

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.07.006

HIF-1 α /VEGF 在稽留流产患者绒毛组织中的表达及其与微血管密度的关系 *

石紫云¹ 张颖² 折开娥¹ 刘飞飞¹ 刘艳丽¹ 袁晓华^{1 Δ}

(1 陕西省人民医院产科 陕西 西安 710068; 2 空军第 986 医院南区妇产科 陕西 西安 710054)

摘要 目的:探讨缺氧诱导因子 1 α (HIF-1 α)/ 血管内皮生长因子(VEGF)在稽留流产患者绒毛组织中的表达及其与微血管密度的关系。**方法:**采用免疫组织化学方法分别检测了 30 例人工流产和 30 例稽留流产患者绒毛组织的微血管密度(MVD)、HIF-1 α 和 VEGF 的表达。分别在缺氧(1% O₂, 5% CO₂ 和 94% N₂)和常氧(20% O₂, 5% CO₂ 和 75% N₂)条件下培养 HTR8/SVneo 细胞,并通过转染 HIF-1 α siRNA 来敲低 HIF-1 α 。通过 qRT-PCR 和 Western blot 分析 HTR8/SVneo 细胞中 HIF-1 α 和 VEGF 的 mRNA 和蛋白表达。此外,通过小管形成实验评价缺氧及转染 HIF-1 α siRNA 对 HTR8/SVneo 细胞小管形成的影响。**结果:**稽留流产组织样本中的 MVD 显著低于人工流产(7.22 $\pm$ 0.55 vs 14.65 $\pm$ 1.12, $P<0.05$)。HIF-1 α 和 VEGF 在稽留流产组织中的表达显著低于人工流产组织($P<0.05$)。HIF-1 α 和 VEGF 的表达均与 MVD 显著正相关。与常氧相比,缺氧可显著上调 HIF-1 α 和 VEGF 的 mRNA 和蛋白水平 ($P<0.05$)。转染 HIF-1 α siRNA 显著下调 HIF-1 α 和 VEGF 的 mRNA 和蛋白水平 ($P<0.05$)。与常氧相比,缺氧可显著促进 HTR8/SVneo 细胞的小管形成($P<0.05$),而转染 HIF-1 α siRNA 则可显著抑制显 HTR8/SVneo 细胞的小管形成($P<0.05$)。**结论:**胎盘发育过程中的缺氧环境丢失及 HIF-1 α /VEGF 的抑制可能是稽留流产发病的一项机制。

关键词:稽留流产;血管生成;缺氧;缺氧诱导因子-1 α ;血管内皮生长因子

中图分类号:R-33;R714.21 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2020)07-1230-06

Expression of HIF-1 α / VEGF in Villus Tissues of Missed Abortion Patients and Its Relationship with Microvessel Density*

SHI Zi-yun¹, ZHANG Ying², SHE Kai-e¹, LIU Fei-fei¹, LIU Yan-li¹, YUAN Xiao-hua^{1 Δ}

(1 Department of Obstetrical, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an, Shaanxi, 710068, China;

2 Department of Obstetrical, The 986th Hospital of PLA Air Force, Xi'an, Shaanxi, 710054, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the expression of HIF-1 α /VEGF in villus tissues of patients with missed abortion and its relationship with microvessel density. **Methods:** Immunohistochemical method was used to detect the microvessel density (MVD), expression of HIF-1 α and VEGF in villus tissue of 30 cases of induced abortion and 30 cases of missed abortion. HTR8/SVneo cells were cultured under hypoxic (1% O₂, 5% CO₂, 94% N₂) and normoxic (20% O₂, 5% CO₂, 75% N₂) conditions, respectively, and HIF-1 α expression was knocked down by transfection of HIF-1 α siRNA. The mRNA and protein expression of HIF-1 α and VEGF in HTR8/SVneo cells were analyzed by qRT-PCR and Western blot. In addition, the effects of hypoxia and HIF-1 α siRNA on tubule formation of HTR8/SVneo cells were evaluated by tubule formation experiments. **Results:** The MVD in the missed abortion tissues was significantly lower than that of induced abortion tissues (7.22 $\pm$ 0.55 vs 14.65 $\pm$ 1.12, $P<0.05$). The expression of HIF-1 α and VEGF in missed abortion tissues was significantly lower than that in induced abortion tissues ($P<0.05$). Both HIF-1 α and VEGF expression were significantly positively correlated with MVD. Hypoxia significantly up-regulated the mRNA and protein levels of HIF-1 α and VEGF compared with normoxia ($P<0.05$). Transfection of HIF-1 α siRNA significantly down-regulated the mRNA and protein levels of HIF-1 α and VEGF ($P<0.05$). Compared with normoxia, hypoxia significantly promoted tubule formation in HTR8/SVneo cells ($P<0.05$), whereas transfection of HIF-1 α siRNA significantly inhibited tubule formation in HTR8/SVneo cells ($P<0.05$). **Conclusions:** Loss of hypoxic environment and inhibition of HIF-1 α /VEGF during placental development may be a mechanism for the occurrence of missed abortion.

