

论著·基础研究

MTA1在子痫前期胎盘组织中的表达及其对滋养细胞功能的影响

耿 瑶^{1,2}, 张 杨², 赵 洁², 李 伟², 蔡国青³

1. 西北大学生命科学学院, 西安 710069; 2. 中国人民解放军空军军医大学基础医学院人体解剖与组织胚胎学教研室, 西安 710032; 3. 中国人民解放军空军军医大学第一附属(西京)医院妇产科, 西安 710032

[摘要] **目的**·探讨转移相关蛋白1 (metastasis-associated protein 1, MTA1) 在子痫前期 (preeclampsia, PE) 胎盘组织中的表达及其对滋养细胞功能的影响。**方法**·采集PE孕妇胎盘标本 (PE组, 20例), 以健康妊娠孕妇胎盘标本作为对照 (对照组, 35例)。采用蛋白质印迹法、免疫荧光双重染色分析MTA1的表达变化情况; 培养人早孕期胎盘滋养层细胞系HTR8/SVneo; 通过细胞伤口愈合实验检测细胞迁移能力; 通过Transwell细胞侵袭实验检测细胞侵袭能力; 体外条件下模拟绒毛外滋养层细胞侵入子宫时的低氧环境, 通过定量实时聚合酶链式反应检测低氧诱导下蛋白酶MMP-2、MMP-9的mRNA表达情况; 构建绒毛外植体模型, 通过绒毛外植体培养检测外植体整体绒毛外延能力; 通过免疫组织化学方法检测内皮标志物CD31, 进行小鼠胎盘血管形成分析; 将Mta1^{-/-}雌性小鼠、野生型C57雌性小鼠各15只, 与野生型雄性C57小鼠合笼, 进行生育力测试。**结果**·蛋白质印迹法分析结果显示, 与对照组比较, MTA1蛋白在PE组胎盘中的表达异常降低; 免疫荧光双重染色结果显示MTA1主要定位于滋养层细胞胞核; 细胞伤口愈合实验表明稳定敲低MTA1的人绒毛膜滋养层细胞HTR8/SVneo的细胞迁移能力弱于对照组 ($P=0.002$), Transwell细胞侵袭实验显示细胞的侵袭性被显著抑制, 明显低于对照组 ($P=0.015$); 低氧刺激诱导的MMP-2、MMP-9表达水平显著降低 ($P=0.020$, $P=0.003$); MTA1敲低后外植体整体绒毛外延能力较对照组下降 ($P=0.003$); 免疫组织化学结果显示Mta1^{-/-}雌鼠胎盘CD31表达明显低于野生型雌鼠 ($P=0.004$); Mta1^{-/-}雌鼠产仔数显著降低 ($P=0.000$)。**结论**·MTA1表达水平与PE密切相关; 内源性MTA1可能参与滋养细胞浸润子宫内膜及绒毛毛细血管重塑过程。

[关键词] 子痫前期; 转移相关蛋白1; 绒毛外滋养层细胞**[DOI]** 10.3969/j.issn.1674-8115.2024.11.005 **[中图分类号]** R714.24 **[文献标志码]** A

Expression of MTA1 in preeclamptic placental tissue and its effects on trophoblast function

GENG Yao^{1,2}, ZHANG Yang², ZHAO Jie², LI Wei², CAI Guoqing³

1. College of Life Science, Northwest University, Xi'an 710069, China; 2. Department of Human Anatomy, Histology and Embryology, Basic Medical Science Academy, Air Force Military Medical University, Xi'an 710032, China; 3. Department of Gynaecology and Obstetrics, Xijing Hospital, Air Force Military Medical University, Xi'an 710032, China

[Abstract] **Objective**·To investigate the expression of metastasis-associated protein 1 (MTA1) in placental tissues of preeclampsia (PE) patients and its impact on trophoblast cell function. **Methods**·Placental specimens were collected from pregnant women with PE (PE group, 20 cases) patients and healthy pregnant women as controls (control group, 35 cases). Western blotting and immunofluorescent double staining were performed to analyze the expression changes of MTA1. The human first-trimester placental trophoblast cell line HTR8/SVneo was cultured, and the cell migration ability was assessed through wound healing assay. The cell invasion ability was detected using Transwell invasion assay. Under hypoxic conditions simulating the invasion of extravillous trophoblasts into the uterus, quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) was performed to analyze the mRNA expression of hypoxia-induced matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9), thus assessing their secretion levels. An extravillous trophoblast explant model was constructed to assess the overall villus outgrowth capacity of the explants. Immunohistochemistry (IHC) was performed to confirm the presence of the endothelial marker CD31 for placental angiogenesis analysis in mice. Fifteen Mta1^{-/-} female mice and fifteen wild-type C57 female mice were mated with wild-type

[基金项目] 国家自然科学基金 (31971070); 陕西省重点研发计划 (2022SF-241)。**[作者简介]** 耿 瑶 (1999—), 女, 硕士生; 电子信箱: ygeng1119@163.com。**[通信作者]** 蔡国青, 电子信箱: 184634529@qq.com。**[Funding Information]** National Natural Science Foundation of China (31971070); General Projects of Shaanxi Provincial Key R & D Plan (2022SF-241).**[Corresponding Author]** CAI Guoqing, E-mail: 184634529@qq.com.

male C57 mice for fertility testing. **Results** Western blotting revealed significantly decreased expression of MTA1 protein in placental tissues of the PE group compared to the control group. Immunofluorescent double staining showed that MTA1 was mainly localized in the nuclei of trophoblast cells. The wound healing assay demonstrated that HTR8/SVneo with stable *MTA1* knockdown exhibited weaker cell migration ability compared to the control group ($P=0.002$). The Transwell invasion assay demonstrated a marked decrease in invasiveness in *MTA1*-knockdown cells, significantly lower than the control group ($P=0.015$). Hypoxia-induced expression levels of matrix metalloproteinases *MMP-2* and *MMP-9* were significantly reduced ($P=0.020$, $P=0.003$). After *MTA1* knockdown, the overall villus outgrowth capacity of the explants was decreased compared to the control group ($P=0.003$). IHC results showed that CD31 expression in the placenta of *Mta1*^{-/-} female mice was significantly lower than that of wild-type female mice ($P=0.004$). The litter size of *Mta1*^{-/-} female mice was significantly reduced ($P=0.000$). **Conclusion** The expression level of MTA1 is closely related to PE. Endogenous MTA1 may be involved in trophoblast invasion into the endometrium and villous capillary remodeling.

