doi:10.11659/jjssx.02E016050

SHBG 基因在人滋养细胞凋亡中的作用

息小雪,练思宇,金 镇,孙 磊,孙 倩,冯 冲,王 越,张 宝 (中国医科大学附属盛京医院妇产科,辽宁 沈阳 110004)

[摘 要] **目的** 研究性激素结合球蛋白(SHBG)基因在人滋养细胞凋亡中的作用。**方法** 用不同 siRNA 干扰沉默人滋养细胞 SHBG 基因的表达并分为 6 组,即正常对照组未经转染(Ⅰ组)、空白对照组仅转染脂质体(Ⅱ组)、阴性对照组转染 Nonspecific siRNA(Ⅲ组)、转染组分别转染 SHBGsiRNA-Ⅰ、SHBGsiRNA-Ⅱ、SHBGsiRNA-Ⅲ(Ⅳ、Ⅴ、Ⅵ组),然后通过 Hoechst 33258 染色检测人滋养细胞凋亡情况,Real-time PCR 和 Western blot 测定 SHBG mRNA 及蛋白和凋亡相关抗体 Caspase-3 mRNA 及蛋白的表达水平。**结果** Ⅰ组、Ⅱ组、Ⅲ组 SHBG 和 Caspase-3 mRNA 及蛋白表达水平组间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。Ⅳ组、Ⅴ组、Ⅵ组 SHBG 和 Caspase-3 mRNA 及蛋白表达水平组间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。与Ⅰ组、Ⅱ组、Ⅲ组比较,Ⅳ组、Ⅴ组、Ⅵ组 SHBG mRNA 和蛋白表达量明显下调,Caspase-3 mRNA 及蛋白表达水平升高,滋养层细胞凋亡增加,差异均具有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 采用 siRNA 干扰技术能够降低人滋养细胞中 SHBG 基因表达量,导致人滋养细胞凋亡。

[关键词] siRNA 干扰;人滋养细胞;SHBG 基因;凋亡
[中图分类号] R711.7 [文献标识码] A [收稿日期] 2016-03-27

Effect of SHBG gene on the apoptosis of human trophoblastic cells

XI Xiao-xue, LIAN Si-yu, JIN Zhen, SUN Lei, SUN Qian, FENG Chong, WANG Yue, ZHANG Bao (Department of Gynaecology and Obstetrics, Shengjing Hospital Affiliated to China Medical University, Shenyang Liaoning 110004, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of sex hormone-binding globulin (SHBG) gene in the apoptosis of human trophoblastic cells. **Methods** The siRNA specific-targeting SHBG gene was transfected into human trophoblastic cells and they were divided into six groups: trophoblasts without transfection in normal control groups (group Ⅰ); transfect liposome in blank control groups (group Ⅱ); transfect nonspecific siRNA in negative control groups (group Ⅲ); transfect SHBG siRNA-Ⅰ, SHBG siRNA-Ⅱ, SHBG siRNA-Ⅲ respectively in transfection group (group Ⅳ, Ⅴ, Ⅵ). Hoechst 33258 dying method was used to detect cell apoptosis. SHBG and Caspase-3 mRNA profiling and the level of SHBG and caspase-3 protein were detected by real-time PCR and Western blot. **Results** There was no statistical significant difference in the gene expression and protein level of SHBG and caspase-3 in group Ⅰ, Ⅱ and Ⅲ ($P>0.05$). In Ⅳ, Ⅴ and Ⅵ group, there was no statistical significant difference in the expression level of SHBG and caspase 3 ($P>0.05$). Compared with group Ⅰ, Ⅱ and Ⅲ, the amount of SHBG gene expression decreased obviously, the caspase-3 mRNA and protein level increased obviously and the trophoblast cell apoptosis increased markedly ($P<0.05$). **Conclusion** Through siRNA interference technology can reduce SHBG gene expression in human trophoblastic cells, and it can lead to excessive apoptosis of human trophoblasts cells.

