

DOI:10.16781/j.0258-879x.2017.02.0183

· 论 著 ·

## 长链非编码 RNA 母系印记基因 3 对人类绒毛发育的作用

丁海遐, 马 妍, 盛 菲, 纪逸萱, 李 文\*

第二军医大学长征医院生殖医学中心, 上海 200003

**[摘要]** **目的** 研究长链非编码 RNA (lncRNA) 母系印记基因 3 (MEG3) 对人类流产绒毛发育的影响, 并探讨其分子机制。**方法** 收集自然流产及人工流产各 15 例患者的绒毛组织, 使用免疫组化方法检测其凋亡因子 Bax 及凋亡抑制因子 Bcl-2 的表达, 使用 qPCR 法检测 MEG3 的表达。在人滋养细胞系 HTR-8/SVneo 细胞中过表达 MEG3 后, 利用 qPCR 法检测 MEG3 的表达, 利用细胞侵袭实验比较过表达组与对照组细胞的侵袭能力。**结果** 人工流产绒毛组织中 Bax 的表达低于自然流产绒毛, 而 Bcl-2 的表达高于自然流产绒毛 ( $P < 0.01$ )。人工流产绒毛组织中的 MEG3 的表达低于自然流产 ( $P < 0.01$ )。人滋养层细胞系 HTR-8/SVneo 细胞中过表达 MEG3 后, HTR-8/SVneo 细胞侵袭能力降低 ( $P < 0.01$ )。**结论** lncRNA MEG3 可调控滋养层细胞的凋亡及侵袭能力, 影响人类绒毛的发育。

**[关键词]** 长链非编码 RNA; 绒毛膜绒毛; 自然流产; 人工流产; 母系印记基因 3; 细胞凋亡; 侵袭

**[中图分类号]** R 321.4 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2017)02-0183-05

## Role of long non-coding RNAs maternally imprinted genes 3 in human villi development

DING Hai-xia, MA Yan, SHENG Fei, JI Yi-xuan, LI Wen\*

Center of Reproductive Medicine, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

**[Abstract]** **Objective** To study the effect of long non-coding RNAs (lncRNAs) maternally imprinted genes 3 (MEG3) on human abortion villi development and to explore the related molecular mechanisms. **Methods** We collected the villi samples from 15 spontaneous abortion (SA) and 15 induced abortion (IA) patients. Immunohistochemistry was applied to detect the expressions of apoptosis factor Bax and apoptosis inhibitory factor Bcl-2 in villi samples. Real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was used to analyze the levels of MEG3 of villi samples. Overexpression of MEG3 in human trophoblast cell line HTR-8/SVneo was identified by qPCR; the invasion ability of HTR-8/SVneo cells was examined by matrigel invasion assay in MEG3 overexpression and control groups. **Results** Immunohistochemistry showed that the expression of Bax in IA group was lower than that in SA group, while the expression of Bcl-2 was higher ( $P < 0.01$ ). The level of MEG3 in IA group was significantly higher than that in SA group ( $P < 0.01$ ). The expression of MEG3 was obviously increased and invasion ability was inhibited in MEG3 overexpressed HTR-8/SVneo cells ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** LncRNAs MEG3 may regulate the apoptosis and invasive ability of bizarre trophoblastic cells and influence on the development of human villi.

**[Key words]** long noncoding RNAs; chorionic villi; spontaneous abortion; induced abortion; maternally imprinted genes 3; apoptosis; invasion

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2017, 38(2): 183-187]

流产指妊娠不足 28 周、胎儿体质量不足 1 000 g 而终止妊娠。流产分为自然流产 (spontaneous abortion, SA) 和人工流产 (induced abortion, IA)。胚胎着床后有 31% 发生自然流产, 其中 80% 为早期

自然流产 (early spontaneous abortion)。早期自然流产即在妊娠 12 周以前出现阴道出血和 (或) 腹痛, 主要的病因包括胚胎染色体异常、母体内分泌疾病、生殖器畸形、环境及免疫因素等; 但其具体影响机制

