

黄燕,张林静,汪洪林,等. lncRNA XIST 靶向 miR-182-5p/HIF-2 α 分子轴对滋养层细胞生物学行为特性影响的机制研究[J]. 中国比较医学杂志, 2026, 36(6): 11-20.

Huang Y, Zhang LJ, Wang HL, et al. Mechanism of long-chain non-coding RNA X-inactive specific transcript on the biological behavior of trophoblast cells by targeting the miR-182-5p/HIF-2 α molecular axis [J]. Chin J Comp Med, 2026, 36(6): 11-20. doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2026.06.002

lncRNA XIST 靶向 miR-182-5p/HIF-2 α 分子轴对 滋养层细胞生物学行为特性影响的机制研究

黄 燕¹, 张林静¹, 汪洪林¹, 张 婷^{1*}, 李 波²

(1.海南省妇女儿童医学中心产科,海口 570206;2.海南省妇女儿童医学中心妇科,海口 570206)

【摘要】 目的 探究长链非编码 RNA(lncRNA)X 染色体失活特异性转录本(XIST)调控滋养层细胞生物学活性的分子机制。**方法** 体外培养人绒毛膜滋养层细胞 HTR-8/Svneo,分为对照组、干扰空载组(转染 si-NC)和 si-XIST-1 组(转染 si-XIST-1)、si-XIST-1+anti-NC 组(共转染 si-XIST-1 和 anti-NC)、si-XIST-1+anti-182-5p 组(共转染 si-XIST-1 和 anti-182-5p)。采用 RT-qPCR 检测细胞中 XIST、miR-182-5p 和低氧诱导因子 2 α (HIF-2 α)mRNA 表达;CCK-8 实验和 EdU 实验检测细胞增殖活力;流式细胞术检测细胞凋亡;划痕愈合实验、Transwell 实验检测细胞迁移、侵袭能力;Western blot 检测细胞中 HIF-2 α 、cleaved-caspase-3、Bcl-2、Bax、基质金属蛋白(MMP)-2、MMP-9 蛋白表达;双荧光素酶报告实验验证 miR-182-5p 与 XIST、HIF-2 α 的靶向关系。**结果** 与对照组、干扰空载组比较,si-XIST-1 组 XIST、HIF-2 α mRNA 水平、凋亡率及 HIF-2 α 、cleaved-caspase-3、Bax 蛋白水平降低,miR-182-5p 水平、细胞活力、EdU 阳性率、划痕愈合率、侵袭细胞数及 Bcl-2、MMP-2、MMP-9 蛋白水平升高($P<0.05$);与 si-XIST-1 组和 si-XIST-1+anti-NC 组比较,si-XIST-1+anti-182-5p 组 HIF-2 α mRNA 水平、凋亡率及 HIF-2 α 、cleaved-caspase-3、Bax 蛋白水平升高,miR-182-5p 水平、细胞活力、EdU 阳性率、划痕愈合率、侵袭细胞数及 Bcl-2、MMP-2、MMP-9 蛋白水平降低($P<0.05$)。lncRNA XIST 可靶向 HTR-8/Svneo 细胞中的 miR-182-5p,HIF-2 α 是 miR-182-5p 的靶标。**结论** 敲低 lncRNA XIST 可能是通过竞争性结合 miR-182-5p 来抑制 HIF-2 α 表达,进而增强 HTR-8/Svneo 细胞增殖、迁移和侵袭能力,并抑制细胞凋亡。

【关键词】 子痫前期;长链非编码 RNA;X 染色体失活特异性转录本;microRNA-182;低氧诱导因子 2 α ;滋养层细胞

【中图分类号】 R714.2; R329.2; R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2026) 06-0011-10

Mechanism of long-chain non-coding RNA X-inactive specific transcript on the biological behavior of trophoblast cells by targeting the miR-182-5p/HIF-2 α molecular axis

HUANG Yan¹, ZHANG Linjing¹, WANG Honglin¹, ZHANG Ting^{1*}, LI Bo²

(1. Department of Obstetrics, Hainan Women and Children's Medical Center, Haikou 570206, China.

2. Department of Gynecology, Hainan Women and Children's Medical Center, Haikou 570206)

【基金项目】 海南省自然科学基金(823RC600)。

【作者简介】 黄燕(1974—),女,本科,主任医师,研究方向:围产医学。E-mail:hr6050@sina.com

【通信作者】 张婷(1892—),女,本科,副主任医师,研究方向:病理产科。E-mail:liming14@haikou.gov.cn

【Abstract】 Objective To investigate the molecular mechanism by which long-chain non-coding RNA (lncRNA) X-inactive specific transcript (XIST) regulates the biological activity of trophoblast cells. **Methods** Human HTR-8/Svneo trophoblast cells were cultured *in vitro* and separated into control, interference empty (transfected with small interfering RNA-normal control (si-NC)), si-XIST-1 (transfected with si-XIST-1), si-XIST-1+anti-NC (co-transfected with si-XIST-1 and anti-NC), and si-XIST-1+anti-182-5p (co-transfected with si-XIST-1 and anti-182-5p) groups. XIST, miR-182-5p, and hypoxia inducible factor-2 α (HIF-2 α) mRNA expression levels were measured by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). Cell proliferation was detected by Cell Counting Kit-8 (CCK-8) and 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) assays. Apoptosis was detected by flow cytometry. Cell migration and invasion abilities were measured by scratch-healing and Transwell experiments. HIF-2 α , cleaved-caspase-3, Bcl-2, Bax, matrix metalloproteinase (MMP)-2, and MMP-9 protein levels in cells were measured by Western blot. The targeting relationship of miR-182-5p with XIST and HIF-2 α was verified by dual-luciferase reporter assay. **Results** XIST and HIF-2 α mRNA levels, apoptosis rate, and HIF-2 α , cleaved-caspase-3, and Bax protein levels in the si-XIST-1 group were lower than those in the control and interference empty groups, while miR-182-5p, cell viability, EdU-positive rate, scratch-healing rate, number of invaded cells, and Bcl-2, MMP-2, and MMP-9 protein levels were higher ($P<0.05$). HIF-2 α mRNA level, apoptosis rate, and HIF-2 α , cleaved-caspase-3, and Bax protein levels in the si-XIST-1+anti-182-5p group were higher than those in the si-XIST-1 and si-XIST-1+anti-NC groups, while miR-182-5p, cell viability, EdU-positive rate, scratch-healing rate, number of invaded cells, and Bcl-2, MMP-2, and MMP-9 protein levels were lower ($P<0.05$). LncRNA XIST was able to target miR-182-5p in HTR-8/Svneo cells, and HIF-2 α was the target of miR-182-5p. **Conclusions** Knocking-down lncRNA XIST may inhibit HIF-2 α expression by competitively binding to miR-182-5p, thereby enhancing the proliferation, migration, and invasion abilities of HTR-8/Svneo cells and inhibiting cell apoptosis.

