

• 论 著 •

miR-517 在子痫前期患者胎盘外泌体中的表达及其对滋养层细胞侵袭与 T 细胞增殖的影响^{*}

罗 书¹, 李书明², 黄 勇³, 关红琼¹1. 海南医学院第二附属医院产科, 海南海口 570311; 2. 海南医学院第二临床医学院, 海南海口 570311;
3. 海南医学院第二附属医院生殖医学科, 海南海口 570311

摘 要:目的 探讨在子痫前期(PE)患者的胎盘组织与胎盘外泌体中微小 RNA-517(miR-517)的表达及其对滋养层细胞侵袭与 T 细胞增殖的影响。方法 收集 2020 年 5 月至 2021 年 5 月于海南医学院第二附属医院确诊为 PE 的患者 50 例(PE 组)和 50 例健康孕产妇(NP 组)的胎盘绒毛组织和外周血,采用实时荧光定量 PCR(qPCR)检测两组胎盘绒毛组织中 miR-517 的表达差异;分离外周血中的胎盘外泌体,采用透射电子显微镜(TEM)与纳米示踪技术(NTA)分析外泌体形态、大小分布及浓度,蛋白质印记法(Western blot)检测外泌体标志蛋白 CD63、肿瘤易感基 101(TSG101)和胎盘特异性蛋白胎盘碱性磷酸酶(PLAP)的表达;体外培养人绒毛滋养层细胞 HTR-8 与人 T 细胞系 Jurkat T 细胞,将过表达 miR-517 的 miR-517 mimic 与阴性对照序列 miR-NC 转染至上述细胞中,并按细胞处理方式的不同将 HTR-8 与 Jurkat T 细胞各分为 5 组:对照组、miR-517 mimic 组、miR-NC 组、NP-外泌体组、PE-外泌体组;qPCR 检测各组 HTR-8 或 Jurkat T 细胞中 miR-517 的表达水平,CCK-8 检测其增殖能力;Transwell 检测各组 HTR-8 细胞的侵袭能力。结果 与 NP 组比较,PE 组胎盘组织与胎盘外泌体中 miR-517 的表达均明显降低($P < 0.05$),且胎盘外泌体具有典型的圆盘状或新月形的双层膜结构,颗粒直径在 30~150 nm,CD63、TSG101、PLAP 表达升高($P < 0.05$);与对照组比较,miR-517 mimic 组与 NP-外泌体组中 miR-517 表达和 HTR-8 细胞增殖及侵袭能力均明显升高($P < 0.05$),Jurkat T 细胞的增殖能力却明显降低($P < 0.05$),miR-NC 组均无明显改变($P > 0.05$),PE-外泌体组中 miR-517 水平无明显差异($P > 0.05$),但 HTR-8 细胞增殖及侵袭能力均降低($P < 0.05$),而 Jurkat T 细胞的增殖能力却明显升高($P < 0.05$)。与 NP-外泌体组比较,miR-517 mimic 组中 miR-517 表达和 HTR-8 细胞增殖、侵袭能力均明显升高($P < 0.05$),而 Jurkat T 细胞的增殖能力却降低($P < 0.05$),PE-外泌体组中 miR-517 表达和 HTR-8 细胞增殖、侵袭能力均明显降低($P < 0.05$),但 Jurkat T 细胞的增殖能力却升高($P < 0.05$)。结论 在 PE 患者胎盘组织与胎盘外泌体中表达下调的 miR-517 可能通过调控滋养层细胞侵袭与 T 细胞增殖参与影响 PE 的发生与发展。

关键词:子痫前期; 微小 RNA-517; 胎盘外泌体; 滋养层细胞; T 细胞; 增殖; 侵袭

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2023.12.009

中图法分类号:R446.19

文章编号:1673-4130(2023)12-1452-07

文献标志码:A

Expression of miR-517 in placental exosomes from patients with preeclampsia and its effect on trophoblast cell invasion and T cell proliferation^{*}

LUO Shu¹, LI Shuming², HUANG Yong³, GUAN Hongqiong¹

1. Department of Obstetrics, the Second Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou, Hainan 570311, China; 2. the Second Clinical Medical College of Hainan Medical College, Haikou, Hainan 570311, China; 3. Department of Reproductive Medicine, the Second Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou, Hainan 570311, China

Abstract: Objective To investigate the expression of microRNA-517 (miR-517) in placental tissues and placental exosomes of patients with preeclampsia (PE) and its effect on trophoblast cell invasion and T cell proliferation. **Methods** Placental villus tissue and peripheral blood were collected from 50 patients diagnosed with PE (PE group) and 50 healthy pregnant women (NP group) in the Second Affiliated Hospital of Hainan Medical College from May 2020 to May 2021. Real-time fluorescence quantitative PCR (qPCR) was used to detect the expression of miR-517 in placental villus tissue of the two groups. Placental exosomes were isolated from peripheral blood. Transmission electron microscopy (TEM) and nanotracer technology (NTA) were used to analyze the morphology, size distribution and concentration of exosomes. The expression of exosome

