doi:10.11659/jjssx.02E024023

·基础研究·

敲低miR-375对子痫前期模型滋养细胞增殖、凋亡的影响及机制

崔 鑫,李秋红,张小学 (秦皇岛市妇幼保健院产科,河北 秦皇岛 066000)

[摘 要] **目的** 探讨敲低miR-375对子痫前期(PE)滋养细胞模型增殖、凋亡的影响及作用机制。**方法** 取人绒毛膜滋养细胞株HTR-8/Svneo,随机分为常氧对照组、PE模型组、miR-NC组和miR-375 inhibitor组。其中,miR-NC组和miR-375 inhibitor组细胞分别转染miR-NC和miR-375 inhibitor;常氧对照组细胞在常氧环境下培养,其余3组细胞均在缺氧条件下培养以建立PE滋养细胞模型。采用RT-PCR检测miR-375的表达,EdU荧光染色、CCK-8实验检测细胞增殖情况,流式细胞术检测细胞凋亡情况,Western blot检测YAP1蛋白及凋亡相关蛋白(Bcl-2、caspase-3及Bax蛋白)的表达。双荧光素酶基因实验检测miR-375与YAP1的靶向调控关系。**结果** 与常氧对照组比较,PE模型组细胞miR-375表达升高($P<0.05$),EdU阳性细胞百分比下降($P<0.05$),细胞增殖能力降低($P<0.05$),细胞凋亡率升高($P<0.05$),Bax、caspase-3蛋白表达水平升高($P<0.05$),YAP1、Bcl-2蛋白表达水平降低($P<0.05$)。PE模型组和miR-NC组细胞上述各项指标比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。与miR-NC组比较,miR-375 inhibitor组细胞miR-375表达降低($P<0.05$),EdU阳性细胞百分比升高($P<0.05$),细胞增殖能力增强($P<0.05$),细胞凋亡率降低($P<0.05$),Bax、caspase-3蛋白表达降低($P<0.05$),YAP1、Bcl-2蛋白表达升高($P<0.05$)。双荧光素酶报告基因实验显示,miR-375对YAP1具有靶向调控作用($P<0.05$)。**结论** 敲低miR-375可促进PE滋养细胞增殖并抑制细胞凋亡,其作用机制可能与其对YAP1基因的靶向调控有关。

[关键词] 子痫前期;miR-375;YAP1;细胞增殖;细胞凋亡
[中图分类号] R714.24+4 [文献标志码] A [收稿日期] 2024-02-15

Effects of miR-375 knockdown on the proliferation and apoptosis of trophoblast cells in a preeclampsia model and its mechanism

CUI Xin, LI Qiu-hong, ZHANG Xiao-xue (Department of Obstetrics, Maternity & Child Care Center of Qinhuangdao, Qinhuangdao Hebei 066000, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of miR-375 knockdown on the proliferation and apoptosis of trophoblast cells in preeclampsia (PE) model and its mechanism. **Methods** Human chorionic trophoblast cell line HTR-8/Svneo was randomly divided into the normoxic control group, the PE model group, the miR-NC group, and the miR-375 inhibitor group. Among them, cells in the miR-NC group and miR-375 inhibitor group were transfected with miR-NC and miR-375 inhibitor, respectively; cells in the normoxic control group were cultured in a normoxic enviroment, and cells in the remaining three groups were cultured under hypoxic conditions to establish the PE trophoblast cell model. The expression of miR-375 was detected by RT-PCR, the proliferation of cells was detected by EdU fluorescence staining and CCK-8 assay, the apoptosis of cells was detected by flow cytometry, and the expression of YAP1 protein and apoptosis-related proteins (Bcl-2, caspase-3, and Bax proteins) were detected by Western blot. The target regulation relationship between miR-375 and YAP1 was detected by dual luciferase reporter gene assay. **Results** Compared with the normoxic control group, the PE model group showed an increase in the expression of miR-375 ($P<0.05$), a decrease in the proportion of EdU-positive cells ($P<0.05$), a decline in the cell proliferation ability ($P<0.05$), increases in the apoptosis rate ($P<0.05$) and the expression levels of Bax and caspase-3 proteins ($P<0.05$), and a decrease in the expression levels of YAP1 and Bcl-2 proteins ($P<0.05$). There was no significant difference in the above indicators between the PE model group and the miR-NC group ($P>0.05$). Compared with the miR-NC group, the miR-375 inhibitor group showed a lower expression of miR-375 ($P<0.05$), an increased percentage of EdU-positive cells ($P<0.05$), an enhanced cell proliferation ability ($P<0.05$), a lower apoptosis rate ($P<0.05$), and a lower expression of Bax and caspase-3 proteins ($P<0.05$), while with a higher expression of YAP1 and Bcl-2 proteins ($P<0.05$). The dual luciferase reporter gene assay showed that miR-375 had a targeted regulatory effect on YAP1 ($P<0.05$). **Conclusion** Knocking down miR-375 can promote the proliferation and inhibit the apoptosis of PE trophoblast cells, and its mechanism may be related to its targeted regulation of YAP1 gene.

