

生长分化因子-8 通过调控性别决定区 Y 框蛋白 2 表达影响滋养层细胞增殖、迁移和侵袭的研究

梁 芳¹, 吴珊珊², 刘广申², 钟雪辉¹, 王建华¹

(1.长沙市第四医院, 湖南 长沙 410000; 2.长沙市妇幼保健院, 湖南 长沙 410000)

[摘要]目的 探讨生长分化因子-8(GDF-8)在子痫前期(PE)产妇胎盘组织中的表达,并分析 GDF-8 通过调控性别决定区 Y 框蛋白 2(SOX2)的表达影响滋养层细胞增殖、迁移和侵袭能力的分子机制。方法 收集行剖宫产手术的 PE 产妇和正常产妇的胎盘组织,qRT-PCR 法检测胎盘组织中 GDF-8 mRNA 表达。体外培养人绒毛膜滋养层细胞系 HTR-8/SVneo 细胞,将 pcDNA-GDF-8、pcDNA-NC1、pcDNA-SOX2、pcDNA-NC2、pcDNA-GDF-8+si-SOX2 和 pcDNA-GDF-8+si-NC 分别转染入细胞,用正常培养、不做转染处理的细胞作为对照。qRT-PCR 法检测细胞中 GDF-8 和 SOX2 mRNA 的表达水平。CCK8 法检测细胞增殖能力。EdU 染色并计数实时增殖的活细胞数占比。划痕实验检测细胞迁移能力。Transwell 小室实验测定细胞侵袭能力。Western blot 法检测细胞中 GDF-8、SOX2、增殖细胞核抗原(PCNA)、Ki67、基质金属蛋白酶 2(MMP-2)、MMP-9 蛋白的表达水平。结果 与正常产妇比较,PE 产妇胎盘组织中 GDF-8 mRNA 表达水平降低($t=35.174, P<0.001$)。与 pcDNA-NC1 组比较,pcDNA-GDF-8 组的 HTR-8/SVneo 细胞增殖能力、EdU 染色阳性细胞占比、细胞划痕愈合率以及 PCNA、Ki67、MMP-2 和 MMP-9 蛋白相对表达水平平均升高,细胞侵袭数目增多($t=21.052, 35.174, 47.602, 19.751, 20.519, 28.412, 25.016, 69.453, P<0.001$);细胞中 SOX2 mRNA 和蛋白相对表达水平平均升高($t=31.520, 26.478, P<0.001$)。与 pcDNA-NC2 组比较,pcDNA-SOX2 组的 HTR-8/SVneo 细胞增殖能力、EdU 染色阳性细胞占比、细胞划痕愈合率以及 PCNA、Ki67、MMP-2 和 MMP-9 蛋白相对表达水平平均升高,细胞侵袭数目增多($t=18.025, 26.510, 32.518, 22.690, 21.547, 24.751, 20.957, 59.120, P<0.001$)。与 pcDNA-GDF-8+si-NC 组比较,pcDNA-GDF-8+si-SOX2 组的 HTR-8/SVneo 细胞增殖能力、EdU 染色阳性细胞占比、细胞划痕愈合率以及 PCNA、Ki67、MMP-2 和 MMP-9 蛋白相对表达水平平均降低,细胞侵袭数目减少($t=13.085, 19.250, 26.510, 15.420, 14.862, 24.599, 26.743, 72.061, P<0.001$)。结论 PE 产妇胎盘组织中 GDF-8 表达降低,过表达 GDF-8 可能通过诱导 SOX2 表达促进滋养层细胞增殖、迁移和侵袭,从而影响 PE 的发生发展。

[关键词]子痫前期;滋养层细胞;生长分化因子-8;性别决定区 Y 框蛋白 2;增殖;迁移;侵袭

Doi:10.3969/j.issn.1673-5293.2025.07.002

[中图分类号]R173

[文献标识码]A

[文章编号]1673-5293(2025)07-0007-12

GDF-8 regulates trophoblast cell proliferation, migration, and invasion by modulating SOX2 expression

LIANG Fang¹, WU Shanshan², LIU Guangshen², ZHONG Xuehui¹, WANG Jianhua¹

(1. The Fourth Hospital of Changsha, Hunan Changsha 410000, China;

2. Changsha Maternal and Child Health Hospital, Hunan Changsha 410000, China)

[Abstract]Objective To investigate the expression of growth differentiation factor-8 (GDF-8) in the placental tissue of patients with preeclampsia (PE) and to explore the molecular mechanism by which GDF-8 regulates the proliferation, migration, and invasion of trophoblast cells by modulating the expression of sex determining region Y-box 2 (SOX2). **Methods** Placental tissues were collected from PE patients and healthy pregnant women undergoing cesarean section. The mRNA expression level of GDF-8 in placental tissues was detected by quantitative real-time PCR (qRT-PCR). The human chorionic trophoblast cell line HTR-8/SVneo was cultured in vitro. Cells were transfected with pcDNA-GDF-8, pcDNA-NC1, pcDNA-SOX2, pcDNA-NC2, pcDNA-GDF-8+si-SOX2, and pcDNA-GDF-8+si-NC, respectively. Cells cultured under normal conditions without transfection were used as the control. The mRNA expression levels of GDF-8 and SOX2 were detected by qRT-PCR. Cell proliferation was assessed using the CCK-8 assay. The proportion of EdU-positive proliferating cells was calculated. Cell migration ability was evaluated using a scratch assay, and invasion ability was assessed using the Transwell chamber assay. Western blot analysis was used to determine the protein expression

[收稿日期]2024-12-31

[基金项目]湖南省卫生健康委科研计划项目(B202305016863)

[作者简介]梁 芳(1986—),女,副主任医师,主要从事妇产科内分泌及妇科研究。

[通讯作者]钟雪辉,主任医师。

levels of GDF-8, SOX2, proliferating cell nuclear antigen (PCNA), Ki67, matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), and MMP-9. **Results** Compared with normal pregnant women, the expression level of GDF-8 mRNA in the placental tissue of PE patients was significantly decreased ($t=35.174, P<0.001$). Compared with the pcDNA-NC1 group, the HTR-8/SVneo cells in the pcDNA-GDF-8 group showed significantly enhanced proliferation, increased proportion of EdU-positive cells, improved scratch wound healing rate, upregulated expression of PCNA, Ki67, MMP-2, and MMP-9 proteins, and increased number of invading cells ($t=21.052, 35.174, 47.602, 19.751, 20.519, 28.412, 25.016$ and 69.453 , respectively, $P<0.001$). Both SOX2 mRNA and protein expression levels were also significantly elevated in these cells ($t=31.520$ and 26.478 , respectively, $P<0.001$). Compared with the pcDNA-NC2 group, the pcDNA-SOX2 group exhibited enhanced cell proliferation, higher proportion of EdU-positive cells, improved scratch wound healing rate, upregulated expression of PCNA, Ki67, MMP-2, and MMP-9 proteins, and increased cell invasion ($t=18.025, 26.510, 32.518, 22.690, 21.547, 24.751, 20.957$ and 59.120 , respectively, $P<0.001$). In contrast, compared with the pcDNA-GDF-8+si-NC group, cells in the pcDNA-GDF-8+si-SOX2 group showed reduced proliferation, lower proportion of EdU-positive cells, decreased scratch healing rate, downregulated expression of PCNA, Ki67, MMP-2, and MMP-9, and reduced cell invasion ($t=13.085, 19.250, 26.510, 15.420, 14.862, 24.599, 26.743$ and 72.061 , respectively, $P<0.001$). **Conclusion** The expression of GDF-8 is decreased in the placental tissue of patients with PE. Overexpression of GDF-8 may promote the proliferation, migration, and invasion of trophoblast cells by inducing SOX2 expression, thereby influencing the occurrence and development of PE.

