基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000840

GPR30蛋白对滋养细胞功能的影响与子痫前期发病的关系

冯 祥,张 华

(重庆医科大学附属第一医院妇产科,重庆 400016)

【摘 要】**目的**:探讨 G-蛋白偶联受体 30(G-protein coupled receptor 30,GPR30)在不同妊娠状态时的滋养细胞上的表达情况,以及其表达变化与子痫前期(preeclampsia,PE)发病的关系。**方法**:应用免疫荧光及免疫组化的方法检测不同孕周早孕期绒毛中 GPR30 的表达,应用免疫组化及 Western blot 检测晚孕期正常和 PE 患者胎盘组织中 GPR30 的表达水平。用缺氧复氧(hypoxia-reoxygenation,H/R)处理人类绒毛膜滋养层细胞株 HTR8/SVneo 以建立 PE 模型,检测其 GPR30 的表达状况。用 17β-雌二醇(17 β-estradiol,E2)、GPR30 特异性激动剂 G1 和阻滞剂 G15 处理 HTR8/SVneo 细胞及绒毛外植体,观察处理因素对滋养层细胞侵袭力的影响。**结果**:GPR30 在早期绒毛组织细胞滋养细胞上表达水平高;晚孕期正常胎盘滋养细胞上 GPR30 的表达明显高于 PE 胎盘。在 PE 细胞模型上 GPR30 表达明显减少。E2 及 G1 可增加滋养细胞的侵袭能力,G15 则可下调其侵袭力。**结论**:GPR30 表达降低可能下调滋养细胞侵袭力,从而与 PE 发病有关。

【关键词】G-蛋白偶联受体 30;子痫前期;滋养细胞;侵袭力

【中图分类号】R714 【文献标志码】A 【收稿日期】2015-06-12

Effect of GPR30 protein on function of trophoblast cells and its relationship with the development of preeclampsia

Feng Xiang, Zhang Hua

(*Department of Obstetrics and Gynecology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University*)

【Abstract】***Objective***: To characterize the expression of G-protein coupled receptor 30(GPR30) in trophoblast cells at different conditions, and to determine the effect of disordered expression of GPR30 on the development of preeclampsia(PE). ***Methods***: The expressions of GPR30 protein were detected not only in villi at first trimester, placentas from normal term and pregnancies complicated with PE, but also in HTR8/SVneo cells which treated with normoxia and hypoxia-reoxygenation(H/R) by immunofluorescence, immunohistochemistry and/or Western blot. The pharmacological modulations of GPR30 were built by the using of 17 β-estradiol(E2), GPR30 specific agonist G1 and GPR30 specific inhibitor G15. H/R was applied to simulate the pathological condition of PE; their effect on human trophoblast cell invasion was determined using vitro invasion assays. ***Results***: GPR30 protein was highly expressed in the cytotrophoblast of first trimester villi and the term placentas from the gestational matched controls(GMCs), but significantly compromised in PE cells model and placentas which complicated by PE. In addition, E2 and G1 treatment significantly increased the invasive capacity of trophoblast cells, however, the antagonist G15 play an opposite role. Meanwhile, H/R significantly attenuated invasiveness of trophoblast cells. ***Conclusion***: the pathogenetic mechanism of PE is associated with the downregultaion of GPR30 protein level in trophoblast which may impair the invasive capacity of trophoblast cells.

【Keywords】G-protein coupled receptor 30; preeclampsia; trophoblast cells; invasion

子痫前期(preeclampsia,PE)为妊娠期特有并发症,是导致孕产妇和围产儿病率及死亡率升高的主要原因之一,但是其病因和发病机制至今尚未完全阐明。目前研究表明,胚胎滋养层细胞侵袭性降低导致胎盘浅着床及子宫螺旋动脉重塑不良与 PE 发病有着重要联系[1-4]。

G-蛋白偶联受体 30(G-protein coupled receptor 30,GPR30)作为新型雌激素受体[5-6],可增加雌激素相关癌细胞如乳腺癌细胞的侵袭功能[7-9]。妊娠期间,

作者介绍:冯 祥,Email:2443772733@qq.com,
研究方向:子痫前期。

通信作者:张 华,Email:zh2844@ gmail.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81100444、81370732)。

优先出版:http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20160109.2101.024.html (2016-01-19)

