

[文章编号] 1671-587X(2024)02-0515-08

DOI:10.13481/j.1671-587X.20240226

## 抑制 miR-151 表达对低氧条件下人绒毛膜滋养层细胞生物学行为的影响

钟黎黎, 杨春芬, 盛莹

(南华大学衡阳医学院附属第一医院产科, 湖南 衡阳 421001)

**[摘要]** **目的:** 探讨微小RNA-151 (miR-151) 对低氧条件下人绒毛膜滋养层细胞 HTR-8/SVneo 生物学行为的影响, 并阐明其可能的作用机制。**方法:** 选择 47 例子痫前期产妇 (子痫前期组) 和 36 例正常产妇 (正常组) 作为研究对象, 采用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 法检测 2 组产妇胎盘组织中 miR-151 表达水平。将 miR-151 inhibitor 及其阴性对照 inhibitor NC 转染至 HTR-8/SVneo 细胞中, 进行低氧 (1% O<sub>2</sub>) 干预 48 h, 设立对照组、低氧组、低氧+inhibitor NC 组和低氧+inhibitor 组。采用 RT-qPCR 法检测各组细胞中 miR-151 表达水平, MTT 法检测各组细胞存活率, Transwell 小室实验检测各组迁移细胞数和侵袭细胞数, Western blotting 法检测各组细胞中基质金属蛋白酶 (MMP)-2 和 MMP-9 及上皮间质转化 (EMT) 相关蛋白表达水平。采用生物信息学分析预测 miR-151 下游靶基因, 并结合 STRING 数据库对交集靶基因进行蛋白-蛋白互作 (PPI) 网络分析。**结果:** 与正常组比较, 子痫前期组产妇胎盘组织中 miR-151 表达水平明显升高 ( $P < 0.05$ )。与对照组比较, 低氧组 HTR-8/SVneo 细胞存活率、迁移细胞数和侵袭细胞数及细胞中 MMP-2、MMP-9、N-钙黏蛋白和波形蛋白表达水平明显降低 ( $P < 0.05$ ), miR-151 和 E-钙黏蛋白表达水平明显升高 ( $P < 0.05$ )。与低氧组比较, 低氧+inhibitor 组 HTR-8/SVneo 细胞中 MMP-2、MMP-9、N-钙黏蛋白和波形蛋白表达水平明显升高 ( $P < 0.05$ ), miR-151 和 E-钙黏蛋白水平明显降低 ( $P < 0.05$ ), 而低氧+inhibitor NC 组上述指标差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。生物信息学分析, miR-151 下游有 34 个潜在靶基因, 其中环指 CCCH-型锌指蛋白域蛋白 1 (RC3H1)、AGO2、AGO3、脆性 X 相关蛋白 1 (FXR1) 和转化因子 2 $\beta$  (TRA2B) 可能是关键潜在靶基因。**结论:** miR-151 在子痫前期患者胎盘组织中高表达, 下调 miR-151 表达可促进低氧条件下滋养层细胞的增殖、迁移和侵袭。

**[关键词]** 子痫前期; 滋养层细胞; 微小RNA-151; 增殖; 侵袭; 迁移

**[中图分类号]** R714.7 **[文献标志码]** A

## Effect of inhibition of miR-151 expression on biological behavior of human chorionic trophoblast cells under hypoxia condition

ZHONG Lili, YANG Chunfen, SHENG Ying

(Department of Obstetrics, First Affiliated Hospital, Hengyang Medical School, University of South China, Hengyang 421001, China)

