

• 论 著 •

SFRP5 调控 Wnt/ β -Catenin 信号通路对子痫前期滋养细胞迁移和侵袭的作用机制研究^{*}

李 娜¹, 彭 娜¹, 姚 霞¹, 朱 燕¹, 贾建桃²

1. 长治医学院附属和济医院产科, 山西长治 046000; 2. 长治医学院基础医学部, 山西长治 046000

摘 要:目的 探讨分泌型卷曲相关蛋白 5(SFRP5)在子痫前期(PE)患者中的表达水平及其对滋养细胞迁移和侵袭能力的影响。方法 收集 2020 年 1 月到 2021 年 10 月在长治医学院附属和济医院产科收治的 15 例 PE 患者(PE 组)和 15 例健康孕妇(正常组)剖宫产手术中获得的胎盘组织和血液样本;采用酶联免疫吸附试验法和免疫组化法分别检测血清和胎盘组织中 SFRP5 表达水平;体外培养人滋养层细胞系 HTR8/SVneo, 分别用重组人 SFRP5 蛋白、Dickkopf 相关蛋白 1(Dkk-1)和氯化锂(LiCl)处理细胞;采用划痕实验和基底胶 Transwell 实验检测 HTR8/SVneo 滋养细胞迁移和侵袭能力;明胶酶谱法检测 HTR8/SVneo 滋养细胞基质金属蛋白酶(MMP)-2/9 的活性;蛋白免疫印迹法检测 HTR8/SVneo 滋养细胞中糖原合成酶-3 β (GSK3 β)和 β -catenin 蛋白的表达。结果 与正常组[(9.03 $\pm$ 1.75)ng/mL]相比,PE 组血清 SFRP5 水平[(48.07 $\pm$ 3.81)ng/mL]显著升高,差异有统计学意义($t=36.063$, $P<0.001$)。与对照组相比,SFRP5 组 HTR8/SVneo 滋养细胞在体外的迁移和侵袭能力显著降低,MMP-2/9 活性降低,GSK3 β 蛋白表达上调,而 β -catenin 表达下降(均 $P<0.05$);LiCl 处理可促进 HTR8/SVneo 滋养细胞的迁移和侵袭,并上调 β -catenin 的表达,SFRP5 和 LiCl 共处理可减弱 LiCl 对 HTR8/SVneo 滋养细胞产生的效应(均 $P<0.05$);Dkk-1 处理抑制了 HTR8/SVneo 滋养细胞的迁移和侵袭能力及 β -catenin 的表达(均 $P<0.05$)。结论 PE 患者血清 SFRP5 表达水平显著升高,高表达 SFRP5 可能通过负向调控 Wnt/ β -catenin 信号通路来抑制 HTR8/SVneo 滋养细胞的迁移和侵袭,进一步参与 PE 的发生发展。

关键词:分泌型卷曲相关蛋白 5; 子痫前期; 滋养细胞; Wnt/ β -catenin 信号通路; 迁移

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2023.05.009

中图法分类号:R714.244

文章编号:1673-4130(2023)05-0553-08

文献标志码:A

Study on the mechanism of SFRP5 regulates Wnt/ β -Catenin on catenin signaling pathway on trophoblast cells migration and invasion in preeclampsia^{*}

LI Na¹, PENG Na¹, YAO Xia¹, ZHU Yan¹, JIA Jiantao²

1. Department of Obstetrics, Heji Hospital Affiliated to Changzhi Medical College, Changzhi Shanxi 046000, China; 2. Department of Basic Medicine, Changzhi Medical College, Changzhi, Shanxi 046000, China

Abstract: **Objective** To investigate the expression level of secreted frizzled-related protein 5 (SFRP5) in patients with preeclampsia (PE) and its effect on trophoblast cells migration and invasion. **Methods** From January 2020 to October 2021, placental tissue and blood samples were collected from 15 PE patients (PE group) and 15 normal pregnant women (normal group) who were admitted to the obstetrics department of Heji Hospital Affiliated to Changzhi Medical College during cesarean section operations; The expression levels of SFRP5 in serum and placental tissue were detected by ELISA and immunohistochemistry, respectively; The human trophoblast cell line HTR8/SVneo was cultured in vitro, and the cells were treated with recombinant human SFRP5 protein, Dickkopf-related protein 1 (Dkk-1) and lithium chloride (LiCl) respectively; The ability of HTR8/SVneo trophoblast cells migration and invasion was detected by scratch assay and Matrigel Transwell assay; Gelatin zymography was used to detect the activity of matrix metalloproteinase (MMP)-2/9 in HTR8/SVneo trophoblast cells; Western blotting was used to detect the expression of glycogen synthase-3 β (GSK3 β) and β -catenin protein in HTR8/SVneo trophoblast cells. **Results** Compared with the normal group

^{*} 基金项目: 山西省自然科学基金项目(201801D12120)。

作者简介: 李娜, 女, 主任医师, 主要从事产科学方向的研究。

$[(9.03 \pm 1.75) \text{ ng/mL}]$, the serum SFRP5 level in PE group $[(48.07 \pm 3.81) \text{ ng/mL}]$ was significantly increased, and the difference was statistically significant ($t = 36.063, P < 0.001$). Compared with the control group, the migration and invasion abilities of HTR8/SVneo trophoblast cells in the SFRP5 group were significantly decreased in vitro, the activity of MMP-2/9 was decreased, the expression of GSK3 β protein was up-regulated, and the expression of β -catenin was decreased (all $P < 0.05$); LiCl treatment can promote HTR8/SVneo trophoblast cells migration and invasion, and up-regulate the expression of β -catenin. Co-treatment of SFRP5 and LiCl can attenuate the effect of LiCl on HTR8/SVneo trophoblast cells (all $P < 0.05$); Dkk-1 treatment inhibited the migration and invasion ability of HTR8/SVneo trophoblast cells and the expression of β -catenin (all $P < 0.05$). **Conclusion** The expression level of serum SFRP5 in PE patients is significantly increased. High expression of SFRP5 may inhibit the migration and invasion of HTR8/SVneo trophoblast cells by negatively regulating the Wnt/ β -catenin signaling pathway, and further participate in the occurrence and development of PE.