雌激素水平明显升高，是保证妊娠过程正常进行的重要前提条件，而雌激素通过 GPR30 对妊娠的调节以及与妊娠期并发症如 PE 发病关系尚未有相关的研究报道。本研究拟以 GPR30 在妊娠期绒毛组织或不同胎盘组织中的表达状况为线索，探索 GPR30 是否能通过调控滋养细胞侵袭功能从而影响 PE 发病。

1 材料及方法

1.1 绒毛组织和胎盘的收集

选取未使用任何药物干预的孕 6~10 周，平均孕周为（8.54±2.28）周自愿行人工流产手术终止妊娠患者的早孕期活体绒毛 5 例。选取 2012 年 3 月至 2013 年 3 月在重庆医科大学附属第一医院产科终止妊娠的晚孕期正常对照组（gestational matched controls，GMCs）胎盘 10 例，平均孕周为（36.89±0.80）周。PE 患者的胎盘 7 例，平均孕周为（36.37±1.12）周。PE 诊断标准依据第七版《妇产科学》。研究对象均为单胎，患者既往无吸烟及酗酒史，无其他合并症，且孕期无感染性疾病。该研究获得重庆人体实验伦理委员会批准，受试者知情并同意。

1.2 主要试剂

17β-雌二醇（17β-estradiol，E_2，ab-120657，Abcam）；GPR30 特异性激动剂-G1（G-6798，Sigma）；GPR30 特异性抑制剂-G15（G6548，Sigma）[10]；多克隆兔抗 GPR30 抗体（ab154069，Abcam）；多克隆兔抗 cytokeratin7（CK7）抗体（ab68459，Abcam），多克隆鼠抗 CK7 抗体（ab151271，Abcam）。

1.3 方法

1.3.1 免疫组化法 具体操作步骤依照免疫组化试剂盒（凯基生物）进行，并利用分析软件（Image Pro Plus 6.0）对组化结果光学密度进行分析。一抗浓度，GPR30 一抗浓度 1:250，CK7 一抗浓度为 1:300。

1.3.2 免疫荧光染色法 绒毛组织冰冻切片或细胞爬片，用 4%多聚甲醛 4 ℃固定 10 min，PBS 漂洗 3 次。用山羊封闭血清常温封闭 1.5 h。绒毛组织多重染色时，封闭后均匀滴加兔抗 GPR30 抗体与鼠抗 CK7 抗体混合的混合稀释抗体（GPR30 为 1:250，CK 为 1:300），4 ℃保湿孵育 48 h，PBS 漂洗 3 次后用异硫氰酸荧光素（FITC）标记的羊抗兔二抗（E031220-01，EARTH）和四甲基异硫氰酸罗丹明（TRITC）标记的羊抗鼠二抗（CW0152，CWBIO）混合抗体（浓度都为 1:50）在 37 ℃条件下避光保湿孵育 2 h，PBS 漂洗后用 DAPI（VECTOR）荧光染核 1.5 min，封片后在显微镜（EVOS FL Auto）下观察 GPR30 的表达。对于细胞爬片，均匀滴入兔抗人 GPR30 多克隆抗体（1:250），4 ℃保湿孵育 48 h，PBS 漂洗 3 次后用异硫氰酸荧光素（FITC）标记的羊抗兔二抗（1:50）37 ℃避光保湿孵育 2 h。碘化丙啶（PI）染核 1.5 min，PBS 漂洗后封片，用激光扫描共聚焦显微镜（Olympus FV10i）观察细胞 GPR30 蛋白表达。

1.3.3 细胞及处理分组 HTR8/SVneo 细胞株由加拿大 Graham 教授惠赠，用含 10%胎牛血清（Gibco）的 RIPM1640 培养基（Gibco）培养。细胞干预及实验分组为：对照组（CON 组，1‰DMSO）、E2 处理组（E2 组）、G1 处理组（G1 组）、G15 处理组（G15 组）、E2 联合 G15 处理组（E2+G15 组）以及缺氧复氧（hypoxia-reoxygenation，H/R）处理组（H/R 组，2%O_2 孵箱中培养 8 h 后移入常氧孵箱继续培养 16 h，下同），在常氧孵箱中培养 24 h 即常氧（Normoxia）处理组（Normoxia 组）。E2、G1、G15 溶于 DMSO 至 1 mol/L 为储存液备用，用完全培养基稀释至工作浓度（E2，G15 为 0.1 μmol /L，G1 为 0.01 μmol/L）。

