网络出版时间: 2020 - 12 - 25 14: 45 网络出版地址: https: //kns. cnki. net/kcms/detail/34. 1065. R. 20201224. 1106. 010. html

妊娠期糖尿病患者来源的胎盘外泌体对内皮细胞血管功能的影响

张艳赏[1], 李 丽[1], 霍 琰[1], 崔京娜[1], 李桂平[2]

摘要 目的 探讨妊娠期糖尿病(GDM)患者来源的胎盘外泌体对血管内皮细胞的增殖、侵袭、迁移及成管能力的影响。**方法** 联合利用胎盘组织块离体培养及超速离心法获取胎盘外泌体; 透射电镜(TEM)、动态光散射(DLS)及 Western blot 检测进行鉴定; 体外培养人脐静脉内皮细胞(HUVEC), 免疫荧光双染后应用荧光共聚焦显微镜检测内皮细胞对外泌体的摄取; 利用 CCK-8 实验和 EdU 染色法、划痕实验、Transwell 侵袭实验和小管形成实验分别检测不同浓度的外泌体对内皮细胞增殖、迁移、侵袭和血管生成能力的影响。**结果** 成功分离直径范围 40 ~ 130 nm 的胎盘外泌体; 分离纯化的胎盘外泌体能够被内皮细胞所摄取, 并能够以浓度依赖性促进内皮细胞的增殖、迁移、侵袭及成管能力, 即高浓度的胎盘外泌体对内皮细胞的上述功能的促进作用越强。**结论** 来源于 GDM 患者胎盘组织的外泌体可促进内皮细胞的增殖、迁移、侵袭及成管能力。

关键词 妊娠期糖尿病; 胎盘外泌体; 内皮细胞

中图分类号 R 344

文献标志码 A **文章编号** 1000 - 1492(2021)02 - 0214 - 07

doi: 10. 19405/j. cnki. issn1000 - 1492. 2021. 02. 009

2020 - 08 - 14 接收

基金项目: 河北省医学科学研究重点科学计划(编号: 20181481)

作者单位: [1] 河北省人民医院产科, 石家庄 050051

[2] 河北医科大学基础医学院, 石家庄 050017

作者简介: 张艳赏, 女, 副主任医师;

李 丽, 女, 副主任医师, 责任作者, E-mail: siyihuanh@163. com

妊娠期糖尿病(gestational diabetes mellitus, GDM)指妊娠期发生或首次发现的糖耐量异常, 包括一部分在妊娠前已患有糖尿病但孕期首次被诊断的患者, 是常见的妊娠并发症之一[1]。GDM 不仅会增加胎儿并发症, 如巨大儿、新生儿低血糖、高胆红素血症等的发生率, 还会增加孕妇罹患心血管疾病和 2 型糖尿病的风险, 严重危害母婴健康[2-3]。然而, 迄今为止 GDM 的发病机制尚不明确。胎盘作为连接母体与胎儿的重要器官, 其通过气体交换、营养供给及代谢废物排出等功能对妊娠的维持发挥关键作用[4]。既往研究证实 GDM 患者胎盘较正常胎盘明显增大, 胎盘毛细血管表面积增加, 毛细血管增生且内皮细胞的增殖活性显著升高[5]。外泌体是由双层磷脂分子包裹的囊泡样小体, 直径为 30 ~ 150 nm, 其能够通过独特的分子结构实现多种功能, 如细胞间信息交换[6]。而细胞间的信号传递对于胎盘组织中各种细胞正常功能的发挥尤为重要[7]。因此, 外泌体可能参与了 GDM 的病理生理学机制。

taken from the angular vein at 7 days, 1 month, 3 months, and 6 months, respectively, and the contents of transferase (AST), alanine transferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), eosinophils (EOS) and leukocytes (WBC), red blood cells (RBC), platelets (PLT) were tested. ***Results*** In this study, three mouse models of abdominal cavity infection from different regions were successfully established. There were no differences in blood routine and liver function index of BALB/c mice from 3 different regions. Among them, EM-2 (Xinjiang strain) group had the most protoscolex. EM-3 (Sichuan strain) had the least number of protoscolex. The EM-2 group had the highest infection rate(77. 8%), and the EM-3 infection rate was the lowest(62. 5%). After HE staining for the liver tissues of 3 groups of mice, vesicles of varying sizes could be seen in the liver tissues of the experimental groups under low power microscope. The Xinjiang strain infected mice could be observed serious liver cell necrosis, and the area of liver necrosis was large. ***Conclusion*** The animal models of infection in abdominal cavity of different regions have been successfully established. Pathogenicity of Echinococcosis multicocularis in different regions of mice are different. The Xinjiang strain has the most serious infectivity and the Sichuan strain has the least infectivity.

