

# 单分子免疫阵列技术测定子痫前期患者 PLGF 的变化及其通过 ERK 途径对滋养细胞功能的调控

李 玮<sup>1</sup>, 郭广丽<sup>1</sup>, 常泽木<sup>2</sup>

(1.河北生殖妇产医院产科,河北石家庄 050091;2.河北省赵县人民医院产科,河北赵县 051530)

**[摘要]** 目的 探究胎盘生长因子(placental growth factor, PLGF)通过细胞外信号调控激酶(extracellular signal-regulated kinases, ERK)转导途径对子痫前期患者滋养细胞功能的调控及其作用机制。方法 收集2022年9月—2024年2月河北生殖妇产医院产科收治的子痫前期患者155例为疾病组,并选择同期健康孕妇60例为对照组,均行剖宫产手术,获得胎盘组织和血液样本,酶联免疫吸附法和免疫组织化学法测定 PLGF 表达水平。将人绒毛膜滋养层细胞 HTR-8/SVneo 分成正常对照组(未经任何处理的 HTR-8/SVneo 细胞)、阳性对照组(过氧化氢处理)、PLGF 病毒组(用含有 PLGF 基因的逆转录病毒感染 HTR-8/SVneo 细胞,使其过表达 PLGF)和 PLGF-shRNA 病毒组(用含有针对 PLGF 基因的 shRNA 的逆转录病毒感染 HTR-8/SVneo 细胞,使其 PLGF 基因沉默)。CCK-8 法测定各组细胞增殖情况,比色法测定各组细胞超氧化物歧化酶和丙二醛含量,Transwell 法测定各组细胞迁移数量,流式细胞仪测定各组细胞凋亡情况,PCR 法测定各组细胞 PLGF 和 ERK mRNA 表达情况,Western blot 法测定各组细胞 PLGF 和 ERK 信号通路蛋白表达情况。结果 疾病组血清 PLGF 水平明显低于对照组  $[1.21 \pm 0.40 \text{ ng/L vs. } (1.67 \pm 0.33) \text{ ng/L}, t = 7.922, P < 0.001]$ , PLGF 在胎盘滋养层细胞里主要以细胞质形态出现,呈现为浅黄或棕色到棕褐色的小粒状染色。正常对照组、阳性对照组、PLGF 病毒组和 PLGF-shRNA 病毒组细胞增殖情况均呈显著增加的趋势,正常对照组细胞增殖均明显高于 PLGF 病毒组、阳性对照组和 PLGF-shRNA 病毒组,组间、时点间、组间·时点间交互作用差异有统计学意义  $(P < 0.001)$ 。正常对照组、阳性对照组、PLGF 病毒组和 PLGF-shRNA 病毒组滋养细胞 MDA  $[(3.71 \pm 0.73) \text{ nmol/mg prot vs. } (12.89 \pm 3.65) \text{ nmol/mg prot vs. } (5.09 \pm 0.40) \text{ nmol/mg prot vs. } (15.20 \pm 3.00) \text{ nmol/mg prot}, F = 33.594, P < 0.001]$ 、SOD  $[(13.89 \pm 4.53) \text{ U/mg prot vs. } (2.76 \pm 0.72) \text{ U/mg prot vs. } (8.55 \pm 1.20) \text{ U/mg prot vs. } (1.29 \pm 0.63) \text{ U/mg prot}, F = 34.931, P < 0.001]$ 、滋养细胞迁移细胞数量  $[(148.15 \pm 32.77) \text{ 个 vs. } (53.49 \pm 13.65) \text{ 个 vs. } (98.22 \pm 8.44) \text{ 个 vs. } (35.28 \pm 5.92) \text{ 个}, F = 44.621, P < 0.001]$ 、凋亡率  $[(4.95 \pm 0.67) \% \text{ vs. } (18.55 \pm 4.73) \% \text{ vs. } (10.23 \pm 4.44) \% \text{ vs. } (25.11 \pm 4.33) \%, F = 31.089, P < 0.001]$ 、PLGF mRNA  $(1.29 \pm 0.34 \text{ vs. } 0.55 \pm 0.13 \text{ vs. } 1.11 \pm 0.19 \text{ vs. } 0.31 \pm 0.09, F = 28.887, P < 0.001)$ 、ERK mRNA  $(1.87 \pm 0.42 \text{ vs. } 0.61 \pm 0.10 \text{ vs. } 1.29 \pm 0.47 \text{ vs. } 0.41 \pm 0.13, F = 22.887, P < 0.001)$ 、PLGF 蛋白  $(1.48 \pm 0.10 \text{ vs. } 0.55 \pm 0.11 \text{ vs. } 1.12 \pm 0.31 \text{ vs. } 0.33 \pm 0.10, F = 51.707, P < 0.001)$ 、ERK 蛋白表达  $(1.69 \pm 0.17 \text{ vs. } 0.47 \pm 0.19 \text{ vs. } 1.21 \pm 0.32 \text{ vs. } 0.29 \pm 0.09, F = 58.179, P < 0.001)$  差异有统计学意义。结论 子痫前期的发生、发展与 PLGF 的低表达相关,其高表达可改善 HTR-8/SVneo 细胞氧化应激反应,促进细胞迁移能力,减小细胞凋亡率,并增强其细胞增殖水平,与 ERK 信号通路表达有关。

**[关键词]** 子痫;胎盘生长因子;细胞外信号调控激酶 doi:10.3969/j.issn.1007-3205.2025.10.011

**[中图分类号]** R714.245 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1007-3205(2025)10-1189-08

## Determination of PLGF changes in patients with preeclampsia using single-molecule immunoarray technology and its regulation of trophoblast function via the ERK pathway

LI Wei<sup>1</sup>, GUO Guang-li<sup>1</sup>, CHANG Ze-mu<sup>2</sup>

(1.Department of Obstetrics, Hebei Reproductive and Obstetrics Hospital, Shijiazhuang 050091, China;

