

miR-21 靶向 RASA1 调节 RAS-MAPK 通路 对子痫前期滋养层细胞功能的影响

丁忠英¹, 陆 艳², 沈伟卫³, 沈国松¹

(湖州市妇幼保健院 1.医学检验中心;2.妇科;3.产科,浙江 湖州 313000)

[摘要]目的 探讨微小 RNA-21(miR-21)靶向 Ras GTP 酶活化蛋白 1(ras GTPase-activating protein 1, RASA1)调节 RAS-丝裂原活化蛋白激酶(RAS-mitogen-activated protein kinase, RAS-MAPK)通路对子痫前期(PE)滋养层细胞功能的影响。**方法** 收集 2023 年 1 月至 12 月在湖州市妇幼保健院治疗的 40 例 PE 患者和 40 例正常分娩孕妇的胎盘组织。RT-PCR 检测 PE 患者和正常孕妇胎盘组织中 miR-21 和 RASA1 mRNA 表达水平;将滋养层 HTR-8/SVneo 细胞分为 CK 组、miR NC 组、miR-21 mimic 组、miR-21 mimic+oe-NC 组、miR-21 mimic+oe-RASA1 组;RT-PCR 检测各组 HTR-8/SVneo 细胞中 miR-21 和 RASA1 mRNA 表达水平;CCK-8 实验检测细胞增殖情况;Transwell 实验检测细胞迁移和侵袭情况;流式细胞术检测细胞凋亡率;Western blot 检测细胞 E-cadherin、N-cadherin、vimentin、Bax、Bcl-2、RASA1 及 RAS-MAPK 通路相关蛋白的表达;验证 miR-21 与 RASA1 的靶向关系。**结果** PE 患者胎盘组织中 miR-21 表达水平显著低于正常孕妇胎盘组织,RASA1 mRNA 表达水平显著高于正常孕妇胎盘组织(t 值分别为 24.393、15.917, $P < 0.001$)。CK 组、miR NC 组、miR-21 mimic 组、miR-21 mimic+oe-NC 组、miR-21 mimic+oe-RASA1 组的 HTR-8/SVneo 细胞中 miR-21 和 RASA1 mRNA 表达水平比较,差异均有统计学意义(F 值分别为 409.444、633.065, $P < 0.001$);五组 HTR-8/SVneo 细胞 OD₄₅₀ 值(48h、72h)、迁移数、侵袭数、凋亡率比较,差异均有统计学意义(F 值分别为 32.074、29.428、70.934、103.170、71.849, $P < 0.001$);五组 HTR-8/SVneo 细胞中 E-cadherin、N-cadherin、vimentin、Bax、Bcl-2、RASA1 蛋白表达水平比较,差异均有统计学意义(F 值分别为 50.597、92.860、57.177、48.272、90.235、55.249, $P < 0.001$);五组 HTR-8/SVneo 细胞中 p-Raf/Raf、p-MEK/MEK 和 p-ERK/ERK 蛋白表达水平比较,差异均有统计学意义(F 值分别为 100.931、87.709、75.244, $P < 0.001$)。miR-21 mimic+RASA1-WT 组荧光素酶活性显著低于 miR-NC+RASA1-WT 组($q = 22.570$, $P < 0.05$)。**结论** miR-21 可能通过下调 RASA1 来激活 RAS-MAPK 通路,进而促进 HTR-8/SVneo 细胞增殖、迁移和上皮间质转化,降低细胞凋亡率,改善滋养层细胞功能。

[关键词]子痫前期;滋养层细胞功能;微小 RNA-21;Ras GTP 酶活化蛋白 1;RAS-丝裂原活化蛋白激酶通路

Doi:10.3969/j.issn.1673-5293.2025.10.005

[中图分类号]R173

[文献标识码]A

[文章编号]1673-5293(2025)10-0029-09

Effect of miR-21 targeting RASA1 to regulate RAS-MAPK signal pathway on function of trophoblast cells in preeclampsia

DING Zhongying¹, LU Yan², SHEN Weiwei³, SHEN Guosong¹

(1.Center of Medical Laboratory;2.Department of Gynecology;3.Department of Obstetrics,
Huzhou Maternity & Child Health Care Hospital, Zhejiang Huzhou 313000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate effect of microRNA 21 (miR-21) targeting ras GTPase-activating protein 1 (RASA1) to regulate RAS-mitogen-activated protein kinase (RAS-MAPK) signal pathway on function of trophoblast cells in preeclampsia (PE). **Methods** The placental tissues of 40 patients with PE and 40 parturient women with normal delivery who admitted to Huzhou Maternal & Child Health Care Hospital from January to December 2023 were collected. Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was used to detect expression levels of miR-21 and RASA1 mRNA in the placental tissues of PE patients and normal pregnant women. The human trophoblast cell line 8/SV40 immortalized cells (HTR-8/SVneo) were divided into normal culture group (CK group), miR NC transfection group (miR NC group), miR-21 mimic transfection group (miR-21 mimic group), miR-21 mimic + oe-NC transfection group (miR-21 mimic + oe-NC group) and miR-21 mimic + oe-RASA1 transfection group (miR-21 mimic + oe-RASA1) group, and the RT-qPCR was applied to detect expression levels of miR-21 and RASA1 mRNA in the trophoblast HTR-8/SVneo cells in the five groups. CCK-8 reagent test was applied to detect proliferation of the cells. Transwell experiment was applied to detect migration and invasion of the cells. Flow cytometry was applied to detect rate

[收稿日期]2024-06-12

[基金项目]湖州市科技计划公益性应用研究项目(2022GYB07)

