

·基础研究·

## miR-130b-5p 下调胰岛素样生长因子-1 抑制人绒毛膜滋养层细胞迁移及侵袭的作用及机制

相 萌<sup>1</sup>, 张旭东<sup>2</sup>

(1. 西安医学院临床医学院妇产科教研室, 陕西 西安 710021; 2. 西安医学院临床医学院拉吉姆实验室, 陕西 西安 710021)

**摘 要:**【目的】探究微小RNA 130b-5p(miR-130b-5p)靶向胰岛素样生长因子-1(*IGF-1*)对人绒毛膜滋养层细胞(HTR8/SVneo)迁移及侵袭的影响。【方法】将HTR8/SVneo细胞分为对照组、miR-NC组、miR-130b-5p mimics组、miR-130b-5p mimics+pcDNA3.1组和miR-130b-5p mimics+pcDNA3.1-IGF-1组,双荧光素酶报告基因检测miR-130b-5p和IGF-1的靶向关系;采用实时荧光定量PCR检测HTR8/SVneo细胞样本中miR-130b-5p及*IGF-1*表达水平;采用CCK-8法检测HTR8/SVneo细胞增殖情况;采用全息细胞仪及Transwell法分析HTR8/SVneo细胞迁移、侵袭能力;Western blot法检测HTR8/SVneo细胞样本中IGF-1及侵袭、上皮间充质转化(EMT)蛋白表达情况。【结果】双荧光素酶报告基因结果显示,*IGF-1*是miR-130b-5p的潜在靶基因;相较于miR-NC组,miR-130b-5p mimics组中miR-130b-5p表达水平、细胞增殖抑制率、钙粘附蛋白E(E-cadherin)表达水平显著增加,IGF-1、c-Myc、细胞周期蛋白D1(CyclinD1)表达水平、迁移距离、侵袭细胞数、基质金属蛋白酶9(MMP9)、基质金属蛋白酶2(MMP2)、神经型钙粘附蛋白(N-cadherin)和波形蛋白(Vimentin)表达水平显著降低( $P<0.05$ );相较于miR-130b-5p mimics+pcDNA3.1组,miR-130b-5p mimics+pcDNA3.1-IGF-1组中细胞增殖抑制率、E-cadherin表达水平显著降低,c-Myc、CyclinD1表达水平、迁移距离、侵袭细胞数、MMP9、MMP2、Vimentin和N-cadherin表达水平显著增加( $P<0.05$ )。【结论】miR-130b-5p过表达可能通过抑制*IGF-1*表达来抑制HTR8/SVneo细胞的迁移和侵袭。

**关键词:**人绒毛膜滋养层细胞;胰岛素样生长因子-1;微小RNA 130b-5p;迁移;侵袭

中图分类号:R714.25 文献标志码:A 文章编号:1672-3554(2022)04-0539-09

DOI:10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).2022.0404

### The Role and Mechanism of MiR-130b-5p in Down-regulating IGF-1 and Inhibiting the Migration and Invasion of Human Chorionic Trophoblast Cells

XIANG Meng<sup>1</sup>, ZHANG Xu-dong<sup>2</sup>

(1. Department of Obstetrics and Gynecology, Clinical College, Xi'an Medical University, Xi'an 710021, China;

2. Laboratory of Clinical Medicine, Xi'an Medical University, Xi'an 710021, China)

Correspondence to: XIANG Meng; E-mail: xjtuxm@126.com

**Abstract:**【Objective】To explore the effects of microRNA 130b-5p (miR-130b-5p) on the migration and invasion of human chorionic trophoblast cells (HTR8/SVneo) by targeting insulin-like growth factor-1 (*IGF-1*).【Methods】HTR8/SVneo cells were divided into control group, miR-NC group, miR-130b-5p mimics group, miR-130b-5p mimics+pcDNA3.1 group and miR-130b-5p mimics+pcDNA3.1-IGF-1 group. The dual luciferase reporter gene was used to detect the targeting relationship between miR-130b-5p and *IGF-1*; real-time fluorescent quantitative PCR was used to detect the ex-

收稿日期:2022-02-18

基金项目:陕西省自然科学基金研究计划(2022JQ-804)

作者简介:相萌,通信作者,医学博士,讲师,主治医师,研究方向:妇产科学基础及临床研究,E-mail:xjtuxm@126.com

pression level of miR-130b-5p and *IGF-1* in HTR8/SVneo cell samples; the CCK-8 method was used to detect the proliferation of HTR8/SVneo cells; holographic cytometer and Transwell method was used to analyze the migration and invasion abilities of HTR8/SVneo cells; Western blot method was used to detect the expression of *IGF-1*, invasion, and epithelial-mesenchymal transition (EMT) proteins in HTR8/SVneo cell samples.【Results】The results of the dual luciferase reporter gene showed that *IGF-1* was a potential target gene of miR-130b-5p; compared with the miR-NC group, the expression level of miR-130b-5p, the cell proliferation inhibition rate, and the expression level of E-cadherin increased significantly in the miR-130b-5p mimics group. The expression levels of *IGF-1*, c-Myc, Cyclin D1, migration distance, number of invaded cells, the expression levels of matrix metalloproteinase 9 (MMP9), matrix metalloproteinase 2 (MMP2), neural cadherin (N-cadherin) and Vimentin were significantly reduced ( $P<0.05$ ); compared with the miR-130b-5p mimics+pcDNA3.1 group, the cell proliferation inhibition rate and the expression level of E-cadherin in the miR-130b-5p mimics+pcDNA3.1-*IGF-1* group were significantly reduced, while the expression levels of c-Myc and CyclinD1, migration distance, number of invasive cells, the expression levels of MMP9, MMP2, Vimentin and N-cadherin were significantly increased ( $P<0.05$ ).【Conclusion】The overexpression of miR-130b-5p may inhibit the migration and invasion of HTR8/SVneo cells by inhibiting the expression of *IGF-1*.

