

网络出版时间:2022-12-26 17:05:58 网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail//34.1065.R.20221226.1522.009.html

低氧下沉默 HLA-G 对 JEG-3 细胞、EPAS1 表达及其生物学行为的影响

孙春蕾^{1,2*}, 杨娟^{2*}, 谢莹莹^{1,2}, 许文宇^{1,2}, 雷娟^{1,2}, 刘朵朵^{1,2}

摘要 **目的** 探讨在低氧条件下,沉默绒毛膜滋养细胞系 JEG-3 细胞的人类白细胞相关抗原-G(HLA-G)表达对 JEG-3 细胞生物学功能的影响和通过内皮 PAS1 区域蛋白 1 (EPAS1)低氧反应通路参与高原低氧条件下子痫前期发病的分子机制。**方法** 通过转染小干扰 RNA (siRNA) 抑制 JEG-3 细胞中 HLA-G 的表达,将转染后的 JEG-3 细胞分为 4 组:常氧对照组、低氧对照组、常氧抑制组、低氧抑制组。采用 CCK-8 实验及体外侵袭实验法检测 4 组细胞的增殖及侵袭能力;用流式细胞术检测 4 组细胞凋亡和细胞周期的影响;通过 qPCR 技术及 Western blot 法检测 4 组细胞中 HLA-G 和 EPAS1 mRNA 及蛋白的表达水平。**结果** ①与常氧对照组相比,低氧对照组及常氧、低氧抑制组均可使 JEG-3 细胞的增殖活性、侵袭能力降低,使得细胞凋亡率显著升高,低

氧对照组与低氧抑制组产生了明显的坏死细胞群。低氧条件下,降低 HLA-G 的表达会提高细胞坏死率。无论在常氧还是低氧下,抑制 HLA-G 表达均使细胞被阻滞在 G1 期。②与常氧对照组相比,低氧对照组及常氧、低氧抑制组均降低 HLA-G 蛋白表达,且低氧和抑制 HLA-G 蛋白表达二者有协同作用,均可增加缺氧诱导因子-2 α (HIF-2 α)、血管内皮生长因子(VEGF)及内皮素-1(ET-1)蛋白表达,抑制 HLA-G 则降低诱导型一氧化氮合成酶(NOS2)的表达。**结论** 低氧环境下,沉默 HLA-G 可能通过 EPAS1 低氧反应通路影响滋养细胞生物学行为,参与了子痫前期的发生发展。

关键词 子痫前期;低氧;人类白细胞抗原 G;内皮 PAS1 区域蛋白 1;高海拔

中图分类号 R 714.252

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)01-0047-07

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.01.009

妊娠期高血压疾病是孕产妇和围产儿死亡的主要原因之一,我国妊娠期高血压疾病的发病率约为 5%~12%,而高原地区的发病率为 24.6%^[1]。青海地区地处青藏高原,有低氧、低压、低湿、寒冷等特

2022-09-25 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81760276)

作者单位:¹ 青海大学研究生院,西宁 810000

² 青海大学附属医院产科,西宁 810000

作者简介:孙春蕾,女,硕士研究生;

谢莹莹,女,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:xyy09001@163.com

* 对本文具有同等贡献

(NDV) exposure to esophageal cancer ECA109 cells, whether its activation is related to K⁺ efflux, and the effect of ATP/P2X7 axis on the activation of NLRP3 inflammasome. **Methods** The expression of NLRP3 and IL-1 β was detected by Western blot; the content of IL-1 β in the supernatant was detected by ELISA; the formation of ASC spots was detected by fluorescence immunoassay; the change of intracellular K⁺ concentration was detected by fluorescent probe technology; Interventions with ATPase, ATP and P2X7 receptor inhibitors were used to investigate their role in NLRP3 inflammasome activation. **Results** Compared with the control group, the expression of NLRP3, IL-1 β and ASC protein in cells was up-regulated after NDV F3 infection; the intracellular potassium concentration decreased with the prolongation of infection time ($P < 0.05$). After the intervention of P2X7 receptor inhibitor, the efflux of intracellular K⁺ was blocked. With the increase of inhibitor concentration, the efflux of K⁺ was maximally inhibited at 10 $\mu\text{mol/L}$ ($P < 0.05$). The results of ATPase and ATP intervention showed that ATPase inhibited K⁺ efflux, while ATP promoted K⁺ efflux. Western blot results showed that compared with the control group, P2X7 receptor was inhibited, and the expressions of NLRP3 and IL-1 β were down-regulated; after ATPase intervened cells, the expressions of NLRP3 and IL-1 β decreased; After ATP intervention in cells, the protein expressions of NLRP3 and IL-1 β were up-regulated ($P < 0.05$). **Conclusion** NDV F3 infection of ECA109 cells can activate the NLRP3 inflammasome, the mechanism may be related to the ATP/P2X7 axis.

