

网络出版时间: 2021-2-5 14:11 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20210205.1050.014.html>

miR101 调控 EZH2 抑制胎盘滋养细胞葡萄糖吸收参与妊娠糖尿病机制研究

王圆圆¹, 王明胜², 赵玉洁², 石中华³

摘要 目的 研究 miR101 通过调节组蛋白甲基转移酶同源序列 2 增强子(EZH2)蛋白对胎盘滋养细胞葡萄糖吸收的影响,以及 miR101 在妊娠期糖尿病(GDM)中的可能作用机制。方法 选取 GDM 孕妇和正常孕妇各 30 例分别作为观察组和对照组,qRT-PCR 检测胎盘组织 miR101 和 EZH2 mRNA 表达,Western blot 检测胎盘组织中 EZH2 蛋白表达。取人绒毛膜滋养层细胞转染 miR101 模拟物、miR101 模拟物对照序列、miR101 抑制剂和 miR101 抑制剂对照序列分别作为 M 组、M-NC 组、I 组和 I-NC 组,设立空白对照 B 组,每组设立 6 个平行复孔。qRT-PCR 检测转染细胞 miR101、EZH2 mRNA 表达量,Western blot 检测转染细胞 EZH2 蛋白表达量,葡萄糖测定试剂盒检测转染细胞对葡萄糖的吸收量。结果 观察组 miR101 表达水平高于对照组($t=5.433, P<0.05$),EZH2 表达水平低于对照组($t=2.178, P<0.05$)。细胞转染后:①M 组 miR101 表达水平较 B 组和 M-NC 组上升($t=2.133, 2.167, P<0.05$),I 组转染 miR101 表达水平较 B 组和 I-NC 组下降($t=2.918, 2.331, P<0.05$);②M 组 EZH2 蛋白表达水平较 B 组和 M-NC 组下降($t=2.018, 2.257, P<0.05$),I 组转染 EZH2 蛋白表达水平较 B 组和 I-NC 组升高($t=3.271, 3.167, P<0.05$);③M 组葡萄糖消耗量较 B 组和 M-NC 组升高($t=3.106, 2.115, P<0.05$),I 组葡萄糖消耗量较 B 组和 I-NC 组降低($t=2.002, 2.158, P<0.05$)。结论 GDM 患者胎盘组织中 miR101 表达异常升高,miR101 可调控 EZH2 表达降低胎盘滋养细胞对葡萄糖吸收量,参与 GDM 病理机制。

关键词 miR101; EZH2; 胎盘滋养细胞; 葡萄糖吸收; 妊娠糖尿病

中图分类号 R 320

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2021)03-0413-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.03.015

妊娠糖尿病(gestational diabetes mellitus, GDM)

2020-09-11 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81571458)

作者单位: ¹ 遵义医学院附属医院 遵义 563000

² 贵州医科大学附属医院 遵义 563000

³ 南京医科大学附属南京妇幼保健院 南京 210000

作者简介: 王圆圆,女,主治医师;

石中华,男,副主任医师,博士,责任作者, E-mail:

zhizhongh556@163.com

是指孕妇在妊娠期间发生或发现糖耐量减低,是产科常见的并发症。研究显示 GDM 给母婴带来极大的危害,高血糖可使胚胎发育异常或死亡,并且流产发生率极高^[1],GDM 孕妇妊娠期高血压疾病和后期糖尿病发生风险比非糖尿病孕妇高^[2-3]。目前 GDM 主要以降糖药物治疗为主,虽然具有一定疗效但安全性仍有很大的争议。近年来,多数学者热衷于从分子机制探讨 GDM 发病机制,如研究发现 miR-29、miR-200a 和 miR-426 等小分子物质在 GDM 患者与非 GDM 中表达水平存在差异^[4-5],抑制 miR-29b 表达可上调缺氧诱导因子 3A 基因表达进一步促进胎盘滋养层细胞的增殖、迁移和侵袭^[6]。微小 RNA(microRNA)具有调控 RNA 转录水平功能的微小 RNA,通过调节蛋白质编码基因的表达而作用于生物体内细胞,从而使目的基因 mRNA 翻译受到抑制或 mRNA 降解。miR101 家族是高度保守的 microRNA,可调节多种基因的表达,研究^[7]显示 miR101 过表达可下调组蛋白甲基转移酶同源序列 2 增强子(Enhancer of histone methyltransferase homologue 2, EZH2)和 MYC 基因表达从而能抑制乳腺癌细胞的增殖。EZH2 可抑制染色质中的靶基因,与细胞生长调节有关。有学者^[8-9]认为胎盘滋养细胞的功能障碍可能与妊娠期高血压、GDM、胎儿生长受限、流产等妊娠并发症密切相关,胎盘滋养细胞对葡萄糖吸收与妊娠糖尿病具有一定关联。本研究旨在观察 miRNA101 影响 EZH2 表达水平及胎盘滋养细胞葡萄糖吸收情况,探讨 miRNA101 在妊娠期糖尿病中的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 病例资料 选取 2018 年 1 月—2018 年 5 月在遵义医学院附属医院就诊的 GDM 孕妇 30 例和正常孕妇 30 例分别作为观察组和对照组,孕妇在妊娠 24~28 周进行口服葡萄糖耐量试验(OGTT),符合以下 1 项或以上的诊断标准即可诊断为 GDM:空腹 ≥ 5.1 mmol/L; 1 h 血糖 ≥ 10.0 mmol/L; 2 h 血糖 ≥ 8.5 mmol/L。观察组和对照组在年龄、胎次等资料