Key words alevolar echinococcosis; protoscolex; abdominal cavity infection; Xinjiang strain; Qinghai strain; Sichuan strain

然而针对胎盘外泌体对内皮细胞功能的研究尚鲜有报道。该研究旨在探讨 GDM 患者胎盘外泌体对血管内皮增殖、迁移等能力的影响。

1 材料与方法

1.1 临床资料 选取 2018 年 5 月—2019 年 5 月河北省人民医院产科住院的 GDM 孕产妇患者 30 例。GDM 的诊断按照第 9 版《妇产科学》的标准[8],即在妊娠的第 24 ~ 28 周空腹口服 75 g 葡萄糖进行糖耐量实验(oral glucose tolerance test,OGTT),其中当空腹血糖≥5.1 mmol/L,或服糖后 1 h 血糖≥10.0 mmol/L,或服糖后 2 h 血糖≥8.5 mmol/L 中任意一点血糖值达到上述标准即可诊断为 GDM。所有受试者孕产妇均为单胎妊娠,排除妊娠合并心脑血管、肺、肝、肾等疾病,妊娠合并甲状腺等内分泌疾病及妊娠前即诊断为糖尿病者。本研究经河北省人民医院伦理委员会审批,所有研究对象均签署知情同意书。

1.2 细胞系与主要试剂 人脐静脉内皮细胞系(HUVEC)购自中国科学院上海细胞库;RPMI-1640、DMEM/HG、0.25 % 胰蛋白酶(美国 Hyclone 公司);Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司);胎牛血清(fetal bovine serum,FBS)、青链霉素混合液(均为 100 U/ml,杭州四季青生物公司);内皮细胞生长因子(美国 Sciencecell 公司);PCR 试剂盒(日本 TaKaRa);CD63 多克隆抗体(美国 Bioworld 公司);CD81、PLAP 及 GAPDH 单克隆抗体(美国 SantaCruz 公司);Transwell 小室(5 μm,美国 Millpore 公司);辣根过氧化酶标记(HRP)的二抗(广州晶彩);其他试剂均为国产分析纯。

1.3 方法

1.3.1 标本采集及提取胎盘外泌体 参考相关文献方法采集胎盘组织及提取胎盘外泌体[9-11],简述如下:胎盘娩出后立即剪取胎儿面约 10 g 绒毛组织,置于预冷的无菌生理盐水中并迅速带回实验室。含 5 % 青链霉素的无菌生理盐水反复漂洗绒毛组织后,无菌外科剪将其剪碎至约 10 mg 左右并置于去除外泌体的含 5% BSA 与 1% 青链霉素的 RPMI-1640 培养液中,于 37 ℃、5% CO_2 恒湿培养箱进行培养,24 h 后收集组织培养上清液进行外泌体提取。利用超速离心法分离胎盘组织块培养上清液中的外泌体。按下列顺序依次进行离心:4 000 r/min 离心 30 min,17 000 r/min 离心 25 min,上清液经 0.2 mm 滤网过滤后,取过滤液经110 000 r/min 离心 2 h。取底层沉淀,不含外泌体的 PBS 重悬后,经不连续蔗糖密度梯度(20% 与 40%)进行纯化,100 000 r/min 离心 4 h 后取中间层溶液加入 1/4 体积的 40% PEG6000,充分混匀后置于 37 ℃孵箱中进行孵育过夜,次日10 000 r/min 离心 1 h,沉淀物即为提取的胎盘外泌体。

1.3.2 外泌体的鉴定 取20 μl 不含外泌体的 PBS 稀释 10 μg 上述分离所得的胎盘外泌体,3.5% 的多聚甲醛固定后滴加到铜网上,2% 的铀酸盐染色,晾干后应用透射电子显微镜(transmission electron microscopy,TEM)观察外泌体形态;参考 Malvern 激光散射粒度测定仪的使用说明通过动态光散射(dynamic light scattering, DLS)测量外泌体的粒径大小及分布。应用 Western blot 实验检测外泌体标志性蛋白 CD81、CD63 及胎盘外泌体特征性蛋白分子 PLAP 的表达。

1.3.3 细胞培养 常规复苏 HUVEC 后使用含 10% FBS、1% 青链霉素与 10 ng/ml 内皮细胞生长因子的 DMEM/HG 培养液于 37 ℃、5% CO_2 恒温培养箱进行培养。待 HUVEC 贴壁生长融合至 80% 时,0.25% 的胰酶进行消化传代。

1.3.4 PKH67/DAPI 双染对外泌体进行标记及追踪 收集分离纯化的外泌体,根据 KPH67 试剂说明书进行标记外泌体,同时根据 DAPI 染料说明书将 HUVEC 进行染核,再将 KPH67 标记的外泌体加入到经 DAPI 染核的 HUVEC 中,于 37 ℃、5% CO_2 恒温培养箱进行培养 12 h,荧光共聚焦显微镜进行观察。

