生殖系统疾病

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000984

MEST/PEG1对绒毛外滋养层细胞侵袭和迁移能力的影响及其在子痫前期中的意义

彭　威[1],陈　莹[1],单　楠[1],丁裕斌[2],漆洪波[1]

（重庆医科大学 1. 附属第一医院妇产科、重庆医科大学中国-加拿大-新西兰联合母胎医学实验室；
2. 公共卫生管理学院生殖生物学实验室、重庆医科大学中国-加拿大-新西兰联合母胎医学实验室，重庆　400016）

【摘　要】目的：通过研究人中胚层特异性转录基因（mesoderm-specific transcript，MEST）对人绒毛滋养细胞迁移和侵袭等生物学功能的影响，探讨其在子痫前期（preeclampsia，PE）中发病的机制。**方法**：用免疫组化法和 Western blot 法检测正常和 PE 患者胎盘中 MEST 及 DNA 甲基转移酶（DNA methyltransferase，DNMT）的表达。并检测 2 组胎盘中 MEST 甲基化水平。用 Western blot 法检测缺氧/复氧（hypoxia/reoxygenation，H/R）和 MEST siRNA 处理人滋养细胞株 HTR8/Svneo 后缺氧诱导因子（hypoxia-inducible factor 1α，HIF1α）及 MEST 表达水平；并检测 siRNA 转染后对各组细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响。**结果**：MEST 在正常胎盘中的表达（4.524 ± 0.586）明显高于 PE 胎盘（2.640 ± 0.334）且在 PE 胎盘中处于高甲基化状态。H/R 后 HIF1α 表达明显升高（3.692 ± 0.441，7.091 ± 0.698），而 MEST 表达明显降低（4.856 ± 0.169，2.205 ± 0.318），特异性敲低 MEST 后 HTR-8 细胞侵袭和迁移能力均明显下降（1.057 ± 0.061，0.551 ± 0.029）（1.113 ± 0.087，0.477 ± 0.034），差异均有统计学意义（$P<0.05$）；而增殖能力无明显影响（0.170 ± 0.010，0.158 ± 0.010）（$P>0.05$）。**结论**：推测 MEST DNA 甲基化异常可能影响滋养细胞的迁移和侵袭，从而参与子痫前期的发病。

【关键词】中胚层特异性转录基因/父源表达基因；DNA 甲基化；滋养细胞侵袭；子痫前期

【中图分类号】R714.24　　**【文献标志码】**A　　**【收稿日期】**2015-12-10

Effects of MEST/PEG1 on cell migration and invasion in the human trophoblast cells and its roles in preeclampsia

Peng Wei[1], *Chen Ying*[1], *Shan Nan*[1], *Ding Yubin*[2], *Qi Hongbo*[1]

(*1. Department of Obstetrics and Gynecology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Canada-China-New Zealand Joint Laboratory of Maternal and Fetal Medicine of Chongqing Medical University;*
2. Laboratory of Reproductive Biology, School of Public Health and Management, Chongqing Medical University, Canada-China-New Zealand Joint Laboratory of Maternal and Fetal Medicine of Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objective*: To evaluate the effects of mesoderm-specific transcript (MEST) on cell migration and invasion in the human trophoblast cells and its roles in preeclampsia. ***Methods***: Immunohistochemistry and Western blot were used to determine the expression of MEST and DNA methyltransferases (DNMTs) in normal and preeclampsia (PE) placental tissues, and to detect the MEST promoter methylation level. HTR8/SVneo cells were treated by hypoxia/ reoxygenation (H/R) or MEST siRNA before detecting the MEST, hypoxia-inducible factor 1α (HIF1α) protein expression and the cell proliferation, migration and invasion ability, respectively. ***Results***: MEST protein expressions were significantly decreased (4.524 ± 0.586, 2.640 ± 0.334) and its gene promoters were hypermethylated in the PE placental tissues. After H/R treatment, the MEST expressions were downregulated (4.856 ± 0.169, 2.205 ± 0.318) while HIF1α were upregulated (3.692 ± 0.441, 7.091 ± 0.698) ($P<0.05$). The cell proliferation was not affected by siRNA of MEST (0.170 ± 0.010, 0.158 ± 0.010) ($P>0.05$), while the migration and invasion rate of HTR-8/SVneo cells were significantly decreased (1.057 ± 0.061, 0.551 ± 0.029) (1.113 ± 0.087, 0.477 ± 0.034) ($P<0.05$). ***Conclusion***: MEST/PEG1 DNA methylation represses trophoblast migration and invasion, a possible pathological mechanism of preeclampsia.

