

网络出版时间: 2019-09-3 17:26 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20190830.1434.019.html>

TGF- β 1 通过调节 HMGA1 表达抑制人滋养层 HTR-8/SVneo 细胞侵袭

刘 昕¹, 李鹏云¹, 高峻峻¹, 李爱萍², 冷茂东¹, 张琳琳¹, 张 展¹

摘要 目的 研究 HMGA1 在转化生长因子 β 1 (TGF- β 1) 抑制人滋养层 HTR-8/SVneo 细胞侵袭过程中的作用。方法

① 培养 HTR-8/SVneo 细胞株,以 5 ng/ml TGF- β 1 作用 0、6、12、24、36 h,采用实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 及 Western blot 法检测 HMGA1 的表达情况。② 培养 HTR-8/SVneo 细胞株,先经 PI3K/AKT 信号通路抑制剂 Wortmannin (0.1 μ mol/L) 预处理或不处理 1 h,再用 5 ng/ml TGF- β 1 处理或不处理 24 h,采用 Real-time PCR 及 Western blot 法检测 HMGA1、P-Akt、Akt 的表达情况。③ 培养 HTR-8/SVneo 细胞株,按分组转染沉默 HMGA1 的 siRNA 和 TGF- β 1 5 ng/ml 处理或不处理 24 h,使用 Transwell 侵袭实验检测各组侵袭力的变化。结果 各时间点 5 ng/ml 浓度的 TGF- β 1 均能够促进 HTR-8/SVneo 细胞表达 HMGA1,而处理 24 h 后 HMGA1 的表达量最高。5 ng/ml 的 TGF- β 1 处理 HTR-8/SVneo 细胞 24 h 后,TGF- β 1 明显上调了 Akt、P-Akt、HMGA1 的蛋白表达水平,而加入 PI3K/AKT 通路抑制剂 Wortmannin (0.1 μ mol/L) 后,TGF- β 1 对 Akt、P-Akt、HMGA1 蛋白表达水平的上调作用受到抑制 ($P < 0.05$)。Transwell 实验结果表明,与 TGF- β 1 5 ng/ml 处理组比较,TGF- β 1 5 ng/ml + siHMGA1 组侵袭细胞数明显增多 ($P < 0.05$)。结论 TGF- β 1 上调 HTR-8/SVneo 细胞中 HMGA1 表达,可能通过 PI3K/AKT 信号通路。TGF- β 1 通过调节 HMGA1 表达抑制人滋养层 HTR-8/SVneo 细胞侵袭。

关键词 高迁移率族蛋白 A1; HTR-8/SVneo; TGF- β 1

中图分类号 R 392.9

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)10-1584-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.10.018

子痫前期 (pre-eclampsia, PE) 是以高血压、蛋白尿为主要表现的一组妊娠期症候群^[1]。研究^[2]表明,胎盘发育过程中滋养细胞侵袭能力减弱导致的子宫螺旋动脉重塑不足是 PE 的主要诱发因素之一。多因素均调节绒毛外滋养层细胞 (extravillous

trophoblast, EVT) 入侵蜕膜和子宫肌层的过程,包括环境因素、细胞因子等。其中转化生长因子 β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) 是一类多功能的细胞因子,通过多种机制影响滋养细胞侵袭能力,导致胎盘发育异常,进而参与 PE 的发病进程。研究^[3]显示,TGF- β 1 抑制滋养细胞侵袭,在避免滋养细胞过度浸润中起到重要作用。

高迁移率族蛋白 A1 (high mobility group A1, HMGA1) 是一种保守的核蛋白,对维持 DNA 重组、修复及转录有重要作用,在 EVT 中表达显著。研究^[4]表明,TGF- β 1 在肿瘤细胞中通过调节 HMGA1 表达,进而调节肿瘤细胞侵袭和迁移。然而 TGF- β 1 通过调节 HMGA1 进而影响滋养层细胞侵袭尚未见报道。该研究拟进一步探讨 TGF- β 1 调节人滋养层细胞系 HTR-8/SVneo 细胞表达 HMGA1 的相关机制,阐明 HMGA1 在 TGF- β 1 抑制人滋养层细胞系 HTR-8/SVneo 细胞侵袭过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 主要试剂包括重组人 TGF- β 1 (美国 PeproTech 公司); P-Akt 抗体、HMGA1 抗体、Akt 抗体 (美国 CST 公司); β -actin 抗体 (武汉三鹰生物技术有限公司); Lipofectamine3000 转染试剂 (美国 Thermo Fisher 公司); SDS-PAGE 试剂 (北京康为世纪公司); Wortmannin (上海碧云天公司); DMEM 培养基、胎牛血清 (美国 Gibco 公司); 青霉素、链霉素 (美国 Sigma 公司)。

