DOI:10.16016/j.1000-5404.202006084

LncRNA HIF1A-AS2 通过抑制 miR-138-5p 促进滋养层细胞的侵袭和上皮间充质转化

李 勤[1],许娟秀[2],尧 旋[2] 330006 南昌,江西省妇幼保健院:产科[1],肿瘤科[2]

[摘要] **目的** 研究长链非编码 RNA(long non-coding RNA,lncRNA)缺氧诱导因子-1α-反义链 2(hypoxia-inducible factor 1 alpha antisense RNA 2,HIF1A-AS2)对滋养层细胞侵袭和上皮间充质转化(epithelial-mesenchymal transition,EMT)的作用和机制。**方法** 比较 20 个子痫前期(preeclampsia,PE)胎盘(PE 组)和 20 个正常胎盘(对照组)组织中 HIF1A-AS2 及其预测的靶基因 miR-138-5p 的表达水平。选用人绒毛膜滋养层细胞系 HTR-8/Svneo,在转染 HIF1A-AS2 过表达质粒、miR-138-5p 拟似物和抑制物及各自阴性对照的 HTR-8/SVneo 细胞中,通过 CCK-8 检测细胞增殖、Transwell 实验检测侵袭、Western blot 检测细胞 EMT 标记分子和转录因子表达来研究 HIF1A-AS2 和 miR-138-5p 对滋养层细胞的作用和机制。通过荧光素酶基因报告实验验证 HIF1A-AS2 和 miR-138-5p 的结合关系。**结果** PE 胎盘中 HIF1A-AS2 显著降低($P<0.05$),而 miR-138-5p 的表达显著增高($P<0.05$)。过表达 HIF1A-AS2 能够抑制 miR-138-5p 的表达($P<0.05$),促进 HTR-8/SVneo 细胞的侵袭能力($P<0.05$),上调 EMT 标记分子 Vimentin 和 N-cadherin 以及 EMT 转录因子 Twist1 的表达水平($P<0.05$)。此外,miR-138-5p 抑制物与过表达 HIF1A-AS2 对 HTR-8/SVneo 细胞的作用相同,而 miR-138-5p 拟似物能够减弱过表达 HIF1A-AS2 对该细胞的作用。另外,HIF1A-AS2 和 miR-138-5p 在 HTR-8/Svneo 细胞中可以直接结合。**结论** LncRNA HIF1A-AS2 能够促进滋养层细胞的侵袭和上皮间充质转化,其作用可能通过抑制 miR-138-5p 水平来实现。

[关键词] 滋养层细胞;LncRNA HIF1A-AS2;miR-138-5p;侵袭;上皮间充质转化
[中图法分类号] R363.21;R394.3;R714.245 [文献标志码] A

LncRNA HIF1A-AS2 promotes trophoblast invasion and epithelial-mesenchymal transformation by inhibiting miR-138-5p

LI Qin[1], XU Juanxiu[2], YAO Xuan[2] [1]Department of Obstetrics, [2]Department of Oncology, Jiangxi Maternal and Child Health Hospital, Nanchang, Jiangxi Province, 330006, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect and underlying mechanism of long non-coding RNA (lncRNA) hypoxia-inducible factor 1 alpha antisense RNA 2 (HIF1A-AS2) on trophoblast invasion and epithelial-mesenchymal transition (EMT). **Methods** The mRNA levels of HIF1A-AS2 and its predicted targering miR-138-5p in the placental tissues of preeclampsia (PE) patients (PE group, $n=20$) and normal placental tissues (control group, $n=20$) were detected with qRT-PCR. Human chorionic trophoblast cell line HTR-8/SVneo (epithelial-like cells with adherent growth) were employed to be transfected with HIF1A-AS2 overexpression plasmid, and/or miR-138-5p mimic, miR-138-5p inhibitor as well as theirs corresponding negative controls. Then the cell proliferation, cell invasion and protein expression of EMT-associated molecules (Vimentin and N-cadherin) and EMT-transcription factor (Twist1) were measured by CCK-8 assay, Transwell assay, and Western blotting, respectively. The binding relationship between HIF1A-AS2 and miR-138-5p was verified by luciferase gene reporter assay. **Results** The mRNA level of HIF1A-AS2 was significantly decreased, while that of miR-138-5p was markedly increased in the PE placental tissues, compared with the normal placental tissues ($P<0.05$). Over-expression of HIF1A-AS2 obviously inhibited the expression of miR-138-5p, promoted cell invasion and enhanced the expression of Vimentin, N-cadherin, and Twist1 in the HTR-8/SVneo cells ($P<0.05$). The effects of miR-138-5 inhibitor showed similar effects on HTR-8/

[通信作者] 许娟秀,E-mail: juanxiu_xjx@163.com

Svneo cells that of over-expression of HIF1A-AS2, but these effects of the overexpression on HTR-8/Svneo cells could be weakened when miR-138-5p mimic was introduced. Furthermore, the direct bonding between HIF1A-AS2 and miR-138-5p was identified in HTR-8/SVneo cells. **Conclusion** LncRNA HIF1A-AS2 promotes trophoblast invasion and EMT, which may be fulfilled by its inhibition on the expression of miR-138-5p.

[**Key words**] trophoblast cells; LncRNA hypoxia-inducible factor 1 alpha antisense RNA 2; miR-138-5p; invasion; epithelial-mesenchymal transformation

Corresponding author: XU Juanxiu, E-mail: juanxiu_xjx@163.com

子痫前期(preeclampsia,PE)是一种发生于妊娠20周后的妊娠并发症,特征是血压升高、尿蛋白质升高,可导致严重的母婴危害。研究发现胎盘滋养层细胞低侵袭能力和上皮间充质转化(epithelial-mesenchymal transition,EMT)功能减弱与PE的发病机制均有关[1-2]。

