

生理性低氧通过HIF1 α 上调P $LOD2$ 参与绒毛外滋养细胞分化

李聪^{1,2} 刘太行² 王永恒² 丁裕斌^{1,2} 李卓航² 王应雄^{2*}

(¹重庆医科大学公共卫生与管理学院, 重庆 400016;

²生殖生物学实验室, 教育部生殖与发育国际合作联合实验室, 重庆 400016)

摘要 生理性低氧在胎盘发育及滋养细胞分化中具有重要作用。HIF1 α 是响应低氧诱导的关键因子之一, 但生理性低氧通过HIF1 α 影响胎盘发育的具体分子机制尚不明确。该研究首先通过生物信息学方法分析了HIF1 α 的下游靶基因和绒毛外滋养细胞分化过程中的差异表达基因, 并筛选出两者交集基因作为HIF1 α 调控绒毛外滋养细胞分化的潜在靶标基因。实验验证发现, 生理性低氧条件下(8% O₂), HIF1 α 和其下游靶基因P $LOD2$ 、HPCAL1、SLC16A3、FAM174B、SYDE1均被诱导上调表达, 而NREP和CD4表达下调。过表达HIF1 α 后, 上述靶基因被调控并呈现与生理性低氧诱导相同的表达模式。通过体外Transwell侵袭、细胞划痕和绒毛外植体实验发现, 敲低靶基因P $LOD2$ 后可显著抑制滋养细胞的侵袭、迁移和外植体外延水平, 并能进一步阻碍滋养细胞的细胞骨架重塑及滋养细胞上皮-间质转换过程。该研究初步发现, 生理性低氧可以诱导HIF1 α 上调, 并进一步介导其下游靶基因P $LOD2$ 等的选择性表达, 促进EVT分化。

关键词 生理性低氧; HIF1 α ; 绒毛外滋养细胞; 侵袭; P $LOD2$

Physiological Hypoxia Is Involved in Trophoblast Differentiation via HIF1 α Mediating Upregulation of P $LOD2$

LI Cong^{1,2}, LIU Taihang², WANG Yongheng², DING Yubin^{1,2}, LI Zhuohang², WANG Yingxiong^{2*}

(¹School of Public Health and Management, Chongqing 400016, China; ²Joint International Research Laboratory of Reproductive and Development, Department of Reproductive Biology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract Physiological hypoxia plays an important role in trophoblast cell differentiation during placental development. HIF1 α is one of the key factors that respond to hypoxia, but it is not fully understood how physiological hypoxia modulates placental development through HIF1 α . In this study, the downstream target genes of HIF1 α and the genes that were differentially expressed during cytotrophoblast cells differentiation into extravillous trophoblast cells were first analyzed by using bioinformatics methods. The genes were considered as the potential target genes involved in hypoxia-induced EVT formation through HIF1 α signaling. It was further found that under physiological hypoxic conditions (8% O₂), HIF1 α and its downstream target genes P $LOD2$, HPCAL1, SLC16A3, FAM174B, and SYDE1 were upregulated, while NREP and CD4 were downregulated. Interestingly, the expression pattern of these target genes was similarly observed when HIF1 α was overexpressed in the cells. Knockdown of

收稿日期: 2020-12-16 接受日期: 2021-02-08

国家自然科学基金(批准号: 81801458)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13320215262, E-mail: yxwang@cqmu.edu.cn

Received: December 16, 2020 Accepted: February 8, 2021

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81801458)

*Corresponding author. Tel: +86-13320215262, E-mail: yxwang@cqmu.edu.cn

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5503>

PLOD2 impaired cytoskeletal actin remodeling, which resulted in the inhibition of epithelial-mesenchymal transition, outgrowth, migration, and invasion of trophoblast cells. This study contributes to understanding how physiological hypoxia (8% O₂) induces the upregulation of HIF1 α , as well as how HIF1 α promotes trophoblast migration and invasion via its downstream target genes such as *PLOD2*.

Keywords physiological hypoxia; HIF1 α ; extravillous trophoblasts; invasion; *PLOD2*

绒毛外滋养细胞(extravillous trophoblast, EVT)是组成胎盘的主要功能细胞之一,由上皮增殖型细胞滋养细胞(cytotrophoblast, CTB)分化而来,在母胎对话建立、血管重塑、胎盘锚定及维持母胎循环中起重要作用^[1-2]。EVT主要具有两种亚型,包括间质型绒毛外滋养细胞(interstitial extravillous trophoblast, iEVT)和血管内滋养细胞(endovascular trophoblast, eEVT)^[3];其中,iEVT能够浸润母体子宫蜕膜甚至到子宫肌层1/3并形成胎盘基板巨细胞,将胎盘和胎儿锚定于母体组织^[4];eEVT主要侵入母体子宫内螺旋动脉,一方面在妊娠第一周通过在螺旋动脉末端形成“栓子”,防止胎盘灌注过早^[5],另一方面参与随后的子宫螺旋动脉重塑,维持低阻力和高流量的母胎血液循环^[6]。CTB成功侵袭并分化为EVT,是胚胎成功植入子宫、建立母胎间联系的重要事件,异常的EVT浸润将导致不良妊娠结局的发生,如EVT侵袭不足会导致螺旋动脉重塑受损、胎盘灌注不足,进而引起胎儿宫内生长受限(intrauterine growth retardation, IUGR)、子痫前期(preeclampsia, PE)等妊娠期综合征^[7];过度的EVT侵袭会引发绒癌和恶性葡萄胎等^[8]。

虽然目前研究已明确证实氧压变化对EVT的侵袭和分化起重要调控作用,然而具体影响机制仍存在诸多争议^[9]。在妊娠早期,胎盘处于低血液灌注状态,绒毛间隙维持在约8%的生理性低氧环境中^[10],可通过促进赖氨酸氧化酶(lysyl oxidase, LOX)等的表达,进而诱导EVT的分化和侵袭^[11];然而,持续过度低氧会抑制EVT侵袭,导致螺旋动脉重塑失败和不良妊娠结局的发生^[12]。在体外研究中,GRAHAM等^[13]证实,永生化和非永生化的绒毛外滋养细胞系HTR-8/SVneo的侵袭能力在低氧条件下增强;但另外研究则认为,低氧导致滋养细胞中Cyclin B的上调和P21的下调,解除细胞周期阻滞,抑制了滋养细胞的向侵袭表型的分化,从而损害EVT的侵袭^[14-15]。已知增殖性的CTB侵袭分化为间质型EVT是一个典型的上皮-间质转换(epithelial-mesenchymal transition,

EMT)过程^[16],缺氧诱导因子1 α (hypoxia-inducible factor 1 alpha, HIF1 α)作为响应低氧的主要因子之一,其报道在滋养细胞的EMT过程中具有重要作用。在正常早孕绒毛中,HIF1 α 被发现在EVT中大量表达,而在CTB中表达量较低,且进一步发现HIF1 α 能够增强ILK介导的EMT过程,促进EVT侵袭^[17]。HIF1 α 还可以通过Notch途径来促进EMT过程^[18],其介导的Notch1/STAT3/ETBR级联通路激活,可促进EVT的侵袭和母胎界面血管发生,进而提升胎盘微血管密度(microvessel density, MVD)及胎盘血液灌注^[19]。此外,HIF1 α 还能参与滋养细胞自噬途径的激活,介导MMP9和细胞内ATP的上调,从而促进了EVT的侵袭^[10]。然而,HIF1 α 被报道能提升miR-210水平,导致妊娠活性氧增加和早期滋养细胞线粒体损伤,从而减弱EVT的侵袭能力^[20]。因此,生理性低氧如何影响EVT侵袭及HIF1 α 如何响应生理性低氧并参与其中,仍需深入探究。

