生殖系统疾病

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001007

LAMA4在胎盘组织中的差异表达及其在滋养细胞中的功能

王平珍，单　楠，王懿铭，漆洪波

（1. 重庆医科大学附属第一医院产科，重庆　400016；2. 重庆市肿瘤研究所肿瘤内科，重庆　400030）

【摘　要】**目的**：探讨层粘连蛋白 α4 链（laminin alpha4，LAMA4）在胎盘组织中的差异表达及其对滋养细胞功能的影响，揭示其在子痫前期（preeclampsia，PE）发病机制中的作用。**方法**：收集 22 例 PE 和 20 例正常产妇的胎盘组织，应用免疫组化方法检测 LAMA4 蛋白在胎盘组织中的表达。采用 RNA 干扰技术，将滋养细胞分为正常培养对照组、缺氧/复氧（hypoxia/reoxygenation，H/R）培养组及干扰培养组，采用细胞免疫荧光和 Western blot 法检测 LAMA4 蛋白在各组细胞中的表达。采用 Transwell 小室模型检测各培养组细胞的侵袭功能。**结果**：①子痫前期胎盘组织中 LAMA4 蛋白的表达水平明显低于对照组（$P<0.05$）。②H/R 及干扰处理后滋养细胞中 LAMA4 蛋白的表达水平明显降低（$P<0.05$）。③下调 LAMA4 的蛋白表达后滋养细胞的侵袭率明显降低（$P<0.05$）。**结论**：LAMA4 蛋白表达的下调可抑制滋养细胞的侵袭功能，可能参与子痫前期的发病。

【关键词】层粘连蛋白 α4 链；侵袭；子痫前期

【中图分类号】R714.24　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2015-01-08

Expression and function of LAMA4 in the placentas and trophoblast

Wang pingzhen[1], *Shan Nan*[1], *Wang Yiming*[2], *Qi Hongbo*[1]

(*1. Department of Obstetrics and Gynecology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University;*
2. Department of Oncology, Chongqing Cancer Hospital)

【Abstract】***Objective***: To investigate the expression of the laminin alpha4(LAMA4) gene and its effect on invasion of HTR-8/SVneo cells and its role in the pathogenesis of preeclampsia. ***Methods***: Twenty-two patients with severe pre-eclampsia and 20 normal pregnant women were investigated. The expression of LAMA4 was determined by immunohistochemistry. Using RNA interference technology, the trophoblast cells were divided into the normal control group, hypoxia/reoxygenation(H/R) oxygen culture group and LAMA4 interference group. Expression of lama4 in each group was detected by the immune fluorescence and Western blot. The invasive ability of the HTR-8/SVneo cells was tested by transwell. ***Results***: (1)The expression of LAMA4 in severe pre-eclampsia group was dramatically lower than that of control group. (2)The expression of LAMA4 in HTR-8/SVneo cells was significantly decreased after H/R and siRNA treatments. (3)The invasive ability of HTR-8/SVneo cells was deduced after the deduction of LAMA4 expression. ***Conclusion***: Damage of LAMA4 is probably involved in the mechanism of onset of preeclampsia by regulating invasion of trophoblast.

【Keywords】laminin alpha4; invasion; preeclampsia

子痫前期是以高血压、蛋白尿为主要特征的妊娠期特发性疾病，发生率约为 2%~8%，迄今为止仍是我国孕产妇及围生儿死亡的重要原因，严重威胁母婴健康。关于子痫前期的相关研究众多，大多数学者认为，子痫前期胎盘组织中存在胎盘浅着床和螺旋动脉重铸障碍，与滋养细胞侵袭能力的下降密切相关[1]。

层粘连蛋白 α4 链（laminin alpha4，LAMA4）由 LAMA4 基因编码，是构成层粘连蛋白-8（laminin-8 或 laminin-411）、层粘连蛋白-9（laminin-9 或 laminin-421）和层粘连蛋白-14（laminin-14 或 laminin-423）的组成成分，主要在外周神经的束膜、内皮细胞及发育中肌纤维周围的基底膜中表达。通过与整合素 α6β1 及 α3β1 结合，LAMA4 可参与调节内皮细胞