^{*} 基金项目:海南省卫生计生行业科研项目(20A200264)。

作者简介:罗书,女,副主任医师,主要从事妊娠期高血压疾病相关研究。

网络首发 [http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1176.R.20230610.0818.008.html\(2023-06-12\)](http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1176.R.20230610.0818.008.html(2023-06-12))

marker cardiac protein CD63, tumor susceptibility gene 101 (TSG101) and placental specific protein placental alkaline phosphatase (PLAP) were detected by Western blot. Human chorionic trophoblastic HTR-8 cells and human T cell line Jurkat T cells were cultured in vitro. miR-517 mimic and negative control sequence miR-NC were transfected into the above cells. HTR-8 and Jurkat T cells were divided into 5 groups according to different cell treatment methods: control group, miR-517 mimic group, miR-NC group, NP-exosome group and PE-exosome group, respectively. qPCR was used to detect the expression of miR-517 in HTR-8 or Jurkat T cells. CCK-8 was used to detect the proliferation ability of HTR-8 or Jurkat T cells, and Transwell was used to detect the invasion ability of HTR-8 cells in each group. **Results** Compared with the NP group, the expression of miR-517 in the placental tissue and placental exosomes in the PE group was significantly decreased ($P < 0.05$). The placental exosomes in the PE group had a typical disc-shaped or crescent-shaped bilayer membrane structure, and the particle diameter was 30–150 nm, and the expression of CD63, TSG101 and PLAP proteins was increased ($P < 0.05$). Compared with the control group, the expression of miR-517 and the proliferation and invasion ability of HTR-8 cells in the miR-517 mimic group and NP-exosome group were significantly increased ($P < 0.05$), but the proliferation ability of Jurkat T cells was significantly decreased ($P < 0.05$). There was no significant change in miR-NC group ($P > 0.05$). There was no significant difference in the level of miR-517 in the PE-exosome group ($P > 0.05$), but the proliferation and invasion ability of HTR-8 cells were decreased ($P < 0.05$), while the proliferation ability of Jurkat T cells was significantly increased ($P < 0.05$). Compared with the NP-exosome group, the expression of miR-517 and the proliferation and invasion ability of HTR-8 cells in the miR-517 mimic group were significantly increased ($P < 0.05$), while the proliferation ability of Jurkat T cells was decreased ($P < 0.05$). The expression of miR-517 and the proliferation and invasion ability of HTR-8 cells in the PE-exosome group were significantly decreased ($P < 0.05$), but the proliferation ability of Jurkat T cells was increased ($P < 0.05$). **Conclusion** The down-regulated expression of miR-517 in placental tissues and placental exosomes of PE patients may be involved in the occurrence and development of PE by regulating trophoblast cell invasion and T cell proliferation.

Key words: preeclampsia; microRNA-517; placental exosomes; trophoblast cells; T cells; proliferation; invasion

子痫前期(PE)是妊娠期特有的并发症,影响全世界约 2%~8% 的妊娠女性,是全球孕产妇和围生期胎儿发病和死亡的重要原因之一。然而,PE 的确切病因和具体发病机制仍不清楚,这导致尽早对其进行诊断和干预治疗仍有困难^[1]。近年来,有研究发现,胎盘特异性生物标志物 19 号染色体微小 RNA (C19MC)簇在 PE 患者的胎盘组织与血浆标本中异常表达^[2]。miR-517 属于 C19MC 簇成员,有研究报道表明,miR-517 在 PE 患者血浆和血浆外泌体中的表达均明显降低,并提示 miR-517 可能是一种新的胎盘特异性标志物,且在妊娠早期,检测上述标本中 miR-517 水平具有早期预测 PE 发生的潜在价值^[3-4]。外泌体是一种直径在 30~150 nm 的胞外囊泡,可由包括滋养层细胞在内的多种细胞分泌,并通过与靶细胞膜融合后,释放多种信号分子(如蛋白质、脂质、RNA、DNA、miRNAs 等)介导细胞间通讯^[5]。既往有研究表明,外泌体可通过 miRNAs 介导免疫调控与滋养层细胞的功能而参与妊娠相关疾病的发生与发展^[6],但在 PE 中,血浆外泌体中 miR-517 异常表达的具体作用尚不清楚。因此,本研究通过体内外实验,旨在进一步验证 miR-517 在胎盘外泌体中的表达及其相关作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2020 年 5 月至 2021 年 5 月于

海南医学院第二附属医院确诊为 PE 的患者 50 例(PE 组)和同期于海南医学院第二附属医院就诊的年龄、孕周相近,且无高血压、蛋白尿等妊娠相关并发症的 50 例健康孕产妇作为 NP 组,两组孕产妇一般临床资料如表 1 所示。纳入标准:(1)孕产妇年龄在 20~35 周岁,妊娠孕周在 20~42 周;(2)PE 患者的诊断标准按照《妇产科学》(第 9 版)^[7]相关标准执行;(3)两组孕产妇均经阴道分娩,且均为自然单胎妊娠,未合并慢性高血压、糖尿病、肾脏疾病、传染病或其他妊娠合并症。使用含 EDTA 的抗凝管抽取两组孕产妇空腹肘静脉血约 7 mL,保存于-80 ℃冰箱用于提取外泌体。同时,在分娩后立即在胎盘中央区去除黏膜后,取适量绒毛组织置于 RNAlater 储存液中,保存于-80 ℃冰箱用于后续胎盘 RNA 的提取。本研究获得医院伦理委员会的批准,所有研究对象均签署书面知情同意书。

1.2 仪器与试剂 人绒毛膜滋养层细胞 HTR-8/SVneo(HTR-8)与人 T 细胞系 Jurkat T 细胞均购自美国 ATCC 细胞库, RPMI-1640 培养基、胎牛血清(FBS)、青霉素与链霉素混合液购自美国 Hyclone 公司,miR-517 mimic 与阴性对照序列(miR-NC)购自广州锐博生物技术有限公司,转染试剂 Lipofectamine® 2000 购自美国 Thermo 公司, RIPA 细胞裂解液、BCA 蛋白定量试剂盒、CCK-8 试剂盒、辣根