非编码RNA如长链非编码RNA(long non-coding RNA,lncRNA)和微小RNA(microRNA,miRNA)可能参与调控PE的发生、发展。LncRNA是一类长度大于200 nt的非编码RNA,大量证据证明lncRNA可以通过扮演“分子海绵”的作用吸附miRNA,从而减少miRNA[3];miRNA是一类高度保守的短链的(20~25 nt)非编码RNA,主要通过与靶基因mRNA的3′-非翻译区的碱基对的结合从而负向调控靶基因表达,导致mRNA降解和翻译抑制[4]。越来越多的证据表明,miRNA及lncRNA与多种疾病的发病过程相关。例如,lncRNA和miRNA异常表达可能影响细胞凋亡、增殖、分化、衰老[5];在肿瘤发生、发展过程中,lncRNA和miRNA的表达增高或降低均可通过调节下游抑癌或促癌靶基因调控肿瘤的进展[6];且深入研究表明,癌细胞EMT和转移相关基因如基质金属蛋白酶9(matrix metalloproteinase 9,MMP-9)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)、钙黏蛋白(E-cadherin)、神经钙黏附蛋白(N-cadherin)同样可被lncRNA和miRNA所调控[7-8]。

有证据表明,lncRNA及miRNA的异常表达还与PE的发生有关[8-9]。LncRNA和miRNA表达谱均显示PE胎盘组织中存在大量差异表达的lncRNA和miRNA[10-11]。这些差异表达的lncRNA和miRNA可能参与PE的发生。LncRNA缺氧诱导因子-1α-反义链2(hypoxia-inducible factor 1 alpha antisense RNA 2,HIF1A-AS2)已被证实与多种肿瘤的进展相关,包括乳腺癌[12]、结直肠癌[13]、膀胱癌[14]等,其能调节肿瘤细胞的侵袭能力。PE的发病机制与滋养层细胞低侵袭能力和EMT功能减弱相关,然而HIF1A-AS2是否参与调控PE发生相关细胞的侵袭鲜有报道。我们通过生物信息学预测发现,HIF1A-AS2与miRNA miR-138-5p序列存在结合位点,其可能扮演“分子海绵”从而吸附miR-138-5p发挥作用。本研究旨在研究HIF1A-AS2及miR-138-5p在PE胎盘组织中水平的变化,两者变化对滋养层细胞侵袭和EMT的影响,以及滋养层细胞中两者的调控和结合关系,以期为PE的防治提供潜在的研究靶点。

1 材料与方法

1.1 样本来源

胎盘组织样本来源于2016年1月至2019年1月在我院生产的40例剖宫产初产妇。基于诊断标准[15],其中有20例产妇患有PE。在剖宫产手术中,从坏死区以外的胎盘裂片中收集胎盘组织,液氮冷冻后保存于-80 ℃。每位受试者无其他妊娠并发症,例如心脏病,妊娠前的高血压,糖尿病和肾病,亦无吸烟史。表1列出了对照组和PE组初产妇的一般资料和基线数据。本研究所有试验经我院伦理委员会于2015年11月批准。每位研究对象均获得知情同意。

1.2 细胞培养

本研究选用的人绒毛膜滋养层细胞系HTR-8/Svneo是猿猴病毒40大T抗原基因(simian virus 40 large T antigen gene,SV40T)转染人孕早期胎盘的绒毛膜绒毛外植体生长的细胞衍生来的细胞系,细胞形态呈上皮样,贴壁生长,多用于滋养层生物学及胎盘功能研究。在Dulbecco改良的Eagle's培养基/F12(DMEM/F12,Sigma, St Louis, MO)中培养HTR-8/SVneo细胞(ATCC),内含100 U/mL青霉素以及链霉素抗生素、10%胎牛血清。细胞培养于37 ℃、5% CO_2的湿润培养箱中。待细胞达到约90%融合度时,进行传代。

1.3 实时定量PCR(quantitative Real-time PCR,qRT-PCR)

根据制造商的说明,RNA提取试剂盒(TaKaRa, Shiga, Japan)用于从细胞和组织中提取总RNA。RNA的质量通过分光光度计(Jenway Ltd,Essex,UK)检测260/280 nm下的光密度值D(260/280)进行检验。2%的琼脂糖凝胶通过电泳用于检查RNA的完整性。采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$方法对相对mRNA的水平进行计算,3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase,GAPDH)作为内参基因。此外,使用Mir-X™ MirS

首链合成和 SYBR® RT-qPCR(Clontech Laboratories, Inc., CA, USA)试剂盒检测 miRNA,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算相对水平,使用 U6 作为 miRNA 的内参基因。HIF1A-AS2 引物:正向 5′-TCTGTGGCTCAGTTCCTTTTGT-3′,反向 5′-ATGTAGGAAGTGCCAGAGCC-3′;miR-138-5p 引物:正向 5′-GCTTAAGGCACGCGG-3′,反向,5′-GTGCAGGGTCCGAGG-3′;U6 引物:正向 5′-CTCGC-TTCGGCAGCACATATACTA-3′,反向 5′-ACGAATTTGCGTGTCATCCTTGCG-3′;GAPDH 引物:正向 5′-ACCCACTCCTCCACCTTTGAC-3′,反向 5′-TGTTGCTGTAGCCAAATTCGTT-3′。

1.4 细胞转染

miR-138-5p 的拟似物(miR-138-5p 拟似物组)和抑制剂(miR-138-5p 抑制物组)及二者的阴性对照(拟似物-NC,抑制物-NC)均从 Genecopoeia(中国,广州)购买。HIF1A-AS2 的真核表达质粒 pcDNA3.1-HIF1A-AS2(pcHIF1A-AS2)及其阴性对照 pcDNA3.1-Null(pcNull)通过 Sangon Biotech(中国,上海)购买。根据制造商的说明,均以 Lipofectamine 2000(Invitrogen, Carlsbad,CA,美国)转染到 HTR-8/SVneo 细胞中。

1.5 Western blot 检测

使用添加蛋白酶抑制剂的 RIPA 缓冲液提取细胞总蛋白。以十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质样本,然后将胶上的蛋白条带电转移到聚偏二氟乙烯膜中。经过含 5%脱脂牛奶的洗膜缓冲液(Tris Buffered Saline Tween,TBST)封闭后。使用的第一抗体如下:波形蛋白(Vimentin,ab92547,Abcam),N-cadherin(ab18203,Abcam),人 Twist 相关蛋白 1(Twist1,ab175430,Abcam)和 GAPDH(ab181602,Abcam)。之后,使用抗小鼠 IgG(H+L)-HRP 偶联抗体(1∶10 000,Invitrogen)或山羊抗兔抗体(1∶5 000,Invitrogen)进行孵育,并使用凝胶成像系统进行拍照。使用 Image J 软件分析相对蛋白表达水平。

