

DOI:10.16781/j.0258-879x.2018.04.0399

· 论 著 ·

RAC3 基因对早期滋养层细胞增殖、迁移和侵袭的影响

盛菲, 纪逸萱, 丁海遐, 章青, 李文*

海军军医大学(第二军医大学)长征医院生殖医学中心, 上海 200003

[摘要] **目的** 探讨 ras 相关 C3 肉毒杆菌毒素底物 3 (RAC3) 对早期滋养层细胞增殖、迁移和侵袭的影响。

方法 收集 2015 年 5 月至 2016 年 5 月在海军军医大学(第二军医大学)长征医院门诊或住院的不明原因自然流产和人工流产妊娠妇女的绒毛组织各 20 例, 应用 qPCR 法检测绒毛组织中 RAC3 mRNA 的表达。取 C57/B6 小鼠孕 6.5、14.5 和 19.5 d 的胎盘组织进行 mRNA 芯片检测。在早期人滋养层细胞系 HTR-8/SVneo 中干扰和过表达 RAC3 后, 应用 CCK-8 法和 Transwell 实验检测 RAC3 对 HTR-8/SVneo 细胞增殖、迁移和侵袭的影响。**结果** 不明原因自然流产绒毛组织中 RAC3 mRNA 的表达低于人工流产绒毛组织 ($P < 0.05$)。小鼠孕 6.5、14.5 d 胎盘组织中 RAC3 mRNA 的表达高于孕 19.5 d (P 均 < 0.05)。与对照组相比, 干扰 RAC3 表达后 HTR-8/SVneo 细胞的增殖、迁移和侵袭能力均减弱 (P 均 < 0.05), 过表达 RAC3 后 HTR-8/SVneo 细胞的增殖、迁移和侵袭能力增强 (P 均 < 0.01)。

结论 RAC3 对早期滋养层细胞的增殖、迁移和侵袭能力具有重要调控作用。

[关键词] 自然流产; 人工流产; ras 相关 C3 肉毒杆菌毒素底物 3; 胎盘; 滋养层细胞

[中图分类号] R 321.4 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2018)04-0399-05

Effect of RAC3 gene on proliferation, migration and invasion of early trophoblast cells

SHENG Fei, JI Yi-xuan, DING Hai-xia, ZHANG Qing, LI Wen*

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

[Abstract] **Objective** To explore the effect of ras-related C3 botulinum toxin substrate 3 (RAC3) on the proliferation, migration and invasion abilities of early trophoblast cells. **Methods** Villus samples from 20 unexplained spontaneous abortion (SA) and 20 induced abortion (IA) patients were collected between May 2015 and May 2016 in Changzheng Hospital of Navy Medical University (Second Military Medical University). qPCR was used to detect the expression of RAC3 mRNA in the villus tissues. mRNA Chip detection was performed on the placental tissues of 6.5, 14.5 and 19.5 days in mice. After interfering or overexpressing RAC3 in early human trophoblast cell line HTR-8/SVneo, the proliferation, migration and invasion abilities were detected by CCK-8 and Transwell assay, respectively. **Results** The expression of RAC3 mRNA was significantly lower in the villus tissue of unexplained SA patients than that in the villus tissue of IA patients ($P < 0.05$). RAC3 mRNA expressions were significantly higher in the placental tissues of 6.5 and 14.5 days in mice than that in the placental tissues of 19.5 days (both $P < 0.05$). Compared with the control group, the proliferation, migration and invasion abilities of the HTR-8/SVneo cells were significantly reduced by interfering RAC3 expression (all $P < 0.05$), and the proliferation, migration and invasion abilities were significantly enhanced by overexpressing RAC3 (all $P < 0.01$). **Conclusion** RAC3 plays an important role in regulating of the proliferation, migration and invasion of early trophoblast cells.