**[收稿日期]** 2016-07-26 **[接受日期]** 2016-12-19

**[基金项目]** 军队创新重点项目 (13CXZ006)。Supported by Military Innovation Key Project (13CXZ006)。

**[作者简介]** 丁海遐, 硕士, 住院医师, E-mail: 771512795@qq.com

\* 通信作者 (Corresponding author)。Tel: 021-81885872, E-mail: lyliwen@sina.com

尚不清楚。滋养层细胞向子宫的增殖、迁移及侵袭是人类胚胎植入和胎盘形成的重要环节。滋养层细胞的侵袭过程与肿瘤的侵袭相似,受许多因素调控,它们之间的平衡保证早孕期滋养层细胞的正常侵袭和胚胎的正常发育,任何一个环节发生异常将可能导致流产的发生<sup>[1]</sup>。

人类基因组的研究结果显示仅有2%的基因编码蛋白,其他序列尽管不编码蛋白质,但绝大部分可以被转录为RNA,这些不能编码蛋白的RNA被统称为非编码RNA<sup>[2]</sup>。近年来,长链非编码RNA(lncRNA)越来越受人们关注,起初lncRNA被认为是基因组转录的“噪音”,是RNA聚合酶II转录的副产物,没有生物学功能;而经过对lncRNA深入研究,发现lncRNA参与了多种基因组调控过程,如基因组印记、X染色体沉默、转录激活及转录干扰等<sup>[3-4]</sup>。

研究发现,lncRNA母系印记基因3(MEG3)是一种抑癌基因,在调节细胞增殖及侵袭等功能中发挥重要作用<sup>[5]</sup>,已有报道称MEG3是一种垂体肿瘤的相关基因,在无功能性垂体腺瘤中高表达<sup>[6]</sup>,近年还发现MEG3在胃癌、肺癌及胚胎性横纹肌瘤中也表达异常<sup>[5,7-8]</sup>。我们前期研究(未发表资料)发现,C57小鼠胎肝芯片筛选结果显示MEG3是上调倍数较高的RNA之一,在小鼠胎肝中高表达;但MEG3对胚胎的生长发育是否具有调节作用并不清楚。早期绒毛的发育是胚胎发育的前提和基础,滋养层细胞的侵袭及增殖能力对早期绒毛发育至关重要。本实验旨在探讨lncRNA MEG3在早期绒毛发育中的作用。研究证实,凋亡因子Bax及凋亡抑制因子Bcl-2与肿瘤细胞的凋亡密切相关<sup>[9]</sup>,滋养层细胞的增殖及凋亡在早期胚胎发育及胚胎植入过程中发挥重要作用,那么Bax与Bcl-2的表达是否影响了滋养层细胞的功能并导致早期绒毛发育异常,本文也将进行初步探讨。

## 1 材料和方法

1.1 研究材料 人滋养层细胞系HTR-8/SVneo细胞(复旦大学妇产科医院李大金教授惠赠);DMEM/F12培养液(美国HyClone公司);胎牛血清、Opti-MEN培养液(美国Gibco公司);RNAiso、qPCR相关试剂(日本TaKaRa公司);Lipofectamine™ 3000转染试剂盒(美国Invitrogen公司);PI染液(美国Sigma公司);凋亡检测试剂盒、Matrigel胶(美国BD Bioscience公司);miRNA

反转录引物、U6内参(中国西安沃尔森公司);Transwell小室(美国Millipore公司);Bax兔抗人抗体、Bcl-2兔抗人抗体(美国Bioworld公司);二抗羊抗兔抗体(中国博士德公司)。

1.2 患者与临床样本收集 收集上海市长宁区中心医院30例早期流产患者(妊娠7~9周)的绒毛组织,其中自然流产和人工流产患者各15例,已通过第二军医大学长征医院伦理委员会审核;标本采集前告知患者用途,签订知情同意书;绒毛组织样本收集即刻,用PBS冲洗后放入液氮以便运输,后保存于-80℃冰箱。

1.3 细胞培养及处理 从-80℃冰箱中取出HTR-8/SVneo细胞,复苏、培养,培养液为含12%胎牛血清、100 IU/mL青霉素和100 mg/mL链霉素的DMEM/F12培养液,置于37℃、5%CO<sub>2</sub>的孵箱中培养。在转染前1d取生长状态好的细胞,用0.25%胰酶消化,以3×10<sup>5</sup>/mL细胞密度、每孔2 mL接种于6孔板中。待细胞生长融合度达到70%~80%时,按照Lipofectamine™ 3000转染试剂盒操作说明用MEG3-PCDN 3.0转染细胞;转染48 h时收集细胞,并用qPCR检测转染效率。MEG3引物由美国Invitrogen公司合成,上游序列5'-CTG CCC ATC TAC ACC TCA CG-3',下游序列5'-CTC TCC GCC GTC TGC GCT AGG GGC T-3'。

