

miR-145 和 PTEN/AKT/ mTOR 通路在砷致大鼠流产及滋养层细胞损害中的作用

彭涛, 梅雪峰, 李翔

重庆市巴南区人民医院妇产科, 重庆 401320



DOI 10.11836/JEOM21322

摘要:

[背景] 砷染毒可损害滋养层细胞进而诱导流产, 但其机制尚不清楚。

[目的] 探讨 miR-145 和 PTEN/AKT/mTOR 通路在砷致孕鼠流产及滋养层细胞损害中的作用。

[方法] 动物实验: SD 孕鼠 20 只, 随机分为正常对照组(生理盐水灌胃)、砷染毒流产组(10.65 mg·kg⁻¹ 亚砷酸钠溶液灌胃, 灌胃体积 10 mL·kg⁻¹), 每组 10 只; 砷染毒流产组出现流产后(染毒 5~6 d), 收集两组胎盘组织, 实时定量 PCR(RT-PCR)检测微小 RNA-145(miR-145)、磷酸酶和张力蛋白同源物(PTEN)、蛋白激酶 B(AKT)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR) mRNA 的表达水平, 蛋白印迹法检测 PTEN、AKT、mTOR、p-AKT、p-mTOR 蛋白表达水平。细胞实验: 将永生化滋养层细胞系(HTR-8/SVNEO 细胞)分为对照组、砷染毒组、miR-145 过表达组、砷染毒+miR-145 过表达组, 各组细胞密度为 5×10⁵ 个·孔⁻¹, 砷染毒剂量为 20 μmol·L⁻¹, 培养环境为 37 °C、5%CO₂, 处理 72 h, MTT 法检测细胞存活率, 结晶紫染色法检测单克隆形成数目, 流式细胞法检测凋亡水平, Image J Angiogenesis Analyzer 1.8.0 插件测定细胞总血管长度和总血管数目; 基因和蛋白的检测指标和方法同“动物实验”。

[结果] (1) 动物实验: 与正常对照组比较, 砷染毒流产组胎盘组织 miR-145 表达水平升高 ($P<0.05$), PTEN、AKT、mTOR mRNA 及其蛋白和 p-AKT、p-mTOR 蛋白表达水平降低 ($P<0.05$)。 (2) 细胞实验: 与对照组比较, 砷染毒组、miR-145 过表达组、砷染毒+miR-145 过表达组存活率、单克隆形成数目、总血管长度、总血管数目降低, 凋亡率升高 ($P<0.05$); 与砷染毒组、miR-145 过表达组比较, 砷染毒+miR-145 过表达组存活率、单克隆形成数目、总血管长度、总血管数目降低, 凋亡率水平升高 ($P<0.05$)。与对照组比较, 砷染毒组、miR-145 过表达组、砷染毒+miR-145 过表达组 miR-145 mRNA 表达水平升高 ($P<0.05$), PTEN、AKT、mTOR mRNA 及其蛋白和 p-AKT、p-mTOR 蛋白表达水平降低 ($P<0.05$); 与砷染毒组、miR-145 过表达组比较, 砷染毒+miR-145 过表达组 miR-145 mRNA 表达水平升高 ($P<0.05$), PTEN、AKT、mTOR mRNA 及其蛋白和 p-AKT、p-mTOR 蛋白表达水平降低 ($P<0.05$)。

[结论] miR-145 可能与砷染毒所致流产有关, miR-145 可抑制滋养层细胞 HTR-8/SVNEO 增殖、血管形成, 促进其凋亡, 其机制可能与 PTEN/AKT/mTOR 通路的抑制有关。

关键词: 微小 RNA-145; 磷酸酶和张力蛋白同源物; 蛋白激酶 B; 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白; 砷; 流产; 滋养层细胞

Role of miR-145 and PTEN/AKT/mTOR pathway in rat abortion and damage of trophoblast cells induced by arsenic exposure PENG Tao, MEI Xuefeng, LI Xiang (Department of Obstetrics and Gynecology, Banan District People's Hospital, Chongqing 401320, China)

Abstract:

[Background] Exposure to arsenic can damage trophoblast cells and thus induce abortion, but the mechanism is not known.

[Objective] To investigate the role of miR-145 and PTEN/AKT/mTOR pathway in arsenic-induced abortion and trophoblast cell damage in rats.