Keywords: siRNA interference; human trophoblastic cells; SHBG gene; apoptosis

性激素结合球蛋白(sex hormone binding globulin, SHBG)是主要由肝细胞合成和分泌的一种多功能球蛋白,在运输激素和调节细胞功能上发挥着重要作用[1]。研究显示 SHBG 在母体血清和胎盘中的低表达可能在诱发或加重妊娠期糖尿病方面有重要作用[2-3]。控制 SHBG 水平不仅可以早期预测妊娠期糖尿病的发生,而且能够评定妊娠期糖尿病发生的时间和程度。然而能否通过沉默 SHBG 基因的表达来研究其对妊娠期糖尿病的影响,目前尚未见相关报道。因此,本研究采用siRNA干扰技术将SHBG基因沉默,以降低其在人滋养细胞中的表达,并进一步研究 SHBG 基因沉默在人滋养细胞凋亡中的作用。

[基金项目] 国家自然科学基金(81170591,81300511)
[通信作者] 金 镇,E-mail:jinzhen66@aliyun.com

1 资料与方法

1.1 材料及试剂

人滋养细胞 HTR8-SVneo 细胞由加拿大多伦多大学 Graham 教授赠送;脂质体 Lipofectamin 购自美国 Invitrogen 公司;SHBG-western blot 兔抗人一抗购自碧云天公司;Caspase-3-western blot 兔抗人一抗购自北京博奥森公司;Hoechst 33258 染色试剂盒购自北京博奥森公司。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 HTR8-SVneo 细胞以 2×10^5/mL ~

3×10^5/mL 接种在 6 孔板中,在 37 ℃室温,5% CO_2 培养箱中培养,用不同 siRNA 干扰技术沉默人滋养细胞 SHBG 基因的表达并分为 6 组,即正常对照组未经转染(Ⅰ组)、空白对照组仅转染脂质体(Ⅱ组)、阴性对照组转染 Nonspecific siRNA(Ⅲ组)、转染组分别转染 SHBGsiRNA-Ⅰ、SHBGsiRNA-Ⅱ、SHBGsiRNA-Ⅲ(Ⅳ、Ⅴ、Ⅵ组)。

1.2.2 siRNA 转染步骤 采用体外化学合成法合成 siRNAs 序列:根据 GenBank 中 SHBG cDNA 的序列号 NM_001040.3,设计 3 对 SHBG siRNAs 序列及 1 对 Nonspecific siRNA,具体序列见表 1。采用 BLAST 检查 siRNA 序列以确保基因和其他基因无同源性,并用实验筛选特异性 siRNA。

表 1 不同 siRNAs 序列

序列名称	序列(5'-3')	靶位点
SHBGsiRNA-Ⅰ	sense strand: 5'-GCUGUGAUGUAGAAUCAAATT-3'	SHBG-homo-683
	antisense strand: 5'-AUCCUCAUGAUGGGAUGGCTT-3'	
SHBGsiRNA-Ⅱ	sense strand: 5'-CUCAGGCAGAAUUCAAUCUTT-3'	SHBG-homo-728
	antisense strand: 5'-AGAUUGAAUUCUGCCUGAGTT-3'	
SHBGsiRNA-Ⅲ	sense strand : 5'-GCCAUCCCAUCAUGAGGAUTT-3'	SHBG-homo-527
	antisense strand: 5'-UUUGAUUCUACAUCACAGCTT-3'	
Nonspecific siRNA	sense strand: 5'-UCUAAGCGAGAAUUCGUACC-3'	
	antisense strand: -5' ACGUGACACGUUCGGAUAAU-3'	

1.2.3 Real-time PCR 检测 SHBG mRNA 表达 按照试剂盒说明书步骤进行细胞 RNA 提取并扩增,内参为人 GAPDH。其中 SHBG 上游引物序列为 5'-CTGAGATCCAACTGCACAATCACT-3',下游引物序列为 5'-ATCCACCTCCAGCAGCACA-3'。