[Key words] preeclampsia; trophoblast cell; GDF-8; SOX2; proliferation; migration; invasion

子痫前期(preeclampsia, PE)是“大产科综合征”之一,是一种危及生命的妊娠相关心血管疾病,以妊娠 20 周时出现高血压和蛋白尿为特征,是孕产妇和围产期发病率和死亡率的主要原因;子痫前期易引发早产^[1-2]。研究发现,人胎盘滋养层细胞增殖、迁移和侵袭的失调可导致胎盘功能障碍和产科并发症,是诱导 PE 发病的主要原因^[3]。积极探索滋养层细胞增殖、迁移和侵袭的精确分子机制对于 PE 的治疗研究具有重要意义。生长分化因子-8(growth differentiation factor-8, GDF-8)最初发现被命名为肌肉生长抑制素,属于转化生长因子 β (transforming growth factor β , TGF- β)超家族的成员,负调节骨骼肌生长^[4]。在人胎盘中能够检测到 GDF-8 的表达,对绒毛膜滋养层细胞具有促侵袭作用,参与子宫肌瘤、PE 和多囊卵巢综合征等生殖功能障碍性疾病的病理生理学^[5-6]。Yoon 等^[7]研究报道,在体外猪试管婴儿胚胎发育中外源性 GDF-8 可通过诱导性别决定区 Y 框蛋白 2(sex determining region Y-box 2, SOX2)的表达影响植入前胚胎发育。SOX2 在胚胎早期发育过程中多能性内细胞团的出现和维持中起着至关重要的作用,缺乏 SOX2 会导致胚胎致死性^[8]。SOX2 对于植入前胚胎中滋养外胚层的形成也十分重要^[9]。最新的研究表明,高血糖诱导的内皮外泌体通过 Pumilio RNA 结合蛋白家族成员 2(pumilio RNA-binding family member 2, PUM2)介导的 SOX2 抑制触发滋养层失调和胎盘异常^[10],提

示 SOX2 可能参与滋养层功能的调控,但 GDF-8 和 SOX2 在滋养层功能中的相关研究较少。基于此,本研究探索 GDF-8 和 SOX2 在滋养层细胞生物学行为中的调控作用以及二者之间的相互作用机制。

1 材料与方法

1.1 临床资料

选择 2020 年 7 月至 2021 年 8 月在本院行剖宫产手术的 PE 产妇 20 例,诊断符合《妊娠期高血压疾病诊治指南(2020)》^[11]中的标准。年龄(29.53 ± 3.12)岁,体质指数(BMI)(27.03 ± 1.81) kg/m^2 ,孕周(37.56 ± 1.72)周。选取同时期行剖宫产手术的正常产妇 20 例,年龄(29.18 ± 3.52)岁, BMI(26.41 ± 1.35) kg/m^2 ,孕周(37.45 ± 1.63)周。PE 产妇的基本资料与正常产妇比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。本研究已获得伦理委员会批准(CSSDSYY-YXLL-SC-2021-10-19)。

1.2 实验细胞

人绒毛膜滋养层细胞系 HTR-8/SVneo 细胞(货号 C1016,批号 230911451,上海盈湾生物科技有限公司)。

1.3 试剂与仪器

RPMI1640 培养基(货号 LM87077C,批号 L453789,上海联迈生物工程有限公司);胎牛血清(货号 35-081-CV,批号 HY4354089,上海华雅思创

生物科技有限公司);GDF-8 过表达质粒(pcDNA-GDF-8)及空载体对照质粒(pcDNA-NC1)、SOX2 过表达质粒(pcDNA-SOX2)及空载体对照质粒(pcDNA-NC2)(南京金斯瑞生物科技有限公司);SOX2 小干扰 RNA 序列(si-SOX2)及阴性对照序列(si-NC)(上海吉玛公司);Lipofectamin 3000 转染试剂盒(货号 11668019,批号 300015000),SYBR Premix Ex Taq 试剂盒(货号 11790200,批号 S751400050)均购自美国 Thermo Fisher 公司;CCK-8 试剂盒(货号 40203ES60,批号 E7548610,艾美捷科技有限公司);RNA Easy Fast 动物组织/细胞总 RNA 提取试剂盒(货号 DP451,批号 D45012-11),FastKing 一步法除基因组 cDNA 第一链合成预混试剂(货号 KR118,批号 K35722-03)购自天根生化科技(北京)有限公司。EdU 染色试剂盒(货号 90603-6,批号 EU4385172-2,上海雅吉生物科技有限公司);Transwell 小室(货号 3450,批号 TW121543,北京杰辉博高生物技术有限公司);Matrigel 基质胶(货号 354230,批号 C44505,美国 Corning 公司);GDF-8 抗体(货号 ABP54505,批号 174530-1)、SOX2 抗体(货号 PACO33706,批号 353542-3)、增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen,PCNA)抗体(货号 CAF50250,批号 127453-6)、Ki67 抗体(货号 10R-KR001,批号 274618-2)、基质金属蛋白酶 2(matrix metalloproteinase 2,MMP-2)抗体(货号 5562R-30T,批号 334545-1)、基质金属蛋白酶 9(matrix metalloproteinase 9,MMP-9)抗体(货号 A-ABV10387,批号 131451-2)、GAPDH 抗体(货号 CAF50124,批号 224522-1)以及生物素偶联的山羊抗兔 IgG(H+L)二抗(货号 NDC-ABB-MBLT0Z-1,批号 130104-2,武汉艾美捷科技有限公司)。

Tanon 1600 型全自动数码凝胶图像分析系统(上海天能有限公司);Synergy H1 型多功能酶标仪[美国伯腾仪器有限公司(BioTek)];BX53 型荧光显微镜(奥林巴斯株式会社)。

1.4 方法

1.4.1 qRT-PCR 法检测胎盘组织中 GDF-8 基因表达

使用 TRIzol 试剂和 RNA Easy Fast 动物组织/细胞总 RNA 提取试剂盒提取胎盘组织中总 RNA。

使用 FastKing 一步法除基因组 cDNA 第一链合成预混试剂反转录合成 cDNA。使用 SYBR Premix Ex Taq 试剂盒在 qRT-PCR 仪上进行 qRT-PCR 分析。qRT-PCR 扩增引物序列见表 1。反应条件为:95℃ 5min;95℃ 45s,60℃ 45s,72℃ 60s,(此步骤采集荧光信号);共进行 40 个循环。以 GAPDH 为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对目的基因表达量进行相对定量。

1.4.2 细胞培养

HTR-8/SVneo 细胞培养于添加 10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素的 RPMI1640 完全培养基中,置于 37℃ 恒温、湿润的 5%CO₂ 的细胞培养箱中培养。每 2~3d 换液一次,选取生长状态良好的指数生长期细胞进行后续实验。

1.4.3 细胞分组与转染

指数生长期的 HTR-8/SVneo 细胞,种 1×10^5 个/孔接种于 24 孔板,细胞贴壁后按照分组进行转染。根据转染载体不同,分别用 pcDNA-GDF-8、pcDNA-NC1、pcDNA-SOX2、pcDNA-NC2、pcDNA-GDF-8+si-SOX2 和 pcDNA-GDF-8+si-NC 转染细胞,分为 pcDNA-GDF-8 组、pcDNA-NC1 组、pcDNA-SOX2 组、pcDNA-NC2 组、pcDNA-GDF-8+si-SOX2 组和 pcDNA-GDF-8+si-NC 组。用正常培养、不做转染处理的细胞为对照组。细胞转染过程严格按照 Lipofectamin 2000 转染试剂盒说明书进行,转染 48h 后,采用 qRT-PCR 法和 Western blot 法检测转染效率。

1.4.4 qRT-PCR 法检测 HTR-8/SVneo 细胞中 GDF-8 和 SOX2 基因表达

实验操作过程同 1.4.1,实验所用引物序列见表 1。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因	序列(5'—3')	预期扩增产物长度(bp)
GDF-8	上游 TTTTACCCAAAGCTCCTCCA	112
	下游 GAGTCTCGACGGGTCTCAAA	
SOX2	上游 GACCAGCTCGCAGACCTACAT	86
	下游 ATGGAGCCAAGAGCCATGC	
GAPDH	上游 GAGTCAACGGAT TTGGTCGT	178
	下游 GACAAGCTTCCC GTTCTCAG	

1.4.5 Western blot 法检测 HTR-8/SVneo 细胞中相关蛋白因子的表达

在 RIPA 裂解缓冲液中裂解 HTR-8/SVneo 细胞提取蛋白质,用 BCA 试剂盒定量。取 10 μ g 蛋白样品进行 10%SDS-PAGE 分离,并转移到 PVDF 膜上。用 5%脱脂牛奶的 TBS-T 缓冲液,于室温封闭膜 1h,TBS-T 洗膜 3 次,向膜上分别滴加一抗,在 4℃下共同孵育过夜,一抗为 GDF-8(1:1 500)、SOX2(1:1 500)、PCNA(1:1 500)、Ki67(1:1 500)、MMP-2(1:1 000)、MMP-9(1:1 000)、GAPDH(1:1 000)。次日,TBS-T 洗膜 3 次,滴加二抗(1:5 000),在室温下与膜共同孵育 2h,TBS-T 洗膜 3 次。采用 ECL 化学发光底物显影目的蛋白条带。凝胶成像系统拍照,使用 Image J 软件测定蛋白条带灰度值。