上具有可比性,差异无统计学意义,两组孕妇均为单胎,既往均无高血压、糖尿病、肾病及心血管疾病病史。所有患者均需签订知情同意书,并表示愿意积极配合研究工作,本研究经过医院伦理委员会批准同意,符合伦理要求。

1.2 方法

1.2.1 样本收集 在孕妇分娩后立即剪取胎盘母体面小叶处组织,分为4份并用PBS洗涤液洗净,置于 -80°C 冰箱储存备用,用10%甲醛固定。

1.2.2 qRT-PCR 检测胎盘组织 miR101 和 EZH2 mRNA 表达 严格按照各试剂盒和仪器说明书进行实验操作,利用 qRT-PCR 检测胎盘组织中 miR101 和 EZH2 mRNA 表达水平。

1.2.3 Western blot 检测胎盘组织中 EZH2 蛋白表达 将各组细胞加入裂解缓冲液 30 min,用离心机离心 10 min 4°C 、12 000 r/min,提取各组细胞的总蛋白。按照说明书方法,利用 Western blot 检测胎盘组织中 EZH2 蛋白表达水平。

1.3 细胞实验

1.3.1 细胞培养 取人绒毛膜滋养层细胞培养于含 10% 胎牛血清、双抗青霉素/链霉素液、高糖培养基中培养,置于 37°C 、5% CO_2 的培养箱培养。

1.3.2 细胞转染 取 miR101 mimics、miR101 mimics NC 系列、miR101 inhibitor 及 miR101 inhibitor NC 系列对上述培养的人绒毛膜滋养层细胞进行转染,将培养细胞置于按 3×10^5 个/孔接种于 6 孔板中,严格按照 LipofectamineTM 2000 说明书操作,加入 1.5 μl miR101 mimics (M 组)、miR101 mimics NC (M-NC 组)、miR101 inhibitor (I 组) 及 miR101 inhibitor NC (I-NC 组) 进行细胞转染,同时设立空白对照组 (B 组) 48 h 后收集转染细胞进行后续实验。

1.3.3 qRT-PCR 检测转染细胞 miR101 和 EZH2 mRNA 表达 严格按照各试剂盒和仪器说明书进行实验操作,利用 qRT-PCR 检测转染细胞 miR101 和 EZH2 mRNA 表达水平。

1.3.4 Western blot 检测转染细胞 EZH2 蛋白表达 提取各组细胞的总蛋白,按照说明书方法,利用 Western blot 检测转染细胞 EZH2 蛋白表达水平。

1.3.5 转染细胞葡萄糖消耗量检测 取各组细胞接种于 96 孔培养板中,培养 24 h 后,取各组细胞的培养上清液,用葡萄糖测定试剂盒检测细胞对葡萄糖的吸收量,计算各组转染细胞葡萄糖消耗量(葡萄糖消耗量 = 培养基葡萄糖含量 - 24 h 后所测葡萄糖含量)。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 22.0 软件进行数据分析,进行方差齐性检验和正态性检验,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。单变量两组资料之间的比较采用 t 检验;多组资料之间的比较采用单因素方差分析,两两比较行 LSD- t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胎盘组织 miR101 表达 qRT-PCR 结果显示,观察组胎盘组织 miR101 表达水平高于对照组($t = 5.433$ $P < 0.05$) (图 1)。