**Key words:** human chorionic trophoblast cells; insulin-like growth factor-1; microRNA 130b-5p; migration; invasion

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2022, 43(4): 539-547]

胎儿生长受限(fetal growth restriction, FGR)是最常见的产前疾病之一,可造成早产及成年期神经障碍及慢性疾病发生率增加,怀孕初期子宫螺旋动脉重构不足是造成其发生的主要原因,而人绒毛膜滋养层细胞侵袭功能异常可导致子宫螺旋动脉重构障碍的发生,因此了解人绒毛膜滋养层细胞的侵袭、迁移机制,对胎儿的生长发育及健康十分重要<sup>[1-3]</sup>。微小RNA(miRNA)作为转录后调节剂,可与其靶基因 mRNA 3'-非翻译区(3'-UTR)特异性结合,以此抑制其翻译,从而参与 FGR、先兆子痫、流产、妊娠期糖尿病等妊娠疾病的发生<sup>[4]</sup>。妊娠期糖尿病可导致 FGR 的发生,而在妊娠期糖尿病患者胎盘滋养细胞系中 miR-130b 表达水平异常增加,除此之外 miR-130b-5p 与多种细胞的侵袭、迁移能力有关<sup>[5-6]</sup>。胰岛素样生长因子-1(insulin-like growth factor-1, IGF-1)主要分泌于胎盘中,其作为子宫内生长调节剂,在 FGR 发生时其循环浓度异常降低<sup>[7]</sup>。研究发现在胶质母细胞瘤中 miR-130b 与 *IGF-1* 表达水平呈负相关关系<sup>[8]</sup>。目前,关于 miR-130b-5p 是否可通过调控 *IGF-1* 来影响人绒毛膜滋养层细胞(HTR-8/SVneo)迁移及侵袭还未可知,因此本研究通过对其探究,以期 FGR 的治疗提供新的靶点。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂和仪器

HTR8/SVneo 细胞(南京赛泓瑞生物科技有限公司,货号:SHC1187);Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent 转染试剂盒(杭州沃森生物技术有限公司,货号:11668019);青链霉素、DMEM 基础培养基、胎牛血清、胰酶溶液(上海中乔新舟生物科技有限公司,货号:0503、ZQ-100、0025、0103);蛋白提取试剂盒(武汉纯度生物科技有限公司,货号:CD-13559-ML);HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗抗体(艾美捷科技有限公司,货号:AAT-16793);BCA 蛋白检测试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,货号:PC0020);兔抗  $\beta$ -actin、波形蛋白(Vimentin)、c-Myc、神经型钙粘附蛋白(N-cadherin)抗体(Cell Signaling Technology, 货号:4967、5741、5605、13116);细胞周期蛋白 D1(CyclinD1)(Biorbyt, 货号:orb77046);兔抗基质金属蛋白酶 9(matrix metalloproteinase 9, MMP9)、基质金属蛋白酶 2(matrix metalloproteinase 2, MMP2)、钙粘附蛋白 E(E-cadherin)抗体(Proteintech, 货号:20874-1-AP、10375-2-AP、10373-2-AP);pcDNA3.1、pcDNA3.1-*IGF-1*、miR-130b-5p mimics、miR-NC 由赛默飞世尔科技合成;CCK-8 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒

(贝博-Bestbio,货号:BB-4202)。

CFX384™ Touch 荧光定量PCR系统购自伯乐(Bio-Rad)公司;M4激光全息细胞成像及分析系统购自瑞典Phiab公司;Invitrogen凝胶成像系统购自赛默飞。

## 1.2 实验方法

1.2.1 HTR8/SVneo 细胞培养 将已复苏的HTR8/SVneo细胞接种于含1%青链霉素及10 g/L胎牛血清的DMEM培养基后,在体积分数5% CO<sub>2</sub>、37 °C培养箱中培养到细胞融合至约80%时经2.5 g/L胰酶消化、传代培养。

1.2.2 双荧光素酶报告基因检测 miR-130b-5p 和 IGF-1 的靶向关系 TargetScan 网址确定 miR-130b-5p 和 IGF-1 的结合位点并对二者间的靶向关系进行验证。将与 miR-130b-5p 靶向序列相结合的 IGF-1 3' -UTR 片段经扩增、酶切后进行连接,构建野生型 pmirGLO-IGF-1-wt,再通过基因突变技术对结合位点进行突变,构建突变型 pmirGLO-IGF-1-mut 载体;根据转染试剂盒说明书将 pmirGLO-IGF-1-wt 及 pmirGLO-IGF-1-mut 分别与 miR-130b-5p mimics 和 miR-NC 进行共转染,分为 pmirGLO-IGF-1-wt+ miR-130b-5p mimics 组、pmirGLO-IGF-1-wt+miR-NC 组、pmirGLO-

