

周俏苗,汪洪林,黄海燕,等. *miR-124-3p* 靶向调控 MAPK 14 对子痫前期大鼠胎盘滋养层细胞增殖及侵袭的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(6): 1-9.

Zhou QM, Wang HL, Huang HY, et al. *miR-124-3p* affects proliferation and migration in preeclampsia pathogenesis by targeting MAPK 14 [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(6): 1-9.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2020.06.001

miR-124-3p 靶向调控 MAPK 14 对子痫前期大鼠胎盘滋养层细胞增殖及侵袭的影响

周俏苗¹,汪洪林¹,黄海燕¹,许 晶¹,肖美芳¹,龚护民^{2*},吴栋才²

(1.海南省妇女儿童医学中心,海口 570000; 2.海南省人民医院妇产科,海口 570000)

【摘要】 目的 探讨 *miR-124-3p* 通过靶向调控 MAPK 14,从而对子痫前期大鼠胎盘滋养层细胞增殖与侵袭产生作用。**方法** 提取正常大鼠及模型大鼠胎盘滋养层组织及原代细胞,分组转染。MTT、流式细胞术、Transwell 检测检测细胞活力、凋亡、周期、迁移及侵袭能力,qRT-PCR 及 Western blot 检测因子的表达水平。验证 *miR-124-3p* 和 MAPK 14 的靶向关系。**结果** 过表达 *miR-124-3p* 后,细胞增殖、侵袭能力降低,细胞阻滞在 G1/G0 期,细胞凋亡增加;抑制 *miR-124-3p* 表达后,结果相反。双荧光素酶报告实验显示 *miR-124-3p* 与 MAPK 14 存在靶向关系。抑制 MAPK 14 表达后,与过表达 *miR-124-3p* 结果一致,细胞活力及侵袭能力降低,凋亡增加;过表达 MAPK 14 实验组与抑制 *miR-124-3p* 表达结果一致。**结论** *miR-124-3p* 可靶向负调控 MAPK 14,对子痫前期大鼠胎盘滋养层细胞的增殖与侵袭产生影响。

【关键词】 *miR-124-3p*;MAPK 14;子痫前期;滋养层细胞;增殖;侵袭

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 06-0001-09

miR-124-3p affects proliferation and migration in preeclampsia pathogenesis by targeting MAPK 14

ZHOU Qiaomiao¹, WANG Honglin¹, HUANG Haiyan¹, XU Jing¹, XIAO Meifang¹, GONG Humin^{2*}, WU Dongcai²

(1. Hainan Women and Children Medical Center, Haikou 570000, China.

2. Department of Obstetrics and Gynecology, Hainan Provincial People's Hospital, Haikou 570000)

【Abstract】 Objective To explore the effects of *miR-124-3p* on the proliferation and invasion of placental trophoblasts during preeclampsia by targeting MAPK 14. **Methods** Preeclampsia rat models were established, followed by extraction of placental trophoblast tissue and primary cells from normal rats and model rats. Primary cells were manipulated by transfections. The MTT assay was used to determine cell viability; flow cytometry was used to detect apoptosis and cell cycle arrest; Transwell was used to determine the cell migration and invasion ability, and qRT-PCR and western blotting were used to determine the expression of *miR-124-3p* and MAPK 14 as well as the expression level of migration-related genes. Verify the binding relationship between *miR-124-3p* and MAPK 14. **Results** Compared with the control cells, *miR-124-3p* overexpression reduced cell proliferation and invasion. Cells arrested at the G1/G0 phase, and the apoptosis rate increased. Suppressing *miR-124-3p* expression produced opposite result. The dual luciferase reporter experiment showed

[基金项目] 国家自然科学基金(81760275)。

[作者简介] 周俏苗(1981—)女,硕士研究生,研究方向:妇产科。E-mail: doctorxiao003@163.com

[通信作者] 龚护民(1972—)女,主任医师。E-mail: 3077075260@qq.com

that MAPK 14 was the target of *miR-124-3p*. Suppressing the expression of MAPK 14 produced result that were consistent with the *miR-124-3p* overexpression effects, i.e., the cell viability and invasion ability decreased, and the apoptosis rate increased. In contrast, MAPK 14 overexpression in the experimental group was consistent with the effects of inhibition of *miR-124-3p* expression. **Conclusions** *miR-124-3p* negatively regulates MAPK 14 and affects the proliferation and invasion of placental trophoblasts in preeclampsia rats.

[Keywords] *miR-124-3p*; MAPK 14; preeclampsia; trophoblasts; proliferation; invasion

子痫前期是妊娠期特有的疾病,据报道,子痫前期的全球发病率为 2%~8%,约占全世界所有孕产妇死亡人数的 14%,孕产妇和围产儿死亡的主要原因之一^[1-2]。子痫前期一般发生于孕 20 周后,起源于胎盘,其特征在于高血压伴随母体或胎儿肾、肝、脑、心等多器官系统损害^[3-4]。