1.2.4 Western blot 检测 SHBG 蛋白表达 收集各组细胞并提取细胞总蛋白,在上样缓冲液加入等量蛋白,煮沸,在 SDS 聚丙烯酰胺凝胶中电泳后,电转至 PVDF 膜,封闭 2 h,加入一抗兔抗人 SHBG(1∶200)或 GAPDH 4 ℃过夜。加入二抗后室温孵育 90 min。洗膜后加入 ECL 1 min,凝胶成像,内参为人 GAPDH。

1.2.5 Hoechst 33258 染色检测细胞凋亡 HTR8-SVneo 细胞以 2×10^5/mL ~ 3×10^5/mL 接种在 6 孔板中并标记,当贴壁率达 90% 以上后转染不同 siRNA 并培养 24 h。加入 100 μl 的 4% 多聚甲醛固定 15 min。PBS 洗 1 ~ 2 次。加入 100 μl Hoechst 33258 染液,使用冷的 PBS 洗 1 ~ 2 次。

1.2.6 Real-time PCR 及 Western blot 方法测定凋亡相关抗体 caspase-3 的表达 方法同 1.2.3 和 1.2.4。其中 caspase-3 上游引物序列为 5'-ATGGAGAAACAATAAAACCT-3',下游引物序列为 5'-CTAGTGATAAAAGTAGAGTTC-3'。

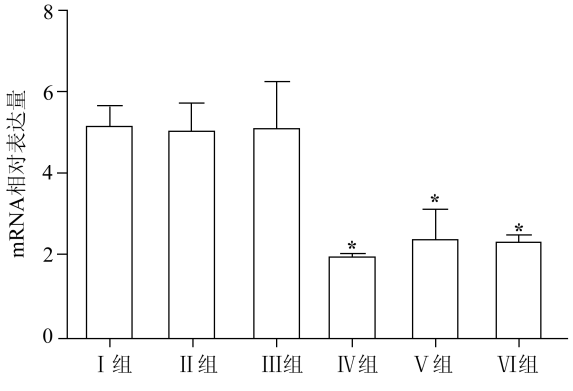
1.3 统计学分析

采用 SPSS 19.0 进行统计学处理,组间比较采用两独立样本 t 检验,$P<0.05$ 表示差异有统计学意义;$P<0.01$ 表示差异具有极显著性统计学意义。

2 结果

2.1 SHBG 的 Real-time PCR 结果

6 组的人滋养细胞于转染后 24 h 检测 SHBG mRNA 基因的表达,结果显示:siRNA 转染前后对正常对照组(Ⅰ组)、空白对照组(Ⅱ组)、阴性对照组(Ⅲ组)SHBG mRNA 的相对表达均无显著影响。与Ⅰ组、Ⅱ组和Ⅲ组比较,Ⅳ组、Ⅴ组、Ⅵ组在 siRNA 转染后,SHBG mRNA 表达水平均降低,差异具有极显著性统计学意义($P<0.01$),见图 1。