**ABSTRACT Objective:** To discuss the effect of microRNA-151 (miR-151) on the biological behavior of

**[收稿日期]** 2023-02-20

**[基金项目]** 湖南省科技厅自然科学基金项目 (2021JJ30626); 湖南省卫健委科研项目 (202105012226)

**[作者简介]** 钟黎黎 (1984-), 女, 湖南省醴陵市人, 主治医师, 医学硕士, 主要从事围产医学相关方面的研究。

**[通信作者]** 杨春芬, 副主任医师, 硕士研究生导师 (E-mail: 294042718@qq.com)

the human trophoblast cells HTR-8/SVneo under hypoxic conditions, and to clarify the potential mechanism. **Methods:** A total of 47 parturients with preeclampsia (preeclampsia group) and 36 parturients (normal group) were selected as the research subjects. The expression level of miR-151 in placenta tissue of the subjects in two groups was detected by real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) method. The miR-151 inhibitor and its negative control inhibitor NC were transfected into the HTR-8/SVneo cells, followed by exposure to hypoxia (1% O<sub>2</sub>) for 48 h to establish control, hypoxia, hypoxia + inhibitor NC, and hypoxia + inhibitor groups. RT-qPCR method was used to detect the expression levels of miR-151 in the cells in various groups; MTT assay was used to detect the survival rates of the cells in various groups; Transwell chamber assay was used to detect the migration and invasion numbers of the cells in various groups; Western blotting method was used to detect the expression levels of matrix metalloproteinases (MMP)-2 and MMP-9, and epithelial-mesenchymal transition (EMT) related proteins in the cells in various groups; Bioinformatics analysis was used to predict the downstream target genes of miR-151, and the intersection target genes were further analyzed for protein-protein interaction (PPI) network by STRING Database. **Results:** Compared with normal group, the expression level of miR-151 in placenta tissue of the patients in preeclampsia group was significantly increased ( $P < 0.05$ ). Compared with control group, the proliferation activity, number of invasion cells, and number of migration cells of HTR-8/SVneo cells in hypoxia group were significantly decreased ( $P < 0.05$ ), the expression levels of MMP-2, MMP-9, N-cadherin, and vimentin in the cells were significantly decreased ( $P < 0.05$ ), and the expression levels of miR-151 and E-cadherin were significantly increased ( $P < 0.05$ ). Compared with hypoxia group, the expression levels of MMP-2, MMP-9, N-cadherin, and vimentin in the cells in hypoxia + inhibitor group were significantly increased ( $P < 0.05$ ); the levels of miR-151 and E-cadherin were significantly decreased ( $P < 0.05$ ); while there were no significant differences in the above indexes in hypoxia + inhibitor NC group ( $P > 0.05$ ). The bioinformatics analysis results showed that 34 potential target genes of miR-151, among which RCCCH-type zinc finger protein 1 (RC3H1), AGO2, AGO3, Fragile X related protein 1 (FXR1), and transformer 2 $\beta$  (TRA2B) may be the key potential target genes. **Conclusion:** miR-151 is highly expressed in placenta tissue of the patients with preeclampsia. The downregulation of miR-151 expression can promote the proliferation, invasion, and migration of the trophoblast cells under hypoxic conditions.

**KEYWORDS** Preeclampsia; Trophoblast cell; MicroRNA-151; Proliferation; Invasion; Migration

子痫前期是以妊娠20周后出现血压升高和蛋白尿为特征的一类疾病,严重影响孕产妇和胎儿的健康,在全球范围内占妊娠的2%~4%,每年约4.6万孕产妇和50万新生儿死亡<sup>[1-2]</sup>。目前子痫前期的病因和发病机制尚不明确,研究<sup>[2-4]</sup>表明:胎盘着床时期的滋养细胞生物学行为异常在子痫前期发病机制中起重要作用。滋养细胞的生物学表型与肿瘤细胞类似,具有较强的增殖活性及侵袭和迁移能力,但由于妊娠早期胎盘持续低氧导致滋养层细胞分化异常、侵袭不足,引起胎盘浅着床,胎盘发育异常。研究<sup>[5]</sup>显示:微小RNA(microRNA, miRNAs)在子痫前期患者胎盘内异常表达,可参与人绒毛膜滋养层细胞, HTR-8/SVneo的增殖、侵袭和迁移过程。miR-151作为miRNAs中的一员,可通过调控靶标基因影响肿瘤细胞的增殖、侵

袭和迁移过程<sup>[6]</sup>。已有研究<sup>[7]</sup>显示:miR-151在重度子痫前期患者胎盘组织中高表达,但尚无相关分子机制的研究。基于此,本研究通过检测子痫前期患者和正常产妇胎盘组织中miR-151表达情况,探讨下调miR-151表达水平对缺氧诱导HTR-8/SVneo细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响及其可能的调控靶基因,以期子痫前期的治疗提供新的靶点。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选择2018年5月—2020年4月在本院产科行剖宫产术的47例子痫前期产妇(子痫前期组)和同期36例正常妊娠产妇(正常组)作为研究对象,术中胎盘娩出4 min内,避开出血、钙化和机化区域,由母体面至胎儿面贯穿取距脐带

2 cm 处母体面胎盘组织, 置于液氮中保存备用。其中, 子痫前期组产妇年龄 ( $28.80 \pm 1.64$ ) 岁, 产妇孕周 ( $36.00 \pm 0.71$ ) 周; 正常组产妇年龄 ( $28.25 \pm 1.89$ ) 岁, 产妇孕周 ( $36.75 \pm 0.50$ ) 周。2 组产妇年龄和孕周比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 具有可比性。纳入标准: ①子痫前期诊断标准依据人民卫生出版社的《妇产科学》第 8 版<sup>[8]</sup>; ②产妇属于初产且单胎; ③除子痫前期外, 无其他并发症。排除标准: ①孕产期期间滥用药物、抽烟和酗酒等不良习惯者; ②患重要脏器功能异常者; ③免疫力低下, 对肝素过敏者; ④患生殖器官疾病者。所有研究对象均签署知情同意书, 并获得本院伦理委员会批准 (伦理审批号: NHFY2018n32)。

**1.2 细胞、主要试剂和仪器** HTR-8/SVneo 购自美国模式培养物寄存库 (ATCC); RPMI-1640 培养基、噻唑蓝 (methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)、二甲亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 和结晶紫购自美国 Sigma 公司, Lipofectamine<sup>®</sup>2000 转染试剂购自美国 Invitrogen 公司, TaqMan miRNA 反转录试剂盒和 TaqMan miRNA 定量 PCR 试剂盒购自哈尔滨新海基因检测有限公司, miR-151 inhibitor 及其阴性对照 inhibitor NC 购自广州锐博生物科技有限公司, 基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP)-2 抗体、MMP-9 抗体、E-钙黏蛋白抗体、N-钙黏蛋白抗体、波形蛋白抗体和  $\beta$ -actin 抗体购自英国 Abcam 公司, 二抗辣根过氧化物酶标记亲和纯化山羊抗兔购自美国 Santa Cruz 公司, Matrigel 基质胶和 Transwell 小室 (孔径  $8.0 \mu\text{m}$ ) 购自美国 Corning 公司;  $\text{CO}_2$  培养箱 (型号: Heracell<sup>™</sup> Vios 160i CR) 和酶标仪 (型号: Multiskan<sup>™</sup> FC) 购自美国 Thermo Fisher 公司, 超微量分光光度计 (型号: Nano-300) 购自杭州奥盛仪器有限公司, 实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR) 仪 (型号: CFX96<sup>™</sup> Touch Deep Well) 购自美国 Bio-Rad 公司, 倒置显微镜 (型号: CKX53) 购自日本 Olympus 公司。