[Key words] preeclampsia (PE); metastasis-associated protein 1 (MTA1); extravillous trophoblast (EVT)

子痫前期 (preeclampsia, PE) 可影响妊娠结局, 每年造成大量孕产妇死亡和胎儿围生期死亡。除了分娩, PE 几乎没有其他治疗方式, 但早产本身又容易影响胎儿健康状况^[1]。PE 发生于妊娠 20 周后的孕妇, 其症状包括高血压、蛋白尿等, 与胎盘功能障碍有关^[2], 特别是子宫螺旋动脉中绒毛外滋养层细胞 (extravillous trophoblast, EVT) 侵袭和迁移不良, 导致血管重塑缺陷和胎盘灌注不足^[3]。

EVT 在胎盘植入过程中表现出高度的侵袭、迁移和增殖, 这与癌症侵袭过程中观察到的病理效应相似^[4]。转移相关蛋白 1 (metastasis-associated protein 1, MTA1) 在肿瘤中具有调控细胞侵袭和转移的作用, 且与 MTA1 功能密切相关的因素如缺氧、基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) 等均与 PE 病理发生过程有关。我们推测, 内源性 MTA1 表达可能对胎盘滋养细胞的功能非常重要。本研究拟探讨 MTA1 在 PE 胎盘组织中的表达及其对其滋养层细胞功能的影响, 以期对妊娠相关胎盘疾病的预防和治疗提供参考。

1 材料与方法

1.1 胎盘来源与分组

随机选取 2015 年 3 月—2017 年 9 月在中国人民解放军空军军医大学第一附属 (西京) 医院产科住院分娩的 PE 孕妇 20 例 (PE 组), 孕妇年龄 22~34 岁, 平均年龄 (31.4±3.5) 岁, 孕龄 (33.4±2.3) 周。以同期在该院分娩的健康妊娠孕妇 35 例作为对照组, 孕妇年龄 (29.3±4.1) 岁, 孕龄 (39.1±0.6) 周。纳入标准: 月经周期规律, 且具备明确的末次月经时间; 经 B 超证实为宫内单胎妊娠; 早孕 B 超符合

停经天数; 经剖宫产终止妊娠。排除标准: 妊娠期糖尿病、肾病、原发性高血压、甲状腺疾病等, 或存在不能用于子痫前期解释的血、尿、生化指标异常。所有小鼠由中国人民解放军空军军医大学实验动物中心提供, 动物生产许可证号为 SCXK2019-001。

妊娠 20 周后出现收缩压≥140 mmHg (1 mmHg=0.133 kPa) 和/或舒张压≥90 mmHg, 合并以下任何一种不良情况诊断为 PE。① 血压不断上升, 收缩压≥160 mmHg 和/或舒张压≥110 mmHg。② 24 h 蛋白尿≥5.0 g, 或随机尿蛋白≥(+++)。③ 视觉不良、持续性头痛或其他脑神经症状。④ 上腹持续疼痛, 有肝破裂或肝包膜下血肿表现。⑤ 肝脏功能异常: 谷丙转氨酶或谷草转氨酶水平上升。⑥ 肾功能异常: 血肌酐 (Scr) >106 μmol/L, 或少尿 (每小时尿量少于 17 mL 或 24 h 尿量少于 400 mL)。⑦ 低蛋白血症合并腹腔积血 (或胸腔积液)。⑧ 血液系统不良表现: 血小板不断降低且 <100×10⁹ 个/L, 血清乳酸脱氢酶 (LDH) 上调, 血管内溶血, 黄疸或贫血。⑨ 肺水肿、心力衰竭。⑩ 胎儿生长受限或羊水过少。

1.2 胎盘标本采集

孕妇胎盘娩出后避开钙化点, 直视下在胎盘母体面中央距脐根 2 cm 处剪取全层的一小块绒毛组织 5 份, 大小约 2 cm×4 cm×1 cm, 经生理盐水清洗干净后, 放入固定液甲醛中 (固定液的体积为胎盘组织的 20 倍), 用于形态学检测; 另取胎盘中央部位约 1 cm×1 cm×1 cm 大小的绒毛组织 10 份, 经生理盐水清洗干净后, 存入液氮罐中, 用于蛋白质提取。将 C57 小鼠安乐死后, 无菌解剖取出子宫, 于冰上剥离胎盘, 去除非胎盘组织。

1.3 HTR8/SVneo细胞培养、缺氧处理和转染

HTR8/SVneo人早孕期胎盘滋养层细胞系获自中国科学院上海细胞生物研究所。在37℃、5% CO₂、20% O₂湿润环境中,用含有10%胎牛血清(Corning,美国)和1%青霉素-链霉素溶液(碧云天,中国)的RPMI1640培养基(Thermo Fisher,美国)培养HTR8/SVneo。