1.4 细胞侵袭实验 HTR-8/SVneo细胞在转染48 h后,在24孔板中放置膜孔直径为8 μm的迁移小室,将细胞按1.0×10<sup>4</sup>/mL的密度接种于小室中;实验分3组:MEG3-PCDN 3.0组、PCDN 3.0组(空载)和空白对照组。将细胞放置于5% CO<sub>2</sub>、37℃孵箱中培养48 h,用0.1%结晶紫染色,使用光学显微镜观察各组细胞的迁移能力,并采集图像。

1.5 qPCR法检测lncRNA MEG3的表达 用TRIzol试剂分别提取15例自然流产绒毛和15例人工流产绒毛标本的总RNA,取2 μg总RNA,利用TaKaRa反转录试剂盒反转录获得cDNA。qPCR扩增体系:95℃预变性5 min;循环扩增40次(95℃变性15 s、60℃退火15 s、72℃延伸20 s);随后检测熔解曲线及扩增曲线情况。以GAPDH作为内参基因,引物序列为:上游5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3',下游5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'。用2<sup>-ΔΔCt</sup>方法计算MEG3的实时定量数据,分析自然流产和人工流产绒毛中MEG3的表达情况。

1.6 免疫组织化学检测 Bax 和 Bcl-2 的表达 绒毛经 4% 多聚甲醛固定、常规脱水, 4 μm 连续冰冻切片, 胰酶消化处理, 然后水化, 用 0.01 mol/L pH 7.2~7.4 的 PBS 洗 5 min, 冷风吹干, 放入湿盒中; 滴加稀释后的荧光抗体, 4℃ 过夜; 用 PBS 洗 2 次、蒸馏水洗 1 次后, 采用抗荧光衰减封片剂封片。在光学显微镜下观察。

1.7 统计学处理 所有实验均重复 3 次, 除非特殊指明。采用 Excel 软件进行数据处理。计量资料采

用  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组间比较采用非配对 *t* 检验, 多组间比较采用方差分析, 检验水准 ( $\alpha$ ) 为 0.05。

## 2 结果

2.1 Bax 和 Bcl-2 在早期流产绒毛的表达 利用免疫组织化学法检测自然流产及人工流产绒毛中 Bax 及 Bcl-2 的表达情况。结果显示人工流产组绒毛中 Bax 的表达低于自然流产组, 而 Bcl-2 的表达高于自然流产组 ( $P < 0.01$ , 图 1)。

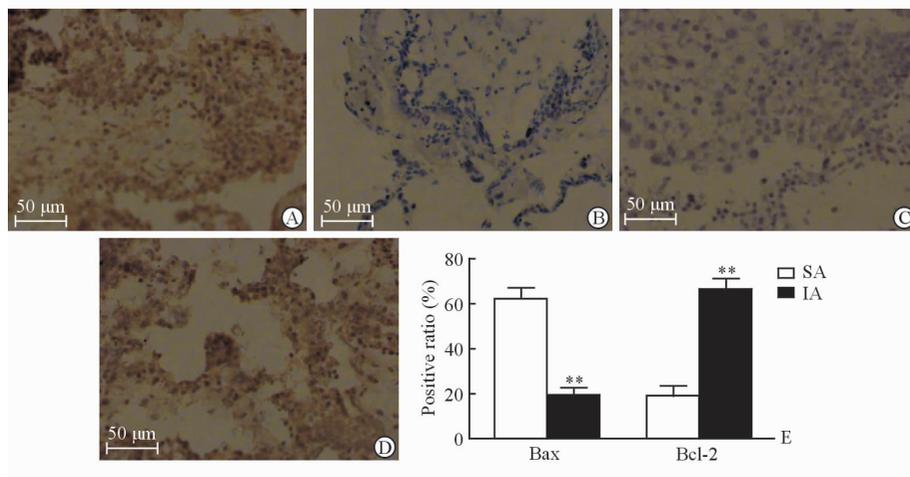


图 1 免疫组织化学法检测自然流产和人工流产绒毛中 Bax 和 Bcl-2 的表达

Fig 1 The expression of Bax and in SA and Bcl-2 IA by immunohistochemistry

A, B; Bax; C, D; Bcl-2; A, C; SA group; B, D; IA group. E: The positive ratio of Bax and Bcl-2 in SA and IA groups. SA: Spontaneous abortion; IA: Induced abortion. \*\*  $P < 0.01$  vs SA group.  $n = 3, \bar{x} \pm s$