1.3.4 绒毛组织及处理 收集到的无菌活体绒毛标本在超净台上用无菌 PBS 清洗去除红细胞，剪碎绒毛至 1~3 mm（注意避开血管，取绒毛外围的顶部），将剪碎的绒毛组织转移至提前铺置有基质胶（BD）的 24 孔板，每孔 4、5 个组织块，加 1 ml 培养基（含 20%胎牛血清），37 ℃常规孵箱中孵育 4 h 待外植体锚定，之后进行药物处理，分组及处理与细胞相同。于镜下观察绒毛组织细胞延展情况和细胞状态，并取图像（OLYMPUS），图像调至相同的适当倍数测量延展距离。

1.3.5 细胞侵袭实验 在侵袭小室上室中加 60 μl 稀释的基质胶（稀释比例 1:10），37 ℃孵箱中孵育 3 h 成胶，上室中加入 200 μl 无血清培养基重悬的细胞悬液（细胞数 1.5×10^5 个），并加入干预处理，下室加 700 μl 含 10%胎牛血清的培养液。置孵箱孵育 24 h，棉签去除上室细胞后用多聚甲醛固定 10 min，甲醇通透 10 min，PBS 漂洗，0.5%结晶紫染色 3 min。用图像分析软件 Image Pro Plus 6.0 随机计数 10 个视野下细胞数。

1.3.6 Western blot 胎盘组织（30 mg）碾碎或细胞（10^6 个），用 RIPA 裂解液提取总蛋白。BCA 法测定蛋白浓度，上样量为 50 μg/孔。依次进行电泳分离、转膜、封闭、一抗孵育过夜、二抗孵育，ECL 化学发光试剂盒显色。Fusion FX5 化学发光成像系统检测蛋白印记条带及 Fusion 图像分析软件进行分析。一抗浓度 GPR30 为 1:1 000，β-actin 为 1:1 000。

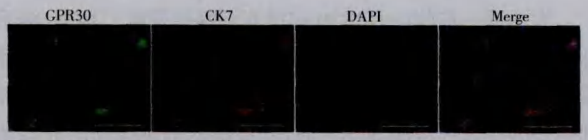
1.4 统计学处理

应用 SPSS 17.0 软件进行统计分析，数据以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，多样本均数比较采用单因素方差分析进行比较，组间两两比较采用 LSD-t 法，检验水准 α=0.05。

2 结 果

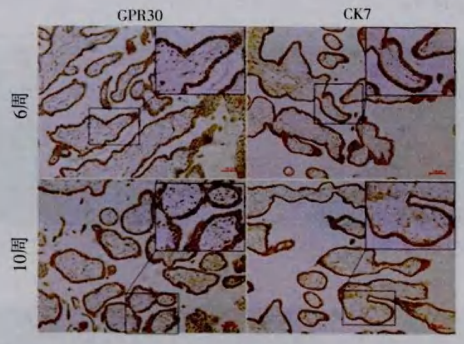
2.1 GPR30 在早孕期绒毛细胞滋养细胞中有明显的表达

首先，应用多重荧光染色的方法探寻 GPR30 在绒毛组织上的表达位置，结果显示，GPR30 的表达位置与细胞滋养细胞特异性标记标记蛋白 CK7 表达位置一致，提示 GPR30 表达于细胞滋养细胞（图 1A）。免疫组化结果显示，GPR30 在不同孕周的早孕期绒毛中都有明显的表达，且表达位置位为细胞滋养细胞，通过半定量的方法比较 GPR30 蛋白表达水平时显示没有统计学差异（P=0.770），见图 1B，表 1。



注：CK7 为绒毛外细胞滋养细胞特异性表达蛋白，用于标记细胞滋养细胞的位置

A. GPR30 蛋白、CK7 蛋白免疫荧光和细胞核 DAPI 多重染色



B. 免疫组化检测 GPR30 在不同孕周早孕期绒毛上的表达

图 1　GPR30 在早孕期绒毛细胞滋养层细胞上的表达

Fig.1　Expression of GPR30 in cytotrophoblast of villus cell at the first trimester

表 1　检测早孕期绒毛中细胞滋养细胞中 GPR30 的平均吸光度值（$\bar{x} \pm s$）

Tab.1　Average positive absorbance of GPR30 in cytotrophoblast of villus cell at the first trimester（$\bar{x} \pm s$）