Keywords: preeclampsia; miR-375; YAP1; cell proliferation; cell apoptosis

子痫前期(preeclampsia, PE)是一种特发性高血压综合征,全球发病率约为4%,若缺乏及时有效的治疗,PE可导致包括肝肾功能受损在内的多器官功能衰

[基金项目] 河北省秦皇岛市科技支撑课题计划项目(202301A138)

竭,是导致妊娠20周后出血、流产、早产、胎儿和孕产妇死亡等不良后果的重要因素[1]。研究发现,PE的发生与胎盘滋养细胞功能紊乱密切相关,胎盘滋养细胞的增殖受阻、凋亡增加、不完全侵袭和子宫内螺旋动脉的异常重塑是PE发生的主要病理机制[2],且滋养细胞的增殖受阻、凋亡增加已被广泛认为是PE的主要病因[3]。研究表明,一些circRNAs、lncRNAs、miRNAs的异常表达与PE的发生有关[4]。因此,研究与PE发病相关的基因表达变化,及其与滋养细胞增殖、凋亡的关系具有重要意义。

有研究报道,PE患者血液和胎盘组织中均发现异常表达的miRNA,其可能在PE的发生中起着重要的作用[5]。miR-375是近年发现的与细胞增殖和凋亡功能有关的miRNA[6]。miR-375在PE患者血清中高表达,是发生不良妊娠结局的危险因素[7-8]。动物实验发现,miR-375与PE大鼠滋养细胞功能有关[9]。目前miR-375在PE发生发展及滋养细胞功能中的作用尚不完全清楚。因此,本研究通过敲低miR-375,探讨其对PE细胞增殖、凋亡的影响及可能的作用机制,旨在为PE发病机制的探讨提供新的依据。

1 材料与方法

1.1 细胞及主要试剂

HTR8/Svneo人绒毛膜滋养细胞购自中科院上海细胞库。RNA提取试剂TRIzol购自北京天根生物公司;RPMI 1640培养基购自美国Gibco公司;反转录试剂盒PrimeScript™ RT Master Mix、RT-qPCR试剂盒Green®PrimeScript™ RT-PCR Kit购自日本TaKaRa公司;双荧光素酶报告基因试剂盒购自美国Promega公司;脂质体转染试剂Lipofectamine 3000购自美国Invitrogen公司;PCR引物、阴性对照(miR-NC)、miR-375抑制物(miR-375 inhibitor)、miR-375模拟物(miR-375 mimics)、突变型YAP1荧光素酶报告基因质粒(YAP1-MUT)、野生型YAP1荧光素酶报告基因质粒(YAP1-WT)购自上海吉玛制药公司;EdU增殖检测试剂盒、CCK-8检测试剂盒、Annexin V-FITC凋亡检测试剂盒购自上海碧云天生物公司;总蛋白提取试剂盒、BCA蛋白检测试剂盒购自江苏凯基生物公司;一抗YAP1、caspase-3、Bcl-2、Bax、GAPDH抗体及二抗IgG购自美国CST公司。

1.2 细胞培养

HTR8/Svneo人绒毛膜滋养细胞在含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基中培养,常氧环境:37 ℃、5% CO_2、95%空气;缺氧环境:37 ℃、1% O_2、5% CO_2、94% N_2。