1-mut+miR-130b-5p mimics 组、pmirGLO-IGF-1-mut+miR-NC 组,于48 h后添加报告基因细胞裂解液(200 μL)及荧光素酶反应液(50 μL)检测荧光强度 A,之后添加反应终止液检测荧光强度 B, A/B 即为荧光素酶相对活性。

1.2.3 分组及 HTR8/SVneo 细胞转染 设置对照组、miR-NC 组、miR-130b-5p mimics 组、miR-130b-5p mimics+pcDNA3.1 组和 miR-130b-5p mimics+pcDNA3.1-IGF-1 组;将 HTR8/SVneo 细胞(1 mL)以 2×10<sup>6</sup> 个/孔的密度接种到6孔板中(设置5个复孔)培养至贴壁后,按照 Lipofectamine™ 2000 说明书进行操作,以 5 nmol/L 为终浓度分别将 miR-NC、miR-130b-5p mimics、pcDNA3.1、pcDNA3.1-IGF-1 转至相应的 HTR8/SVneo 细胞中后培养 48 h,检测 miR-130b-5p 表达水平。

1.2.4 qRT-PCR 检测 HTR8/SVneo 细胞样本中 miR-130b-5p 及 IGF-1 表达水平 将各组转染后的 HTR8/SVneo 细胞根据 Trizol 法提取细胞中总 RNA 并检测其浓度,取所得 RNA 反转录为 cDNA 后进行 qRT-PCR 扩增(5个复孔);引物由 Oligo 7 软件设计(表1),上海生工合成,以 U6 和 GAPDH 为内参分别对 miR-130b-5p 及 IGF-1 进行标准化,2<sup>-ΔΔCt</sup> 计算基因表达水平。

表1 qRT-PCR 引物  
Table 1 qRT-PCR primers

Gene	Upstream primer(5'-3')	Downstream primer(5'-3')
miR-130b-5p	CCC GCCAGT GCAATGATGAA	GTG CAGGGTCCGAGGT
U6	CTC GCTTCGGCAGCACA	AAC GCTTCACGAATTTGCGT
GAPDH	GAAGGTGAAGGTCCGAGTC	GAAGATGGTGATGGGATTTC
IGF-1	GTCTGATAA TCTTGTTAGTCTATA	CACAG ATGGAATCTTGTG

1.2.5 CCK-8 法检测 HTR8/SVneo 细胞增殖情况 将转染后的 HTR8/SVneo 细胞以 1×10<sup>4</sup> 个/孔的密度接种于 96 孔板中(重复 5 孔),培养 24 h 后添加 CCK-8(10 μL/孔)培养 2 h 后在酶标仪 450 nm 处测定 OD 值,计算 HTR8/SVneo 细胞增殖抑制率(%) = [(对照组 OD 值 - 实验组 OD 值)/(对照组 OD 值 - 空白组 OD 值)] × 100%。

1.2.6 全息细胞仪分析 HTR8/SVneo 细胞迁移能力 将转染后的 HTR8/SVneo 细胞以 2×10<sup>5</sup> 个/孔的密度接种于 6 孔板中培养 24 h 后,通过激光全

息细胞分析及成像系统监测细胞在 24 h 内的迁移情况。

1.2.7 Transwell 法检测 HTR8/SVneo 细胞侵袭能力 用无血清培养基以 1:8 的比例稀释 Matrigel 后加入到 Transwell 小室上室 4 h 孵育,将各组 200 μL HTR8/SVneo 细胞悬液以 1×10<sup>5</sup> 个/mL 接种到上室后在下室加入 600 μL DMEM 培养基培养 12 h, PBS 清洗后用棉签擦拭上室 HTR8/SVneo 细胞,10 min 甲醇固定后 30 min 结晶紫染色,选取 5 个视野进行观察,对穿膜细胞进行计数。

1.2.8 Western blot 检测 HTR8/SVneo 细胞中的蛋白表达情况 添加 400  $\mu$ L RIPA 蛋白裂解液裂解 HTR8/SVneo 细胞后 12 000 r/min ( $r=10$  cm) 10 min 离心取上清, BCA 法定量分析总蛋白; 将 40  $\mu$ g 蛋白样品通过 SDS-PAGE 凝胶电泳 (40  $\mu$ g/孔) 进行分离后在低温条件下将蛋白转移至 PVDF 膜上, 1 h 脱脂奶粉封闭后加入兔抗 MMP9、MMP2、c-Myc、CyclinD1、E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、 $\beta$ -actin、IGF-1 抗体 (1:1 000) 一抗孵育 (4  $^{\circ}$ C) 过夜, 用 Tris-HCl 缓冲盐溶液加 Tween (Tris Buffered saline Tween, TBST) 进行洗膜后添加 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗 (1:10 000) 进行孵育 2 h, TBST 洗膜、化学发光试剂 (ECL Reagent) 显色, 蛋白凝胶成像仪显影观察后 Image J 软件检测条带灰度值,  $\beta$ -actin 为内参, 计算蛋白含量 (重复 5 孔)。