Key words: Missed abortion; Angiogenesis; Hypoxia; Hypoxia-inducible factor-1 α ; Vascular endothelial growth factor

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R714.21 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2020)07-1230-06

* 基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(81200418);陕西省科技创新基地-科技资源开放共享平台项目(2018PT-12)

作者简介:石紫云(1974-),女,硕士,副主任医师,研究方向:围产医学与优生优育,电话:18192816635, E-mail: PurClShi@163.com

Δ 通讯作者:袁晓华(1979-),女,博士,副研究员,研究方向:生殖遗传, E-mail: tianbolong2008@163.com

(收稿日期:2019-10-23 接受日期:2019-11-18)

前言

血管生成是胎儿和胎盘发育中最重要的因素,在妊娠的前三个月,分化的胎盘滋养层细胞(称为绒毛外细胞滋养层细胞, extravillous trophoblast, EVT)侵入母体血管,促进胎盘着床,并重塑螺旋动脉,导致血液流向绒毛内^[1-4]。血管内绒毛外细胞滋养层细胞侵袭不足会使血管系统发生紊乱及血管新生受损,从而导致胎盘功能不全等多种妊娠障碍^[5]。

胎盘血管生成依赖于各种生长因子和许多信号通路,例如血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)及其受体^[6,7]。低氧环境在妊娠早期胎盘中对于调节滋养层功能非常重要,并且对于早期胎盘发育是至关重要的。因此,妊娠早期的低氧环境可能对于绒毛外细胞滋养层细胞的生长扩张有重要意义。已知缺氧诱导因子 1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)可调节细胞对低氧条件的适应性,稳定的 HIF-1 α 易位至细胞核并与几种靶基因(如 VEGF)的缺氧反应元件结合,从而参与血管生成的调节。据报道,VEGF 在低氧条件下也会被上调^[8]。

前人研究显示 HIF-1 α /VEGF 信号通路在血管生成和肿瘤生长中起关键作用^[9-11]。尽管 HIF-1 α /VEGF 在绒毛血管生成中的作用尚不清楚,但考虑到滋养细胞和癌细胞之间的相似性,本研究预测其在胎盘血管生成中的作用可能类似于其在癌症中的作用。因此,本研究评估了 HIF-1 α /VEGF 的表达及人工流产和稽留流产组织样本中微血管密度(microvessel density, MVD),并考察了 HIF-1 α /VEGF 在 HTR8/SVneo 细胞系小管形成中的作用。

1 材料与方法

1.1 人绒毛组织的收集

收集我院妊娠早期进行选择性人工流产($n=30$)和稽留流产($n=30$)的孕妇绒毛组织。纳入标准:(1)妊娠 6-10 周;(2)年龄 20-40 岁;(3)血常规检查各项指标正常;(4)妊娠期间均未服用过保胎药物;(5)无心肝肾功能不全、恶性肿瘤、遗传性疾病及其他严重疾病。排除标准:(1)妊娠时间小于 6 周或大于 10 周;(2)年龄小于 20 岁或大于 40 岁;(3)血常规指标异常、伴有其他严重疾病、妊娠期间服用保胎药物;(4)未签订知情同意的患者。人工流产患者的年龄为(25.21 ± 6.39)岁,平均孕周为(6.56 ± 1.64)周;稽留流产患者的年龄为(26.52 ± 5.71)岁,平均孕周为(6.73 ± 1.55)周。两组患者的年龄和孕周无显著差异($P < 0.05$)。将绒毛组织样本固定在 10%中性福尔马林中用于进一步的免疫组织化学研究。

1.2 实验方法

1.2.1 HTR8/SVneo 细胞的培养 人胎盘绒毛膜滋养层细胞系 HTR8/SVneo 购自中国科学院上海细胞库。在常氧或低氧条件下,将细胞培养在含有 5%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基(美国 GIBCO 公司)中。在含有 20% O₂、5% CO₂ 和 75% N₂ 的 37℃ 环境中进行常氧培养^[12]。在 1% O₂、5% CO₂ 和 94% N₂ 的 37℃ 环境中进行缺氧培养^[13,14]。细胞达到约 80%融合后,分别将细胞进行常氧和低氧培养 24 h。

1.2.2 免疫组化 采用链霉抗生物素蛋白-过氧化物酶(SP)免疫组化染色法检测绒毛组织样本中 HIF-1 α 、VEGF 和 CD34 的表达。根据试剂盒说明书(英国 Abcam 公司),使用兔抗人

HIF-1 α (1:1000 稀释)、VEGF(1:1000 稀释)和 CD34(1:2000 稀释)抗体作为一抗。用 PBS 缓冲液代替一抗作为阴性对照。辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 抗体(1:1000 稀释,英国 Abcam 公司)作为二抗。根据制造商的说明使用 DAB 底物试剂盒(英国 Abcam 公司)分析样品。通过光学显微镜随机选择 5 个视野(400 $\times$)拍摄切片。使用 Image-Pro plus 6.0 软件分析图像的平均光密度。根据 Foote 等报道的方法,通过计数高倍镜(400 $\times$)的 CD34 染色血管来评估微血管密度(MVD)^[15]。