1.4.6 CCK-8 法检测 HTR-8/SVneo 细胞活力

HTR-8/SVneo 细胞,种 1 $\times$ 10³ 个/孔于 96 孔板,细胞培养 24h,弃培养基,更换成含有 10% CCK-8 试剂的培养基,继续孵育 4h 后,上机酶标仪,在 450nm 处测定各孔吸光度(OD)值,以 OD 值指示细胞增殖能力。

1.4.7 EdU 染色实验检测 HTR-8/SVneo 细胞增殖能力

HTR-8/SVneo 细胞,种 1 $\times$ 10⁵ 个/孔于 24 孔培养板,常规培养 24h,弃培养基,每孔加 100 μ L EdU 工作液(50 μ mol/L),培养箱中孵育 2h。4%多聚甲醛固定 30min;每孔加入 100 μ L Triton X-100 通透液(0.5%),室温孵育 15min;每孔加入 100 μ L 的 1 $\times$ Apollo 染色反应液,室温避光孵育 30min,弃反应液;用 DAPI 染液复染细胞核(蓝色)30min。荧光显微镜下镜检拍照,计算 EdU 染色阳性细胞占比。EdU 染色阳性细胞(红色)占比=红色细胞数/蓝色细胞数 $\times$ 100%。

1.4.8 划痕实验检测 HTR-8/SVneo 细胞迁移能力

收集各组 HTR-8/SVneo 细胞,按 1 $\times$ 10⁴ 个/孔密度接种至 6 孔板,培养 24h 后,用 200 μ L 移液枪的枪头在细胞上进行单层划线,做好标记,培养箱内继续培养 24h 后,于显微镜下拍照细胞划痕,细胞划痕愈合率=(0h 划痕距离-24h 划痕距离)/0h 划痕距

离 $\times$ 100%。

1.4.9 Transwell 小室测定 HTR-8/SVneo 细胞侵袭能力

按 1:8 的比例用无血清培养基稀释 Matrigel。取 50 μ L Matrigel 包被 Transwell 小室。HTR-8/SVneo 细胞,接种 1 $\times$ 10⁵/mL 至 Transwell 小室,下室 24 孔板中添加 600 μ L RPMI1640 完全培养基。连续培养 24h 后,用棉签轻轻擦去 Transwell 小室内膜细胞,用 4%多聚甲醛固定外膜细胞,0.1%的结晶紫染色。使用光学显微镜拍照并计数细胞。

1.5 统计学处理

采用 Prism GraphPad v8 软件进行统计学分析。以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)的形式表示计量数据。两组间比较采用 *t* 检验;多组间比较采用单因素方差分析,并采用事后 Turkey's 检验进行组间多重比较分析。以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PE 产妇与正常产妇胎盘组织中 GDF-8 mRNA 表达水平测定和比较

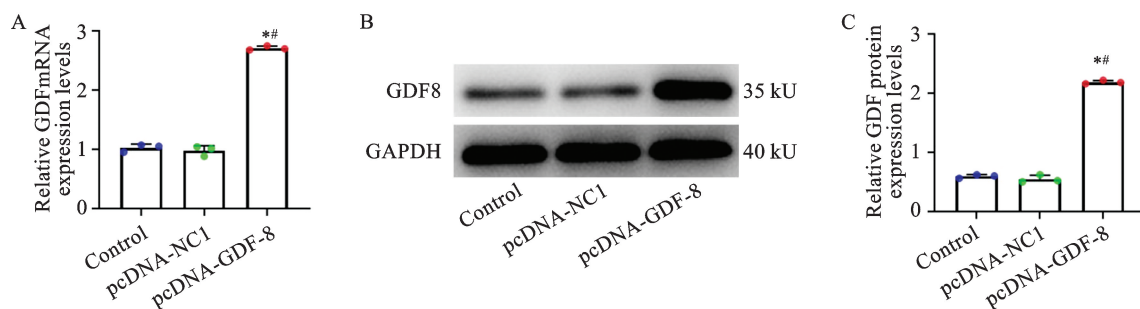
与正常产妇比较,PE 产妇胎盘组织中 GDF-8 mRNA(0.47 $\pm$ 0.05 *vs.* 1.00 $\pm$ 0.10)显著降低(*t*=35.174,*P*<0.001)。

2.2 过表达 GDF-8 对滋养层细胞增殖的影响

与对照比较,pcDNA-GDF-8 组 GDF-8 mRNA 表达水平和蛋白相对表达水平均显著升高(*t*=12.510、12.608,*P*<0.001);与 pcDNA-NC1 组比较,pcDNA-GDF-8 组细胞中 GDF-8 mRNA 表达水平和蛋白相对表达水平均显著升高(*t*=12.659、12.760,*P*<0.05),图 1。与 pcDNA-NC1 组比较,pcDNA-GDF-8 组细胞增殖能力、EdU 染色阳性细胞占比、细胞中 PCNA 蛋白表达水平和 Ki67 蛋白表达水平均显著升高(*t*=21.052、35.174、19.751、20.519,*P*<0.001),图 2 和图 3。

2.3 过表达 GDF-8 对滋养层细胞迁移和侵袭的影响

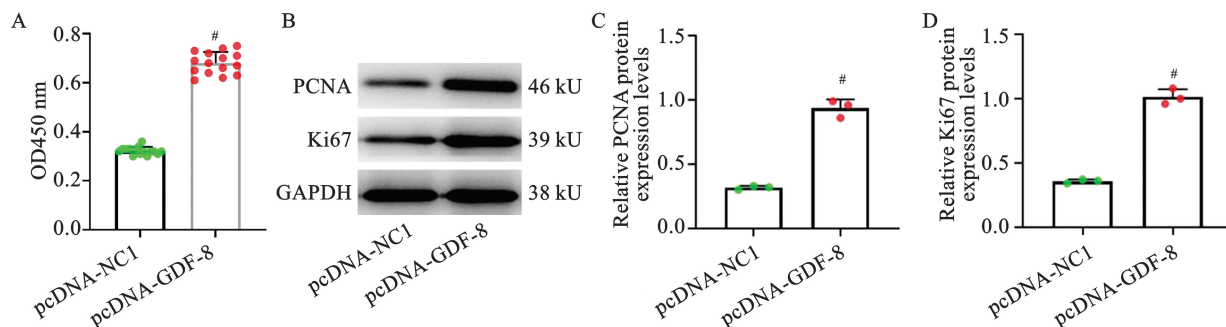
与 pcDNA-NC1 组比较,pcDNA-GDF-8 组细胞划痕愈合率、侵袭数目、MMP-2 蛋白表达水平和 MMP-9 蛋白相对表达水平均显著升高(*t*=47.602、69.453、28.412、25.016,*P*<0.001),图 4。



注:A 图为 qRT-PCR 检测细胞中 GDF-8 mRNA 表达水平;B、C 图为 Western blot 检测细胞中 GDF-8 蛋白表达水平;与 Control 组比较, * $P < 0.05$, 与 pcDNA-NC1 组比较, # $P < 0.05$ 。

图 1 转染 pcDNA-GDF-8 后 HTR-8/SVneo 细胞中 GDF-8 mRNA 和蛋白表达水平

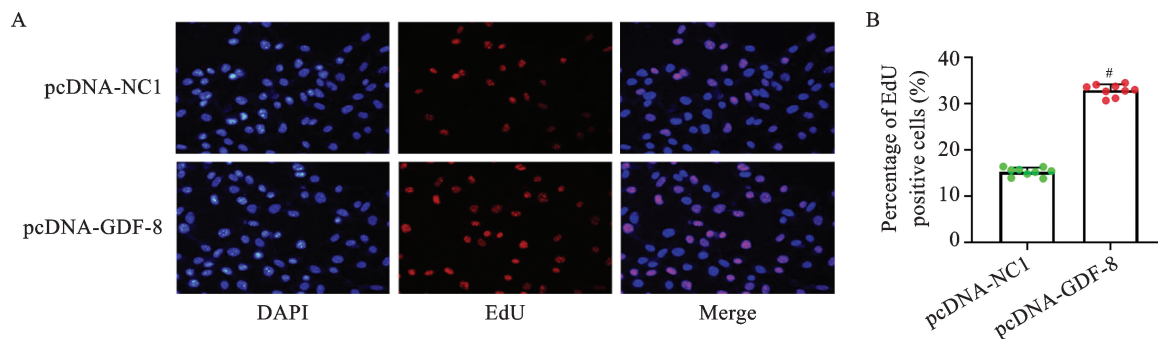
Fig.1 Expression levels of GDF-8 mRNA and protein in HTR-8/SVneo cells after transfection with pcDNA-GDF-8