2.Department of Obstetrics, People's Hospital of Zhao County, Hebei Province,

Zhao County 051530, China)

[收稿日期]2025-03-12

[基金项目]石家庄市科技计划项目(221460843)

[作者简介]李玮(1983-),女,河北石家庄人,河北生殖妇产医院

院主治医师,医学学士,从事产科疾病诊治研究。

**[Abstract] Objective** To explore the regulation of placental growth factor (PLGF) on trophoblast function in patients with preeclampsia via the extracellular signal-regulated kinases (ERK) transduction pathway and its mechanism. **Methods** A total of 155 patients with preeclampsia who were admitted to the Department of Obstetrics and Gynecology, Hebei Reproductive and Obstetrics Hospital from September 2022 to February 2024 were collected as the disease group, and 60 healthy pregnant women during the same period were selected as the control group. All patients underwent cesarean section. Placental tissue and blood samples were obtained, and PLGF expression levels were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunohistochemistry (IHC). Human chorionic trophoblastic cells HTR-8/SVneo were divided into normal control group (untreated HTR-8/SVneo cells), positive control group (hydrogen peroxide-treated HTR-8/SVneo cells), PLGF virus group (HTR-8/SVneo cells infected with retrovirus containing PLGF gene to induce PLGF overexpression) and PLGF-shRNA virus group (HTR-8/SVneo cells infected with retrovirus containing shRNA against PLGF gene to silence PLGF gene). The cell proliferation was detected by CCK-8 method, the content of superoxide dismutase and malondialdehyde was detected by colorimetry, and the number of cell migration was detected by Transwell method. The cell apoptosis was detected by flow cytometry, and the expression of PLGF and ERK mRNA was detected by PCR. Western blot was used to measure the protein expression of PLGF and ERK signaling pathway in each group. **Results** The serum PLGF level in the disease group was significantly lower than that in the control group [ $(1.21 \pm 0.40)$  ng/L vs.  $(1.67 \pm 0.33)$  ng/L,  $t = 7.922$ ,  $P < 0.001$ ]. PLGF was mainly expressed in the cytoplasm of placental trophoblast cells, showing light yellow or brown to tan granular staining. The cell proliferation of normal control group, positive control group, PLGF virus group and PLGF-shRNA virus group were significantly increased, and the cell proliferation of normal control group was significantly higher than that of PLGF virus group, positive control group and PLGF-shRNA virus group. There were significant differences in the interaction between groups, time points, and time points between groups ( $P < 0.001$ ). MDA in trophoblast cells of normal control group, positive control group, PLGF virus group and PLGF-shRNA virus group [ $(3.71 \pm 0.73)$  nmol/mg prot vs.  $(12.89 \pm 3.65)$  nmol/mg prot vs.  $(5.09 \pm 0.40)$  nmol/mg prot vs.  $(15.20 \pm 3.00)$  nmol/mg prot,  $F = 33.594$ ,  $P < 0.001$ ], SOD [ $(13.89 \pm 4.53)$  U/mg prot vs.  $(2.76 \pm 0.72)$  U/mg prot vs.  $(8.55 \pm 1.20)$  U/mg prot vs.  $(1.29 \pm 0.63)$  U/mg prot,  $F = 34.931$ ,  $P < 0.001$ ], the number of trophoblast migration cells [ $(148.15 \pm 32.77)$  vs.  $(53.49 \pm 13.65)$  vs.  $(98.22 \pm 8.44)$  vs.  $(35.28 \pm 5.92)$ ,  $F = 44.621$ ,  $P < 0.001$ ], apoptosis rate [ $(4.95 \pm 0.67)$  % vs.  $(18.55 \pm 4.73)$  % vs.  $(10.23 \pm 4.44)$  % vs.  $(25.11 \pm 4.33)$  %,  $F = 31.089$ ,  $P < 0.001$ ], PLGF mRNA ( $1.29 \pm 0.34$  vs.  $0.55 \pm 0.13$  vs.  $1.11 \pm 0.19$  vs.  $0.31 \pm 0.09$ ,  $F = 28.887$ ,  $P < 0.001$ ), ERK mRNA ( $1.87 \pm 0.42$  vs.  $0.61 \pm 0.10$  vs.  $1.29 \pm 0.47$  vs.  $0.41 \pm 0.13$ ,  $F = 22.887$ ,  $P < 0.001$ ), PLGF protein ( $1.48 \pm 0.10$  vs.  $0.55 \pm 0.11$  vs.  $1.12 \pm 0.31$  vs.  $0.33 \pm 0.10$ ,  $F = 51.707$ ,  $P < 0.001$ ), and ERK protein expression ( $1.69 \pm 0.17$  vs.  $0.47 \pm 0.19$  vs.  $1.21 \pm 0.32$  vs.  $0.29 \pm 0.09$ ,  $F = 58.179$ ,  $P < 0.001$ ). **Conclusion** The occurrence and development of preeclampsia are related to the low expression of PLGF. The high expression of PLGF can improve oxidative stress response, promote cell migration ability, reduce cell apoptosis rate and enhance cell proliferation in HTR-8/SVneo cells, which is related to the expression of ERK signaling pathway.