[Key words] spontaneous abortion; artificial abortion; ras-related C3 botulinum toxin substrate 3; placenta; trophoblast cell

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2018, 39(4): 399-403]

早期自然流产是妊娠常见不良结局之一, 在临床确诊的妊娠中自然流产的发生率约为 15%; 造成自然流产的病因有很多, 包括胚胎染色异常、感

染、免疫缺陷等, 而其中仍有 50% 以上是原因不明的自然流产^[1-2]。因此, 阐明造成不明原因流产的因素以及不明原因流产的发生机制十分必要。

[收稿日期] 2018-03-09 **[接受日期]** 2018-04-10

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

[作者简介] 盛菲, 硕士生。E-mail: shengfei@smmu.edu.cn

*通信作者(Corresponding author)。Tel: 021-81885872, E-mail: liwen@smmu.edu.cn

妊娠受一系列精密复杂的因素调控,其中胎盘作为一个暂时性存在的胚外器官是连接母体和胎儿的桥梁,胎盘的正常发育是胚胎存活和胎儿生长的保障^[3]。滋养层细胞作为胎盘的主要组成,在胎盘发育过程中扮演着重要角色,其参与了胚胎着床、启动胎盘形成,以及调控血管分化、内分泌和免疫保护等过程。若滋养层细胞发育或功能异常,则会导致早期妊娠失败或妊娠相关疾病发生^[4-5]。因此深入了解调控滋养层细胞分化和功能的相关调节机制将为解释妊娠相关疾病的发生提供重要理论支持。

Ras 相关 C3 肉毒杆菌毒素底物 3 (ras-related C3 botulinum toxin substrate 3, *RAC3*) 基因位于 17 号染色体,是 Rho-GTPase 超家族成员之一,该家族成员参与调控细胞生长、细胞骨架重组和蛋白激酶激活等多个细胞事件,有关 Rho-GTPase 家族与肿瘤发生和肿瘤细胞增殖、迁移及侵袭关系的研究被广泛报道^[6]。目前研究发现 *RAC3* 在多种组织中高表达^[7],尤其是在肿瘤组织中,其参与调控肺癌、乳腺癌、前列腺癌及卵巢癌等的发生、发展,调控肿瘤细胞的增殖、凋亡和迁移、侵袭等^[8-9]。滋养层细胞的生物学特性与肿瘤细胞之间存在相似性,具有高度的增殖、侵袭及迁移能力^[10],这些功能的正常行使为胎盘形成和维持胎儿发育生长所必需,因此本研究旨在明确 *RAC3* 在早期胎盘发育中是否也起着重要的调控作用。本研究通过观察 *RAC3* 在早期流产人绒毛组织中的表达及其对滋养层细胞增殖、迁移及侵袭的作用,探讨 *RAC3* 对早期胎盘发育中滋养层细胞功能的影响。

1 材料和方法

1.1 人绒毛组织样本采集与处理 自然流产组:2015年5月至2016年5月在海军军医大学(第二军医大学)长征医院门诊或住院流产的患者20例,妊娠6~12周,经B超检查确诊为胚胎宫内死亡尚未自然排出且病因不明。人工流产组:同期在医院门诊自愿要求行人工流产终止妊娠的健康妇女20名,均无死胎、死产、自然流产史,本次妊娠期间无先兆流产症状和体征,B超检查显示胚胎发育正常,无用药、感染以及放射线接触史。两组年龄差异无统计学意义[(29.1±1.37)岁 vs (32.2±1.13)岁, $P>0.05$]。采集两组的绒毛组

织,经生理盐水漂洗后,装入液氮罐保存。

1.2 小鼠胎盘组织芯片检测 实验动物选择 C57/B6 小鼠,选取经阴道分泌物检测证实处于发情期的雌性小鼠以 3:1 (雌:雄) 比例合笼,第 2 天早晨检查小鼠阴道精栓,阴栓阳性的单独饲养,标记为孕 0.5 d (E0.5 d)。于孕 6.5、14.5 和 19.5 d 获取小鼠胎盘组织用于 mRNA 芯片检测, mRNA 芯片检测委托上海康成生物工程有限公司完成,每个时间点重复检测 3 只小鼠,取平均值。

