

广东汉族妊娠期糖尿病妇女胎盘组织 microRNA 差异表达谱分析

李 伟^{1*}, 胡宝春¹, 龚 照²

(1 武警广东省总队医院内分泌科, 2 妇产科, 广东 广州 510507)

[摘要] 目的:探索妊娠期糖尿病(gestational diabetes mellitus, GDM)与正常妊娠胎盘组织微小 RNA(miRNA, miRNA)的差异表达,为深入研究 GDM 发病机制提供基础。方法:选取于 2013 年 1 月—2014 年 1 月在武警广东省总队医院、南方医科大学珠江医院就诊并分娩的 GDM 孕妇 20 例作为观察组(GDM 组),均为粤籍汉族并且相互之间无亲缘关系,随机选取同期无妊娠合并症的正常广东汉族孕妇 20 例作为对照组。胎儿分娩后收集胎盘组织,用 TRIzol 法进行总 RNA 提取,经过质量和纯度分析鉴定合格后分别选取 5 个样本混合成 GDM 和对照组,采用逆转录法构建小 RNA 文库,使用第二代高通量测序采用边合成边测序的方法对 miRNA 进行测序并分析结果。结果:从胎盘组织提取到的总 RNA 纯度较高, $D(260\text{ nm})/D(280\text{ nm}) > 1.90$,并成功构建小 RNA 的 cDNA 文库。采用高通量测序得到长度为 10~35 nt 的小 RNA 片段,其中文库数量最多的小 RNA 长度 21~24 nt, miRNA 量占有小 RNA 总量的 30%以上,最终获得洁净的片段超过 10 000 000。将得到的片段与 Genebank 及 Rfam 数据库比对,去除其他小 RNA 筛选出 miRNA 达 7 000 多种。通过样本两两两比较分析,与对照组相比,发现 GDM 组有 138 种已知的 miRNA 表达明显上调,包括 hsa-miR-548a-5p、hsa-miR-95a-5p、hsa-miR-373-5p、hsa-miR-216-5p 等($\log_2\text{-ratio} > 1, P < 0.01$); 16 种已知 miRNAs 明显表达下调,如 hsa-miR-5699-5p、hsa-miR-4286 等($\log_2\text{-ratio} < -1, P < 0.01$)。Mireap 软件预测出 27 种新 miRNA,其中有 9 种在 GDM 表达升高,6 种表达降低。结论:GDM 的胎盘组织 miRNAs 与对照组存在表达差异,胎盘组织 miRNA 可能在 GDM 发病过程中起一定的调节作用。

[关键词] 妊娠期糖尿病;miRNA;差异表达谱;高通量测序

[中图分类号] R714.256

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2017)03-0298-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20170308

Investigation of microRNA expression profile of placental tissues between gestational diabetes mellitus (GDM) and normal pregnant women

Li Wei^{1*}, Hu Baochun¹, Gong Zhao²

(¹Department of Endocrinology, ²Department of Gynaecology and Obstetrics, the Hospital of the Chinese Peoples' Arm Force, Guangzhou 510507, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate microRNA(miRNA) expression profile of placental tissues between gestational diabetes mellitus (GDM) and normal pregnant women. **Methods:** A total of 20 cases of pregnant women with GDM were randomly selected from Armed Police Hospital Affiliated to Guangzhou Medical College and Zhujiang Hospital of Southern Medical University in January 2013 to January 2014, and normal pregnant Han women from Guangdong without complications in the same period were enrolled as control. Placenta was obtained after delivery followed by total RNA extraction with Trizol. Five samples of total RNA were randomly picked and mixed as the GDM and normal control group, respectively, for next step. miRNA library of GDM and control was built by the reverse transcription method and used for investigation of expression of various miRNAs by high throughput sequencing. **Results:** Purified total RNA was extracted from placenta and miRNA library was successfully constructed. After transition from raw data, there were over 10 000 000 clean reads with 21-24 nt-long small RNA the most among which miRNAs were over 30% in each group. After removal of other RNA by comparison between Rfam and Genebank database over 7 000 miRNA species were accounted for. A total of 138 known miRNAs were expressed at higher levels in patients with GDM than those in the control group, including hsa-miR-548a-5p, hsa-miR-95a-5p, hsa-miR-373-5p and hsa-miR-216a-5p($\log_2\text{-ratio} > 1, P < 0.01$). Sixteen known miRNAs in GDM were expressed at