[作者简介]丁忠英(1985—),女,主任技师,主要从事子痫前期相关疾病的研究。

of cell apoptosis. Western blot was applied to detect expressions of E-cadherin, N-cadherin, vimentin, Bax, Bcl-2, RASA1, and RAS-MAPK pathway related proteins in the cells. The targeting relationship between miR-21 and RASA1 was validated. **Results** The expression level of miR-21 in PE placental tissues was significantly lower than that in the normal placental tissues, while the expression level of RASA1 mRNA was significantly higher than that in the normal placental tissues ($t = 24.393$ and 15.917 respectively, both $P < 0.001$). The expression levels of miR-21 and RASA1 mRNA in HTR-8/SVneo cells among the CK group, the miR-NC group, the miR-21 mimic group, the miR-21 mimic + oe-NC group and the miR-21 mimic + oe-RASA1 group were compared and showed statistically significant differences ($F = 409.444$ and 633.065 respectively, both $P < 0.001$). There were statistically significant differences in OD450 values (48h, 72h), migration number, invasion number and apoptosis rate of HTR-8/SVneo cells among the five groups ($F = 32.074, 29.428, 70.934, 103.170$ and 71.849 respectively, all $P < 0.001$). And also, there were statistically significant differences in E-cadherin, N-cadherin, vimentin, Bax, Bcl-2 and RASA1 among the five HTR-8/SVneo cells groups ($F = 50.597, 92.860, 57.177, 48.272, 90.235$ and 55.249 respectively, all $P < 0.001$). The comparison of protein expression levels of p-Raf/Raf, p-MEK/MEK and p-ERK/ERK in the HTR-8/SVneo cells among the five groups showed statistically significant differences ($F = 100.931, 87.709$ and 75.244 respectively, all $P < 0.001$). The luciferase activity in the miR-21 mimic + oe-RASA1-wild type transfection group (miR-21 mimic + RASA1-WT group) was significantly lower than that in the miR-NC + RASA1-wild type transfection group (miR-NC + RASA1-WT group) ($q = 22.570, P < 0.001$). **Conclusion** MiR-21 may activate RAS-MAPK pathway by down-regulating RASA1, and then promote proliferation, migration and epithelial-mesenchymal transition of the HTR-8/SVneo cells, thereby, reduce apoptosis rate and improve function of the trophoblast cells.

[Key words] preeclampsia; function of trophoblast cell; miR-21; RASA1; RAS-MAPK pathway

子痫前期(preeclampsia, PE)是一种妊娠 20 周后出现高血压和蛋白尿症状的妊娠疾病,可导致严重的多系统器官如肾脏、肝脏损害,以及胎儿早产或死亡等,严重者甚至威胁孕妇生命^[1]。PE 的发病机制尚不明确,临床治疗多以维持母胎稳定适时终止妊娠为主^[2]。研究显示绒毛外滋养层细胞增殖、迁移和上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)功能降低是引发 PE 的主要因素^[3]。因此改善绒毛外滋养层细胞生理学功能对治疗 PE 具有重要意义。随着分子生物技术的快速发展,从分子水平干预已成为治疗多种疾病的重点研究方向。微小 RNA (microRNA, miRNA) 是一种非编码小 RNA,可经影响其靶基因表达调控细胞的正常生理代谢过程^[4]。研究显示,miR-21 在 PE 孕妇血清中低表达^[5]。miR-21 在 PE 胎盘组织中表达被抑制,过表达 miR-21 可通过抑制 Ras GTP 酶活化蛋白 1 (ras GTPase-activating protein 1, RASA1) 表达来促进滋养层细胞增殖和侵袭,降低细胞凋亡率^[6]。miR-21 在 PE 中发挥生物学作用可能与调控 RASA1 有关,生物信息学预测 miR-21 和 RASA1 存在靶向结合位点。Zhang 等^[7]研究表明,RASA1 是一种信号支架蛋白,通过抑制 RAS-丝裂原活化蛋白激酶(RAS-mitogen-activated protein kinase, RAS-MAPK)信号通路可抑制细胞的生长和增殖过程;

RASA1 在复发性流产孕妇绒毛滋养层细胞中高表达,通过抑制 RAS-MAPK 通路活性可抑制人滋养层细胞系 8/SV40 永生化细胞(human trophoblast cell line 8/SV40 immortalized cell line, HTR-8/SVneo)增殖和迁移能力,并促进细胞凋亡。张俊等^[8]研究表明,RASA1 调节 RAS-MAPK 通路可抑制细胞增殖和迁移。本研究旨在探讨 miR-21 是否可通过靶向 RASA1 调节 RAS-MAPK 通路影响 PE 患者滋养层细胞的功能。

1 研究材料与方法

1.1 研究材料

1.1.1 实验细胞和组织来源

依据《妇产科学》^[9]中对 PE 的诊疗标准。收集 2023 年 1 月至 12 月在潮州市妇幼保健院治疗的 40 例 PE 患者和 40 例正常分娩孕妇的胎盘组织。人绒毛膜滋养层 HTR-8/SVneo 细胞购自苏州海星生物科技有限公司。

本研究通过潮州市妇幼保健院医学伦理委员会审批(2022-R-016)。

1.1.2 主要试剂

RPMI 1640 培养基和胎牛血清购自北京达科生物技术有限公司;总 RNA 提取试剂盒和 RT-PCR 试剂盒购自北京博雷德生物科技有限公司;CCK-8 试

剂盒、Transwell 小室购自北京柯兰生物科技有限公司;细胞凋亡检测试剂盒、BCA 试剂盒购自北京兴怡雅创生物技术有限公司;E-cadherin、N-cadherin、vimentin、Bax、Bcl-2、RASA1、Raf、p-Raf、MEK、p-MEK、ERK、p-ERK、 β -actin 抗体购自北京达科生物技术有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 miR-21 和 RASA1 mRNA 表达的检测

提取 PE、正常孕妇胎盘组织和细胞的总 RNA, 逆转录为 cDNA 后进行荧光定量 PCR 扩增, 计算 miR-21 和 RASA1 mRNA 的相对表达量($2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法)。引物:

miR-21 正向: 5'-GGGTAGCTTATCAGACTGATGTT-3', 反向: 5'-CAGTGCAGGGTCCGAGGT-3'; RASA1 mRNA 正向: 5'-CCCGCCTTCCTTTCTCTCTC-3', 反向: 5'-CGAAAACTTCCTCGCTGCAC-3'; GAPDH 正向: 5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3', 反向: 5'-GGCATGCACTGTGGTCATGAG-3'; U6 正向: 5'-AACTCGCTTCGGCAGCAC-3', 反向: 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'。