Key words: secreted frizzled-related protein 5; preeclampsia; trophoblast cells; Wnt/ β -catenin signaling pathway; migration

子痫前期(PE)是临床常见的妊娠期特异性并发症,好发于妊娠 20 周以后,是导致孕妇死亡的重要原因^[1]。PE 的主要症状为高血压和尿蛋白升高,如未得到及时有效治疗,可引起胎盘早剥、胎儿生长受限、围产期死亡等多种不良妊娠结局。同时,显著增加胎儿未来罹患心血管疾病的风险^[2]。目前普遍认为,绒毛膜滋养细胞迁移和侵袭减少引起的胎盘功能障碍是 PE 的核心病理基础,但其调控机制尚未阐明^[3]。研究表明,PE 发病机制受到多种信号通路的调控,如 Notch、MAPK、Wnt 和 NF- κ B 等^[4-6]。其中,经典的 Wnt/ β -catenin 信号通路在调节胚胎黏附、着床、滋养层细胞融合、增殖、侵袭和分化等方面发挥重要作用^[7]。因此,探索 PE 过程中调控 Wnt/ β -catenin 信号通路的病理因素具有重要意义。分泌卷曲相关蛋白 5 (SFRP5)作为分泌型糖蛋白家族成员之一,结构上与 Wnt 信号特异性卷曲蛋白(Fz)受体极为相似,可竞争性抑制 Wnt 蛋白活性^[8]。有研究显示,SFRP5 可通过作用于 Wnt 信号通路抑制肿瘤细胞的生长、侵袭、迁移和肿瘤形成,发挥抑癌作用^[9-10]。但 SFRP5 与 PE 的关系及对滋养细胞的影响目前鲜少研究。本研究旨在评估 SFRP5 在 PE 患者胎盘和血清中的水平,并探讨其对人类滋养细胞迁移和侵袭的影响,揭示 PE 的潜在分子机制。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2020 年 1 月至 2021 年 10 月在长治医学院附属和济医院(简称本院)产科收治的 15 例 PE 患者(PE 组)和 15 例健康孕妇(正常组)及作为研究对象,收集研究对象剖宫产手术中获得的胎盘组织和血液样本。纳入标准:(1)PE 患者符合人民卫生出版社(第 9 版)《妇产科学》中的相关诊断标准;(2)年龄 18~40 岁,孕周 34~40 周,孕前体重指数(BMI)为 $18.5 \sim 24.9 \text{ kg/m}^2$;(3)75 g 口服葡萄糖耐量试验(OGTT)阴性;(5)单胎妊娠;(6)剖宫产分娩。排除

标准:(1)孕前合并高血压、内分泌和免疫系统疾病、恶性肿瘤及传染病;(2)有不良孕产史;(3)有其他妊娠合并症及并发症。另选取在本院同期妊娠 7~10 周无任何并发症的人工流产孕妇 5 例作阴性对照,纳入研究的患者均签署知情同意书,且本研究通过本院伦理委员会审核(GS20190622)。

1.2 仪器与试剂 RPMI 1649 培养基购自美国 Gibco 公司,货号 21870084;胎牛血清购自美国 Gibco 公司,货号 10099141;免疫组化染色试剂盒购自上海碧云天公司,货号 SP-9000;氯化锂(LiCl)购自美国 Sigma 公司,货号 L9650;重组 Dickkopf 相关蛋白 1 (Dkk-1)购自美国 Sigma 公司,货号 SRP3258;CCK8 试剂盒购自北京索莱宝公司,货号 CA1210;重组人 SFRP5 蛋白购自美国 Abcam 公司,货号 ab202176;SFRP5 ELISA 试剂盒购自武汉 USCN 公司,货号 E-EL-H5544c;多重基质金属蛋白酶(MMP)酶谱检测试剂盒购自北京普利莱公司,货号 P1700;糖原合成酶激酶 3 β (GSK3 β)抗体购自美国 Cell signaling technology 公司,货号 9327S;SFRP5 抗体购自美国 Abcam 公司,货号 ab230425; β -catenin 购自美国 Santa Cruz 公司,货号 sc-7963; β -actin 抗体购自美国 Santa Cruz 公司,货号 sc-81178。细胞培养箱购自美国 NU-AIRE 公司;荧光显微镜购自日本 Olympus 公司;凝胶成像系统购自美国 Bio-Rad 公司;FC 型酶标仪购自美国 Thermo Fisher 公司。

1.3 方法

1.3.1 组织样本采集 剖宫产手术前收集 PE 组和正常组空腹静脉血 5 mL,离心提取血清,-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。阴性对照孕妇术中胎盘娩出后 0.5 h 内,从母体面剥离未见明显梗死、钙化、血肿或撕裂、位于脐带插入点和胎盘外周边缘之间约 1 cm^3 的胎盘组织,保存在-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中,用于后续蛋白免疫印迹实验研究。另取 PE 组部分新鲜足月胎盘组织用 4%多聚甲

醛固定用于免疫组化染色,以及收集阴性对照孕妇的妊娠初期蜕膜和胎盘绒毛组织。

1.3.2 免疫组化染色检测胎盘组织 SFRP5 表达 取经 4%多聚甲醛固定后的胎盘组织,常规石蜡包埋、切片(4 μm)、脱蜡、水化后,3%双氧水甲醇溶液中孵育 10 min 以淬灭内源性过氧化物酶活性,0.01 mmol/L 柠檬酸钠缓冲液(pH 6.0)中煮沸 20 min 以恢复抗原。室温下山羊血清封闭 15 min,加入 SFRP5 抗体(1:200)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。次日,磷酸盐缓冲液充分洗涤后,加入山羊抗兔二抗(1:1 000)室温孵育 1 h。最后加入二氨基联苯胺显色,苏木精反染,封片,显微镜拍照记录,阳性表达为棕黄色。以正常组健康人体皮肤组织作为阳性对照,阴性对照孕妇的妊娠初期蜕膜、胎盘绒毛组织、正常组足月胎盘组织为正常对照,正常对照、阳性对照石蜡切片由本院病理科提供。

