

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2023.11.002
文章编号: 1005-8982 (2023) 11-0007-07

妊娠糖尿病专题·论著

妊娠糖尿病患者血清 microRNA-21 调节 Bcl-2/ Caspase-9 对滋养层细胞生物学行为的影响*

李奕莎, 吉文倩, 卢佳南

[三亚市妇幼保健院(三亚市妇女儿童医院) 产科, 海南 三亚 572029]

摘要: 目的 探讨妊娠糖尿病(GDM)患者血清 microRNA-21(miR-21)表达变化及其对滋养层细胞生物学行为的作用机制。**方法** 选取2019年1月—2020年10月三亚市妇幼保健院收治的66例GDM孕妇及同期体检且孕周相近的38例健康孕妇作为研究对象。采用实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测血清 miR-21 mRNA 表达水平, microRNA 转染JAR 细胞系构建 Control、miR-21 NC、miR-21、miR-21 inhibitor NC 和 miR-21 inhibitor 组细胞。采用 CCK-8 法检测细胞活力, Brdu 检测细胞增殖, Matrigel 侵袭实验检测细胞侵袭, TUNEL 法检测细胞凋亡; 采用 Western blotting 检测 Bcl-2、Bax、Cleaved-Caspase 9、E-cadherin 及 Vimentin 蛋白表达。**结果** 研究组患者 miR-21 mRNA 相对表达量及 FPG、HbA1c 水平较对照组高($P < 0.05$)。miR-21 组细胞 miR-21 mRNA 相对表达量高于 Control 组($P < 0.05$), miR-21 inhibitor 组细胞 mRNA 相对表达量低于 Control 组($P < 0.05$)。CCK-8 法检测结果显示, miR-21 组细胞活力较 Control 组下调($P < 0.05$), miR-21 inhibitor 组细胞活力较 Control 组上升($P < 0.05$)。miR-21 组细胞增殖能力较 Control 组减弱($P < 0.05$), miR-21 inhibitor 组细胞增殖能力较 Control 组增强($P < 0.05$)。miR-21 组细胞凋亡率较 Control 组升高($P < 0.05$), miR-21 inhibitor 组细胞凋亡率较 Control 组降低($P < 0.05$)。miR-21 组的穿膜细胞数低于 Control 组($P < 0.05$), miR-21 inhibitor 组的穿膜细胞数高于 Control 组($P < 0.05$)。相较于 Control 组, miR-21 组 E-cadherin 表达上调, Vimentin 表达下调($P < 0.05$), miR-21 inhibitor 组 E-cadherin 表达下调, Vimentin 表达上调($P < 0.05$)。相较于 Control 组, miR-21 组 Cleaved Caspase-9、Bax 蛋白相对表达量上升, Bcl-2 蛋白相对表达量下降($P < 0.05$); miR-21 inhibitor 组 Caspase-9、Bax 蛋白相对表达量下降, Bcl-2 蛋白相对表达量上升($P < 0.05$)。**结论** GDM 孕妇存在 miR-21 高表达, miR-21 可通过调节 Bcl-2/Caspase-9 介导对滋养层细胞增殖、侵袭的抑制作用, 继而促进细胞凋亡。

关键词: 妊娠糖尿病; microRNA-21; 增殖; 侵袭; 凋亡

中图分类号: R714.256

文献标识码: A

Effect of serum microRNA-21 in pregnant women with diabetes mellitus on biological behavior of trophoblast cells by regulating Bcl-2/Caspase-9*

Li Yi-sha, Ji Wen-qian, Lu Jia-nan

[Department of Obstetrics, Sanya Maternal and Child Health Hospital (Sanya Women and Children's Hospital), Sanya, Hainan 572029, China]

Abstract: Objective To investigate the changes of serum miRNA-21 expression in patients with gestational diabetes and its mechanism on the biological behavior of trophoblast cells. **Methods** From January 2019 to October 2020, 66 pregnant women with diabetes in pregnancy and 38 healthy pregnant women with similar