1.2.2 细胞转染与分组处理

将 HTR-8/SVneo 细胞分为 CK 组(正常培养, 6 例)、miR NC 组(转染 miR NC, 6 例)、miR-21 mimic 组(转染 miR-21 mimic, 6 例)、miR-21 mimic + oe-NC 组(转染 miR-21 mimic 和 oe-NC, 6 例)、miR-21 mimic + oe-RASA1 组(转染 miR-21 mimic 和 oe-RASA1, 6 例), 用 Lipofectamine 2000 试剂分别将对应质粒转染到 HTR-8/SVneo 细胞中, 培养 48h 后进行后续实验。

1.2.3 细胞增殖的检测

于 96 孔板中接种各组 HTR-8/SVneo 细胞, 在 48h 和 72h 时加入 $10\mu\text{L}$ 的 CCK-8 试剂, 避光孵育 2h, 摇匀后酶标仪 450nm 处检测吸光值(optical density, OD_{450} 值)。

1.2.4 细胞迁移和侵袭的检测

迁移实验: 收集各组 HTR-8/SVneo 细胞, 调整细胞浓度(5×10^5 个/mL), 将细胞悬液加入 Transwell 上室($200\mu\text{L}$), 下室加入 $600\mu\text{L}$ 培养基, 置于培养箱中培养 24h 后取出, 固定细胞并染色, 显微镜观察细胞迁移情况。侵袭实验: Transwell 上室用

Matrigel 胶包被, 后续步骤同上。

1.2.5 细胞凋亡的检测

离心收集各组 HTR-8/SVneo 细胞, 用 PBS 缓冲液重悬(1×10^6), 加入 $5\mu\text{L}$ 的 Annexin V-FITC 和 $5\mu\text{L}$ 的 PI 试剂进行染色, 室温避光孵育 15min, 以流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.2.6 Western blot 检测 E-cadherin、N-cadherin、vimentin、Bax、Bcl-2、RASA1 蛋白表达

提取细胞总蛋白质并定量, 将蛋白热变性后电泳, 转膜, 封闭 2h 后加入兔抗 E-cadherin、N-cadherin、vimentin、Bax、Bcl-2、RASA1、Raf、p-Raf、MEK、p-MEK、ERK、p-ERK、 β -actin, 摇床 4°C 过夜, 二抗孵育, ECL 显色, 用 Image-Pro Plus 分析蛋白灰度值。

1.2.7 miR-21 与 RASA1 靶向关系的验证

构建 RASA1-WT(野生型)和 RASA1-MUT(突变型)载体, 将两种载体分别与 miR-NC 和 miR-21 mimic 共转染于 HTR-8/SVneo 细胞中, 即 miR-NC 和 RASA1-WT 转染至 HTR-8/SVneo 细胞中为一组, miR-21 mimic 和 RASA1-WT 转染至 HTR-8/SVneo 细胞中为一组, miR-NC 和 RASA1-MUT 转染至 HTR-8/SVneo 细胞中为一组, miR-21 mimic 和 RASA1-MUT 转染至 HTR-8/SVneo 细胞中为一组, 检测细胞荧光素酶活性。

1.3 统计学方法

应用 Graphpad Prism 8.0.1 软件分析数据; 计量资料以均数士标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 单独两组比较采用 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 多重比较用 SNK- q 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 不同胎盘组织及各组 HTR-8/SVneo 细胞中 miR-21 和 RASA1 mRNA 表达的比较

PE 患者胎盘组织中 miR-21 表达水平显著低于正常孕妇胎盘组织, RASA1 mRNA 表达水平显著高于正常孕妇胎盘组织($t = 24.393, 15.917, P < 0.001$), 见表 1。

CK 组、miR NC 组、miR-21 mimic 组、miR-21 mimic + oe-NC 组、miR-21 mimic + oe-RASA1 组的 HTR-8/SVneo 细胞中 miR-21 和 RASA1 mRNA 表达水平比较, 差异均有统计学意义($F = 409.444$ 、

633.065, $P < 0.001$); 其中, miR-21 mimic 组 HTR-8/SVneo 细胞中 miR-21 表达水平均高于 CK 组和 miR NC 组, RASA1 mRNA 表达水平均显著低于 CK 组和 miR NC 组 ($q = 36.770, 35.827, 49.262, 51.685, P < 0.001$); miR-21 mimic + oe-RASA1 组 HTR-8/SVneo 细胞中 RASA1 mRNA 表达水平显著高于 miR-21 mimic + oe-NC 组 ($q = 29.880, P < 0.001$), 而 miR-21 表达水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 2。

表 1 PE 患者与正常孕妇胎盘组织中 miR-21 和 RASA1 mRNA 表达水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of expression levels of miR-21 and RASA1 mRNA in the placental tissues between the PE patient group and the normal parturient women group ($\bar{x} \pm s$)

胎盘组织	例数	miR-21	RASA1 mRNA
正常孕妇胎盘组织	40	1.02 ± 0.15	1.01 ± 0.18
PE 胎盘组织	40	0.43 ± 0.03	2.16 ± 0.42
<i>t</i>		24.393	15.917
<i>P</i>		<0.001	<0.001

表 2 各组 HTR-8/SVneo 细胞中 miR-21 和 RASA1 mRNA 表达水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of expression levels of miR-21 and RASA1 mRNA in the HTR-8/SVneo cells among the five groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	miR-21	RASA1 mRNA
CK 组	6	1.00 ± 0.01	0.99 ± 0.01
miR NC 组	6	1.02 ± 0.03	1.02 ± 0.04
miR-21 mimic 组	6	1.78 ± 0.08 ^{ab}	0.38 ± 0.03 ^{ab}
miR-21 mimic + oe-NC 组	6	1.79 ± 0.05	0.39 ± 0.04
miR-21 mimic + oe-RASA1 组	6	1.81 ± 0.06	0.76 ± 0.02 ^c
<i>F</i>		409.444	633.065
<i>P</i>		<0.001	<0.001

注: ^a与 CK 组比较, $P < 0.05$; ^b与 miR NC 组比较, $P < 0.05$; ^c与 miR-21 mimic + oe-NC 组比较, $P < 0.05$ 。