1.3.5 EdU 染色法及 CCK-8 实验检测外泌体对内皮细胞增殖能力的影响 取处于对数生长期的 HUVEC,细胞计数后以 4×10^4 个/孔接种于 24 孔板中,按“1.3.3”项下方法进行培养,待细胞生长融合至 60% 时,按加入胎盘外泌体浓度的不同将 HUVEC 分为 4 组:正常培养的对照组(negative control,NC 组),A 组为含 10 μg/ml 胎盘外泌体,B 组为含 20 μg/ml 胎盘外泌体;C 组为含 40 μg/ml 胎盘外泌体。① EdU 染色法:按 EdU 试剂说明书进行操作,用 DMEM/HG 按 1∶1 000稀释 EdU 溶液,并制成含 50 μmol/L EdU 的 DMEM/HG 培养液。上述各组细胞于 37 ℃、5% CO_2 恒温培养箱中培养 48 h 后,弃除培养液,PBS 轻轻洗涤细胞后,向每孔加入 4% 的多聚甲醛于室温下进行固定 30 min,弃除固定液,每孔加入 200 μl 含 2 mg/ml 的甘氨酸溶液充分振荡 5 min,弃除甘氨酸溶液后 PBS 洗涤细胞,每孔加入

200 μl Apollo 染色反应液进行避光孵育 30 min，加入 Hoechst3342 复染细胞核 30 min，置于荧光显微镜使用 550 nm 的激发光观察 Appolo567 染色，使用 350 nm 的激发光观察 Hoechst3342 染色，最后拍照计算细胞核（Hoechst）与增殖细胞（Appolo）染色的细胞数，Appolo/Hoechst 比值即为细胞增殖率。每组设置 5 个复孔，实验单独重复 3 次。② CCK-8 实验：取生长状态良好的 HUVEC，常规消化后调整细胞密度至 2×10^3 个/孔接种于 96 孔板中，并按上述于 37 ℃、5% CO_2 恒温培养箱中进行培养过夜后，按上述方法向每孔加入不同浓度的外泌体并将细胞分为 4 组，即 NC 组，A 组（10 μg/ml），B 组（20 μg/ml），C 组（40 μg/ml）及 10 μl CCK-8 试剂，分别于 0、12、36、48 h 后置于酶标仪 570 nm 波长处检测每孔吸光度值（OD_{570}），每个时间点每组设置 5 个复孔，并绘制各组细胞的生长曲线。

1.3.6 *内皮细胞划痕实验* 预先在 6 孔板每个孔的底部使用记号笔划 2 条间隔为 5 mm 的横线，再将处于对数生长期的 HUVEC 以 4×10^5 个/孔接种于 6 孔板中，并按“1.3.5”项下方法将细胞分为 NC 组、A 组、B 组及 C 组，按上述方法进行培养，待细胞生长融合至 80% 时使用 20 μl 移液器枪头在细胞培养面垂直于记号笔划线，PBS 冲洗细胞 3 次以去除刮除掉的细胞。再向每孔加入含不同浓度的外泌体培养液，于细胞培养箱中继续培养 24 h 后，倒置显微镜下拍摄，使用 Image J 软件测量细胞间距离进行分析。

1.3.7 *内皮细胞迁移实验* Martrigel 基质胶 4 ℃ 溶解后，用不含 FBS 的 RPMI-1640 培养基以 1∶8 进行稀释，并取 40 μl 稀释后的基质胶包被 Transwell 上室，于细胞培养箱中静置 4 h，待胶凝固后备用。取处于对数生长期的 HUVEC 细胞进行常规消化后，细胞计数后调整密度至 5×10^5 个/ml，取 200 μl 的细胞悬液接种至 24 孔板的 Transwell 上室中，将 Transwell 下室按“1.3.5”项下方法在 600 μl 的培养液中加入不同浓度的胎盘外泌体，即将细胞分为 NC 组、A 组、B 组及 C 组。每组设定 3 个复孔，于细胞培养箱培养 24 h。取出上室，PBS 冲洗 2 次，并用湿棉签轻轻擦拭小室上层未穿出细胞，无水酒精固定 15 min，室温下晾干，0.1% 的结晶紫于室温下染色 30 min，PBS 冲洗 2 次后于倒置显微镜下观察穿出的细胞数，每组随机选取 5 个视野进行计数。

1.3.8 *内皮细胞成管实验* 按上述“1.3.7”项下方法溶解、稀释基质胶后，取 40 μl 均匀平铺于 12 孔板中。取处于对数生长期的 HUVEC，将调整细胞密度至 2×10^4 个/孔接种至 12 孔板中，在 600 μl 的培养液中加入不同浓度的外泌体，并按“1.3.5”项下方法将细胞分为 NC 组、A 组、B 组及 C 组。每组设定 3 个复孔，于细胞培养箱培养 24 h 后，于显微镜下观察小管形成情况，计算形成的管样节点数。