【Key words】mesoderm-specific transcript/paternally expressed gene 1; DNA methylation; trophoblast invasion; preeclampsia

作者介绍：彭　威，Email：xning47@sina.com，
研究方向：围产医学。

通信作者：漆洪波，Email：qihongbo@sina.com。

基金项目：国家自然科学基金资助项目（编号：81300509、81300508、81370731）。

优先出版：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20160513.1652.114.html（2016-05-13）

子痫前期(preeclampsia,PE)是一种妊娠特有疾病,其主要症状表现为高血压和蛋白尿,是孕产妇和胎儿健康的极大威胁[1]。其中表观遗传因素异常导致绒毛外滋养细胞侵袭能力降低,螺旋动脉形成受限等是目前较为常见的发病学说之一[2-3]。人中胚层特异性转录基因(mesoderm-specific transcript,MEST),也叫父源表达基因(paternally expressed gene 1,PEG1)可促进胚胎及胎盘的生长和发育[4]。DNA 甲基化调控基因或印记基因的表达也参与着早期胚胎发育,可能与 PE 发生相关[5]。虽然多数研究表明,印记基因 MEST 在人胎盘组织中高表达,且主要表达于绒毛细胞滋养细胞和血管内皮细胞[6-7],但 MEST 对滋养细胞侵袭能力的影响及在 PE 发生中的作用尚不清楚。本研究主要探讨 MEST DNA 甲基化水平与 PE 发生的相关性,为子痫前期病因学提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 胎盘组织的收集 收集 2014 年 2 月至 2014 年 12 月在我院产科住院行选择性剖宫产术的重度 PE 孕妇(n=13)(重度 PE 诊断标准参照《妇产科学》第 8 版全国统编教材)和正常足月妊娠行择期剖宫产术的孕妇的胎盘组织(n=16)。所有研究对象均为单胎;既往无高血压、心脏病、肾脏病、糖尿病及甲状腺功能异常等病史;无复发性自然流产、畸胎、死胎等不良孕产史;无吸烟、长期服用药物史。该研究经重庆人体实验伦理委员会批准,所有受试者均知情并同意。

1.1.2 细胞及 siRNA 合成 HTR8/SVneo 细胞株由加拿大 Graham 教授惠赠,缺氧/复氧(hypoxia/reoxygenation,H/R)采用缺氧 8 h,复氧 16 h,2 个循环,缺氧浓度为 2%[8]。MEST 干扰和阴性对照的 siRNA 由上海吉玛制药技术有限公司提供的 MEST siRNA 有效靶序列:5'-GGAUCCUGUAAAUCCCU-AUTTAUAGGGAU UUACAGGAUCCTT-3'构建。

1.1.3 主要试剂及仪器 胎牛血清和 RIPM1640 培养基购自美国 Gibco 公司;Lipofectamine 2000 购自美国 Invitrogen 公司;蛋白抽提、定量、凝胶配制试剂盒和 ECL 化学发光试剂盒购自江苏碧云天生物技术研究所。多克隆羊抗 MEST 抗体(abcam,USA),单克隆鼠抗 DNA 甲基转移酶(DNA methyltransferase,DNMT)抗体(abcam,USA),单克隆兔抗缺氧诱导因子 1α(hypoxia-inducible factor 1α,HIF1α)抗体(Millipore,Germany)。Transwell 小室(膜孔径 8 μm)为美国 Millipore 公司产品;Matrigel 基质胶购自美国 BD 公司。DNA 甲基化测序(Bisulfite sequencing PCR,BSP)主要由上海生工生物有限公司提供。测序区域为:

