

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.08.021

View this article at: http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2018.08.021

RhoGDI3 在重度子痫前期胎盘中的表达及意义

刘思诗, 陈静, 庄艳艳, 刘彩霞

(中国医科大学附属盛京医院妇产科, 沈阳 110004)

[摘要] 目的: 探讨RhoGDI3 mRNA及蛋白在子痫前期胎盘中表达情况及意义。方法: 采用qRT-PCR法检测20例重度子痫前期及17例正常妊娠胎盘组织中RhoGDI3 mRNA的表达情况, 采用Western印迹法检测RhoGDI3蛋白的表达情况, 采用免疫组织化学染色方法检测RhoGDI3在胎盘中的表达情况。结果: 正常孕妇组胎盘中RhoGDI3 mRNA水平明显高于重度子痫前期组, 为重度子痫前期胎盘的2倍($P<0.05$)。RhoGDI3蛋白在正常妊娠胎盘和重度子痫前期胎盘中均有表达, 且正常妊娠胎盘中的表达量为重度子痫前期胎盘的2倍($P<0.05$)。免疫组织化学检测发现: 正常胎盘和重度子痫前期胎盘中均有RhoGDI3的阳性表达, 且主要表达在胎盘滋养细胞中。重度子痫前期组孕妇胎盘组织中RhoGDI3蛋白的阳性表达率(35.3%, 6/17), 明显低于对照组(80%, 16/20)。结论: RhoGDI3无论在基因水平还是蛋白水平, 在重度子痫前期胎盘中的表达均减少, 提示可能与重度子痫前期的发病有关。

[关键词] RhoGDI3; 子痫前期; 滋养细胞

Expression and significance of RhoGDI3 in maternal placenta of preeclampsia

LIU Sishi, CHEN Jing, ZHUANG Yanyan, LIU Caixia

(Department of Obstetrics and Gynecology, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, China)

Abstract **Objective:** To investigate the expression of RhoGDI3 in placental tissue with preeclampsia and its relationship with the pathogenesis of preeclampsia. **Methods:** The expression of RhoGDI3 protein level was detected with Western bolt, RhoGDI3 mRNA was detected with real-time PCR, and the location of RhoGDI3 in the placenta was detected by immunohistochemistry, in specimens of 20 preeclampsia placentas, 17 normal human placentas. **Results:** We found that the expression of RhoGDI3 mRNA was stronger in normal placentas than in preeclampsia placentas, and it was twice that of the preeclampsia placentas ($P<0.05$). RhoGDI3 protein was expressed in the normal placentas and preeclampsia placentas, and the expression in the normal placentas was twice that of preeclampsia placentas ($P<0.05$). Immunohistochemistry test showed that both the normal placentas and the preeclampsia placentas had the positive RhoGDI3 expression, which was mainly expressed in the placental

收稿日期 (Date of reception): 2018-05-25

通信作者 (Corresponding author): 刘彩霞, Email: Liucx1716@163.com

基金项目 (Foundation item): 国家自然科学基金 (81501260)。This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81501260).

trophoblast. RhoGDI3 protein positive expression rate was significantly lower in preeclampsia placentas (35.3%, 6/17) than the normal placentas (80%, 16/20). **Conclusion:** Regardless of the level of mRNA or protein, the expression level of RhoGDI3 was stronger in normal placentas than in preeclampsia placentas, which show that RhoGDI3 may be associated with the onset of preeclampsia.

Keywords RhoGDI3; preeclampsia; trophoblast

妊娠期高血压疾病, 尤其是重度子痫前期, 是妊娠期严重的并发症。很多重度子痫前期患者围产期发病率增高, 如心脏疾病, 严重威胁母婴的预后, 因此, 子痫前期的预测和预防显得非常重要^[1-2]。研究^[3]发现子痫前期可能是由滋养细胞侵袭能力减弱导致。滋养细胞侵袭能力不足, 导致胎盘浅着床及胎盘着床部位子宫螺旋动脉重铸障碍, 从而导致子痫前期发病。Rho GTPases家族在调节滋养细胞侵袭中起重要作用, RhoGDIs可以控制Rho GTPases在细胞内的分布并且可与Rho GTPases相互作用, 调节鸟苷酸交换因子和GTPase-活性蛋白。RhoGDI通过Rho GTPase调节多种细胞功能, 包括细胞迁移、侵袭、黏附和分化等^[4]。RhoGDI3为RhoGDIs的成员之一, 目前未见RhoGDI3在胎盘中的相关研究, 本研究主要检测RhoGDI3在正常胎盘及重度子痫前期胎盘中的表达情况, 探讨RhoGDI3与重度子痫前期的关系。