1.1.2 主要实验仪器 主要设备包括 Forma-311 CO₂ 培养箱 (美国 Thermo 公司); Sj-CJ-4800Y 超净工作台 (苏州安泰公司); DNM-9606 酶标仪 (北京普朗公司); JY-SCZ2 + 垂直电泳仪 (北京君意东方公司); Bio-Rad 化学发光成像系统 (美国赛默飞公司)。

1.2 方法

1.2.1 HTR-8/SVneo 的培养及传代 用 DMEM 高糖培养基 (10% FBS、100 U/ml 青霉素、100 U/ml 链

2019-05-31 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81501285)

作者单位: ¹ 郑州大学第三附属医院检验科, 郑州 450052

² 郑州大学第二附属医院检验科, 郑州 450014

作者简介: 刘 昕, 女, 硕士研究生;

张 展, 女, 教授, 主任技师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: zhangzhanmd@126.com

霉素) 培养 HTR-8/SVneo 细胞。细胞悬浮后置于 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度的恒温培养箱进行培养。用 0.25% 胰蛋白酶消化, 2~3 d 传代 1 次。实验时, 选择对数生长期的 HTR-8/SVneo 细胞, 消化并接种于细胞培养板, 接种时每孔细胞浓度为 1.0×10^6 , 接种后将细胞培养板置于恒温培养箱孵育 24 h。

1.2.2 TGF- β 1 作用不同时间对 HTR-8/SVneo 细胞中 HMGA1 表达的影响 采用终浓度为 5 ng/ml TGF- β 1 分别作用 HTR-8/SVneo 细胞 0、6、12、24、36 h, 收集细胞后提取蛋白和 RNA, 采用 Real-time PCR 和 Western blot 实验检测 HMGA1 的表达。

Western blot 操作步骤如下: 用 50 μ g 蛋白按照说明书进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 电泳结束后把蛋白转移到 PVDF 膜上, 5% 脱脂牛奶封闭 1 h, TBST 洗脱 3 次, 每次 5 min。加入 HMGA1、P-Akt、 β -actin、Akt 的一抗 (1:2 000) 孵育 2 h 后 4 °C 过夜。次日 TBST 冲洗 3 次, 每次 5 min, 再与二抗 (1:5 000) 室温作用 2 h, TBST 冲洗 3 次, 每次 5 min, 用 ECL 发光液发光显色, 在自动凝胶成像分析系统成像, 使用 Image J 软件进行分析。实验重复 3 次。

Real-time PCR 操作步骤如下: 收集细胞后, 使用 RIPA 法提取 mRNA, 使用 Nanodrop 2000 仪器检测总 RNA 浓度及纯度。根据逆转录试剂盒说明书合成 cDNA 后, 根据 Real-time PCR 说明书, 将 PCR 反应孔置于 ABI7500 型荧光定量 PCR 反应仪进行反应, 记录每个 PCR 反应孔的 CT 值 (目标扩增产物的荧光信号达到设定阈值所经历的循环数), 按照 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算 HMGA1 和内参 β -actin 的荧光定量 PCR 数据。实验重复 3 次。各引物序列见表 1。

表 1 Real-time PCR 的引物序列

因子	引物序列 (5'-3')
β -actin	F: GGGAAATCGTGCGTGACATTAAGG
	R: CAGGAAGGAAGCGCTGGAAGAGTG
HMGA1	F: TCCAAGAAGGCATCCGCATT
	R: AGGAGCAGCTGGAAGACTGA

1.2.3 TGF- β 1 通过激活 PI3K/AKT 通路上调 HMGA1 将细胞分为: 空白对照组、TGF- β 1 处理组、TGF- β 1 + Wortmannin 处理组、Wortmannin 处理组。HTR-8/SVneo 细胞无血清饥饿 12 h 后, 在 TGF- β 1 + Wortmannin 处理组、Wortmannin 处理组中加入 PI3K/AKT 通路抑制剂 Wortmannin (0.1 μ mol/L) 进行预处理 1 h, 而后用 5 ng/ml TGF- β 1 加入 TGF- β 1 处理组和 TGF- β 1 + Wortmannin 处理组, 培养 24 h