GTTTTCGTTGTTGGTTAGTTTTGTACGGTTGCGGGTTTT
GCGGCGTTCGGTGTTTTGTAACGTTGCGGCGGGCGGTATGG
GATAACGCGGTTATGGTGCGTCGAGATCGTTTTCGTAGGTG
AGTGTGCGGTGGGAACGAGGGGGTGTGGTTGGCGGTTTTGG
GATTAGGGCGTAGGCGAGCGGAGGATTGTGTGTTCGTGTTC
GAGTTGGGGTTGTTTTTGGG MEST-F5'-GTTTTYGTTGTT-GGTTAGTTTTG-3'MEST-R 5'-CCAAAAACAACCCCAACTC-3'。带框为设计的引物位置,中间部分为待测序列。MEST 片段中含有 22 个 CpG 位点。

1.2 方法

1.2.1 siRNA 转染及实验分组 HTR8/SVneo 细胞置于含 10% 胎牛血清的 RIPM1640 培养基常规培养,细胞生长至对数生长期时分别加入终浓度为 50 nmol/L MEST siRNA 和阴性对照 siRNA(NC siRNA)转染液,摇动混匀后,放入 37 ℃,CO_2 培养箱孵育 48 h 进行 MEST 蛋白表达检测实验。细胞分为 2 组:实验组(si-MEST)转染 MEST siRNA,对照组(si-NC)转染 NC siRNA。

1.2.2 分别用 Western blot 检测 MEST、DNMT1、DNMT3a、DNMT3b 和 HIF1α 的蛋白表达 分别提取各组细胞和组织总蛋白,测定蛋白浓度,蛋白上样量为 20 μg。依次进行电泳分离、转膜、封闭、一抗 4 ℃孵育过夜、二抗孵育 1 h,最后用 ECL 化学发光试剂盒显色。一抗浓度 MEST 抗体为 1:2 000 稀释、DNMT1、DNMT3a、DNMT3b 抗体为 1:2 000 稀释、HIF1α 抗体为 1:2 000,β-actin 抗体为 1:1 000 稀释。ChemiDocXRS 化学发光成像系统检测蛋白质印迹条带,用 Image Lab 图像分析软件进行分析。

1.2.3 Transwell 实验测定转染后细胞侵袭和迁移能力 细胞侵袭实验用 60 μl Matrigel(1:8 稀释)基质胶对 Transwell 小室的微孔膜进行铺胶,固化后,上室加入无血清培养基稀释的含细胞数量为 5×10^4 个、体积为 200 μl 细胞悬液,下室加入 600 μl 含 10%胎牛血清的培养液。置培养箱孵育 24 h 后,微孔膜外表面的细胞用甲醇固定 10 min,PBS 洗涤,结晶紫染色。迁移实验步骤与细胞侵袭实验基本相同,区别在于迁移实验 Transwell 小室的膜上不包被基质胶。在显微镜下随机选取 3 个视野,计数每视野中的细胞数,计算平均值。

1.2.4 四甲基偶氮唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium,MTT)显色法测定转染后细胞的增殖能力 细胞转染前 1 d 在 96 孔板中以 4×10^3 个细胞的密度铺板,待转染前细胞汇合度达到 70%时。细胞分别转染 MEST siRNA 或 NC siRNA,继续培养 20 h,细胞换液,每孔加入 100 μl MTT 试剂,继续培养 4 h,加入 100 μl DMSO 显色。在波长 570 nm 下,用酶标仪(Thermo scientific)测定每孔的吸光度值。

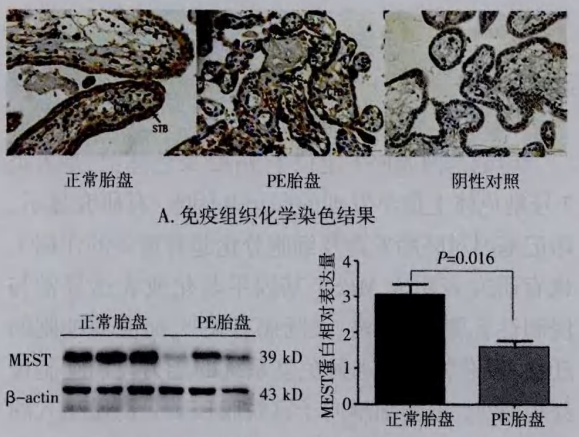
1.3 统计学处理

应用 GraphPad Prism 5.0 软件,所有值采用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用独立样本 t 检验分析。检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 MEST 蛋白在正常和 PE 胎盘中的表达

