Figure 1. Effect of PDE on the expression of genes related to proliferation and apoptosis in female and male offspring placenta ($n=12$)

注: A. *Ki67* mRNA在雌性仔鼠胎盘中的相对表达水平; B. *Ki67* mRNA在雄性仔鼠胎盘中的相对表达水平; C. *Bax* mRNA在雌性仔鼠胎盘中的相对表达水平; D. *Bax* mRNA在雄性仔鼠胎盘中的相对表达水平; 与对照组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ 。

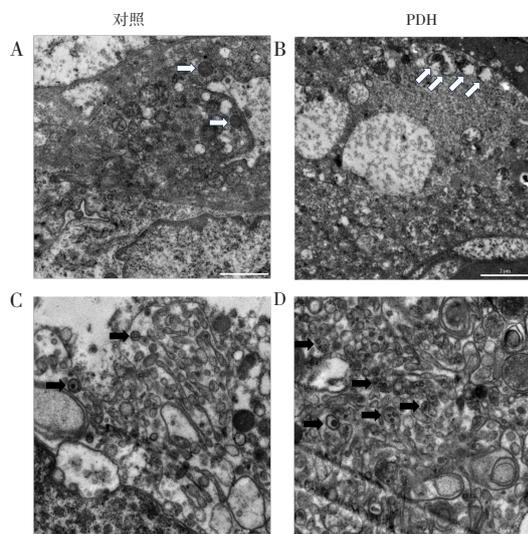


图2 PDE对仔鼠胎盘细胞超微结构的影响

Figure 2. Effects of PDE on the cell ultrastructure of offspring placenta

注: A、C. 透射电镜观察对照组胎盘细胞超微结构和放大倍率 5 000 \times ; B、D. 透射电镜观察PDH组胎盘细胞超微结构和放大倍率 5 000 \times ; 白色箭头: 线粒体; 黑色箭头: 自噬小体。

与对照组相比, PDM组和PDH组雄性胎盘中ATP含量显著减少($P < 0.05$) (图4)。提示PDE可导致胎盘线粒体动力学紊乱, 整体向融合不足而裂变增强的方向转变, 尤其在雄性仔鼠更为显著, 并伴有ATP水平下降等线粒体功能损伤性改变。

2.4 PDE对仔鼠胎盘组织中ROS产生的影响

线粒体是细胞产生ROS的主要场所。ROS过度积累会诱发氧化损伤, 破坏细胞稳态, 进一步加重线粒体功能障碍^[13]并形成恶性循环, 最终损害细胞增殖和(或)分化, 并引发凋亡等细胞死亡过程。利用ROS荧光探针检测PDE时胎盘组织中ROS含量的变化, 结果显示: PDM组和PDH组雌、雄性仔鼠胎盘组织中ROS荧光强度均明显高于对照组; PDL组荧光强度较对照组无明显性差异(图5)。以上提示PDE可诱导胎盘ROS生成的增加, 以中、高剂量更显著。

2.5 PDE对仔鼠胎盘自噬相关指标的影响

自噬是一种重要的细胞稳态调控机制, 可将细胞内受损、变性的细胞器等运输至溶酶体并降解清除。ROS的过量蓄积导致氧化应激和线粒体损伤, 是引发自噬的常见诱因^[15]。同时需注意的是, 自噬具有双重作用, 并可与其他细胞死亡过程互相串扰, 当该过程过度激活时也有可能加剧细胞功能紊乱。为了进一步评估PDE时胎盘细胞的自噬状态, 本研究采用qRT-PCR检测了不同剂量PDE对自噬相关基因*LC3*、*P62*和*Beclin 1*的mRNA表达影响。