1.3.9 *Western blot 实验* 分别应用外泌体 RNA/蛋白提取试剂盒和 RIPA 细胞裂解液与蛋白酶抑制剂进行提取胎盘外泌体和内皮细胞中的总蛋白。BCA 法进行蛋白定量，按照 1∶4 向上清液中加入 5×上样缓冲液，并于沸水中加热变性 10 min。取 30 μg 的蛋白进行聚丙烯酰胺凝胶（SDS-PAGE）电泳进行蛋白分离，采用湿转法将分离的蛋白转至 PVDF 膜上，5% 的脱脂牛奶于室温下封闭 2 h 后，分别加入 CD81（1∶500）、CD63（1∶500）、PLAP（1∶800）GAPDH（1∶1 000）一抗，4 ℃ 摇床孵育过夜。TBST 溶液清洗 3 次，5 min/次，以辣根酶标记的二抗（1∶5 000）室温孵育 1 h，以 TBST 溶液清洗 3 次，5 min/次。最后均匀滴加 ECL 发光液后于凝胶成像仪进行曝光拍照。Image J 软件测定条带灰度值，以目标蛋白与内参 GAPDH 的比值作为其相对含量。以上实验单独重复 3 次。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据分析，计量资料数据结果用 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用单因素方差分析（one-way ANOVA）的 LSD-t 事后检验进行分析。显著性检验水准 $\alpha=0.05$，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胎盘外泌体的培养及摄取 TEM 观察结果显示胎盘外泌体呈典型的圆形或椭圆形囊泡结构，直径为 40～130 nm（图 1A），DLS 粒径分析显示分离所得的外泌体多数分布在 49～131 nm 之间，主要集中在 80 nm（图 1B），Western blot 结果显示胎盘外泌体高表达外泌体特征性蛋白 CD81、CD63 及胎盘外泌体特征性蛋白分子抗体 PLAP（图 1C）。PKH67（绿色荧光）标记的胎盘外泌体与 DAPI（蓝色荧光）染核后的 HUVEC 共培养 12 h 后，共聚焦显微镜检测发现，PKH67 荧光标记的胎盘外泌体进入 HUVEC 细胞质内（图 1D）。

2.2 胎盘外泌体对内皮细胞增殖的影响 EdU 染色法及 CCK-8 检测结果表明 GDM 胎盘外泌体能够提高内皮细胞的增殖活性，且外泌体浓度越高其对内皮细胞的促增殖效应越强。其中 CCK8 实验结果显示：与 NC 组 36 h 及 48 h 的吸光度值比较［（0.41

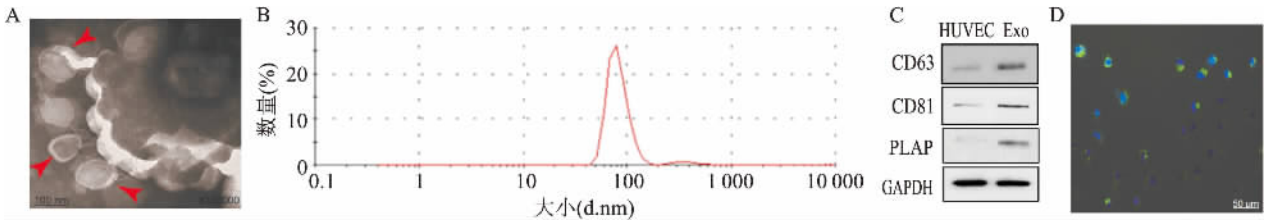

图 1　外泌体的鉴定及摄取

A: TEM 观察显示胎盘外泌体呈杯状或双凹状形态; B: DSL 结果显示分离纯化的胎盘外泌体在 80 nm 处形成单峰; C: Western blot 显示胎盘外泌体高表达 CD63、CD81、PLAP 标记蛋白; D: 共聚焦显微镜显示 DAPI(蓝色荧光)染核后的 HUVEC 能够摄取 PKH67(绿色荧光)标记的胎盘外泌体(免疫荧光染色 ×100)

±0.09),(0.48 ±0.07)],B 组和 C 组处理内皮细胞 36 h [(0.63 ±0.02),(0.71 ±0.04)]与 48 h [(0.77 ±0.10),(0.84 ±0.03)]后细胞的增殖活性升高,差异均有统计学意义(F = 14.66, P < 0.05),A 组对应细胞的增殖活性变化 [(0.44 ±0.05),(0.52 ±0.03)],差异无统计学意义(F = 2.76, P > 0.05);EdU 实验结果显示:与 NC 组细胞增殖率比较(12.14 ±7.03)%,B 组和 C 组的细胞增殖率 [(31.27 ±3.22)%,(33.56 ±9.10)%]增加(F = 11.02, P < 0.05),而 A 组细胞的增殖率(16.39 ±4.55)%变化差异无统计学意义(F = 4.05, P > 0.05),见图 2、3。