在缺氧条件(37℃、5% CO₂、3% O₂)培养48 h,之后复氧,在常规条件(37℃、5% CO₂、20% O₂)下培养24 h。

将HTR8/SVneo细胞以1×10⁵个/孔的密度接种于24孔板,培养24 h。分为Scramble sh组与MTA1 sh组,将稀释好的siRNA和Lipofectamine 3000(Invitrogen,美国)轻轻混合均匀,室温孵育20 min以配制转染复合物。待细胞汇合度达到70%~90%后,弃掉旧培养基,磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗后,加入新培养基,滴加转染试剂混和液至孔板内。“十”字法摇晃培养板数次,放入恒温培养箱继续培养6~8 h,更换为完全培养基;继续培养48 h,收取细胞,用于后续试验。

1.4 蛋白质印迹法检测MTA1的表达

对临床获取的人胎盘组织、绒毛外植体、小鼠胎盘组织分别进行蛋白提取,样品经SDS-PAGE凝胶电泳后转移至PVDF膜,封闭后添加一抗MTA1(Abcam,英国),4℃孵育过夜。复温1 h, PBS洗涤5 min×3次,经二抗孵育和洗膜后使用ECL化学发光显色液显影,凝胶成像系统(Bio-Rad,美国)拍照。以GAPDH作为内参蛋白。

1.5 免疫荧光双重染色检测胎盘组织MTA1的表达

对照组和PE组胎盘组织常规石蜡包埋切片、脱蜡、水合,用PBS洗涤,牛血清蛋白于37℃封闭1 h,滴加混合后的MTA1与CK-14(ab7800, Abcam,英国)一抗(1:400稀释),用非免疫血清代替一抗作为阴性对照,4℃孵育过夜。第2日, PBS洗涤5 min×3次后,荧光山羊抗兔、山羊抗鼠二抗混合(1:400稀释),37℃孵育1 h, PBS清洗后,含抗荧光淬灭剂的DAPI封片,激光共聚焦显微镜下拍照并采集图像。

1.6 细胞伤口愈合实验检测细胞迁移情况

HTR8/SVneo细胞分为Scramble sh组与MTA1 sh组,处理同前。在24孔板中,每孔接种6×10⁴个HTR8/SVneo细胞,待细胞汇合度达到70%~90%,进行转染操作。转染48 h后,用枪头在孔板底部垂直划线,并清洗1次,去除多余细胞。分别在正常培养前(0 h)、培养24 h后,使用倒置显微镜拍照,并通过ImageJ软件计算HTR8/SVneo细胞伤口愈合面积。

1.7 Transwell细胞侵袭实验检测细胞的侵袭

HTR8/SVneo细胞分为Scramble sh组与MTA1 sh组,处理同前。使用Transwell插入物(BD Biosciences,美国)进行体外细胞侵袭和迁移测定。Transwell插入物的底部由聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET)膜制成,该膜具有直径8 μm的孔,允许细胞通过。用5 mg/mL基质胶(BD Biosciences,美国)涂覆用于细胞侵袭实验的Transwell插入物的PET膜。将Transwell插入物放入24孔细胞培养板中,将孔分离成上室和下腔。将细胞悬液接种入预处理的Transwell小室中。每组实验均在下室加入600 μL完全培养基,将Transwell小室在37℃、5% CO₂湿润的细胞培养箱中培养24 h;随后用PBS洗涤Transwell小室3次,棉签拭去小室内多余细胞,将细胞在预冷的95%乙醇中固定10 min。用2 μg/mL DAPI(KPL,美国)对留在膜上侧的细胞染色2 min;室温下,用1 μg/mL碘化丙啶(Sigma-Aldrich,德国)对到达膜下侧的侵袭性细胞染色1 min。在倒置荧光显微镜下对细胞进行计数。为了消除负载误差等非特异性因素对Transwell测定结果的影响,将细胞侵袭能力定义为侵袭细胞数与非侵袭细胞数的比值,而不是仅计算膜底面的侵袭细胞数。实验重复3次。将处理过的样本的侵入能力标准化为相应对照的侵入能力。

1.8 定量实时聚合酶链式反应检测蛋白酶MMP-2、MMP-9的mRNA表达情况

用TRIzol提取细胞总RNA。使用SuperScript RT(Invitrogen,美国)试剂盒将所提RNA反转录为cDNA。将cDNA与PowerUp™ SYBR® Green Master Mix(Thermo Fisher,美国)混合,进行定量实时聚合酶链式反应(qRT-PCR)。MMP2(NM_008610.3)引物为5'-TTGGCGGACAGTGACACCAC-3'和

5'-GGGGCCTCATACACAGCGTC-3', 产物大小为 102 bp; *MMP9* (NM_013599.5) 引物为 5'-CCTTCA CCTTCGAGGGACGC-3' 和 5'-GCCGTGCTCCGTGT AGAGTC-3', 产物大小为 146 bp。

1.9 绒毛外植体培养、观察及检测

早孕绒毛组织来自中国人民解放军空军军医大学第一附属(西京)医院妇产科。运输中全程置于冰冷的 DMEM/F-12 培养基中, 并保证在 2 h 内完成组织处理。用无菌 PBS 清洗组织, 将母体子宫内膜与胎膜剥离去除。剪刀剪取 2~4 mm 绒毛片段, 置于预先包被 Matrigel 胶 (Matrigel: DMEM=1:19) 的 12 孔板中, 轻轻按压以固定绒毛, 37 °C 恒温孵箱中静置聚合 30 min, 再将孔板转移至 37 °C 培养箱。培养 4 h 后取出孔板, 小心加入 1 mL 完全培养基 (含有 20% PBS 和 1% 青霉素-链霉素), 尽量避免冲起绒毛。培养 24 h 后, 选取含贴壁绒毛的孔进行 *MTA1* shRNA 绒毛外植体转染, 转染过程同前。8 h 后常规换液, 更换为完全培养基, 转染 24 h。 *MTA1* shRNA 转染 96 h 后观察绒毛外植体存活和外延情况, 用蛋白质免疫印迹法检测绒毛外植体中 MTA1 蛋白的表达。