1 对象与方法

1.1 对象

选择重度子痫前期患者20例为实验组, 入选标准参考谢幸等^[5]主编的《妇产科学》第八版, 同时选取17例正常妊娠患者作为对照组。入选患者均无其他内外科疾病, 均为中国医科大学附属盛京医院择期剖宫产的患者(标本为废弃组织, 已免除知情同意)。两组患者年龄、孕周差异无统计学意义($P>0.05$)。

1.2 方法

1.2.1 标本制备

剖宫产术中, 胎盘娩出后立刻采集母体面正中(避开钙化区及出血点)大小约1.0 cm × 1.0 cm × 1.0 cm的数块组织。用生理盐水反复冲洗, 装入冷冻管后迅速放入液氮中保存, 转运后置于-80 °C冰箱备用, 用于PCR及Western印迹试验, 另一部分置于4%的多聚甲醛中固定过夜, 用于免疫组织化学实验。

1.2.2 Real-time PCR

应用大连宝生物公司(TaKaRa)的TRIzol提取试剂盒提取胎盘组织的总RNA, 用紫外分光光度计测定RNA纯度。先行去除DNA基因组反应, 体系为5 ×g DNA Eraser Buffer 2.0 μL, gDNA Eraser 1.0 μL, 总RNA 1 μL, RNase Free dH₂O up to 10 μL(步骤1反应液), 行反转录, 反转录体系为PrimeScript RT Enzyme Mix I 1.0 μL, RT Primer Mix⁺ 1.0 μL, PrimeScript Buffer 2 (for Real Time) 4.0 μL, RNase Free dH₂O 4.0 μL, 步骤1反应液 10 μL, 总体积20 μL。然后行实时定量PCR, 引物由上海生工生物有限公司设计, RhoGDI3上游引物5'-TTCAAGGTCCACAGGGAGAT-3', 下游引物5'-CATAGCTGCCACCATGTAG-3', GAPDH上游引物: 5'-GGTGAAGGTCGGAGTCAACG-3', 下游引物: 5'-CCATGTAGTTGAGGTCAATGAAG-3'。反应体系为SYBR Premix Ex Taq II(2×)(Tli RNaseH Plus), Bulk 10 μL, PCR Forward Primer (10 μmol/L)0.8 μL, PCR Reverse Primer (10 μmol/L)0.8 μL, ROX Reference Dye(50×)0.08 μL, DNA模板2 μL, 灭菌水6.32 μL, 总体积20 μL, 反应条件为95 °C预变性30 s, 95 °C变5 s, 60 °C退火30 s, 设置40个变性/退火循环。每个标本设置3个复孔, 通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算RhoGDI3 mRNA的相对表达量。

1.2.3 Western 印迹

用RIPA裂解液裂解蛋白, 取上清并用BCA法测定蛋白浓度, 经浓度标准化后行Western印迹检测。取总蛋白, 经12%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后, 将蛋白电转至PVDF膜上。以含5%脱脂奶粉的TBS-T室温下封闭非特异性抗原2 h; 加入1:500稀释的兔抗人RhoGDI3多克隆抗体、1:15 000稀释鼠抗人GAPDH多克隆抗体, 4 °C过夜; 用TBS-T洗膜10 min × 3; 加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:2 000稀释), 37 °C摇床作用2 h; 用TBS-T洗膜10 min × 3; 化学发光(ECL)显色反应与曝光: 等体积混合适量ECL A液和B液, 根据膜的大小按每10 cm²膜加1 mL ECL工作液, 室温放置1~2 min, 发光(时间按发光强度而定), 测蛋白条带的灰度值。