Key words newcastle disease virus; ATP; P2X7; K⁺; NLRP3 inflammasome; ECA109 cells

点,其中低氧环境是导致高海拔地区妊娠期高血压疾病发病率升高的原因^[2]。人类白细胞相关抗原-G(human leukocyte antigen-G, HLA-G)参与调节滋养细胞浸润的功能从而与子痫前期的发生发展相关联,课题组前期研究^[3]显示低氧在影响 HLA-G 表达上可能起着举足轻重的作用,HLA-G 基因低表达究竟通过何种途径影响滋养细胞的增殖、侵袭能力尚不明确。而内皮 PAS1 区域蛋白 1 (endothelial Pas1 region protein 1, EPAS1) 参与长期慢性的低氧反应通路,参与滋养细胞的增殖、侵袭及凋亡过程,其靶基因涉及到血管的生长、收缩及通透性增加等方面^[4]。该研究旨在通过低氧下沉默 JEG-3 细胞的 HLA-G 表达,探讨 HLA-G 通过 EPAS1 低氧反应通路参与高原低氧条件下子痫前期发病的分子机制,为高原地区孕妇产前防治提供新的思路和理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料 人绒毛膜细胞 JEG-3 (资源编号: 3111C0001CCC000071), 来源于中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 JEG-3 细胞培养采用含 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) (货号 10100147, 美国 Gibco 公司) 与 1% 青霉素和链霉素的 DMEM 培养基 (货号 C11995500BT, 美国 Gibco 公司), 37 °C、5% CO₂、饱和湿度体外培养, 1 : 3 传代接种。

1.2.2 验证 siRNA 转染后 JEG-3 细胞中 HLA-G 表达的抑制 取对数生长期的 JEG-3 细胞, 调整细胞密度至 1×10^5 /ml, 接种至 6 孔板, 每孔 2×10^5 /2 ml。贴壁细胞用 3 个设计的 HLA-G siRNAs 转染: siRNA-1 上游引物 5'-3': CCGCGGGUAUGAACAGUA UTT, 下游引物 5'-3': AUACUGUUCAUACCCGCGG TT; siRNA-2 上游引物: CCACCCUGUCUUUGACU AUTT 下游引物 5'-3': AUAGUCAAGACAGGGUGG TT; siRNA-3 上游引物 5'-3': GCAGAGAUACA CGUGCCAUTT, 下游引物 5'-3': AUGGCACGUG UAUCUCUGCTT (上海吉玛制药技术有限公司)。按照试剂盒说明书使用 ExFect2000 Transfection Reagent (南京诺唯赞生物科技有限公司), 同时设置空载对照组 (转染 NC 序列), 培养 6 h 后弃原培养基, 加入新的完全培养基, 继续培养至 72 h, 用 qPCR 检测 siRNA (上海赛默飞世尔公司产品) 转染后 HLA-G 表达水平, 3 种 HLA-G 的表达均下降, 其中 siR-

NA3 对 JEG-3 细胞的 HLA-G mRNA 表达的抑制效果最好, 见图 1A。通过 Western blot 法验证了常氧对照、siRNA-1、siRNA-2 及 siRNA-3 共 4 组, 见图 1B。结果显示 siRNA-3 片段抑制 JEG-3 细胞 HLA-G 蛋白的表达效果最好, 与 qPCR 技术的结果一致, 因此, 后续实验使用 siRNA3 进行转染。

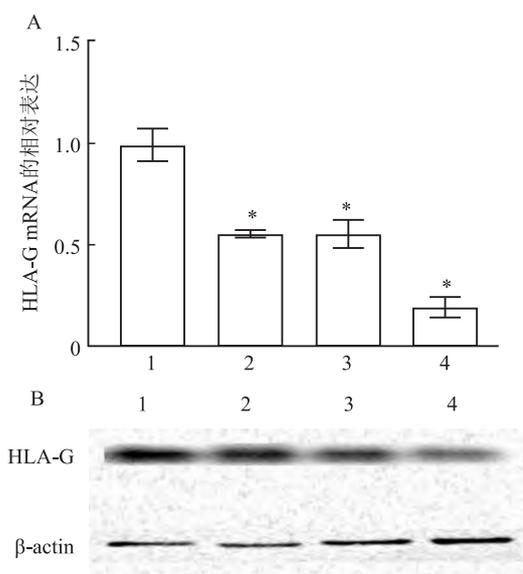


图 1 3 种 siRNA 沉默 JEG-3 滋养细胞中 HLA-G 的 mRNA 与蛋白的表达

A: 采用实时定量 PCR 法检测 JEG-3 中的 HLA-G mRNA 水平; B: Western blot 法验证 JEG-3 滋养细胞中 HLA-G 蛋白的抑制效果; 1: 常氧对照组; 2: siRNA-1 组; 3: siRNA-2 组; 4: siRNA-3 组; 与常氧对照组比较: * $P < 0.05$

1.2.3 分组 通过转染小干扰 RNA (siRNA) 抑制 JEG-3 细胞中 HLA-G 的表达, 将转染后的 JEG-3 细胞分为 4 组: 常氧对照组、低氧对照组、常氧抑制组、低氧抑制组。

1.2.4 CCK-8 检测 4 组细胞增殖活性 使用 CCK-8 试剂盒 (杭州联科生物技术有限公司), 检测 JEG-3 细胞的增殖活性。培养 JEG-3 细胞密度至 5×10^4 个/ml, 接种 96 孔板, 用 siRNAs 转染到 HLA-G, 转染 6 h 后, 加入新的完全培养基, 同时将低氧组的培养板移入低氧培养箱中, 氧气浓度已提前预设降至 1%。每孔加入 10 μ l 的 CCK-8 工作液, 37 °C 避光反应 1 h, 450 nm 处读取各孔吸光度 (optical density, OD) 值, 计算细胞活力 ($n = 6$)。