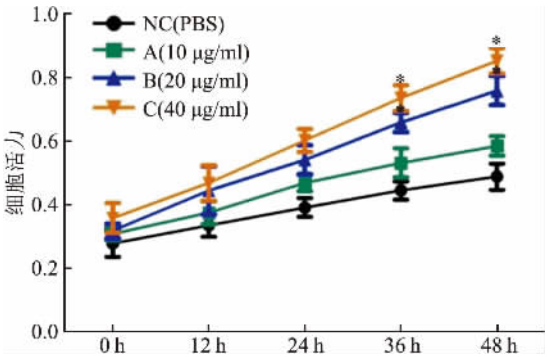

图 2　CCK-8 实验检测胎盘外泌体对内皮细胞增殖活性的影响

与 NC 组比较: * P < 0.05

2.3　胎盘外泌体对内皮细胞迁移及侵袭能力的影响

细胞划痕及侵袭实验结果表明,胎盘外泌体处理内皮细胞 24 h 后,能够促进内皮细胞的迁移及侵袭能力,且外泌体浓度越高其对内皮细胞的迁移及侵袭能力的促进作用越强。其中划痕实验结果显示:与 NC 组细胞的迁移距离(0.14 ±0.08) cm 比较,B 组迁移距离为(0.36 ±0.11) cm、C 组为(0.57 ±0.20) cm,差异均有统计学意义(F = 13.09, P <

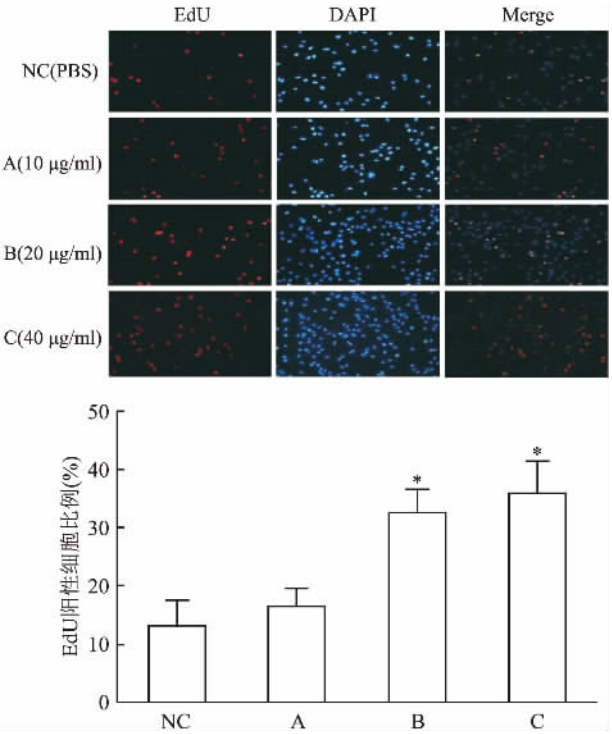

图 3　EdU 实验检测胎盘外泌体对内皮细胞增殖活性的影响　×40

与 NC 组比较: * P < 0.05

0.05),A 组迁移距离(0.16 ±0.03) cm,差异无统计学意义(F = 2.17, P > 0.05);Transwell 侵袭实验结果显示:与 NC 组侵袭细胞数(68.20 ±6.23)个比较,A 组侵袭细胞数为(122.00 ±9.47)个、B 组为(189.50 ±8.65)个、C 组为(189.60 ±10.49)个,这提示外泌体刺激内皮细胞 24 h 后,细胞的侵袭能力增强,差异均有统计学意义(F = 33.72, P < 0.05),见图 4、5。

2.4　胎盘外泌体对内皮细胞小管形成能力的影响

成管实验结果显示:胎盘外泌体处理内皮细胞 24 h 后,能够促进内皮细胞的成管能力,且外泌体浓度越高其成管能力的促进作用越强。其中与 NC 组细胞形成的节点(12.17 ±5.87)个比较,B 组为(55.90