作者介绍：王平珍，Email：1253967891@qq.com，
研究方向：妊娠期高血压疾病的诊断及治疗。

通信作者：漆洪波，Email：qihongbo728@163.com。

优先出版：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20160623.1600.020.html（2016-06-23）

的凋亡，促进血管生成，具有促进肿瘤细胞迁移及粘附的作用。但有关 LAMA4 对滋养细胞功能影响的研究非常有限。因此，本研究将在胎盘组织和细胞模型上着力研究 LAMA4 的差异表达及其对滋养细胞功能的影响，探究其在子痫前期发生过程中的可能机制。

1 材料与方法

1.1 研究对象

选择 2012 年 2 月至 2013 年 2 月在重庆医科大学附属第一医院住院分娩的孕妇 42 例，其中 20 例足月择期行剖宫产的健康孕妇作为对照组，22 例重度子痫前期孕妇作为子痫前期组，诊断标准参照《妇产科学》第 8 版教材。2 组孕妇均为单胎、经剖宫产分娩终止妊娠。2 组孕妇既往均无长期服用药物史及吸烟史；无心脏病、肝肾疾病、高血压、糖尿病及甲状腺功能亢进等病史；无复发性自然流产、畸胎、死胎等不良孕产史；孕期无急、慢性感染性疾病史；胎儿经系统彩超检查未见明显畸形。入院时肝、肾功能检查均正常。两组孕妇年龄、孕周、产次、BMI 比较，差异均无统计学意义（$P>0.05$），而蛋白尿、血压、新生儿体质量及胎盘重量相比较，具有统计学意义（$P<0.01$）。见表 1。

表 1 子痫前期及正常妊娠晚期孕妇的临床特征

Tab.1 Clinical characteristics of the pre-eclampsia and control groups

类别	子痫前期组	对照组
数量	22	20
年龄	27.25 ± 2.38	27.59 ± 2.54
孕周	36.82 ± 1.40	38.65 ± 1.04
产次	1.92 ± 0.95	1.77 ± 0.83
BMI	24.97 ± 1.07	25.62 ± 0.79
尿蛋白	2.32 ± 0.13[a]	0.04 ± 0.01
收缩压（mmHg）	150.14 ± 6.18[a]	99.75 ± 9.24
舒张压（mmHg）	106.91 ± 8.52[a]	73.5 ± 9.19
新生儿体质量（g）	2 338.05 ± 111.45[a]	3 405 ± 187.18
胎盘重量（g）	436.14 ± 18.14[a]	524.95 ± 10.29

注：a，$P<0.01$

1.2 主要研究试剂

细胞培养相关试剂均采购自美国 Gibco 公司；免疫组织化学试剂盒购于北京中杉金桥生物技术有限公司；Western blot 相关试剂盒购自江苏碧云天生物技术研究所；PVDF 膜、Transwell 小室为美国 Millipore 公司产品；LAMA4 一抗购自美国 Sigma 公司，β-actin 一抗购自美国 Santa Cruze 公司；FITC 标记的羊抗兔荧光二抗购自美国 Santa Cruze 公司。

1.3 研究方法

1.3.1 免疫组织化学 术中取得的新鲜胎盘组织标本常规以石蜡包埋，轮转式切片机连续切片，厚度约 5 μm。操作方法按照 SP 法试剂盒说明书进行，染色方法采用二氨基联苯胺（DAB）法。兔抗人 LAMA4 多克隆抗体以 PBS 稀释至 1:200，采用兔血清 IgG 代替一抗作为阴性对照。显微镜检测切片中的各抗体阳性表达情况，以组织中各种细胞的胞质、胞核或间质中出现棕黄（褐）色视为阳性染色。

