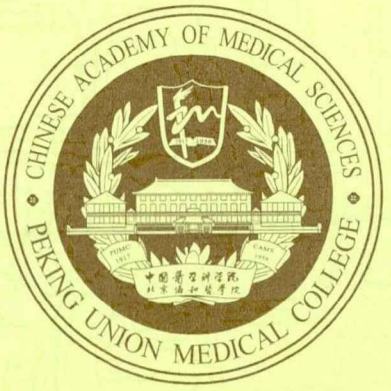
北京協和醫學院
中國醫學科學院

硕士研究生学位论文



北京协和医学院研究生院

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

学校代码： 10023
学 号：S2017020005

硕 士 学 位 论 文

大鼠胚胎着床后短暂抑制雌激素对胎盘滋养层细胞功能的影响

所 院 ： 国家卫生健康委科学技术研究所
姓 名 ： 刘婷婷
指导教师： 贺斌 副研究员
导师小组： 徐祥波 陈西华

学科专业： 细胞生物学
研究方向： 女性生殖生理
完成日期： 2020年7月

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

目录

目录 - 2 -
摘要 - 4 -
ABSTRACT - 6 -
引言 - 8 -
第一部分 大鼠妊娠早期雌激素缺乏对胎盘及胎盘生长因子的影响 - 10 -
前言 - 10 -
材料与方法 - 12 -
1. 大鼠妊娠着床后雌激素缺乏模型的建立及组织形态学观察 - 12 -
2. 检测 mRNA 的表达量-实时荧光定量 PCR - 16 -
3. 蛋白质表达的原位检测-免疫组织化学染色 - 19 -
4. 检测蛋白质的表达含量-蛋白免疫印迹杂交 - 20 -
5. 大鼠胎盘糖原差异性表达-PAS 染色 - 24 -
6. 统计学分析 - 24 -
结果 - 25 -
1. 大鼠胚胎着床后短暂雌激素缺乏模型的建立 - 25 -
2. Plgf mRNA 在大鼠胎盘组织中的表达 - 28 -
3. 大鼠着床后短暂雌激素缺乏模型 GD13.5 和 GD19.5 胎盘滋养层细胞侵袭结果 - 31 -
4. Plgf 蛋白在大鼠胚胎着床后雌激素短暂缺乏模型中的原位表达 - 32 -
5. Plgf 蛋白质在大鼠胚胎着床后雌激素短暂缺乏模型中的表达变化 - 33 -
讨论 - 34 -
小结 - 36 -
第二部分 ANGPTL8 对滋养层细胞增殖迁移侵袭的影响 - 37 -
前言 - 37 -
材料方法 - 39 -
1. 大鼠雌激素短暂缺乏模型子宫妊娠相关基因的差异性表达-表达谱芯片检测 - 39 -
2. qPCR 检测大鼠子宫差异基因的相对表达 - 40 -
3. Western Blot 检测大鼠子宫胎盘组织 Angptl8 蛋白的相对表达 - 41 -
4. 人滋养层细胞（HTR8-SVneo）的培养与鉴定 - 41 -
5. 重组 Angptl8 蛋白对 HTR8-Svneo 细胞增殖、迁移、侵袭的影响 - 44 -
结果 - 47 -
1. 大鼠雌激素缺乏模型子宫组织转录组基因芯片结果 - 47 -

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2. 大鼠妊娠子宫组织差异基因 mRNA 的验证 - 55 -
3. 大鼠妊娠子宫组织 Angptl8 蛋白的相对表达 - 55 -
4. HTR8-SVneo 绒毛膜滋养层细胞的鉴别结果 - 56 -
5. 重组 Angptl8 蛋白对 HTR8-Svneo 细胞增殖、迁移、侵袭的影响 - 56 -
讨论 - 61 -
小结 - 64 -
缩略词表 - 65 -
参考文献 - 67 -
综述 - 72 -
参考文献 - 76 -
致谢 - 80 -

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

摘要

胎盘的形成与滋养层细胞功能密切相关，涉及滋养层细胞的动态分化成熟，功能正常的滋养层细胞具有迁移性和侵入性特性，并具有与母体微环境内细胞的互动能力，对于胎盘的发育成熟不可或缺。雌激素和孕激素对于妊娠的起始、胎盘功能的维持和胎儿的生长发育具有重要作用。雌二醇（E_2）、孕酮（P_4）及其代谢物通过上调滋养层细胞的增殖、分化和迁移来参与血管生成以及正常的滋养细胞发育和侵袭。低 E_2 水平可能导致滋养层发育和血管生成过程不足，进而可能进一步导致低 E_2 水平，但其具体机制远未阐述清楚。

目的：研究胚胎着床后短暂雌激素水平低下对胎盘滋养层细胞影响机制。

方法：Wistar 雌性大鼠胚胎着床后于 GD6.5、GD7.5、GD8.5 给予来曲唑 0.16 mg/kg/d 灌胃，建立了大鼠胚胎着床后雌激素短暂缺乏模型。并于 GD10.5、GD13.5、GD16.5 和 GD19.5 四个妊娠时间点收集样本，测量胎盘大小重量，ELISA 方法测定血清 E_2 浓度，并对子宫胎盘组织进行组织学观察，采用 CK7 抗体免疫组织化学方法及糖原染色方法标记滋养层细胞，并利用免疫组织化学染色、qPCR 和 Western Blot 方法检测了胎盘生长因子（Plgf）在 GD19.5 时胎盘中的表达。大鼠胚胎着床后雌激素短暂缺乏模型单侧输卵管结扎后，使用表达谱芯片技术对实验组妊娠组织特异性差异表达基因进行了筛选和生物信息学分析，验证并选择候选基因 *Angptl8*，利用人滋养层细胞系 HTR8-SVneo 细胞研究重组 ANGPTL8 蛋白对细胞增殖、迁移、侵袭的影响，并采用油酸和软脂酸进行了功能补救实验。

结果：1. 与对照组相比，大鼠胚胎着床后短暂抑制雌激素可导致孕晚期胎盘肥大，在胎盘形成过程中滋养层细胞侵袭能力减弱，大鼠胎盘连接区空泡样糖原细胞出现蓄积，提示孕早期雌激素水平降低可影响滋养层细胞功能。**2.** 大鼠胚胎着床后给予来曲唑短暂抑制雌激素合成可导致孕晚期 Plgf 表达升高，提示孕早期雌激素水平降低影响孕晚期胎盘功能。**3.** 模型组子宫妊娠组织表达谱芯片特异性差异基因生物信息学分析结果提示着床后短暂抑制雌激素合成后，妊娠相关组织的差异基因主要与代谢功能异常、细胞增殖等功能相关。**4.** 着床后短暂抑制雌激素合成后可导致子宫妊娠组织 *Angptl8* 基因和 Angptl8 蛋白高表达，体外细胞培养中 1 nmol/L 至 8 nmol/L 的重组 Angptl8 蛋白抑制滋养层细胞侵袭功能，回补 0.1 mmol/L 的油酸和 0.1 mmol/L-0.2 mmol/L 软脂酸可挽救 Angptl8 抑制的滋养层细胞侵袭功能。

结论：大鼠孕早期短暂雌激素水平低下可以导致胎盘发育异常，滋养层细胞侵袭能力减弱，晚期胎盘组织 Plgf 表达升高；并可导致子宫妊娠组织 Angptl8 升高，Angptl8 可通过脂代谢途径抑制滋养层细胞侵袭能力。通过解析孕早期雌激素异常

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

波动对胎盘发育的影响，深入了解胎盘发育过程中雌激素的调控作用，为妊娠并发症及临床多种不良妊娠结局的溯源和防治策略提供有力实验理论依据。

关键词：雌二醇；胎盘；胎盘生长因子；HTR8-SVneo 细胞系；人血管生成素样蛋白 8

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Abstract

The formation of placenta is closely related to the function of trophoblastic cells, which are involved in the dynamic differentiation and maturation of trophoblastic cells. Normal functioning trophoblastic cells have the characteristics of migration and invasion, and have the ability to interact with cells in the maternal microenvironment, which is indispensable for the development and maturation of placenta. Estrogen and progesterone play an important role in pregnancy initiation, placental function maintenance and fetal growth and development. Estradiol (E_2), progesterone (P_4) and their metabolites are involved in angiogenesis and normal trophoblast cell development and invasion by up-regulating the proliferation, differentiation and migration of trophoblast cells. Low E_2 level may lead to insufficient trophoblast development and angiogenesis, which may further lead to low E_2 level, but the specific mechanism is far from clear.

Objective: To study the effect of transient postimplantation low estrogen on trophoblastic cells of placenta.

Methods: After implantation, Wistar female rats were given letrozole 0.16 mg/kg/d by intragastric administration on GD6.5, 7.5 and 8.5, and the model of transient estrogen deficiency after implantation was established. In GD10.5, GD13.5, GD16.5 and GD19.5 four pregnancy time collecting samples, measuring the placenta weight size, ELISA method for determination of serum E_2 concentration, and the uterine placenta tissue histology observation, using immunohistochemical methods CK7 antibody and glycogen dyeing method marked trophoblast cells, and by using immunohistochemical staining, qPCR and Western Blot methods to detect the placental growth factor (Plgf) GD19.5 expression in placenta. Rat embryo implantation after brief lack of estrogen after unilateral tubal ligation model, used the expression profile chip technology experimental pregnancy tissue specificity screening differentially expressed genes and bioinformatics analysis, validation and select candidate genes *Angptl8*, using the human trophoblast cell lines HTR8-SVneo cell research reorganization Angptl8 protein influence on cell proliferation, migration, invasion, and functional recovery experiment using oleic acid and palmitic acid.

Results: 1. Compared with the control group, temporary inhibition of estrogen after embryo implantation in rats can lead to placental hypertrophy in the third trimester, weakened invasion ability of trophoblast cells during placenta formation, and accumulation of vacuole-like glycogen cells in the placental junction area of rats, suggesting that decreased estrogen level in the first trimester can affect trophoblast cell

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

function. **2.** Temporary inhibition of estrogen synthesis by letrozole after implantation in rat embryos can lead to increased expression of Plgf in the third trimester, suggesting that decreased estrogen level in the first trimester affects placental function in the third trimester. **3.** Microarray specific differential gene bioinformatics analysis of the expression profile of pregnancy tissues in the model group indicated that after temporary inhibition of estrogen synthesis after implantation, the differential genes in pregnancy-related tissues were mainly related to metabolic dysfunction, cell proliferation and other functions. **4.** After implantation, temporary inhibition of estrogen synthesis can lead to high expression of *Angptl8* gene and Angptl8 protein in pregnancy tissues. In vitro cell culture, 1 nmol/L to 8 nmol/L recombinant Angptl8 protein inhibits trophoblastic cell invasion.

Conclusion: Transient low estrogen level in early pregnancy in rats can lead to abnormal placental development, decreased invasion ability of trophoblastic cells, and increased expression of Plgf in late placental tissues.It can also lead to the increase of Angptl8 in pregnancy tissue, which can inhibit the invasion ability of trophoblastic cells through the lipid metabolism pathway. By analyzing the effect of abnormal fluctuation of estrogen in early pregnancy on placenta development, it is not only beneficial to understand the regulation effect of estrogen during placenta development, but also can provide experimental and theoretical basis for the tracing and prevention and treatment strategies of many pregnancy complications and clinical adverse pregnancy outcomes.

Key words: Estradiol; Placenta; Placental growth factor; HTR8-SVneo cell line; Human angiogenin-like protein 8

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

引言

类固醇激素，又称甾体激素，对于维持妊娠期多种功能的平衡十分重要[1]。雌二醇（E_2）和孕酮（P_4）是甾体激素中的两类性激素，在妊娠早期阶段干预实现母体血管重塑和胎盘形成[2]，对胎儿的生长发育和胎盘功能的维持起关键作用[3,4]。雌激素和孕激素参与了从着床到分娩的妊娠全过程，它们的生物合成和新陈代谢是由胎儿、胎盘和母体的复杂途径产生的[5]。孕激素作为"妊娠激素"已被广泛应用于治疗不同的妇科病理（先兆流产、复发性流产、早产等）以及辅助生殖技术和妊娠的维持，主要用于调节免疫反应和抑制炎症反应(孕酮的存在及其在蜕膜水平上与孕酮受体的相互作用在孕产妇防御策略中起着重要作用)、减少子宫收缩性(子宫肌层适当的孕酮浓度能够对抗前列腺素以及催产素的刺激活动)、改善子宫胎盘循环并支持黄体期 (黄体酮可通过抑制绒毛外滋养层细胞的凋亡促进绒毛外滋养层细胞向蜕膜侵袭)，一旦确定了孕激素的治疗需要，再就是确定最佳的施药途径（口服、阴道和肌肉注射）和最佳剂量[6]。孕激素的波动异常已有较为透彻的基础研究和成熟的临床治疗手段，而对妊娠期雌激素异常波动及其可能引起的妊娠不良结局的研究还未深入透彻，值得我们深入研究。

有研究表明，子痫前期（preeclampsia，PE）是与雌激素和雌激素代谢物的合成、代谢及积累异常有关，结果强调了研究子痫前期病理生理学中雌激素和雌激素代谢物的血管功能和其他生理机制的必要性[7]。最近的研究表明，子痫前期中的雌二醇水平显著下降，E_2 水平低可能导致滋养细胞发育和血管生成过程的不足，进而进一步导致 E_2 水平降低，导致激素失衡和植入受损之间的恶性循环[8]。雌激素失调与 PE 发生的密切联系可能验证了雌激素水平作为一种生物标志物的有效性，也可能揭示一种预防或治疗 PE 的潜在方法。在妊娠早期，雌激素、孕酮及其代谢物参与胎盘血管生成和正常滋养层细胞的发育和侵袭，雌二醇改变血管生成标志物 VEGF、Plgf 和 sFLT 的浓度，这些标志物调节血管生成过程[9]。雌二醇水平低可能导致滋养细胞发育和血管生成不足，这被称为雌激素缺乏假说，由于胚胎着床受损，一旦雌二醇的代谢转移到胎盘，雌二醇的低水平可能会持续整个妊娠期，这解释了有时在子痫前期观察到的雌激素水平降低的原因[8, 10]。这也提示我们，在妊娠早期雌激素不足可能是子痫前期的病因之一。

成功的妊娠需要滋养层细胞大量侵入母体子宫蜕膜组织，以促进发育的胎盘和胎儿更接近母体血流供应[11]。如果做不到这一点，可能会导致临床上常见的妊娠并发症，如早产、子痫前期(PE)和胎儿生长受限[12]。侵袭性绒毛外滋养层细胞(EVT)起源于位于胎盘锚定绒毛顶端的细胞滋养细胞（CT）亚群，该亚群经历上皮-间质细胞转化[13]。EVT 从绒毛迁移并侵袭通过子宫内膜更深的地方和子宫肌层的内部三分之

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

一，特别靶向子宫蜕膜螺旋小动脉的相关部位[14,15]。EVT 入侵主要有两种途径：通过螺旋小动脉管腔的血管或母体组织的间质进入[16]。子宫螺旋小动脉的 EVT 侵袭会带来功能和结构上的改变，这对确保血管能够不受阻碍地提供低压、高血流量至关重要，特别是在胎儿呈指数增长的怀孕后期。重塑在妊娠中期完成，分为三个阶段：关键的第一步是不依赖滋养层细胞的蜕膜相关重塑，在蜕膜过程中，蜕膜化的子宫内膜被认为通过表达诸如基质金属蛋白酶(MMPs)、内分泌因子和细胞因子等调控因子的表达来控制滋养层细胞运动[17]；侵入并位于螺旋小动脉内或周围的 EVT 被认为可以诱导血管平滑肌细胞和内皮细胞的凋亡并对其进行替换[18,19]；结果，螺旋小动脉扩张，阻力低，失去交感神经支配，对血管收缩因子无反应[17,20,21]，这种变化，连同血管生成，允许 40 倍的子宫血流到胎盘[21]，至此完成了子宫螺旋动脉的重塑。

E_2 由合胞体滋养细胞以母体雄激素和胎儿肾上腺雄激素为前体合成[22,23]。E_2 参与妊娠的各个阶段，从促进子宫内膜的增殖[24]准备子宫植入、促进母体心血管适应妊娠到最终生产[17]。雄激素被认为是雌激素合成的底物[1]，雌激素主要是雄激素在芳香化酶的催化下合成而来的。来曲唑（Letrozole）是一种选择性的、非甾体类的芳香化酶抑制剂[25]，可以竞争性地与细胞色素 P450 酶的亚单位血红素结合，进而抑制芳香化酶的活性[26]，导致雌激素在所有组织中的生物合成减少[27]。研究表明，适当的 E_2 对早期妊娠的维持有重要意义，若 E_2 水平过低，妊娠则难以维持[28,29]，提示孕早期 E_2 水平对于健康妊娠的重要性。尽管 E_2 在生殖组织中的作用各不相同，但其在调节滋养细胞功能中的作用尚不清楚，且孕早期 E_2 异常波动对于妊娠的影响也研究很少。本课题组前期研究显示，大鼠妊娠胚胎着床后短暂抑制雌激素合成[30,31]，会导致胎盘发育异常[32]。故而我们进一步利用该模型，深入探索妊娠大鼠着床后短暂抑制雌激素对胎盘滋养层细胞功能的影响。本文以大鼠胚胎着床后雌激素短暂缺乏模型为立足点，探究大鼠妊娠着床后一过性的雌激素水平低下对妊娠晚期可能会产生的影响，利用表达谱芯片筛选差异基因，并研究特异性差异基因 *Angptl8* 对胎盘滋养层细胞的作用影响，利用体外细胞培养实验来模拟过表达的 ANGPTL8 差异蛋白对人绒毛膜滋养层细胞的影响，以及回补下游产物挽救该蛋白对滋养层细胞特性的改变。通过解析孕早期雌激素异常波动对孕晚期胎盘发育的影响，不仅有利于深入了解胎盘发育过程中雌激素的调控作用，为妊娠并发症和临床上各种不良妊娠结局的溯源及防治策略提供有力的实验和理论依据。

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

第一部分 大鼠妊娠早期雌激素缺乏对胎盘及胎盘生长因子的影响

前言

女性体内有四种有活性的内源性雌激素类型：雌酮（Estrone，E_1），雌二醇（Estradiol，E_2），雌三醇（Estriol，E_3），雌四醇（Estetrol，E_4）[33]。在育龄期的女性中，从血清绝对水平和雌激素活性来看，E_2是主要的雌激素。所有不同形式的雌激素都是由雄激素，尤其是睾酮和雄烯二酮[34]，通过芳香化酶合成而来的。雌激素扩散进入细胞膜，结合并激活二聚体核蛋白雌激素受体（Estrogen Receptor，ERs），雌激素-雌激素受体复合物结合到激素应答元件（Hormone Response Element，HRE）的 DNA 序列上激活靶基因的转录[35]，调节靶基因的表达。此外，雌激素还能够结合并激活快速信号膜雌激素受体（mERs），如 GPER（GPR30）[3]。雌激素发挥作用取决于细胞内的雌激素受体水平，雌激素受体表达在特定的组织，如卵巢、子宫、和乳房[36]。E_2 和 P_4 对于妊娠的起始以及妊娠过程中胎盘功能的维持和胎儿的生长发育都起着重要的作用。特别是 IVF 中，医源性黄体缺乏需要在黄体期补充 P_4 已得到普遍认可，但对于伴随的 E_2 下降是否对妊娠结局有害，以及补充 E_2 是否会改善结局尚无共识[37]。临床研究提示，IVF 促排卵后黄体期 E_2 降低 10%，其临床妊娠和活产率下降 40-50%，尽管血清 E_2 水平仍然是评估对卵巢刺激刺激反应的重要组成部分，但 E_2 水平任何特定变化的预后价值仍不清楚，有关雌激素对妊娠影响的具体作用机理远未阐明[38]。

来曲唑是第三代非甾体高效选择性的芳香化酶抑制剂，可以抑制从雄激素向雌激素的生物合成过程，从而降低生物体内雌激素的生物合成[34,39]。本课题组前期实验结果表明在大鼠胚胎着床后短期给予来曲唑抑制雌激素合成会引起妊娠后期胎盘过度增生等病理现象的发生[30]。胎盘是母体与胚胎物质交换的媒介，它包括来自滋养细胞的胎儿部分（绒毛膜绒毛）和来自子宫内膜的母体部分（蜕膜）[1]。在雌性动物妊娠胎盘形成后，胎盘能产生一系列类固醇、蛋白质和肽激素（胎盘激素）等。

胎盘生长因子（PLGF）是一种血管生成蛋白，在妊娠期高表达，与胎盘功能密切相关[40]。PLGF 是血管内皮生长因子(VEGF)家族中的一员，是一种分泌的二聚糖蛋白[41]，主要表达于胎盘滋养层细胞中，与血管内皮生长因子受体（VEGFR）结合，对胎儿胎盘循环发挥促血管生成作用[42]，并且能增加血管通透性，可以促进滋养细胞增殖与分化，它在子痫前期预测、诊断和治疗中发挥着越来越重要的作用[43]。本研究以大鼠为研究对象建立动物模型，研究大鼠胚胎着床后短暂抑制体内雌激素生

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

物合成对孕晚期胎盘及胎盘生长因子的影响，为雌激素对妊娠影响的具体作用机理提供实验依据。

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

材料与方法

1. 大鼠妊娠着床后雌激素缺乏模型的建立及组织形态学观察

1) 建立大鼠妊娠着床后雌激素缺乏模型

(1) 实验动物与饲养

在北京维通利华实验动物技术有限公司订购 50 只大鼠，分别为 35 只 9-10 周龄的 Wistar 雌性大鼠（SPFII），15 只 9-10 周龄 Wistar 雄性大鼠，并在国家卫生健康委科学技术研究所的实验动物中心进行饲养，大鼠自由采食和饮水。每天早上 8:00 至晚上 8:00 为光照时间，其余时间为黑暗。动物房环境温度为 21±1 °C，相对湿度为 60%-80%。实验严格遵循国家卫生健康委科学技术研究所伦理委员会相关规定[44]。

(2) 实验试剂与器材

试剂	厂家
羧甲基纤维素钠	国药集团化学试剂有限公司
来曲唑	诺华制药
NaCl、$Na_2HPO_4•12H_2O$、KCl、KH_2PO_4	国药集团化学试剂有限公司
多聚甲醛	天津市光复科技发展有限公司
PBS 缓冲液粉末	北京中杉金桥生物技术有限公司
天平	METTLER TOLEDO
加热搅拌器	Thermolyne
灌胃针	北京合力科创科技发展有限公司
1 mL 0.4 μm 针头注射器	上海米沙瓦医科工业有限公司
高熔点石蜡	Leica
组织包埋盒	江苏世泰实验器材有限公司
石蜡包埋机	Leica
病理组织漂片仪（摊片机）	LAB-LINE INSTRUMENTS
病理级显微镜载玻片	江苏世泰实验器材有限公司
病理级显微镜盖玻片	江苏世泰实验器材有限公司
粘附载玻片	江苏世泰实验器材有限公司
病理切片刀片	Leica
石蜡切片机	Leica RM2235
石蜡包埋模具	北京中杉金桥生物技术有限公司
苏木素	珠海贝索生物技术有限公司
伊红 Y	北京索莱宝科技有限公司
乙醇	北京化工厂
二甲苯	北京化工厂

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

中性树胶	北京华申康复器械有限公司
17β-Estradiol-Elisa-Kit	Abcam ab108667
大鼠固定器	维通利华
热水袋	上海永字牌橡胶热水袋厂商公司
1.5 mL EP 管	Axygen
75%乙醇	北京化工厂
棉球	河南省升元医用卫材有限公司

① 配制羧甲基纤维素钠溶液：

CMC-Na 0.5g

粉末加热搅拌溶解到100 mL蒸馏水中，配制成0.5%羧甲基纤维素钠混悬液作为来曲唑粉末的溶媒。

② 配制来曲唑混悬液：

来曲唑 2.5mg

充分碾碎加入到过滤除菌的羧甲基纤维素钠溶液中，过夜搅拌，配制成0.04 mg/mL的来曲唑混悬液。

③ 配制 4%多聚甲醛溶液：

多聚甲醛 40 g

溶解到 900 mL 1x PBS 缓冲液中，加入转子，放在磁力搅拌器上搅拌过夜。次日再添加 0.01 M PBS 缓冲液定容至 1000 mL，充分混匀，室温保存备用。

2) 大鼠妊娠胚胎着床后雌激素缺乏模型的建立和子宫胎盘标本收集

在武斌，苑凤等人的实验[30, 31]基础上建立大鼠妊娠胚胎着床后雌激素短暂缺乏模型，并进行大鼠子宫妊娠相关组织取材。具体实验流程如下。

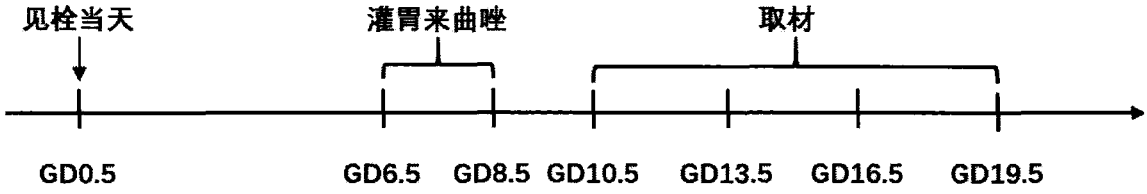


图 1-1 大鼠妊娠早期雌激素缺乏模型建立流程

(1) 雌性大鼠妊娠

晚上 8 点，雌雄大鼠以 1：1 的比例合笼，以次日见到阴道栓作为妊娠标志，记为妊娠第 0.5 天（GD 0.5）。将妊娠大鼠随机分为两组，分别为对照组和实验组，对照组和实验组又各分为 GD10.5、GD13.5、GD16.5 和 GD19.5 四个妊娠时间点。

(2) 灌胃给药

实验组大鼠（n=20）在 GD6.5、GD7.5、GD8.5 的上午灌胃来曲唑混悬液，灌

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

胃前称取大鼠体重，按0.16 mg/kg的来曲唑灌胃剂量对大鼠进行灌胃。进行灌胃前，应将来曲唑混悬液混匀再进行灌胃操作。对照组大鼠（n=20）灌胃同等体积的溶媒羧甲基纤维素钠混悬液。并将实验组和对照组大鼠分为4个时间点（GD10.5、GD13.5、GD16.5、GD19.5）分别取材。

(3) 大鼠尾静脉取血

大鼠固定器固定住大鼠，用热水袋捂热大鼠尾巴，并用酒精棉球将鼠尾擦拭干净，用干净的普通棉球擦干酒精。刀片迅速横切鼠尾并将静脉血引流到干净的1.5 mL EP管中。室温水平静置4 h后，6000 r，离心15 min，4 ℃，吸取血清于新EP管中，冻于-80 ℃保存。

(4) 大鼠取材

在GD10.5、GD13.5、GD16.5和GD19.5分别取材（每个时间点大鼠的只数n=5）。颈椎脱臼法处死大鼠，酒精润湿皮毛，剪开大鼠腹部，剖出双侧子宫后，GD 16.5和GD 19.5小心剥离出胎盘，分别固定在4%多聚甲醛和冻存在液氮中。GD 10.5和GD 13.5胎盘还未成形，无法剥离，直接固定和冻存整个子宫部分。4%多聚甲醛固定液体积需大于固定组织体积的10倍，室温固定48h后，再继续进行后续石蜡包埋染色等处理。速冻在液氮的样本放在-80°C冰箱保存，用于后续组织RNA和蛋白质的提取。

3) ELISA法测定血清雌激素浓度

将上述大鼠尾部取血的血清4 ℃冰箱过夜解冻，混匀5 min。将试剂盒中的试剂恢复至室温（18-25 ℃）。用ddH_2O水将10x洗涤液稀释为1x并混合均匀。

(1) 板子每孔添加25 μL标准品、对照品和样品。每孔添加200 μL HRP标记的17β-雌二醇二抗，留一个孔作为空白孔。

(2) 用试剂盒中的箔纸覆盖板子，37 ℃孵育2 h。

(3) 孵育完成后丢弃箔纸，弃去孔内液体，加入300 μL的1x洗涤液清洗孔板3遍，轻轻贴壁加入，避免溢出孔外，每次洗涤液清洗浸泡时间需大于5 s。最后，在无尘纸上倒置拍打并弃去剩余液体。

(4) 每孔加入100 μL TMB底物溶液，室温避光孵育30 min。

(5) 以相同的顺序相同的速率，每孔添加100 μL终止液。轻柔震荡板子，溶液由蓝色变为黄色。

(6) 添加终止液后，测定450 nm波长下的吸光度，反应终止后30 min内都可测。

(7) 根据标准品绘制标准曲线，求得各样本血清中雌激素的浓度（pg/mL）。

4) 组织形态学观察

(1) 制备大鼠组织石蜡切片

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

① 乙醇脱水：组织固定 48 h 横切后，装入包埋盒，标明序号，75%乙醇、85%乙醇、95%乙醇 I、95%乙醇 II、100%乙醇 I 和 100%乙醇 II 各脱水 1 h[45]。浸泡时晃动包埋盒或乙醇缸，避免包埋盒中有气泡导致脱水不充分，后续浸泡二甲苯和石蜡也是如此；

② 二甲苯透明：浸泡 30 min，即二甲苯 I 和 II 各浸泡 15 min；

③ 浸蜡：烤箱预热至 65°C，待缸里的石蜡融化后，将二甲苯缸 II 移至烤箱附近，迅速将组织浸入融化的蜡缸中，蜡缸 I 和 II 各 1 h，随后进行组织石蜡块包埋;

④ 组织石蜡块包埋：将大鼠子宫或胎盘组织的横切面朝下贴近石蜡包埋模具中，盖上石蜡包埋盒的底槽部分，顺着边角添加部分融化石蜡埋住包埋盒底槽后，放置在光滑平整的水平桌面上，待石蜡自然冷却；