1.3.3 酶联免疫吸附试验法(ELISA)检测血清 SFRP5 表达 采集 PE 组和正常组的空腹血样,4 $^{\circ}\text{C}$ 静置 4 h,4 $^{\circ}\text{C}$ 3 500 r/min 离心 10 min 离心,取上清液,使用 SFRP5 ELISA 试剂盒检测血清中 SFRP5 水平。

1.3.4 滋养细胞培养和分组 人绒毛膜滋养层细胞 HTR8/SVneo(简称 HTR8/SVneo 滋养细胞)购自 ATCC 中国细胞库。常规复苏后,置于含有 10%胎牛血清(FBS)、100 U/mL 青霉素和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素的 RPMI 1649 培养基中,放置在含有 5% CO_2 的 37 $^{\circ}\text{C}$ 全湿度细胞培养箱中培养。当细胞融合率达到 80%~90%时传代处理。HTR8/SVneo 滋养细胞随机分为 6 组:对照组、SFRP5 组、LiCl 组、SFRP5 + LiCl 组、Dkk-1 组和 Dkk-1 + LiCl 组。

胰酶消化细胞重新悬浮并接种于 6 孔板。细胞聚集达 60%~70%后,更换为无血清培养基。根据已报道文献[11]实验剂量,6 组 HTR8/SVneo 滋养细胞按照重组人 SFRP5 蛋白(100 ng/mL)、LiCl(1 mmol/L)和重组人 Dkk-1 蛋白(50 ng/mL)的剂量处理 24 h 后做后续 HTR8/SVneo 滋养细胞迁移和侵袭检测实验研究,对照组 HTR8/SVneo 滋养细胞不作任何处理。

1.3.5 CCK-8 法检测 HTR8/SVneo 滋养细胞活力 将 HTR8/SVneo 滋养细胞(5×10^3 个/mL)接种于 96 孔板中培养 12 h。细胞贴壁后更换无血清培养基,放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 的 5% CO_2 细胞培养箱中继续培养。根据文献[12-13]报道药物处理浓度,用含有不同浓度 LiCl(10、20、50、100、200 和 500 $\mu\text{mmol}/\text{L}$,1、2、5、10、20、30、40 和 50 mmol/L)和 Dkk-1(1、2、5、10、20、50、60、80 和 100 ng/mL)的新鲜培养基替换原培养基。培养 12 h 后,每孔加入 10 μL CCK-8 试剂继续培养 1 h。根据每孔细胞在 450 nm 波长下的吸光度(A 值)计算细胞活力。

1.3.6 划痕实验检测 HTR8/SVneo 滋养细胞迁移

将 HTR8/SVneo 滋养细胞接种于 6 孔板中,并接受 1.3.3 描述方法处理。细胞量达到 90%后,用 10 μL 无菌枪头对细胞单层沿直线做轻轻划痕,培养 24 h。在 0、6、12 和 24 h,用光学显微镜 40 倍放大拍照记录图像。使用 Image J 评估划痕愈合面积,并计算迁移面积:迁移面积=0 h 划痕愈合面积-24 h 划痕愈合面积。

1.3.7 基底胶 Transwell 侵袭实验检测 HTR8/SVneo 滋养细胞侵袭能力 以基底胶(1:9 稀释)预涂于 Transwell 小室。将 HTR8/SVneo 滋养细胞以 1.0×10^5 个/小室接种于上述 Transwell 小室,并在下室加入 600 μL 含有 10% FBS 的培养基。培养 24 h 后,甲醇固定,结晶紫染色,清洗,拍照。显微镜下随机选取 5 个视野进行计数求平均值。

1.3.8 明胶酶谱实验检测 HTR8/SVneo 滋养细胞 MMP 活性 收集 6 组 HTR8/SVneo 滋养细胞培养液上清液。将明胶加入 0.1% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺分离胶中,加入 6 组 HTR8/SVneo 滋养细胞培养液上清液后进行电泳。用 50 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(pH 7.5)、5 mmol/L CaCl_2 和 2.5% 聚乙二醇辛基苯基醚清洗凝胶,37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜。考马斯亮蓝染色,洗脱,保存,并干燥。采用凝胶成像系统扫描拍照,以 Image J 软件分析图像,以 6 组 HTR8/SVneo 滋养细胞 MMP 条带与空白对照条带恢复值之比表示 MMP 活性。

1.3.9 蛋白免疫印迹法检测各组 HTR8/SVneo 滋养细胞 GSK3 β 、 β -catenin、SFRP5 蛋白表达水平 用 RIPA 裂解缓冲液将经过各种处理的 HTR8/SVneo 滋养细胞提取总蛋白。采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度。6 组 HTR8/SVneo 滋养细胞按 25 μg 蛋白上样量经 10% SDS-PAGE 凝胶进行电泳分离,200 mA 恒流转膜到聚偏氟乙烯膜。5%脱脂奶粉封闭 1 h, TBST 洗膜后,加入 GSK3 β 、 β -catenin、SFRP5 和 β -actin 的特异性抗体(1:1 000 稀释),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。次日,加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗(1:1 500 稀释)孵育 1 h。使用增强化学发光法检测,拍照,以 β -actin 为内参,使用 Image J 软件进行灰度值分析。

1.4 统计学处理 利用 GraphPad Prism 软件(8.3.0 版,GraphPad Software,美国)进行实验数据分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组之间比较行 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析(ANOVA)。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两组一般情况比较 与正常组相比,PE 组年龄、孕初 BMI 和孕期增重比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。PE 组平均收缩压(SBP)和舒张压(DBP)比正常组升高,而新生儿出生体重和胎盘重量