[Methods] In the animal experiment, twenty SD pregnant rats were randomly divided into a normal control group (saline gavage) and an arsenic-induced abortion group (10.65 mg·kg⁻¹ sodium arsenite solution was administered by gavage, and the gavage volume was 10 mL·kg⁻¹), with 10 rats in each group. After the miscarriage occurred in the arsenic-induced abortion group

基金项目

重庆市綦江区科技攻关项目(2018091)

作者简介

彭涛(1989—), 男, 学士, 主治医师;
E-mail: pengtao1983001@126.com

通信作者

李翔, E-mail: 2894692260@qq.com

伦理审批 已获取

利益冲突 无申报

收稿日期 2021-07-17

录用日期 2022-02-10

文章编号 2095-9982(2022)03-0331-07

中图分类号 R114

文献标志码 A

►引用

彭涛, 梅雪峰, 李翔. miR-145 和 PTEN/AKT/mTOR 通路在砷致大鼠流产及滋养层细胞损害中的作用 [J]. 环境与职业医学, 2022, 39(3): 331-336, 347.

►本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.11836/JEOM21322

Funding

This study was funded.

Correspondence to

LI Xiang, E-mail: 2894692260@qq.com

Ethics approval Obtained

Competing interests None declared

Received 2021-07-17

Accepted 2022-02-10

► To cite

PENG Tao, MEI Xuefeng, LI Xiang. Role of miR-145 and PTEN/AKT/mTOR pathway in rat abortion and damage of trophoblast cells induced by arsenic exposure[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2022, 39(3): 331-336, 347.

► Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.11836/JEOM21322

(5-6 d after exposure), placental tissues were collected from the two groups. The mRNA expression levels of microRNA-145 (miR-145), phosphatase and tensin homologue (PTEN), kinase B (AKT), mammalian target of rapamycin (mTOR) were detected by real-time quantitative PCR (RT-PCR), and the protein expression levels of PTEN, AKT, mTOR, p-AKT, and p-mTOR were detected by Western blotting. For the *in vitro* study with immortalized human trophoblast cell line (HTR-8/SVneo cells), a control group, an arsenic exposure group, an miR-145 overexpression group, and an arsenic exposure+miR-145 overexpression group were prepared and cultured for 72 h with 37 °C and 5% CO₂, at cell density of 5×10⁵ cells per well, and the arsenic exposure concentration was 20 μmol·L⁻¹. The MTT method was applied to detect cell viability, crystal violet staining to detect the number of monoclonal formation, flow cytometry to detect the level of apoptosis, Image J Angiogenesis Analyzer 1.8.0 plug-in to evaluate total blood vessel length and total blood vessel number; the detection indexes and methods of genes and proteins were the same as "animal experiment".

[Results] (1) In the animal experiment, compared with the normal control group, the expression level of *miR-145* mRNA in the placenta tissues of the arsenic-induced abortion group was increased ($P<0.05$), and the expression levels of *PTEN*, *AKT*, *mTOR* mRNA and proteins, and p-AKT and p-mTOR proteins were decreased ($P<0.05$). (2) For the *in vitro* study, compared with the control group, the cell viability rate, number of monoclonal formation, total vessel length, and total vessel number were decreased, and the apoptosis rate was increased in the arsenic exposure group, the miR-145 overexpression group, and the arsenic exposure+miR-145 overexpression group ($P<0.05$). Compared with the arsenic exposure group and the miR-145 overexpression group, the cell viability rate, number of monoclonal formation, total vessel length, and vessel number were decreased, and the apoptosis rate was increased in the arsenic exposure+miR-145 overexpression group ($P<0.05$). Compared with the control group, the levels of *miR-145* mRNA in the arsenic exposure group, the miR-145 overexpression group, and the arsenic exposure+miR-145 overexpression group increased ($P<0.05$), the expression levels of *PTEN*, *AKT*, *mTOR* mRNA and protein and the expression levels of p-AKT and p-mTOR protein were decreased ($P<0.05$); compared with the arsenic exposure group and the miR-145 overexpression group, the level of *miR-145* mRNA in the arsenic exposure+miR-145 overexpression group was increased ($P<0.05$), and the levels of *PTEN*, *AKT*, *mTOR* mRNA and protein as well as p-AKT and p-mTOR protein were decreased ($P<0.05$).

[Conclusion] miR-145 might be related to abortion due to arsenic exposure. miR-145 could inhibit the proliferation and angiogenesis of trophoblast HTR-8/SVNEO cells, and promotes their apoptosis; the mechanism may be related to the inhibition of PTEN/AKT/mTOR pathway.