1.3.2 细胞培养及基因转染 人滋养外细胞株 HTR-8/SV-neo 由加拿大皇后大学 Graham 教授馈赠。细胞培养采用 RPMI1640 培养基（含 10%胎牛血清），置 37 ℃、5%CO_2 细胞孵育箱常规培养。滋养细胞实验分组如下：（1）正常培养对照组。（2）缺氧/复氧（hypoxia/reoxygenation，H/R）培养组。按照参考文献进行细胞 H/R 处理[2]，先将细胞缺氧培养 8 h，随后再行常氧培养 16 h，共培养 2 个循环合计 48 h。（3）siRNA 干扰组。各组培养时间均为 48 h。LAMA4 siRNA 由上海吉码基因公司设计并合成。细胞转染后应用 qRT-PCR 和 Western blot 法检测其转染效率，共设计 3 条序列，选择转染效率最高的序列进行后续实验。有效抑制 LAMA4 表达的引物序列为：上游 5'-CAGGGAUUUAUGCAGAAAUTT-3'，下游 5'-AUUUCU-GCAUAAAUCCCCUGTT-3'。转染方法按照 lipofectamine 2000 说明书进行，具体方法如下：转染前 24 h，将 HTR-8/SVneo 细胞以 5×10^5 个/孔于接种于 6 孔培养板，第 2 天观察细胞汇聚率达到 50%~70%后进行转染。将 10 μl siLAMA4（100 pmol）及 5 μl lipofectamine 2000 脂质体分别加入无血清的 1640 培养基 250 μl 中，5 min 后将二者轻轻混合，20 min 后将混合液加入 6 孔板内充分混匀，随后将孔板置于细胞孵育箱。转染 6 h 后弃转染液，再在 6 孔板内每孔加入含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养基 2 ml，随后常规培养 48 h。

1.3.3 蛋白质免疫印迹法（Western blot） 各组细胞培养结束后，立即提取细胞总蛋白进行 Western blot 检测。蛋白含量测定应用 BCA 法，随后以 5×上样缓冲液配成同一浓度的蛋白质进行上样。蛋白上样后继续进行电泳、转膜、封闭、一抗孵育过夜（LAMA4 浓度为 1:1 000；β-actin 浓度为 1:1 000）、二抗孵育 2 h（羊抗兔 IgG 浓度为 1:5 000），最后采用 ECL 化学发光试剂盒进行显色。使用 ChemiDoc XRS 化学发光成像系统检测蛋白质印记条带灰度，灰度分析采用 Quantity One 4.6.2 版图像分析软件。

1.3.4 细胞免疫荧光 将各培养组细胞进行细胞爬片 48 h、随后洗涤细胞爬片，采用冰甲醇固定、并使用山羊血清封闭细胞爬片。于爬片上滴加 LAMA4 抗体（1:100），将爬片置于湿盒中 4 ℃过夜。第二日于细胞爬片上滴加 FITC 标记的荧光二抗（1:200），室温孵育 1 h，细胞核染色采用碘化丙啶（PI），染色后以 50%甘油封片，将爬片置于激光共聚焦显微镜下观察并采集图片。

1.3.5 Transwell 侵袭实验 将 200 μl 浓度为 1×10^5 个/ml 细胞悬液接种于预先已铺凝固基质胶的 Transwell 小室的上层小室内，下层的 24 孔板内采用 600 μl 的含 10%胎牛血清的培养液起趋化作用，48 h 后计数穿过小室膜孔的细胞数。计

数时以 3%结晶紫染色 20 min。以自来水充分洗涤后在显微镜下随机选取 5 个视野，计数每视野中的细胞数，计算平均值。

1.3.6　细胞凋亡检测　采用流式细胞仪检测各培养组 HTR-8/SVneo 的凋亡率，实验步骤按 Annexin-V-FITC 和 PI 试剂盒（凯基，生物技术）说明书进行，以流式细胞仪（BD Bioscience，San Jose，CA，USA）检测并分析细胞早期凋亡及晚期凋亡率之和。以上实验均重复 3 次。

