

## let-7f-5p 在不明原因复发性流产绒毛组织中的表达及其功能研究

梁 婕<sup>1</sup>, 韩 莉<sup>2</sup>, 梁 健<sup>2</sup>, 凌 敏<sup>1</sup>, 卞 倩<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>江苏省疾病预防控制中心毒理与功能评价所, 江苏 南京 210009; <sup>2</sup>南京医科大学附属淮安第一医院产科, 江苏 淮安 223300)

**[摘要]** 目的:筛选与不明原因复发性流产(unexplained recurrent spontaneous abortion, URSA)相关的微小 RNA(miRNA),探讨其在 URSA 发生中的作用及其可能机制。方法:通过对 URSA 绒毛组织进行 miRNAs 测序,初步筛选差异表达的 miRNAs;利用实时荧光定量 PCR,验证筛选所得 miRNAs 表达水平;利用 DAVID 软件对靶基因进行 Pathway 分析;利用实时荧光定量 PCR,检测 p53 通路中靶基因及其下游基因的表达水平。结果:let-7f-5p 在 URSA 绒毛组织中表达水平显著上升;let-7f-5p 的靶基因富集于 p53 通路,通路中靶基因 MDM-X 和其下游靶标促生长基因 MDM2 水平显著下降,促凋亡基因 p53 表达水平显著上升。结论:let-7f-5p 可能调控 p53 信号通路中 MDM-X/MDM2/p53 基因,促进细胞凋亡,最终导致 URSA 发生发展。

**[关键词]** 不明原因复发性流产;let-7f-5p;凋亡

**[中图分类号]** R714.21

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2017)08-971-05

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20170810

## The mechanism study of enhancer RNA inducing inflammatory response in unexplained recurrent spontaneous abortion

Liang Jie<sup>1</sup>, Han Li<sup>2</sup>, Liang Jian<sup>2</sup>, Ling Min<sup>1</sup>, Bian Qian<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Institution for Toxicology and Function Assessment, Jiangsu Provincial Center for Disease Prevention and Control, Nanjing 210009; <sup>2</sup>Department of Gynecology, Huai'an First People's Hospital Affiliated to NJMU, Huai'an 223300, China)

**[Abstract]** **Objective:** To screen the differently expressed miRNAs study the expression and function of let-7f-5p in unexplained recurrent spontaneous abortion (URSA) and investigate the roles of miRNAs played in URSA. **Methods:** The miRNA-sequencing was applied to screen miRNAs that differently expressed in URSA placental villous; The qRT-PCR was used to validate the miRNA's expression of screened miRNAs; The DAVID was applied to analyze pathway; The qRT-PCR was conducted to measure the expression of target genes in p53 pathway. **Results:** The expression of let-7f-5p was markedly up-regulated highly expressed in URSA placental villous; The targets of let-7f-5p were abundant in p53 pathway, and the expression of MDM-X and MDM2 was significantly down-regulated, while the expression of p53 was significantly up-regulated. **Conclusion:** let-7f-5p might promote cell apoptosis in URSA by regulating the expression of MDM-X/MDM2/p53 in p53 pathway.

**[Key words]** URSA; let-7f-5p; apoptosis

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(08):971-975]

复发性自然流产(recurrent spontaneous abortion, RSA)是指连续发生 2 次或 2 次以上妊娠不足 20 周,或胎儿体重不足 500 g 的妊娠丢失。RSA 病因非常复杂,包括遗传学异常、子宫解剖异常、内分泌异常、感染因素、免疫学、环境因素等已明确病因,但

仍约有 50% 病因并不明确,因此临床上称之为不明原因复发性自然流产(unexplained recurrent spontaneous abortion, URSA)<sup>[1-2]</sup>。流行病学调查显示 URSA 患者再次发生妊娠丢失的风险与流产次数呈正相关<sup>[3]</sup>。因此,鉴于 URSA 已是严重影响孕妇身心健康的一个重要公共卫生问题,探讨其病因及发病机制一直是预防医学领域疾病早期防治的热点。

