

环状RNA BRAF₂在子痫前期胎盘滋养细胞增殖和凋亡中的作用及其机制

张玉月^{1,2,3}, 朱亚飞⁴, 高丽娜^{1,2,3}, 殷荷¹, 马朝霞^{1,2,3}, 吴玉珠^{1,2,3}, 王艳华², 吴凯⁴, 张慧萍^{2,3*}

¹宁夏医科大学临床医学院, 宁夏银川 750004; ²宁夏医科大学总医院产前诊断中心, 宁夏银川 750004; ³国家卫生健康委员会代谢性心血管疾病研究重点实验室/宁夏血管损伤与修复研究重点实验室, 宁夏银川 750004; ⁴宁夏医科大学基础医学院, 宁夏银川 750004

[中图分类号] R714.25 [文献标志码] A [DOI] 10.11855/j.issn.0577-7402.2023.04.0374

[声明] 本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文] 张玉月, 朱亚飞, 高丽娜, 等. 环状RNA BRAF₂在子痫前期胎盘滋养细胞增殖和凋亡中的作用及其机制[J]. 解放军医学杂志, 2023, 48(4): 374-382.

[收稿日期] 2022-01-05 [录用日期] 2022-04-10 [上线日期] 2022-10-17

[摘要] **目的** 探讨环状RNA BRAF₂(circRNA BRAF₂)在子痫前期(PE)胎盘滋养细胞增殖和凋亡中的作用及其机制。**方法** 收集2018年1月—2019年2月宁夏医科大学总医院正常妊娠与PE孕妇的胎盘组织($n=21$), 采用qRT-PCR检测两组胎盘组织中circRNA BRAF₂的表达水平, 并分析circRNA BRAF₂表达水平与血压的相关性。体外培养人源胎盘滋养细胞株(HTR8-S/Vneo): (1)将细胞分为对照组与缺氧组, 采用qRT-PCR检测circRNA BRAF₂的表达; (2)在HTR8-S/Vneo中转染circRNA BRAF₂慢病毒空载体和过表达慢病毒, 分为对照组、circRNA BRAF₂阴性对照组及circRNA BRAF₂过表达组, 使用qRT-PCR对circRNA BRAF₂进行过表达验证; (3)在circRNA BRAF₂过表达慢病毒转染成功的基础上, 将细胞分为对照组、circRNA BRAF₂阴性对照组、circRNA BRAF₂过表达组、缺氧组、缺氧+circRNA BRAF₂阴性对照组与缺氧+circRNA BRAF₂过表达组, 采用EdU和CCK-8法检测细胞增殖情况, 流式细胞术检测细胞凋亡水平, Western blotting检测凋亡相关蛋白caspase-3、caspase-9、Bcl-2及Bax的表达。采用qRT-PCR检测circRNA BRAF₂在HTR8-S/Vneo细胞质和细胞核中的表达水平, 通过生物信息学分析筛选与circRNA BRAF₂可能结合的miRNA并检测其在组织和细胞中的表达水平。**结果** 与正常妊娠组比较, PE组孕妇胎盘组织中circRNA BRAF₂表达水平明显降低($P<0.001$), 且circRNA BRAF₂表达水平与收缩压、舒张压呈负相关($r=-0.4531, P<0.01$; $r=-0.4381, P<0.01$)。qRT-PCR检测结果显示, 与对照组比较, 缺氧组circRNA BRAF₂表达水平明显降低($P<0.01$)。circRNA BRAF₂阴性对照组circRNA BRAF₂表达水平与对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$); 与circRNA BRAF₂阴性对照组比较, circRNA BRAF₂过表达组circRNA BRAF₂表达水平明显升高($P<0.001$)。EdU及CCK-8法检测结果显示, 与对照组比较, 缺氧组EdU阳性细胞百分比明显下降($P<0.001$), 滋养细胞增殖能力降低($P<0.001$); 与缺氧+circRNA BRAF₂阴性对照组比较, 缺氧+circRNA BRAF₂过表达组滋养细胞EdU阳性细胞百分比明显升高($P<0.001$), 滋养细胞增殖能力明显增强($P<0.001$)。流式细胞术检测结果显示, 与对照组比较, 缺氧组细胞凋亡率明显增高($P<0.001$); 与缺氧+circRNA BRAF₂阴性对照组比较, 缺氧+circRNA BRAF₂过表达组细胞凋亡率明显降低($P<0.001$)。Western blotting检测结果显示, 与对照组比较, 缺氧组caspase-3、caspase-9及Bax蛋白表达水平升高($P<0.01$ 或 $P<0.001$), Bcl-2蛋白表达水平降低($P<0.01$); 与缺氧+circRNA BRAF₂阴性对照组比较, 缺氧+circRNA BRAF₂过表达组caspase-3、caspase-9及Bax蛋白表达水平降低($P<0.001$ 或 $P<0.01$), Bcl-2蛋白表达水平升高($P<0.05$)。qRT-PCR检测结果显示, circRNA BRAF₂主要在细胞质中表达, 生物信息学分析结果显示, circRNA BRAF₂与miR-7855-5p存在结合位点。qRT-PCR检测结果显示, 与正常妊娠组比较, miR-7855-5p在PE胎盘组织中高表达($P<0.05$); 与对照组细胞比较, 缺氧组miR-7855-5p明显高表达($P<0.001$)。**结论** circRNA BRAF₂可促进PE胎盘滋养细胞增殖并抑制其凋亡, 作用机制可能与miR-7855-5p有关。

[关键词] 子痫前期; circRNA; 细胞增殖; 细胞凋亡; miRNAs

[基金项目] 国家自然科学基金地区项目(81760270); 宁夏自然科学基金重点项目(2020AAC02038); 宁夏自然科学基金一般项目(2020AAC03380); 宁夏回族自治区重点研发计划重点项目(2019BFG02004, 2021BEG02028)

[作者简介] 张玉月, 硕士研究生, 主要从事子痫前期发病机制方面的研究

[通信作者] 张慧萍, E-mail: zhp19760820@163.com

Role and mechanism of circRNA BRAF_2 in proliferation and apoptosis of placental trophoblast cells in preeclampsia

Zhang Yu-Yue^{1,2,3}, Zhu Ya-Fei⁴, Gao Li-Na^{1,2,3}, Yin He¹, Ma Zhao-Xia^{1,2,3}, Wu Yu-Zhu^{1,2,3}, Wang Yan-Hua², Wu Kai⁴, Zhang Hui-Ping^{2,3*}

¹College of Clinical Medicine, Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China

²Prenatal Diagnosis Center, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China