1.2.3 qRT-PCR 通过 qRT-PCR 检测 HTR8/SVneo 细胞中 HIF-1 α 和 VEGF 的 mRNA 表达水平。用 TRIzol 试剂(日本 Takara 公司)从 HTR8/SVneo 细胞中提取总 RNA。通过 NanoDrop 2000 超微量分光光度计评估 RNA 的纯度和浓度。反应体系为 20 μ L,逆转录条件为 37℃ 15 min,85℃ 5 min。然后将第一链 cDNA 用作 mRNA 扩增的模板,使用 SYBR Green Master Mix(南京诺唯赞生物科技有限公司)进行扩增。人甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)用作对照。使用 ABI StepOne 系统(美国 Applied Bio-Systems 公司)根据制造商的说明进行 qRT-PCR,引物如下:HIF-1 α (正向:5'-TTGTCACGCTCATCTTCCAGTC-3',反向:5'-ATTCATTGTCTTCCTGTGCAGCAA-3'),VEGF-A (正向:5'-CGGCCAGGTGTGCCAGAGTGT-3',反向:5'-CAGGTTGCAGATCTGCATATG-3'),GADPH (正向:5'-GAAGTCGAGAGTTCGGGT T-3',反向:5'-GATTCCTCGTCATCTCAGCAG-3')。反应程序如下:95℃ 30 s,95℃ 10 s 和 60℃ 30 s,40 个循环。用 2^{- $\Delta\Delta$ CT}方法测定基因的相对表达。

1.2.4 蛋白质印迹分析 用冰 PBS 洗涤细胞 3 次,并在加入蛋白酶抑制剂混合物的冰裂解缓冲液中裂解(德国 Roche 公司)。然后用 BCA 试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)测定蛋白质浓度。在 SDS-PAGE 上分离体积为 20 μ g 的每种样品,然后转移至 PVDF 膜,并用 5%脱脂牛奶封闭 1 h。将膜在 4℃ 下与一抗抗 HIF-1 α (1:1000 稀释)、VEGF (1:2000 稀释)和 GAPDH(1:1000 稀释)过夜孵育,抗体购自英国 Abcam 公司。然后将膜在 0.1%吐温磷酸盐缓冲液(PBST)中洗涤两次,每次 10 min,然后将膜在室温下与山羊抗兔二抗孵育 60 min。抗体均购自英国 Abcam 公司。通过超敏 ECL 化学发光试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)进行显影。GAPDH 作为内部对照并计算相对表达量。

1.2.5 siRNA 转染 使用 Lipofectamine RNAiMAX 转染试剂(德国 Roche 公司)根据制造商的说明书进行 siRNA 转染。转染前一天,将 250 μ L 不含抗生素的生长培养基加入 24 孔板中,然后接种 3.0×10^4 个细胞。转染时细胞密度达到 30%-50% 融合,用靶向 HIF-1 α 的 siRNA(si-HIF-1 α)及阴性对照 siRNA (si-NC)转染细胞。将细胞在低氧条件下于 37℃ 孵育 24 h。

1.2.6 小管形成测定 参考文献^[16]方法进行小管形成实验。将基质胶生长因子减少型(美国 BD Biosciences 公司)用无血清培养基以 1:2 的比例稀释,并在冰上加入 24 孔板中(每孔 150 mL)。在基质胶混合物固化后,将各组 HTR8/SVneo 细胞缓慢加入每个孔中(每孔 1.0×10^5),然后进行常规或低氧培养 12 h。使用倒置相差显微镜拍摄三个随机视野的显微照片,计数形成小管的分支点数。

1.3 统计分析

使用 SPSS 18.0 软件进行统计分析。所有数据均表示为平

均值±标准差。通过 Student's t 检验或单因素方差分析(ANOVA) 进行组间比较,使用 Tukey 检验进行多重比较。使用 Pearson 相关分析进行相关分析。 $P<0.05$ 表示差异在统计学上具有显著性。

2 结果

2.1 人工流产和稽留流产组织样本中的微血管密度(MVD)比较

本研究检测了人工流产和稽留流产组织样本中的微血管密度(MVD),人工流产和稽留流产患者的年龄、孕龄等方面无显著差异。结果显示,稽留流产组织样本中的 MVD 显著低于人工流产(7.22 ± 0.55 vs 14.65 ± 1.12 , $P<0.05$)。见图 1。

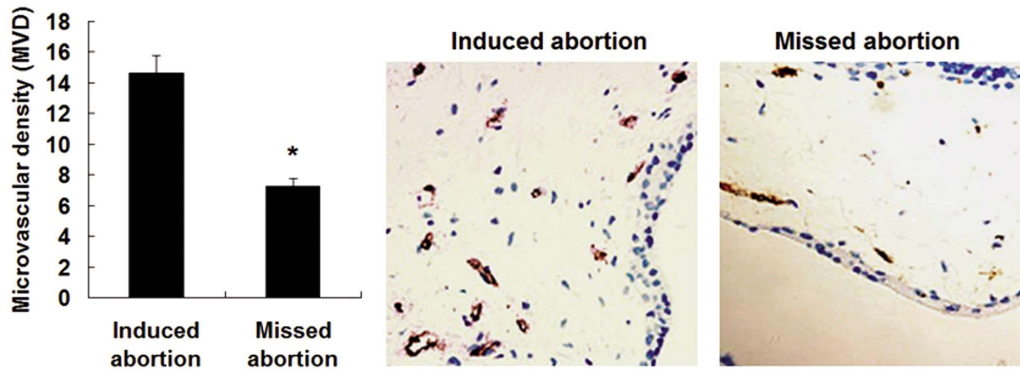


图 1 人工流产和稽留流产组织样本中的微血管密度(MVD)(× 400)

Fig.1 Microvessel density (MVD) in induced abortion and missed abortion tissue samples (× 400)

Note: Compared with the induced abortion group, $*P<0.05$.