收稿日期: 2023-01-17

* 基金项目: 海南省自然科学基金(No: 821MS0847); 海南省临床医学中心建设项目[No: 琼卫医函(2021)75号]

gestational weeks who underwent physical examination at the same time were selected as the study subjects. The expression level of miR-21 in serum of the two groups was tested by qRT-PCR. The JAR cell lines were transfected with miRNA to construct control, miR-21NC, miR-21, miR-21 inhibitor NC, and miR-21 inhibitor group cells. Cell viability was tested by cell proliferation detection kit 8 (CCK-8), cell proliferation was tested by Brdu, cell invasion was tested by Matrigel invasion test, and cell apoptosis was tested by TUNEL. The expression levels of Bcl-2, Bax, Cleared-caspase 9, Vimentin, and E-cadherin were tested by Western blotting. **Results** The expression levels of FPG, miRNA-21, and HbA1c in the study group were higher than those in the control group ($P < 0.05$). The expression level of miR-21 in miR-21 group and miR-21 inhibitor group was higher and lower than that in control group ($P < 0.05$). CCK-8 test results showed that the cell viability of miR-21 group was lower than that of control group, and that of miR-21 inhibitor group was higher than that of control group and miR-21 group ($P < 0.05$). Compared with control group, the proliferation ability of cells in miR-21 group and miR-21 inhibitor group decreased and increased significantly ($P < 0.05$). The apoptosis rate of miR-21 group and miR-21 inhibitor group was significantly higher and lower than that of control group ($P < 0.05$). The number of penetrating cells in miR-21 group and miR-21 inhibitor group was significantly lower than that in control group ($P < 0.05$). Compared with the control group, the expression of E-cadherin and Vimentin in the miR-21 group was down and up, respectively, but the expression of E-cadherin and Vimentin in the miR-21 inhibitor group was down and up, respectively, compared with the control group and the miR-21 group ($P < 0.05$). The expression of anti-apoptotic protein Bcl-2 decreased in miRNA-21 group and increased in miR-21 inhibitor group ($P < 0.05$). Compared with the control group, the expression of Bax and Cleared caspased-9 protein in the miRNA-21 group increased, while the expression of the above proteins in the miR-21 inhibitor group decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** There is high expression of miRNA-21 in pregnant women with gestational diabetes. miRNA-21 can promote cell apoptosis by regulating the inhibitory effect of Bcl-2/Caspase-9 on trophoblast cell proliferation and invasion.

Keywords: gestational diabetes mellitus; microRNA-21; proliferation; invasion; apoptosis

妊娠糖尿病(gestational diabetes mellitus, GDM)是一种常见的妊娠期代谢综合征,孕妇在妊娠期首次发生或者出现糖代谢异常,发病率呈逐年上升趋势^[1-2]。GDM可导致孕妇出现妊娠高血压、子痫等疾病,还可能导致胎儿窘迫、胎儿畸形、死胎,以及新生儿低血钙和低血糖,严重威胁孕妇和胎儿的生命安全^[3]。目前关于GDM的发病机制尚未完全揭示,可能是遗传因素、饮食习惯、生活环境等众多因素共同作用的结果^[4]。MicroRNA(miRNA)是与信使RNA结合并调控基因转录的一种内源性小分子RNA。MicroRNA-21(miR-21)作为由RNA聚合酶II转录的第1个miRNA,被证实具有多种生物学作用,参与胰岛素分泌、脂肪细胞分化、糖酵解等一系列生物学调控过程,在心血管疾病和恶性肿瘤的发生和发展中发挥调控作用^[5]。有研究表明,糖尿病患者血清miR-21表达异常升高,但其具体作用机制还需要进一步研究^[6]。因此,本研究通过分析miR-21在GDM患者血清中的表达变化,深入探究其影响滋养层细胞的凋亡、侵袭等生物学相关行为的作用机制,旨在为GDM的发生与对应治疗提供支持。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2019年1月—2020年10月三亚市妇幼保健院66例GDM孕妇及同期本院体检且孕周相似的38例健康孕妇为研究对象。GDM孕妇纳入标准:符合GDM相关的确诊标准,即孕24~28周空腹血糖(fasting plasma glucose, FPG) ≥ 5.1 mmol/L,或者孕妇在口服75 g葡萄糖后1 h的血糖水平 ≥ 10.0 mmol/L,服糖2 h后的血糖水平 ≥ 8.5 mmol/L^[7]。排除标准:①严重的肾、心、肝功能障碍;②伴有血液、免疫、内分泌系统及认知功能方面的障碍;③伴有妊娠期冠心病、高血压等其他类型并发疾病;④多胎妊娠;⑤近3个月使用糖皮质激素或服用降血糖、降血压药物。两组孕妇孕周、年龄等一般资料比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。本研究经医院医学伦理委员会批准,所有孕妇签署知情同意书。