1.2.5 流式细胞术检测 4 组细胞凋亡 使用 AnnexinV-FITC/PI 细胞凋亡试剂盒 (杭州联科生物技术有限公司) 测量细胞凋亡。取对数生长期的 JEG-3 细胞, 调整细胞密度至 1×10^5 /ml, 接种 6 孔板, 每

孔 $2 \times 10^5/2$ ml。siRNAs 转染及低氧处理同实验 1.2.2 项和 1.2.4 项。胰蛋白酶(美国 Gibco 公司)消化收集各组细胞,重悬于 100 μ l 的 buffer 中,加入 5 μ l 的 Annexin V-FITC 和 10 μ l 的 PI 染液,避光孵育 5 min,流式细胞仪(美国 BD 公司)检测细胞凋亡($n=3$)。

1.2.6 流式细胞术检测细胞周期 使用细胞周期试剂盒(杭州联科生物技术有限公司)测量细胞周期。取对数生长期的 JEG-3 细胞,调整细胞密度至 $1 \times 10^5/\text{ml}$,接种 6 孔板,每孔 $2 \times 10^5/2$ ml, siRNAs 转染及低氧处理同实验 1.2.2 项和 1.2.4 项。胰蛋白酶消化收集各组细胞,用 PBS 洗涤 1 次,加入含有 10 μ l 渗透性溶液的 1 ml DNA 染色溶液中,涡旋振荡 5~10 s 混匀。室温避光孵育 30 min。流式细胞仪(美国 BD 公司)检测细胞周期($n=3$)。

1.2.7 体外侵袭实验法检测细胞侵袭 取 10 mg/ml 的基质胶(美国 BD 公司)与等体积的无血清培养基轻轻混匀,加入到穿膜小室的上室(美国 Corning 公司),将细胞密度调整为 5×10^4 个/ml,取 200 μ l 细胞悬液加入上室,下室加入含 10% FBS 的培养基。siRNAs 转染及低氧处理同实验 1.2.2 项和 1.2.4 项。然后在 37 $^{\circ}\text{C}$ 常氧和低氧分别培养至 24 h。用 4% 多聚甲醛(上海国药化工试剂有限公司)室温固定 15 min, PBS 轻轻漂洗 3 次,用棉签擦去上室细胞,加入 0.1% 的结晶紫(美国 Sigma 公司)染色 15 min,用倒置光学显微镜(IX73,日本奥林巴斯)获得图像($\times 200$),随机选取 5 个视野计数,并量化了侵袭细胞的平均数量($n=3$)。

1.2.8 qPCR 和 Western blot 检测 HLA-G、HIF-2 α 、VEGF、NOS2 及 ET-1 的 mRNA 和蛋白表达量 使用高纯总 RNA 快速提取试剂盒(上海捷瑞生物工程有限公司)提取总 RNA。根据制造商协议,使用 HiScript II Q RT SuperMix(南京诺唯赞生物科技有限公司)进行反向转录。使用 ChamQ SYBR Color qPCR Master Mix(南京诺唯赞生物科技有限公司)进行实时定量 PCR,通过 CFX 连接实时 PCR 检测系统(美国 Bio-Rad)进行荧光扩增。PCR 引物序列见表 1。

Western blot 法检测 4 组细胞相关蛋白的表达:收集细胞后用细胞裂解液(上海碧云天生物技术有限公司)裂解细胞提取细胞总蛋白,绘制标准曲线并确定上样量,经琼脂糖凝胶电泳,转膜后分别加入一抗 HLA-G 抗体(美国 Abcam 公司产品)及二抗辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(杭州联科生物技

表 1 HIF-2 α 、VEGF、NOS2、ET-1 及 GAPDH 引物序列

基因 ID	基因名称	引物序列
3135	HLA-G	F:GAGGAGACACGGAACACCAAG R:GTCGCAGCCAATCATCCACT
2034	HIF-2 α	F:CATGCGCTAGACTCCGAGAA R:GCAGGTTGCGAGGGTTGT
7422	VEGF	F:TCACCAAGGCCAGCACAT R:ACGCTCCAGGACTTATACCG
4843	NOS2	F:GGACTCACAGCCTTTGGA R:GGATGTCGGACTTTGTAGATT
1906	ET-1	F:CATCATTTGGGTCAACACT R:GCACATTTGGCATCTATTTT
2597	GAPDH	F:TCAAGATCATCAGCAATG R:CGATACCAAAGTTGTCAT

术有限公司)孵育后进行化学发光检测。以抗 GAPDH 抗体(杭州联科生物技术有限公司)作为内部参考。使用 ChemiDoc XRS 凝胶成像系统(美国 Bio-RAD)获得了特定蛋白质带的化学发光图像。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 22.0 软件对数据进行统计学分析。符合正态分布的计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 低氧和(或)抑制 HLA-G 对 JEG-3 细胞增殖活性的影响 CCK-8 法检测增殖活性结果显示:4 组细胞的增殖活性比较,差异有统计学意义($F = 48.54, P < 0.05$)。常氧条件下,降低 HLA-G 的表达后, JEG-3 细胞的活力显著下降;缺氧条件下, JEG-3 细胞的细胞活力低于常氧条件,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 2。

