

生殖医学

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000253

Gadd45 α 对绒毛外滋养细胞迁移和侵袭能力影响的相关研究刘西茹¹, 慕华桥², 罗 欣¹, 漆洪波¹

(1. 重庆医科大学附属第一医院妇产科, 重庆 400016; 2. 重庆市妇幼保健院医务科, 重庆 400013)

【摘要】目的:研究人生长阻滞和 DNA 损伤 45 α (growth arrest and DNA damage 45 α , Gadd45 α)基因对滋养细胞 HTR8/SV-neo 增殖、凋亡、迁移和侵袭等生物学功能的影响,探讨其在子痫前期(preeclampsia, PE)发生发展中的可能作用。**方法:**构建 Gadd45 α 短发夹干扰 RNA,以阴性对照组作为参照,转染人滋养细胞 HTR8/SVneo,即分为实验组(si-Gadd45 α)和阴性对照组(si-NC)进行实验;应用流式细胞仪检测转染效率,并应用 qRT-PCR 和 Western blot 检测转染后各组细胞中 Gadd45 α mRNA 和蛋白表达水平;采用四甲基偶氮唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)显色法检测转染后各组细胞增殖能力;应用流式细胞仪对转染后各组细胞进行细胞凋亡分析;采用 Transwell 法检测转染后各组细胞迁移和侵袭能力;采用早孕绒毛外植体培养模型观察敲除 Gadd45 α 基因后对绒毛外滋养细胞外生性迁移能力的影响;收集各组细胞培养上清液,明胶酶谱法检测基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)的表达,蛋白免疫印迹检测基质金属蛋白酶组织抑制因子(tissue inhibitors of MMPs, TIMPs)的表达。**结果:**流式细胞仪检测转染效率约为 90%;转染后实验组较对照组 Gadd45 α mRNA 的表达量约降低 80%,蛋白表达水平约下降 70%,差异均有统计学意义($P < 0.01$),证明干扰 Gadd45 α 表达成功。MTT 法和流式细胞仪检测细胞增殖和凋亡,结果显示实验组和对照组细胞增殖和凋亡均无统计学差异($P > 0.05$)。Transwell 实验表明干扰 Gadd45 α 后 HTR8/SVneo 侵袭能力明显增加,约为对照组的 1.65 倍;迁移能力也明显增加,约为对照组的 2 倍,均有统计学差异($P < 0.01$)。早孕绒毛外植体培养结果显示:与阴性对照组的绒毛相比,Gadd45 α 干扰片段处理的绒毛外滋养细胞外生性迁移的距离明显增加,差异有统计学意义($P = 0.005$)。明胶酶谱实验结果显示干扰 Gadd45 α 后基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinases, MMP-2)和 MMP-9 的活性增强,而 Western blot 检测发现其抑制因子 TIMP-1 和 TIMP-2 相应地下降($P < 0.01$)。**结论:**推测 Gadd45 α 可能是通过调控蛋白酶的活性来抑制滋养细胞的迁移和侵袭,从而参与 PE 的发生发展。

【关键词】生长阻滞和 DNA 损伤 45 α 基因;滋养细胞侵袭;滋养细胞迁移;子痫前期

【中图分类号】R714.24

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-09-24

Effects of Gadd45 α on cell migration and invasion in the human trophoblast derived HTR8/SVneo cellsLiu Xiru¹, Mu Huaqiao², Luo Xin¹, Qi Hongbo¹

(1. Department of Obstetrics and Gynaecology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University;

2. Medical Department, Chongqing Health Centre for Women and Children)

【Abstract】Objective: To investigate the effects of growth arrest and DNA damage 45 α (Gadd45 α) gene on proliferation, apoptosis, migration and invasion of HTR8/SVneo cells and the role of Gadd45 α in the pathogenesis of preeclampsia. **Methods:** The role of Gadd45 α in HTR8/SVneo cells was examined by RNA interference technology using Gadd45 α specific short hairpin RNA (siRNA). The experiment was composed of two groups: si-Gadd45 α group and si-negative control group (si-NC group). mRNA and protein expression of Gadd45 α was identified by qRT-PCR and Western blot respectively. Changes of cell proliferation, apoptosis, migration and invasion were respectively detected by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT), flow cytometry, transwell migration and Matrigel invasion assay. Placental villous explants culture model was employed to further verify the effect of Gadd45 α on outgrowth and migration of extravillous trophoblast cells. Gelatin zymography was used to detect the expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2/9 in culture medium. Western blot was used to detect the expressions of tissue inhibitors of MMPs (TIMP)-1 and TIMP-2. **Results:** (1) The trans-

fection efficiency was about 90%. The mRNA and protein levels

of Gadd45 α in si-Gadd45 α group were reduced by 80% and

70% respectively, with significant differences ($P < 0.01$).