目前关于子痫前期的主要发病机制并不清楚,早期多数学者认为早发型重度子痫前期的发病根源为胎盘^[5]。胎盘在进化中形成了很强的侵袭能力,胎盘最重要的细胞是滋养层细胞^[6]。滋养细胞是胎盘绒毛的特化细胞,在调节胚胎发育中起着至关重要的作用,特别在胎盘植入的孕妇中滋养细胞具有高度增殖和侵袭性^[7]。微小 RNA(miRNA)是近年来的研究热点,到目前为止人类中大约有 2000 多种成熟 miRNA 被发现^[8]。最新研究发现,miRNA 在人类胎盘组织中的表达可影响滋养细胞的侵袭和增殖等生物学功能,从而影响胎盘的正常发育^[9]。比如,Zhu 等^[10]研究发现,低表达的 *miR-18a* 可能通过对其靶基因的调节而参子痫前期过程。陈静等^[11]人发现 *miR-155* 可以通过下调 *CYR61* 而参与子痫前期的发病过程。*miR-124* 家族最早是 Mishima 等^[12]于 2007 年从小鼠大脑中提取出来,主要包括 *miR-124-1*、*miR-124-2*、*miR-124-3* 三个亚型。近年更是发现,*miR-124* 在肿瘤的形成过程中发挥重要的作用,可通过靶向基因调控细胞的增殖和侵袭^[13]。而在本研究中,我们将探讨 *miR-124-3p* 与子痫前期的调控机制。子痫前期的发病机制不是任何单个分子的作用,miRNA 通过靶向基因参与滋养细胞侵袭障碍、促进血管内皮损伤等病理过程,促进子痫前期的发生与发展^[14]。*p38* 丝裂原活化蛋白激酶(*p38MAPK*)信号通路可以影响细胞的增殖、分化与凋亡等系列细胞过程,根据目前研究表明,*p38MAPK* 蛋白家族包括 *p38α*(即 MAPK 14)、*p38β*、*p38γ* 和 *p38δ* 4 种异构体亚型^[15]。最新研究发现,*p38MAPK* 参与子痫前期的发病^[16]。在本研究中,我们将进一步探讨 *miR-124-3p* 与 MAPK

14 对子痫前期胎盘滋养层细胞的增殖与侵袭产生影响,希望为子痫前期的治疗提供新思路。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

成年的 SPF 级 SD 大鼠(20 只雌性、10 只雄性)购买于湖南省斯莱克景达实验动物公司[SCXK(湘)2016-0004],月龄 2~3 个月,体重 200~220 g。无菌手术在海南省人民医院实验设施进行[SYXK(琼)2017-0011]。实验获我院伦理委员会审批[2017]7 号文件(201707),并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

1.1.2 细胞

HEK293T 细胞购自中科院上海细胞库。

1.2 主要试剂与仪器

lipofectamin 2000 试剂盒购自美国 Invitrogen 公司;*miR-124-3p* 的模拟物及对照均购买于 Invitrogen;MAPK 14-wt 质粒、MAPK 14-mut 质粒由广州锐博生物科技公司合成;Dual-Luciferase Reporter Assay System 购自美国 Promega 公司;实验所用引物均由上海吉玛制药技术有限公司提供;BCA 购自美国 Thermo Fisher 公司;本研究所用抗体均购自英国 Abcam 公司;细胞凋亡试剂盒购自美国 R&D Systems 公司;Matrigel 胶购买于美国 BD 公司。

倒置显微镜、CO₂ 培养箱购自 OLYMPUS 奥林巴斯公司。

1.3 实验方法

1.3.1 动物模型建立及滋养层细胞的提取

置于恒温恒湿环境中分笼饲养,自由采食饮水,适应一周。雌性与雄性按 2:1 合笼,第 2 天早上进行分泌物涂片镜检,发现精子则定为妊娠期第 1 天。将孕鼠随机分为正常组与模型组,妊娠第 10 天开始,模型组皮下注射 L-NAME 100 mg/(kg·d),正常组注射相同浓度的生理盐水,至第 18 天,检测平均尾动脉收缩压达到(110.12±5.73) mm/Hg,尿蛋

白达到(6.33±0.42)mg/24 h,则视为造模成功。

剖宫产后处死母鼠,取出胎盘,分离出绒毛膜滋养层组织。剪成厚度在3 mm左右的薄片,37℃水浴下用0.25%的胰酶消化3次,每次10 min。3000 r/min离心5 min去沉淀,得到细胞悬液,PBS洗涤2次,用含10% FBS的DMEM/F12重悬细胞,接种于培养板中,在37℃、5% CO₂的培养箱中培养。倒置显微镜下观察可见上皮样细胞形态,呈板层状生长。鉴定为无杂质滋养层细胞后,在37℃、5% CO₂培养箱中进一步培养。细胞传代后,用第三代细胞滋养细胞转染。

1.3.2 细胞转染

本实验分两组进行转染,第一组:Control组(正常对照组)、NC组(子痫前期大鼠滋养层细胞转染阴性对照组)、*miR*-124-3*p* mimic组(子痫前期细胞转染*miR*-124-3*p*过表达组)、*miR*-26*b*-3*p* inhibitor组(子痫前期大鼠滋养层细胞转染*miR*-26*b*-3*p*抑制物组)。第二组:NC组(子痫前期大鼠滋养层细胞转染MAPK14转染阴性对照)、*si*-MAPK14组(子痫前期大鼠滋养层细胞转染MAPK14干扰组)、*oe*-MAPK14组(子痫前期细胞转染MAPK14过表达)。

本实验使用lipofectamin 2000 (Invitrogen)试剂盒进行转染,转染序列、目的质粒均于上海吉玛生物公司合成并购买。按照转染试剂说明书操作如下:用250 μL无血清Opti-MEM (Gibco,美国)培养基分别稀释5 μg目的质粒和5 μL Lipofectamine 2000,轻弹混匀。室温静置5 min,两者混合均匀,放置20 min后将100 μL混合液加到培养孔中,来回轻柔摇晃细胞培养板,置于37℃、5% CO₂培养箱中培养继续培养6~8 h后换成完全培养基培养24 h后再用于后续实验。

1.3.3 双荧光素酶报告实验

生信网站Target Scan分析确认*miR*-124-3*p*与MAPK14存在结合位点,接着用双荧光素酶报告实验验证*miR*-124-3*p*与MAPK14的靶向调节作用。HEK293T细胞接种至24孔板,培养24 h,用脂质体转染法将MAPK14-wt质粒和MAPK14-mut质粒分别和*miR*-124-3*p* mimic与*miR*-NC转染至HEK293T细胞内,转染48 h后收集细胞,根据Dual-Luciferase Reporter Assay System说明书指示(E1910,Promega,美国)检测萤火虫荧光素酶活性,以萤火虫荧光素酶活性/海肾荧光素酶活性作为相