1.3 细胞转染及分组

取对数生长期的HTR8/Svneo细胞接种于6孔板,每孔1×10^4个,然后随机分为常氧对照组、PE模型组、miR-NC组和miR-375 inhibitor组。miR-NC组和miR-375 inhibitor组细胞应用脂质体转染试剂Lipofectamine 3000按照说明书操作分别转染miR-NC和miR-375 inhibitor,转染24 h后将miR-NC组和miR-375 inhibitor组细胞置于缺氧环境中培养。常氧对照组和PE模型组不进行转染,常氧对照组细胞置于常氧环境培养,PE模型组细胞置于缺氧环境中培养。各组细胞培养48 h后进行后续试验。

1.4 RT-PCR检测miR-375表达

取各组细胞,TRIzol提取总RNA,应用PrimeScript™ RT Master Mix反转录生成cDNA。以cDNA为模板,加入PCR引物,应用Green®PrimeScript™ RT-PCR Kit按照说明书进行PCR扩增反应。PCR反应条件:95 ℃ 10 min;95 ℃ 20 s,55 ℃ 30 s,70 ℃ 30 s,共35个循环。miR-375正向引物:5′-GGCTCTAGAGGGGACGAAGC-3′,反向引物:5′-GGCAAGCTTTTTCCACACCTCAGCCTTG-3′;U6正向引物:5′-GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT-3′,反向引物5′-CGCTTCACGAATTTGCGTGTCAT-3′。以U6为内参,采用$2^{-\triangle\triangle Ct}$法计算miR-375的表达。

1.5 EdU荧光染色和CCK-8法检测细胞增殖能力

EdU荧光染色:取各组细胞接种于共聚焦培养皿中,每孔1×10^5个,随后加入100 μL EdU溶液继续孵育2 h,加入细胞固定液固定15 min,PBS清洗后加入EdU反应混合物继续孵育30 min,然后加入DAPI进行核染色,PBS清洗后,应用荧光显微镜采集图像,计算EdU阳性细胞百分比。

CCK-8法:取各组细胞接种于96孔细胞板,每孔1×10^4个,在常规培养0 h、24 h、48 h时向每孔滴加10 μL CCK-8溶液,继续培养2 h后,采用自动酶标仪检测各组细胞在450 nm波长处的光密度($D_{450\,nm}$)值。

1.6 流式细胞术检测细胞凋亡水平

取各组细胞,PBS清洗2次,用结合缓冲液重悬细胞,分别加入Annexin V-FITC和PI各5 μL后,室温避光继续孵育15 min,上流式细胞仪检测各组细胞的凋亡率。

1.7 Western blot检测YAP1、caspase-3、Bcl-2及Bax蛋白表达

提取各组细胞总蛋白,各样本取30 μg蛋白行10% SDS-PAGE电泳,然后转移至PVDF膜;加入5%脱

脂牛奶室温封闭1 h,加入YAP1、caspase-3、Bcl-2、Bax、GAPDH一抗4 ℃孵育过夜,TBST洗膜3次,加入二抗,室温孵育1 h,TBST洗膜3次,ECL试剂暗室显影,拍照并分析条带灰度值。

1.8 双荧光素酶基因实验检测miR-375与YAP1的靶向调控关系

通过生物信息学软件Targetscan(http://www.targetscan.org/vert_80/)预测miR-375与YAP1的结合位点。取对数生长期的细胞接种于24孔板,应用脂质体转染试剂Lipofectamine 3000按照说明书操作分别将miR-375 mimics或miR-NC与YAP1-MUT或YAP1-WT共转染至细胞,转染后的细胞分为miR-375 mimics+YAP1-MUT组、miR-NC+YAP1-MUT组、miR-375 mimics+YAP1-WT组、miR-NC+YAP1-WT组,转染24 h后,检测各组细胞的相对荧光素酶活性。