(2) The results of MTT and flow cytometry indicated that cell proliferation and apoptosis were not affected by siRNA of Gadd45 α

($P > 0.05$).

(3) Knocking-down Gadd45 α expression by siRNA

作者介绍:刘西茹, Email: xixi0201@gmail.com,

研究方向: 围产医学与生殖医学。

通信作者:漆洪波, Email: qihongbocq@gmail.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号: 81070502, 81300508);

国家临床重点专科资助项目(编号: 201101CKZD)

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyx.000253.html>

significantly promoted invasion(1.65 folds) and migration(2 folds) potentials of HTR8/SVneo cells ($P<0.01$). (4) Gadd45 α silencing significantly promoted outgrowth of villous explants in vitro ($P=0.005$). (5) Gadd45 α regulated migration and invasion through controlling gelatinolytic activities of MMP-9, MMP-2 ($P<0.05$) and the expressions of TIMP-1 and TIMP-2 ($P<0.01$). **Conclusion:** Gadd45 α is probably involved in the onset of preeclampsia by regulating invasion and migration of trophoblast through controlling the activities of MMPs and the expressions of TIMPs.

【Key words】growth arrest and DNA damage 45 alpha; trophoblast invasion; trophoblast migration; preeclampsia

子痫前期(preeclampsia, PE)是一种以高血压、蛋白尿为主要特征的妊娠期特有的疾病,发病率较高,一直是我国孕产妇和围产儿死亡及其严重并发症的一个主要原因,至今仍无有效治疗手段^[1]。目前,多数学者认为滋养细胞的侵袭缺陷,胎盘浅着床和螺旋动脉重铸异常是 PE 发病的主要原因^[2-3],临床上亟需阐明这其中的具体机制,进而有效的预测和治疗 PE。生长阻滞和 DNA 损伤 45 α (growth arrest and DNA damage 45 alpha, Gadd45 α)在调控细胞周期、修复 DNA 损伤、传导细胞信号及抑制肿瘤的转移和侵袭方面起着重要的作用。前期研究发现:与正常对照组相比,在 PE 患者胎盘组织中 Gadd45 α 的 mRNA 及蛋白表达水平明显增高,且主要定位于滋养层细胞的胞浆及胞核中^[4];这表明 Gadd45 α 可能调控滋养细胞的生物学功能,从而参与 PE 的发生发展,但其中的机制不清。本研究中采用 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)技术^[5],进一步研究其中可能的机制,为 PE 提供新的治疗靶点和理论依据,为其他胎盘缺血性疾病切实提高疗效提供新途径。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞及慢病毒载体 HTR8/SVneo 细胞株由加拿大 Graham 教授惠赠,用含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养基,于 37℃、5%CO₂ 细胞培养箱中常规培养,每 2 d 更换培养液,待细胞汇聚率达到 80%~90%时用胰酶消化传代。Gadd45 α 干扰和阴性对照的慢病毒载体由上海吉玛制药技术有限公司依照文献^[6]提供的 Gadd45 α siRNA 有效靶序列:5'-AA-CGTCGACCCCGATAACGTG-3'构建。

1.1.2 主要试剂 胎牛血清和 RPMI1640 培养基购自美国 Gibco 公司;总 RNA 提取试剂盒 TRIzol 购自 Invitrogen 公司;PCR 反应引物均由上海生工生物工程公司合成;PrimeScript 逆转录试剂盒购自日本 TaKaRa 公司;蛋白抽提、定量、凝胶配制试剂盒和 ECL 化学发光试剂盒购自江苏碧云天生物技术有限公司;小鼠抗人基质金属蛋白酶特异性抑制因子(tissue

inhibitors of MMPs, TIMP)-1/2、抗人 β -actin 单克隆抗体均购自美国 Santa Cruz 公司;兔抗人 Gadd45 α 多克隆抗体和 Transwell 小室(膜孔径 8 μ m)为美国 Millipore 公司产品;Matrigel 基质胶购自美国 BD 公司;HRP 标记的山羊抗兔/鼠 IgG 购自北京中杉金桥生物技术有限公司;四甲基偶氮唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)粉、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)购自上海生工生物工程有限公司;Annexin V FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司。