### 1.3 统计学方法

计量资料满足正态分布及方差齐性并使用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 对其进行描述, 柱状图采用 Origin 软件进行制作, 通过 SPSS 20.0 统计学软件进行数据分析, 使用  $t$  检验进行两组间比较, 单因素方差分析进行多组间比较, snk-q 检验进行多组间进一步两两比较,  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 miR-130b-5p 和 IGF-1 在 HTR8/SVneo 细胞中的靶向关系验证

TargetScan 在线网址预测结果显示: miR-130b-5p 和 IGF-1 二者间具有靶向结合位点 (图 1); 如图 2 所示, 荧光素酶报告基因实验结果显示:

与 pmirGLO-IGF-1-wt+miR-NC 组相比, pmirGLO-IGF-1-wt+miR-130b-5p mimics 组荧光素酶活性显著降低 ( $t=6.040, P < 0.001$ ); 其余两组荧光素酶活性无显著变化 ( $t=0.243, P > 0.05$ )。

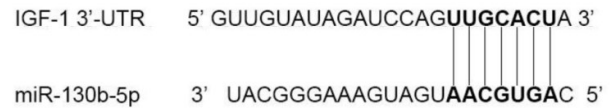
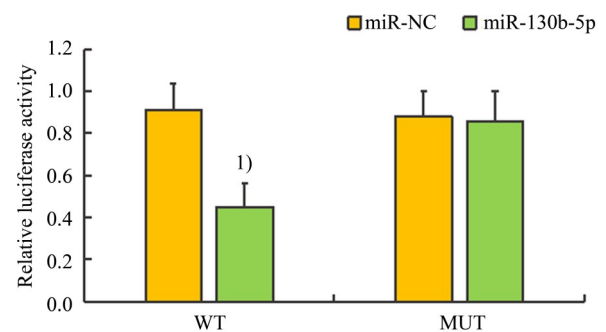


图 1 miR-130b-5p 和 IGF-1 间的具有靶向结合位点  
Fig. 1 Targeted binding site between miR-130b-5p and IGF-1



Compared with pmirGLO-IGF-1-wt+miR-NC group, <sup>1)</sup> $P < 0.05$ .

图 2 荧光素酶活性检测

Fig. 2 Luciferase activity assay

### 2.2 miR-130b-5p 及 IGF-1 表达水平检测

如表 2 所示, 相较于对照组, HTR8/SVneo 细胞中 miR-130b-5p、IGF-1 蛋白及 mRNA 表达水平在 miR-NC 组中的差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 相较于 miR-NC 组, miR-130b-5p mimics 组中 miR-130b-5p 表达水平显著增加, IGF-1 蛋白及 mRNA 表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ ; 表 2, 图 3)。

表 2 miR-130b-5p 及 IGF-1 表达水平检测

Table 2 Detection of expression levels of miR-130b-5p and IGF-1

( $n=5, \bar{x} \pm s$ )

Groups	miR-130b-5p	IGF-1 mRNA	IGF-1/ $\beta$ -actin
Control	1.01 $\pm$ 0.14	1.00 $\pm$ 0.10	1.32 $\pm$ 0.25
miR-NC	0.99 $\pm$ 0.15	1.01 $\pm$ 0.08	1.31 $\pm$ 0.23
miR-130b-5p mimics	1.53 $\pm$ 0.20 <sup>1)</sup>	0.58 $\pm$ 0.06 <sup>1)</sup>	0.74 $\pm$ 0.16 <sup>1)</sup>
<i>F</i>	17.125	45.175	11.727
<i>P</i>	<0.001	<0.001	0.002

Compared with the miR-NC group, <sup>1)</sup> $P < 0.05$ . IGF-1: insulin-like growth factor-1.

### 2.3 miR-130b-5p对HTR8/SVneo细胞增殖的影响

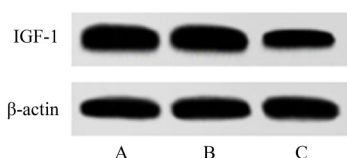
相较于对照组,HTR8/SVneo细胞增殖抑制率、c-Myc和CyclinD1表达水平在miR-NC组中的差异无统计学意义( $P>0.05$ );相较于miR-NC组,miR-130b-5p mimics组中细胞增殖抑制率显著增加,c-Myc和CyclinD1表达水平显著降低( $P<0.05$ );相较于miR-130b-5p mimics组,

HTR8/SVneo细胞增殖抑制率、c-Myc和CyclinD1表达水平在miR-130b-5p mimics+pcDNA3.1组中的差异无统计学意义( $P>0.05$ );相较于miR-130b-5p mimics+pcDNA3.1组,miR-130b-5p mimics+pcDNA3.1-IGF-1组中细胞增殖抑制率显著降低,c-Myc和CyclinD1表达水平显著增加( $P<0.05$ ;表3,图4)。

表3 miR-130b-5p对HTR8/SVneo细胞增殖的影响  
Table 3 The effect of miR-130b-5p on the proliferation of HTR8/SVneo cells (n=5,  $\bar{x} \pm s$ )