免疫组织化学结果显示，MEST 在正常胎盘中的阳性染色明显强于 PE 胎盘，且主要定位于细胞滋养层细胞（cytotrophoblast，CTB）（图 1A）；Western blot 结果显示，PE 胎盘组织中 MEST 蛋白表达量（2.640 ± 0.334）较正常胎盘组（4.524 ± 0.586）约降低 58%，且差异有统计学差异（t=2.810，P=0.016）。（图 1B）。



A. 免疫组织化学染色结果

B. Western blot 结果

STB：合体滋养层细胞；CTB：细胞滋养层细胞；棕褐色为阳性染色；400×

图 1 MEST 在正常胎盘和 PE 胎盘组织中的表达

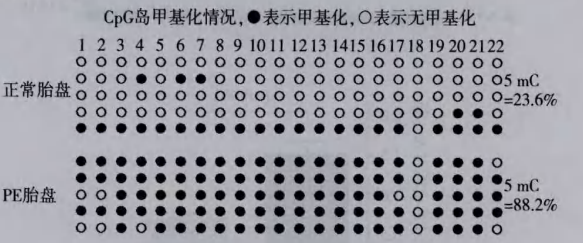
Fig.1 Expression of MEST protein in normal and PE placenta

2.2 正常和 PE 胎盘中 MEST 基因甲基化水平和 DNMTs 表达量

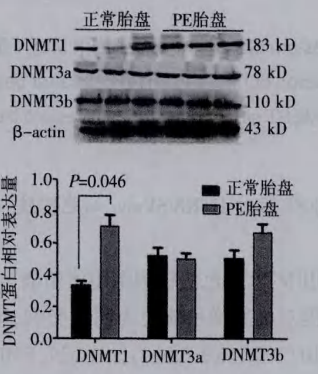
BSP 测序结果显示，MEST 基因在 PE 胎盘中甲基化率为 88.2%，在正常胎盘组中为 23.6%（图 2A）。由于 DNA 甲基化与 DNMTs 的表达密切相关。研究进一步分析了 3 种 DNMT-DNMT1、DNMT3a 和 DNMT3b 在 PE 和正常胎盘之间的差异。Western blot 结果显示，DNMT1 在 PE 胎盘中蛋白表达量（4.284 ± 0.787）比正常胎盘（2.347 ± 0.374）约升高 55%，差异有统计学意义（t=2.222，P=0.046），而 DNMT3a 和 DNMT3b 蛋白在正常和 PE 胎盘中的表达无明显差异[（3.000 ± 0.592），（2.483 ± 0.586），t=0.619，P=0.547；（3.648 ± 0.565），（3.376 ± 0.764），t=0.284，P=0.781]（图 2B）。

2.3 HTR-8 细胞 H/R 后 MEST 和 HIF1α 的蛋白表达

已有研究显示 PE 的发生与胎盘缺氧密切相关。研究进一步分析了缺氧对 MEST 表达的影响，Western blot 结果显示，MEST 蛋白在 H/R 组中的表达明显低于正常组（N 组），分别为（2.205 ± 0.318）、（4.856 ± 0.169），差异有统计学意义（t=7.339，P=0.002），而 HIF1α 蛋白在 H/R 组中的表达明显高于 N 组，分别为（7.091 ± 0.698）、（3.692 ± 0.441），差异有统计学意义（t=4.112，P=0.015）（见图 3）。研究提示 H/R 可能经HIF1α 途径影响 MEST 的表达。



A. BSP 法检测胎盘组织中 MEST 启动子甲基化



B. Western blot 检测 DNMT 蛋白在胎盘组织中的表达

图 2 MEST 基因在胎盘组织中的甲基化水平及 DNMT 蛋白表达水平

Fig.2 Promoter methylation of MEST in placenta tissue and the expression of DNMT protein level