1.2 方法

1.2.1 慢病毒转染与实验分组 HTR8/SVneo 细胞置于含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养基常规培养,细胞生长至对数生长期时用 0.125%胰酶消化,按 1×10^5 个/孔的密度接种至 6 孔板中后放入培养箱中培养 24 h,待细胞密度达到 50%~70%时加入慢病毒颗粒进行转染(按照慢病毒操作手册,以预实验中转染效率最高的病毒感染复数为 50 进行转染),24 h 后更换为完全培养液继续培养。感染 48、72 h 后,荧光显微镜下观察细胞的生长状态及荧光强度。细胞分为 2 组:实验组(si-Gadd45 α)转染 Gadd45 α siRNA、对照组(si-NC)转染 negative control siRNA。

1.2.2 qRT-PCR 技术检测 HTR8/SVneo 细胞中 Gadd45 α 基因 mRNA 的表达 用 Trizol 试剂提取各组细胞总 RNA,提取步骤按照说明书进行。RNA 提取后用 0.01%氰代磷酸二乙酯水溶解,逆转录总 RNA,进行 PCR 反应。PCR 反应引物均由上海生工生物工程有限公司合成,Gadd45 α 上游引物为:5'-CGAAAGGATGGATAAGG-3',下游引物为:5'-CAG-CAGGCACAACACC-3',扩增片段长度为 139 bp。以 GAPDH 基因为内参照;上游:5'-CTTTGGTATCGTGGAAGGACTC-3',下游:5'-GTAGAGGCAGGGATGATGTTCT-3',扩增片段长度为 132 bp。反应条件为:94℃预变性 3 min;94℃变性 20 s, 58℃退火 20 s, 72℃延伸 30 s,共 35 个循环。

1.2.3 Western blot 检测 HTR8/SVneo 细胞中 Gadd45 α 和 TIMP-1/2 的蛋白表达 分别提取各组细胞总蛋白,测定蛋白浓度,蛋白上样量为 80 μ g。依次进行电泳分离、转膜、封闭、一抗孵育过夜、二抗孵育 1 h,最后用 ECL 化学发光试剂盒显色。一抗浓度 Gadd45 α 抗体为 1:800 稀释、 β -actin 抗体为 1:2 000 稀释、TIMP-1 和 2 抗体为 1:500 稀释。ChemiDoc XRS 化学发光成像系统检测蛋白质印迹条带,用 Quantity One 图像分析软件进行分析。

1.2.4 MTT 比色法测定转染后细胞的增殖能力 细胞转染前 1 d 在 96 孔板中以 1×10^3 个细胞的密度铺板,待转染前细胞汇合度达到 50%。细胞分别转染 Gadd45 α siRNA 或 negative control siRNA,继续培养 44 h,细胞换液,每孔加入 100 μ l MTT 试剂,继续培养 4 h,加入 100 μ l DMSO 显色。在波长 570 nm 下,用酶标仪(Beckman DU530)测定每孔的光密度值。

1.2.5 流式细胞仪检测细胞凋亡率 用胰酶消化收集各组细胞,按 Annexin V FITC/PI 试剂盒说明书操作;流式细胞仪分析 Annexin V+/PI-、Annexin V+/PI+ 细胞的百分率,即早期凋亡细胞与晚期凋亡细胞的总凋亡率。

1.2.6 Transwell 实验测定细胞侵袭和迁移能力 细胞侵袭实验用 50 μ l Matrigel (1:9 稀释)基质胶对 Transwell 小室的微孔膜进行铺胶,固化后,上室加入 200 μ l 细胞悬液(无血清培养基稀释,细胞数为 1×10^5 个),下室加入 600 μ l 含 10% 胎牛血清的培养液。置培养箱孵育 24 h 后,滤膜外表面的细胞用甲醇固定 10 min,PBS 洗涤,结晶紫染色。迁移实验步骤与细胞侵袭实验基本相同,差别在于 Transwell 小室的膜上不包被基质胶。在显微镜下随机选取 5 个视野,计数每视野中的细胞数,计算平均值。