过氧化物酶标记兔抗小鼠 IgG 购自江苏碧云天生物技术有限公司, TRIzol 试剂购自美国 Invitrogen 公司, RNAlater 储存液、外泌体 RNA 提取试剂盒、实时荧光定量 PCR(qPCR)试剂盒 SYBR™ Green Master Mix 购自美国 Qiagen 公司, 基质胶购自美国 BD 公司, miRNA 反转录试剂盒购自广州易锦生物技术有限公司, 小鼠抗 CD63、肿瘤易感基因 101(TSG101)、

胎盘碱性磷酸酶(PLAP)、清蛋白抗体购自美国 Abcam 公司, PKH67 荧光染料试剂盒购自美国 Sigma 公司, 共聚焦显微镜(C2+型)购自日本 Nikon 公司, 酶标仪(ReadMax 1000F 型)购自上海闪谱生物技术有限公司, Nanosight LM10 纳米示踪分析仪器(NS300 型)购自英国 Malvern 公司, 超薄切片(JEM-1011 型)购自日本 JEOL 公司。

表 1 两组孕产妇一般临床资料比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	年龄(岁)	收缩压(mmHg)	舒张压(mmHg)	分娩孕周(周)	胎儿体重(g)
NP 组	50	31.09±3.47	111.91±6.49	72.18±6.37	38.71±0.62	3 480.10±275.72
PE 组	50	28.71±6.42	163.14±6.27	100.22±5.87	39.43±1.29	2 691.07±566.93
<i>t</i>		1.149	21.520	12.620	1.368	2.519
<i>P</i>		0.260	<0.001	<0.001	0.182	0.012

1.3 方法

1.3.1 细胞的培养和转染 采用含 10%FBS 和 100 U/mL 青霉素与 100 μg/mL 链霉素混合的 RPMI-1640 培养基培养 HTR-8 与 Jurkat T 细胞,并置于 37℃、5%CO₂ 的培养箱中。每 2 d 更换一次培养基, 4~5 d 传代一次细胞。取传至 3 代以后的 HTR-8 或 Jurkat T 细胞,调整密度后,按 2.5×10⁵/mL 接种至 6 孔板中,待细胞生长融合至 60%~80%时,按照转染试剂 Lipofectamine® 2000 使用说明书方法将终浓度为 25 nmol/L 的 miR-517 mimic 与 miR-NC 转染入细胞中,24 h 后检测转染效率。

1.3.2 外泌体的分离 取两组孕产妇的抗凝肘静脉血,800×g 离心 10 min,取上层血浆,加入等量的 PBS 溶液进行稀释后,4℃下 3 000×g 离心 30 min,取上层组织清液,参考文献[8]方法分离血浆中的胎盘外泌体,将上述组织清液经 0.22 μm 的滤网过滤后,加入 8%聚乙二醇(PEG)6000 在 4℃下孵育过夜,10 000×g 离心 20 min 后,取底层沉淀物重悬于 0.25 nmol/L 的蔗糖溶液中,采用蔗糖密度梯度进一步离心纯化,逐层取出各个梯度溶液后,加入 8%PEG 6000 再次于 4℃下孵育过夜,10 000×g 离心 1 h,沉淀物即为所需的胎盘外泌体,200 μL PBS 稀释后用于后续实验。

1.3.3 透射电子显微镜(TEM)观察外泌体形态 采用 TEM 观察外泌体形态,简述如下:取 5~10 μL 新鲜分离的外泌体悬液进行超速离心后,4℃下在 2%多聚甲醛和 2.5%戊二醛的固定液中固定 1 h,梯度乙醇脱水,随后浸泡在环氧树脂中过夜。包埋样品后,60℃下聚合 24 h,铅铀染色,超薄切片后进行 TEM 观察。所有切片在 80 kV 加速电压下观察、拍照。

1.3.4 纳米示踪技术(NTA)分析 NTA 从光散射和布朗运动两个方面检测外泌体的大小分布和浓度。使用 PBS 溶液将外泌体样品稀释至(1~9)×10⁸/mL,采用 Nanosight LM10 仪器进行检测。跟踪每个样品 30 s,摄像机设置为 16,其中增益设置为 6.0,阈值设置为 11。记录外泌体的运动轨迹。以稀

释后样品的浓度和粒度分布图为输出,计算外泌体粒径大小分布与浓度。

1.3.5 外泌体的标记与摄取 参考 PKH67 荧光染料试剂盒标记外泌体,并采用 BCA 蛋白定量试剂盒进行外泌体定量。取稀释后的外泌体悬液与 PKH67 试剂轻轻混匀后,4℃下 100 000×g 离心 2 h,取底层沉淀,PBS 溶液洗涤 2 次后,取约 100 μg 标记的外泌体溶液加入提前接种于 24 孔板中的 HTR-8 细胞中,在 37℃、5%CO₂ 孵箱中孵育 24 h,用激光共聚焦扫描显微镜观察 HTR-8 细胞摄取外泌体的情况。

1.3.6 细胞的处理与分组 取处于对数生长期的 HTR-8 或 Jurkat T 细胞,按实验目的将细胞分为 5 组:正常培养的对照组,转染 miR-517 mimic 序列的 miR-517 mimic 组,转染 miR-NC 序列的 miR-NC 组,分别与 5.0 μg/mL NP-外泌体或 PE-外泌体进行共同培养的 NP-外泌体组或 PE-外泌体组。上述各组 HTR-8 或 Jurkat T 细胞置于 37℃、5%CO₂ 的培养箱中孵育 48 h,用于后续实验检测。

1.3.7 CCK-8 法检测细胞的增殖 将 HTR-8 或 Jurkat T 细胞按 5×10³/孔的密度接种至 96 孔板中,按步骤 1.3.1 将 miR-517 mimic 与 miR-NC 转染至细胞中,并按步骤 1.3.6 的分组进行处理后置于 37℃、5%CO₂ 的培养箱中培养,按照 CCK-8 试剂盒操作方法分别在培养的 0、24、48 h 后,在酶标仪 490 nm 处检测各组细胞吸光度值(A 值)。所有时间点的细胞活力以各孔与空白对照校正后的 A 值表示,并以 0 h 的细胞活力进行归一化处理。