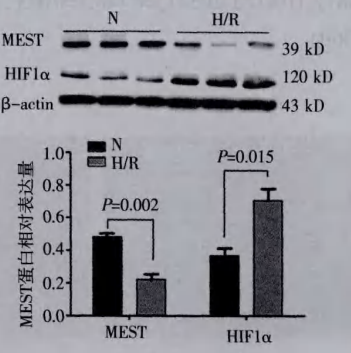


图 3 HTR8 细胞 H/R 后 MEST 和 HIF1α 的蛋白表达量

Fig.3 Expression of MEST and HIF1α in HTR8 cell lines after H/R treatment

2.4 siRNA 干扰后对 HTR8/SVneo 细胞中 MEST 蛋白表达的影响

进而模拟 MEST 表达抑制对滋养细胞迁移、侵袭和增殖等能力的影响。Western blot 检测 MEST 蛋白表达结果显示，siRNA 能显著抑制 MEST 蛋白表达，干扰后分别为（6.195 ± 0.280）；（1.373 ± 0.968），差异有统计学意义（t=7.451，P=0.002），说明干扰成功（见图 4）。

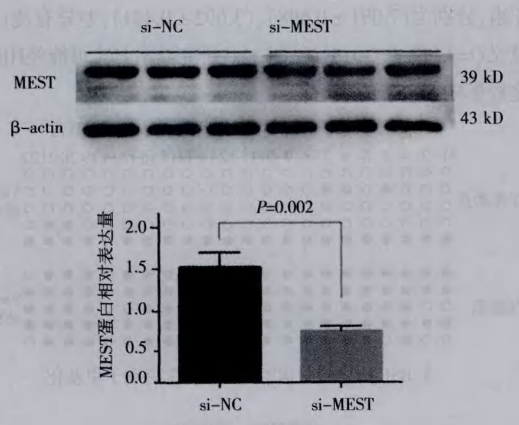


图 4 Western blot 检测转染后细胞中 MEST 蛋白的表达

Fig.4 Expression of MEST in HTR8 cells after being treated with MEST siRNA detected by Western blot

2.5 干扰 MEST 后对 HTR8/SVneo 细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响

研究采用 MTT 比色法检测细胞增殖能力，结果显示干扰 MEST 基因对细胞增殖能力无明显影响，干扰后分别为（0.170 ± 0.010）、（0.158 ± 0.010）（t=1.029，P=0.361，见图 5）。Matrigel 侵袭实验结果显示，干扰 MEST 后 HTR8 细胞侵袭能力明显降低，约为对照组的 52%[分别为（1.057 ± 0.061）、（0.551 ± 0.029），t=7.379，P=0.002]差异有统计学意义（见图6A）。Transwell 迁移实验检测细胞迁移结果显示，干扰 MEST 后 HTR8 细胞迁移能力明显下降，约为对照组的 42%[分别为（1.113 ± 0.087）、（0.477 ± 0.034），t=6.746，P=0.003]，差异有统计学意义（见图6B）。

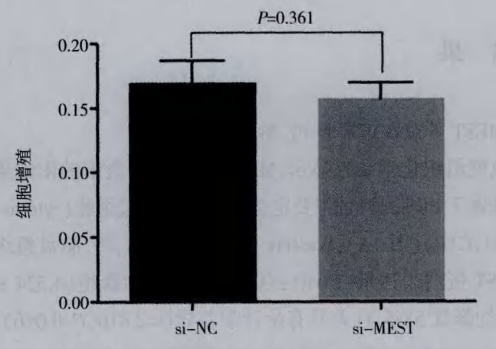


图 5 MTT 法检测干扰后细胞增殖能力的改变

Fig.5 Cell proliferation potential identified by MTT assay

3 讨 论

印记基因 MEST 定位于 7q32 染色体上，是人类 7 号染色体上最早发现的印记基因[4]。有研究显示，印记基因对胚胎发育及细胞分化起着重要的作用[9]。也有研究表明人 MEST 基因甲基化或表达异常与侵润性乳腺癌、肺癌、大肠癌有关[10]，而滋养细胞的迁移、侵袭特性和逃避免疫系统的能力与癌细胞极其相似[11]。滋养细胞向子宫蜕膜侵袭是胚胎植入的关键，而侵袭能力不足会导致妊娠期并发症，如自然流产、宫内生长受限、子痫前期等[12]。但是 MEST 在胎盘发育相关疾病中的作用目前并不清楚。本研究结果显示，MEST 在 PE 胎盘中蛋白表达低于正常胎盘，提示 MEST 可能参与 PE 的发生过程。MEST