1 材料与方法

1.1 临床样本与细胞系

本研究得到重庆医科大学生物医学研究伦理委员会批准,且标本收集严格经过患者知情同意。早孕绒毛(孕周在6~8周, $n=6$)来源于重庆医科大学附属第一医院门诊部2020年10月自愿人工引产的妊娠早期妇女。所有绒毛样本通过最后一次月经的日期来计算胎龄,并使用超声方法测量孕囊的直径和胚胎头臀径,所有患者年龄均为20~35岁,无既往不良孕产史,无不良生活习惯和长期用药史。

人绒毛滋养层细胞系HTR-8/SVneo由加拿大皇后大学Charles H. Graham教授惠赠,人绒毛膜癌细胞系JEG-3由中科院生殖生物学国家重点实验室王雁玲研究员惠赠。

1.2 主要试剂和仪器

RPMI1640培养基、MEM培养基、DMEM/F-12培养基、Lipofectamine 3000购自美国ThermoFisher公司。链霉素、青霉素、RIPA裂解液、5 \times SDS-

PAGE上样缓冲液、HIF1 α 抗体、抗荧光淬灭剂、DAPI购自上海碧云天生物技术有限公司。胎牛血清购自天津康源生物技术有限公司。siRNA购自上海吉玛制药技术有限公司。Trizol购自日本TaKaRa公司。Easstep[®] RT Master Mix Kit购自美国promega公司。2 \times SYBR Green qPCR Master Mix购自美国Bimake公司。引物购自深圳华大基因股份有限公司。脱脂奶粉、 β -actin抗体、HRP二抗购自武汉博士德生物工程有限公司。E-CAD抗体、N-CAD抗体购自美国Proteintech公司。Vimentin抗体购自北京博奥森生物技术有限公司。Tween-20购自上海生工生物工程股份有限公司。ECL显影液购自苏州新赛美生物科技有限公司。PBS缓冲液粉末购自北京中杉金桥生物技术有限公司。Triton-X100购自美国Sigma-Aldrich公司。FITC-鬼笔环肽、多聚甲醛购自北京索莱宝科技有限公司。牛血清白蛋白购自德国Biofrox公司。基质胶Matrigel、Transwell小室购自美国Corning公司。Forma[™] Steri-cycle[™] i160二氧化碳培养箱购自美国ThermoFisher公司。CFX Connect[™]荧光定量PCR检测系统、ChemiDoc[™] XRS+System化学发光显色仪购自美国Bio-Rad公司。光学显微镜、倒置显微镜购自日本Olympus公司。共聚焦激光扫描显微镜购自日本Nikon公司。

1.3 生物信息学分析

通过人类转录因子靶基因数据库(Database of Human Transcription Factor Targets, hTFtarget)(<http://bioinfo.life.hust.edu.cn/hTFtarget/>)筛选出转录因子HIF1 α 的靶基因。根据GEO数据库,王红梅等关于母胎界面的^[21]scRNA-seq数据(GSE89497),以 $|\log FC| \geq 1$ 和 $P < 0.05$ 为基准筛选EVT分化过程中的差异表达基因。对HIF1 α 的潜在靶基因和EVT分化过程的差异表达基因进行Venn分析,筛选共有因子,作为生理性低氧通过HIF1 α 参与滋养细胞侵袭调节的潜在靶标因子,用于后续研究。

1.4 细胞低氧诱导

HTR-8/SVneo和JEG-3细胞以 1×10^7 个细胞接种于100 mm培养皿中,分别用RPMI1640培养基和MEM培养基进行培养,培养基均含有100 μ g/mL链霉素、100 U/mL青霉素和10%的FBS。设置CO₂培养箱条件为37 $^{\circ}$ C、5% CO₂和21% O₂进行细胞常氧培养;设置37 $^{\circ}$ C、5% CO₂和8% O₂模拟生理性低氧进行低氧培养。

1.5 转染

将HTR-8/SVneo和JEG-3细胞以 1×10^5 细胞/孔的密度接种于二十四孔板中培养24 h,待细胞汇合度达到70%~90%后,使用Lipofectamine 3000分别对HTR-8/SVneo和JEG-3细胞进行转染,严格遵照试剂说明书进行操作。pCDH-HIF1 α 过表达质粒由本实验室留存;赖氨酸羧化酶2(procollagen-lysine 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2, *PLOD2*)的siRNA包含*PLOD2*-siRNA片段(sequence1, 5'-GGU CUU UGC AGG CUA UUA UTT-3'; sequence2, 5'-AUA AUA GCC UGC AAA GAC CTT-3')和阴性对照片段(scrambled-sequence control)。

1.6 实时荧光定量PCR(RT-qPCR)

使用Trizol分离提取总RNA,使用Easstep[®] RT Master Mix Kit对RNA样品进行逆转录。使用2 \times SYBR Green qPCR Master Mix在CFX Connect[™]荧光定量PCR检测系统中进行RT-qPCR,所使用引物的序列如表1所示,基因相对表达量使用2^{- $\Delta\Delta C_t$} 计算,所有表达量均使用*GAPDH*作为内参基因进行标准化处理。

1.7 Western blot

在细胞转染48 h后,收集细胞并使用RIPA裂解液对细胞进行裂解,加入5 \times SDS-PAGE上样缓冲液,煮沸10 min进行蛋白变性处理。蛋白样品通过8% SDS-PAGE电泳分离并将其转移到PVDF膜上,使用5%脱脂奶粉封闭液在37 $^{\circ}$ C封闭1.5 h,4 $^{\circ}$ C过夜分别孵育一抗HIF1 α (1:1 000)、E-CAD(1:1 000)、N-CAD(1:1 500)、Vimentin(1:1 000)和 β -actin(1:1 000),PBST洗涤10 min \times 3次,二抗37 $^{\circ}$ C摇床孵育,PBST洗涤10 min \times 3次,使用ECL显影液显色,并在Chemi-Doc[™] XRS+System化学发光显色仪下进行拍照观察。

1.8 基质胶侵袭表型分化诱导

利用Matrigel/RPMI1640培养基1:20包被二十四孔板,诱导滋养细胞向侵袭表型分化。将消化的HTR-8/SVneo细胞按照 6×10^4 个细胞/孔密度接种入二十四孔板中,并在37 $^{\circ}$ C、5% CO₂下处理48 h。

1.9 划痕实验

在二十四孔板中每孔接种 6×10^4 个HTR-8/SVneo或JEG-3细胞,待细胞汇合度达到70%~90%,进行转染操作。转染48 h后,用枪头在孔板底部垂直划线,并清洗1次去除多余细胞。分别在正常培养0 h、

表1 定量引物序列

Table 1 The sequences of primers

基因 Genes	正向引物(5'→3') Forward primers (5'→3')	反向引物(5'→3') Reverse primers (5'→3')
<i>PLOD2</i>	ATT ACG GCA AAT GGT CTG GG	TGA GGA CGA AGA GAA CGC TG
<i>HPCAL1</i>	ATG GGC AAA CAG AAC AGC AA	AGG GGA AGA AGT TGG CGT AG
<i>SLC16A3</i>	TTG TGG GGG GTC TCT TTG C	GAT GAG CGA GGG CTG GAA G
<i>FAM174B</i>	CGT TCG CCT TTA CCA CCC T	CCA TTT CCA CTC GCT CTG C
<i>SYDE1</i>	TGG ACT TCA AGC ACC ACA TCG	GTC GTT TGG GTC GCA AGT AAG
<i>EGLN3</i>	GAT GTG GAG CCC ATT TTT GAC	GCA CTT CGT GTG GGT TCC TAC
<i>NREP</i>	CAA GAA CCA TTT CCA AAC AAG G	GGC AGC GTT TGT CTC ATC G
<i>CD4</i>	GTA TGC TGG CTC TGG AAA CCT C	CGA GAC CTT TGC CTC CTT GTT
<i>HLA-G</i>	GGA GAC ACG GAA CAC CAA GG	AGG CAT ACT GTT CAT ACC CGC
<i>MMP9</i>	CAG TCC ACC CTT GTG CTC TTC	GCC ACC CGA GTG TAA CCA TAG
<i>HIF1α</i>	CAT TAG AAA GCA GTT CCG CAA	GTG GCA TTA GCA GTA GGT TCT TGT
<i>E-CAD</i>	TTC TGC TGC TCT TGC TGT TT	TGG CTC AAG TCA AAG TCC TG
<i>N-CAD</i>	CCT GCT TAT CCT TGT GCT GA	CCT GGT CTT CTT CTC CTC CA
<i>GAPDH</i>	AGA TCA TCA GCA ATG CCT CCT	TGG TCA TGA GTC CTT CCA CG