**1.3 细胞培养及转染** 将复苏的 HTR-8/SVneo 细胞放在 RPMI-1640 培养基中, 置于培养箱内培养、消化传代, 培养条件为  $37^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$ 。取对数生长期 HTR-8/SVneo 细胞, 采用胰酶消化处理后接种于 6 孔细胞培养板 (每孔  $1 \times 10^5$  个细胞)

中, 细胞密度达到  $80\%$  时, 根据 Lipofectamine<sup>®</sup>2000 转染试剂说明书将 miR-151 inhibitor 及其阴性对照 inhibitor NC 分别转染至 HTR-8/SVneo 细胞中, 分为空白组、inhibitor NC 组和 inhibitor 组。各组细胞转染 48 h 后采用 RT-qPCR 法检测细胞中 miR-151 表达以验证转染效率。

**1.4 HTR-8/SVneo 细胞分组和处理方式** 取对数生长期 HTR-8/SVneo 细胞, 采用胰酶消化处理后接种于 6 孔细胞培养板 (每孔  $1 \times 10^5$  个细胞) 中, 细胞密度达  $80\%$  时, 以常氧条件 ( $21\% \text{O}_2 + 5\% \text{CO}_2 + 74\% \text{N}_2$ ) 培养的 HTR-8/SVneo 细胞作为常氧组, 以低氧条件 ( $1\% \text{O}_2 + 5\% \text{CO}_2 + 94\% \text{N}_2$ ) 培养的 HTR-8/SVneo 细胞作为实验组; 将转染后的 HTR-8/SVneo 细胞进行低氧干预, 分组如下: 对照组, 未经转染的 HTR-8/SVneo 细胞在常氧条件下培养 48 h; 低氧组, 未经转染的 HTR-8/SVneo 在低氧条件下培养 48 h; 低氧 + inhibitor NC 组, 转染 miR-151 inhibitor NC 的 HTR-8/SVneo 细胞在低氧条件下培养 48 h; 低氧 + miR-151 inhibitor 组, 转染 miR-151 inhibitor 的 HTR-8/SVneo 细胞在低氧条件下培养 48 h。各组细胞培养 48 h 后进行后续检测。

**1.5 RT-qPCR 法检测 2 组产妇胎盘组织和细胞中 miR-151 表达水平** 取 2 组产妇胎盘组织和细胞, 分别加入 TRIzol 试剂裂解液提取总 RNA, 采用分光光度计测定总 RNA 含量。根据 TaqMan miRNA 反转录试剂盒说明书将总 RNA 反转录成 cDNA, 采用 TaqMan miRNA 定量 PCR 试剂盒进行 PCR 扩增反应。引物序列: miR-151 上游引物  $5\text{'-CGCCTA-GACTGAAGCTCCT-3'}$ , miR-151 下游引物  $5\text{'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'}$ ; U6 (内参) 上游引物  $5\text{'-GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT-3'}$ , U6 (内参) 下游引物  $5\text{'-CGCTTCACGA-ATTTGCGTGTCAT-3'}$ 。反应条件:  $94^\circ\text{C}$  变性 5 s,  $62^\circ\text{C}$  退火 30 s,  $72^\circ\text{C}$  延伸 10 s, 扩增循环 40 次。以 U6 为内参, 采用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法计算 miR-151 表达水平。

**1.6 MTT 法检测各组细胞存活率** 取对数生长期细胞, 调整细胞悬液浓度为每毫升  $1 \times 10^5$  个细胞, 接种于 96 孔细胞培养板中, 每孔加入  $100 \mu\text{L}$ , 待细胞生长达  $80\%$  融合后分组处理, 每组设置 5 个复孔, 同时设置空白组, 于  $37^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$  条件下孵育 48 h, 每孔加入  $10 \mu\text{L}$   $0.5\%$  MTT 溶液, 继续培

养4 h,离心弃上清后每孔加入100  $\mu\text{L}$  DMSO,置摇床上低速振荡10 min,溶解结晶,采用酶标仪在490 nm波长处检测各孔的吸光度(A)值,计算细胞存活率。细胞存活率=(实验组A值-空白组A值)/(对照组A值-空白组A值) $\times 100\%$ 。