1.2 细胞及主要试剂

人绒毛膜癌细胞株JAR由美国菌种保藏中心提供,miR-21 NC、miR-21、miR-21 inhibitor NC、miR-21

inhibitor 均购自美国 Thermo Fisher 公司,胎牛血清购自美国 Hyclone 公司,RPMI 1640 培养基购自美国 Life Technologies 公司,Bax、Bcl-2、E-cadherin、Cleaved Caspase-9、GAPDH 和 Vimentin 等抗体购自美国 Abcam 公司,miRNA 的相应提取试剂盒购自上海泽叶公司,Matrigel 胶购自美国 Sigma-Aldrich 公司,辣根过氧化物酶 IgG 抗体购自云南沃森生物技术股份有限公司,CCK-8 kit 购自北京中科瑞泰生物科技有限公司,TUNEL 检测试剂盒购自南京建成科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 JAR 细胞培养及转染 对人绒毛癌细胞株 JAR 细胞进行复苏处理,使用含有 10% 胎牛血清 RPMI 1640 培养基进行细胞培养(培养条件为 37 °C、5% CO₂),培养细胞密度为 5 × 10⁵ 个/60 m² 培养皿,细胞增殖至 75% 时进行传代并添加 500 pmol miRNA-21 进行细胞转染,培养 24 h 后更换新培养基继续培养。Control 组:未做任何处理;miR-21 NC 组:加入 miR-21 模拟物;miR-21 组:加入 miR-21;miR-21 inhibitor NC 组:加入 miR-21 inhibitor 模拟物;miR-21 inhibitor 组:加入 miR-21 inhibitor。

1.3.2 CCK-8 法检测细胞活力 挑选处于对数生长期约 5 × 10³ 个细胞接种于 96 孔板内,将培养板置于培养箱孵育 24、48、72 h 后取出,去除培养液,用 10% PBS 冲洗完全后加入 100 μL PBS,然后向每个孔中加入约 10 μL 的 CCK-8 溶液,并将培养板继续放在培养箱内孵育 2 h。在 450 nm 双波长处用酶联免疫检测仪(型号:JC-1086A,中国聚创环保设备有限公司)检测吸光度(A)值。

1.3.3 Brdu 增殖实验检测细胞增殖 把转染后的细胞按 5 × 10⁴ 个/孔接种于 24 孔板内,培养 24 h 后,加 PBS 予以漂洗。加入浓度为 30 μg/L 的 Brdu 细胞培养基,在 37 °C 情况下予以孵育 1 h,丢弃培养液,PBS 洗涤,固定,加入 DNase(浓度为 300 μg/mL),37 °C 条件下孵育 1 h,洗涤,加入 FITC-Brdu 抗体后,37 °C 条件下孵育 30 min。PBS 洗涤,DAPI(1 μg/mL)37 °C 孵育 10 min,PBS 洗涤,最后在荧光显微镜下观察。

1.3.4 TUNEL 法检测细胞凋亡 采用 TUNEL 检测试剂盒进行检测,转染结束后将细胞按 5 × 10⁴ 个/孔接种于 24 孔板内,培养 24 h,PBS 漂洗。用 4% 多聚甲醛固定,20 μg/mL 蛋白酶 K 在室温下孵育

15 min,依据试剂盒说明书检测细胞凋亡情况,并在荧光显微镜下观察。

1.3.5 细胞侵袭实验 用在 -20 °C 预冷 30 min 的移液枪头吸取浓度 25 μg/mL,且体积 50 μL 的 Matrigel,均匀加入 Transwell 小室,震荡均匀后将其置于 37 °C 孵育 1 h。然后按 1 × 10⁵ 个细胞/孔将细胞接种于 Transwell 小室中,加入无血清培养基 150 μL,并在外层孔板中加入含 20% FBS 的培养基 600 μL 培养 48 h。将小室取出并利用酒精擦去 Matrigel 胶上没有迁移出去的细胞,PBS 完全清洗后用 4% 多聚甲醛固定 15 min,0.1% 结晶紫染色 15 min,在显微镜下(×200)观察并计算侵袭细胞数量。