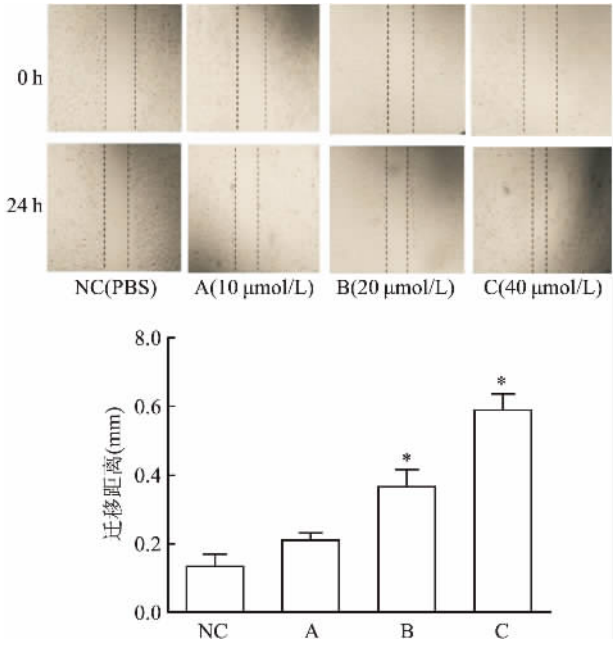

图 4 胎盘外泌体对内皮细胞迁移功能的影响

与 NC 组比较: $^{*}P<0.05$

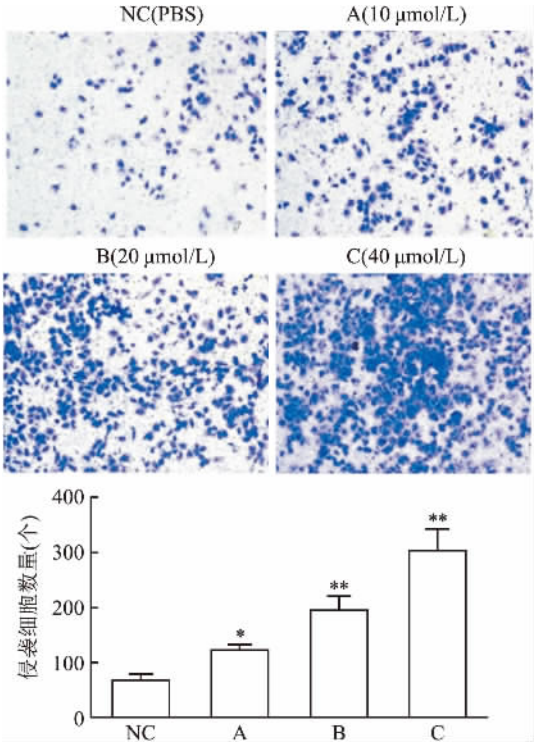

图 5 胎盘外泌体对内皮细胞侵袭功能的影响

与 NC 组比较: $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$

±12.55) 个、C 组为(81.41 ±15.03) 个,细胞的成管能力增强,差异均有统计学意义($F=44.36$, $P<0.05$),A 组细胞形成节点为(14.24 ±3.16) 个,成管能力与 NC 组比较差异无统计学意义($F=5.04$, $P>0.05$),见图 6。

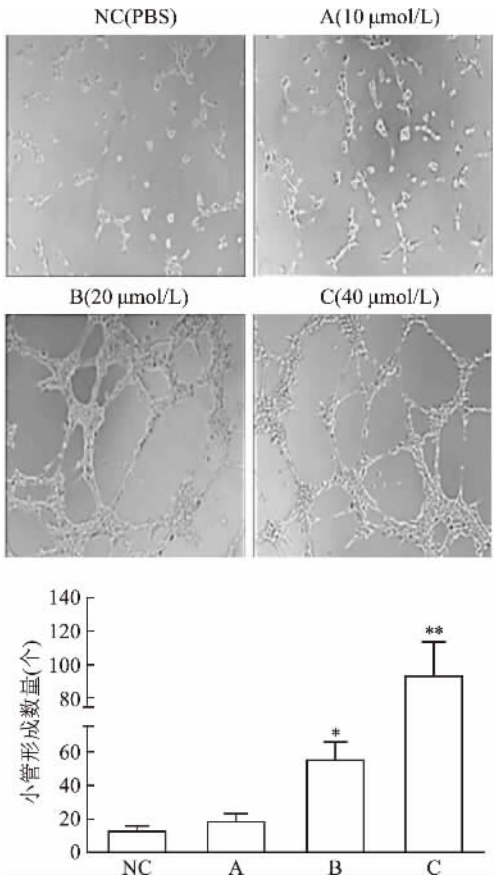

图 6 胎盘外泌体对内皮细胞成管能力的影响

与 NC 组比较: $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$

3 讨论

GDM 是妊娠期妇女常见的并发症,其常常伴发胎盘形态与功能的异常[12]。大量研究显示 GDM 患者的胎盘较正常胎盘组织呈现出过度增长状态,这与 GDM 孕产妇的新生儿体质量增加密切相关[13-14]。而血管内皮细胞作为糖尿病发展过程中敏感且易受损的细胞,其对 GDM 的发生发展起着重要的作用。

滋养层细胞作为胎盘组织主要的组成细胞,可分为绒毛滋养细胞(villous cytotrophoblasts,VCT) 与绒毛膜外滋养层细胞(extravillous cytotrophoblasts,EVT),其中 EVT 是胎盘锚定于母体蜕膜组织的关键成分,同时也是妊娠母血直接接触的胎盘细胞,所以目前胎盘外泌体的基础研究主要集中在 EVT[15]。外泌体作为细胞与组织间重要的信息载体,其能够将母体特征性生物信息物质(如蛋白、DNA、mRNA/miRNA/lncRNA、脂类等) 传递给靶细胞从而参与调控后者功能。已有研究证实妊娠期的胎盘组织能够