【Keywords】 preeclampsia; long-chain non-coding RNA; X-inactive specific transcript; microRNA-182; hypoxia inducible factor 2 α ; trophoblast cells

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

子痫前期 (preeclampsia, PE) 是妊娠高血压病的一种分类,通常发生在妊娠 20 周以后,主要表现为血压升高和蛋白尿^[1]。滋养层细胞是来自胚胎外的滋养层中具有滋养功能的细胞。滋养层细胞侵袭异常、凋亡增多是 PE 发病的主要病因^[2],同时,大量研究证实,多种 PE 相关基因的异常表达是其发生发展的重要因素^[3,4]。因此,通过研究 PE 发病相关基因,可以更深入地了解 PE 时影响滋养层细胞生物学行为的机制,从而为 PE 的治疗提供更坚实的理论基础和指导。

长链非编码 RNA (lncRNA) 在 PE 中发挥重要作用,并且可能成为治疗 PE 的靶标^[5]。X 染色体失活特异性转录本 (X inactive specific transcript, XIST) 是近年来研究较多的 lncRNA 之一,据报道, lncRNA XIST 在 PE 中上调, lncRNA XIST 的上调对滋养层细胞的增殖和侵袭产生抑制作用^[6]。然而, lncRNA XIST 在 PE 发病中的作用机制还未得到深入研究。 lncRNA 可以“海绵”吸附的方式解除微小 RNA (microRNA, miRNA)

对靶基因信使 RNA (mRNA) 的作用,参与疾病进展^[7]。低氧诱导因子 2 α (hypoxia inducible factor 2 α , HIF-2 α) 又称内皮 PAS 区域 1 (endothelial PAS domain protein 1, EPAS1), 是低氧调节通路中的重要因子,研究显示, PE 患者胎盘中 HIF-2 α 呈高表达, HIF-2 α 可抑制滋养层细胞侵袭及血管形成^[8];此外,有报道称,重度子痫前期患者胎盘组织中 HIF-2 α 蛋白的高表达可能是导致其胎儿生长受限的原因之一^[9]。miR-182-5p 在调控细胞增殖、迁移、缺氧和凋亡等方面发挥重要作用,据报道,在缺氧诱导的人绒毛膜滋养层细胞 HTR-8/Svneo 中 miR-182-5p 表达降低,上调其表达可促进细胞迁移、侵袭能力恢复,降低细胞凋亡率^[10]。通过利用生物信息学预测网站预测 lncRNA XIST 可能吸附的 miRNA,发现 miR-182-5p 为 lncRNA XIST 的候选靶标之一,且 HIF-2 α 的 3'-UTR 包含 miR-182-5p 的结合位点, HIF-2 α 和 miR-182-5p 之间可能存在靶向关系。然而, lncRNA XIST 是否可以通过与 miR-182-5p 相互作

用来调节 HIF-2 α 表达,进而调控滋养层细胞的生物学行为仍不清楚。因此,本研究以人绒毛膜滋养层细胞 HTR-8/Svneo 为研究对象,探讨 lncRNA XIST 调控滋养层细胞生物学活性的分子机制,以期 PE 的诊断与治疗提供有效的理论依据。

1 材料和方法

1.1 细胞

人绒毛膜滋养层细胞 HTR-8/SVneo (CL-0765,武汉普诺赛生命科技有限公司)。

1.2 主要试剂与仪器

lncRNA XIST 干扰靶序列 (si-XIST-1: 5'-GUACAAGGGACUAGUUAATT-3', si-XIST-2: 5'-GGACAUAUUGGACAUAATT-3', si-XIST-3: 5'-GGAAUGAACUAUUGGCUUATT-3')、miR-182-5p 模拟物 (miR-182-5p mimic)、miR-182-5p 抑制剂 (anti-miR-182-5p) 及其阴性对照 (si-NC、mimic NC、anti-NC) 由上海生工合成;超纯 RNA 提取试剂盒 (CW0581M, CWBIO); HiScript II Q RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper) (R223-01, Vazyme); Lipofectamine 3000 (L3000150, Solarbio); EdU 细胞增殖检测试剂盒 (C0085S, 碧云天); ECL 试剂盒 (PE0010, Solarbio); HIF-2 α (ab109616, Abcam); cleaved-caspase-3 (ab32042, Abcam); Bcl-2 (ab182858, Abcam); Bax (ab32503, Abcam); 基质金属蛋白 (matrix metalloproteinase, MMP)-2 (ab97779, Abcam); MMP-9 (ab38898, Abcam); β -actin (ab8227, Abcam); 山羊抗兔 IgGH&L (HRP, ab205718, Abcam); 双荧光素酶载体 (中洪分子实验室提供); 双荧光素酶报告基因检测试剂盒 (RG027, 碧云天); DMEM 完全培养基 (KGM12800S, 凯基生物)。

CO₂ 培养箱 (BPN-80CW, 上海一恒科学仪器

有限公司); 倒置荧光显微镜 (MF53, 广州市明美光电有限公司); 多功能酶标分析仪 (SuPerMax3100, 上海闪谱生物科技有限公司); 荧光 PCR 仪 (CFX Connect™ 实时, 伯乐生命医学产品 (上海) 有限公司); 流式细胞仪 (FACSCalibur, 美国 Becton-Dickinson 公司); 激光扫描共聚焦显微镜 (TCS-SP2, 德国 Leica 公司); 多功能凝胶图像分析系统 (Tannon 1600, 上海天能生命科学有限公司); 迷你转印电泳仪 (DYCZ-40D, 北京六一生物科技有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞转染与分组

HTR-8/Svneo 细胞接种在 6 孔板 (2 $\times$ 10⁵/孔) 中培养, 当细胞密度达 70% 时, 进行转染。实验 1: HTR-8/Svneo 细胞分为对照组 (正常培养, 不转染)、干扰空载组 (转染 si-NC)、si-XIST-1 组 (转染 si-XIST-1)、si-XIST-2 组 (转染 si-XIST-2)、si-XIST-3 组 (转染 si-XIST-3); 实验 2: HTR-8/Svneo 细胞分为对照组 (正常培养, 不转染)、干扰空载组 (转染 si-NC)、si-XIST-1 组 (转染 si-XIST-1)、si-XIST-1 + anti-NC 组 (共转染 si-XIST-1 和 anti-NC)、si-XIST-1 + anti-182-5p 组 (共转染 si-XIST-1 和 anti-182-5p)。转染 6 h 后在 6 孔板中加入血清含量为 20% 的完全培养基, 继续培养 48 h 进行后续实验。