Groups	Proliferation inhibition rate/%	c-Myc/ $\beta$ -actin	CyclinD1/ $\beta$ -actin
Control	3.94±1.35	1.35±0.20	1.43±0.20
miR-NC	3.95±1.30	1.33±0.20	1.42±0.21
miR-130b-5p mimics	35.31±1.95 <sup>1)</sup>	0.74±0.14 <sup>1)</sup>	0.80±0.15 <sup>1)</sup>
miR-130b-5p mimics+pcDNA3.1	33.98±1.80	0.75±0.15	0.81±0.18
miR-130b-5p mimics+pcDNA3.1-IGF-1	12.07±1.60 <sup>2)</sup>	1.06±0.16 <sup>2)</sup>	1.11±0.23 <sup>2)</sup>
F	350.245	15.002	12.523
P	<0.001	<0.001	<0.001

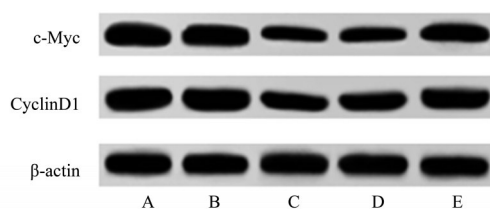
Compared with the miR-NC group, <sup>1)</sup> $P<0.05$ ; Compared with the miR-130b-5p mimics+ pcDNA3.1 group, <sup>2)</sup> $P<0.05$ .



A: control group; B: miR-NC group; C: miR-130b-5p mimics group.

图3 HTR8/SVneo细胞中IGF-1蛋白表达情况

Fig. 3 Expression of IGF-1 protein in HTR8/SVneo cells



A: control group; B: miR-NC group; C: miR-130b-5p mimics group; D: miR-130b-5p mimics+pcDNA3.1 group; E: miR-130b-5p mimics+pcDNA3.1-IGF-1 group.

图4 miR-130b-5p对HTR8/SVneo细胞增殖相关蛋白的影响

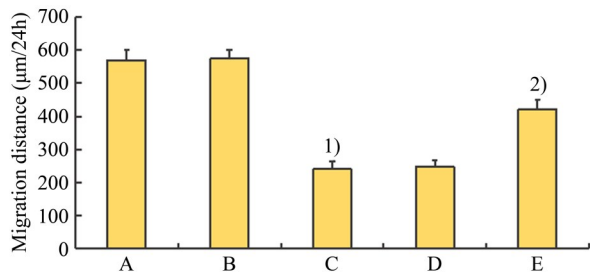
Fig. 4 The effect of miR-130b-5p on the proliferation-related proteins of HTR8/SVneo cells

### 2.4 miR-130b-5p对HTR8/SVneo细胞迁移的影响

相较于对照组,HTR8/SVneo细胞迁移距离在miR-NC组中的差异无统计学意义( $P>0.05$ );相较于miR-NC组,miR-130b-5p mimics组中细胞迁移距离显著降低( $P<0.05$ );相较于miR-130b-5p mimics组,miR-130b-5p mimics+pcDNA3.1组中HTR8/SVneo细胞迁移距离的差异无统计学意义( $P>0.05$ );相较于miR-130b-5p mimics+pcDNA3.1组,miR-130b-5p mimics+pcDNA3.1-IGF-1组中细胞迁移距离显著增加( $P<0.05$ ;图5)。

### 2.5 miR-130b-5p对HTR8/SVneo细胞侵袭的影响

如表4所示,相较于对照组,HTR8/SVneo细胞侵袭细胞数、MMP9和MMP2表达水平在miR-NC组中的差异无统计学意义( $P>0.05$ );相较于miR-NC组,miR-130b-5p mimics组中细胞侵袭细胞数、MMP9和MMP2表达水平显著降低( $P<0.05$ );相较于miR-130b-5p mimics组,miR-130b-5p mimics+pcDNA3.1组中HTR8/SVneo细胞侵袭细胞数、



One-way ANOVA for the differences among the five groups ( $F=192.427$ ,  $P=0.000$ ); Compared with the miR-NC group,  $^1P < 0.05$ ; Compared with the miR-130b-5p mimics+ pcDNA3.1 group,  $^2P < 0.05$ . A: control group; B: miR-NC group; C: miR-130b-5p mimics group; D: miR-130b-5p mimics+pcDNA3.1 group; E: miR-130b-5p mimics+pcDNA3.1-IGF-1 group.

图5 miR-130b-5p对HTR8/SVneo细胞迁移的影响

Fig. 5 The effect of miR-130b-5p on the migration of HTR8/SVneo cells

MMP9和MMP2表达水平的差异无统计学意义( $P > 0.05$ );相较于miR-130b-5pmimics+pcDNA3.1组,miR-130b-5pmimics+pcDNA3.1-IGF-1组中细胞侵袭细胞数、MMP9和MMP2表达水平显著增加( $P < 0.05$ ;图6,图7)。

### 2.6 miR-130b-5p对HTR8/SVneo细胞E-cadherin、Vimentin和N-cadherin蛋白表达的影响

如表5所示,相较于对照组,HTR8/SVneo细胞中E-cadherin、Vimentin和N-cadherin表达水平在miR-NC组的差异无统计学意义( $P > 0.05$ );相较于miR-NC组,miR-130b-5p mimics组中E-cadherin表达水平显著增加,Vimentin和N-cadherin表达水平显著降低( $P < 0.05$ );相较于miR-130b-5p mimics组,miR-130b-5pmimics+pcDNA3.1组中E-cad-

herin、Vimentin和N-cadherin表达水平的差异无统计学意义( $P > 0.05$ );相较于miR-130b-5pmimics+pcDNA3.1组,miR-130b-5pmimics+pcDNA3.1-IGF-1组中E-cadherin表达水平显著降低,Vimentin和N-cadherin表达水平显著增加( $P < 0.05$ ;图8)。