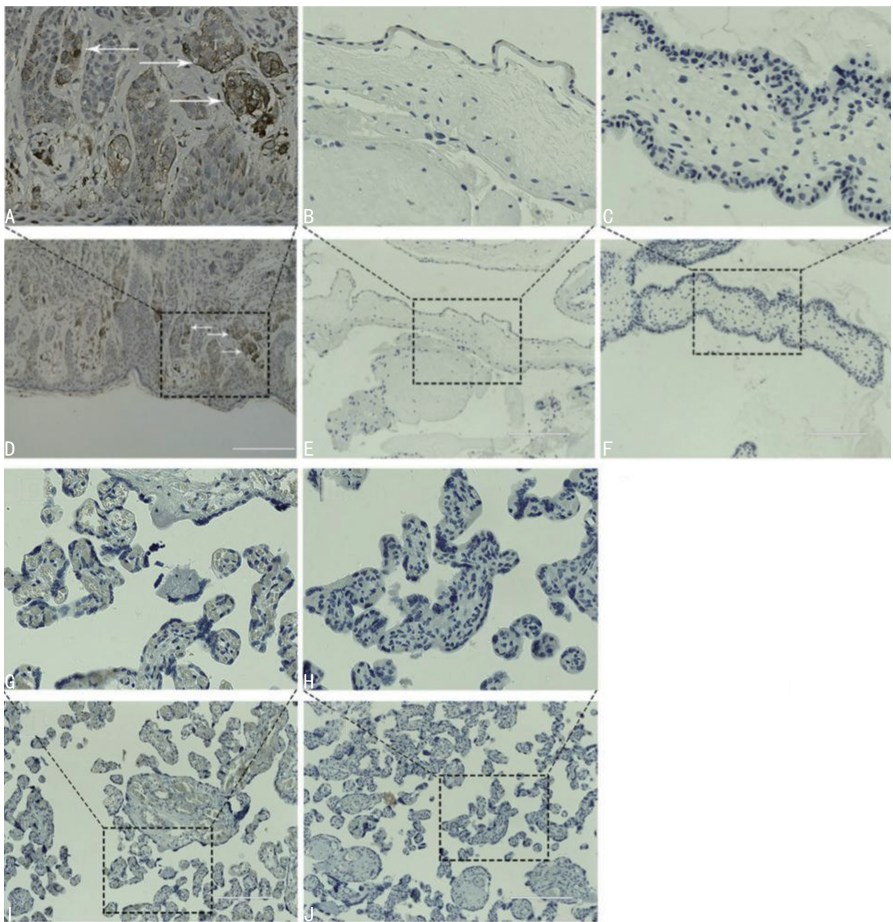
比正常组降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

表 1 PE 组与正常组一般情况比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	年龄(年)	孕初 BMI (kg/m ²)	孕期增重 (kg)	SBP (mm Hg)	DBP (mm Hg)	新生儿出生 体重(g)	胎盘重量 (g)
PE 组	15	31.93±1.24	21.44±0.35	16.27±1.77	164.50±3.53	101.70±2.25	2 952.0±190.8	515.30±24.97
正常组	15	29.10±0.98	20.79±0.43	14.10±1.17	116.10±2.27	70.53±1.30	3 431.0±107.8	575.30±11.87
<i>t</i>		0.980	1.470	0.245	44.665	46.457	8.465	8.405
<i>P</i>		0.372	0.202	0.816	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

2.2 正常组和 PE 组胎盘组织和血清中 SFRP5 的表达比较 免疫组化法检测结果显示,与阳性对照比较,正常组和 PE 组中均为 SFRP5 阴性表达。见图 1。ELISA 结果显示,与正常组[(9.03±1.75)ng/mL]相比,PE 组血清 SFRP5 水平[(48.07±3.81)ng/mL]显著升高,差异有统计学意义($t=36.063$ 、 $P<0.001$)。

2.3 Dkk-1 和 LiCl 刺激对 HTR8/SVneo 滋养细胞活力的影响 CCK8 法检测结果显示,不同浓度 Dkk-1 和 LiCl 刺激对 HTR8/SVneo 滋养细胞活力产生不同的影响,无明显梯度规律,见图 2。与对照组比较,1 mmol/L LiCl 和 50 ng/mL Dkk-1 对 HTR8/SVneo 滋养细胞活力的抑制作用最小,差异有统计学意义($t=4.953$ 、 3.162 、 $P<0.05$)。



注:A~J 免疫组化染色,A、B、C、G 和 H 依次为 D、E、F、I 和 J 所示黑色虚线框内区域的放大图像;A/D 为阳性对照,箭头表示 SFRP5 阳性角质细胞;E、F、I/B、C、G 为正常对照,E/B 为阴性对照孕妇的妊娠初期蜕膜组织、F/C 为阴性对照孕妇的妊娠初期胎盘绒毛组织、I/G 为正常组足月胎盘组织;J/H 为 PE 组足月胎盘组织。

图 1 正常组和 PE 组胎盘组织和血清 SFRP5 的表达($\times 200$)

2.4 SFRP5 对 HTR8/SVneo 滋养细胞迁移的影响 划痕实验结果显示,SFRP5+LiCl 组、SFRP5 组、

LiCl 组、对照组、Dkk-1 组和 Dkk-1+LiCl 组 HTR8/SVneo 滋养细胞 24 h 划痕愈合百分比分别为(14.6±

1.2)%、(5.4±0.2)%、(52.4±0.9)%、(34.2±0.8)%、(1.8±0.3)%和(22.1±0.6)%。可见, SFRP5 组 HTR8/SVneo 滋养细胞 24 h 划痕愈合百分比显著小于对照组, 差异有统计学意义($t=11.762, P<0.001$)。与对照组相比, LiCl 组 HTR8/SVneo 滋养细胞 24 h 划痕愈合百分比显著增加($t=4.389, P=0.007$); 与 LiCl 组相比, SFRP5 组和 SFRP5+LiCl 组 HTR8/SVneo 滋养细胞 24 h 划痕愈合百分比明显降低($t=8.082, P<0.001; t=4.93,$

$P=0.004$); 与 LiCl 组相比, SFRP5+LiCl 组 HTR8/SVneo 滋养细胞 24 h 划痕愈合百分比亦显著降低($t=12.471, P<0.001$)。此外, Dkk-1 组和 Dkk-1+LiCl 组 HTR8/SVneo 滋养细胞的 24 h 划痕愈合百分比均显著低于对照组($t=8.655, P<0.001; t=1.681, P=0.154$); 与 LiCl 组相比, Dkk-1+LiCl 组 HTR8/SVneo 滋养细胞 24 h 划痕愈合百分比亦显著降低($t=12.023, P<0.001$), 见图 3。