对值进行统计分析。

1.3.4 qRT-PCR 检测相关基因的表达

首先采用经典的TRIzol (Invitrogen,美国)提取总RNA,紫外分光光度计测定OD₂₆₀/OD₂₈₀以及总RNA浓度。Primer Script TMRT reagent Kit将1 μg总RNA反转录反应获得cDNA。采用实时荧光定量PCR检测相关基因的表达。反应条件为:95℃进行2 min初始变性,随后在95℃变性15 s,60℃退火30 s,最后68℃延伸1 min,扩增35个循环。基因的相对表达量根据2^{-ΔΔCt}公式计算,GAPDH作为MAPK14的内参基因,U6作为*miR*-124-3*p*的内源性对照。反应中所用的引物如表1所示。

表1 qRT-PCR 引物序列表
Table 1 Primer sequence of qRT-PCR

基因 Gene	引物序列 Primer sequence
MAPK 14	上游 F 5'-TTACCGATGACCACGTTTCAGTTTC-3'
	下游 R 5'-AGCGAGGTTGCTGGGCTTTA-3'
<i>miR</i> -124-3 <i>p</i>	上游 F 5'-TGCGGTAAGGCACGCGGTGAATGCC-3'
	下游 R 5'-CCAGTGCAGGTCGAGGT-3'
GAPDH	上游 F 5'-TGCTGAAGCTCGGAGTGAAC-3'
	下游 R 5'-GGAAGATGCTGATGGCCTTTC-3'
U6	上游 F 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3'
	下游 R 5'-AACGCTTCACGAATTGCGT-3'

1.3.5 Western blot 检测相关蛋白的表达

PBS洗涤2次,加入细胞裂解液,冰上裂解10 min。将裂解后的蛋白吸入EP管内,BCA测蛋白浓度(Thermo Fisher,美国)。5×Loading Buffer混合煮沸5 min后进行SDS-PAGE凝胶电泳。电泳完成后将蛋白转移至PVDF膜上,含5% BSA的TBST室温摇床封闭1 h,TBST洗涤一遍后加入一抗(购买于Abcam公司)包括:MMP-2兔多克隆抗体(1:2000,ab92536),MMP-9兔单克隆抗体(1:10000,ab76003),GAPDH兔单克隆抗体(1:10000,ab181602),4℃振荡过夜,TBST摇床洗涤3遍,每次15 min。山羊抗兔二抗(ab205718,Abcam)孵育1 h,TBST摇床洗涤3次,每次15 min。将膜上液体沥干后轻轻放于保鲜膜上,加入ECL发光液,反应1 min。保鲜膜将PVDF膜封住,X光胶片曝光。Image J进行灰度扫描,GAPDH为内参进行,用目标条带与GAPDH条带的灰度值比值来表示相对蛋白表达量。

1.3.6 MTT 检测细胞增殖

转染24 h后,取对数生长期细胞接种于96孔

板(每毫升 1×10^5 个细胞),每组6个复孔,培养24、48、72 h后,每孔加入10 μ L MTT 溶液(5 mg/mL, 购买于上海碧云天生物公司),再于37℃、5% CO₂ 培养箱中孵育4 h,酶标仪测定570 nm处吸光度。

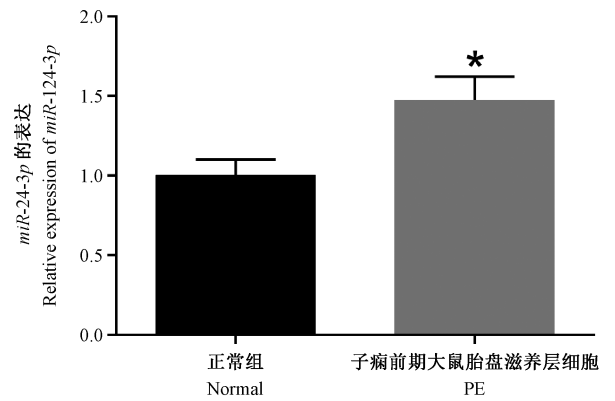
1.3.7 流式检测细胞凋亡与周期

各组细胞转染48 h后,用0.25%的胰酶消化收集细胞,PBS洗涤2次。按细胞凋亡试剂盒操作,细胞记数,调整细胞浓度为 1×10^5 /mL,用80 μ L的平衡试剂重悬,接着加入10 μ L的Annexin V-FITC(10 μ g/mL)及10 μ L的PI(5 μ g/mL),混匀后室温孵育15 min,再加入400 μ L的缓冲液,于流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

同上收集细胞,PBS洗涤2次,3000 r/min离心5 min。取1 mL细胞悬液(细胞浓度约为 5×10^5 /mL),离心后用预冷是75%乙醇固定2 h。PBS洗涤1次,细胞筛网过滤一次去细胞团,离心后按说明书(BD,美国)指示,再加入500 μ L的RNase/PI染色液混匀,室温避光孵育15 min。上机前4℃保存,于流式细胞仪检测细胞周期。

1.3.8 Transwell 检测细胞侵袭

孔径为8 μ m的Transwell板购买于美国康宁。各组细胞转染后,胰酶常规消化,1000 r/min离心5 min,PBS洗涤两遍。将100 μ L含有 2×10^4 个细胞的悬液接种于预涂有基质凝胶的上室(侵袭实验前先将100 μ L稀释好的Matrigel胶加入上室中,室温过夜处理)。下室加入500 μ L完全培养基后置于



注:与Normal组对比,* $P < 0.05$ 。

图1 *miR-124-3p* 在正常大鼠与子痫前期大鼠胎盘滋养层细胞中的表达

Note. Compared with Normal group, * $P < 0.05$.