1.3.6 实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测 miRNA-21 表达 取患者空腹静脉血 5 mL,3 000 r/min 离心 10 min(离心半径 10 cm),分离血清,置于 -80 °C 冰箱。用 TRIzol 溶液抽提患者血清或者 JAR 细胞总 RNA,采用茎环法将 RNA 逆转录为 cDNA,对逆转录产物进行 qRT-PCR 反应,以 U6 为内参基因,按照检测试剂盒说明书建立 PCR 反应体系,qRT-PCR 反应体系:1.6 μL Uni-miRq PCR Primer(5 μmol/L),10 μL SYBR PremixExTaq II(2 ×),0.8 μL PCR Forward Primer(10 μmol/L),2 μL 模板(cDNA)。qRT-PCR 反应条件:95 °C 预变性 30 s,94 °C 变性 5 s,60 °C 退火 30 s,65 °C 延伸 30 s,共 45 个循环。绘制 PCR 产物的熔解曲线,miR-21 正向引物:5'-CTGTAACGATACGCTAC-3',反向引物:5'-GTAATCCAGGATAGGCTG-3',引物长度 131 bp;U6 正向引物:5'-CTCTTGCCGGCAGTATACACACT-3',反向引物:5'-ACGTCCTACGAACGTGTTTGTG-3',引物长度 125 bp。根据 Ct 值计算相对表达量,以 2^{-ΔΔCt} 表示,ΔΔCt=(Ct_{目的基因}-Ct_{内参})-(Ct_{对照目的基因}-Ct_{对照内参})。

1.3.7 Western blotting 检测 Bcl-2、Cleaved Caspase-9、Bax 蛋白表达 各组细胞经 PBS 冲洗 3 次,加入 RIPA Lysis Buffer 提取细胞总蛋白,将待测蛋白液上样到 SDS-PAGE(10%)凝胶电泳中,电泳分离后转移至 PVDF 膜,5% 脱脂牛奶封闭,取膜,清洗,抗 Bcl-2、Cleaved Caspase-9、Bax 一抗孵育和辣根过氧化物酶标记的二抗孵育,室温孵育 1 h 后,TBST 洗涤 3 次,最后滴加 ECL 发光液曝光显影,检测蛋白条带,以 GAPDH 为内参,采用 Image J 软件进行条带灰度数据分析,计算 Bcl-2、Cleaved Caspase-9、Bax 蛋

白相对表达量。

1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 20.0 统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较用 t 检验或方差分析, 进一步两两比较用 LSD- t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 研究组与对照组一般资料比较

研究组与对照组年龄、孕周、收缩压和舒张压比较, 经 t 检验, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 两组研究对象一般资料比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	年龄/ 岁	孕周	收缩压/ mmHg	舒张压/ mmHg
研究组	66	26.58 \pm 3.35	28.45 \pm 2.03	125.26 \pm 10.25	79.56 \pm 5.15
对照组	38	25.65 \pm 3.41	28.78 \pm 2.16	126.47 \pm 10.63	80.29 \pm 5.24
<i>t</i> 值		1.354	1.123	0.572	0.692
<i>P</i> 值		0.179	0.274	0.569	0.491

2.2 研究组与对照组 miR-21 mRNA 相对表达量及 FBG、HbA1c 水平比较

研究组与对照组 miRNA-21 mRNA 相对表达量及 FPG、HbA1c 水平比较, 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 研究组 miR-21 mRNA 相对表达量及 FPG、HbA1c 水平较对照组高。见表 2。

表 2 两组 miR-21 mRNA 相对表达量及 FPG、HbA1c 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	miR-21 mRNA	FPG/(mmol/L)	HbA1c/%
研究组	66	4.13 \pm 0.76	5.56 \pm 0.48	5.26 \pm 0.57
对照组	38	0.89 \pm 0.35	4.39 \pm 0.39	4.68 \pm 0.42
<i>t</i> 值		29.608	12.784	5.471
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000