1.10 小鼠基因型鉴定

从中国人民解放军空军军医大学基础医学院李伟副教授课题组获得 *Mta1*^{-/-} 小鼠 (全身敲除)^[5-7], C57/BL6 背景, 饲养于 SPF 级动物房内。剪取小鼠尾部末端组织, 碱裂解法提取 DNA; PCR 扩增 DNA 片段。引物序列: F-AGGAGGAAGAGGAGGAGG AGAGTGAATATAGGTTA, R-GGCACCAGATCACA TAGTTGTG。PCR 反应条件: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 45 s, 重复 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min; 扩增产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳, 通过条带分析小鼠基因型。筛选出 *Mta1*^{-/-} 小鼠。

1.11 免疫组织化学方法检测小鼠胎盘内 CD31 表达

将小鼠胎盘组织用 4% 的多聚甲醛固定过夜, 梯度乙醇脱水、二甲苯透明后石蜡包埋, 切片。石蜡切片于二甲苯与梯度乙醇复水, 柠檬酸钠缓冲液 (10 mmol/L, pH 值 6.0) 中微波修复 15 min, 冷却至室温。PBS 清洗后, 于 0.03% 甲醇-0.3% 过氧化氢中

室温孵育 30 min; PBS 洗涤, 血清封闭 30 min; CD31 (ab28364, Abcam, 美国) 一抗 4 °C 过夜孵育, 对照玻片用非免疫血清代替一抗孵育。次日, 切片复温 1 h, PBS 清洗; 二抗室温孵育 3 h, PBS 清洗; ABC 复合物孵育 1 h, PBS 清洗, DAB 显色; 自来水冲洗切片, 苏木精复染 1 min。切片脱水、透明、封片, 扫描成像。

1.12 生育力测试

以 *Mta1*^{-/-} 雌性小鼠为实验组, C57 野生型雌性小鼠作为对照组 (*Mta1*^{+/+}), 每组各 15 只, 均为 8 周龄。2 组小鼠分别与生育力正常的 8 周龄 C57 野生型雄性小鼠合笼 2 周, 记录每只雌性小鼠的产仔数。

1.13 统计学分析

使用 GraphPad Prism 10 软件进行统计分析。组间比较采用两样本 *t* 检验。所有实验至少重复 3 次。 *P*<0.05 表示差异有统计学意义。

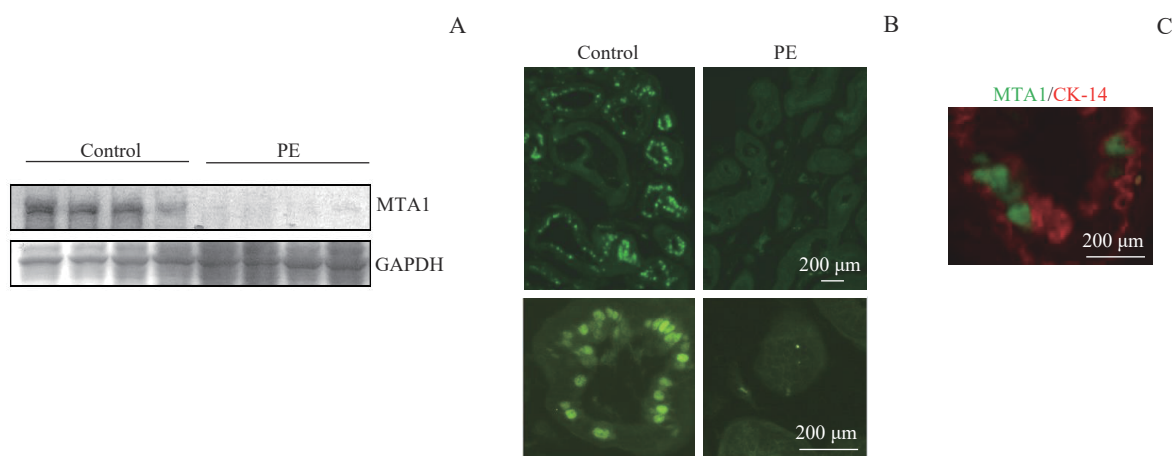
2 结果

2.1 人胎盘组织内 MTA1 的表达情况

蛋白质印迹法与免疫荧光结果均显示, MTA1 在 PE 组胎盘中的表达水平明显低于对照组 (图 1A、B)。免疫荧光双重染色结果显示 MTA1 (绿色荧光) 主要定位于滋养层细胞 (CK-14, 红色荧光) 胞核 (图 1C)。

2.2 敲低 MTA1 对 HTR8/SVneo 细胞迁移、侵袭能力及蛋白酶表达的影响

MTA1 shRNA 转染后, 蛋白质印迹法检测 HTR8/SVneo 滋养层细胞 MTA1 表达, 结果显示, 与 Scramble sh 组相比, 滋养层细胞 MTA1 的表达明显降低 (图 2A)。伤口愈合实验 (图 2B) 显示, 划伤后 24 h, *MTA1* sh 组细胞迁移量明显低于 Scramble sh 组 (*P*=0.002); Transwell 细胞体外侵袭实验 (图 2C) 显示, *MTA1* sh 组细胞侵袭能力与 Scramble sh 组相比显著下降 (*P*=0.015); 该结果提示 MTA1 能够促进滋养层细胞侵袭及迁移。将滋养层细胞在缺氧环境中培养后复氧, 以模拟 PE 胎盘缺氧环境, 进行 qRT-PCR 检测以明确 MTA1 对蛋白酶 *MMP*-2、*MMP*-9 表达的影响; 结果 (图 2D) 显示, 低氧刺激下, 与 Scramble