2.2 人工流产和稽留流产组织样本中 HIF-1 α 和 VEGF 的表达情况

结果显示,HIF-1 α 在稽留流产组织中的表达显著低于人

工流产组织(0.33 ± 0.03 vs 0.54 ± 0.05 , $P<0.05$)。此外,VEGF 在稽留流产组织中的表达显著低于人工流产组织 (0.41 ± 0.03 vs 0.63 ± 0.06 , $P<0.05$)。见图 2。

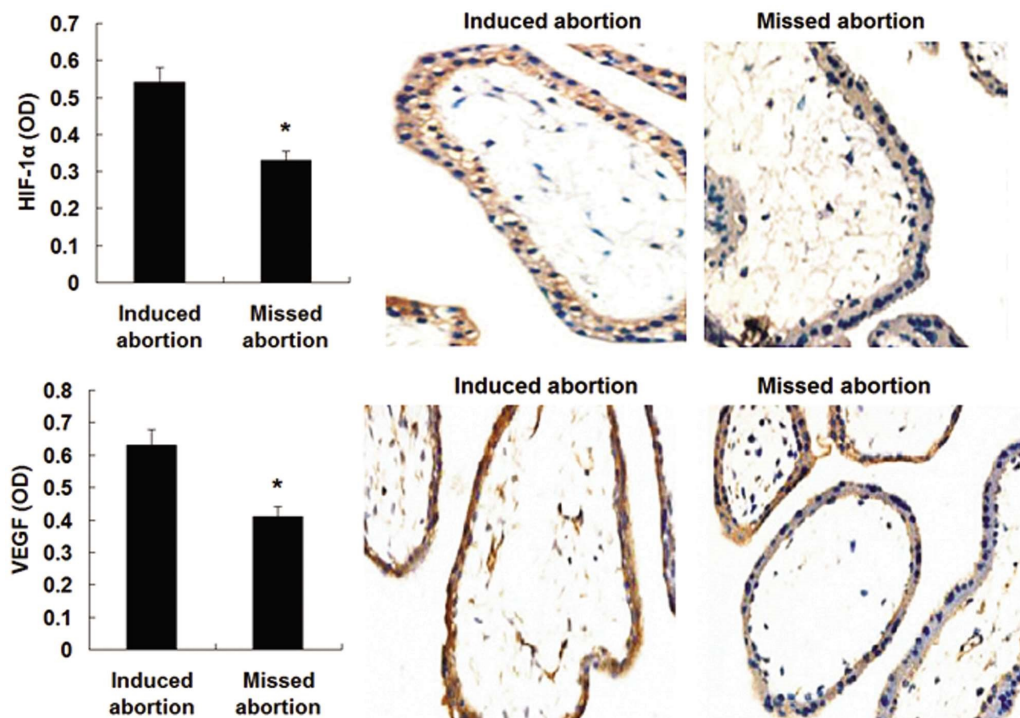


图 2 人工流产和稽留流产组织样本中 HIF-1 α 和 VEGF 的表达 (× 400)

Fig.2 Expression of HIF-1 α and VEGF in induced abortion and missed abortion tissue samples (× 400)

Note: Compared with the induced abortion group, $*P<0.05$.