1.3.2 RT-qPCR 检测细胞 XIST、miR-182-5p 和 HIF-2 α mRNA 表达

TRIzol 裂解液提取细胞总 RNA, 将 RNA 逆转录合成 cDNA 后进行 PCR 扩增。以 β -actin 和 U6 作为内部对照根据 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法计算基因的相对表达量。反应条件: 预变性 95 $^{\circ}$ C (10 min), 变性 95 $^{\circ}$ C (10 s)、退火 58 $^{\circ}$ C (30 s)、延伸 72 $^{\circ}$ C (30 s), 循环 40 次。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因名称 Gene name	正向引物 (5'-3') Forward primer (5'-3')	反向引物 (5'-3') Reverse primer (5'-3')
XIST	ATAGCAGGTCAGGCAGAGGA	CGATACAACAATCAGCAAAG
miR-182-5p	GCGTTTGGCAATGGTAGAACT	AGTGCAGGGTCCGAGGTATT
HIF-2 α	GAGGGTTTCATTGCTGTGCT	CTCACGGATCTCCTCATGGT
β -actin	TGGCACCCAGCACAAATGAA	CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA
U6	CTCGCTTCGGCAGCAC	AACGCTTCACGAATTTGCGT

1.3.3 细胞增殖检测

CCK-8 实验:将细胞接种于 96 孔板(7×10^3 /孔),按照 1.3.1 分组进行转染,48 h 后,每孔加入 10 μ L CCK-8 试剂,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱中孵育 2 h;酶标仪在 450 nm 波长处检测每孔的吸光值(A)。

EdU 细胞增殖实验:将细胞接种于 96 孔板(7×10^3 /孔)中,按照 1.3.1 分组进行转染,转染 48 h 后,加入 EdU 试剂孵育 2 h,按照制造商的说明使用 EdU 试剂盒测量细胞增殖,室温下用 DAPI 溶液孵育细胞 15 min。由激光共聚焦显微镜拍摄图像,Image J 1.8.0 软件计数 EdU 阳性细胞数和细胞总数,计算 EdU 阳性率。

EdU 阳性率/% = EdU 阳性细胞数/细胞总数 $\times 100\%$

1.3.4 细胞凋亡检测

各组细胞转染 6 h 后,在 6 孔板中加入血清含量为 20%或 10%的完全培养基,继续培养 48 h 后,收集、洗涤和重悬各组细胞,加入 5 μ L Annexin V-FITC 和 5 μ L PI,避光孵育 15 min 以染色细胞;流式细胞仪分析凋亡细胞。

1.3.5 划痕愈合实验

转染后的细胞接种于 6 孔板(2×10^5 /孔),生长至铺满孔底后,使用无菌移液器尖端在细胞单层中垂直划痕。用 PBS 冲洗去除细胞碎片,分别在划痕后 0 h 和在无血清培养基中培养 48 h 时,用显微镜拍摄细胞图像。使用 ImageJ 1.8.0 软件分析迁移距离,计算划痕愈合率。

1.3.6 Transwell 实验

消化收集转染后的各组细胞,离心并重悬细胞,计数,在小室上室(预铺基质胶)加入 300 μ L 细胞悬液(细胞数量为 7×10^4 个);在小室下室加入 500 μ L 完全培养基,48 h 后,用棉签擦去未通过孔的细胞,侵入的细胞用 4%多聚甲醛固定并用 0.1%结晶紫染色。然后在光学显微镜下对 3 个随机选择的区域中的侵袭细胞进行计数。

1.3.7 Western blot 实验

提取各组细胞总蛋白,定量后,通过 SDS-PAGE 分离蛋白样品,并转移到 PVDF 膜上,封闭膜 1 h 后,将膜与相应的一抗(HIF-2 α (1 : 1000)、cleaved-caspase-3(1 : 1000)、Bcl-2(1 : 1000)、Bax(1 : 1000)、E-cadherin(1 : 1000)、N-cadherin(1

: 2000)、MMP-2(1 : 3000)、MMP-9(1 : 1000)、 β -actin(1 : 1000))在 4 $^{\circ}$ C 下孵育 24 h,再与山羊抗兔 IgG 二抗(1 : 4000)室温下孵育 2 h。使用 ECL 试剂盒观察蛋白条带,ImageJ 1.8.0 软件测定蛋白条带的灰度值。结果以目的蛋白与内参蛋白 β -actin 的灰度值之比表示。

1.3.8 双荧光素酶报告基因检测

利用 ENCORI 预测 miR-182-5p 在 XIST 和 HIF-2 α 中的潜在靶序列,将 XIST 或 HIF-2 α 3'-UTR 序列插入 pGL3 载体构建 XIST-wt 或 HIF-2 α -wt 报告载体,通过突变可能的结合位点,构建 XIST-mut 或 HIF-2 α -mut 报告载体,将报告载体分别与 miR-182-5p mimic 或 mimic NC 共转染 HTR-8/Svneo 细胞,采用双荧光素酶报告基因检测试剂盒检测荧光素酶活性。

1.4 统计学方法

GraphPad Prism 9.0 软件用于统计分析,结果表示为平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)。多组间比较前,先进行正态性检验(Shapiro-Wilk 检验)和方差齐性检验(Levene 检验);若数据符合正态分布且方差齐性,采用单因素方差分析和 SNK- q 检验进行多组间比较;若数据不符合正态分布或方差不齐,则采用非参数检验进行组间比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RT-qPCR 检测 XIST 表达水平以评估其干扰效果

RT-qPCR 检测结果显示,与对照组、干扰空载组比较,si-XIST-1 组、si-XIST-2 组、si-XIST-3 组 XIST 表达水平降低($P < 0.05$),其中 si-XIST-1 组 XIST 表达水平显著低于 si-XIST-2 组、si-XIST-3 组($P < 0.05$),见表 2,故选择 si-XIST-1 进行后续实验。

2.2 各组细胞 XIST、miR-182-5p 和 HIF-2 α mRNA 表达比较

与对照组、干扰空载组比较,si-XIST-1 组 XIST、HIF-2 α mRNA 水平降低,miR-182-5p 水平升高($P < 0.05$);与 si-XIST-1 组、si-XIST-1 + anti-NC 组比较,si-XIST-1 + anti-182-5p 组 HIF-2 α mRNA 水平升高,miR-182-5p 水平降低($P < 0.05$),见表 3。

2.3 各组细胞增殖活力比较

与对照组、干扰空载组比较, si-XIST-1 组细胞活力、EdU 阳性率升高 ($P<0.05$); 与 si-XIST-1 组、si-XIST-1+anti-NC 组比较, si-XIST-1+anti-182-5p 组细胞活力、EdU 阳性率降低 ($P<0.05$), 见图 1 和表 4。

表 2 RT-qPCR 检测 XIST 表达水平 ($\bar{x}\pm s, n=3$)
Table 2 RT-qPCR was used to detect the expression level of XIST ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别 Groups	XIST
对照组 Control group	1.00±0.11
干扰空载组 Interference empty group	0.99±0.10
si-XIST-1 组 si-XIST-1 group	0.34±0.04 ^{*#}
si-XIST-2 组 si-XIST-2 group	0.49±0.05 ^{*#&}
si-XIST-3 组 si-XIST-3 group	0.56±0.07 ^{*#&}
<i>F</i>	43.953
<i>P</i>	<0.001

注:与对照组相比, ^{*} $P<0.05$;与干扰空载组相比, [#] $P<0.05$;与 si-XIST-1 组相比, [&] $P<0.05$ 。
Note. Compared with control group, ^{*} $P<0.05$. Compared with interference empty group, [#] $P<0.05$. Compared with si-XIST-1 group, [&] $P<0.05$.