**[Key words]** eclampsia; placenta growth factor; extracellular signal-regulated kinase

子痫前期是在妊娠 20 周后可能出现的妊娠相关疾病,主要临床表现为高血压和蛋白尿,且可能出

现系统性水肿,尤其是在下肢、手和面部等,该疾病不仅对母体健康构成严重威胁,如增加脑出血、肾功

能障碍和肝功能异常的风险,而且对胎儿也带来不良影响,包括宫内生长迟缓、早产和宫内死亡等<sup>[1-3]</sup>。尽管子痫前期的临床表现和危害已经被广泛认知,但目前尚无针对其的特异性治疗方法,仅能通过定期监测血压、住院观察及药物等方式控制疾病进程<sup>[4]</sup>。鉴于此深入了解子痫前期的发病机制显得尤为重要,有助于开发新的治疗策略,在多种生理过程中,胎盘生长因子(placental growth factor, PLGF)是血管内皮生长因子家族重要成员,主要在胎盘中表达,促进胎盘的血管形成和分化,以确保胎儿获得充足的营养,并在缺氧、切口愈合和肿瘤生长等病理条件下异常表达<sup>[5]</sup>。细胞外信号调控激酶(extracellular signal-regulated kinases, ERK)信号通路可调节多种生物过程,包括细胞增殖、分化、迁移、存活和凋亡等,与心血管疾病、炎症和肿瘤等相关疾病中表达<sup>[6]</sup>, Anis 等<sup>[7]</sup>发现,ERK 表达增加可能通过刺激细胞增殖和迁移而促进肺动脉高压的发病机制,但具体与孕期的疾病研究相对较少,本文旨在探讨 PLGF 通过 ERK 转导途径对子痫前期患者滋养细胞功能的调控及其作用机制,为临床控制和治疗子痫前期等提供依据。

## 1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2022 年 9 月—2024 年 2 月期间河北生殖妇产医院产科筛查出的自愿接受剖宫产的子痫前期孕妇 155 例作为研究对象,孕妇年龄 23~35 岁,平均(27.49±2.10)岁;平均孕周(36.21±1.26)周,手术过程中,从胎盘母体面中央区域取材约 1 cm<sup>3</sup> 组织,严格规避损伤或异常组织区域,提取的组织样本经生理盐水清洁后立即置于液氮中保存。同时纳入健康孕妇 60 名作为对照组,年龄 23~34 岁,平均(26.94±2.13)岁;平均孕周(37.05±1.18)周,对照组组织样本取材方式与子痫前期组保持一致。纳入标准:①单胎妊娠,孕期状态稳定,无妊娠期并发症(如慢性高血压、糖尿病等)及并发症;②心、肝、肾等重要脏器功能正常,无器质性疾病史;③初产妇,无不良孕产史。排除标准:①有流产史、胎儿畸形或发育异常;②孕期有吸烟史或接受过多种系统性药物治疗;③合并免疫系统疾病、恶性肿瘤等全身性疾病。

本研究经医院伦理委员会审批通过(批件号:20220013),所有研究参与者均已充分知情并签署知情同意书。

### 1.2 试剂和仪器

1.2.1 试剂 PLGF 慢病毒、PLGF-shRNA 干扰病

毒(上海吉凯基因医学科技股份有限公司);HTR8/SVneo 滋养细胞(ATCC 中国细胞库);PLGF 单抗(北京义翘神州科技股份有限公司);ERK 单抗(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司);Trizol 试剂(北京百奥莱博科技有限公司);超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)与丙二醛(malondialdehyd, MDA)试剂盒(艾美捷科技有限公司);人 PLGF 试剂盒(上海雅吉生物科技有限公司)。

1.2.2 仪器 UV2450 型紫外分光光度计(岛津公司);Heraeus Fresco 21 型离心机(赛默飞世尔科技公司);Multiskan FC 型酶标仪(赛默飞世尔科技公司);荧光定量 PCR 仪(罗氏化学公司)。

1.3 组织样本采集 剖宫产前,分别采集所有受试者空腹静脉血 5 mL(禁食时间≥8 h),经离心处理(3 000 r/min, 10 min)后分离血清,置于-80℃低温冰箱保存备用。

对照组足月胎盘组织采集:在胎盘自然娩出后 0.5 h 内,于胎盘母体面脐带连接点与胎盘边缘之间区域,剥离约 1 cm<sup>3</sup> 健康组织(严格避开梗死、钙化、血肿及撕裂区域),经生理盐水快速冲洗后置于-80℃冷冻保存,用于后续蛋白质印迹实验。疾病组部分新鲜足月胎盘组织经 4%多聚甲醛固定,用于免疫组织化学染色检测。对照组妊娠早期组织样本采集:选取因非医学原因自愿终止妊娠的健康早期孕妇(孕周 6~10 周),经超声引导下清宫术获取蜕膜与胎盘绒毛组织样本。取材后立即用生理盐水冲洗去除残留血液及黏液,部分组织置于 4%多聚甲醛固定,部分组织迅速冻存于-80℃冰箱,所有操作均符合伦理要求并经研究对象知情同意。

1.4 免疫组织化学染色法检测胎盘组织 PLGF 表达 从已经用 4%多聚甲醛处理过的胎盘组织中获取样本,接着进行标准的石蜡嵌入、切割(厚度为 4 μm)、脱蜡和水化处理。为了中和内部的过氧化物酶活性,样本在 3%的双氧水甲醇溶液中孵化 10 min。随后,使用 0.01 mmol/L 的柠檬酸钠缓冲液(pH 6.0)煮沸 20 min 以激活抗原。经过室温下的山羊血清处理 15 min 后,添加 PLGF 抗体(稀释比为 1:200)并在 4℃下孵化整夜。在第 2 天,使用磷酸盐缓冲液洗净样本,添加山羊对兔二抗(稀释比为 1:1 000)并在室温下孵化 1 h;最终利用二氨基联苯胺进行显色,并用苏木精染色进行反染。阳性反应表现为棕黄色,作为阳性对照,使用正常人的皮肤组织样本;同时,使用对照孕妇的妊娠初期蜕膜、胎

盘绒毛组织及正常组的足月胎盘组织作为标准对照。所有对照的石蜡切片均由医院的病理部门提供。

**1.5 酶联免疫吸附法测定血清 PLGF 表达** 所有受试者抽取空腹血液样本,并在 4 °C 下放置 4 h; 3 500 r/min 条件下离心 10 min,取得上层液体。随后,应用 PLGF 的 ELISA 试剂盒测定血清中的 PLGF 浓度。