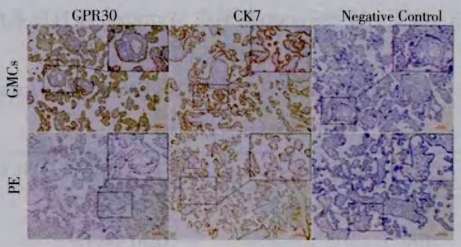
组别	免疫组化平均吸光度值 GPR30 表达
6 周	10.08 ± 1.27
10 周	10.50 ± 1.92
t 值	0.320
P 值	0.770

2.2　GPR30 在 GMCs 胎盘和 PE 患者胎盘组织中的表达存在差异

用免疫组化的方法检测晚孕期 GMCs 和 PE 胎盘组织中 GPR30 的表达状况，结果显示，GPR30 在 GMCs 胎盘组织的细胞滋养细胞中有较高水平的表达，但是在 PE 胎盘组织的细胞滋养细胞中，GPR30 的表达却明显降低（P=0.004）。为进一步检验该结果，本课题组使用了 Western blot 方法，结果同样显示，GPR30 在 PE 胎盘组织中的表达水平明显低于 GMCs 组（P=0.024）。见图 2，表 2。

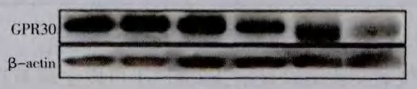
2.3　H/R 环境下，HTR8/SVneo 细胞表达的 GPR30 下调

为进一步验证以上实验结果，HTR8/SVneo 细胞分别在 Normoxia 和 H/R 的条件下进行处理以建立正常及 PE 妊娠模型[11-12]，并用免疫荧光的方法检测 GPR30 表达位置，Western blot 的方法检测 GPR30 表达水平。荧光结果显示，GPR30 在 HTR8/SVneo 细胞中有明显表达。见图 3A、B。Western blot 结果显示，GPR30 在 H/R 条件下明显下调（P=0.001）。见图3C，表3。



Negative Control：阴性对照，未加任何一抗

A. 免疫组化显示 GPR30 在 GMCs 和 PE 胎盘中的表达



B. Western blot 方法检测 GPR30 在 GMCs 和 PE 胎盘中的表达

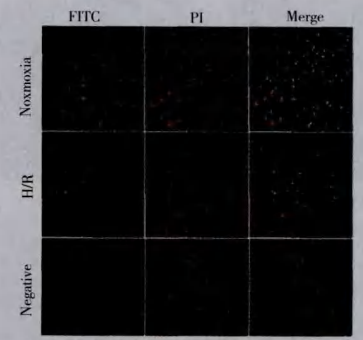
图 2　GPR30 在晚孕期正常和 PE 胎盘组织中的表达

Fig.2　Expression of GPR30 protein in placentas from normal term and PE pregnancies

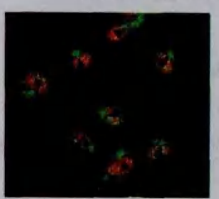
表 2　检测晚孕期正常和 PE 胎盘中 GPR30 的平均吸光度值（$\bar{x} \pm s$）

Tab.2　Average positive absorbance of GPR30 in placentas from normal term and PE pregnancies（$\bar{x} \pm s$）

组别	免疫组化 GPR30 表达	Western blotGPR30 表达
GMCs	9.68 ± 1.27	3.06 ± 0.23
PE	4.02 ± 1.00	1.97 ± 0.48
t 值	6.060	3.560
P 值	0.004	0.024

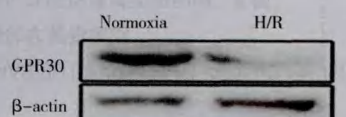


A. 免疫荧光显示，HTR8/SVneo 细胞在 Normoxia 及 H/R 时 GPR30 的表达



▲指示细胞内的 GPR30 高表达区（400×）

B. 高倍镜下，GPR30 在 HTR8/SVneo 细胞上的表达位置



C. Western blot 检测 HTR8/SVneo 细胞在 Normoxia 及 H/R 时 GPR30 的表达

图 3　HTR8/SVneo 细胞在 Normoxia 及 H/R 条件下 GPR30 的表达位置及表达水平

Fig.3　Localization and expression of GPR30 in HTR8/SVneo cells treated by normoxia and H/R