lower levels than the control, such as hsa-miR-5699-5p and hsa-miR-4286($\log_2\text{-ratio} < -1, P < 0.01$). Besides, 27 new miRNAs were predicted by Mireap, among which 9 were expressed at higher levels and 6 were expressed at lower levels in the GDM group.

[基金项目] 广东省医学科研基金(A2013452)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: weili2318@126.com

Conclusion: High-throughput sequencing of miRNA extracted from placenta tissues of patients with GDM was firstly analyzed through constructing c-DNA library of miRNA and we found abnormal expression of a large number of miRNAs, among some of which could be related to pathogenesis of GDM.

[Key words] gestational diabetes mellitus; miRNA; expression profile; high through-put sequencing

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(06): 298-302]

妊娠期糖尿病(gestational diabetes mellitus, GDM)是指妊娠期发生或首次发现的糖耐量异常^[1],但不排除糖类不耐受在妊娠前已经存在的可能性^[2]。GDM 的发病率因种族不同和采用的诊断标准不一,各国报道有差别,为 1.7%~11.6%^[3]。GDM 是妊娠期常见的并发症之一,对母婴健康影响大,GDM 孕妇产后发生临床糖尿病的危险性明显增加,易造成胎儿羊水过多、死产、难产、巨大儿、胎儿宫内缺氧及新生儿呼吸窘迫综合征等,而 GDM 持续增长的流行病学趋势已构成严重的世界公共卫生问题,是当前威胁孕产妇及子代健康的重要疾病,但是其发病机制目前仍不清楚。

微小 RNA (microRNA, miRNA) 是一类长度为 19~24 nt 的非编码单链 RNA 分子,具有高度的保守性、表达多样性和基因簇集排列的特点,能够特异靶向信使 RNA (mRNA) 并通过对 mRNA 剪切或转录后抑制的机制发挥重要的调节功能^[4]。研究表明,miRNA 在 2 型糖尿病^[5]和 GDM^[6]中也有重要的调节作用。目前,关于 GDM 胎盘组织 miRNA 的表达谱鲜见报道。本研究采用第 2 代高通量测序法来检测 GDM 胎盘组织 miRNA 的表达变化,为深入研究 GDM 发病机制提供基础。

1 对象和方法

1.1 对象

选取于 2013 年 1 月—2014 年 1 月在武警广东省总队医院、南方医科大学珠江医院就诊并分娩的妊娠期糖尿病孕妇 20 例作为观察组(GDM 组),年龄(25 ± 2)岁,均为粤籍汉族并且相互之间无亲缘关系。随机选取同期无妊娠合并症或并发症的正常广东汉族孕妇 20 例作为对照组,年龄(24 ± 2)岁。纳入标准为 2013 年世界卫生组织(world health organization, WHO)GDM 诊断标准;排除对象包括合并存在妊娠期高血压疾病、原有糖尿病、先天性心脏病、双胞胎妊娠、早产、肝炎、甲状腺功能异常等代谢性疾病、产前发热等炎症急性期孕妇。

1.2 方法

1.2.1 胎盘组织获取

胎儿、胎盘娩出后,在胎盘的中央带取材,取胎盘中央母体面脐带根部 1 cm × 1 cm × 1 cm 组织 2~4 块(约重 120 mg),-80℃保存备用。

1.2.2 组织总 RNA 提取与小 RNAs 制备

组织研磨并分离核酸蛋白后采用 TRIzol 试剂盒(翔博科技公司)提取 RNA,所有步骤均按试剂盒说明操作。对得到的 RNA 利用紫外-可见分光光度计进行纯度检测,合格后利用 15%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离并回收纯化 16~30 nt 范围内的小 RNA。