2.4 各组细胞凋亡比较

与对照组、干扰空载组比较, si-XIST-1 组细胞凋亡率降低 ($P<0.05$); 与 si-XIST-1 组、si-XIST-1+anti-NC 组比较, si-XIST-1+anti-182-5p 组细胞凋亡率升高 ($P<0.05$), 见图 2 和表 5。

2.5 各组细胞迁移能力比较

与对照组、干扰空载组比较, si-XIST-1 组划痕愈合率升高 ($P<0.05$); 与 si-XIST-1 组、si-XIST-1+anti-NC 组比较, si-XIST-1+anti-182-5p 组划痕愈合率降低 ($P<0.05$), 见图 3 和表 6。

2.6 各组细胞侵袭能力比较

与对照组、干扰空载组比较, si-XIST-1 组侵袭细胞数增多 ($P<0.05$); 与 si-XIST-1 组、si-XIST-1+anti-NC 组比较, si-XIST-1+anti-182-5p 组侵袭细胞数减少 ($P<0.05$), 见图 4 和表 7。

2.7 各组细胞 HIF-2 α 、凋亡与迁移、侵袭相关蛋白表达比较

与对照组、干扰空载组比较, si-XIST-1 组 HIF-2 α 、cleaved-caspase-3、Bax 蛋白水平降低, Bcl-2、MMP-2、MMP-9 蛋白水平升高 ($P<0.05$); 与 si-XIST-1 组、si-XIST-1+anti-NC 组比较, si-XIST-1+anti-182-5p 组 HIF-2 α 、cleaved-caspase-3、Bax 蛋白水平升高, Bcl-2、MMP-2、MMP-9 蛋白水平降低 ($P<0.05$), 见图 5 和表 8。

表 3 各组细胞 XIST、miR-182-5p 和 HIF-2 α mRNA 表达比较 ($\bar{x}\pm s, n=3$)
Table 3 Comparison of XIST, miR-182-5p and HIF-2 α mRNA expression in each group ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别 Groups	XIST	miR-182-5p	HIF-2 α mRNA
对照组 Control group	1.00±0.09	1.01±0.12	1.00±0.10
干扰空载组 Interference empty group	0.99±0.10	1.02±0.11	1.01±0.08
si-XIST-1 组 si-XIST-1 group	0.37±0.05 ^{*#}	4.66±0.20 ^{*#}	0.49±0.07 ^{*#}
si-XIST-1+anti-NC 组 si-XIST-1+anti-NC group	0.35±0.06	4.71±0.19	0.46±0.05
si-XIST-1+anti-182-5p 组 si-XIST-1+anti-182-5p group	0.40±0.07	1.38±0.16 ^{&△}	0.80±0.09 ^{&△}
<i>F</i>	59.933	444.582	33.419
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

注:与对照组相比, ^{*} $P<0.05$;与干扰空载组相比, [#] $P<0.05$;与 si-XIST-1 组相比, [&] $P<0.05$;与 si-XIST-1+anti-NC 组相比, [△] $P<0.05$ 。
Note. Compared with control group, ^{*} $P<0.05$. Compared with interference empty group, [#] $P<0.05$. Compared with si-XIST-1 group, [&] $P<0.05$. Compared with si-XIST-1+anti-NC group, [△] $P<0.05$.

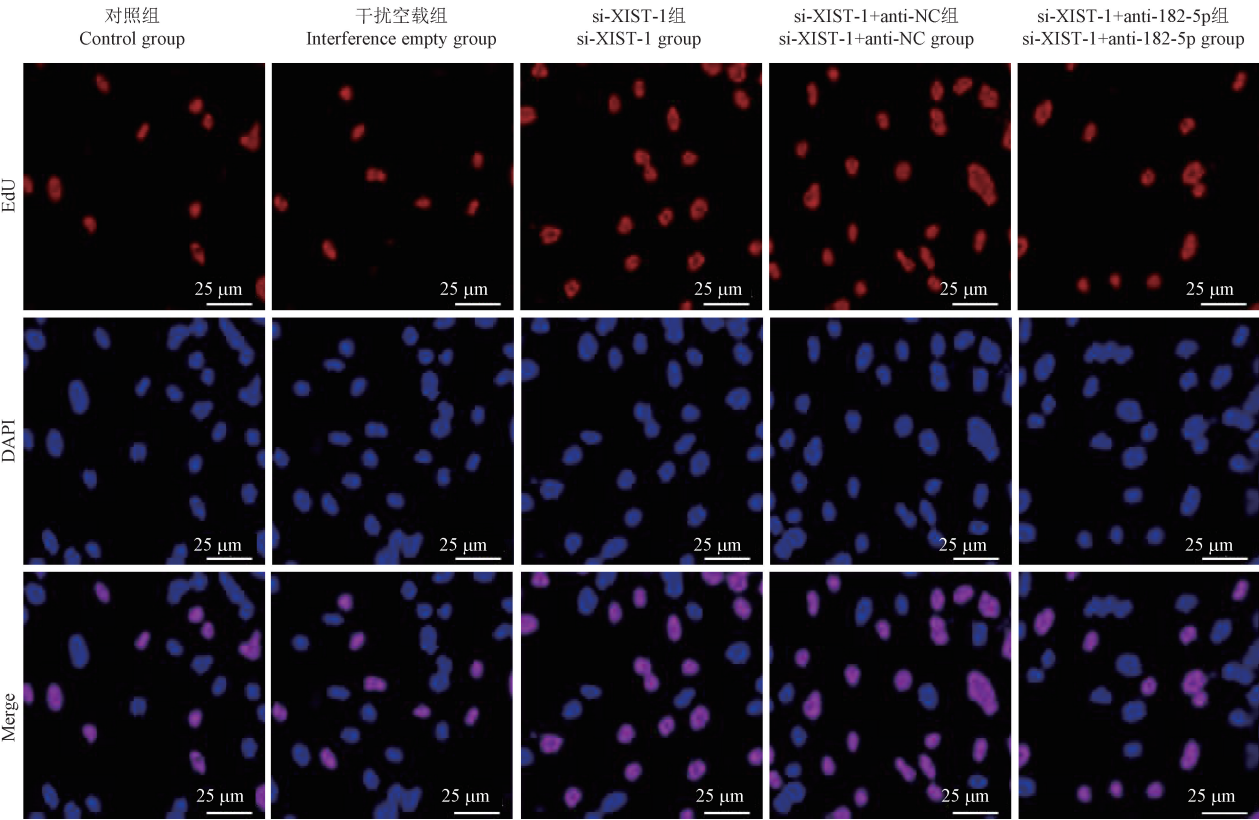


图 1 EdU 染色检测细胞增殖水平(×400)