2.3 HIF-1 α /VEGF 与微血管密度(MVD)的相关性

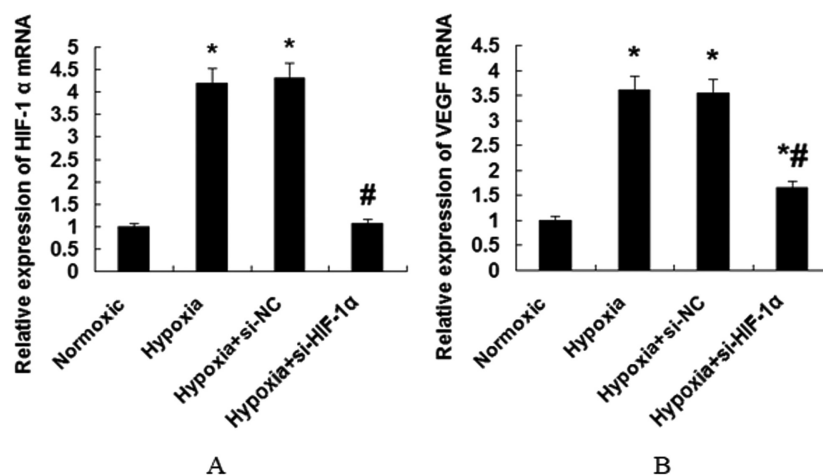
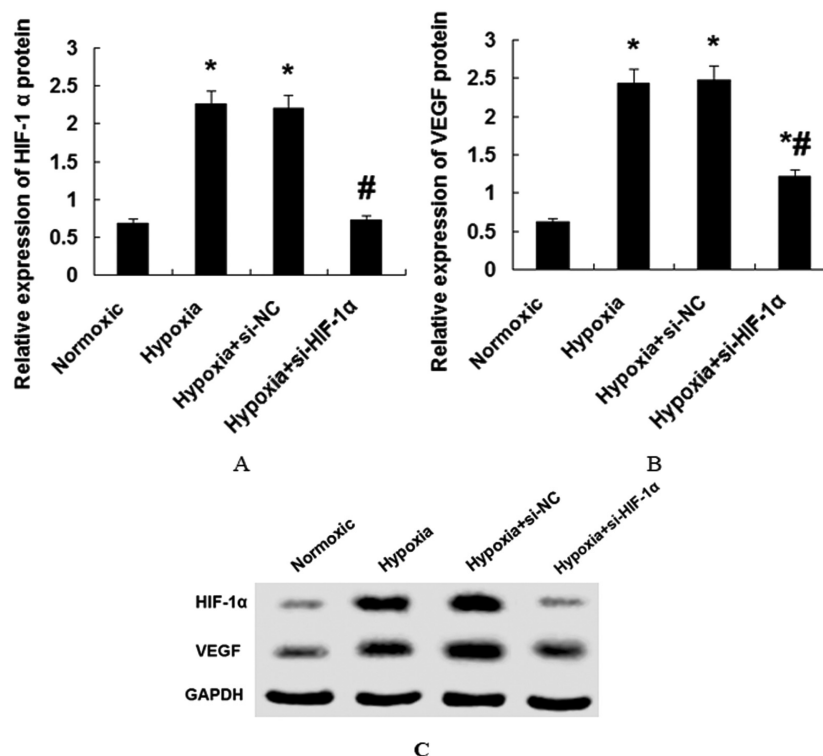
相关性分析结果显示,两组中 HIF-1 α 和 VEGF 的表达均与 MVD 显著正相关。表明 HIF-1 α /VEGF 信号通路正向调节滋养细胞中的血管生成。见表 1。

2.4 缺氧及转染 HIF-1 α siRNA 对 HTR8/SVneo 细胞中 HIF-1 α 和 VEGF 表达的影响

为了确定 HIF-1 α /VEGF 在 HTR8/SVneo 细胞系中的表达,本研究用 qRT-PCR 和 Western blot 检测了 HIF-1 α 和 VEGF 的 mRNA 和蛋白质表达。结果显示,与常氧相比,缺氧可显著上调 HIF-1 α 和 VEGF 的 mRNA 和蛋白水平($P<0.05$)。此外,转染 HIF-1 α siRNA 显著下调 HIF-1 α 和 VEGF 的 mRNA 和蛋白水平($P<0.05$)。见图 3 和图 4。

表 1 HIF-1 α / VEGF 与微血管密度(MVD)的相关性Table 1 The correlation between HIF-1 α /VEGF and microvessel density (MVD)

Correlation		Induced abortion			Missed abortion		
		HIF-1 α	VEGF	MVD	HIF-1 α	VEGF	MVD
Induced abortion	HIF-1 α	1					
	VEGF	0.757*	1				
	MVD	0.633*	0.598*	1			
Missed abortion	HIF-1 α	0.679*	0.446*	0.348*	1		
	VEGF	0.437*	0.648*	0.387*	0.726*	1	
	MVD	0.489*	0.389*	0.559*	0.673*	0.737*	1

Note: * Indicates significant difference, $P < 0.05$.图 3 缺氧及转染 HIF-1 α siRNA 对 HTR8/SVneo 细胞中 HIF-1 α 和 VEGF mRNA 表达的影响Fig. 3 Effect of hypoxia and transfection of HIF-1 α siRNA on HIF-1 α and VEGF mRNA expression in HTR8/SVneo cellsNote: A: HIF-1 α ; B: VEGF; Compared with normoxic group, * $P < 0.05$; Compared with hypoxia+si-NC group, # $P < 0.05$.图 4 缺氧及转染 HIF-1 α siRNA 对 HTR8/SVneo 细胞中 HIF-1 α 和 VEGF 蛋白表达的影响Fig. 4 Effect of hypoxia and transfection of HIF-1 α siRNA on HIF-1 α and VEGF protein expression in HTR8/SVneo cellsNote: A: HIF-1 α ; B: VEGF; C: typical band of Western blot; Compared with normoxic group, * $P < 0.05$; Compared with hypoxia+si-NC group, # $P < 0.05$.