**1.6 实验分组、细胞培养和转染** HTR8/SVneo 滋养细胞(即人绒毛膜滋养层细胞 HTR8/SVneo)经过标准的复苏步骤后,被放置在 RPMI 1649 培养基里,该培养基添加 10% 的胎牛血清、100 kU/L 青霉素以及 100 mg/L 链霉素;随后将其放入一个 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 和全湿度的细胞培养环境中进行孵化,当细胞的融合程度在 80%~90% 之间时,进行细胞传代。从-70 °C 的冷冻设备中拿出 PLGF 病毒或 PLGF-shRNA 病毒,放置于 4 °C 下进行复苏。随后,从培养设备中取出培养中的细胞,当细胞生长良好时,便开始实验。使用移液工具精确取样病毒和细胞,比例是 50:1。接着,添加培养液,并为增强病毒的感染能力,引入 5 mg/L 聚凝胺。实验中,细胞被分为以下几组:正常对照组(原始的培养细胞)、阳性对照组(用 250 μmol/L 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理 24 h)、PLGF 病毒组(在 250 μmol/L 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用 24 h 后,转染 PLGF 慢病毒,均转染 24 h)以及 PLGF-shRNA 病毒组(在 250 μmol/L 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用 24 h 后,引入 PLGF 沉默技术的病毒,均转染 24 h)。

**1.7 CCK-8 法测定各组细胞增殖情况** 取各组 HTR-8/SVneo 细胞,将其调整至 5 000 细胞/孔的密度,并将其种植于 96 孔板内。之后,在 37 °C 及 5% CO<sub>2</sub> 的环境中进行培养。使用磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer saline,PBS)进行冲洗后,转移到含有胎牛血清(fetal bovine serum,FBS)的 DMEM-F12 培养基中。在培养 48 h 后,取上清液,与新鲜培养基和 10 μL 的细胞计数试剂(cell counting kit-8,CCK-8)溶液混合。接着,在 96 孔板中孵化 2 h,并利用酶标仪来测定 450 nm 的吸光度。

**1.8 比色法测定各组细胞 SOD 和 MDA 含量** 培养 HTR-8/SVneo 细胞至适当的生长阶段,收集细胞并用 PBS 冲洗,用适当的缓冲液裂解细胞并得到细胞裂解液,使用专门活性检测试剂盒,比色技术来分析 HTR-8/SVneo 细胞中的 SOD 和 MDA 的浓度。

**1.9 Transwell 法测定各组细胞迁移数量** 从各组提取 5 × 10<sup>4</sup> 细胞并将其悬浮在 200 μL 含有 2%

FBS 的培养基中。然后,将该悬浮液放入 Transwell 室内,并在 37 °C 及 5% CO<sub>2</sub> 的条件下培养。12 h 后,使用 PBS 清洗 Transwell 室,并用多聚甲醛固定 20 min。用 0.5% 结晶紫染色 5 min,用蒸馏水冲洗后,利用显微镜对移动的细胞数量进行计算。

**1.10 流式细胞仪测定各组细胞凋亡情况** 将各组 HTR-8/SVneo 细胞调整至 2 × 10<sup>5</sup> /mL 的浓度,并种植在 6 孔板中。根据操作指南,使用 PBS 冲洗 HTR-8/SVneo 细胞,然后添加 AnnexinV 结合液进行重悬。接下来,加入 0.4 μL 的 RNase,再加入 10 μL 的 Annexin V-FITC 和 10 μL 的碘化丙啶;最后利用流式细胞仪来分析细胞的凋亡情况。

**1.11 PCR 法测定 PLGF 和 ERK mRNA 表达** 对各组 HTR-8/SVneo 细胞,使用 0.25% 胰酶进行消化处理,随后添加 1 mL Trizol 以提取总 RNA。检测 RNA 的纯度后,进行逆转录得到 cDNA。使用实时 PCR 方法来分析 PLGF 和 ERK 的表达,PLGF 的正向引物为:5'-CTTCTCCGTTACTA-CTACGACAGG-3',反向引物为:5'-TTCTATCC-TCCAGCAAGCATCG-3';ERK 的正向引物为:5'-CAGAGATCGTCAACACCCTGGA-3',反向引物为:5'-ACGGTGGTAAAGGCCGTGAA-3';β-actin 为参考基因,其正向引物为:5'-ACCGAGCGCGGCTACAG-3',反向引物为:5'-CTTAATGTCACGCACGATTTCC-3'。PCR 的总体反应体积为 25 μL,反应条件包括:预热于 95 °C 30 s,95 °C 变性 5 s,60 °C 退火 30 s,68 °C 延伸 1 min,总共 40 个循环,采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 方法来估算 PLGF 和 ERK 的 mRNA 相对表达。

**1.12 Western blot 法测定各组细胞 PLGF 和 ERK 信号通路蛋白表达情况** 收集各组 HTR-8/SVneo 滋养层细胞,用 RIPA 缓冲液进行细胞裂解并提取蛋白,利用 BCA 方法来测定样本中的蛋白质浓度。接着,添加电泳缓冲液进行 SDS-PAGE 电泳。电泳完成后,将蛋白转移到 PVDF 膜上。之后使用 5% 的脱脂牛奶进行封闭处理。接着,添加 PLGF(1:1 500)和 ERK(1:1 000)的一抗,并在冷藏条件下孵化 24 h。使用 PBST 洗涤后,再孵化相应的二抗 60 min。再次用 PBST 清洗后,应用 ECL 试剂进行化学显影,并拍照记录结果。最后,使用 Image J 1.47 软件对结果进行定量评估。

**1.13 统计学方法** 应用 SPSS 25.0 统计软件进行数据分析。计量资料比较采用 *t* 检验、单因素方差分析、SNK-*q* 检验和重复测量的方差分析。*P* <

0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 疾病组和对照组一般情况比较 疾病组收缩压和舒张压显著高于对照组,新生儿出生体重和胎

盘重量均显著低于对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );2组孕妇年龄、孕早期 BMI 及孕期体重增加等一般资料比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表 1。