通过释放外泌体来介导母胎界面的免疫调节、子宫螺旋动脉的重塑及胎盘屏障的形成等重要事件[16-17]，如在用低氧(1%的氧浓度)模拟子痫前期(pre-eclampsia，PE)环境下，滋养细胞系 HTR-8/SV-neo 分泌的外泌体能够抑制血管内皮细胞的迁移，并诱导其释放高浓度的肿瘤坏死因子 α，而后者又能抑制滋养细胞的增殖并促进其发生凋亡并损害内皮细胞的结构，阻碍螺旋动脉的重铸，从而诱发 PE 的发生[18]。Pillay et al[19]进一步研究发现 PE 患者循环中胎盘外泌体的数量及所负载的信息物质均较正常孕妇存在显著变化，这提示胎盘外泌体可能在 PE 中具有重要的病理生理学作用，有望使其成为 PE 的诊断及预后的生物标记物；在妊娠期免疫耐受的相关研究中发现，胎盘外泌体表达的活化 NK 细胞受体 NKG2D 的第二配体，即 UL-16 结合蛋白(UL-16 Binding proteins，ULBP)可通过下调 NK 细胞、γδT 细胞表面的 NKG2D 受体表达从而降低上述免疫细胞的细胞毒性，进而诱导母体对胎儿免疫耐受，维持正常的妊娠过程[17]。此外，胎盘外泌体含有功能性的 Fas 配体和 TRAIL 分子，能够以剂量依赖性的方式诱导 T 细胞和外周单核细胞发生凋亡从而调节母体免疫状态[11]。而在 GDM 中，最新的研究发现 GDM 患者体内胎盘外泌体分泌水平与正常女性比较，其在孕早期升高 2.2 倍，孕中期增加 1.5 倍，孕晚期约增加 1.8 倍，这提示外泌体与 GDM 的病理生理学发生机制密切相关[20]。此外，Salomon et al[18]研究发现高糖、低氧环境更能促进人胎盘绒毛膜癌细胞 BEWO 对外泌体的释放。本研究首先结合胎盘组织块培养及超速离心法分离纯化胎盘外泌体，经透射电镜，DLS 粒径分析及 Western blot 进行鉴定，结果显示胎盘外泌体直径范围在 40～130 nm，80 nm 处形成唯一单峰。胎盘外泌体高表达外泌体特征性蛋白 CD81、CD63 及胎盘外泌体特征性蛋白 PLAP，后者是 EVT 分泌的特异性蛋白，其仅存在于妊娠妇女中。KH67/DAPI 双染色实验表明胎盘外泌体能够被内皮细胞所摄取。随后我们继续探究胎盘外泌体对血管内皮细胞增殖、迁移、侵袭及成管能力的影响，结果显示胎盘外泌体能够以浓度依赖性发挥对内皮细胞上述功能的促进作用，即浓度越高，胎盘外泌体对内皮细胞的增殖、迁移、侵袭及成管能力的促进作用越强。这与既往对 GDM 患者中胎盘外泌体的功能研究一致。

综上所述，GDM 患者胎盘外泌体能够显著促进内皮细胞的增殖、迁移、侵袭及成管能力，从而促进 GDM 的发展。然而外泌体在细胞间通过其所包裹的蛋白质、脂质、mRNA、miRNA 等发挥作用，如在 Shen et al[21]研究发现 PE 患者胎盘外泌体通过 miR-155 抑制内皮细胞表达具有舒张血管作用的内皮型一氧化氮合酶(eNOS)，从而导致血管收缩，血压升高。在 GDM 中研究发现，GDM 患者胎盘外泌体特异性 C19MC miRNA，包括-518a-5p、-518b、-518c 等表达显著增加，其可能对 GDM 的发生发展密切相关[20]。本课题组将会在后续研究中深入探究 GDM 外泌体具体通过何种分子发挥对内皮细胞的上述功能影响，以期进一步揭示 GDM 的发生发展机制，为临床更好地预防及治疗 GDM 提供理论基础。

参考文献

[1] Dias S, Pheiffer C, Abrahams Y, et al. Molecular biomarkers for gestational diabetes mellitus[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(10): 2926-47.

[2] Muche A A, Olayemi O O, Gete Y K. Effects of gestational diabetes mellitus on risk of adverse maternal outcomes: a prospective cohort study in Northwest Ethiopia[J]. BMC Pregnancy Childbirth, 2020, 20(1): 73-84.

[3] Lee K W, Ching S M, Hoo F K, et al. Neonatal outcomes and its association among gestational diabetes mellitus with and without depression, anxiety and stress symptoms in malaysia: a cross-sectional study[J]. Midwifery, 2020, 7(18): 102586-3341.

[4] Sibley C P, Brownbill P, Glazier J D, et al. Knowledge needed about the exchange physiology of the placenta[J]. Placenta, 2018, 11(64 Suppl 1): S9-15.

[5] Akarsu S, Bagirzade M, Omeroglu S, et al. Placental vascularization and apoptosis in Type-1 and gestational DM[J]. J Matern Fetal Neonatal Med, 2017, 30(9): 1045-50.