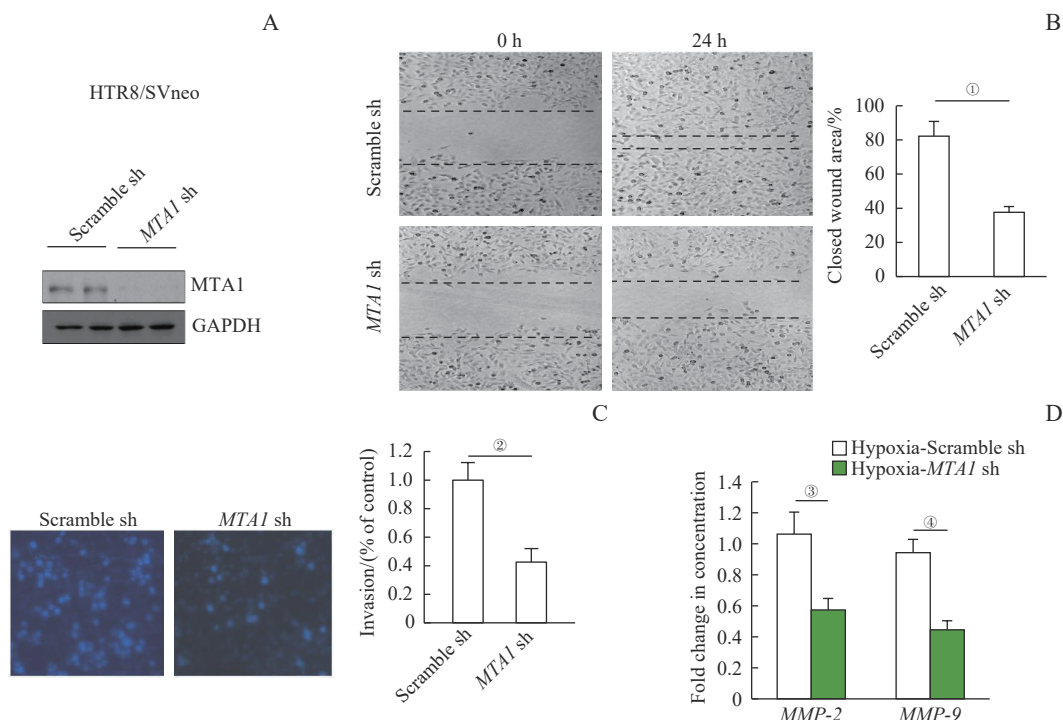
Note: A. Western blotting. B. Immunofluorescence assay. C. Expression site of MTA1 protein located by immunofluorescence double staining.

图1 人胎盘组织 MTA1 蛋白的表达

Fig 1 Expression of MTA1 protein in human placental tissues

sh 组相比, *MTA1* sh 组 *MMP-2* 和 *MMP-9* 的 mRNA 表达水平均降低 ($P=0.020$, $P=0.003$); 提示低氧刺激

诱导下 MTA1 对于促进 *MMP-2* 和 *MMP-9* 的表达有重要作用。



Note: A. Expression of MTA1 protein in HTR8/SVneo cells with stable MTA1 knockdown by Western blotting. B. Wound healing assay. Representative images were taken at the beginning of wound healing (0 h) and 24 h later. The level of cell migration towards the wound scratches was quantified by measuring the distance of wound closure. C. Invasive capacity of the cells by Transwell *in vitro* invasion assay and statistical analysis. D. Expression levels of *MMP-2* and *MMP-9* by qRT-PCR. $n=4$. ^① $P=0.002$, ^② $P=0.015$, ^③ $P=0.020$, ^④ $P=0.003$.

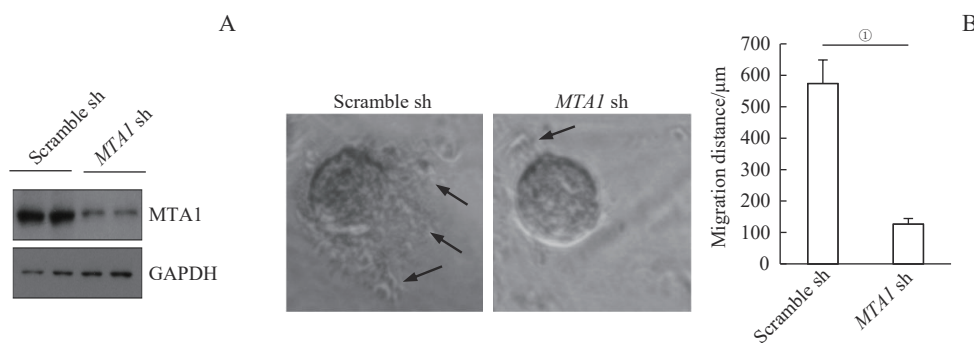
图2 敲低 *MTA1* 对 HTR8/SVneo 细胞功能的影响

Fig 2 Impact of *MTA1* knockdown on the functional properties of HTR8/SVneo cells

2.3 敲低 *MTA1* 对体外培养的绒毛外植体延伸能力的影响

与 Scramble shRNA 转染组相比, *MTA1* shRNA 转染组绒毛组织中 MTA1 蛋白的表达水平显著降低 (图 3A)。对外植体进行整体绒毛外延检测, 倒置显

微镜下观察绒毛外植体的生长状态, 结果显示, 与 Scramble shRNA 转染组相比, *MTA1* shRNA 转染组外植体中 EVT 迁移的距离显著缩短 (图 3B、C), 差异具有统计学意义 ($P=0.003$)。



Note: A. Expression of MTA1 protein in villous explants by Western blotting. B. The growth state of villus explants (arrows) under the inverted microscope. C. The average migration distance of villous explants. $n=4$. ^① $P=0.003$.