1.2.4 免疫组织化学

石蜡标本连续切片, 免疫组织化学实验按照免疫组织化学试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司)说明书进行。RhoGDI3抗体购自英国Abcam公司(抗体编号: ab223058), 苏木精复染, 中性树胶封片, 显微镜下观察染色情况。随机观察5个高倍镜($\times 400$)视野, 根据阳性细胞百分率和染色强度进行半定量分析。染色强度: 无染色0分, 轻度染色1分, 中度染色2分, 重度染色3分; 阳性细胞数 $< 10\%$ 为0分, $\geq 10\%$ 且 $< 25\%$ 为1分, $\geq 25\%$ 且 $< 50\%$ 为2分, $\geq 50\%$ 为3分。2项指标积分之和0~1分为阴性病例(-), 2~3分为弱阳性病例(+), ≥ 4 分为强阳性病例(2+), 后两者统称为阳性。

1.3 统计学处理

采用SPSS 17.0统计软件, 结果用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 两组间差异性比较采用独立样本 t 检验和卡方检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组 RhoGDI3 mRNA 表达量的比较

正常妊娠胎盘组织中RhoGDI3 mRNA的表达量为重度子痫前期胎盘的2倍($P < 0.05$; 表1, 图1)。

表1 两组RhoGDI3 mRNA的表达量比较($2^{-\Delta\Delta Ct}$)

Table 1 Comparison of expression of RhoGDI3 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) between the 2 groups

组别	n	RhoGDI3 mRNA的 ΔCt 值
实验组	20	6.29 (9.10~4.89)
对照组	17	4.96 (5.89~3.90)
P		<0.001

2.2 两组 RhoGDI3 蛋白表达量的比较

Western印迹法检测发现正常妊娠胎盘中RhoGDI3蛋白的表达量为重度子痫前期胎盘的2倍($P < 0.05$, 图2)。

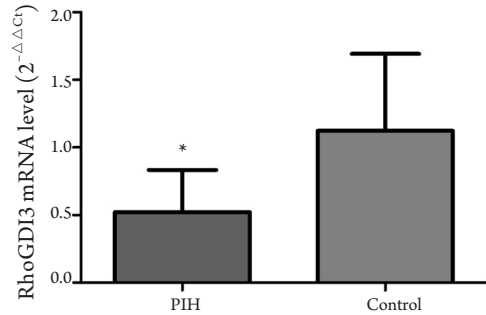


图1 荧光实时定量RT-PCR技术检测RhoGDI3的mRNA在胎盘中的表达情况

Figure 1 Expression of RhoGDI3 mRNA detected by real-time PCR with the control group, $*P < 0.05$.

Compared with the control group, $*P < 0.05$.

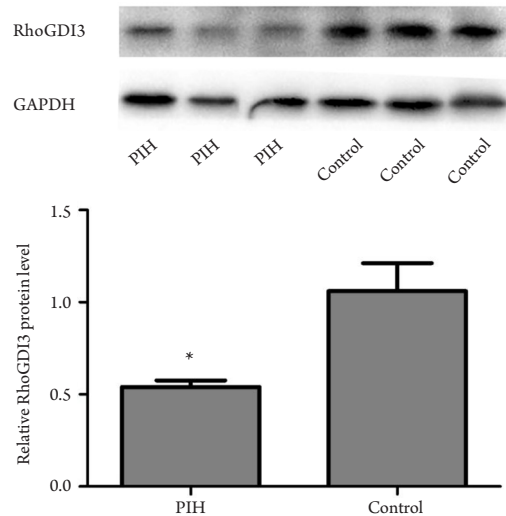


图2 RhoGDI3蛋白在胎盘中的表达情况

Figure 2 RhoGDI3 protein expression in the placenta

与对照组相比, $*P < 0.05$.

Compared with the control group, $*P < 0.05$.

2.3 正常胎盘和重度子痫前期胎盘中 RhoGDI3 的表达

两组RhoGDI3主要在胎盘滋养细胞中表达。重度子痫前期组孕妇胎盘组织中RhoGDI3蛋白的阳性表达率(35.3%, 6/17)明显低于对照组(80%, 16/20), 差异有统计学意义($\chi^2 = 7.691$, $P < 0.05$; 图3)。