Keywords: microRNA-145; phosphatase and tensin homologue; kinase B; mammalian target of rapamycin; arsenic; abortion; trophoblast cell

砷易穿过胎盘屏障,具有胚胎毒性和致畸作用。流行病学研究和动物实验证据表明,砷与流产存在关联^[1-3]。滋养层的发育对于胚胎植入和妊娠至关重要,滋养细胞的损害可引起子宫胎盘功能不全,增加流产风险^[4]。微小RNA(microRNA, miRNA)是一类约23个核苷酸组成的单链RNA分子。研究证实miRNA在流产中发挥作用,在严重子痫的妇女的胎盘组织中,微小RNA-145(miR-145)失调可抑制小鼠胚胎成纤维细胞的增殖^[5]。此外miR-145调节白细胞介素-6表达来诱导胎盘免疫防御^[6]。磷酸酶和张力蛋白同源物(phosphatase and tensin homolog, PTEN)是miR-145的靶标^[7],PTEN对磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸(phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate, PIP3)进行去磷酸化而充当磷酸肌醇3激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)的负调节剂,导致其下游靶标的活化并降低蛋白激酶B(protein kinase B, AKT)活性。哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)的下游靶标在滋养层细胞增殖、生长和凋亡中发挥作用^[8]。研究表明,PTEN缺失可抑制滋养细胞生长^[9]。PTEN/AKT/mTOR信号通路可调节流产后的滋养

层细胞再生,对受损滋养层细胞的再生能力意义重大^[10]。目前尚无关于砷染毒流产机制与滋养层细胞miR-145、PTEN、AKT、mTOR表达关系的文献报道;故本研究分别从动物实验和细胞实验深入探讨miR-145和PTEN/AKT/mTOR通路与砷染毒流产的关系,这将为砷染毒所致流产的防治提供理论依据。

1 对象与方法

1.1 动物实验

1.1.1 砷染毒流产大鼠模型的建立 50只体重180~220 g的Sprague-Dawley(SD)大鼠获自昆明医科大学动物试验中心[许可证编号SCXK(云)2018-0013,合格证号:SCXK(云)2020-0001],雌雄各半。雄鼠雌鼠按照1:1的比例同笼喂养,每日清晨观察阴栓,查出阴栓为孕期0 d,按照上述方法共获得孕鼠20只,将孕鼠按照体重随机分为正常对照组10只、砷染毒流产组10只。砷染毒流产组每日以亚砷酸钠溶液灌胃^[11](参照文献并结合预实验结果,得出亚砷酸钠致孕鼠流产的剂量为10.65 mg·kg⁻¹,灌胃体积10 mL·kg⁻¹),正常对照组以等体积的生理盐水灌胃。染毒5~6 d后两组

大鼠腹部碘伏备皮行 B 超(美国通用动物 HB-415 超声诊断仪,腹部探头频率 4 MHz,依据厂家说明书,在大鼠出现阴栓一周左右可见妊娠胎囊情况)检查妊娠情况。正常对照组胚胎正常发育,B 超可见完整胎囊、胎囊逐渐增大、胚芽发育;砷染毒组全部出现了流产,B 超见宫腔内无胎囊,有胚胎残留物,宫腔线清晰或不连续。第 7 天时处死两组大鼠,收集胎盘组织,用于后续 miR-145、PTEN、AKT、mTOR、磷酸化 AKT(p-AKT)、磷酸化 mTOR(p-mTOR)分子表达水平的检测。本研究获得重庆市巴南区人民医院医学伦理协会批准,伦理审批编号为 20190711。

1.1.2 胎盘组织 miR-145、PTEN、AKT、mTOR mRNA 表达水平测定 使用 Trizol 试剂(美国 Invitrogen)提取胎盘组织总 RNA,然后使用 HiScript First Strand cDNA 合成试剂盒(中国江苏诺唯赞生物科技有限公司)将 1 μg RNA 合成 cDNA。使用 SYBR[®]Green 实时 PCR 预混液(中国碧云天生物科技有限公司)以及 ABI StepOnePlus[™]实时 PCR 系统(美国 ABI)进行实时定量 PCR(real-time quantitative PCR, RT-PCR)测定。miR-145、PTEN、AKT、mTOR 引物由上海生工科技合成,序列如下:miR-145, 5'-GTCGACGTTATTGTTGACGTC-3'(正向)和 5'-TGACTGCAGGGTCCCCTGTA-3'(反向);PTEN, 5'-TGTCGTACGCTTCGTGTGACGCATTTGA-3'(正向)和 5'-TGGAATATGGGGTGCTCGTGAATTTG-3'(反向);AKT, 5'-CCCTGTGCAGAGGCGCTATTGACATG-3'(正向)和 5'-GTGACATGGCCACTGAACAGTCGA-3'(反向);mTOR, 5'-TGACGTGATCATGTACGCCGTAGCA-3'(正向)和 5'-CGTAGCAGTCATCCTGCTTCCGTGTACAGT-3'(反向); β -肌动蛋白, 5'-AAAGACCTGTACGCCAACAC-3'(正向)和 5'-GTCATACTCTGCTTGCTGAT-3'(反向)。扩增条件如下:94 $^{\circ}\text{C}$ 、12 min;90 $^{\circ}\text{C}$ 、10 s 和 60 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min,50 个循环。 β -肌动蛋白用作内源性对照。应用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算 miR-145、PTEN、AKT、mTOR 的相对表达水平。