1.3 细胞培养与转染 选用人早期绒毛外滋养层细胞 (extravillous trophoblast, EVT) HTR-8/SVneo (复旦大学附属妇产科医院李大金教授惠赠),培养体系为含 10% 胎牛血清 (美国 Gibco 公司) 和 1% 青-链霉素 (美国 Hyclone 公司) 的 DMEM/F-12 培养液 (美国 Hyclone 公司),置于 37 °C、5% CO₂ 的恒温箱中培养。转染 *RAC3* 小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 和过表达质粒前将细胞接种于 6 孔板培养备用,待细胞贴壁生长至 70%~80% 融合后,按照转染试剂说明书进行转染,用 Lipofectamine 3000 (美国 Invitrogen 公司) 分别转染 siRNA 和过表达质粒进入 HTR-8/SVneo 细胞,并设置对照组,培养 48 h 后收取细胞,应用 qPCR 法检测干扰和过表达效率。siRNA 及过表达质粒购于广州复能基因有限公司,其中 siRNA-1 序列为 5' -AGA CUC CUU AGG ACC GCU UdTdT-3', siRNA-2 序列为 5' -CUG ACG UCU UUC UGA UCU GdTdT-3'。

1.4 RNA 提取和 qPCR 应用 TRIzol 试剂盒 (美国 Invitrogen 公司) 提取人绒毛组织中以及细胞中的总 RNA,测定 RNA 浓度后用反转录试剂盒 (日本 TaKaRa 公司) 将 RNA 反转录成 cDNA。选用 SYBR Green PCR 试剂盒 (日本 TaKaRa 公司) 进行 qPCR。引物序列如下:*RAC3* 上游 5' -CTC CAA AGT CAT CGT CCG GTT-3', 下游 5' -TGA GTT GCA CGT CAA ATC TGG-3'; 内参基因 β -actin 上游 5' -CAT CCG TAA AGA CCT CTA TGC CAA C-3', 下游 5' -ATG GAG CCA CCG ATC CAC A-3'。PCR 反应条件:95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 15 s、60 °C 退火 15 s、72 °C 延伸 20 s,共 40 个循环。反应结束后进行熔解曲线和扩增曲线分析。分析样本的 $\Delta\Delta C_t$ 值及 RQ 值,根据 RQ 值计算 *RAC3* 的表达量。为减少实验中加样误差,实验中设置 3 个复

孔, 计算时取其平均值。

1.5 细胞增殖能力检测 应用 CCK-8 试剂 (日本同仁公司) 检测 HTR-8/SVneo 细胞的增殖能力。将转染 siRNA 或过表达质粒后的 HTR-8/SVneo 细胞用胰酶消化并重悬, 调整细胞密度为 5 000/mL 后接种于 96 孔板, 每孔加入细胞悬液 100 μ L。每组设 5 个复孔, 分别于 12、24、36、48 和 72 h 时检测细胞生长情况, 检测前每孔加入 10 μ L CCK-8 试剂, 孵箱中孵育 2 h 后用酶标仪检测 450 nm 波长处的光密度 (*D*) 值。每组实验重复 3 次。

1.6 细胞迁移、侵袭能力检测 细胞迁移实验: 转染 siRNA 或过表达质粒后的 HTR-8/SVneo 细胞培养 48 h, 胰酶消化, 用无血清培养液重悬, 调整细胞密度为 5×10^5 /mL, 于 Transwell 小室上层 (8 μ m, 美国 Corning 公司) 加入 25 μ L 细胞悬液, 将小室置于 24 孔板中, 小室外加入 800 μ L 含 10% 胎牛血清的培养液, 置于孵箱中培养 24 h 后, 用棉签擦去小室上层细胞, 然后将小室放入 0.1% 多聚甲醛溶液中固定, 固定后用结晶紫染液染色。于光学显微镜下观察迁移细胞个数, 每组随机选取 5 个视野, 计算迁移细胞平均个数。细胞侵袭实验: 选取带基质胶的小室 (8 μ m, 美国 Corning 公司), 实验方法同细胞迁移实验。每组实验重复 3 次。