Figure 1 Detection of cell proliferation level by EdU staining (×400)

表 4 各组细胞增殖活力比较($\bar{x}\pm s, n=3$)
Table 4 Comparison of cell proliferation activity in each group ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别 Groups	细胞活力/A Cell viability/A	EdU 阳性率/% EdU positive rate/%
对照组 Control group	0.65±0.07	38.74±4.25
干扰空载组 Interference empty group	0.62±0.06	36.91±4.13
si-XIST-1 组 si-XIST-1 group	0.87±0.09 ^{*#}	65.58±6.09 ^{*#}
si-XIST-1+anti-NC 组 si-XIST-1+anti-NC group	0.91±0.10	70.11±6.54
si-XIST-1+anti-182-5p 组 si-XIST-1+anti-182-5p group	0.68±0.08 ^{&△}	42.39±5.26 ^{&△}
<i>F</i>	8.150	26.300
<i>P</i>	0.003	<0.001

注:与对照组相比, ^{*} $P<0.05$;与干扰空载组相比, [#] $P<0.05$;与 si-XIST-1 组相比, [&] $P<0.05$;与 si-XIST-1+anti-NC 组相比, [△] $P<0.05$ 。
Note. Compared with control group, ^{*} $P<0.05$. Compared with interference empty group, [#] $P<0.05$. Compared with si-XIST-1 group, [&] $P<0.05$. Compared with si-XIST-1+anti-NC group, [△] $P<0.05$.

表 5 各组细胞凋亡率比较($\bar{x}\pm s, n=3$)
Table 5 Comparison of apoptosis rate in each group ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别 Groups	凋亡率/% Apoptosis rate/%	
	20% 血清 20% serum	10% 血清 10% serum
对照组 Control group	5.35±0.36	11.78±1.05
干扰空载组 Interference empty group	5.41±0.41	11.86±1.08
si-XIST-1 组 si-XIST-1 group	2.27±0.27 ^{*#}	5.61±0.47 ^{*#}
si-XIST-1+anti-NC 组 si-XIST-1+anti-NC group	2.19±0.24	5.54±0.44
si-XIST-1+anti-182-5p 组 si-XIST-1+anti-182-5p group	4.88±0.32 ^{&△}	9.89±0.96 ^{&△}
<i>F</i>	76.696	41.758
<i>P</i>	<0.001	<0.001

注:与对照组相比, ^{*} $P<0.05$;与干扰空载组相比, [#] $P<0.05$;与 si-XIST-1 组相比, [&] $P<0.05$;与 si-XIST-1+anti-NC 组相比, [△] $P<0.05$ 。
Note. Compared with control group, ^{*} $P<0.05$. Compared with interference empty group, [#] $P<0.05$. Compared with si-XIST-1 group, [&] $P<0.05$. Compared with si-XIST-1+anti-NC group, [△] $P<0.05$.

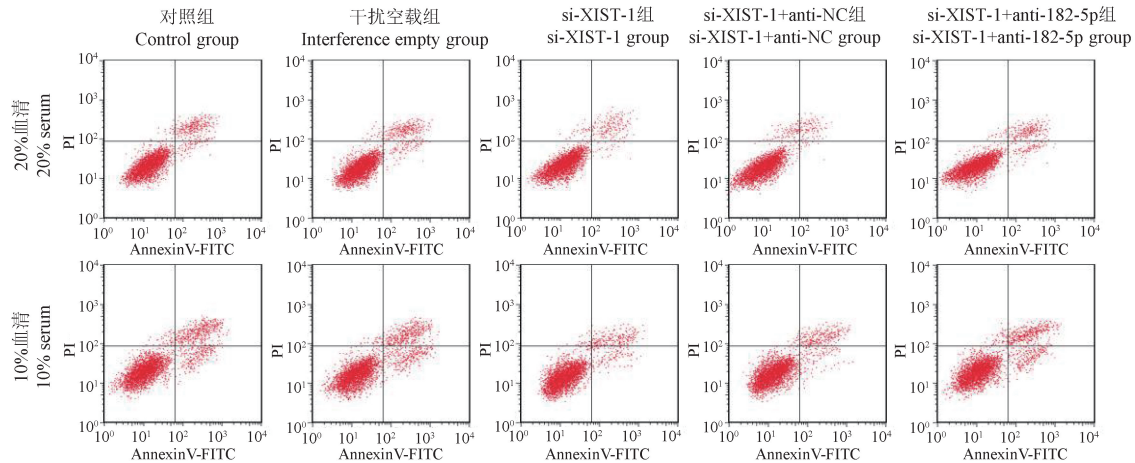


图 2 流式细胞术检测不同血清培养下各细胞凋亡水平

Figure 2 Flow cytometric analysis of apoptosis levels of each cell cultured with different serum

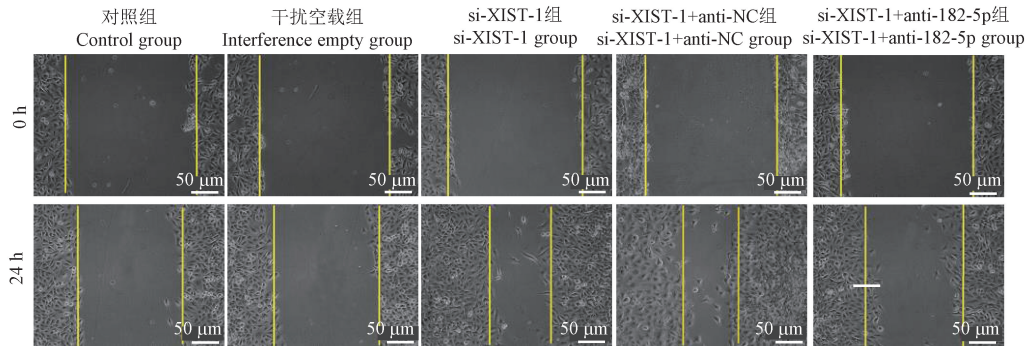


图 3 划痕愈合实验检测细胞迁移(×200)