1.1.3 PTEN、AKT、mTOR、p-AKT、p-mTOR 蛋白表达水平测定 用 RIPA 缓冲液(中国碧云天生物科技有限公司)提取胎盘组织总蛋白,使用蛋白质检测试剂盒(美国 Bio-Rad)测定总蛋白含量,10 μg 蛋白质样品在 10%(质量分数)SDS-PAGE(美国 EMD Millipore)上分离并转移到 PVDF 膜(美国 Abcam)上,室温下在 5%(质量分数)牛奶中封闭 1 h 后,与 PTEN、AKT、mTOR、p-AKT、p-mTOR 的特异性一抗(1:1000,美国 Santa Cruz Biotech)和兔抗人 GAPDH 抗体(1:1000,美国 Cell Signaling Technology)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,然后与山羊抗

兔 IgG 二抗(1:10000,美国 Cell Signaling Technology)一起孵育。使用增强型化学发光试剂(美国 Thermo)进行蛋白印迹实验。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)作为内部对照。

1.2 细胞实验

1.2.1 HTR-8/SVNEO 细胞培养及各细胞组的建立 永生化人滋养层细胞系 HTR-8/SVNEO 购自中国科学院细胞研究所。将细胞保存在含 100 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 青霉素钠(美国 Sigma)、100 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 硫酸链霉素(美国 Sigma)、10%胎牛血清(美国 Invitrogen)的 DMEM 培养基(美国 Gibco BRL)中。培养箱条件:37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%(体积分数,后同) CO_2 ,细胞每隔 3~4 d 传代一次。为探讨 miR-145 以及砷染毒对 HTR-8/SVNEO 细胞增殖、凋亡、血管形成以及 PTEN、AKT、mTOR、p-AKT、p-mTOR 表达水平的影响,将 HTR-8/SVNEO 细胞分为对照组、砷染毒组、miR-145 过表达组、砷染毒+miR-145 过表达组。对照组培养方法如前所述,无干预措施。砷染毒组的培养方法:10 mL HTR-8/SVNEO 细胞液(细胞密度 5×10^5 个 $\cdot\text{孔}^{-1}$)于含 10%(质量分数)胎牛血清的 DMEM 培养液中,加入亚砷酸钠(使其最终浓度为 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,预试验得出亚砷酸钠对 HTR-8/SVNEO 细胞的 LD_{50} 为 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,以 1/4 LD_{50} 为染毒剂量)置于 CO_2 培养箱(37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、20% O_2)。miR-145 过表达组的培养方法:上海 GenePharma 公司合成 miR-145 过表达体(5'-GGCGUAUACAGGAACAAUA-3'),使用 Lipofectamine 2000 转染试剂(美国 Invitrogen)、miR-145 模拟物在无血清培养基中进行细胞转染。转染步骤如下:取 50 μL HTR-8/SVNEO 细胞液、200 μL 100 $\text{pmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 miR-145 模拟物、4 μL Lipofectamine 2000 于 DMEM 培养基中,室温培育 30 min。砷染毒+miR-145 过表达组的培养方法为在 miR-145 过表达组培养基基础上加入 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (终浓度)的亚砷酸钠溶液培养。以上各组每孔设 6 个平行样,培养 72 h。

1.2.2 细胞存活率及单克隆形成数目测定 存活率、单克隆形成数目均为细胞增殖指标。培养结束后,将细胞接种到 96 孔板中,细胞密度为 1×10^5 个 $\cdot\text{孔}^{-1}$ 。加入 20 μL 5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ MTT 溶液(美国 Sigma-Aldrich)孵育 4 h。除去上清液,添加 100 μL 二甲基亚砜。在转染后(72 h)测量细胞存活率。用 Multiskan 酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific)在 490 nm 波长下测量光密度 D 值。存活率 = $(D_{\text{实验组}} - D_{\text{对照组}}) / (D_{\text{实验组}} - D_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。

将每组细胞铺在 6 孔板中(每孔 500 个细胞),在含有 10%(质量分数)胎牛血清的 DMEM 培养基中孵育。2 周后,将单克隆形成细胞用 10%甲醛固定 5 min,并用 1.0%结晶紫(中国碧云天生物科技公司)染色 30 s。在倒置显微镜下计数单克隆形成数目。

1.2.3 细胞凋亡水平测定 转染 72 h 后,将各组细胞铺在 6 孔板中(1×10^5 个/孔⁻¹)。使用膜联蛋白 V-FITC 标记的细胞凋亡检测试剂盒(美国 Invitrogen)检测细胞凋亡。流式细胞仪的 FL1 通道检测 Annexin V-FITC 荧光信号,FL2 通道检测 PI 荧光信号。