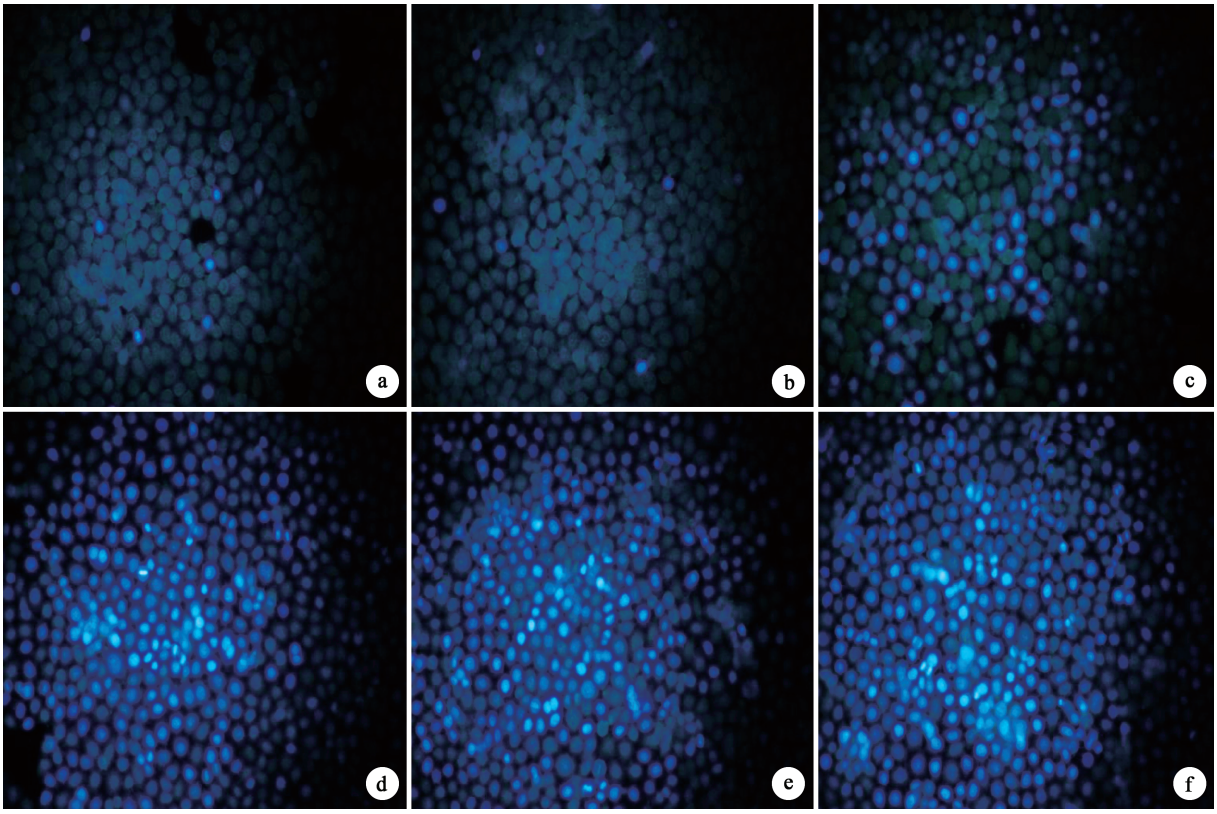


*:与Ⅰ组比较,$P<0.01$

图 1 各组 SHBG mRNA 的相对表达

2.2 Hoechst 33258 染色检测细胞凋亡结果

凋亡细胞的细胞核呈碎片状或致密浓染。Ⅳ、Ⅴ、Ⅵ组细胞凋亡率明显高于Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ组,见图 2。



a:Ⅰ组;b:Ⅱ组;c:Ⅲ组;d:Ⅳ组;e:Ⅴ组;f:Ⅵ组

图 2 各组细胞 Hoechst 33258 染色(×100)

2.3 SHBG Western blot 检测结果

Ⅰ组、Ⅱ组和Ⅲ组 SHBG 蛋白表达水平组间比较差异无统计学意义($P>0.05$),Ⅳ组、Ⅴ组、Ⅵ组 SHBG 蛋白表达水平组间比较差异无统计学意义($P>0.05$),Ⅳ组、Ⅴ组、Ⅵ组与Ⅰ组、Ⅱ组、Ⅲ组进行比较,SHBG 蛋白表达水平均降低,差异具有统计学意义($P<0.05$),见图 3。