2.2 lncRNA MEG3 在早期流产绒毛的表达 采用 qPCR 检测自然流产组和人工流产组绒毛中 lncRNA MEG3 的表达情况, 结果显示人工流产组绒毛中 MEG3 水平低于自然流产组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ , 图 2)。

2.3 人滋养层细胞系 HTR-8/SVneo 细胞过表达 lncRNA MEG3 在 HTR-8/SVneo 细胞转染 48 h 时, 采用 qPCR 检测 MEG3-PCDN 3.0 的转染情况。转染 MEG3-PCDN 3.0 后, MEG3 的表达较空载 PCDN 3.0 组增加, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ , 图 3)。

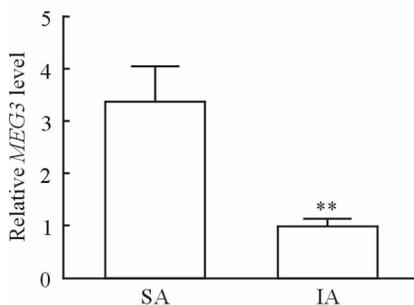


图 2 qPCR 检测自然流产和人工流产绒毛中 lncRNA MEG3 的表达

Fig 2 The expression of lncRNA MEG3 in SA and IA by qPCR

SA: Spontaneous abortion; IA: Induced abortion. \*\*  $P < 0.01$  vs SA groups.  $n = 3, \bar{x} \pm s$

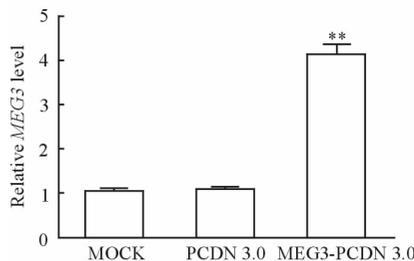


图 3 qPCR 检测转染后人滋养层细胞系 HTR-8/SVneo 细胞中 lncRNA MEG3 的表达

Fig 3 The expression level of lncRNA MEG3 in HTR-8/SVneo cells by qPCR

MOCK: Blank group; PCDN 3.0: Empty vector group; MEG3-PCDN 3.0: MEG3 overexpression group. \*\*  $P < 0.01$  vs PCDN 3.0 groups.  $n = 3, \bar{x} \pm s$

2.4 过表达 *MEG3* 抑制 HTR-8/SVneo 细胞的侵袭能力 转染 HTR-8/SVneo 细胞 48 h 后,检测 *MEG3*-PCDN 3.0 组、PCDN 3.0 组和空白对照组细胞的侵袭能力。结果显示,与空白对照组和

PCDN 3.0 组相比,*MEG3*-PCDN 3.0 组 HTR-8/SVneo 细胞的侵袭能力受到抑制,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ,图 4)。

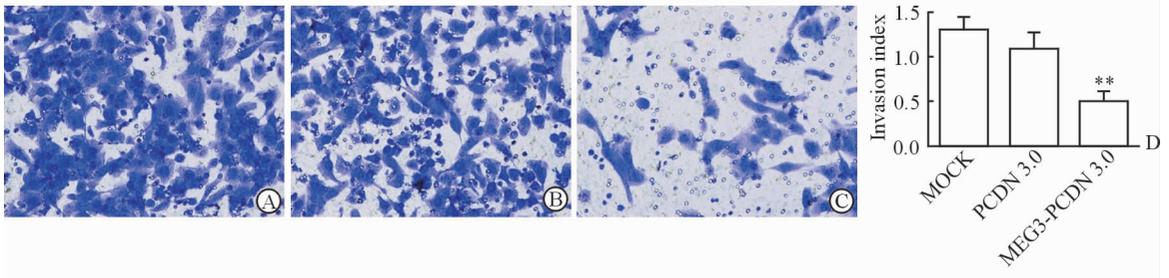


图 4 lncRNA *MEG3* 过表达对 HTR-8/SVneo 侵袭能力影响

Fig 4 The effect of lncRNA *MEG3* on HTR-8/SVneo cell invasion ability

A: The invasion ability of HTR-8/SVneo cells in MOCK group; B: The invasion ability in PCDN 3.0 group; C: The invasion ability in *MEG3*-PCDN 3.0 group; D: The invasion index of three groups showing that the HTR-8/SVneo cells in *MEG3*-PCDN 3.0 group have an obvious inhibition effect on the invasion ability. MOCK: Blank group; PCDN 3.0: Empty vector group; *MEG3*-PCDN 3.0: *MEG3* overexpression group. Original magnification:  $\times 20$  (A-C).  $** P < 0.01$  vs MOCK or PCDN 3.0 group.  $n = 3, \bar{x} \pm s$