24 h后,使用倒置显微镜拍照,并通过ImageJ分别计算HTR-8/SVneo和JEG-3细胞伤口愈合面积。

1.10 Transwell侵袭实验

利用Matrigel/RPMI1640培养基1:6包被的Transwell小室,评估*PLOD2*异常表达对HTR-8/SVneo细胞侵袭水平的影响。将消化的HTR-8/SVneo细胞重悬于无血清的RPMI1640培养基中,按照 2.5×10^4 个细胞/个小室接种入包被好的Transwell小室中,并在下室加入600 μ L完全培养基。将Transwell小室在37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 条件下培养24 h,用PBS洗涤Transwell小室2次,并用棉签除去附着在膜上表面的细胞。用4%多聚甲醛固定膜下表面的细胞,苏木素染色20 min,在光学显微镜下进行拍照和细胞数目统计。

1.11 绒毛外植体培养

早孕绒毛组织运输中全程置于冰冷的DMEM/F-12培养基中,并保证在2 h内完成组织处理。首先,早孕绒毛用无菌磷酸盐缓冲溶液清洗,分离并去除母体子宫内膜和胎膜,在冰上剪取2~5 mm的绒毛片段,用DMEM/F-12清洗3次,轻轻放置到预先包被有Matrigel的十二孔板中,每个孔置入2~3个绒毛片段。其中,在十二孔板的Matrigel包被中,Matrigel按照Matrigel:无血清培养基1:19方式进行混合,每孔加入1 mL混合物,放置于37 $^{\circ}$ C孵箱中孵育30 min包被,包被完成后弃掉上清,最后加入1 mL的DMEM/F-12完全培养基(含有100 μ g/mL链霉素、100 U/mL青霉素和20% FBS)备用。绒毛片段置于37 $^{\circ}$ C和5% CO_2

条件下培养,每24 h在镜下进行照相,并通过ImageJ计算外植体外延面积。

1.12 细胞骨架染色

HTR-8/SVneo细胞和JEG-3细胞在室温下用4%多聚甲醛固定10 min, PBS洗涤5 min \times 3次, 0.5% Triton-X100通透10 min, PBS洗涤5 min \times 3次, 5%牛血清白蛋白(BSA) 37 $^{\circ}$ C封闭1 h。避光配制鬼笔环肽染色液,使用FITC-鬼笔环肽(37 $^{\circ}$ C, 1:200, 45 min)对细胞骨架进行染色, PBS洗涤5 min \times 3次, DAPI染核3 min, PBS清洗3次,用抗荧光淬灭剂封片,共聚焦激光扫描显微镜拍照。

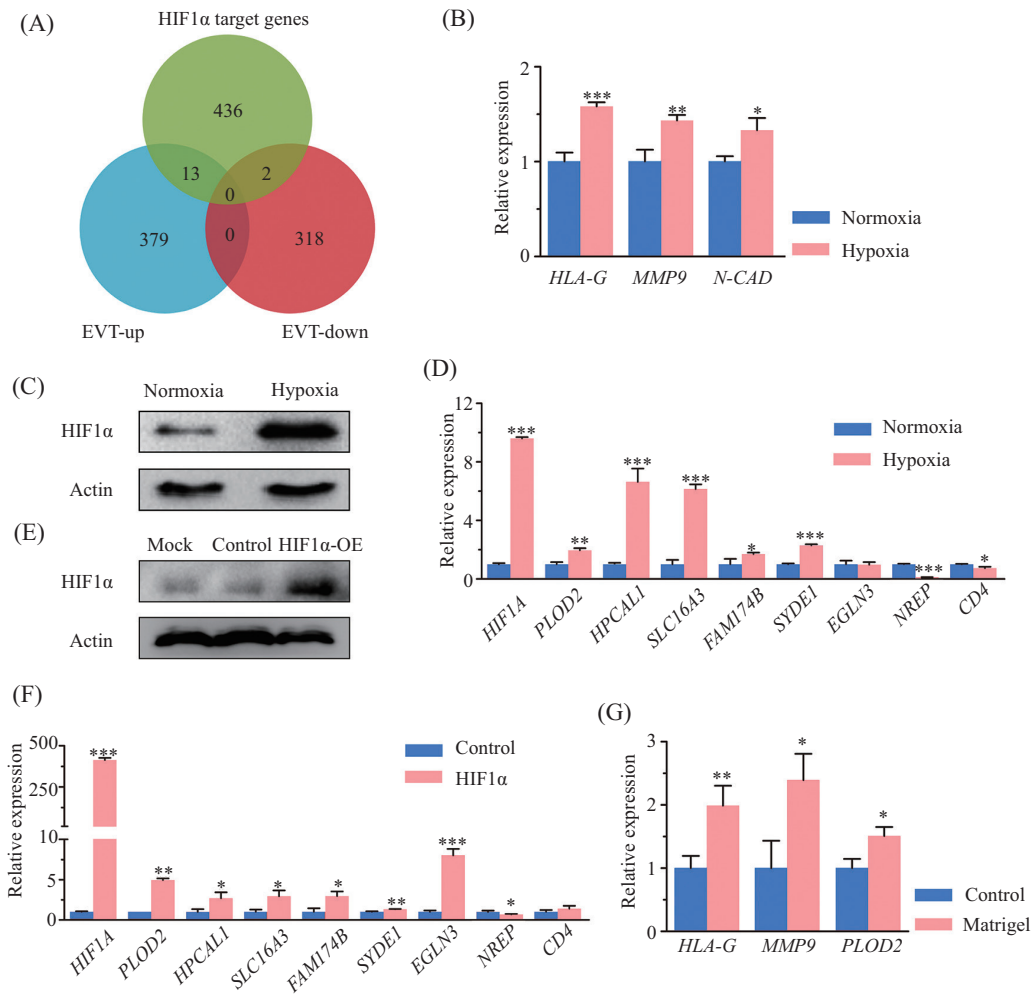
1.13 数据分析

每个实验数据通过3次重复独立实验组获得,用平均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)来描述统计量。该研究使用Student's *t*检验和SPSS 20.0软件进行数据分析,使用GraphPad Prism 5进行作图, * $P < 0.05$ 表示差异显著; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ 表示差异较显著。

2 结果

2.1 生理性低氧经HIF1 α 的下游靶基因参与EVT分化调控

基于hTFtarget数据库筛选了441个HIF1 α 的潜在下游基因,并利用王红梅等文章^[21]中的scRNA-seq测序数据,筛选了EVT分化过程中的392个上调差异表达基因和320个下调差异表达基因。进一步通过Venn分析,筛选出13个既是HIF1 α 下游基因又