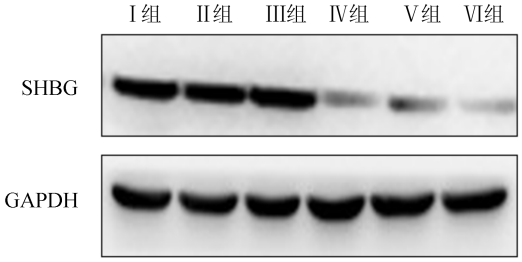


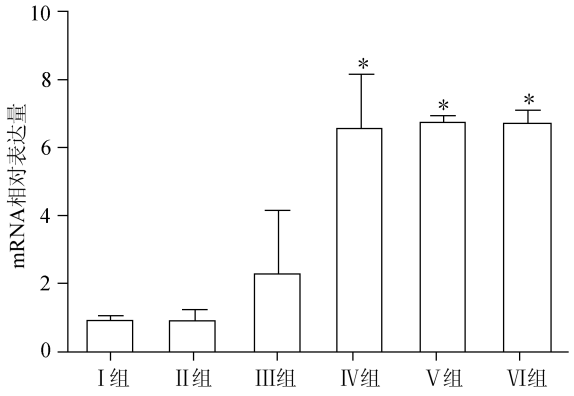
图 3 各组细胞中 SHBG 蛋白的表达

2.4 Caspase-3 的 Real-time PCR 结果

6 组的人滋养细胞于转染后 24 h 检测 Caspase-3 mRNA 基因的表达,Ⅰ组、Ⅱ组和Ⅲ组 Caspase-3 mRNA 表达水平组间比较差异无统计学意义($P>0.05$),Ⅳ、Ⅴ、Ⅵ组 Caspase-3 mRNA 表达水平组间比较差异无统计学意义($P>0.05$),Ⅳ、Ⅴ、Ⅵ组分别与Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ组进行比较,Caspase-3 mRNA 表达水平均明显升高,差异具有统计学意义($P<0.05$),见图 4。

2.5 Caspase-3 的 Western blot 检测结果

Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ组 Caspase-3 蛋白表达水平组间比较差异无统计学意义($P>0.05$),Ⅳ、Ⅴ、Ⅵ组 Caspase-3 蛋白表达水平组间比较差异无统计学意义($P>0.05$),Ⅳ组、Ⅴ组、Ⅵ组分别与Ⅰ组、Ⅱ组和Ⅲ组进行比较,Caspase-3 蛋白表达水平均明显升高,差异具有统计学意义($P<0.05$),见图 5。



*:与Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ组比较,$P<0.05$

图 4 各组细胞 Caspase-3 mRNA 的相对表达

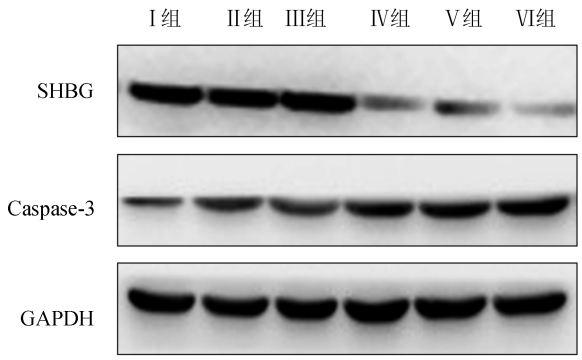


图5 各组细胞 Caspase-3 蛋白的表达

3 讨论

SHBG 是一种由肝细胞产生的循环类胆固醇蛋白,受性激素调节,在运输激素和调节细胞功能上发挥着重要作用。有研究表明,SHBG 表达降低是妊娠期糖尿病和2型糖尿病的独立危险因素,是高胰岛素血症性胰岛素抵抗的一个标志[4-6]。