³National Health Commission Key Laboratory of Metabolic Cardiovascular Diseases Research/Ningxia Key Lab of Vascular Injury and Repair Research, Yinchuan, Ningxia 750004, China

⁴College of Basic Medicine, Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China

*Corresponding author, E-mail: zhp19760820@163.com

This work was supported by the Regional Program of the National Natural Science Foundation of China (81760270), the Key Project of Natural Science Foundation of Ningxia (2020AAC02038), the General Program of Natural Science Foundation of Ningxia (2020AAC03380), and the Ningxia Key Research and Development Projects (2019BFG02004, 2021BEG02028)

[Abstract] **Objective** To investigate the role and mechanism of circRNA BRAF_2 in proliferation and apoptosis of placental trophoblast cells in preeclampsia (PE). **Methods** Placental tissues of pregnant women with normal pregnancy and PE were collected ($n=21$) in the General Hospital of Ningxia Medical University from January 2018 to February 2019. The expression level of circRNA BRAF_2 in placental tissues of the two groups was detected by qRT-PCR, and the correlation between circRNA BRAF_2 expression level and blood pressure was analyzed. Human placental trophoblast cell lines (HTR8-S/Vneo) were cultured *in vitro*, (1) Cells were divided into control group and hypoxia group, and the expression of circRNA BRAF_2 were detected by qRT-PCR. (2) HTR8-S/Vneo was transfected with circRNA BRAF_2 lentivirus empty vector and circRNA BRAF_2 overexpression lentivirus, and then divided into control group, circRNA BRAF_2 negative control group and circRNA BRAF_2 overexpression group. The overexpression of circRNA BRAF_2 was verified with qRT-PCR. (3) Based on the successful transfection of circRNA BRAF_2 overexpressing lentivirus, the cells were divided into control group, circRNA BRAF_2 negative control group, circRNA BRAF_2 overexpression group, hypoxia group, hypoxia + circRNA BRAF_2 negative control group, and hypoxia + circRNA BRAF_2 overexpression group. EdU and CCK-8 methods were used to detect the proliferation. Flow cytometry was used to detect the changes of apoptosis level. Western blotting was used to detect the expression levels of apoptosis-related proteins caspase-3, caspase-9, Bcl-2 and Bax. qRT-PCR was used to detect the expression levels of circRNA BRAF_2 in HTR8-S/Vneo cytoplasm and nucleus. Bioinformatics analysis was performed to screen out the miRNA that might bind circRNA BRAF_2 and detect their expression levels in tissues and cells. **Results** Compared with normal pregnancy group, the expression level of circRNA BRAF_2 was significantly decreased in placenta of PE group ($P<0.001$), and of circRNA BRAF_2 was negatively correlated with systolic pressure and diastolic pressure ($r=-0.4531$, $P<0.01$; $r=-0.4381$, $P<0.01$). qRT-PCR showed that compared with control group, the expression level of circRNA BRAF_2 in hypoxia group was significantly decreased ($P<0.01$), and the relative expression level of circRNA BRAF_2 in negative control group showed no significant difference when compared with control group ($P>0.05$). Compared with that in circRNA BRAF_2 negative control group, the circRNA BRAF_2 expression level increased significantly in circRNA BRAF_2 overexpression group ($P<0.001$). The detection results of EdU and CCK-8 showed that, compared with control group, the percentage of positive EdU cells decreased significantly ($P<0.001$) in hypoxia group, trophoblast proliferation ability decreased ($P<0.001$); Compared with the hypoxia + circRNA BRAF_2 negative control group, the percentage of EdU positive trophoblast cells increased significantly in hypoxia + circRNA BRAF_2 overexpression group ($P<0.001$), and the proliferation ability of trophoblast cells was significantly enhanced ($P<0.001$). The detection results of flow cytometry showed that, compared with control group, the apoptosis rate of hypoxia group increased obviously ($P<0.001$); Compared with the hypoxia + circRNA BRAF_2 negative control group, the apoptosis rate of the hypoxia + circRNA BRAF_2 overexpression group decreased significantly ($P<0.001$). Western blotting showed that compared with control group, the relative expressions of caspase-3, caspase-9 and Bax proteins increased ($P<0.01$ or $P<0.001$), and of Bcl-2 protein decreased ($P<0.01$) in hypoxia group; Compared with the hypoxia + circRNA BRAF_2 negative control group, the relative expressions of caspase-3, caspase-9 and Bax proteins decreased ($P<0.001$ or $P<0.01$), and of Bcl-2 protein increased ($P<0.05$) in hypoxia + circRNA BRAF_2 overexpression group. The results of qRT-PCR showed that circRNA BRAF_2 was expressed mainly in cytoplasm, and bioinformatics analysis showed that binding sites existed between circRNA BRAF_2 and miR-7855-5p. and miR-7855-5p was highly expressed in PE placental tissue than that in normal pregnancy group ($P<0.05$); Compared with control group, miR-7855-5p was obviously highly expressed in hypoxia group ($P<0.001$). **Conclusion** circRNA BRAF_2 can promote proliferation and inhibit apoptosis of PE placental trophoblast cells, and the mechanism may be related to miR-7855-5p.

[Key words] preeclampsia; circRNA; cell proliferation; cell apoptosis; miRNAs

子痫前期(preeclampsia, PE)是一种妊娠期特发性疾病^[1-2],全球患病率为3%~5%,目前仍是导致孕产妇发病和死亡的重要原因^[3-4],但其发病机制尚不清楚。大量研究发现,胎盘结构功能异常在PE的发病中起主要作用^[5-7]。滋养细胞作为胎盘的主要组成成分,其正常的结构和功能对维持胎盘的正常生理功能至关重要^[8],滋养细胞增殖分化不足、凋亡增加、合胞化异常等可引起子宫螺旋动脉重构障碍,进而导致胎盘发育障碍并诱发PE^[9]。环状RNA(circRNAs)是内源性表达的非编码RNA(ncRNAs)^[10],与线性RNA比较,环状RNA高度稳定,且不易被RNA酶降解^[11],可影响细胞增殖、凋亡、自噬、侵袭、迁移等重要的生物学功能^[12-13],并参与人类多种疾病的发生发展^[14]。PE患者胎盘中存在大量差异表达的circRNAs,但仅少部分被证实^[15],而circRNA BRAF_2在PE发病机制中的研究尚未见报道。因此,本研究以人胎盘组织及滋养细胞为研究对象,同时制备滋养细胞体外缺氧模型模拟PE发生发展的病理环境,探讨circRNA BRAF_2在PE胎盘滋养细胞增殖和凋亡中的作用及可能机制,旨在为PE的早期诊断及治疗提供新的理论基础。

