

低氧环境下 HLA-G 及 EPAS1 参与大鼠子痫前期发病机制研究

谢莹莹¹, 马萌¹, 赵海宁², 徐梦婷¹, 何岑盈¹, 孙春蕾¹, 许文宇¹

摘要 目的 探讨低氧对孕鼠胎盘组织人类白细胞抗原-G (HLA-G) 及内皮 PAS 结构域包含蛋白 1 (EPAS1) 的影响及参与子痫前期发病机制研究。方法 将 SD 孕鼠随机分为常氧组, 急性低氧组: 48 h、72 h、1 周组, 慢性低氧组: 2 周、3 周组, 共 6 组; 通过腹腔注射亚硝基左精氨酸甲酯 (L-NAME) 溶液建立子痫前期模型。运用无创血压仪测量孕鼠尾动脉血压, 全自动生化分析仪检测孕鼠血清丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、白蛋白 (ALB)、尿素氮 (BUN)、肌酐 (Cr) 值及尿蛋白值, 免疫组化检测孕鼠胎盘 HLA-G 蛋白及 EPAS1 蛋白表达情况。结果 ① 各子痫前期组孕鼠平均收缩压、平均舒张压及妊娠 21 d 尿蛋白均高于同条件正常妊娠孕鼠, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 而低氧对孕鼠血压及尿蛋白无影响。② 低氧环境下, 孕鼠 ALT、BUN 值均发生改变, 其中正常妊娠、子痫前期组孕鼠 ALT、BUN 值均在低氧 72 h 后开始上升, 低氧 1 周升高达最大值, 低氧 3 周下降, 但仍比常氧组稍高 ($P < 0.05$)。③ 各子痫前期组与同条件正常妊娠组孕鼠比较, HLA-G 蛋白表达阳性率均下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 低氧亦影响孕鼠 HLA-G 蛋白表达阳性率, HLA-G 蛋白阳性率整体呈先下降后上升的动态变化。④ 各子痫前期组与同条件正常妊娠组孕鼠比较, EPAS1 蛋白表达阳性率均上升, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 低氧亦影响孕鼠 EPAS1 蛋白表达阳性率, EPAS1 蛋白阳性率整体呈先上升后下降的动态变化。结论 低氧环境下孕鼠胎盘 HLA-G 蛋白整体表达呈先下降后上升的动态变化, 急性低氧可能加重母体对胎盘产生免疫攻击性, 但在机体适应低氧后, 母体和胎盘免疫关系又恢复正常; EPAS1 蛋白整体表达呈先上升后下降的动态变化, EPAS1 对缺氧的高选择性压力的反应, 可能引起对于高原缺氧的习服适应。

关键词 低氧环境; 大鼠; 子痫前期; 人类白细胞抗原-G; 内皮 PAS 结构域包含蛋白 1

中图分类号 R 714.252

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)09-1436-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.09.018

高原地区有低压、缺氧、寒冷、强紫外线辐射等特点, 其中最重要的是低氧环境, 易诱发子痫前期 (preeclampsia, PE)。该课题组前期研究^[1]发现, 低氧条件下通过小分子干扰 RNA 抑制绒毛膜滋养细胞系 JEG-3 细胞人类白细胞抗原-G (human leukocyte antigen-G, HLA-G) 的表达, 可能影响滋养细胞的增殖及侵袭能力, 参与妊娠期高血压疾病的发生。内皮 PAS 结构域包含蛋白 1 (endothelial PAS domain-containing protein 1, EPAS1) 是细胞在缺氧应答反应中最重要的调节因子之一。依据 EPAS1 的生物学特性, 可将 EPAS1 低氧信号通路作为主要细胞信号通路, 通过大鼠实验来明确 HLA-G、EPAS1 蛋白参与高原低氧环境下子痫前期发病的分子机制。故该研究建立 PE 孕鼠模型, 在模拟低氧环境下研究低氧环境对正常妊娠和 PE 孕鼠血压、24 h 尿蛋白、血清丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT)、白蛋白 (albumin, ALB)、尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN)、肌酐 (creatinine, Cr) 值的影响及胎盘 HLA-G 蛋白和 EPAS1 蛋白表达变化, 探讨低氧环境下孕鼠胎盘 HLA-G、EPAS1 低氧反应通路对子痫前期的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物 雌性和雄性 SD 大鼠, 10~12 周龄, 体质量 (230 ± 20) g, SPF 级, 购于北京维通利华实验动物技术有限公司 [许可证号: SCXK(京)2016-0006]。SD 大鼠于动物饲养中心适应性喂养 1 周后, 于下午 18 点将雌鼠与雄鼠按 2:1 合笼, 次日日上午 8 点观察受孕情况, 以观察到阴道栓日为妊娠第 1 天。本实验通过了青海大学附属医院伦理委员会的伦理审查 (伦理批号: P-SL-2017064)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 观察到孕栓的大鼠随机分为常氧组 (5 只正常妊娠孕鼠, 5 只 PE 模型孕鼠, 共 10 只), 急性低氧组: 分 48 h、72 h 和 1 周三三个时间点, (每个低氧时间点包括 5 只正常妊娠孕鼠、5 只 PE 模型孕鼠, 共 30 只), 慢性低氧组: 分 2 周、3 周两个