2.5 缺氧及转染 HIF-1 α siRNA 对 HTR8/SVneo 细胞小管形成的影响

结果显示,与常氧相比,缺氧可显著促进 HTR8/SVneo 细

胞的小管形成($P<0.05$),而转染 HIF-1 α siRNA 则可显著抑制显 HTR8/SVneo 细胞的小管形成($P<0.05$)。见图 5。

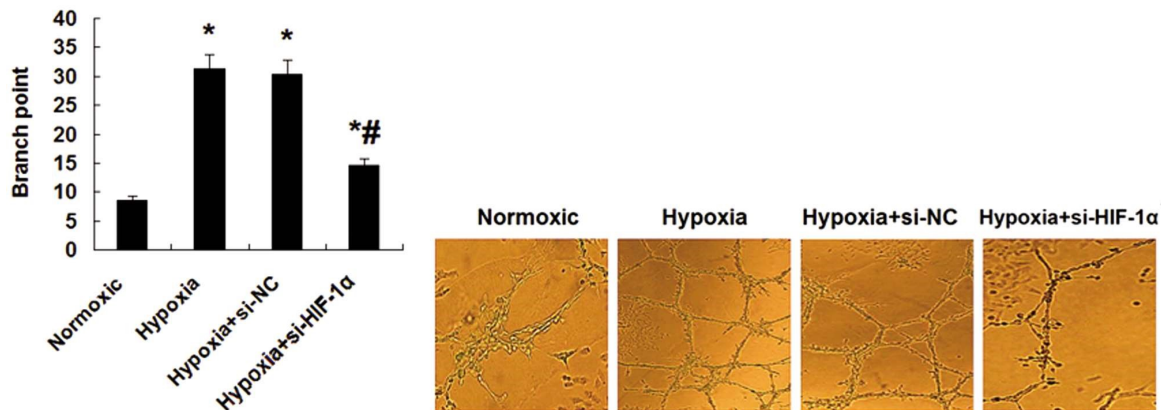


图5 缺氧及转染 HIF-1 α siRNA 对 HTR8/SVneo 细胞小管形成的影响

Fig.5 Effect of hypoxia and transfection of HIF-1 α siRNA on HTR8/SVneo cell tubule formation

Note: Compared with normoxic group, * $P<0.05$; Compared with hypoxia+si-NC group, # $P<0.05$.

3 讨论

遗传因素、内分泌因素和解剖因素等多种因素均可导致稽留流产,然而,由于 50%的稽留流产病例的病理生理机制尚未完全了解,最近有研究显示异常血管生成是导致稽留流产的重要原因^[17-19]。人胎盘发育与血管系统的形成密切相关,胎盘血管网络的建立非常复杂,主要包括血管发生和血管生成两个要过程,血管生成过程包括血管的出芽、内填和延长。前人研究报道,氧分压、炎症因子、氧化应激、等均可影响胎盘血管形成,并引起胎盘功能障碍^[20-22]。据报道,胎盘血管系统紊乱与复发性自然流产、先兆子痫、胎儿窘迫等不良妊娠密切相关。母体螺旋动脉的重塑涉及滋养层侵袭和 EVT 分化,其中 EVT 形成子宫血管的内层^[1]。侵入血管内的滋养细胞限制了血流并阻断了螺旋小动脉,从而维持了 1%-2%的低氧环境。在稽留流产等妊娠相关疾病中胎盘血管化改变的病理机制尚未完全揭示,因此,确定胎盘血管形成发生的机制对于稽留流产的生物标志物筛选和靶向治疗非常。本研究检测了人工流产和稽留流产组织样本中的微血管密度(MVD),发现稽留流产组织样本中的 MVD 显著低于人工流产,提示稽留流产与异常胎盘血管形成有关。

据报道,缺氧是保持胎盘血管生成的重要因素,缺氧参与调控毛细血管的形成和内皮细胞的迁移^[23]。缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)信号转换是胎儿发育所必需的。HIF-1 α 是各种细胞对低氧反应的主要调控因子,其在人体内广泛表达。前人研究显示,缺氧可诱导 HIF-1 α 高表达并激活其下游缺氧反应基因,从而调节血管生成等一系列生理过程^[24]。据报道,血管内皮生长因子(VEGF)是 HIF-1 α 信号传导途径的下游靶标,前人研究已经证实 VEGF 家族调节胎盘血管生成和母体螺旋动脉重塑。在滋养层细胞内,HIF-1 α / VEGF 可能调节缺氧反应、血管生成等多种功能^[25,26]。本研究发现,HIF-1 α 和 VEGF 在稽留流产组织中的表达显著低于人工流产组织,说明 HIF-1 α / VEGF 信号在稽留流产组织中被抑制。此外,相关性分析显示,HIF-1 α 和 VEGF 的表达均与 MVD 显著正相关。表明 HIF-1 α / VEGF 信号通路正向调节滋养细胞中的血管生成。