1.7 统计学处理 应用 GraphPad Prism 5.0 软件进行数据分析并制图, 呈正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 Student's *t* 检验。检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 自然流产、人工流产人绒毛组织中 *RAC3* mRNA 和小鼠胎盘组织中 *Rac3* mRNA 的表达 mRNA 芯片分析结果显示, 与人正常妊娠早期人工流产绒毛组织相比, 人妊娠早期不明原因自然流产绒毛组织中 *RAC3* mRNA 的表达下调 ($P < 0.05$, 图 1A); 小鼠胎盘组织中 *Rac3* mRNA 在胎盘发育孕 6.5、14.5 d 的表达高于孕 19.5 d (P 均 < 0.05 , 图 1B)。

2.2 下调 *RAC3* 表达抑制 HTR-8/SVneo 细胞的增殖能力 经 siRNA-1 和 siRNA-2 干扰后 HTR-8/SVneo 细胞中 *RAC3* mRNA 表达减弱, 与对照组相比下降超过 50% ($P < 0.05$, 图 2A); 转染过表达 *RAC3* 质粒的细胞中 *RAC3* mRNA 表达升高, 超过

对照组约 15 倍 ($P < 0.01$, 图 2B)。CCK-8 法检测结果显示, 干扰 *RAC3* (siRNA-2) 表达 48 h 和 72 h 后 HTR-8/SVneo 细胞的增殖能力较同时间点对照组降低 ($P < 0.05$, 图 2C), 而过表达 *RAC3* 后 HTR-8/SVneo 细胞的增殖能力增加 ($P < 0.05$, 图 2D)。结果表明 *RAC3* 与滋养层细胞 HTR-8/SVneo 的增殖能力有关, 下调其表达会减弱 HTR-8/SVneo 细胞的增殖能力。

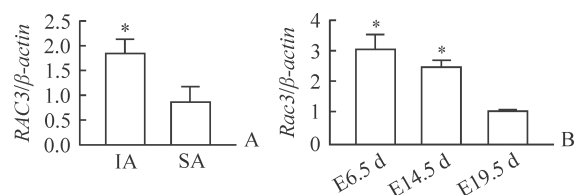


图 1 自然流产、人工流产人绒毛组织中 *RAC3* mRNA 和小鼠胎盘组织中 *Rac3* mRNA 的表达

Fig 1 mRNA expressions of *RAC3* in human villus tissues of SA and IA and *Rac3* in mouse placental tissues

A: Expression of *RAC3* mRNA in human villus tissues of SA and IA by qPCR ($P < 0.05$ vs SA. $n = 20$, $\bar{x} \pm s$); B: Expression of *Rac3* mRNA in mouse placental tissues by qPCR ($P < 0.05$ vs E19.5 d. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$). SA: Spontaneous abortion; IA: Induced abortion; E6.5 d: Embryonic day 6.5; E14.5 d: Embryonic day 14.5; E19.5 d: Embryonic day 19.5

2.3 下调 *RAC3* 表达抑制 HTR-8/SVneo 细胞的迁移和侵袭能力 与对照组相比, 干扰 *RAC3* 表达后 HTR-8/SVneo 细胞的迁移和侵袭能力均减弱 ($P < 0.05$, 图 3A), 过表达 *RAC3* 后 HTR-8/SVneo 细胞的迁移和侵袭能力增强 ($P < 0.05$, 图 3B)。结果表明, *RAC3* 可能影响滋养层细胞 HTR-8/SVneo 的迁移和侵袭能力, 从而影响滋养层细胞及胎盘的正常生长发育和功能。