2021-12-02 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81760276)

作者单位: 青海大学附属医院¹ 产科, ² 肿瘤外科, 西宁 810001

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

时间点(每个低氧时间点包括5只正常妊娠孕鼠、5只PE模型孕鼠,共20只)。因大鼠平均孕期在22 d左右,低氧48 h处理孕鼠于妊娠第19天放置低压氧舱中(模拟5 000 m海拔,氧浓度12%左右),低氧72 h处理孕鼠于妊娠第18天放置低压氧舱中,低氧1周处理孕鼠于妊娠第14天放置低压氧舱中,低氧2周处理孕鼠于妊娠第7天放置低压氧舱中,低氧3周处理孕鼠于妊娠第1天放置低压氧舱中,这样检测孕鼠胎盘因子表达结果时,孕鼠都处于妊娠晚期,可消除妊娠不同时期胎盘因子的变化对实验结果的影响。低氧处理期间每日固定时间喂水,喂食。

1.2.2 PE造模 孕鼠于妊娠第11天开始,使用亚硝基左精氨酸甲酯(N-nitro-L-arginine methylester, L-NAME)溶液(美国SIGMA公司)0.25 g/(kg·d)腹腔注射,共7 d,正常妊娠孕鼠于妊娠第11天开始规律腹腔注射同剂量生理盐水,共7 d。低氧48 h、72 h模型组大鼠为造模成功后放置低压氧舱中,低氧1周、2周、3周模型组大鼠为低氧处理同时腹腔注射L-NAME。所有孕鼠于妊娠第9天和妊娠第21天运用大鼠鼠尾无创血压仪(安徽正华生物仪器设备有限公司)测量血压;分别于妊娠第9天和妊娠第21天放入代谢笼中,禁食不禁水,收集孕鼠24 h尿液。运用全自动生化分析仪测量24 h尿蛋白总量。

目前国内外尚无统一的动物子痫前期诊断标准,本实验按收缩压和(或)舒张压达到140 mmHg和(或)90 mmHg^[2],造模前后24 h尿蛋白明显升高为造模成功。

1.2.3 肝、肾功能检测 于妊娠第21天,使用20%乌拉坦按[梯希爱(上海)化成工业发展有限公司]5 ml/kg剂量腹腔注射麻醉后,留取下腔静脉血4 ml左右,全自动生化分析仪检测ALT、ALB、BUN、Cr值。

1.2.4 免疫组化检测胎盘组织HLA-G、EPAS1蛋白表达 孕鼠麻醉后切开子宫,无菌剪剪取适量胎盘组织,放至甲醛溶液(中性)中固定。免疫组化检测胎盘组织中HLA-G、EPAS1低氧反应通路蛋白表达。

1.3 统计学处理 采用统计学软件SPSS 22.0进行数据分析,数据进行正态分布检验、方差齐性检验,正态分布数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组内两两比较用配对 t 检验,两组间比较用独立 t 检验,三组及三组以上组间比较用单因素方差分析,两两比较用LSD法,分类资料使用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠无创血压仪测量血压值 妊娠第1天,各组孕鼠平均收缩压与舒张压差异无统计学意义($P > 0.05$)。妊娠第21天,各组孕鼠平均收缩压与舒张压均有差异,且差异有统计学意义($P < 0.05$),其中,与同条件正常妊娠孕鼠比较,各PE组平均收缩压、舒张压均升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),PE孕鼠造模成功;各正常妊娠低氧组、PE低氧组孕鼠平均收缩压、舒张压分别与对应常氧组比较差异无统计学意义($P > 0.05$),即低氧处理对孕鼠血压无影响,见表1。