表 1 疾病组和对照组一般情况比较

Table 1 Comparison of general conditions between the disease group and the control group

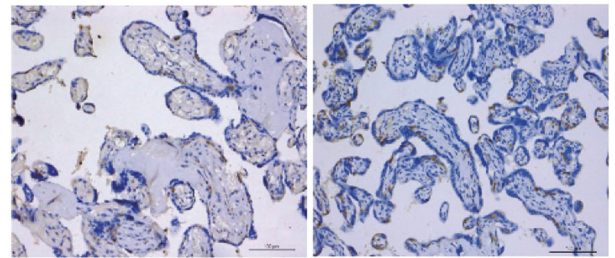
组别	例数	年龄(岁)	孕初 BMI	孕期体重增加(kg)	收缩压(mmHg)	舒张压(mmHg)	新生儿出生体重(kg)	胎盘重量(g)	$(\bar{x} \pm s)$	
疾病组	155	27.49±2.10	22.50±2.41	15.21±1.54	134.51±3.41	101.71±2.28	2.98±0.19	515.33±24.98		
对照组	60	26.84±2.13	22.41±2.09	15.50±2.03	121.10±3.29	78.05±3.05	3.43±0.20	571.02±21.87		
<i>t</i> 值		1.716	0.255	1.001	26.115	54.484	15.349	15.161		
<i>P</i> 值		0.088	0.799	0.320	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001		

1 mmHg=0.133 kPa

2.2 疾病组和对照组血清和胎盘组织中 PLGF 的表达比较 疾病组血清 PLGF 水平明显低于对照组[(1.21±0.40) ng/L vs. (1.67±0.33) ng/L,  $t = 7.922$ ,  $P < 0.001$ ], PLGF 在胎盘的滋养层细胞中以细胞质形态出现,呈浅黄或棕色到棕褐色的小粒状染色(图 1)。

2.3 CCK-8 法测定各组细胞增殖情况 4 组细胞增殖情况均呈显著增加的趋势,正常对照组细胞增殖均明显高于 PLGF 病毒组、阳性对照组和 PLGF-shRNA 病毒组,组间、时点间、组间·时点间交互作用差异有统计学意义( $P < 0.001$ ),说明不同组别在不同时间点的滋养细胞增殖变化趋势存在显著差

异。见表 2。



对照组

疾病组

图 1 疾病组和对照组胎盘组织 PLGF 表达(免疫组织化学法 ×200)

Figure 1 PLGF expression in placental tissue of disease group and control group (immunohistochemistry ×200)

表 2 各组细胞增殖情况比较

Table 2 Comparison of cell proliferation among groups

组别	$(n = 6, \bar{x} \pm s)$				
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
正常对照组	0.69±0.08	0.98±0.11	1.43±0.28	1.65±0.40	1.93±0.41
阳性对照组	0.65±0.10	0.94±0.12	0.90±0.11	1.21±0.19	1.43±0.37
PLGF 病毒组	0.62±0.11	1.01±0.10	1.21±0.32	1.34±0.38	1.64±0.39
PLGF-shRNA 病毒组	0.71±0.12	0.91±0.13	0.75±0.13	1.07±0.33	1.16±0.45
组间			<i>F</i> 值=24.155	<i>P</i> 值<0.001	
时点间			<i>F</i> 值=89.467	<i>P</i> 值<0.001	
组间·时点间			<i>F</i> 值=5.612	<i>P</i> 值<0.001	

2.4 比色法测定各组细胞 SOD 和 MDA 含量 4 组滋养细胞 SOD 和 MDA 差异有统计学意义( $P < 0.001$ );两两比较,阳性对照组滋养细胞 SOD 低于正常对照组,MDA 高于正常对照组;PLGF 病毒组滋养细胞 SOD 低于正常对照组,高于阳性对照组,MDA 高于正常对照组,低于阳性对照组;PLGF-shRNA 病毒组滋养细胞 SOD 低于正常对照组、阳性对照组和 PLGF 病毒组,MDA 高于正常对照组、阳性对照组和 PLGF 病毒组,差异有统计学意义( $P < 0.001$ )。见表 3。

2.5 Transwell 法测定各组细胞迁移数量 正常对照组、阳性对照组、PLGF 病毒组和 PLGF-shRNA 病毒组滋养细胞迁移细胞数量分别为(148.15±32.77)个、(53.49±13.65)个、(98.22±8.44)个、(35.28±5.92)个,4 组间滋养细胞迁移细胞数量差异有统计学意义( $F = 44.621$ ,  $P < 0.001$ );两两比较,阳性对照组滋养细胞迁移细胞数量低于正常对照组,PLGF 病毒组滋养细胞迁移细胞数量低于正常对照组,高于阳性对照组,PLGF-shRNA 病毒组滋养细胞迁移细胞数量低于正常对照组、阳性对照

组、PLGF 病毒组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见图 3。

2.6 流式细胞仪测定各组细胞凋亡情况 正常对照组、阳性对照组、PLGF 病毒组和 PLGF-shRNA 病毒组滋养细胞凋亡率分别为  $(4.95 \pm 0.67)\%$ 、 $(18.55 \pm 4.73)\%$ 、 $(10.23 \pm 4.44)\%$ 、 $(25.11 \pm 4.33)\%$ , 4 组间滋养细胞凋亡率差异有统计学意义 ( $F = 31.089, P < 0.001$ ); 两两比较, 阳性对照组滋养细胞凋亡率高于正常对照组, PLGF 病毒组滋养细胞凋亡率高于正常对照组, 低于阳性对照组, PLGF-shRNA 病毒组滋养细胞凋亡率高于正常对照组、阳性对照组、PLGF 病毒组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见图 4。