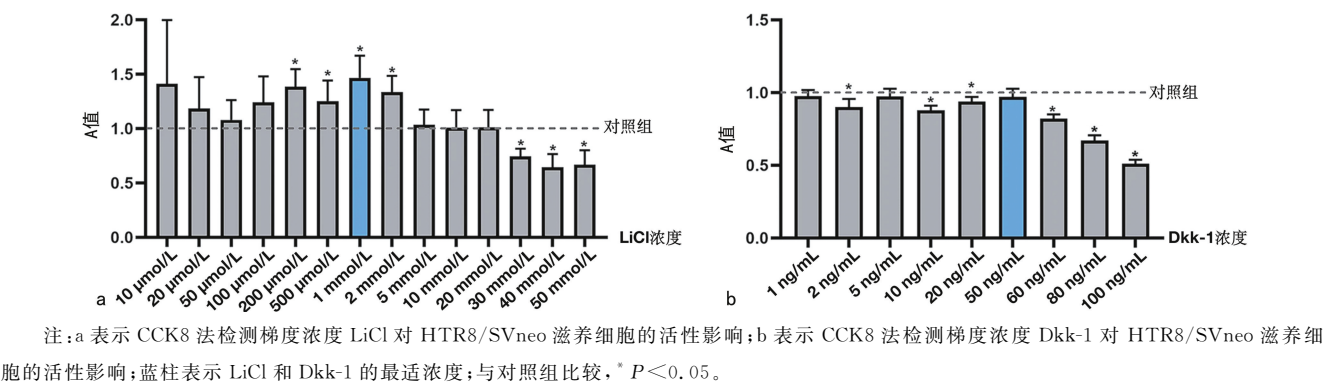


图 2 CCK8 法检测不同浓度 LiCl 和 Dkk-1 对 HTR8/SVneo 滋养细胞的活性影响

2.5 SFRP5 对 HTR8/SVneo 滋养细胞侵袭能力的影响 基底胶 Transwell 侵袭实验结果显示, SFRP5+LiCl 组、SFRP5 组、LiCl 组、对照组、Dkk-1 组和 Dkk-1+LiCl 组 HTR8/SVneo 滋养细胞侵袭细胞数分别为(129.78±2.91)个、(84.67±3.34)个、(487.98±5.43)个、(159.89±2.69)个、(41.67±2.96)个和(81.32±3.67)个。与对照组相比, SFRP5 组 HTR8/SVneo 滋养细胞侵袭细胞数量明显降低($t=14.434, P<0.001$); LiCl 组 HTR8/SVneo 滋养细胞侵袭细胞数量显著增多($t=3.712, P=0.014$)。

与 LiCl 组相比, SFRP5 组和 SFRP5+LiCl 组 HTR8/SVneo 滋养细胞侵袭细胞数量均明显减少($t=7.670, P<0.001; t=6.757, P<0.001$); 与 LiCl 组相比, SFRP5+LiCl 组 HTR8/SVneo 滋养细胞侵袭细胞数量亦显著降低($t=6.166, P<0.001$)。与对照组相比, Dkk-1 组和 Dkk-1+LiCl 组 HTR8/SVneo 滋养细胞侵袭细胞数量均显著降低($t=33.541, P<0.001; t=8.385, P<0.001$); 与 LiCl 组相比, Dkk-1+LiCl 组 HTR8/SVneo 滋养细胞侵袭细胞数量亦显著降低($t=8.305, P<0.001$), 见图 4。

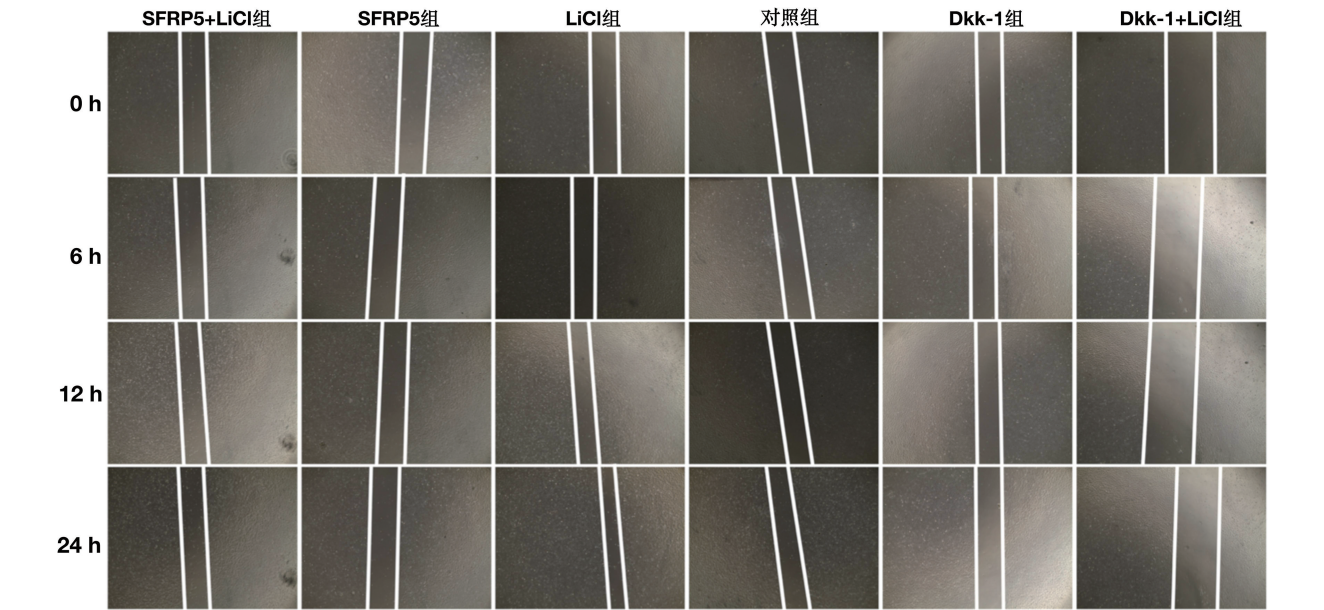


图 3 6 组 HTR8/SVneo 滋养细胞迁移能力比较(×40)