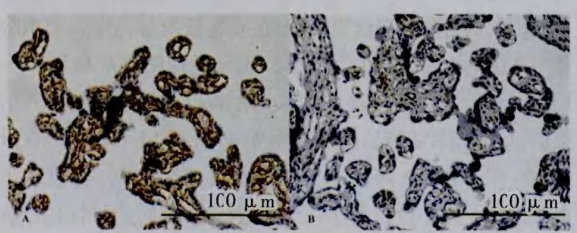
1.4　统计学处理

应用 GraphPad Prism 6.0 软件进行统计分析，所有数据用均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示。2 组均数间比较采用独立样本 t 检验分析，多组均数间比较采用单因素方差分析。检验水准 α=0.05。

2　结　果

2.1　LAMA4 蛋白在胎盘组织中的差异表达

免疫组化提示足月胎盘组织中有 LAMA4 蛋白表达，而子痫前期胎盘组织中 LAMA4 蛋白的表达较对照组明显减弱。如图 1 所示，孕晚期 LAMA4 蛋白主要定位于滋养细胞和血管内皮细胞的胞浆中。图 1A 为 LAMA4 蛋白在正常足月孕妇胎盘组织中的表达情况，可见其在滋养细胞胞浆中度表达，内皮细胞中为阳性表达。图 1B 为 LAMA4 蛋白在子痫前期孕妇胎盘组织中的表达情况，可见其在滋养细胞及内皮细胞中蛋白的表达均明显减弱。见表 2。



A. 正常足月孕妇　　B. 子痫前期孕妇

图 1　LAMA4 蛋白在各组胎盘组织中的表达（200×）

Fig.1　Expression of LAMA4 in placenta tissues detected by immunohistochemistry（200×）

表 2　LAMA4 在胎盘组织中表达水平的半定量分析

Tab.2　Semiquantitative analysis of LAMA4 expression in the placentas

组别	例数	LAMA4（%）	t 值	P 值
对照组	20	100.1 ± 0.785	37.01	0.003
PE组	22	22.05 ± 1.836		

2.2　各培养组细胞中 LAMA4 蛋白的表达

经 Western blot 定量分析显示，见图 2 及表 3，与正常培养组相比，siRNA 转染可明显降低 LAMA4 蛋白的表达水平（P=0.000），H/R 处理也可显著抑制 LAMA4 蛋白的表达水平（P=0.000）。

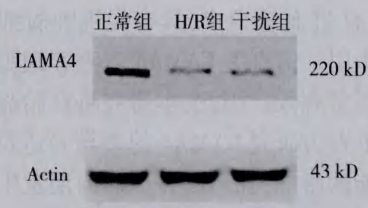


图 2　LAMA4 蛋白在各培养组细胞中的表达水平

Fig.2　Expressions of LAMA4 in trophoblasts with different treatments

表 3　各培养组滋养细胞中 LAMA4 蛋白表达水平的定量分析

Tab.3　Quantitative analysis of LAMA4 protein in HTR8/SVneoof each group

组别	LAMA4蛋白水平	P 值
正常组	0.603 ± 0.047	-
H/R组	0.179 ± 0.023	0.000
干扰组	0.148 ± 0.047	0.000

如图 3 所示，PI 染色标记的细胞核呈红色荧光，LAMA4 蛋白经 FITC 标记的荧光二抗结合显色呈绿色荧光。经细胞免疫荧光实验显示：LAMA4 蛋白主要定位于滋养细胞膜中表达。siRNA 干扰组细胞膜中的荧光明显低于正常培养组，H/R 培养组细胞膜中的荧光强度也较正常培养组明显减弱。