A: Venn分析hTFtarget数据库中HIF1 α 的靶基因和scRNA-seq中EVT分化过程差异表达基因。hTFtarget, Database of Human Transcription Factor Targets; EVT-up, EVT分化过程上调差异表达基因; EVT-down, EVT分化过程下调差异表达基因。B: HTR-8/SVneo细胞分别在低氧(8% O₂)和常氧(21% O₂)培养8 h后, 利用RT-qPCR检测HLA-G、MMP9和N-CAD的mRNA水平, 使用GAPDH作为内参基因。* P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001, 与常氧组比较。C: Western blot检测HTR-8/SVneo细胞在低氧(8% O₂)和常氧(21% O₂)处理8 h后HIF1 α 的蛋白水平。D: HTR-8/SVneo细胞分别在低氧(8% O₂)和常氧(21% O₂)培养8 h后, 利用RT-qPCR检测HIF1 α 、P $LOD2$ 、HPCAL1、SLC16A3、FAM174B、SYDE1、EGLN3、NREP、CD4的mRNA水平, 使用GAPDH作为内参基因。* P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001, 与常氧组比较。E: HTR-8/SVneo细胞分别转染HIF1 α -OE、阴性对照空载质粒(Control)或只添加转染试剂(Mock)培养48 h后, 利用Western blot检测HIF1 α 的蛋白水平。F: 分别在HTR-8/SVneo细胞中转染HIF1 α 过表达质粒(HIF1 α -OE)、阴性对照空载质粒(Control), 培养48 h后, 利用RT-qPCR检测HIF1 α 、P $LOD2$ 、HPCAL1、SLC16A3、FAM174B、SYDE1、EGLN3、NREP、CD4的mRNA水平, 使用GAPDH作为内参基因。* P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001, 与对照组比较。G: HTR-8/SVneo细胞使用基质胶或溶剂对照处理后培养48 h, 利用RT-qPCR检测HLA-G、MMP9和P $LOD2$ 的mRNA的水平, 使用GAPDH作为内参基因, 相对表达量差异使用Student's t 检验统计分析, * P <0.05, ** P <0.01, 与对照组比较。

A: Venn diagram display of the analyzed HIF1 α target genes in the hTFtarget database as well as the differentially expressed genes in the EVT formation process in scRNA-seq data. hTFtarget, Database of Human Transcription Factor Targets; EVT-up, upregulated differentially expressed genes during EVT formation; EVT-down, downregulated differentially expressed genes during EVT formation. B: RT-qPCR detection of the mRNA levels of HLA-G, MMP9 and N-CAD in normoxia- and hypoxia-treated HTR-8/SVneo cells, using GAPDH as an internal reference gene. * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001 compared with normoxia group. C: Western blot detection of the protein levels of HIF1 α in the normoxia- and hypoxia-treated HTR-8/SVneo cells. D: RT-qPCR detection of the mRNA levels of HIF1 α , P $LOD2$, HPCAL1, SLC16A3, FAM174B, SYDE1, EGLN3, NREP and CD4 in normoxia- and hypoxia-treated HTR-8/SVneo cells, using GAPDH as an internal reference gene. * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001 compared with normoxia group. E: HTR-8/SVneo cells were transfected with HIF1 α -overexpression plasmid (HIF1 α -OE), negative control vector plasmid (Control) or only with transfection reagent (Mock) after 48 h of culture, and Western blot was used to detect the protein level of HIF1 α . F: HIF1 α -overexpression plasmid (HIF1 α -OE) or negative control vector plasmid (Control) was transfected into the HTR-8/SVneo cells. RT-qPCR detection of the mRNA levels of HIF1 α , P $LOD2$, HPCAL1, SLC16A3, FAM174B, SYDE1, EGLN3, NREP, and CD4. GAPDH was used as the internal reference gene. * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001 compared with control group. G: HTR-8/SVneo cells were treated with Matrigel or solvent control and cultured for 48 h. RT-qPCR was used to detect the mRNA level of HLA-G, MMP9 and P $LOD2$. The relative expression levels were statistically analyzed by using Student's t test, * P <0.05, ** P <0.01 compared with control group.

图1 生理性低氧(8% O₂)经HIF1 α 的下游靶基因参与EVT分化调控

Fig.1 Physiological hypoxia (8% O₂) participates in EVT formation via downstream target genes of HIF1 α

是 EVT 分化过程中上调表达的基因, 包括 *PLOD2*、*HPCAL1*、*SLC16A3*、*FAM174B*、*SYDE1*、*EGLN3*、*SFXN3*、*PAM*、*TLN2*、*PYGL*、*HK2*、*SCD*、*PLD3*; 和 2 个既是 HIF1 α 下游基因又是 EVT 分化过程中下调表达的共有基因, 包括 *CD4* 和 *NREP* (图 1A)。鉴于早期妊娠处于生理性低氧环境^[1], 为了探究生理性低氧是否能够调控 EVT 分化, 采用 8% 氧压环境作为模拟生理性低氧的条件处理 HTR-8/SVneo 细胞^[9-10,22], 并检测了 EVT 分化相关基因的表达, 结果发现低氧 (8% O₂) 可显著增强 *HLA-G*、*MMP9* 和 *N-CAD* 的表达 (图 1B)。进一步通过 RT-qPCR 检测了 *HIF1 α* 和 8 个上述基因, 结果显示, HIF1 α 在生理性低氧处理后显著上调 9 倍左右, 共有基因 *PLOD2*、*HPCAL1*、*SLC16A3*、*FAM174B*、*SYDE1* 同样在生理性低氧后发生表达上调, 而 *NREP* 和 *CD4* 发生表达下调 (图 1C 和 1D); 更重要的是, 其与 EVT 分化过程中的表达趋势一致。为了探究这些共有因子是否能够受转录因子 HIF1 α 的转录调控, 在 HTR-8/SVneo 细胞中过表达了 HIF1 α , 并检测了上述共有基因的表达, 结果发现, HIF1 α 的过表达可显著增强 *PLOD2*、*HPCAL1*、*SLC16A3*、*FAM174B*、*SYDE1*、*EGLN3* 的表达, 并抑制 *NREP* 的转录 (图 1E 和图 1F)。上述结果提示, 生理性低氧可能通过诱导 HIF1 α 上调, 介导 HIF1 α 下游靶基因选择性表达, 进而参与 EVT 分化调控。进一步综合低氧诱导及过表达 HIF1 α 研究结果发现, 虽然 *HPCAL1*、*SLC16A3*、*SYDE1* 和 *PLD2* 在生理性低氧环境下均有显著上调表达, 但作为转录因子 HIF1 α 的潜在下游靶基因, *PLD2* 在过表达 HIF1 α 后的上调表达趋势最为显著 (图 1D 和图 1F); 因此选择 *PLD2* 作为靶标进行后续研究。最后, 通过基质胶诱导 HTR-8/SVneo 细胞向侵袭表型方向分化^[23], RT-qPCR 检测发现, *HLA-G*、*MMP9* 和 *PLD2* 的 mRNA 水平显著上调, 进一步提示 *PLD2* 参与 EVT 分化 (图 1G)。

2.2 敲低 *PLD2* 抑制滋养细胞的迁移和侵袭

我们选取 HIF1 α 靶基因和 EVT 分化过程上调差异表达基因的共有基因 *PLD2* 作为靶基因进行了功能研究。利用 RT-qPCR 检测 HTR-8/SVneo 细胞中 si-*PLD2* 的干扰效率, 发现 si-RNA 组 *PLD2* 的 mRNA 表达较 Control 组和 Mock 组显著下降 (图 2A)。在人早孕绒毛中敲低 *PLD2*, 通过外植体培养实验发现, 敲低 *PLD2* 后绒毛外植体的外延面积较对照组显著低, 平均下调了 2.5 倍 ($P < 0.01$) (图 2B 和图 2C)。此

外, 分别在 HTR-8/SVneo 细胞和 JEG-3 细胞中利用 siRNA 敲低 *PLD2*, 并通过细胞划痕实验发现, 敲低 *PLD2* 均可显著抑制两种细胞的伤口愈合; 统计分析发现, 与对照组相比两种细胞的平均愈合百分比分别降低了 28.8% 和 24.2% ($P < 0.01$) (图 2D 和图 2E)。进一步通过 HTR-8/SVneo 细胞的 Transwell 侵袭实验发现, 敲低 *PLD2* 组与对照组相比, 其侵袭数目平均降低了 4.1 倍 ($P < 0.01$) (图 2F 和图 2G)。