义 ( $P < 0.05$ )。见图 4。

表 3 各组细胞 SOD 和 MDA 含量比较

Table 3 Comparison of SOD and MDA contents in cells among groups

组别	SOD(U/mg prot)	MDA(nmol/mg prot)
正常对照组	13.89 ± 4.53	3.71 ± 0.73
阳性对照组	2.76 ± 0.72 *	12.89 ± 3.65 *
PLGF 病毒组	8.55 ± 1.20 * #	5.09 ± 0.40 * #
PLGF-shRNA 病毒组	1.29 ± 0.63 * #△	15.20 ± 3.00 * #△
F 值	34.931	33.594
P 值	<0.001	<0.001

\* P 值 < 0.05 与正常对照组比较 # P 值 < 0.05 与阳性对照组比较 △ P 值 < 0.05 与 PLGF 病毒组比较 (SNK-q 检验)

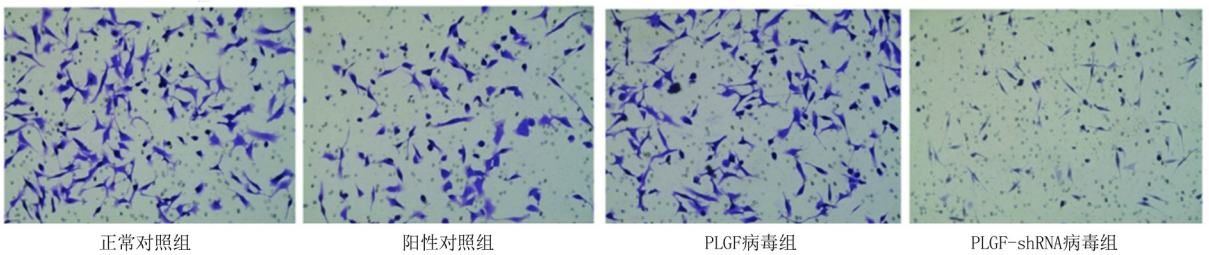


图 3 Transwell 法测定各组细胞迁移数量

Figure 3 Transwell method to determine the number of cell migration in each group

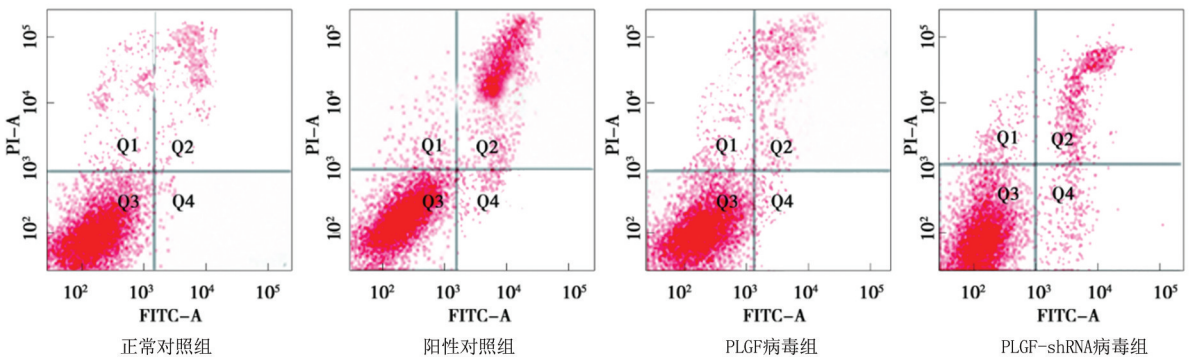


图 4 流式细胞仪测定各组细胞凋亡情况

Figure 4 Flow cytometry to measure cell apoptosis in each group

2.7 PCR 法测定 PLGF 和 ERK mRNA 表达 正常对照组、阳性对照组、PLGF 病毒组和 PLGF-shRNA 病毒组滋养细胞 PLGF mRNA 和 ERK mRNA 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); 两两比较, 阳性对照组滋养细胞 PLGF mRNA 和 ERK mRNA 低于正常对照组, PLGF 病毒组滋养细胞 PLGF mRNA 和 ERK mRNA 低于正常对照组, 高于阳性对照组, PLGF-shRNA 病毒组滋养细胞 PLGF mRNA 和 ERK mRNA 低于正常对照组、阳性对照组、PLGF 病毒组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 4。

表 4 各组 PLGF 和 ERK mRNA 表达情况比较

Table 4 Comparison of PLGF and ERK mRNA expressions among groups

组别	PLGF mRNA	ERK mRNA
正常对照组	1.29 ± 0.34	1.87 ± 0.42
阳性对照组	0.55 ± 0.13 *	0.61 ± 0.10 *
PLGF 病毒组	1.11 ± 0.19 * #	1.29 ± 0.47 * #
PLGF-shRNA 病毒组	0.31 ± 0.09 * #△	0.41 ± 0.13 * #△
F 值	28.880	22.887
P 值	<0.001	<0.001

\* P 值 < 0.05 与正常对照组比较 # P 值 < 0.05 与阳性对照组比较 △ P 值 < 0.05 与 PLGF 病毒组比较 (SNK-q 检验)

2.8 Western blot 法测定各组细胞 PLGF 和 ERK 信号通路蛋白表达情况 正常对照组、阳性对照组、

PLGF 病毒组和 PLGF-shRNA 病毒组滋养细胞 PLGF 蛋白和 ERK 蛋白差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); 两两比较, 阳性对照组滋养细胞 PLGF 蛋白和 ERK 蛋白低于正常对照组, PLGF 病毒组滋养细胞 PLGF 蛋白和 ERK 蛋白低于正常对照组, 高于阳性对照组, PLGF-shRNA 病毒组滋养细胞 PLGF 蛋白和 ERK 蛋白低于正常对照组、阳性对照组、PLGF 病毒组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 5, 图 5。