2.2 各组 HTR-8/SVneo 细胞增殖、迁移、侵袭及凋亡率的比较

CK 组、miR NC 组、miR-21 mimic 组、miR-21 mimic + oe-NC 组、miR-21 mimic + oe-RASA1 组的 HTR-8/SVneo 细胞 OD₄₅₀ 值 (48h、72h)、迁移数、侵袭数、凋亡率比较, 差异均有统计学意义 ($F =$

32.074、29.428、70.934、103.170、71.849, $P < 0.001$), 见表 3。

miR-21 mimic 组 HTR-8/SVneo 细胞 OD₄₅₀ 值 (48h、72h) 均显著高于 CK 组和 miR NC 组 ($q = 10.627, 11.292, 10.411, 10.827, P < 0.001$); miR-21 mimic + oe-RASA1 组 HTR-8/SVneo 细胞 OD₄₅₀ 值 (48h、72h) 均显著低于 miR-21 mimic + oe-NC 组 ($q = 6.642, 6.642, P < 0.001$), 见表 3。

miR-21 mimic 组 HTR-8/SVneo 细胞迁移数和侵袭数均显著高于 CK 组和 miR NC 组 ($q = 17.006, 17.322, 20.870, 20.473, P < 0.001$); miR-21 mimic + oe-RASA1 组 HTR-8/SVneo 细胞迁移数和侵袭数均显著低于 miR-21 mimic + oe-NC 组 ($q = 9.085, 11.095, P < 0.001$), 见表 3、图 1 和 2。

miR-21 mimic 组 HTR-8/SVneo 细胞凋亡率均显著低于 CK 组和 miR NC 组 ($q = 17.658, 16.536, P < 0.001$); miR-21 mimic + oe-RASA1 组 HTR-8/SVneo 细胞凋亡率显著高于 miR-21 mimic + oe-NC 组 ($q = 8.922, P < 0.001$), 见表 3、图 3。

2.3 各组 HTR-8/SVneo 细胞中 E-cadherin、N-cadherin、vimentin、Bax、Bcl-2、RASA1 蛋白表达水平的比较

CK 组、miR NC 组、miR-21 mimic 组、miR-21 mimic + oe-NC 组、miR-21 mimic + oe-RASA1 组的 HTR-8/SVneo 细胞中 E-cadherin、N-cadherin、vimentin、Bax、Bcl-2、RASA1 比较, 差异均有统计学意义 ($F = 50.597, 92.860, 57.177, 48.272, 90.235, 55.249, P < 0.001$), 见表 4。

miR-21 mimic 组 HTR-8/SVneo 细胞中 E-cadherin、Bax、RASA1 蛋白表达水平均显著低于 CK 组和 miR NC 组, N-cadherin、vimentin、Bcl-2 蛋白表达水平均显著高于 CK 组和 miR NC 组 ($q = 14.364, 13.766, 14.216, 13.920, 14.740, 14.113, 19.610, 19.253, 14.977, 14.700, 18.419, 19.141, P < 0.001$); miR-21 mimic + oe-RASA1 组 HTR-8/SVneo 细胞中 E-cadherin、Bax、RASA1 蛋白表达水平均显著高于 miR-21 mimic + oe-NC 组, N-cadherin、vimentin、Bcl-2 蛋白表达水平均显著低于 miR-21 mimic + oe-NC 组 ($q = 6.883, 8.589, 9.722, 8.557, 8.043, 10.835, P < 0.001$), 见表 4、图 4。

表 3 各组 HTR-8/SVneo 细胞增殖、迁移、侵袭及凋亡率的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of proliferation, migration, invasion and apoptosis rate of the HTR-8/SVneo cells among the five groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	OD ₄₅₀		迁移数(个)	侵袭数(个)	凋亡率(%)
	48h	72h			
CK 组	0.25±0.03	0.57±0.05	53.87±5.93	34.24±4.19	10.26±1.31
miR NC 组	0.24±0.03	0.56±0.05	52.41±6.72	35.75±4.52	9.84±1.17
miR-21 mimic 组	0.41±0.04 ^{ab}	0.82±0.07 ^{ab}	132.64±15.38 ^{ab}	113.64±12.73 ^{ab}	3.65±0.43 ^{ab}
miR-21 mimic+oe-NC 组	0.42±0.05	0.83±0.07	129.36±14.67	110.57±13.26	3.78±0.46
miR-21 mimic+oe-RASA1 组	0.32±0.03 ^c	0.68±0.05 ^c	87.28±10.56 ^c	68.36±7.64 ^c	7.12±0.85 ^c
<i>F</i>	32.074	29.428	70.934	103.170	71.849
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:^a与 CK 组比较, $P<0.05$;^b与 miR NC 组比较, $P<0.05$;^c与 miR-21 mimic+oe-NC 组比较, $P<0.05$ 。

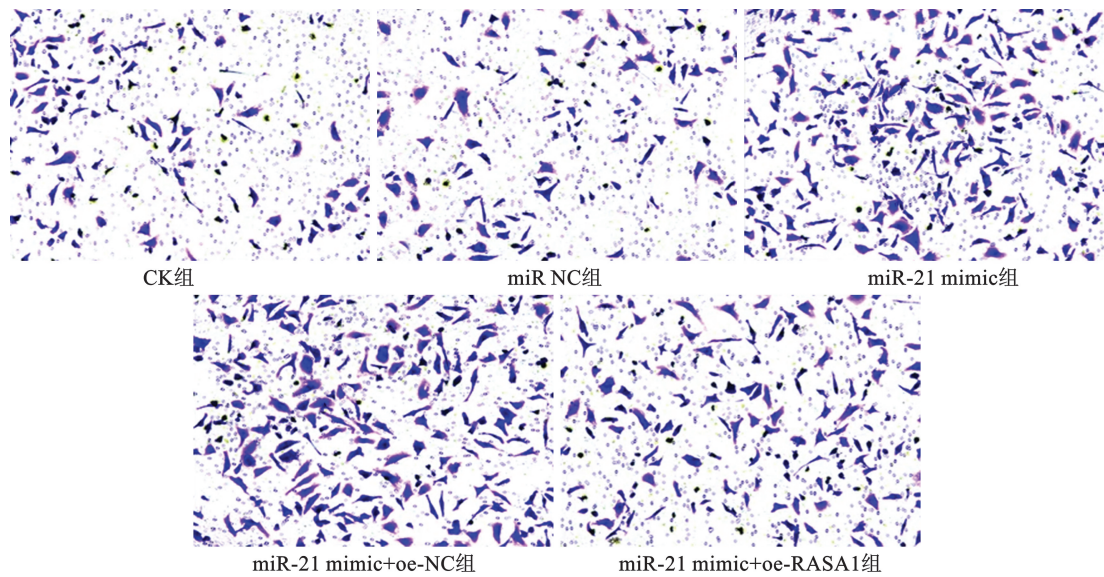


图 1 HTR-8/SVneo 细胞迁移结果图(×200)