1.2.7 早孕绒毛外植体培养 将早孕阶段(6~9 孕周)的正常绒毛组织块(来自重庆医科大学附属第一医院妇产科早孕人工流产绒毛标本)在 Matrigel 涂层上培养,待绒毛锚定在 Matrigel 上之后,小室内加入不含酚红的无血清培养基,根据分组的不同分别加入 500 nmol/L 的 Gadd45 α 干扰片段和阴性对照干扰片段,放入培养箱培养,每天观察照相,动态观察并定量分析绒毛外滋养细胞自绒毛末端的外生性游出和迁移的距离。

1.2.8 明胶酶谱法测基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)-2/9 的活性 收集细胞培养上清液,调整上清液中蛋白浓度使其总量一致。依次进行上样、电泳、洗涤凝胶、孵育、显色、条带扫描,显示出 MMP-2(72 kD)和 MMP-9(92 kD),用凝胶图像分析系统分析读取条带面积,宽度和灰度值,并分析积分光密度值(integral optical density, IOD)做统计分析。以上实验均重复 3 次。

1.3 统计学处理

所有数据采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析,计量资料用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用独立样本 t 检验分析,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 Gadd45 α 干扰效率的鉴定及干扰后对 HTR8/SVneo 细胞中 Gadd45 α mRNA 及蛋白表达的影响

慢病毒包装系统共感染 HTR8/SVneo 细胞后 48 h,荧光显微镜下细胞生长状态良好,可见绿色荧光,表明慢病毒包装成功(图 1A、B)。慢病毒滴度为 1×10^8 TU/ml;最适感染复

数(multiplicity of infection, MOI)为 50;感染 72 h 时荧光最强(图 1C、D);流式细胞仪检测感染效率约为 90%。qRT-PCR 检测转染后 Gadd45 α mRNA 表达结果显示,实验组(0.200 ± 0.065)较对照组 Gadd45 α mRNA 的表达量(1.000 ± 0.100)约降低 80%,差异有统计学意义($t=11.582, P=0.000$)(图 2)。蛋白印迹法检测 Gadd45 α 蛋白表达结果显示,实验组 Gadd45 α 蛋白表达量(0.353 ± 0.042)较对照组(1.000 ± 0.050)约降低 70%,差异有统计学意义($t=17.215, P=0.000$)(图 3)。

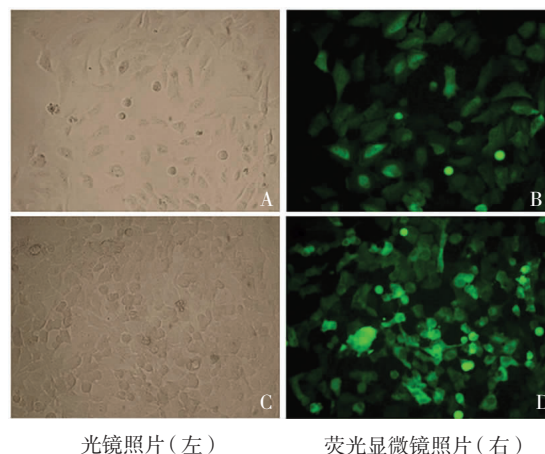


图 1 HTR8/SVneo 细胞转染慢病毒 48 h (A & B) 和 72 h (C & D) 光镜及荧光显微镜下图片 (200 $\times$)

Fig.1 Images of HTR8/SVneo cells at 48 h (A & B) and 72 h (C & D) after the transfection with lentivirus under light and fluorescence microscope (200 $\times$)

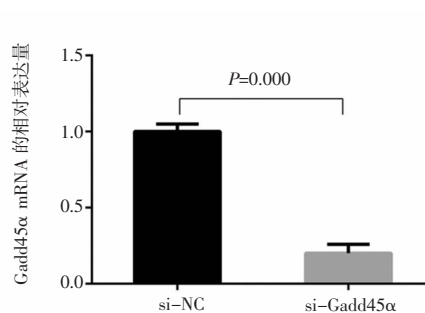


图 2 2 组细胞中 Gadd45 α 基因 mRNA 的相对表达量
Fig.2 Relative expression of Gadd45 α mRNA in HTR8/SVneo cells between two groups