表1 各组孕鼠收缩压、舒张压变化(mmHg, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	收缩压			舒张压		
		妊娠第1天	妊娠第21天	P值	妊娠第1天	妊娠第21天	P值
正常妊娠常氧	5	102.86 ± 5.03	103.06 ± 2.91	0.941	70.37 ± 4.03	71.21 ± 3.02	0.743
正常妊娠低氧48 h	5	106.45 ± 3.89	105.26 ± 5.09	0.729	69.57 ± 3.59	69.47 ± 3.94	0.972
正常妊娠低氧72 h	5	105.82 ± 4.83	106.58 ± 3.55	0.784	72.89 ± 3.06	70.59 ± 3.60	0.393
正常妊娠低氧1周	5	106.33 ± 2.13	105.10 ± 2.19	0.392	69.37 ± 2.86	72.26 ± 1.60	0.206
正常妊娠低氧2周	5	106.08 ± 4.62	103.81 ± 3.53	0.433	71.51 ± 3.00	69.79 ± 3.51	0.466
正常妊娠低氧3周	5	104.50 ± 5.38	105.87 ± 2.12	0.645	69.09 ± 2.28	70.24 ± 4.37	0.677
PE常氧	5	100.74 ± 6.46	142.86 ± 2.27*	<0.001	68.28 ± 3.41	91.78 ± 1.46*	<0.001
PE低氧48 h	5	106.11 ± 5.62	141.86 ± 1.22*	<0.001	72.36 ± 3.43	91.54 ± 0.69*	<0.001
PE低氧72 h	5	104.93 ± 4.95	141.73 ± 1.26*	<0.001	72.64 ± 3.07	92.53 ± 1.46*	<0.001
PE低氧1周	5	104.57 ± 3.94	142.04 ± 1.32*	<0.001	68.04 ± 4.37	91.58 ± 2.14*	0.001
PE低氧2周	5	104.36 ± 6.20	141.52 ± 2.44*	0.001	68.36 ± 3.08	92.25 ± 1.97*	<0.001
PE低氧3周	5	104.77 ± 4.05	144.28 ± 2.45*	<0.001	70.12 ± 2.77	93.81 ± 2.97*	<0.001
F值		0.579	253.847		1.414	82.467	
P值		0.836	<0.001		0.198	<0.001	

与同条件正常妊娠组比较: * $P < 0.05$

2.2 全自动生化分析仪测量 24h 尿蛋白总量 妊娠第 1 天, 各组孕鼠 24 h 尿蛋白差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。妊娠第 21 天, 各组孕鼠 24 h 尿蛋白间差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 其中, 与同条件正常孕鼠比较, 各 PE 组 24 h 尿蛋白增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 即注射 L-NAME 溶液后孕鼠 24 h 尿蛋白增加; 各正常妊娠低氧组、PE 低氧组孕鼠 24 h 尿蛋白与同条件常氧组比较均差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 即低氧处理对正常妊娠孕鼠、PE 孕鼠 24 h 尿蛋白无影响, 见表 2。

表 2 各组孕鼠 24h 尿蛋白变化 (mg/24h, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	24 h 尿蛋白		P 值
		妊娠第 1 天	妊娠第 21 天	
正常妊娠常氧	5	4.10 ± 0.74	3.62 ± 0.85	0.497
正常妊娠低氧 48 h	5	4.07 ± 1.09	4.93 ± 1.07	0.198
正常妊娠低氧 72 h	5	3.95 ± 2.03	5.35 ± 1.35	0.350
正常妊娠低氧 1 周	5	4.17 ± 1.40	3.96 ± 1.38	0.771
正常妊娠低氧 2 周	5	4.12 ± 1.48	4.73 ± 1.68	0.469
正常妊娠低氧 3 周	5	4.05 ± 0.74	5.06 ± 1.59	0.191
PE 常氧	5	4.04 ± 0.94	47.94 ± 20.45	0.009
PE 低氧 48 h	5	4.36 ± 0.76	50.82 ± 15.95*	0.002
PE 低氧 72 h	5	4.82 ± 2.37	50.78 ± 14.21*	0.001
PE 低氧 1 周	5	5.00 ± 2.06	42.96 ± 20.61*	0.014
PE 低氧 2 周	5	4.08 ± 1.72	44.36 ± 8.41*	0.001
PE 低氧 3 周	5	5.11 ± 1.45	47.51 ± 19.62*	0.006
F 值		0.376	17.135	
P 值		0.959	<0.001	