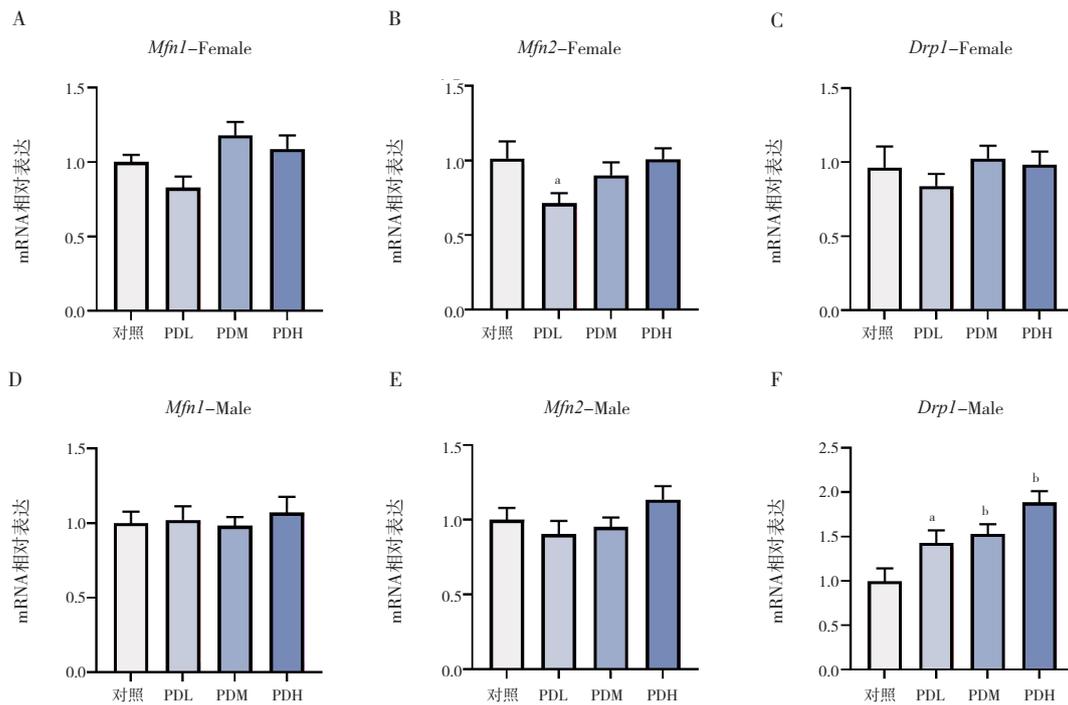


图3 PDE对仔鼠胎盘*Mfn1*、*Mfn2*和*Drp1* mRNA表达的影响 (n=12)

Figure 3. Effects of PDE on mRNA expression of *Mfn1*, *Mfn2* and *Drp1* in offspring placenta (n=12)

注：A、D. *Mfn1* mRNA在雌性和雄性仔鼠胎盘中的相对表达水平；B、E. *Mfn2* mRNA在雌性和雄性仔鼠胎盘中的相对表达水平；C、F. *Drp1* mRNA在雌性和雄性仔鼠胎盘中的相对表达水平；与对照组比较，^a*P*<0.05, ^b*P*<0.01。

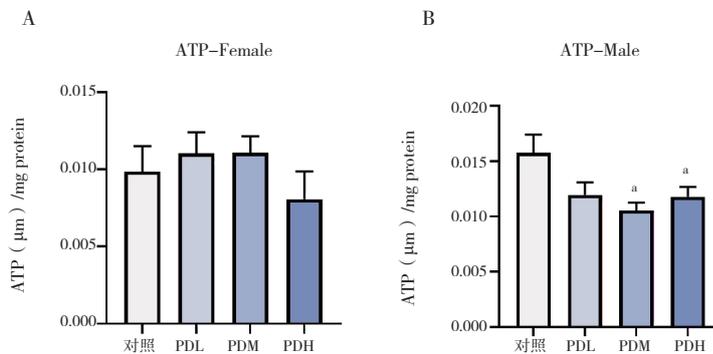


图4 PDE对仔鼠胎盘ATP含量的影响 (n=12)

Figure 4. Effects of PDE on ATP content in offspring placenta (n=12)