⑤ 切片：组织蜡块在-20°C 冰箱预冷，然后连续切片至大鼠子宫或胎盘组织最大横切面（厚约 4~5 μm）。30%乙醇预展组织，再捞入病理组织漂片仪（摊片机）37 °C 水中进一步延展。待其自然展开后，载玻片捞片，65°C 烤箱中烤 2 h，烤化石蜡后直接染色，或者室温存放备用，待染色前需要重新烤 1.5h 烤化石蜡。

(2) H&E（苏木精-伊红）染色

① 配制主要试剂

伊红染液：

伊红 Y	2 g
蒸馏水	500 mL
冰醋酸	5 滴

② 组织石蜡切片脱蜡水化

a. 脱蜡：65 °C烤箱烘烤切片 60 min，待石蜡完全融化后，将二甲苯缸移至烤箱旁，迅速浸入二甲苯 I 中脱蜡，二甲苯 I 和 II 各浸泡 15 min；

b. 水化：100%乙醇 I、100%乙醇 II、95%乙醇 I、95%乙醇 II、85%乙醇、70%乙醇、蒸馏水各水化 5 min[46]。

③ 苏木素伊红染色

a. 苏木素染色：苏木素染色 1 min，水洗 3 次；

b. 分化：1%盐酸乙醇分化 2 s，水洗 3 次；

c. 返蓝：1%氨水乙醇返蓝 1 min，水洗 3 次；

d. 伊红染色：伊红染色 1 min，水洗 3 次。

④ 脱水、透明、封片

a. 脱水：75%乙醇浸泡 2 s，95%I 乙醇、95%II 乙醇、100%I 乙醇和 100%II 乙醇中各脱水 5 min[47]；

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

b. 透明：二甲苯 I、II 各 15 min。

c. 封片：滴加中性树胶，盖玻片封片，避免气泡。

2. 检测 mRNA 的表达量-实时荧光定量 PCR

1) 提取总 RNA

(1) 主要仪器试剂和配制流程

试剂	厂家
Trizol	Ambion
RNase Free EP 管、枪头	Axygen
三氯甲烷、异丙醇、无水乙醇	北京化工厂
高通量组织研磨器	宁波新芝生物科技股份有限公司
离心机	Sigma
涡旋机	江苏海门仪器厂
DEPC 水	生工生物工程(上海)股份有限公司
紫外分光光度计	Thermo Fisher Scientific
DYY－III 型电泳仪	北京六一仪器厂
凝胶成像系统	北京赛智创业科技有限公司
琼脂糖	北京全式金生物技术有限公司
电子天平	Mettler-Toledo
微波炉	格兰仕
50x TAE	北京索莱宝科技有限公司
GelRed	Biotium
DNA/RNA Marker	天根生化科技(北京)有限公司
DNA/RNA Loading Buffer	天根生化科技(北京)有限公司

(2) 操作步骤

① 将冻存在-80°C 冰箱的组织在电子天平上称出 50 mg，放入盛有 500 μL Trizol 的 2 mL RNase-Free EP 管中，放入高通量组织研磨器中，1500 rcf，1 min。

② 静置 10 min，使组织完全裂解。

③ EP 管中加入 100 μL 三氯甲烷，剧烈震荡 15 s。室温静置 3 min 后，12000 g，4°C 离心 15 min。

④ 轻拿出 EP 管，EP 管中分为上中下 3 层，上层即无色透明水相 RNA，中层即白色蛋白质相，下层即粉红色有机相。轻轻吸取 100 μL 上清液转移至新的 1.5 mL RNase-Free 的 EP 管中，小心避免吸出其他层液体。

⑤ 每管加入 100 μL 在-20°C 冰箱预冷的异丙醇，上下晃动，均匀沉淀 RNA，静置 10 min。

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

⑥ 12000 g，4°C 离心 10 min，弃上清，小心避免将 EP 管底部的白色沉淀 RNA 倒出。

⑦ 加入 1 mL -20°C 预冷的 75%乙醇（1 体积 DEPC 水+3 体积无水乙醇），上下颠倒晃动充分洗涤 RNA。12000 g，4°C，离心 5 min，弃上清。可重复一次洗涤一次。

⑧ 滤纸吸干液体，干燥 RNA。加入 20 μL DEPC 水溶解 RNA。若 RNA 干燥过度导致溶解不充分，可 55°C 水浴 8 min 助溶。用 NanoDrop 2000 分光光度计测定单链 RNA 的 OD 值，OD260/280 大于 2.0 说明 RNA 无蛋白质和酚类污染，OD260/230 大于 2.0 就说明 RNA 无碳水化合物和胍盐污染，综合以上两条判定 RNA 提取纯度合格。

⑨ 用 1%琼脂糖凝胶电泳方法判定 RNA 是否完整，无降解。用电子天平称取 0.4 g 琼脂糖于锥形瓶中，加入 40 mL TAE 缓冲液，放入微波炉中加热 2 min 后取出，待温度降至 65°C 左右，加入 4 μL 10000x 的 GelRed 混匀后倒入装有凝胶托盘的制胶器中，插入 1 mm 厚的 11 齿试样格。制胶器放在水平桌面上，静置 30 min 后，竖直拔出试样格，将凝胶从凝胶托盘中推入电泳仪中，凝胶孔一侧朝负极，避免凝胶破碎，倒入 TAE 电泳缓冲液，液面稍稍没过凝胶即可。将 RNA 和 Marker 分别与（6x）Loading Buffer 混合均匀后点样，盖上电泳仪上盖，接入电流，恒压 120V，20min。将凝胶放入成像仪中，在紫外灯光照射下成像拍照，凝胶文件和图像分析系统分析处理结果。

2) RNA 逆转录为 cDNA

(1) 主要试剂来源和配制：

试剂耗材	制造商
PCR 扩增仪	Eppendorf
RNase-free Microtube，枪头	Axygen
PrimeScript™ RT reagent Kit（RR037A）	Takara 宝生物工程(大连)有限公司

(2) 实验步骤

① 根据测定的 RNA 浓度计算 500 ng RNA 所需要的液体体积。在 RNase Free Microtube 管中配制 10 μL 体系的模板 RNA 的反应液。操作步骤在冰上进行，反应体系如下：

5x PrimeScript Buffer	2 μL
PrimeScript RT Enzyme Mix I	0.5 μL
Oligo dT Primer	0.5 μL
Random 6 mers	0.5 μL
Total RNA	500 ng
RNase-Free ddH_2O	up to 10 μL

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

总体积	**10 μL**

②在 Microtube 管内配制好上述反应体系，在下述反应条件下进行逆转录：

反应温度	反应时间
37 °C	15 min（逆转录）
85 °C	5 s（逆转录酶失活）
4 °C	反应结束

③ 将逆转录后的反应液加 RNase Free dH_2O 稀释 10 倍。

3) Real-time Fluorescence Quantitive PCR

(1) 主要试剂

仪器试剂	厂家
逆转录试剂盒	Takara 宝生物工程(大连)有限公司
StepOnePlus™ 实时 PCR 扩增仪	Applied Biosystems
引物	Invitrogen，北京擎科生物科技有限公司

引物序列如下：

基因名称		引物序列
Rat *Plgf*	正义引物	5'- TGTCTGCTGGGAACAACTCAA -3'
	反义引物	5'- CCACTACAGCGACTCAGAAGG -3'
Rat *β-Actin*	正义引物	5'- CTATGAGGGTTACGCGCTCC -3'
	反义引物	5'- ATGTCACGCACGATTTCCCT -3'

(2) 操作步骤

① 将逆转录后的 cDNA 用 DEPC 水稀释 10 倍备用，所有 cDNA 样本用引物扩增均需重复 3 次。

② 配制 20 μL qPCR 反应体系，在冰上操作：

SYBR Premix Ex TaqII	10.0 μL
Forward Primer	0.8 μL
Reverse Primer	0.8 μL
Rox Reference Dye	0.4 μL
cDNA溶液	2 μL
dH_2O	6.0 μL
总体积	**20 μL**

③ 在 StepOnePlus™ 实时荧光定量 PCR 扩增仪上设置两步法 PCR 反应程序。

过程	温度	时间	循环数
预变性	95.0°C	30 s	1
PCR 反应	95.0°C	5 s	40

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

	60.0°C	30 s
熔解曲线	95.0°C	15 s
	60.0°C	1 min
	95.0°C	15 s

④ 1%琼脂糖水平凝胶电泳检验 cDNA 条带准确性。

用电子天平称取 0.4 g 琼脂糖粉末于锥形瓶中，加入 40 mL TAE 缓冲液，放入微波炉中小火加热 2 min 后取出。待温度降至 65°C 左右，加入 4 μL 10000x 的 GelRed，混匀后迅速倒入装有凝胶托盘的制胶器中，避免气泡，插入 1 mm 厚的 11 齿试样格。制胶器放在水平桌面上，静置 30 min 后，竖直拔出试样格，将凝胶从凝胶托盘中推入电泳仪中，凝胶孔一侧朝负极，避免凝胶破碎，倒入 TAE 电泳缓冲液，液面稍稍没过凝胶即可。将 cDNA 和 Marker 分别与（6x）Loading Buffer 混合均匀后上样，盖上电泳仪上盖，接入电流，恒压 100V，30min。电泳完后将凝胶放入成像仪中，在紫外灯光照射下拍照成像，凝胶文件和图像分析系统分析处理结果。

4) 数据计算采集(ΔΔCt 法)

目的基因扩增，扩增和熔解曲线，求得 Ct 值，代入下列公式：

$$\Delta Ct=Ct_{目的基因}-Ct_{内参基因}$$

$$\Delta\Delta Ct=\Delta Ct_{实验组}-\Delta Ct_{对照组}$$

$$基因相对表达量 = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

3. 蛋白质表达的原位检测-免疫组织化学染色

1) 主要试剂

抗体来源及稀释浓度

抗体	厂商	IHC 稀释比例
兔抗 CK7 单克隆抗体	Abcam	1：2000
兔抗 PLGF 多克隆抗体	ABclonal	1：200

其他	制造商
内源性过氧化物酶阻断剂、封闭用正常山羊血清工作液、生物素标记山羊抗兔 IgG 聚合物、辣根酶标记链霉卵白素工作液	北京中杉金桥生物技术有限公司
柠檬酸缓冲液	北京中杉金桥生物技术有限公司
PBS 缓冲液粉末	北京中杉金桥生物技术有限公司
苏木素	珠海贝索生物技术有限公司

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

无水乙醇、95%乙醇	北京化工厂
二甲苯	北京化工厂
DAB 显色试剂盒	北京中杉金桥生物技术有限公司
中性树胶	北京华申康复器械有限公司
高压锅	广东顺发五金制品有限公司
电磁炉	美的集团有限公司
免疫组化笔	北京中杉金桥生物技术有限公司
黑色湿盒	协力塑料制品厂

2) 实验步骤

(1) 大鼠子宫和胎盘组织经固定、包埋、切片、烤片、二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化至 ddH_2O 中，具体步骤详见大鼠组织石蜡切片内容；

(2) 抗原修复：pH 6.0 的 1x 柠檬酸缓冲液水浴加热至沸腾后，96-98°C 煮片 20 min，自然冷却至室温。PBS 涮洗切片 3 次，每次 5 min。

(3) 猝灭内源性过氧化物酶活性：用免疫组化笔圈出组织并滴加内源性过氧化物酶阻断剂，室温孵育 10 min。PBS 涮洗切片 3 次，每次 5 min。

(4) 封闭：用二抗种属来源的非免疫血清（山羊血清）室温封闭 2 h。

(5) 一抗：封闭后直接把封闭液弃去，不清洗。直接滴加一抗，在 37°C 恒温箱中湿盒内孵育 1 h 或 4°C 过夜孵育，恒温箱中加入水盘，保持湿润防止干片。PBS 浸泡切片涮洗 3 次，每次 5 min。

(6) 二抗：滴加辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG，室温孵育 30 min。PBS 涮洗切片 3 次，每次 5 min。

(7) DAB 显色：将 50 μL 试剂 1（DAB 浓缩液）和 1 mL 试剂 2（DAB 底物液）混匀，配制成 DAB 工作液，滴加到组织表面反应 5~8 min。组织反应部位产生棕黄色沉淀物再用清水洗去显色液终止反应。DAB 显色液配制好后避光保存，6 h 内使用。

(8) 细胞核复染：苏木精染液染色 1 min，清水洗去残留染色液，涮洗 3 次。在 1% 盐酸乙醇中分化 2 s，清水涮洗 3 遍。1%氨水乙醇返蓝 40 s，清水涮洗 3 遍。

(9) 脱水封片：75%乙醇、95%乙醇 I、95%乙醇 II、100%乙醇 I、100%乙醇 II 脱水，二甲苯 I、II 共透明 30 min，滴加中性树胶封片[48]。

4. 检测蛋白质的表达含量-蛋白免疫印迹杂交

1) 实验仪器及试剂

实验仪器及试剂	厂家
RIPA 裂解液	Thermo Fisher Scientific
PMSF	索莱宝生物科技有限公司
蛋白酶抑制剂混合物	江苏凯基生物技术股份有限公司

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

蛋白磷酸酶抑制剂	索莱宝生物科技有限公司
甲醇	北京市通广精细化工公司
PVDF 膜	Merck Millipore
电泳槽、转印槽、厚滤纸等	Bio-Rad
杂交袋	北京欣经科生物技术有限公司
酶标仪	上海宝予德科学仪器有限公司
高通量组织研磨器	宁波新芝生物科技股份有限公司
BCA 蛋白分析试剂盒	Thermo Fisher Scientific
SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒	上海碧云天生物技术有限公司
5×Loading Buffer	北京康为世纪生物科技有限公司
Prestained protein ladder	Thermo Fisher
电泳缓冲液	索莱宝生物科技有限公司
电转缓冲液	索莱宝生物科技有限公司
脱脂奶粉	内蒙古伊利实业集团股份有限公司
通用型抗体稀释液	苏州新赛美生物科技有限公司
TBST	索莱宝生物科技有限公司
HRP 山羊抗兔 IgG	武汉爱博泰克生物科技有限公司
ECL 发光试剂盒	苏州新赛美生物科技有限公司
凝胶文件和图像分析系统	北京赛智创业科技有限公司

抗体与稀释浓度

抗体	制造商	WB 稀释比例
兔抗 PLGF 多抗	ABclonal	1:1000
β-Actin 多抗	Proteintech	1:3000

(1) 5%脱脂奶粉

脱脂奶粉 1 g

TBST 缓冲液 20 mL

溶解混匀使用。

(2) SDS-PAGE 凝胶配制

配胶成分	10%分离胶（mL）	5%浓缩胶（mL）
蒸馏水	2.7	2.7
30%Acr-Bis（29：1）	3.3	0.67
1M Tris（pH 8.8）	3.8	—
1M Tris（pH 6.8）	—	0.5

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

10%SDS	0.1	0.04
10%过硫酸铵	0.1	0.04
TEMED	0.004	0.004
总计	10	4

2) 实验步骤

(1) 分离提取组织蛋白

-80°C 冰箱中取出冰冻的大鼠子宫，冰盒上切取 50 mg 大鼠子宫和胎盘组织放在液氮中备用。将组织加入到含有 500 μL RIPA 裂解液和 0.5 μL（1000x）PMSF 和 0.5 μL 蛋白酶抑制剂的 2 mL 螺口管中，高通量组织破碎器破碎组织 1min，然后 12000 g，4°C，离心 15 min，吸取上清液于新的 1.5 mL EP 管中。

(2) BCA 法检测蛋白质浓度

用BCA法测定蛋白质浓度。根据BCA蛋白定量检测试剂盒说明书的操作步骤进行下述实验：

① 用 PBS 将 BSA 充分溶解，倍比稀释成 5 个浓度梯度的标准溶液，最后一管不加 BSA：2 mg/mL、1 mg/mL、0.5 mg/mL、0.25 mg/mL、0.125 mg/mL、0 mg/mL；

② 按每个样品 200 μL 的体积配制试剂 A 和 B 的工作液。试剂 A：B=50:1；

③ 将混匀的工作液以每孔 200 μL 体积加入到 96 孔板中，并依次加入 2 μL 不同浓度梯度的标准品溶液和待测蛋白样品，充分混匀；

④ 37°C 恒温箱孵育 30 min，用酶标仪 562 nm 波长测定吸光度（OD）值。制作 OD-蛋白浓度标准曲线（图 1-2），并据此来计算待测样品的蛋白质浓度。

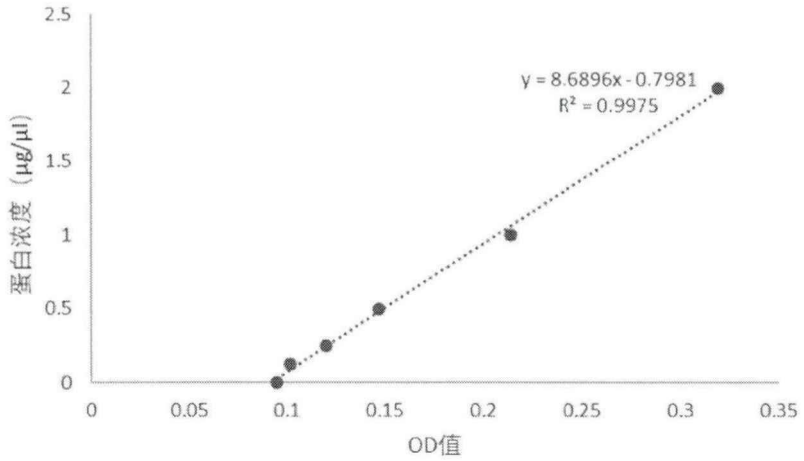


图 1-2 蛋白质浓度标准曲线

(3) 蛋白质变性：

根据得到的蛋白质浓度，计算单位上样体积（35 μL）内所需的蛋白质的量，加

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

入 5×loading buffer，剩余体积用 PBS 缓冲液补足，95 °C 水浴加热 12 min。

(4) SDS-PAGE 凝胶电泳

① 根据试剂盒说明书配制胶块，组装凝胶板水平放置并检查是否漏液，待 10%分离胶加入后 1-2 min 内缓慢倒入异丙醇液封。待分离胶充分凝固 20 min 后，微微倾斜缓慢倒出异丙醇，加入 5%浓缩胶后立即插入 1.0 mm 的梳子，补液打出气泡。放置 20 min 凝固后，竖直拔出梳子，放入电泳槽中，内槽缓慢加入电泳缓冲液没过凝胶板，外槽电泳液没过底部电极线，用微量移液器加入样品及预染蛋白 Marker(5 μL ,含 7 μL 5×loading buffer 和 23 μL PBS 缓冲液)各 35 μL，勿打出气泡；

② 连接电泳仪与电泳槽，恒压 70 V，电泳 30 min。待蛋白样品电泳至分离胶后，恒压 100 V，电泳 1.5 h，待溴酚蓝电泳至凝胶底部时停止电泳[46]；

③ 轻柔取下凝胶，将浓缩胶切除，并切除一角标记正反，置于摇床蒸馏水中轻摇 2 min 洗去多余的盐分；

④ 裁剪适当大小 PVDF 膜浸没在甲醇中活化 3 min，使 PVDF 膜带上电荷。然后浸入电转缓冲液中平衡 10 min；

⑤ 按照海绵垫-滤纸-胶-PVDF 膜-滤纸-海绵垫的顺序组装夹子。用玻璃棒轻轻滚压夹层避免 PVDF 膜和胶之间有气泡，组装完成后置于电转槽中。胶靠近负极一侧，PVDF 膜靠近正极一侧，倒入电转液没过夹子；

⑥ 将电转槽放入冰水混合物中，连通电转槽与电泳仪电源。恒流 300 mA，电转 1 h。

(5) 免疫杂交反应

① 将 PVDF 膜浸入 5%脱脂奶粉中室温摇床封闭 2 h，TBST 清洗 3 次，每次 5 min；

② 用抗体稀释液按一抗说明书建议比例稀释一抗，和 PVDF 膜一同倒入抗体杂交盒中，浸没 PVDF 膜，4 °C 冰箱摇床孵育过夜，或者室温摇床孵育 2 h；

③ TBST 室温摇床轻摇清洗 PVDF 膜 3 次，每次 5 min；

④ 用 3%脱脂奶粉稀释的 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 浸泡 PVDF 膜，室温摇床轻摇孵育 2 h；

⑤ TBST 清洗 PVDF 膜 3 次，室温摇床轻摇清洗，每次 5 min。

(6) 显影

① 超敏 ECL 发光试剂盒溶液 A 和 B 以 1：1 体积比混合，现用现配；

② 擦净暗盒，夹起 PVDF 膜，小心沥去表面液体，平放在暗盒板上，避免气泡。用移液器将发光液均匀滴加至 PVDF 膜上；

③ 暗盒连接电脑显影软件系统自动曝光，或依据发光亮度，调节曝光时间并保存显影图片；

④ 发光显色后，用清水冲去 PVDF 膜上残余发光液，室温晾干并保存在自封袋中。

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

(6) 凝胶图像分析

曝光显影条带拍照后进行灰度扫描分析。用 imagej 图像分析软件计算出目的蛋白和内参蛋白的灰度值，并代入以下公式。

$$目的蛋白相对表达量 = \frac{目的蛋白}{内参蛋白}$$

5. 大鼠胎盘糖原差异性表达-PAS 染色

1) 实验仪器与试剂

实验仪器与试剂	制造商
无水乙醇	北京化工厂
95%乙醇	北京化工厂
75%乙醇	北京化工厂
二甲苯	北京化工厂
AB-PAS 染色试剂盒	北京索莱宝科技有限公司

2) 实验方法

(1) 胎盘组织经常规固定、脱水、包埋、切片并脱蜡至水，蒸馏水冲洗 2 min。

(2) 免疫组化笔圈出组织，并滴加阿利新蓝染色液染色 20 min。蒸馏水洗 3 次，每次 2 min。

(3) 放入氧化剂中室温氧化 5 min。

(4) Schiff Reagent 浸染 20 min。弃去 Schiff Reagent，水洗 10 min。

(5) 苏木素染色液染核 1 min 淡染，水洗 3 min。

(6) 酸性分化液分化 5 s，水洗 3 min。

(7) Scott 蓝化液返蓝，水洗 3 min。

(8) 常规 75%乙醇、95%乙醇 I、95%乙醇 II、100%乙醇 I、100%乙醇 II 梯度脱水。二甲苯透明 30 min，中性树胶封片。

(9) 显微镜下观察切片并拍照记录。

6. 统计学分析

用 Graph Pad Prism7.0 软件系统分析数据，实验数据用平均值±标准差作图表示，两组数据比较用 t 检验（Student's t-test）检验其差异性。与对照组相比，$P<0.05$ 记为有差异统计学意义，$P<0.01$ 记为差异有显著统计学意义，$P<0.001$ 记为差异有极显著统计学意义。

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

结果

1. 大鼠胚胎着床后短暂雌激素缺乏模型的建立

1）大鼠雌激素缺乏模型妊娠期雌激素的变化

实验组大鼠在见栓后 GD6.5 天开始灌胃三天雌激素抑制剂来曲唑，制造一个雌激素短暂缺乏的效应，并用 17β-雌二醇 ELISA 试剂盒检测大鼠妊娠期雌二醇的外周血清浓度。结果如下图 1-3，与对照组相比，实验组大鼠在 GD8.5 灌胃三天来曲唑后，雌激素血清的浓度明显升高减缓（$P<0.05$），而对照组在灌胃来曲唑溶媒羧甲基纤维素钠后，雌激素血清浓度并无明显下降趋势，反而随着妊娠天数的增加而升高。这说明实验组妊娠大鼠在灌胃来曲唑后，雌激素的合成受到了抑制，雌激素浓度明显下降，而在 GD9.5 后，雌激素浓度随着妊娠天数的增加而轻微升高，这说明来曲唑灌胃建立大鼠胚胎着床后雌激素短暂缺乏模型已有明显抑制雌激素合成效应，模型建立成功。

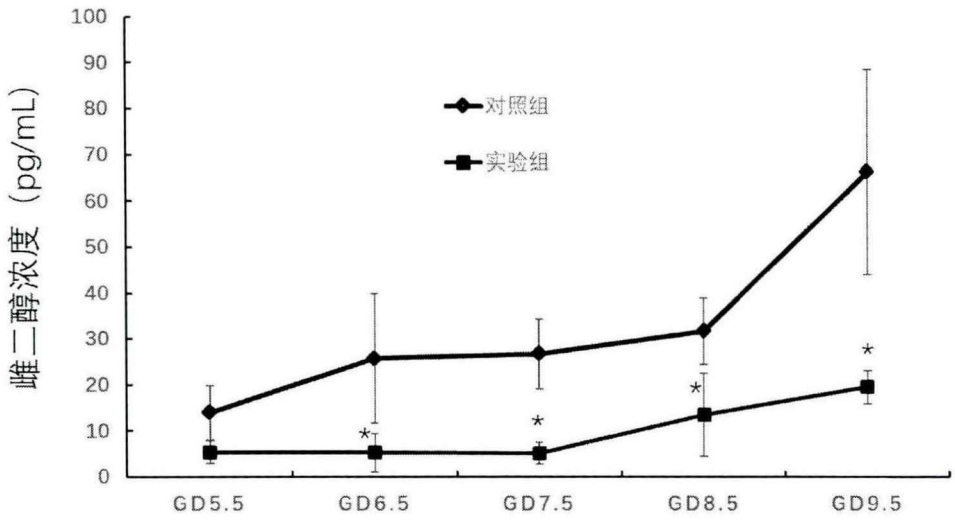


图 1-3 大鼠胚胎着床后雌激素短暂缺乏模型妊娠期雌激素的变化结果

2）大鼠胚胎着床后雌激素短暂缺乏模型组织形态学结果

建立起大鼠胚胎着床后雌激素短暂缺乏模型，并在 GD10.5、GD13.5、GD6.5、GD19.5 取材大鼠的子宫和胎盘组织。

解剖观察妊娠各个天数的大鼠子宫形态，取 GD10.5、GD13.5、GD19.5 的子宫进行拍照。由下图可以看出子宫外形随着妊娠天数的增加而逐渐变粗，妊娠早期第 10.5 天子宫呈粉红色且有弹性和韧性。妊娠中后期，胎儿逐渐增大，胎盘发育显著。相比于对照组子宫，实验组子宫外侧系膜连接的血管出血量增多，血液呈暗红色，

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

子宫内胚胎透明清晰可见（图 1-4 A，D）。对比观察实验组和对照组妊娠中后期的子宫发现，实验组子宫颜色黯淡无光似缺血缺氧（图 1-4E，F），而对照组子宫颜色深红且有光泽（图 1-4B，C）。

解剖 GD19.5 的大鼠子宫，逐一测量胎盘长径、短径和厚度并称重，如图 1-5 结果显示，GD19.5 对照组中大鼠胎盘表面光滑，呈暗红色，形态正常，表面可见明显血管；GD19.5 实验组大鼠胎盘较对照组胎盘长度宽度都有所增加，体积增大，部分胎盘呈深暗红色，表面可见血管明显增多增粗。与对照组胎盘重量[（0.462±0.040)g]比较，实验组胎盘重量[（0.788±0.101)g]显著增加（$P<0.05$）。

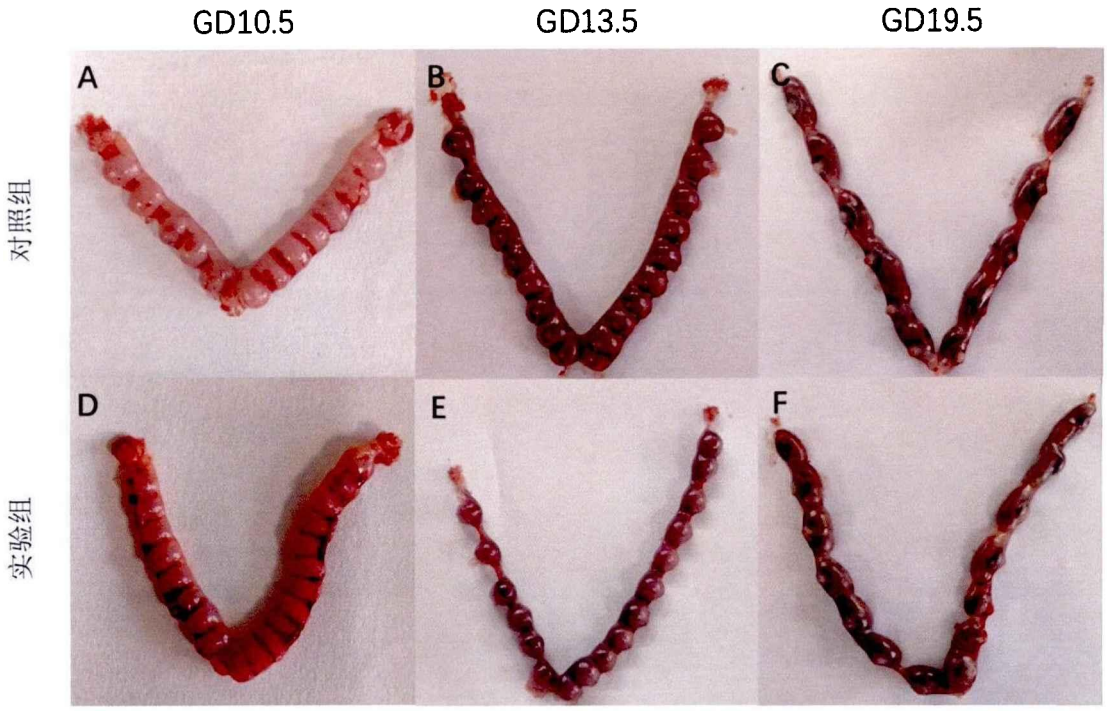


图 1-4 大鼠胚胎着床后雌激素短暂缺乏模型子宫形态

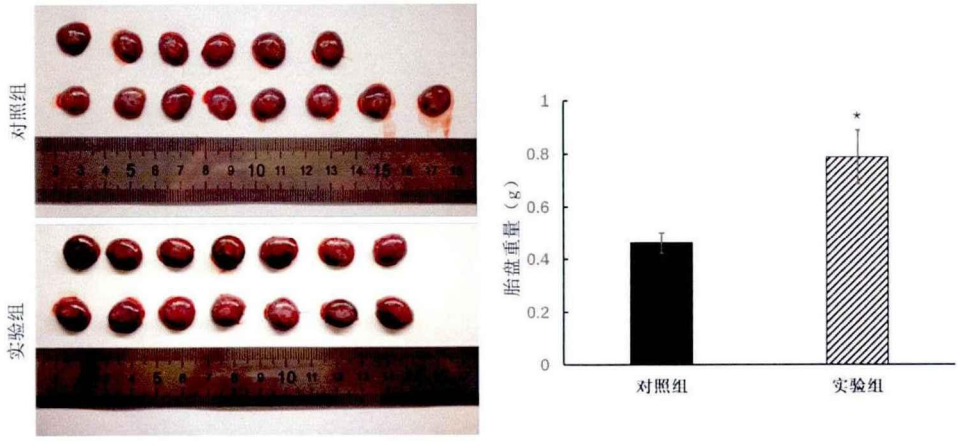


图 1-5 大鼠胚胎着床后雌激素短暂缺乏模型在 GD19.5 时胎盘大小重量

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

3）大鼠胚胎着床后雌激素短暂缺乏模型组织病理学结果

大鼠子宫组织石蜡横切面切片 HE 染色结果观察到，在 GD13.5 时，对照组已出现明显的胎盘迷路区结构特征呈绵密的网状结构，有大量分支的绒毛膜滋养层细胞，核仁明显且数量变多，基质细胞排列紧密，血窦发育充分（图 1-6-1A，B）。而实验组胎盘基质细胞排列不规则，细胞核固缩，胞质空泡化，绒毛膜细胞分支较少，排列杂乱无规则（图 1-6-1C，D）。