2.3 miR-21 对各组细胞活力的影响

Control 组、miR-21 NC 组、miR-21 组、miR-21 inhibitor NC 组、miR-21 inhibitor 组细胞 miR-21 mRNA 相对表达量和 OD 值比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与 Control 组比较, miR-21 组 miR-21 mRNA 相对表达量升高, OD 值下降 ($P < 0.05$), miR-21 inhibitor 组 miR-21 mRNA 相对表达量

降低, OD 值升高 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 各组细胞 miR-21 mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	miR-21 mRNA	OD 值
Control 组	1.02 \pm 0.07	1.00 \pm 0.05
miR-21 NC 组	1.01 \pm 0.06	1.01 \pm 0.05
miR-21 inhibitor NC 组	0.99 \pm 0.05	0.98 \pm 0.06
miR-21 组	5.23 \pm 1.20 [†]	0.42 \pm 0.10 [†]
miR-21 inhibitor 组	0.26 \pm 0.08 [†]	1.73 \pm 0.22 [†]
<i>F</i> 值	23.265	27.614
<i>P</i> 值	0.000	0.000

注: [†]与 Control 组比较, $P < 0.05$ 。

2.4 过表达 miRNA-21 对细胞增殖的影响

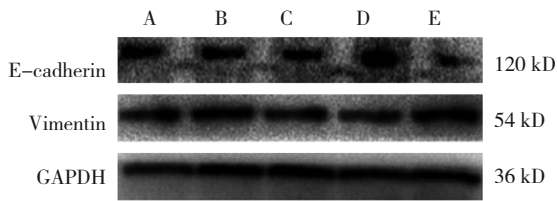
BrdU 增殖实验结果表明, 各组细胞增殖能力: Control 组 (18.28 \pm 3.21)%, miR-21 NC 组 (18.67 \pm 3.55)%, miR-21 组 (5.41 \pm 1.33)%, miR-21 inhibitor NC 组 (19.12 \pm 3.86)%, miR-21 inhibitor 组 (36.36 \pm 5.38)%, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 51.286, P = 0.000$)。与 Control 组比较, miR-21 组细胞增殖能力减弱 ($P < 0.05$), miR-21 inhibitor 组细胞增殖能力增强 ($P < 0.05$)。

2.5 过表达 miRNA-21 对细胞凋亡的影响

细胞凋亡实验结果表明, 各组细胞凋亡率: Control 组 (12.48 \pm 2.93)%, miR-21 NC 组 (13.12 \pm 3.36)%, miR-21 组 (32.54 \pm 6.21)%, miR-21 inhibitor NC 组 (12.76 \pm 3.05)%, miR-21 inhibitor 组 (4.73 \pm 0.89)%, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 64.027, P = 0.000$)。与 Control 组比较, miR-21 组细胞凋亡率上升 ($P < 0.05$), miR-21 inhibitor 组细胞凋亡率下降 ($P < 0.05$)。

2.6 过表达 miRNA-21 对细胞侵袭能力的影响

侵袭实验结果表明, Control 组、miR-21 NC 组、miR-21 组、miR-21 inhibitor NC 组、miR-21 inhibitor 组的穿膜细胞数、E-cadherin、Vimentin 相对表达量比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与 Control 组比较, miR-21 组穿膜细胞数减少, Vimentin 相对表达量下降, E-cadherin 相对表达量上升 ($P < 0.05$); miR-21 inhibitor 组穿膜细胞数增加, Vimentin 相对表达量上升, E-cadherin 相对表达量下降 ($P < 0.05$)。见图 1 和表 4。



A: Control 组; B: miR-21 NC 组; C: miR-21 inhibitor NC 组; D: miR-21 组; E: miR-21 inhibitor 组。