与同条件正常妊娠组比较: * $P < 0.05$

2.3 全自动生化分析仪检测 ALT、ALB、BUN、Cr 值 各组孕鼠 ALT、BUN 值比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 其中低氧环境下正常妊娠孕鼠 ALT、

BUN 值均呈一过性改变, ALT 值在低氧 72 h 后开始上升, 低氧 1 周、2 周升高达最大值, 低氧 3 周下降, 但仍比常氧组和低氧 48 h 组增高 ($P < 0.05$); BUN 值在低氧 48 h 后即开始升高, 至低氧 1 周达最大值, 低氧 2 周、3 周降低, 但仍比常氧组稍高 ($P < 0.05$), PE 组 ALT、BUN 值呈相同趋势; 各低氧时间点的 PE 组 ALT、BUN 值与同条件正常妊娠组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 即注射 L-NAME 对孕鼠 ALT、BUN 值无影响。各组孕鼠 ALB、Cr 值比较均差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 即低氧处理和注射 L-NAME 溶液对正常妊娠孕鼠和 PE 孕鼠 ALB、Cr 值无影响, 见表 3。

2.4 各组孕鼠胎盘组织 HLA-G 蛋白表达 每张免疫组化片子里随机选取 20 个高倍视野, 每组 5 张片子, 共 100 个视野进行统计分析。HLA-G 蛋白主要表达于胎盘滋养细胞的胞质和胞膜中 (见图 1A、B)。低氧环境下正常妊娠组内胎盘组织 HLA-G 蛋白表达比较, 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 201.62, P < 0.001$)、PE 组内比较差异亦有统计学意义 ($\chi^2 = 159.74, P < 0.001$), 说明低氧环境影响 HLA-G 蛋白表达; 正常妊娠组内比较, 胎盘 HLA-G 蛋白表达阳性率在低氧 48 h、72 h 处理后下降, 低氧 1 周处理后阳性率较低氧 48 h、72 h 增加, 但仍低于常氧水平, 至低氧 2 周、3 周阳性率与常氧无差异, PE 组组内比较胎盘 HLA-G 蛋白阳性表达率呈相同趋势。各 PE 组孕鼠胎盘 HLA-G 蛋白表达阳性率与同条件正常妊娠组孕鼠比较, HLA-G 蛋白表达阳性率均下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 即 PE 孕鼠胎盘 HLA-G 蛋白阳性表达率低于正常妊娠孕鼠, 见表 4。

表 3 各组孕鼠 ALT、ALB、BUN、Cr 值变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ALT (U/L)	ALB (g/L)	BUN (mmol/L)	Cr ($\mu\text{mol/L}$)
正常妊娠常氧	5	43.62 ± 7.41	29.94 ± 12.74	5.88 ± 1.97	30.00 ± 9.77
正常妊娠低氧 48 h	5	44.28 ± 7.46	33.08 ± 4.55	8.92 ± 1.85*	28.60 ± 3.97
正常妊娠低氧 72 h	5	54.14 ± 10.48*#	35.44 ± 2.57	10.20 ± 2.02*	36.00 ± 2.92
正常妊娠低氧 1 周	5	72.96 ± 4.47*# Δ ∇	31.82 ± 2.81	11.10 ± 1.57*# ∇	30.80 ± 3.70
正常妊娠低氧 2 周	5	72.70 ± 5.01*# Δ ∇	31.72 ± 5.57	10.22 ± 1.63*	34.60 ± 3.05
正常妊娠低氧 3 周	5	54.40 ± 2.92*#	29.08 ± 2.79	9.04 ± 0.62*	33.20 ± 3.63
PE 常氧	5	41.64 ± 3.97	32.76 ± 5.83	6.36 ± 0.98	31.20 ± 2.39
PE 低氧 48 h	5	41.32 ± 2.64	31.36 ± 5.33	8.42 ± 0.53*	30.40 ± 4.51
PE 低氧 72 h	5	50.24 ± 6.14*#	33.78 ± 2.63	9.78 ± 0.72*	29.40 ± 3.51
PE 低氧 1 周	5	65.80 ± 5.17*# Δ ∇	31.00 ± 3.95	10.94 ± 0.44*# ∇	30.20 ± 5.89
PE 低氧 2 周	5	70.00 ± 8.14*# Δ ∇	31.56 ± 4.79	9.38 ± 1.54*	31.40 ± 3.44
PE 低氧 3 周	5	50.74 ± 6.16*#	34.16 ± 4.99	8.96 ± 0.77*	30.60 ± 1.67
F 值		19.098	0.527	7.199	1.162
P 值		<0.001	0.875	<0.001	0.338