**1.7 Transwell小室实验检测各组细胞迁移细胞数和侵袭细胞数** Transwell小室下室加入含10%血清的RPMI-1640培养基,上室加入100  $\mu\text{L}$ 细胞悬液(每毫升 $1\times 10^5$ 个细胞),于37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 培养箱中培养24 h,弃去上室液体,加入800  $\mu\text{L}$ 甲醛固定30 min,弃去甲醛,加入800  $\mu\text{L}$  0.5%结晶紫溶液染色30 min,PBS缓冲液冲洗浸泡3次后取出孔膜,晾干封片,于显微镜下取5个随机视野( $\times 200$ )计数迁移细胞数。细胞侵袭实验需将Matrigel基质胶提前在4  $^{\circ}\text{C}$ 过夜融化,于Transwell小室上室底部中央垂直加入100  $\mu\text{L}$ 稀释后的Matrigel基质胶( $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ),37  $^{\circ}\text{C}$ 温育5 h形成胶状,后续实验步骤同细胞迁移实验,封片后于显微镜取5个随机视野( $\times 200$ )计数侵袭细胞数。

**1.8 Western blotting法检测各组细胞中上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)相关蛋白表达水平** 取各组细胞沉淀,加入适当体积的RIPA裂解液,冰浴30 min进行充分裂解,12 000 g离心5 min,收集上清即为总蛋白溶液,使用酶标仪测定蛋白浓度。取蛋白样品: SDS-PAGE电泳蛋白上样缓冲液为4:1的比例进行混匀,于沸水浴中变性10 min,上样选择90 V恒压进行电泳40 min,更换120 V恒压电泳80 min,转PVDF膜,TBST溶液洗膜2次,放入5%脱脂奶粉封闭液内室温摇床封闭1 h,将封闭后的膜放入杂交袋中,分别加入一抗MMP-2抗体(1:1 000)、MMP-9抗体(1:1 000)、E-钙黏蛋白抗体(1:1 000)、N-钙黏蛋白抗体(1:1 000)、波形蛋白抗体(1:1 000)和 $\beta$ -actin抗体(内参,1:1 000),于4  $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育过夜。次日,TBST溶液洗涤膜3次,加入二抗(1:10 000)室温摇床孵育1 h,TBST溶液洗涤膜3次,滴加增强型化学发光液(ECL),放置2 min后在凝胶成像系统中观察拍照。使用Image J软件进行灰度分析,计算目的蛋白表达水平。目的蛋白相对表达水平=目的蛋白条带灰度值/ $\beta$ -actin蛋白条带灰度值。

**1.9 采用生物信息学软件预测 miR-151 的靶基因** 基于 miRDB (<http://mirdb.org/>)、

TargetScan7.1 ([https://www.targetscan.org/vert\\_71/](https://www.targetscan.org/vert_71/))和mirDIP (<http://ophid.utoronto.ca/mirDIP/>)等在线软件预测 miR-151 的下游靶基因,取其共同靶基因制作韦恩图。将靶基因导入 String (<https://cn.string-db.org/>)数据库进行蛋白-蛋白互作(protein-protein interaction, PPI)网络分析,设置物种为Homo sapiens,获取各个基因节点的相互作用信息,每个节点的相对作用信息均对应一个分值,分值越高表示其置信度越高<sup>[9]</sup>,选出置信度(置信度 $>0.9$ )最高的节点作为PPI网络中的关键靶标。

**1.10 统计学分析** 采用SPSS 22.0统计软件进行统计学分析。2组产妇胎盘组织和细胞中 miR-151 表达水平,各组细胞中细胞存活率、迁移细胞数和侵袭细胞数及MMP-2、MMP-9、E-钙黏蛋白、N-钙黏蛋白以及波形蛋白表达水平均服从正态性分布,以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间样本均数比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用SNK- $q$ 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

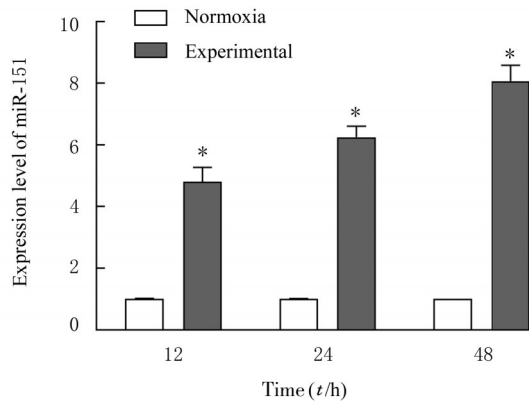
## 2 结果

**2.1 2组产妇胎盘组织中 miR-151 表达水平** 与正常组( $1.00\pm 0.02$ )比较,子痫前期组产妇胎盘组织中 miR-151 表达水平( $7.96\pm 0.54$ )明显升高( $P<0.001$ )。

**2.2 各组 HTR-8/SVneo 细胞中 miR-151 表达水平** 实验组 HTR-8/SVneo 细胞于各个低氧培养时间点的 miR-151 表达水平均较常氧组明显升高( $P<0.001$ ),且随着低氧时间的增长,HTR-8/SVneo 细胞中 miR-151 表达水平逐渐升高,但差异无统计学意义( $P>0.05$ )。见图1。

**2.3 各组细胞中 miR-151 表达水平** 与空白组( $1.00\pm 0.01$ )和inhibitor NC组( $1.00\pm 0.02$ )比较,inhibitor组 HTR-8/SVneo 细胞中 miR-151 表达水平( $0.12\pm 0.04$ )明显降低( $P<0.001$ )。与对照组( $1.00\pm 0.01$ )比较,低氧组 HTR-8/SVneo 细胞中 miR-151 表达水平( $8.01\pm 0.47$ )明显升高( $P<0.001$ );与低氧组比较,低氧+inhibitor组 HTR-8/SVneo 细胞中 miR-151 表达水平( $0.46\pm 0.12$ )明显降低( $P<0.001$ ),而低氧+inhibitor NC组 HTR-8/SVneo 细胞中 miR-151 表达水平( $7.99\pm 0.43$ )差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

**2.4 各组 HTR-8/SVneo 细胞存活率** 与对照组



\* $P < 0.001$  compared with normoxia group.