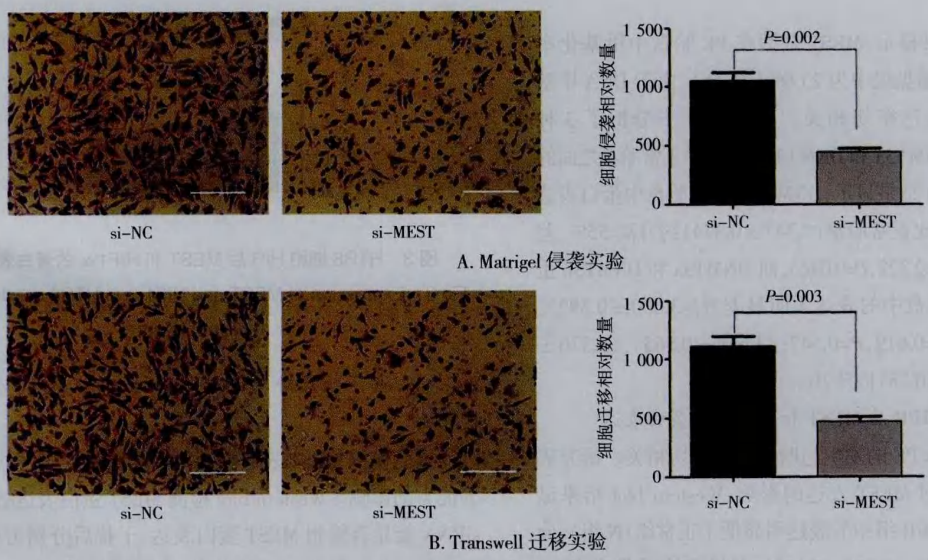


图 6 干扰 MEST 后细胞侵袭和迁移能力检测

Fig.6 Changes of migration and invasion potential in HTR8 cells after being treated with siRNA

作为印记基因，受 DNA 甲基化的调控，DNA 甲基化异常与胎盘代谢功能异常相关[13]。且父源基因MEST宫内暴露可导致启动子异常甲基化[14]。本研究结果显示 PE 胎盘中 MEST 启动子超甲基化，这可能提示 DNA 甲基化可能通过抑制 MEST 基因的表达，参与 PE 的发生过程。现已知胎盘 H/R 导致的氧化应激损伤和基因的甲基化异常是导致 PE 发生的重要因素[2-3]，而在细胞缺氧时，HIF1α 诱导和参与一系列缺氧病理生理反应，进一步引起血管内皮损伤，最终发展为 PE[15-16]。且 HIF1α 介导下的上皮间质转化过程在肿瘤的浸润转移中发挥着重要作用[17]，缺氧亦能改变滋养细胞的 DNA 甲基化[18]。进而利用来源于人类正常早孕期胎盘的绒毛外滋养细胞系 HTR8/SVneo 细胞株分析 H/R 对 MEST 的影响，结果显示，H/R 后 HIF1α 表达显著增高而 MEST 表达明显降低，这可能提示 H/R 产生的氧化应激通过 HIF1α 使 MEST 发生异常甲基化，从而降低滋养细胞侵袭和迁移能力，最终导致 PE 的发生。

此外，本研究还采用 siRNA 干扰 MEST 基因的表达模拟高甲基化过程，结果同样显示抑制 MEST 的表达可显著抑制绒毛外滋养细胞的迁移、侵袭能力。这提示，MEST 除了与胎盘发育功能相关，亦与滋养细胞的侵袭与迁移相关。MEST 因 DNA 甲基化调控异常，进而引起的基因表达异常，可能是 PE 发生的原因之一。

综上所述，MEST 基因可能参与了调控滋养细胞的侵袭与迁移过程，MEST 基因异常甲基化或者表达水平下降可能抑制滋养细胞的侵袭与迁移能力。本研究结果可能为子痫前期等滋养细胞功能障碍疾病的诊断和治疗提供新的思路。

参 考 文 献

[1] Coolman M, de Groot CJ, Jaddoe VW, et al. Medical record validation of maternally reported history of preeclampsia[J]. J Clin Epidemiol, 2010, 63(8): 932-937.