注：A. 雌性仔鼠胎盘组织中ATP含量；B. 雄性仔鼠胎盘组织中ATP含量；与对照组比较，^a*P*<0.05。

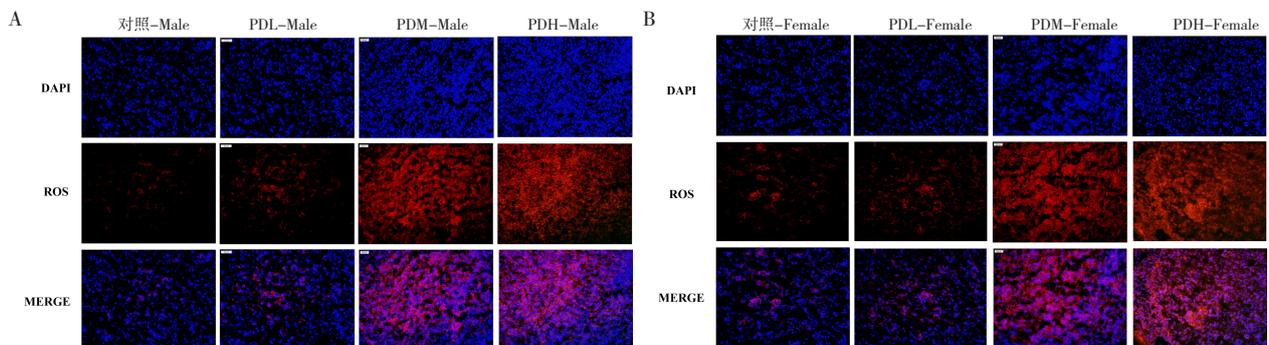


图5 PDE诱导仔鼠胎盘组织中ROS水平的升高 (100 X)

Figure 5. PDE induced the increase of ROS levels in tissues of offspring plcenta (100 x)

注：A. 各剂量PDE下雄性仔鼠胎盘组织中ROS的代表性荧光图像；B. 各剂量PDE下雌性仔鼠胎盘组织中ROS的代表性荧光图像。

结果显示：与对照组相比，雌性仔鼠胎盘在 PDL 组和 PDH 组呈现 *LC3* 基因的 mRNA 表达升高 ($P < 0.05$) (图 6A~C)；雄性仔鼠胎盘则在 PDH 组呈现 *LC3* 和 *Beclin 1* 基因的 mRNA 表达显著增加 ($P < 0.05$)，而 *P62* 基因 mRNA 表达降低 ($P < 0.05$) (图 6D~F)。采用 Western blotting 检测

PDH 组 *LC3II/LC3I*、*P62* 和 *Beclin 1* 蛋白的表达水平。结果表明：与对照组相比，雌/雄性仔鼠胎盘 *LC3II/LC3I* 蛋白比值均显著增加 ($P < 0.05$)；而且雄性仔鼠胎盘还伴有 *P62* 蛋白表达的显著降低 ($P < 0.05$) (图 7)。提示 PDE 可导致仔鼠胎盘细胞自噬过程增强，并以雄性改变更为明显。