[6] Saez T, De Vos P, Sobrevia L, et al. Is there a role for exosomes in foetoplacental endothelial dysfunction in gestational diabetes mellitus? [J]. Placenta, 2018, 22(61): 48-54.

[7] Burton G J, Fowden A L. The placenta: a multifaceted, transient organ[J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2015, 370(1663): 1-8.

[8] 谢 兴，孔北华，段 涛. 妇产科学[M]. 9 版. 北京：人民卫生出版社，2018: 105-10.

[9] Hedlund M, Stenqvist A C, Nagaeva O, et al. Human placenta expresses and secretes NKG2D ligands *via* exosomes that down-modulate the cognate receptor expression: evidence for immunosuppressive function[J]. J Immunol, 2009, 183(1): 340-51.

[10] 李玉静. 重度子痫前期胎盘外泌体影响滋养细胞及内皮细胞

功能的初步研究[D]. 南京:东南大学,2015.

[11] Stenqvist A C, Nagaeva O, Baranov V, et al. Exosomes secreted by human placenta carry functional Fas ligand and TRAIL molecules and convey apoptosis in activated immune cells, suggesting exosome-mediated immune privilege of the fetus[J]. J Immunol, 2013,191(11):5515 - 23.

[12] Edu A, Teodorescu C, Dobjanschi C G, et al. Placenta changes in pregnancy with gestational diabetes[J]. Rom J Morphol Embryol,2016,57(2):507 - 12.

[13] Kc K, Shakya S, Zhang H. Gestational diabetes mellitus and macrosomia: a literature review[J]. Ann Nutr Metab,2015,66(14 Suppl 2) :14 - 20.

[14] Tryggestad J B, Vishwanath A, Jiang S, et al. Influence of gestational diabetes mellitus on human umbilical vein endothelial cell miRNA[J]. Clin Sci (Lond),2016,130(21):1955 - 67.

[15] Pillay P, Moodley K, Moodley J, et al. Placenta-derived exosomes: potential biomarkers of preeclampsia[J]. Int J Nanomedicine,2017,12(19):8009 - 23.

[16] Saez T, De Vos P, Sobrevia L, et al. Is there a role for exosomes in foetoplacental endothelial dysfunction in gestational diabetes mellitus? [J]. Placenta,2018,61(21):48 - 54.

[17] Delorme-Axford E, Donker R B, Mouillet J F, et al. Human placental trophoblasts confer viral resistance to recipient cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A,2013,110(29):12048 - 53.

[18] Salomon C, Ryan J, Sobrevia L, et al. Exosomal signaling during hypoxia mediates microvascular endothelial cell migration and vasculogenesis[J]. PLoS One,2013,8(7):e68451.

[19] Pillay P, Moodley K, Moodley J, et al. Placenta-derived exosomes: potential biomarkers of preeclampsia[J]. Int J Nanomedicine,2017,12(1):8009 - 23.

[20] Iljas J D, Guanzon D, Elfeky O, et al. Review: Bio-compartmentalization of microRNAs in exosomes during gestational diabetes mellitus[J]. Placenta,2017,54:76 - 82.

[21] Shen L, Li Y, Li R, et al. Placenta associated serum exosomal miR 155 derived from patients with preeclampsia inhibits eNOS expression in human umbilical vein endothelial cells[J]. Int J Mol Med, 2018,41(3):1731 - 9.

Effects of placental exosomes from gestational diabetes mellitus on vascular function of endothelial cells

Zhang Yanshang, Li Li, Huo Yan, et al

(*Dept of Obstetrics, Hebei Provincial People's Hospital, Shijiazhuang* 050051)

Abstract ***Objective*** To investigate the effects of placenta derived exosomes on the proliferation, invasion, migration and tube formation capacity of vascular endothelial cells in gestational diabetes mellitus (GDM). ***Methods*** Placental exosomes were obtained by using the method of *in vitro* culture of placental mass and hypervelocity centrifugation. Transmission electron microscopy (TEM), dynamic light scattering (DLS) and Western blot were used to identify those exosomes; Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were cultured *in vitro*. The uptake of exosomes by HUVEC was detected by fluorescence confocal microscopy after double staining; CCK-8 and EdU, scratch and Transwell invasion and tube formation assay were used to detect the effects of different concentrations of exosomes on the proliferation, migration, invasion and angiogenesis of endothelial cells. ***Results*** The placental exosomes with diameters ranging from 40 to 130 nm were successfully isolated. The isolated and purified placenta exosomes could be absorbed by endothelial cells and could promote the proliferation, migration, invasion and tube forming ability of endothelial cells in a concentration dependent manner. ***Conclusion*** The exosomes from placental tissue of gestational diabetes mellitus can promote the proliferation, migration, invasion and tube forming ability of endothelial cells.

Key words gestational diabetes mellitus; placenta exosomes; endothelial cells