Figure 3 Cell migration detected by scratch healing assay (×200)

表 6 各组细胞划痕愈合率比较($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 6 Comparison of cell scratch healing rate in each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别 Groups	划痕愈合率/% Scratch healing rate/%
对照组 Control group	18.26±2.04
干扰空载组 Interference empty group	19.03±2.25
si-XIST-1 组 si-XIST-1 group	56.44±3.81 ^{*#}
si-XIST-1+anti-NC 组 si-XIST-1+anti-NC group	58.05±3.72
si-XIST-1+anti-182-5p 组 si-XIST-1+anti-182-5p group	24.11±2.65 ^{&△}
F	138.282
P	<0.001

注:与对照组相比, ^{*} $P<0.05$;与干扰空载组相比, [#] $P<0.05$;与 si-XIST-1 组相比, [&] $P<0.05$;与 si-XIST-1+anti-NC 组相比, [△] $P<0.05$ 。

Note. Compared with control group, ^{*} $P<0.05$. Compared with interference empty group, [#] $P<0.05$. Compared with si-XIST-1 group, [&] $P<0.05$. Compared with si-XIST-1+anti-NC group, [△] $P<0.05$.

表 7 各组细胞侵袭细胞数比较($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 7 Comparison of the number of invasive cells in each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别 Groups	侵袭细胞数/个 Number of invasive cells /n
对照组 Control group	82.40±7.66
干扰空载组 Interference empty group	83.17±8.01
si-XIST-1 组 si-XIST-1 group	127.90±10.42 ^{*#}
si-XIST-1+anti-NC 组 si-XIST-1+anti-NC group	131.25±11.05
si-XIST-1+anti-182-5p 组 si-XIST-1+anti-182-5p group	94.30±9.23 ^{&△}
F	19.729
P	<0.001

注:与对照组相比, ^{*} $P<0.05$;与干扰空载组相比, [#] $P<0.05$;与 si-XIST-1 组相比, [&] $P<0.05$;与 si-XIST-1+anti-NC 组相比, [△] $P<0.05$ 。

Note. Compared with control group, ^{*} $P<0.05$. Compared with interference empty group, [#] $P<0.05$. Compared with si-XIST-1 group, [&] $P<0.05$. Compared with si-XIST-1+anti-NC group, [△] $P<0.05$.

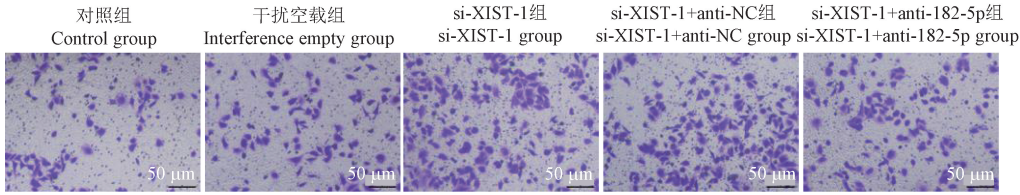


图 4 Transwell 实验检测细胞侵袭(结晶紫染色,×200)

Figure 4 Transwell assay to detect cell invasion (crystal violet staining, ×200)

表 8 各组细胞中 HIF-2α、凋亡与迁移、侵袭相关蛋白表达($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 8 Expression of HIF-2α, apoptosis, migration and invasion related proteins in each group ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别 Groups	HIF-2α	cleaved-caspase-3	Bcl-2	Bax	MMP-2	MMP-9
对照组 Control group	0.57±0.07	0.21±0.03	0.30±0.04	0.35±0.05	0.24±0.04	0.15±0.03
干扰空载组 Interference empty group	0.58±0.06	0.20±0.04	0.33±0.05	0.32±0.04	0.25±0.05	0.18±0.03
si-XIST-1 组 si-XIST-1 group	0.27±0.04 ^{*#}	0.11±0.02 ^{*#}	0.59±0.08 ^{*#}	0.15±0.02 ^{*#}	0.84±0.07 ^{*#}	0.46±0.05 ^{*#}
si-XIST-1+anti-NC 组 si-XIST-1+anti-NC group	0.25±0.03	0.10±0.02	0.64±0.07	0.16±0.04	0.89±0.08	0.48±0.06
si-XIST-1+anti-182-5p 组 si-XIST-1+anti-182-5p group	0.46±0.06 ^{&Δ}	0.17±0.03 ^{&Δ}	0.44±0.05 ^{&Δ}	0.27±0.03 ^{&Δ}	0.36±0.04 ^{&Δ}	0.25±0.04 ^{&Δ}
F	25.921	9.179	19.316	17.893	91.791	38.416
P	<0.001	0.002	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与对照组相比, * $P<0.05$;与干扰空载组相比, # $P<0.05$;与 si-XIST-1 组相比, <math>P<0.05</math>;与 si-XIST-1+anti-NC 组相比, Δ $P<0.05</math>。
Note. Compared with control group, * $P<0.05$. Compared with interference empty group, # $P<0.05$. Compared with si-XIST-1 group, <math>P<0.05</math>. Compared with si-XIST-1+anti-NC group, Δ $P<0.05$.$

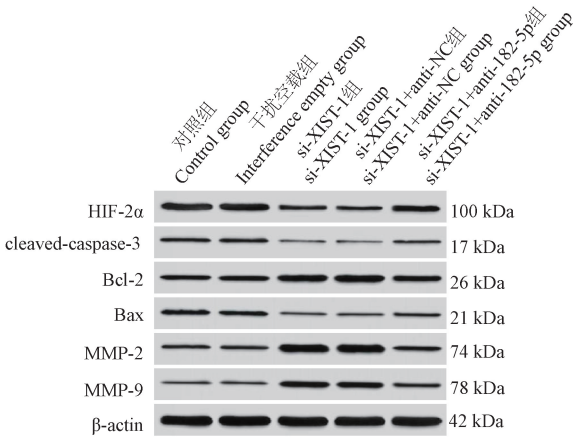


图 5 各组细胞中 HIF-2α、凋亡与迁移、侵袭相关蛋白表达

Figure 5 Expression of HIF-2α, apoptosis, migration and invasion related proteins in each group of cells

2.8 miR-182-5p 与 XIST、HIF-2α 的靶向关系验证

生物信息学分析显示, XIST 序列包含 miR-182-5p 的结合位点(图 6A), HIF-2α 的 3'-UTR 序列包含 miR-182-5p 的结合位点(图 6B)。与 XIST-wt 和 mimic NC 共转染的细胞相比, XIST-wt 和 miR-182-5p mimic 共转染细胞荧光素酶活性降低((0.48±0.05) vs (1.00±0.07), $P<0.05$)。而