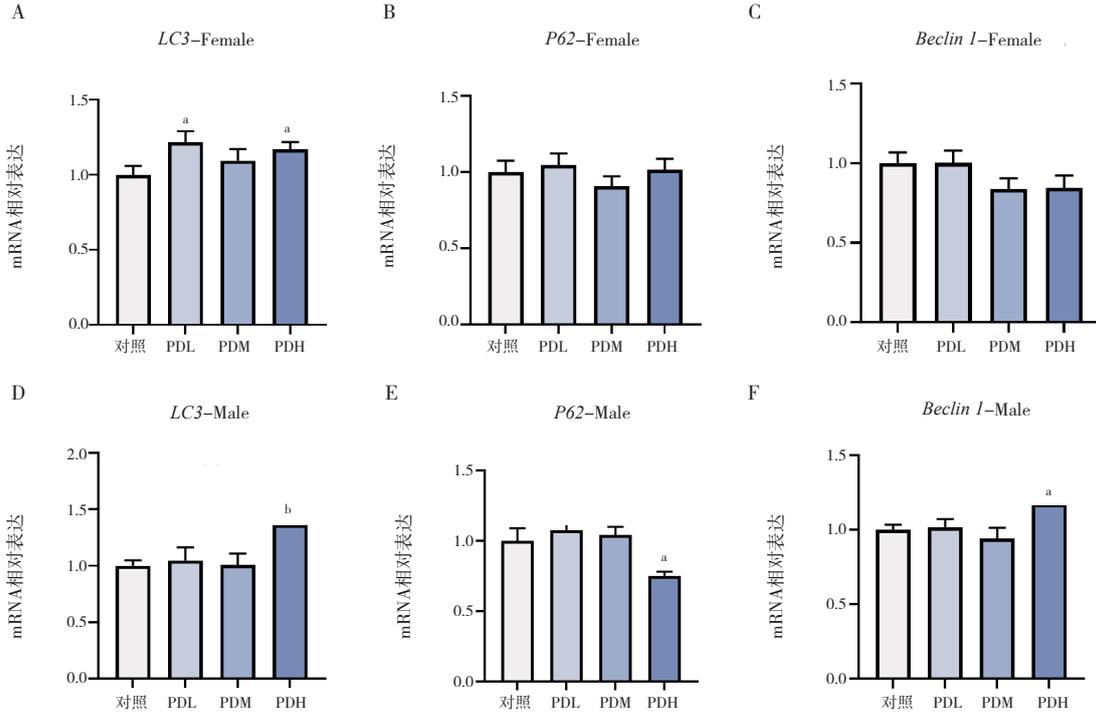


图6 PDE对仔鼠胎盘*LC3*、*P62*和*Beclin 1* mRNA表达的影响 (n=12)

Figure 6. Effects of PDE on mRNA expression of *LC3*、*P62* and *Beclin 1* in offspring placenta (n=12)

注：A~C. 雌性仔鼠胎盘中的mRNA相对表达水平；D~F. 雄性仔鼠胎盘中的mRNA相对表达水平；与对照组比较，^a $P < 0.05$ ，^b $P < 0.01$ 。

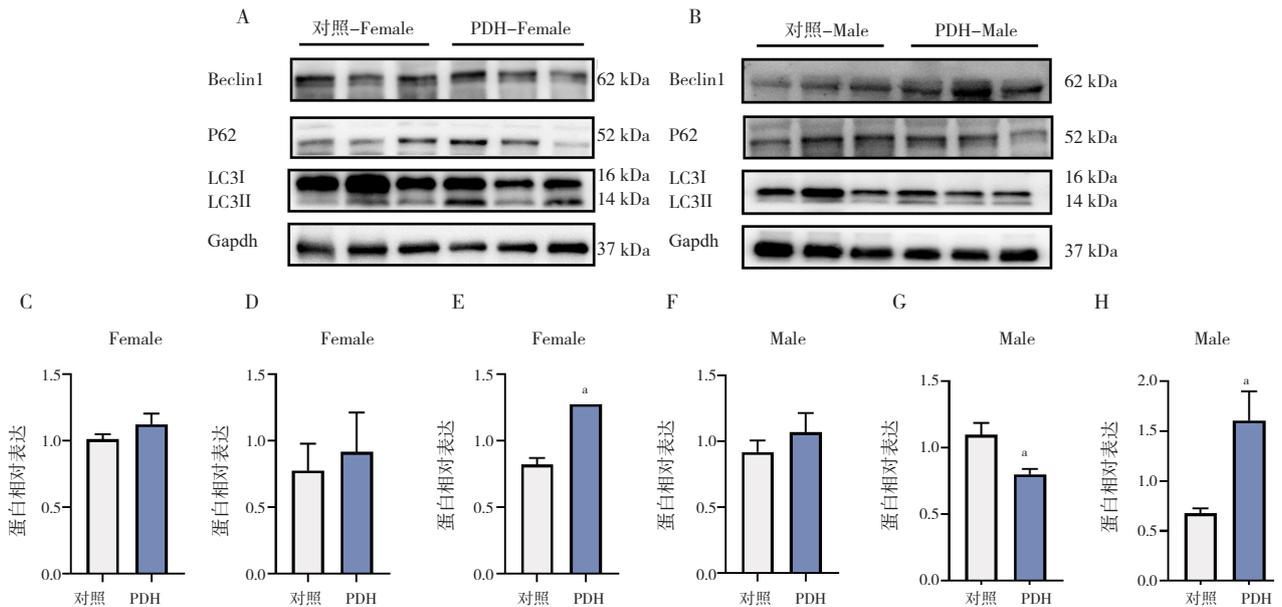


图7 PDE对仔鼠胎盘*LC3*、*P62*和*Beclin 1*蛋白表达的影响 (n=12)