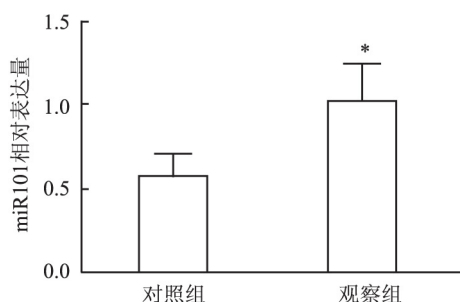


图 1 2 组 miR101 表达水平比较
与对照组比较: * $P < 0.05$

2.2 胎盘组织 EZH2 表达 qRT-PCR 结果显示,观察组胎盘组织 EZH2 mRNA 表达水平低于对照组($t = 2.352$ $P < 0.05$) (图 2A),Western blot 检测结果显示,观察组胎盘组织 EZH2 蛋白表达水平低于对照组($t = 2.178$ $P < 0.05$) (图 2B、图 3)。

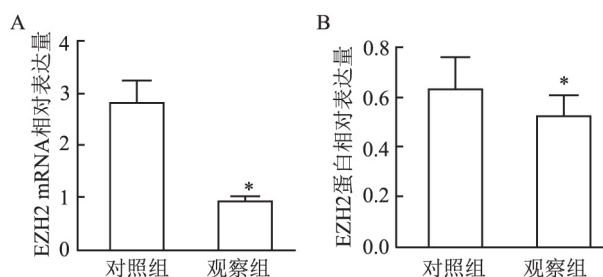


图 2 2 组 EZH2 表达水平比较

A: EZH2 mRNA 相对表达量; B: EZH2 蛋白相对表达量; 与对照组比较: * $P < 0.05$

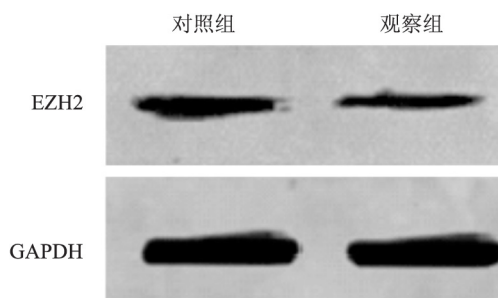


图 3 Western blot 检测胎盘组织 EZH2 蛋白表达

2.3 细胞转染后 miR101 表达 qRT-PCR 结果显示(图4), miR101 表达水平在 B 组、M-NC 组和 M 组差异有统计学意义($F = 27.302, P < 0.05$), M 组高于 B 组($t = 2.133, P < 0.05$), M 组高于 M-NC 组($t = 2.167, P < 0.05$)。miR101 表达水平在 B 组、I-NC 组和 I 组差异有统计学意义($F = 16.499, P < 0.05$), I 组低于 B 组($t = 2.918, P < 0.05$), I 组低于 I-NC 组($t = 2.331, P < 0.05$)。

2.4 细胞转染后 EZH2 表达 qRT-PCR 结果显示(图5A、B), EZH2 mRNA 表达水平在 B 组、M-NC 组和 M 组差异有统计学意义($F = 15.381, P < 0.05$), B 组高于 M 组($t = 3.266, P < 0.05$), M-NC 组高于

M 组($t = 3.190, P < 0.05$); EZH2 mRNA 表达水平在 B 组、I-NC 组和 I 组差异有统计学意义($F = 9.463, P < 0.05$), B 组低于 I 组($t = 2.276, P < 0.05$), I-NC 组低于 I 组($t = 2.176, P < 0.05$)。Western blot 检测结果显示(图5C、D,图6), EZH2 蛋白表达水平在 B 组、M-NC 组和 M 组差异有统计学意义($F = 17.593, P < 0.05$), B 组高于 M 组($t = 2.018, P < 0.05$), M-NC 组高于 M 组($t = 2.257, P < 0.05$); EZH2 蛋白表达水平在 B 组、M-NC 组和 M 组差异有统计学意义($F = 21.748, P < 0.05$), B 组低于 I 组($t = 3.271, P < 0.05$), I-NC 组低于 I 组($t = 3.167, P < 0.05$)。