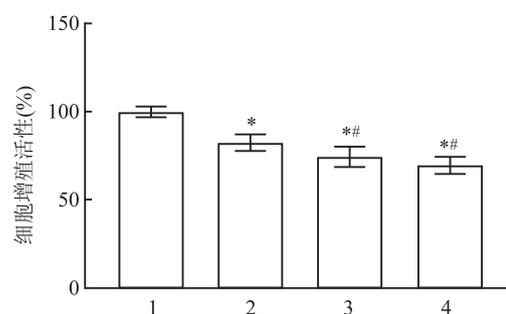


图 2 CCK-8 法检测 4 组细胞增殖活性

1: 常氧对照组; 2: 常氧抑制组; 3: 低氧对照组; 4: 低氧抑制组; 与常氧对照组比较: * $P < 0.05$; 与常氧抑制组比较: # $P < 0.05$

2.2 低氧和(或)抑制 HLA-G 对 JEG-3 细胞凋亡和坏死的影响 流式细胞术检测细胞凋亡和坏死结果显示:4 组细胞的凋亡细胞数比较,差异有统计学

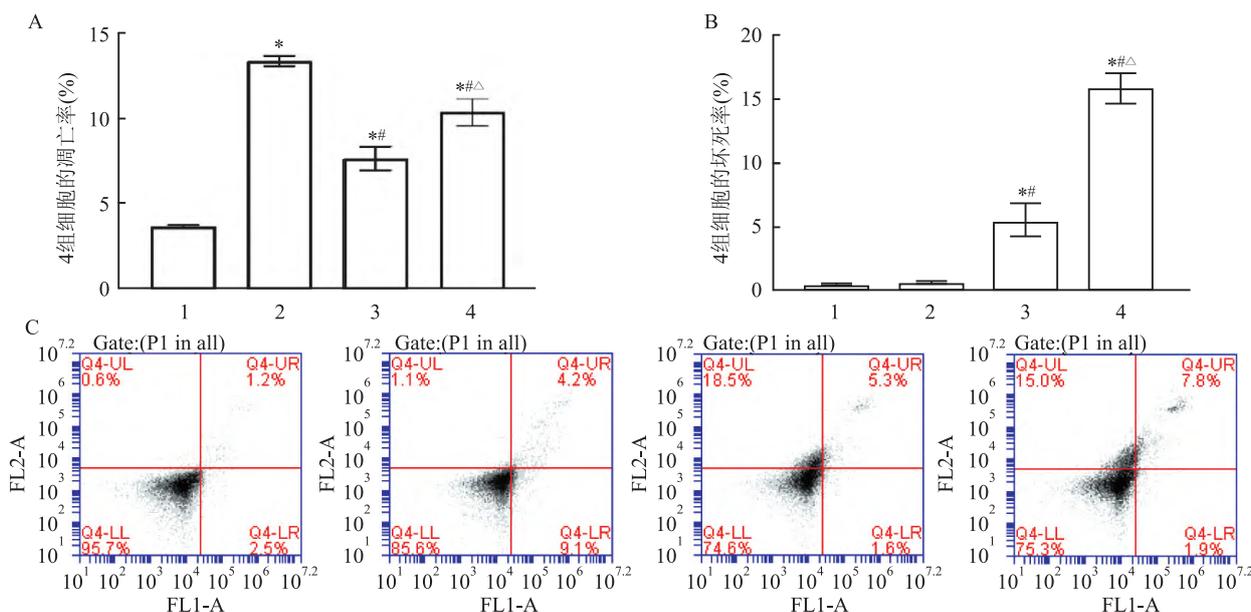


图3 流式细胞术检测4组细胞凋亡率和坏死率

A:4组细胞的细胞凋亡率;B:4组细胞的细胞坏死率;C:4组细胞凋亡率和坏死率的流式细胞术图;1:常氧对照组;2:常氧抑制组;3:低氧对照组;4:低氧抑制组;与常氧对照组比较: * $P < 0.05$;与常氧抑制组比较: # $P < 0.05$;与低氧对照组比较: △ $P < 0.05$

意义 ($F = 165.653, P < 0.001$)。常氧抑制组 JEG-3 细胞的凋亡细胞数与常氧对照组比较,凋亡数增加,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);低氧抑制组 JEG-3 细胞凋亡数与低氧对照组比较,凋亡数增加,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见图 3A、C。

4组细胞的细胞坏死率比较,差异有统计学意义 ($F = 195.642, P < 0.001$)。低氧对照组 JEG-3 细胞的细胞坏死率与常氧对照组比较,坏死率增加,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);低氧下,无论对照组还是抑制组 JEG-3 细胞坏死率均增加,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见图 3B。