### 3 讨论

研究发现,早期妊娠阶段滋养层细胞向子宫蜕膜增殖、侵袭,对其过程的调控是妊娠成功的关键<sup>[10-11]</sup>。滋养层细胞来自滋养外胚层,是人类胚胎中分化、发育最早的细胞类型之一,是母-胎界面唯一与母体免疫系统直接接触的胎儿细胞,在胚胎植入、母-胎免疫耐受过程中发挥重要作用<sup>[12-13]</sup>。滋养层细胞的增殖、分化、凋亡及侵袭性行为是胎盘形成、胚胎发育及妊娠顺利完成的基本要素,而对滋养层细胞的增殖、分化、凋亡及侵袭性行为调控的分子机制一直是近年来的研究热点。

滋养层细胞的增殖及凋亡在早期胚胎发育及植入过程中发挥重要作用,而 Bax 与 Bcl-2 的表达参与了细胞凋亡过程。本研究比较了自然流产和人工流产绒毛中 Bax 与 Bcl-2 的表达水平,结果显示人工流产组绒毛中 Bax 的表达低于自然流产组,Bcl-2 的表达高于自然流产组,提示自然流产的绒毛组织发育不良、细胞凋亡增加可能是导致自然流产的重要原因之一。

表观遗传学调控机制参与了滋养层细胞增殖、分化、凋亡及侵袭性行为的调控,研究表明 lncRNA 在胎盘及胚胎发育过程中也发挥重要的调控作用<sup>[11,14]</sup>,如 miR-155、miR-210、miR-195 等。lncRNA *MEG3* 位于染色体 14q32 上,已经报道

*MEG3* 是一种垂体相关的抑癌基因<sup>[15]</sup>。进一步的研究发现,*MEG3* 在许多正常组织中也有表达,如在脑组织及脑垂体呈高表达<sup>[16]</sup>,而在胃癌、结肠癌等肿瘤组织中表达降低甚至缺失<sup>[17-18]</sup>;此外有研究发现过表达 *MEG3* 可抑制肿瘤生长,可能是一种抑癌基因<sup>[19-20]</sup>。虽然 *MEG3* 与肿瘤生长密切相关,但 *MEG3* 对胎盘及胚胎发育的影响并不清楚。本研究结果显示人工流产绒毛中 *MEG3* 的表达水平低于自然流产,提示 *MEG3* 可能参与调节绒毛发育过程。而在人滋养层细胞系 HTR-8/SVneo 细胞中过表达 *MEG3* 的 HTR-8/SVneo 细胞侵袭能力下降,提示 *MEG3* 可能参与调节滋养层细胞的侵袭能力,进而调节早期绒毛的发育过程。但 *MEG3* 对早期绒毛发育的调节机制尚不清楚,有待进一步研究。

胚胎植入和胎盘形成是人类孕育过程中的重要环节,影响此过程的任何因素都可能导致流产,绒毛的发育及功能异常则是其中重要的因素之一。本研究发现 Bax、Bcl-2 在自然流产和人工流产绒毛中的表达存在差异,Bax、Bcl-2 参与了绒毛的发育过程,其表达异常导致的细胞凋亡增加可能是导致自然流产的重要原因之一;lncRNA *MEG3* 也可能通过抑制滋养层细胞的侵袭能力调节早期绒毛的发育过程。进一步阐明其作用机制将对不明原因流产的诊治和预后具有重要的临床意义。