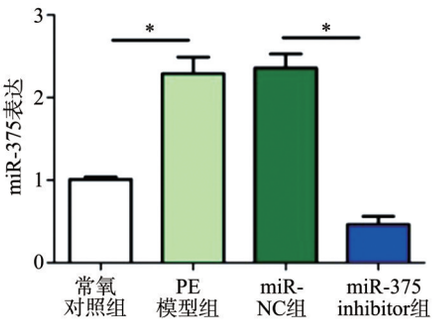
1.9 统计学方法

采用SPSS 20.0软件分析数据,计量数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用单因素方差分析,进一步两两比较采用*LSD-t*法。以$P<0.05$表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组细胞miR-375表达比较

PE模型组细胞miR-375表达高于常氧对照组($P<0.05$),miR-375 inhibitor组细胞miR-375表达低于miR-NC组($P<0.05$)。PE模型组和miR-NC组细胞miR-375表达比较差异无统计学意义($P>0.05$),见图1。



*:$P<0.05$

图1 各组细胞miR-375表达比较

2.2 各组细胞增殖水平比较

PE模型组、miR-NC组EdU阳性细胞百分比及0 h、24 h、48 h时的$D_{450\ nm}$值均低于常氧对照组($P<0.05$)。miR-375 inhibitor组EdU阳性细胞百分比及0 h、24 h、48 h时$D_{450\ nm}$值均高于miR-NC组($P<0.05$)。PE模型组和miR-NC组EdU阳性细胞百分比及各时间点$D_{450\ nm}$值比较差异均无统计学意义($P>0.05$),见图2、表1。

2.3 各组细胞凋亡率比较

PE模型组细胞凋亡率高于常氧对照组($P<0.05$);miR-375 inhibitor组细胞凋亡率低于miR-NC组($P<0.05$);PE模型组和miR-NC组细胞凋亡率比较差异无统计学意义($P>0.05$),见图3。

2.4 各组细胞YAP1、caspase-3、Bcl-2及Bax蛋白表达比较

PE模型组和miR-NC组caspase-3、Bax蛋白表达高于常氧对照组($P<0.05$),YAP1、Bcl-2蛋白表达低于常氧对照组($P<0.05$)。miR-375 inhibitor组caspase-3、Bax蛋白表达低于miR-NC组($P<0.05$),YAP1、Bcl-2蛋白表达高于miR-NC组($P<0.05$)。PE模型组和miR-NC组YAP1、caspase-3、Bcl-2及Bax蛋白表达比较差异均无统计学意义($P>0.05$),见图4和表2。

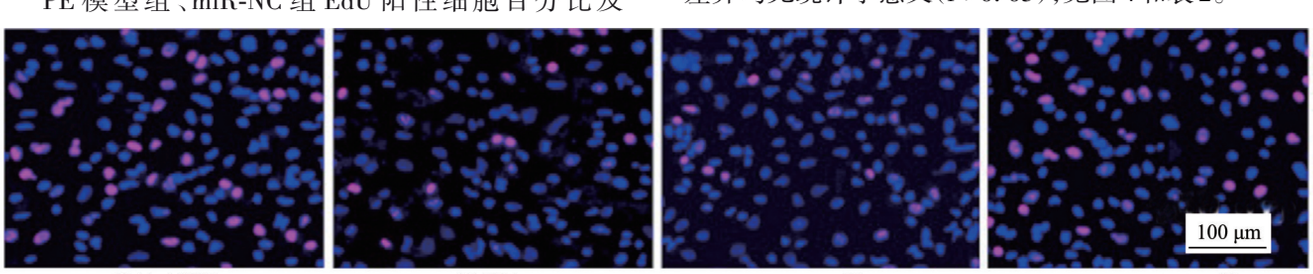


图2 各组EdU荧光染色阳性细胞

2.5 miR-375对YAP1的靶向调控

Targetscan预测结果显示,miR-375与YAP1具有潜在结合位点(图5a)。双荧光素酶报告基因实验结果显示,miR-375 mimics+YAP1-WT组细胞相对荧光素酶活性低于miR-NC+YAP1-WT组($P<0.05$),miR-375 mimics+YAP1-MUT组和miR-NC+YAP1-MUT组细胞相对荧光素酶活性比较差异无统计学意义($P>0.05$),见图5b。