注:A 图为 CCK-8 法检测细胞增殖能力;B、C、D 图为 Western blot 检测细胞内相关蛋白表达水平;与 pcDNA-NC1 组比较, # $P < 0.05$ 。

图 2 过表达 GDF-8 对滋养层细胞增殖和增殖蛋白表达的影响

Fig.2 Effect of GDF-8 overexpression on trophoblast cell proliferation and expression of proliferation-related proteins



注:A 图为 EdU 染色结果;B 图为 EdU 染色阳性细胞占比统计柱状图;与 pcDNA-NC1 组比较, # $P < 0.05$ 。

图 3 荧光显微镜下观察过表达 GDF-8 对滋养层细胞增殖的影响(EdU 染色, $\times 200$)

Fig.3 Effect of GDF-8 overexpression on trophoblast cell proliferation observed under a fluorescence microscope (EdU staining, $\times 200$)

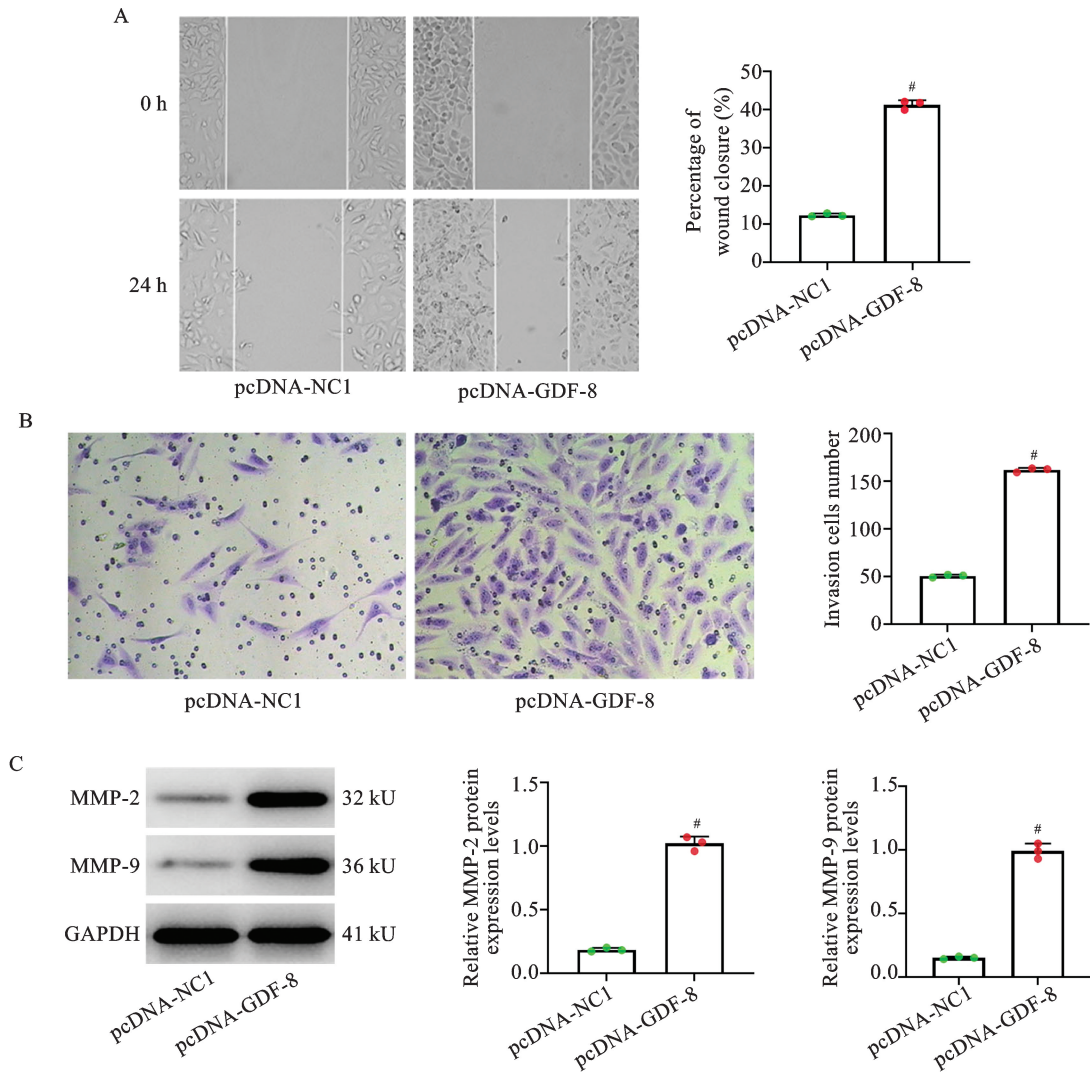
2.4 过表达 GDF-8 对滋养层细胞 SOX2 表达的影响

与 pcDNA-NC1 组比较, pcDNA-GDF-8 组细胞中 SOX2 mRNA 和 SOX2 蛋白相对表达水平均显著升高($t = 31.520, 26.478, P < 0.001$), 图 5。

2.5 过表达 SOX2 对滋养层细胞增殖的影响

与对照比较, pcDNA-SOX2 组细胞中 SOX2 mRNA 和 SOX2 蛋白相对表达水平均显著升高

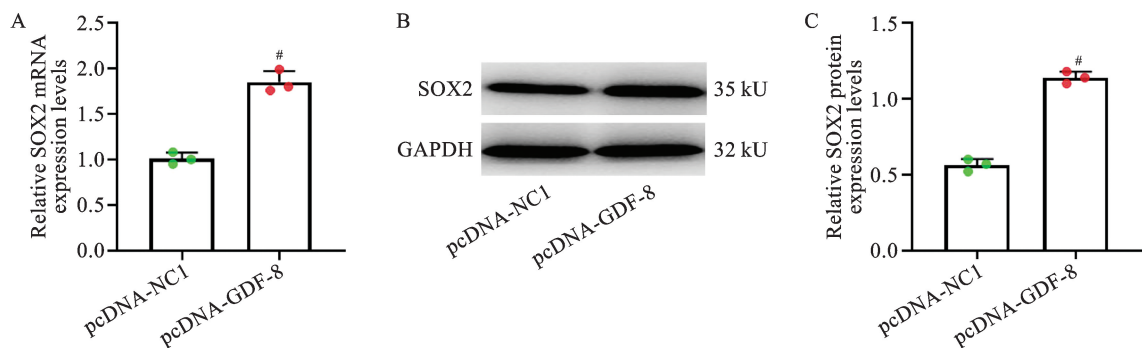
($t = 14.666, 14.329, P < 0.001$); 与 pcDNA-NC2 组比较, pcDNA-SOX2 组细胞中 SOX2 mRNA 和 SOX2 蛋白相对表达水平均显著升高($t = 14.795, 14.452, P < 0.05$), 图 6。与 pcDNA-NC2 组比较, pcDNA-SOX2 组细胞增殖能力、细胞中 PCNA 蛋白表达水平和 Ki67 蛋白相对表达水平、EdU 染色阳性细胞占比均显著升高($t = 18.025, 22.690, 21.547, 26.510, P < 0.001$), 图 7 和图 8。



注: A 图为划痕细胞迁移实验结果; B 图为 Transwell 细胞侵袭实验结果($\times 200$); C 图为 Western blot 实验结果; 与 pcDNA-NC1 组比较, $^{\#}P < 0.05$ 。