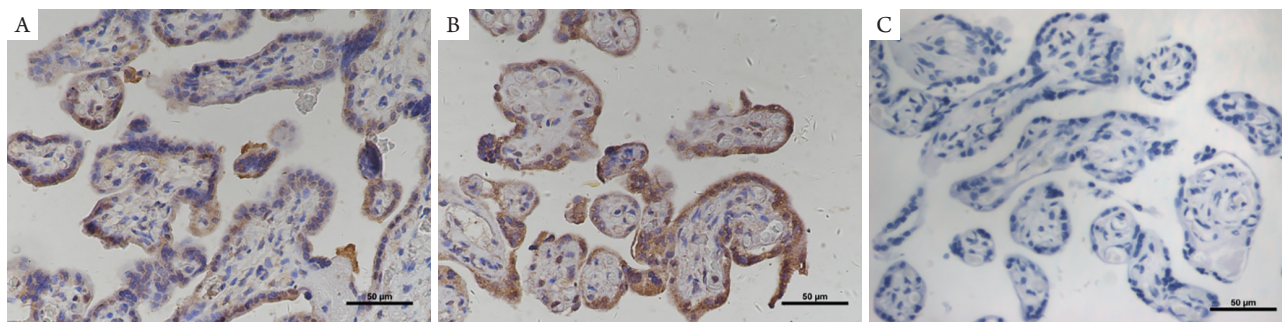


图3 免疫组织化学方法检测RhoGDI3在子痫前期胎盘组织及正常胎盘组织中的表达情况(EnVision, ×400)

Figure 3 Immunohistochemical methods were used to detect the expression of RhoGDI3 in preeclampsia placenta tissue and normal placenta tissue (EnVision, ×400)

(A)重度子痫前期组; (B)对照组; (C)阴性对照。

(A) Preeclampsia placenta; (B) Normal placenta tissue; (C) Negative control.

3 讨论

子痫前期是导致孕产妇和围产儿死亡的主要妊娠期特异性疾病之一, 具体的发病机制尚不清楚, 多数认为其可能与胎盘滋养细胞侵入过浅有关。

RhoGDI家族在细胞的转移、侵袭等方面起重要作用。RhoGDI家族成员包括RhoGDI1, RhoGDI2和RhoGDI3。研究^[6]发现RhoGDI1在组织中广泛表达且可以与多个GTPases相互作用。RhoGDI2与RhoGDI1有70.7%的同源性, RhoGDI2在淋巴及骨髓组织中表达, 另外在脑组织、前列腺及胰腺等组织中也表达。前期研究^[7]也发现RhoGDI2在滋养细胞、早孕绒毛及足月胎盘中均有表达, 并且影响滋养细胞的侵袭能力。RhoGDI3是RhoGDI家族的第3个成员, 与RhoGDI1具有62.1%的同源性, 与RhoGDI2具有70.7%的同源性。RhoGDI3最初在鼠科的大脑组织中被发现, 之后发现在人类大脑和胰腺组织中也有表达^[8-9]。目前尚未见RhoGDI3在胎盘及滋养细胞中表达情况的研究报道。本研究首次探讨RhoGDI3在重度子痫前期和正常胎盘中的表达情况, 发现RhoGDI3在胎盘中有表达, 且RhoGDI3无论在基因水平还是蛋白水平, 在子痫前期胎盘中的表达均减少。

滋养细胞的一些生物学行为, 包括侵袭、转移等, 和恶性肿瘤细胞的生物学行为类似, 滋养细胞的侵袭异常和母体螺旋动脉重塑障碍的病理生理学改变可引起重度子痫前期一系列临床症状。目前, 有学者在肿瘤细胞中及神经细胞中研究RhoGDI3的表达情况。Wang等^[10]研究发现:

神经干细胞中表达RhoGDI3, 并且RhoGDI3可以通过抑制Rac1的表达, 从而抑制神经干细胞的迁移。de León-Bautista等^[11]研究发现: RhoGDI3在晚期胰腺癌中表达减少, 且跟胰腺癌肿瘤的进展及侵袭行为密切相关。另外Jiang等^[12]研究发现: 在正常的乳腺组织中, RhoGDI3有较高的免疫反应性, 但是在乳腺癌中没有, RhoGDI3 mRNA的表达情况与此一致, RhoGDI3可能成为乳腺癌临床分期的一个重要的预后指标。