2.3 低氧和(或)抑制 HLA-G 对 JEG-3 细胞周期的影响 流式细胞术检测细胞周期结果显示:4组细胞的 G1 期细胞数比较,差异有统计学意义 ($F = 69.291, P < 0.001$)。与常氧、低氧对照组相比,常氧、低氧抑制组均增加了 G1 相细胞的数量,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。4组细胞的 S 期细胞数比较,差异有统计学意义 ($F = 9.070, P = 0.006$)。与常氧、低氧对照组相比,常氧、低氧抑制组减少了 JEG-3 滋养细胞的 S 相凋亡,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。4组细胞的 G2 期细胞数比较,差异无统计学意义 ($F = 1.154, P = 0.385$)。这些结果表明,HLA-G 的下调均阻断了细胞周期从 G1 相到 S 相的转变。见图 4。

2.4 低氧和(或)抑制 HLA-G 对 JEG-3 细胞侵袭能力的影响 Transwell 法检测细胞侵袭能力结果

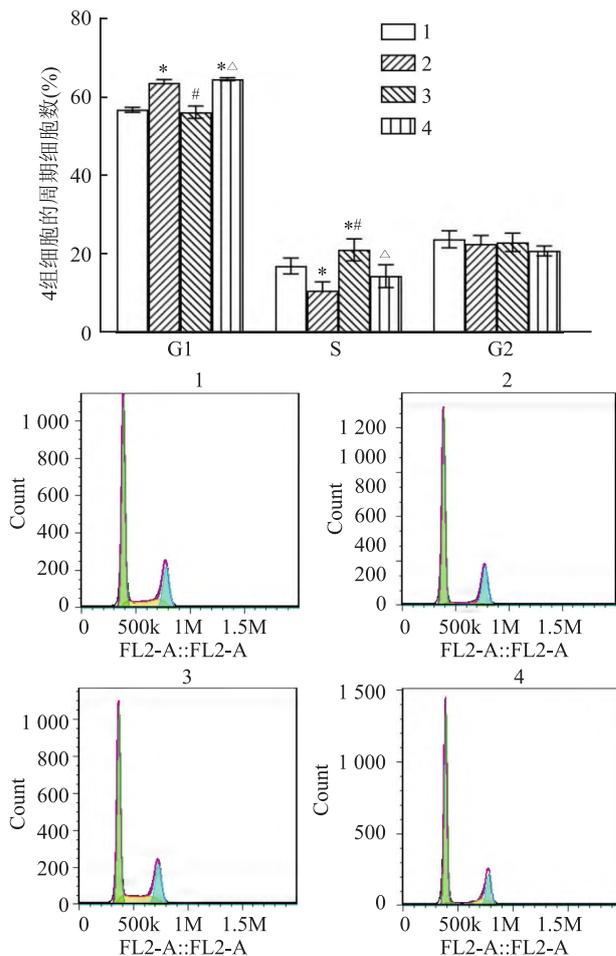


图4 流式细胞仪检测四组细胞周期分布

1:常氧对照组;2:常氧抑制组;3:低氧对照组;4:低氧抑制组;与常氧对照组比较: * $P < 0.05$;与常氧抑制组比较: # $P < 0.05$;与低氧对照组比较: △ $P < 0.05$

显示:4组细胞的穿模细胞数比较,差异有统计学意义($F = 22.947, P < 0.001$)。常氧抑制组 JEG-3 细胞的侵袭能力与常氧对照组比较,细胞侵袭能力减弱,差异有统计学意义($P < 0.05$);低氧对照组和低氧抑制组分别与常氧对照组和常氧抑制组比较,细胞侵袭能力均减弱,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 5。