1.2.4 细胞血管形成水平测定^[12] 将 4 组 HTR-8/SVNEO 细胞用内皮细胞基础培养基饥饿 24 h,然后置于 96 孔板上。每孔用 60 μ L BD Matrigel 基质(美国 BD Biosciences)包被,并在 37 $^{\circ}$ C 下固化基质胶。将 96 孔板在 CO₂ 培养箱中 37 $^{\circ}$ C 温育 6 h,直到管网完全形成。用立体镜(日本 OLYMPUS IX51)捕获图像,并使用 Image J Angiogenesis Analyzer 1.8.0 插件测定总血管长度和总血管数目。

1.2.5 miR-145、PTEN、AKT、mTOR mRNA 表达水平测定 方法同“1.1.2”。

1.2.6 PTEN、AKT、mTOR、p-AKT、p-mTOR 蛋白表达水平测定 方法同“1.1.3”。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 23.0 对数据进行录入、统计学分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差表示,数据均呈正态分布且方差齐,两两比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,多组间两两比较采用 LSD- t 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

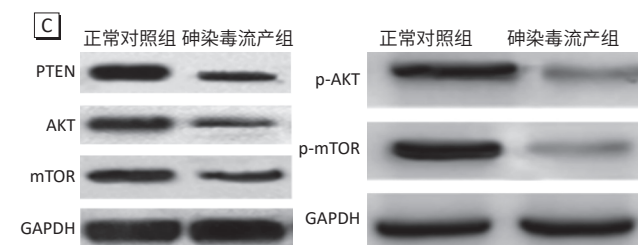
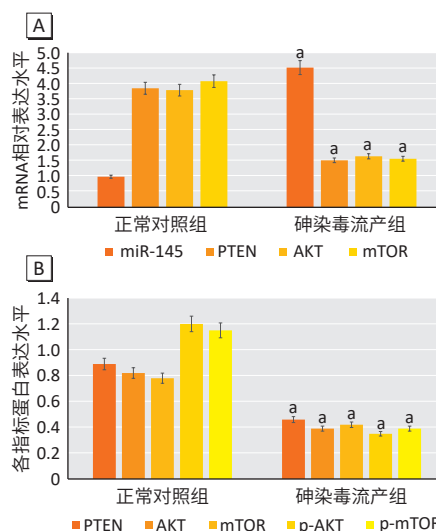
2 结果

2.1 胎盘组织中 miR-145 和 PTEN/AKT/mTOR 通路相关基因及其蛋白的表达

图 1 可见,与正常对照组比较,砷染毒流产组胎盘组织 miR-145 表达水平升高($P<0.05$),PTEN、AKT、mTOR mRNA 及其蛋白和 p-AKT、p-mTOR 蛋白表达水平降低($P<0.05$)。

2.2 各组 HTR-8/SVNEO 细胞存活率、单克隆形成数目的比较

表 1 可见,与对照组比较,砷染毒组、miR-145 过表达组、砷染毒+miR-145 过表达组 HTR-8/SVNEO 细胞存活率、单克隆形成数目降低($P<0.05$);与砷染毒组、miR-145 过表达组比较,砷染毒+miR-145 过表达组存活率、单克隆形成数目降低($P<0.05$)。



[注] A: mRNA 表达水平; B: 蛋白表达水平; C: 蛋白电泳条带。a: 与正常对照组相比, $P<0.05$ 。

图 1 胎盘组织中 miR-145 和 PTEN/AKT/mTOR 通路基因及其蛋白的表达

Figure 1 Expressions of miR-145 and PTEN/AKT/mTOR pathway genes and their proteins in placental tissues

表 1 各组 HTR-8/SVNEO 细胞存活率、单克隆形成数目的比较 ($n=6$)

Table 1 Comparison of cell viability rate and number of monoclonal formation of HTR-8/SVNEO cells in each group ($n=6$)		
组别	存活率/%	单克隆形成数目/个
对照组	92.52 $\pm$ 2.51	399.96 $\pm$ 34.91
砷染毒组	77.54 $\pm$ 2.45 ^a	198.96 $\pm$ 29.96 ^a
miR-145过表达组	79.52 $\pm$ 2.53 ^a	206.52 $\pm$ 35.85 ^a
砷染毒+miR-145过表达组	50.45 $\pm$ 2.57 ^{abc}	106.96 $\pm$ 30.50 ^{abc}
F	296.04	84.08
P	<0.01	<0.01