在 GD19.5 时，对照组胎盘各分区结构清晰明显，连接区可见大小不一的滋养层细胞，主要为海绵滋养层细胞，糖原细胞和滋养层巨细胞消退少见，母体区见较多糖原细胞；迷路区纹理清晰规整，致密海绵状，血窦致密发育充分，可见母体红细胞和胎儿红细胞充盈，无坏死现象（图 1-6-2 A、B、C、D）。实验组胎盘连接区除海绵滋养层细胞外，滋养层巨细胞多见，并可见少量糖原细胞，伴有少量纤维素样沉积；迷路区绒毛间隙加大，血窦大小不一，部分轻度扩张，红细胞充盈减少，有少量空泡化和坏死现象（图 1-6-2 E、F、G、H）。结果提示，实验组胎盘连接区呈现异常增生，迷路区血流交换不足，来曲唑对着床后的短暂雌激素抑制可诱导胎盘呈病理性增生，影响了妊娠晚期胎盘的发育。

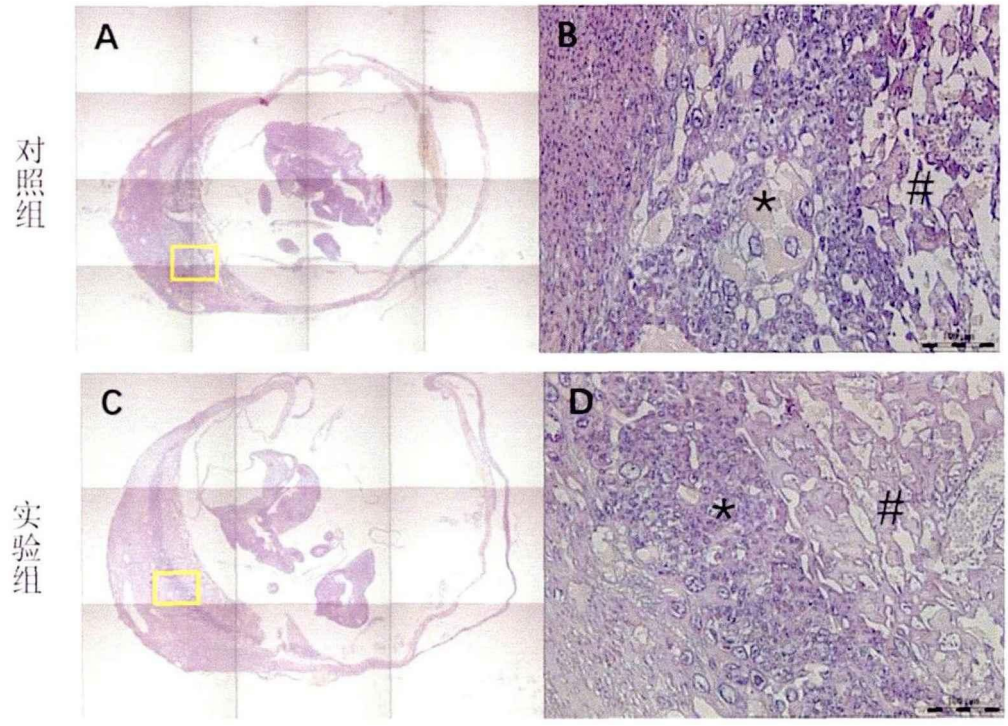


图 1-6-1 大鼠胚胎着床后短暂抑制雌激素合成后 GD13.5 时胎盘的组织学。*胎盘连接区，#胎盘迷路区，比例尺=100μm。

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

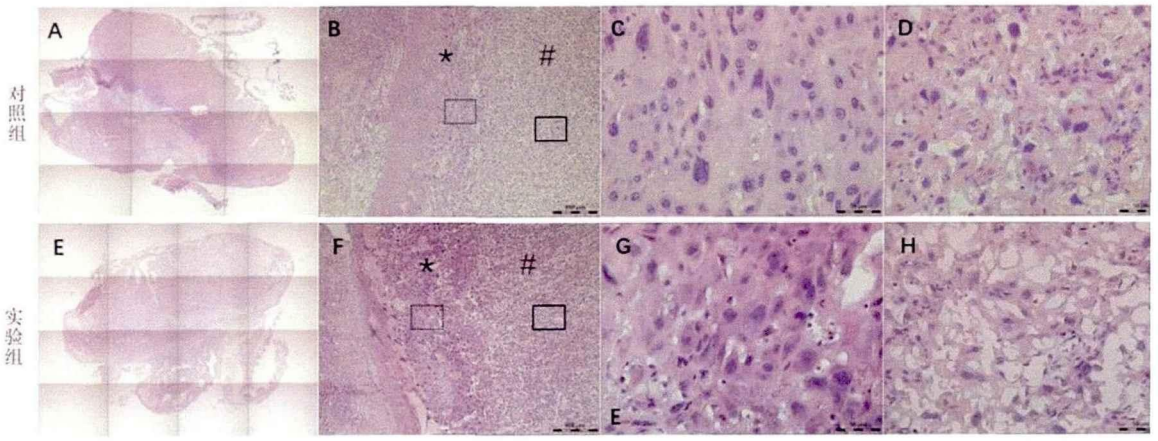


图 1-6-2 大鼠胚胎着床后短暂抑制雌激素合成后 GD19.5 时胎盘的组织学。C、G 分别是对照组和实验组的胎盘连接区（虚线框）高倍视野，D、H 分别是对照组和实验组的胎盘迷路区（实线框）高倍视野。*胎盘连接区；#胎盘迷路区；图 B、F 标尺=400 μm，图 C、D、G、H 标尺=50 μm。

2. *Plgf* mRNA 在大鼠胎盘组织中的表达

1) 核酸电泳条带验证

(1) 总 RNA 完整性验证

大鼠胚胎着床后雌激素短暂缺乏模型实验组和对照组 GD10.5、GD13.5 的子宫和 GD16.5、GD19.5 实验组和对照组的胎盘组织提取总 RNA 后，并进行 1%琼脂糖凝胶电泳检验 mRNA 完整度，结果如图 1-7，提取的 RNA 有三条带，最上面 28S 条带的亮度大约是 18S 的两倍，且第三条带最暗，说明 RNA 的完整性较好，未发生严重降解。且 OD260/OD280 均大于 2.0，表明提取的 RNA 质量较好，没有其他蛋白或酚类污染。

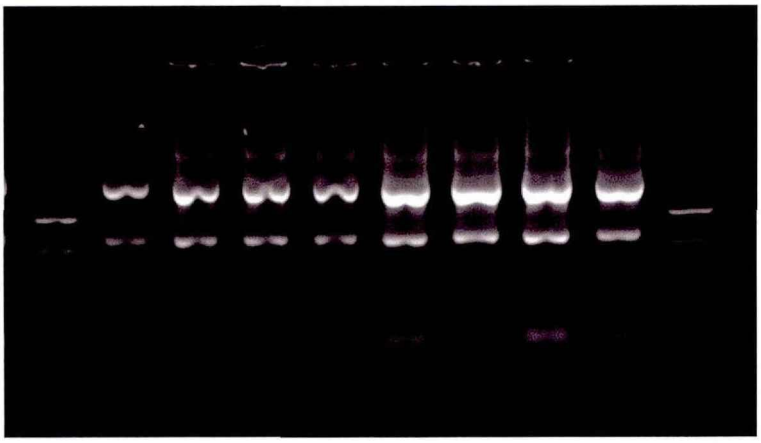


图 1-7 大鼠胚胎着床后雌激素短暂缺乏模型子宫及胎盘总 RNA 提取结果。左起：Marker、对照组 GD10.5、实验组 GD10.5、对照组 GD13.5、实验组 GD13.5、对照组 GD16.5、实验组 GD16.5、对照组 GD19.5、实验组 GD19.5、Marker。

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

(2) cDNA 扩增产物目的条带验证

总 RNA 逆转录为 cDNA 后，加入设计的引物进行实时荧光定量 PCR 扩增。得到的扩增产物进行 1%琼脂糖水平凝胶电泳，结果如图 1-8 和图 1-9。图 1-8 是设计 *Plgf* 引物扩增出的条带与目的 *Plgf* 条带都在 169bp 附近，大小相近，处于琼脂糖凝胶相同位置，故可认定为扩增出来的条带是目的 *Plgf* 条带。图 1-9 是设计 β-actin 引物扩增出的条带目的 β-actin 条带都在 141bp 附近，与目的基因 β-actin 大小一致，符合预期。

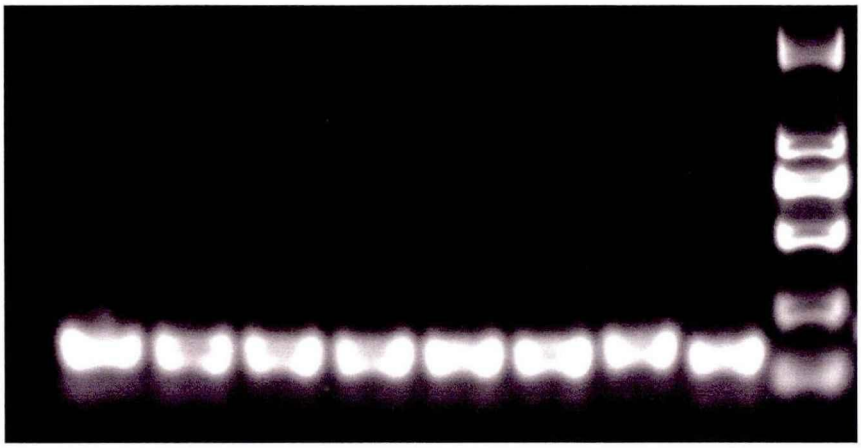


图 1-8 大鼠胚胎着床后雌激素短暂缺乏模型 cDNA 的 *Plgf* 引物扩增结果。左起：对照组 GD10.5、实验组 GD10.5、对照组 GD13.5、实验组 GD13.5、对照组 GD16.5、实验组 GD16.5、对照组 GD19.5、实验组 GD19.5、Marker。

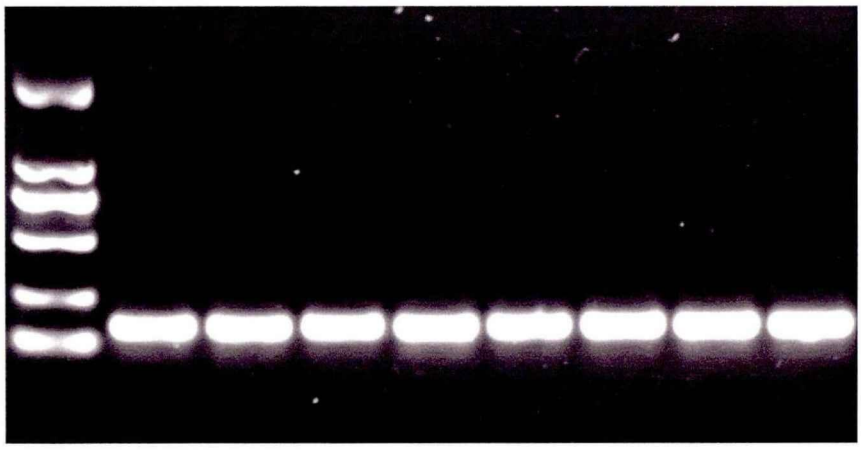


图 1-9 大鼠胚胎着床后雌激素短暂缺乏模型 cDNA 的 β-actin 引物扩增结果。左起：Marker、对照组 GD10.5、实验组 GD10.5、对照组 GD13.5、实验组 GD13.5、对照组 GD16.5、实验组 GD16.5、对照组 GD19.5、实验组 GD19.5。

2) 大鼠胚胎着床后雌激素短暂缺乏模型子宫和胎盘 *Plgf* mRNA 的表达

如图 1-10，扩增曲线为 S 型，有明显的四个时期：基线期、指数增长期、线性

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

增长期、平台期。熔解曲线呈现 2 个峰，左边的是目的基因的峰，右边是 β-actin 的峰，且峰值温度与已知退火温度相符，无引物二聚体或非特异性扩增产物。两图说明引物设计合理，目的基因扩增正常，qPCR 结果具有可信性。

如图 1-11，大鼠胚胎着床后雌激素短暂缺乏模型 GD10.5 子宫组织实验组 *Plgf* mRNA 相对表达量明显低于对照组（$P<0.05$），在 GD13.5、GD16.5、GD19.5 实验组 *Plgf* mRNA 相对表达量明显高于对照组（$P<0.05$）。

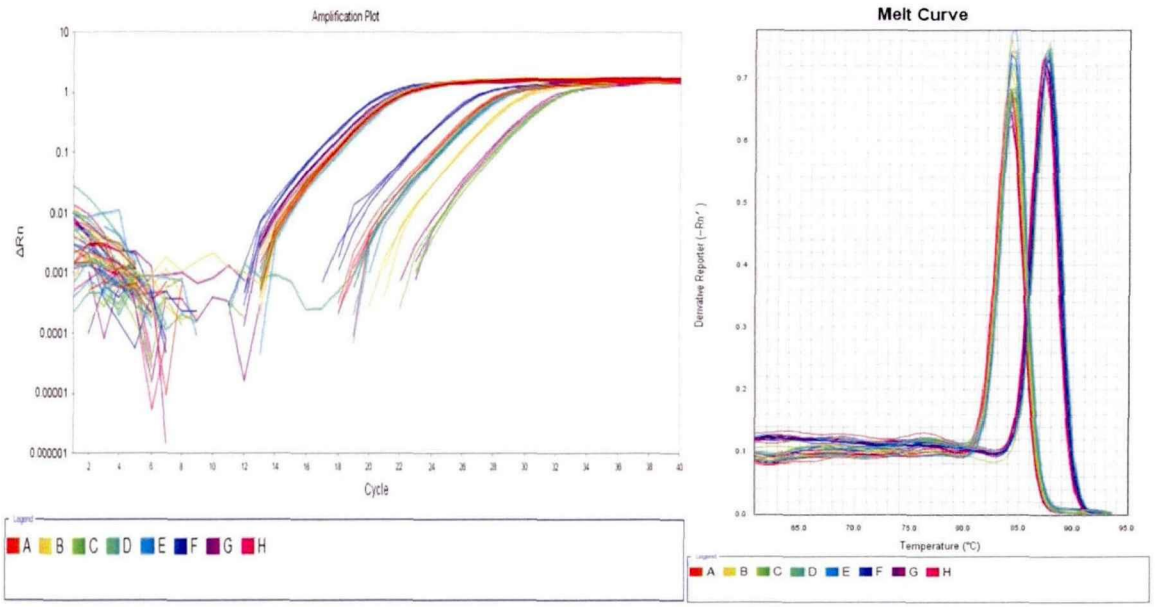


图 1-10 大鼠胚胎着床后雌激素短暂缺乏模型 GD19.5 胎盘 *β-actin* 和 *Plgf* mRNA 的扩增曲线和熔解曲线图。

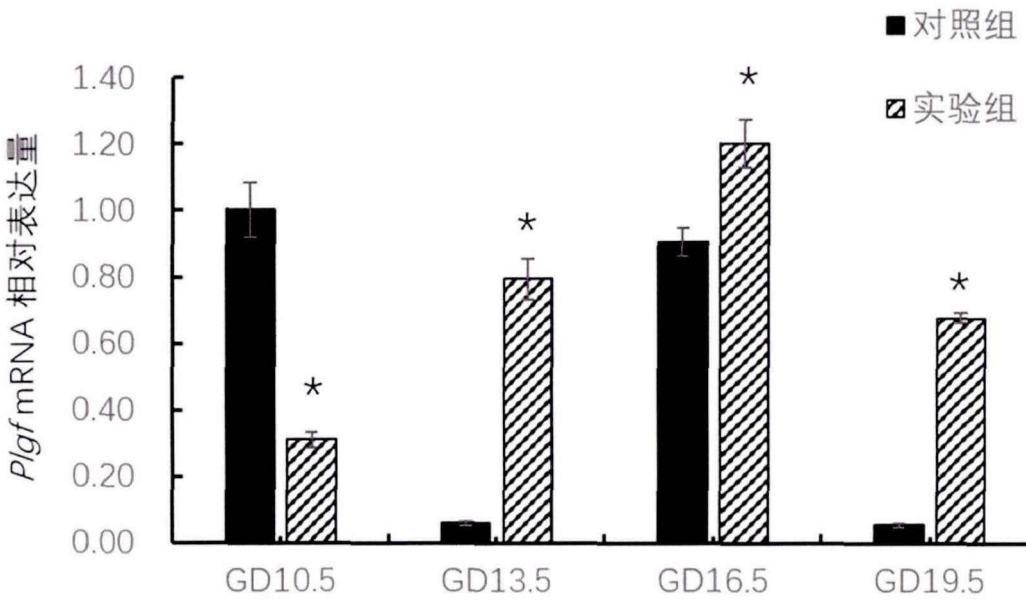


图 1-11 大鼠胚胎着床后短暂抑制雌激素合成妊娠组织（子宫胎盘）*Plgf* mRNA 表达情况。*实验组与对照组比较，$P<0.05$。

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

3. 大鼠着床后短暂雌激素缺乏模型 GD13.5 和 GD19.5 胎盘滋养层细胞侵袭结果

使用细胞角蛋白 7(Cytkoeratin 7,CK7) 胎盘组织滋养层细胞的分子标记物进行胎盘组织免疫组织化学染色以观察滋养层细胞侵袭情况。结果显示，GD13.5 时，对照组母体区血管内可见较多空泡样滋养层细胞侵袭（图 1-12A,a）；实验组母体区未见有滋养层细胞侵袭（图 1-12B,b）。GD19.5 时，对照组母体区见大量滋养层细胞侵袭，特别是血管周围可见较多的滋养层细胞侵袭（图 1-12C,c）；在实验组，虽然母体区可见滋养层细胞侵袭，但数量少，特别是血管周滋养层细胞少于对照组（图 1-12D,d）。

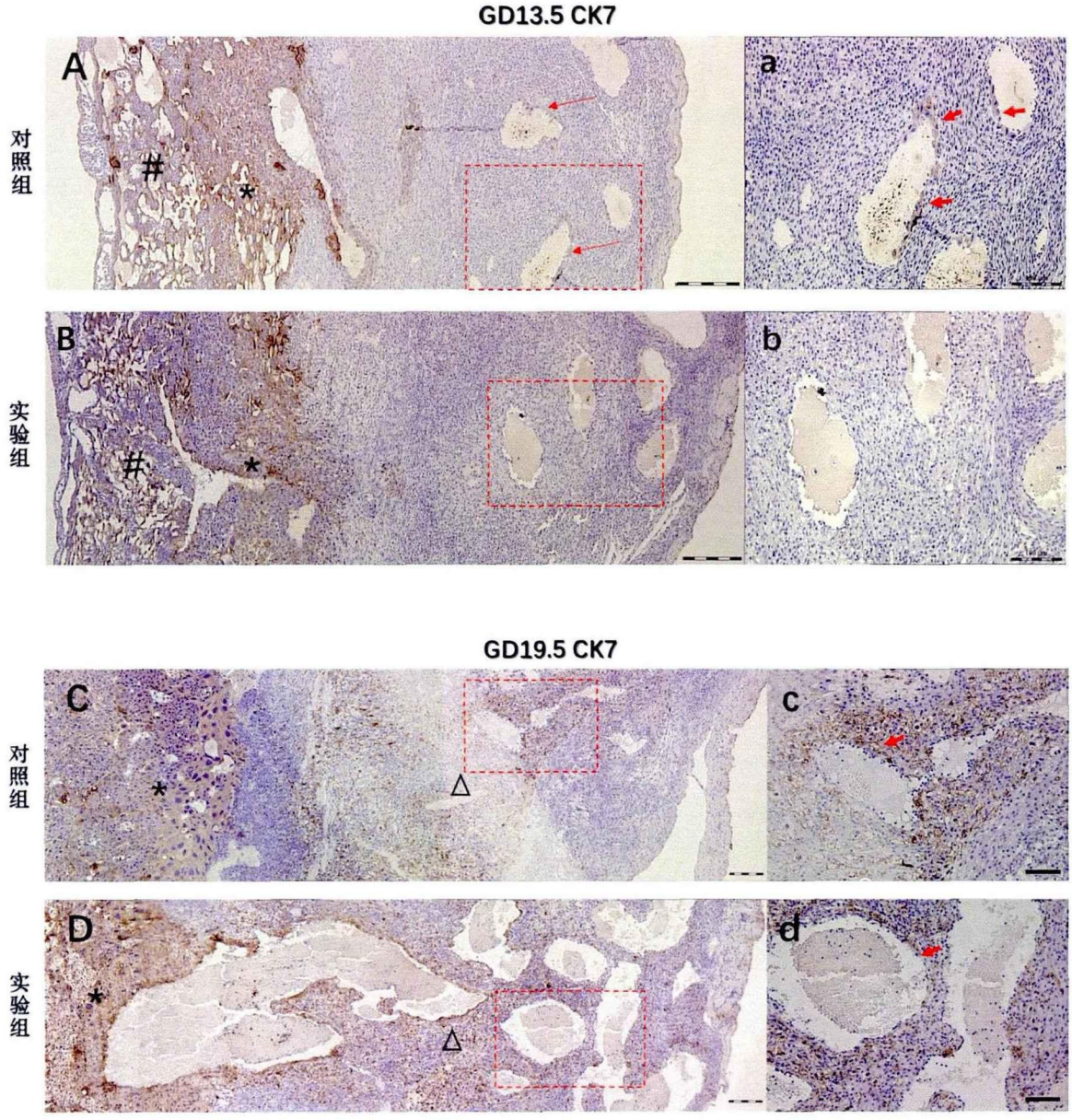


图 1-12 GD13.5 和 GD19.5 时胎盘滋养层细胞侵袭情况。abcd 分别为 ABCD 红色虚线局部放大图。ABCD 的标尺=200μm，abcd 标尺=100μm。

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

在大鼠胎盘发育过程中，来源于滋养层祖细胞的四种滋养层细胞包括滋养层巨细胞（trophoblast giant cells）、海绵滋养层细胞（spongiotrophoblast cells）、糖原细胞（glycogen cells）和侵入性滋养层细胞（invasive trophoblast cells），分别行使不同的功能。其中，空泡样糖原细胞于妊娠中期开始出现，表现为显著的蓄积糖原，细胞呈空泡样，最终特化为一类侵入性滋养层细胞，可侵入子宫系膜三角区，位于血管之间，在子宫螺旋动脉重塑中发挥关键作用。我们对 GD19.5 的大鼠胎盘组织做了阿利新蓝-过碘酸-雪夫染色对胎盘组织中的糖原进行染色标记。结果显示，对照组胎盘连接区仅少量空泡样糖原细胞（图 1-13A，a），实验组大鼠胎盘连接区空泡样糖原细胞明显高于对照组，母体区糖原细胞数量减少，提示实验组胎盘连接区空泡样滋养层细胞出现异常蓄积。

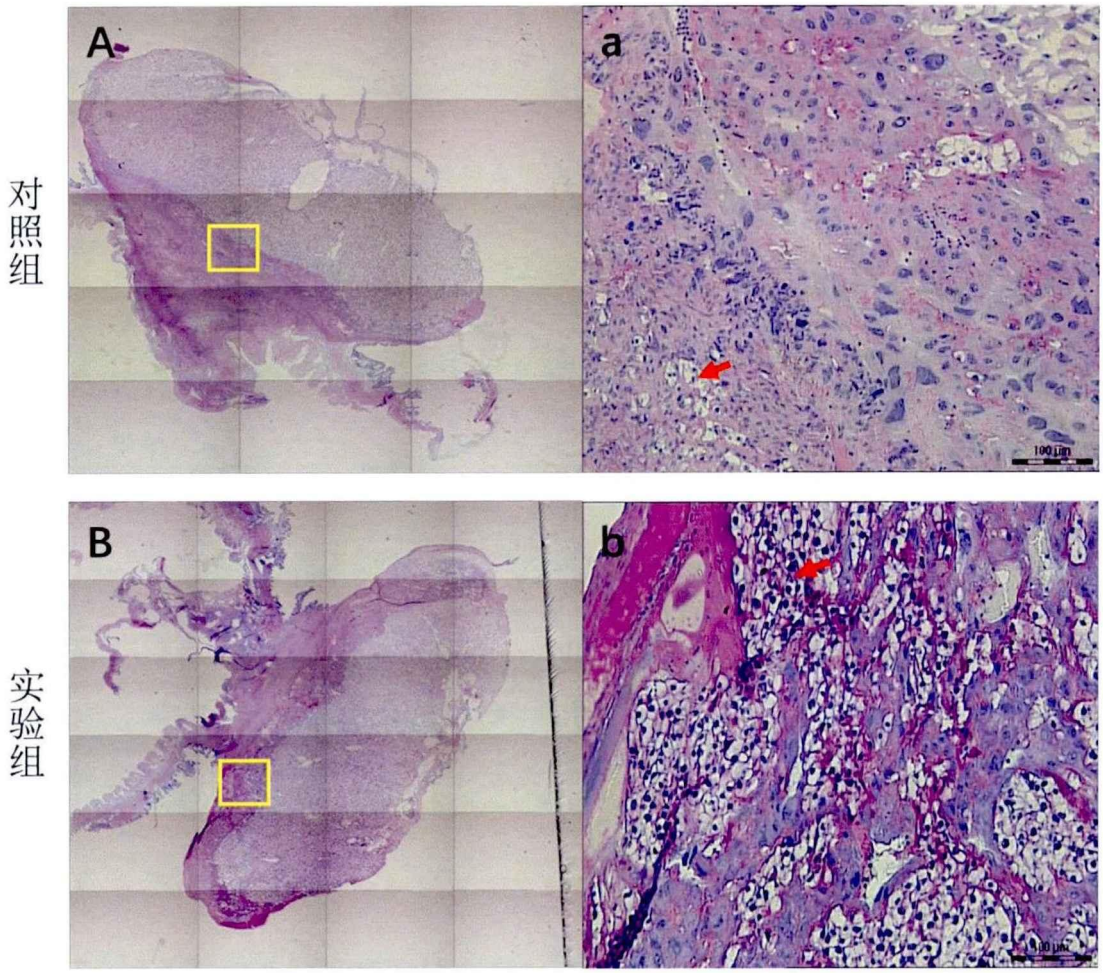


图 1-13 大鼠胚胎着床后雌激素短暂缺乏模型胎盘糖原表达结果

4. Plgf 蛋白在大鼠胚胎着床后雌激素短暂缺乏模型中的原位表达

为了进一步明确 Plgf 蛋白在大鼠胎盘组织中的区域性表达及细胞表达情况，我们用免疫组织化学方法检测胎盘 Plgf 蛋白原位表达情况（图 1-14）。对照组中，Plgf 蛋白以迷路区表达为主，迷路区合体滋养层细胞胞浆中可见棕褐色颗粒，连接区滋