[2] Genbacev O, Joslin R, Damsky CH, et al. Hypoxia alters early gestation human cytotrophoblast differentiation/invasion in vitro and models the placental defects that occur in preeclampsia[J]. J Clin Invest, 1996, 97(2): 540-550.

[3] Choudhury M, Friedman JE. Epigenetics and microRNAs in preeclampsia[J]. Clin Exp Hypertens, 2012, 34(5): 334-341.

[4] Lefebvre L, Viville S, Barton SC, et al. Abnormal maternal behavivour and growth retardation associated with loss of the imprinted gene Mest[J]. Nat Genet, 1998, 20(2): 163-169.

[5] Koukoura O, Sifakis S, Spandidos DA, et al. DNA methylation in the human placenta and fetal growth(review)[J]. Mol Med Rep, 2012, 5(4): 883-889.

[6] McMinn J, Wei M, Sadovsky Y, et al. Imprinting of PEG1/MEST isoform 2 in human placenta[J]. Placenta, 2006, 27(2-3): 119-126.

[7] Mayer W, Hemberger M, Frank HG, et al. Expression of the imprinted genes MEST/Mest in human and murine placenta suggests a role in angiogenesis[J]. Developmental Dynamics, 2000, 217(1): 1-10

[8] 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]. Reprod Biomed Online, 2014, 28(1): 70-79.

[9] Falls JG, Pulford DJ, Wylie AA, et al. Genomic imprinting: implications for human disease[J]. American Journal of Pathology, 1999, 154(3): 635-647.

[10] Pedersen IS, Dervan PA, Broderick D, et al. Frequent loss of imprinting of PEG1/MEST in invasive breast cancer[J]. Cancer Research, 1999, 59(21): 5449-5451.

[11] Ferretti C, Bruni L, Dangles-Marie V, et al. Molecular circuits shared by placental and cancer cells, and their implications in the proliferative, invasive and migratory capacities of trophoblasts[J]. Human Reproduction Update, 2007, 13(2): 121-141.

[12] Knofler M, Pollheimer J. IFPA Award in Placentology lecture: molecular regulation of human trophoblast invasion[J]. Placenta, 2012, 33(s): 55-62.

[13] Himes KP, Young A, Koppes E, et al. Loss of inherited genomic imprints in mice leads to severe disruption in placental lipid metabolism [J]. Placenta, 2015, 36(4): 389-396.

[14] El Hajj N, Pliushch G, Schneider E, et al. Metabolic programming of MEST DNA methylation by intrauterine exposure to gestational diabetes mellitus[J]. Diabetes, 2013, 62(4): 1320-1328.

[15] Fiona L, Judith Nicola B, Elizabeth D, et al. Human trophoblast invasion and spiral artery transformation: the role of pecam-1 in normal pregnancy, preeclampsia, and fetal growth restriction[J]. American Joumal of Pathology, 2001, 158(5): 1713-1721.

[16] Naicker T, Khedun SM, Moodley, et al. Quanititative analysis of trophoblast invasion in preeclampsia[J]. Acta Obstet Gynecol Scand, 2003, 82(8): 722-729.

[17] Zhang Q, Bai X, Chen W, et al. Wnt/beta-catenin signaling enhances hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma via crosstalk with hif-1alpha signaling[J]. Carcinogenesis, 2013, 34(5): 962-973.

[18] Yuen RK, Chen B, Blair JD, et al. Hypoxia alters the epigenetic profile in cultured human placental trophoblasts[J]. Epigenetics, 2013, 8(2): 192-202.

（责任编辑：冉明会）