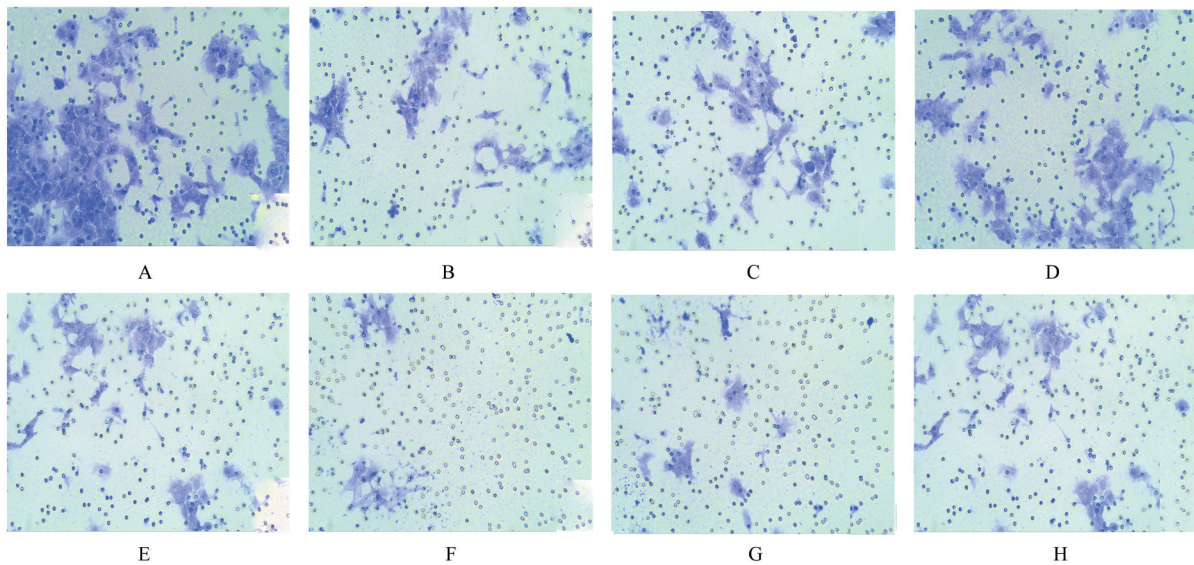
图1 各组HTR-8/SVneo中miR-151表达水平

Fig. 1 Expression level of miR-151 in HTR-8/SVneo in various groups

( $1.00 \pm 0.00$ ) 比较, 低氧组 HTR-8/SVneo 细胞存活率 ( $0.38 \pm 0.12$ ) 明显降低 ( $P < 0.001$ ); 与低氧组比较, 低氧+inhibitor 组 HTR-8/SVneo 细胞存活率 ( $0.82 \pm 0.08$ ) 明显升高 ( $P < 0.001$ ), 而低氧+inhibitor NC 组 HTR-8/SVneo 细胞存活率 ( $0.36 \pm 0.10$ ) 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

### 2.5 各组HTR-8/SVneo细胞的迁移细胞数和侵袭细胞数

与对照组比较, 低氧组 HTR-8/SVneo 细胞中迁移细胞数和侵袭细胞数明显降低 ( $P < 0.001$ ); 与低氧组比较, 低氧+inhibitor 组 HTR-8/SVneo 细胞中迁移细胞数和侵袭细胞数明显升高 ( $P < 0.001$ ), 而低氧+inhibitor NC 组 HTR-8/SVneo 细胞中迁移细胞数和侵袭细胞数差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见图2和表1。



A, E: Control group; B, F: Hypoxia group; C, G: Hypoxia+ inhibitor NC group; D, H: Hypoxia+inhibitor group.

图2 各组HTR-8/SVneo迁移(A~D)和侵袭(E~H)情况( $\times 200$ )

Fig. 2 Migration(A-D) and invasion(E-H) of HTR-8/SVneo in various groups( $\times 200$ )

### 2.6 各组HTR-8/SVneo中EMT相关蛋白表达水平

与对照组比较, 低氧组 HTR-8/SVneo 细胞中 MMP-2、MMP-9、N-钙黏蛋白和波形蛋白表达水平明显降低 ( $P < 0.001$ ), E-钙黏蛋白表达水平明显升高 ( $P < 0.001$ ); 与低氧组比较, 低氧+inhibitor 组细胞中 MMP-2、MMP-9、N-钙黏蛋白和波形蛋白表达水平明显升高 ( $P < 0.001$ ), E-钙黏蛋白表达水平明显降低 ( $P < 0.001$ ), 而低氧+inhibitor NC 组 HTR-8/SVneo 细胞上述指标差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见图3。