1.2.3 小 RNA 文库构建和测序

采用美国 Illumina 公司的 Small RNA Sample Prep Kit 构建小 RNA 文库。具体过程是分别在小 RNA 加上 3' 接头和 5' 接头,利用与 3' 接头反向互补的引物反转录扩增出 cDNA,最后进行 15 个循环的 PCR 扩增获得小 RNA 文库,将得到的 RT-PCR 产物回收纯化。利用 Illumina HiSeq™ 2000 高通量测序技术对该文库进行测序。

1.3 统计学方法

应用 HiSeq2000 测序统计软件对数据进行统计学分析,统计方法为归一并标准化分析不同样品间的 miRNA 差异,两组 miRNA 的统计 P 值 $< 1.0 \times 10^{-6}$,且倍比变化绝对值 > 2 倍,认为该 miRNA 在两样本中存在显著表达差异^[7]。取检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

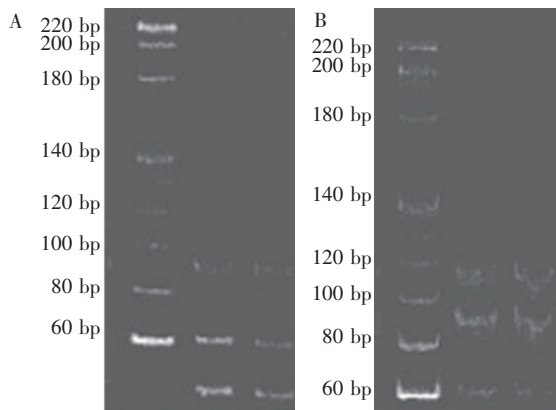
2 结果

2.1 文库建立

经紫外-可见分光光度计检测,所有胎盘组织提取的总 RNA 的 $D(260 \text{ nm})/D(280 \text{ nm})$ 均在 1.9~2.1 之间。抽提出来的 miRNA 首先连接 5' 接头,切胶回收,再连接 3' 接头,最后 PCR 扩增后切胶回收 60 bp 处的目的条带(图 1)。

2.2 GDM 和对照 miRNA 序列分析

标本测序得到的原始图像经过转化得到数据,去除测序质量较低、有 5' 接头污染、没有 3' 接头序

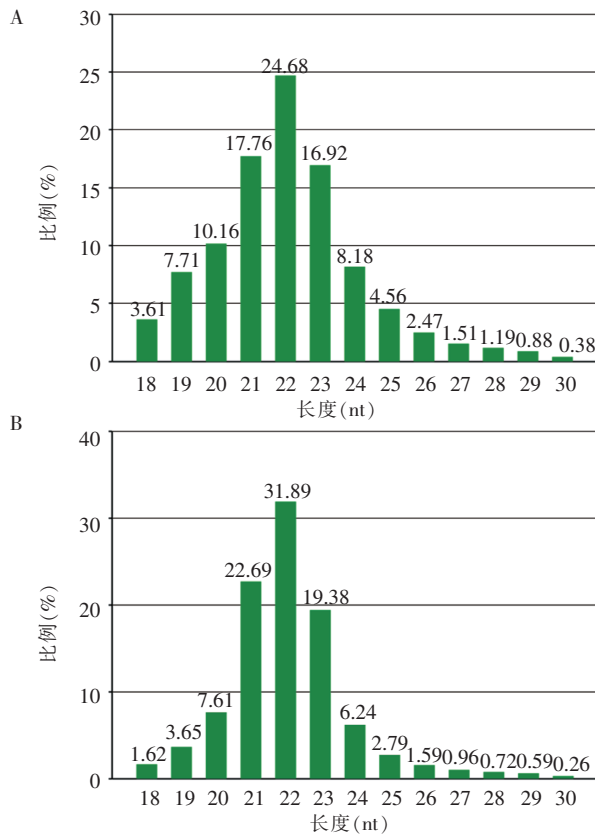


A: 对照组; B: GDM 组。

图 1 miRNA-cDNA 电泳图

Figure 1 Electropherogram of miRNA-cDNA

列、包含 polyA 和小于 18 nt 的小片段等,得到干净序列统计小 RNA 片段的长度分布。图 2 在一定程度上反映出高通量高质量的数据,对照组和 GDM 组大部分的小 RNA 长度集中在 20~24 nt,峰值出现在 22 nt,符合 miRNA 的长度特征,GDM 样本的 miRNAs 数量(87.36%)明显多于对照组(77.7%)。