1.6 CCK-8 检测细胞增殖

在 96 孔板中加入细胞,每孔 5×10^3 个细胞。在 2、8、16 h 和 24 h 进行 CCK-8 检测。培养时使用含有 100 μL 的 CCK-8 培养基(DOJINDO,日本)。使用 Varioskan™ 闪存微孔板读数器(Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)分析培养 2 h 后在 450 nm 波长下的光密度值 $D(450)$,计算每个时间点下 3 个重复孔的平均光密度值。

1.7 Transwell 侵袭实验

将 2×10^4 个细胞加入到铺有 Martrigel 滤膜的 Transwell 小室中,培养基为含 20%胎牛血清的 DMEM/F12。此外,在 37 ℃下培养细胞,细胞在 24 h 内进入 Matrigel 滤膜屏障。95%的苏木精溶液与乙醇一起用于固定和染色侵袭细胞。此后,使用棉签清除未侵袭的细胞。通过显微镜观察,对染色细胞进行计数用以评估细胞侵袭指数。使用光学显微镜(Nikon, Tokyo, Japan)捕获图像。

1.8 荧光素酶基因报告实验

使用 Starbase 2.0 预测并获取与 miR-138-5p 相互结合的 HIF1A-AS2 序列,并预测目标位点内的突变序列(http://starbase.sysu.edu.cn/mirLncRNA.php)。将获得的序列插入到 pGL3 载体(Promega, Madison, WI, USA)的 XbaI/FseI 位点。以 HIF1A-AS2 为模板,扩增 HIF1A-AS2 及其突变体(HIF1A-AS2-mut)。DharmFECT Duo 转染试剂(Thermo Fisher Scientific, Glasgow, UK)用于荧光素酶活性分析。随后,根据制造商的要求,使用双荧光素酶测定系统(Promega)进行荧光素酶测定。

1.9 统计学分析

采用 SPSS 10.0 统计软件进行分析,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。对照组和 PE 组两组间的数据比较采用 t 检验。采用单因素方差分析及 SNK-Q(Student-Newman-Keuls Q)检验进行多组间比较。检验水准 $\alpha=0.05$。

2 结果

2.1 两组初产妇一般资料

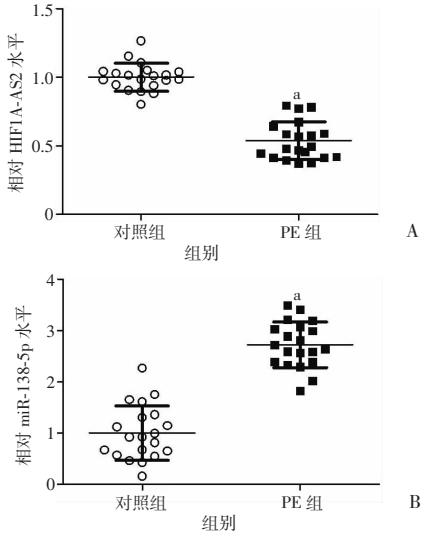
与对照组相比,PE 组初产妇的收缩压和舒张压及蛋白尿水平升高($P<0.05$)。其他基线数据两组间差异无统计学意义($P>0.05$,表 1)。

2.2 两组胎盘组织中 HIF1A-AS2 及 miR-138-5p 水平比较

通过 RT-qPCR 检测 HIF1A-AS2 和 miR-138-5p 在两组胎盘组织中的水平,结果显示与对照组相比,PE 组初产妇胎盘组织中 HIF1A-AS2 相对水平降低(图 1A),miR-138-5p 水平升高(图 1B),差异均具有统计学意义($P<0.05$)。

表 1 PE 组与对照组初产妇一般资料比较($n=20,\bar{x}\pm s$)

组别	年龄/岁	胎龄/周	收缩压/mmHg	舒张压/mmHg	蛋白尿/g·24 h^{-1}
对照组	28.37±1.07	37.41±1.10	110.40±8.28	72.50±4.97	
PE 组	27.96±0.89	36.96±0.95	145.40±10.10	107.65±7.62	2.10±0.13
P	0.196	0.175	<0.05	<0.05	<0.05