Figure 7. Effects of PDE on protein expression of *LC3*、*P62* and *Beclin 1* in offspring placenta (n=12)

注：A. 雌性仔鼠胎盘中的蛋白条带图；B. 雄性仔鼠胎盘中的蛋白条带图；C~E. 雌性仔鼠胎盘中的蛋白相对表达水平；F~H. 雄性仔鼠胎盘中的蛋白相对表达水平；与对照组比较，^a $P < 0.05$ 。

3 讨论

胎盘是母胎之间物质、信息沟通的重要桥梁, 不仅决定胎儿宫内发育, 而且对子代出生后的健康状态产生深远影响。胎盘功能异常是介导孕期不良因素影响胎儿发育的首要环节。地塞米松是一种产科常用的糖皮质激素类药物, 被广泛用于早产及相关妊娠疾病的治疗, 但同时也有多项研究提示地塞米松会影响胎儿发育编程, 并增加出生后代代谢性疾病等的易感风险。聚焦于胎盘开展对孕期地塞米松发育毒性的研究, 不仅有助于发现影响胎儿器官发育编程的共性机制, 而且因其取材的便利性, 更利于发掘方便、易行的预警或干预方案。

目前国际指南对于孕期地塞米松的使用方案建议为每 12 h 肌注 6 mg, 共 4 次, 本研究基于临床给药方案建立了 PDE 大鼠模型。按照孕妇平均体重 60 kg、人与大鼠的体表面积比 (1:6.17) 计算, 大鼠孕期地塞米松日常最大暴露量为 $12 \text{ mg}/60 \text{ kg} \times 37/6 \approx 1.23 \text{ mg}/\text{kg}/\text{d}$ 。本研究中采用低于临床每日最大暴露量 (0.8 mg/kg/d) 作为高剂量组。此外, 为研究不同 PDE 剂量对胎盘的影响, 同时建立了低剂量组 (0.2 mg/kg/d) 和中剂量组 (0.4 mg/kg/d)。

胎盘滋养细胞包含多种亚类, 分别具有独特的时空分布规律和功能特性。其中, 细胞滋养细胞可通过分裂、增殖形成各级绒毛干, 是构成胎盘主体结构的主要成分。研究表明, 多种不良因素如氧化应激增加会抑制细胞滋养细胞增殖^[16], 从而限制胎盘发育。在正常氧代谢情况下, 单个核的细胞滋养细胞可自发融合形成多个核的合体滋养细胞, 后者属于终末分化细胞, 失去增殖能力, 但覆盖在绒毛表面成为母胎界面的重要组分, 同时是甾体类激素、糖蛋白、酶类等生物大分子合成分泌的主要场所, 承担着母胎间的氧气、营养物转运及内分泌调控等多种生理功能。适度的细胞凋亡过程对于滋养细胞更新和合体化过程具有积极意义, 但不良因素导致的过度凋亡则会造成胎盘发育不良、血管内皮细胞损伤以及免疫反应改变^[17], 甚至导致先兆子痫、IUGR 等妊娠并发症的发生^[7]。本研究显示, PDE 时雌、雄仔鼠胎盘中 *Ki67* mRNA 均表达减少, 而 *Bax* mRNA 表达增加, 说明 PDE 可导致胎盘细胞的增殖减少,

凋亡增加, 而且在高剂量组尤为显著。本课题组前期曾构建不同时期、剂量和疗程的孕期地塞米松小鼠给药模型, 研究其对胎儿多脏器发育的影响, 发现孕中晚期、高剂量和多疗程对子代多器官发育和功能改变更为显著^[18], 与本研究在胎盘组织中观察到的规律具有一致性。