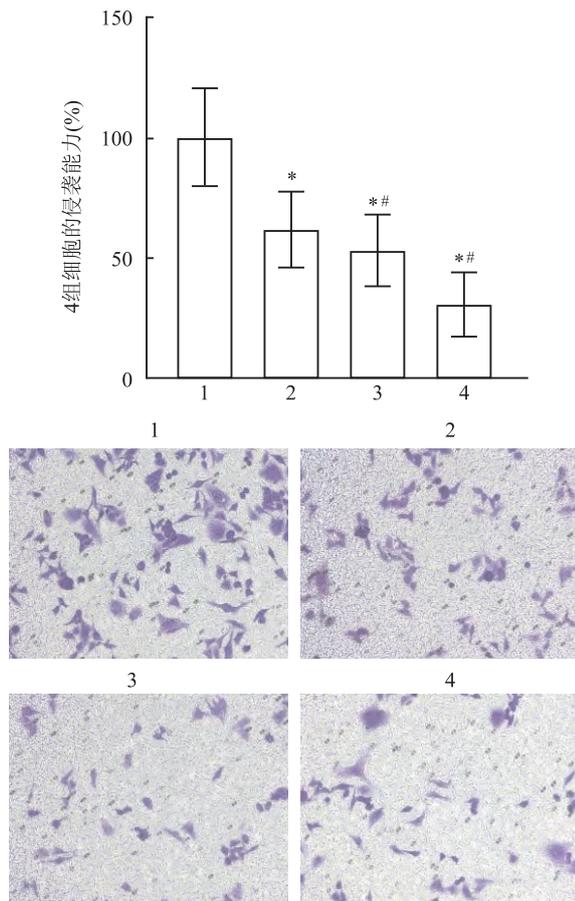


图5 Transwell 法检测 4 组细胞的细胞侵袭能力 $\times 200$

1:常氧对照组;2:常氧抑制组;3:低氧对照组;4:低氧抑制组;与常氧对照组比较: * $P < 0.05$;与常氧抑制组比较: # $P < 0.05$

2.5 4 组转染后 JEG-3 细胞 HLA-G、HIF-2 α 、VEGF、NOS2 及 ET-1 表达水平的比较

通过 qPCR 和 Western blot 检测 HLA-G、HIF-2 α 及其靶基因 VEGF、NOS2、ET-1 mRNA 和蛋白表达,结果显示低氧(1% O_2)和抑制 HLA-G 均降低 HLA-G mRNA 表达,且二者有协同作用(图 6A)。低氧(1% O_2)和抑制 HLA-G 均可增加 HIF-2 α 、VEGF、ET-1 mRNA 表达,不过对于 HIF-2 α 和 VEGF,仅低氧状态下其自身 mRNA 表达高于低氧抑制 HLA-G 状态下的蛋白表达(图 6A)。对于 NOS2,无论在常氧或低氧状态下,抑制 HLA-G 表达同样抑制 NOS2 mRNA 表达,

而在仅低氧状态下其自身表达升高,见图 6A。通过 Western blot 验证了各组蛋白表达,结果显示与各组 mRNA 表达水平趋势一致。见图 6B。

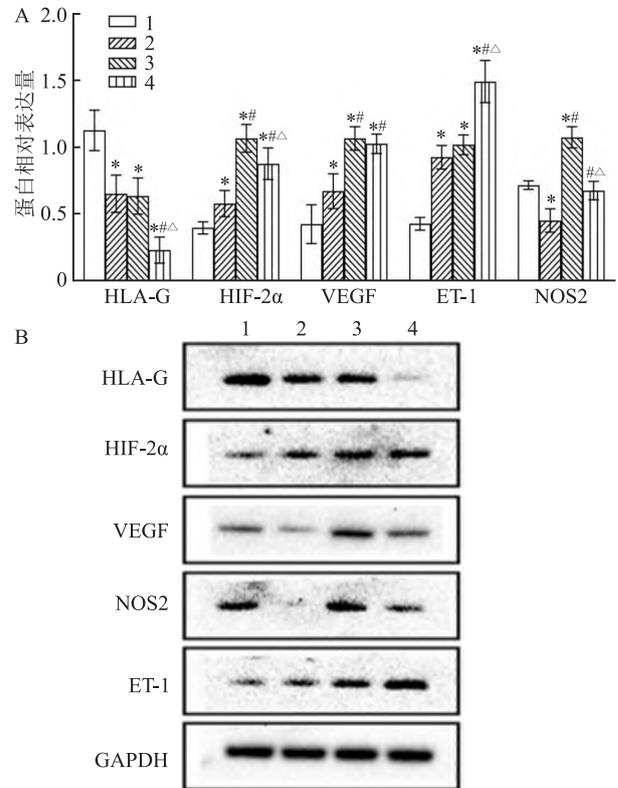


图6 4 组转染后 JEG-3 细胞 HLA-G、HIF-2 α 、VEGF、ET-1 及 NOS2 表达情况

A:qPCR 检测 HLA-G、HIF-2 α 、VEGF、ET-1 及 NOS2 的 mRNA 相对表达量;B:Western blot 检测 HLA-G、HIF-2 α 、VEGF、ET-1 及 NOS2 的蛋白相对表达量;1:常氧对照组;2:常氧抑制组;3:低氧对照组;4:低氧抑制组;HLA-G mRNA 表达水平比较($F = 22.969, P < 0.001$);HIF-2 α mRNA 表达水平比较($F = 41.926, P < 0.001$);VEGF mRNA 表达水平比较($F = 21.91, P < 0.001$);NOS2 mRNA 表达比较($F = 40.556, P < 0.001$);ET-1 mRNA 表达水平比较($F = 56.588, P < 0.001$);与常氧对照组比较: * $P < 0.05$;与常氧抑制组比较: # $P < 0.05$;与低氧对照组比较: $\Delta P < 0.05$

3 讨论

子痫前期是一种以孕妇发生高血压和蛋白尿为特征的严重危害母婴健康的疾病^[5]。子痫前期发病机制尚不清楚,滋养细胞浸润障碍被认为是子痫前期发生的重要原因^[6]。高原地区子痫前期发病率高于平原地区,且子痫前期发病随海拔升高有明显上升趋势^[2]。课题组前期研究^[7]显示,低氧环境下 HLA-G 表达下降可能通过影响滋养细胞增殖活性及侵袭能力参与子痫前期的发生。而 HLA-G 可