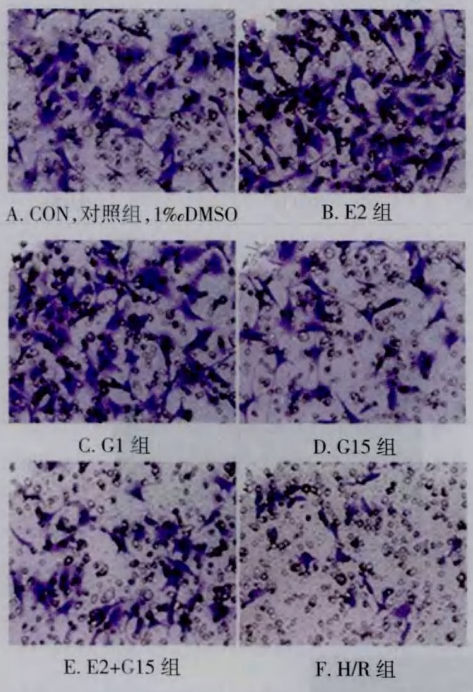
表 3 检测 HTR8/SVneo 细胞在 Normoxia 和 H/R 条件下 GPR30的表达（$\bar{x} \pm s$）

Tab.3 Expression of GPR30 in HTR8/SVneo cells treated by normoxia and H/R（$\bar{x} \pm s$）

组别	Western blot 平均吸光度值 GPR30 表达
Normoxia	1.44 ± 0.10
H/R	0.40 ± 0.18
t 值	8.610
P 值	0.001

2.4 GPR30 参与对滋养细胞侵袭功能的调节

细胞侵袭实验结果显示，E2 和 G1 可以上调 HTR8/SVneo 细胞侵袭力，而 G15 有下调 HTR8/SVneo 细胞侵袭性的趋势，并且 G15 可能发挥了对抗 E2 调节功能的作用，用 H/R 处理后，细胞的侵袭能力明显下降，而且细胞的形态也发生改变（P_a=0.011 E2 vs. ；P_a=0.012 G1 vs. ；P_a=0.038 H/R vs. ；P_b=0.007 G15 vs. ；P_b=0.010 E2+G15 vs. ；P_b=0.003 H/R vs. ；P_c=0.007 G15 vs. ；P_c=0.011 E2+G15 vs. ；P_c=0.003 H/R vs. ）。见图 4，表4。



A. CON，对照组，1‰DMSO　B. E2 组

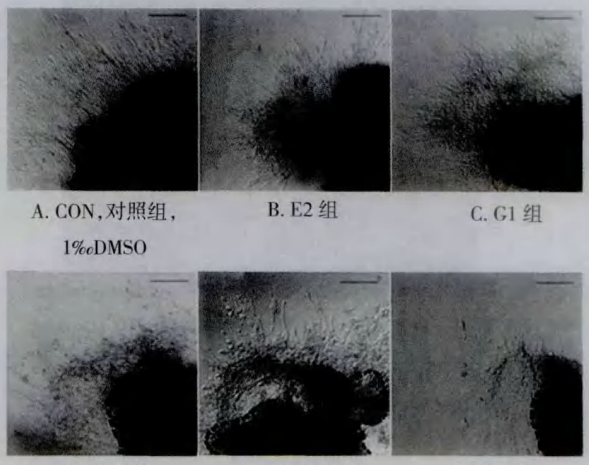
C. G1 组　D. G15 组

E. E2+G15 组　F. H/R 组

图 4 细胞侵袭实验检测 GPR30 对 HTR8/SVneo 细胞侵袭力的影响

Fig.4 Effect of GPR30 on HTR8/SVneo cells invasive capacity

为了进一步验证 GPR30 对滋养细胞侵袭能力影响，绒毛外植体实验也被采用。结果显示，在 E2 和 G1 处理的外植体滋养细胞的外展侵袭能力上调，G15 处理的外植体不仅滋养细胞外展侵袭的范围减小，而且延展出的细胞排列明显紊乱（P_a=0.014 E2 vs. ；P_a=0.012 G1 vs. ；P_a=0.019 H/R vs. ；P_b=0.017 G15 vs. ；P_b=0.001 H/R vs. ；P_c=0.015 G15 vs. ；P_c=0.001 H/R vs.）。见图 5，表 4。