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

养层细胞胞浆中仅见少量棕褐色颗粒。实验组中，不仅迷路区合体滋养层细胞胞浆中见大量棕褐色颗粒，连接区滋养层细胞特别是滋养层巨细胞胞浆中可见丰富的棕褐色颗粒。

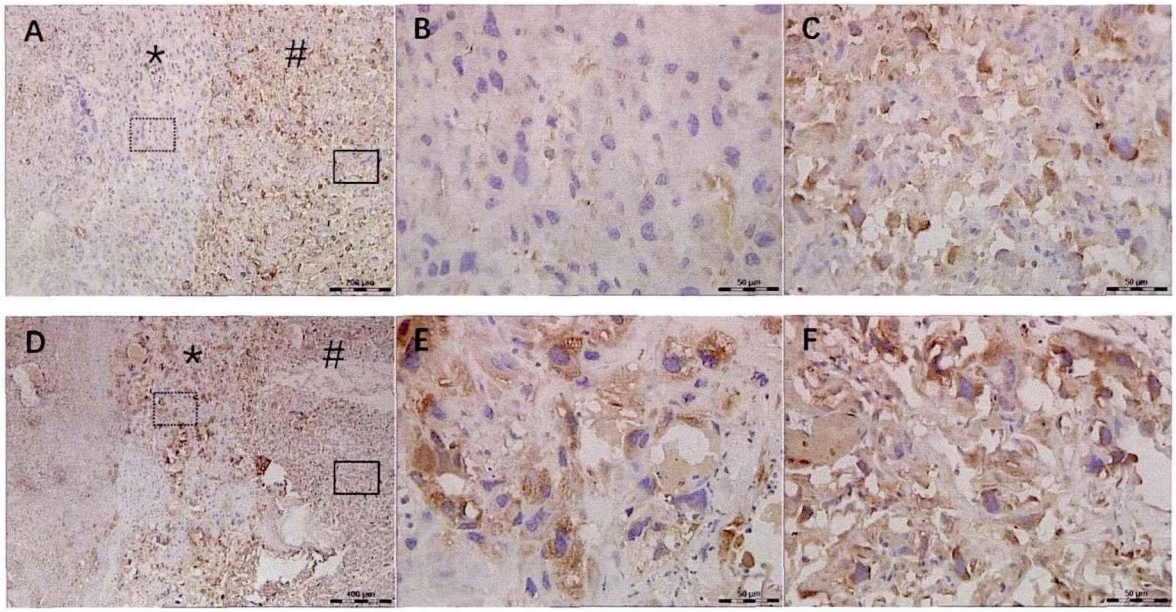


图 1-14 大鼠胚胎着床后雌激素短暂缺乏模型 GD19.5 胎盘 Plgf 蛋白表达免疫组织化学方法检测结果。A、D 分别是对照组和实验组的胎盘 Plgf 免疫组织化学染色结果，其中 B、E 分别是对照组和实验组的胎盘连接区高倍视野（虚线框），C、F 分别是对照组和实验组的胎盘迷路区高倍视野（实线框）。*，胎盘连接区；#，胎盘迷路区；图 A 标尺=200 μm，D 标尺=400 μm，图 BCEF 标尺=50 μm。

5. Plgf 蛋白质在大鼠胚胎着床后雌激素短暂缺乏模型中的表达变化

GD19.5 胎盘组织中 Plgf 蛋白的 Western Blot 结果显示，实验组中雌激素抑制剂处理后 lgf 蛋白相对表达量较对照组明显升高（$P<0.05$，图 1-15），说明在妊娠后期，Plgf 在蛋白质翻译水平表达明显增高。

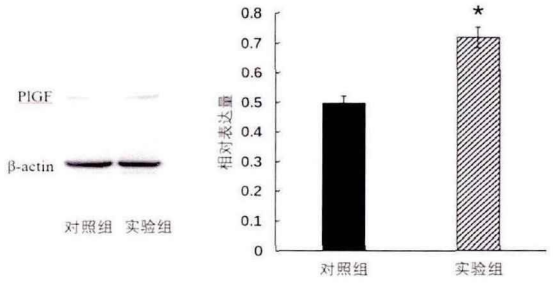


图 1-15 大鼠胚胎着床后雌激素短暂缺乏模型胎盘 Plgf 蛋白表达结果。*与对照组比较，$P<0.05$

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

讨论

在第一部分的研究中，通过在大鼠妊娠胚胎着床后短暂抑制了雌激素的生物合成，我们成功建立了大鼠胚胎着床后雌激素短暂缺乏模型。在大鼠胚胎着床后雌激素短暂缺乏模型中，我们用酶联免疫吸附测定法检测到了外周血中雌激素合成的减少，模拟了正常孕妇受精卵着床后雌激素不足可能会对妊娠结局带来的影响。胎盘是高度特化的妊娠期器官，胎盘的生长和功能得到精确的调节和协调，以确保母体和胎儿循环系统之间养分和废物交换得以最大程度地发挥作用，支持胎儿的正常生长发育[49]。胎盘正常功能的行使有赖于正常的形态结构，在着床后胎盘形成前短暂雌激素减少，尽管不影响胚胎着床及胎鼠在宫内的发育[30]，但组织学观察显示胎盘的连接区及迷路区细胞及组织结构发生了变化，提示已经影响了胎盘的形态和功能。在大鼠胚胎着床后雌激素短暂缺乏模型中，我们通过观察妊娠早中晚期子宫的状态和妊娠晚期胎盘的形态，发现在大鼠妊娠胚胎着床后雌激素的短暂缺乏会引起妊娠后期胎盘的发育不足，主要表现是胎盘大小和重量的明显增加。其次在解剖胎盘过程中，我们发现了胎盘不仅重量大小增加明显，而且子宫系膜以及胎盘内的血管形态也发生了改变，相比于正常对照组，胎盘的血管明显增粗，且血流量增大，血液呈深红色。这提示我们去探索与胎盘滋养层细胞生长和血管发生等生理过程相关的因子，如血管内皮生长因子（VEGF）、血管内皮生长因子受体 1（Flt1）、胎盘生长因子（PLGF）等，又因胎盘生长因子主要是由合体滋养层细胞合成，可与位于滋养层细胞和血管内皮细胞表面的酪氨酸酶受体结合，对滋养层细胞功能有自分泌作用，并且对血管生长有旁分泌作用，与我们解剖出的胎盘表型相一致，这提示我们胎盘滋养层细胞的过度增殖和血管的过度新生可能与胎盘生长因子的合成有关。

本研究采用来曲唑灌胃在大鼠胚胎着床后短暂抑制体内雌激素合成，可以导致孕晚期胎盘增生肥大及胎盘组织中 Plgf 的升高。从 mRNA 转录水平来看，妊娠前期 Plgf 表达较低，而对照组表达较高，随着妊娠天数的增加，实验组大鼠 *Plgf* 基因表达明显上升，mRNA 相对表达量高于对照组，差异有统计学意义（$P<0.05$）。从蛋白质翻译水平来看，与对照组相比，实验组大鼠胎盘 Plgf 蛋白表达也有所升高，差异有统计学意义（$P<0.05$）。qPCR 和 Western Blot 结果提示我们，大鼠妊娠早期胚胎成功着床后，此时雌激素短暂缺乏会导致妊娠后期胎盘异常增生、新生血管异常，这都与胎盘生长因子的相对表达量升高有关。提示妊娠早期雌激素的波动对妊娠后期胎盘生长因子的表达有调控效应。

PLGF 是在母体循环中鉴定出的血管生成因子，属于 VEGF 家族，直接和间接机制发挥其血管生成作用，并且是诊断和处理胎盘疾病的关键生物标志物[41]。在正常妊娠时，血清 PLGF 的中值水平与胎龄呈曲线关系，随着孕早期和孕中期的增加，

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

达到最高水平，并在整个妊娠过程中维持其含量处于一定的生理水平，对胎盘内的血管形成和胚胎发育起重要作用，至孕晚期时随着胎盘功能老化，PLGF 水平明显下降[50,51]。有研究显示，人胎盘缺氧/缺血区域中特别是具有特征性“缺氧/缺血性改变（HIC）”绒毛的滋养层细胞中 PLGF 表达增加[52]。免疫组织化学结果显示，大鼠胚胎着床后胎盘开始形成前，短暂抑制雌激素合成，会使妊娠晚期胎盘中的 Plgf 表达明显升高，尤其是在胎盘迷路区和连接区的滋养层细胞中大量表达，而对照组中，Plgf 蛋白以迷路区表达为主，迷路区的合体滋养层细胞胞浆中可见棕褐色颗粒，连接区滋养层细胞胞浆中仅见少量棕褐色颗粒。结合组织学结果，提示实验组孕晚期胎盘可能是由于缺血缺氧导致滋养层细胞代偿性增生并促使 Plgf 大量表达。胎盘生长因子的过度表达会导致表皮血管在大小、数量、分支结构上持续增加，并且血管的通透性也会有所增加；同时，过多的 Plgf 蛋白的表达促使胎盘血管增粗，血流量增多，胎盘滋养层细胞过度增殖异常侵袭[53]，导致胎盘体积质量增加，出现病理胎盘，影响母体和胎儿营养物质和废物的运输，从而影响胚胎生长发育。推测胎盘肥大的内部原因是大鼠早期妊娠雌激素合成过程成功被抑制，较少的雌激素与雌激素受体结合发挥作用，导致下游信号的抑制，大鼠胚胎生长发育所需营养物质难以维持，使得滋养层细胞过度增殖、血管内皮细胞过度增生代偿提供养分。想要深入了解雌激素调控 Plgf 的表达机制，还需要进一步的科学实验验证。

PAS 糖原染色提示，着床后短暂抑制雌激素合成，可以导致胎盘连接区空泡样糖原细胞增多蓄积，这也侧面印证了滋养层细胞的异常增殖和病理性胎盘的发生发展与糖脂相关代谢途径有着密不可分的联系。这提示我们糖脂代谢途径可能参与到病理胎盘形成过程中，糖脂能量代谢对于胎盘的生长发育有重要作用。

综上，本研究在大鼠胚胎着床后短暂抑制体内雌激素合成，初步揭示了孕早期一过性雌激素水平降低能够导致孕晚期胎盘增生肥大并促使 Plgf 蛋白异常表达，为雌激素对妊娠影响的具体作用机理提供了新的依据和研究线索。并且本研究证实了胎盘生长因子是引起大鼠妊娠后期胎盘滋养层细胞异常增生及血管内皮细胞过度增殖的原因之一。同时发现，胎盘异常增殖与能量代谢也有一定的关系。众所周知，胎盘缺血缺氧导致滋养层细胞增生及血管内皮细胞损伤是妊娠高血压疾病重要的病理学改变[54]，我们的大鼠胚胎着床后雌激素短暂缺乏模型研究也为深入了解妊娠高血压等疾病提供了理论帮助和支持。

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

小结

1. 大鼠胚胎着床后断在抑制雌激素短暂缺乏模型，可导致孕晚期胎盘肥大，在胎盘形成过程中滋养层细胞侵袭能力减弱，大鼠胎盘连接区空泡样糖原细胞出现蓄积，提示孕早期雌激素水平降低可影响滋养层细胞功能。
2. 大鼠胚胎着床后给予来曲唑短暂抑制雌激素合成可导致孕晚期 Plgf 表达升高，提示孕早期雌激素水平降低影响孕晚期胎盘功能。

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

第二部分 Angptl8 对滋养层细胞增殖迁移侵袭的影响

前言

胎盘是一个短暂的器官，在维持妊娠和支持胎儿生长和营养方面起着关键作用[55,56]。胎盘上皮由滋养层细胞组成，滋养层细胞是胚胎发生过程中最先分化的细胞类型，并最终分化成具有独特功能的异质细胞群，这些细胞对胎盘发育至关重要[57]。我们的部分结果提示在着床后，雌激素短暂缺乏，会导致滋养层细胞功能受到影响，同时，对于雌激素引起滋养层细胞功能改变的可参考文献及研究结果较少，所以，为了进一步探究背后的机制，我们利用芯片检测进行了生物信息学分析。

表达谱芯片是人类基因组研究项目中常用的一种技术。表达谱芯片是通过与已知序列核酸探针杂交进行核酸序列测定的方法。当含有数千个 DNA 或寡核苷酸的DNA芯片杂交到标记样品时，可以大规模地高效分析基因表达、DNA测序以及DNA突变和多态性[58]。因此我们使用了表达谱芯片的方法对大鼠胚胎着床后雌激素短暂缺乏模型 GD8.5 子宫组织进行了检测。差异基因 GO 分析提示差异基因功能主要以糖脂代谢、细胞增殖等相关，涉及 *Angptl8*、*Igfbp5*、*Ccr7*、*Pfkfb3* 等基因。

血管生成素样蛋白质（ANGPTLs）是由 8 个成员（ANGPTL1-8）组成的一组分泌糖蛋白。ANGPTL1-7 共有共同结构，具有不同的功能[59]。ANGPTL3 和 ANGPTL4 蛋白彼此高度同源，在不同营养状态下一同调节脂质代谢。ANGPTL8 是一种 22 kDa，含有 198 个氨基酸的蛋白质，由于缺少 ANGPTL1-7 共有的共同结构 N 端类纤维蛋白原结构域，而不同于 ANGPTL 家族的其他成员[60]。另一方面，ANGPTL8 通过显示与 ANGPTL3 和 ANGPTL4蛋白的 N 端结构域的同源性来表现其家族关系，并表现出与这两种蛋白质功能的相似性，可与脂蛋白脂酶（LPL）结合并调节甘油三酯代谢。因此，ANGPTL8 被认为是在 ANGPTL 家族里一种新颖但非典型的成员并且在脂质代谢中发挥作用的蛋白质[61]。此外，关于 ANGPTL8 在 β 细胞增殖中的作用的长期争议，引起了许多研究人员对 ANGPTL8 对 β 细胞扩张和胰岛功能的影响研究[62]。虽然 ANGPTL8 无法控制 β 细胞扩张和胰岛功能，但 ANGPTL8 由于其独特的结构和对脂质代谢的关键作用。找不到令人信服的证据支持 ANGPTL8 对 β 细胞复制的直接影响[63]，因此 ANGPTL8 不被视为糖尿病干预的可能目标。然而，许多流行病学研究表明，外周循环中的 ANGPTL8 水平在代谢性疾病，包括糖尿病、肥胖症和代谢综合征中发生变化[64]。调节 ANGPTL8 的表达可能成为使脂质和葡萄糖代谢紊乱正常化的一种新途径[65]。晚发型高血压、糖尿病、肥胖等都是子痫前期的危险因素，而且正常妊娠时孕妇某些代谢性改变如一定程度的胰岛素抵抗、高脂血

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

症或炎症反应性上调等也与子痫前期相伴[66]。一项包括 2720 名孕妇的荟萃分析报告显示，高甘油三酯血症与子痫前期相关[67]，同时有研究显示孕晚期诊断的子痫前期常伴有孕中期高甘油三酯血症，并猜测高甘油三酯血症参与子痫前期发生的过程[68]。脂肪酸对于胎儿胎盘的生长和发育至关重要。孕妇脂肪酸及其代谢产物通过支持细胞生长和发育，细胞信号传导以及调节结构和功能过程的其他关键方面，参与妊娠的每个阶段。因此，我们推测 Angptl8 可能通过调节脂代谢影响滋养层细胞的功能。

为了进一步研究 Angptl8 与滋养层细胞之间的调控关系，我们利用重组蛋白 Angptl8 干预人绒毛膜滋养层细胞的生长特性，并且在游离脂肪酸产物油酸或软脂酸存在的情况下验证是否会恢复滋养层细胞原来的特性，从而证明 Angptl8 蛋白通过结合脂蛋白脂肪酶（LPL）促进甘油三脂的分解参与到滋养层细胞的特性改变过程中，进而深入研究滋养层细胞中能量代谢复杂的调控网络机制。

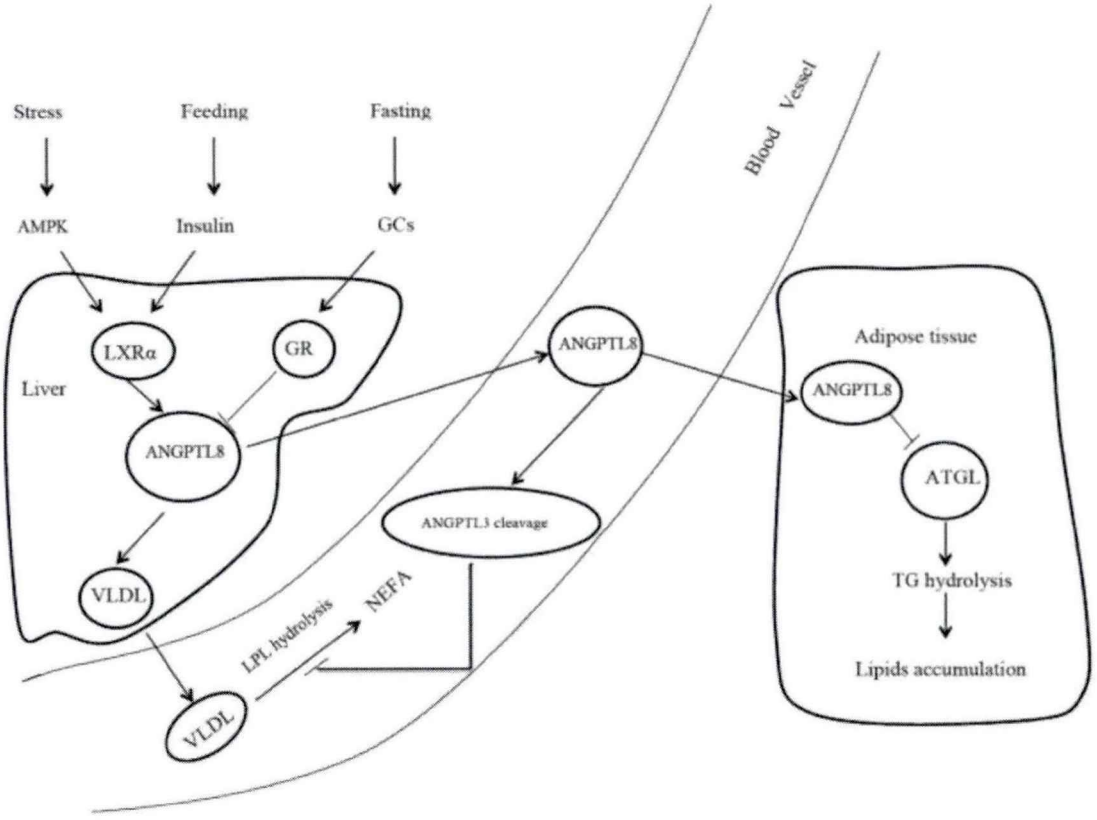


图 2-1 Angptl8 代谢调控机制图

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

材料方法

1. 大鼠雌激素短暂缺乏模型子宫妊娠相关基因的差异性表达-表达谱芯片检测

1) 实验仪器与试剂

实验仪器与试剂	制造商
医疗器械	上海医疗器械（集团）有限公司手术器械厂
碘伏	北京四环卫生药械厂有限公司
75%酒精消毒液	山东利尔康医疗科技股份有限公司
非吸收性外科缝线	扬州环宇医疗器械有限公司
医用缝合针	上海仓松医疗器械有限公司
异氟烷麻醉机	北京吉安得尔科技有限公司
医用棉棒	耐特伟业(北京)科技有限公司
生理盐水	石家庄四药有限公司
RNase-free EP 管	Axygen

2) 实验步骤

（1）样本收集及分组

大鼠交配前一周对一侧输卵管进行结扎手术。给大鼠剃毛，喷洒酒精，在大鼠背部脊柱中下部左右两侧各开一个口子，剪开表皮和内层结缔组织，找到白色脂肪组织，轻轻拖拽出卵巢和子宫，在输卵管位置用医用手术缝合线结扎并剪断部分输卵管，然后将子宫和卵巢塞进大鼠体内，缝合伤口，抹上碘伏消毒。

大鼠进行手术后，伤口恢复一周基本愈合之后，开始进行交配。晚 8 点，雌雄大鼠以 1：1 的比例合笼，次日见阴栓为妊娠标志，记为妊娠第 0.5 天（GD 0.5）。实验组大鼠（n=3）交配后的 GD6.5，GD7.5，GD8.5 灌胃给药来曲唑，对照组大鼠（n=3）交配后的 GD6.5，GD7.5，GD8.5 灌胃来曲唑溶媒羧甲基纤维素钠。取材大鼠 GD8.5 子宫组织，取材器械提前高温 180 ℃烘烤灭活 RNA 酶。实验组（n=3）妊娠一侧子宫胚胎（FR）和结扎一侧子宫（FL）分别装到 RNase-Free EP 管中。结扎一侧子宫（FL）作为非妊娠子宫代表着床后雌激素短暂降低对机体子宫产生的影响，未结扎一侧的子宫为成功妊娠的子宫妊娠相关组织，代表着床后雌激素短暂降低对子宫、蜕膜组织和胚胎产生的影响。对照组（n=3）也分为妊娠子宫胚胎组（CFR）和非妊娠子宫组（CFL）实验取材部位分组如下图所示：

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

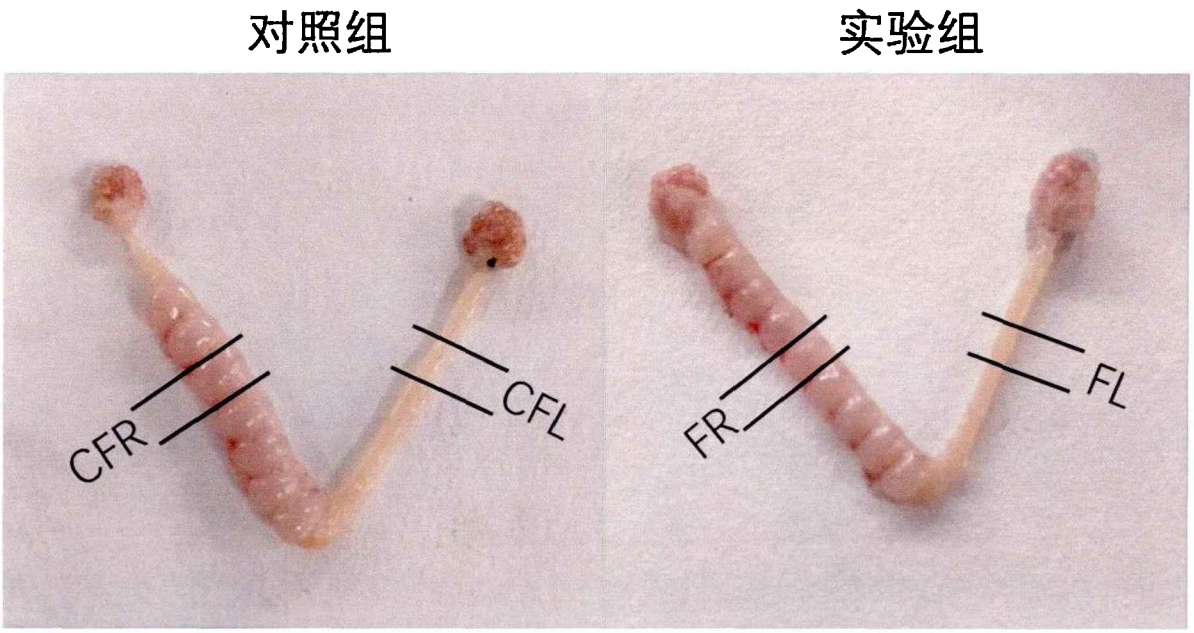


图 2-2 大鼠 GD8.5 子宫取材位置示意图

（2）基因芯片实验

委托上海殴易生物医学科技有限公司进行检测。方法简述如下：提取组织总RNA，RNA 质量检测，逆转录合成 cDNA。样本标记完 Cyanine-3-CTP(Cy3)荧光后，进行芯片杂交、洗涤及扫描获得原始数据。对芯片进行质控和预处理，并统计检出率，进行样本间相关性分析及主成分分析使数据标准化。过滤探针与检出数据，用 T 检验方法筛选差异 mRNA，以基因表达量上或下调 2 倍以上的变化值为标准筛选出差异基因。对筛出的基因进行散点图、火山图和聚类图绘制，然后进行 GO 富集分析、KEGG 富集分析和聚类分析，来判断差异基因影响的主要信号通路或生物学功能。

Gene Ontology(GO)数据库[69,70]提供了专业的术语来定义基因产物的属性，对差异基因进行 GO 分析，从而对这个基因的功能进行描述。它包含三大类：生物学过程（Biological Process，BP）表示一个分子活动事件的过程，包括细胞、组织、器官和物种的功能集合，往往也是和实验研究问题关联程度最高的一类；细胞组分（Cellular Component，CC）代表细胞或其所处的外界环境；分子功能（Molecular Function，MF）是描述在分子水平上基因产物的活性元件。

2. qPCR 检测大鼠子宫差异基因的相对表达

1) 基因名称及引物

基因名称		引物序列
Rat *β-Actin*	正义引物	5'- CTATGAGGGTTACGCGCTCC -3'

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

	反义引物	5'- ATGTCACGCACGATTTCCCT -3'
Rat *Igfbp5*	正义引物	5′-CCCTGCGACGAGAAAGCTC-3′
	反义引物	5′-TCTTTTCGTTGAGGCAAACCC-3′
Rat *Ccr7*	正义引物	5'-CAGGTGTGCTTCTGCCAAGAT-3'
	反义引物	5'-GGTAGGTATCCGTCATGGTCT-3'
Rat *Angptl8*	正义引物	5'- CCACCTCTTGTGGGCTCTCAC -3'
	反义引物	5'- TCTCTGCTGGATCTGCCGCA -3'
Rat *Pfkfb3*	正义引物	5'- CAACTCCCCAACGGTGATTGT -3'
	反义引物	5'- GAGGTAGCGAGTCAGCTTCTT -3'

2) qPCR实验步骤

提取大鼠子宫妊娠相关组织、胎盘组织总RNA，逆转录成cDNA，并进行实时荧光定量PCR，具体实验操作步骤同第一部分2.检测mRNA表达量-实时荧光定量PCR。

3．Western Blot 检测大鼠子宫胎盘组织 Angptl8 蛋白的相对表达

提取大鼠子宫和胎盘组织总蛋白、蛋白定量及 Western Blot 具体流程详见第一部分 3. 蛋白质表达量的检测-蛋白免疫印迹杂交。

4. 人滋养层细胞（HTR8-SVneo）的培养与鉴定

1) 人滋养层细胞的培养

(1) HTR8-SVneo 细胞复苏

人绒毛膜滋养层细胞（HTR8-SVneo）系是购于美国ATCC细胞库的永生化细胞系，能够稳定传代十多代，并且性质不发生改变，一些细胞特异性标志因子也能够稳定表达，稳定性好、重复性高，因此选用这个细胞系做进一步的实验验证。HTR8-SVneo细胞培养所需试剂及耗材如下：

试剂耗材名称	厂家
RPMI-1640 培养基	Gibco
胎牛血清（FBS）	Gibco
双抗（100×）	Gibco
胰酶 Trypsin-EDTA	Gibco
PBS（1×）	Gibco
DMSO	Sigma
15 mL、50 mL 离心管	Corning
T25 培养瓶	Corning
100 μL、1 mL 枪头、EP 管	Axygen

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

CO_2 培养箱	Thermo
电热恒温水浴锅（数显）	上海博迅医疗生物仪器股份有限公司

FBS，双抗，胰酶等实验试剂提前分装好，-20 ℃冰箱保存，需要使用时提前拿出化冻。水浴锅预热至37 ℃，超净工作台紫外灯灭菌30 min后，通风1 min。RPMI-1640培养基、胰酶、PBS等实验试剂提前从冰箱拿出恢复到温内温度。RPMI-1640培养基加入10% 胎牛血清（FBS）和1%青链霉素混合液双抗，配制成HTR8-SVneo细胞完全培养基。

冻存的HTR8-SVneo细胞迅速37 ℃水浴加热融化，酒精消毒后移入超净台中。用移液器尽量吸尽冻存管中液体转移至含有4 mL完全培养基的15 mL离心管中。800 r，室温离心5 min。小心弃去上清液，5 mL完全培养基吹打重悬细胞，并转移至T25培养瓶中，使细胞均匀分散在培养瓶底面。37 ℃、5% CO_2培养箱中培养。隔天换液，弃培养液，PBS缓冲液清洗细胞一遍，洗去细胞碎片，再添加5 mL完全培养基继续培养。

(2) HTR8-SVneo细胞传代培养

HTR8-SVneo细胞长到T25培养瓶底面积的80%以上即可传代。弃去培养液，PBS缓冲液清洗1遍，加1 mL 0.25%胰酶-EDTA，37 ℃、5% CO_2培养箱中消化60 s。待大部分细胞不贴壁，变圆时，加4 mL完全培养基，终止消化。移液器轻轻吹打下细胞。将吹打下来的细胞悬液转移至15 mL离心管中离心，800 r，5 min，弃上清。加3 mL完全培养基重悬细胞，均分至3个已含4 mL完全培养基的T25培养瓶中，吹打混匀，放入37 ℃、5% CO_2培养箱继续培养。

(3) HTR8-SVneo 细胞冷冻保存

待HTR8-SVneo细胞长到培养瓶底面积80%左右且生长状态较好时，即可冻存。收集细胞步骤同上（2）HTR8-SVneo细胞传代培养。离心后，弃上清，加入1 mL含有72% RPMI-1640培养基、20% FBS和8% DMSO的细胞冻存液，重悬细胞并混悬均匀。将细胞悬液转移至标记好的冻存管中，每管约10^6个细胞/mL，封口膜封口。放入细胞梯度降温冻存盒中，在-80 ℃冰箱中放置过夜，再转移至液氮罐中长期保存。

2) 人滋养层细胞的鉴别

(1) 免疫荧光法鉴别 HTR8-SVneo 滋养层细胞纯度

免疫荧光所需试剂耗材如下：

试剂耗材名称	厂家
RPMI-1640 培养基	Gibco
胎牛血清（FBS）	Gibco
双抗（100×）	Gibco
胰酶 Trypsin-EDTA	Gibco

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

PBS（1×）	Gibco
15 mL 离心管	Corning
T25 培养瓶	Corning
荧光显微镜	Leica
多聚甲醛	天津市光复科技发展有限公司
0.2% Triton X-100	Sigma-Aldrich
CK19 抗体	Proteintech
DAPI	北京博奥龙免疫技术有限公司
荧光标记二抗	Proteintech
EP 管	Axygen