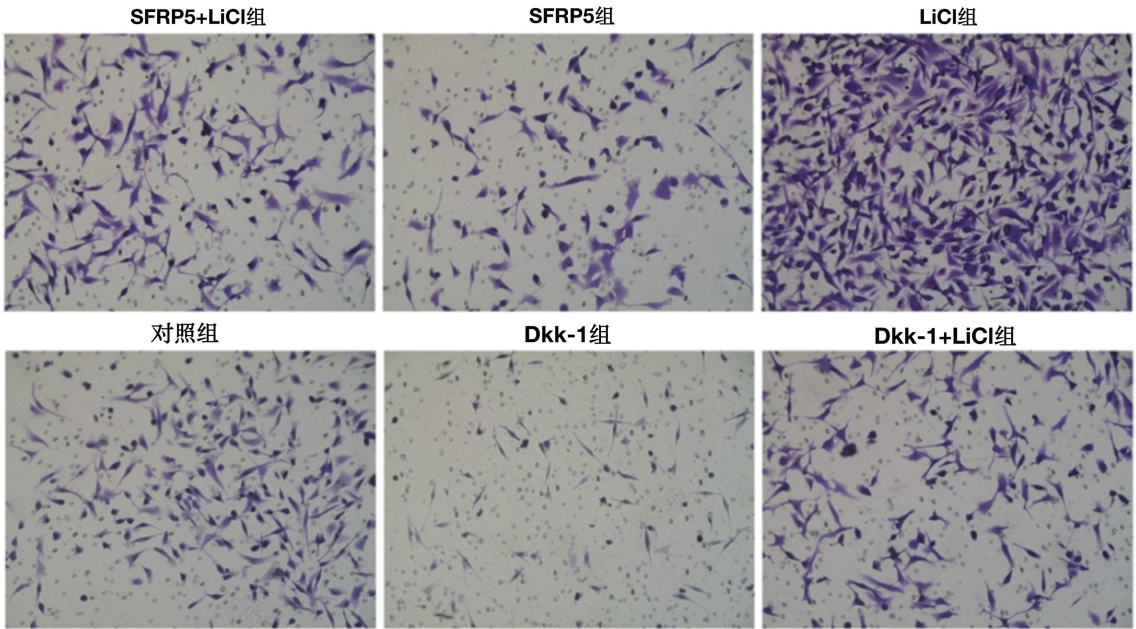


图 4 SFRP5 处理后 HTR8/SVneo 滋养细胞侵袭比较(×200)

2.6 SFRP5 对各组 HTR8/SVneo 滋养细胞 MMP-2/9 活性的影响 明胶酶谱法检测 HTR8/SVneo 滋养细胞中 MMP-2/9 活性,结果显示,与对照组 HTR8/SVneo 滋养细胞 MMP-2/9 活性[依次为(1.02±0.04)和(1.06±0.03)]相比,SFRP5 组 HTR8/SVneo 滋养细胞 MMP-2(0.58±0.09)和 MMP-9(0.52±0.23)活性均显著降低,差异有统计学意义($t=4.193$ 、 $P=0.016$; $t=2.887$ 、 $P=0.034$)。见图 5。

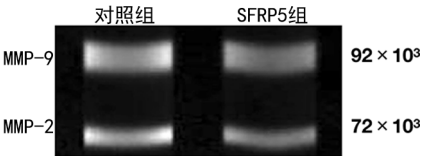


图 5 SFRP5 处理后 HTR8/SVneo 滋养细胞中 MMP-2/9 活性

2.7 SFRP5 对 HTR8/SVneo 滋养细胞中 Wnt/ β -Catenin 信号通路表达的影响 蛋白免疫印迹结果表明,对照组 HTR8/SVneo 滋养细胞 SFRP5 蛋白阴性表达,这与胎盘免疫组化的结果一致;与对照组 HTR8/SVneo 滋养细胞 GSK3 β 表达、 β -catenin 表达[依次为(1.05±0.03 和 1.02±0.02)]比较,SFRP5 组 HTR8/SVneo 滋养细胞 GSK3 β 表达(1.72±0.87)增加, β -catenin 表达(0.21±0.04)减少,差异有统计学意义($t=10.392$ 、 $P<0.01$, $t=12.124$ 、 $P<0.001$);与对照组 HTR8/SVneo 滋养细胞 GSK3 β 表达、 β -catenin 表达比较,LiCl 组 HTR8/SVneo 滋养细胞 GSK3 β 表达(0.24±0.05)降低, β -catenin 表达(1.33±0.13)增加($t=5.196$ 、 $P=0.003$, $t=7.031$ 、 $P<0.001$);与对照组 HTR8/SVneo 滋养细胞

GSK3 β 表达、 β -catenin 表达比较,Dkk-1 组 HTR8/SVneo 滋养细胞 GSK3 β 表达(2.26±0.46)增加, β -catenin 表达(0.16±0.05)降低($t=8.660$ 、 $P<0.001$, $t=15.155$ 、 $P<0.001$)。与 LiCl 组 HTR8/SVneo 滋养细胞 β -catenin 表达、GSK3 β 表达[依次为(1.33±0.13 和 0.24±0.05)]相比,SFRP5+LiCl 组 HTR8/SVneo 滋养细胞 β -catenin 表达(0.54±0.09)降低($t=6.433$ 、 $P<0.001$),而 GSK3 β 表达(0.31±0.06)比较差异无统计学意义($t=2.004$ 、 $P=0.076$);与 LiCl 组 HTR8/SVneo 滋养细胞 GSK3 β 表达、 β -catenin 表达相比,Dkk-1+LiCl 组 HTR8/SVneo 滋养细胞 GSK3 β 表达(8.23±1.43)增加,而 β -catenin 表达(0.33±0.06)降低($t=16.267$ 、 $P<0.001$, $t=6.193$ 、 $P<0.001$)。见图 6。

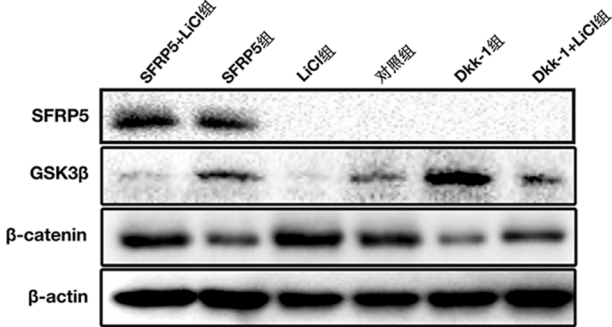


图 6 SFRP5 处理促进 HTR8/SVneo 滋养细胞中 SFRP5、GSK3 β 和 β -catenin 蛋白的表达

3 讨 论

PE 是造成当今世界围产期病死率的主要原因之一,每年约导致 6 万名产妇死亡^[2]。然而,目前临床缺乏有效的预防和治疗方法,这与 PE 的具体病因尚未完全阐明有关。研究发现,Wnt/ β -catenin 信号通