A. CON，对照组，1‰DMSO　B. E2 组　C. G1 组

D. G15 组　E. E2+G15 组　F. H/R 组

图 5 绒毛外植体实验检测 GPR30 对滋养细胞外展侵袭力的影响

Fig.5 GPR30 regulates trophoblast cells invasion in explants

3 讨 论

妊娠期间，雌激素水平明显上升，通过其受体对维持正常妊娠状态起重要作用。经典雌激素核受体 ERα 和 ERβ 与雌激素结合，发生构象变化，继而与细胞核内 DNA 结合，作为转录因子影响基因的表达，最后导致细胞功能改变[13-14]，但此途径发挥作用较慢，且不会涉及细胞内第二信使，称为雌激素的慢速基因作用。然而有证据显示，许多细胞内信号通路是主要由雌激素快速非基因组效应介导[15]。Filardo 等证明 GPR30 为新型雌激素受体，介导雌激素的快速反应通路[16]。同时，有大量研究表明，GPR30 介导雌激素促进雌激素相关肿瘤如乳腺癌，子宫内膜癌以及绒毛膜癌等癌细胞的增殖侵袭迁移能力，

表 4 侵袭实验中细胞数量和外植体中滋养细胞延展距离（$\bar{x} \pm s$）

Tab.4 Average number of invasive HTR8/SVneo cells in cells invasion assay and outgrowth distance of trophoblast cells from the tip of explants（$\bar{x} \pm s$）

组别	CON	E2	G1	G15	E2+G15	H/R	F 值	P 值
侵袭细胞数（个）	96.70 ± 12.58	166.33 ± 24.01^{a}	169.33 ± 25.50^{a}	82.33 ± 14.36^{bc}	94.00 ± 13.53^{bc}	64.00 ± 13.53^{abc}	52.500	0.000
细胞延展距离（mm）	10.33 ± 1.75	15.83 ± 1.46^{a}	16.13 ± 1.52^{a}	9.03 ± 2.60^{bc}	10.27 ± 5.49	4.87 ± 1.78^{abc}	6.980	0.002

注：a，与 CON 组比较；b，与 E2 组比较；c，与 G1 组比较

从而增加了癌细胞的恶性程度[17-19]。动物实验发现，GPR30 对小鼠早孕期的胚胎着床以及胚胎发育有重要作用，G15 可以下调小鼠囊胚对子宫壁的亲和力，降低胚胎着床率[20]。提示 GPR30 可能与胚胎滋养细胞的侵袭功能有关。

而目前已明确，滋养细胞侵袭能力下降导致的胚胎浅着床和子宫螺旋动脉重塑不良是导致 PE 的早期病理改变的关键[21-23]。滋养细胞不仅有分泌各种激素的功能，也作为一种具有侵袭性的特殊细胞侵入母体的蜕膜层，使子宫螺旋动脉重塑，保证胎儿足够的血氧供应。滋养细胞侵袭力不足产生的一系列后果会导致胎儿缺血缺氧和胎盘缺氧复氧损伤，进而释放各种因子并进入母体导致 PE 的发病[12,22]。雌激素受体 GPR30 是否能通过影响滋养细胞侵袭力而与 PE 等妊娠期并发症发生发展有关，目前尚未见相关研究。

在本研究中，发现 GPR30 在早孕期不同孕周的绒毛细胞滋养细胞上均有较高表达，提示 GPR30 对早孕期胚胎着床、细胞滋养细胞的功能可能发挥某种作用。然而，在晚孕期 PE 胎盘组织的滋养细胞上的 GPR30 表达明显低于 GMCs 组，故提示 GPR30作用于滋养细胞对维持正常的妊娠有重要作用，且其表达下降可能与 PE 发病有关。但因为伦理等因素，课题组无法采集到中孕期的胎盘标本检测 GPR30 表达情况，比较各阶段 GPR30 的表达变化。在 PE细胞模型中还发现，GPR30 主要表达于 HTR8/SVneo 细胞的细胞膜和核旁细胞器上，该细胞器可能为内质网，提示 GPR30 影响蛋白合成。通过细胞和外植体的药理学模型，检测 GPR30 对滋养细胞侵袭性的影响时发现，上调或激活 GPR30 可以使细胞侵袭能力增加；而下调或阻滞 GPR30 则导致了侵袭力下降。在 H/R 处理后，滋养的细胞的侵袭性则明显下降，而结合 GPR30 在常氧和 H/R 环境中的表达差异，提示 H/R 可能通过改变 GPR30 蛋白水平的表达，从而降低滋养细胞的侵袭能力。