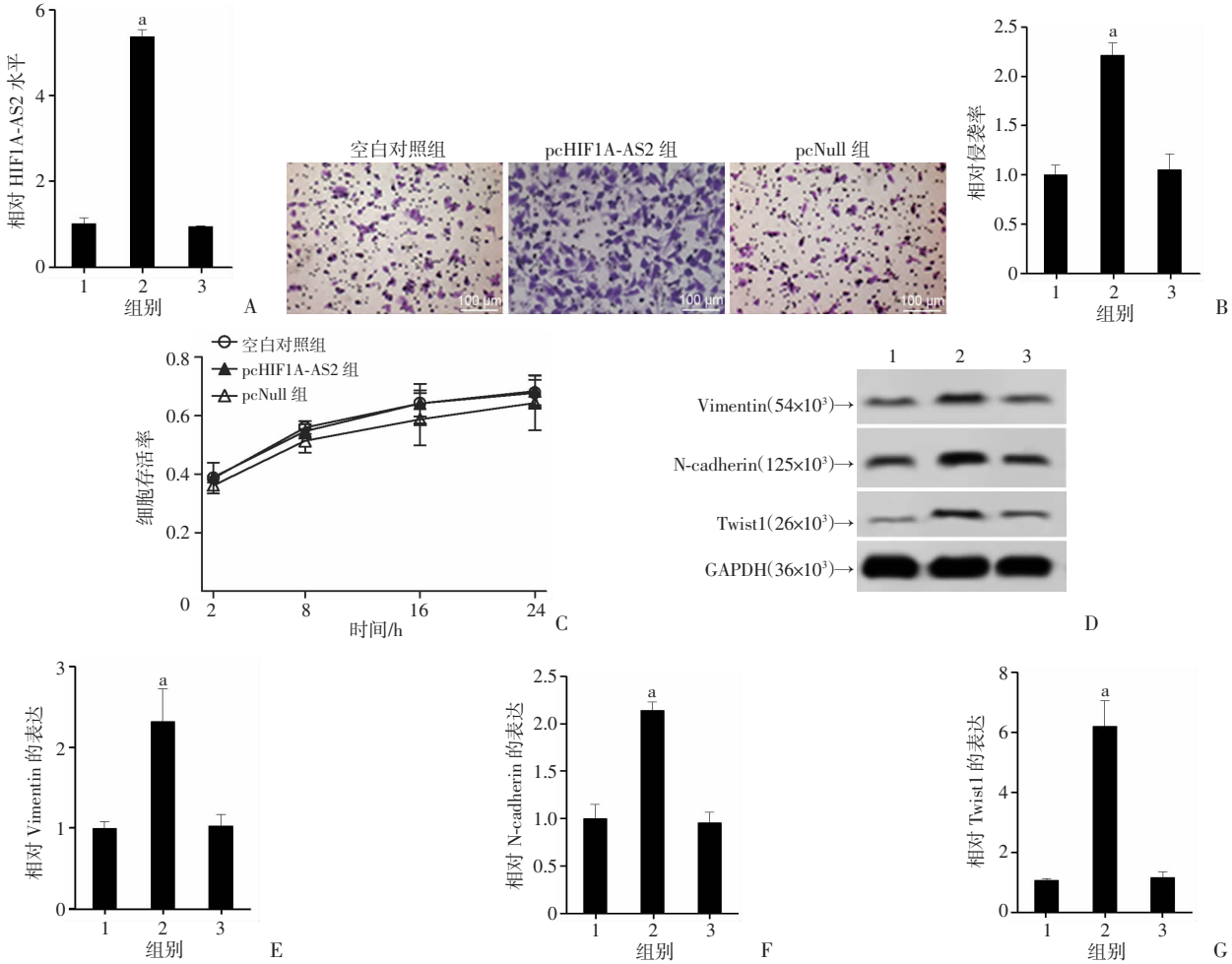


A:相对 HIF1A-AS2 水平;B:相对 miR-138-5p 水平　a:$P<0.05$,与对照组比较

图 1　PE 组和对照组初产妇胎盘组织中 HIF1A-AS2 和 miR-138-5p 的表达水平($n=20$)

2.3　HIF1A-AS2 上调促进 HTR-8/SVneo 细胞侵袭和 EMT

将 pcHIF1A-AS2 及其阴性对照 pcNull 转染到 HTR-8/SVneo 细胞中。转染 48 h 后,检测结果显示 HIF1A-AS2 水平在 pcHIF1A-AS2 组明显增高,证实转染成功($P<0.05$,图 2A)。转染 72 h 后,以 Transwell 实验检测细胞侵袭,结果显示 pcHIF1A-AS2 组中细胞相对侵袭率高于空白对照组及 pcNull 组($P<0.05$,图 2B)。应用 CCK-8 实验检测 HIF1A-AS2 对细胞增殖的影响,结果显示,pcHIF1A-AS2 转染后,细胞增殖无变化($P>0.05$,图 2C)。Western blot 检测结果显示,与空白对照组及 pcNull 组相比,EMT 相关分子 Vimentin、N-cadherin 及 Twist1 在 pcHIF1A-AS2 组中的表达水平升高($P<0.05$,图 2D~G)。上述结果表明,HIF1A-AS2 上调能够促进 HTR-8/SVneo 细胞侵袭和 EMT。



1:空白对照组;2:pcHIF1A-AS2 组;3:pcNull 组;A:相对 HIF1A-AS2 水平;B:HTR-8/SVneo 细胞侵袭率与统计结果;C:HTR-8/SVneo 细胞存活率;D:Western blot 检测 EMT 相关分子表达;E:相对 Vimentin 的表达;F:相对 N-cadherin 的表达;G:相对 Twist1 的表达　a:$P<0.05$,与空白对照组及 pcNull 组比较($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

图 2　HIF1A-AS2 对 HTR-8/SVneo 细胞侵袭和上皮间充质转化(EMT)的影响

2.4 miR-138-5p 抑制物转染促进 HTR-8/SVneo 细胞侵袭和 EMT

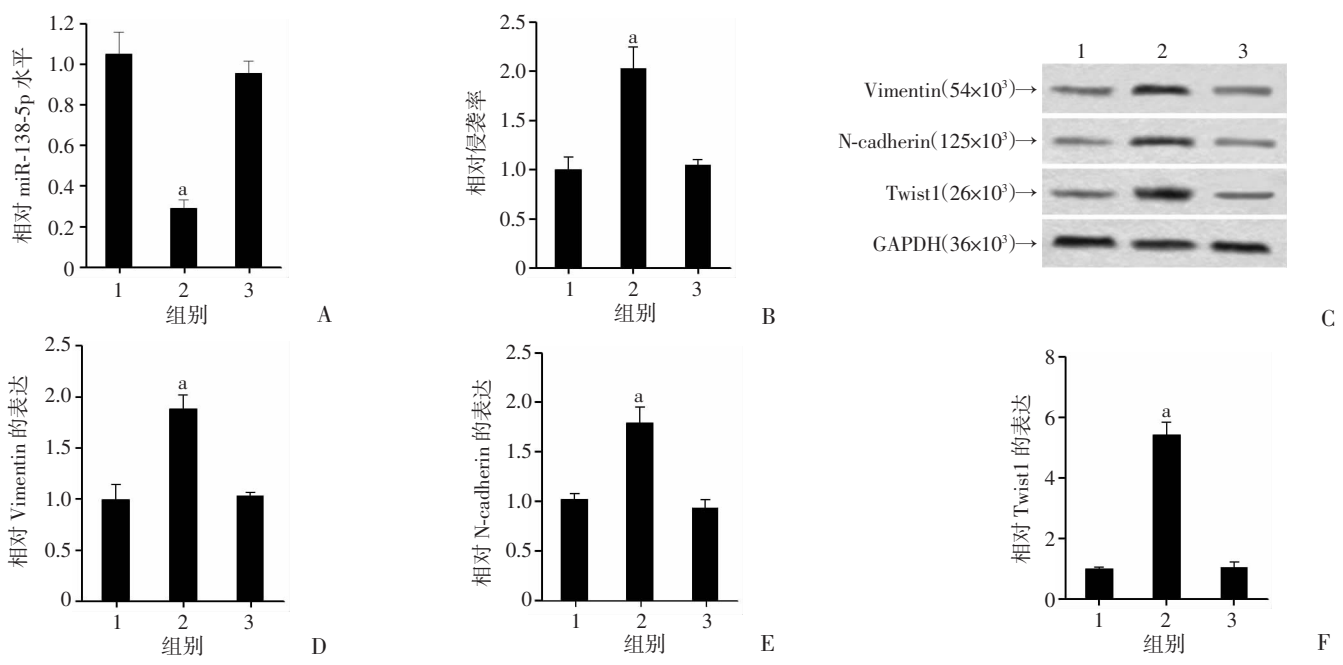
将 miR-138-5p 抑制物及其阴性对照抑制物-NC 转染到 HTR-8/SVneo 细胞中。转染 48 h 后，miR-138-5p 水平在 miR-138-5p 抑制物组降低，证实转染成功（$P<0.05$，图 3A）。转染 72 h 后，Transwell 实验结果显示 miR-138-5p 抑制物组中细胞相对侵袭率高于空白对照组及抑制物-NC 组（$P<0.05$，图 3B）。与空白对照组及抑制物-NC 组相比，EMT 相关分子 Vimentin、N-cadherin 及 Twist1 在 miR-138-5p 抑制物组中的表达水平升高，差异均具有统计学意义（图 3C~F，$P<0.05$）。上述结果显示，miR-138-5p 抑制物转染能促进 HTR-8/SVneo 细胞侵袭和 EMT。