后进行蛋白提取, 用 Western blot 检测 P-Akt、Akt 蛋白表达。

1.2.4 阻断 PI3K/AKT 通路对 TGF- β 1 调节细胞中 HMGA1 表达的影响 分组同上。依照分组添加或不添加 5 ng/ml 的 TGF- β 1 和 0.1 μ mol/L 的 Wortmannin, 采用 Western blot 法检测 HMGA1 的表达。

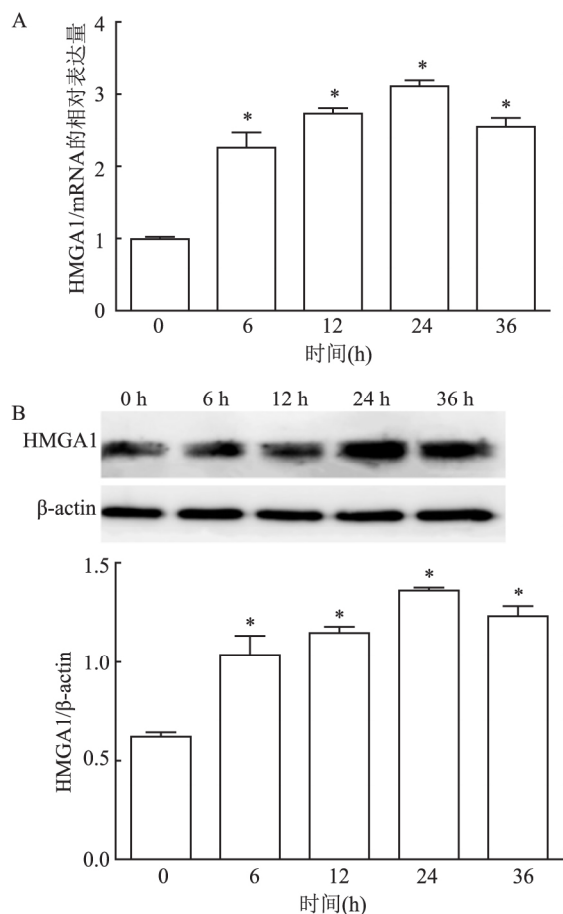
1.2.5 HMGA1 参与 TGF- β 1 对人滋养层 HTR-8/SVneo 细胞侵袭的抑制过程 使用验证过沉默效率的 HMGA1 siRNA 用于后续实验 (正义链: GCCAAGUGCCAACACCUAATT; 反义链: UUAGGU-GUUGGCACUUCGCTT), 根据实验目的, 将 HTR-8/SVneo 细胞分为 4 组: 空白对照组、TGF- β 1 处理组、TGF- β 1 + siHMGA1 组、siHMGA1 组。采用 Transwell 侵袭实验检测各组细胞侵袭力的变化。显微镜下随机选取 5 个视野, 观察转移至下室内的细胞并拍照。使用 Image J 软件分析各组侵袭的细胞数目。

1.3 统计学处理 应用 SPSS 21.0 软件对实验数据进行分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间数据的比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-t 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TGF- β 1 作用不同时间对 HMGA1 在 HTR-8/SVneo 中表达的影响 为研究 TGF- β 1 对 HMGA1 表达的影响, 用 5 ng/ml TGF- β 1 处理 HTR-8/SVneo 细胞不同时间。Western blot 结果显示, 各时间点 HMGA1 蛋白水平均增高, 而处理 24 h 后 HMGA1 蛋白水平显著增高 ($F = 1.38, P < 0.05$)。Real-time PCR 显示, 5 ng/ml TGF- β 1 处理 24 h 后, HMGA1 的 mRNA 水平 (3.11 ± 0.08) 显著增高 ($F = 19.02, P < 0.05$)。见图 1。

2.2 TGF- β 1 诱导 HMGA1 上调通过活化 PI3K/AKT 通路 用 TGF- β 1 浓度为 5 ng/ml 处理或不处理 HTR-8/SVneo 细胞 24 h, 使用 Wortmannin (0.1 μ mol/L) 预处理或不处理 1 h, 用 Western blot 检测 HTR-8/SVneo 细胞 PI3K/AKT 信号通路的活化情况。结果显示 (图 2): 与空白对照组比较, 在 HTR-8/SVneo 细胞中 TGF- β 1 明显上调了 Akt、P-Akt 的蛋白表达水平 ($F = 3.12, P < 0.05$; $F = 1.36, P < 0.05$)。与 TGF- β 1 组相比, TGF- β 1 + Wortmannin 组中 Akt、P-Akt 的蛋白表达水平降低 ($F = 1.11, P < 0.05$; $F = 1.08, P < 0.05$)。这说明 TGF- β 1 诱导 HMGA1 上调通过活化 PI3K/AKT 信号通路。