其他研究者报道,在正常足月胎盘分离的原代人滋养细胞中,缺氧可上调 HIF-1 α 蛋白和 mRNA 表达^[27]。此外,在缺氧处理的人滋养层细胞系 HTR8/SVneo 中也取得了相同的结果^[28]。之前的报道显示,HTR-8/SVneo 细胞在基质胶上生长时,在形成管状结构网络的能力方面表现出内皮细胞样行为^[29]。本研究检测了 HTR8 / SVneo 细胞系中 HIF-1 α 和 VEGF 的 mRNA 和蛋白质表达。发现与常氧相比,缺氧可显著上调 HIF-1 α 和 VEGF 的 mRNA 和蛋白水平($P<0.05$)。与上述结果一致。然而,另一项研究发现,在早期人类胎盘中,缺氧对这些转录因子的调节发生在蛋白质水平而非 mRNA 的水平^[30]。缺氧条件下 HIF-1 α mRNA 调控的这些明显矛盾的原因尚不清楚,可能与各研究中的缺氧条件和细胞类型有关。此外,转染 HIF-1 α siRNA 显著下调 HIF-1 α 和 VEGF 的 mRNA 和蛋白水平($P<0.05$)。表明缺氧对 VEGF 表达的调节作用是通过 HIF-1 α 介导的。现在已经确定 VEGF 是影响血管生成的最有效因子,一些研究表明 VEGF 的低表达与早期妊娠障碍有关^[31-35]。本研究表明 HIF-1 α / VEGF 在稽留流产等胎盘功能不全相关的妊娠障碍的发展中起重要作用。

此外,本研究发现,与常氧相比,缺氧可显著促进 HTR8/SVneo 细胞的小管形成($P<0.05$),而转染 HIF-1 α siRNA 则可显著抑制显 HTR8/SVneo 细胞的小管形成($P<0.05$)。表明在正常胎盘组织中,缺氧条件上调了人胎盘绒毛膜滋养层细胞的 HIF-1 α 表达,从而激活了其下游靶标 VEGF 的表达,进而促进胎盘绒毛血管生成。提示胎盘发育过程中的缺氧环境丢失及 HIF-1 α / VEGF 的抑制可能是稽留流产发病的一项机制。

参考文献(References)

- [1] Moser G, Weiss G, Sundl M, et al. Extravillous trophoblasts invade more than uterine arteries: evidence for the invasion of uterine veins [J]. *Histochemistry and Cell Biology*, 2017, 147(3): 353-366
- [2] Chang X, Li H, Li Y, et al. RhoA/MLC signaling pathway is involved in Δ^9 -tetrahydrocannabinol-impaired placental angiogenesis[J]. *Toxicology Letters*, 2018, 285: 148-155
- [3] Xu F, Ren ZX, Zhong XM, et al. Intrauterine Inflammation Damages Placental Angiogenesis via Wnt5a-Flt1 Activation [J]. *Inflammation*,