1.3.8 Transwell 检测细胞的侵袭 在 24 孔板中采用孔径为 8 μm 的 Transwell 小室检测各组 HTR-8 细胞的侵袭能力。简述如下:在预先包被 BD 基质胶的小室中加入 200 μL 含 1%FBS 和 1×10⁶ 个细胞的 RPMI-1640 细胞悬液,下室为 800 μL 含 10%FBS 的 RPMI-1640 培养基,37℃、5%CO₂ 的培养箱中孵育 48 h 后,取出小室,经 4℃预冷 5%戊二醛固定和 0.1%结晶紫染色后,PBS 溶液充分洗涤细胞 2 次,显微镜下观察穿出的细胞数。

1.3.9 qPCR 检测细胞与外泌体中 miR-517 的表达 TRIzol 法提取胎盘组织或细胞中的总 RNA,外泌体中总 RNA 利用外泌体 RNA 提取试剂盒说明书方法进行提取。使用反转录试剂盒 All-in-One™ 将总 RNA 反向转录为 cDNA,然后用 SYBR™Green Master Mix 进行 qPCR 检测,引物序列如下:miR-517 上游:5'-GCCACATCGTGCACCCTTTT-3', miR-517 下游:5'-GTCGTACCAGTGCAGGGTCC-3',U6 上游:5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3',U6 下游:5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3',以 U6 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法分析 miR-517 表达。

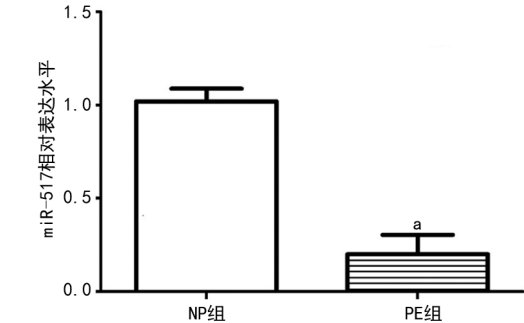
1.3.10 蛋白质印记法(Western blot)检测外泌体标志性蛋白 CD63、TSG101 和胎盘特异性蛋白 PLAP 的表达 采用蛋白酶抑制剂和 RIPA 裂解液在冰上提取外泌体中的总蛋白,4℃下,12 000 r/min 离心 4 min,收集上清液,BCA 试剂盒测定蛋白浓度。取约 20 μg 蛋白样品在 10%聚丙烯酰胺凝胶电泳上进行层析后,湿转法转移至聚偏氟乙烯膜上,采用 5%脱脂奶粉在室温下封闭抗体 1 h 后,加入一抗 CD63(1:500)、TSG101(1:1 000)、PLAP(1:500)、血清清蛋白(1:2 000),4℃下孵育过夜,随后加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:5 000),室温下孵育 2 h 后,滴加增强型化学发光检测试剂在凝胶成像系统进行显色、成像,采用 Image-Pro Plus 6.0 软件用于蛋白灰度分析。

1.4 统计学处理 采用 SPSS21.0 统计软件进行数据处理和分析。呈正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学

意义。

2 结 果

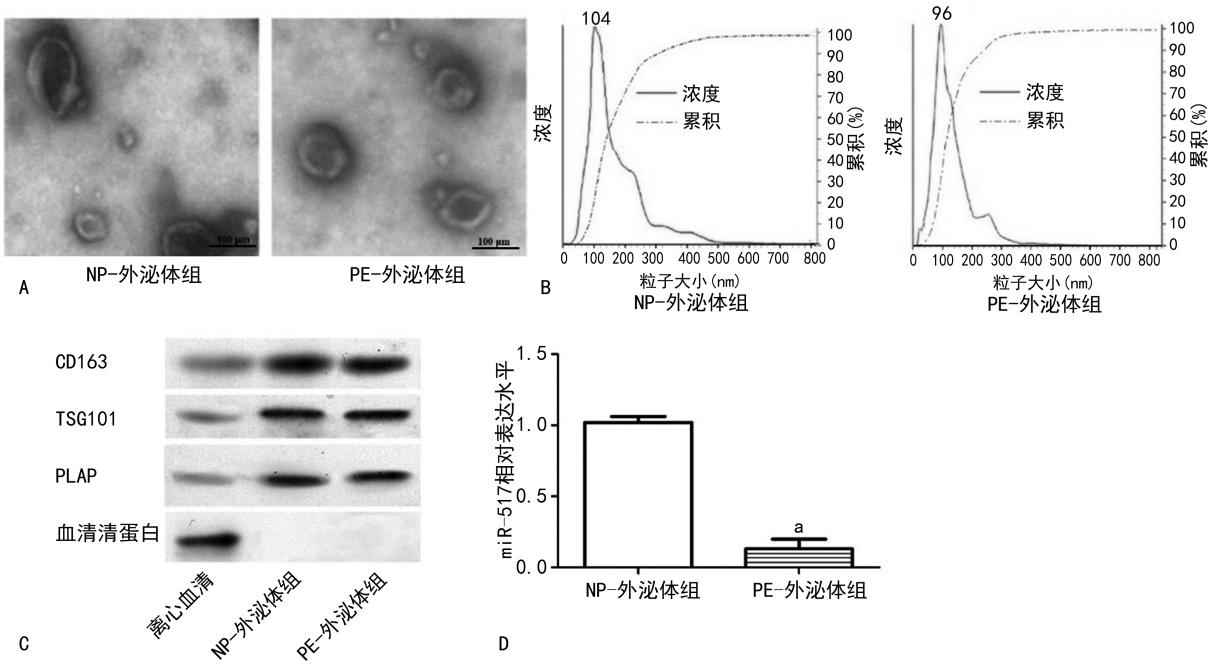
2.1 miR-517 在健康孕产妇和 PE 患者胎盘组织中的表达 qPCR 检测结果显示,与 NP 组比较,miR-517 在 PE 组胎盘组织中的表达明显降低($P < 0.05$),见图 1。