图 1 各组 E-cadherin、Vimentin 蛋白的表达

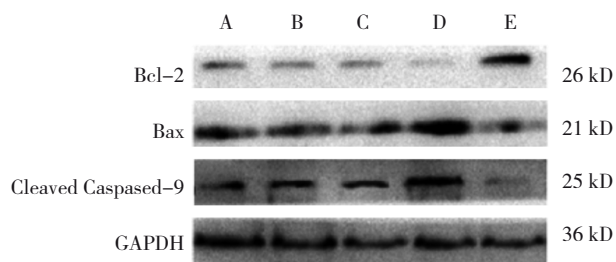
表 4 各组穿膜细胞数及 E-cadherin、Vimentin 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	穿膜细胞数/ (个/HP)	E-cadherin 蛋白	Vimentin 蛋白
Control 组	1.02 ± 0.31	0.47 ± 0.09	0.42 ± 0.13
miR-21 NC 组	1.01 ± 0.28	0.45 ± 0.10	0.43 ± 0.13
miR-21 inhibitor NC 组	0.99 ± 0.30	0.48 ± 0.11	0.40 ± 0.15
miR-21 组	0.53 ± 0.11 [†]	1.23 ± 0.37 [†]	0.21 ± 0.05 [†]
miR-21 inhibitor 组	1.77 ± 0.52 [†]	0.24 ± 0.06 [†]	0.78 ± 0.17 [†]
F 值	20.173	17.315	15.147
P 值	0.000	0.000	0.000

注: †与 Control 组比较, $P < 0.05$ 。

2.7 过表达 miR-26a 调节凋亡相关蛋白表达

Western blotting 检测结果显示, 各组细胞 Bcl-2、Cleaved Caspased-9、Bax 蛋白相对表达量比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与 Control 组比较, miR-21 组 Cleaved Caspased-9、Bax 蛋白相对表达量上升, Bcl-2 蛋白相对表达量下降 ($P < 0.05$); miR-21 inhibitor 组 Caspased-9、Bax 蛋白相对表达量下降, Bcl-2 相对表达量上升 ($P < 0.05$)。见图 2 和表 5。



A: Control 组; B: miR-21 NC 组; C: miR-21 inhibitor NC 组; D: miR-21 组; E: miR-21 inhibitor 组。

图 2 各组 Bcl-2、Bax、Cleaved Caspased-9 蛋白的表达

表 5 各组 Bcl-2、Cleaved Caspased-9、Bax 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Bcl-2 蛋白	Cleaved Caspased-9 蛋白	Bax 蛋白
Control 组	1.03 ± 0.11	1.01 ± 0.13	1.02 ± 0.09
miR-21 NC 组	1.01 ± 0.28	0.45 ± 0.10	0.43 ± 0.13
miR-21 inhibitor NC 组	0.99 ± 0.30	0.48 ± 0.11	0.40 ± 0.15
miR-21 组	0.51 ± 0.08 [†]	5.12 ± 1.23 [†]	3.52 ± 0.48 [†]
miR-21 inhibitor 组	12.79 ± 3.15 [†]	0.51 ± 0.08 [†]	0.43 ± 0.10 [†]
F 值	148.614	43.017	20.104
P 值	0.000	0.000	0.000

注: †与 Control 组比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

随着分子生物学及基因组学研究的深入, 糖尿病治疗也发生了较大变化, 其中靶向治疗已成为近年来临床研究的热点。越来越多研究发现 miRNA 的异常表达与 GDM 的发生、发展密切相关, 其通过 3'UTR 区域特异性地结合目的靶基因, 从而让目的 mRNA 沉默或者是降解, 抑制蛋白的表达, 参与调控滋养层细胞的生长、增殖、分化、侵袭和迁移等生物学过程, 具有成为靶向治疗靶点的潜能^[8-9]。有研究表明^[10-12], miR-21 的差异表达与妊娠期高血压疾病的发生存在相关性, 还能调节成骨细胞、滋养层细胞等细胞分化、增殖与凋亡, 参与调控细胞的生物学行为。本研究结果显示, 研究组患者 miR-21 处于高表达状态, 表明提示 GDM 与血清 miR-21 水平存在相关性。