在实验前我们进行了人绒毛膜滋养层细胞纯度初步验证，我们使用上皮细胞标记物 CK19 的多克隆抗体与所购细胞进行特异性结合，然后用带有荧光基团的二抗来识别 CK19 抗体，荧光显微镜下用绿光激发连接在 CK19 抗体上的荧光二抗，即可观察到激活的荧光信号并根据其荧光二抗强度判断其细胞纯度。

(2) 免疫荧光法鉴定 HTR8-SVneo 滋养层细胞的操作步骤

① 消化收集 T25 培养瓶中的 HTR8-SVneo 细胞，将细胞接种于盛有圆形玻片的 6 孔板中，每孔有 $5x10^4$ 个细胞。过夜培养，使细胞贴壁，等到细胞在玻片上生长至 80-90%的时候，将 6 孔板从 37 ℃恒温箱中取出，吸出培养基，用恢复室温的 1×PBS 浸洗玻片 3 次，每次 5 min，每次浸洗之后，将多余的液体吸出，注意不要干片，也不要把玻片上的贴壁细胞吹打下来，液体应贴壁缓慢滴加。

② 用预冷的 4%多聚甲醛室温固定细胞 30 min。1×PBS 浸洗 3 次，每次 5 min。

③ 0.1%或 0.2% TritonX-100 室温透化 5 或 10 min。1×PBS 浸洗 3 次，每次 5 min。

④ 将样品放置于干燥的培养皿中，用 2% 或 5%BSA（PBS 配制）将玻片完全浸没，置于湿盒中室温封闭 1 h。用吸水纸吸走多余的 BSA-PBS 封闭液，注意不要干片。

⑤ 将玻片放置在载玻片上，然后用油性笔将玻片圈住，防止抗体溢出玻片，再加入 100 μL 兔抗 CK19 多克隆抗体（3%BSA 稀释），用非免疫的兔 IgG 代替兔抗 CK19 多克隆抗体作为阴性对照。

⑥ 将载玻片置于湿盒中，室温孵育 2 h。用 PBS 浸洗 3 次，每次 5 min。

⑦ 用吸水纸吸干载玻片上多余的液体后，迅速滴加 100 μL 荧光素标记的山羊抗兔 IgG（3% BSA 稀释）。将载玻片置于湿盒中，室温孵育 2 h。加入标有荧光素二抗后，尽量避光操作。用 PBS 浸洗 3 次，每次 5 min。

⑧ 在载玻片上滴，200 μL 含有的 DAPI 的封片剂，将玻片正面向下覆盖在载玻片上，进行封片，避免气泡。

⑨ 用荧光显微镜（紫外激发 DAPI 细胞核呈蓝色，绿光激发 CK19 细胞质呈红色）

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

进行镜下观察并采集图像（20x）。

5. 重组 Angptl8 蛋白对 HTR8-Svneo 细胞增殖、迁移、侵袭的影响

1) 重组 Angptl8 蛋白对 HTR8-SVneo 细胞增殖、迁移、侵袭的影响

(1) 实验耗材与药品配制

试剂名称	生产厂商
HTR8-SVneo 细胞	ATCC
6 孔板、96 孔板	Corning
Transwell 嵌套	Corning
Angptl8 重组蛋白	OriGene
Marker 笔、直尺	Deli
移液器	Eppendorf
枪头	Axygen
1640 RPMI、PBS	Gibco
15 mL 离心管	Corning
甲醇	北京市通广精细化工公司
PBS 缓冲液	北京中杉金桥生物技术公司
结晶紫	索莱宝生物科技有限公司

药品的配制方法步骤：

Angptl8 重组蛋白浓度为 0.098 mg/mL，共 50 μg，分子量为 20.8 kDa。

迁移培养基、Transwell 上室培养基：根据细胞培养所需培养基体积，取重组 Angptl8 蛋白溶液溶于 1640 RPMI 培养基中，配制成 8 nmol/L 的 Angptl8 重组蛋白培养基，再倍比稀释成 4 nmol/L，2 nmol/L，1 nmol/L。

增殖培养基、Transwell 下室培养基：根据细胞培养所需培养基体积，取重组 Angptl8 蛋白溶液溶于 20 mL 含 10% FBS 的 1640 RPMI 培养基中，配制成 8 nmol/L 的 Angptl8 重组蛋白培养基，也依次倍比稀释成 4 nmol/L，2 nmol/L，1 nmol/L。

每次给细胞加药之前，都要先将药品充分涡旋震荡混匀。

(2) HTR8-Svneo 细胞增殖实验操作步骤

① 胰酶消化收集细胞并计数，在 96 孔板中加入 $5x10^3$ 个细胞/100 μL 细胞悬液，设置 5 个时间点，分别为 0 h、24 h、48 h、72 h、96 h。将培养板在培养箱中 37 ℃，5% CO_2 培养箱中培养一段时间使细胞贴壁。

② 细胞贴壁培养一段时间后，加药换液。向 96 板中加入 100 μL 浓度分别为 0，1，2，4，8 nmol/L 重组 Angptl8 蛋白的培养基继续培养。0 h 的待测细胞直接加入 10 μL CCK-8 溶液，无需换液。96 孔板在培养箱内孵育 2 h 后在 450 nm 波长处测定吸光度数值。

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

③ 换液培养后，每天向待测孔中加入 10 μL CCK-8 溶液，孵育 2 h，加 CCK-8 前需要更换新鲜培养基。气泡会影响 OD 值的读数，如若有气泡可以用酒精灯烧红的注射器针头扎破气泡。

④ 根据每天的 OD 值，绘制出细胞增殖曲线。

(3) HTR8-Svneo 细胞迁移实验操作步骤

② 超净工作台中紫外灯灭菌 30 min 后通风 1 min。在无菌 6 孔板底部用直尺比着划线，每隔 1 cm 划线横穿过孔，每孔 3 条直线。

② 收集对数生长期的 HTR8-SVneo 细胞，弃培养液，PBS 清洗细胞，加入 1 mL 胰酶 37 ℃消化 1.5 min 左右，RPMI 1640 完全培养基终止消化，吹打收集细胞于 15 mL 离心管中，离心 800 r，5 min，加 1 mL 完全培养基重悬细胞计数。

③ 将细胞种在 6 孔板中，每孔 $1x10^6$ 个细胞，过夜孵育。在 37 ℃、含 5% CO_2 培养箱中过夜培养。

④ 换用不含胎牛血清的 RPMI 1640 培养基配制不同浓度梯度的 Angptl8 重组蛋白 0 nmol/L，1 nmol/L，2 nmol/L，4 nmol/L，8 nmol/L。

⑤ 细胞贴壁后，用 200 μL 枪头竖直划线，PBS 清洗 3 遍轻轻洗去划掉的细胞，换成不含胎牛血清的不同浓度重组蛋白培养基培养。之后每 24 h 选取适当的孔拍照。

⑥ 用 ImageJ 软件进行划痕面积灰度分析，迁移率=（T0 时面积-Tt 时面积）/T0 时面积*100%。

(4) HTR8-SVneo 细胞侵袭实验操作步骤

①用无血清培养基将基质胶以 1:20 的比例稀释后，Transwell 上室每孔均匀加入 100 μL，放入 37 ℃、5% CO_2 细胞培养箱孵育 2 小时。2 小时后弃去未凝固液体。

② 消化离心收集细胞。无血清添加 0、1、2、4、8 nmol/L 不同浓度梯度的 Angptl8 重组蛋白的培养基重悬细胞，计数后按每个孔 2000 个细胞/100 μL 的量将细胞接种于 Transwell 上室，在下室加入 600 μL 含 10%FBS 的 RPMI 1640 完全培养基，置于 37 ℃，5 %CO_2 恒温箱中培养 12h、24 h、48 h、72 h 后取出小室进行固定染色。

③在新的 24 孔板中用 PBS 洗涤细胞一次。用甲醇或 4%多聚甲醛固定细胞 15 分钟后再用 1xPBS 洗涤细胞一次。

④ 2.5%的结晶紫染液（75%甲醇+25%去离子水配制成 5%的结晶紫母液，然后用 PBS 将母液稀释一倍，配制成 2.5%的结晶紫染液工作液）染色 15 分钟。

⑤ 清水洗净小室，避免碰到小室外侧底面。用棉签擦净小室内壁底面的细胞。

⑥ 在倒置显微镜下，拍照并计算细胞数量，每个小室拍 5 个不同视野的照片。计数取平均值和标准差，用 Graph Pad 软件进行统计学分析。

2) 油酸和软脂酸对 HTR8-SVneo 细胞增殖、迁移、侵袭影响的恢复作用

(1) 药品与配制

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

试剂名称	生产厂商
Angptl8	OriGene
油酸 OA	Sigma-Aldrich
软脂酸 PA	Sigma-Aldrich
三氯甲烷	国药集团化学试剂北京有限公司

用含 10%FBS 的 RPMI 1640 和不含 FBS 的 RPMI 1640 将 Angptl8 蛋白配制 4 nmol/L 的溶液，同时分别加入 0，0.1，0.2，0.4 mmol/L 的油酸（OA）和软脂酸（PA），分别配制成 Angptl8+OA 的培养基和 Angptl8+PA 的培养基，且 OA 和 PA 分别有 4 个浓度梯度，即 0，0.1，0.2，0.4 mmol/L。

(2) 实验操作步骤

细胞增殖实验具体操作步骤同前滋养层细胞增殖实验操作步骤。

细胞侵袭实验具体操作步骤同前滋养层细胞侵袭实验操作步骤。

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

结果

1. 大鼠雌激素缺乏模型子宫组织转录组基因芯片结果

1）原始数据扫描图

Agilent 芯片的原始数据扫描图主要用于展示每个样本的扫描效果，如果扫描均匀，无大块划痕，则代表基因芯片扫描结果真实可靠，为探索妊娠后期改变大鼠胎盘表型提供有力依据。芯片利用 Cy3（绿色荧光）进行染色，扫描图上呈现的每个绿色点对应一个探针。

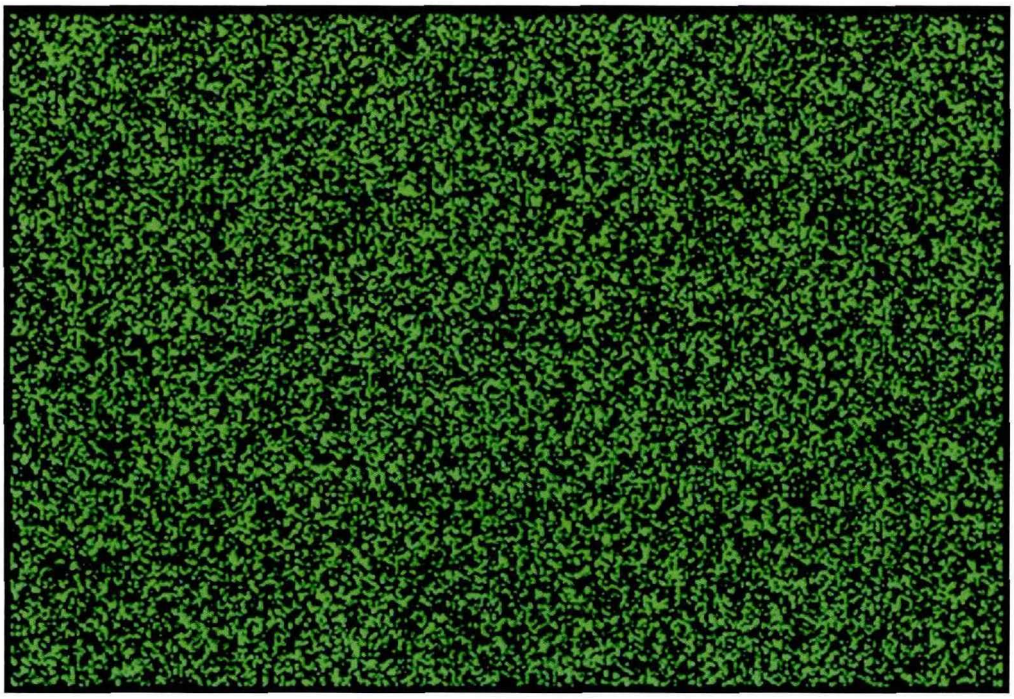


图 2-3 Agilent 单标记芯片扫描缩略图

2）变异系数

根据芯片探针的重复，计算质控点和非质控点的 CV 值，取中位值和变异系数判断检测体系的稳定性，CV 值一般要求低于 15%。本次检测结果中平均 CV 值为 2.0068，最大 CV 值为 2.6282，芯片实验成功。

表 1 基因芯片变异系数结果

样本名称	非质控探针 CV 值中位值	质控探针 CV 值中位值
CFL1	1.9111	2.6282
CFL2	2.0431	2.0689
CFL3	1.5368	1.641
CFR1	2.0035	2.4112

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

CFR2	2.1866	2.4506
CFR3	1.3242	1.5136
FL1	1.7554	1.7882
FL2	2.1594	2.4369
FL3	2.1656	2.092
FR1	2.1452	2.5394
FR2	1.779	1.791
FR3	1.8135	1.9782

3）检出率

芯片的检出率，主要统计的是每个样本标记为检出的探针占总探针的比例。本次检测结果中最低检出率为 52.33%,平均检出率为 61.38%，最大检出率为 66.59%。

表 2 基因芯片检出率结果

样本名称	检出率
CFL1	63.88%
CFL2	59.78%
CFL3	63.76%
CFR1	66.59%
CFR2	55.49%
CFR3	52.33%
FL1	60.94%
FL2	60.80%
FL3	63.66%
FR1	59.44%
FR2	64.67%
FR3	65.21%

4）箱线图

箱线图（Box Plot）[71]，又称为盒须图、盒式图或箱形图，用于展示标准化前后的两组数据的分布情况，它可以粗略地了解数据的分布情况。它是以图形的方法展示其四分位数分布的描述性统计手段。箱线图从上到下包含 6 个数据节点，分别对应上边缘、上四分位数（Q3，UQ)、中位数、下四分位数（Q1)、下边缘，以及上下边缘之外的异常值。异常值是小于 Q1-1.5IQR 或者大于 Q3+1.5IQR 的值，其中 IQR=Q3-Q1。本次结果中展示了至少在任意一个样本中检测到的 36149 个 mRNA 信号分布情况。

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

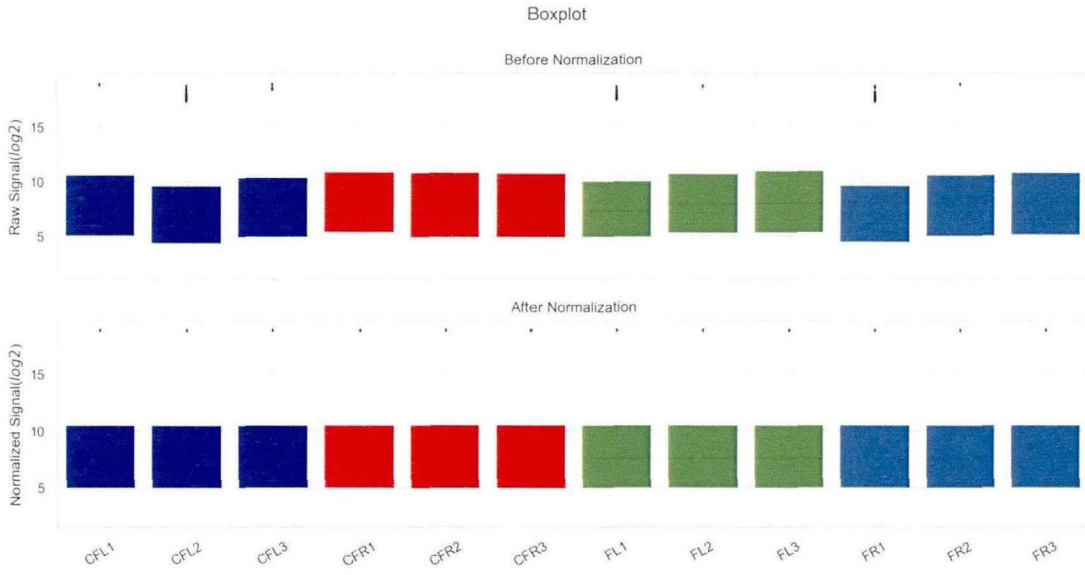


图 2-4 箱线图

5）样本相关性分析

检验样本选择的合理性和实验的可靠性，可进行样品间基因表达水平相关性分析，相关系数越接近 1，表明样品之间的表达模式相似度越高。相关性计算数据来源于标准化后的所有探针检测到的信号值，所用的方法为 Pearson Correlation[72]。

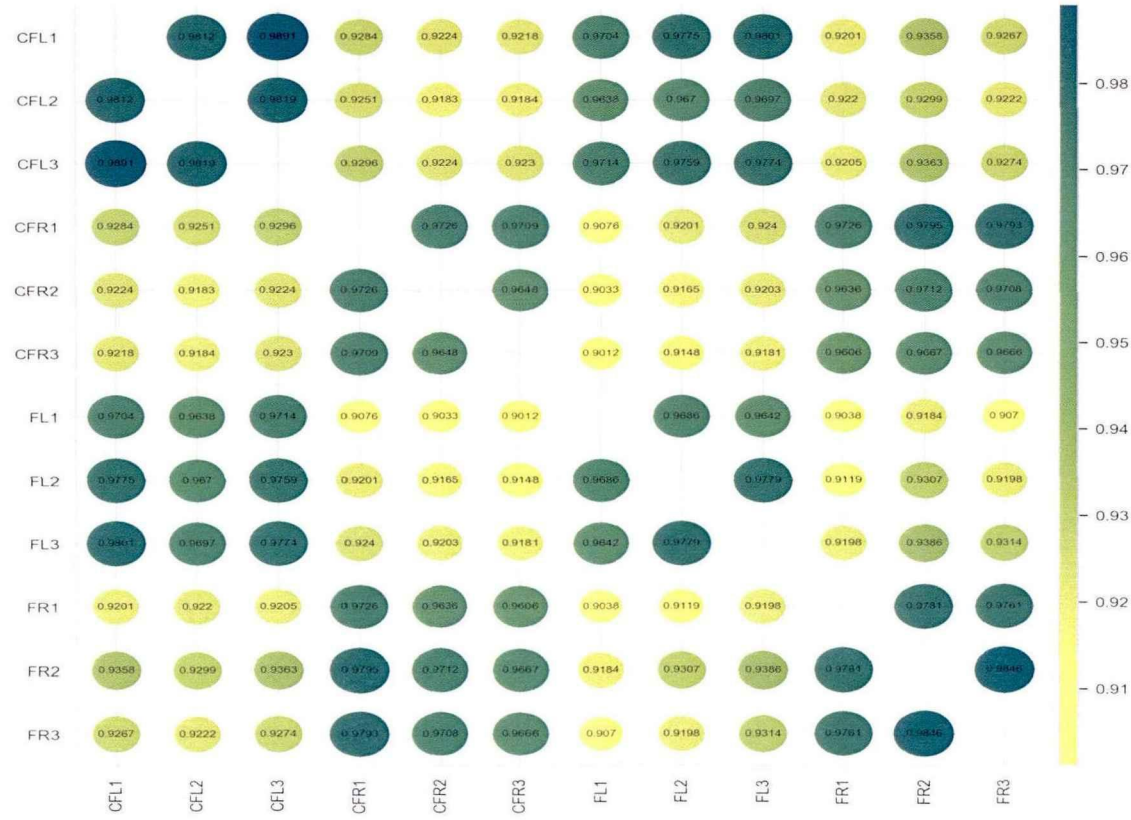


图 2-5 样本相关性图

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

6）样本相关性分析

对基因的表达含量进行主成分分析(PCA, Principal Component Analysis)[73]可以从不同维度展现样本间的关系并对实验设计进行验证。理想的 PCA 结果是不同组样本相对离散，而同组样本距离较近。

PCA 图上各个坐标轴上解释的方差之和越大，说明在对应的图片上看到的信息量越大，作用因素越单一；反之，方差之和越小，说明图片上看到的样本分布不足以代表实际样本信息。

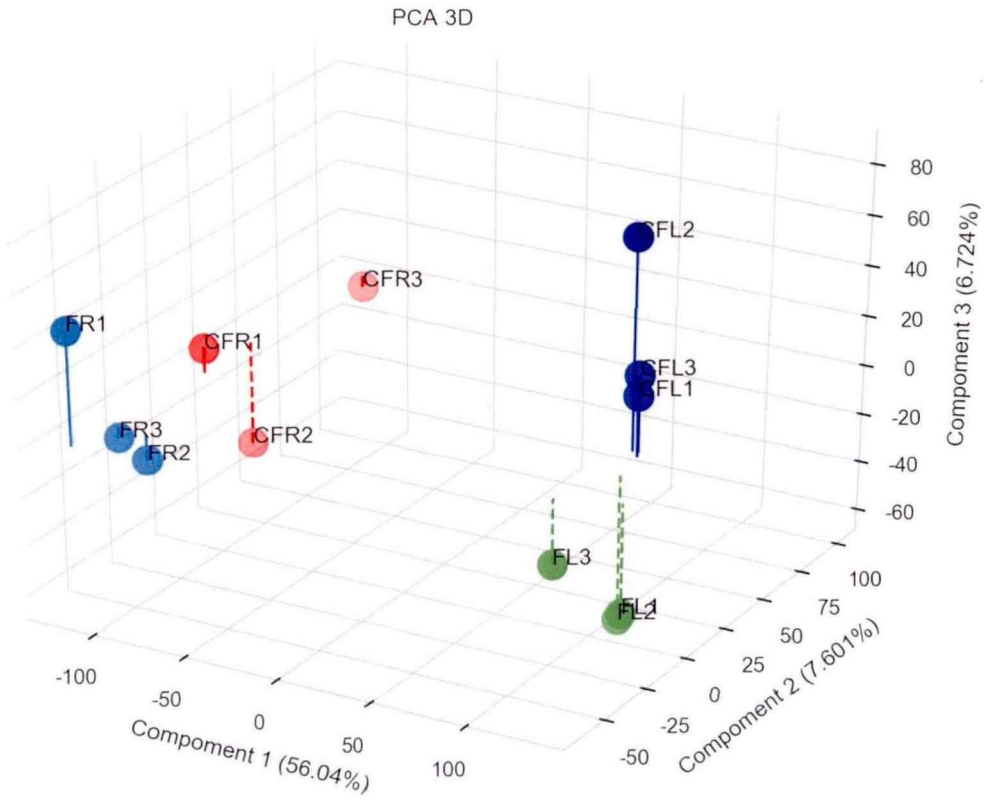


图 2-6 PCA 图

7）差异筛选

差异筛选的标准：

针对每组实验组和对照组的比较，选择至少有一组中 75%样本标记为‘Detected’的探针进行下一步差异筛选；

对于无生物学重复组按照差异倍数的绝对值大于等于 2 进行差异筛选；

对于有生物学重复的分组按照差异倍数的绝对值大于等于 2 且 T 检验[74]筛选得到的 pvalue 小于等于 0.05 进行差异筛选。

根据分组情况(共计 4 组)对数据进行过滤并根据对应的阈值(差异倍数：[2], P

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

值：[0.05])分别进行差异筛选，最终共计 4 组比较结果。

表 3 差异筛选结果

组别名称	上调基因个数	下调基因个数	总计
comp1_FL_vs._CFL_FC2P0.05	188	444	632
comp2_FR_vs._CFR_FC2P0.05	224	411	635
comp3_FR_vs._FL_FC2P0.05	3788	4043	7831
comp4_CFR_vs._CFL_FC2P0.05	3116	4040	7156

(1) 火山图

在有生物重复的分组比较中，往往是通过差异倍数以及 pvalue 来确定差异基因。利用火山图(Volcano Plot)可以很好地同时展示差异倍数以及 pvalue 的分布情况，以及最终筛选得到差异基因分布情况。

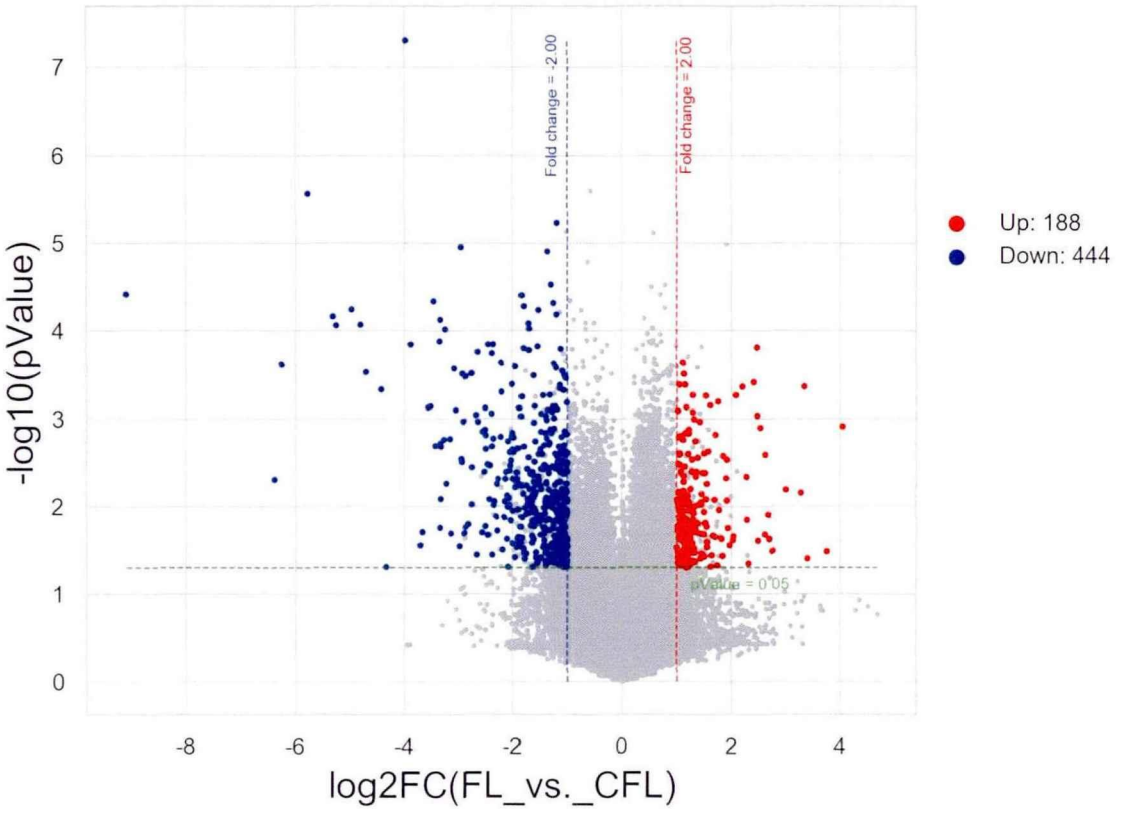


图 2-7 火山图

(2) 散点图

利用散点图来展示两组数据中基因表达的变化情况。

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

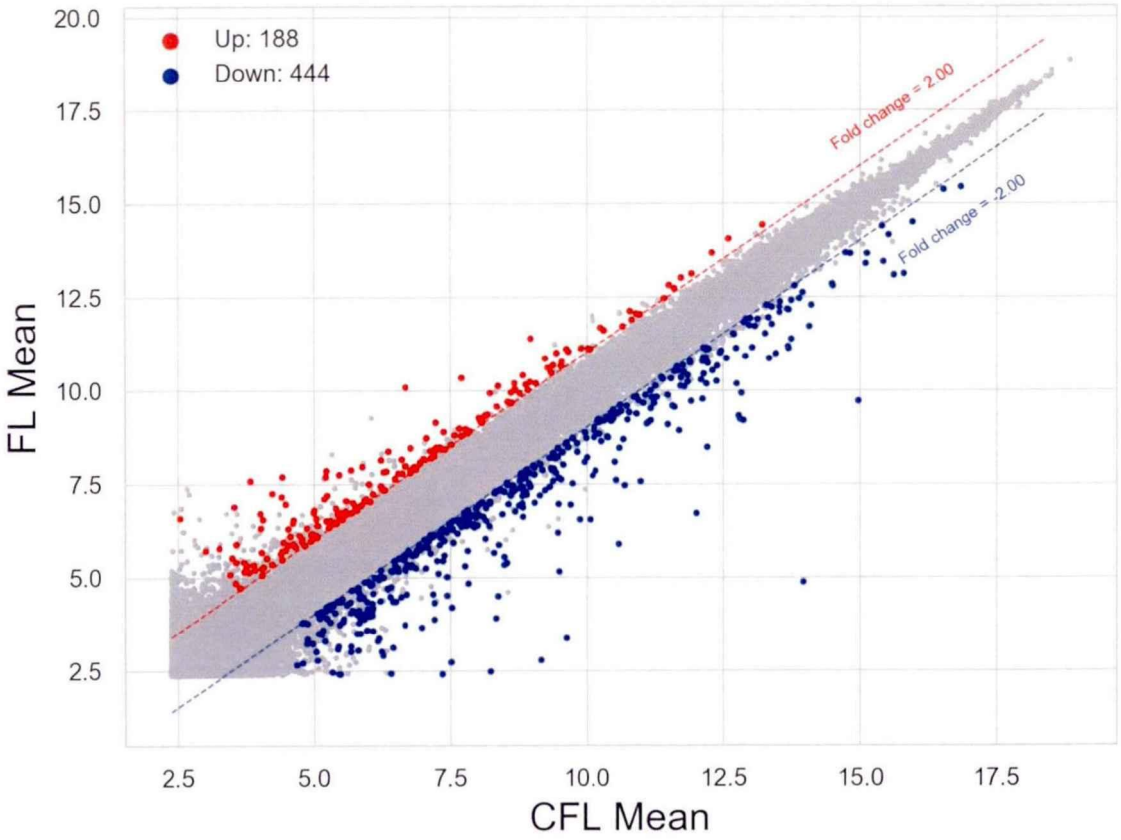
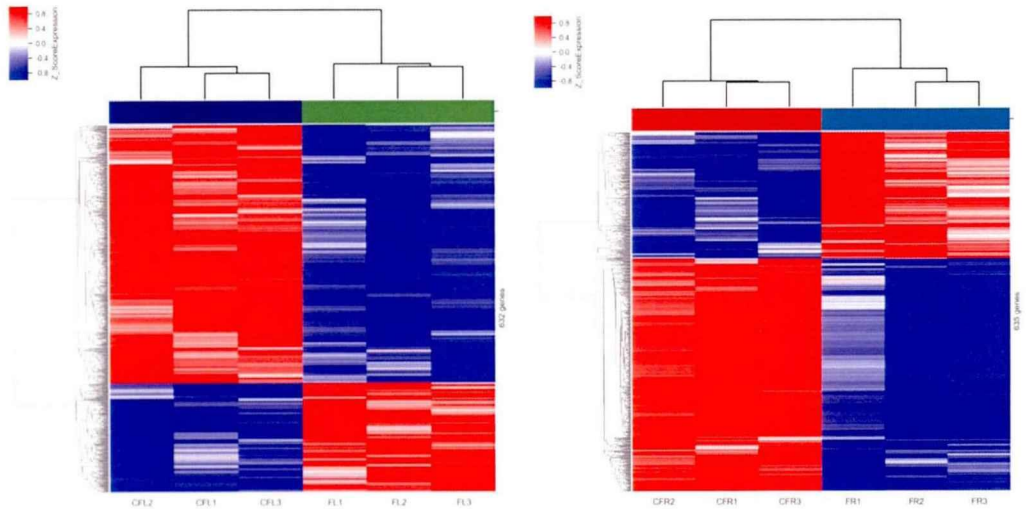