注:与 NP 组比较,^a $P < 0.05$ 。

图 1 qPCR 检测 miR-517 在健康孕产妇和 PE 患者胎盘组织中的表达

2.2 miR-517 在胎盘外泌体中的表达 TEM 与 NTA 检测结果显示,来源于 PE 组与 NP 组的胎盘外泌体具有典型的圆盘状或新月形的双层膜结构,颗粒直径在 30~150 nm,见图 2A、B。Western blot 检测结果显示,CD63、TSG101、PLAP 在胎盘外泌体中高表达,而血清清蛋白呈低表达,见图 2C。上述结果符合胎盘外泌体的基本特征,提示成功分离了来源于 PE 组与 NP 组血浆中的胎盘外泌体。qPCR 检测结果显示,与 NP-外泌体组比较,miR-517 在 PE-外泌体组中的表达明显降低($P < 0.05$),见图 2D。

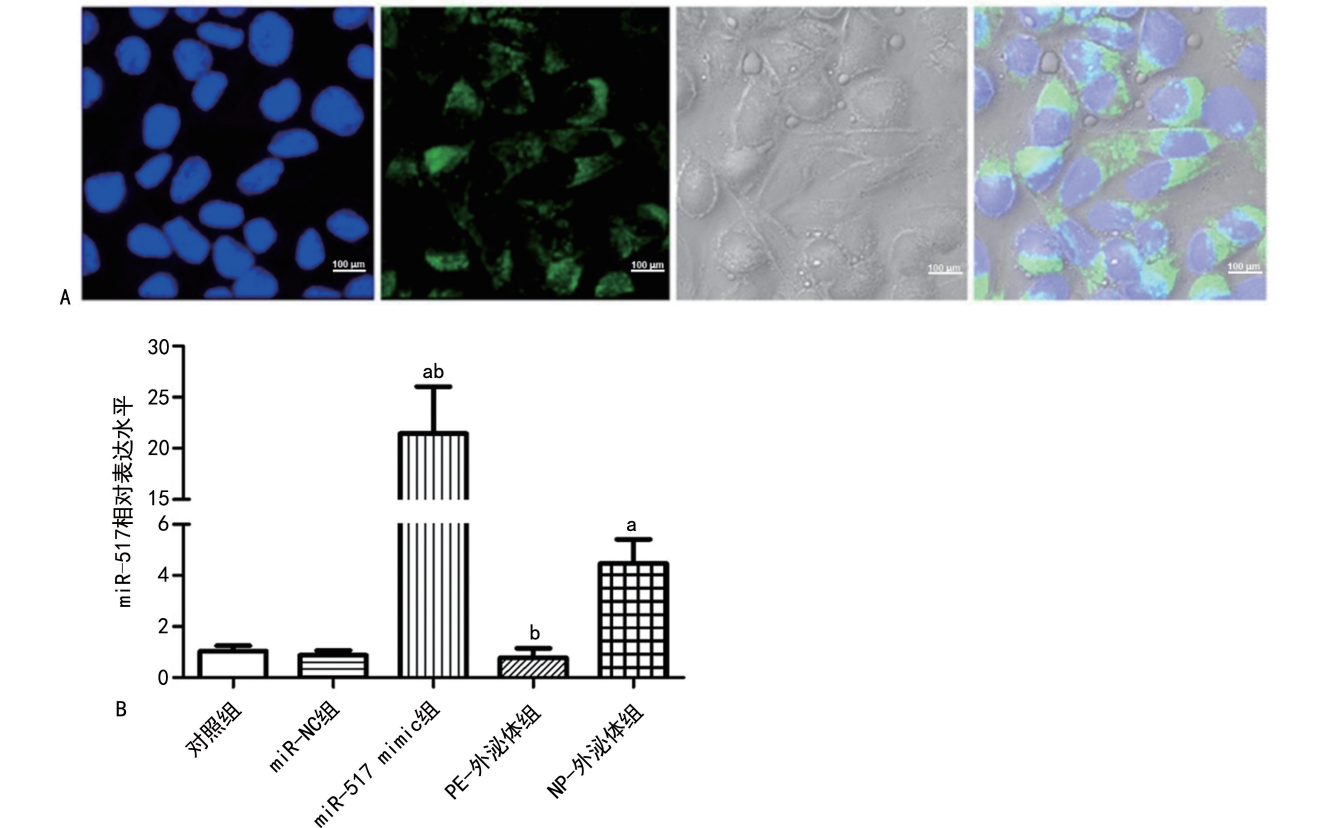


注:A 为 TEM 观察外泌体形态;B 为 NTA 检测外泌体大小和密度;C 为 Western blot 检测 CD63、TSG101、PLAP 的表达;D 为 qPCR 检测 miR-517 在胎盘外泌体中的表达;与 NP-外泌体组比较,^a $P < 0.05$ 。

图 2 胎盘外泌体的鉴定及 qPCR 检测 miR-517 的表达

2.3 各组滋养层细胞中 miR-517 表达比较 PKH67 标记的胎盘外泌体与 HTR-8 细胞共培养后,采用激光共聚焦扫描显微镜观察,结果表明,胎盘外泌体可被 HTR-8 细胞摄取,见 3A;qPCR 检测各组 HTR-8 细胞中 miR-517 表达的结果显示,与对照组比较,miR-517 mimic 组与 NP-外泌体组中 miR-517 表达明