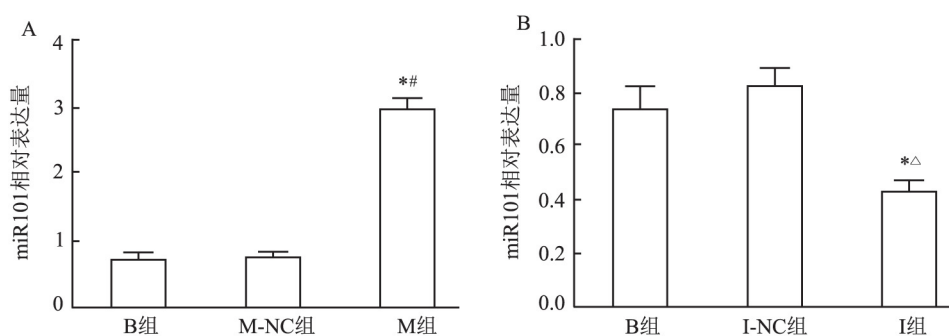


图4 细胞转染后 miR101 表达水平

A: miR101 mimics 转染后 miR101 表达水平; B: miR101 inhibitor 转染后 miR101 表达水平; 与 B 组比较: * $P < 0.05$; 与 M-NC 组: # $P < 0.05$; 与 I-NC 组比较: △ $P < 0.05$ 。

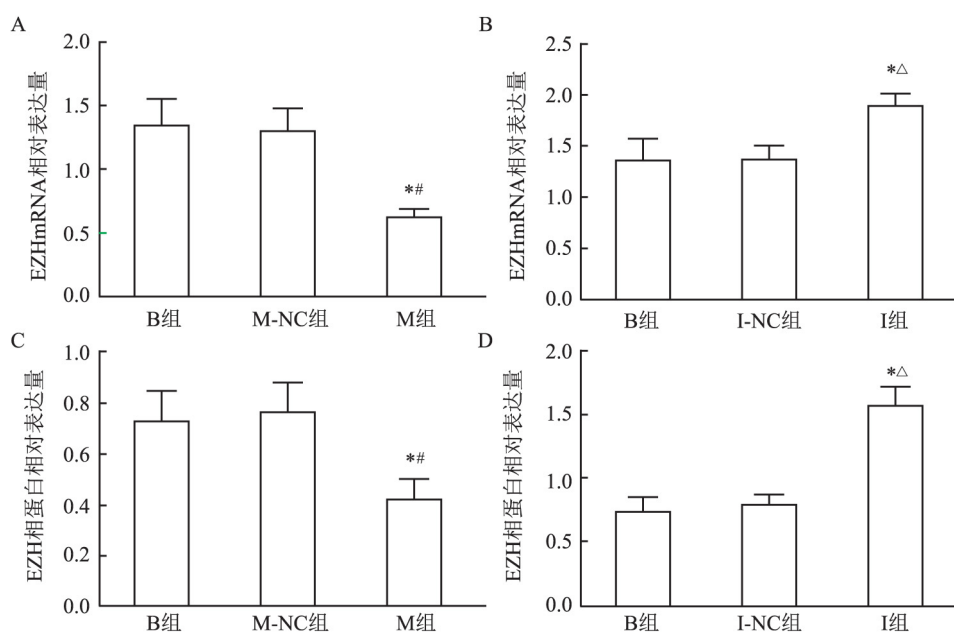


图5 细胞转染后 EZH2 表达水平

A: miR101 mimics 转染后 EZH2 mRNA 表达水平; B: miR101 inhibitor 转染后 EZH2 mRNA 表达水平; C: miR101 mimics 转染后 EZH2 蛋白表达水平; D: miR101 inhibitor 转染后 EZH2 蛋白表达水平; 与 B 组比较: * $P < 0.05$; 与 M-NC 组: # $P < 0.05$; 与 I-NC 组比较: △ $P < 0.05$

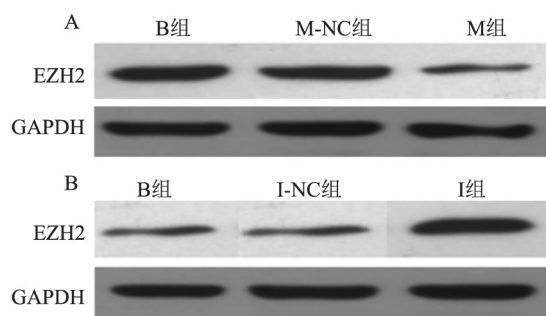


图6 Western blot 检测各组转染细胞 EZH2 蛋白表达

A: miR101 mimics 转染后 EZH2 蛋白表达; B: miR101 inhibitor 转染后 EZH2 蛋白表达

2.5 细胞转染后葡萄糖吸收情况 B 组 (1.26 ± 0.20) mmol/L、M-NC 组 (1.22 ± 0.12) mmol/L 和 M 组 (1.75 ± 0.21) mmol/L 葡萄糖消耗量差异有统计学意义 ($F = 12.523, P < 0.05$) , M 组高于 B 组和 M-NC 组 ($t = 3.106, 2.115$, 均 $P < 0.05$) 。 B 组、I-NC 组 (1.13 ± 0.27) mmol/L 和 I 组 (0.68 ± 0.09) mmol/L 葡萄糖消耗量差异有统计学意义 ($F = 31.161, P < 0.05$) I 组低于 B 组和 I-NC 组 ($t = 2.002, 2.158, P < 0.05$) 。