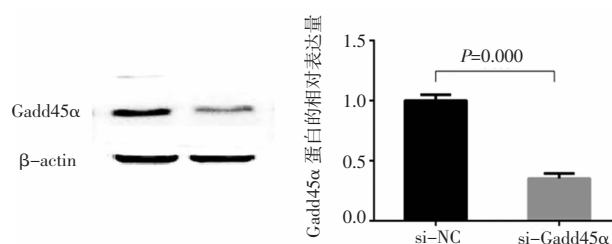


图 3 蛋白印迹法检测转染后 2 组细胞中 Gadd45 α 蛋白的表达
Fig.3 Expression of Gadd45 protein in two groups identified by Western blot

2.2 干扰 Gadd45 α 后对 HTR8/SVneo 细胞增殖和凋亡的影响

采用 MTT 比色法检测细胞增殖,采用流式细胞仪检测细胞凋亡,结果提示 Gadd45 α 基因干扰对细胞增殖(对照组 1.012 ± 0.036 , 实验组 1.051 ± 0.038 , $t=-1.314$, $P=0.259$)和凋亡(对照组 3.297 ± 0.758 , 实验组 3.460 ± 1.303 , $t=-0.188$, $P=0.860$)均无明显影响(图 4 和图 5)。

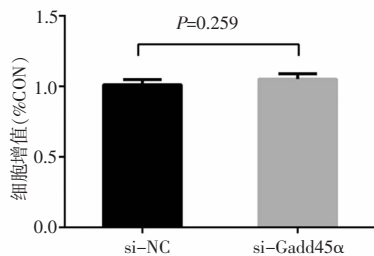


图 4 MTT 法检测转染后各组细胞增殖能力变化

Fig.4 Changes of proliferation potential identified by MTT

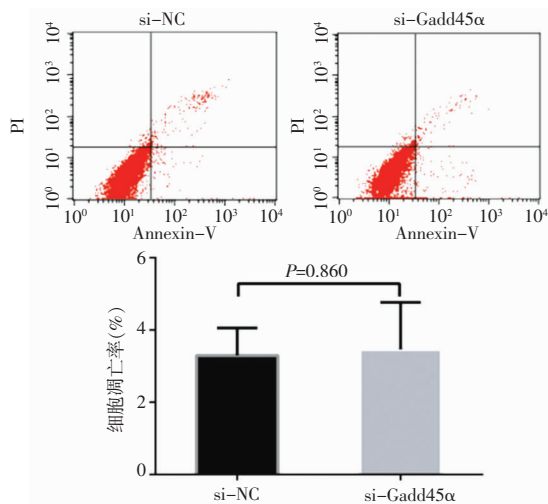


图 5 流式细胞术分析转染后各组的细胞凋亡情况

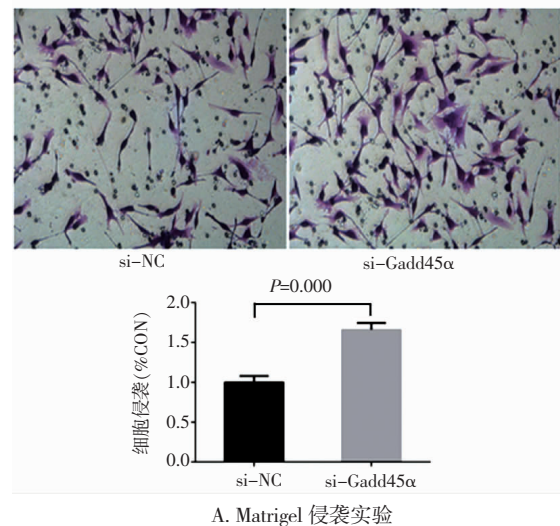
Fig.5 Analysis of apoptotic rates by flow cytometry