2.5 miR-138-5p 拟似物逆转 HIF1A-AS2 对 HTR-8/SVneo 细胞侵袭和 EMT 的促进作用

将 HTR-8/SVneo 细胞以 pcHIF1A-AS2 和/或 miR-138-5p 拟似物共转染。转染 48 h 后，miR-138-5p 水平在 miR-138-5p 拟似物组升高，证实转染成功（$P<0.05$）。同时，pcHIF1A-AS2 转染能够导致 miR-138-5p 水平显著降低（$P<0.05$，图 4A），并且该作用在引入 miR-138-5p 拟似物后得以部分逆转（$P<0.05$）。此外，复测结果显示，由 pcHIF1A-AS2 转染引发的细胞侵袭增加和 EMT 相关分子（Vimentin、N-cadherin、Twist1）表达增加，在 miR-138-5p 拟似物+pcHIF1A-AS2 组中均得以减弱（$P<0.05$，图 4B~F）。上述结果显示，HIF1A-AS2 通过抑制 miR-138-5p 水平促进滋养层细胞的侵袭和 EMT。

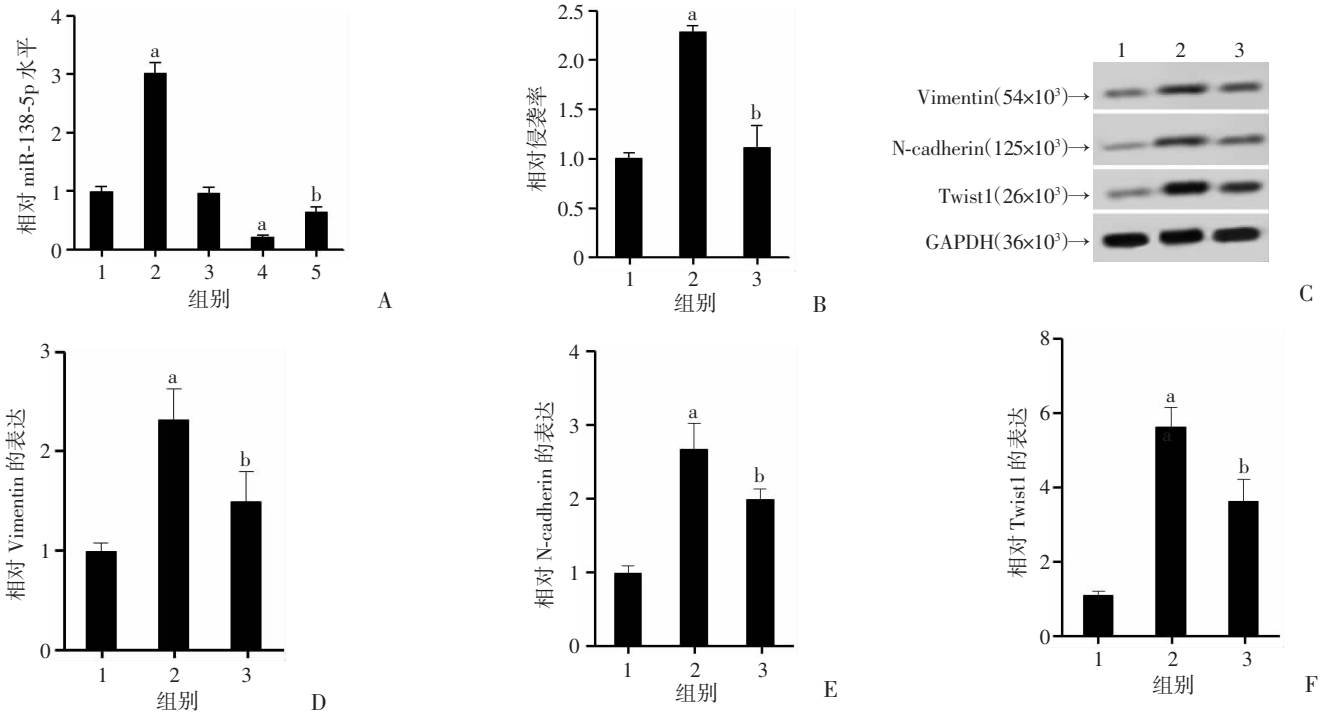
2.6 HTR-8/Svneo 细胞中 HIF1A-AS2 与 miR-138-5p 直接结合

通过生物信息学软件预测发现 HIF1A-AS2 和 miR-138-5p 可能存在结合位点（图 5A）。采用荧光素酶基因报告实验研究两者之间的结合关系，发现野生型 HIF1A-AS2 可以抑制 miR-138-5p 的荧光素酶活性，差异具有统计学意义（$P<0.05$，图 5B）。结果表明，HIF1A-AS2 和 miR-138-5p 在 HTR-8/Svneo 细胞中可以直接结合。



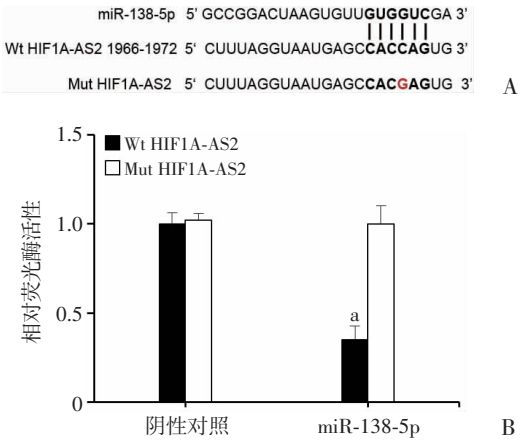
1：空白对照组；2：miR-138-5p 抑制物组；3：抑制物-NC 组；A：相对 miR-138-5p 水平；B：HTR-8/SVneo 细胞侵袭率；C：Western blot 检测 EMT 相关分子表达；D：相对 Vimentin 的表达；E：相对 N-cadherin 的表达；F：相对 Twist1 的表达　a：$P<0.05$，与空白对照组及抑制物-NC 组比较（$n=3$，$\bar{x}\pm s$）