Fig.1 Images of migration result of the HTR-8/SVneo cells(×200)

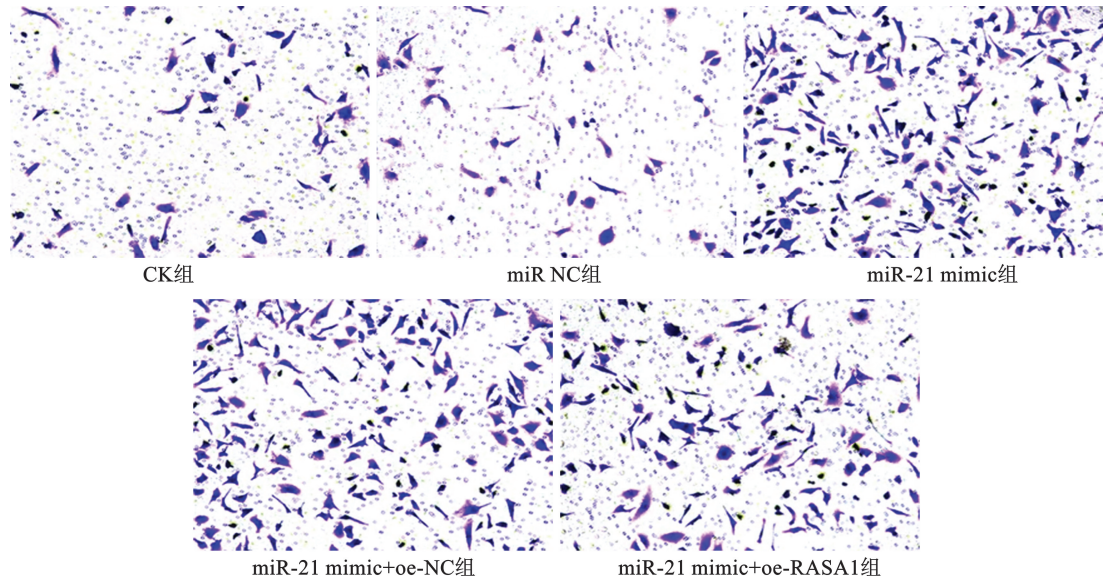


图 2 HTR-8/SVneo 细胞侵袭结果图(×200)

Fig.2 Images of invasion result of the HTR-8/SVneo cells (×200)