- 2019, 42(3): 818-825
- [4] Zhao H, Kalish FS, Wong RJ, et al. Hypoxia regulates placental angiogenesis via alternatively activated macrophages[J]. American Journal of Reproductive Immunology, 2018, 80(Suppl A): e12989
- [5] Windsperger K, Dekan S, Pils S, et al. Extravillous trophoblast invasion of venous as well as lymphatic vessels is altered in idiopathic, recurrent, spontaneous abortions[J]. Human Reproduction, 2017, 32(6): 1208-1217
- [6] Pandya AD, Das MK, Sarkar A, et al. Tube formation in the first trimester placental trophoblast cells: Differential effects of angiogenic growth factors and fatty acids[J]. Cell Biology International, 2016, 40(6): 652-661
- [7] Liu F, Wu W, Wu K, et al. MiR-203 participates in human placental angiogenesis by inhibiting VEGFA and VEGFR2 expression [J]. Reproductive Sciences, 2017, 25(3): 358-365
- [8] Nagano M, Yamashita T, Hamada H, et al. Identification of functional endothelial progenitor cells suitable for the treatment of ischemic tissue using human umbilical cord blood [J]. Blood, 2007, 110(1): 151-160
- [9] Wan J, Chai H, Yu Z, et al. HIF-1 α effects on angiogenic potential in human small cell lung carcinoma[J]. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 2011, 30(1): 77
- [10] Zhang W, Xiong Z, Wei T, et al. Nuclear factor 90 promotes angiogenesis by regulating HIF-1 α /VEGF-A expression through the PI3K/Akt signaling pathway in human cervical cancer [J]. Cell Death & Disease, 2018, 9(3): 276
- [11] Zhang L, Luo X, Chen F, et al. LncRNA SNHG1 regulates cerebrovascular pathologies as a competing endogenous RNA through HIF-1 α /VEGF signaling in ischemic stroke [J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2018, 119(7): 5460-5472
- [12] Chang H J, Ching-Sheng Y, Huang M Y, et al. GLUT1 gene is a potential hypoxic marker in colorectal cancer patients [J]. BMC Cancer, 2009, 9(1): 241-241
- [13] Lopez-Pascual A, Lorente-Cebrián S, Moreno-Aliaga M J, et al. Inflammation stimulates hypoxia-inducible factor-1 α regulatory activity in 3T3-L1 adipocytes with conditioned medium from lipopolysaccharide-activated RAW 264.7 macrophages[J]. Journal of Cellular Physiology, 2018, 234(1): 550-560
- [14] Bauer N, Liu L, Aleksandrowicz E, et al. Establishment of hypoxia induction in an in vivo animal replacement model for experimental evaluation of pancreatic cancer [J]. Oncology Reports, 2014, 32(1): 153-158
- [15] Foote RL, Weidner N, Harris J, et al. Evaluation of tumor angiogenesis measured with microvessel density (MVD) as a prognostic indicator in nasopharyngeal carcinoma: Results of RTOG 9505 [J]. International Journal of Radiation Oncology Biology Physics, 2005, 61(3): 745-753
- [16] Basak S, Sarkar A, Mathapati S, et al. Cellular growth and tube formation of HTR8/SVneo trophoblast: effects of exogenously added fatty acid-binding protein-4 and its inhibitor[J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 2018, 437(1-2): 55-64
- [17] Özçakir T, Thran MA, Simşek F, et al. A comparison of the molecular distribution of proangiogenic factors in endometrium of missed abortions and of voluntary first trimester termination cases [J]. Clinical & Experimental Obstetrics & Gynecology, 2015, 42(1): 40-48
- [18] Xia S, Zhen Y, Ma H, et al. Abnormal expression of microRNA-575 leads to missed abortion through regulating apoptosis and angiogenesis[J]. Experimental & Therapeutic Medicine, 2017, 14(5): 3993-4000
- [19] Zhi Z, Yang W, Liu L, et al. Early missed abortion is associated with villous angiogenesis via the HIF-1 α /VEGF signaling pathway [J]. Archives of Gynecology & Obstetrics, 2018, 298(3): 537-543
- [20] Hirsch AJ, Vhj R, Grigsby PL, et al. Zika virus infection in pregnant rhesus macaques causes placental dysfunction and immunopathology [J]. Nature Communications, 2018, 9(1): 263
- [21] Yougbaré I, Tai WS, Zdravic D, et al. Activated NK cells cause placental dysfunction and miscarriages in fetal alloimmune thrombocytopenia[J]. Nature Communications, 2017, 8(1): 224
- [22] Sández T, Salsoso R, Leiva A, et al. Human umbilical vein endothelium-derived exosomes play a role in foetoplacental endothelial dysfunction in gestational diabetes mellitus [J]. Biochim Biophys Acta, 2017, 1864(2): 499-508
- [23] Dunwoodie SL. The role of hypoxia in development of the mammalian embryo[J]. Developmental Cell, 2009, 17(6): 755-773
- [24] Chang CW, Wakeland AK, Parast MM. Trophoblast lineage specification, differentiation and their regulation by oxygen tension[J]. Journal of Endocrinology, 2018, 236(1): R43-R56
- [25] Tang X, Zhang Q, Shi S, et al. Bisphosphonates suppress insulin-like growth factor 1-induced angiogenesis via the HIF-1 α /VEGF signaling pathways in human breast cancer cells [J]. International Journal of Cancer, 2010, 126(1): 90-103
- [26] 梁琳, 胡东辉, 刘黎明, 等. 稽留流产患者血清和绒毛中 HIF-1 α 和 VEGF 表达水平及其相关性分析 [J]. 现代生物医学进展, 2016, 16(16): 3090-3093
- [27] Nüsken E, Herrmann Y, Wohlfarth M, et al. Strong hypoxia reduces leptin synthesis in purified primary human trophoblasts [J]. Placenta, 2015, 36(4): 427-432
- [28] Wang K, Chen Y, Ferguson SD, et al. MTA1 and MTA3 regulate hif1 α expression in hypoxia-treated human trophoblast cell line HTR8/SVneo[J]. Medical Journal of Obstetrics & Gynecology, 2013, 1(3): 1017
- [29] Wang R, Wang W, Ao L, et al. Benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide suppresses the migration and invasion of human extravillous trophoblast HTR-8/SVneo cells by down-regulating MMP2 through inhibition of FAK/SRC/PI3K/AKT pathway[J]. Toxicology, 2017, 386: 72-83
- [30] Rajakumar A. Expression, ontogeny, and regulation of hypoxia-inducible transcription factors in the human placenta[J]. Biology of Reproduction, 2000, 63(2): 559-569
- [31] Manolea MM, Dijmărescu AL, Popescu FC, et al. Evaluation of the implantation site morphology in spontaneous abortion[J]. Rom J Morphol Embryol, 2015, 56(1): 125-131
- [32] Welm A, Blank B, Zhang C, et al. A class of extracellular vesicles from breast cancer cells activates VEGF receptors and tumour angiogenesis[J]. Nature Communications, 2017, 8: 14450
- [33] Wang X, Valls AF, Schermann G, et al. YAP/TAZ Orchestrate VEGF Signaling during Developmental Angiogenesis [J]. Developmental Cell, 2017, 42(5): 462-478
- [34] Dallanora D, Marcon J, Walter MP, et al. Effect of dietary amino acid supplementation during gestation on placental efficiency and litter birth weight in gestating gilts[J]. Livestock Science, 2017, 197: 30-35
- [35] Mess A, Carreira AC, Fratini P, et al. Pilot study: Yolk sac vascular development and VEGF expression during early gestation in bovines derived from nuclear transfer[J]. Placenta, 2014, 35(9): A48-A49