图 3　miR-138-5p 抑制物转染对 HTR-8/SVneo 细胞侵袭和 EMT 的影响



A:相对 miR-138-5p 水平　1:空白对照组;2:miR-138-5p 拟似物组;3:拟似物-NC 组;4:pcHIF1A-AS2 组;5:miR-138-5p 拟似物+pcHIF1A-AS2 组;B:HTR-8/SVneo 细胞侵袭率　1:空白对照组;2:pcHIF1A-AS2 组;3:miR-138-5p 拟似物+pcHIF1A-AS2 组;C:Western blot 检测 EMT 相关分子表达　1:空白对照组;2:pcHIF1A-AS2 组;3:miR-138-5p 拟似物+pcHIF1A-AS2 组;D:相对 Vimentin 的表达　1:空白对照组;2:pcHIF1A-AS2 组;3:miR-138-5p 拟似物+pcHIF1A-AS2 组; E:相对 N-cadherin 的表达　1:空白对照组;2:pcHIF1A-AS2 组;3:miR-138-5p 拟似物+pcHIF1A-AS2 组;F:相对 Twist1 的表达　1:空白对照组;2:pcHIF1A-AS2 组;3:miR-138-5p 拟似物+pcHIF1A-AS2 组　a:$P<0.05$,与空白对照组或拟似物-NC 组比较;b:$P<0.05$,与 pcHIF1A-AS2 组比较($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

图 4　miR-138-5p 拟似物逆转 HIF1A-AS2 对 HTR-8/SVneo 细胞侵袭和 EMT 的促进作用



A:HIF1A-AS2 和 miR-138-5p 的预测结合序列;B:相对荧光素酶活性　a:$P<0.05$,与 Mut HIF1A-AS2 比较

图 5　HIF1A-AS2 和 miR-138-5p 在 HTR-8/Svneo 细胞中直接结合　($n=3$,$\bar{x}\pm s$)

3　讨论

PE 发生初期,滋养层细胞的侵袭和 EMT 特性异常减弱,这很可能与 lncRNA 和 miRNA 的异常表达和功能失调有关[16-17]。本研究中,HIF1A-AS2 水平在 PE 组织中异常降低,且外源性增加 HIF1A-AS2 水平可显著促进 HTR-8/Svneo 细胞的侵袭和 EMT 标志物表达。此外,miR-138-5p 拟似物的引入能够减弱 HIF1A-AS2 水平升高对 HTR-8/Svneo 细胞侵袭及 EMT 的促进作用。另外,我们发现 HTR-8/Svneo 细胞中,HIF1A-AS2 能够显著抑制 miR-138-5p 水平,且两者可以直接结合。因此,本研究得出以下结论,HIF1A-AS2 能够通过抑制 miR-138-5p 水平促进滋养层细胞的侵袭和 EMT 进程,可能有利于预防 PE 的发生。

对于哺乳动物而言,胎盘是母胎之间必不可少的纽带,其支持着胎儿的生长和发育。胎盘功能下降会导致各种妊娠并发症,例如 PE 的发生引起母体高血

压、蛋白尿、母体血管功能障碍以及对胎儿生长发育的长期不利影响。目前,尚无法明确 PE 的发病原因。然而,PE 的发病机制存在多种理论假说,例如,滋养层细胞的浸润性下降[18]、胎盘功能下降[19]、滋养层细胞凋亡增加[20]、内皮细胞功能障碍[21]和子宫螺旋动脉重塑受损[22]。在这些假说中,滋养层细胞迁移和侵袭的降低作用可能最令人信服[18]。既往研究中,HIF1A-AS2 多被发现能够促进肿瘤细胞的迁移和侵袭能力[12-14],本研究特别发现 HIF1A-AS2 对滋养层细胞侵袭及 EMT 也具有调节作用,使 HIF1A-AS2 有望成为 PE 防治的潜在研究靶点。

绒毛外滋养层细胞(extrayillous trophoblast,EVTs)在子宫内膜内迁移、浸润子宫蜕膜、螺旋动脉重塑等过程中起重要作用,其在妊娠过程中为胎儿提供适当的营养和氧气供应[23-24]。在增殖、凋亡、迁移和侵袭能力方面,滋养层细胞也表现出与癌细胞非常相似的表型[25],例如滋养层细胞的 EMT 在迁移和侵袭功能获得过程中同样发挥重要作用[26]。在本研究中,我们探索了其潜在的分子机制,发现与正常妊娠初产妇相比,PE 初产妇胎盘组织中 HIF1A-AS2 水平异常下调。外源性增加 HIF1A-AS2 水平可有效促进滋养层细胞的侵袭能力,上调 EMT 标志物 Vimentin、N-cadherin 以及 EMT 诱导转录因子 Twist1 的表达。提示 HIF1A-AS2 是一种重要的调节分子,其降低可能主要参与调节 PE 发生过程中滋养层细胞 EMT 和浸润活性的抑制功能,HIF1A-AS2 水平异常降低可能是一种关键的潜在的 PE 诊断指标。

MiRNA 对胎盘的正常发育非常重要[27]。研究表明,胎盘表达的 miRNA 首先由滋养层细胞产生[28]。这些差异表达的 miRNA 可以导致胎盘功能受损并导致 PE 发生。有学者报道 miR-138-5p 能够抑制多种肿瘤细胞的侵袭功能和 EMT[29-30]。在本研究中,我们证实,与正常初产妇胎盘组织相比,PE 初产妇胎盘组织中的 miR-138-5p 水平显著增加。而 miR-138-5p 拟似物引入对 HIF1A-AS2 作用的减弱效果,表明 miR-138-5p 可能是一种关键的促 PE miRNA,其水平增加可能会导致 PE 的发生。