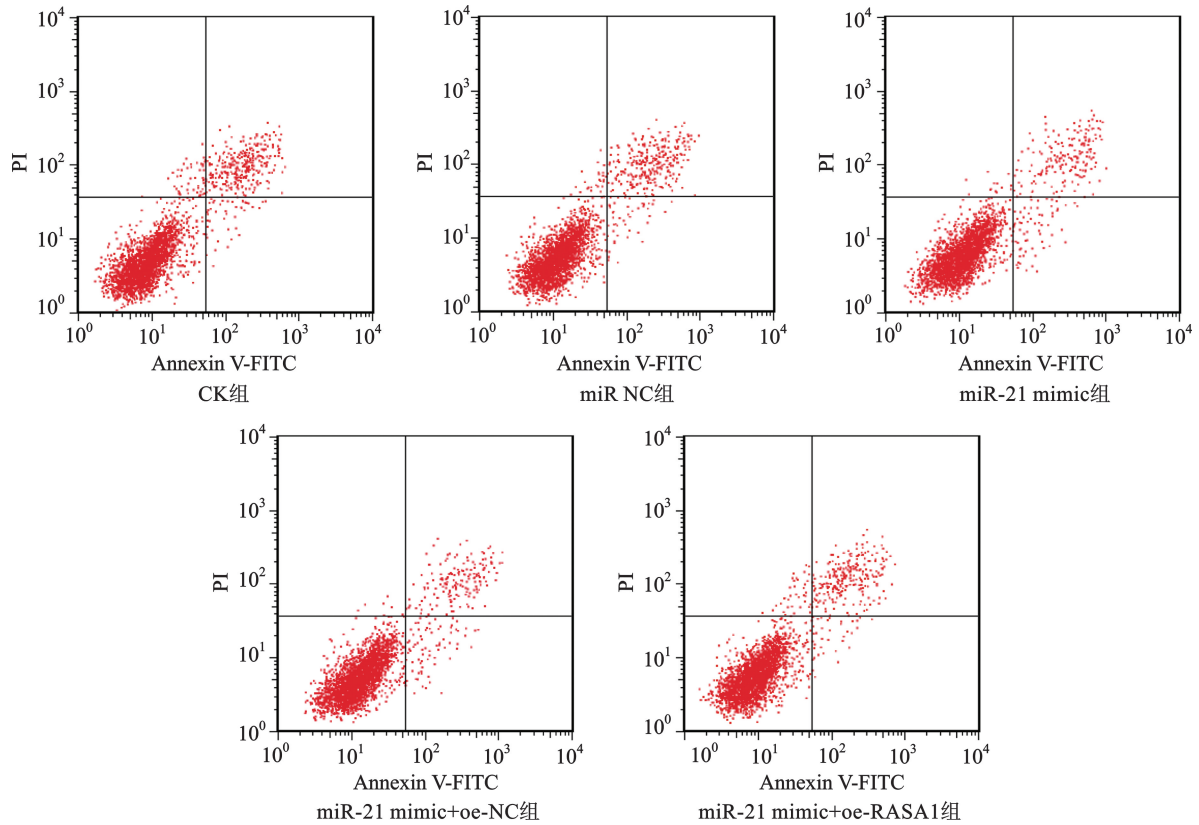


图 3 HTR-8/SVneo 细胞凋亡图

Fig.3 Apoptosis maps of the HTR-8/SVneo cells

表 4 各组 HTR-8/SVneo 细胞中相关蛋白表达水平的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Comparison of expression levels of related proteins in the HTR-8/SVneo cells among the five groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	E-cadherin	N-cadherin	vimentin	Bax	Bcl-2	RASA1
CK 组	0.85±0.11	0.24±0.03	0.38±0.05	0.87±0.10	0.21±0.04	0.81±0.10
miR NC 组	0.83±0.10	0.25±0.04	0.39±0.06	0.86±0.10	0.19±0.04	0.79±0.10
miR-21 mimic 组	0.37±0.05 ^{ab}	0.79±0.09 ^{ab}	0.92±0.11 ^{ab}	0.39±0.05 ^{ab}	0.72±0.09 ^{ab}	0.34±0.05 ^{ab}
miR-21 mimic+oe-NC 组	0.36±0.05	0.78±0.09	0.94±0.12	0.41±0.06	0.73±0.09	0.32±0.04
miR-21 mimic+oe-RASA1 组	0.59±0.08 ^c	0.54±0.07 ^c	0.65±0.08 ^c	0.70±0.09 ^c	0.43±0.06 ^c	0.63±0.08 ^c
<i>F</i>	50.597	92.860	57.177	48.272	90.235	55.249
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:^a与 CK 组比较, $P<0.05$;^b与 miR NC 组比较, $P<0.05$;^c与 miR-21 mimic+oe-NC 组比较, $P<0.05$ 。

2.4 各组 HTR-8/SVneo 细胞中 RAS-MAPK 通路相关蛋白表达水平的比较

CK 组、miR NC 组、miR-21 mimic 组、miR-21 mimic+oe-NC 组、miR-21 mimic+oe-RASA1 组的 HTR-8/SVneo 细胞中 p-Raf/Raf、p-MEK/MEK 和 p-ERK/ERK 蛋白表达水平比较,差异均有统计学意义($F=100.931, 87.709, 75.244, P<0.001$),见表 5。

miR-21 mimic 组 HTR-8/SVneo 细胞中 p-Raf/Raf、p-MEK/MEK 和 p-ERK/ERK 蛋白表达水平均显著高于 CK 组和 miR NC 组($q=19.752, 19.380, 17.629, 17.309, 17.151, 16.861, P<0.001$);

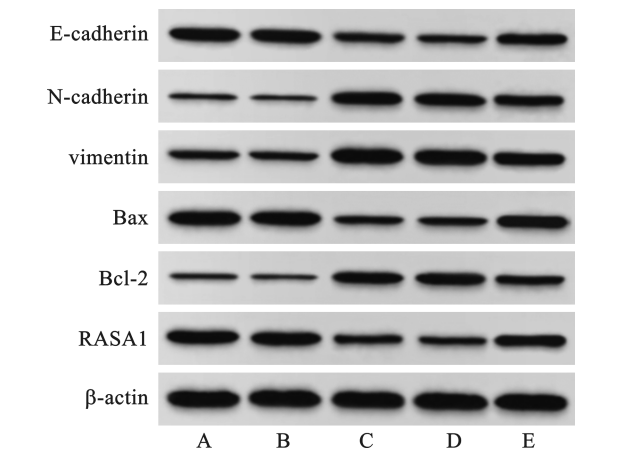
miR-21 mimic+oe-RASA1 组 HTR-8/SVneo 细胞中 p-Raf/Raf、p-MEK/MEK 和 p-ERK/ERK 蛋白表达水平均显著低于 miR-21 mimic+oe-NC 组($q=13.044, 15.385, 9.593, P<0.001$),见图 5、表 5。

2.5 miR-21 与 RASA1 靶向关系的验证

预测 miR-21 与 RASA1 的结合位点,miR-21 与 RASA1 可能存在靶向调控关系;miR-NC+RASA1-WT 组、miR-21 mimic+RASA1-WT 组、miR-NC+RASA1-MUT 组、miR-21 mimic+RASA1-MUT 组的荧光素酶相对活性比较,差异有统计学意义

义($F=143.061, P<0.001$); miR-21 mimic+RASA1-WT 组荧光素酶活性显著低于 miR-NC+RASA1-WT 组($q=22.570, P<0.001$), 与 miR-NC+

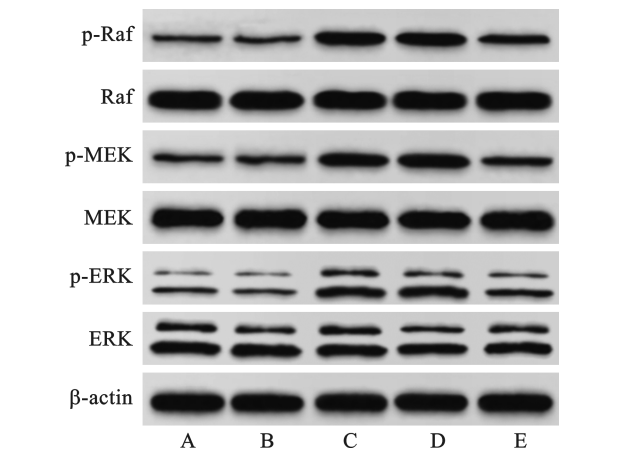
RASA1-MUT 组比较, miR-21 mimic+RASA1-MUT 组荧光素酶活性无统计学差异($P>0.05$), 见图 6、表 6。



注: A 为 CK 组; B 为 miR NC 组; C 为 miR-21 mimic 组; D 为 miR-21 mimic+oe-NC 组; E 为 miR-21 mimic+oe-RASA1 组。

图 4 各组 HTR-8/SVneo 细胞中 E-cadherin、N-cadherin、vimentin、Bax、Bcl-2、RASA1 蛋白的表达

Fig.4 Expression of E-cadherin, N-cadherin, vimentin, Bax, Bcl-2 and RASA1 proteins in the five groups of HTR-8/SVneo cells



注: A 为 CK 组; B 为 miR NC 组; C 为 miR-21 mimic 组; D 为 miR-21 mimic+oe-NC 组; E 为 miR-21 mimic+oe-RASA1 组。