显升高($P<0.05$),miR-NC 组与 PE-外泌体组 miR-517 表达均无明显改变($P>0.05$);与 NP-外泌体组比较,miR-517 mimic 组 miR-517 表达明显升高($P<0.05$),PE-外泌体组 miR-517 表达明显降低($P<0.05$),见图 3B。



注:A为共聚焦显微镜观察 HTR-8 细胞摄取 PKH67 标记的胎盘外泌体;B为 qPCR 检测各组 HTR-8 细胞中 miR-517 表达;与对照组比较,^a $P<0.05$;与 NP-外泌体组比较,^b $P<0.05$ 。

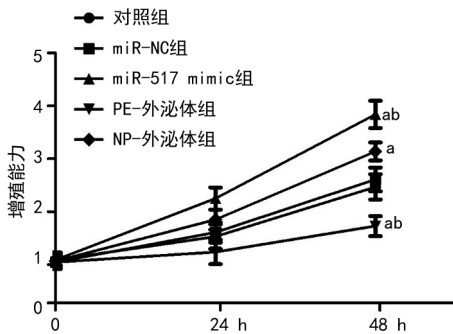
图 3 PKH67 标记的胎盘外泌体的摄取与 qPCR 检测各组 HTR-8 细胞中 miR-517 表达

2.4 各组滋养层细胞增殖能力的检测 CCK-8 法检测各组 HTR-8 细胞增殖能力的结果显示,与对照组比较,miR-517 mimic 组和 NP-外泌体组细胞的增殖能力明显升高($P<0.05$),miR-NC 组无明显改变($P>0.05$),PE-外泌体组明显降低($P<0.05$);与 NP-外泌体组比较,miR-517 mimic 组细胞增殖能力明显升高($P<0.05$),而 PE-外泌体组明显降低($P<0.05$),见图 4。

2.5 各组滋养层细胞侵袭能力的检测 Transwell 检测结果显示,与对照组比较,miR-517 mimic 组和 NP-外泌体组的侵袭细胞数明显增加($P<0.05$),miR-NC 组无明显改变($P>0.05$),PE-外泌体组明显减少($P<0.05$);与 NP-外泌体组比较,miR-517 mimic 组的侵袭细胞数明显增加($P<0.05$),PE-外泌体组却明显减少($P<0.05$),见图 5。

2.6 各组 Jurkat T 细胞中 miR-517 的表达及增殖能力检测 qPCR 检测外泌体中 miR-517 表达的结果显示,与对照组比较,miR-517 mimic 中 miR-517 表达

表达明显升高($P<0.05$),miR-NC 组无明显改变($P>0.05$),见图 6A;CCK-8 法检测结果显示,与对照组比较,miR-517 mimic 组与 NP-外泌体组的 Jurkat T 细胞增殖能力明显降低($P<0.05$),miR-NC 组无明显改变($P>0.05$),而 PE-外泌体组却明显升高($P<0.05$);与 NP-外泌体组比较,miR-517 mimic 组 Jurkat T 细胞增殖能力明显降低($P<0.05$),而 PE-外泌体组却明显升高($P<0.05$),见图 6B。