能通过哪些可能的细胞信号通路参与调节滋养细胞的生物学行为,导致高原地区子痫前期高发,此类研究国内外尚未见报道。

HLA-G 是一种可受应激诱导的蛋白质分子,其表达形式和水平的变化与机体免疫功能,尤其是生殖、移植免疫功能密切相关。研究^[8]显示随海拔高度增加,子痫前期孕妇胎盘组织 HLA-G 表达水平呈下降趋势。高原低氧环境下 HLA-G 的表达及滋养细胞生物学行为在子痫前期的发生中起着重要作用,但具体机制仍不明确。本研究模拟低氧条件,通过 siRNA 技术抑制了 JEG-3 细胞中 HLA-G 的表达,建立了低表达 HLA-G 的滋养细胞模型。结果显示低氧(1% O₂)和抑制 HLA-G 均降低 HLA-G 表达,且二者有协同作用。抑制 HLA-G 表达后导致 JEG-3 细胞增殖活性下降,侵袭能力降低,细胞凋亡率显著升高,并使细胞被阻滞在 G1 期。低氧环境亦可使细胞增殖活性下降,侵袭能力降低,还产生明显的坏死细胞群,但对于细胞周期没有明显改变。故低氧条件和滋养细胞 HLA-G 表达下降,二者相辅相成,互相影响改变了滋养细胞的生物学行为,共同作用加重了滋养细胞浸润障碍。

低氧在影响 HLA-G 表达上可能起着举足轻重的作用,由于 EPAS1 是转录因子家族成员之一,与细胞侵袭行为及疾病的发生发展密切相关,推断 HLA-G 可能通过 EPAS1 低氧反应通路参与调节滋养细胞的生物学行为,从而参与高原低氧环境下子痫前期的发生^[9]。EPAS1 又名缺氧诱导因子 2 (HIF-2),HIF 被认为在人类胎盘正常发育中起着重要的作用^[10]。HIF-2 α 与缺氧诱导因子 1 α 具有高度同源性,可以激活目标基因以应对缺氧等应激因素^[11]。然而 HIF-2 α 在不同氧浓度下对滋养细胞生物学行为的影响结果不尽一致。在常氧情况下通过下调 HIF-2 α 可增强细胞凋亡,限制滋养层的侵袭^[12]。但是在缺氧情况下,低氧可诱导滋养层细胞高表达 HIF-2 α ,抑制滋养细胞侵袭及血管形成能力,提示 HIF-2 α 有可能涉及子痫前期的发生^[13]。EPAS1 靶基因主要有血管内皮生长因子(VEGF)、诱导型一氧化氮合酶(NOS2)、乳酸脱氢酶、3-磷酸甘油醛脱氢酶、血清中内皮素 1(endothelin-1,ET-1)、转铁蛋白、酪氨酸羟化酶等,作用涉及血管生长、血管收缩、骨髓造血、能量代谢、儿茶酚胺合成和铁代谢等。VEGF 介导生理性及病理性血管增生,与许多疾病包括肿瘤、类风湿性关节炎、视网膜血管病变、心血管疾病有关。NOS2 的表达增加,引起血管

上皮和内皮细胞损伤^[14]。ET-1 主要由血管内皮细胞产生,缺氧缺血发生后,ET-1 的水平升高,参与了全身各器官灌注不足特别是对心脑血管的损害^[15]。本研究中,低氧(1% O₂)和抑制 HLA-G 均可增加 HIF-2 α 、VEGF 及 ET-1 表达,对于 HIF-2 α 和 VEGF,低氧更能影响其表达的升高;对于 NOS2,则抑制 HLA-G 表达同样抑制 NOS2 表达,而在低氧状态下其表达升高。推测 HLA-G 可能通过 EPAS1 低氧反应通路增加 HIF-2 α 、VEGF、ET-1 表达从而影响滋养细胞生物学行为,参与了子痫前期的发生。而 NOS2 在低氧下和抑制 HLA-G 下不同表达,可能是由于对 NOS2 表达的调控相对复杂的缘故,其原因还待于进一步研究。

综上所述,低氧条件下经 siRNA 转染后抑制 JEG-3 细胞中 HLA-G 的表达,可能影响滋养细胞的增殖、侵袭能力及细胞凋亡率,并使细胞被阻滞在 G1 期,并且低氧和抑制 HLA-G 均可增加 HIF-2 α 、VEGF 及 ET-1 表达,推测 HLA-G 可能通过 EPAS1 低氧反应通路影响滋养细胞生物学行为,从而参与了子痫前期的发生。本课题仅从细胞实验验证了低氧、HLA-G 对滋养细胞生物学行为的影响,和对 EPAS1 及靶基因表达的影响,下一步希望能通过动物实验验证 HLA-G 通过 EPAS1 低氧反应通路参与高原低氧环境下子痫前期发病的分子机制,以及高原地区子痫前期 EPAS1 表达及转录活性改变。

参考文献

- [1] 格日力. 高原医学[M]. 北京:北京大学医学出版社, 2015: 232.
- [2] 吴翠群. 迪庆高原地区妊娠期高血压疾病的发病情况调查与分析[J]. 昆明医学院学报, 2010, 31(2): 104-6, 109.
- [3] 谢莹莺, 曲新霞, 赵海宁, 等. HLA-G 表达对滋养细胞系 JEG-3 细胞侵袭和增殖能力的影响[J]. 中华妇产科杂志, 2019, 54(3): 179-83.
- [4] Patel J, Landers K, Mortimer R H, et al. Regulation of hypoxia inducible factors (HIF) in hypoxia and normoxia during placental development[J]. Placenta, 2010, 31(11): 951-7.
- [5] Ahmed A, Dunk C, Ahmad S, et al. Regulation of placental vascular endothelial growth factor (VEGF) and placenta growth factor (PlGF) and soluble Flt-1 by oxygen—a review[J]. Placenta, 2000, 21 Suppl A: S16-24.
- [6] Pauli J M, Repke J T. Preeclampsia: Short-term and long-term implications[J]. Obstet Gynecol Clin North Am, 2015, 42(2): 299-313.
- [7] 曲新霞, 谢莹莺, 赵海宁, 等. 低氧对 JEG-3 细胞 HLA-G 表达及滋养细胞生物学行为的影响[J]. 实用妇产科杂志, 2019, 35(3): 218-22.