图 5 各组 HTR-8/SVneo 细胞中 p-Raf、Raf、p-MEK、MEK、p-ERK、ERK 蛋白的表达

Fig.5 Expression of p-Raf, Raf, p-MEK, MEK, p-ERK and ERK proteins in the five groups of HTR-8/SVneo cells

表 5 各组 HTR-8/SVneo 细胞中 RAS-MAPK 通路相关蛋白表达水平的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Comparison of expression levels of RAS-MAPK pathway-related proteins in the HTR-8/SVneo cells among the five groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	p-Raf/Raf	p-MEK/MEK	p-ERK/ERK
CK 组	0.23±0.03	0.28±0.03	0.34±0.04
miR NC 组	0.24±0.03	0.29±0.04	0.35±0.05
miR-21 mimic 组	0.76±0.09 ^{ab}	0.83±0.11 ^{ab}	0.93±0.11 ^{ab}
miR-21 mimic+oe-NC 组	0.78±0.09	0.86±0.11	0.91±0.12
miR-21 mimic+oe-RASA1 组	0.43±0.06 ^c	0.38±0.05 ^c	0.58±0.07 ^c
F	100.931	87.709	75.244
P	<0.001	<0.001	<0.001

注: ^a与 CK 组比较, $P<0.05$; ^b与 miR NC 组比较, $P<0.05$; ^c与 miR-21 mimic+oe-NC 组比较, $P<0.05$ 。

表 6 各组细胞中荧光素酶活性的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Comparison of luciferase activity among the five groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	荧光素酶相对活性
miR-NC+RASA1-WT 组	0.99±0.05
miR-21 mimic+RASA1-WT 组	0.40±0.03 ^a
miR-NC+RASA1-MUT 组	1.03±0.07
miR-21 mimic+RASA1-MUT 组	1.05±0.09
F	143.061
P	<0.001

注: ^a与 miR-NC+RASA1-WT 组比较, $P<0.05$ 。



图 6 miR-21 与 RASA1 的靶向结合位点

Fig.6 Targeted binding sites between miR-21 and RASA1

3 讨论

3.1 PE 与 miR-21 的关系

PE 是一种发源于女性妊娠期间的疾病, 一般病发于妊娠 20 周之后^[10]。临床症状主要为高血压、

蛋白尿,伴随/不伴随出现全身或局部水肿,严重者还会造成多器官功能障碍,危及孕妇和胎儿生命^[11]。滋养层细胞是胎盘组织的主要成分。研究显示,滋养层细胞功能异常可引发多种妊娠相关疾病,如复发性流产、PE、胎儿发育不良等^[12]。因此,改善滋养层细胞功能对PE的临床治疗具有促进作用。目前,PE发病的分子机制未明确,临床治疗中主要采取降压、解痉、镇静、密切监测、适时终止妊娠等有效措施,控制病情、延长孕周、保障母婴安全。因此,探究PE的分子发生机制,并通过分子靶向干预是治疗PE的研究方向^[13]。miRNA是一种含有约为20~22个碱基的非编码RNA。研究显示,miRNA通过与mRNA的碱基互补结合可调控mRNA表达,进而调控细胞的生长、增殖和凋亡过程^[14]。有研究显示,miR-21参与调控PE滋养层细胞的生物学过程,miR-21在PE滋养层细胞中低表达,miR-21表达升高时可提高滋养层细胞增殖、迁移和侵袭能力^[15]。抑制miR-21表达可降低HTR-8/SVneo细胞增殖、迁移和侵袭^[16]。本研究显示,PE患者胎盘组织中miR-21表达明显降低,miR-21可能参与了PE的发生、发展过程。推测上调miR-21表达可能具有减轻PE的作用。

3.2 miR-21与HTR-8/SVneo细胞的关系

本研究显示,过表达miR-21可促进HTR-8/SVneo细胞增殖。EMT是具有极性的上皮细胞失去上皮特性获得间质细胞特性的发育过程,可反映细胞迁移和侵袭的能力。E-cadherin、N-cadherin和vimentin为EMT标志蛋白,E-cadherin可维持细胞间粘附作用,N-cadherin可促进上皮-间质细胞的迁移,细胞角蛋白细胞骨架转化为波形蛋白vimentin为主的细胞骨架,获得间质细胞的形态和迁移能力^[17]。本研究显示,HTR-8/SVneo细胞中N-cadherin、vimentin蛋白低表达,E-cadherin蛋白高表达。上调miR-21表达后可促进细胞EMT,进一步通过细胞迁移和侵袭实验证实上调miR-21表达可促进细胞迁移和侵袭能力。Bax和Bcl-2蛋白可调控细胞凋亡过程,Bax可通过激活凋亡蛋白,破坏线粒体结构来促进细胞凋亡;Bcl-2可抑制多种凋亡蛋白表达和激活,维持线粒体结构来降低细胞凋亡^[18]。本研究显示,上调miR-21表达可通过调控

Bax和Bcl-2蛋白来降低HTR-8/SVneo细胞的凋亡,进一步通过凋亡实验证实该结论。提示过表达miR-21可促进HTR-8/SVneo细胞增殖、迁移和侵袭。

3.3 miR-21与RASA1的关系

RASA1是一种RAS-GAP蛋白,一个关键的细胞内分子,可调节与增殖、分化和凋亡相关的信号通路。RASA1激活Ras的内在GTPase活性,促进Ras GTP水解为Ras GDP。RASA1通过GTPase激活蛋白(GAP)相关的催化结构域与活化的Ras(Ras GTP)结合,阻断Ras信号通路,抑制RAS-MAPK通路,从而抑制细胞增殖,促进细胞凋亡^[7]。张丹瑜等^[19]研究表明,RASA1在不明原因复发性流产妇女滋养层细胞中高表达,可能通过阻断RAS-MAPK通路来抑制滋养层细胞生物学活性,致使流产发生。Zhang等^[20]研究表明,激活RAS-MAPK通路可促进滋养层细胞增殖和侵袭能力。本研究显示,RASA1在PE胎盘组织和PE滋养层细胞中高表达,RAS-MAPK通路相关蛋白p-Raf/Raf、p-MEK/MEK和p-ERK/ERK表达水平降低,HTR-8/SVneo细胞功能活性被抑制。过表达miR-21后,RASA1表达水平明显降低,RAS-MAPK通路相关蛋白p-Raf/Raf、p-MEK/MEK和p-ERK/ERK表达水平升高,HTR-8/SVneo细胞增殖、迁移和侵袭能力增强,细胞凋亡率降低。双荧光素酶活性实验证实miR-21与RASA1存在靶向调节关系。这提示miR-21可能通过下调RASA1来激活RAS-MAPK通路,进而促进HTR-8/SVneo细胞生物学活性。为进一步验证该结论,本研究进行回复实验,在过表达miR-21的同时上调RASA1表达,并以仅过表达miR-21作对比,结果显示,上调RASA1表达可部分逆转过表达miR-21对HTR-8/SVneo细胞功能的改善作用。