2.3 干扰 Gadd45 α 的表达可以促进 HTR8/SVneo 细胞的侵袭和迁移

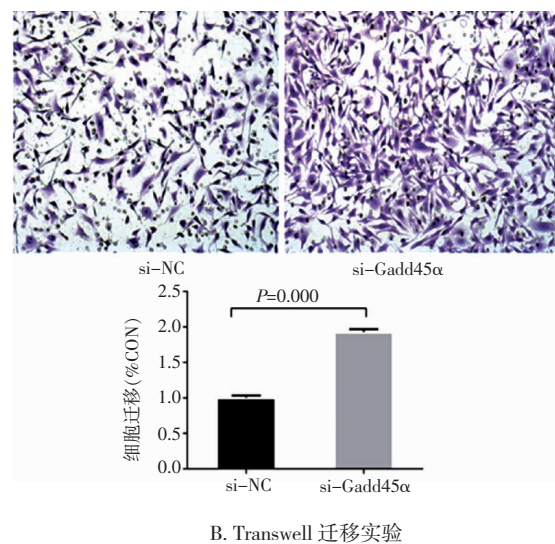
Transwell 侵袭实验结果显示干扰 Gadd45 α 后 HTR8/SVneo 侵袭能力明显增加,约是对照组的 1.65 倍(对照组 1.000 ± 0.079 , 实验组 1.659 ± 0.087 , $t=-12.564$, $P=0.000$),差异有统计学意义(图 6)。迁移实验结果显示,干扰 Gadd45 α 后 HTR8/SVneo 迁移能力增加约 1 倍(对照组 1.000 ± 0.036 , 实验组 1.928 ± 0.042 , $t=-37.561$, $P=0.000$),差异有统计学意义。

2.4 Gadd45 α siRNA 在外植体培养中促进绒毛外滋养层细胞的迁移

在 24 h 时绒毛锚定在 Matrigel 上,并有一定的外延生长,培养 72 h 后照相并进行定量分析结果显示:与对照组的绒毛($4\,680 \pm 634$) μm 相比,Gadd45 α 干扰片段处理的绒毛外滋养细胞外生性迁移的距离($8\,888 \pm 1104$) μm 明显增加,差异有统计学意义($t=-5.723$, $P=0.005$)(图 7)。



A. Matrigel 侵袭实验



B. Transwell 迁移实验

图 6 干扰 Gadd45 α 的表达可以促进绒毛外滋养细胞侵袭和迁移

Fig.6 Knockdown of Gadd45 α promotes the migration and invasion of extravillous trophoblast cells

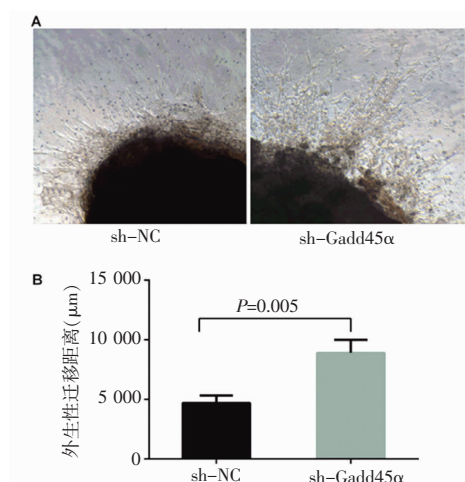


图 7 早孕绒毛外植体模型观察绒毛外滋养细胞外生性迁移

Fig.7 Observation of outgrowth and migration of extravillous trophoblast cells in placental villous explants model

2.5 干扰 Gadd45 α 的表达会影响 MMP-9/2 的活性及 TIMP-1/TIMP-2 的表达

为了鉴定 Gadd45 α 在滋养层细胞侵袭过程中对 MMPs 以及它们的抑制因子 TIMP-1 和 TIMP-2 的影响,采用明胶酶谱法检测上清液中细胞分泌的 MMP-2 和 MMP-9 的活性。实验结果显示干扰 Gadd45 α 后 MMP-2(对照组 1.000 ± 0.155 , 实验组 2.950 ± 0.858 , $t=-3.873$, $P=0.018$)和 MMP-9(对照组 1.000 ± 0.099 , 实验组 2.525 ± 0.446 , $t=-5.785$, $P=0.004$)的活性增强(图 8),而 Western blot 检测发现其抑制因子 TIMP-1(对照组 0.653 ± 0.026 , 实验组 0.312 ± 0.027 , $t=15.506$, $P=0.000$)和 TIMP-2(对照组 0.782 ± 0.034 , 实验组 0.218 ± 0.020 , $t=24.572$, $P=0.000$)的表达量相应地降低(图 9)。