3 讨论

滋养层细胞是决定胎盘和胎儿正常生长发育的关键因素, 参与连接胚胎和母体之间的物质交换以及胚胎着床和胎盘发育^[1], 滋养层细胞的高度增殖性和侵袭性是胚胎植入的关键, 当滋养层细胞出现增殖和侵袭功能缺陷时会影响胚胎着床, 引起妊娠相关疾病的发生, 如胎儿宫内生长受限、子痫和流产等^[12-13]。近年来有关滋养层细胞在妊娠过程中的重要作用受到关注。滋养层细胞的增殖和侵袭能力是保证胎盘正常生长发育的重

要因素^[14]。当滋养层细胞的增殖与凋亡之间的平衡失调时,会造成滋养层细胞功能异常,而滋养层

细胞侵袭或迁移能力异常也会造成滋养层功能的缺陷,从而引起妊娠相关疾病的发生。

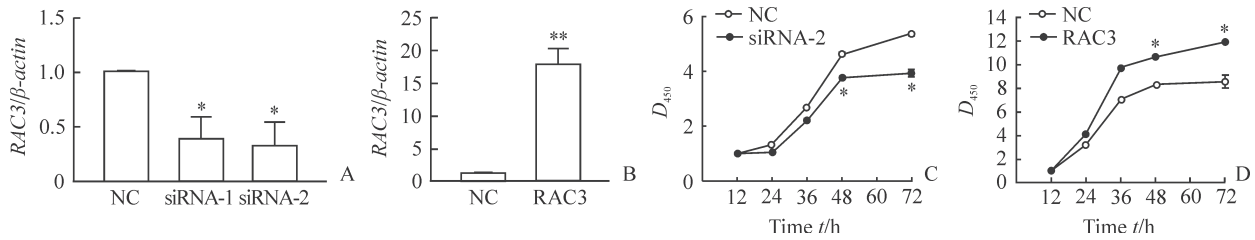


图2 HTR-8/SVneo 细胞中 RAC3 干扰效率和过表达结果及 RAC3 对 HTR-8/SVneo 细胞增殖能力的影响

Fig 2 Interference efficiency and overexpression of RAC3 in HTR-8/SVneo cells and effects of RAC3 on proliferation of HTR-8/SVneo cells

A, B: Expression of RAC3 mRNA in the HTR-8/SVneo cells transfected with siRNA (A) or overexpressed plasmid (B) by qPCR; C, D: Effects of down-regulated (C) and up-regulated (D) expressions of RAC3 on proliferation of HTR-8/SVneo cells by CCK-8 assay. NC: Normal control; siRNA: Small interfering RNA. *P<0.05, **P<0.01 vs NC group. n=3, $\bar{x}\pm s$