[注] a: 与对照组相比, $P<0.05$; b: 与砷染毒组相比, $P<0.05$; c: 与 miR-145 过表达组相比, $P<0.05$ 。

2.3 各组 HTR-8/SVNEO 细胞凋亡率、总血管长度、总血管数目的比较

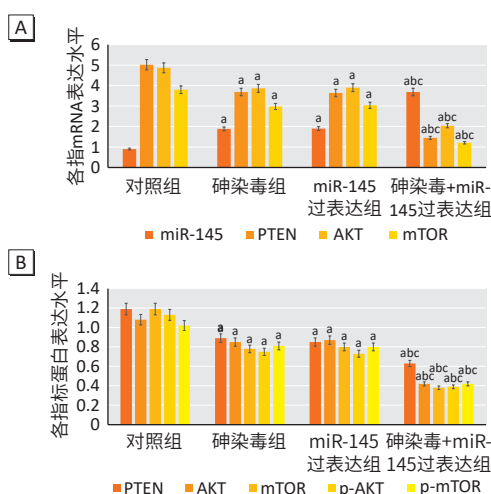
表 2 可见,与对照组比较,砷染毒组、miR-145 过表达组、砷染毒+miR-145 过表达组凋亡率升高($P<0.05$),总血管长度、总血管数目降低($P<0.05$);与砷染毒组、miR-145 过表达组比较,砷染毒+miR-145 过表达组凋亡率升高($P<0.05$),总血管长度、总血管数目降低($P<0.05$)。

表2 各组 HTR-8/SVNEO 细胞对照组凋亡率、总血管长度、总血管数目的比较 ($n=6$)

Table 2 Comparison of apoptosis rate, total blood vessel length, and total blood vessel number of HTR-8/SVNEO cells in each group ($n=6$)

组别	凋亡率/%	总血管长度/ μm	总血管数目/个
对照组	4.26 $\pm$ 3.42	1.31 $\pm$ 0.04	1.34 $\pm$ 0.05
砷染毒组	8.54 $\pm$ 3.85 ^a	0.82 $\pm$ 0.04 ^a	0.89 $\pm$ 0.06 ^a
miR-145过表达组	8.69 $\pm$ 3.89 ^a	0.85 $\pm$ 0.07 ^a	0.92 $\pm$ 0.08 ^a
砷染毒+miR-145过表达组	12.36 $\pm$ 3.39 ^{abc}	0.69 $\pm$ 0.03 ^{abc}	0.58 $\pm$ 0.07 ^{abc}
<i>F</i>	14.950	211.930	134.380
<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01

[注] a: 与对照组相比, $P < 0.05$; b: 与砷染毒组相比, $P < 0.05$; c: 与 miR-145 过表达组相比, $P < 0.05$ 。



[注] A: mRNA 表达水平; B: 蛋白表达水平; C: 蛋白电泳条带。a: 与对照组相比, $P < 0.05$; b: 与砷染毒组相比, $P < 0.05$; c: 与 miR-145 过表达组相比, $P < 0.05$ 。

图2 各组 HTR-8/SVNEO 细胞 miR-145 和 PTEN/AKT/mTOR 通路基因蛋白表达水平比较

Figure 2 Comparison of expressions of miR-145 and PTEN/AKT/mTOR pathway genes and their proteins in HTR-8/SVNEO cells in each group

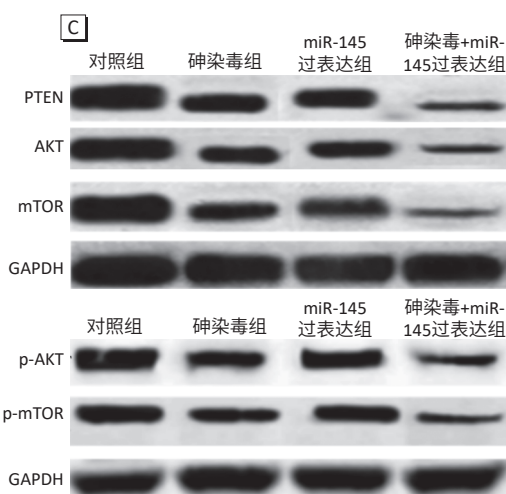
3 讨论

一项针对接触砷的孕妇的前瞻性队列研究发现,随着孕妇产前尿液中砷浓度的增加,流产率及婴儿死亡率明显增加^[13]。胎盘滋养层的发育对于胚胎植入和妊娠至关重要。当胎盘受到多种因素的复合作用时,滋养细胞异常增殖、分化、侵袭和凋亡,这为砷染毒流产提供了细胞学基础^[14]。滋养层细胞过度凋亡,不仅导致细胞结构完整性的破坏,而且导致滋养层功能障碍,这表明滋养层细胞凋亡可能是砷染毒流产中的关键事件。

miRNA 在胎盘植入过程中至关重要。miRNA-145 的异常表达与女性生殖系统疾病有关,包括子宫内膜异位、先兆子痫、异位妊娠和复发性流产^[15]。证据表明 miR-145 与滋养层细胞、增殖、炎症和免疫反应有关,其可调节 Toll 样受体-4 和白细胞介素-17 所依赖