综上所述,miR-21可能通过下调RASA1来激活RAS-MAPK通路,进而促进HTR-8/SVneo细胞增殖、迁移和细胞间质转化,降低细胞凋亡率,以改善滋养层细胞功能。本研究仅在细胞水平进行了实验,后期还需进行动物实验加以验证。

[参考文献]

[1] Tyrmi J S, Kaartokallio T, Lokki A I, et al. Genetic risk

- factors associated with preeclampsia and hypertensive disorders of pregnancy[J]. *JAMA Cardiol*, 2023, 8(7): 674-683.
- [2] Yang C, Baker P N, Granger J P, et al. Long-term impacts of preeclampsia on the cardiovascular system of mother and offspring[J]. *Hypertension*, 2023, 80(9): 1821-1833.
- [3] Viana-Mattioli S, Fonseca-Alaniz M H, Pinheiro-de-Sousa I, et al. Missing links in preeclampsia cell model systems of endothelial dysfunction[J]. *Trends Mol Med*, 2023, 29(7): 541-553.
- [4] Yang X, Huang X, Lu W, et al. Transcriptome profiling of miRNA-mRNA interactions and associated mechanisms in chemotherapy-induced neuropathic pain[J]. *Mol Neurobiol*, 2023, 60(10): 5672-5690.
- [5] Dong K, Zhang X, Ma L, et al. Downregulations of circulating miR-31 and miR-21 are associated with preeclampsia[J]. *Pregnancy Hypertens*, 2019, 17(2): 59-63.
- [6] Dong K, Hou Y, Zhang N, et al. Down-regulated placental miR-21 contributes to preeclampsia through targeting RASA1[J]. *Hypertens Pregnancy*, 2021, 40(3): 236-245.
- [7] Zhang J, Liu X, Gao Y. Abnormal H3K27 histone methylation of RASA1 gene leads to unexplained recurrent spontaneous abortion by regulating Ras-MAPK pathway in trophoblast cells[J]. *Mol Biol Rep*, 2021, 48(6): 5109-5119.
- [8] 张竣, 张丹瑜, 刘新琼. RASA1 通过调控 Ras-MAPK 通路抑制滋养细胞的增殖迁移功能[J]. 暨南大学学报(自然科学与医学版), 2021, 42(6): 563-570.
- [9] 谢幸, 孔北华, 段涛. 妇产科学[M]. 9 版. 北京: 人民卫生出版社, 2018: 84-89.
- [10] Socha M W, Chmielewski J, Pietrus M, et al. Endogenous digitalis-like factors as a key molecule in the pathophysiology of pregnancy-induced hypertension and a potential therapeutic target in preeclampsia[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(16): 12743-12754.
- [11] 张雅, 刘晓红. GRHL2 在子痫前期患者胎盘中的表达及对滋养层细胞增殖、侵袭的影响[J]. 中国妇幼健康研究, 2024, 35(9): 7-13.
- [12] Mirzakhani H, Handy D E, Lu Z, et al. Integration of circulating microRNAs and transcriptome signatures identifies early-pregnancy biomarkers of preeclampsia[J]. *Clin Transl Med*, 2023, 13(11): e1446.
- [13] Qin Y, Bily D, Aguirre M, et al. Understanding PPAR γ and its agonists on trophoblast differentiation and invasion: potential therapeutic targets for gestational diabetes mellitus and preeclampsia[J]. *Nutrients*, 2023, 15(11): 2459-2462.
- [14] Xu W, Liu F, Li Q, et al. Integrated analysis of miRNA and mRNA regulation network in hypertension[J]. *Biochem Genet*, 2023, 61(6): 2566-2579.
- [15] Zheng D, Hou Y, Li Y, et al. Corrigendum: Long Non-Coding RNA Gas5 is associated with preeclampsia and regulates biological behaviors of trophoblast via MicroRNA-21[J]. *Front Genet*, 2022, 12(4): 805011-80523.
- [16] Chaiwangyen W, Ospina-Prieto S, Photini S M, et al. Dissimilar microRNA-21 functions and targets in trophoblastic cell lines of different origin[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2015, 68(2): 187-196.
- [17] Liu J, Song J, Yang Q, et al. Correlation between Lactobacillus and expression of E-cadherin, β -catenin, N-cadherin, and Vimentin in postmenopausal cervical lesions[J]. *Ann Palliat Med*, 2022, 11(1): 135-145.
- [18] Salavatipour M S, Kouhbananinejad S M, Lashkari M, et al. Kermanian propolis induces apoptosis through upregulation of Bax/Bcl-2 ratio in acute myeloblastic leukemia cell line (NB4)[J]. *J Cancer Res Ther*, 2023, 19(2): 327-334.
- [19] 张丹瑜, 张竣, 肖云敏, 等. RASA1 与 Ras-MAPK 信号通路在 URSA 滋养细胞中的表达及临床意义[J]. 当代医学, 2018, 24(19): 32-34.
- [20] Zhang J, Liu X, Gao Y. The long noncoding RNA MEG3 regulates Ras-MAPK pathway through RASA1 in trophoblast and is associated with unexplained recurrent spontaneous abortion[J]. *Mol Med*, 2021, 27(1): 70-79.
- [专业责任编辑: 宗 璐]
[中文编辑: 刘昕田; 英文编辑: 杨周岐]