A: 对照组; B: GDM 组。

图 2 胎盘组织小 RNA 片段长度分布

Figure 2 Distribution length of small RNA from placental tissues

2.3 GDM 和对照组小 RNAs 序列组成及分布

将上述得到的序列与在线数据库(Genbank,

Rfam11.0 和 miBase20.0)进行比对,发现长度 21~24 nt 的 miRNAs 量约占所有小 RNA 总量的 30%以上,种类约占总小 RNA 种类的 1%左右,体现了小 RNA 种类保守而数量分布广泛的特点。将数据与 miRNA 数据库(miRBase20.0)中的 miRNA 前体(若 miRBase 中无该物种 miRNA 前体序列则用成熟 miRNA 的序列)进行比对。GDM 组中筛选出 189 个成熟的 miRNA、465 个 miRNA-5p、443 个 miRNA-3p,共有 7 990 种小 RNA 共 4 975 021 条片段能与发现的 849 条 miRNA 前体匹配上(表 1)。通过总结发现不同组间 miRNA 的表达频率差别很大,表达量最高的是 hsa-miR-424-5p。

2.4 不同组间 miRNA 表达差异分析

采用阈值 $P < 1.0 \times 10^{-6}$,且 2 种样本测得序列数目必须有 2 倍的变化作为显著标准,最终发现表达有显著差异的 miRNA 共有 154 种。与正常对照相比,GDM 组中有 138 个 miRNAs 表达显著上调,包括 hsa-miR-548au-5p、hsa-miR-95-5p、hsa-miR-373-5p、hsa-miR-216a-5p 等;16 个 miRNAs 明显表达下调,如 hsa-miR-5699-5p、hsa-miR-4286 等(图 3,表 2)。本研究发现与以往在高糖刺激下细胞组织 miRNA 表达差异一致的有:miR-29a^[6]、miR-125a^[8]和 miR-146^[9]。

2.5 新 miRNA 预测与分析

通过选取一定长度小 RNA 比对上的基因组序列,分析该序列的 Dicer 酶切位点信息、能量、主次要 miRNA 的间距、侧翼序列等特征,利用华大基因开发的 Mireap 软件^[10]对没有注释的小 RNA 进行预测,预测新的 miRNA,分析差异表达谱。通过分析,在对照组发现 26 种新 miRNA,总表达量达 362;GDM 组中发现 27 种新 miRNA,总表达量达 455。

由于这些 miRNA 中有 8 种新 miRNA 的表达量在对照组及 GDM 组表达均很低,不纳入进一步分析。为了判断两样品之间新 miRNA 的表达量是否存在显著性差异,并分别使用 \log_2 -ratio、Scatter plot 图比较两者共同表达的新 miRNA 表达量的差异。分析结果显示,与对照组相比,GDM 组有 9 种新 miRNA 表达显著上调,6 种新 miRNA 显著下调。4 种新 miRNA 表达在对照和 GDM 中无明显差别(图 4)。

3 讨论

近年来研究显示,miRNA 在糖尿病的发生进展中起重要作用。研究表明 miRNA 也参与了 GDM 的发病,孕早期血清 miRNA 的表达可预示 GDM 的发

表 1 样品中已知 miRNA 数量统计

Table 1 Total account of familiar miRNA in all samples

(n)

组别	miRNA	miRNA-5p	miRNA-3p	miRNA 前体	匹配上 miRNA 前体的	匹配上 miRNA 前体的
					unique sRNA	total sRNA
对照组	168	432	430	795	7 711	2 943 364
GMD 组	189	465	443	849	7 990	4 975 021