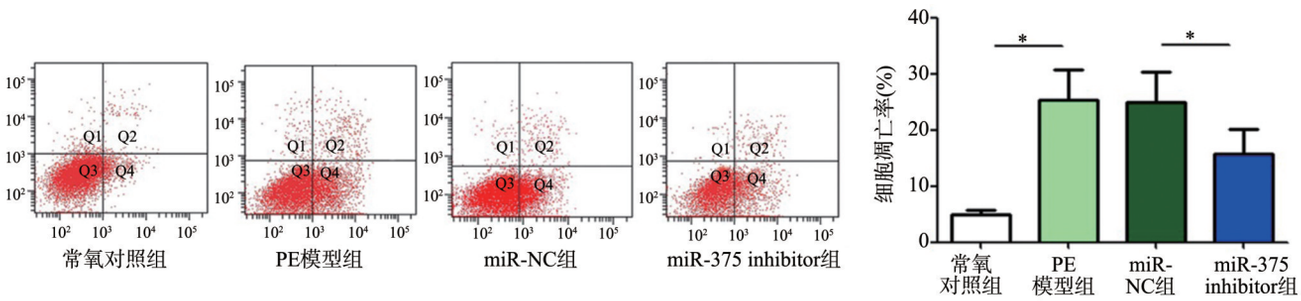
3 讨论

PE是一种复杂的妊娠疾病,其主要特征是水肿、高血压和蛋白尿,近年来PE的发病率居高不下,严重

表1　各组细胞EdU阳性细胞百分比和不同时间$D_{450\,nm}$值比较($\bar{x}\pm s$)

组别	$D_{450\,nm}$值			EdU阳性细胞百分比(%)
	0 h	24 h	48 h	
常氧对照组	0.40±0.06	0.75±0.12	1.08±0.20	42.19±5.36
PE模型组	0.22±0.03*	0.35±0.09*	0.62±0.11*	18.36±3.14*
miR-NC组	0.21±0.04*	0.32±0.10*	0.64±0.15*	17.47±3.80*
miR-375 inhibitor组	0.33±0.05△#	0.59±0.13△#	0.94±0.10△#	34.27±5.71△#
F	15.550	13.551	9.733	27.682
P	<0.001	<0.001	0.002	<0.001

*:与常氧对照组比较,*P*<0.05;△:与PE模型组比较,*P*<0.05;#:与miR-NC组比较,*P*<0.05



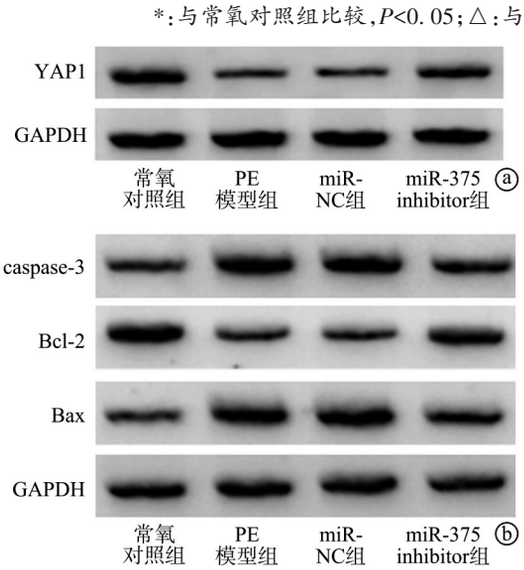
*:*P*<0.05

图3　各组细胞凋亡率比较

表2　各组细胞YAP1、caspase-3、Bcl-2、Bax蛋白表达比较($\bar{x}\pm s$)

组别	YAP1	caspase-3	Bcl-2	Bax
常氧对照组	1.09±0.08	0.82±0.15	1.18±0.12	0.78±0.09
PE模型组	0.48±0.10*	1.29±0.18*	0.79±0.14*	1.23±0.16*
miR-NC组	0.52±0.13*	1.35±0.11*	0.73±0.16*	1.29±0.17*
miR-375 inhibitor组	0.92±0.11△#	1.00±0.10△#	1.03±0.09△#	0.98±0.09△#
F	31.754	12.892	10.400	12.541
P	<0.001	0.001	0.001	0.001