图 4 过表达 GDF-8 对滋养层细胞迁移、侵袭和侵袭蛋白表达的影响

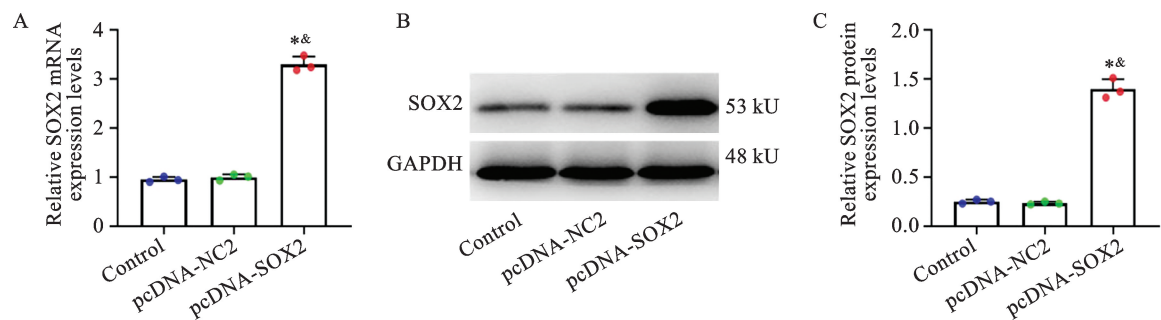
Fig.4 Effect of GDF-8 overexpression on trophoblast cell migration, invasion, and expression of invasion-related proteins



注: A 图为 qRT-PCR 检测 SOX2 mRNA 表达水平结果; B、C 图为 Western blot 检测 SOX2 蛋白表达水平结果; 与 pcDNA-NC1 组比较, $^{\#}P < 0.05$ 。

图 5 过表达 GDF-8 对滋养层细胞 SOX2 表达的影响

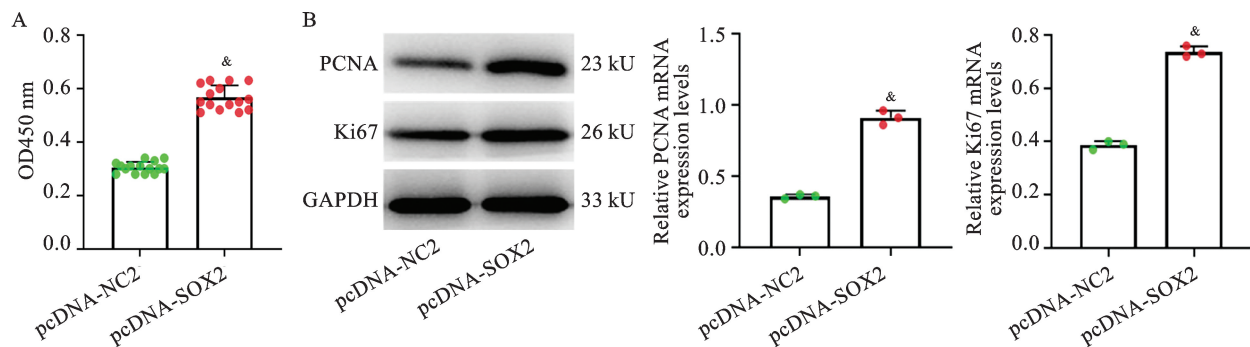
Fig.5 Effect of GDF-8 overexpression on the expression of SOX2 in trophoblast cells



注:A 图为 qRT-PCR 检测 SOX2 mRNA 表达水平;B、C 图为 Western blot 检测 SOX2 蛋白表达水平;与 Control 组比较,
* $P<0.05$;与 pcDNA-NC2 组比较,& $P<0.05$ 。

图 6 转染 pcDNA-SOX2 后 HTR-8/SVneo 细胞中 SOX2 mRNA 和蛋白表达水平

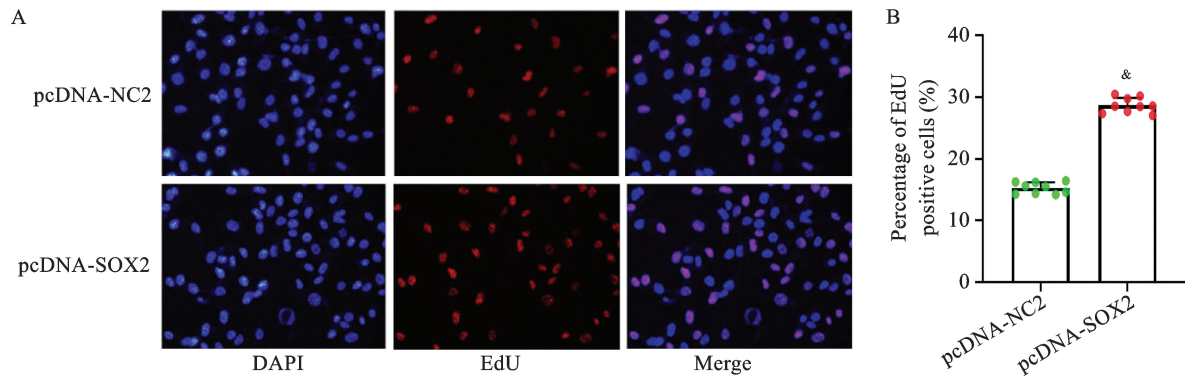
Fig.6 Expression levels of SOX2 mRNA and protein in HTR-8/SVneo cells after transfection with pcDNA-SOX2



注:A 图为 CCK-8 法检测细胞增殖能力;B 图为 Western blot 实验结果;与 pcDNA-NC2 组比较,& $P<0.05$ 。

图 7 过表达 SOX2 对滋养层细胞增殖和增殖蛋白表达的影响

Fig.7 Effect of overexpression of SOX2 on trophoblast cell proliferation and expression of proliferation-related proteins



注:A 图为 EdU 染色结果;B 图为 EdU 染色阳性细胞占比统计柱状图;与 pcDNA-NC2 组比较,& $P<0.05$ 。

图 8 荧光显微镜下观察过表达 SOX2 对滋养层细胞增殖的影响(EdU 染色, $\times 200$)

Fig.8 Effect of overexpression of SOX2 on trophoblast cell proliferation under
fluorescence microscope (EdU staining, $\times 200$)

2.6 过表达 SOX2 对滋养层细胞迁移和侵袭的影响

与 pcDNA-NC2 组比较,pcDNA-SOX2 组细胞

划痕愈合率、侵袭数目、MMP-2 蛋白表达水平和 MMP-9 蛋白相对表达水平均显著升高($t=32.518$ 、 59.120 、 24.751 、 20.957 , $P<0.001$),图 9。