路作为可调控细胞增殖、迁移、侵袭和死亡等生物学过程的重要信号转导通路,其活性异常参与多种产科、妇科和代谢性疾病^[14]。最近的研究表明,重度 PE 胎盘中 Wnt/ β -catenin、c-myc 和 cyclinD1 表达水平较对照组显著降低^[15-16]。提示 Wnt/ β -catenin 信号通路异常可能参与调控 PE 的发生发展。SFRP5 是分泌卷曲相关蛋白家族的成员,由于其在结构上与 Wnt 信号通路中的 Fz 受体非常相似,故通常作为 Wnt 信号通路抑制剂而被人们所熟知^[8],但 SFRP5 与 PE 的关系及对滋养细胞的作用尚不明确。

本研究结果发现,与正常组比较,PE 组血清 SFRP5 水平明显升高。而正常对照及 PE 组胎盘中 SFRP5 阴性表达,这提示血清 SFRP5 的异常升高可能参与了 PE 的发展。研究发现,SFRP5 启动子可发生高甲基化,在一些肿瘤组织中 SFRP5 的表达减少^[9-10]。推测启动子甲基化对 SFRP5 的表观遗传学沉默可能导致 SFRP5 在胎盘组织阴性表达。因此,与 PE 相关的血清 SFRP5 水平增高可能并非来源于胎盘。脂肪组织是一个高度活跃的 SFRP5 分泌组织,并通过产生炎症介质与 PE 相关的炎症状态相关^[17]。因此,假设血清中 SFRP5 的增加可能来自于 PE 患者的脂肪组织,然而,本研究仅检测了 SFRP5 的蛋白表达,未研究 mRNA 的转录和启动子甲基化,需要进一步的大规模基因转录相关研究来进一步解释其血清升高的原因。

Wnt 通路调控许多发育过程,包括细胞命运的规范和细胞极性。而在疾病病理过程中,Wnt 信号与癌细胞和滋养细胞的增殖及转移有关^[18]。MMP-2 和 MMP-9 是 Wnt/ β -catenin 信号通路的下游靶点^[19]。作为 Wnt 抑制剂,SFRP5 在胚胎和内胚层发育过程中抑制典型和非典型的 Wnt 信号传导途径^[20]。由 β -catenin 的聚集和核转位激活的经典 Wnt 信号,促进滋养细胞的侵袭性分化^[21]。有研究发现,在癌细胞和多能干细胞中,SFRP5 通过降低磷酸化 GSK3 β 和非磷酸化 β -catenin(活性 β -catenin)及随后的 T 细胞转录因子 4(TCF4)/淋巴增强子结合因子 1(LEF1)介导的基因表达,使 Wnt/ β -catenin 信号途径失活^[22]。由于早期胎盘滋养细胞的侵袭行为与肿瘤细胞相似,假设 SFRP5 可能对它们的功能有类似的影响。在体外实验中利用 SFRP5 重组蛋白,发现 SFRP5 通过增加 GSK3 β 和降低 β -catenin 的水平来抑制滋养细胞的迁移和侵袭。进一步的研究发现,SFRP5 可降低 MMP-2 和 MMP-9 的活性。而 MMP-2 和 MMP-9 作为 Wnt/ β -catenin 信号通路的下游蛋白酶,可通过分解蜕膜细胞外基质促进滋养细胞的迁移和侵袭。这些结果提示,SFRP5 可能通过抑制 Wnt/ β -catenin 信号

通路及其下游 MMP2/9 的活性对滋养细胞迁移和侵袭能力产生抑制作用。

本研究发现 LiCl 处理可促进 HTR8/SVneo 滋养细胞的迁移和侵袭,并上调 β -catenin 的表达。与 SFRP5 相似,Dkk-1 抑制了滋养细胞的迁移和侵袭能力及经典 Wnt/ β -catenin 通路。此外,SFRP5 和 Dkk-1 可减弱 LiCl 的效应。总之,本研究结果表明,SFRP5 的过度激活可能通过抑制 Wnt/ β -catenin 途径在 HTR8/SVneo 滋养细胞功能障碍中发挥关键作用。

综上所述,SFRP5 可能通过负向调控 Wnt/ β -catenin 途径和下游的 MMP-2 和 MMP-9,抑制 HTR8/SVneo 滋养细胞的迁移和侵袭,导致 HTR8/SVneo 滋养细胞功能障碍和 PE 的发生发展。因此,本研究的结果从一个新的角度仔细研究了 PE 的发病机制,并在未来为 PE 提供了新的治疗靶点。

参考文献

- [1] MAGEE L A, NICOLAIDES K H, VON DADELSZEN P. Preeclampsia[J]. N Engl J Med, 2022, 386(19): 1817-1832.
- [2] PITTARA T, VYRIDES A, LAMNISOS D, et al. Pre-eclampsia and long-term health outcomes for mother and infant: an umbrella review[J]. BJOG, 2021, 128(9): 1421-1430.
- [3] 薛平平, 王慧艳, 樊文强, 等. PTEN 在子痫前期胎盘滋养细胞浸润不足中的作用及机制研究[J]. 现代妇产科进展, 2017, 26(10): 739-743.
- [4] XUE P, FAN W, DIAO Z, et al. Up-regulation of PTEN via LPS/AP-1/NF- κ B pathway inhibits trophoblast invasion contributing to preeclampsia [J]. Mol Immunol, 2020, 118(1): 182-190.
- [5] LIU J J, ZHANG L, ZHANG F F, et al. Influence of miR-34a on preeclampsia through the Notch signaling pathway [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(3): 923-931.
- [6] WANG Y, CHENG K, ZHOU W, et al. miR-141-5p regulate ATF2 via effecting MAPK1/ERK2 signaling to promote preeclampsia [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 115(1): 108953.
- [7] NUSSE R, CLEVERS H. Wnt/ β -catenin signaling, disease, and emerging therapeutic modalities[J]. Cell, 2017, 169(6): 985-999.
- [8] LIU L B, CHEN X D, ZHOU X Y, et al. The Wnt antagonist and secreted frizzled-related protein 5: implications on lipid metabolism, inflammation, and type 2 diabetes mellitus[J]. Biosci Rep, 2018, 38(4): BSR20180011.
- [9] CHENG Y Y, MOK E, TAN S, et al. SFRP tumour suppressor genes are potential plasma-based epigenetic biomarkers for malignant pleural mesothelioma [J]. Dis

Markers, 2017, 2017(1):2536187.