Figure 1 Expression of *miR-124-3p* in placenta of normal and preeclampsia rats

培养箱内24 h。取出Transwell上室,用棉签棒擦去滤膜上层胶以及细胞,用70%的甲醛快速固定10 min,0.02%结晶紫染色5 min,蒸馏水洗涤2次。随机取5个视野,显微观察染色细胞数拍照并计算平均值。

1.4 统计学方法

所有数据均用SPSS 21.0统计软件(IBM公司,美国)处理。计量资料以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。两组间比较用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析(ANOVA),以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

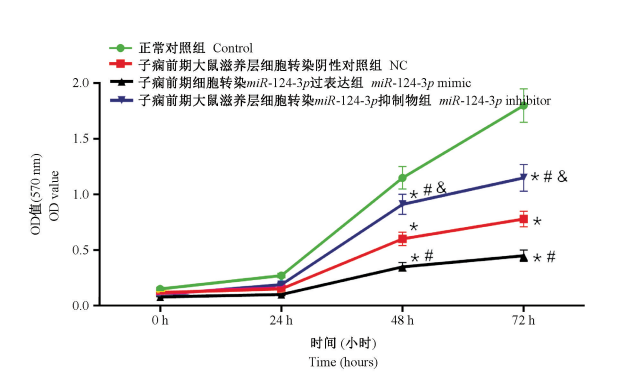
2 结果

2.1 *miR-124-3p* 在子痫前期大鼠胎盘滋养层细胞表达

为研究*miR-124-3p*在子痫前期大鼠胎盘滋养层细胞表达,qRT-PCR检测*miR-124-3p*在正常大鼠胎盘滋养层细胞及子痫前期大鼠胎盘滋养层细胞的表达(图1),结果显示:与正常大鼠胎盘滋养层细胞相比,子痫前期大鼠胎盘滋养层细胞中*miR-124-3p*表达明显增加($P < 0.05$)。

2.2 *miR-124-3p* 可影响子痫前期大鼠胎盘滋养层细胞增殖

在子痫前期大鼠胎盘滋养层细胞中转染*miR-124-3p* mimic及*miR-124-3p* inhibitor,MTT检测各



注:与Control组相比较,* $P < 0.05$;与NC组对比,# $P < 0.05$;与*miR-124-3p* mimic相比,& $P < 0.05$ 。

图2 过表达或抑制*miR-124-3p*后子痫前期大鼠胎盘滋养层细胞的增殖情况

Note. Compared with Control group, * $P < 0.05$. Compared with NC group, # $P < 0.05$. Compared with *miR-124-3p* mimic, & $P < 0.05$.

Figure 2 Proliferation of placental trophoblast cells in preeclampsia rats after overexpression or inhibition of *miR-124-3p*

组细胞增殖情况(图 2),结果发现,与正常大鼠滋养层细胞 Control 组相比,其余各组子痫前期大鼠滋养层细胞增殖能力明显降低;同 NC 组相比,*miR-124-3p* mimic 组细胞增殖能力明显降低,*miR-124-3p* inhibitor 组增殖能力明显增强(均 $P < 0.05$)。

2.3 *miR-124-3p* 可影响子痫前期大鼠胎盘滋养层细胞周期与凋亡

流式检测细胞周期(图 3A、3B),结果发现,与 Control 组相比,其余各组细胞 G1/G0 期细胞的比例明显上升;与 NC 组相比,*miR-124-3p* mimic 组 G1/G0 期细胞的比例明显上升($P < 0.05$);*miR-26b-3p* inhibitor 组 G1/G0 期细胞的比例明显下降($P < 0.05$)。

流式细胞术检测细胞凋亡结果显示(图 3C、3D),结果发现,与 Control 组相比,其余各组细胞凋亡明显增加;同 NC 组相比,*miR-124-3p* mimic 组细胞凋亡明显增加,*miR-124-3p* inhibitor 组凋亡明显降低(均 $P < 0.05$)。

2.4 *miR-124-3p* 对子痫前期大鼠胎盘滋养层细胞侵袭及相关因子的影响

Transwell 分析检测转染后细胞的侵袭能力(图 4A、4B)。结果显示:与 Control 相比,其余各组细胞侵袭能力均显著降低;与 NC 组相比,*miR-124-3p* mimic 组细胞侵袭能力显著降低,*miR-124-3p* inhibitor 组细胞侵袭能力显著增加($P < 0.05$)。

Western blot 检测侵袭相关因子 MMP-2 及 MMP-9 的蛋白表达(图 4C),结果发现,与 Transwell 侵袭能力结果一致。与 Control 相比,其余各组 MMP-2 及 MMP-9 表达均显著降低;与 NC 组相比,*miR-124-3p* mimic 组 MMP-2 及 MMP-9 表达显著下调,*miR-124-3p* inhibitor 组 MMP-2 及 MMP-9 表达显著上调($P < 0.05$)。

2.5 MAPK 14 在子痫前期大鼠胎盘滋养层细胞中低表达,且 *miR-124-3p* 靶向负调控 MAPK 14

qRT-PCR 检测 MAPK 14 在正常大鼠胎盘滋养层细胞及子痫前期大鼠胎盘滋养层细胞的表达(图 5A),结果显示:与正常大鼠胎盘组织相比,子痫前期大鼠胎盘滋养层细胞中 MAPK 14 表达明显下调($P < 0.05$)。