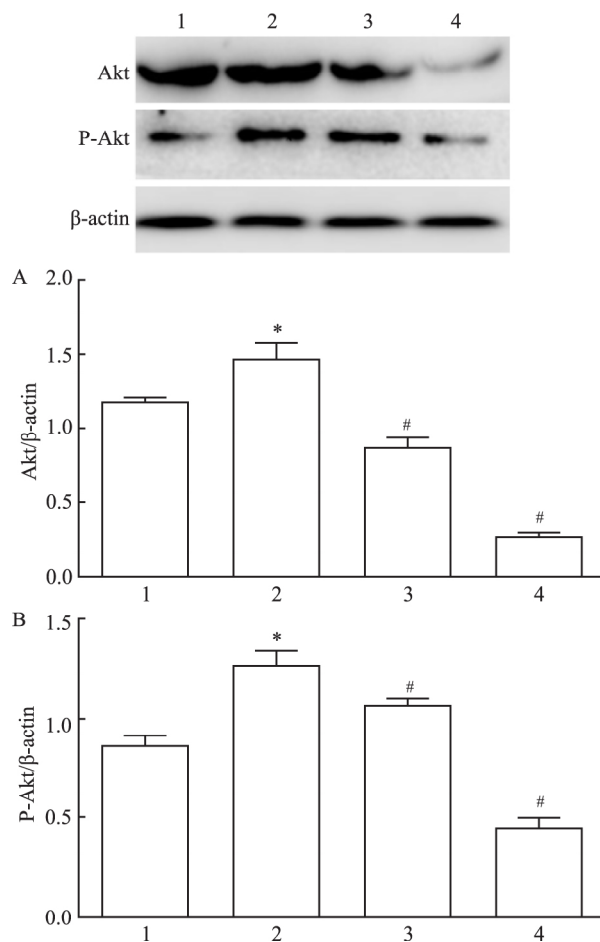
图1 不同时间点的 TGF-β₁ 诱导

HTR-8/SVneo 后 HMGA1 蛋白和 mRNA 的表达

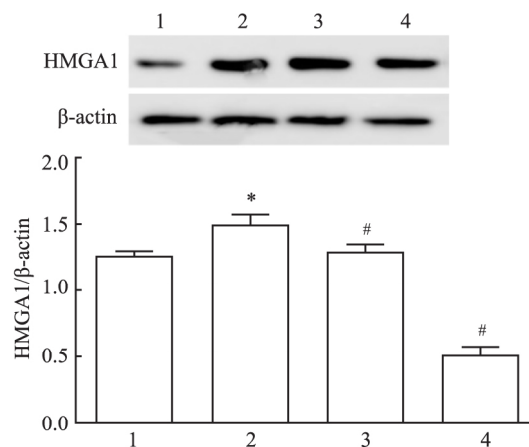
A: HMGA1 mRNA; B: HMGA1 蛋白表达; 与 0 h 比较: * $P < 0.05$

2.3 阻断 PI3K/AKT 通路对 TGF-β₁ 调节细胞 HMGA1 表达的影响 Western blot 结果显示(图 3): 5 ng/ml 的 TGF-β₁ 明显提高了 HTR-8/SVneo 细胞 HMGA1 的蛋白表达水平 ($F = 5.06, P < 0.05$), Wortmannin 则抑制了 TGF-β₁ 对 HMGA1 的诱导 ($F = 2.25, P < 0.05$)。说明通路抑制剂 Wortmannin 阻断了 PI3K/AKT 通路, 进而抑制了 TGF-β₁ 对 HMGA1 表达的上调作用, 即 PI3K/AKT 信号通路是此过程中的关键环节。

2.4 HMGA1 参与 TGF-β₁ 对人滋养层 HTR-8/SVneo 细胞侵袭抑制过程 检查 TGF-β₁ 诱导调节 HMGA1 是否参与 TGF-β₁ 对人滋养层细胞的侵袭抑制过程, 利用已验证过沉默效率的 HMGA1 siRNA 转入细胞 (Sense: GCGAAGUGCCAACACCUAAT, Antisense: UUAGGUGUUGGCACUUCGCTT)。实验分组如前所述。如图 4 所示, TGF-β₁ 处理组发生侵袭的细胞数为 (45.20 ± 3.38), 空白对照组发生侵袭细胞数为 (106.30 ± 3.62), TGF-β₁ + siHMGA1 组侵袭