LncRNA 发挥功能的关键途径之一是吸附目标 miRNA 从而发挥“分子海绵”的作用,进一步可能影响下游功能靶基因的表达和功能[31]。例如 DLX6-AS1 是一种在 PE 胎盘组织表达上调的 lncRNA,且 DLX6-AS1 的序列可直接与 miR-376c 结合发挥“分子海绵”的作用,进而下调 miR-376c 的水平并抑制滋养细胞的迁移和侵袭[32]。HIF1A-AS2 能够通过吸附 miR-153-3p 促进缺氧诱导因子-1α 上调,进而促进低氧条件下人脐静脉内皮细胞的血管生成[33]。在脂肪干细胞中,HIF1A-AS2 被发现能够通过调节 miR-665/IL-6 轴而促进该细胞成骨分化过程[34]。本研究发现 HIF1A-AS2 不仅可以诱导滋养层细胞的侵袭和 EMT,而且可以下调 miR-138-5p 水平。另外,miR-138-5p 抑制物对滋养层细胞侵袭和 EMT 的影响趋势与过表达 HIF1A-AS2 一致,且 miR-138-5p 拟似物引入可抑制因 HIF1A-AS2 过表达所引起的滋养层细胞侵袭和 EMT 的增加。生物信息学预测显示 HIF1A-AS2 可能与 miR-138-5p 序列具有结合位点。本研究使用荧光素酶基因报告实验证实 HIF1A-AS2 的 1966-1972 序列“... CAC-CAG...”与 miR-138-5p 序列互补结合。表明 HIF1A-AS2 对 miR-138-5p 的抑制可能是直接作用。

综上所述,本研究发现,HIF1A-AS2 可能通过直接抑制 miR-138-5p 水平促进滋养层细胞的侵袭和 EMT,为 PE 的防治提供了新的潜在研究靶点。此外,本研究发现的分子调控机制尚缺乏体内相关实验研究证据,我们将在以后的研究中进一步探讨。

参考文献:

[1] JI L, BRKIĆ J, LIU M, *et al*. Placental trophoblast cell differentiation: physiological regulation and pathological relevance to preeclampsia[J]. Mol Aspects Med, 2013, 34(5): 981-1023. DOI: 10.1016/j.mam.2012.12.008.

[2] GE H S, YIN N L, HAN T L, *et al*. Interleukin-27 inhibits trophoblast cell invasion and migration by affecting the epithelial-mesenchymal transition in preeclampsia [J]. Reprod Sci, 2019, 26(7): 928-938. DOI: 10.1177/193371911879 9206.

[3] 郑伟, 董洁, 李少华, 等. LncRNA-GAS5 抑制 miR-21 介导的非完全匹配靶 mRNA 降解[J]. 生物化学与生物物理进展, 2017, 44(7): 580-590. DOI: 10.16476/j.pibb.2017.0113.

ZHENG W, DONG J, LI S H, *et al*. LncRNA-GAS5 inhibits decay of microRNA-21 imperfect complementary target mRNAs[J]. Prog Biochem Biophys, 2017, 44(7): 580-590. DOI: 10.16476/j.pibb.2017.0113.

[4] 汤丽莎, 崔毓桂. miRNA 与胎盘发育的相互功能调控及其在早期复发性流产中的研究进展[J]. 中国妇幼保健, 2017, 32(15): 3693-3696. DOI: 10.7620/zgfybj.j.issn.1001-4411.2017.15.100.

TANG L S, CUI Y G. The mutual functional regulation of miRNA and placental development and its research progress

in early recurrent abortion[J]. Matern Child Heal Care China, 2017, 32(15): 3693-3696. DOI: 10.7620/zgfybj.j.issn.1001-4411.2017.15.100.

[5] 龚勇, 谢海龙. 肿瘤中 miRNA 异常表达的分子调控机制及研究进展[J]. 临床与实验病理学杂志, 2014, 30(10): 1152-1155. DOI: 10.13315/j.cnki.cjcep.2014.10.018.
GONG Y, XIE H L. Molecular regulation mechanism and research progress of abnormal miRNA expression in tumors[J]. J Clin Exp Pathol, 2014, 30(10): 1152-1155. DOI: 10.13315/j.cnki.cjcep.2014.10.018.

[6] 祝烨, 宋鑫. miRNA 与 lncRNA 的相互调控作用在肿瘤中的研究进展[J]. 基础医学与临床, 2015, 35(11): 1554-1558. DOI: CNKI:SUN:JCYL.0.2015-11-027.
ZHU Y, SONG X. The advance of the interaction between miRNA and lncRNA in cancer reseach[J]. Basic Clin Med, 2015, 35(11): 1554-1558. DOI: CNKI:SUN:JCYL.0.2015-11-027.

[7] LI W L, JIA G T, QU Y W, *et al*. Long non-coding RNA (LncRNA) HOXA11-AS promotes breast cancer invasion and metastasis by regulating epithelial-mesenchymal transition [J]. Med Sci Monit, 2017, 23: 3393-3403.

[8] LI J L, LI R, GAO Y, *et al*. LncRNA CCAT1 promotes the progression of preeclampsia by regulating CDK4[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(5): 1216-1223. DOI: 10.26355/eurrev_201803_14461.

[9] SINGH K, WILLIAMS J III, BROWN J, *et al*. Up-regulation of microRNA-202-3p in first trimester placenta of pregnancies destined to develop severe preeclampsia, a pilot study[J]. Pregnancy Hypertens, 2017, 10: 7-9. DOI: 10.1016/j.preghy.2017.04.002.

[10] GUNEL T, HOSSEINI M K, GUMUSOGLU E, *et al*. Expression profiling of maternal plasma and placenta microRNAs in preeclamptic pregnancies by microarray technology [J]. Placenta, 2017, 52: 77-85. DOI: 10.1016/j.placenta.2017.02.019.

[11] HE X J, HE Y Y, XI B R, *et al*. LncRNAs expression in preeclampsia placenta reveals the potential role of LncRNAs contributing to preeclampsia pathogenesis[J]. PLoS ONE, 2013, 8(11): e81437. DOI: 10.1371/journal.pone.0081437.

[12] WANG Y F, ZHANG G C, HAN J. HIF1A-AS2 predicts poor prognosis and regulates cell migration and invasion in triple-negative breast cancer[J]. J Cell Biochem, 2019, 120(6): 10513-10518. DOI: 10.1002/jcb.28337.