网站分析发现 *miR-124-3p* 与 MAPK 14 存在结合位点(图 5B)。双荧光素酶报告检测发现(图 5C),与 NC 组相比,*miR-124-3p* 与野生型 MAPK 14-

wt 共转染组中荧光素酶活性强度明显下降($P < 0.05$),与突变型 MAPK 14-mut 共转染组的荧光素酶活性强度无明显差异。

2.6 干扰/过表达 MAPK 14 对子痫前期大鼠胎盘滋养层细胞增殖与迁移的影响

在子痫前期大鼠胎盘滋养层细胞中转染 si-MAPK 14 及过表达 MAPK 14,MTT 检测各组细胞增殖情况(图 6A),结果发现,同 NC 组相比,si-MAPK 14 组细胞增殖能力明显降低,oe-MAPK 14 组增殖能力明显增强(均 $P < 0.05$)。

流式检测细胞凋亡(图 6B),结果发现,同 NC 组相比,si-MAPK 14 组细胞凋亡明显率上升,oe-MAPK 14 组细胞凋亡率明显下降(均 $P < 0.05$)。

Transwell 检测细胞侵袭能力(图 6C),结果发现同 NC 组相比,si-MAPK 14 组细胞侵袭能力明显率下降,oe-MAPK 14 组细胞侵袭能力明显上升(均 $P < 0.05$)。

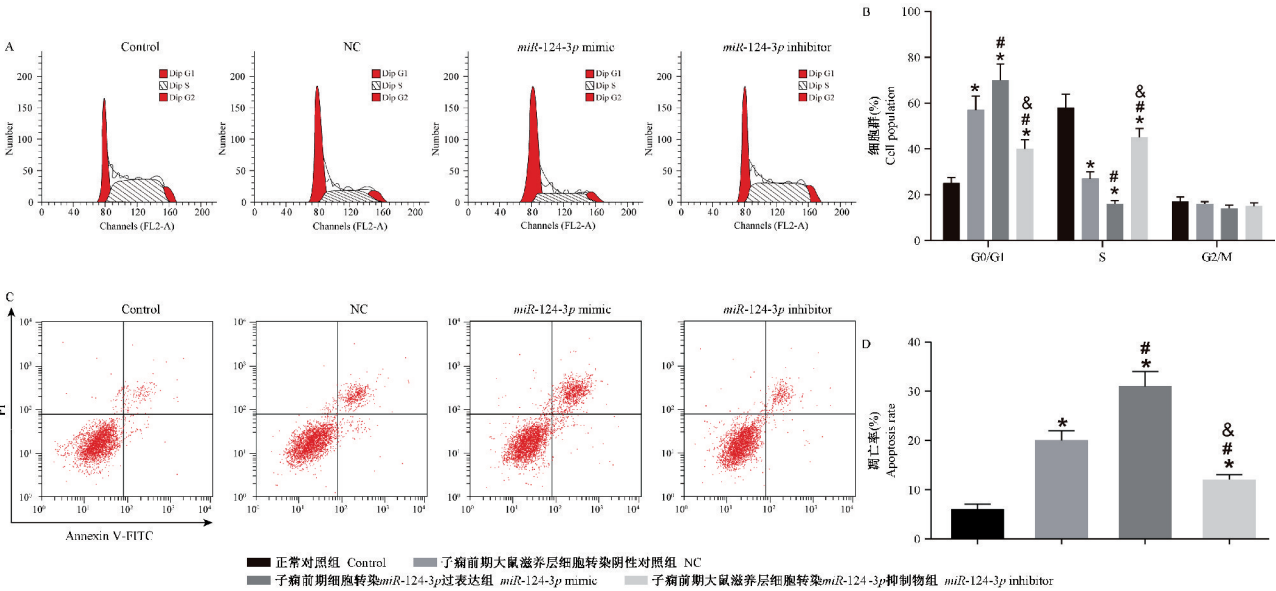
综上所述可知,干扰/过表达 MAPK 14 可模拟 *miR-124-3p* mimic 或 *miR-26b-3p* inhibitor 的实验结果。

3 讨论

胎盘是胎儿和母体环境重要的交换界面,胎盘最重要的细胞是滋养层细胞。但其发育和侵袭过程受到时间和空间的严格精细调控,对其调节失控会导致各种疾病,包括子痫前期^[17]。

近年来,miRNA 在子痫前期发病过程中发挥的作用成为研究热点,越来越多的研究表明,miRNA 参与调控子痫前期的疾病进程^[18]。通过 Meta 分析,有学者发现子痫前期患者胎盘组织中差异性表达的 miRNA 至少有 20 个,其中 11 个呈现低表达,9 个高表达^[9]。刘文娟等^[19]进一步发现,子痫前期组胎盘组织中 *miR-27b* 的表达水平高于对照组,且重度子痫前期组胎盘组织的 *miR-27b* 的表达水平高于轻度子痫前期组。这与本研究结果类似,本研究也发现,与正常大鼠胎盘组织相比,子痫前期大鼠胎盘组织中 *miR-124-3p* 表达明显增加。

miRNA 通过结合靶基因 mRNA 的 3'UTR 直接调控蛋白质的翻译表达,调控细胞的增殖、侵袭、凋亡等生物学过程^[20]。在本实验中,网站分析发现 *miR-124-3p* 与 MAPK 14 存在结合位点,且 MAPK 14 在子痫前期大鼠胎盘滋养层细胞中低表达,*miR-*