1 材料与方法

1.1 研究对象 选取2018年1月—2019年2月宁夏医科大学总院收治的PE患者($n=21$)和同期正常妊娠剖宫产分娩的健康孕妇($n=21$),采集其胎盘组织进行回顾性分析。PE组纳入标准:符合PE诊断标准[妊娠20周后收缩压 ≥ 140 mmHg和(或)舒张压 ≥ 90 mmHg],并伴有以下任何一种情况:尿蛋白 ≥ 0.3 g/24 h或随机尿蛋白 $\geq (+)$;或虽无尿蛋白,但合并下列5项中的任何一项[①血小板减少($<100 \times 10^9$);②肝功能损害(血清转氨酶水平为正常值范围上限2倍以上);③肾功能损害(血肌酐水平 >0.11 mg/L或为正常值范围上限2倍以上);④肺水肿;⑤新发生的中枢神经系统异常或视觉障碍]^[16]。正常妊娠组纳入标准:同期因胎位不正、瘢痕子宫、高龄孕妇、社会因素等行剖宫产的孕妇。排除标准:(1)多胎妊娠;(2)合并高血压等心血管疾病、糖尿病等代谢性疾病、自身免疫性疾病、肝硬化、胆汁淤积、血液系统疾病及继发性高血压等。本研究获宁夏医科大学总医院伦理委员会审查批准(2017-069)。收集胎盘组织标本前征得所有孕产妇同意并签署知情同意书。

1.2 细胞及主要试剂 人绒毛膜滋养层细胞(HTR8-S/Vneo)购自上海复旦细胞库。胎牛血清、RPMI 1640培养基购自美国Gibco公司,青链霉素

及胰蛋白酶消化液购自北京Solarbio公司,总蛋白提取试剂盒购自上海贝博公司,兔抗胱天蛋白酶-9(caspase-9)抗体购自武汉赛维尔生物科技有限公司,兔抗Bcl-2抗体购自北京博奥森生物技术有限公司,兔抗caspase-3抗体购自美国CST公司,兔抗Bax抗体购自美国Affinity公司,总RNA提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司,反转录试剂盒、荧光定量PCR试剂盒购自日本TaKaRa公司,CCK-8检测试剂盒购自北京兰博利德生物技术有限公司。miR-7855-5p和U6引物由广州锐博公司(该公司不提供引物序列)合成。circRNA BRAF_2引物:上游TTGCACGACAGACTGCACAG,下游TGAGGATCGGTCTCGTTGCC;人ACTB(内参)引物:上游CCTGGCACCCAGCACAAAT,下游GGGCCGACTCGTCATAC。引物序列由上海生工公司合成。

1.3 方法

1.3.1 患者资料收集及胎盘组织采集 收集研究对象的临床资料,并分析胎盘组织中circRNA BRAF_2表达水平与血压的相关性。采集正常妊娠及PE组孕妇剖宫产后母面胎盘组织,避开肉眼可见的钙化灶和坏死区域,以脐带为中心2 cm处向下1 cm,分3处取样,切取大小为1.0 cm \times 1.0 cm \times 1.0 cm的胎盘组织3块,将3块胎盘组织分别放入3个冻存管中,标注姓名和住院号,冻存于 -80 °C冰箱。

1.3.2 细胞培养 培养HTR8-S/Vneo细胞,分为常氧培养和缺氧培养两种培养方法。常氧培养方法:在37 °C、5% CO₂培养箱中,使用含10%胎牛血清、1%青链霉素的RPMI 1640培养基培养滋养细胞,细胞生长融合至90%时用胰蛋白酶消化传代,每1~2 d换一次培养液。缺氧培养方法:细胞在培养箱中以37 °C、1% O₂和5% CO₂的条件培养,48 h后收取细胞进行后续实验。

1.3.3 细胞转染 培养滋养细胞至对数生长期,消化后接种于6孔板中继续培养,待细胞生长融合至60%~70%时采用过表达慢病毒颗粒试剂盒转染,培养4~6 h弃原培养基,更换新的培养基继续培养24 h,加入含有最小致死浓度嘌呤霉素的培养液,筛选稳定转染的细胞群,收取细胞进行后续实验。

1.3.4 CCK-8法检测细胞增殖能力 将细胞分为对照组、circRNA BRAF_2阴性对照组、circRNA BRAF_2过表达组、缺氧组、缺氧+circRNA BRAF_2阴性对照组、缺氧+circRNA BRAF_2过表达组,培养各组细胞至对数生长期,胰酶消化后将各组细胞接种至96孔板中,约每孔 3×10^3 个细胞,培养24 h后换液,48 h后每孔加入10 μ l CCK-8试剂,混匀继续培养2 h后,酶标仪检测450 nm处各孔吸光度值。

1.3.5 EdU染色检测细胞增殖能力 细胞分组同1.3.4, 培养各组细胞至对数生长期, 胰酶消化后将各组细胞接种至激光共聚焦小皿中, 每皿约 $2 \times 10^4 \sim 1 \times 10^6$ 个细胞, 48 h后, 用含血清培养基按1000:1的比例稀释EdU溶液(试剂A), 制备50 $\mu\text{mol/L}$ 的EdU培养基, 每个小皿中加入50 $\mu\text{mol/L}$ EdU培养基500 μl 孵育2 h, PBS清洗细胞5 min \times 2次。依次加入固定液(含4%多聚甲醛的PBS)、甘氨酸、渗透剂进行孵育, PBS清洗5 min, 然后加入500 μl 染色反应液孵育30 min, 弃染色反应液, 加入500 μl 渗透剂脱色, 摇床清洗10 min \times 2次, 弃渗透剂。每个小皿加入500 μl $1 \times$ Hoechst 33342反应液孵育30 min后PBS清洗5 min \times 3次。染色完成后立即在荧光显微镜下观察。

1.3.6 流式细胞术检测细胞凋亡情况 细胞分组同1.3.4, 收集各组细胞, 用PBS洗5 min \times 2次, 加入1 ml不含酚红和EDTA的胰酶消化1 min, 弃胰酶, 加入1 ml PBS轻柔吹落细胞, 并转移至1.5 ml离心管中, 1000 r/min离心5 min, 弃上清, 再加入1 ml PBS离心5 min, 弃上清。重复以上步骤2次。避光放置, 每管先加入100 μl 结合液, 吹匀后先加入5 μl 7-氨基放线菌素D(7-AAD), 再加5 μl 藻红蛋白(PE), 混匀, 静置15 min, 加入400 μl 结合液, 吹匀, 用滤膜过滤后上机。在流式细胞仪上用空白对照管调节前向散射光(FSC)、侧向散射光(SSC)和荧光通道电压后进行检测。