### 2.7 miR-151潜在靶基因预测结果

miR-151 包含

miR-151-5p 和 miR-151-3p, TargetScan7.1、miRDB 和 mirDIP 在线软件分析结果显示: miR-151 下游有 114、220 和 159 个潜在靶基因, 而三者交集有 34 个潜在靶基因; PPI 网络图分析结果显示: 环指 CCCH-型锌指蛋白域蛋白 1 (ring finger CCCH-type zinc finger protein domain protein 1, RC3H1)、真核翻译起始因子 2C2 (eukaryotic translation initiation factor 2C subunit 2, AGO2)、真核翻译起始因子 2C3 (eukaryotic translation initiation factor 2C subunit 3, AGO3)、脆性 X 相关蛋白 1 (fragile X-associated protein 1, FXR1) 和转化因子 2 $\beta$

表1 Transwell小室实验检测各组HTR-8/SVneo细胞的迁移细胞数和侵袭细胞数

Tab. 1 Numbers of migration and invasion HTR-8/SVneo cells in various groups detected by Transwell chamber assay ( $n=4, \bar{x} \pm s$ )

Group	Number of migration cells	Number of invasion cells
Control	182.00±7.72	90.00±4.93
Hypoxia	59.00±2.89*	16.00±2.06*
Hypoxia+inhibitor NC	62.00±3.70	17.00±2.87
Hypoxia+inhibitor	99.00±4.99 <sup>△</sup>	51.00±3.70 <sup>△</sup>

\* $P<0.001$  compared with control group; <sup>△</sup> $P<0.001$  compared with hypoxia group.

(conversion factor 2 $\beta$ , TRA2B) 等靶基因置信度最高, 为PPI网络中的核心靶点, 可能是关键潜在靶基因。见图4。

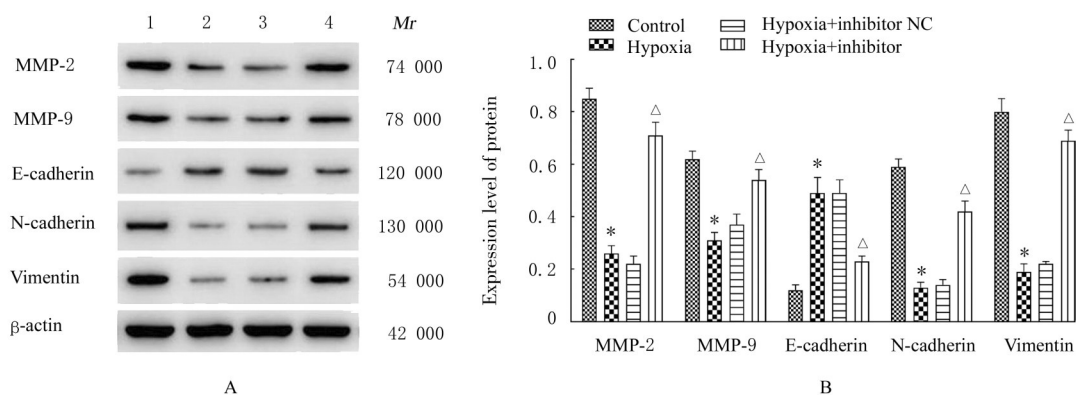
### 3 讨论

孕期对于孕妇和胎儿都是一个非常脆弱的时期, 子痫前期可导致孕妇和胎儿的病死率升高。滋养层细胞可参与胎盘的形成和妊娠的正常维持, TONG等<sup>[10]</sup>研究认为: 低氧引起的滋养层细胞生物学行为异常是引发子痫前期的主要因素。研究<sup>[11-12]</sup>证实: 长时间暴露于低氧环境下, 滋养层细胞的增殖、侵袭和迁移能力降低, 导致胎盘缺血缺氧, 引发子痫前期。因此, 本研究推测滋养层细胞的生物学行为对于阐明子痫前期的发病机制及治疗效果有重大意义。本研究通过低氧诱导HTR-8/

SVneo, 结果显示: 低氧时间延长, HTR-8/SVneo中miR-151的表达水平持续升高, 明显高于正常HTR-8/SVneo, 与子痫前期患者胎盘组织中miR-151表达结果一致, 推测miR-151与子痫前期的发生发展存在相关性。

miR-151作为疾病的诊断工具, 对多种细胞的生物学行为均发挥促进或者抑制作用<sup>[13]</sup>。ZHANG等<sup>[14]</sup>研究显示: miR-151过表达可通过靶向肌动蛋白结合蛋白抑制人胶质瘤细胞的增殖、迁移和侵袭。HUANG等<sup>[15]</sup>研究显示: 抑制miR-151-3p活性以促进MEX-3 RNA结合家族成员C(MEX3 RNA binding protein family C, MEX3C)表达, 从而提高卵巢癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力。同时, miR-151在子痫前期患者胎盘组织中呈高表达<sup>[16]</sup>, 但目前暂无研究表明miR-151对滋养层细胞的生物学行为的影响。本研究通过脂质体转染法下调HTR-8/SVneo细胞中miR-151的表达, 结果显示: 下调miR-151表达可促进低氧条件下HTR-8/SVneo增殖、侵袭和迁移能力。