与同一条件常氧组比较: * $P < 0.05$; 与同一条件低氧 48 h 组比较: # $P < 0.05$; 与同一条件低氧 72 h 组比较: Δ $P < 0.05$; 与同一条件低氧 3 周组比较: ∇ $P < 0.05$

表4 低氧环境孕鼠 HLA-G 蛋白表达变化

组别	视野数	阴性	阳性	χ^2 值	P 值
常氧				12.180	<0.001
正常妊娠	100	1	99		
PE	100	14	86		
低氧 48 h				4.119	0.042
正常妊娠	100	54	46		
PE	100	68	32		
低氧 72 h				4.160	0.041
正常妊娠	100	55	45		
PE	100	69	31		
低氧 1 周				4.147	0.042
正常妊娠	100	22	78		
PE	100	35	65		
低氧 2 周				11.060	0.001
正常妊娠	100	1	99		
PE	100	13	87		
低氧 3 周				7.680	0.006
正常妊娠	100	2	98		
PE	100	12	88		

正常妊娠组和 PE 组孕鼠组内两两比较调整检验水准 = 0.05/15 = 0.003 3。正常妊娠组内比较总 $\chi^2 = 194.609, P = 0.000$, PE 组内比较总 $\chi^2 = 162.232, P = 0.000$, 两组组内均是除低氧 48 h 组 vs 低氧 72 h 组、低氧 2 周组 vs 常氧组、低氧 3 周组 vs 常氧组、低氧 2 周组 vs 低氧 3 周组无差异, 其余组间两两比较 P 均 < 0.003 3

表5 低氧环境孕鼠 EPAS1 蛋白表达变化

组别	视野数	阴性	阳性	χ^2 值	P 值
常氧				11.499	0.001
正常妊娠	100	90	10		
PE	100	71	29		
低氧 48 h				24.719	<0.001
正常妊娠	100	22	78		
PE	100	0	100		
低氧 72 h				19.207	<0.001
正常妊娠	100	20	80		
PE	100	1	99		
低氧 1 周				5.808	0.016
正常妊娠	100	55	45		
PE	100	38	62		
低氧 2 周				8.562	0.003
正常妊娠	100	87	13		
PE	100	70	30		
低氧 3 周				8.000	0.005
正常妊娠	100	88	12		
PE	100	72	28		

正常妊娠组和 PE 组孕鼠组内两两比较调整检验水准 = 0.05/15 = 0.003 3。正常妊娠组内比较总 $\chi^2 = 229.036, P = 0.000$, PE 组内比较总 $\chi^2 = 245.731, P = 0.000$, 两组组内均是除低氧 48 h 组 vs 低氧 72 h 组、低氧 2 周组 vs 常氧组、低氧 3 周组 vs 常氧组、低氧 2 周组 vs 低氧 3 周组无差异, 其余组间两两比较 P 均 < 0.003 3