图3 敲低 *MTA1* 对体外培养的绒毛外植体外延能力的影响

Fig 3 Effect of knocking down *MTA1* on epitaxial ability of cultured villous explants *in vitro*

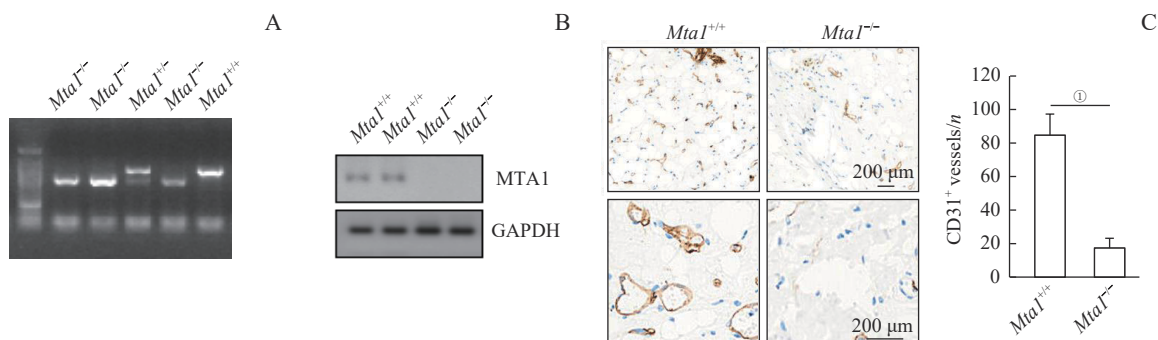
2.4 *MTA1*^{-/-} 雌鼠胎盘血管形成情况与产仔数目

提取小鼠基因组 DNA 和胎盘组织蛋白进行基因型与蛋白鉴定。PCR 结果显示野生型 (*Mta1*^{+/+}) 小鼠目的片段产物约在 800 bp, 杂合子 (*Mta1*^{+/-}) 小鼠目的片段在 800 bp 和 408 bp 位置呈现 2 个条带, 而纯合子 (*Mta1*^{-/-}) 小鼠目的条带约在 408 bp (图 4A)。蛋白质印迹法结果显示, 纯合子小鼠胎盘组织中无 MTA1 表达, 证实其被成功敲除 (图 4B)。

通过血管内皮标志物 CD31 的表达量分析胎盘

血管生成过程。免疫组织化学结果表明 (图 4C), *MTA1*^{-/-} 组小鼠的 CD31⁺ 微血管密度显著低于对照组 ($P=0.004$), *MTA1*^{-/-} 组小鼠胎盘血管生成受到损害。

生育力测试结果显示, *Mta1*^{+/+} 组小鼠产仔数分别为 7、8、8、8、8、9、9、9、9、10、10、10、10、12、12 只; *MTA1*^{-/-} 组小鼠产仔数分别为 0、0、2、2、3、3、4、4、5、5、6、6、7、7、8 只。与对照组相比, *Mta1*^{-/-} 雌鼠产仔数显著降低 ($P=0.000$)。



Note: A. PCR identification results of mouse tail genomic DNA. B. Detection of MTA1 expression in placental tissues by Western blotting. C. Immunohistochemical staining and quantitative analysis of CD31⁺ protein in placental tissues of mice. $n=4$. ^① $P=0.004$.

图4 *Mta1*^{-/-} 小鼠的鉴定及其胎盘组织中 CD31 表达情况

Fig 4 Identification of *Mta1*^{-/-} mice and expression of CD31 in the placental tissues

3 讨论

目前, 主流理论认为胎盘发育异常是引起 PE 的主要原因^[8-9]。在人类早期妊娠期间, EVT 侵入子宫壁并完成螺旋动脉的重塑。如果滋养层细胞入侵失败或血管上皮缺失, 将导致子宫螺旋动脉重塑不足, 胎盘血供显著减少, 进而导致胎盘缺血和氧化应激, 引发 PE。血管生成因子的异常释放, 进一步改变胎盘血管体积密度。氧梯度在诱导滋养层细胞迁移、增殖

和分化中发挥重要作用, 因此胎盘快速生长期存在低氧环境。

MTA1 在人滋养层细胞中表达水平较高, 揭示了 MTA1 在正常人滋养层细胞中具有潜在作用^[10]。MTA1 是一个与肿瘤发生和发展相关的转录调节因子^[11-12], 文献报道主要集中在其调控多种人类肿瘤细胞的侵袭和转移方面^[13-14]。蛋白质印迹法结果显示, MTA1 在 PE 患者胎盘中表达异常降低。免疫荧光双重染色结果显示 MTA1 主要定位于滋养层细胞胞

核。考虑到胎盘滋养细胞作为胎盘侵袭、浸润和子宫血管重塑的执行细胞,其侵袭活性和功能的异常是导致胎盘发育障碍的根本原因,而与MTA1功能密切相关的因素(缺氧、MMP表达降低等)均与PE病理发生过程有关。我们推测,内源性MTA1表达可能对胎盘滋养细胞的功能非常重要。

EVT中MMP的异常表达与先兆子痫有关^[15]。滋养层细胞侵袭过程涉及MMP介导细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的降解^[16-17]。MMP在生理和病理生理过程中对胎盘发育、炎症、血管生成、肿瘤侵袭和转移等均具有重要意义^[18]。Akt/MMP-9信号通路是乳腺癌细胞侵袭和转移的关键信号通路^[19]。MTA1是第一个发现的转移相关基因(MTA)家族成员,在乳腺癌侵袭和转移过程中是癌症进展相关基因^[20]。同样,MMP-2也与肿瘤细胞的增殖与侵袭转移作用机制关联密切^[21]。滋养细胞分泌的MMP-2为酶解子宫内层外基质与基底膜的重要调控因子,有利于滋养细胞侵入子宫内层,是妊娠早期调控滋养细胞浸润的关键酶^[22]。MMP-2低表达与子痫前期发生高度相关,使滋养细胞的浸润能力下调,子宫螺旋动脉重铸不足^[23]。MMP-2是准确的PE预测生物标志物^[24]。本研究将滋养层细胞在缺氧环境中培养后复氧,模拟胎盘的缺氧环境,结果显示稳定敲低MTA1的人绒毛膜滋养层细胞HTR8/SVneo在低氧刺激诱导下,MMP-2、MMP-9表达水平显著降低。该结果提示了MTA1在滋养细胞浸润子宫内层方面具有重要作用。