[10] SHENG W, ZHANG Z C, SHI D Y, et al. Epigenetic silencing of SFRP5 promotes the metastasis and invasion of chondrosarcoma by expression inhibition and Wnt signaling pathway activation[J]. Chem Biol Interact, 2018, 296(1):1-8.

[11] CARSTENSEN M, WIZA C, ROHRIG K, et al. Effect of Sfrp5 on cytokine release and insulin action in primary human adipocytes and skeletal muscle cells[J]. PLoS One, 2014, 9(1):e85906.

[12] GAO X, ZHANG S, WANG D, et al. (Pro)renin receptor contributes to hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis and autophagy in myocardial cells via the beta-catenin signaling pathway[J]. Physiol Res, 2020, 69(3):427-438.

[13] BIAN Y, XIANG J. Salvianolic acid B promotes the osteogenic differentiation of human periodontal ligament cells through Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. Arch Oral Biol, 2020, 113:104693.

[14] HUANG P, YAN R, ZHANG X, et al. Activating Wnt/ β -catenin signaling pathway for disease therapy: challenges and opportunities[J]. Pharmacol Ther, 2019, 196(1):79-90.

[15] WANG X, ZHANG Z, ZENG X, et al. Wnt/ β -catenin signaling pathway in severe preeclampsia[J]. J Mol Histol, 2018, 49(3):317-327.

[16] ZHANG Z, WANG X, ZHANG L, et al. Wnt/ β -catenin signaling pathway in trophoblasts and abnormal activation in preeclampsia (review)[J]. Mol Med Rep, 2017, 16(2):1007-1013.

[17] NARUSE K, AKASAKA J, SHIGEMITSU A, et al. Involvement of visceral adipose tissue in immunological modulation of inflammatory cascade in preeclampsia[J]. Mediators Inflamm, 2015, 2015(1):325932.

[18] KWON M, LEE S J, WANG Y, et al. Filamin A interacting protein 1-like inhibits WNT signaling and MMP expression to suppress cancer cell invasion and metastasis[J]. Int J Cancer, 2014, 135(1):48-60.

[19] LI L, PENG W, ZHOU Q, et al. LRP6 regulates Rab7-mediated autophagy through the Wnt/ β -catenin pathway to modulate trophoblast cell migration and invasion[J]. J Cell Biochem, 2020, 121(2):1599-1609.

[20] STUCKENHOLZ C, LU L, THAKUR P C, et al. Sfrp5 modulates both Wnt and BMP signaling and regulates gastrointestinal organogenesis [corrected] in the zebrafish, *Danio rerio* [J]. PLoS One, 2013, 8(4):e62470.

[21] QU B, LIU B R, DU Y J, et al. Wnt/ β -catenin signaling pathway may regulate the expression of angiogenic growth factors in hepatocellular carcinoma [J]. Oncol Lett, 2014, 7(4):1175-1178.

[22] HOEPFNER J, KLEINSORGE M, PAPP O, et al. Biphasic modulation of Wnt signaling supports efficient foregut endoderm formation from human pluripotent stem cells [J]. Cell Biol Int, 2016, 40(5):534-548.

(收稿日期:2022-05-27 修回日期:2023-01-23)

(上接第 552 页)

[17] CUI X, LI M, HE Z, et al. MiR-302b-5p enhances the neuroprotective effect of IGF-1 in methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine-induced Parkinson's disease by regulating inducible nitric-oxide synthase [J]. Cell Biochem Funct, 2020, 38(8):1025-1035.

[18] GODAU J, HERFURTH M, KATTNER B, et al. Increased serum insulin-like growth factor 1 in early idiopathic Parkinson's disease[J]. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2010, 81(5):536-538.

[19] SHARMA S K, CHORELL E, WITTUNG-STAFSHEDE P. Insulin-degrading enzyme is activated by the C-terminus of alpha-synuclein[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 466(2):192-195.

[20] SOKE F, KOCER B, FIDAN I, et al. Effects of task-oriented training combined with aerobic training on serum BDNF, GDNF, IGF-1, VEGF, TNF- α , and IL-1 β levels in people with Parkinson's disease: a randomized controlled study[J]. Exp Gerontol, 2021, 150(1):111384-111392.

[21] TAI L M, MEHRA S, SHETE V, et al. Soluble apoE/A beta complex: mechanism and therapeutic target for APOE4-induced AD risk[J]. Mol Neurodegener, 2014, 9(2):1-14.

[22] WANG X S, LUEBBE P, GRUENSTEIN E, et al. Apolipoprotein E(ApoE) peptide regulates tau phosphorylation via two different signaling pathways[J]. J Neurosci Res, 2015, 51(5):658-665.

[23] FAN K H, FEINGOLD E, ROSENTHAL S L, et al. Whole-exome sequencing analysis of Alzheimer's disease in non-APOE*4 carriers[J]. J Alzheimers Dis, 2020, 76(4):1553-1565.

[24] 郭立军, 何正初, 李宜军, 李琼. α -突触核蛋白、A β 1-42、EGF 与重症帕金森病患者病情程度及认知功能障碍的关系[J]. 热带医学杂志, 2020, 20(12):1573-1576.

[25] ROBINSON J L, LEE E B, XIE S X, et al. Neurodegenerative disease concomitant proteinopathies are prevalent, age-related and APOE4-associated [J]. Brain, 2018, 141(7):2181-2193.

(收稿日期:2022-05-09 修回日期:2023-01-25)