本研究首次探究了 GPR30 在早孕期绒毛和不同胎盘组织的细胞滋养细胞上的表达状况，发现了 GPR30 在 PE 患者胎盘细胞滋养细胞上表达降低，初步证明了滋养细胞侵袭力的下调与 GPR30 表达下降有关，从而推断 PE 发病可能与 GPR30 蛋白表达水平下降有关。在研究中也有许多值得改进的方法及值得深究的问题，如：采用更精确的实时检测方法测量细胞侵袭能力的改变，更加深入探究GPR30对滋养细胞侵袭力调控的下游分子机制等。

参 考 文 献

[1] Reister F, Frank HG, Kingdom JC, et al. Macrophage-induced apoptosis limits endovascular trophoblast invasion in the uterine wall of preeclamptic women[J]. Lab Invest, 2001, 81(8): 1143-1152.

[2] Khong TY, De Wolf F, Robertson WB, et al. Inadequate maternal vascular response to placentation in pregnancies complicated by pre-eclampsia and by small-for-gestational age infants[J]. Br J Obstet Gynaecol, 1986, 93(10): 1049-1059.

[3] Huppertz B. Placental origins of preeclampsia: challenging the current hypothesis[J]. Hypertension, 2008, 51(4): 970-975.

[4] Brosens IA, Robertson WB, Dixon HG. The role of the spiral arteries in the pathogenesis of preeclampsia[J]. Obstet Gynecol Annu, 1972(1): 177-191.

[5] Prossnitz ER, Maggiolini M. Mechanisms of estrogen signaling and gene expression via GPR30[J]. Mol Cell Endocrinol, 2009, 308(1-2): 32-38.

[6] Bjornstrom L, Sjoberg M. Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes[J]. Mol Endocrinol, 2005, 19(4): 833-842.

[7] Prossnitz ER, Arterburn JB, Smith HO, et al. Estrogen signaling through the transmembrane G protein-coupled receptor GPR30[J]. Annu Rev Physiol, 2008(70): 165-190.

[8] Lappano R, Pisano A, Maggiolini M. GPER Function in breast cancer: an overview[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2014(5): 66.

[9] Petrie WK, Dennis MK, Hu C, et al. G protein-coupled estrogen receptor-selective ligands modulate endometrial tumor growth[J]. Obstet Gynecol Int, 2013(2013): 472720.

[10] Burai R, Ramesh C, Nayak TK, et al. Synthesis and characterization of tricarbonyl-Re/Tc(I) chelate probes targeting the G protein-coupled estrogen receptor GPER/GPR30[J]. PLoS One, 2012, 7(10): e46861.

[11] Luo X, Yao ZW, Qi HB, et al. Gadd45alpha as an upstream signaling molecule of p38 MAPK triggers oxidative stress-induced sFlt-1 and sEng upregulation in preeclampsia[J]. Cell Tissue Res, 2011, 344(3): 551-565.

[12] Hung TH, Burton GJ. Hypoxia and reoxygenation: a possible mechanism for placental oxidative stress in preeclampsia[J]. Taiwan J Obstet Gynecol, 2006, 45(3): 189-200.

[13] Molvarec A, Ver A, Fekete A, et al. Association between estrogen receptor alpha(ESR1) gene polymorphisms and severe preeclampsia[J]. Hypertens Res, 2007, 30(3): 205-211.

[14] Maruyama A, Nakayama T, Sato N, et al. Association study using single nucleotide polymorphisms in the estrogen receptor beta(ESR2) gene for preeclampsia[J]. Hypertens Res, 2004, 27(12): 903-909.

[15] Feldman RD, Gros R. Rapid vascular effects of steroids - a question of balance[J]. Can J Cardiol, 2010, 26(Suppl A): 22A-26A.