图 2-8 散点图

(3) 聚类图

聚类分析是数据建模和数据挖掘中常用的方法，也是一种结果展示手段。

对差异基因进行非监督层次聚类分析，根据数据的数学特征进行聚类，从而展示样本之间，基因之间的聚类关系。通常，较好的生物学重复筛选得到的差异基因，经过非监督层次聚类之后，可以很好的把两组或者多组样本区分开。



(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

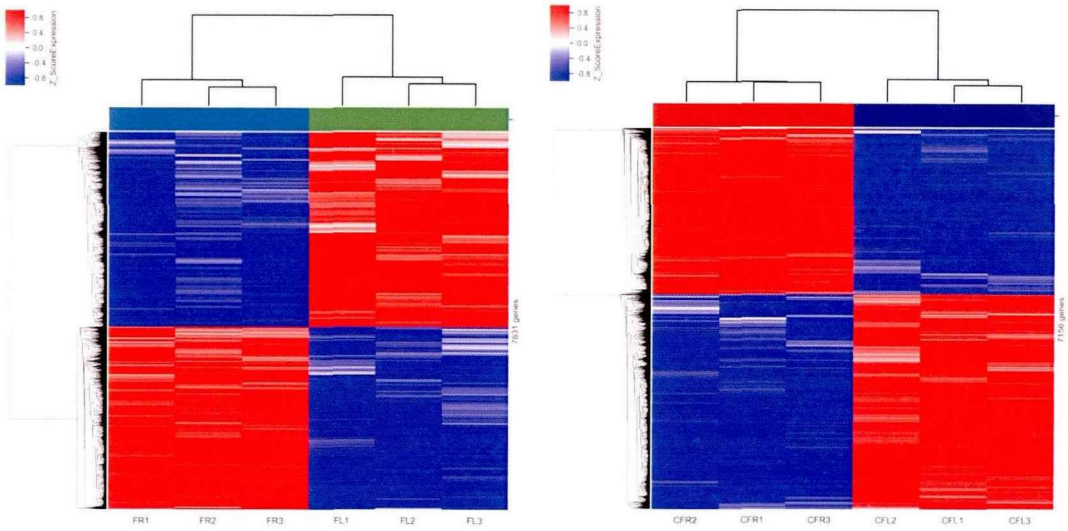


图 2-9 聚类图

8）韦恩分析

对上、下调的差异基因进行韦恩（Venn）分析：目的是进一步明确 letrozole 实验条件干预，即胚胎着床后短暂抑制雌激素合成后，妊娠 8.5 天时妊娠组织特有的差异基因表达。

蓝色圆：实验组和对照组非妊娠侧（FL 组 vs. CFL 组）的差异基因反映了来曲唑实验条件干预，即胚胎着床后短暂抑制雌激素合成后，妊娠 8.5 天时非妊娠子宫组织基因表达的差异；

红色圆：实验组和对照组妊娠侧（FR 组 vs. CFR 组）的差异基因反映了来曲唑实验条件干预，即胚胎着床后短暂抑制雌激素合成后，妊娠 8.5 天时妊娠组织基因表达的差异。

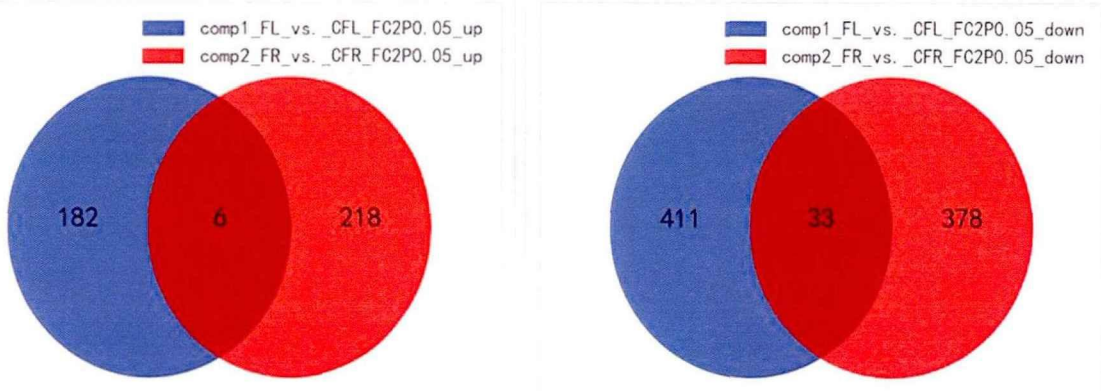
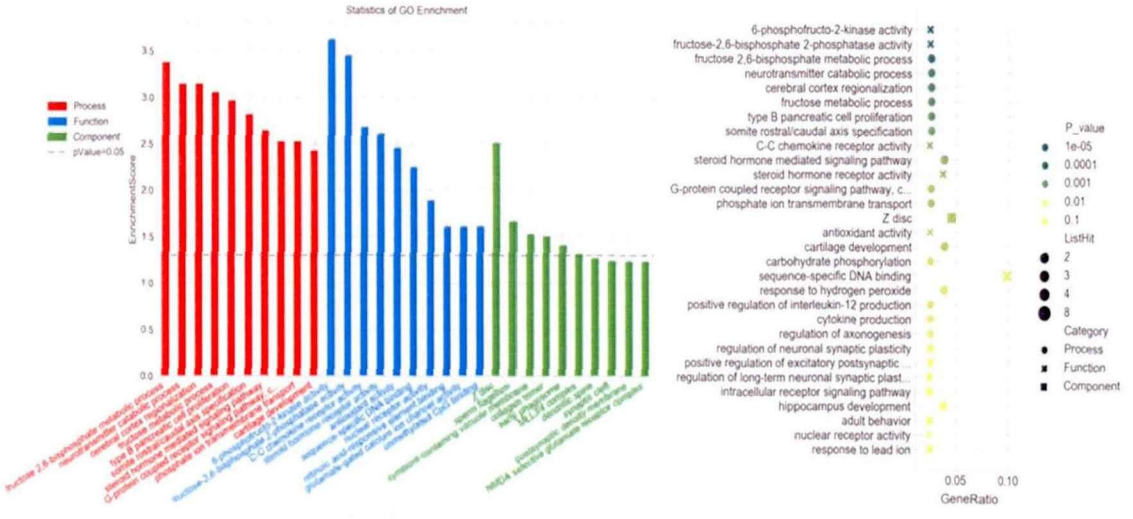


图 2-10 上调、下调差异基因个数

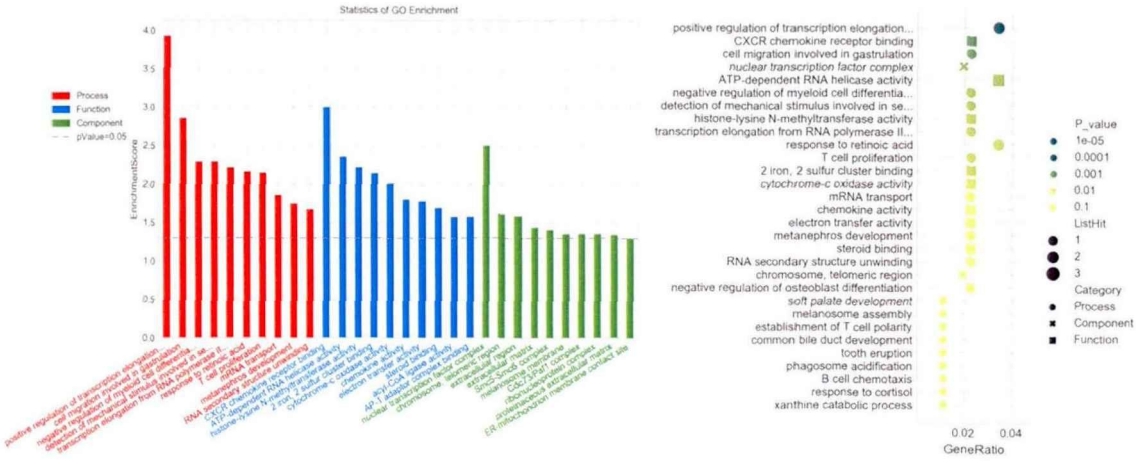
取材的子宫，提取 mRNA 并进行 Agilent 芯片杂交，对处理组进行全基因组表

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

达谱芯片检测。实验组妊娠相关组织特有的上调差异基因有 218 个，下调差异基因有 378 个。对上、下调的差异基因进行 GO 分析，从而对差异基因的功能进行描述。将 GO 富集分析结果中生物学过程（BP），细胞组分（CC），分子功能（MF）中的条目绘制成条形图（图 11 左），在同一张图中展示 GO 三大类结果中最显著 top10 的 GO 条目。并将 GO 富集分析结果中 P 值最小的 top30 条目绘制成气泡图（图 11 右）。展示 GO 富集分析结果中最显著的条目，以及对应的分类（BP，CC，MF）。GO 分析发现对照组和实验组中与能量代谢相关的基因数目较多，差异基因主要涉及代谢功能异常、细胞增殖等功能为主，涉及 *Angptl8*、*Igfbp5*、*Ccr7*、*Pfkfb3* 等特异性差异基因。实验组妊娠组织特有的差异基因中，我们对感兴趣的上调差异基因拟进行功能研究的候选的基因是：*Angptl8*、*Igfbp5*、*Ccr7*、*Pfkfb3*。



——主要涉及代谢功能异常、细胞增殖等功能为主



--主要涉及细胞分化侵袭迁移等

图 2-11 条形图和气泡图

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表 4 拟进行功能筛选的候选基因

Term_ID	Term_description	GeneSymbols	P_value	Category
GO:0006003	fructose 2,6-bisphosphate metabolic process	*Pfkfb3*	0.000411	Process
GO:0044342	type B pancreatic cell proliferation	*Angptl8;Igfbp5*	0.001065	Process
GO:0016493	C-C chemokine receptor activity	*Ccr7*	0.002048	Function

2. 大鼠妊娠子宫组织差异基因 mRNA 的验证

如图 2-12，*Angptl8* 和 *Igfbp5* 基因的 qPCR 结果显示，在 GD8.5 时实验组中表达上调高于对照组(P<0.05)，符合表达谱芯片结果。在 GD10.5 和 GD13.5 时，*Angptl8* 基因表达升高。在 GD10.5，实验组 *Ccr7* 基因表达明显低于对照组（P<0.05），*Pfkfb3* 基因表达没有差异，与表达谱芯片结果不一致，出现此现象的原因还需进一步深入的科学实验验证。

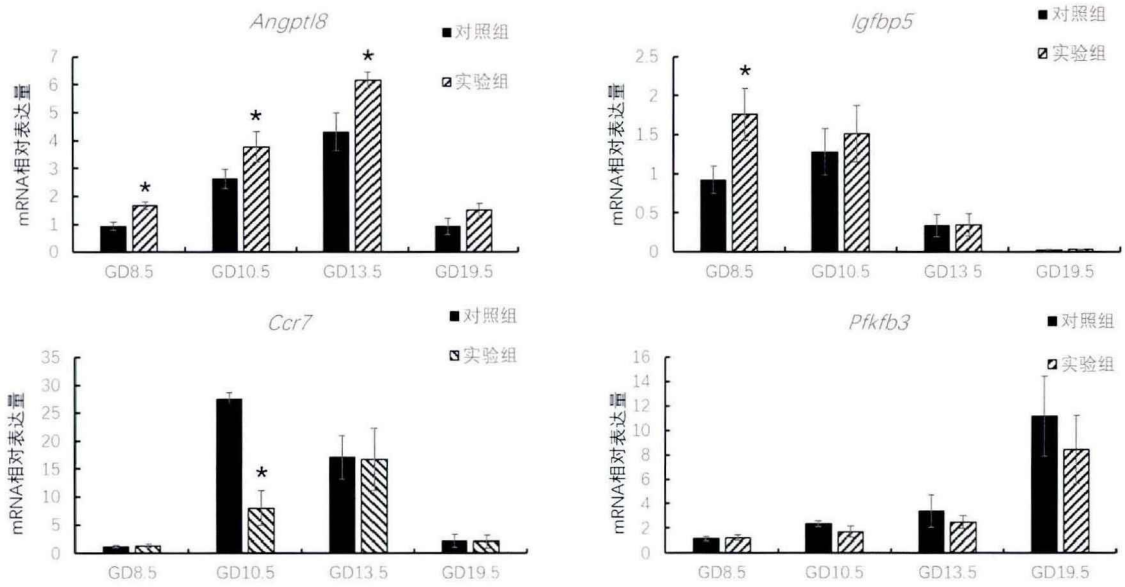


图 2-12 大鼠子宫及胎盘组织 *Angptl8*、*Igfbp5*、*Ccr7*、*Pfkfb3* 基因表达结果

3. 大鼠妊娠子宫组织 Angptl8 蛋白的相对表达

如图 2-13，与对照组相比，在 GD8.5、GD10.5 和 GD13.5 时，实验组 Angptl8 蛋白表达量明显上调（P<0.05），在 GD19.5 时，呈升高趋势，但无统计学差异。

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

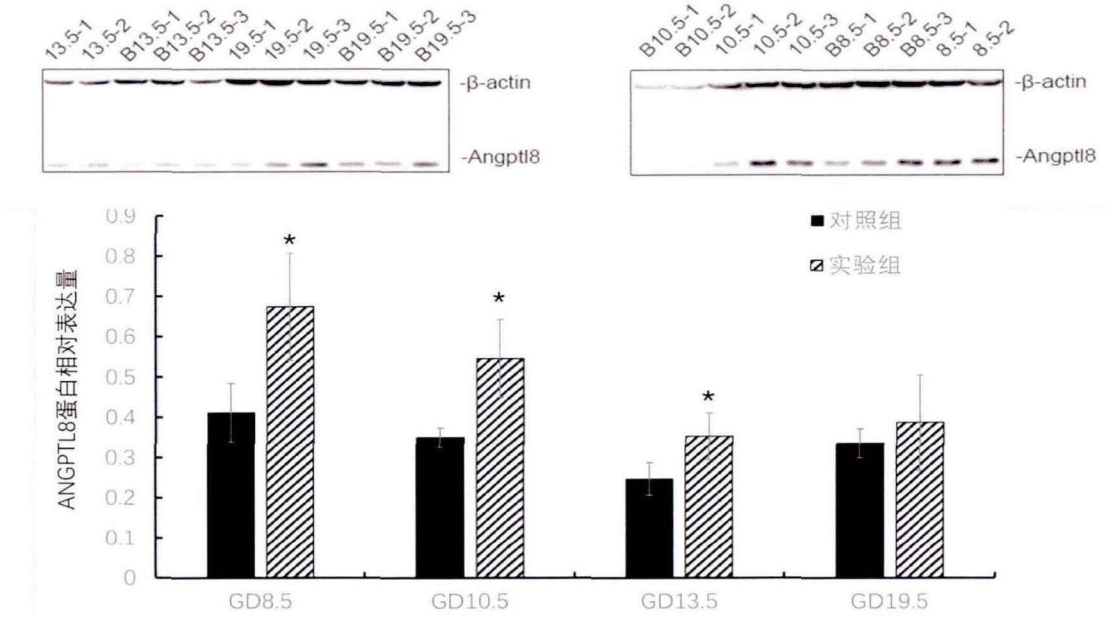


图 2-13 大鼠妊娠子宫组织 Angptl8 蛋白表达结果

4. HTR8-SVneo 绒毛膜滋养层细胞的鉴别结果

我们用 DAPI 染细胞核，指示细胞核所在位置，用上皮细胞标志物 CK19 染细胞质。然后用共聚焦显微镜的紫外光激发 DAPI，用绿光激发连接在 CK19 多克隆抗体上的荧光二抗，并在共聚焦显微镜镜下观察并采集图像（20x，比例尺 50 μm）如下图 2-14：DAPI 指示的细胞核呈蓝色，连接兔抗 CK19 多克隆抗体的荧光二抗指示的细胞质呈红色，说明胞浆表达 CK19 蛋白，具有上皮细胞特性，区别于子宫基质细胞，是我们需要的滋养层细胞。

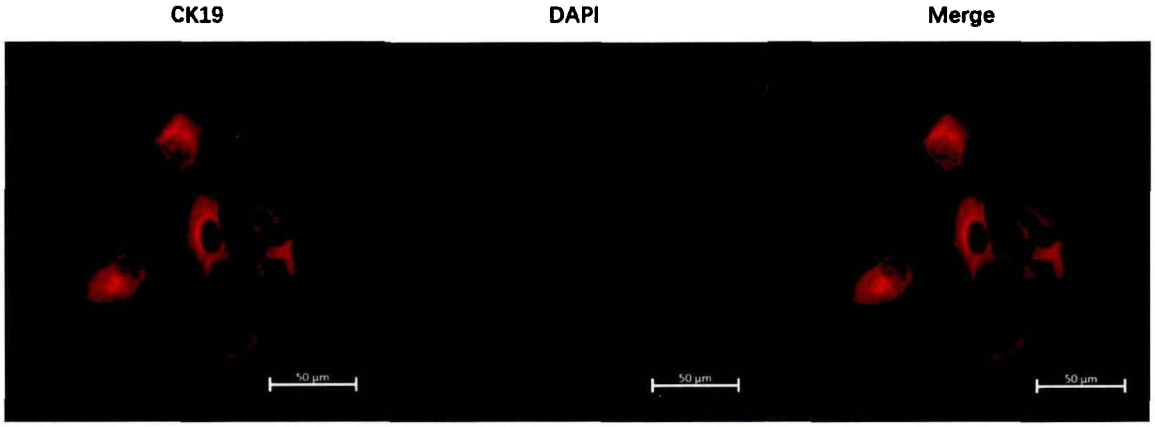


图 2-14 HTR8-SVneo 细胞的 CK19 抗体免疫荧光结果

5. 重组 Angptl8 蛋白对 HTR8-Svneo 细胞增殖、迁移、侵袭的影响

1) 重组 Angptl8 蛋白对 HTR8-Svneo 细胞增殖的影响

由下图 2-15 可以看出，与对照组相比，48 h 内，各浓度重组 Angptl8 蛋白对 HTR8-Svneo 细胞增殖的作用不明显。而从 72 h 开始，1、2、4、8 nmol/L 浓度对 HTR8-Svneo 细胞的增殖有轻度促进作用，但各浓度之间的促进作用差异不大，提

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

示 Angptl8 蛋白对人绒毛膜滋养层细胞 HTR8-Svneo 的增殖作用并不明显，高浓度的 Angptl8 对滋养层细胞具有一定的促进增殖作用。

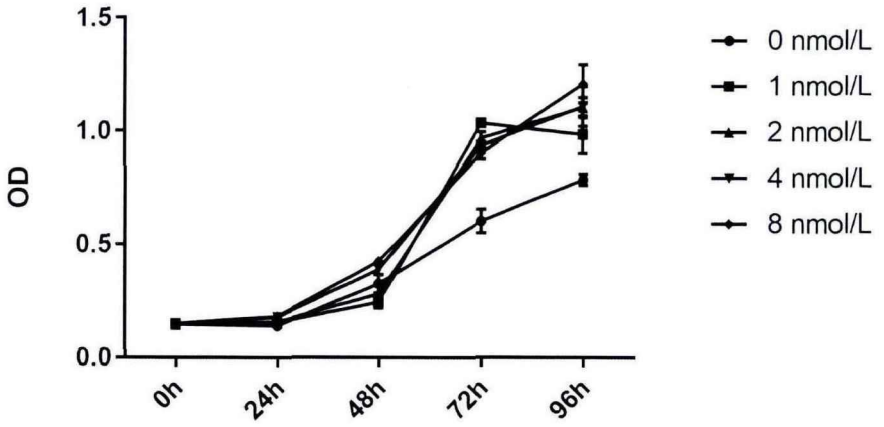
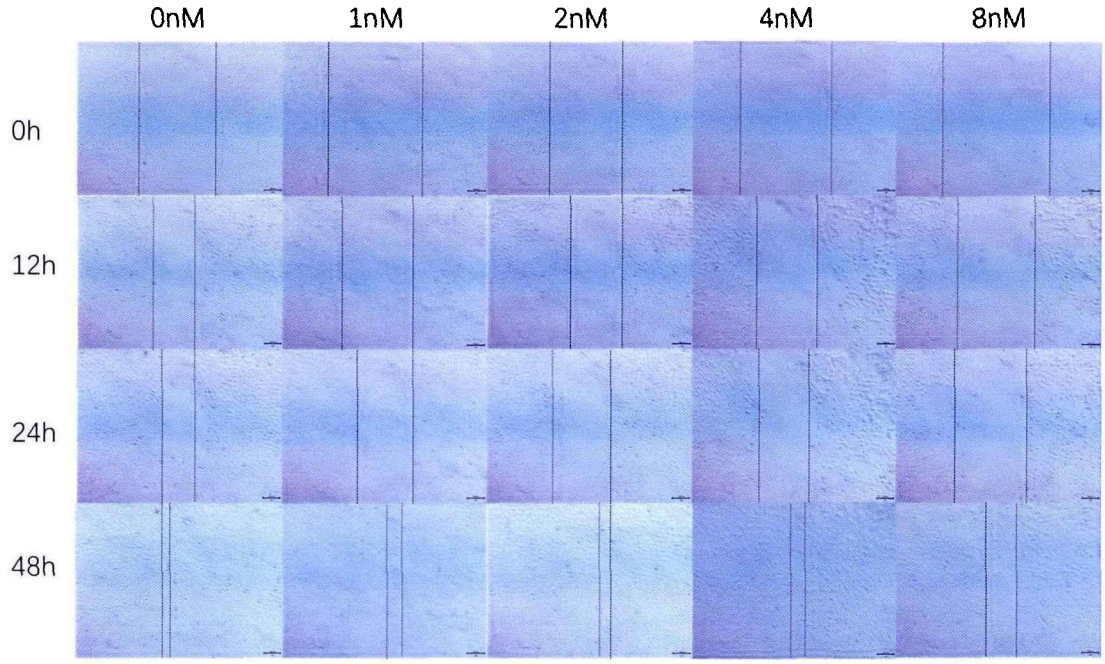


图 2-15 重组 Angptl8 蛋白对人绒毛膜滋养层细胞增殖的影响

(2) 重组 Angptl8 蛋白对 HTR8-Svneo 细胞迁移的影响结果

如图 2-16，与对照组相比，1、2、4、8 nmol/L 的 Angptl8 蛋白对 HTR8-SVneo 细胞的迁移没有差异。仅 8 nmol/L 的 Angptl8 蛋白对 HTR8-SVneo 细胞的迁移表现出一定抑制作用，48 h，8 nmol/L 的重组 Angptl8 蛋白表现出较明显的 HTR8-SVneo 细胞迁移的抑制效应（$P<0.05$），其他处理组没有统计学差异（$P>0.05$）。



(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

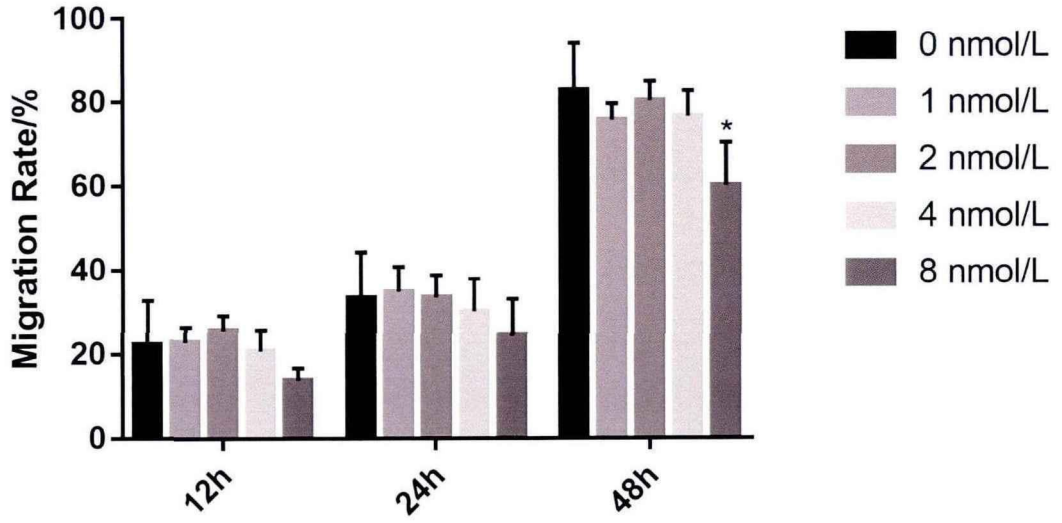


图 2-16 重组 Angptl8 蛋白对人绒毛膜滋养层细胞迁移的影响

(3) 重组 Angptl8 蛋白对 HTR8-Svneo 细胞侵袭的影响结果

如图 2-17，与对照组相比，可以看出随着 Angptl8 浓度的增高，侵袭穿过基质胶的细胞数量逐渐减少，且差异有统计学意义（$P<0.05$）。这说明过多的 Angptl8 蛋白抑制了人绒毛膜滋养层细胞（HTR8-SVneo）的侵袭作用，干扰了滋养层细胞正常的生长特性。提示，大鼠着床后短暂抑制雌激素引起 Angptl8 表达升高，影响了滋养层细胞的侵袭作用，使滋养层细胞在子宫内膜侵袭异常，绒毛滋养层细胞不能稳定锚定在子宫内膜上，致使胎盘不能从子宫内膜血管中交换血液汲取足够的营养物质，从而促使妊娠后期胎盘异常增生代偿以提供更多的养分。

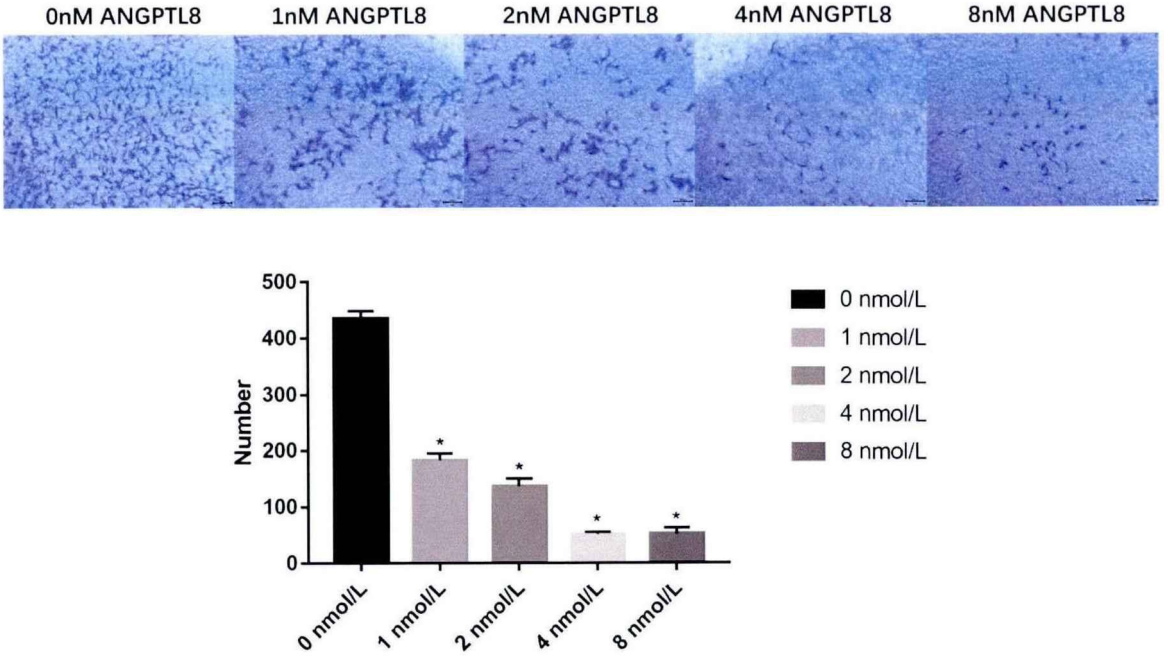


图 2-17 Angptl8 对人绒毛膜滋养层细胞侵袭的影响

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2) 油酸和软脂酸对滋养层细胞特性的恢复作用

(1) 油酸和软脂酸对重组 Angptl8 蛋白干预滋养层细胞增殖的恢复结果

有研究显示，Angptl8 可以与 Angptl3 和 Angptl4 共同抑制 LPL 活性，阻止甘油三酯水解成脂肪酸。为了进一步解析 Angptl8 对滋养层细胞功能影响的机制，在使用 Angptl8 干预滋养层细胞功能时添加了油酸（Oleic acid，OA）和软脂酸（palmitic acid，PA）。如图 2-18，与对照组相比，添加 0.1 mmol/L 的 OA 和 PA 至 48h 时对细胞增殖并无影响，72h 时表现出一定的抑制细胞增殖作用；而 0.2 mmol/L 和 0.4 mmol/L 的 OA 和 PA 呈现明显抑制细胞增殖的作用，且 0.4 mmol/L OA 和 0.4 mmol/L PA 都会对细胞生长产生毒性作用，所有细胞在第 24 h 到 48 h 就已基本死亡。这个结果说明，OA 和 PA 能在一定程度上抑制 Angptl8 重组蛋白对人绒毛膜滋养层细胞增殖的促进作用。