## [参考文献]

- [1] VITIELLO D, PATRIZIO P. Implantation and early embryonic development; implications for pregnancy [J]. *Semin Perinatol*, 2007, 31: 204-207.
- [2] LEE J T. Epigenetic regulation by long noncoding RNAs [J]. *Science*, 2013, 338: 1435-1439.
- [3] ANDREW T, SHARPLESS N E. Genetic “lnc”-age of noncoding RNAs to human disease [J]. *J Clin Invest*, 2012, 122: 3837-3839.
- [4] CABILI M N, TRAPNELL C, GOFF L, KOZIOL M, TAZON-VEGA B, REGEV A, et al. Integrative annotation of human large intergenic noncoding RNAs reveals global properties and specific subclasses [J]. *Genes Dev*, 2011, 25: 1915-1927.
- [5] ZHOU Y, ZHANG X, KLIBANSKI A. *MEG3* noncoding RNA: a tumor suppressor [J]. *J Mol Endocrinol*, 2012, 48: R45-R53.
- [6] BALIK V, SROVNAL J, SULLA I, KALITA O, FOLTANOVA T, VAVERKA M, et al. *MEG3*: a novel long noncoding potentially tumour-suppressing RNA in meningiomas [J]. *J Neurooncol*, 2013, 112: 1-8.
- [7] BENETATOS L, VARTHOLOMATOS G, HATZIMICHAEL E. *MEG3* imprinted gene contribution in tumorigenesis [J]. *Int J Cancer*, 2011, 129: 773-779.
- [8] 曹娟,文飞球,徐金永,陈小文,崔东,李红,等. 长链非编码 RNA *MEG3* 在胚胎性横纹肌肉瘤凋亡中的研究 [J]. *中国小儿血液与肿瘤杂志*, 2013, 18: 120-123, 128.
- [9] REED J C. Proapoptotic multidomain Bcl-2/Bax-family proteins: mechanisms, physiological roles, and therapeutic opportunities [J]. *Cell Death Differ*, 2006, 13: 1378-1386.
- [10] LALA P K, CHAKRABORTY C. Factors regulating trophoblast migration and invasiveness: possible derangements contributing to preeclampsia and fetal injury [J]. *Placenta*, 2003, 24: 575-587.
- [11] NORWITZ E R, SCHUST D J, FISHER S J. Implantation and the survival of early pregnancy [J]. *N Engl J Med*, 2001, 345: 1400-1408.
- [12] CROSS J C. How to make a placenta: mechanisms of trophoblast cell differentiation in mice: a review [J]. *Placenta*, 2005, 26: S3-S9.
- [13] PIJNENBORG R. Implantation and immunology: maternal inflammatory and immune cellular responses to implantation and trophoblast invasion [J]. *Reprod Biomed Online*, 4(Suppl 3): 14-17.
- [14] YIN L J, ZHANG Y, LÜ P P, HE W H, WU Y T, LIU A X, et al. Insufficient maintenance DNA methylation is associated with abnormal embryonic development [J]. *BMC Med*, 2012, 10: 26.
- [15] MENON A G, RUTTER J L, VON SATTEL J P, SYNDER H, MURDOCH C, BLUMENFELD A, et al. Frequent loss of chromosome 14 in atypical and malignant meningioma: identification of a putative ‘tumor progression’ locus [J]. *Oncogene*, 1997, 14: 611-616.
- [16] MEZZOMO L C, GONZALES P H, PESCE F G, KRETZMANN FILHO N, FERREIRA N P, OLIVEIRA M C, et al. Expression of cell growth negative regulators *MEG3* and *GADD45* is lost in most sporadic human pituitary adenomas [J]. *Pituitary*, 2012, 15: 420-427.
- [17] 孙倩,刘博巽,林梦洁,尹凌帝,陈志强,孙明,等. 长链非编码 RNA *MEG3* 对胃癌细胞增殖的影响 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2014, 34: 1-6.
- [18] 李苹,杨凯云,曾龙剑,徐偈炬,姚树祥,吴锡南,等. 长链非编码 RNA *MEG3* 等在肺癌组织中的表达 [J]. *环境与健康杂志*, 2013, 30: 988-990.
- [19] YING L, HUANG Y, CHEN H, WANG Y, XIA L, CHEN Y, et al. Downregulated *MEG3* activate autophagy and increases cell proliferation in bladder cancer [J]. *Mol Biosyst*, 2013, 9: 407-411.
- [20] ZHOU Y, ZHANG X, KLIBANSKI A. *MEG3* noncoding RNA: a tumor suppressor [J]. *J Mol Endocrinol*, 2012, 48: R45-R53.

[本文编辑] 杨亚红