早孕绒毛外植体培养最大程度上维持了组织结构的完整性,通常用来研究多种生物学功能,包括细胞增殖、凋亡、迁移以及侵袭等^[25]。对绒毛外植体进行反义寡核苷酸或者人源重组活性因子的干预,可探究某个基因或外源性因子对外植体存活和功能的影响。为进一步证实MTA1对滋养细胞迁移能力的影响,本研究使用了早孕绒毛外植体培养模型,以便更好地模拟胎盘早期发育中滋养细胞的分化过程。MTA1 shRNA转染绒毛外植体,培养至96 h,采用蛋白质印迹法检测绒毛外植体中MTA1蛋白的表达;结果显示,与Scramble shRNA组相比,MTA1 shRNA可显著降低绒毛组织中MTA1蛋白的表达水平。MTA1 shRNA转染96 h后,对外植体进行整体绒毛外延检测;结果显示,与Scramble shRNA转染组相比,MTA1 shRNA显著降低了外植

体中EVT迁移的距离。结合MTA1表达定位结果,我们推测MTA1可能参与了早孕期EVT的分化过程。

PE发生涉及多种细胞的相互作用,是一个异常复杂的病理变化过程^[26]。血管生成标志物能准确诊断PE,并具有较高的阴性预测值,可能有助于排除PE^[27-30]。为了进一步在体内水平确定MTA1的作用性质,本研究使用Mta1^{-/-}小鼠进行不同基因型小鼠胎盘组织内MTA1蛋白表达情况和胎盘血管形成检测。表型分析结果显示,Mta1^{-/-}雌鼠胎盘血管形成明显弱于野生型雌鼠,且Mta1^{-/-}雌鼠产仔率显著降低。结合MTA1在血管发生、肿瘤细胞侵袭和浸润中的作用特点,我们推测内源性MTA1可能通过影响滋养细胞浸润子宫内层及绒毛毛细血管重塑过程参与PE的发病机制,具体机制有待阐明。

综上所述,MTA1在胎盘发育和先兆子痫发病机制中发挥重要作用,可通过调节滋养细胞迁移和血管重塑影响胎盘功能。MTA1作为PE潜在的治疗靶点,其具体作用机制需要进一步研究。

利益冲突声明/Conflict of Interests

所有作者声明不存在利益冲突。

All authors disclose no relevant conflict of interests.

伦理批准和知情同意/Ethics Approval and Patient Consent

本研究涉及的所有试验均已通过中国人民解放军空军军医大学第一附属(西京)医院伦理委员会的审核批准(KY20194015)。所有试验过程均遵照《赫尔辛基宣言》的条例进行。

All trials involved in this study have been approved by the ethics committee of Xijing Hospital of Air Force Military Medical University (KY20194015). All test procedures were carried out in accordance with the regulations of the Declaration of Helsinki.

作者贡献/Authors' Contributions

耿瑶负责文章撰写;李伟、张杨、赵洁、蔡国青参与了文章修改;耿瑶、张杨、赵洁参与实验操作与数据整理;李伟、蔡国青负责课题总体设计、技术及材料支持。所有作者均阅读并同意了最终稿件的提交。

GENG Yao was responsible for writing the article. LI Wei, ZHANG Yang, ZHAO Jie and CAI Guoqing participated in the revision of the article. GENG Yao, ZHANG Yang and ZHAO Jie participated in the experimental operation and data collation. LI Wei and CAI Guoqing were responsible for the overall design of the project, and the support of technology and material. All authors have read the final manuscript and agreed to the submission.