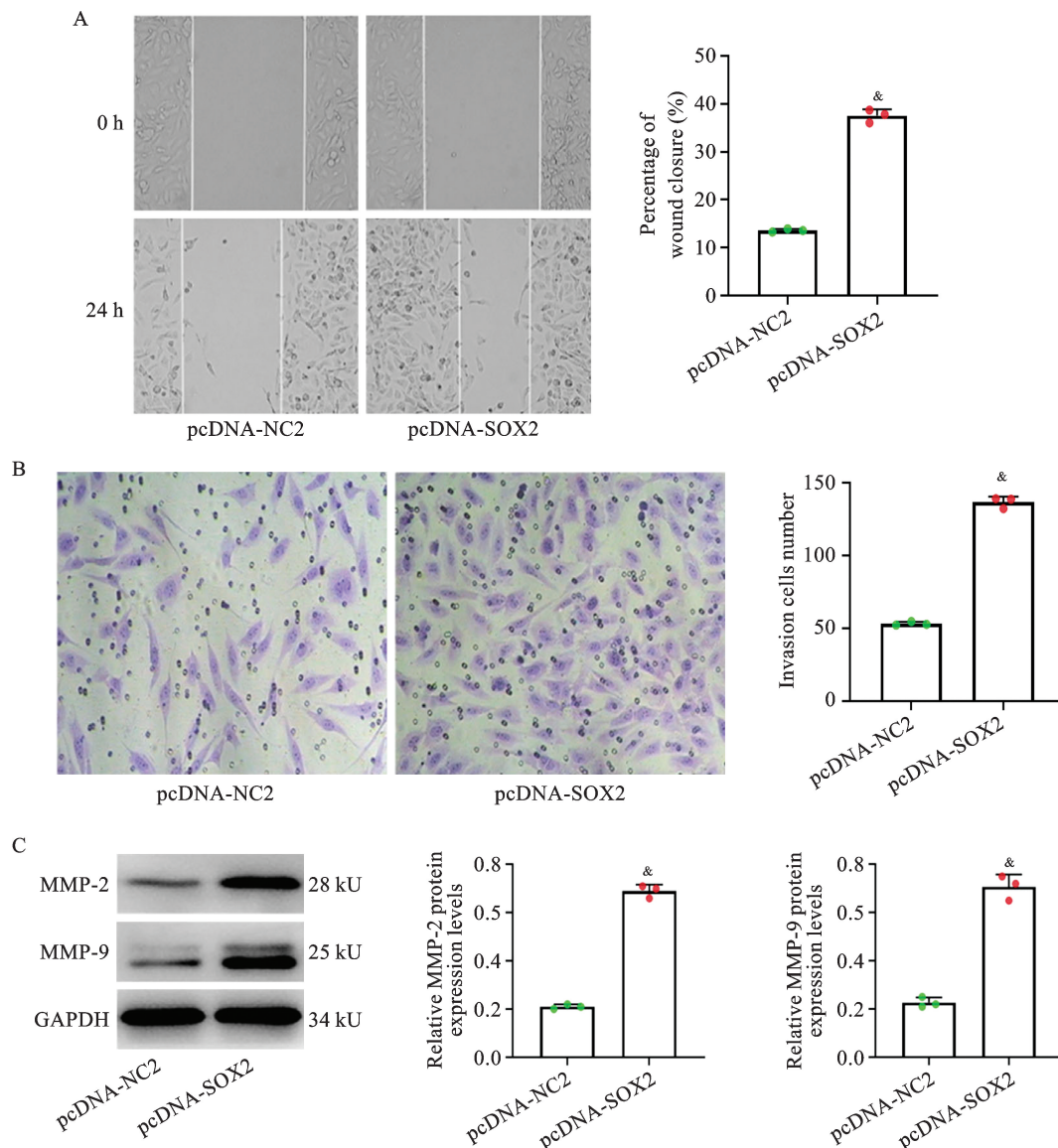
2.7 沉默 SOX2 对过表达 GDF-8 调控滋养层细胞增殖的影响

与 pcDNA-GDF-8 组比较, pcDNA-GDF-8 + si-SOX2 组细胞中 SOX2 mRNA 和 SOX2 蛋白相对表达水平均显著降低($t = 12.276, 11.091, P < 0.001$); 与 pcDNA-GDF-8 + si-NC 组比较, pcDNA-GDF-8 + si-SOX2 组细胞中 SOX2 mRNA 和 SOX2 蛋白相对表达水平均显著降低($t = 12.442, 11.365, P < 0.05$), 图 10。与 pcDNA-GDF-8 + si-NC 组比较, pcDNA-GDF-8 + si-SOX2 组细胞增殖能力、细胞中 PCNA

蛋白表达水平和 Ki67 蛋白相对表达水平、EdU 染色阳性细胞占比均显著降低($t = 13.085, 15.420, 14.862, 19.250, P < 0.001$), 图 11 和图 12。

2.8 沉默 SOX2 对过表达 GDF-8 调控滋养层细胞迁移和侵袭的影响

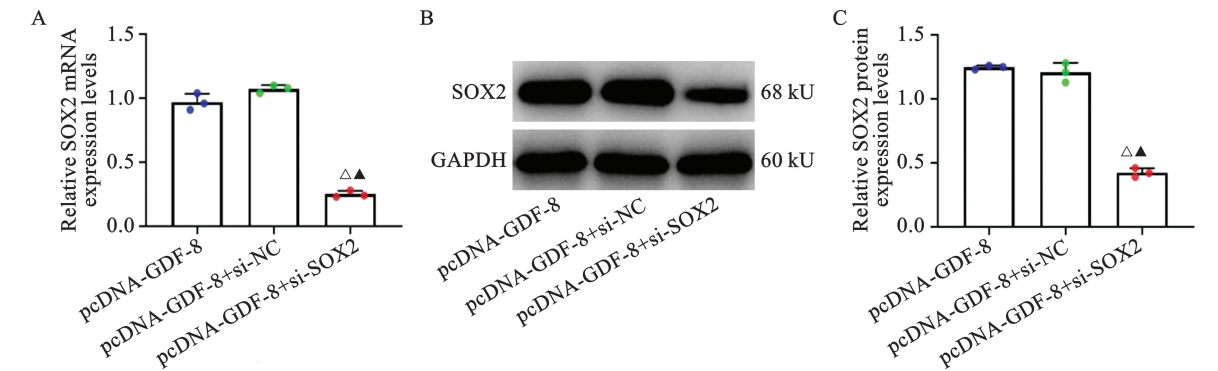
与 pcDNA-GDF-8 + si-NC 组比较, pcDNA-GDF-8 + si-SOX2 组细胞划痕愈合率、侵袭数目、细胞中 MMP-2 蛋白表达水平和 MMP-9 蛋白相对表达水平均显著降低($t = 26.510, 72.061, 24.599, 26.743, P < 0.001$), 图 13。



注: A 图为划痕细胞迁移实验结果; B 图为 Transwell 细胞侵袭实验结果($\times 200$); C 图为 Western blot 实验结果; 与 pcDNA-NC2 组比较, $^{\&}P < 0.05$ 。

图 9 过表达 SOX2 对滋养层细胞迁移、侵袭和侵袭蛋白表达的影响

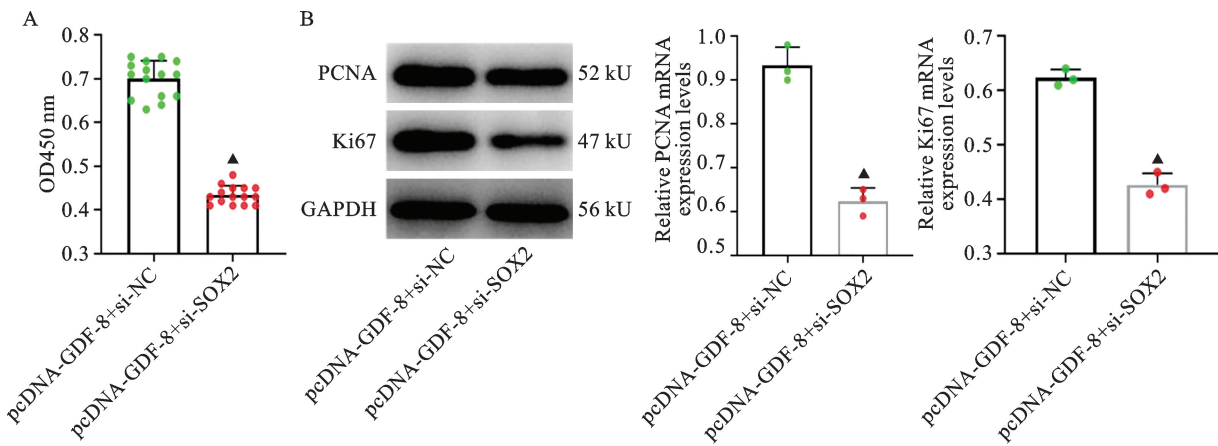
Fig.9 Effect of overexpression of SOX2 on trophoblast cell migration, invasion, and expression of invasion-related proteins



注:A 图为 qRT-PCR 检测 SOX2 mRNA 表达水平;B 图为 Western blot 检测 SOX2 蛋白表达水平;与 pcDNA-GDF-8 组比较, $\Delta P < 0.05$;与 pcDNA-GDF-8+si-NC 组比较, $\blacktriangle P < 0.05$ 。

图 10 转染 pcDNA-GDF-8+si-NC 后 HTR-8/SVneo 细胞中 SOX2 mRNA 和蛋白表达水平

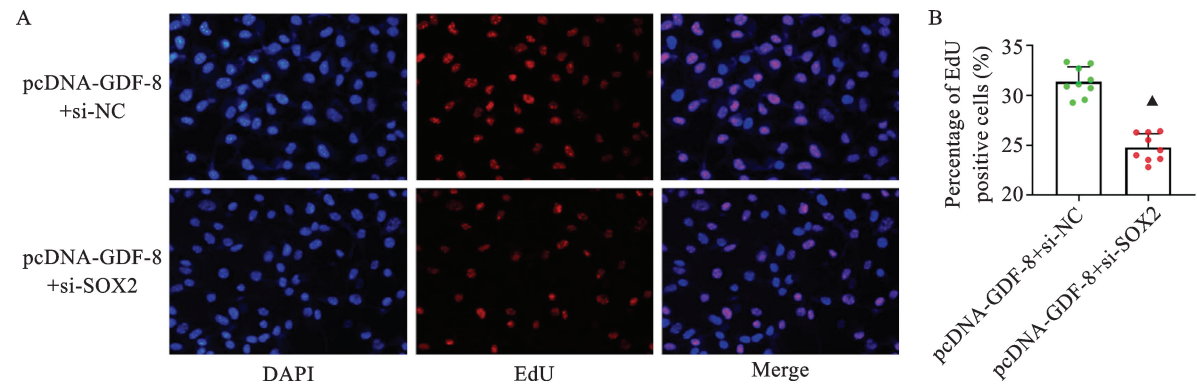
Fig.10 Expression levels of SOX2 mRNA and protein in HTR-8/SVneo cells after transfection with pcDNA-GDF-8+si-NC