1.3.7 Western blotting检测凋亡相关蛋白表达水平 细胞分组同1.3.4, 收集各组细胞, 按照全蛋白提取试剂盒提取总蛋白; 采用BCA蛋白定量法检测蛋白浓度, 经SDS-PAGE后, 以300 mA恒电流转80 min至PVDF膜。经50 g/L脱脂牛奶封闭2 h; 加入兔抗Bax抗体(1:3000)、兔抗Bcl-2抗体(1:500)、兔抗caspase-3抗体(1:1000)、兔抗caspase-9抗体(1:1000)、兔抗 β -actin抗体(1:5000), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜; PBST浸洗10 min \times 3次, 加入HRP标记的山羊抗兔IgG(1:5000), 室温孵育2 h; PBST浸洗10 min \times 3次, ECL化学发光显色, 应用Image Lab软件对检测结果的吸光度值进行分析。以目的蛋白/ β -actin的比值作为目的蛋白的相对表达量。

1.3.8 qRT-PCR检测circRNA BRAF_2及miR-7855-5p相对表达水平 (1)取正常妊娠组与PE组胎盘组织, 检测circRNA BRAF_2和miR-7855-5p相对表达水平; (2)收集对照组与缺氧组细胞, 检测circRNA BRAF_2和miR-7855-5p相对表达水平; (3)为了验证滋养细胞circRNA BRAF_2过表达慢病毒转染成功, 收集对照组、circRNA BRAF_2阴性对照组、circRNA BRAF_2过表达组细胞, 检测circRNA

BRAF_2相对表达水平; (4)按照细胞质/细胞核RNA分离试剂盒说明书提取滋养细胞细胞质/细胞核的RNA, 检测circRNA BRAF_2相对表达水平。提取所需组别细胞总RNA, 用反转录试剂盒反转录成cDNA, 并根据qRT-PCR说明书步骤进行扩增。circRNA BRAF_2扩增条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性5 s、60 $^{\circ}\text{C}$ 退火及延伸30 s, 共40个循环。miR-7855-5p扩增条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性5 s、60 $^{\circ}\text{C}$ 退火及延伸30 s, 共40个循环。设置空白对照和内参(miR-7855-5p内参为U6; circRNA BRAF_2内参为人ACTB)对照同体系扩增。反应结束后, 根据扩增曲线计算circRNA BRAF_2及miR-7855-5p的相对表达水平。

1.4 统计学处理 采用Prism 7.0软件进行统计分析。所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用独立样本 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用Tukey检验; circRNA BRAF_2与患者血压的关系采用Pearson相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 正常妊娠组与PE组临床资料比较 与正常妊娠组比较, PE组年龄和孕周差异无统计学意义($P > 0.05$), 但收缩压和舒张压均明显增高($P < 0.0001$) (表1)。

表1 正常妊娠组与PE组临床资料比较($\bar{x} \pm s$, $n=21$)

Tab.1 Comparison of clinical data of gravida in normal pregnancy group and preeclampsia group ($\bar{x} \pm s$, $n=21$)

项目	正常妊娠组	PE组	P
年龄(岁)	30.8 \pm 4.4	28.8 \pm 5.5	0.2018
孕周(周)	38.60 \pm 1.74	38.03 \pm 1.62	0.3290
收缩压(mmHg)	117.50 \pm 14.29	154.60 \pm 12.05	<0.0001
舒张压(mmHg)	77.24 \pm 7.63	103.50 \pm 12.29	<0.0001

PE. 子痫前期

2.2 circRNA BRAF_2在正常妊娠组及PE组胎盘组织中的表达 qRT-PCR检测结果显示, PE组circRNA BRAF_2的表达水平明显低于正常妊娠组(0.2132 ± 0.1187 vs. 0.3940 ± 0.1908 , $P < 0.001$)。

2.3 circRNA BRAF_2表达水平与PE患者血压的相关性分析 Pearson相关分析结果显示, circRNA BRAF_2的表达水平与收缩压和舒张压均呈负相关($r = -0.4531$, $P < 0.01$; $r = -0.4381$, $P < 0.01$, 图1)。

2.4 circRNA BRAF_2在缺氧诱导HTR8-S/Vneo细胞中的表达 HTR8-S/Vneo经缺氧处理48 h后, 与对照组比较, 缺氧组中的circRNA BRAF_2表达降低(0.0210 ± 0.0081 vs. 0.1625 ± 0.0430 , $P < 0.01$)。

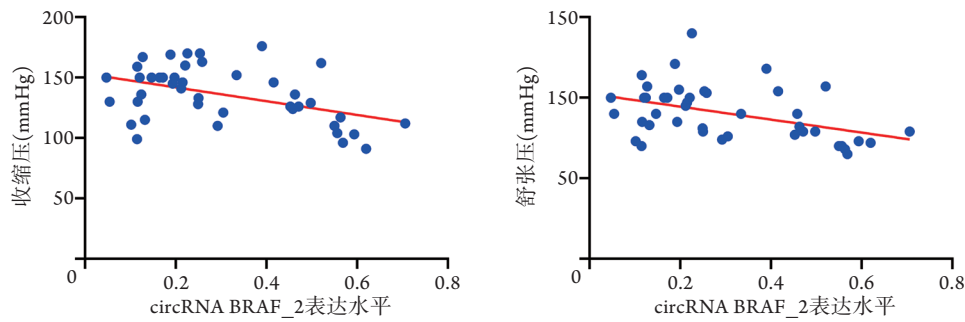


图1 circRNA BRAF_2表达水平与PE患者血压的相关性分析

Fig.1 Correlation analysis of circRNA BRAF_2 expression level with blood pressure of patients

2.5 滋养细胞circRNA BRAF_2过表达慢病毒转染验证 将circRNA BRAF_2过表达慢病毒转染至滋养细胞后, qRT-PCR检测结果显示, circRNA BRAF_2阴性对照组circRNA BRAF_2相对表达水平与对照组比较差异无统计学意义(0.0338 ± 0.0072 vs. 0.0363 ± 0.0061 , $P > 0.05$); 与circRNA BRAF_2阴性对照组比较, circRNA BRAF_2过表达组circRNA BRAF_2相对表达水平(0.2456 ± 0.0552)明显升高($P < 0.001$), 提示成功构建了circRNA BRAF_2过表达细胞系, 可用于后续实验。