• Received: 2024-01-02

• Accepted: 2024-05-13

• Published online: 2024-11-28

参 · 考 · 文 · 献

- [1] VON DADELSZEN P, MAGEE L A. Pre-eclampsia: an update[J]. *Curr Hypertens Rep*, 2014, 16(8): 454.
- [2] NAKASHIMA A, CHENG S B, IKAWA M, et al. Evidence for lysosomal biogenesis proteome defect and impaired autophagy in preeclampsia[J]. *Autophagy*, 2020, 16(10): 1771-1785.
- [3] ZHANG H, HE Y, WANG J X, et al. MiR-30-5p-mediated ferroptosis of trophoblasts is implicated in the pathogenesis of preeclampsia[J]. *Redox Biol*, 2020, 29: 101402.
- [4] TABRIZI M E A, GUPTA J K, GROSS S R. Ezrin and its phosphorylated Thr567 form are key regulators of human extravillous trophoblast motility and invasion[J]. *Cells*, 2023, 12(5): 711.
- [5] GHANTA K S, LI D Q, ESWARAN J, et al. Gene profiling of *MTA1* identifies novel gene targets and functions[J]. *PLoS One*, 2011, 6(2): e17135.
- [6] QIN J H, KE Z Y, ZHOU Q, et al. Metastasis-associated protein 1 deficiency results in compromised pulmonary alveolar capillary angiogenesis in mice[J]. *Med Sci Monit*, 2017, 23: 3932-3941.
- [7] LI D Q, PAKALA S B, REDDY S D N, et al. Metastasis-associated protein 1 is an integral component of the circadian molecular machinery[J]. *Nat Commun*, 2013, 4: 2545.
- [8] VALERO-PACHECO N, TANG E K, MASSRI N, et al. Maternal IL-33 critically regulates tissue remodeling and type 2 immune responses in the uterus during early pregnancy in mice[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2022, 119(35): e2123267119.
- [9] AFSAR B, ELSURER AFSAR R. The dilemma of sodium intake in preeclampsia: beneficial or detrimental? [J]. *Nutr Rev*, 2024, 82(3): 437-449.
- [10] BRÜNING A, MAKOVITZKY J, GINGELMAIER A, et al. The metastasis-associated genes *MTA1* and *MTA3* are abundantly expressed in human placenta and chorionic carcinoma cells[J]. *Histochem Cell Biol*, 2009, 132(1): 33-38.
- [11] MA J, LI C, QIAN H, et al. *MTA1*: a vital modulator in prostate cancer[J]. *Curr Protein Pept Sci*, 2022, 23(7): 456-464.
- [12] BURGOLD T, BARBER M, KLOET S, et al. The Nucleosome Remodelling and Deacetylation complex suppresses transcriptional noise during lineage commitment[J]. *EMBO J*, 2019, 38(12): e100788.
- [13] LI W, WU Z Q, ZHAO J, et al. Transient protection from heat-stress induced apoptotic stimulation by metastasis-associated protein 1 in pachytene spermatocytes[J]. *PLoS One*, 2011, 6(10): e26013.
- [14] LI W, MA L, ZHAO J, et al. Expression profile of *MTA1* in adult mouse tissues[J]. *Tissue Cell*, 2009, 41(6): 390-399.
- [15] LUIZON M R, PEREIRA D A, MAMEDE I, et al. Antihypertensive therapy responsiveness and adverse outcomes in preeclampsia: insights into molecular mechanisms underlying cardiovascular and renal complications[J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1281382.
- [16] SHI H, KONG R, MIAO X, et al. Decreased PPP1R3G in preeclampsia impairs human trophoblast invasion and migration via Akt/MMP-9 signaling pathway[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2023, 248(16): 1373-1382.
- [17] JIE Q, CHEN L, LIANG J, et al. Downregulated *ETV4* inhibits the proliferation, migration, and invasion of trophoblast cells in preeclampsia[J]. *Reproduction*, 2023, 165(4): 373-381.
- [18] SUI S, ZHANG Y, HUANG Y. MicroRNA-378a-3p plays a regulatory role in trophoblast cell function in preeclampsia by targeting *CMTM3*[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2023, 576: 111997.
- [19] LI J, ZHANG J, WANG Y, et al. Synergistic inhibition of migration and invasion of breast cancer cells by dual docetaxel/quercetin-loaded nanoparticles via Akt/MMP-9 pathway[J]. *Int J Pharm*, 2017, 523(1): 300-309.
- [20] YIN X, TENG X, MAT Y, et al. *RUNX2* recruits the NuRD(*MTA1*)/*CRL4B* complex to promote breast cancer progression and bone metastasis[J]. *Cell Death Differ*, 2022, 29: 2203-2217.
- [21] CANCEMI P, BUTTACAVOLI M, ROZ E, et al. Expression of α -enolase (*ENO1*), myc promoter-binding protein-1 (*MBP-1*) and matrix metalloproteinases (*MMP-2* and *MMP-9*) reflect the nature and aggressiveness of breast tumors[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(16): E3952.
- [22] MYERS J E, MERCHANT S J, MACLEOD M, et al. *MMP-2* levels are elevated in the plasma of women who subsequently develop preeclampsia[J]. *Hypertens Pregnancy*, 2005, 24(2): 103-115.
- [23] DING J, HUANG F, WU G, et al. MiR-519d-3p suppresses invasion and migration of trophoblast cells via targeting *MMP-2*[J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0120321.
- [24] LIN C, HE H, CUI N, et al. Decreased uterine vascularization and uterine arterial expansive remodeling with reduced matrix metalloproteinase-2 and -9 in hypertensive pregnancy[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2020, 318(1): H165-H180.
- [25] CHU Y J, ZHU C Z, YUE C Y, et al. Chorionic villus-derived mesenchymal stem cell-mediated autophagy promotes the proliferation and invasiveness of trophoblasts under hypoxia by activating the *JAK2/STAT3* signalling pathway[J]. *Cell Biosci*, 2021, 11(1): 182.
- [26] PEREA V, VINAGRE I, SERÉS-NORIEGA T, et al. Impact of preeclampsia and parity on sex-based discrepancies in subclinical carotid atherosclerosis in type 1 diabetes[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2024, 109(9): e1759-e1767.
- [27] CHAPPELL L C, DUCKWORTH S, SEED P T, et al. Diagnostic accuracy of placental growth factor in women with suspected preeclampsia: a prospective multicenter study[J]. *Circulation*, 2013, 128(19): 2121-2131.
- [28] DUHIG K E, MYERS J, SEED P T, et al. Placental growth factor testing to assess women with suspected pre-eclampsia: a multicentre, pragmatic, stepped-wedge cluster-randomised controlled trial[J]. *Lancet*, 2019, 393(10183): 1807-1818.
- [29] CERDEIRA A S, O'SULLIVAN J, OHUMA E O, et al. Randomized interventional study on prediction of preeclampsia/eclampsia in women with suspected preeclampsia: INSPIRE[J]. *Hypertension*, 2019, 74(4): 983-990.
- [30] ZEISLER H, LLURBA E, CHANTRAINE F, et al. Predictive value of the sFlt-1: PLGF ratio in women with suspected preeclampsia[J]. *N Engl J Med*, 2016, 374(1): 13-22.

[本文编辑] 吴 洋