Zhang等^[13]研究发现: RhoGDI1在兔的滋养层干细胞(trophoblast stem cells, TSCs)中存在, 并且影响其侵袭能力。RhoGDI1过表达促进了TSCs的凋亡, 敲除RhoGDI1促进TSCs的增殖和侵袭。前期研究^[7]发现: RhoGDI2在早孕及足月胎盘中均有表达, 且在RhoGDI2在孕足月胎盘中的表达水平显著高于孕早期胎盘中的表达水平, RhoGDI2通过RAC1的活性影响滋养细胞的迁移能力。RhoGDI3作为RhoGDI家族的成员, 目前在胎盘和滋养细胞中未见研究报道, 本研究发现RhoGDI3在胎盘中表达, 并且在子痫前期胎盘中表达减少, 说明RhoGDI3也许在滋养细胞的迁移侵袭中可能起一定的作用, 需要今后进一步研究, 为子痫前期发病机制提供新的思路。

参考文献

1. Anderson CM, Ralph JL, Wright ML, et al. DNA methylation as a biomarker for preeclampsia[J]. Biol Res Nurs, 2014, 16(4): 409-420.
2. Tang L, He G, Liu X, et al. Progress in the understanding of the etiology and predictability of fetal growth restriction[J]. Reproduction, 2017,

- 153(6): R227-R240.
3. Pennington KA, Schlitt JM, Jackson DL, et al. Preeclampsia: multiple approaches for a multifactorial disease[J]. *Dis Model Mech*, 2012, 5(1): 9-18.
 4. Lakhe-Reddy S, Khan S, Konieczkowski M, et al. Beta8 integrin binds Rho GDP dissociation inhibitor-1 and activates Rac1 to inhibit mesangial cell myofibroblast differentiation[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(28): 19688-19699.
 5. 谢幸, 苟文丽. 妇产科学[M]. 8版. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 63-71.
XIE Xing, GOU Wenli. *Obstetrics and gynecology*[M]. 8th ed. Beijing: People's Medical Publishing House Co., LTD, 2013: 63-71.
 6. Regazzi R, Kikuchi A, Takai Y, et al. The small GTP-binding proteins in the cytosol of insulin-secreting cells are complexed to GDP dissociation inhibitor proteins[J]. *J Biol Chem*, 1992, 267(25): 17512-17519.
 7. Liu S, Cui H, Li Q, et al. RhoGDI2 is expressed in human trophoblasts and involved in their migration by inhibiting the activation of RAC1[J]. *Biol Reprod*, 2014, 90(4): 88.
 8. Adra CN, Iyengar AR, Syed FA, et al. Human ARHGDI3, a GDP-dissociation inhibitor for Rho proteins: genomic structure, sequence, expression analysis, and mapping to chromosome 16p13.3[J]. *Genomics*, 1998, 53(1): 104-109.
 9. Adra CN, Manor D, Ko JL, et al. RhoGDIgamma: a GDP-dissociation inhibitor for Rho proteins with preferential expression in brain and pancreas[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, 94(9): 4279-4284.
 10. Wang J, Li X, Cheng H, et al. Overexpression of Rho-GDP-dissociation inhibitor-γ inhibits migration of neural stem cells[J]. *J Neurosci Res*, 2013, 91(11): 1394-1401.
 11. de León-Bautista MP, Cardenas-Aguayo MD, Casique-Aguirre D, et al. Immunological and functional characterization of RhoGDI3 and its molecular targets RhoG and RhoB in human pancreatic cancerous and normal cells[J]. *PLoS One*, 2016, 11(11): e0166370.
 12. Jiang WG, Watkins G, Lane J, et al. Prognostic value of rho GTPases and rho guanine nucleotide dissociation inhibitors in human breast cancers[J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(17): 6432-6440.
 13. Zhang J, Li T, Ji W, et al. Rho GDIalpha modulates rabbit trophoblast stem cell survival and migration[J]. *Biol Reprod*, 2015, 93(6): 144.

本文引用: 刘思诗, 陈静, 庄艳艳, 刘彩霞. RhoGDI3在重度子痫前期胎盘中的表达及意义[J]. *临床与病理杂志*, 2018, 38(8): 1720-1724. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.08.021

Cite this article as: LIU Sishi, CHEN Jing, ZHUANG Yanyan, LIU Caixia. Expression and significance of RhoGDI3 in maternal placenta of preeclampsia[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2018, 38(8): 1720-1724. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.08.021