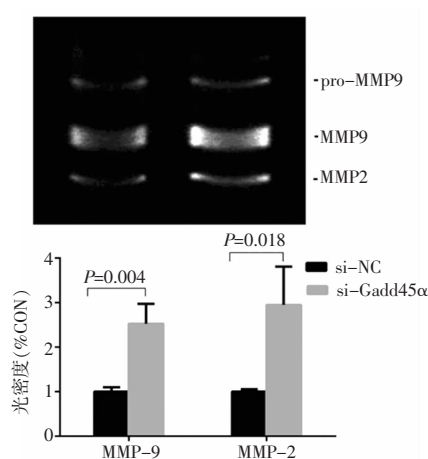


图 8 明胶酶谱灰度扫描统计结果

Fig.8 Results of gelatin zymography

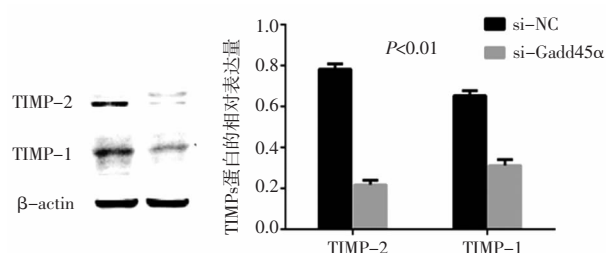


图 9 Western blot 检测 TIMPs 的相对表达量

Fig.9 Relative protein expression of TIMPs by Western blot

3 讨论

在人类妊娠过程中,滋养层细胞对母体子宫蜕膜和浅肌层的适度侵袭是胎盘形成的关键环节,这个侵袭过程受多种分子的调控,其中的调控异常可能会导致 PE、流产、胎儿生长受限和胎盘植入等多种妊娠相关疾病的发生^[7]。很多研究发现 PE 胎盘组织中存在滋养细胞侵袭能力降低和螺旋动脉重铸

障碍。Gadd45 α 是 1988 年由 Fornace 等在用紫外线照射和甲磺酸甲脂处理中国仓鼠卵巢细胞引起 DNA 碱基损伤后发现的,该基因可以在紫外线照射、氧化应激、血清饥饿等不同环境和损伤因素的作用下表达上调,在调控细胞周期、凋亡及信号通路的传导中发挥着重要的作用。近年来在肿瘤学领域的研究表明 Gadd45 α 可以抑制肿瘤细胞的迁移和侵袭^[8-9],胚胎的滋养细胞与肿瘤细胞的生物学特性是极其相似的,加上前期研究发现 Gadd45 α 在 PE 胎盘组织滋养层细胞中高表达,主要定位于滋养层细胞的胞浆及胞核中,血管内皮细胞及少量间质细胞胞核仅可见少量阳性染色^[4],推测 Gadd45 α 可能参与滋养层细胞生物学行为的调控,从而参与 PE 的发病,目前国内外尚无相关报道。

本研究利用 HTR8/SVneo 细胞株,这一来源于人类正常早孕期胎盘的绒毛外滋养细胞系进行相关机制的研究,因为其功能和表型都很接近于在体滋养细胞^[10]。研究中应用阴性对照组作为参照,明确了下调 Gadd45 α 基因表达的意义。采用慢病毒载体将化学合成的 siRNA(si-Gadd45 α 和 si-NC)转染入 HTR8/SVneo 细胞,发现 Gadd45 α 干扰片段在 mRNA 和蛋白水平上均能有效降低 Gadd45 α 的表达;进而使用 Transwell 迁移实验和 Matrigel 侵袭实验模型来验证沉默 Gadd45 α 对 HTR8/SVneo 细胞生物学功能的影响,发现干扰 Gadd45 α 的表达后, HTR8/SVneo 细胞的迁移和侵袭能力均明显增加,而这种促进细胞迁移和侵袭的能力并不是因为干扰片段增强了细胞增殖能力或者降低了细胞凋亡能力引起的。为进一步验证 Gadd45 α 对滋养细胞功能的调控作用,使用了早孕绒毛外植体培养模型,发现外植体在基质胶上锚定后,绒毛滋养层柱分化出绒毛外滋养细胞,并向外迁移,72 h 后 si-Gadd45 α 组绒毛外滋养细胞外生性迁移距离较阴性对照组明显远。因此进一步证实了 Gadd45 α 抑制绒毛外滋养细胞的迁移和侵袭功能,从而参与 PE 的发生发展,那么其中的机制是什么呢?进而通过明胶酶谱法和蛋白免疫印迹法分别检测了 MMPs 的活性及其抑制因子 TIMPs 的表达,发现 Gadd45 α 可能是通过直接或间接调控基质金属蛋白酶的活性来调控滋养细胞的迁移和侵袭能力的。在胚胎着床过程中,滋养层细胞对子宫内膜细胞外基质的降解和重建是其中的关键步骤之一,这个过程主要是依靠 MMPs 和其特异性抑制因子 TIMPs 之间形成动态平