## 3 讨论

FGR是一种产科疾病,可导致胎儿生长受损,增加围产期死亡率<sup>[9-11]</sup>。绒毛膜滋养层细胞是胎盘的主要组成细胞之一,侵袭功能受到抑制会造成子宫螺旋动脉重塑障碍、胎盘缺氧缺血的发生,从而导致FGR、先兆子痫和胎盘增生等妊娠并发症的发生<sup>[3,12]</sup>。因此详细了解绒毛膜滋养层细胞在FGR中的侵袭机制对疾病治疗极其重要。

miRNA作为高度保守的非编码RNA,近几年有研究发现其参与调控绒毛膜滋养层细胞的侵袭和迁移<sup>[13]</sup>。miR-130b-5p参与多种癌症的侵袭迁移过程,其在宫颈癌组织中表达异常降低,通过促进ELK1表达来促进癌细胞的增殖、侵袭和迁移<sup>[14]</sup>。而最近有研究表明miR-130b-3p在妊娠期糖尿病胎盘滋养层细胞中表达异常增加,沉默其表达可保护细胞免受氧化应激损伤<sup>[5]</sup>。MMP9、MMP2由于可降解子宫内皮主要成分IV型胶原而在HTR8/SVneo细胞侵袭子宫内皮过程中具有重要作用<sup>[3]</sup>。人绒毛膜滋养层细胞经过上皮间充质转化(Epithelial-Mesenchymal Transition, EMT)渗入母体蜕膜间质和血管中,因此EMT过程对绒毛膜滋养层细胞

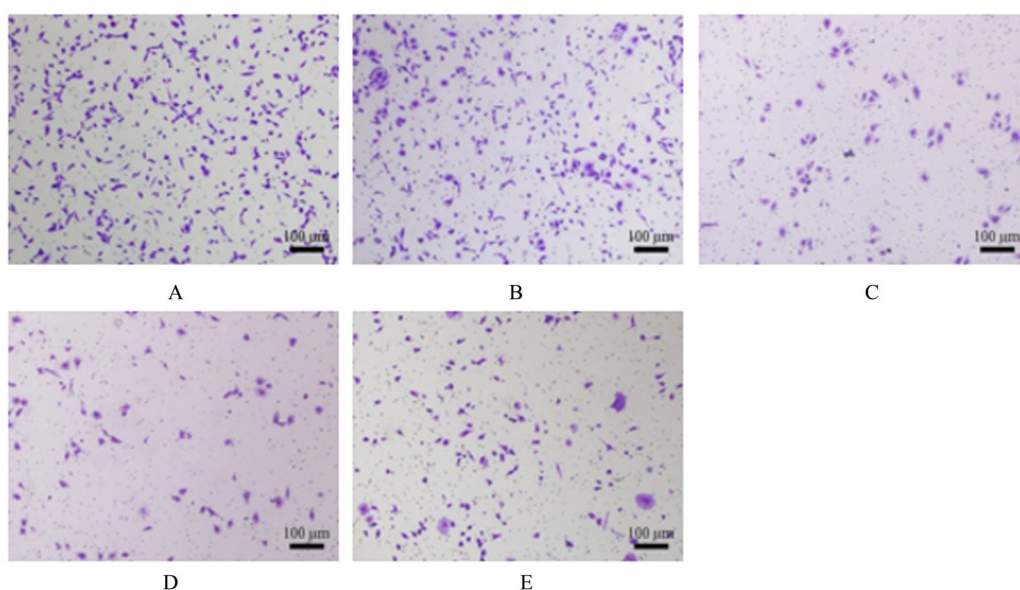
表4 miR-130b-5p对HTR8/SVneo细胞侵袭的影响

Table 4 The effect of miR-130b-5p on the invasion of HTR8/SVneo cells

( $n=5$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

Groups	Number of invasive cells(pcs)	MMP9/ $\beta$ -actin	MMP2/ $\beta$ -actin
Control	140.66 $\pm$ 21.61	1.39 $\pm$ 0.23	1.43 $\pm$ 0.22
miR-NC	137.10 $\pm$ 20.88	1.38 $\pm$ 0.25	1.42 $\pm$ 0.21
miR-130b-5p mimics	65.04 $\pm$ 14.72 <sup>1)</sup>	0.69 $\pm$ 0.17 <sup>1)</sup>	0.73 $\pm$ 0.18 <sup>1)</sup>
miR-130b-5pmimics+pcDNA3.1	63.81 $\pm$ 14.98	0.71 $\pm$ 0.16	0.74 $\pm$ 0.17
miR-130b-5pmimics+pcDNA3.1-IGF-1	110.33 $\pm$ 17.2 <sup>2)</sup>	1.16 $\pm$ 0.28 <sup>2)</sup>	1.20 $\pm$ 0.24 <sup>2)</sup>
<i>F</i>	21.370	13.080	14.419
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

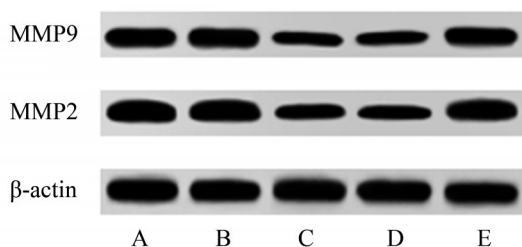
Compared with the miR-NC group,  $^1P < 0.05$ ; Compared with the miR-130b-5p mimics+ pcDNA3.1 group,  $^2P < 0.05$ . MMP9: matrix metalloproteinase 9; MMP2: matrix metalloproteinase 2.