线粒体作为细胞的能量中心, 通过呼吸链实现三羧酸循环和氧化磷酸化, 具有能量转化、钙离子存储、膜电位控制等多种功能, 广泛参与细胞增殖、代谢及凋亡等生物学过程的调节^[19-20]。线粒体稳态是指通过动态平衡机制维持线粒体网络的结构完整性和功能稳定性, 涵盖线粒体动力学、蛋白稳态及自噬降解等生物学事件。在滋养细胞这类高能量需求细胞中, 线粒体稳态的精密调控直接关联胎盘的发育和功能以及妊娠过程的进展^[13, 21]。本研究亦证实 PDE 时胎盘细胞存在超微结构的紊乱, 尤其线粒体呈现明显肿胀、伴有膜破损和嵴断裂。

融合与分裂是线粒体动力学的关键过程。其中, 线粒体外膜融合由 *Mfn1* 和 *Mfn2* 介导, 线粒体分裂由 *Drp1*、线粒体分裂因子和分裂蛋白 1 介导^[22]。线粒体融合有助于修复细胞轻微损伤, 线粒体分裂则促进细胞凋亡, 并能够通过线粒体自噬彻底清除受损的线粒体^[20]。过强的线粒体分裂会导致线粒体 DNA 突变、ATP 生成减少、ROS 堆积等。过度产生的 ROS 可诱导心磷脂过氧化, 导致凋亡或其他形式的细胞死亡以及细胞炎症; 同时还可通过多种信号通路损害细胞增殖和 (或) 分化^[23-25]。为了进一步评估 PDE 对线粒体稳态的影响, 本研究对线粒体分裂及融合相关基因 mRNA 进行检测, 证实 PDE 时雌性胎盘 *Mfn2* 表达下降, 而雄性胎盘 *Drp1* 则呈剂量依赖性表达上调, 整体上向线粒体分裂增加偏离。此外, PDE 胎盘还存在 ATP 含量的显著下降和 ROS 水平的显著升高。以上发现均提示线粒体稳态失衡是介导 PDE 时滋养细胞增殖减少、凋亡增加和胎盘发育受损的重要机制之一。

线粒体稳态的改变还会影响其他细胞器的互作。如 ROS 过度蓄积时, 线粒体可发生去极化损伤、外膜电位丧失和碎片化等改变, 通过 PINK/PRKN 通路或泛素化等途径被自噬体识别、隔离, 最终与溶酶体融合并降解。除线粒体结构的异常外, 本研究确实还观察到 PDE 胎盘细胞中自噬

小体数量的明显增加。此外，自噬标志物 LC3II/LC3I 蛋白比值在雌、雄性胎盘中均显著升高。LC3 的前体裂解后形成的胞质形式为 LC3I，进一步裂解、偶联后形成的膜结合形式为 LC3II，是自噬体的结构蛋白。因此，LC3II/LC3I 蛋白比值的升高意味着 PDE 时自噬过程的增强。同时，PDE 雄鼠胎盘中自噬抑制性标志物 *P62* mRNA 及蛋白均显著下降，亦提示了自噬的激活^[26]。这些变化可能是线粒体损伤后继发的细胞维稳机制。但需要指出的是，自噬的过度活化也可能导致健康线粒体的误清除，影响细胞正常功能，甚或引发细胞凋亡或坏死。关于自噬与 PDE 线粒体稳态失衡的关系，未来还有待进一步探索。

本研究也存在一定的局限性：首先，本研究主要基于动物模型，需进一步通过临床样本验证其临床相关性；其次，虽然本研究聚焦于线粒体稳态失衡这一机制，但未能全面探讨其他可能参与发育障碍的分子通路，如氧化应激、内质网应激等；最后，研究主要集中在胎盘组织层面，缺乏对胎儿器官发育、远期代谢的系统评估，未来研究应结合多系统、多阶段的综合分析，以更全面理解地塞米松对胎儿发育的长期影响。

综上所述，本研究发现 PDE 可造成胎盘细胞中线粒体动力学紊乱，尤其是分裂增加，伴有 ATP 含量减少、ROS 积累和线粒体形态破坏，同时还可见自噬过程的激活，尤其在雄性胎盘中表现更为显著。这些细胞器网络稳态的改变可能是介导 PDE 时滋养细胞增殖减少、凋亡增加的机制之一。本研究从线粒体等亚微结构层面揭示了 PDE 导致胎盘发育不良的机制，为深入解析子代疾病的胎盘起源积累了实验依据，并为探索新的预警靶标或干预策略提供新的思路。