3 讨论

GDM 的病因极为复杂,迄今为止仍未得以完全阐明。研究^[10]表明遗传基因、炎症因子、脂肪细胞因子和胰岛素抵抗是其主要病因,尤其是胰岛素抵抗患者在 GDM 的发病中有着重大作用。胰岛素抵抗的产生主要原因是靶组织对胰岛素的敏感性降低,持续性的胰岛素抵抗会造成胰岛 β 细胞的胰岛素分泌绝对或相对不足,进而引起糖尿病的发生。

miRNAs 是调控靶向基因的小分子非编码 RNA,在细胞增殖、分化和代谢中扮演了重要的角色^[11],多项研究表明 miRNAs 参与多种疾病病理机制。目前,在 miRNAs 与 GDM 关联研究中,多数学者的观点都支持 GDM 发病与 miRNAs 调控靶向基因相关,尽管发病相关机制不是很明确,但通过体外实验和模拟实验可证实它们存在一定联系。miR101 作为 microRNA 的一种,学者对其研究比较深入,以往研究中 miR101 被认为是促癌基因,miR101 过表达会促进卵巢癌细胞和肺癌细胞的增殖^[12-13]。安丽等^[14]在总结 miR101 与脂质代谢关联研究中,提到 miR101 与 2 型糖尿病和 GDM 发生息息相关。EZH2 是由组蛋白、赖氨酸、N-甲基转移酶组成的核心蛋白复合体,与细胞生长调节有关。

有多项研究^[7,15]证实,miR101 可通过调控 EZH2 表达参与调控多种疾病的进展。

本研究结果显示,GDM 患者胎盘组织 miR101 表达水平更高,而 EZH2 表达水平下降,提示 miR101 过表达可能是 GDM 发病的潜在风险。为了进一步验证 GDM 与 miR101 的相关性,开展了体外细胞实验,给人绒毛膜滋养层细胞转染 miR101 mimics 和 miR101 inhibitor 试剂,通过上调和抑制 miR101 的表达观察 EZH2 表达和细胞对葡萄糖吸收量的影响。结果表明过表达的 miR101 能抑制 EZH2 表达,促进细胞吸收葡萄糖,抑制 miR101 表达呈现出相反的结果。因此推测,过表达的 miR101 可下调 EZH2 表达,EZH2 表达水平下降使胎盘滋养层细胞发生胰岛素抵抗,从而导致葡萄糖吸收受到影响。

综上,miR101 可能通过调控 EZH2 表达降低胎盘滋养细胞对葡萄糖吸收量,参与 GDM 病理机制。该研究仍有不足之处,研究人群样本量相对较少,不具有群体代表性,有些微小效应仍未观察到,进一步了解该分子机制仍需要构建动物模型进行验证。

参考文献

- [1] 赖梦宇,王育璠.持续葡萄糖监测在妊娠期高血糖中的应用进展[J].中国医学前沿杂志(电子版)2018,10(9):15-20.
- [2] 胡雅琼.妊娠期糖尿病与妊娠期高血压疾病两者之间的相互关系[J].实用妇科内分泌电子杂志2019,6(8):72-5.
- [3] 杨幼林,赵荷兰,安利红,等.妊娠期糖尿病产妇产后糖尿病发生情况及危险因素研究[J].实用预防医学2017,24(6):696-8.
- [4] 倪雯,刘佳,张弘睢.miR-29、miR-200a 在妊娠期糖尿病患者外周血中表达及临床意义[J].中国计划生育学杂志,2018,26(10):947-50.
- [5] 王青,寇莉,李小林.妊娠期糖尿病孕妇血清 miR-426、sV-CAM-1 水平与血脂代谢的相关性[J].中国计划生育学杂志,2018,26(12):1245-8.
- [6] 孙大光.MiR-29b 与妊娠期糖尿病的相关性及其分子机制的研究[D].北京:北京协和医学院,2017.
- [7] 庞亚梅,王翠翠,李岁萍,等.miR-401、EZH2 和 MYC 调控乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖能力的机制[J].现代肿瘤医学,2018,26(18):2832-7.
- [8] Lv S, Wang N, Lv H, et al. The attenuation of trophoblast invasion caused by the downregulation of EZH2 is involved in the pathogenesis of human recurrent miscarriage [J]. Mol Ther Nucleic Acids 2019,14:377-87.
- [9] Aires M B, Dos Santos A C. Effects of maternal diabetes on trophoblast cells [J]. World J Diabetes, 2015, 6(2):338-44.
- [10] 韦红霞.妊娠期糖尿病发病机制及治疗进展[J].世界最新医学信息文 2016,16(8):65-6,69.