注:与对照组比较,^a $P<0.05$;与 NP-外泌体组比较,^b $P<0.05$ 。

图 4 CCK-8 法检测各组 HTR8 细胞的增殖能力

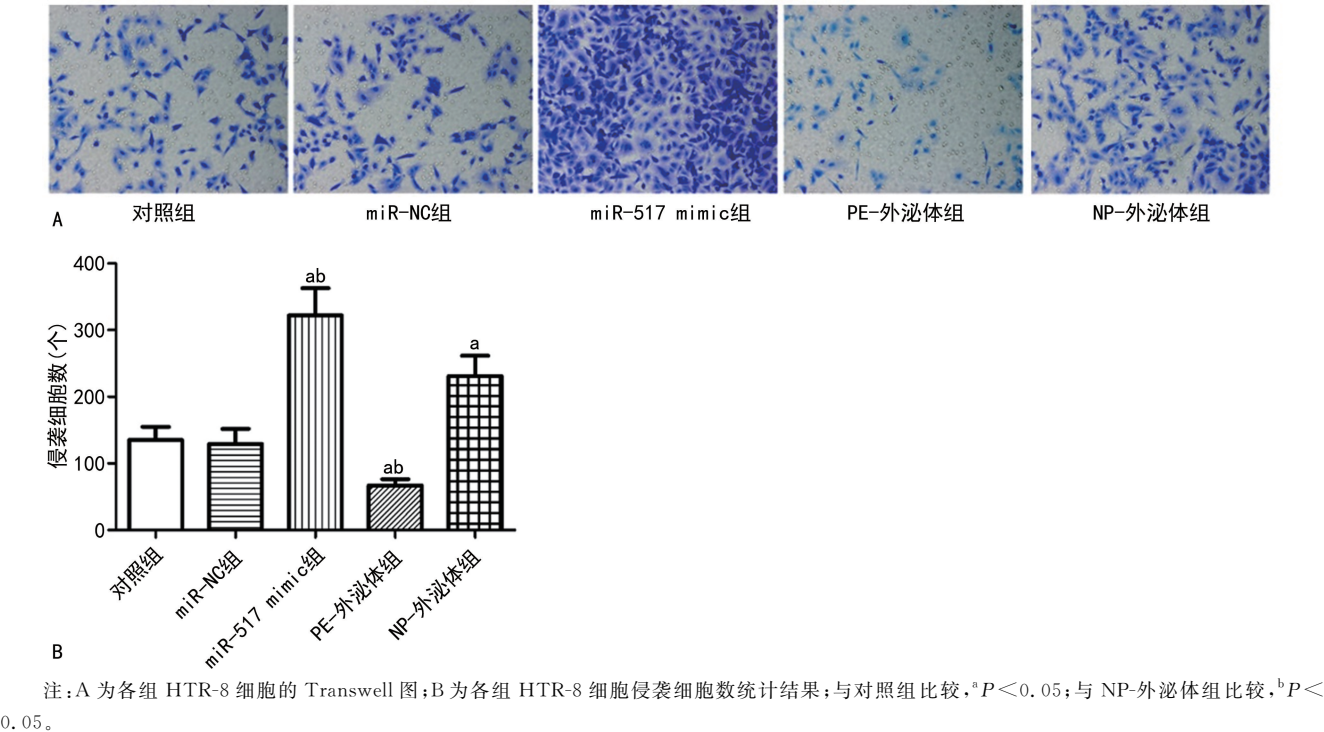
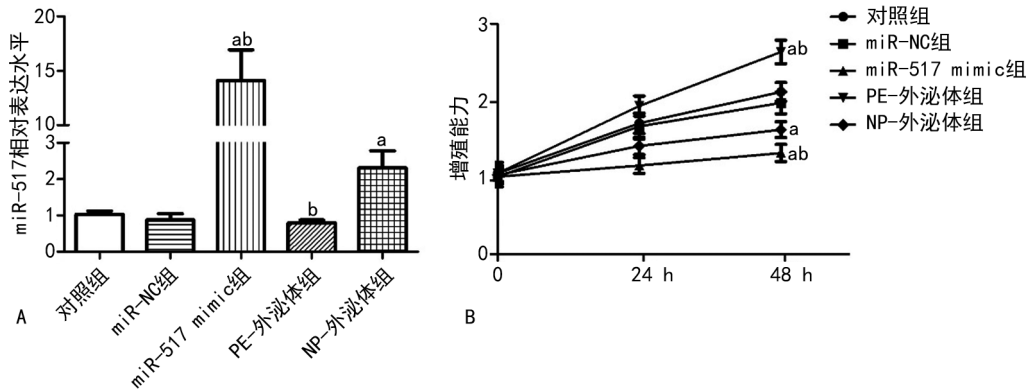


图 5 Transwell 检测各组 HTR-8 细胞的侵袭细胞数



注:A 为 qPCR 检测各组 Jurkat T 细胞中 miR-517 表达;B 为 CCK-8 法检测各组 Jurkat T 细胞的增殖能力;与对照组比较, ^a $P < 0.05$;与 NP-外泌体组比较, ^b $P < 0.05$ 。

图 6 qPCR 检测 miR-517 在外泌体中的表达和 CCK-8 法检测各组 Jurkat T 细胞的增殖能力

3 讨 论

PE 严重影响母婴健康,其不仅增加早产和低出生体重儿的风险,而且也是导致孕产妇和胎儿死亡的主要原因。同时,PE 还使孕产妇和胎儿在远期罹患心血管疾病和高血压的风险明显升高^[1]。miRNA 是一类非编码小 RNA 分子,可通过调控机体超过 90% 的基因表达而参与多种疾病的发生和进展。人类胎盘细胞表现出器官和物种特有的 miRNA 图谱,该图谱在整个妊娠过程中不断变化,对反映孕产妇和胎儿的健康状况具有重要意义^[3]。C19MC 簇是一种独特的胎盘特异性生物标志物,因其在妊娠期间的血浆外泌体表达较高而被检测到。如 C19MC 簇中的成员 miR-517,在其他组织中表达极少,但在孕妇血浆(从妊娠早期到足月妊娠)标本中的检出率为 100%,提示其表达变化的检测可能具有妊娠相关疾病的诊断潜力^[2,4]。本研究结果显示,miR-517 在 PE 患者胎盘组

织与胎盘外泌体中的表达明显降低,而过表达 miR-517 可促进滋养层细胞增殖与侵袭能力,但可抑制 Jurkat T 细胞的增殖。

既往研究表明,在妊娠早期(妊娠 12~14 周)的血浆标本中 miR-517 表达的降低对 PE 发展具有较高的预测准确性^[2]。同时,近期一项基于血浆外泌体中 C19MC 簇定量检测的回顾性研究发现,妊娠早期血浆外泌体中 miR-517 表达降低同样具有诊断早期 PE 的潜力,且其诊断准确性明显高于孕妇血浆标本^[4]。这提示,作为 C19MC 簇的代表性成员,miR-517 可能被胎盘细胞以外泌体的形式释放至周围环境中进而调控多种靶细胞的功能,参与影响 PE 的发生、发展。如前所述,尽管 PE 的发病机制尚不清楚,但主流观点认为:滋养层细胞侵袭能力受损,导致的子宫螺旋小动脉重铸不足,胎盘血流减少和胎盘功能受损诱导孕妇的炎症分子和细胞因子的大量释放是最终导致系