2.6 circRNA BRAF_2过表达对胎盘滋养细胞增殖能力的影响 EdU染色结果显示, 缺氧组EdU阳性细胞百分比较对照组明显降低($P < 0.001$); 与缺氧+circRNA BRAF_2阴性对照组比较, 缺氧+circRNA BRAF_2过表达组阳性细胞百分比明显增高($P < 0.001$)(图2A、B)。CCK-8法检测结果显示, 与对照组比较, 缺氧组滋养细胞增殖活力下降($P < 0.001$), 缺氧+circRNA BRAF_2过表达组细胞增殖活力较缺氧+circRNA BRAF_2阴性对照组明显增强($P < 0.001$)(图2C)。

2.7 circRNA BRAF_2过表达对胎盘滋养细胞凋亡的影响 流式细胞仪检测结果显示, 缺氧组细胞凋亡率较对照组明显增高($P < 0.001$); 与缺氧+circRNA BRAF_2阴性对照组比较, 缺氧+circRNA BRAF_2过表达组细胞凋亡率明显降低($P < 0.001$, 图3A)。Western blotting检测结果显示, 缺氧组细胞中caspase-3、caspase-9和Bax蛋白表达水平较对照组明显升高($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$), 而Bcl-2表达水平明显降低($P < 0.01$); 与缺氧+circRNA BRAF_2阴性对照组比较, 缺氧+circRNA BRAF_2过表达组caspase-3、caspase-9、Bax的表达水平明显降低($P < 0.001$ 或 $P < 0.01$), 而Bcl-2表达水平升高($P < 0.05$, 图3B)。

2.8 circRNA BRAF_2的定位分析结果 qRT-PCR检测结果显示, circRNA BRAF_2在细胞质和细胞核中均有表达, 但主要在细胞质中表达(占比为96.34%), 细胞核中占比仅为3.66%。

2.9 生物信息学分析结果 RNA hybrid生物信息学软件分析发现, circRNA BRAF_2与miR-7855-5p存在互补配对序列(图4A)。qRT-PCR检测结果显示, 与正常妊娠组比较, PE组胎盘组织中miR-7855-5p表达水平明显升高($P < 0.05$, 图4B), 且HTR8-S/Vneo经缺氧处理48 h后, 与对照组比较, 缺氧组中的miR-7855-5p表达水平明显升高, 差异有统计学意义($P < 0.001$, 图4C)。

3 讨论

PE是指妊娠20周后出现的高血压, 伴有蛋白尿或其他终末器官损伤, 严重危害孕产妇的身体健康。尽管大量研究致力于明确PE的预防及治疗措施, 但在过去几十年中, 该病的发病率并未明显改变, 这可能是由于PE潜在的病理生理机制尚未完全阐明^[17]。有研究发现, 在妊娠早期胎盘滋养细胞发生增殖及侵袭迁移, 可促进子宫螺旋动脉重塑, 从而维持胎盘的正常功能; 而PE患者的滋养细胞增殖减少、凋亡增加^[18], 子宫螺旋动脉重塑异常及胎盘持续缺氧, 从而引起胎盘功能障碍, 提示滋养细胞功能改变可能是PE发病的关键环节^[19-21]。

circRNAs是一种新型的非编码RNA^[22], 可参与各种疾病的发生发展, 在细胞周期、细胞凋亡、细胞侵袭、细胞迁移等多种生物过程中起关键作用^[23]。孙文思等^[24]发现, circ_0000267在急性淋巴细胞白血病患者中表达上调, 抑制circ_0000267的表达可抑制KOCL44细胞增殖并促进其凋亡。Li等^[25]发现, circ_0001438在PE胎盘组织中呈高表达, 而敲低circ_0001438则可促进胎盘滋养细胞增殖, 抑制其凋亡。本课题组前期在临床收集了正常妊娠孕妇和PE患者胎盘组织各10例并进行测序, 结果发现circRNAs表达谱在不同组织中存在明显差异, 且circRNA BRAF_2在PE胎盘组织中表达明显降低(未发表); 本研究在正常妊娠孕妇及PE患者各21例胎盘组织中进一步验证发现, circRNA BRAF_2在PE胎盘组织中的表达降低, 与测序结果一致, 提