SHBG 存在于妊娠期糖尿病孕妇的胎盘合体滋养层细胞内,胎盘合体滋养层细胞受损会导致 SHBG 的合成和分泌减少[7]。目前研究认为,妊娠期糖尿病的发病机理与2型糖尿病相似,胰岛素抵抗是导致妊娠期糖尿病发生、发展的主要原因,而胰岛素传导通路的异常是发生胰岛素抵抗的病理基础。在胰岛素受体后信号传导通路中,IR/IRS-1/PI3K/AKT/GLUT-4 通路对血糖的调节起关键性作用。正常的信号传导主要通过 IRS-1 与胰岛素受体结合并发生酪氨酸磷酸化进一步激化 PI3K,通过一系列复杂的作用使得葡萄糖转运蛋白4转位至胞膜。当该信号传导通路中一个或多个信号分子或环节发生异常时,均可导致胰岛素抵抗[8-9]。当 IRS-1 受抑制时,较高浓度的 IRS-2 则成为胰岛素受体的主要底物,并能与 PI3Kp85 结合从而进行胰岛素信号的传导。在妊娠期糖尿病中,胎盘中 SHBG 的表达水平会对胰岛素传导通路产生影响,从而导致妊娠期糖尿病的发生。对此,本研究采用 siRNA 干扰技术沉默 SHBG 基因,降低其在人滋养细胞中的表达,以研究 SHBG 基因沉默在人滋养细胞凋亡中的作用。

在前期研究中采用免疫电镜技术,镜下可以观察到妊娠期糖尿病中 SHBG 免疫染色在整个胎盘合体滋养细胞均呈弱阳性表达。同时应用 Real-time PCR 法、Western blot 法及 ELISA 法分别检测了 GDM 胎盘组织,结果显示 SHBG mRNA、蛋白和浓度均显著降低[10]。在体外通过 RNA 干扰技术,将 SHBG siRNA 转染至原代培养的人绒毛滋养层细胞中,双染流式细胞术检测绒毛滋养层细胞凋亡情况及 MTT 法检测细胞增殖情况,结果表明 SHBG 沉默可以导致人滋养细胞增殖减弱和凋亡增加[11-12]。这显示妊娠期糖尿病中胎盘滋养细胞中有 SHBG 存在,但是其合成和分泌较少,其表达降低将导致人滋养细胞生物学改变,说明 SHBG 在妊娠期糖尿病的发病过程中可能发挥着重要作用。

凋亡是细胞程序性死亡,是指有核细胞在一定条件下启动自身内部机制,通过内源性 DNA 内切酶的激活而发生的细胞自然死亡过程,通常伴有细胞核染色质的聚集,和凋亡小体形成等系列病理学改变[13-15]。Caspase-3 作为 Caspase 家族成员中细胞凋亡的关键酶之一,是细胞凋亡的中枢效应器[16-18]。多种刺激因素可以激活 Caspase-3,然后裂解多种蛋白,阻止 DNA 的复制和细胞修复,最终引起细胞凋亡,同时 Caspase-3 活化程度也是判断细胞凋亡严重性的可靠指标之一[19-20]。因此本研究通过检测 Caspase-3 的表达水平来分析 SHBG 基因沉默在人滋养细胞凋亡中的影响。

在本研究中,用不同 siRNA 干扰沉默人滋养细胞 SHBG 基因的表达,并采用 Real-time PCR 和 Western blot 测定 SHBG mRNA 及蛋白和凋亡相关抗体 Caspase-3 mRNA 及蛋白的表达水平,结果显示Ⅳ组、Ⅴ组、Ⅵ组分别与Ⅰ组、Ⅱ组和Ⅲ组进行比较,SHBG 表达水平降低、Caspase-3 表达升高,表明转染后人滋养细胞中 SHBG 表达降低。采用 Hoechst 33258 染色检测显示Ⅳ、Ⅴ、Ⅵ组细胞凋亡率明显高于对照组Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ组,这说明滋养细胞中 SHBG 表达降低会导致人滋养细胞凋亡。本研究为进一步阐明妊娠期糖尿病的发病机制提供了理论依据。

综上所述,在妊娠期糖尿病时血清中胰岛素水平升高会抑制胎盘滋养细胞中 SHBG 的合成和分泌减少,同时 SHBG 减少会导致人滋养细胞凋亡,从而加剧妊娠期糖尿病发病。

[参考文献]

[1] Wallace IR, McKinley MC, Bell PM, et al. Sex hormone binding globulin and insulin resistance[J]. Clin Endocrinol, 2013, 78(3): 321 - 329. doi: 10.1111/cen.12086.