图2 Western blot 检测 TGF-β₁ 和抑制剂 Wortmannin 单独及联合作用对 HTR-8/SVneo 细胞 Akt、P-Akt 蛋白的影响

A: Akt; B: P-Akt; 1: 空白对照组; 2: TGF-β₁ 处理组; 3: TGF-β₁ + Wortmannin 处理组; 4: Wortmannin 处理组; 与空白对照组比较: * $P < 0.05$; 与 TGF-β₁ 处理组比较: # $P < 0.05$

图3 阻断 PI3K/AKT 通路对 TGF-β₁ 调节细胞 HMGA1 蛋白表达的影响

1: 空白对照组; 2: TGF-β₁ 处理组; 3: TGF-β₁ + Wortmannin 处理组; 4: Wortmannin 处理组; 与空白对照组比较: * $P < 0.05$; 与 TGF-β₁ 处理组比较: # $P < 0.05$

细胞数为 (75.10 ± 2.91) , siHMGA1 处理组为 (64.60 ± 4.15) 。与空白对照组比较, TGF- β_1 处理组侵袭细胞数明显降低, 差异有统计学意义 ($F = 10.51, P < 0.05$)。与 TGF- β_1 处理组比较, TGF- β_1 + siHMGA1 组侵袭细胞数明显增多, 说明 HMGA1 参与了 TGF- β_1 对人滋养层 HTR-8/SVneo 细胞侵袭的抑制过程。

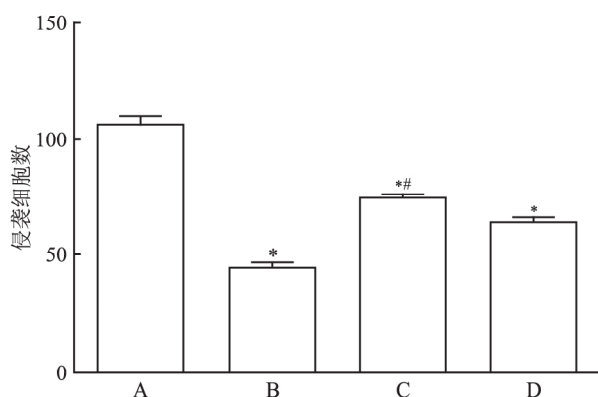
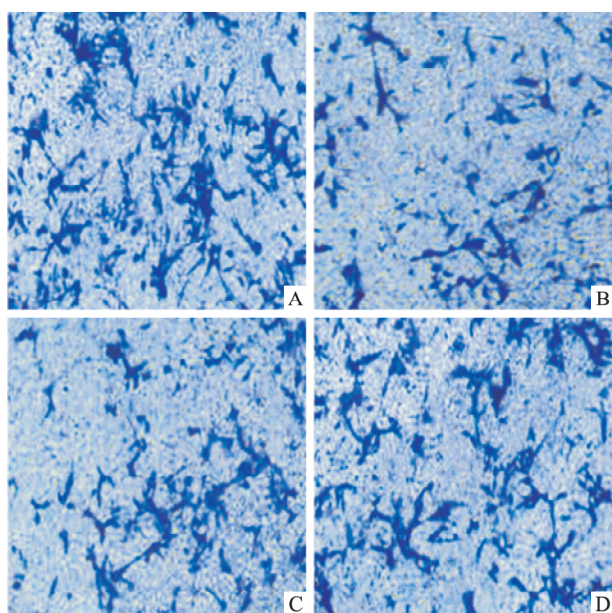


图4 各处理组的侵袭细胞数 结晶紫染色 $\times 100$

A: 空白对照组; B: TGF- β_1 处理组; C: TGF- β_1 + siHMGA1 处理组; D: siHMGA1 处理组; 与空白对照组比较: * $P < 0.05$; 与 TGF- β_1 处理组比较: # $P < 0.05$

3 讨论

PE 是一种复杂的全身性血管疾病, 增加了怀孕和患严重疾病的风险, 极其危害母婴健康^[1]。现临床上以对症治疗为主, 但终止妊娠才是唯一有效的治疗手段^[2]。许多学者认为 PE 是一种滋养细胞疾病, 因为 PE 患者胎盘的主要病理特征是滋养细胞

浸润过浅和子宫螺旋动脉重塑障碍^[3]。而正常妊娠过程中母体子宫内膜是适当浸润的。研究^[4]显示滋养细胞侵袭功能的下降与 PE 密切相关, 但相关分子机制尚不明确。