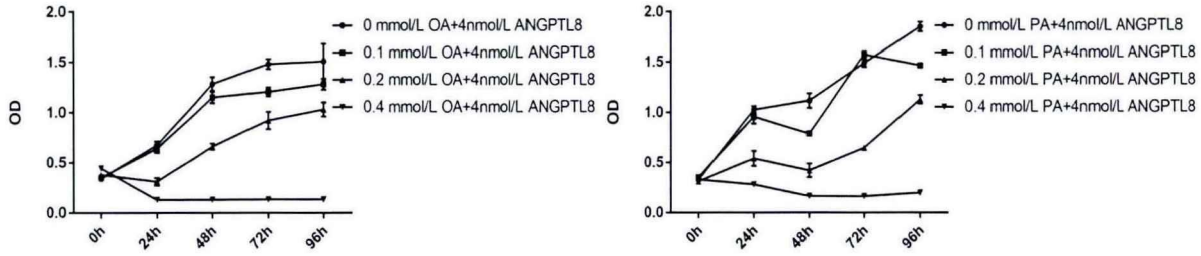


图 2-18 OA 和 PA 对 Angptl8 干预滋养层细胞增殖特性的恢复

(2) 油酸和软脂酸对重组 Angptl8 蛋白干预滋养层细胞侵袭的恢复结果

如图 2-19，与对照组相比，仅 0.1 mmol/L 的 OA 对重组 Angptl8 蛋白抑制人绒毛膜滋养层细胞的侵袭效应有逆转作用（$P<0.05$）。与对照组相比，添加 0.1 mmol/L、0.2 mmol/L 的 PA，滋养层细胞侵袭能力恢复（$P<0.05$），0.4 mmol/L 的 PA 对重组 Angptl8 蛋白抑制人绒毛膜滋养层细胞的侵袭效应也有一定逆转作用，但逆转作用没有 0.1 mmol/L、0.2 mmol/L 的 PA 那么强，可能是由于 0.4 mmol/L 的 PA 对细胞的毒性作用占了主导地位。

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

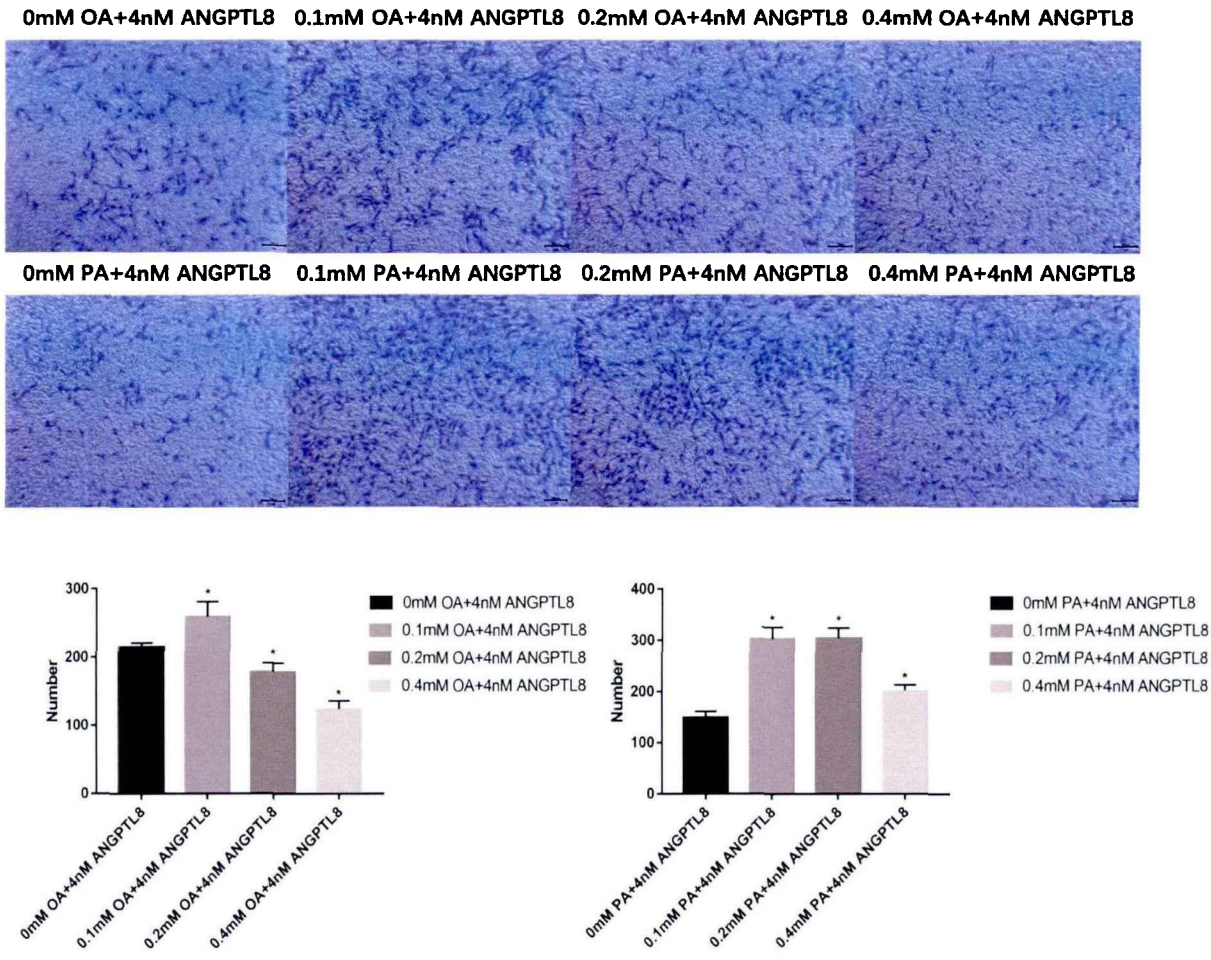


图 2-19　OA 和 PA 对 Angptl8 干预滋养层细胞侵袭特性的恢复

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

讨论

胎盘的形成与滋养层细胞功能密切相关，涉及滋养层细胞的动态分化成熟，功能正常的滋养层细胞具有迁移性和侵入性特性，并具有与母体环境内细胞的互动能力，对于胎盘的发育成熟不可或缺。

雌激素和孕激素作为最重要的甾体性激素，对于妊娠的起始、胎盘功能的维持和胎儿的生长发育具有重要的作用。E_2、孕酮及其代谢物通过上调滋养层细胞的增殖、分化和迁移来参与血管生成[75-77]以及正常的滋养细胞发育和侵袭[78-82]。低 E_2 水平可能导致滋养层发育和血管生成过程不足，进而可能进一步导致低 E_2 水平，但其具体机制远未阐述清楚。

在第一部分的研究中，在大鼠胚胎着床后短暂给予来曲唑抑制雌激素的合成，建立了大鼠胚胎着床后短暂雌激素缺乏模型，发现了妊娠后期胎盘的异常增生可能与胎盘连接区滋养层细胞的增殖、侵袭功能的异常改变和血管新生异常有关。因此在本部分研究中对大鼠胚胎着床后短暂雌激素缺乏的子宫妊娠组织，进行了表达谱基因芯片检测分析，进一步了解影响大鼠妊娠晚期胎盘异常增生的原因及内部调控机制。

表达谱芯片结果的生物信息学分析提示，大鼠着床后短暂抑制雌激素合成后的子宫妊娠组织特异性差异基因主要集中于糖脂代谢途径、细胞增殖等相关功能，提示孕早期的雌激素波动很有可能通过影响糖脂代谢进而对妊娠过程中的胎盘发育造成影响。前期研究显示，在大鼠孕早期即 GD6.5-8.5 时给予 0.16mg/kg/d 的来曲唑，可以短时影响雌激素合成导致体内雌激素水平一过性降低，在胎盘发育的后续阶段雌激素水平仍维持在正常浓度[31]，表明孕早期体内雌激素短时低下会促使母体胎盘发育微环境的改变进而影响后期胎盘发育。

血管生成素样蛋白 8（ANGPTL8）是一种新近鉴定的分泌性蛋白，具有调节葡萄糖和脂质代谢途径的能力，是血管生成素样蛋白（ANGPTL）家族的新成员。在 2012 年，多个小组以 RIFL[83]，Lipasin[84]，ANGPTL8[85]和 Betatrophin[86]等各种名称发现并报道了以前未鉴定的基因 Gm6484 在脂质代谢中的功能。 2015 年 10 月，HUGO 基因命名委员会[87]将该基因的正式名称指定为 ANGPTL8（人类）和 Angptl8（小鼠）。血管生成素样蛋白（ANGPTL）是由八个成员（ANGPTL1-8）组成的一组分泌糖蛋白，ANGPTL1-7 具有相同的结构并具有不同的功能[88]。ANGPTL8 是一种具有 198 个氨基酸的 22 kDa 蛋白，是 ANGPTL 家族中的一个独特成员，因为它缺少 ANGPTL1-7 共有的共同结构；但 ANGPTL8 通过与 ANGPTL3 和 ANGPTL4 的 N 末端结构域显示结构同源性来表明其亲缘关系[84]，并与这两种蛋白表现出功能相

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

似性，即可与脂蛋白脂酶（LPL）结合并调节甘油三酸酯代谢[89]。因此，ANGPTL8被认为是 ANGPTL 家族中一个新颖但非典型的成员，也是脂质代谢的新兴参与者[60, 90, 91]。

临床上妊娠并发症的发生常伴有脂代谢异常，如妊娠糖尿病、妊娠高血压、妊娠期胆汁淤积症等妊娠并发症，继而导致不良妊娠结局。糖脂代谢异常对胎盘滋养层细胞功能的影响尚不清楚。本研究中，在大鼠胚胎着床后，可以导致子宫妊娠组织中 Angptl8 mRNA 和蛋白表达水平的升高，但其来源于低雌激素水平对全身系统性影响还是对局部妊娠组织特别是蜕膜组织的作用所致尚有待于进一步明晰。体外细胞实验结果显，Angptl8 对滋养层细胞具有轻度的促进增生作用，对滋养层细胞侵袭则具有较明显的抑制作用。大鼠着床后抑制短暂抑制雌激素后，可以观察到GD13.5 和 GD19.5 时胎盘母体去没有或少量滋养层细胞侵袭浸润，在 GD19.5 时胎盘迷路区可见大量糖原细胞（侵袭性滋养层细胞的一种）堆积，推测可能与局部 Angptl8 水平升高有关。

ANGPTL8 具有与 ANGPTL3 和 ANGPTL4蛋白 N 端结构域的同源性，并表现出与这两种蛋白质相似的功能，可与脂蛋白脂酶（LPL）结合并调节甘油三酯代谢[92]。ANGPTL8 蛋白与 LPL 结合，形成二聚体，可以抑制细胞溶酶体中的水解酶一脂蛋白脂肪酶（LPL）的活性，使游离脂肪酸的水平升高。游离脂肪酸包括油酸、软脂酸、亚油酸等，这些游离脂肪酸可能影响滋养层细胞侵袭功能的主要物质。当 ANGPTL8 蛋白上调后，二聚体解体，LPL 的活性被释放，游离脂肪酸含量减少。在体外细胞实验中，Angptl8 抑制滋养层细胞侵袭的同时，我们通过回补游离脂肪酸包括油酸和软脂酸，结果显示回补油酸仅在 0.1 mmol/L 时对抑制侵袭有明显挽救效应，而其他浓度油酸对抑制侵袭没有挽救效应。回补软脂酸可以较明显的挽救 Angptl8 蛋白对滋养层细胞侵袭能力的抑制，提示 Angptl8 很可能通过干预滋养层细胞 LPL 介导脂代谢途径进而影响细胞的侵袭能力，有关具体机制尚需深入研究。

本研究在体外进一步验证 ANGPTL8 蛋白对人绒毛膜滋养层细胞生长特性的调控。结果显示，ANGPTL8 蛋白抑制人绒毛膜滋养层细胞的侵袭，而回补油酸和软脂酸能够恢复其侵袭功能。这提示我们在大鼠胚胎着床后短暂抑制雌激素可以促使 Angptl8 表达水平升高，并通过干预滋养层细胞脂代谢抑制滋养层细胞的侵袭能力，使胎盘滋养层细胞植入过浅，不能从子宫内膜血管中换取更多的养分，抑制了胎儿的生长发育，从而导致妊娠后期胎盘生长因子代偿性升高，改变血管壁的厚度以及血管通透性以汲取更多氧气和营养物质以供胎儿生长发育。值得注意的是，孕早期短暂的雌激素水平低下也可以影响到后期胎盘发育，是典型的前程因素对后程事件的影响。因此，通过解析孕早期雌激素异常波动对胎盘发育的影响及其机制，不仅

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

有利于深入了解胎盘发育过程中雌激素的调控作用，为妊娠并发症及临床上各种不良妊娠结局的溯源和防治策略提供实验和理论依据。

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

小结

1. 表达谱芯片结果提示着床后短暂抑制雌激素合成后，妊娠相关组织的差异基因主要与代谢功能异常、细胞增殖等功能相关。

2. 着床后短暂抑制雌激素合成后可导致 *Angptl8* 基因和 Angptl8 蛋白高表达，Angptl8 蛋白上调可以抑制滋养层细胞侵袭功能。

3. 通过回补软脂酸可挽救 Angptl8 抑制的滋养层细胞侵袭功能，Angptl8 可通过参与脂代谢途径抑制滋养层细胞的侵袭功能。

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

缩略词表

英文缩写	英文全称	中文名称
AP	Ammonium PersμLfate	过硫酸胺
Angptl8	Angiopoietin-Like Protein 8	人血管生成素样蛋白 8
BSA	Bovine Serum Albumin	牛血清白蛋白
Bp	Base Pair	碱基对
CCK-8	Cell Counting Kit-8	细胞计数试剂盒-8
cDNA	Complementary Deoxyribonucleic Acid	互补脱氧核糖核酸
CMC-Na	Sodium CarboxymethylcellμLose	羧甲基纤维素钠
D	Day(s)	天
DAB	3,3'-Diaminobenzidine	3,3'-二氨基联苯胺
DEPC	Diethyl Pyrocarbonate	焦碳酸二乙酯
DMSO	Dimethyl SμLphoxide	二甲基亚砜
dNTP	Deoxynueleotidetriphosphate	脱氧三磷酸
E_2	Estradiol	雌二醇
ECL	Enhanced Chemiluminescence	增强化学发光
ECM	ExtracellμLar Matrix	细胞胞外基质
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid	乙二胺四乙酸
EP	Eppendorf tube	埃普多夫管
FBS	Fetal Bovine Serum	胎牛血清
FSH	Follicle-StimμLating Hormone	促卵泡激素
GD	Gestation Days	妊娠天数
GO	Gene Ontology	基因本体分析
H	Hour	小时
H&E	Harris And Eosin	苏木素伊红
IHC	Immunohistochemistry	免疫组织化学染色
i.g.	Gastric Injection	灌胃注射
IgG	I mmunoglobulin G	免疫球蛋白 G
LH	Luteinizing Hormone	促黄体生成素
min	Minute(s)	分钟
MMPs	Matrix Metallo Preteinases	基质金属蛋白酶
mRNA	Messenger RNA	信使 RNA
O.D.	Optical Density	光密度

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

英文缩写	英文全称	中文名称
P_4	Progesterone	孕酮
PAGE	Polyacrylamidegel Electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶
PAS	Periodic Acid-Schiff	过碘酸希夫
PBS	Phosphate-Buffered Saline	磷酸盐缓冲液
PIC	Protein Inhibitor Cocktail	蛋白酶抑制剂
PMSF	PhenylmethanesμLfonyl Fluoride	苯甲基磺酰氟
Plgf	Placenta Growth Factor	胎盘生长因子
RNase-Free	Ribonuclease Free	无核糖核酸酶
rpm	Rotate Per Minute	转/分
RT-PCR	Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction	逆转录聚合酶链式反应
s	Seconds	秒
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate	十二烷基硫酸钠
TEMED	N,N,N,N-Tetramethyl Ethylenedamine	四甲基乙二胺
Tris-HCl	Tris-Hydroxymethyl Aminomethane Hydro-Chloride	三羟甲基氨基甲烷盐酸盐

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

参考文献

[1]. Noyola-Martinez, N., A. Halhali and D. Barrera, Steroid hormones and pregnancy. Gynecol Endocrinol, 2019. 35(5): p. 376-384.

[2]. Beltrame, J.S., et al., Steroid hormones induce in vitro human first trimester trophoblast tubulogenesis by the lysophosphatidic acid pathway. 2018. p. 126-132.

[3]. Fuentes, N. and P. Silveyra, Estrogen receptor signaling mechanisms. Adv Protein Chem Struct Biol, 2019. 116: p. 135-170.

[4]. Clark, N.C., C.A. Pru and J.K. Pru, Novel Regulators of Hemodynamics in the Pregnant Uterus. Prog Mol Biol Transl Sci, 2017. 145: p. 181-216.

[5]. Morel, Y., et al., Evolution of steroids during pregnancy: Maternal, placental and fetal synthesis. Ann Endocrinol (Paris), 2016. 77(2): p. 82-9.

[6]. Di Renzo, G.C., et al., Progesterone in normal and pathological pregnancy. Horm Mol Biol Clin Investig, 2016. 27(1): p. 35-48.

[7]. Jobe, S.O., C.T. Tyler and R.R. Magness, Aberrant synthesis, metabolism, and plasma accumulation of circulating estrogens and estrogen metabolites in preeclampsia implications for vascular dysfunction. Hypertension, 2013. 61(2): p. 480-7.

[8]. Berkane, N., et al., From Pregnancy to Preeclampsia: A Key Role for Estrogens. Endocr Rev, 2017. 38(2): p. 123-144.

[9]. Aberdeen, G.W., et al., Suppression of trophoblast uterine spiral artery remodeling by estrogen during baboon pregnancy: impact on uterine and fetal blood flow dynamics. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2012. 302(10): p. H1936-44.

[10]. Cantonwine, D.E., et al., Estrogen metabolism pathways in preeclampsia and normal pregnancy. Steroids, 2019. 144: p. 8-14.

[11]. Kajihara, T., J.J. Brosens and O. Ishihara, The role of FOXO1 in the decidual transformation of the endometrium and early pregnancy. Med Mol Morphol, 2013. 46(2): p. 61-8.

[12]. Grazul-Bilska, A.T., et al., Placental development during early pregnancy in sheep: vascular growth and expression of angiogenic factors in maternal placenta. Reproduction, 2010. 140(1): p. 165-74.

[13]. Genbacev, O., et al., In vitro differentiation and ultrastructure of human extravillous trophoblast (EVT) cells. Placenta, 1993. 14(4): p. 463-75.

[14]. Pollheimer, J., V. Fock and M. Knofler, Review: the ADAM metalloproteinases - novel regulators of trophoblast invasion? Placenta, 2014. 35 Suppl: p. S57-63.

[15]. von Rango, U., et al., Apoptosis of extravillous trophoblast cells limits the trophoblast invasion in uterine but not in tubal pregnancy during first trimester. Placenta, 2003. 24(10): p. 929-40.

[16]. Pijnenborg, R., L. Vercruysse and M. Hanssens, The uterine spiral arteries in human pregnancy: facts and controversies. Placenta, 2006. 27(9-10): p. 939-58.

[17]. Burton, G.J., et al., Rheological and physiological consequences of conversion of the maternal spiral arteries for uteroplacental blood flow during human pregnancy. Placenta, 2009. 30(6): p. 473-82.

[18]. Li, P., et al., microRNA-29b contributes to pre-eclampsia through its effects on apoptosis, invasion and angiogenesis of trophoblast cells. Clin Sci (Lond), 2013. 124(1): p. 27-40.

[19]. Whitley, G.S. and J.E. Cartwright, Trophoblast-mediated spiral artery remodelling: a role for apoptosis. J Anat, 2009. 215(1): p. 21-6.

[20]. Zhu, R., D. Xiao and L. Zhang, Potassium channels and uterine vascular adaptation to pregnancy and

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

chronic hypoxia. Curr Vasc Pharmacol, 2013. 11(5): p. 737-47.
[21]. Chang, K. and Z. Lubo, Review article: steroid hormones and uterine vascular adaptation to pregnancy. Reprod Sci, 2008. 15(4): p. 336-48.
[22]. Chen, J.Z., et al., Vessel remodelling, pregnancy hormones and extravillous trophoblast function. Mol Cell Endocrinol, 2012. 349(2): p. 138-44.
[23]. Good, P., Evidence the U.S. autism epidemic initiated by acetaminophen (Tylenol) is aggravated by oral antibiotic amoxicillin/clavulanate (Augmentin) and now exponentially by herbicide glyphosate (Roundup). Clin Nutr ESPEN, 2018. 23: p. 171-183.
[24]. King, A.E. and H.O. Critchley, Oestrogen and progesterone regulation of inflammatory processes in the human endometrium. J Steroid Biochem Mol Biol, 2010. 120(2-3): p. 116-26.
[25]. 张德荣, 来曲唑治疗晚期乳腺癌的临床分析. 临床合理用药杂志, 2012. 5(26): 第40页.
[26]. 童卫杭等, 来曲唑片在中国健康人体的生物等效性. 中国临床药理学杂志, 2012. 28(02): 第131-134页.
[27]. 李凤荣, 来曲唑治疗多囊卵巢综合征患者的研究进展. 医疗装备, 2020. 33(10): 第193-194页.
[28]. 程玲慧,曹云霞, 催乳素、孕酮、雌二醇及其受体对早期胚胎发育的影响. 实用妇产科杂志, 2011. 27(04): 第307-309页.
[29]. 王文珍等, 孕酮、雌二醇、血β-hCG水平与早期妊娠相关性的探讨. 中外医学研究, 2015. 13(32): 第154-156页.
[30]. 武斌, 雌激素对子宫内膜自发蜕膜化以及妊娠过程影响的初步研究, 2014, 北京协和医学院. 第 122页.
[31]. 苑凤, 妊娠大鼠胚胎着床后短暂抑制体内雌激素合成对分娩的影响, 2016, 北京协和医学院. 第 56页.
[32]. 刘婷婷等, 大鼠胚胎着床后短暂抑制体内雌激素合成对孕晚期胎盘及胎盘生长因子的影响. 生殖医学杂志, 2020. 29(06): 第792-797页.
[33]. Shimizu, Y., Estrogen: estrone (E1), estradiol (E2), estriol (E3) and estetrol (E4). Nihon Rinsho, 2010. 68 Suppl 7: p. 448-61.
[34]. Kovacs, K., et al., Estrogen metabolism during pregnancy. Orv Hetil, 2019. 160(26): p. 1007-1014.
[35]. Green, S., et al., The N-terminal DNA-binding 'zinc finger' of the oestrogen and glucocorticoid receptors determines target gene specificity. EMBO J, 1988. 7(10): p. 3037-44.
[36]. 马晓萍等, 戊酸雌二醇对去卵巢大鼠子宫、阴道、乳腺雌激素受体表达的影响. 中国药科大学学报, 2014. 45(03): 第341-345页.
[37]. 孙赟等, 黄体支持与孕激素补充共识. 生殖与避孕, 2015. 35(01): 第1-8页.
[38]. Kondapalli, L.A., et al., A decrease in serum estradiol levels after human chorionic gonadotrophin administration predicts significantly lower clinical pregnancy and live birth rates in in vitro fertilization cycles. Hum Reprod, 2012. 27(9): p. 2690-7.
[39]. Dellapasqua, S. and M. Colleoni, Letrozole. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2010. 6(2): p. 251-9.
[40]. De Falco, S., The discovery of placenta growth factor and its biological activity. Exp Mol Med, 2012. 44(1): p. 1-9.
[41]. Hayes, R.D., et al., Placental growth factor: A review of literature and future applications. Pregnancy Hypertens, 2018. 14: p. 260-264.
[42]. Hendrix, M., et al., Role of sFlt-1 and PlGF in the screening of small-for-gestational age neonates during pregnancy: A systematic review. Ann Clin Biochem, 2020. 57(1): p. 44-58.
[43]. Chau, K., A. Hennessy and A. Makris, Placental growth factor and pre-eclampsia. J Hum Hypertens,

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2017. 31(12): p. 782-786.
[44]. 暴国, 可降解金属Mg、Zn在模拟子宫微环境中的腐蚀行为及生物相容性研究, 2019, 北京协和医学院. 第 124页.
[45]. 周芳等, PGE_2及其受体在小鼠月经模型中子宫内膜崩解期的含量与表达研究. 生殖医学杂志, 2019. 28(05): 第536-541页.
[46]. 郭士格, HIF1A在月经发生中调控CXCR4对子宫内膜崩解作用的研究, 2018, 北京协和医学院. 第 80页.
[47]. 周芳, 前列腺素及其受体在月经发生中对子宫内膜崩解脱落作用机制的研究, 2018, 北京协和医学院. 第 132页.
[48]. 郭士格等, 月经发生中低氧诱导因子-1A对VEGF的调节. 生殖医学杂志, 2018. 27(05): 第416-421页.
[49]. Gude, N.M., et al., Growth and function of the normal human placenta. Thromb Res, 2004. 114(5-6): p. 397-407.
[50]. Aasa, K.L., et al., Placental growth factor influences maternal cardiovascular adaptation to pregnancy in mice. Biol Reprod, 2015. 92(2): p. 44.
[51]. Tsiakkas, A., et al., Serum placental growth factor in the three trimesters of pregnancy: effects of maternal characteristics and medical history. Ultrasound Obstet Gynecol, 2015. 45(5): p. 591-8.
[52]. Kumazaki, K., et al., Expression of vascular endothelial growth factor, placental growth factor, and their receptors Flt-1 and KDR in human placenta under pathologic conditions. Hum Pathol, 2002. 33(11): p. 1069-77.
[53]. 刘斌, 胎盘生长因子(PlGF)的生物学功能. 国外医学(生理、病理科学与临床分册), 2003(04): 第407-409页.
[54]. Tateishi, A., et al., Histopathological findings of pregnancy-induced hypertension: histopathology of early-onset type reflects two-stage disorder theory. Virchows Arch, 2018. 472(4): p. 635-642.
[55]. Song, X., et al., Dysregulation of LncRNAs in Placenta and Pathogenesis of Preeclampsia. Curr Drug Targets, 2017. 18(10): p. 1165-1170.
[56]. Jansson, T. and T.L. Powell, Role of placental nutrient sensing in developmental programming. Clin Obstet Gynecol, 2013. 56(3): p. 591-601.
[57]. Baines, K.J. and S.J. Renaud, Transcription Factors That Regulate Trophoblast Development and Function. Prog Mol Biol Transl Sci, 2017. 145: p. 39-88.
[58]. Han, A.J. and M. Xiong, [Gene chip technology and its advances in medical science]. Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao, 2001. 23(5): p. 528-31.
[59]. Dijk, W. and S. Kersten, Regulation of lipid metabolism by angiopoietin-like proteins. Curr Opin Lipidol, 2016. 27(3): p. 249-56.
[60]. Fu, Z., et al., Lipasin, thermoregulated in brown fat, is a novel but atypical member of the angiopoietin-like protein family. Biochem Biophys Res Commun, 2013. 430(3): p. 1126-31.
[61]. Luo, M. and D. Peng, Angptl8: An Important Regulator in Metabolic Disorders. Front Endocrinol (Lausanne), 2018. 9: p. 169.
[62]. Zhang, R. and A.B. Abou-Samra, Emerging roles of Lipasin as a critical lipid regulator. Biochem Biophys Res Commun, 2013. 432(3): p. 401-5.
[63]. Gusarova, V., et al., Angptl8/betatrophin does not control pancreatic beta cell expansion. Cell, 2014. 159(3): p. 691-6.
[64]. Fu, J., et al., Vitamin D modifies the associations between circulating betatrophin and cardiometabolic

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

risk factors among youths at risk for metabolic syndrome. Cardiovasc Diabetol, 2016. 15(1): p. 142.
[65]. Siddiqa, A., et al., Visualizing the regulatory role of Angiopoietin-like protein 8 (Angptl8) in glucose and lipid metabolic pathways. Genomics, 2017. 109(5-6): p. 408-418.
[66]. Brown, M.C., et al., Cardiovascular disease risk in women with pre-eclampsia: systematic review and meta-analysis. Eur J Epidemiol, 2013. 28(1): p. 1-19.
[67]. Gallos, I.D., et al., Pre-eclampsia is associated with, and preceded by, hypertriglyceridaemia: a meta-analysis. BJOG, 2013. 120(11): p. 1321-32.
[68]. Montoro, M.N., et al., Insulin resistance and preeclampsia in gestational diabetes mellitus. Diabetes Care, 2005. 28(8): p. 1995-2000.
[69]. Ashburner, M., et al., Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. Nat Genet, 2000. 25(1): p. 25-9.
[70]. The Gene Ontology Resource: 20 years and still GOing strong. Nucleic Acids Res, 2019. 47(D1): p. D330-D338.
[71]. Variations of Box Plots Author(s): Robert McGill, John W. Tukey and Wayne A. Larsen Source: The American Statistician, Vol. 32, No. 1 (Feb., 1978), pp. 12-16 Published by: American Statistical Association Stable URL: http://www.jstor.org/stable/2683468 . Accessed: 13/08/2013 17:41.
[72]. Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences by Jacob Cohen Review by: Sylvia Wassertheil Biometrics, Vol. 26, No. 3 (Sep., 1970), p. 588.
[73]. Jolliffe, I.T. and J. Cadima, Principal component analysis: a review and recent developments. Philos Trans A Math Phys Eng Sci, 2016. 374(2065): p. 20150202.
[74]. Fisher, B.J., Commentary: on RA Fisher's Bateson lecture on statistical methods in genetics. Int J Epidemiol, 2010. 39(2): p. 335-9.
[75]. Losordo, D.W. and J.M. Isner, Estrogen and angiogenesis: A review. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2001. 21(1): p. 6-12.
[76]. Rauschemberger, M.B., M.J. Sandoval and V.L. Massheimer, Cellular and molecular actions displayed by estrone on vascular endothelium. Mol Cell Endocrinol, 2011. 339(1-2): p. 136-43.
[77]. Storment, J.M., M. Meyer and G. Osol, Estrogen augments the vasodilatory effects of vascular endothelial growth factor in the uterine circulation of the rat. Am J Obstet Gynecol, 2000. 183(2): p. 449-53.
[78]. Kanasaki, K., et al., Deficiency in catechol-O-methyltransferase and 2-methoxyoestradiol is associated with pre-eclampsia. Nature, 2008. 453(7198): p. 1117-21.
[79]. Jobe, S.O., et al., Estradiol-17beta and its cytochrome P450- and catechol-O-methyltransferase-derived metabolites stimulate proliferation in uterine artery endothelial cells: role of estrogen receptor-alpha versus estrogen receptor-beta. Hypertension, 2010. 55(4): p. 1005-11.
[80]. Perez-Sepulveda, A., et al., Metabolic pathways involved in 2-methoxyestradiol synthesis and their role in preeclampsia. Reprod Sci, 2013. 20(9): p. 1020-9.
[81]. Jobe, S.O., et al., Estradiol-17beta and its cytochrome P450- and catechol-O-methyltransferase-derived metabolites selectively stimulate production of prostacyclin in uterine artery endothelial cells: role of estrogen receptor-alpha versus estrogen receptor-beta. Hypertension, 2013. 61(2): p. 509-18.
[82]. Lee, S.B., et al., Preeclampsia: 2-methoxyestradiol induces cytotrophoblast invasion and vascular development specifically under hypoxic conditions. Am J Pathol, 2010. 176(2): p. 710-20.
[83]. Ren, G., J.Y. Kim and C.M. Smas, Identification of RIFL, a novel adipocyte-enriched insulin target gene with a role in lipid metabolism. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2012. 303(3): p. E334-51.
[84]. Zhang, R., Lipasin, a novel nutritionally-regulated liver-enriched factor that regulates serum

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

triglyceride levels. Biochem Biophys Res Commun, 2012. 424(4): p. 786-92.
[85]. Quagliarini, F., et al., Atypical angiopoietin-like protein that regulates Angptl3. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. 109(48): p. 19751-6.
[86]. Yi, P., J.S. Park and D.A. Melton, Betatrophin: a hormone that controls pancreatic beta cell proliferation. Cell, 2013. 153(4): p. 747-58.
[87]. Gray, K.A., et al., Genenames.org: the HGNC resources in 2015. Nucleic Acids Res, 2015. 43(Database issue): p. D1079-85.
[88]. Dijk, W. and S. Kersten, Regulation of lipid metabolism by angiopoietin-like proteins. Curr Opin Lipidol, 2016. 27(3): p. 249-56.
[89]. Fu, Z., et al., Lipasin, thermoregulated in brown fat, is a novel but atypical member of the angiopoietin-like protein family. Biochem Biophys Res Commun, 2013. 430(3): p. 1126-31.
[90]. Zhang, R. and A.B. Abou-Samra, Emerging roles of Lipasin as a critical lipid regulator. Biochem Biophys Res Commun, 2013. 432(3): p. 401-5.
[91]. Li, J., et al., Triglyceride metabolism and angiopoietin-like proteins in lipoprotein lipase regulation. Clin Chim Acta, 2020. 503: p. 19-34.