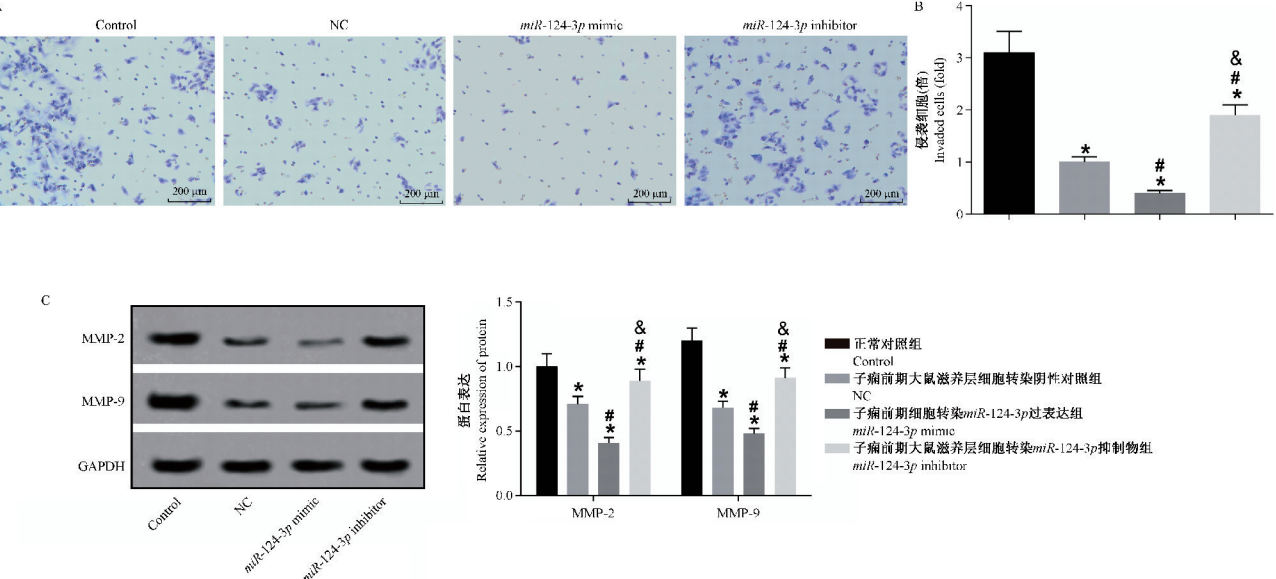


注:A、B;细胞周期流式检测结果及分析;C、D;细胞凋亡流式检测图及结果分析;与 Control 组相比较, * $P < 0.05$; 与 NC 组对比, # $P < 0.05$; 与 *miR*-124-3p mimic 相比, & $P < 0.05$ 。

图 3 流式检测细胞周期及细胞凋亡

Note. A, B, Cell cycle flow cytometry results and analysis. C, D, Cell apoptosis flow cytometry and results analysis. Compared with Control group, * $P < 0.05$. Compared with NC group, # $P < 0.05$. Compared with *miR*-124-3p mimic, & $P < 0.05$.

Figure 3 Flow cytometry for cell cycle and apoptosis

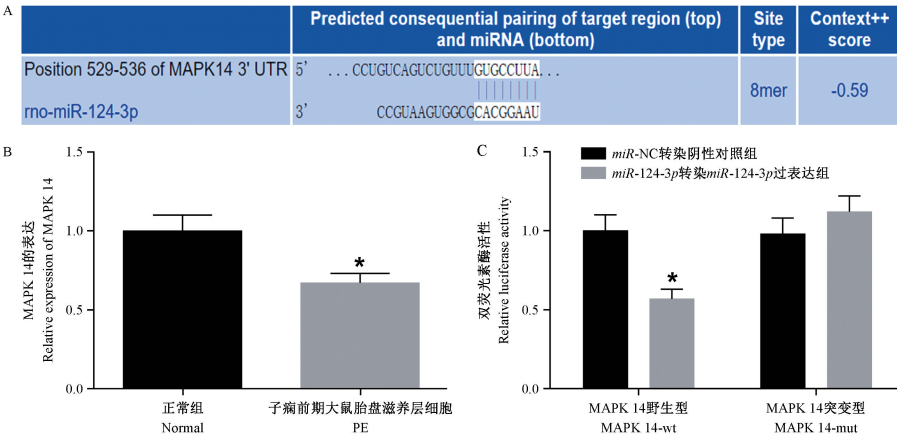


注:A、B;Transwell 分析检测转染后滋养层细胞的侵袭能力显微观察及结果分析;C:Western blot 检测侵袭相关因子 MMP-2 及 MMP-9 的蛋白表达;与 Control 组相比较, * $P < 0.05$; 与 NC 组对比, # $P < 0.05$; 与 *miR*-124-3p mimic 相比, & $P < 0.05$ 。

图 4 子痫前期大鼠胎盘滋养层细胞侵袭情况及相关因子的表达

Note. A, B, Transwell analysis was used to detect the invasiveness of trophoblast cells after transfection. C, The expression of MMP-2 and MMP-9 were detected by Western blot. Compared with Control group, * $P < 0.05$. Compared with NC group, # $P < 0.05$. Compared with *miR*-124-3p mimic, & $P < 0.05$.

Figure 4 Invasion of placental trophoblasts and expression of related factors in preeclampsia rats