注:A 图为 CCK-8 法检测细胞增殖能力;B 图为 Western blot 实验结果;与 pcDNA-GDF-8+si-NC 组比较, $\blacktriangle P < 0.05$ 。

图 11 沉默 SOX2 对过表达 GDF-8 调控滋养层细胞增殖和增殖蛋白表达的影响

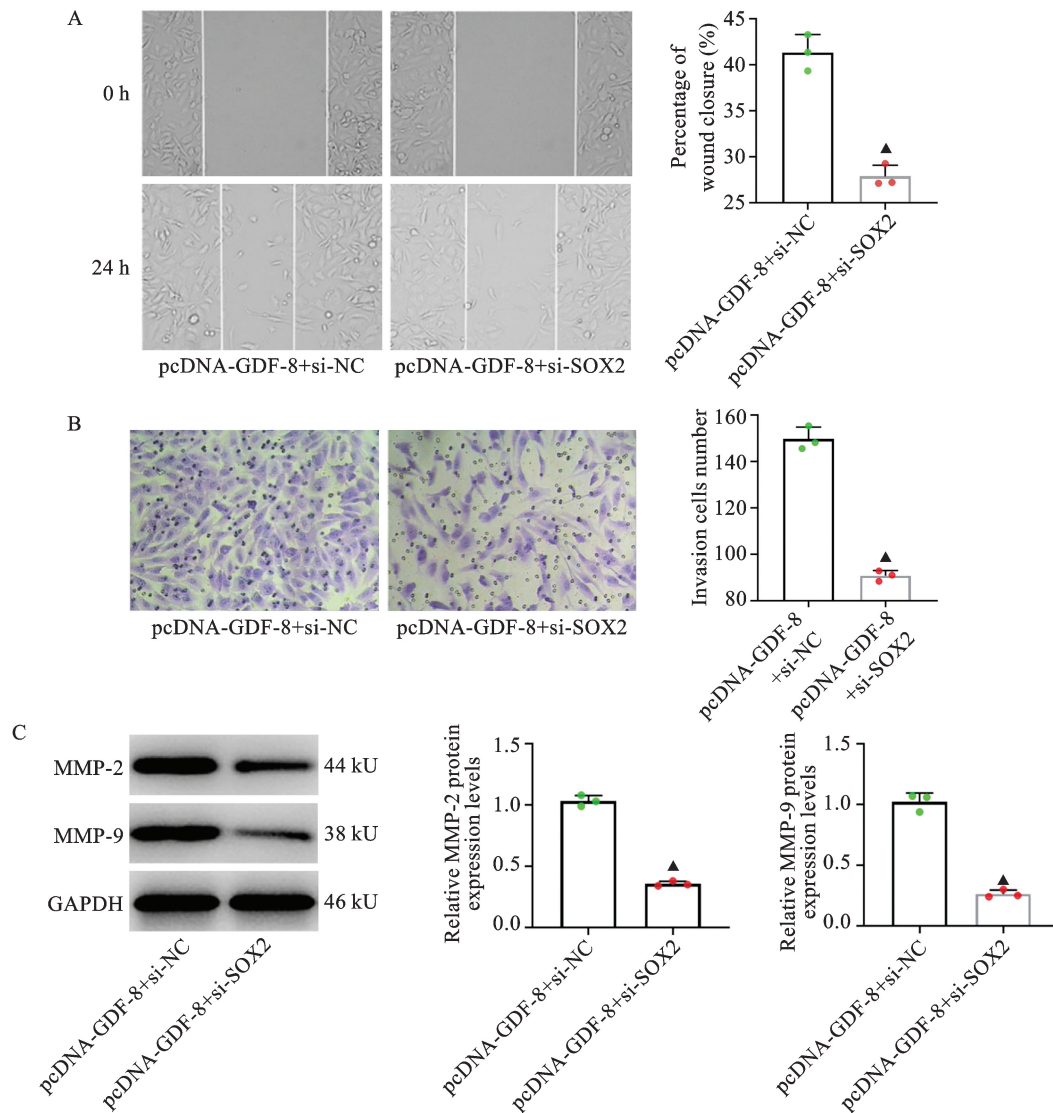
Fig.11 Effects of silencing SOX2 on GDF-8 overexpression-induced proliferation and proliferation-related protein expression in trophoblast cells



注:A 图为 EdU 染色实验结果;B 图为 EdU 染色阳性细胞占比统计柱状图;与 pcDNA-GDF-8+si-NC 组比较, $\blacktriangle P < 0.05$ 。

图 12 荧光显微镜下观察沉默 SOX2 对过表达 GDF-8 调控滋养层细胞增殖的影响(EdU 染色, $\times 200$)

Fig.12 Effects of silencing SOX2 on GDF-8 overexpression-induced proliferation in trophoblast cells observed under a fluorescence microscope (EdU staining, $\times 200$)



注：A 图为划痕细胞迁移实验结果；B 图为 Transwell 细胞侵袭实验结果（ $\times 200$ ）；C 图为 Western blot 实验结果；与 pcDNA-GDF-8+si-NC 组比较， $\blacktriangle P < 0.05$ 。

图 13 沉默 SOX2 对过表达 GDF-8 调控滋养层细胞迁移、侵袭和侵袭蛋白表达的影响

Fig.13 Effects of silencing SOX2 on GDF-8 overexpression-induced migration, invasion, and invasion-related protein expression in trophoblast cells

3 讨论

3.1 GDF-8 调控滋养层细胞的生物学行为

目前认为 PE 的主要病因和病理生理在于胎盘，胎盘外滋养层细胞的增殖降低和异常分化是 PE 发生的基础^[12]，而胎盘细胞滋养层侵入畸形、滋养层侵入受损、母体螺旋动脉重塑不充分导致胎盘缺血缺氧是 PE 发生发展的第一步^[13]。GDF-8 已被证实参与多种疾病中细胞增殖、迁移和侵袭的调控^[14-15]。Fang 等^[16]研究发现，GDF-8 通过诱导 ALK5-SMAD2/3 介导的 MMP-2 表达刺激滋养层细胞侵袭。本研究检测发现，PE 产妇胎盘组织中

GDF-8 表达显著降低。在此基础上体外培养滋养层 HTR-8/SVneo 细胞，分析过表达 GDF-8 对 HTR-8/SVneo 细胞增殖、迁移和侵袭的影响，结果显示，过表达 GDF-8 促进了其增殖、迁移和侵袭能力，证实 GDF-8 参与了 HTR-8/SVneo 细胞的生物学行为。

3.2 GDF-8 通过介导相关蛋白表达调控滋养层细胞的生物学行为

PCNA 和 Ki67 是滋养层细胞增殖相关标志物蛋白因子^[17]。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)是血管和子宫重塑的重要调节因子，也是细胞迁移、侵袭的主要蛋白分子。MMPs 已被证明在滋养层侵入子宫壁的过程中表现出蛋白水

解活性, MMPs 酶的失调与妊娠高血压、PE 相关^[18]。研究表明, 诱导 MMP-2 和 MMP-9 表达可促进滋养层细胞迁移和侵袭^[19]。本研究结果显示, GDF-8 的过表达显著上调了 PCNA、Ki67、MMP-2 和 MMP-9 的蛋白表达。该结果表明, 过表达 GDF-8 可能通过诱导上述蛋白表达促进 HTR-8/SVneo 细胞的增殖、迁移和侵袭能力。