表 5 各组 PLGF 和 ERK 信号通路蛋白情况比较

Table 5 Comparison of PLGF and ERK signaling pathway proteins among groups

( $n=6, \bar{x} \pm s$ )		
组别	PLGF 蛋白	ERK 蛋白
正常对照组	1.48 ± 0.10	1.69 ± 0.17
阳性对照组	0.55 ± 0.11 *	0.47 ± 0.19 *
PLGF 病毒组	1.12 ± 0.31 * #	1.21 ± 0.32 * #
PLGF-shRNA 病毒组	0.33 ± 0.10 * # △	0.29 ± 0.09 * # △
F 值	51.707	58.179
P 值	<0.001	<0.001

\*  $P$  值 < 0.05 与正常对照组比较 #  $P$  值 < 0.05 与阳性对照组比较 △  $P$  值 < 0.05 与 PLGF 病毒组比较 (SNK- $q$  检验)

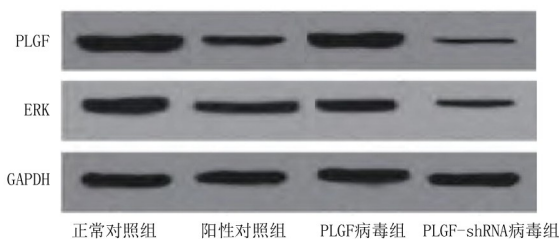


图 5 Western blot 法测定各组细胞 PLGF 和 ERK 蛋白表达情况

Figure 5 Western blot method to determine the expression of PLGF and ERK proteins in cells in each group

### 3 讨论

流行病学显示<sup>[8]</sup>, 24 万名孕产妇中, 有 10 万名患有妊娠期高血压, 其中 7 万例子痫患者, 与后代从出生到成年早期的总体病死率和各种原因特定病死率的风险增加相关。胚胎在妊娠初期的着床和随后的胎盘形成是整个妊娠过程中的 2 个至关重要的步骤, 滋养细胞扮演关键角色, 不仅帮助胚胎在子宫壁上稳固地固定, 还通过对子宫血管的重塑, 为胎儿生长提供充足的血液供应, 滋养细胞的不良侵袭和迁移与多种妊娠并发症的发生有关, 尤其是子痫前期<sup>[9-10]</sup>。现阶段大多学者认为<sup>[11-13]</sup>, 滋养细胞的功能减退导致子宫螺旋动脉的不完整重塑, 造成胎盘的血液供应不足, 进而引发子痫前期的临床症状, 但具体作用机制尚未阐明。

本研究聚焦于胎盘滋养层细胞, 特别是通过 PLGF 及其与 ERK 信号通路的相互作用, 探讨了子痫前期的发生和发展机制, 子痫前期的发病机制复杂, 涉及遗传、免疫、环境及多种生物分子网络的交互作用。Strickland 等<sup>[14]</sup>研究表明, 生化标记物如可溶性 FMS 样酪氨酸激酶 1/PLGF, 有助于先兆子痫的诊断; Savka 等<sup>[15]</sup>证实, PLGF 可通过促进血管生成在胎盘发育中发挥着至关重要的作用, 先兆子痫女性 PLGF 浓度显著低于健康孕妇, 即 PLGF 在子痫前期作用机制研究中尤为重要。本研究结果表明, 疾病组 PLGF 的表达明显低于正常对照组, 强调 PLGF 在先兆子痫诊断中的重要性, 并验证 PLGF 在胎盘发育中的关键作用。在高血压、高血糖等不良孕期条件刺激下, PLGF 低表达可能导致滋养层细胞的功能障碍, 从而影响胎盘的正常发育和孕妇的健康<sup>[16-18]</sup>。HTR-8/SVneo 细胞提供了一个有价值的模型系统, 用于研究子痫前期以及与其相关的胎盘功能异常。Pang 等<sup>[19]</sup>研究表明, 在体内研究中使用降低子宫灌注压大鼠模型 ERK 信号传导在滋养层增殖中发挥重要作用。因而, 为深入探讨 PLGF 的作用机制, 本研究引入 ERK 信号通路, 并应用 PLGF 过表达和 PLGF 干扰 RNA 技术对 HTR-8/SVneo 细胞进行转染, 结果表明, 与 PLGF-shRNA 病毒组比较, PLGF 病毒组的 ERK 活性明显增加, 细胞迁移能力增强, 细胞凋亡率降低, 细胞增殖活性提高, 分析认为, PLGF 具有促进细胞生长、迁移和存活的作用, 在多种细胞类型和疾病状态中发挥重要作用, PLGF 可激活抗氧化酶和抗氧化分子的表达, 减轻细胞内的氧自由基水平, 保护细胞免受氧化应激的损害; 并可激活抗凋亡蛋白, 抑制促凋亡蛋白, 从而减少细胞凋亡<sup>[20-21]</sup>。ERK 信号通路是丝裂原活化蛋白激酶, 主要参与细胞生长、分裂和存活等过程, 可以促进细胞骨架的重组, 通过影响细胞骨架的重组和胞外基质降解酶的表达, 调控细胞的迁移和侵袭能力, 并参与调节细胞的代谢活动, 包括糖代谢、脂质代谢等, 同时可调控凋亡相关蛋白, 抑制细胞凋亡, 从而增强细胞的存活能力<sup>[22-23]</sup>。本研究结果显示, PLGF 和 ERK 信号通路在 HTR-8/SVneo 细胞中可能有协同作用, 以促进细胞迁移、抗氧化、减少凋亡和增强增殖, 值得临床进一步研究<sup>[24]</sup>。本研究通过细胞实验深入探讨 PLGF 在子痫前期中的潜在作用机制, 发现其通过激活 ERK 信号通路, 促进滋养层细胞的生长、迁移和存活, 同时减轻氧化应激和减少细胞凋亡, 不仅为子痫前期的发病机制提供新的视角, 也为未来开发

针对该疾病的治疗策略提供理论依据。然而,子痫前期的发病机制复杂多样,PLGF 及其信号通路可能只是其中的一部分。因此,未来研究应进一步探讨 PLGF 与其他生物分子网络之间的相互作用,以及在子痫前期发病中的综合效应。尽管已有研究表明 PLGF 与胎盘功能和孕妇健康状况密切相关,但其作为治疗靶点的临床探索仍处于初步阶段,未来需更多临床试验来评估其安全性和有效性<sup>[25]</sup>。

综上所述,子痫前期的发生、发展与 PLGF 低表达相关,其高表达可改善 HTR-8/SVneo 细胞氧化应激反应,促进细胞迁移能力,减小细胞凋亡率,并增强其细胞增殖水平,与 ERK 信号通路表达有关,但关于 PLGF/ERK 信号通路在子痫前期的进展、恶化仍需进一步实验探索和验证。

#### [参考文献]

[1] Dimitriadis E, Rolnik DL, Zhou W, et al. Pre-eclampsia[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2023, 9(1): 8.