*:与常氧对照组比较,*P*<0.05;△:与PE模型组比较,*P*<0.05;#:与miR-NC组比较,*P*<0.05

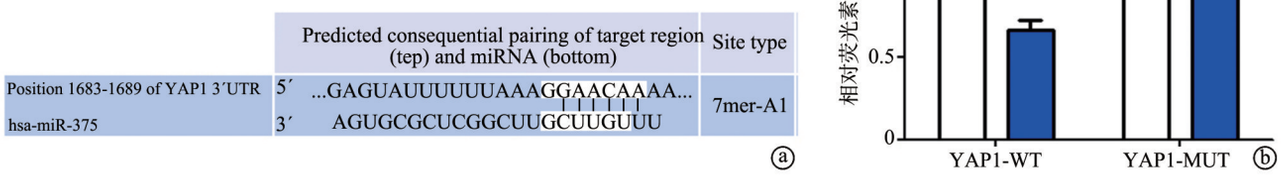


a:YAP1蛋白印迹图;b:凋亡相关蛋白印迹图

图4　各组细胞YAP1蛋白和凋亡相关蛋白表达比较

影响孕妇和新生儿的健康。PE的病因和发病机制尚不完全清楚,目前的研究认为PE患者滋养细胞增殖受阻、凋亡增加以及子宫内螺旋动脉的异常重塑导致胎盘缺血、缺氧是PE的主要病理机制[10]。通过缺氧环境培养滋养细胞是目前研究建立PE细胞模型的常用方法[11-12]。建立可靠的PE细胞模型,将有助于阐明PE发生发展的确切机制并找到新的治疗靶点。

miRNA是一种内源性非编码小分子RNA,通过与下游靶基因的3′UTR片段结合抑制靶基因的功能,参与细胞增殖、凋亡等细胞功能的调控。近年来研究发现,PE患者胎盘组织中异常表达的miRNA可能与滋养细胞的增殖、凋亡异常有关[13-14]。岳巾晶等[15]发现,miR-155在PE患者胎盘组织中表达上调,miR-155可能通过影响滋养细胞的增殖、迁移和凋亡参与PE的发病。霍春霞等[16]的研究报道,过表达miR-409-3p能够直接靶向TGIF1促进滋养细胞的增殖。miR-206、miR-486-5p等miRNAs相继被发现与滋养细胞的增殖、凋亡等功能有关[17-18]。miR-375是一种高度保守的miRNA,位于Cryba2和Ccdc108基因之间,定位于人类的2号染色体。目前的研究发现,异常表达的miR-375与免疫细胞、肿瘤细胞的增殖和凋亡等功能异常有关[6]。近期研究发现,miR-375在PE患者血清中高表达[8];且动物实验结果显示,miR-375异常表达与PE大



a:Targetscan预测miR-375与YAP1的靶向结合位点图;b:双荧光素酶报告基因实验验证miR-375与YAP1的靶向关系 *:$P<0.05$

图5 miR-375靶向调控YAP1基因

鼠滋养细胞功能失调有关[9]。为了更深入探讨miR-375在人PE发生发展中的作用及机制,本研究通过缺氧环境培养滋养细胞建立PE细胞模型,结果显示,PE模型组细胞EdU阳性细胞百分比较常氧对照组下降,细胞增殖能力降低,caspase-3及Bax蛋白表达升高,Bcl-2蛋白表达降低,提示PE细胞模型建立成功。本研究进一步研究发现,PE细胞模型中miR-375表达异常升高;通过脂质体转染法敲低PE细胞模型中miR-375表达水平,结果发现与miR-NC组比较,miR-375 inhibitor组细胞EdU阳性细胞百分比升高,细胞增殖能力增强,caspase-3及Bax蛋白表达降低,Bcl-2蛋白表达升高,提示敲低miR-375的PE细胞模型增殖活性明显升高,凋亡水平明显降低。