- [8] 谢莹莺, 赵海宁, 裴青青, 等. 青海地区不同海拔藏族汉族子痫前期患者人类白细胞抗原 G 表达研究[J]. 中国全科医学, 2017, 20(16): 1978-82.
- [9] Zheng X, Zhang Y, Liu Y, et al. HIF-2 α activated lncRNA NEAT1 promotes hepatocellular carcinoma cell invasion and metastasis by affecting the epithelial-mesenchymal transition[J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(4): 3247-56.
- [10] Saito S, Nakashima A. A review of the mechanism for poor placentation in early-onset preeclampsia: the role of autophagy in trophoblast invasion and vascular remodeling[J]. *J Reprod Immunol*, 2014, 101-102: 80-8.
- [11] Yang H, Geng Y H, Wang P, et al. Extracellular ATP promotes breast cancer invasion and epithelial-mesenchymal transition *via* hypoxia-inducible factor 2 α signaling[J]. *Cancer Sci*, 2019, 110(8): 2456-70.
- [12] Xie Y, Zhao H, Luo P, et al. Downregulation of HIF-2 α enhances apoptosis and limits invasion in human placental JEG-3 trophoblast cells[J]. *Reprod Sci*, 2021, 28(9): 2710-7.
- [13] 郭永, 付竹梅. HIF-2 α 、VEGF 在子痫前期患者胎盘组织中的表达及意义[J]. 中国优生与遗传杂志, 2015, 23(2): 54-5.
- [14] Filipczak P T, Senft A P, Seagrave J, et al. NOS-2 inhibition in phosgene-induced acute lung injury[J]. *Toxicol Sci*, 2015, 146(1): 89-100.
- [15] Jankowich M, Choudhary G. Endothelin-1 levels and cardiovascular events[J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2020, 30(1): 1-8.

The effects of hypoxia on silencing HLA-G expression and biological behaviors of JEG-3 cells and EPAS1

Sun Chunlei^{1,2}, Yang Juan², Xie Yingying^{1,2}, Xu Wenyu^{1,2}, Lei Juan^{1,2}, Liu Duoduo^{1,2}

(¹Graduate School of Qinghai University, Xining 810000;

²Dept of Obstetrics, Affiliated Hospital of Qinghai University, Xining 810000)

Abstract Objective To investigate the effect of silencing human leukocyte-associated antigen-G (HLA-G) expression in the chorionic trophoblast cell line JEG-3 cells under hypoxic conditions on the biological function of JEG-3 cells and through the hypoxia response pathway of endothelial PAS1 region protein 1 (EPAS1) is involved in the molecular mechanism of preeclampsia under high altitude hypoxia. **Methods** The expression of HLA-G in JEG-3 cells was inhibited by transfection of small interfering RNA (siRNA). The JEG-3 cells after transfection were divided into four groups: normoxic control group, hypoxic control group, normoxic inhibition group, and hypoxic inhibition group. CCK-8 test and Transwell test were used to detect the proliferation and invasion ability of the cells in four groups; The effects of four groups of apoptosis and cell cycle were detected by flow cytometry; HLA-G and EPAS1 mRNA and protein expression levels were detected by real-time fluorescence quantitative PCR (qPCR) and Western blot. **Results** ① Compared with the normoxic control group, hypoxic control group, normoxic inhibition group, and hypoxic inhibition group could reduce the proliferation activity and invasion ability of JEG-3 cells, and significantly increase the apoptosis rate. The hypoxic control group and hypoxic inhibition group also produced an obvious necrotic cell population; Under the condition of hypoxia, after reducing the expression of HLA-G, the cell necrosis rate was further aggravated; Whether under normoxia or hypoxia, inhibition of HLA-G expression caused the cells to be blocked in the G1 phase. ② Compared with the normoxic control group, hypoxia control group, normoxic inhibition group, and hypoxia inhibition group decreased the expression of HLA-G protein, and hypoxia and inhibition of HLA-G had a synergistic effect; Hypoxia-inducible factors-2 α (HIF-2 α), vascular endothelial growth factor (VEGF) and endothelin-1 (ET-1) protein expression could be added, inhibition of HLA-G decreased the expression of inducible nitric oxide synthase (NOS2). **Conclusion** In the hypoxic environment, silencing HLA-G may affect the biological behavior of trophoblast through the EPAS1 hypoxic response pathway and participate in the occurrence and development of preeclampsia.

Key words preeclampsia; hypoxia; human leukocyte antigen-G; endothelial PAS1 region protein 1; high altitude