TGF- β 是一类多潜能细胞因子超家族, 其亚型包括 TGF- β_1 、TGF- β_2 和 TGF- β_3 , 可以调节细胞分化、增殖、凋亡等重要生物学功能^[5]。其中 TGF- β_1 参与滋养细胞的增殖分化, 在胚胎着床中起重要作用, 可诱导 TIMP 产生进而抑制滋养细胞浸润^[6]。子宫内膜中 TGF- β_1 主要表达于基质和上皮细胞, 滋养层细胞也含丰富的 TGF- β_1 。胎盘中 TGF- β_1 定位于绒毛膜滋养层细胞胞质、蜕膜细胞和绒毛附近区域。未着床的孕胚可分泌 TGF- β_1 受体与 TGF- β_1 结合, 因此 TGF- β_1 贯穿了整个妊娠过程, 包括着床、子宫螺旋动脉重构、胎盘和胎儿的正常生长^[7]。研究^[8]显示, PE 组孕妇母体外周血清和胎盘组织 TGF- β_1 水平显著高于对照组, 可能与 PE 的发生密切相关。TGF- β_1 及其受体通过多种机制引起滋养细胞侵袭不足, 影响子宫-胎盘血管床的发育和重塑, 导致胎盘缺血低氧, 进而参与 PE 进程。研究^[9]表明在甲状腺癌细胞中, HMGA1 影响了 TGF- β_1 在细胞侵袭过程的作用。而在滋养细胞中, HMGA1 是否参与 TGF- β_1 对滋养层细胞侵袭的调节仍不清楚。本研究中, TGF- β_1 通过上调 HMGA1 抑制滋养细胞侵袭, 有助于了解 TGF- β_1 抑制滋养细胞侵袭的作用机制。本研究表明, 5 ng/ml TGF- β_1 明显抑制人滋养层细胞 HTR-8/SVneo 的侵袭性, 这与 Cheng et al^[10] 的研究一致。5 ng/ml 的 TGF- β_1 通过 PI3K/AKT 信号通路对 HMGA1 表达有上调作用, 而加入 PI3K/AKT 信号通路的抑制剂 Wortmanin 后, TGF- β_1 对 HMGA1 的上调作用明显被抑制, 这表明 PI3K/AKT 信号通路是 TGF- β_1 调节 HMGA1 表达的桥梁。这与 Zu et al^[11] 在乳腺癌 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞中的研究有相似之处。

HMGA1 是高迁移率族蛋白家族中的一员, 它通过与位于多种基因的启动子和增强子区域的 A/T 丰富 DNA 序列直接相互作用, 参与调控染色质结构^[12]。滋养层细胞侵袭不足被认为是 PE 的发病原因之一, 而 HMGA1 可调节在胎盘形成过程中绒毛外滋养层细胞的迁移, 与不充分的滋养细胞入侵有关^[13]。而本研究中 Transwell 实验显示, 5 ng/ml 的 TGF- β_1 明显抑制了滋养层细胞的侵袭。而用小干扰 RNA 敲低 HMGA1 后, 减少了 TGF- β_1 对滋养细胞侵袭的抑制作用。这说明 HMGA1 是 TGF- β_1 抑

制滋养细胞侵袭过程的重要环节。然而妊娠中滋养细胞的侵袭与恶性肿瘤的侵袭不同,在时间和空间上受多种因素的综合调节,空间上限于子宫内膜和子宫肌层的内 1/3,时间上限于妊娠早期,从而限制了滋养细胞侵袭的深度,所以 TGF- β 1/HMGA1 对滋养细胞侵袭的调节作用与 PE 的关系仍需进一步探讨。

综上所述,TGF- β 1 抑制滋养细胞侵袭,可能导致 PE 的发生。而 TGF- β 1 抑制滋养细胞侵袭通过上调 HMGA1 表达。为此,推测通过以 TGF- β 1/HMGA1 为靶点,可为探索 PE 发病机制及为治疗提供新的思路。