[2] Smirnakis KV, Plati A, Wolf M, et al. Predicting gestational diabetes: choosing the optimal early serum marker[J]. Am J Obstet Gynecol, 2007, 196(4): 410 - 411. doi: 10.1016/j.ajog.2006.12.011.

[3] McElduff A, Hitchman R, McElduff P. Is sex hormone-binding globulin associated with glucose tolerance[J]. Diabet Med, 2006, 23(3): 306 - 312. doi: 10.1111/j.1464 - 5491.2005.01780.x.

[4] Perry JR, Weedon MN, Langenberg C, et al. Genetic evidence that raised sex hormone binding globulin (SHBG) levels reduce the risk of type 2 diabetes[J]. Hum Mol Genet, 2010, 19(3): 535 - 544. doi: 10.1093/hmg/ddp522.

doi:10.11659/jjssx.05E016019

第1跖背动脉显微外科解剖类型观察和临床意义

张依生[1],孟 镔[1],宋峰亮[1],储博书[1],崔英健[1],孟 珩[1],徐江发[2],路小欢[1],孙玉献[1],余 滨[1] (1.安徽理工大学医学院解剖学教研室,安徽 淮南 232001;2.安徽理工大学医学院附属医院骨科,安徽 淮南 232001)

[摘 要] **目的** 通过观察国人足部第1跖背动脉的解剖类型及所测得的解剖学数据,为临床显微外科进行修复手和足部合并骨和肌腱外露的皮肤软组织损伤以及手拇指再造时,以取用第1跖背动脉为蒂的皮瓣移植提供解剖学依据。**方法** 选用16具成人尸体双侧足部标本32例,对其第1跖背动脉用游标卡尺进行解剖测量,并对第1跖背动脉测量数据进行统计学分析。**结果** 通过对32例足部标本的测量,第1跖背动脉可分为5种类型。Ⅰ型(肌上型):第1跖背动脉走行于第1骨间背侧肌浅面,共13例(40.6%);Ⅱ型(肌内型):第1跖背动脉穿行于第1骨间背侧肌内部,共11例(34.4%);Ⅲ型(肌下型):第1跖背动脉走行于第1骨间背侧肌深面,共6例(18.8%);Ⅳ型(细小型):第1跖背动脉极其细小,共1例(3.1%);Ⅴ型(缺如型):第1跖背动脉缺如,共1例(3.1%)。第1跖背动脉发出的前、后穿支与跖骨和跖趾关节的距离:后穿支起点至第1跖骨底中点距离为(2.4±0.3)mm;后穿支起点至第1跖骨头中点距离为(10.1±1.0)mm;前穿支起点至跖趾关节中点距离为(7.6±2.7)mm。**结论** 第1跖背动脉对手和足部创伤及拇指再造等皮瓣移植有重要临床参考意义。

[关键词] 第1跖背动脉;解剖类型;皮瓣移植;动脉变异
[中图分类号] R602;R616.2 [文献标识码] A [收稿日期] 2016-06-16

[5] Ding EL,Song Y,Manson JE,et al. Plasma sex steroid hormones and risk of developing type 2 diabetes in women:a prospective study[J]. Diabetologia,2007,50(10):2076-2084. doi:10.1007/s00125-007-0785-y.

[6] Stefan N,Schick F,Häring HU. Sex hormone-binding globulin and risk of type 2 diabetes[J]. N Engl J Med,2009,361(27):2675-2676. doi:10.1056/NEJMc0910143.