2.5 各组孕鼠胎盘组织 EPAS1 蛋白表达 EPAS1 蛋白主要表达于滋养细胞胞核和胞质(见图 1C、D)。低氧环境下正常妊娠组内胎盘组织 EPAS1 蛋白表达比较, 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 229.04, P = 0.000$)、PE 组内比较差异亦有统计学意义 ($\chi^2 = 245.73, P = 0.000$), 说明低氧环境下 EPAS1 蛋白表达水平升高; 正常妊娠组内比较, 胎盘 EPAS1 蛋白表达阳性率在低氧 48 h、72 h 处理后阳性率上升, 低氧 1 周处理后阳性率下降, 至低氧 2 周、3 周阳性率与常氧无差异, PE 组组内比较胎盘 EPAS1 蛋白阳性表达率呈相同趋势。各 PE 组孕鼠胎盘 EPAS1 蛋白表达阳性率与同条件正常妊娠组孕鼠比较, EPAS1 蛋白表达阳性率均上升, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。即 PE 孕鼠胎盘 EPAS1 蛋白阳性表达率高于正常妊娠孕鼠, 见表 5。

3 讨论

3.1 高原低氧环境与 PE 的关系 高原低氧是人类生存面临的最大的环境威胁之一, 缺氧是许多广泛存在的人类疾病的中心特征, 而且高海拔会损害胎儿生长, 增加 PE 的发病率, 并因此增加围产期和/或产妇发病率和死亡率的风险^[3]。众所周知, 血管内皮细胞损伤是 PE 的基本病理变化之一, 它使血

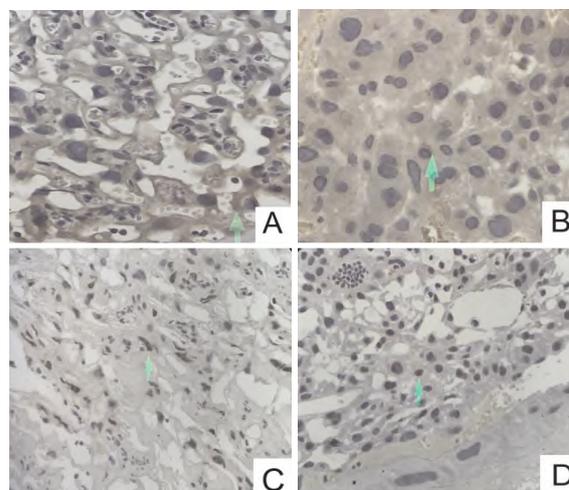


图1 HLA-G 蛋白与 EPAS1 蛋白免疫组化表达部位 SP × 400

A、B: HLA-G 蛋白的表达部位, 箭头所指 HLA-G 蛋白表达在滋养细胞的胞质、胞膜上; C、D: EPAS1 蛋白的表达部位, 箭头所指 EPAS1 蛋白表达在滋养细胞的胞核和胞质

管扩张物质如一氧化氮等合成减少, 从而促进血管痉挛。L-NAME 作为一种一氧化氮合酶的抑制剂, 可抑制一氧化氮产生, 使动物模型的血流动力学发生了一系列变化, 包括胎盘和肾脏缺血, 缺氧症状, 血管内皮损伤、氧化应激和炎症反应加剧, L-NAME 诱发 PE 模型为研究 PE 的发病机制提供了强有力

的工具^[4]。本研究使用 L-NAME 溶液制作 PE 孕鼠模型,模拟海拔 5 000 m 高原低氧环境研究低氧对正常孕鼠及 PE 孕鼠的影响,结果显示低氧处理对孕鼠 ALB、Cr 值均无影响,ALT、BUN 值于低氧 48 h 至 72 h 后开始上升,低氧 1 周、2 周升高达最大值,可能是 ALT、BUN 值对缺氧的反应更为敏感。而低氧对孕鼠血压、尿蛋白无明显影响,不能体现高原地区对 PE 发病率的影响,可能与实验样本量不够大及大鼠在西宁地区(海拔 2 200 m)适应性喂养 1 周有关。

3.2 低氧环境下大鼠胎盘组织 HLA-G 表达的影响 HLA-G 称为非经典的 HLA-I 分子,区别于经典 HLA 分子,具有有限的基因多态性、限制性组织分布、特殊的选择性剪切模式的特点^[5]。HLA-G 分子的特点及功能决定了它必然在母胎免疫耐受方面具有关键性作用。首次对青海高原地区 PE 患者胎盘组织中 HLA-G mRNA 及蛋白进行定量分析发现,HLA-G 基因转录的下调及其蛋白质表达下降,在青海高原地区 PE 的发生发展过程中可能发挥重要作用^[6]。前期还研究了不同海拔 PE 患者 HLA-G 的表达,结果发现海拔的增高引起 HLA-G 低表达,可能是高原地区 PE 发病率高于平原地区的原因之一^[7]。本研究中通过免疫组化研究了低氧环境下孕鼠胎盘 HLA-G 蛋白的表达,结果表明 HLA-G 蛋白在 PE 孕鼠胎盘阳性表达率明显降低,进一步通过动物实验验证了 HLA-G 可能参与 PE 的发病机制。另外胎盘 HLA-G 蛋白整体表达呈先下降后上升的动态变化。这与课题组前期低氧环境下细胞实验结果一致,低氧组在 48 h 及 72 h, JEG-3 细胞中 HLA-G mRNA 水平较常氧组降低^[8]。急性低氧可能加重母体对胎盘产生免疫攻击性,但在机体适应低氧后,母体和胎盘免疫关系又恢复正常。