参考文献

- Trifunović S, Šošić Jurjević B, Ristić N, et al. Maternal dexamethasone exposure induces sex-specific changes in histomorphology and redox homeostasis of rat placenta[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 24(1): 540. DOI: [10.3390/ijms24010540](https://doi.org/10.3390/ijms24010540).
- Bloom SL, Sheffield JS, McIntire DD, et al. Antenatal dexamethasone and decreased birth weight[J]. *Obstet Gynecol*, 2001, 97(4): 485–490. DOI: [10.1016/s0029-7844\(00\)01206-0](https://doi.org/10.1016/s0029-7844(00)01206-0).
- Long NM, Shasa DR, Ford SP, et al. Growth and insulin dynamics in two generations of female offspring of mothers receiving a single course of synthetic glucocorticoids[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2012, 207(3): 203.e1–8. DOI: [10.1016/j.ajog.2012.06.024](https://doi.org/10.1016/j.ajog.2012.06.024).
- Bensley JG, De Matteo R, Harding R, et al. Preterm birth with antenatal corticosteroid administration has injurious and persistent effects on the structure and composition of the aorta and pulmonary artery[J]. *Pediatr Res*, 2012, 71(2): 150–155. DOI: [10.1038/pr.2011.29](https://doi.org/10.1038/pr.2011.29).
- Gude NM, Roberts CT, Kalionis B, et al. Growth and function of the normal human placenta[J]. *Thromb Res*, 2004, 114(5–6): 397–407. DOI: [10.1016/j.thromres.2004.06.038](https://doi.org/10.1016/j.thromres.2004.06.038).
- Guo J, Fang M, Zhuang S, et al. Prenatal dexamethasone exposure exerts sex-specific effect on placental oxygen and nutrient transport ascribed to the differential expression of IGF2[J]. *Ann Transl Med*, 2020, 8(5): 233. DOI: [10.21037/atm.2019.12.156](https://doi.org/10.21037/atm.2019.12.156).
- Sharp AN, Heazell AE, Crocker IP, et al. Placental apoptosis in health and disease[J]. *Am J Reprod Immunol*, 2010, 64(3): 159–169. DOI: [10.1111/j.1600-0897.2010.00837.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2010.00837.x).
- Zhang M, Muralimanoharan S, Wortman AC, et al. Primate-specific miR-515 family members inhibit key genes in human trophoblast differentiation and are upregulated in preeclampsia[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(45): E7069–E7076. DOI: [10.1073/pnas.1607849113](https://doi.org/10.1073/pnas.1607849113).
- Mittal CK, Murad F. Activation of guanylate cyclase by superoxide dismutase and hydroxyl radical: a physiological regulator of guanosine 3',5'-monophosphate formation[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1977, 74(10): 4360–4364. DOI: [10.1073/pnas.74.10.4360](https://doi.org/10.1073/pnas.74.10.4360).
- Lin MT, Beal MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases[J]. *Nature*, 2006, 443(7113): 787–795. DOI: [10.1038/nature05292](https://doi.org/10.1038/nature05292).
- Stowe DF, Camara AK. Mitochondrial reactive oxygen species production in excitable cells: modulators of mitochondrial and cell function[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2009, 11(6): 1373–1414. DOI: [10.1089/ars.2008.2331](https://doi.org/10.1089/ars.2008.2331).
- Perez-Garcia V, Fineberg E, Wilson R, et al. Placentation defects are highly prevalent in embryonic lethal mouse mutants[J]. *Nature*, 2018, 555(7697): 463–468. DOI: [10.1038/nature26002](https://doi.org/10.1038/nature26002).
- Fisher JJ, Bartho LA, Perkins AV, et al. Placental mitochondria and reactive oxygen species in the physiology and pathophysiology of pregnancy[J]. *Exp Pharmacol Physiol*, 2020, 47(1): 176–184. DOI: [10.1111/1440-1681.13172](https://doi.org/10.1111/1440-1681.13172).
- Whitley BN, Engelhart EA, Hoppins S. Mitochondrial dynamics and their potential as a therapeutic target[J]. *Mitochondrion*, 2019, 49: 269–283. DOI: [10.1016/j.mito.2019.06.002](https://doi.org/10.1016/j.mito.2019.06.002).
- Li D, Ding Z, Du K, et al. Reactive oxygen species as a link between antioxidant pathways and autophagy[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 5583215. DOI: [10.1155/2021/5583215](https://doi.org/10.1155/2021/5583215).
- Kar F, Hacıoglu C, Kacar S, et al. Betaine suppresses cell proliferation by increasing oxidative stress-mediated apoptosis and inflammation in DU-145 human prostate cancer cell line[J]. *Cell Stress Chaperones*, 2019, 24(5): 871–881. DOI: [10.1007/s12192-019-01022-x](https://doi.org/10.1007/s12192-019-01022-x).
- Hoegh AM, Tannetta D, Sargent I, et al. Effect of syncytiotrophoblast microvillous membrane treatment on gene expression in human umbilical vein endothelial cells[J]. *BJOG*, 2006, 113(11): 1270–1279. DOI: [10.1111/j.1471-0528.2006.01061.x](https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2006.01061.x).