[13] LIN J G, SHI Z H, YU Z Y, *et al*. LncRNA HIF1A-AS2 positively affects the progression and EMT formation of colorectal cancer through regulating miR-129-5p and DNMT3A [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 98: 433-439. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.12.058.

[14] CHEN M W, ZHUANG C L, LIU Y C, *et al*. Tetracycline-inducible shRNA targeting antisense long non-coding RNA HIF1A-AS2 represses the malignant phenotypes of bladder cancer[J]. Cancer Lett, 2016, 376(1): 155-164. DOI: 10.1016/j.canlet.2016.03.037.

[15] ACOG practice bulletin. ACOG practice bulletin. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia[J]. Int J Gynaecol Obstet, 2002, 77(33): 67-75. DOI: 10.1016/S0020-7292(02)80002-9.

[16] ZUO Q, HUANG S Y, ZOU Y F, *et al*. The lnc RNA SPRY4-IT1 modulates trophoblast cell invasion and migration by affecting the epithelial-mesenchymal transition[J]. Sci Rep, 2016, 6(1): 37183. DOI: 10.1038/srep37183.

[17] RAHNAMA F, SHAFIEI F, GLUCKMAN P D, *et al*. Epigenetic regulation of human trophoblastic cell migration and invasion[J]. Endocrinology, 2006, 147(11): 5275-5283. DOI:10.1210/en.2006-0288.

[18] LIANG W, SONG W, XIE Y, *et al*. miR-181a-5p suppresses invasion and migration of HTR-8/SVneo cells by directly targeting IGF2BP2[J]. Cell Death Dis, 2018, 9(2): 16. DOI: 10.1038/s41419-017-0045-0.

[19] MA Y, KONG L R, GE Q, *et al*. Complement 5a-mediated trophoblasts dysfunction is involved in the development of pre-eclampsia[J]. J Cell Mol Med, 2018, 22(2): 1034-1046. DOI: 10.1111/jcmm.13466.

[20] NIU Z R, HAN T, SUN X L, *et al*. MicroRNA-30a-3p is overexpressed in the placentas of patients with preeclampsia and affects trophoblast invasion and apoptosis by its effects on IGF-1[J]. Am J Obstet Gynecol, 2018, 218(2): 249.e1-249.e12. DOI:10.1016/j.ajog.2017.11.568.

[21] GRANGER J P, SPRADLEY F T, BAKRANIA B A. The endothelin system: A critical player in the pathophysiology of preeclampsia[J]. Curr Hypertens Rep, 2018, 20(4): 32. DOI: 10.1007/s11906-018-0828-4.

[22] AHMED A, REZAI H, BROADWAY-STRINGER S. Evidence-based revised view of the pathophysiology of preeclampsia[J]. Adv Exp Med Biol, 2017, 956: 355-374. DOI: 10.1007/5584_2016_168.

[23] PAIVA P, SALAMONSEN L A, MANUELPILLAI U, *et al*. Interleukin 11 inhibits human trophoblast invasion indicating a likely role in the decidual restraint of trophoblast invasion during placentation[J]. Biol Reprod, 2009, 80(2): 302-310. DOI:10.1095/biolreprod.108.071415.

[24] CANIGGIA I, WINTER J, LYE S J, *et al*. Oxygen and pla-

cental development during the first trimester: implications for the pathophysiology of pre-eclampsia[J]. Placenta, 2000, 21: S25-S30. DOI: 10.1053/plac.1999.0522.

[25] ZOU Y F, JIANG Z Y, YU X, *et al*. Upregulation of long noncoding RNA SPRY4-IT1 modulates proliferation, migration, apoptosis, and network formation in trophoblast cells HTR-8SV/neo[J]. PLoS ONE, 2013, 8(11): e79598. DOI: 10.1371/journal.pone.0079598.

[26] KOKKINOS M I, MURTHI P, WAFAI R, *et al*. Cadherins in the human placenta-epithelial-mesenchymal transition (EMT) and placental development[J]. Placenta, 2010, 31(9): 747-755. DOI: 10.1016/j.placenta.2010.06.017.

[27] CHELOUFI S, DOS SANTOS C O, CHONG M M W, *et al*. A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires ago catalysis[J]. Nature, 2010, 465(7298): 584-589. DOI: 10.1038/nature09092.

[28] HROMADNIKOVA I, DVORAKOVA L, KOTLABOVA K, *et al*. Circulating heat shock protein mRNA profile in gestational hypertension, pre-eclampsia & foetal growth restriction[J]. Indian J Med Res, 2016, 144(2): 229-237. DOI: 10.4103/0971-5916.195037.

[29] LI D D, HE C J, WANG J F, *et al*. MicroRNA-138 inhibits cell growth, invasion, and EMT of non-small cell lung cancer *via* SOX4/p53 feedback loop[J]. Oncol Res, 2018, 26(3): 385-400. DOI: 10.3727/096504017x14973124850905.

[30] ZHAO L, YU H B, YI S J, *et al*. The tumor suppressor miR-138-5p targets PD-L1 in colorectal cancer[J]. Oncotarget, 2016, 7(29): 45370-45384. DOI: 10.18632/oncotarget.9659.

[31] LIZ J, ESTELLER M. lncRNAs and microRNAs with a role in cancer development[J]. Biochim et Biophys Acta, 2016, 1859(1): 169-176. DOI: 10.1016/j.bbagrm.2015.06.015.

[32] TAN Y, XIAO D, XU Y B, *et al*. Long non-coding RNA DLX6-AS1 is upregulated in preeclampsia and modulates migration and invasion of trophoblasts through the miR-376c/GADD45A axis[J]. Exp Cell Res, 2018, 370(2): 718-724. DOI: 10.1016/j.yexcr.2018.07.039.

[33] LI L J, WANG M Y, MEI Z J, *et al*. lncRNAs HIF1A-AS2 facilitates the up-regulation of HIF-1α by sponging to miR-153-3p, whereby promoting angiogenesis in HUVECs in hypoxia[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 96: 165-172. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.09.113.

[34] WU R Y, RUAN J H, SUN Y J, *et al*. Long non-coding RNA HIF1A-AS2 facilitates adipose-derived stem cells (ASCs) osteogenic differentiation through miR-665/IL6 axis via PI3K/Akt signaling pathway[J]. Stem Cell Res Ther, 2018, 9(1): 1-13. DOI: 10.1186/s13287-018-1082-z.

(**收稿**:2020-06-09;**修回**:2020-08-28)

(编辑 王 红)