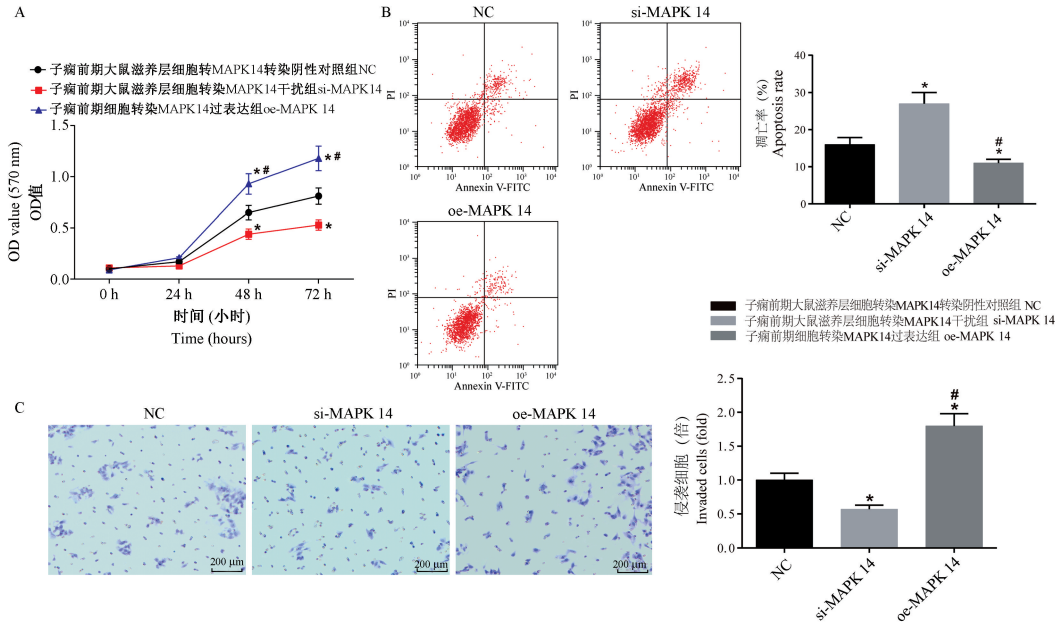


注:A:MAPK 14 在子痫前期大鼠胎盘滋养层细胞中低表达,与 Normal 组对比, * $P < 0.05$;B: 生信网站预测分析 *miR-124-3p* 与 MAPK 14 之间的结合位点;C: 双荧光素酶报告实验验证 *miR-124-3p* 与 MAPK 14 之间的靶向关系,与 *miR-NC* 组对比, * $P < 0.05$ 。

图 5 *miR-124-3p* 与 MAPK 14 具有靶向结合关系

Note. A, MAPK 14 was low expressed in placental trophoblast cells of preeclampsia rats. Compared with Normal group, * $P < 0.05$. B, The binding sites between *miR-124-3p* and MAPK 14 were predicted and analyzed by the website. C, The target relationship between *miR-124-3p* and MAPK 14 was verified by the double Luciferase Report experiment. Compared with *miR-NC* group, * $P < 0.05$.

Figure 5 *miR-124-3p* has a targeted binding relationship with MAPK 14



注:A:MTT 检测过表达/干扰 MAPK 14 后各组细胞增殖情况;B: 流式检测各组细胞凋亡情况及统计分析图;C: Transwell 检测侵袭能力显微拍照及结果分析;与 NC 组相比较, * $P < 0.05$; 与 si-MAPK 14 组对比, # $P < 0.05$ 。

图 6 干扰/过表达 MAPK 14 对子痫前期大鼠胎盘滋养层细胞增殖与迁移的影响

Note. A, MTT was used to detect the proliferation of cells in each group after overexpression/interference of MAPK 14. B, Flow cytometry was used to detect the apoptosis of cells in each group and the statistical analysis chart. C, Transwell was used to detect the invasiveness in microphotography and result analysis. Compared with NC group, * $P < 0.05$. Compared with si-MAPK 14 group, # $P < 0.05$.

Figure 6 Effect of interference/overexpression of MAPK 14 on proliferation and migration of placental trophoblasts in preeclampsia rats

124-3p 靶向负调控 MAPK 14。过往研究证实, *miR*-124-3p 是脑组织中表达最为丰富的 miRNA, 其表达失调与肿瘤发生有关^[21]。由于滋养层细胞增殖、侵袭等生物学功能与肿瘤细胞有极大的相似性, 因此推测 *miR*-124-3p 可通过靶向基因影响滋养层细胞的增殖、侵袭等功能。

滋养层细胞可分化成具有类似肿瘤细胞的高侵袭能力的绒毛外滋养层细胞, 其具有的侵袭性可侵入子宫内膜将胎盘锚定在子宫, 协助胎盘重铸血管, 为胎儿发育提供必需的营养物质和氧气, 保证胎儿的正常发育和生长^[22]。而子痫前期与 miRNA 的作用机制在于通过靶基因参与妊娠滋养细胞的增殖和侵袭, 具体来说参与滋养细胞侵袭障碍以及调节血管生成因子, 促进血管内皮损伤^[23]。比如之前研究发现, *miR*-210 通过抑制其靶分子-受体酪氨酸激酶配体 (EFNA3) 和 HOMEBOX-19 的表达, 降低滋养细胞侵袭性, 抑制滋养细胞的迁移和浸润^[24]。过往众多研究已证实了 p38MAPK 在子痫前期的作用^[25-26], 氧化应激产物, 激活 p38MAPK 的磷酸化, 还可以通过调节钙离子泵, 使血管内皮细胞内钙离子浓度超负荷, 导致血管平衡紊乱, 引发内皮细胞损伤和功能障碍, 影响胎盘浅着床, 导致重度子痫前期的发生^[27-28]。在本次研究中, 我们进一步发现, *miR*-124-3p 可靶向负调控 MAPK 14, 对子痫前期大鼠胎盘滋养层细胞的增殖与侵袭产生影响。

综上所述, *miR*-124-3p 在子痫前期大鼠胎盘组织中高表达, MAPK 14 低表达。 *miR*-124-3p 可靶向负调控 MAPK 14, 对子痫前期大鼠胎盘滋养层细胞的增殖与侵袭产生影响。不过子痫前期的病因复杂, 可能与血管、遗传、胎盘缺血缺氧、免疫或环境等多种因素参有关, 本文仅从胎盘角度揭示子痫前期的发生发展, 未来希望可从其他角度进行探索, 进一步为子痫前期的预防与治疗提供思路。

参考文献:

- [1] Cornelius DC, Cottrell J, Amaral LM, et al. Inflammatory mediators: a causal link to hypertension during preeclampsia [J]. Br J Pharmacol, 2019, 176(12): 1914-1921.
- [2] Stevens W, Shih T, Incerti D, et al. Short-term costs of preeclampsia to the United States health care system [J]. Am J Obstet Gynecol, 2017, 217(3): 237-248.
- [3] Soma-Pillay P, Louw MC, Adeyemo AO, et al. Cardiac diastolic function after recovery from pre-eclampsia [J]. Cardiovasc J Afr, 2018, 29(1): 26-31.
- [4] Rolnik DL, Wright D, Poon LC. Aspirin versus placebo in pregnancies at high risk for preterm preeclampsia [J]. N Engl J Med, 2017, 377(7): 613-622.
- [5] Tong S, Mol BW, Walker SP. Preventing preeclampsia with aspirin: does dose or timing matter? [J]. Am J Obstet Gynecol, 2017, 216(2): 95-97.
- [6] Wang YF, Yang HX. Clinical analysis of hypothyroidism during pregnancy [J]. Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi, 2007, 42(3): 157-160.
- [7] Jauniaux E, Burton GJ. The role of oxidative stress in placental-related diseases of pregnancy [J]. J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris), 2016, 45(8): 775-785.
- [8] Mingardi J, Musazzi L, De Petro G, et al. miRNA editing: new insights into the fast control of gene expression in health and disease [J]. Mol Neurobiol, 2018, 55(10): 7717-7727.
- [9] Morales-Prieto DM, Chaiwangyen W, Ospina-Prieto S, et al. MicroRNA expression profiles of trophoblastic cells [J]. Placenta, 2012, 33(9): 725-734.
- [10] Zhu XM, Han T, Sargent IL, et al. Differential expression profile of microRNAs in human placentas from preeclamptic pregnancies vs normal pregnancies [J]. Am J Obstet Gynecol, 2009, 200(6): 661.
- [11] 陈静, 秦智慧, 何方舟. MicroRNA-155 在子痫前期发病机制中的研究进展 [J]. 中国优生与遗传杂志, 2015, 23(9): 14-16.
- [12] Mishima T, Mizuguchi Y, Kawahigashi Y, et al. RT-PCR-based analysis of microRNA (miR-1 and -124) expression in mouse CNS [J]. Brain Res, 2007, 1131(1): 37-43.
- [13] Meng Q, Zhang W, Xu X, et al. The effects of TRAF6 on proliferation, apoptosis and invasion in osteosarcoma are regulated by miR-124 [J]. Int J Mol Med, 2018, 41(5): 2968-2976.
- [14] 邹娜, 刘远远, 裘娟, 等. 凋亡细胞及过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 在子痫前期患者胎盘中的表达及临床意义 [J]. 大连医科大学学报, 2016, 38(5): 432-435.
- [15] Wang Y, Huang G, Wang Z, et al. Elongation factor-2 kinase acts downstream of p38 MAPK to regulate proliferation, apoptosis and autophagy in human lung fibroblasts [J]. Exp Cell Res, 2018, 363(2): 291-298.
- [16] Li F, Yang Z, Zhang A, et al. The changes of LCHAD in preeclampsia with different clinical features and the correlation with NADPH P47-phox, p38MAPK- α , COX-2 and serum FFA and TG [J]. Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi, 2015, 50(2): 92-100.
- [17] Labarrere CA, Dicarlo HL, Bammerlin E, et al. Failure of

- physiologic transformation of spiral arteries, endothelial and trophoblast cell activation, and acute atherosclerosis in the basal plate of the? placenta [J]. Am J Obstet Gynecol, 2017, 216 (3):287.
- [18] Betoni JS, Derr K, Pahl MC, et al. MicroRNA analysis in placentas from patients with preeclampsia; comparison of new and published results [J]. Hypertens Pregnancy, 2013, 32(4): 321-339.
- [19] 刘文娟, 彭静, 柳杨. miRNA-27b 在子痫前期胎盘中的表达及丹参对其表达的影响[J]. 蚌埠医学院学报, 2018, 43 (5): 577-580.
- [20] Rouleau S, Glouzon JS, Brumwell A, et al. 3' UTR G-quadruplexes regulate miRNA binding [J]. RNA, 2017, 23 (8): 1172-1179.
- [21] Xu X, Li S, Lin Y, et al. MicroRNA-124-3p inhibits cell migration and invasion in bladder cancer cells by targeting ROCK1 [J]. J Transl Med, 2013, 11: 276.
- [22] Lin Y, Chen Y, Huang J, et al. Efficacy of premedication with intranasal dexmedetomidine on inhalational induction and postoperative emergence agitation in pediatric undergoing cataract surgery with sevoflurane [J]. J Clin Anesth, 2016, 33: 289 -295.
- [23] Hu Y, Li P, Hao S, et al. Differential expression of microRNAs in the placenta of Chinese patients with severe pre-eclampsia [J]. Clin Chem Lab Med, 2009, 47(8): 923-929.
- [24] Muralimanoharan S, Maloyan A, Mele J, et al. Mele. MIR-210 modulates mitochondrial respiration in placenta with preeclampsia [J]. Placenta, 2012, 33(10): 816-823.
- [25] Menon R, Papaconstantinou J. p38 mitogen activated protein kinase (MAPK): a new therapeutic target for reducing the risk of adverse pregnancy outcomes [J]. Expert Opin Ther Targets, 2016, 20(12): 1397-1412.
- [26] Sun XL, Yang Z, Wang W, et al. Interaction mechanism and influence between fatty acid oxidation in trophoblast cells and p38MAPK signal transduction pathway of severe preeclampsia [J]. Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi, 2013, 48(11): 853-857.
- [27] Müller R, Daniel C, Hugo C, et al. The mitogen-activated protein kinase p38 α regulates tubular damage in murine anti-glomerular basement membrane nephritis [J]. PLoS One, 2013, 8(2): e56316.
- [28] Luo X, Liu DD, Qi HB, et al. Study on p38 mitogen activated protein kinase in vascular endothelial cells dysfunction in preeclampsia [J]. Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi, 2011, 46 (1): 36-40.

[收稿日期]2020-01-08