表 2 共同表达的部分 miRNA 表达差异分析结果

Table 2 Results of different expressions of common miRNA

名称	对照组*	GMD 组*	fold-change	
			(log ₂ GMD 组/对照组)	P 值
hsa-miR-369-3p	331.374	721.358	1.122	<0.001
hsa-miR-5699-5p	1.032	0.204	-2.342	0.021
hsa-miR-628-3p	0.722	2.036	1.495	0.013
hsa-miR-146b-3p	0.413	1.527	1.887	0.012
hsa-miR-663a	1.135	0.204	-2.479	0.012
hsa-miR-2116-3p	3.612	1.730	-1.062	0.011
hsa-miR-340-3p	2.064	4.173	1.016	0.008
hsa-miR-373-5p	0.206	1.221	2.565	0.008
hsa-miR-149-3p	0.826	2.341	1.504	0.008
hsa-miR-6516-3p	2.167	0.713	-1.605	0.007
hsa-miR-548aw	1.858	3.970	1.096	0.006
hsa-miR-548ak	2.064	4.275	1.050	0.006
hsa-miR-548z	0.413	1.730	2.068	0.005
hsa-miR-15a-3p	0.929	2.646	1.516	0.005
hsa-miR-130a-5p	1.548	0.305	-2.342	0.004
hsa-miR-95-5p	0.103	1.120	3.439	0.004
hsa-miR-450a-1-3p	2.580	5.191	1.009	0.003
hsa-miR-548e-3p	2.477	5.089	1.039	0.003
hsa-miR-548aq-3p	0.310	1.629	2.395	0.003
hsa-miR-598-3p	1.342	3.461	1.367	0.002
hsa-miR-4286	3.818	1.425	-1.422	0.001
hsa-miR-548au-5p	0.619	2.443	1.980	0.001
hsa-miR-584-3p	0.206	1.629	2.980	0.001
hsa-miR-624-3p	0.516	2.545	2.302	0.001
hsa-miR-30c-1-3p	3.199	7.023	1.134	0.001
hsa-miR-655-3p	0.722	3.054	2.080	0.001
hsa-miR-3648	3.199	0.713	-2.167	<0.001
hsa-miR-4508	5.779	2.138	-1.435	<0.001
hsa-miR-3664-3p	2.167	6.005	1.470	<0.001
hsa-miR-125b-3p	10.320	20.764	1.009	<0.001
hsa-let-7d-3p	5.470	11.604	1.085	<0.001
hsa-miR-34a-3p	3.612	8.855	1.294	<0.001
hsa-miR-216a-5p	0.413	3.664	3.150	<0.001
hsa-miR-372-5p	0.010	2.545	7.991	<0.001
hsa-miR-561-3p	3.199	9.466	1.565	<0.001
hsa-miR-29b-1-5p	5.882	13.741	1.224	<0.001

* :miRNA 的归一化表达量。

达明显下调。

已有研究报道 GDM 患者血清 miR-29a 水平显著低于正常妊娠者, 体外实验证实 miR-29a 表达下降后可以增加胰岛素诱导基因 1 (Insig1) 的表达, 导致蛋白激酶 2 表达上调从而使血糖水平升高。有研