[2] Li P, Wang H, Guo L, et al. Association between gut microbiota and preeclampsia-eclampsia: A two-sample Mendelian randomization study[J]. *BMC Med*, 2022, 20(1): 443.

[3] Woo Kinshella ML, Sarr C, Sandhu A, et al. Calcium for pre-eclampsia prevention: A systematic review and network meta-analysis to guide personalised antenatal care[J]. *BJOG*, 2022, 129(11): 1833-1843.

[4] Kinshella MW, Pickerill K, Bone JN, et al. An evidence review and nutritional conceptual framework for pre-eclampsia prevention[J]. *Br J Nutr*, 2023, 130(6): 1065-1076.

[5] Chaemsaitong P, Gil MM, Chaiyasit N, et al. Accuracy of placental growth factor alone or in combination with soluble fms-like tyrosine kinase-1 or maternal factors in detecting preeclampsia in asymptomatic women in the second and third trimesters: A systematic review and meta-analysis[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2023, 229(3): 222-247.

[6] Park JI. MAPK-ERK pathway[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(11): 9666.

[7] Anis M, Gonzales J, Halstrom R, et al. Non-muscle MLCK contributes to endothelial cell hyper-proliferation through the ERK Pathway as a mechanism for vascular remodeling in pulmonary hypertension[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(21): 13641.

[8] Huang C, Wei K, Lee PMY, et al. Maternal hypertensive disorder of pregnancy and mortality in offspring from birth to young adulthood: National population based cohort study[J]. *BMJ*, 2022, 379: e072157.

[9] Jaszczuk I, Koczkodaj D, Kondracka A, et al. The role of miRNA-210 in pre-eclampsia development [J]. *Ann Med*, 2022, 54(1): 1350-1356.

[10] Stepan H, Galindo A, Hund M, et al. Clinical utility of sFlt-1 and PlGF in screening, prediction, diagnosis and monitoring of

pre-eclampsia and fetal growth restriction [J]. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2023, 61(2): 168-180.

[11] Louwen F, Kreis NN, Ritter A, et al. BCL6, a key oncogene, in the placenta, pre-eclampsia and endometriosis [J]. *Hum Reprod Update*, 2022, 28(6): 890-909.

[12] Wright D, Wright A, Magee LA, et al. Calcium supplementation for the prevention of pre-eclampsia: Challenging the evidence from meta-analyses [J]. *BJOG*, 2024, 131(11): 1524-1529.

[13] Davidson B, Rayner B, Wearne N, et al. Long-term cardio-renal-metabolic complications following pre-eclampsia [J]. *Cardiol Clin*, 2025, 43(3): 457-467.

[14] Strickland SW, Zhu Y. Biochemical markers, sFLT-1/PlGF, aid in the diagnostic odyssey of preeclampsia [J]. *J Appl Lab Med*, 2023, 8(3): 440-442.

[15] Savka RF, Mykolaiovych Berbets A, Mykhailovych Barbe A, et al. Changes in concentrations of melatonin, PlGF, and cytokines in women with preeclampsia [J]. *J Med Life*, 2023, 16(3): 471-476.

[16] Verma ML, Singh U, Yadav G, et al. Placental growth factor in first trimester of pregnancy for prediction of maternal and perinatal adverse outcomes [J]. *J Obstet Gynaecol India*, 2022, 72(5): 396-401.

[17] Gladstone RA, Ahmed S, Huszti E, et al. Midpregnancy placental growth factor screening and early preterm birth [J]. *JAMA Netw Open*, 2024, 7(11): e2444454.

[18] Rosenberg EA, Seely EW. Update on preeclampsia and hypertensive disorders of pregnancy [J]. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 2024, 53(3): 377-389.

[19] Pang H, Lei D, Huang J, et al. Elevated PGT promotes proliferation and inhibits cell apoptosis in preeclampsia by Erk signaling pathway [J]. *Mol Cell Probes*, 2023, 67: 101896.

[20] Huang D, Liu G, Xu Z, et al. The multifaceted role of placental growth factor in the pathogenesis and progression of bronchial asthma and pulmonary fibrosis: Therapeutic implications [J]. *Genes Dis*, 2022, 10(4): 1537-1551.

[21] Romero Infante XC, Uriel M, et al. First trimester placental growth factor in maternal blood and placenta related disorders [J]. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2022, 35(25): 7668-7675.

[22] Liu J, Zuo Z, Ewing M, et al. ERK pathway reactivation prevents anthrax toxin lethality in mice [J]. *Nat Microbiol*, 2025, 10(5): 1145-1155.

[23] Yakubov R, Kaloti R, Persaud P, et al. It's all downstream from here: RTK/Raf/MEK/ERK pathway resistance mechanisms in glioblastoma [J]. *J Neurooncol*, 2025, 172(2): 327-345.

[24] Liao L, Liu M, Gao Y, et al. The long noncoding RNA TARID regulates the CXCL3/ERK/MAPK pathway in trophoblasts and is associated with preeclampsia [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2022, 20(1): 159.

[25] Zerbib J, Ippolito MR, Eliezer Y, et al. Human aneuploid cells depend on the RAF/MEK/ERK pathway for overcoming increased DNA damage [J]. *Nat Commun*, 2024, 15(1): 7772.