2.3 敲低 *PLD2* 阻碍滋养细胞的肌动蛋白细胞骨架重塑

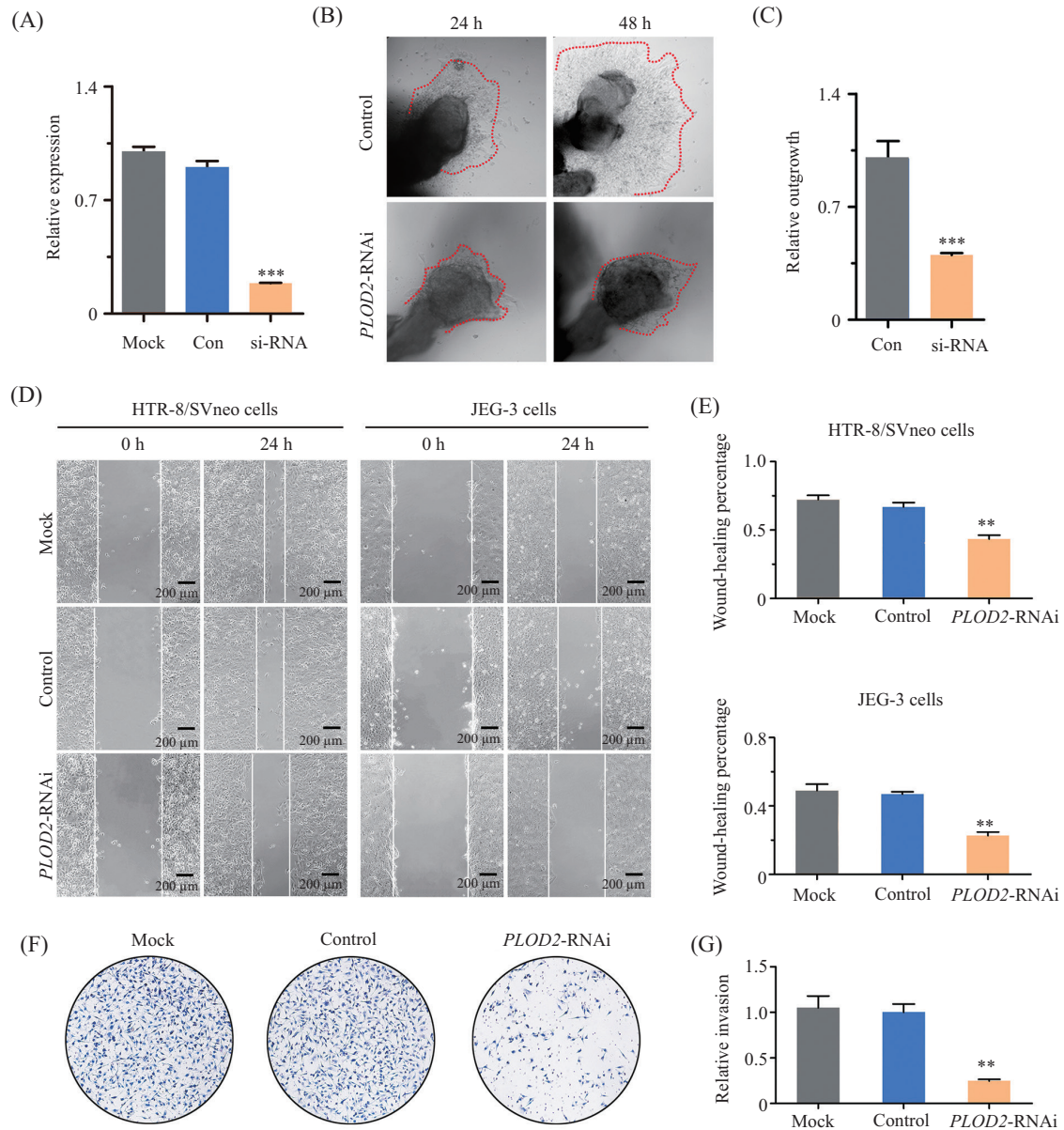
分别用 si-*PLD2* 转染 HTR-8/SVneo 和 JEG-3 细胞, 并用鬼笔环肽对细胞骨架染色, 激光共聚焦 3D 层扫结果表明, 敲低 *PLD2* 显著减少了处于细胞边缘的片状伪足数量, 同时导致了肌动蛋白聚合减少及肌动蛋白细胞骨架紊乱 (图 3A); 荧光统计结果显示, 与对照组相比肌动蛋白平均在 HTR-8/SVneo 细胞中下调了 1.3 倍 ($P < 0.05$), 在 JEG-3 细胞中平均下调了 2.3 倍 ($P < 0.01$) (图 3B 和图 3C)。这些结果提示, *PLD2* 可能通过介导细胞骨架重塑参与调控滋养细胞分化。

2.4 敲低 *PLD2* 抑制滋养细胞的 EMT

进一步分别在 HTR-8/SVneo 和 JEG-3 细胞中干扰 *PLD2*, 并检测 EMT 相关调控因子, 以验证 *PLD2* 是否能够通过影响 EMT 过程参与 EVT 侵袭分化调控。在 HTR-8/SVneo 细胞中, 对 EMT 相关标记 *N-Cadherin* (间质标记物) 的转录水平检测结果表明, 敲低 *PLD2* 导致 HTR-8/SVneo 细胞中 *N-Cadherin* 的 mRNA 表达平均下降 1.3 倍 (图 4A)。Western blot 检测蛋白水平同样显示, 干扰 *PLD2* 显著抑制 *N-Cadherin* 和波形蛋白 *Vimentin* 的表达 (图 4B)。敲低 *PLD2* 对 JEG-3 细胞 EMT 的影响与 HTR-8/SVneo 的结果一致, 不论 mRNA 还是蛋白水平, *N-Cadherin* 和 *Vimentin* 均被显著抑制, 而 *E-Cadherin* (上皮标记物) 显著被增强 (图 4C、图 4D 和图 4E)。上述结果表明, 敲低 *PLD2* 可能通过抑制 EMT 过程, 进而阻碍滋养细胞分化。

3 讨论

早期妊娠环境处于生理性低氧环境, HIF1 α 是响应低氧环境的关键因子之一, 为探究妊娠早期低氧环境是否通过 HIF1 α 调控胎盘滋养细胞分化的潜在机制, 本研究首先通过生物信息学方法分析了 HIF1 α 的下游靶基因和 EVT 分化过程中的差异表达