- [11] McCall M N , Kim M S , Adil M , et al. Toward the human cellular microRNAome[J]. *Genome Res* , 2017 27(10) : 1769 – 81.
- [12] 孙连碧, 曹东华, 任忠名, 等. 过表达 miR-101 对卵巢癌 SKOV3 细胞增殖和迁移的影响及可能机制[J]. *解剖学研究* 2018 40 (5) : 385 – 9.
- [13] 韩 乐. MiR-101 靶向调控 E 盒锌指蛋白 1(ZEB1) 抑制肺癌生长和转移的作用与机制研究[D]. 西安: 中国人民解放军空军军医大学 2018.
- [14] 安 丽, 王秋月. MiR-101 在器官纤维化及糖脂代谢中作用机制的研究进展[J]. *医学综述* 2016 22(21) : 4189 – 92.
- [15] Tsou P S , Campbell P , Amin M A , et al. Inhibition of EZH2 prevents fibrosis and restores normal angiogenesis in scleroderma[J]. *Proc Natl Acad Sci USA* 2019 , 116(9) : 3695 – 702.

miR101 regulates EZH2 to inhibit glucose absorption by placental trophoblasts and its mechanism in gestational diabetes

Wang Yuanyuan¹ , Wang Mingsheng² , Zhao Yujie² , et al

(¹ *The Affiliated Hospital of Zunyi Medical College , Zunyi 563000;*

² *Affiliated Hospital of Guizhou Medical University , Zunyi 563000*)

Abstract Objective To study the effect of miR101 on glucose absorption in placental trophoblast by regulating EZH2 protein , and the possible mechanism of miRNA101 in gestational diabetes mellitus(GDM) . **Methods** The total of 30 pregnant women with GDM and 30 normal pregnant women were selected as the observation group and the control group respectively. The expression of miR101 and EZH2 mRNA in placental tissue was detected by qRT-PCR , and the expression of EZH2 protein in placental tissue was detected by Western blot. Human chorionic trophoblast cells were transfected with mir101 mimic , mir101 mimic control sequence , mir101 inhibitor and mir101 inhibitor control sequence as M group , M-NC group , I group and I-NC group respectively. Blank control group B was set up with 6 parallel multiple pores in each group. qRT-PCR was used to detect miR101 and EZH2 mRNA expression. Western blot was used to detect EZH2 protein expression , and glucose detection kit was used to detect glucose uptake. **Results** The expression level of miR101 in the observation group was significantly higher than that in the control group ($t = 5.433$, $P < 0.05$) , and the expression level of EZH2 in the observation group was lower than that in the control group ($t = 2.178$, $P < 0.05$) . After cell transfer: ① The expression level of miR101 in group M was significantly higher than that in group B and M-NC ($t = 2.133$, 2.167 , $P < 0.05$) . The expression level of miR101 in group M was significantly lower than that in group B and I-NC ($t = 2.918$, 2.331 , $P < 0.05$) . ② The expression of EZH2 in group M was significantly lower than that in group B and M-NC ($t = 2.018$, 2.257 , $P < 0.05$) . The expression level of EZH2 in group M was significantly lower than that in group B and I-NC ($t = 3.271$, 3.167 , $P < 0.05$) . ③ Glucose consumption in group M was lower than that in group B and M-NC ($t = 3.106$, 2.115 , $P < 0.05$) . Glucose consumption in group M was higher than that in group B and I-NC ($t = 2.002$, 2.158 , $P < 0.05$) . **Conclusion** The expression of miR101 in patients with GDM placental trophoblast abnormally increase. MiR101 could regulate the expression of EZH2 and decrease the absorption of glucose by placental trophoblasts , which was involved in the pathological mechanism of GDM.

Key words miR101; EZH2; placental trophoblast; glucose absorption; gestational diabetes mellitus