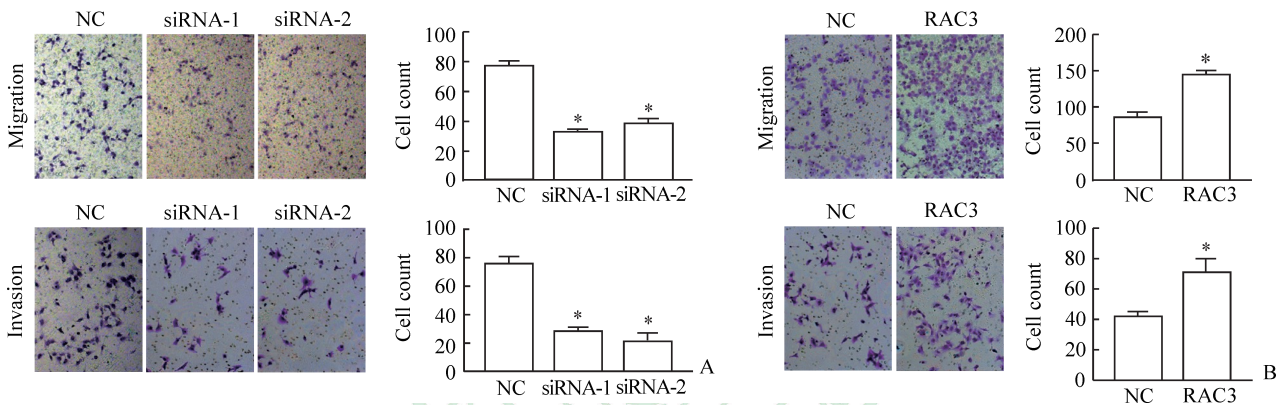


图3 下调 (A) 或过表达 (B) RAC3 对 HTR8-/SVneo 细胞迁移和侵袭能力的影响

Fig 3 Effects of down-regulation (A) or up-regulation (B) of RAC3 on migration and invasion of HTR8-/SVneo cells

NC: Normal control; siRNA: Small interfering RNA. Original magnification: $\times 100$. *P<0.05 vs NC group. n=3, $\bar{x}\pm s$

RAC3 作为一种致癌基因,首次报道于乳腺癌中且呈高表达^[15],后续相关研究证实其在许多恶性肿瘤中高度表达,调控细胞周期进展和细胞增殖、侵袭、迁移等相关基因的表达,抑制细胞凋亡、自噬和衰老,参与肿瘤的发生、发展^[16-18]。而在正常组织中 RAC3 的表达和相关功能少有报道,有研究称 RAC3 能够参与保持干细胞的多能性和自我更新^[19]。在正常组织或器官中,RAC3 的表达在成熟或分化细胞以及衰老组织中下调^[20],这些结果表明其表达水平的变化可能在发育中起关键作用。结合本研究小鼠胎盘组织 mRNA 芯片结果显示的 Rac3 在小鼠胎盘发育过程中的动态表达,推测其在胎盘发育或早期滋养层细胞中可能具有重要作用。

为了探讨 RAC3 在调控滋养层细胞功能中的作用,本研究选用早期 EVT 来源的 HTR-8/SVneo

细胞进行研究,通过干扰和过表达 RAC3 表达,探讨滋养层细胞的增殖、迁移和侵袭能力的改变。结果发现 RAC3 在早期不明原因自然流产人绒毛组织中表达下调,在滋养层细胞 HTR-8/SVneo 中干扰 RAC3 表达后细胞增殖能力下降,侵袭和迁移能力减弱;而在滋养层细胞中过表达 RAC3 后观察到相反结果。这些结果提示 RAC3 参与调控滋养层细胞的增殖和侵袭,表明滋养层细胞中 RAC3 表达下调可能会造成滋养层细胞功能缺陷,参与早期不明原因自然流产的发生。

总之,本研究发现 RAC3 在不明原因自然流产人绒毛组织中表达下调,RAC3 表达下调后滋养层细胞的增殖、侵袭和迁移能力减弱,而上调其表达则相反。这些结果均提示 RAC3 在滋养层细胞的生长发育和功能行使过程中发挥重要调控作用,而

RAC3 表达下调可能导致滋养层细胞功能异常, 这可能是发生不明原因流产的原因之一。然而 RAC3 参与调控滋养层细胞功能的具体机制仍需进一步探索。

[参考文献]