目前相关研究显示,miRNA主要通过调控靶基因的转录或翻译,参与机体细胞功能的调节[19]。YAP1是Hippo信号通路的下游信号分子,在细胞生长、凋亡、DNA修复等方面发挥着重要的作用[20]。目前YAP1基因在PE发生发展中的作用研究较多,且YAP1在滋养细胞的增殖、凋亡等细胞功能的调控中也起着重要的作用[21]。研究发现,YAP1在PE患者胎盘和滋养细胞中的表达显著降低,过表达YAP1能够促进滋养细胞的增殖并抑制其凋亡[22-23]。以往研究显示,miR-375能够靶向调控YAP1基因参与细胞功能的调控[24-25]。本研究发现,PE滋养细胞模型中YAP1蛋白表达降低,与以往研究[21-23,26]结果一致;进一步研究发现,与miR-NC组比较,miR-375 inhibitor组细胞YAP1蛋白表达升高,双荧光素酶报告基因结果证实miR-375对YAP1存在靶向调控关系。以上结果提示,敲低miR-375可影响PE滋养细胞的增殖及凋亡,其机制可能与其对YAP1基因的靶向调控有关。

综上所述,敲低miR-375促进PE滋养细胞增殖并抑制其凋亡,其作用机制可能与靶向调控YAP1基因有关,这为PE的发病机制及靶向治疗提供了新的研究方向。

[参考文献]

[1] Mol BWJ, Roberts CT, Thangaratinam S, et al. Pre-eclampsia[J]. Lancet, 2016, 387(10022):999-1011. doi: 10.1016/S0140-6736(15)00070-7.

[2] Jung E, Romero R, Yeo L, et al. The etiology of preeclampsia[J]. Am J Obstet Gynecol, 2022, 226(2S):S844-S866. doi:10.1016/j.ajog.2021.11.1356.

[3] Bakrania BA, Spradley FT, Drummond HA, et al. Preeclampsia: linking placental ischemia with maternal endothelial and vascular dysfunction[J]. Compr Physiol, 2020, 11(1):1315-1349. doi:10.1002/cphy.c200008.

[4] Liu S, Xie X, Lei H, et al. Identification of key circRNAs/lncRNAs/miRNAs/mRNAs and pathways in preeclampsia using bioinformatics analysis[J]. Med Sci Monit, 2019, 25:1679-1693. doi:10.12659/MSM.912801.

[5] Hromadnikova I, Kotlabova K, Dvorakova L, et al. Postpartum profiling of microRNAs involved in pathogenesis of cardiovascular/cerebrovascular diseases in women exposed to pregnancy-related complications[J]. Int J Cardiol, 2019, 291:158-167. doi:10.1016/j.ijcard.2019.05.036.

[6] Liu Y, Wang Q, Wen J, et al. MiR-375: a novel multifunctional regulator[J]. Life Sci, 2021, 275(1):119323. doi:10.1016/j.lfs.2021.119323.

[7] Akgör U, Ayaz L, Çayan F. Expression levels of maternal plasma microRNAs in preeclamptic pregnancies[J]. J Obstet Gynaecol, 2021, 41(6):910-914. doi:10.1080/01443615.2020.1820465.

[8] 贾清淼,马丽丽,闫凤梅. 早发型子痫前期患者血清miR-152,miR-375水平与妊娠结局关系[J]. 中国计划生育学杂志,2023,31(8):1943-1947. doi:10.3969/j.issn.1004-8189.2023.08.037.

[9] Ren Y, Xu Y, Wang Y, et al. Regulation of miR-375 and Sonic hedgehog on vascular endothelial growth factor in preeclampsia rats and its effect on trophoblastcells[J]. Biosci Rep, 2020, 15(1):BSR20200613. doi:10.1042/BSR20200613.

[10] Raghupathy R. Cytokines as key players in the pathophysiology of preeclampsia[J]. Med Princ Pract, 2013, 22(Suppl 1):8-19. doi:10.1159/000354200.

[11] 张玉月,朱亚飞,高丽娜,等. 环状RNA BRAF_2在子痫前期胎盘滋养细胞增殖和凋亡中的作用及其机制[J]. 解放军医学杂志,2023,48(4):374-382. doi:10.11855/j.issn.0577-7402.2023.04.0374.

[12] 杨晓涛,韩顶立,Philip N. Baker,等. 体外缺氧诱导子痫前期滋养细胞模型优化及代谢组学鉴定[J]. 重庆医科大学学报,2017,42(8):1045-1052. doi:10.13406/j.cnki.cyxb.001343.