统性炎症反应和一系列孕妇临床病理表现的重要机制^[1]。本研究首先比较 miR-517 在 PE 患者与健康孕产妇的胎盘组织与胎盘外泌体中的表达差异,结果表明,miR-517 在 PE 患者中的表达明显降低,这与上述研究结果一致,均提示 miR-517 具有作为 PE 生物学标志物的应用潜力^[2-4]。然而,miR-517 是否调控 PE 发生中具有重要地位的滋养层细胞的侵袭功能尚不清楚。但在肿瘤领域,如在结直肠癌中,MA 等^[9]研究表明,在结直肠癌组织中的表达明显升高的 miR-517a 可能通过促进肿瘤细胞的迁移与侵袭能力而发挥促癌基因的功能。而在胶质瘤中,中药活性成分柴胡皂苷 D 可通过下调 miR-517a 的表达,促进胶质瘤细胞发生凋亡,并抑制细胞的迁移、侵袭与增殖能力,从而在体内发挥抑制肿瘤细胞与组织生长的作用^[10]。鉴于滋养层细胞与肿瘤细胞均具有活跃的增殖与侵袭能力^[11],本研究通过分离来源于健康孕产妇与 PE 患者血浆中的胎盘外泌体,在体外实验中探究 miR-517 表达差异的外泌体对滋养层细胞增殖与侵袭能力的影响。同时,在滋养层细胞中进行过表达 miR-517 进一步直接验证 miR-517 对滋养层细胞的影响。研究结果显示,与 PE 患者的胎盘外泌体比较,健康孕产妇的胎盘外泌体可明显促进滋养层细胞的增殖与侵袭能力,且过表达滋养层细胞中的 miR-517 则具有更为明显的促进作用,这提示胎盘外泌体中的 miR-517 表达对滋养层细胞的增殖与侵袭能力具有明显的促进作用。

众所周知,外泌体可被邻近或远处的受体细胞识别并内化,从而通过其内携带的多种生物活性成分诱导后者的功能发生一系列改变^[5]。由于孕妇免疫系统在妊娠期间需要进行特定地适应,以产生对同种异体胎儿的免疫耐受性,因此免疫细胞可能是来源于胎盘外泌体的重要靶目标,尤其是具有多种亚型与功能的 T 细胞^[12]。T 细胞的增殖、活化及其释放的白细胞介素(IL)-2、IL-17 和其他炎症细胞因子对妊娠具有潜在的危害,并可能参与 PE 和其他妊娠相关疾病的发生与进展^[13]。同时,探究胎盘外泌体转运的 miRNAs 对 PE 的早期诊断和治疗及理解免疫调控机制具有重要意义。因此,为进一步探究胎盘外泌体对 T 细胞功能的影响,本研究选取了 Jurkat T 细胞进行体外实验,结果表明与来源健康孕妇的胎盘外泌体比较,PE 患者的外泌体能明显促进 Jurkat T 细胞的增殖能力,但过表达细胞中的 miR-517 却抑制了 Jurkat T 细胞的增殖能力,这提示胎盘外泌体中的 miR-517 表达对 T 细胞功能可能发挥下调作用。而 miR-517 对滋养层细胞与 Jurkat T 细胞增殖方面的相反作用也证实了 miRNAs 功能的异质性和细胞特异性反应的假说。

综上所述,在 PE 患者胎盘组织与胎盘外泌体中表达下调的 miR-517 可能通过调节滋养层细胞的增

殖与侵袭和 T 细胞的功能参与疾病发生与进展。本研究进一步探讨了 miR-517 在 PE 中的作用及其可能的作用方式,为 miR-517 成为 PE 的早期临床诊断的生物学标志物提供了新的思路与依据。

参考文献

[1] JUNG E,ROMERO R,YEO L,et al. The etiology of pre-eclampsia[J]. Am J Obstet Gynecol, 2022, 226 (2S): S844-S866.

[2] HROMADNIKOVA I,KOTLABOVA K,ONDRACKOVA M,et al. Expression profile of C19MC microRNAs in placental tissue in pregnancy-related complications[J]. DNA Cell Biol, 2015, 34(6): 437-457.

[3] YANG S,LI H,GE Q,et al. Deregulated microRNA species in the plasma and placenta of patients with pre-eclampsia[J]. Mol Med Rep, 2015, 12(1): 527-534.

[4] HROMADNIKOVA I,DVORAKOVA L,KOTLABOVA K,et al. The prediction of gestational hypertension, pre-eclampsia and fetal growth restriction via the first trimester screening of plasma exosomal C19MC microRNAs[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(12): e2972.

[5] KALLURI R,LEBLEU V S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes[J]. Science, 2020, 367(6478): eaau6977.

[6] CONDRAT C E,VARLAS V N,DUICĂ F,et al. Pregnancy-related extracellular vesicles revisited[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(8): e3904.

[7] 谢幸,孔北华,段涛. 妇产科学[M]. 9 版. 北京:人民卫生出版社, 2019: 83-90.

[8] SHEN L,LI Y J,LI R T,et al. Placenta-associated serum exosomal miR-155 derived from patients with preeclampsia inhibits eNOS expression in human umbilical vein endothelial cells[J]. Int J Mol Med, 2018, 41 (3): 1731-1739.

[9] MA W Q,YU Q,JIANG J,et al. MiR-517a is an independent prognostic marker and contributes to cell migration and invasion in human colorectal cancer[J]. Oncol Lett, 2016, 11(4): 2583-2589.

[10] 徐敬轩,杨岩,张勘,等. 柴胡皂苷 D 通过下调 miR-517a 调节胶质瘤细胞体外和体内移植瘤生长[J]. 医学分子生物学杂志, 2020, 17(1): 33-39

[11] MOSER G,WINDSPERGER K,POLLHEIMER J,et al. Human trophoblast invasion: new and unexpected routes and functions[J]. Histochem Cell Biol, 2018, 150(4): 361-370.

[12] YEUNG H Y,DENDROU C A. Pregnancy immunogenetics and genomics: implications for pregnancy-related complications and autoimmune disease[J]. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2019, 20: 73-97.

[13] STEFANSKA K,ZIELINSKI M,JANKOWIAK M,et al. Cytokine imprint in preeclampsia[J]. Front Immunol, 2021, 12: e667841.

(收稿日期: 2022-09-12 修回日期: 2023-02-22)