妊娠早期滋养层细胞主要分化为游离绒毛、固定绒毛, 其中前者主要控制母体与子代间的气体与营养物质的交换, 而后者则利用不断的增生、侵袭子宫内膜的基底层, 并分化呈间质滋养细胞, 从而达到浸润肌层、蜕膜及血管的效果。妊娠期的滋养细胞迁移、增殖、浸润等相关的生物学行为受损会造成胎盘血管网络出现不良的生长发育, 是引起 GDM 的重要因素^[13]。本研究结果显示, 滋养层细胞转染 miR-21 后, 滋养层细胞的侵袭、增殖能力降低, 而抑制了滋养层细胞 miR-21 的表达后, 其侵袭、增殖能力增强, 表明 miR-21 是滋养层细胞生物学行为的负性调节因子, 可抑制细胞

的侵袭、增殖。另外，上皮细胞间质转化可反映细胞转移和侵袭能力，其中 E-cadherin、Vimentin 是重要的细胞黏附分子，调节细胞侵袭和增殖，还参与胚胎的着床和转移等生理过程^[14]。本研究也发现，miR-21 组的 E-cadherin 低表达，而 Vimentin 高表达，表明抑制 miR-21 表达可下调 E-cadherin 表达，促进 Vimentin 表达，从而对滋养层细胞上皮间质转化、增殖和侵袭发挥调控作用。

miRNA 是用于对基因表达产生调节作用的一类单链非编码 RNA，在各类细胞生物过程中均能够发挥相应的作用，例如细胞的分化、增殖和凋亡等过程。目前相关的研究发现^[15-16]，miR-21 具有多种生物学作用，如诱导肠上皮屏障功能损伤及加速炎症的出现，使胰岛 β 细胞中的凋亡因子 Bcl-2 表达降低，进而加速细胞凋亡等。细胞凋亡是一种生物体内具有高度保守性质的死亡过程，可以对生长发育产生自主调节作用，并确保人体环境的稳定，一般正常细胞异常凋亡或者凋亡受阻则机体稳态和平衡被破坏，导致病变，以及疾病的发生。有研究表明^[17]，GDM 孕妇胎盘组织绒毛的外滋养细胞凋亡率 >15%。而健康孕妇仅存在极少数的滋养细胞凋亡，因此可通过评估 miR-21 对滋养细胞凋亡的影响，从而反映 miR-21 与疾病的关系。本研究发现，miR-21 组凋亡率高于 control 组，而 miR-21 inhibitor 组凋亡率低于 Control 组，表明下调滋养层细胞 miR-21 表达可抑制细胞凋亡。Caspase、Bcl-2 均是细胞凋亡过程的关键因子，其中线粒体途径上游 Caspase-9 的激活与凋亡酶的激活因子关系密切^[18]。线粒体内存在脱氧腺苷三磷酸与细胞色素 c 时，凋亡蛋白酶 9 前原蛋白可以结合 Apaf-1 凋亡蛋白酶聚集片段，从而激活 Caspase-9，启动凋亡。Bcl-2 可以阻断 pro-Caspase-9 与 Apaf-1，抑制 Caspase-9 活化，下调细胞凋亡。同时，本研究观察到，miR-21 组细胞抗凋亡蛋白 Bcl-2 相对表达量降低，Cleaved Caspase-9、Bax 蛋白相对表达量升高，而 miR-21 inhibitor 组细胞凋亡相关蛋白的表达正好相反，进一步证实下调 miR-21 表达可抑制促凋亡蛋白的表达，诱导抗凋亡蛋白的表达，从而抑制细胞凋亡，即过表达 miR-21 通过抑制 Bcl-2 表达，激活 Caspase-9，进而促进细胞凋亡。

综上所述，GDM 孕妇 miRNA-21 存在高表达，miRNA-21 可通过调节 Bcl-2/Caspase-9 介导对滋养层细胞增殖、侵袭的抑制作用，继而促进细胞凋亡。