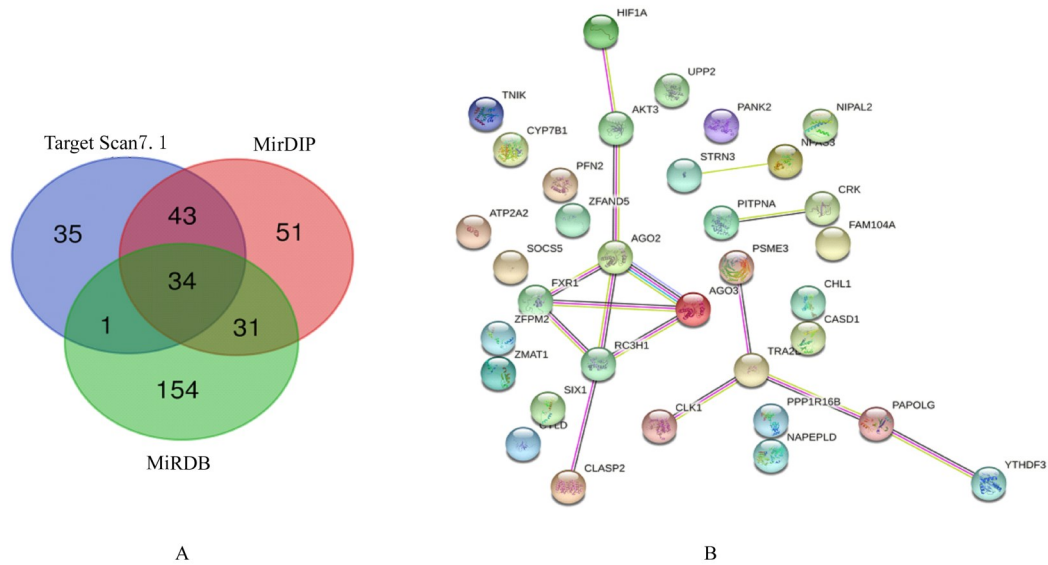
EMT作为细胞迁移和侵袭的关键步骤, 研究<sup>[17]</sup>表明: 间充质标志物(波形蛋白和N-钙黏蛋白)的上调可诱导EMT, 而上皮标志物E-钙黏蛋白(细胞侵袭抑制剂)的上调可抑制EMT。MMPs对滋养层细胞的侵袭能力也有作用, 如MMP-2和MMP-9通过对细胞外基质的降解从而影响侵袭能力<sup>[18]</sup>。研究<sup>[19-20]</sup>显示: 在子痫前期, 滋养层细胞增殖、侵袭和迁移能力降低时, MMP-2和MMP-9蛋白表达水平也降低, 且EMT过程被



Lane 1: Control group; Lane 2: Hypoxia group; Lane 3: Hypoxia+inhibitor NC group; Lane 4: Hypoxia+inhibitor group. \* $P<0.001$  compared with control group; <sup>△</sup> $P<0.001$  compared with hypoxia group.

图3 各组HTR-8/SVneo中EMT相关蛋白表达电泳图(A)和直条图(B)

Fig. 3 Electrophoresis (A) and histogram (B) of expressions of EMT-related proteins in HTR-8/SVneo in various groups



A: Online database prediction of downstream target genes of miR-151-3p; B: STRING website for PPI analysis.

图4 miR-151-3p下游靶基因筛选

Fig. 4 Screening of downstream target genes of miR-151-3p

抑制, 与本研究中期细胞检测结果一致。进一步研究发现: 下调 miR-151 表达可显著升高低氧条件下 HTR-8/SVneo 细胞中 MMP-2、MMP-9、N-钙黏蛋白和波形蛋白表达水平, 同时降低 E-钙黏蛋白的表达水平。提示 miR-151 通过调控滋养层细胞 EMT 促进细胞增殖、侵袭和迁移能力, 但其作用靶点尚不清楚。

本研究应用生物信息学的方法预测 miR-151 的下游靶基因, 发现共有 34 个潜在靶基因, 其中 RC3H1、AGO2、AGO3、FXR1 和 TRA2B 等靶基因可能是 miR-151 关键潜在靶基因。研究<sup>[21-24]</sup>显示: RC3H1、AGO2、AGO3、FXR1 和 TRA2B 与 miRNA 及蛋白存在相互作用, 通过调节各种分子机制 (免疫平衡、miRNA 活性和细胞的生物学行为等), 如 miR-202-5p 通过靶向 FXR1 的 3'UTR 反向调节 FXR1 的表达, 使 FXR1 敲低从而诱导 HTR-8/SVneo 的增殖、迁移和侵袭。本研究虽然确定了潜在靶基因, 但未进行双荧光素酶实验验证 miR-151 和靶基因的靶向调控关系, 仍需进一步探索。

综上所述, miR-151 在子痫前期产妇胎盘组织中高表达, 下调 miR-151 表达可促进低氧条件下滋养层细胞的增殖、侵袭和迁移, 推测 miR-151 有望成为子痫前期的治疗新靶点。