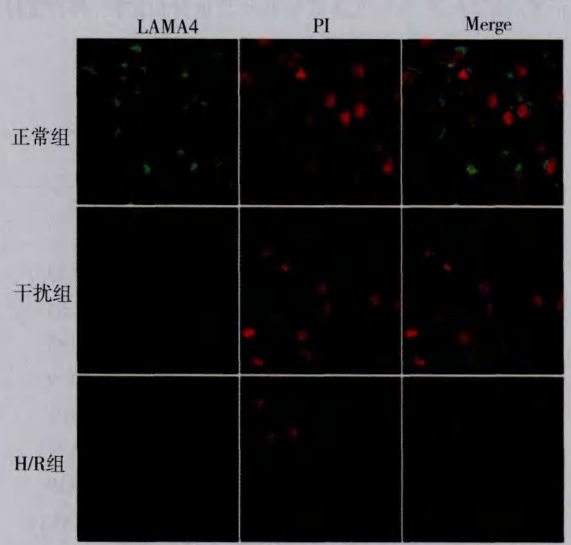
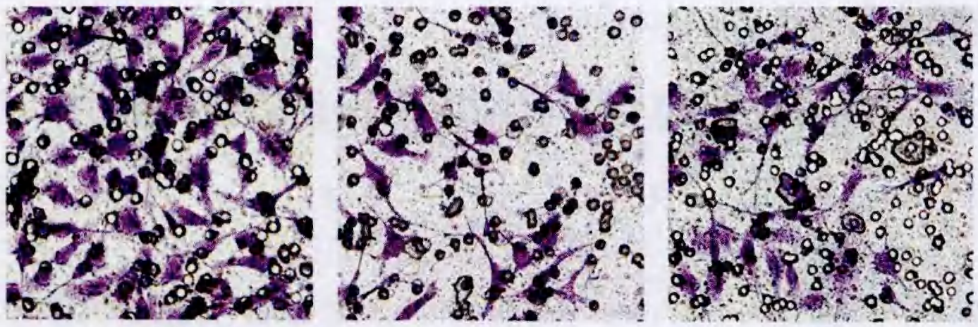


图 3　LAMA4 蛋白在各培养组滋养细胞中的免疫荧光表达（400×）

Fig.3　Immunofluorescence staining of LAMA4 protein in HTR-8/SVneo cells with different treatments（400×）

2.3　LAMA4 蛋白表达水平下调后对 HTR-8/SVneo 滋养细胞侵袭的影响

高倍镜（200×）下观察各种处理 48 h 后各培养组滋养细胞穿过 transwell 小室的情况，见图 4。侵袭实验提示：siRNA 干扰组为（50.290 ± 1.938）个，H/R 培养组为（43.340 ± 3.409），分别与对照组（130.000 ± 4.040）相比，差异均具有统计学意义（均 P=0.000）。



A. 正常组　　B. H/R 组　　C. 干扰组

图 4　transwell 实验检测各培养组细胞侵袭能力（200×）

Fig.4　Representative images of the transwell invasion assay in HTR-8/SVneo cells with different treatments (200×)

2.4　LAMA4 蛋白表达水平下调后对 HTR-8/SVneo 滋养细胞凋亡率的影响

采用流式细胞仪对各培养组细胞进行凋亡率的检测，如表 4 所示，H/R 培养组细胞的总凋亡率明显增加，与正常对照组相比差异具有统计学意义（P=0.000）；而 siRNA 干扰技术下调 LAMA4 蛋白的表达对于 HTR-8/SVneo 滋养细胞的凋亡率无明显影响（P=0.723）。

表 4　各培养组 HTR-8/SVneo 滋养细胞凋亡率的比较

Tab.4　Apoptosis rates in HTR8/SVneo of each group

组别	凋亡率（%）	P 值
正常组	1.888 ± 0.307	-
H/R组	17.195 ± 3.548	0.000
干扰组	3.025 ± 0.772	0.723