[7] Sun L,Jin Z,Teng W,et al. SHBG in GDM maternal serum,placental tissues and umbilical cord serum expression changes and its significance[J]. Diabetes Res Clin Pract,2013,99(2):168-173. doi:10.1016/j.diabres.2012.05.019.

[8] Hylander B,Lehtihet M. Testosterone and gonadotropins but not SHBG vary with CKD stages in young and middle aged men[J]. Basic Clin Androl,2015,25:9. doi:10.1186/s12610-015-0027-y.

[9] Karlsson M,Thorn H,Parpal S,et al. Insulin induces translocation of glucose transporter GLUT4 to plasma membrane caveolae in adipocytes[J]. FASEB J,2002,16(2):249-251. doi:10.1096/fj.01-0646fje.

[10] Sun L,Jin Z,Teng W,et al. Expression changes of sex hormone binding globulin in GDM placental tissues[J]. J Perinat Med,2012,40(2):129-135. doi:10.1515/JPM.2011.128.

[11] 孙 倩,孙 磊,金 镇,等. RNA干扰技术抑制SHBG基因表达对滋养细胞凋亡的影响[J]. 中国医科大学学报,2013,42(8):689-692. doi:10.3969/j.issn.0258-4646.2013.08.005.

[12] 范杰慧,金 镇,孙 倩,等. RNA干扰SHBG基因表达对滋养细胞增殖的影响[J]. 中国优生与遗传杂志,2015,23(2):3-4.

[13] Goyeneche AA,Harmon JM,Telleria CM. Cell death induced by serum deprivation in luteal cells involves the intrinsic pathway of apoptosis[J]. Reproduction,2006,131(1):103-111. doi:10.1530/rep.1.00751.

[14] Dong Y,Miao L,Hei L,et al. Neuroprotective effects and impact on caspase-12 expression of tauroursodeoxycholic acid after acute spinal cord injury in rats[J]. Int J Clin Exp Pathol,2015,8(12):15871-15878. doi:10.1530/rep.1.00751.

[15] Farhadi F,Jahanpour S,Hazem K,et al. Garlic ((Allium sativum)) Fresh Juice Induces Apoptosis in Human Oral Squamous Cell Carcinoma:The Involvement of Caspase-3,Bax and Bcl-2[J]. J Dent Res Dent Clin Dent Prospects,2015,9(4):267-273. doi:10.15171/joddd.2015.047.

[16] 曹蜀炜. 喉鳞癌组织中Caspase-3蛋白与Survivin蛋白的表达水平及相关性[J]. 中国医学前沿杂志(电子版),2015,7(3):104-107. doi:10.3969/j.issn.1674-7372.2015.03.011.

[17] 李莉艳,常清贤,靳旺杰,等. MCV、MCH、HbA_2在妊娠期珠蛋白生成障碍性贫血筛查中的临床应用价值[J]. 中国医学前沿杂志(电子版),2015,7(12):1-4.

[18] 闵 洁,陈璐璐,胡 帝,等. 孕中期血糖水平与不良妊娠结局的关系研究[J]. 中国医学前沿杂志(电子版),2015,7(8):24-28. doi:10.3969/j.issn.1674-7372.2015.08.008.

[19] Jakubowska K,Guzińska-Ustymowicz K,Famulski W,et al. Reduced expression of caspase-8 and cleaved caspase-3 in pancreatic ductal adenocarcinoma cells[J]. Oncol Lett,2016,11(3):1879-1884. doi:10.3892/ol.2016.4125.

[20] Lebelt A,Rutkowski R,Och W,et al. Survivin,caspase-3 and MIB-1 expression in astrocytic tumors of various grades[J]. Adv Med Sci,2016,61(2):237-243. doi:10.1016/j.advms.2016.02.001.

(编辑:魏 源)