参 考 文 献：

- [1] JOHNS E C, DENISON F C, NORMAN J E, et al. Gestational diabetes mellitus: mechanisms, treatment, and complications[J]. Trends Endocrinol Metab, 2018, 29(11): 743-754.
- [2] SWEETING A, WONG J, MURPHY H R, et al. A clinical update on gestational diabetes mellitus[J]. Endocr Rev, 2022, 43(5): 763-793.
- [3] MOON J H, JANG H C. Gestational diabetes mellitus: diagnostic approaches and maternal-offspring complications[J]. Diabetes Metab J, 2022, 46(1): 3-14.
- [4] VINCE K, PERKOVIĆ P, MATIJEVIĆ R. What is known and what remains unresolved regarding gestational diabetes mellitus (GDM)[J]. J Perinat Med, 2020, 48(8): 757-763.
- [5] EL-SAYED N S, ELATREBI S, SAID R, et al. Potential mechanisms underlying the association between type II diabetes mellitus and cognitive dysfunction in rats: a link between miRNA-21 and Resveratrol's neuroprotective action[J]. Metab Brain Dis, 2022, 37(7): 2375-2388.
- [6] GUAN C Y, TIAN S, CAO J L, et al. Down-regulated miR-21 in gestational diabetes mellitus placenta induces PPAR- α to inhibit cell proliferation and infiltration[J]. Diabetes Metab Syndr Obes, 2020, 13: 3009-3034.
- [7] HADAR E, OATS J, HOD M. Towards new diagnostic criteria for diagnosing GDM: the HAPO study[J]. J Perinat Med, 2009, 37(5): 447-449.
- [8] HILL M, TRAN N. Global miRNA to miRNA interactions: impacts for miR-21[J]. Trends Cell Biol, 2021, 31(1): 3-5.
- [9] 褚翔鹏, 万人安, 王鹏, 等. MicroRNA-133b 调节 FGFR1-ERK1/2-SOX2 信号通路对裸鼠肺癌 NCI-H1975 细胞移植瘤生长的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2023, 33(3): 48-56.
- [10] 朱丽君, 方正美, 黄孟云, 等. 外周血 miR-21 水平与高血压相关性的 Meta 分析[J]. 海南医学院学报, 2021, 27(1): 46-51.
- [11] 冯罡, 李军, 王晓丽, 等. 糖尿病肾病患者血清 microRNA-21 含量及其与氧化应激指标的相关性[J]. 中国现代医学杂志, 2017, 27(1): 60-63.
- [12] 杨坤, 胡晓晨. 微小 RNA-21 在心脏疾病中的研究进展[J]. 浙江大学学报(医学版), 2019, 48(2): 214-218.
- [13] 吕晓辉, 李君, 董黔. MicroRNA-136 在妊娠糖尿病患者血清中的表达及其对高糖诱导的滋养层细胞增殖和侵袭的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2021, 37(18): 2419-2422.
- [14] GOYAL N, SINGH M, SAGAR N, et al. Association of E-cadherin & vimentin expression with clinicopathological parameters in lingual squamous cell carcinomas & their role in incomplete epithelial mesenchymal transition[J]. Indian J Med Res, 2021, 153(4): 484-491.

- [15] YAN H L, HUANG W X, RAO J, et al. *miR-21* regulates ischemic neuronal injury via the p53/Bcl-2/Bax signaling pathway[J]. *Aging (Albany NY)*, 2021, 13(18): 22242-22255.
- [16] LIU E P, LV L, ZHAN Y H, et al. METTL3/N6-methyladenosine/ miR-21-5p promotes obstructive renal fibrosis by regulating inflammation through SPRY1/ERK/NF- κ B pathway activation[J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(16): 7660-7674.
- [17] 刘莎莎, 赵云, 孙国强, 等. 妊娠期糖尿病患者胎盘组织中 Apelin 和 APJ 的表达及其对滋养层细胞胰岛素抵抗和行为的影响[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2022, 48(5): 1314-1323.
- [18] SURaweera C D, BANJARA S, HINDS M G, et al.

Metazoans and intrinsic apoptosis: an evolutionary analysis of the Bcl-2 family[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(7): 3691.

(张西倩 编辑)

本文引用格式: 李奕莎, 吉文倩, 卢佳南. 妊娠糖尿病患者血清 microRNA-21 调节 Bcl-2/Caspase-9 对滋养层细胞生物学行为的影响[J]. *中国现代医学杂志*, 2023, 33(11): 7-13.

Cite this article as: LI Y S, JI W Q, LU J N. Effect of serum microRNA-21 in pregnant women with diabetes mellitus on biological behavior of trophoblast cells by regulating Bcl-2/Caspase-9[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2023, 33(11): 7-13.