衡,这样即有利于胚胎着床,又可避免滋养细胞的过度侵袭。若二者之间的平衡被破坏,则可能会造成病理妊娠的发生。在该家族的众多成员中,研究表明明胶酶家族 MMP-2 和 MMP-9 在滋养细胞侵袭和胚胎着床过程中发挥的作用最大,其活性能被相应的特异性抑制因子 TIMP-2 和 TIMP-1 抑制。因此当本研究中 MMP-2 和 MMP-9 活性下降, TIMP-2 和 TIMP-1 表达增高时,滋养细胞迁移和侵袭能力降低,从而会造成胎盘浅着床,进而导致 PE 的发生。

综上所述, Gadd45 α 基因可能在调控滋养细胞的迁移和侵袭能力方面起到了一定的作用。Gadd45 α 基因表达水平的增高可以使滋养细胞迁移和侵袭能力下降,从而导致螺旋动脉重铸异常,进而诱导 PE 的发生。近年来 RNAi 是基因治疗的研究热点。本研究成功构建了 Gadd45 α 干扰慢病毒载体,它可以有效地沉默绒毛外滋养细胞中 Gadd45 α 的基因表达,从而提高 HTR8/SVneo 细胞的迁移和侵袭能力,其感染效率、沉默效率均比较高,亦未发现明显的细胞毒性,为 PE 的基因治疗提供了新的靶点,为开发新型、安全、无毒的基因治疗生物制品提供了参考。后续研究中,将深入研究该慢病毒载体是否会改善 PE 动物模型的临床症状,为基因治疗 PE 提供进一步的理论依据。

参 考 文 献

[1] 林其德.对子痫前期的新认识[J].中华妇产科杂志,2009,44(2):

81-83.

[2] Warrington JP, George EM, Palei AC, et al. Recent advances in the understanding of the pathophysiology of preeclampsia[J]. Hypertension, 2013, 62(4): 666-673.

[3] Ciantar E, Walker JJ. Pre-eclampsia, severe pre-eclampsia and hemolysis, elevated liver enzymes and low platelets syndrome: what is new? [J]. Women's Health, 2011, 7(5): 555-569.

[4] Luo X, Yao Z, Qi H, et al. Growth Arrest and DNA Damage-inducible 45 α as an upstream signalling molecule of p38 mitogen-activated protein kinase triggers oxidative stress-induced sFlt-1 and sEng upregulation in preeclampsia[J]. Cell Tissue Res, 2011, 344(3): 551-565.

[5] Kesharwani P, Gajbhiye V, Jain NK. A review of nanocarriers for the delivery of small interfering RNA[J]. Biomaterials, 2012, 33(29): 7138-7150.

[6] Zerbini LF, Wang Y, Czibere A, et al. NF- κ B-mediated repression of growth arrest- and DNA-damage-inducible proteins 45 α and γ is essential for cancer cell survival[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(37): 13618-13623.

[7] Knöfler M, Pollheimer J. IFPA Award in Placentology lecture: molecular regulation of human trophoblast invasion[J]. Placenta, 2012, 33(Suppl): S55-S62.

[8] Yang F, Zhang W, Li D, et al. Gadd45a suppresses tumor angiogenesis via inhibition of the mTOR/STAT3 protein pathway[J]. J Biol Chem, 2013, 288(9): 6552-6560.

[9] Shan Z, Li G, Zhan Q, et al. Gadd45a inhibits cell migration and invasion by altering the global RNA expression[J]. Cancer Biol Ther, 2012, 13(11): 1112-1122.

[10] Suman P, Gupta SK. Comparative analysis of the invasion-associated genes expression pattern in first trimester trophoblastic (HTR-8/SVneo) and JEG-3 choriocarcinoma cells[J]. Placenta, 2012, 33(10): 874-877.

(责任编辑:唐宗顺)

欢迎订阅,敬请赐稿!