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

综述

胎盘滋养层细胞与妊娠相关疾病

与胎盘异常相关的常见妊娠疾病包括妊娠高血压疾病、妊娠糖尿病、宫内生长受限或子痫前期[1]。研究者们认为胎盘值得深入研究。现对与胎盘相关的妊娠疾病及与这些妊娠疾病相关的表达基因作如下综述：

妊娠早期称为胚胎着床，是指囊胚附着于子宫壁上[2]。在人体内，着床黄体生成素窗口高峰后 6-10 天，子宫内膜细胞发生变化，使胚胎离子宫内膜更近[3]。这期间，子宫内膜血管化，基质细胞形态和功能发生转变，转化为蜕膜细胞[4]。蜕膜可分为两部分，基底蜕膜(DB)位于胚胎的基底部与滋养细胞相连和不附着在胚胎上的顶蜕膜[5]。植入后到妊娠早期，蜕膜组织被胎盘替代。附着在子宫内膜的囊胚启动着床过程。囊胚和子宫内膜之间松散且强壮的连接被称为定位和粘附[6]。首先，透明带在“孵化”过程中被溶解因子去除。然后，滋养层细胞开始侵入到子宫内膜并分化成新的细胞类型：合胞体滋养细胞和细胞滋养细胞[7]。合胞滋养细胞继续穿透并侵入子宫间质。胚胎着床后约 2 天，称为“陷窝期”，合胞滋养细胞来源的分泌物在蜕膜产生陷窝，并与母体血管结合[2]。随后，绒毛期伴随绒毛的建立，开始形成胎盘，称为胎盘形成期，与子宫血流增加和血管生成同时进行[8]。这些改变是调节胎盘血管结构和适应孕期母体血管系统所必需的[9, 10]。血管发育受损可能与子宫和脐带血流减少有关，影响妊娠维持，并可能导致妊娠并发症，如子痫前期和流产[8]。

胎盘是怀孕期间形成的重要器官，其正常发育对胚胎存活至关重要[11]。氧调节是胎盘发生的一个关键决定因素，在妊娠期间，如果氧水平没有得到适当的调节，就会发生异常的滋养细胞分化和发育，并导致妊娠相关的疾病[12]。低氧诱导因子1 (Hif-1α)是细胞氧化应激机制的必要组成部分，被认为是滋养层细胞分化的主要调节因子[13]。人类胎盘中Hif-1α的水平升高与妊娠相关疾病的发展有关，如子痫前期和胎儿生长受限[14]。我们注意到胎盘分化的显著生理变化，包括分支形态发生减少，母体和胎儿血腔改变，以及母体螺旋动脉重建失败，这些胎盘的改变导致随后的产妇高血压和产妇肾小球内皮增生症伴蛋白尿，这是子痫前期的典型特征。研究表明，滋养细胞特异性组成型活性的Hif-1α长时间表达会导致胎儿出生体重的显著下降[15]。

子痫前期（PE）是一种妊娠特异的全身性紊乱的疾病，其特征是各种器官功能障碍的表现。滋养层细胞侵入子宫壁的不足是 PE 的发病原因之一，PE 的诊断通过呈现新发性高血压、≥140 mmHg 收缩压（BP）或≥90 mmHg 舒张 BP，以及蛋白尿、水肿或其他伴随症状，如肾功能不全、血小板减少、肝功能障碍、肺水肿或脑/视觉模糊[16]。这些迹象可能突然发生，没有预兆。在妊娠 34 周之前呈现的 PE 被认为是早发，与妊娠 34 周时或之后发生的为晚发 PE，其围产期发病率/死亡率的风险更大。

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

目前没有治疗 PE 的方法，通过钙和阿司匹林在有风险的孕妇中预防，可能会降低其发病率[17]，唯一有效的治疗方法是分娩婴儿和胎盘[18]，往往是早产。早产往往导致新生儿或婴儿的发病率和死亡率升高，因为婴儿在发育能力方面尚不能生活在子宫外。PE 也是导致胎儿生长受限 （FGR） 的主要原因之一[19]，12-25%的宫内生长受限和小妊娠年龄（SGA）婴儿也要归因于 PE。阐明可导致 PE 的病理生理机制将有助于我们准确预防、管理和治疗 PE 的能力，从而避免母体和胎儿的损失[20]。有研究表明，SGA 与妊娠早期胎盘厚度较小有关，发生 PE 的孕妇胎盘厚度更大，而合并 SGA 和 PE 的孕妇和对照组妊娠早期胎盘厚度相似[21]。

胎儿生长受限（FGR），也称宫内生长受限（IUGR），是指胎儿出生体重低于同孕龄胎儿平均体重的两个标准差或第10百分位数[22]，生产时宫内缺氧围生儿中有50%为FGR，FGR是胎儿在母体孕期子宫内生长迟缓的一种围生儿死亡率较高的妊娠期并发症。引起FGR的原因包括母体、胎儿和胎盘因素[23]，遗传因素也起着重要作用，在FGR的病因学中已经发现了几种母体、胎儿和胎盘基因[24]。患有 IUGR 的儿童，特别是如果他们在早年发育时出现追赶性，则长期问题的风险较高，包括身材矮小、代谢综合征、II型糖尿病、胰岛素抵抗和心血管疾病[25]。有研究表明，IGF–I与FGR存在一定的相关性[26]。有学者认为，孕妇血清中IGF-1的水平可作为评价胎儿生长发育的指标[27]，而孕妇血清MMP-9含量的检测可以预测胎盘功能。脐血瘦素和IGF-I水平与胎儿生长发育状态密切相关，脐血瘦素或IGF-I水平降低可能是FGR发生的原因之一[28]，瘦素调控胎儿生长发育没有IGF-I的直接参与，脐动脉血与脐静脉血瘦素及IGF-I水平均可作为胎儿生长发育的临床指标。母血、脐血EGF减少可能也是引起FGR的原因之一[29]。有研究表明，FGR组的胎盘组织中Bcl-2的表达下降, 而Bax的表达增高[30]。EGF可以通过上调Bcl-2的表达, 抑制胎盘细胞凋亡, 促进胎儿生长发育[31]。另外，妊娠高血压疾病母亲胎盘中VEGF蛋白含量降低与妊娠高血压的发生及其胎儿宫内生长受限有关[32]。FGR患者的胎盘Ang-2和PLGF表达也有所下降[33]。

PLGF 是由 69kD 的 α 链和 34kD 的 β 链通过二硫键连接形成的，是一种分泌型的二聚体酸性糖蛋白[34]，其碱基序列与 VEGF 高度同源，属于 VEGF 家族中的一员，位于染色体 14q24q31。PLGF 通过 mRNA 选择性拼接，有 4 种亚型，PLGF2 和 PLGF4 有肝素结合结构域，而 PLGF1 和 PLGF3 没有[38]。PLGF 和 VEGF 都可与 fms 样酪氨酸激酶 1（Flt-1）受体结合[35]，激活 Flt-1 不同的酪氨酸残基部位[36]，发挥协同生物学效应，诱导血管生长、增殖、迁移，加强血管生成。PLGF 除了促进血管新生功能，还与血管生长相关，并促进血管内皮细胞的生长、增殖、迁移[37]。在一些子痫前期和流产等情况中，还会介导炎症反应，并伴随着血管生成减少。大部分的妊娠损失发生在胎盘形成的妊娠早期[38,39]，这些损失可能是由于女性生殖系统不同部位的血管生成失衡，如胎盘[8]所致。PLGF 在子宫内膜、蜕膜、胎盘、子宫 NK

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

细胞（uNK cells）和滋养层中表达[40-45]，其血管生成和炎症方式被认为是受孕成功的关键因素[46]。PLGF 可以使巨噬细胞释放血管生成因子[47]，并且加强树突状细胞的活力和它们的抗体识别能力[48]。PLGF 表达在子宫内膜、胎盘和滋养层细胞中，并与子宫 NK 细胞的成熟有关。dNK 细胞通过产生 IL-8 和 HGF 促进滋养细胞侵袭，并且它们通过产生 VEGF-C 和 HGF 诱导滋养层细胞向内皮细胞表型分化[49]。PLGF 的上调促进 VEGF 和 VEGFR-2 结合，加强血管生成，然而，当 VEGF/VEGFR-2 信号通路受损时，PLGF 可以转移到重症炎症部位引起组织损伤，而这会导致早孕丢失[50]。PLGF 是参与早孕血管生成的重要血管生成因子之一，其下降与妊娠并发症有关[51]。妊娠期相对的缺氧环境使胎盘滋养细胞表达的 sFlt-1 增高[52]，sFlt-1 竞争性与 PLGF、VEGF 相结合，使胎盘血管生成不良，而形成 FGR。研究表明，FGR 组孕妇血清中的 sFlt-1 表达明显高于对照组，PLGF 表达低于对照组，表明 sFlt-1、PLGF 有可能可作为 FGR 的筛查指标和治疗的监测指标[52]。

血管生成素样蛋白8 (ANGPTL8)是一种新发现的分泌蛋白，由198个氨基酸组成，在人的肝脏中富集[53]。血管生成素样蛋白8（ANGPTL8）在细胞增殖、糖尿病、心血管疾病发展中有重要作用，可能对细胞增殖有潜在影响。有研究认为[54]，ANGPTL8的下调促进了HTR8-SVneo细胞的增殖，减少了p21表达，增加了周期蛋白依赖性激酶2（CDK2）的表达水平，增加了细胞中细胞核抗原的增殖。ANGPTL8的沉默导致细胞迁移和入侵的显著加速，并显著提高了基质金属蛋白酶（MMP）-2和MMP-9表达水平；此外，与对照组和阴性对照组相比，转染了siRNA-ANGPTL8-1的基质金属蛋白酶组织抑制因子（TIMP）-1和TIMP-2组中的蛋白表达水平降低，这些结果表明，ANGPTL8的下调促进了滋养层细胞的增殖、迁移和侵袭[54]。因此，ANGPTL8抑制了滋养层细胞的活力、增殖、迁移和入侵，可能是PE临床治疗的潜在治疗靶点。也有研究表明，增生性糖尿病视网膜病变（PDR）患者的玻璃体和血清ANGPTL8水平均升高；PDR患者中ANGPTL8水平的升高与血管生成和高脂血症因子有关，这些结果提示ANGPTL8是PDR治疗的一个潜在的新的诊断标志物和治疗靶点[55]。ANGPTL8也与2型糖尿病的两个重要功能过程有关，即胰岛素抵抗和脂质代谢。脂蛋白脂肪酶(LPL)是一种限速酶，将循环甘油三酯(TG)水解为游离脂肪酸，被外周组织吸收。ANGPTL8通过与ANGPTL3直接作用调节脂蛋白脂肪酶的活性，而脂蛋白脂肪酶是脂蛋白脂解途径中的关键酶，初步研究表明ANGPTL8在肝脏、白色脂肪和棕色脂肪组织中表达[56]。餐后白色脂肪组织(WAT)的LPL活性升高，而心脏和骨骼肌的LPL活性下降，从而将循环中的TG引导到WAT储存;禁食期间的情况正好相反[57]。血管生成素样蛋白(ANGPTLs)3，4，8作为脂蛋白脂肪酶(LPL)的有效抑制剂，已成为血脂代谢的关键调节因子[58]。

综上，胎盘在母体妊娠期高血压、子痫前期、胰岛素抵抗和妊娠糖尿病的发

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

生和发展过程中起到重要作用，胎盘维持正常的结构和功能特别是滋养层细胞，对于妊娠母亲和子代的健康具有深远影响。深入了解人类胎盘滋养层细胞的功能及其调控机制对于妊娠期并发症的预测、诊疗和预后的关键生物靶标分子提供帮助。

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

参考文献

[1]. Brue, T., V. Amodru and F. Castinetti, MANAGEMENT OF ENDOCRINE DISEASE: Management of Cushing's syndrome during pregnancy: solved and unsolved questions. Eur J Endocrinol, 2018. 178(6): p. R259-R266.

[2]. Enders, A.C., Transition from lacunar to villous stage of implantation in the macaque, including establishment of the trophoblastic shell. Acta Anat (Basel), 1995. 152(3): p. 151-69.

[3]. Xiao, Y., et al., Leukemia inhibitory factor is dysregulated in the endometrium and uterine flushing fluid of patients with adenomyosis during implantation window. Fertil Steril, 2010. 94(1): p. 85-9.

[4]. Plaisier, M., Decidualisation and angiogenesis. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2011. 25(3): p. 259-71.

[5]. Sindram-Trujillo, A.P., et al., Differential distribution of NK cells in decidua basalis compared with decidua parietalis after uncomplicated human term pregnancy. Hum Immunol, 2003. 64(10): p. 921-9.

[6]. Lambropoulou, M., et al., Imbalance of mononuclear cell infiltrates in the placental tissue from foetuses after spontaneous abortion versus therapeutic termination from 8th to 12th weeks of gestational age. Clin Exp Med, 2006. 6(4): p. 171-6.

[7]. Knofler, M., et al., Human placenta and trophoblast development: key molecular mechanisms and model systems. Cell Mol Life Sci, 2019. 76(18): p. 3479-3496.

[8]. Grazul-Bilska, A.T., et al., Placental development during early pregnancy in sheep: vascular growth and expression of angiogenic factors in maternal placenta. Reproduction, 2010. 140(1): p. 165-74.

[9]. Torry, R.J. and B.J. Rongish, Angiogenesis in the uterus: potential regulation and relation to tumor angiogenesis. Am J Reprod Immunol, 1992. 27(3-4): p. 171-9.

[10]. Vrachnis, N., et al., Placental growth factor (PlGF): a key to optimizing fetal growth. J Matern Fetal Neonatal Med, 2013. 26(10): p. 995-1002.

[11]. Herrick, E.J. and B. Bordoni, Embryology, Placenta. 2020.

[12]. Zhou, F., et al., Regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha, regulated in development and DNA damage response-1 and mammalian target of rapamycin in human placental BeWo cells under hypoxia. Placenta, 2016. 45: p. 24-31.

[13]. Hirota, K., An intimate crosstalk between iron homeostasis and oxygen metabolism regulated by the hypoxia-inducible factors (HIFs). Free Radic Biol Med, 2019. 133: p. 118-129.

[14]. Patel, N., et al., Placenta growth factor augments endothelin-1 and endothelin-B receptor expression via hypoxia-inducible factor-1 alpha. Blood, 2008. 112(3): p. 856-65.

[15]. Albers, R.E., et al., Trophoblast-Specific Expression of Hif-1alpha Results in Preeclampsia-Like Symptoms and Fetal Growth Restriction. Sci Rep, 2019. 9(1): p. 2742.

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

[16]. Kintiraki, E., et al., Pregnancy-Induced hypertension. Hormones (Athens), 2015. 14(2): p. 211-23.

[17]. Ramos, J., N. Sass and S. Costa, Preeclampsia. Rev Bras Ginecol Obstet, 2017. 39(9): p. 496-512.

[18]. Mol, B., et al., Pre-eclampsia. Lancet, 2016. 387(10022): p. 999-1011.

[19]. Yu, J., et al., Effects of SAC on oxidative stress and NO availability in placenta: potential benefits to preeclampsia. Placenta, 2012. 33(6): p. 487-94.

[20]. Sones, J.L. and R.L. Davisson, Preeclampsia, of mice and women. Physiol Genomics, 2016. 48(8): p. 565-72.

[21]. Vachon-Marceau, C., et al., First-trimester placental thickness and the risk of preeclampsia or SGA. Placenta, 2017. 57: p. 123-128.

[22]. Casanello, P., et al., [Placental epigenetic programming in intrauterine growth restriction (IUGR)]. Rev Chil Pediatr, 2016. 87(3): p. 154-61.

[23]. Saenger, P., et al., Small for gestational age: short stature and beyond. Endocr Rev, 2007. 28(2): p. 219-51.

[24]. Sharma, D., P. Sharma and S. Shastri, Genetic, metabolic and endocrine aspect of intrauterine growth restriction: an update. J Matern Fetal Neonatal Med, 2017. 30(19): p. 2263-2275.

[25]. Hanson, M.A. and P.D. Gluckman, Early developmental conditioning of later health and disease: physiology or pathophysiology? Physiol Rev, 2014. 94(4): p. 1027-76.

[26]. 张永芬, 胰岛素样生长因子与胎儿生长受限的相关性分析. 深圳中西医结合杂志, 2019. 29(07): 第173-174页.

[27]. 王树辉, 胰岛素样生长因子、基质金属蛋白酶与胎儿生长受限的相关性研究. 临床合理用药杂志, 2013. 6(23): 第104-105页.

[28]. 蒋小青, 王净与于红, 胎儿生长受限与瘦素、胰岛素样生长因子-I水平的相关性. 现代医学, 2005(01): 第4-6页.

[29]. Rab, A., et al., Placental gene expression patterns of epidermal growth factor in intrauterine growth restriction. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2013. 170(1): p. 96-9.

[30]. Shen, S.F. and C.H. Hua, Effect of L-arginine on the expression of Bcl-2 and Bax in the placenta of fetal growth restriction. J Matern Fetal Neonatal Med, 2011. 24(6): p. 822-6.

[31]. 王豫黔等, 表皮生长因子与胎儿生长受限胎盘组织Bcl-2,Bax基因表达相关性研究. 中华妇幼临床医学杂志, 2007(01): 第23-25页.

[32]. 郑毅等, 血管内皮生长因子与妊娠高血压母亲胎儿宫内生长受限的相关性研究. 中国新生儿科杂志, 2015. 30(04): 第268-272页.

[33]. 沈寅琛, 促血管生成素与血管生成及妊娠的相关性研究进展. 海南医学, 2010. 21(15): 第111-113页.

[34]. Yang, W., et al., Evidence of a novel isoform of placenta growth factor (PlGF-4) expressed in human trophoblast and endothelial cells. J Reprod Immunol, 2003. 60(1): p. 53-60.

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

[35]. Dewerchin, M. and P. Carmeliet, PlGF: a multitasking cytokine with disease-restricted activity. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. 2(8).

[36]. Autiero, M., et al., Role of PlGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1. Nat Med, 2003. 9(7): p. 936-43.

[37]. Schmidt, T., et al., Loss or inhibition of stromal-derived PlGF prolongs survival of mice with imatinib-resistant Bcr-Abl1(+) leukemia. Cancer Cell, 2011. 19(6): p. 740-53.

[38]. Reynolds, L.P., et al., Uteroplacental vascular development and placental function: an update. Int J Dev Biol, 2010. 54(2-3): p. 355-66.

[39]. Reynolds, L.P. and D.A. Redmer, Angiogenesis in the placenta. Biol Reprod, 2001. 64(4): p. 1033-40.

[40]. Chen, X., et al., Differential expression of vascular endothelial growth factor angiogenic factors in different endometrial compartments in women who have an elevated progesterone level before oocyte retrieval, during in vitro fertilization-embryo transfer treatment. Fertil Steril, 2015. 104(4): p. 1030-1036.

[41]. Miyagami, S., et al., Physiological changes in the pattern of placental gene expression early in the first trimester. Reprod Sci, 2013. 20(6): p. 710-4.

[42]. Plaisier, M., et al., Different degrees of vascularization and their relationship to the expression of vascular endothelial growth factor, placental growth factor, angiopoietins, and their receptors in first-trimester decidual tissues. Fertil Steril, 2007. 88(1): p. 176-87.

[43]. Santi, A., et al., Increased endometrial placenta growth factor (Plgf) gene expression in women with successful implantation. Fertil Steril, 2011. 96(3): p. 663-8.

[44]. Tayade, C., et al., Lymphocyte contributions to altered endometrial angiogenesis during early and midgestation fetal loss. J Leukoc Biol, 2007. 82(4): p. 877-86.

[45]. Wallace, A.E., et al., Increased angiogenic factor secretion by decidual natural killer cells from pregnancies with high uterine artery resistance alters trophoblast function. Hum Reprod, 2014. 29(4): p. 652-60.

[46]. Kridli, R.T., et al., Placentation, maternal-fetal interface, and conceptus loss in swine. Theriogenology, 2016. 85(1): p. 135-44.

[47]. Selvaraj, S.K., et al., Mechanism of monocyte activation and expression of proinflammatory cytochemokines by placenta growth factor. Blood, 2003. 102(4): p. 1515-24.

[48]. Rolny, C., et al., HRG inhibits tumor growth and metastasis by inducing macrophage polarization and vessel normalization through downregulation of PlGF. Cancer Cell, 2011. 19(1): p. 31-44.

[49]. Ma, L., et al., dNK cells facilitate the interaction between trophoblastic and endothelial cells via VEGF-C and HGF. Immunol Cell Biol, 2017. 95(8): p. 695-704.

[50]. Nejabati, H.R., et al., Placental growth factor (PlGF) as an angiogenic/inflammatory switcher: lesson from early pregnancy losses. Gynecol Endocrinol, 2017. 33(9): p. 668-674.

[51]. Weckman, A.M., et al., The Impact of Infection in Pregnancy on Placental Vascular Development and

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Adverse Birth Outcomes. Front Microbiol, 2019. 10: p. 1924.

[52]. 徐月芳等, 胎儿生长受限患者sFlt-1、Plgf的表达及其意义. 海南医学院学报, 2012. 18(06): 第838-839页.

[53]. Wang, S., et al., Angiopoietin-like protein 8: An attractive biomarker for the evaluation of subjects with insulin resistance and related disorders. Diabetes Res Clin Pract, 2017. 133: p. 168-177.

[54]. Wang, W., X. Li and D. Ji, Molecular mechanism of the effect of angiopoietin-like protein 8 on the proliferation, invasion and migration of placental trophoblasts in preeclampsia. Exp Ther Med, 2020. 19(6): p. 3461-3468.

[55]. Lu, Q., et al., Expression of angiopoietin-like protein 8 correlates with VEGF in patients with proliferative diabetic retinopathy. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2017. 255(8): p. 1515-1523.

[56]. Abu-Farha, M., J. Abubaker and J. Tuomilehto, Angptl8 (betatrophin) role in diabetes and metabolic diseases. Diabetes Metab Res Rev, 2017. 33(8).

[57]. Zhang, R., The Angptl3-4-8 model, a molecular mechanism for triglyceride trafficking. Open Biol, 2016. 6(4): p. 150272.

[58]. Kovrov, O., et al., On the mechanism of angiopoietin-like protein 8 for control of lipoprotein lipase activity. J Lipid Res, 2019. 60(4): p. 783-793.

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

致谢

硕士研究生期间，我成长了很多，学会了很多知识和道理。首先，我要感谢我的导师贺斌老师，感谢贺老师在学习和生活中给予我的关心和支持。贺老师总是特别温柔耐心地跟我们讲解一些实验学习中的事项，是我们科研道路上的领路人。生活上，贺老师像大家长一样关心关注着我们科室的每一个人。贺老师在学习和实验技能上面也给予了我很多帮助和悉心教导。

感谢徐祥波老师，徐老师对我的学习和生活上给予了很大的支持。徐老师总是设身处地的为我考虑以后会遇到的问题，并教导我很多为人处世的道理。感谢尹德东老师、陈西华老师、许如华老师、张常勇老师、张树成老师在实验思路和实验技巧方面给予我的莫大帮助。感谢他们在理论基础知识和基础实验细节方面给予我细致入微的教导。

感谢郭士格师姐、南楠师姐、孙明明师姐、暴国师兄、樊倩倩师姐、葛东峰师兄、汪坤师兄、杨丽君师姐在实验技术方面教会我很多基础实验技能，非常感谢你们。感谢陪我一起上下学的张博男同学，陪我一起熬夜做实验的南楠师姐、梁敏师妹和祝立权师弟，还有一起做实验讲笑话的刁天师妹和张欣师妹。感谢他们在生活和实验中给予我的无私帮助和特别的温暖。

特别感谢吕岩红老师，她作为我们研究生的大家长，帮助我们一起度过研究生期间的每一个阶段，她细致入微，不辞劳苦地照顾我们的生活，像阳光普照着大地，甘霖滋润着小禾，真的十分感谢吕老师。感谢北京协和医学院及国家卫健委科研所所有默默为我们学生奉献的老师，感谢你们。

感谢关爱我的爸爸妈妈和家人。这次突发的疫情，让我本该在实验室埋头研究实验和写论文的时候，却待在家里研究菜谱；让我在本该穿着西装到处面试的时间，却穿着睡衣在家里给爸妈理发染发。这次疫情虽然阻碍了我实验的进度但却增进了我和家人的亲情，让我见识到了中国的日渐强大和政府的有力措施，有效控制疫情蔓延。这次疫情，让我成为了更好的我，让中国成为了更好的国家，让我们的党和政府成为了更好的领导和管理者。希望北京此次疫情早日过去，还给我们大家见面时的拥抱和热聊。希望国外大环境一片祥和，不要再有伤痛和死亡！感谢所有为我科研工作献出生命的大鼠们！

最后感谢参加本次论文评阅和答辩工作的专家和老师们！谢谢你们！

2020 年 7 月

刘婷婷

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

独创性声明

本人声明所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。论文中除了特别加以标注和致谢的地方外，不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得其他教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示谢意。

学位论文作者签名：刘婷婷　签字日期：2020 年 7 月 20 日

学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解 **北京协和医学院** 有关保存、使用学位论文的管理办法。有权保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅。本人授权 **北京协和医学院** 可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。

（保密的学位论文在解密后适用本授权书）

学位论文作者签名：刘婷婷　　导师签名：

签字日期：2020年 7 月 20 日　　签字日期：2020年 7 月 20 日

学位论文作者毕业后去向：

工作单位：　　电话：

通讯地址：　　邮编：

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net