#### 利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

#### 作者贡献声明:

钟黎黎负责大部分实验和文章撰写, 杨春芳负责文章构思、设计和修改; 盛莹负责统计学分析、部分实验和试剂采购。

#### [参考文献]

- [1] OPICHKA M A, RAPPELT M W, GUTTERMAN D D, et al. Vascular dysfunction in preeclampsia [J]. *Cells*, 2021, 10(11):3055.
- [2] QUITTERER U, ABDALLA S. Pathological AT1R-B2R protein aggregation and preeclampsia [J]. *Cells*, 2021, 10(10):2609.
- [3] DING H L, DAI Y M, LEI Y, et al. Upregulation of CD81 in trophoblasts induces an imbalance of Treg/Th17 cells by promoting IL-6 expression in preeclampsia [J]. *Cell Mol Immunol*, 2019, 16 (1): 302-312.
- [4] WANG Y Y, ZHOU R, ZHOU B, et al. Overexpression of heparanase is associated with preeclampsia by inhibiting invasion of trophocytes [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(10):18107-18114.
- [5] 钟黎黎, 盛莹, 郭江虹, 等. 过表达 miR-198 通过靶向调控 Wnt2B 表达抑制滋养细胞 HTR-8/SVneo 的增殖、转移与侵袭 [J]. *现代妇产科进展*, 2021, 30(2): 100-105.
- [6] LI X, LIU Y, ZHANG X X, et al. Circular RNA

- hsa\_circ\_0000073 contributes to osteosarcoma cell proliferation, migration, invasion and methotrexate resistance by sponging miR-145-5p and miR-151-3p and upregulating NRAS[J]. *Aging*, 2020, 12(14):14157-14173.
- [7] XU P, ZHAO Y Y, LIU M, et al. Variations of microRNAs in human placentas and plasma from preeclamptic pregnancy[J]. *Hypertension*, 2014, 63(6):1276-1284.
- [8] 谢 幸, 苟文丽. 妇产科学[M]. 8版. 北京:人民卫生出版社, 2013:64-72.
- [9] 刘鑫旭, 吴嘉瑞, 张 丹, 等. 基于网络药理学的生脉散作用机制分析[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(16):219-226.
- [10] TONG W, GIUSSANI D A. Preeclampsia link to gestational hypoxia[J]. *J Dev Orig Health Dis*, 2019, 10(3):322-333.
- [11] 徐 曼, 安泓润, 郝媛媛. 抑制miR-152对低氧诱导子痫前期滋养细胞增殖凋亡侵袭能力的影响及机制[J]. *山东医药*, 2021, 61(13):37-41.
- [12] CHAUDHARY P, BABU G S, SOBTI R C, et al. HGF regulate HTR-8/SVneo trophoblastic cells migration/invasion under hypoxic conditions through increased HIF-1 $\alpha$  expression via MAPK and PI3K pathways [J]. *J Cell Commun Signal*, 2019, 13(4):503-521.
- [13] LIMA C R, GOMES C C, SANTOS M F. Role of microRNAs in endocrine cancer metastasis[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2017, 456:62-75.
- [14] ZHANG W X, NIU H H, WANG R Z, et al. MicroRNA-151 regulates the growth, drug sensitivity and epithelial mesenchymal transition of human glioma cells by targeting profilin 2[J]. *Acta Biochim Pol*, 2022, 69(1):147-153.
- [15] HUANG K J, LIU D, SU C L. Circ\_0007841 accelerates ovarian cancer development through facilitating MEX3C expression by restraining miR-151-3p activity [J]. *Aging*, 2021, 13(8):12058-12066.
- [16] ZHU L B, LIU Z Q. Serum from patients with hypertension promotes endothelial dysfunction to induce trophoblast invasion through the miR-27b-3p/ATPase plasma membrane Ca<sup>2+</sup> transporting 1 axis[J]. *Mol Med Rep*, 2021, 23(5):319.
- [17] LEE D Y, SONG M Y, KIM E H. Trefoil factor 1 suppresses epithelial- mesenchymal transition through inhibition of TGF-beta signaling in gastric cancer cells[J]. *J Cancer Prev*, 2021, 26(2):137-144.
- [18] 任艳芳, 姜永杰, 张秀玲, 等. SHH信号通路对子痫前期患者滋养细胞凋亡和侵袭的影响及其机制[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2018, 44(3):510-515.
- [19] PENG P P, SONG H M, XIE C H, et al. miR-146a-5p-mediated suppression on trophoblast cell progression and epithelial-mesenchymal transition in preeclampsia [J]. *Biol Res*, 2021, 54(1):30.
- [20] WANG L K, LI Y G. MiR-29b-3p affects growth and biological functions of human extravillous trophoblast cells by regulating bradykinin B2 receptor[J]. *Arch Med Sci*, 2022, 18(2):499-522.
- [21] ZHEN X X, YANG L, GU Y, et al. MNSF $\beta$  regulates TNF $\alpha$  production by interacting with RC3H1 in human macrophages, and dysfunction of MNSF $\beta$  in decidual macrophages is associated with recurrent pregnancy loss[J]. *Front Immunol*, 2021, 12:691908.
- [22] PARK M S, SIM G, KEHLING A C, et al. Human Argonaute2 and Argonaute3 are catalytically activated by different lengths of guide RNA[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020, 117(46):28576-28578.
- [23] PAUDEL D, OUYANG Y Q, HUANG Q T, et al. Expression of TRA2B in endometrial carcinoma and its regulatory roles in endometrial carcinoma cells[J]. *Oncol Lett*, 2019, 18(3):2455-2463.
- [24] ZHANG Z H, WANG Y P. Over-expression of long non-coding RNA NORAD promotes trophoblastic cell viability, migration, and invasion in preeclampsia via the miR-202-5p/FXR1 axis[J]. *Taiwan J Obstet Gynecol*, 2022, 61(2):255-264.