基础研究 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000691

丹皮酚对 HepG2 细胞 MRP2 表达和功能的影响

王莉莉，于 超
（重庆医科大学生命科学研究院，重庆 400016）

【摘 要】**目的**：研究丹皮酚对人肝细胞株 HepG2 细胞中多药耐药相关蛋白 2（multidrug resistance-associated protein 2，MRP2）表达及功能的影响，以探讨丹皮酚消退黄疸的作用机制。**方法**：采用 CCK8 法检测丹皮酚对 HepG2 细胞存活率的影响；qPCR 法测定丹皮酚对 HepG2 细胞 MRP2 和 PXR mRNA 表达水平的影响；流式细胞术测定丹皮酚干预后细胞内 CDFDA 的荧光强度。**结果**：丹皮酚（2 μg/ml）对 HepG2 细胞存活率影响较小；丹皮酚在实验条件下明显上调 MRP2 药物转运体和 PXR 在转录水平的表达，并增加其对 MRP2 特异性荧光底物的转运效率（P=0.000）。**结论**：丹皮酚可能通过上调 PXR 诱导 HepG2 细胞药物转运体 MRP2 基因表达，从而促进其底物的跨膜转运。提示丹皮酚上调 MRP2 转运体表达而起到降黄的临床作用可能与核受体PXR途径相关。

【关键词】丹皮酚；HepG2 细胞；多药耐药相关蛋白 2
【中文分类号】R966 【文献标志码】A 【收稿日期】2015-04-20

Effects of Paeonol on expression and function of drug transporters MRP2 in HepG2 cells

Wang Lili, Yu Chao
(*Institute of Life Sciences, Chongqing Medical University*)

【Abstract】***Objective***: To investigate influences of Paeonol on mRNA expression and function of drug transporters multidrug resistance-associated protein 2(MRP2) in HepG2 cell. ***Methods***: Cell counting Kit-8 assay was used to detect the viability of HepG2 cells. Real-time fluorescent quantitative PCR(qPCR) was performed to measure the expressions of MRP2 and PXR. Flow cytometry was applied to determine the transport function of MRP2. ***Results***: Paeonol(2 μg/ml)did not decrease HepG2 cell survival rate. Paeonol(2 μg/ml) markedly induced the expression and function of drug transporters MRP2(P=0.000) and the expression of PXR. ***Conclusion***: Paeonol can up-regulate the expression of MRP2 mRNA through the PXR, which may be one of processes of eliminating jaundice.

【Key words】Paeonol; HepG2 cells; multidrug resistance-associated protein 2(MRP2)

作者介绍：王莉莉，Email：wanglili1020@sina.cn，
研究方向：药物代谢动力学。
通信作者：于 超，Email：yuchaom@163.com。
基金项目：国家自然科学基金资助项目（编号：NSFC，81370403）。
优先出版：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150708.2331.018.html (2015-07-08)

[16] Filardo EJ, Quinn JA, Jr Frackelton AR, et al. Estrogen action via the G protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis[J]. Mol Endocrinol, 2002, 16(1): 70-84.

[17] Scaling AL, Prossnitz ER, Hathaway HJ. GPER mediates estrogen-induced signaling and proliferation in human breast epithelial cells and normal and malignant breast[J]. Horm Cancer, 2014, 5(3): 146-160.

[18] Ohshiro K, Schwartz AM, Levine PH, et al. Alternate estrogen receptors promote invasion of inflammatory breast cancer cells via non-genomic signaling[J]. PLoS One, 2012, 7(1): e30725.

[19] Ge X, Guo R, Qiao Y, et al. The G protein-coupled receptor GPR30 mediates the nontranscriptional effect of estrogen on the activation of PI3K/Akt pathway in endometrial cancer cells[J]. Int J Gynecol Cancer, 2013, 23(1): 52-59.

[20] Yu LL, Qu T, Zhang SM, et al. GPR30 Mediates the fast effect of estrogen on mouse blastocyst and its role in implantation[J]. Reprod Sci, 2015. [Epub ahead of print].

[21] Pennington KA, Schlitt JM, Jackson DL, et al. Preeclampsia: multiple approaches for a multifactorial disease[J]. Dis Model Mech, 2012, 5(1): 9-18.

[22] Burton GJ, Woods AW, Jauniaux E, et al. Rheological and physiological consequences of conversion of the maternal spiral arteries for uteroplacental blood flow during human pregnancy[J]. Placenta, 2009, 30(6): 473-482.

[23] Goldman-Wohl D, Yagel S. Regulation of trophoblast invasion: from normal implantation to pre-eclampsia[J]. Mol Cell Endocrinol, 2002, 187(1-2): 233-238.

（责任编辑：冉明会）