3.3 低氧环境下大鼠胎盘组织 EPAS1 表达的影响

胎盘最初是在含氧量为 1% 的低氧环境中发育,直到怀孕 10 周后。在此期间,氧浓度对滋养细胞活性有重要影响,缺氧诱导因子被认为是影响妊娠早期滋养细胞生物学行为的重要调节因子之一^[9]。其中 HIF-1 和 EPAS1 是细胞在缺氧应答反应中最重要的调节因子。EPAS1 又名缺氧诱导因子 2 (hypoxia inducible factor-2, HIF-2)。有研究报道低氧状态下为维持内皮细胞氧平衡, HIF-2 α 可能替代 HIF-1 α 起作用, HIF-2 α 在长期慢性缺氧反应中起着重要作用, HIF-1 α 则与急性缺氧反应有关^[10]。本研究发现,各 PE 组的孕鼠胎盘 EPAS1 蛋白阳性表达

率较正常妊娠孕鼠高, EPAS1 可能参与 PE 的发病机制。另外低氧环境下胎盘 EPAS1 蛋白整体表达呈先上升后下降的动态变化,这表明孕鼠在急性缺氧的 48 h、72 h 内对 EPAS1 蛋白的影响最大,从低氧 1 周开始由急性缺氧转为初期习服过程,至低氧 2 周、3 周,尤其 3 周达到习服水平,与 Ahmed et al^[11]的研究结果一致,可能预示着 PE 的低氧细胞对缺氧的高选择性压力的反应,具有更高的遗传变异性,这可能导致适应高海拔。

综上所述, HLA-G 和 EPAS1 可能参与 PE 发病机制。本研究推测, HLA-G 作为一种免疫抑制因子,急性低氧可能会下调 HLA-G 表达使母胎免疫失衡。在急性低氧环境下滋养细胞可能为了应对低氧使 EPAS1 表达增加,从而调节下游基因使血管生成增加,组织血供增加应对缺氧,在机体适应缺氧后 EPAS1 蛋白表达又恢复至正常水平,低氧环境下胎盘 EPAS1 的整体表达趋势可看作机体对低氧反应的适应。而 HLA-G 和 EPAS1 也可能存在某种关系,将下一步实验计划中尝试通过细胞实验检测沉默表达后 HLA-G、EPAS1 和其下游基因的变化,为 PE 的发病机制和治疗提供更好的依据。

参考文献

- [1] 谢莹莹,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.
- [2] Lee J S, Lee M K, Ha T Y, et al. Supplementation of whole persimmon leaf improves lipid profiles and suppresses body weight gain in rats fed high-fat diet[J]. *Food Chem Toxicol*, 2006, 44(11): 1875-83.
- [3] Julian C G. High altitude during pregnancy[J]. *Clin Chest Med*, 2011, 32(1): 21-31.
- [4] Shu W, Li H, Gong H, et al. Evaluation of blood vessel injury, oxidative stress and circulating inflammatory factors in an L-NAME induced preeclampsialike rat model[J]. *Exp Ther Med*, 2018, 16(2): 585-94.
- [5] Dahl M, Djuricic S, Vauvert F T, et al. The many faces of human leukocyte antigen-G: relevance to the fate of pregnancy[J]. *J Immunol Res*, 2014, 2014: 591489.
- [6] 谢莹莹,李凤莲,刘春燕,等. 青海地区子痫前期患者 HLA-G mRNA 及蛋白表达研究[J]. 实用妇产科杂志, 2012, 28(8): 671-4.
- [7] 谢莹莹,赵海宁,裴青青,等. 青海地区不同海拔藏汉民族子痫前期患者人类白细胞抗原-G 表达研究[J]. 中国全科医学杂志, 2017, 20(6): 1978-82.
- [8] 曲新霞,谢莹莹,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.