A: control group; B: miR-NC group; C: miR-130b-5p mimics group; D: miR-130b-5p mimics+pcDNA3.1 group; E: miR-130b-5p mimics+pcDNA3.1-IGF-1 group; Scale bar: 100 μm.

图6 miR-130b-5p对HTR8/SVneo细胞侵袭的影响

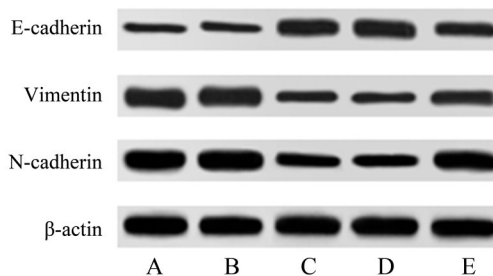
Fig. 6 The effect of miR-130b-5p on the invasion of HTR8/SVneo cells



A: control group; B: miR-NC group; C: miR-130b-5p mimics group; D: miR-130b-5p mimics+pcDNA3.1 group; E: miR-130b-5p mimics+pcDNA3.1-IGF-1 group.

图7 miR-130b-5p对HTR8/SVneo细胞侵袭相关蛋白的影响

Fig.7 Effects of miR-130b-5p on invasion-related proteins of HTR8/SVneo cells



A: control group; B: miR-NC group; C: miR-130b-5p mimics group; D: miR-130b-5p mimics+pcDNA3.1 group; E: miR-130b-5p mimics+pcDNA3.1-IGF-1 group.

图8 miR-130b-5p对HTR8/SVneo细胞EMT相关蛋白的影响

Fig. 8 Effects of miR-130b-5p on EMT-related proteins in HTR8/SVneo cells

的侵袭功能十分重要<sup>[15]</sup>。本研究发现 miR-130b-5p 过表达可显著促进 HTR8/SVneo 细胞增殖抑制率和 E-cadherin 表达水平,降低 c-Myc、CyclinD1 表达水平、迁移距离、侵袭细胞数、MMP9、MMP2、N-cadherin、Vimentin 表达水平,该结果表明 miR-130b-5p 过表达可显著抑制 HTR8/SVneo 的增殖和迁移、侵袭能力。

研究发现在发育 70 d 的猪仔肝脏中 miR-130b-3p 靶向促进 IGF-1 表达<sup>[16]</sup>。本研究双荧光素酶报告基因结果显示,IGF-1 是 miR-130b-5p 的潜在靶基因;miR-130b-5p 过表达可显著降低 IGF-1

表达水平,与前人研究结果相似。IGF-1 已被证明是滋养层细胞增殖和侵袭的重要调节剂,IGF-1 表达上调可促进 MMP-2 表达,以此促进 HTR-8/SVneo 细胞的侵袭能力<sup>[17-18]</sup>。胎盘功能不全造成的宫内生长受限患者胎盘中由于胰岛素样生长因子结合蛋白 1(insulin-like growth factor-binding protein-1, IGFBP-1)过度磷酸化,导致 IGF-1 表达水平显著降低<sup>[19]</sup>。本研究发现 miR-130b-5p mimics+pcDNA3.1-IGF-1 组对 miR-130b-5p 所造成的细胞增殖、侵袭和迁移的抑制起到逆转作用。提示,miR-

表5 miR-130b-5p对HTR8/SVneo细胞E-cadherin、Vimentin和N-cadherin蛋白表达的影响

Table 5 Effects of miR-130b-5p on the expression of E-cadherin, Vimentin and N-cadherin proteins in HTR8/SVneo cells

(n=5,  $\bar{x} \pm s$ )

Groups	E-cadherin/ $\beta$ -actin	Vimentin/ $\beta$ -actin	N-cadherin/ $\beta$ -actin
Control	0.62±0.15	1.31±0.21	1.45±0.27
miR-NC	0.64±0.14	1.33±0.22	1.44±0.24
miR-130b-5p mimics	1.38±0.20 <sup>1)</sup>	0.72±0.14 <sup>1)</sup>	0.80±0.18 <sup>1)</sup>
miR-130b-5p mimics+pcDNA3.1	1.37±0.21	0.74±0.18	0.81±0.20
miR-130b-5p mimics+pcDNA3.1-IGF-1	0.91±0.16 <sup>2)</sup>	1.06±0.20 <sup>2)</sup>	1.12±0.23 <sup>2)</sup>
F	23.144	11.839	10.011
P	<0.001	<0.001	<0.001

Compared with the miR-NC group, <sup>1)</sup>P<0.05; Compared with the miR-130b-5p mimics+ pcDNA3.1 group, <sup>2)</sup>P<0.05.