3.3 过表达 GDF-8 通过介导 SOX2 的表达调控滋养层细胞的生物学行为

SOX2 是性别决定区 Y 基因家族的成员之一, 对许多发育过程的正常进行至关重要。大量研究表明, SOX2 表达的增加参与促进细胞增殖能力、上皮-间质转化、迁移和侵袭能力^[20-22]。本研究中, 过表达 GDF-8 显著增加了 HTR-8/SVneo 细胞中 SOX2 mRNA 和蛋白表达水平。过表达 SOX2 促进细胞的增殖、迁移和侵袭。同时, 过表达 SOX2 也上调 PCNA、Ki67、MMP-2 和 MMP-9 蛋白的表达。该结果提示, 过表达 GDF-8 可能通过上调 SOX2 表达促进 HTR-8/SVneo 细胞的增殖能力、迁移和侵袭能力。为进一步确定 HTR-8/SVneo 细胞中 GDF-8 和 SOX2 的调控关系, 本研究在细胞中过表达 GDF-8 的同时使用沉默 SOX2 表达, 结果发现, 沉默 SOX2 表达明显减弱了过表达 GDF-8 对 HTR-8/SVneo 细胞增殖、迁移和侵袭的促进作用, 沉默 SOX2 表达亦减弱了过表达 GDF-8 对 HTR-8/SVneo 细胞中 PCNA、Ki67、MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达的上调作用。证实 SOX2 可能是 GDF-8 调节 HTR-8/SVneo 细胞生物学行为的关键因子之一, 过表达 GDF-8 介导的 HTR-8/SVneo 细胞增殖、迁移和侵袭的提升能够被沉默 SOX2 表达部分逆转。

综上所述, GDF-8 可能通过上调 SOX2 表达促进 HTR-8/SVneo 细胞增殖能力、迁移和侵袭能力, 以阻遏 PE 的进展。本研究揭示了 PE 的发病机制中的新的重要因子, 为 PE 的治疗提供了新的治疗靶点。目前本研究不足之处在于仅在体外细胞层面开展了实验, 后期仍需在体内实验进一步验证。

[参考文献]

[1] Rana S, Lemoine E, Granger J P, et al. Preeclampsia: pathophysiology, challenges, and perspectives [J]. Circ

Res, 2019, 124(7):1094-1112.

- [2] Ma'ayeh M, Costantine M M. Prevention of preeclampsia [J]. Semin Fetal Neonatal Med, 2020, 25(5):101123.
- [3] 江伟杰, 贺海波, 唐红波, 等. 胎盘组织核因子- κ B 与妊娠并发症关系研究进展 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2021, 26(1):82-87.
- [4] Lee S J. Myostatin: a skeletal muscle chalone [J]. Annu Rev Physiol, 2023, 85:269-291.
- [5] Wang S, Fang L, Cong L, et al. Myostatin: a multifunctional role in human female reproduction and fertility—a short review [J]. Reprod Biol Endocrinol, 2022, 20(1):96.
- [6] Zheng X, Zheng Y, Qin D, et al. Regulatory role and potential importance of GDF-8 in ovarian reproductive activity [J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2022, 13:878069.
- [7] Yoon J D, Hwang S U, Kim M, et al. GDF-8 enhances SOX2 expression and blastocyst total cell number in porcine IVF embryo development [J]. Theriogenology, 2019, 129:70-76.
- [8] Metz E P, Rizzino A. Sox2 dosage: a critical determinant in the functions of Sox2 in both normal and tumor cells [J]. J Cell Physiol, 2019, 234(11):19298-19306.
- [9] Li L, Lai F, Hu X, et al. Multifaceted SOX2-chromatin interaction underpins pluripotency progression in early embryos [J]. Science, 2023, 382(6676):eadi5516.
- [10] Zhu A, Qi S, Li W, et al. Hyperglycemia-induced endothelial exosomes trigger trophoblast dysregulation and abnormal placentation through PUM2-mediated repression of SOX2 [J]. Hum Exp Toxicol, 2023, 42:9603271221149656.
- [11] 中华医学会妇产科学分会妊娠期高血压疾病学组. 妊娠期高血压疾病诊治指南 (2020) [J]. 中华妇产科杂志, 2020, 55(4):227-238.
- [12] Huppertz B. The critical role of abnormal trophoblast development in the etiology of preeclampsia [J]. Curr Pharm Biotechnol, 2018, 19(10):771-780.
- [13] 苏铭, 黄建华, 张颖. 胎盘生长因子预测子痫前期临床研究进展 [J]. 医学理论与实践, 2021, 34(17):2965-2967.
- [14] Wallner C, Drysch M, Becerikli M, et al. Interaction with the GDF-8/11 pathway reveals treatment options for adenocarcinoma of the breast [J]. Breast, 2018, 37:134-141.
- [15] Xie J, Zhu H, Chang H M, et al. GDF-8 promotes the cell invasiveness in human trophoblasts by upregulating

- the expression of follistatin-like 3 through the ALK5-SMAD2/3 signaling pathway[J].Front Cell Dev Biol, 2020,8:573781.
- [16] Fang L, Wang Z, Wu Z, et al. GDF-8 stimulates trophoblast cell invasion by inducing ALK5-SMAD2/3-mediated MMP2 expression[J].Reproduction, 2021, 162(5): 331-338.
- [17] 商宏恺, 傅爱萍, 陈露芳, 等. 地塞米松对人胎盘葡萄糖转运功能的作用及机制[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2017, 22(11): 1221-1226.
- [18] Gannoun M B A, Raguema N, Zitouni H, et al. MMP-2 and MMP-9 polymorphisms and preeclampsia risk in tunisian arabs: a case-control study[J]. J Clin Med, 2021, 10(12): 2647.
- [19] Xu Y, Sui L, Qiu B, et al. ANXA4 promotes trophoblast invasion via the PI3K/Akt/eNOS pathway in preeclampsia[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2019, 316(4): C481-C491.
- [20] Liu X, Qiao B, Zhao T, et al. Sox2 promotes tumor aggressiveness and epithelial-mesenchymal transition in tongue squamous cell carcinoma[J]. Int J Mol Med, 2018, 42(3): 1418-1426.
- [21] Chang X, Zhang H, Yang Q, et al. LncRNA SOX2OT affects cervical cancer cell growth, migration and invasion by regulating SOX2[J]. Cell Cycle, 2020, 19(11): 1391-1403.
- [22] Mirzaei S, Paskeh M D A, Entezari M, et al. SOX2 function in cancers: association with growth, invasion, stemness and therapy response[J]. Biomed Pharmacother, 2022, 156: 113860.
- [专业责任编辑: 于学文]
[中文编辑: 刘昕田; 英文编辑: 杨 寅]

《中国妇幼健康研究》杂志简介

《中国妇幼健康研究》杂志是妇幼卫生专业学术性刊物, 主要以专家论坛、专题研究、临床研究、妇幼营养研究、妇幼卫生服务研究、出生缺陷预防、妇幼卫生教学研究等栏目形式, 向读者介绍国内外妇幼卫生专业方面的新进展, 妇女及儿童各阶段疾病预防的新经验, 妇幼心理行为及健康指导、围产医学、优生、遗传等方面的新理论和实验研究新动向的原创性文章。《中国妇幼健康研究》是国家级期刊, 国际标准连续出版物号: ISSN 1673-5293; 国内统一连续出版物号: CN 61-1448/R。现为月刊, 每月下旬出版(年定价: 360 元)。2007 年已被评为中国科技核心期刊(中国科技论文统计源期刊), 已取得《中国期刊网》和《中国学术期刊(光盘版)》全文收录, 并作为“中国学术期刊综合评价数据库”“中国科学引文数据库”来源期刊。同时被《中文医学科学核心期刊要目总览》、《中国生物医学文献光盘数据库》(CBMdisc)、《中文生物医学期刊目次数据库》(CMCC)、《中国科技期刊篇名数据库》及两种书本式检索刊《中国科技资料目录》(医药卫生)、《中国医药文献》进行目次、文摘或全文的收录, 现已在微信平台发布, 并被中国知网及万方数据——数字化期刊群全文收录。2009 年以来多次获中国高校科技期刊质量奖、优秀奖及省科协“学会创新和服务能力提升”项目优秀科技期刊奖, 2020 年又获中国高校科技期刊优秀奖和省科技期刊优秀奖。

主管单位: 中华人民共和国教育部

主办单位: 西安交通大学、中国妇幼健康研究会

地 址: 西安市雁塔西路 76 号(西安交通大学医学部)009 号信箱

电 话: (029)82655049 邮政编码: 710061

国内邮发代号: 52-135 海外发行代号: BM6616

在线投稿网址: mchchina.xjtu.edu.cn

电子信箱: bjblm@mail.xjtu.edu.cn