3　讨　论

作为细胞基底膜的重要组成部分，层粘连蛋白是粘附分子整和素蛋白家族的主要配体，它们的结构为 1 条重链（α 链）和 2 条轻链（β 链和 γ 链），经二硫键连接为异源三聚体。目前已有 5 种 α 链、3 种 β 链和 3 种 γ 链被发现，由其构成的层粘连蛋白异源三聚体至少有 16 种。层粘连蛋白之间及层粘连蛋白与其它基底膜成分的相互作用可促进基底膜形成和稳定。通过与细胞间的相互作用，层粘连蛋白可直接或间接控制细胞的活动，如粘附或转移、分化和极化、增殖或凋亡、基因表达及新生血管重铸等。有文献指出，LAMA4 的缺失会抑制胚胎及新生儿期出血和微血管生成[3]。层粘连蛋白-8 被认为是大多数胚胎和新生儿组织血管基底膜中唯一的层粘连蛋白三聚体，其在神经胶质瘤的衍进及迁移中具有重要作用。层粘连蛋白-8 还参与肿瘤细胞通路调控，Fujiwara 等[4]指出其可通过 Rac 通路调节整合素介导的内皮细胞粘附及迁移。Stenzel 等[5]也发现 LAMA4 可通过Dll4/Notch 通路调节新生血管生成。

有研究表明，层粘连蛋白的表达的明显上调，具有促进肿瘤细胞迁移及粘附的作用，还可促进肿瘤细胞中基质金属蛋白酶 MMPs 的表达，MMPs 可降解基膜成分，有利于肿瘤细胞向周围组织的浸润及血管芽的新生[6]。已有研究发现在子痫前期胎盘组织中层粘连蛋白表达降低，本研究也通过检测正常妊娠和子痫胎盘组织中 LAMA4 蛋白的表达验证了其在子痫前期胎盘组织中表达较正常妊娠明显降低，推测该蛋白下调可能参与子痫前期的发生过程。

结合既往的研究，本课题组已充分证实，与子痫前期胎盘组织所表现的情况相似，HTR8/SVneo 细胞可经缺氧/复氧处理诱发细胞内 ROS 水平明显上调，导致显著的氧化应激反应[2]。因此，本研究中也通过 H/R 处理，模拟子痫前期的发病机制，发现该处理可明显抑制 LAMA4 蛋白的表达，并明显抑制滋养细胞侵袭及凋亡的能力，与其他学者的研究相一致[7]，进一步证实 LAMA4 蛋白的表达受损可能参与子痫前期的发病机制。

正常早孕时，滋养细胞浸润子宫的深度可达肌层的 1/3[8]，而在子痫前期患者的妊娠早期，滋养细胞的浸润仅达子宫蜕膜层，螺旋动脉重塑障碍，导致子宫肌层的血管狭窄或扩张不足，严重影响了子宫胎盘循环的血流灌注，进而孕妇导致全身系统症状的发生。本研究采用 RNA 干扰技术，经 Western blot 技术验证，在人滋养细胞株 HTR-8/SVneo 中有效抑制 LAMA4 阳性表达，随后采用 Transwell 小室侵袭实验，再次证明 LAMA4 蛋白的受损可抑制滋养细胞的侵袭功能，明确了该基因下调对滋养细胞侵袭功能的影响。

由此推测，LAMA4 蛋白表达水平的下降将导致滋养细胞侵袭能力减弱，可能导致滋养细胞植入过浅，进而诱导子痫前期的发生。LAMA4 基因具体通过何种途径影响滋养细胞的侵袭能力，及其在子

生殖系统疾病 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000953

宫颈上皮内瘤变术前临床指标预测价值研究

吴 瑾,罗 鸣,段赵宁,贾 英
(重庆医科大学附属第一医院妇产科,重庆 400016)