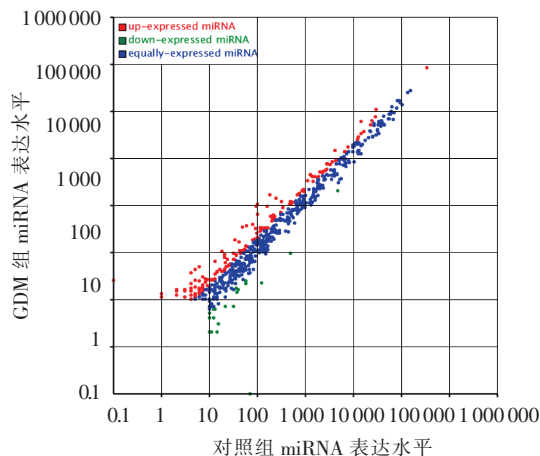
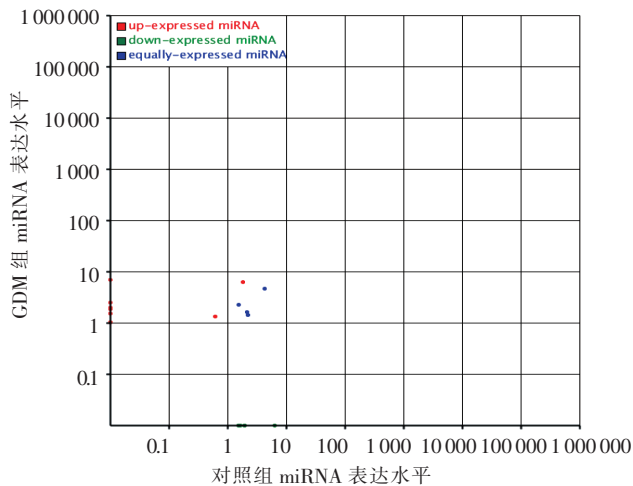


图 3 对照组与 GDM 组已知 miRNA 差异表达的散点图

Figure 3 Scatter plot of different expression of familiar miRNA in different groups

生, miR-29a, miR-222, miR-132 的表达下降与 GDM 有关^[6]。血清 miRNAs 来源于多种组织与细胞, 循环中 miRNA 的差异表达并不能充分说明其在组织中所起的作用, 因为 miRNA 作用的部位主要为组织细胞。胎盘组织在 GDM 发生发展中起重要作用^[11-12], 但是目前尚罕见关于 miRNA 在 GDM 胎盘组织表达谱的研究。

本研究首先提取胎盘的总 RNA, 经过分光光度计鉴定, 表明总 RNA 质量可靠, 可用于后续实验。构建小 RNA 的 cDNA 文库, 而后采用 Hiseq 高通量测序技术分析正常妊娠及 GDM 胎盘组织的小 RNA 信息并筛选和比较两者差异表达的 miRNAs。各样本的小 RNA 高质量 reads 达 10 000 000, 占总序列的 95% 以上, 体现了 Illumina 测序技术高通量高质量的特点^[13]。这些高质量的序列长度分布图有助于判断小 RNA 的种类, 样品中长度区间主要集中在 20~24 nt, 峰值在 22 nt, 符合 miRNA 长度特征^[14], 其量约占所有小 RNA 总量的 30% 以上, 种类约占总小 RNA 种类的 1% 左右, 体现了 miRNAs 种类保守而数量分布广泛的特点。log₂-ratio 是用于判断正常对照组和 GDM 患者 miRNA 表达谱中 miRNAs 表达量是否存在差异的指标, 而 P 值表示 miRNAs 在两样品间表达差异的显著程度, P 值越小差异越显著。通过分析可以发现与正常对照相比, GDM 组有 138 个已知 miRNAs 表达显著上调、16 个已知 miRNAs 表



红色代表 $\text{ratio} > 2$ 的 miRNA, 蓝色代表 $1/2 \leq \text{ratio} \leq 2$ 的 miRNA, 绿色代表 $\text{ratio} < 1/2$ 的 miRNA。

图 4 新 miRNA 表达散点图

Figure 4 Scatter plot of new miRNA expression

究报道 2 型糖尿病模型大鼠脂肪和骨骼肌组织 miR-29 家族表达上调,可能与外周组织胰岛素抵抗有关^[6]。本研究显示 GDM 胎盘组织的 miR-29a 表达增高,这可能与其抑制胎盘组织对胰岛素刺激的葡萄糖摄取作用有关。miRNA 测序结果显示胎盘组织有 miR-125a 表达,并且 GDM 组胎盘组织的表达明显高于正常。有文献发现 miR-125a 是唯一一个在 GK 小鼠(糖尿病模型小鼠)的肝脏和脂肪组织表达均差异显著的 miRNA;miR-125a 的靶基因涉及到丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路,该通路在糖尿病时被激活,在糖尿病及并发症发生、发展中发挥重要作用^[8]。据此本文推测 GDM 胎盘组织中高表达的 miR-125a 也可能是通过调控 MAPK 信号转导通路中的某些靶基因而发挥作用。