- [9] Highet A R, Khoda S M, Buckberry S, et al. Hypoxia induced HIF-1/HIF-2 activity alters trophoblast transcriptional regulation and promotes invasion[J]. *Eur J Cell Biol*, 2015, 94(12):589-602.
- [10] Holmquist-Mengelbier L, Fredlund E, Lofstedt T, et al. Recruitment of HIF-1alpha and HIF-2alpha to common target genes is differentially regulated in neuroblastoma; HIF-2alpha promotes an aggressive phenotype[J]. *Cancer Cell*, 2006, 10(5):413-23.
- [11] Ahmed S I Y, Ibrahim M E, Khalil E A G. High altitude and preeclampsia: adaptation or protection [J]. *Med Hypotheses*, 2017, 104:128-32.

HLA-G and EPAS1 participate in the pathogenesis of preeclampsia under hypoxia environment in rats

Xie Yingying¹, Ma Meng¹, Zhao Haining², Xu Mengting¹, He Cenyong¹, Sun Chunlei¹, Xu Wenyu¹

(¹Dept of Obstetrics, ²Dept of Surgical Oncology, The Affiliated Hospital of Qinghai University, Xining 810001)

Abstract Objective To investigate the effect of hypoxia on human leukocyte antigen-G (HLA-G) and endothelial PAS domain protein-1 (EPAS1) in placenta of pregnant rats and its mechanism in pathogenesis of preeclampsia.

Methods Experimental grouping and modeling: SD pregnant rats were randomly divided into normoxia group and acute hypoxia group. Both groups were subdivided into different groups of 48 h, 72 h and 1 week; the third group is chronic hypoxia group lasting for 2 weeks or 3 weeks. The preeclampsia model was established by intraperitoneal injection of L-NAME solution. Tail artery blood pressure of pregnant rats was measured with a noninvasive sphygmomanometer, serum alanine aminotransferase (ALT), serum albumin (ALB), blood urea nitrogen (BUN), creatinine (Cr) and urinary protein in pregnant rats was detected by the automatic biochemical analyzer, HLA-G protein and EPAS1 protein expressions were detected with the immunohistochemical method in the placenta of the pregnant rats.

Results ① The mean systolic blood pressure, mean diastolic blood pressure and urinary protein on the 21st day of pregnancy in each pre-eclampsia group were significantly higher than those in normal pregnant rats under the same conditions ($P < 0.05$), but hypoxia had no effect on blood pressure and urinary protein; ② There were differences in ALT and BUN among normal pregnant rats and preeclampsia rats under hypoxic environment, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). In hypoxia environment, the ALT and BUN values of normal pregnant rats and pre-eclampsia rats were shown significant differences, namely, the ALT and BUN values of normal pregnancy and preeclampsia group began to rise after 72 hours, hypoxia induced them to the maximum value in 1 week, and then decreased in 3 weeks, but it was still higher than that of normoxia group ($P < 0.05$). ③ The positive rate of HLA-G protein expression in preeclampsia group was lower than that in normal pregnancy group ($P < 0.05$); Hypoxia also affected the positive rate of HLA-G protein expression in pregnant rats. The positive rate of HLA-G protein decreased first and then increased. ④ The positive rate of EPAS1 protein expression in preeclampsia group was significantly higher than that in normal pregnancy group ($P < 0.05$); Hypoxia also affected the positive rate of EPAS1 protein expression in pregnant rats. The positive rate of EPAS1 protein increased first and then decreased. **Conclusion** The overall expression of HLA-G protein in placenta of pregnant rats decreased first and then increased under hypoxic environment. Acute hypoxia may aggravate maternal immune aggression to placenta, but after the body adapts to hypoxia, the immune relationship between mother and placenta returns to normal. The overall expression of EPAS1 protein increased first and then decreased. The response of EPAS1 to the high selective pressure of hypoxia may lead to the acclimation to high altitude hypoxia.

Key words hypoxic environment; rats; preeclampsia; human leukocyte antigen-G; endothelial PAS domain protein-1