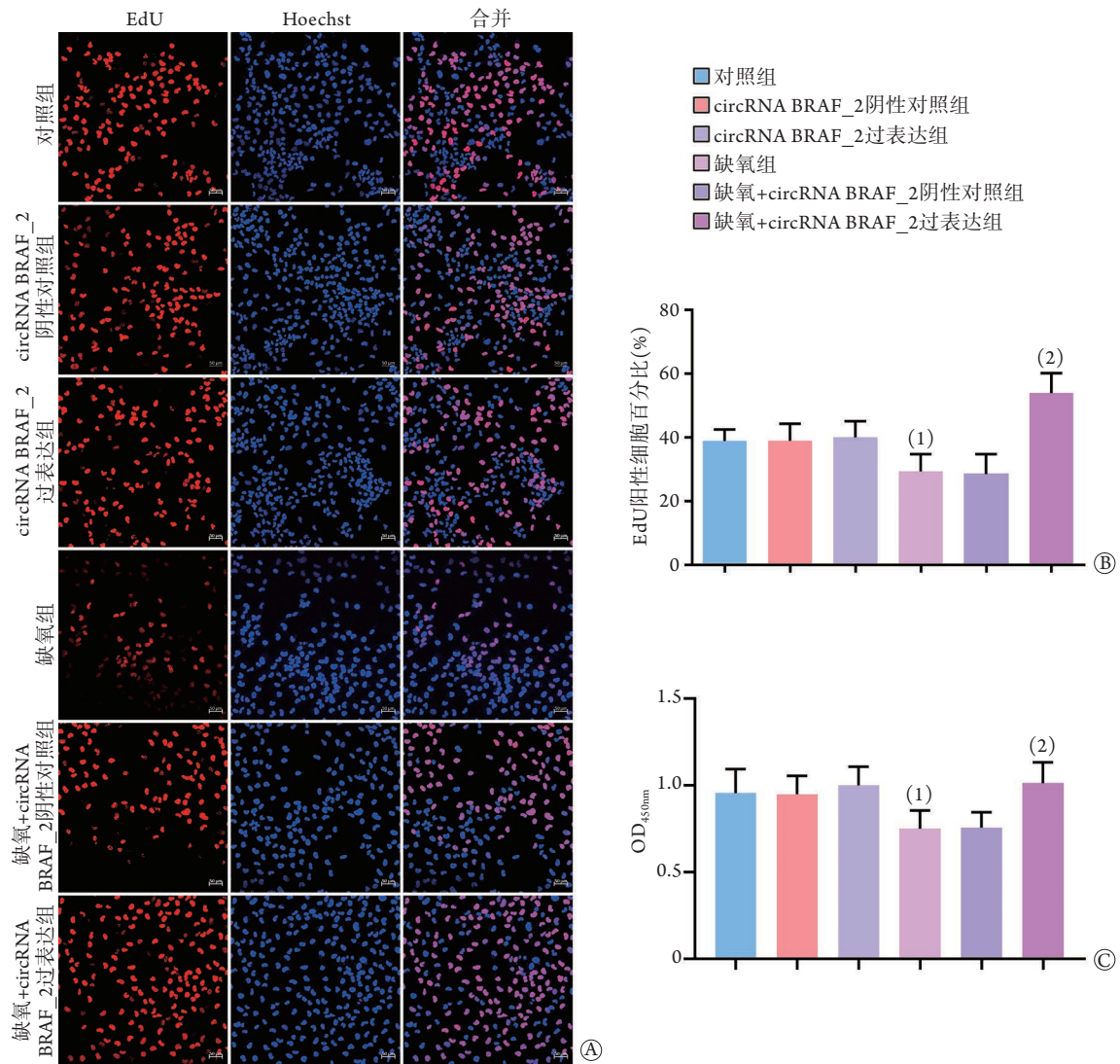


图2 circRNA BRAF_2过表达对胎盘滋养细胞增殖能力的影响

Fig.2 Effect of overexpression circRNA BRAF_2 on the proliferation ability of placental trophoblast cells

A. EdU染色检测滋养细胞增殖水平; B. 各组EdU阳性细胞百分比比较; C. CCK-8法检测滋养细胞增殖活力; 与对照组比较, (1) $P < 0.001$; 与缺氧+circRNA BRAF_2阴性对照组比较, (2) $P < 0.001$

示circRNA BRAF_2可能参与了PE的发生发展。此外,本研究还发现, circRNA BRAF_2的表达水平与孕妇的收缩压、舒张压呈负相关,提示circRNA BRAF_2参与了PE的发生发展,且其表达水平可能与PE病情严重程度呈负相关。因此,本研究进一步采用体外缺氧处理滋养细胞模拟PE发病的微环境,发现circRNA BRAF_2在缺氧处理滋养细胞中的表达水平明显降低,在细胞水平验证了其可参与PE的发生发展。随后,本研究通过多种实验探究circRNA BRAF_2在胎盘滋养细胞增殖及凋亡中的作用, CCK-8和EdU实验结果显示,缺氧可抑制滋养细胞增殖,但缺氧并过表达circRNA BRAF_2后细胞增殖活性明显增强,提示过表达circRNA BRAF_2可缓解由缺氧诱导的滋养细胞增殖能力下降。

目前,细胞凋亡主要的途径有死亡受体介导

的外部凋亡途径、线粒体途径、B粒酶介导的细胞凋亡途径及内质网应激途径^[26-27],其中,线粒体途径是主要的细胞凋亡途径^[28]。线粒体途径主要调控Bcl-2蛋白家族促凋亡成员(Bax)和抗凋亡成员(Bcl-2)之间的平衡,若两者失衡可导致线粒体膜的通透性改变,继而释放细胞色素C激活caspase-9,活化的caspase-9进一步激活caspase-3,最终引起细胞凋亡^[29]。本研究发现,与对照组比较,缺氧组caspase-3、caspase-9、Bax表达水平升高, Bcl-2表达水平降低,而滋养细胞缺氧并过表达circRNA BRAF_2后, caspase-3、caspase-9、Bax表达水平降低, Bcl-2表达水平升高,提示circRNA BRAF_2可能通过抑制线粒体凋亡途径而减少缺氧诱导的滋养细胞凋亡。

有研究证实,竞争性内源RNA(ceRNA)机制

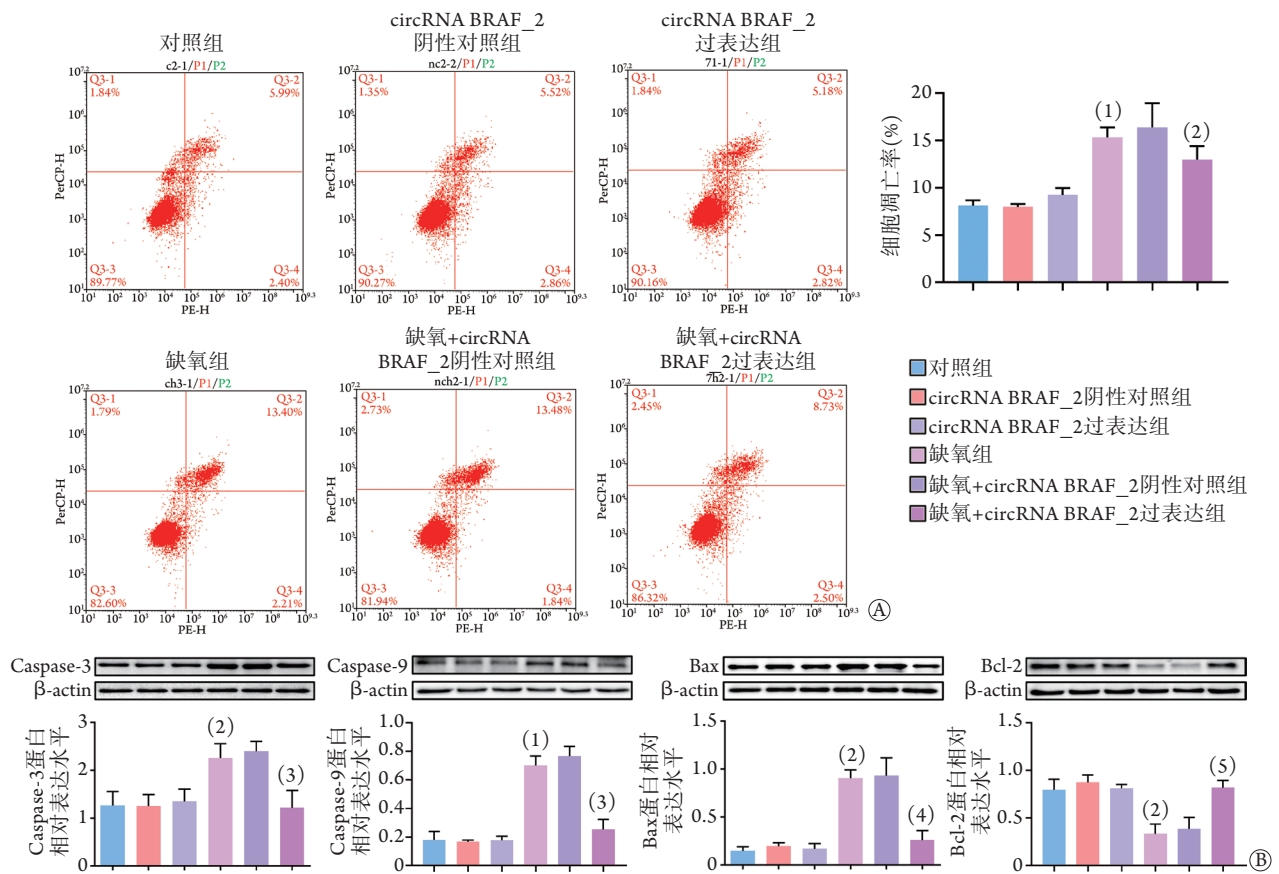


图3 circRNA BRAF_2过表达对胎盘滋养细胞凋亡的影响

Fig.3 Effect of overexpression circRNA BRAF_2 on apoptosis of placental trophoblast cells