除了已知的 miRNAs 有表达差异外,本研究还利用 Mireap 软件预测新的 miRNA 并分析表达差异,在 GDM 患者胎盘组织中预测出 27 种新 miRNA,由于有 8 种新 miRNA 在两组样本中的表达均过低,不参与差异表达分析。差异分析显示 9 种新 miRNA 表达明显上调、6 种新 miRNA 表达明显下调、4 种新 miRNA 表达在对照和 GDM 中无明显差别。

迄今,miRNA 已经被公认为基因表达调控的核心因子之一。GDM 发病机制错综复杂,正常妊娠与 GDM 胎盘组织 miRNA 差异表达谱的筛选有望为 GDM 的发病机制研究提供新线索。然而,高通量测序分析结果有一定局限性,获得的 miRNA 差异表达谱有假阳性的可能,因此仍需进一步实验来验证。总之,通过构建 GDM 和正常妊娠妇女胎盘 RNA 的 cDNA 文库和 HiSeq 高通量测序技术,首次进行

了 GDM 胎盘组织 miRNA 的高通量测序研究,发现有 138 种已知 miRNA 表达上调,16 种已知 miRNA 表达下调,部分表达上调的 miRNA 与胰岛素有关,可能参与了 GDM 的发病机制。

[参考文献]

- [1] American Diabetes Association. Gestational diabetes mellitus[J]. Diabetes Care, 2004, 27(suppl 1): 88-90
- [2] Metzger BE, Organizing Committee. Summary and recommendation of the Third International Workshop Conference on gestational diabetes mellitus[J]. Diabetes, 1991, 40 (8suppl 2): 197-201
- [3] Schneider S, Bock C, Wetzel M, et al. The prevalence of gestational diabetes in advanced economies[J]. J Perinat Med, 2012, 40(5): 511-520
- [4] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell, 2004, 116(2): 281-297
- [5] Tang X, Muniappan L, Tang G, et al. Identification of glucose-regulated miRNAs from pancreatic β cells reveals a role for miR-30d in insulin transcription[J]. RNA, 2009, 15(2): 287-293
- [6] Zhao C, Dong J, Jiang T, et al. Early second-trimester serum miRNA profiling predicts gestational diabetes mellitus[J]. PLoS One, 2011, 6(8): e23925
- [7] Morin RD, O'connor MD, Griffith M, et al. Application of massively parallel sequencing to microRNA profiling and discovery in human embryonic stem cells[J]. Genome Res, 2008, 18(4): 610-621
- [8] Herrera BM, Lockstone HE, Taylor JM, et al. MicroRNA-125a is overexpressed in insulin target tissues in a spontaneous rat model of type 2 diabetes[J]. BMC Med Genomics, 2009, 2(1): 54-65
- [9] Kovacs B, Lumayag S, Cowan C, et al. MicroRNAs in early diabetic retinopathy in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011, 52(7): 4402-4409
- [10] Ang W, Lian J, Feng Y, et al. Genome-wide miRNA-profiling of aflatoxin B1-induced hepatic injury using deep sequencing[J]. Toxicol Lett, 2014, 226(2): 140-149
- [11] Newbern D, Freemark M. Placental hormones and the control of maternal metabolism and fetal growth[J]. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes, 2011, 18(6): 409-416
- [12] Colomiere M, Permez M, Riley C, et al. Defective insulin signaling in placenta from pregnancies complicated by gestational diabetes mellitus[J]. Eur J Endocrinol, 2009, 160(4): 567-578
- [13] 陈洁, 林海建, 潘光堂, 等. 利用深度测序技术检测玉米根系和叶片中已知的 microRNAs[J]. 遗传, 2010, 32(11): 1175-1186
- [14] Ruby JG, Jan C, Player C, et al. Large-scale sequencing reveals 21U-RNAs and additional microRNAs and endogenous siRNAs in *C. elegans*[J]. Cell, 2006, 127(6): 1193-1207

[收稿日期] 2015-09-14