- [1] ALLISON J L, SCHUST D J. Recurrent first trimester pregnancy loss: revised definitions and novel causes[J]. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 2009, 16: 446-450.
- [2] LATHI R B, GRAY HAZARD F K, HEEREMAN-McKENNEY A, TAYLOR J, CHUEH J T. First trimester miscarriage evaluation[J]. *Semin Reprod Med*, 2011, 29: 463-469.
- [3] BAINES K J, RENAUD S J. Transcription factors that regulate trophoblast development and function[J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2017, 145: 39-88.
- [4] PFEFFER P L, PEARTON D J. Trophoblast development[J]. *Reproduction*, 2012, 143: 231-246.
- [5] KNOTT J G, PAUL S. Transcriptional regulators of the trophoblast lineage in mammals with hemochorial placentation[J]. *Reproduction*, 2014, 148: R121-R136.
- [6] LI H, PEYROLLIER K, KILIC G, BRAKEBUSCH C. Rho GTPases and cancer[J]. *Biofactors*, 2014, 40: 226-235.
- [7] HAATAJA L, GROFFEN J, HEISTERKAMP N. Characterization of RAC3, a novel member of the Rho family[J]. *J Biol Chem*, 1997, 272: 20384-20388.
- [8] LIU T Q, WANG G B, LI Z J, TONG X D, LIU H X. Silencing of Rac3 inhibits proliferation and induces apoptosis of human lung cancer cells[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2015, 16: 3061-3065.
- [9] MORRIS C M, HAATAJA L, McDONALD M, GOUGH S, MARKIE D, GROFFEN J, et al. The small GTPase RAC3 gene is located within chromosome band 17q25.3 outside and telomeric of a region commonly deleted in breast and ovarian tumours[J]. *Cytogenet Cell Genet*, 2000, 89: 18-23.
- [10] MURRAY M J, LESSEY B A. Embryo implantation and tumor metastasis: common pathways of invasion and angiogenesis[J]. *Semin Reprod Endocrinol*, 1999, 17: 275-290.
- [11] GUZELOGLU-KAYISLI O, BASAR M, ARICI A. Basic aspects of implantation[J]. *Reprod Biomed Online*, 2007, 15: 728-739.
- [12] CASTELLUCCI M, KOSANKE G, VERDENELLI F, HUPPERTZ B, KAUFMANN P. Villous sprouting: fundamental mechanisms of human placental development[J]. *Hum Reprod Update*, 2000, 6: 485-494.
- [13] LOREGGER T, POLLHEIMER J, KNÖFLER M. Regulatory transcription factors controlling function and differentiation of human trophoblast—a review[J]. *Placenta*, 2003, 24(Suppl A): S104-S110.
- [14] UNDERHILL L A, ROBINS J C. Trophoblast development in the murine preimplantation embryo[J]. *Semin Reprod Med*, 2016, 34: 57-62.
- [15] LI H, GOMES P J, CHEN J D. RAC3, a steroid/nuclear receptor-associated coactivator that is related to SRC-1 and TIF2[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 8479-8484.
- [16] ZHANG C, LIU T, WANG G, WANG H, CHE X, GAO X, et al. Rac3 regulates cell invasion, migration and EMT in lung adenocarcinoma through p38 MAPK pathway[J]. *J Cancer*, 2017, 8: 2511-2522.
- [17] COLO G P, ROSATO R R, GRANT S, COSTAS M A. RAC3 down-regulation sensitizes human chronic myeloid leukemia cells to TRAIL-induced apoptosis[J]. *FEBS Lett*, 2007, 581: 5075-5081.
- [18] FERNANDEZ LARROSA P N, ALVARADO C V, RUBIO M F, RUIZ GRECCO M, MICENMACHER S, MARTINEZ-NOEL G A, et al. Nuclear receptor coactivator RAC3 inhibits autophagy[J]. *Cancer Sci*, 2012, 103: 2064-2071.
- [19] CHITILIAN J M, THILLAINADESAN G, MANIAS J L, CHANG W Y, WALKER E, ISOVIC M, et al. Critical components of the pluripotency network are targets for the p300/CBP interacting protein (p/CIP) in embryonic stem cells[J]. *Stem Cells*, 2014, 32: 204-215.
- [20] FERNÁNDEZ LARROSA P N, RUÍZ GRECCO M, MENGUAL GÓMEZ D, ALVARADO C V, PANELO L C, RUBIO M F, et al. RAC3 more than a nuclear receptor coactivator: a key inhibitor of senescence that is downregulated in aging[J/OL]. *Cell Death Dis*, 2015, 6: e1902. doi: 10.1038/cddis.2015.218.

[本文编辑] 杨亚红