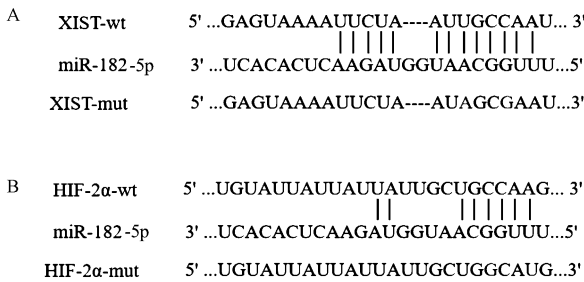


图 6 ENCORI 数据库中预测的 XIST、HIF-2α 和 miR-182-5p 的靶向结合序列

Figure 6 Predicted target binding sequences of XIST, HIF-2α, and miR-182-5p in the ENCORI database

共转染 XIST-mut 和 miR-182-5p mimic 的细胞荧光素酶活性较共转染 XIST-mut 和 mimic NC 的细胞荧光素酶活性无显著差异((1.01±0.09) vs (1.00±0.12), $P>0.05$)。与 HIF-2α-wt 和 mimic NC 共转染的细胞相比, HIF-2α-wt 和 miR-182-5p mimic 共转染细胞荧光素酶活性降低((0.45±0.03) vs (1.00±0.08), $P<0.05$)。而共转染 HIF-2α-mut 和 miR-182-5p mimic 的细胞荧光素酶活性较共转染 HIF-2α-mut 和 mimic NC 的细胞荧光素酶活性无显著差异((1.03±0.11) vs (1.00±0.09), $P>0.05$)。

3 讨论

PE 的发生与胎盘滋养层细胞功能障碍密切相关,其主要病理机制包括胎盘滋养层细胞凋亡、滋养层细胞侵袭不全、子宫内螺旋动脉异常重塑等^[11,12]。因此,在治疗和预防 PE 时,需要关注滋养层细胞的功能状态,并采取相应的措施进行干预。

lncRNA 的异常表达与 PE 的发展密切相关。大量研究表明,lncRNA 通过其对滋养层细胞的增殖、迁移、侵入和凋亡的影响而参与 PE 进展,如过表达 lncRNA MALAT1 可抑制低氧诱导的滋养层细胞凋亡,增强其增殖和侵袭能力^[13];lncRNA MR193BHG 的过度表达可抑制滋养层细胞增殖、迁移和侵袭,同时提高了滋养层细胞的凋亡率^[14]。lncRNA XIST 是哺乳动物 X 染色体转录沉默的主要调控因子,其编码基因位于人类染色体 Xq13.2,已被证明在大多数肿瘤中上调,促进肿瘤的发生、进展和转移^[15,16]。在本研究中,敲低 lncRNA XIST 表达可增强 HTR-8/Svneo 细胞的增殖、侵袭和迁移能力,同时降低细胞凋亡率。GUO 等^[6]报道 lncRNA XIST 在 PE 患者胎盘中的表达较健康对照者高,且在 HTR-8/Svneo 细胞中,lncRNA XIST 的升高抑制了细胞增殖和入侵,并诱导细胞凋亡;这一发现与本研究一致,提示敲低 lncRNA XIST 可能通过增强滋养层细胞的生物学功能抑制 PE 的发生。

miRNA 是调节基因表达的小非编码 RNA,参与胎盘滋养层细胞的增殖、凋亡、迁移等过程,在 PE 的发生发展中发挥重要作用^[17,18]。研究表明,探索 lncRNA-miRNA-mRNA 在竞争性内源性 RNA 生物信息学网络中的作用机制可能为 PE 的研究提供新的靶点^[19,20]。本研究通过生物信息学网站分析了与 lncRNA XIST 具有结合潜力的 miRNA,发现下调的 miRNA 中 miR-182-5p 可能与滋养层细胞的生物学功能有关。miR-182-5p 已被报道在缺氧诱导的 HTR-8/Svneo 细胞中呈低表达,其表达上调后可抑制 HTR-8/Svneo 细胞凋亡,增强其迁移、侵袭能力^[10]。在本研究中,miR-182-5p 的水平因 lncRNA XIST 的敲低而升高,且下调 miR-182-5p 表达后,由 lncRNA XIST 敲低引起的细胞增殖、迁移和侵袭促进作用被减弱,同

时 lncRNA XIST 敲低的抗凋亡作用也被 anti-miR-182-5p 恢复,且双荧光素酶实验证实 lncRNA XIST 与 miR-182-5p 存在靶向关系,表明 lncRNA XIST 可能是 HTR-8/Svneo 细胞中 miR-182-5p 的海绵。提示 lncRNA XIST 可靶向 miR-182-5p 并在 HTR-8/Svneo 细胞中负调控 miR-182-5p 表达。

为了进一步了解 lncRNA XIST/miR-182-5p 在调节 PE 方面的作用机制,本研究对 miR-182-5p 靶基因进行了预测和验证,发现 HIF-2 α 与 PE 密切相关。据报道,HIF-2 α 的高表达可抑制滋养层细胞侵袭和血管形成^[8];且重度 PE 患者胎盘组织中 HIF-2 α 的高表达可能是引起胎儿生长受限的原因之一^[9]。生物信息学数据库预测到 HIF-2 α 的 3'-UTR 序列中存在 miR-182-5p 的结合位点,双荧光素酶报告实验进一步证实了 HIF-2 α 是 miR-182-5p 的靶基因。更重要的是,lncRNA XIST 的敲低可抑制 HIF-2 α 表达,而下调 miR-182-5p 的表达可升高 HIF-2 α 表达,减弱 lncRNA XIST 敲低对 HTR-8/Svneo 细胞生物学功能的影响,表明 lncRNA XIST 可能通过与 miR-182-5p 结合来调节 HIF-2 α ,从而参与 PE 进展。

总之,本研究表明,lncRNA XIST 可能通过 miR-182-5p/HIF-2 α 轴介导了滋养层细胞的生物学功能。这种新的机制为 PE 的治疗提供了新的思路。然而,不足的是本研究尚未通过回复实验验证 miR-182-5p 对 HIF-2 α 的调控作用,未来将增设 si-XIST-1 + OE-HIF-2 α 组及 miR-182 + OE-HIF-2 α 组,进一步证实 lncRNA XIST 靶向 miR-182/HIF-2 α 分子轴的具体机制。同时,需要更进一步的实验(如体内和临床实验)来证实 lncRNA XIST/miR-182-5p/HIF-2 α 轴在 PE 进展中的生物学功能,并进一步研究是否有其他相关分子或通路介导 lncRNA XIST 调控 PE 进展的过程。

参考文献:

- [1] ROBERTS J M. Preeclampsia epidemiology (ies) and pathophysiology (ies) [J]. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2024, 94: 102480.
- [2] NURZADEH M, GHALANDARPOOR-ATTAR S M, GHALANDARPOOR-ATTAR S N, et al. The role of interferon (IFN)- γ in extravillous trophoblast cell (EVT) invasion and preeclampsia progression [J]. Reprod Sci, 2023, 30(5): 1462-1469.