参考文献

- [1] Cheng J C, Yi Y, Chang H M, et al. TGF- β 1 up-regulates cadherin-11 expression through Snail: a potential mechanism for human trophoblast cell differentiation [J]. *Cell Signal*, 2018, 43: 55-61.
- [2] Zhong J, Liu C, Zhang Q H, et al. TGF- β 1 induces HMGA1 expression: the role of HMGA1 in thyroid cancer proliferation and invasion [J]. *Int J Oncol*, 2017, 50(5): 1567-78.
- [3] 王利平, 王安英, 李筱梅. 母血中胎儿游离 KISS-1 mRNA 和 β -HCG mRNA 在子痫前期的表达 [J]. *安徽医科大学学报*, 2012, 47(6): 709-11.
- [4] Gajzlerska-Majewska W, Bomba-Opon D A, Wielgos M. Is pravas-tatin a milestone in the prevention and treatment of preeclampsia? [J]. *J Perinat Med*, 2018, 46(8): 825-31.
- [5] 胡 静, 陈 沂, 高劲松. 早孕期联合筛查预测子痫前期 [J]. *中华围产医学杂志*, 2017, 20(1): 2-6.
- [6] 薛平平, 王慧艳, 樊文强, 等. PTEN 在子痫前期胎盘滋养细胞浸润不足中的作用及机制研究 [J]. *现代妇产科进展*, 2017, 26(10): 739-43.
- [7] Zhao H F, Zhang X H, Zhao J Q, et al. Involvement of Rho-associated coiled-coil kinase signaling inhibition in TGF- β 1/Smad 2, 3 signal transduction *in vitro* [J]. *Int J Ophthalmol*, 2017, 10(12): 1805-11.
- [8] 张亚光, 刘 丽, 黎渊明. TGF- β 1/Smad 信号转导通路在子痫前期患者胎盘组织中的表达及其临床意义 [J]. *中国优生与遗传杂志*, 2013, 9(12): 99-101.
- [9] 谢玉珍, 何文智, 刘玉冰, 等. 子痫前期患者血清及胎盘组织中 TGF- β 1 的表达探讨 [J]. *实用妇产科杂志*, 2016, 32(10): 751-5.
- [10] Perucci L O, Gomes K B, Freitas L G, et al. Soluble endoglin, transforming growth factor- β 1 and soluble tumor necrosis factor alpha receptors in different clinical manifestations of preeclampsia [J]. *PLoS One*, 2014, 9(5): e97632.
- [11] Zu X, Zhong J, Tan J, et al. TGF- β 1 induces HMGA1 expression in human breast cancer cells: implications of the involvement of HMGA1 in TGF- β 1 signaling [J]. *Int J Mol Med*, 2015, 35(3): 693-701.
- [12] 袁绍辉, 潘 琦, 尚 剑, 等. RNAi 对骨肉瘤细胞株 HMGA1 基因表达及侵袭力抑制的实验研究 [J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2010, 17(15): 1185-9.
- [13] Uchikura Y, Matsubara K, Muto Y, et al. Extranuclear translocation of high-mobility group A1 reduces the invasion of extravillous trophoblasts involved in the pathogenesis of preeclampsia: new aspect of high-mobility group A1 [J]. *Reprod Sci*, 2017, 24(12): 1630-8.

TGF- β 1 inhibits human trophoblast cell invasion by upregulating HMGA1

Liu Xin, Li Pengyun, Gao Junjun, et al

(Dept of Clinical Laboratory, The Third Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052)

Abstract Objective To investigate the role of HMGA1 in the inhibition of human trophoblastic HTR-8/SVneo cell invasion by transforming growth factor β 1 (TGF- β 1). **Methods** ① HTR-8/SVneo cell lines were cultured and treated with 5 ng/ml TGF- β 1 at different time 0, 6, 12, 24, 36 h. Cells were collected and the expression of HMGA1 was detected by Real-time PCR and Western blot. ② HTR-8/SVneo cell lines were cultured, pretreated with or without PI3K/AKT signaling pathway inhibitor Wortmannin (0.1 μ mol/L) for 1 h, then treated with or without 5 ng/ml TGF- β 1 for 24 h. The cells were collected and the expressions of HMGA1, P-Akt and Akt were detected by Real-time PCR and Western blot. ③ Cultured trophoblast HTR-8/SVneo cell lines, transfected with or without silencing HMGA1 siRNA and TGF- β 1 5 ng/ml for 24 h, and Transwell assay was used to verify the changes in the invasiveness of trophoblast cells in each group. **Results** HMGA1 expression in HTR-8/SVneo cells can be promoted by TGF- β 1, and HMGA1 expression in cells treated with 5 ng/ml TGF- β 1 for 24 h was the highest. After HTR-8/SVneo cells treated with 5 ng/ml TGF- β 1 for 24 h, the protein expression levels of Akt, P-Akt and

网络出版时间: 2019-9-3 17:26 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20190830.1434.020.html>