130b-5p 过表达对 HTR8/SVneo 细胞的增殖、侵袭和迁移的抑制可能与其抑制 IGF-1 表达有关。

综上所述, miR-130b-5p 过表达可能通过抑制 IGF-1 表达来抑制 HTR8/SVneo 细胞的增殖、侵袭和迁移。本研究不仅为 FGR 的发生机制研

究提供进一步参考, 还为其治疗提供了新的潜在治疗靶点。但在未来的研究中还需对 miR-130b-5p 在 FGR 中的下游调控机制进行深入探究。

#### 参考文献

- [1] Colella M, Frérot A, Novais ARB, et al. Neonatal and long-term consequences of fetal growth restriction [J]. *Curr Pediatr Rev*, 2018, 14(4): 212-218.
- [2] Burton GJ, Jauniaux E. Pathophysiology of placental-derived fetal growth restriction [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2018, 218(2S): S745-S761.
- [3] 王艳丽, 杨亚培, 宋欢欢. PAPP-A 与子宫动脉多普勒在早发型子痫前期和胎儿生长受限预测中的价值 [J]. *广东医学*, 2021, 42(5): 582-585.  
Wang YL, Yang YP, Song HH, et al. The value of PAPP-A and uterine artery Doppler in the prediction of early-onset preeclampsia and fetal growth restriction [J]. *Guangdong Med J*, 2021, 42(5): 582-585.
- [4] Wang P, Chen X, Chang Y, et al. Inhibition of microRNA-149 protects against recurrent miscarriage through upregulating RUNX2 and activation of the PTEN/Akt signaling pathway [J]. *J Obstet Gynaecol Res*, 2020, 46(12): 2534-2546.
- [5] Jiang S, Teague AM, Tryggstad JB, et al. Role of microRNA-130b in placental PGC-1 $\alpha$ /TFAM mitochondrial biogenesis pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 487(3): 607-612.
- [6] Chen H, Yang Y, Wang J, et al. MiR-130b-5p promotes proliferation, migration and invasion of gastric cancer cells via targeting RASAL1 [J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(5): 6361-6367.
- [7] Banjac L, Kotur-Stevuljević J, Gojković T, et al. Relationship between insulin-like growth factor type 1 and intrauterine growth [J]. *Acta Clin Croat*, 2020, 59(1): 91-96.
- [8] Ho KH, Chen PH, Hsi E, et al. Identification of IGF-1-enhanced cytokine expressions targeted by miR-181d in glioblastomas via an integrative miRNA/mRNA regulatory network analysis [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 732-742.
- [9] Pels A, Beune IM, van Wassenaer-Leemhuis AG, et al. Early-onset fetal growth restriction: a systematic review on mortality and morbidity [J]. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 2020, 99(2): 153-166.
- [10] Spinillo A, Gardella B, Adamo L, et al. Pathologic placental lesions in early and late fetal growth restriction [J]. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 2019, 98(12):

- 1585-1594.
- [11] 唐本玉, 陈丹纯, 郭蕾, 等. 宫内发育迟缓雌性仔鼠早期营养对生长追赶的影响[J]. 中山大学学报(医学版), 2019, 40(4):532-539.
- Tang BY, Chen DC, Guo L, et al. Effects of early life nutritional status on weight catch-up growth, Puberty initiation and obesity in female rats with intrauterine growth retardation [J]. J Sun Yat-sen Univ (Med), 2019, 40(4): 532-539.
- [12] Lee KM, Seo HW, Kwon MS, et al. SIRT1 negatively regulates invasive and angiogenic activities of the extravillous trophoblast [J]. Am J Reprod Immunol, 2019, 82(4): e13167-e13177.
- [13] Wen H, Hu Y, Chen L, et al. MiR-338-5p targets epidermal growth factor-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1 to inhibit the growth and invasion of trophoblast cells in selective intrauterine growth restriction [J]. Reprod Sci, 2020, 27(6): 1357-1364.
- [14] Huang Y, Luo F. Elevated microRNA-130b-5p or silenced ELK1 inhibits self-renewal ability, proliferation, migration, and invasion abilities, and promotes apoptosis of cervical cancer stem cells [J]. IUBMB Life, 2021, 73(1): 118-129.
- [15] Liang H, Zhang Q, et al. MSX2 induces trophoblast invasion in human placenta [J]. PLoS One, 2016, 11(4): e0153656-e0153666.
- [16] Yu cel Cicek OS, Hekimoglu ER, Turgal M, et al. Differential expression of leukemia inhibitory factor and insulin like growth factor-1 between normal pregnancies, partial hydatidiform moles and complete hydatidiform moles [J]. Placenta, 2018, 69(1): 64-70.
- [17] Liu J, Ning C, Li B, et al. Transcriptome comparison between prenatal and postnatal large white livers identifies differences in the expression level of genes related to metabolism and postnatal growth [J]. Gene, 2019, 686(1): 92-103.
- [18] Zhou SQ, Shen L, Li XY, et al. Effect of serum restriction on insulin like growth factor-1 expressions and invasiveness in human trophoblast HTR-8/SVneo cells in vitro [J]. J South Med Univ, 2017, 37(6): 774-779.
- [19] Singal SS, Nygard K, Gratton R, et al. Increased insulin-like growth factor binding protein-1 phosphorylation in decidualized stromal mesenchymal cells in human intrauterine growth restriction placentas [J]. J Histochem Cytochem, 2018, 66(9): 617-630.

(编辑 孙慧兰)