- [3] CHEN Y, ZHANG Y, XIE S, et al. Establishment of a placental lncRNA-mRNA expression network for early-onset preeclampsia [J]. BMC Pregnancy Childbirth, 2024, 24(1): 329.
- [4] LEKVA T, MICHELSEN A E, ROLAND M C P, et al. Increased ferroptosis in leukocytes from preeclamptic women involving the long non-coding taurine upregulated gene 1 (TUG1) [J]. J Intern Med, 2024, 295(2): 181-195.
- [5] 吕英, 叶丽燕, 范徐妃, 等. 子痫前期 P53 和 LncRNA TINCR 表达及胎盘滋养层细胞凋亡研究 [J]. 中华全科医学, 2021, 19(4): 611-613.
- LYU Y, YE L Y, FAN X F, et al. Expression of P53 and LncRNA TINCR in preeclampsia and apoptosis of placental trophoblast cells [J]. Chin J Gen Pract, 2021, 19(4): 611-613.
- [6] GUO Y, GAO Y, LIU S. LncRNA XIST is associated with preeclampsia and mediates trophoblast cell invasion *via* miR-340-5p/KCNJ16 signaling pathway [J]. Transpl Immunol, 2022, 74: 101666.
- [7] ZHANG Q, WANG Z, CHENG X, et al. LncRNA DANCER promotes the migration and invasion of trophoblast cells through microRNA-214-5p in preeclampsia [J]. Bioengineered, 2021, 12(2): 9424-9434.
- [8] 雷帝, 范翠芳. 缺氧诱导因子-2 α 对滋养细胞 HTR8/SVneo 侵袭及血管形成的影响 [J]. 武汉大学学报(医学版), 2018, 39(4): 577-582.
- LEI D, FAN C F. Effect of hypoxia-inducible factor 2 α on the invasion and tube formation of extravillous trophoblast cell line HTR8/SVneo [J]. Med J Wuhan Univ, 2018, 39(4): 577-582.
- [9] 孙琳, 徐红梅, 张海鹏, 等. HIF-2 α 蛋白与妊娠期高血压疾病的相关性研究 [J]. 中国妇幼保健, 2011, 26(35): 5611-5613.
- SUN L, XU H M, ZHANG H P, et al. Correlation between HIF-2 α protein and hypertensive disorder complicating pregnancy [J]. Matern Child Health Care Chin, 2011, 26(35): 5611-5613.
- [10] 孙艺娟, 贾杰, 邓恋, 等. 丙泊酚通过 miR-182-5p 介导 HIF-1 α 通路对缺氧诱导胎盘滋养细胞生物学活性的影响 [J]. 实用医学杂志, 2023, 39(15): 1869-1875.
- SUN Y J, JIA J, DENG L, et al. Effect of propofol regulating HIF-1 α signaling pathway through miR-182-5p on biological activity in placental trophoblast cells induced by Hypoxia [J]. J Pract Med, 2023, 39(15): 1869-1875.
- [11] KOLAC U K, DONMEZ YALCIN G, KARAYEL R, et al. The role of protein kinase R in placental inflammation, mtUPR and apoptosis [J]. Placenta, 2023, 139: 200-211.
- [12] 曾克非, 夏婷婷, 吴小兰, 等. 木犀草素通过 TLR4/PI3K/AKT 通路对子痫前期大鼠胎盘血管生成及细胞凋亡的影响 [J]. 中国免疫学杂志, 2024, 40(2): 330-336.
- ZENG K F, XIA T T, WU X L, et al. Effects of luteolin on placental angiogenesis and cell apoptosis in rats with preeclampsia through TLR4/PI3K/AKT pathway [J]. Chin J Immunol, 2024, 40(2): 330-336.
- [13] 卢智健, 李晓茵, 卢倩瑜, 等. 子痫前期上调 lncRNA MALAT1 对缺氧诱导的滋养细胞功能损伤的作用机制探究 [J]. 中国计划生育和妇产科, 2024, 16(6): 71-76, 82.
- LU Z J, LI X Y, LU Q Y, et al. Mechanism of upregulated lncRNA MALAT1 on hypoxia-induced trophoblast functional impairment in preeclampsia [J]. Chin J Fam Plan Gynecotokology, 2024, 16(6): 71-76, 82.
- [14] WANG P, CHEN Y, YANG S, et al. MIR193BHG inhibits the proliferation, migration and invasion of trophoblasts by upregulating p53 [J]. Exp Ther Med, 2024, 28(2): 320.
- [15] KONG Y L, WANG H D, GAO M, et al. LncRNA XIST promotes bladder cancer progression by modulating miR-129-5p/TNFSF10 axis [J]. Discov Oncol, 2024, 15(1): 65.
- [16] PEHLIVANOGLU B, AYSAL A, AGALAR C, et al. LncRNA XIST interacts with regulatory T cells within the tumor microenvironment in chronic hepatitis B-associated hepatocellular carcinoma [J]. Turk Patoloji Derg, 2024, 40(2): 101-108.
- [17] 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.
- [18] 钟黎黎, 杨春芬, 盛莹. 抑制 miR-151 表达对低氧条件下人绒毛膜滋养层细胞生物学行为的影响 [J]. 吉林大学学报(医学版), 2024, 50(2): 515-522.
- ZHONG L L, YANG C F, SHENG Y. Effect of inhibition of miR-151 expression on biological behavior of human chorionic trophoblast cells under hypoxia condition [J]. J Jilin Univ Med Ed, 2024, 50(2): 515-522.
- [19] 纪龙花, 韩毓, 陈莲芳, 等. LncRNA NEAT1 通过靶向 miR-103a-3p/SDF2 轴调节滋养层细胞增殖、凋亡和侵袭 [J]. 现代妇产科进展, 2023, 32(3): 171-176.
- JI L H, HAN Y, CHEN L F, et al. LncRNA NEAT1 regulates the proliferation, apoptosis and invasion of trophoblast cells by targeting miR-103a-3p/SDF2 axis [J]. Prog Obstet Gynecol, 2023, 32(3): 171-176.
- [20] LUO S, WANG L, LI S, et al. Identification of key molecules and lncRNA-miRNA-mRNA *CeRNA* network in preeclampsia [J]. Int J Gen Med, 2021, 14: 7579-7590.

[收稿日期] 2025-08-01