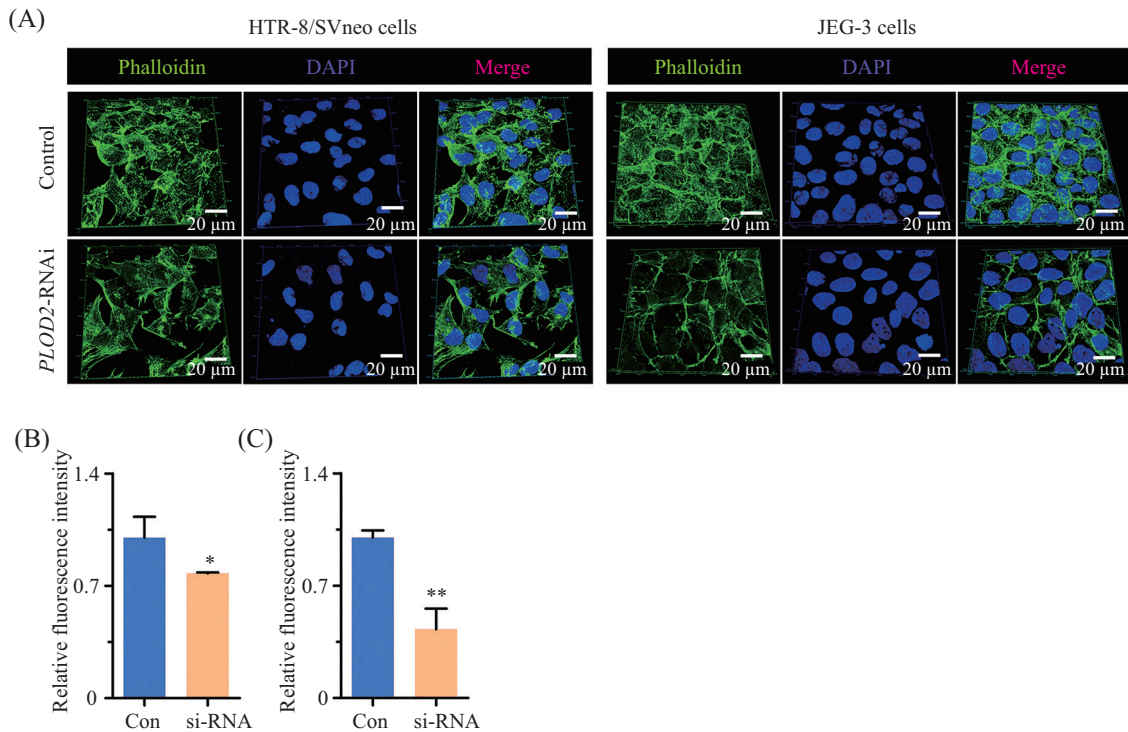


A: 通过RT-qPCR检测HTR-8/SVneo细胞中si-*PLOD2*的干扰效率。si-RNA, *PLOD2*-RNAi; Con, 阴性对照乱序序列siRNA; Mock, 仅转染试剂 (** $P < 0.001$, 与对照组比较)。B: 干扰*PLOD2*对绒毛外植体外延面积的影响, 分别在处理后24 h和48 h进行拍照观察。C: 统计绒毛外植体分别在转染si-*PLOD2*组和Control组中的相对外延面积 (** $P < 0.001$, 与对照组比较)。实验数据为分别进行三次重复独立实验获得。D: 划痕实验检测敲低*PLOD2*对HTR-8/SVneo和JEG-3细胞迁移能力的影响, 分别在敲低*PLOD2*并划痕后的0 h和24 h进行拍照。si-*PLOD2*, *PLOD2*-RNAi; Control, 阴性对照序列siRNA; Mock, 仅转染试剂。E: 分别统计HTR-8/SVneo细胞和JEG-3细胞在*PLOD2*-RNAi、Control、Mock组下的愈合百分比 (** $P < 0.01$, 与对照组比较)。F: 通过Transwell侵袭实验观察HTR-8/SVneo细胞在*PLOD2*-RNAi、Control、Mock组的侵袭细胞数目。G: 分别统计HTR-8/SVneo细胞分别在*PLOD2*-RNAi、Control、Mock组下的平均侵袭细胞数目 (** $P < 0.01$, 与对照组比较)。

A: RT-qPCR assessment of the knockdown efficiency of si-*PLOD2* in HTR-8/SVneo cells of the *PLOD2*-RNAi, Control and Mock groups, using *GAPDH* as an internal reference gene (** $P < 0.001$ compared with Control group). B: photographic display of the influence of *PLOD2* knockdown on the outgrowth of villous explants at 24 h and 48 h after treatment. C: average count of the relative outgrowth of villous explants in the transfected si-*PLOD2* group and the Control group. The experimental data were obtained from three independent experiments (** $P < 0.001$ compared with Control group). D: Scratch assay assessment of the effect of *PLOD2* knockdown on the migration of HTR-8/SVneo and JEG-3 cells in the *PLOD2*-RNAi, Control and Mock groups at 0 h and 24 h. E: count the wound-healing percentage of HTR-8/SVneo cells and JEG-3 cells in the *PLOD2*-RNAi, Control and Mock groups (** $P < 0.01$ compared with Control group). F: the number of invasive HTR-8/SVneo cells in the *PLOD2*-RNAi, Control and Mock groups through the Transwell invasion assay. G: average count of the number of invasive HTR-8/SVneo cells in the *PLOD2*-RNAi, Control and Mock groups respectively (** $P < 0.01$ compared with Control group).

图2 敲低*PLOD2*对HTR-8/SVneo和JEG-3细胞的迁移和侵袭的影响

Fig.2 The effects of *PLOD2* knockdown on the migration and invasion of HTR-8/SVneo and JEG-3 cells



A: 检测HTR-8/SVneo和JEG-3细胞在转染si-*PLOD2*和对照siRNA后F-actin染色情况。B: 统计HTR-8/SVneo细胞分别在*PLOD2*-RNAi、Control组的相对荧光强度。C: 统计JEG-3细胞分别在*PLOD2*-RNAi、Control组下的相对荧光强度,进行三次重复独立实验,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,与对照组比较。

A: detection of F-actin in HTR-8/SVneo and JEG-3 cells in the *PLOD2*-RNAi and Control groups. B: count of the relative fluorescence intensity of HTR-8/SVneo cells in the *PLOD2*-RNAi and Control groups. C: count of the relative fluorescence intensity of JEG-3 cells in the *PLOD2*-RNAi and Control groups. The data are from three independent experiments, each performed in triplicate. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with Control group.

图3 敲低*PLOD2*阻碍滋养细胞的肌动蛋白细胞骨架重塑

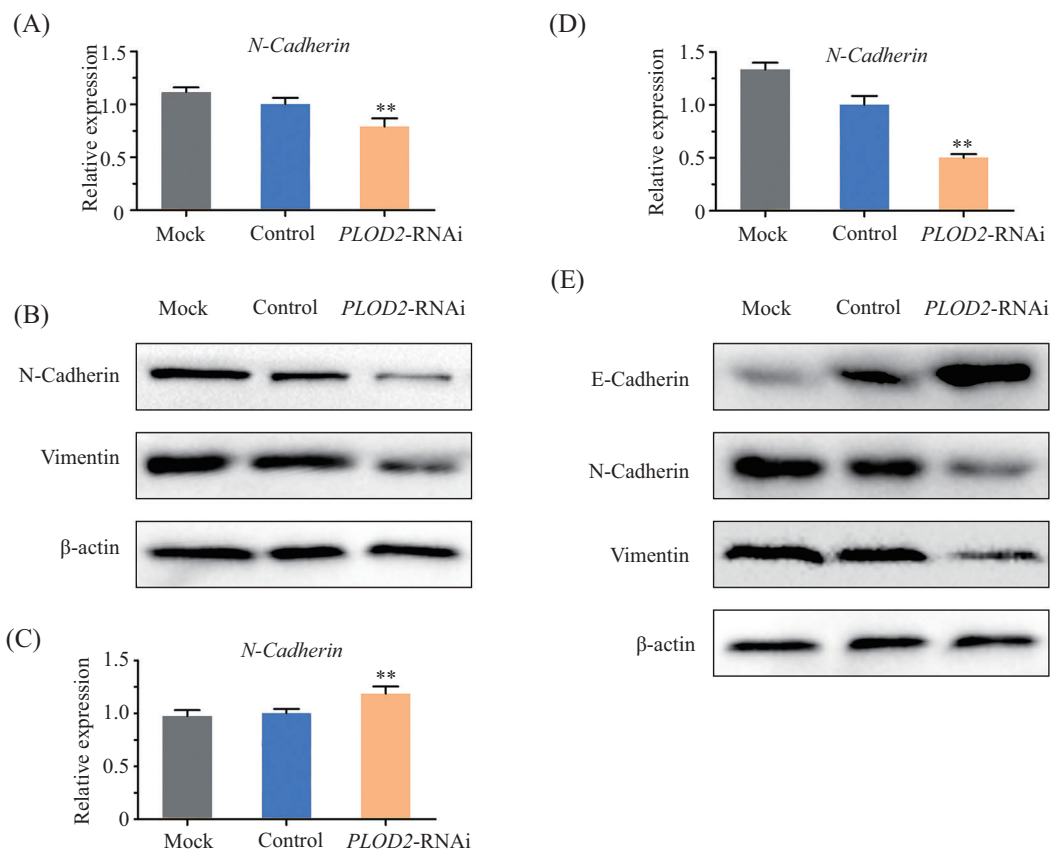
Fig.3 *PLOD2*-knockdown inhibits actin cytoskeletal remodeling of trophoblasts