2.4 各组 HTR-8/SVNEO 细胞 miR-145 及 PTEN/AKT/mTOR 通路相关基因及其蛋白表达水平比较

图2可见,与对照组比较,砷染毒组、miR-145 过表达组、砷染毒+miR-145 过表达组 miR-145 mRNA 表达水平升高($P < 0.05$), PTEN、AKT、mTOR mRNA 及其蛋白和 p-AKT、p-mTOR 蛋白表达水平降低($P < 0.05$);与砷染毒组、miR-145 过表达组比较,砷染毒+miR-145 过表达组 miR-145 mRNA 表达水平升高($P < 0.05$), PTEN、AKT、mTOR mRNA 及其蛋白和 p-AKT、p-mTOR 蛋白表达水平降低($P < 0.05$)。



的免疫反应^[16]; miR-145 依赖 Wnt 信号通路抑制滋养层细胞增殖,调节滋养层细胞凋亡、迁移和侵袭^[17]。近期发现,通过饮用水暴露于砷的墨西哥妇女,其 miRNA-145 水平与其流产、畸胎相关^[18]; miRNA-145 与砷诱导的肝、肾、肺、生殖系统损伤具有关联性^[19];在燃煤型砷中毒病区砷暴露人群皮肤、肝、肾、生殖系统损伤过程中,miR-145 也起重要调控作用^[20];此外 miR-145 通过靶向切除修复交叉互补基因 2 参与亚硝酸盐诱导的人类肝细胞 DNA 损伤^[21]。本研究大鼠样本检测结果显示:与正常对照组比较,砷染毒流产组大鼠胎盘组织 miR-145 表达水平明显升高,PTEN、AKT、mTOR mRNA 及其蛋白和 p-AKT、p-mTOR 蛋白表达水平明显降低。这初步表明胎盘组织 miR-145、PTEN、AKT、mTOR 的异常表达与砷染毒流产密切相关。而细胞学研究结果发现:与对照组比较,砷染毒组、miR-145 过表达组

增殖水平、血管形成能力下降,凋亡水平升高;砷染毒+miR-145 过表达组增殖水平、血管形成能力低于砷染毒组、miR-145 过表达组,凋亡水平高于砷染毒组、miR-145 过表达组。这表明砷染毒、miR-145 分别可抑制滋养层细胞 HTR-8/SVNEO 增殖、血管形成,促进其凋亡,而砷染毒协同 miR-145 过表达更加明显地抑制滋养层细胞 HTR-8/SVNEO 增殖、血管形成,促进其凋亡。这与前述研究中 miR-145 抑制滋养层细胞的结果一致。此外,研究已证实 miR-145-3p 可以与 B-细胞淋巴瘤因子 11A 基因的 3'-UTR 区域结合,miR-145 的过表达导致血管内皮中 B-细胞淋巴瘤因子 11A 蛋白的减少^[22]。而本研究中 miR-145 抑制血管生成,可能与该机制有关。

研究发现 miR-145 靶向调节生殖相关基因,而作为 miR-145 靶标的 PTEN 在滋养细胞的增殖凋亡中起关键作用^[23]。miR-145 靶向 PI3K 磷酸化,参与 PI3K/AKT 信号的调节,从而促进 AKT 的磷酸化和该途径下游成分的活化^[24];而 PI3K/AKT 信号通路在滋养细胞迁移和入侵中起着至关重要的作用,这是妊娠建立和维持的基本事件^[25-27]。体外细胞学研究表明,PTEN、AKT、mTOR 的异常表达通过调控上皮细胞-间充质转化过程影响滋养细胞的凋亡、侵袭和迁移^[28];此外 miR-145 可以通过与其 3'-UTR 区域结合来转录后调控 PTEN 在滋养细胞中的表达。本研究结果显示:与对照组比较,砷染毒组、miR-145 过表达组、砷染毒+miR-145 过表达组 miR-145 水平升高,PTEN、AKT、mTOR 磷酸化水平降低;与砷染毒组、miR-145 过表达组比较,砷染毒+miR-145 过表达组 miR-145 水平升高,PTEN、AKT、mTOR 磷酸化水平降低。结合前述动物试验结果中砷染毒流产组胎盘组织 miR-145 表达水平明显升高,PTEN、AKT、mTOR 水平明显降低;砷染毒、miR-145 可抑制滋养层细胞 HTR-8/SVNEO 增殖、血管形成,促进其凋亡这提示,miR-145 可抑制滋养层 HTR-8/SVNEO 细胞 PTEN、AKT、mTOR 磷酸化,进而抑制 PTEN/AKT/mTOR 通路的激活。本研究结果结合前述研究表明,miR-145/PTEN/AKT/mTOR 轴可能通过影响滋养细胞的凋亡、侵袭和迁移而参与砷染毒流产的发病机制。