- 18 Zhao X, Xiao H, Li X, et al. Multi-organ developmental toxicity and its characteristics in fetal mice induced by dexamethasone at different doses, stages, and courses during pregnancy[J]. Arch Toxicol, 2024, 98(6): 1891–1908. DOI: [10.1007/s00204-024-03707-4](https://doi.org/10.1007/s00204-024-03707-4).
- 19 Archer SL. Mitochondrial dynamics—mitochondrial fission and fusion in human diseases[J]. N Engl J Med, 2013, 369(23): 2236–2251. DOI: [10.1056/NEJMra1215233](https://doi.org/10.1056/NEJMra1215233).
- 20 Adebayo M, Singh S, Singh AP, et al. Mitochondrial fusion and fission: the fine-tune balance for cellular homeostasis[J]. FASEB J, 2021, 35(6): e21620. DOI: [10.1096/fj.202100067R](https://doi.org/10.1096/fj.202100067R).
- 21 Li M, Cheng W, Zhang L. Maternal selenium deficiency suppresses proliferation, induces autophagy dysfunction and apoptosis in the placenta of mice[J]. Metallomics, 2021, 13(11): mfab058. DOI: [10.1093/mtomcs/mfab058](https://doi.org/10.1093/mtomcs/mfab058).
- 22 Tilokani L, Nagashima S, Paupe V, et al. Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms[J]. Essays Biochem, 2018, 62(3): 341–360. DOI: [/10.1042/ebc20170104](https://doi.org/10.1042/ebc20170104).
- 23 Singh M, Denny H, Smith C, et al. Presynaptic loss of dynamin-related protein 1 impairs synaptic vesicle release and recycling at the mouse calyx of Held[J]. J Physiol, 2018, 596(24): 6263–6287. DOI: [10.1113/jp276424](https://doi.org/10.1113/jp276424).
- 24 Chakrabarti S, Jahandideh F, Wu J. Food-derived bioactive peptides on inflammation and oxidative stress[J]. BioMed Res Int, 2014, 2014: 608979. DOI: [10.1155/2014/608979](https://doi.org/10.1155/2014/608979).
- 25 Tang C, Cai J, Yin XM, et al. Mitochondrial quality control in kidney injury and repair[J]. Nat Rev Nephrol, 2021, 17(5): 299–318. DOI: [/10.1038/s41581-020-00369-0](https://doi.org/10.1038/s41581-020-00369-0).
- 26 Onishi M, Yamano K, Sato M, et al. Molecular mechanisms and physiological functions of mitophagy[J]. EMBO J, 2021, 40(3): e104705. DOI: [10.15252/embj.2020104705](https://doi.org/10.15252/embj.2020104705).

收稿日期: 2025 年 02 月 20 日 修回日期: 2025 年 03 月 20 日
本文编辑: 桂裕亮 钟巧妮