A. 流式细胞术检测滋养细胞凋亡率, 与对照组比较, (1) $P < 0.001$; 与缺氧+circRNA BRAF_2阴性对照组比较, (2) $P < 0.001$; B. Western blotting检测各组滋养细胞凋亡相关蛋白表达水平; 与对照组比较, (1) $P < 0.001$, (2) $P < 0.01$; 与缺氧+circRNA BRAF_2阴性对照组比较, (3) $P < 0.001$, (4) $P < 0.01$, (5) $P < 0.05$



图4 生物信息学分析circRNA BRAF_2与miR-7855-5p的结合关系并检测其表达

Fig.4 The binding relationship between circRNA BRAF_2 and miR-7855-5p and detection of their expression (Bioinformatics analysis)

A. circRNA BRAF_2的预测结合位点; B. miR-7855-5p在正常妊娠组和PE组胎盘组织中的表达水平; C. miR-7855-5p在缺氧诱导HTR8-S/Vneo细胞中的表达水平; 与正常妊娠组比较, (1) $P < 0.05$; 与对照组比较, (2) $P < 0.001$

是circRNAs调控基因表达的重要机制之一^[30], circRNAs中富含miRNAs应答元件, 可竞争性地与miRNAs结合, 解除miRNAs对其靶基因的抑制, 上调靶基因的表达^[31]。研究发现, circ0011460在PE胎盘中表达上调, 而circ0011460与miR-762结合后可

上调HTRA1的表达, 提示circ0011460可通过靶向结合miR-762影响滋养细胞的生物学功能^[32]。本研究发现, circRNA BRAF_2主要在细胞质表达, 随后通过生物信息学分析发现circRNA BRAF_2可能结合miR-7855-5p, 而qRT-PCR实验证实, miR-7855-5p在

PE胎盘组织和缺氧诱导的滋养细胞中的表达均上调,提示circRNA BRAF_2可能通过结合miR-7855-5p来调节胎盘滋养细胞的增殖与凋亡。

综上所述, circRNA BRAF_2可能通过与miR-7855-5p结合来影响胎盘滋养细胞的增殖与凋亡,为研究PE的发病机制提供了新的方向,为进一步深入探讨circRNAs在PE胎盘滋养细胞增殖和凋亡过程中的调控作用提供了新的线索。此外,考虑到circRNA具有稳定性及组织特异性等特点, circRNA BRAF_2有望成为PE早期风险评估及预防、诊断的分子标记物。但是,目前本研究还存在一定的局限性,如缺乏PE的动物模型,无法通过体内实验探究circRNA BRAF_2的作用机制,且对于circRNA BRAF_2与miR-7855-5p的直接结合及其下游机制研究不够充分。因此, circRNA BRAF_2如何在机体内调节滋养细胞增殖、凋亡及相关的调控机制是未来进一步研究的方向,可为PE的发病机制提供新的理论依据。