【摘 要】**目的**:探讨宫颈上皮内瘤变 2~3 级(cervical intraepithelial neoplasia,CIN)的临床指标与宫颈环状电切术(loop electrosurgical excision procedure,LEEP)治疗预后的相关性。**方法**:回顾性分析 835 例 CIN2~3 级患者行 LEEP 术前的细胞学检查(ThinPrep cell test,TCT),人乳头状瘤病毒(human papillomavirus,HPV)及病检,与术后切缘及复发的关系。**结果**:术后切缘阳性者 105 例(12.6%),CIN3 及 CIN 累腺组切缘阳性率高($P<0.05$);复发者 19 例(2.3%),HPV16 型组复发率高($P<0.05$);多因素 logistic 分析中,术前 CIN3 组($OR=1.717$,95%$CI=1.110\sim2.656$)和腺体受累组($OR=1.611$,95%$CI=1.048\sim2.477$)术后切缘阳性的风险增高;术前 HPV16 阳性($OR=5.840$,95%$CI=1.772\sim19.275$)术后 CIN 复发风险增高,但切除宽度>2 cm 组($OR=0.240$,95%$CI=0.065\sim0.888$)复发的风险降低。**结论**:术前 CIN3 及 CIN 累及腺体可作为 LEEP 切除范围的指导指标,而 HPV16 感染可作为预测术后复发的指标。

【关键词】宫颈上皮内瘤变;宫颈环状电切术;液基细胞学检查;人乳头状瘤病毒;病理学检查
【中图分类号】737.33 【文献标志码】A 【收稿日期】2015-12-17

Preoperative assessment indicators for high-grade cervical intraepithelial neoplasia

Wu Jin, Luo Ming, Duan Zhaoning, Jia Ying
(*Department of Gynecology and Obstetrics, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University*)

【Abstract】***Objective***: To investigate clinical indicators to assess resection range, lesions residue and prognosis after loop electrosurgical excision procedure (LEEP) for cervical intraepithelial neoplasia (CIN) 2/3. ***Methods***: The clinical data of 836 patients with CIN2/3 who were treated with LEEP were retrospectively analyzed. The relationship between pre-operative results of ThinPrep cell test (TCT), human papillomavirus (HPV), pathological examination, resection range and post-operative excision margins and residual/recurrent was explored. ***Results***: Positive excision margin was

作者介绍:吴 瑾,Email:289703232@qq.com,
研究方向:妇科肿瘤。
通信作者:贾 英,Email:jiaying284@tom.com。
优先出版:http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20160513.1028.052.html (2016-05-13)

痫前期发生、发展中的其他作用,还有待进一步的探究。还需进一步观察 LAMA4 蛋白在妊娠期动物模型中的作用,为子痫前期的发病及诊治提供新的理论依据。

参 考 文 献

[1] Tal R. The role of hypoxia and hypoxia-inducible factor-1Alpha in preeclampsia pathogenesis[J]. Biology of Reproduction, 2012, 87(6): 1-8.

[2] Li J, Luo X, Xiao X, et al. Decreased expression of Wiskott-Aldrich syndrome protein family verprolin-homologous protein 2 may be involved in the development of pre-eclampsia[J]. Reproductive Biomedicine Online, 2014, 28(1): 70-79.

[3] Kleinman HK, Koblinski J, Lee S, et al. Role of basement membrane in tumor growth and metastasis[J]. Surgical Oncology Clinics of North America, 2001, 10(10): 329.

[4] Fujiwara H, Gu J, Sekiguchi K. Rac regulates integrin-mediated endothelial cell adhesion and migration on laminin-8[J]. Experimental Cell Research, 2004, 292(292): 67-77.

[5] Stenzel D, Franco CA, Estrach S, et al. Endothelial basement membrane limits tip cell formation by inducing Dll4/Notch signalling in vivo[J]. Embo Reports, 2011, 12(11): 1135-1143.

[6] Miyazaki K. Laminin-5 (laminin-332): Unique biological activity and role in tumor growth and invasion[J]. Cancer Science, 2006, 97(2): 91-98.

[7] Liu X, Mu H, Luo X, et al. Expression of Gadd45 α in human early placenta and its role in trophoblast invasion[J]. Placenta, 2014, 35(6): 370-377.

[8] Redhorse K, Yan Z, Genbacev O, et al. Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface[J]. Journal of Clinical Investigation, 2004, 114(6): 744-754.

(责任编辑:张辉洁)