基因,并筛选出交集基因,将其作为生理性低氧通过HIF1 α 参与EVT分化的潜在靶基因。鉴于1%的氧压环境更多被用于病理状态下的PE研究^[24],而8%氧压环境更多被用于生理状态下的滋养细胞功能研究^[25],因此我们采取8%氧压环境模拟生理性低氧。有趣的是,这些靶基因在8% O₂生理性低氧诱导下、EVT分化过程中及HIF1 α 过表达中均呈现相同表达模式,提示生理性低氧条件在推动EVT正常分化过程中具有重要作用,且可能是通过HIF1 α 介导的下游基因选择性表达实现的。

已有研究显示,*PLOD2*属于2-酮戊二酸5-双加氧酶家族,在低氧响应、细胞骨架重塑、肿瘤EMT等方面均有重要作用^[26-27]。已有研究发现,在人成纤维细胞中,低氧可以促进HIF1 α 特异性结合到*PLOD2*启动子区域的HAS和HIF位点,并促进*PLOD2*的转录^[28]。我们研究中也发现,低氧和HIF1 α 过表达均能诱导*PLOD2*上调表达,且hTFtarget数据也表明*PLOD2*是HIF1 α 的靶标因子,因此*PLOD2*在EVT分化过程的

上调表达可能是HIF1 α 介导的。在未分化多形性肉瘤、宫颈癌细胞、子宫内膜癌细胞等肿瘤中已明确报道,低氧通过诱导HIF1 α 上调*PLOD2*的转录,促进细胞骨架重塑或PI3K/AKT信号通路激活等,从而增强肿瘤的迁移、侵袭或EMT过程^[29-30]。低氧还可以通过诱导IL-6和瘦素介导的JAK/STAT3和AKT信号通路,上调正常乳房组织脂肪细胞中*PLOD2*的表达,并且通过调节N-CAD、E-CAD、SLUG和Vimentin来促进EMT过程和细胞骨架应力纤维的形成,诱导乳腺的正常细胞转化为侵袭性的癌细胞^[31-33]。此外,低氧协同IL-10上调HIF1 α ,促进*PLOD2*的转录,加快人巨噬细胞迁移^[34-35]。本研究在滋养细胞中初步证实,*PLOD2*在滋养细胞的侵袭、细胞骨架重塑和EMT过程中具有重要作用。因此,生理性低氧驱动的*PLOD2*选择性上调表达可能促进EVT的分化进程。

此外,本研究还发现其他既是HIF1 α 下游基因又是EVT分化过程中差异表达的共有基因。*SL-*



A: RT-qPCR检测敲低 *PLOD2* 后对 HTR-8/SVneo 细胞 *N-Cadherin* 转录水平的影响。B: Western blot 检测敲低 *PLOD2* 后对 HTR-8/SVneo 细胞 *N-Cadherin* 和 *Vimentin* 蛋白水平的影响, 使用 β -actin 作为内参蛋白。C: RT-qPCR 检测敲低 *PLOD2* 后对 JEG-3 细胞 *E-Cadherin* 转录水平的影响。si-*PLOD2*, *PLOD2*-RNAi; Control, 阴性对照乱序序列 siRNA; Mock, 仅转染试剂; 使用 *GAPDH* 作为内参基因。D: RT-qPCR 检测敲低 *PLOD2* 后对 JEG-3 细胞 *N-Cadherin* 转录水平的影响。E: Western blot 检测敲低 *PLOD2* 后对 JEG-3 细胞 *E-Cadherin*、*N-Cadherin* 和 *Vimentin* 蛋白水平的影响, 使用 β -actin 作为内参蛋白。** $P < 0.01$, 与对照组比较。

A: RT-qPCR assessment of the effect of *PLOD2* knockdown on *N-Cadherin* mRNA level in HTR-8/SVneo cells. B: Western blot assessment of the effect of *PLOD2* knockdown on the protein levels of *N-Cadherin* and *Vimentin* in HTR-8/SVneo cells, using β -actin as an internal reference protein. C: RT-qPCR assessment of the effect of *PLOD2* knockdown on the mRNA level of *E-Cadherin* in JEG-3 cells in the *PLOD2*-RNAi, Control and Mock groups, using *GAPDH* as an internal reference gene. D: RT-qPCR assessment of the effect of *PLOD2* knockdown on *N-Cadherin* mRNA level in JEG-3 cells. E: Western blot assessment of the effect of *PLOD2* knockdown on the protein levels of *E-Cadherin*, *N-Cadherin* and *Vimentin* in JEG-3 cells, using β -actin as an internal reference protein. ** $P < 0.01$ compared with Control group.

图4 敲低 *PLOD2* 对 HTR-8/SVneo 和 JEG-3 细胞 EMT 过程的影响

Fig.4 The effect of *PLOD2* knockdown on the EMT process of HTR-8/SVneo and JEG-3 cells

CL16A3 是 SLC16 家族编码的跨膜蛋白成员之一, 参与低氧调控、癌症转移等。在结肠癌细胞中, 低氧通过 NF- κ B 通路抑制 ZBTB7A 和 FBI-1 因子, 激活 *SLC16A3* 的转录, 激活乳酸外排并形成低 pH 的微环境, 协助癌细胞侵袭^[36]。*SYDE1* 是突触缺陷蛋白 1 同源物家族编码的成员之一, 在滋养细胞中特异性表达, 主要功能是促进细胞信号转导、细胞迁移。低氧在人胎盘中可以诱导 *GCM1* 及其下游因子 *SYDE1*, 并激活 GTPases 的表达, 促进滋养细胞的细胞骨架重塑、细胞迁移和侵袭^[37-38]。此外, *SYDE1* 作为间质标记基因, 在卵巢上皮癌细胞系 SKOV-3 细胞中通过抑

制 E-CAD, 来促进 EMT 过程^[39]。这提示了低氧诱导的 *SLC16A3*、*SYDE1* 可能是 EVT 分化的潜在靶标。本研究通过对 HTR-8/SVneo 细胞进行生理性低氧处理后下调了 *NREP* 和 *CD4* 的表达。进一步过表达 HIF1 α 下调了 *NREP* 的表达, 但是对 *CD4* 的表达没有影响。根据文献查阅, *HIF2 α* 基因敲除上调了小鼠结肠 *CD4* 的表达, 而 *HIF1 α* 基因敲除无法提升 *CD4* 表达, 提示 *CD4* 在低氧条件下的上调表达可能主要受其他转录因子的调控, 而受 HIF1 α 调控较小或不受 HIF1 α 调控^[40]。然而这些基因在 EVT 分化中的作用仍有待深入研究。

参考文献 (References)