综上所述,miR-145 可能与砷染毒所致流产有关,miR-145 可抑制滋养层细胞 HTR-8/SVNEO 增殖、血管形成,促进其凋亡;其机制可能与 miR-145 可抑制滋养层 HTR-8/SVNEO 细胞 PTEN、AKT、mTOR mRNA 表达及其磷酸化,进而抑制 PTEN/AKT/mTOR 通路的激活有关。

参考文献

- [1] MILTON AH, HUSSAIN S, AKTER S, et al. A review of the effects of chronic arsenic exposure on adverse pregnancy outcomes[J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2017, 14(6): 556.
- [2] 张兵, 张爱君. 砷的生殖毒性[J]. 中国地方病防治杂志, 2009, 24(6): 411-413.
ZHANG B, ZHANG AJ. Reproductive toxicity of arsenic[J]. *Chin J Control Endem Dis*, 2009, 24(6): 411-413.
- [3] KIM YJ, KIM JM. Arsenic toxicity in male reproduction and development[J]. *Dev Reprod*, 2015, 19(4): 167-180.
- [4] HAN L, ZHAO Y, LUO QQ, et al. The significance of miR-145 in the prediction of preeclampsia[J]. *Bratisl Med J*, 2017, 118(9): 523-528.
- [5] KANG YJ, LEES M, MATTHEWS LC, et al. miR-145 suppresses embryo-epithelial juxtacrine communication at implantation by modulating maternal IGF1R[J]. *J Cell Sci*, 2015, 128(4): 804-814.
- [6] CHUNG DJ, WU YL, YANG MY, et al. *Nelumbo nucifera* leaf polyphenol extract and gallic acid inhibit TNF- α -induced vascular smooth muscle cell proliferation and migration involving the regulation of miR-21, miR-143 and miR-145[J]. *Food Funct*, 2020, 11(10): 8602-8611.
- [7] XU N, PAPAGIANNAKOPOULOS T, PAN GJ, et al. MicroRNA-145 regulates OCT4, SOX2, and KLF4 and represses pluripotency in human embryonic stem cells[J]. *Cell*, 2009, 137(4): 647-658.
- [8] ROOS S, LAGERLÖF O, WENNERGREN M, et al. Regulation of amino acid transporters by glucose and growth factors in cultured primary human trophoblast cells is mediated by mTOR signaling[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2009, 297(3): C723-C731.
- [9] LAGUÉ MN, DETMAR J, PAQUET M, et al. Decidual PTEN expression is required for trophoblast invasion in the mouse[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2010, 299(6): E936-E946.
- [10] TIAN S, YU J, ZHANG Y, et al. Overexpression of PTEN regulated by miR-19b and miR-494 in the villous of recurrent spontaneous abortion patients[J]. *J Immunol*, 2020, 140: 103133.
- [11] 郑冲, 张人华. 砷致雌性大鼠生殖系统损害的研究[J]. 环境与职业医学, 2016, 33(9): 854-857.
ZHENG C, ZHANG RH. Reproductive damage in female rats exposed to arsenic[J]. *J Environ Occup Med*, 2016, 33(9): 854-857.
- [12] AN JN, DU Y, FAN XJ, et al. EGFL6 promotes breast cancer by simultaneously enhancing cancer cell metastasis and stimulating tumor angiogenesis[J]. *Oncogene*, 2019, 38(12): 2123-2134.
- [13] HE WJ, GREENWELL RJ, BROOKS DM, et al. Arsenic exposure in pregnant mice disrupts placental vasculogenesis and causes spontaneous abortion[J]. *Toxicol Sci*, 2007, 99(1): 244-253.
- [14] LI CS, LOCH-CARUSO R. Sodium arsenite inhibits migration of extravillous trophoblast cells in vitro[J]. *Reprod Toxicol*, 2007, 24(3/4): 296-302.
- [15] TIAN QX, XIA SH, WU YH, et al. Comprehensive analysis of the differential expression profile of microRNAs in missed abortion[J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2020, 36(2): 114-121.
- [16] LV Y, LU X, LI CY, et al. miR-145-5p promotes trophoblast cell growth and invasion by targeting FLT1[J]. *Life Sci*, 2019, 239: 117008.
- [17] CHI ZJ, ZHANG ML. Exploration of the regulation and control mechanisms of miR-145 in trophoblast cell proliferation and invasion[J]. *Exp Ther Med*, 2018, 16(6): 5298-5304.
- [18] RUÍZ-VERA T, OCHOA-MARTÍNEZ Á C, ZARAZÚA S, et al. Circulating miRNA-126, -145 and -155 levels in Mexican women exposed to inorganic arsenic via drinking water[J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2019, 67: 79-86.

(下转第 347 页)