【参考文献】

- [1] Zheng Y, Ma C, Liu X, *et al.* Association between HLA-A gene polymorphism and early-onset preeclampsia in Chinese pregnant women early-onset[J]. *BMC Pregnancy Childbirth*, 2020, 20(1): 656-662.
- [2] Liu C, Qu DY. Changes of soluble CD163 and inflammatory factors in pregnant women with preeclampsia[J]. *Clin J Med Offic*, 2020, 48(6): 679-681. [刘聪, 曲冬颖. 子痫前期孕妇血清可溶性血红蛋白清道夫受体及炎性因子水平变化[J]. *临床军医杂志*, 2020, 48(6): 679-681.]
- [3] Wang Y, Li B, Zhao Y. Inflammation in preeclampsia: genetic biomarkers, mechanisms, and therapeutic strategies[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 883404.
- [4] Sun HX, Cai YF, Ma Z, *et al.* Preventive effect of low-dose aspirin on preeclampsia occurred in preeclampsia high-risk pregnant women and its mechanism[J]. *J Jilin Univ (Med Ed)*, 2020, 46(1): 138-143. [孙红霞, 蔡娱飞, 马哲, 等. 小剂量阿司匹林对子痫前期高危孕妇发生子痫前期的预防作用及其机制[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2020, 46(1): 138-143.]
- [5] Zou Z, Forbes K, Harris LK, *et al.* The potential role of the E SRRG pathway in placental dysfunction[J]. *Reproduction*, 2021, 161(3): R45-R60.
- [6] Chen J, Yue C, Xu J, *et al.* Downregulation of receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1 in preeclampsia placenta inhibits human trophoblast cell proliferation, migration, and invasion by PI3K/AKT/mTOR pathway accommodation[J]. *Placenta*, 2019, 82: 17-24.
- [7] Liu D, Gao Q, Wang Y, *et al.* Placental dysfunction: the core mechanism for poor neurodevelopmental outcomes in the offspring of preeclampsia pregnancies[J]. *Placenta*, 2022, 126: 224-232.
- [8] Zhang CC, Zhang AP, Li YQ. Effect of high expression of Snail on invasion capacity of placental trophoblasts in preeclampsia rats and its mechanism[J]. *J Jilin Univ (Med Ed)*, 2021, 47(4): 911-918. [张长存, 张爱萍, 李玉琴. Snail高表达对子痫前期大鼠胎盘滋养细胞侵袭能力的影响及其机制[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2021, 47(4): 911-918.]
- [9] Jiang L, Li M, Gan H, *et al.* miR-335 targets CRIM1 to promote the proliferation and inhibit the apoptosis of placental trophoblast cells in preeclamptic rats[J]. *Am J Transl Res*, 2021, 13(5): 4676-4685.
- [10] Ou Y, Zhu L, Wei X, *et al.* Circular RNA circ_0111277 attenuates human trophoblast cell invasion and migration by regulating miR-494/HTRA1/Notch-1 signal pathway in pre-eclampsia[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(6): 479-506.
- [11] Wang M, Gu B, Yao G, *et al.* Circular RNA expression profiles and the pro-tumorigenic function of CircRNA_10156 in hepatitis B virus-related liver cancer[J]. *Int J Med Sci*, 2020, 17(10): 1351-1365.
- [12] Zhang K, Shi JT, Zhang XB, *et al.* Research progression in the role and clinical value of circRNAs in intervertebral disc degeneration[J]. *Med J Chin PLA*, 2020, 45(11): 1184-1189. [张凯, 施锦涛, 张晓勃, 等. 环状RNA在椎间盘退变中的作用机制及临床价值[J]. *解放军医学杂志*, 2020, 45(11): 1184-1189.]
- [13] Xia H, Yang X, Chen Y, *et al.* Effect of cervical cancer-derived exosomal hsa_circ_0087432 on the proliferation and migration of HUVECs[J]. *Med J Chin PLA*, 2021, 46(4): 327-332. [夏红, 杨翔, 陈焯, 等. 宫颈癌细胞外泌体has_circ_0087432对人脐静脉内皮细胞增殖及迁移的影响[J]. *解放军医学杂志*, 2021, 46(4): 327-332.]
- [14] Zhang Y, Cao L, Jia J, *et al.* CircHIPK3 is decreased in preeclampsia and affects migration, invasion, proliferation, and tube formation of human trophoblast cells[J]. *Placenta*, 2019, 85: 1-8.
- [15] Li Z, Zhou X, Gao W, *et al.* Circular RNA VPK1 facilitates preeclampsia progression via sponging miR-221-3P to regulate PTEN/Akt[J]. *J Cell Mol Med*, 2022, 26(6): 1826-1841.
- [16] Xie X, Kong BH, Duan T. *Obstetrics and Gynecology*[M]. 9nd ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2018: 83. [谢幸, 孔北华, 段涛. *妇产科学*[M]. 9版. 北京: 人民卫生出版社, 2018: 83.]
- [17] Shan L, Hou X. Circular RNA hsa_circ_0026552 inhibits the proliferation and invasion of trophoblast cells via the miR-331-3p/TGF- β R1 axis in pre-eclampsia[J]. *Mol Med Rep*, 2021, 24(5): 798-828.
- [18] Yin H, Wu QR, Gao LN, *et al.* Role and molecular mechanism of circular RNA RBM39 in placental trophoblast apoptosis induced by hypoxia[J]. *Chin J Clin Pharmacol*, 2021, 37(16): 2180-2183. [殷荷, 吴琪瑞, 高丽娜, 等. 环状RNA circRBM39在缺氧致胎盘滋养细胞凋亡中的作用及其分子机制[J]. *中国临床药理学杂志*, 2021, 37(16): 2180-2183.]
- [19] Mo HQ, Tian FJ, Li X, *et al.* ANXA7 regulates trophoblast proliferation and apoptosis in preeclampsia[J]. *Am J Reprod Immunol*, 2019, 82(6): e13183.
- [20] Chen PS, Chiu WT, Hsu PL, *et al.* Pathophysiological implications of hypoxia in human diseases[J]. *J Biomed Sci*, 2020, 27(1): 63-127.
- [21] Jairajpuri DS, Malalla ZH, Sarray S, *et al.* Analysis of differential expression of hypoxia-inducible microRNA-210 gene targets in mild and severe preeclamptic patients[J]. *Noncoding RNA Res*, 2021, 6(1): 51-57.
- [22] Liu K, Mou Y, Shi X, *et al.* Circular RNA 100146 promotes

- colorectal cancer progression by the microRNA 149/HMGA2 axis[J]. *Mol Cell Biol*, 2021, 41(2): e00445-20.
- [23] Yuan Y, Chen X, Huang E. Upregulation of circular RNA itchy E3 ubiquitin protein ligase inhibits cell proliferation and promotes cell apoptosis through targeting miR-197 in prostate cancer[J]. *Technol Cancer Res Treat*, 2019, 18: 1533033819886867.
- [24] Sun WS, Yu JJ, Lin S. Role of circ_0000267 targeting miR-198 in the proliferation and apoptosis of acute lymphoblastic leukemia cells KOCL44[J/OL]. *Chin J Cell Stem Cell (Electr Ed)*, 2022, 12(1): 19-25. [孙文思, 于皎皎, 林杉. circ_0000267靶向miR-198对急性淋巴细胞白血病细胞KOCL44增殖和凋亡的影响[J/OL]. *中华细胞与干细胞杂志(电子版)*, 2022, 12(1): 19-25.
- [25] Li X, Yang R, Xu Y, *et al*. Circ_0001438 participates in the pathogenesis of preeclampsia via the circ_0001438/miR-942/NLRP3 regulatory network[J]. *Placenta*, 2021, 104: 40-50.
- [26] Bhosale PB, Vetrivel P, Ha SE, *et al*. Iridin induces G₂/M phase cell cycle arrest and extrinsic apoptotic cell death through PI3K/AKT signaling pathway in AGS gastric cancer cells[J]. *Molecules*, 2021, 26(9): 2802.
- [27] Wang F, Yao S, Xia H. SIRT1 is a key regulatory target for the treatment of the endoplasmic reticulum stress-related organ damage[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 130: 110601.
- [28] Gao LN, Wu QR, Yin H, *et al*. The nuclear translocation of circRNA CPSF6 promotes apoptosis of trophoblast cells induced by homocysteine[J]. *Chin J Cell Mol Immunol*, 2022, 38(2): 146-152. [高丽娜, 吴琪瑞, 殷荷, 等. circRNA CPSF6核内转移促进同型半胱氨酸诱导的滋养细胞凋亡[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2022, 38(2): 146-152.]
- [29] Ma L, Zhang Z, Dong K, *et al*. TWIST1 alleviates hypoxia-induced damage of trophoblast cells by inhibiting mitochondrial apoptosis pathway[J]. *Exp Cell Res*, 2019, 385(2): 111687.
- [30] Yang J, Cong X, Ren M, *et al*. Circular RNA hsa_circRNA_0007334 is predicted to promote MMP7 and COL1A1 expression by functioning as a miRNA sponge in pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *J Oncol*, 2019, 2019: 7630894.
- [31] Shi Y, Fang N, Li Y, *et al*. Circular RNA LPAR3 sponges microRNA-198 to facilitate esophageal cancer migration, invasion, and metastasis[J]. *Cancer Sci*, 2020, 111(8): 2824-2836.
- [32] Fan Z, Wang Q, Deng H. Circ_0011460 upregulates HTRA1 expression by sponging miR-762 to suppress HTR8/SVneo cell growth, migration, and invasion[J]. *Am J Reprod Immunol*, 2021, 86(5): e13485.

(责任编辑: 张小利)