- [1] JI L, BRKIĆ J, LIU M, et al. Placental trophoblast cell differentiation: physiological regulation and pathological relevance to preeclampsia [J]. *Mol Aspects Med*, 2013, 34(5): 981-1023.
- [2] ADU-GYAMFI E A, CZIKA A, GORLEKU P N, et al. The involvement of cell adhesion molecules, tight junctions, and gap junctions in human placentation [J]. *Reprod Sci*, 2021, 28(2): 305-20.
- [3] CHANG W L, LIU Y W, DANG Y L, et al. PLAC8, a new marker for human interstitial extravillous trophoblast cells, promotes their invasion and migration [J]. *Development*, 2018, 145(2): dev148932.
- [4] MENKHORST E, WINSHIP A, VAN SINDEREN M, et al. Human extravillous trophoblast invasion: intrinsic and extrinsic regulation [J]. *Reprod Fertil Dev*, 2016, 28(4): 406-15.
- [5] CHADDHA V, VIERO S, HUPPERTZ B, et al. Developmental biology of the placenta and the origins of placental insufficiency [J]. *Semin Fetal Neonatal Med*, 2004, 9(5): 357-69.
- [6] PAULE S, LI Y, NIE G. Cytoskeletal remodelling proteins identified in fetal-maternal interface in pregnant women and rhesus monkeys [J]. *J Mol Histol*, 2011, 42(2): 161-6.
- [7] REDLINE R W, PATTERSON P. Pre-eclampsia is associated with an excess of proliferative immature intermediate trophoblast [J]. *Hum Pathol*, 1995, 26(6): 594-600.
- [8] CANIGGIA I, WINTER J, LYE S J, et al. Oxygen and placental development during the first trimester: implications for the pathophysiology of pre-eclampsia [J]. *Placenta*, 2000, 21(suppl 1): 25-30.
- [9] CHANG C W, WAKELAND A K, PARAST M M. Trophoblast lineage specification, differentiation and their regulation by oxygen tension [J]. *J Endocrinol*, 2018, 236(1): R43-56.
- [10] YAMANAKA-TATEMATSU M, NAKASHIMA A, FUJITA N, et al. Autophagy induced by HIF1 α overexpression supports trophoblast invasion by supplying cellular energy [J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): e76605.
- [11] TREISSMAN J, YUAN V, BALTAYEVA J, et al. Low oxygen enhances trophoblast column growth by potentiating differentiation of the extravillous lineage and promoting LOX activity [J]. *Development*, 2020, 147(2): dev181263.
- [12] STANEK J. Hypoxic patterns of placental injury: a review [J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2013, 137(5): 706-20.
- [13] GRAHAM C H, POSTOVIT L M, PARK H, et al. Adriana and Luisa Castellucci award lecture 1999: role of oxygen in the regulation of trophoblast gene expression and invasion [J]. *Placenta*, 2000, 21(5/6): 443-50.
- [14] CANIGGIA I, GRISARU-GRAVNOSKY S, KULISZEWSKY M, et al. Inhibition of TGF- β 3 restores the invasive capability of extravillous trophoblasts in preeclamptic pregnancies [J]. *J Clin Invest*, 1999, 103(12): 1641-50.
- [15] GENBACEV O, ZHOU Y, LUDLOW J W, et al. Regulation of human placental development by oxygen tension [J]. *Science*, 1997, 277(5332): 1669-72.
- [16] DASILVA-ARNOLD S, JAMES J L, AL-KHAN A, et al. Differentiation of first trimester cytotrophoblast to extravillous trophoblast involves an epithelial-mesenchymal transition [J]. *Placenta*, 2015, 36(12): 1412-8.
- [17] WAKELAND A K, SONCIN F, MORETTO-ZITA M, et al. Hypoxia directs human extravillous trophoblast differentiation in a hypoxia-inducible factor-dependent manner [J]. *Am J Pathol*, 2017, 187(4): 767-80.
- [18] TIAN Q, XUE Y, ZHENG W, et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α induces migration and invasion through Notch signaling [J]. *Int J Oncol*, 2015, 47(2): 728-38.
- [19] YU N, WU J L, XIAO J, et al. HIF-1 α regulates angiogenesis via Notch1/STAT3/ETBR pathway in trophoblastic cells [J]. *Cell Cycle*, 2019, 18(24): 3502-12.
- [20] ANTON L, DE VINE A, POLYAK E, et al. HIF-1 α stabilization increases miR-210 eliciting first trimester extravillous trophoblast mitochondrial dysfunction [J]. *Front Physiol*, 2019, 10: 699.
- [21] LIU Y, FAN X, WANG R, et al. Single-cell RNA-seq reveals the diversity of trophoblast subtypes and patterns of differentiation in the human placenta [J]. *Cell Res*, 2018, 28(8): 819-32.
- [22] SOARES M J, IQBAL K, KOZAI K. Hypoxia and placental development [J]. *Birth Defects Res*, 2017, 109(17): 1309-29.
- [23] HIGHET A R, ZHANG V J, HEINEMANN G K, et al. Use of Matrigel in culture affects cell phenotype and gene expression in the first trimester trophoblast cell line HTR8/SVneo [J]. *Placenta*, 2012, 33(7): 586-8.
- [24] HAYASHI M, SAKATA M, TAKEDA T, et al. Up-regulation of c-met protooncogene product expression through hypoxia-inducible factor-1 α is involved in trophoblast invasion under low-oxygen tension [J]. *Endocrinology*, 2005, 146(11): 4682-9.
- [25] NAKASHIMA A, YAMANAKA-TATEMATSU M, FUJITA N, et al. Impaired autophagy by soluble endoglin, under physiological hypoxia in early pregnant period, is involved in poor placentation in preeclampsia [J]. *Autophagy*, 2013, 9(3): 303-16.
- [26] NODA T, YAMAMOTO H, TAKEMASA I, et al. PLOD2 induced under hypoxia is a novel prognostic factor for hepatocellular carcinoma after curative resection [J]. *Liver Int*, 2012, 32(1): 110-8.
- [27] QI Y, XU R. Roles of PLODs in collagen synthesis and cancer progression [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2018, 6: 66.
- [28] ROSELL-GARCÍA T, PALOMO-ÁLVAREZ O, RODRÍGUEZ-PASCUAL F. A hierarchical network of hypoxia-inducible factor and SMAD proteins governs procollagen lysyl hydroxylase 2 induction by hypoxia and transforming growth factor β 1 [J]. *J Biol Chem*, 2019, 294(39): 14308-18.
- [29] SONG Y, ZHENG S, WANG J, et al. Hypoxia-induced PLOD2 promotes proliferation, migration and invasion via PI3K/Akt signaling in glioma [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(26): 41947-62.
- [30] WAN J, QIN J, CAO Q, et al. Hypoxia-induced PLOD2 regulates invasion and epithelial-mesenchymal transition in endometrial carcinoma cells [J]. *Genes Genomics*, 2020, 42(3): 317-24.
- [31] HE J Y, WEI X H, LI S J, et al. Adipocyte-derived IL-6 and leptin promote breast cancer metastasis via upregulation of lysyl hydroxylase-2 expression [J]. *Cell Commun Signal*, 2018, 16(1): 1-19.
- [32] SHI FANG YAN, TRITTO I, PINSKY D, et al. Induction of interleukin 6 (IL-6) by hypoxia in vascular cells. Central role of the binding site for nuclear factor-IL-6 [J]. *J Biol Chem*, 1995, 270(19): 11463-71.
- [33] RAUSCH L K, HOFER M, PRAMSOHLER S, et al. Adiponectin, leptin and visfatin in hypoxia and its effect for weight loss in obesity [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2018, 9: 615.

- [34] TAUSENDSCHÖN M, REHLI M, DEHNE N, et al. Genome-wide identification of hypoxia-inducible factor-1 and -2 binding sites in hypoxic human macrophages alternatively activated by IL-10 [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1849(1): 10-22.
- [35] LURIER E B, DALTON D, DAMPIER W, et al. Transcriptome analysis of IL-10-stimulated (M2c) macrophages by next-generation sequencing [J]. *Immunobiology*, 2017, 222(7): 847-56.
- [36] CHOI S H, KIM M Y, YOON Y S, et al. Hypoxia-induced RelA/p65 derepresses SLC16A3 (MCT4) by downregulating ZBTB7A [J]. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*, 2019, 1862(8): 771-85.
- [37] MCCAIG D, LYALL F. Hypoxia upregulates GCM1 in human placenta explants [J]. *Hypertens Pregnancy*, 2009, 28(4): 457-72.
- [38] LO H F, TSAI C Y, CHEN C Y C P, et al. Association of dysfunctional synapse defective 1 (SYDE1) with restricted fetal growth-SYDE1 regulates placental cell migration and invasion [J]. *J Pathol*, 2017, 241(3): 324-36.
- [39] HUANG R Y J, KUAY K T, TAN T Z, et al. Functional relevance of a six mesenchymal gene signature in epithelial-mesenchymal transition (EMT) reversal by the triple angiokinase inhibitor, nintedanib (BIBF1120) [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(26): 22098-113.
- [40] KERBER E L, PADBERG C, KOLL N, et al. The importance of hypoxia-inducible factors (Hif-1 and hif-2) for the pathophysiology of inflammatory bowel disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(22): 1-27.