表皮生长因子对大鼠睾丸间质干细胞增殖和分化的影响研究

张磊¹, 纪洵敏¹, 苏志坚², 唐芮¹, 蒲俏虹¹, 彭拓华¹, 张吉凯¹

摘要 目的 研究表皮生长因子对大鼠睾丸间质干细胞增殖和分化的影响。方法 二甲磺基乙烷单次腹腔注射成年雄性大鼠(75 mg/kg), 7 d后, 分离曲细精管, 构建曲细精管体外培养模型, 进行处理: ①表皮生长因子处理24 h, 试剂盒进行5-乙炔基-2'-脱氧尿嘧啶核苷(EdU)标记, Image-Pro Plus软件统计分析睾丸间质干细胞增殖情况; ②表皮生长因子处理3 d后, 换为含LH培养基继续培养至21 d, 收集培养基上清液, 放射免疫法检测上清液睾酮的分泌情况, 同时收集曲细精管提取RNA, 荧光定量PCR检测睾酮合成通路相关基因的表达情况, 综合分析睾丸间质干细胞在表皮生长因子作用下的分化情况。结果 表皮生长因子能够显著地促进睾丸间质干细胞的增殖; 曲细精管培养基上清液的睾酮水平明显上升, 并且在睾酮合成通路上Star、Cyp11a1和Hsd3b1经过表皮生长因子诱导后, 在mRNA水平上均出现了明显的上调, 表明睾丸间质干细胞出现了分化。结论 表皮生长因子能够诱导睾丸间质干细胞的大量增殖和向睾丸间质细胞系的分化。

关键词 表皮生长因子; 睾丸间质细胞; 曲细精管; 促黄体生成素

中图分类号 Q 2-33

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2019)10-1589-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.10.019

睾丸间质细胞(leydig cell)是哺乳动物睾丸间

2019-04-16 接收

基金项目 广东省自然科学基金博士启动项目(编号: 2015A030310132)

作者单位: ¹广东省生物制品与药物研究所耐药监测室, 广州 510440

²暨南大学细胞生物学系, 广州 510632

作者简介: 张磊, 男, 博士, 副主任技师, 责任作者, E-mail: swz1100@sina.com

质中的一种内分泌细胞, 具有合成和分泌睾酮的功能, 是男性体内雄激素的最主要来源^[1], 具有促进胚胎期生殖器官的分化发育、形成和维持男性第二性征, 促使精子发生与成熟, 激发性欲, 维持性功能以及调节人体的新陈代谢(如蛋白质合成、骨骼生长及红细胞生成等)等极其重要的生理功能^[2]。近几十年来, 伴随着全球老龄化问题的加剧, 中老年男性部分性激素缺乏综合征引起的社会问题日益突出, 而传统的激素治疗方法存在严重不足, 因而迫切需要开发全新的生物相容性高的替代治疗方法。在这种形势下, 睾丸间质细胞再生分化的研究逐渐成为时下研究的热点。

表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)于1962年首次在小鼠的颌下腺中发现^[3]。EGF是由53个氨基酸组成的多肽单链, 分子量为6 045, EGF的生物学效应是通过与其受体(EGFR)结合而发挥作用的。它是一种促细胞分裂剂, 能加速核酸和蛋白质的合成, 从而促进多种细胞分裂增殖, 并影响细胞的分化^[4]。近年来, 研究显示EGF与睾丸间质细胞的增殖分化功能存在密切关系^[5], 但是缺乏直接的研究证据, 由于睾丸间质细胞株和原代睾丸间质细胞存在的缺陷和不足^[6], 该研究采用课题组构建的二甲磺基乙烷(ethylene dimethanesulfonate, EDS)处理曲细精管体外培养模型^[7]来探讨EGF在睾丸间质细胞的再生分化过程中对其增殖和分化的影响, 目前国内开展这方面的研究较少, 该模型直观地反映了EGF在睾丸间质干细胞再生增殖分化中的作用, 为研究EGF在治疗中老年男性部分性激素缺乏综合征中的功能和作用提供了重要的研究基础数

HMGA1 were significantly up-regulated, while the up-regulated expression levels of Akt, P-Akt and HMGA1 were inhibited by the addition of PI3K/AKT pathway inhibitor Wortmannin(0.1 $\mu\text{mol/L}$, $P < 0.05$). The results of Transwell assay showed that compared with the TGF- β 1 treatment group, the number of invasive cells in the TGF- β 1 + siHMGA1 group was significantly increased($P < 0.05$). **Conclusion** HMGA1 expression of HTR-8/SVneo cells may be up-regulated by TGF- β 1 through the PI3K/AKT signaling pathway. TGF- β 1 inhibits human trophoblast HTR-8/SVneo cell invasion by regulating HMGA1 expression.

Key words high mobility group A1; HTR-8/SVneo; transforming growth factor- β 1