胎盘单位由羊膜、叶状绒毛膜和底蜕膜构成,位于母体与胚胎之间(母-胎界面),它是胚胎发育

**[基金项目]** 江苏省“333 高层次人才培养工程”(BRA2015490)

\*通信作者(corresponding author); E-mail: bianqian@jscdc.cn

成熟,妊娠成功的重要因素。而绒毛组织中滋养层细胞是母体与胎儿直接接触的部分,滋养层细胞生物学特性(分化、增殖、侵袭和凋亡)的异常改变是 URSA 发生的重要细胞学基础<sup>[4-6]</sup>。

近年来,微小 RNA(microRNA, miRNA)成为非编码 RNA 领域的明星分子,大小为 18~25 个核苷酸,在生物进化过程中高度保守,在细胞中具有时空特异性表达模式。通过负向调控靶基因的转录和翻译,miRNAs 参与调控胚胎发育、细胞增殖、分化、凋亡及肿瘤发生等重要病理生理过程<sup>[7-8]</sup>,其表达异常有可能导致病理妊娠发生,如子痫前期、胎儿生长受限、妊娠高血压、自然流产等<sup>[9]</sup>。越来越多研究发现,miRNA 与自然流产相关,如 miRNA-133a 通过调节 HLA-G 的表达参与早期自然流产的发病过程<sup>[10]</sup>,miRNA-34a-3p/5p、miRNA-141-3p/5p 和 miRNA-24 通过信号通路(MAPK、Wnt、PI3K-Akt 等)参与 URSA 的发生发展<sup>[11]</sup>。

尽管关于 miRNA 与 URSA 关联的研究已有报道,但仍缺乏全面整体研究,本研究拟通过高通量测序初步筛选 URSA 绒毛组织中差异表达的 miRNAs,并运用荧光定量 PCR 法进一步验证差异表达的 miRNAs,以探讨 miRNAs 与 URSA 发生的关系。随后,通过信号通路分析及靶基因表达水平分析,以研究 URSA 发生的分子机制,为治疗 URSA 提供潜在的治疗靶点。

## 1 资料和方法

### 1.1 资料

收集 2015 年 1—6 月在南京医科大学附属淮安第一医院妇产科门诊就诊的 13 例 URSA 患者(年龄为 20~45 周岁)资料,其中随机挑选 3 例样本用于测序,10 例样本用于差异表达 miRNAs 及其靶基因水平的验证。纳入标准主要有:①连续 2 次或 2 次以上的孕 20 周前或胎儿体重不足 500 g 的妊娠丢失;②B 超显示无胚芽或无胎心搏动;③排除因单基因遗传病、多基因遗传病、染色体异常以及基因突变等因素引发的流产。同时,根据年龄、妊娠周数、体重指数(BMI)等指标,以频数匹配法选择 13 例生育能力正常、非医学原因选择流产的孕妇作为对照(无流产征兆及体征,无流产史,且至少有 1 个正常小孩出生),其中随机挑选 3 例样本用于测序,10 例样本用于差异表达 miRNAs 及其靶基因水平的验证。经知情同意,采集其绒毛生物样本。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 组织总 RNA 的提取和 miRNA 测序

取 50~100 mg 新鲜无菌绒毛组织,按 TRIzol 试剂盒(Invitrogen 公司,美国)操作说明书抽提 RNA,计算 RNA 浓度并检测 RNA 纯度和完整性;运用 IlluminaHiSeq 2000 高通量测序平台完成对绒毛组织 miRNA 测序。

#### 1.2.2 质量控制和差异 miRNAs 的筛选

对测序得到的原始数据(Fastq 格式)进行接头过滤和污染序列过滤,滤除质量低和长度在 18~36 bp 范围以外的序列。进而运用 FastQC 软件对测序数据的质量进行整体评估,包括碱基的质量值分布、读长质量、GC 含量、PCR 重复含量等。运用 miRDeep2 软件将 miRNAreads 和未匹配上的 reads 与 miRBase 数据库中相应物种的 miRNA 前体及成熟体进行比对,鉴定出已知的 miRNA 及其二级结构,并分别用 edgeR 与 DESeq2 进行样本间 miRNA 表达量差异分析,为了保证分析结果的准确性,取二者交集作为最终结果。纳入后续 miRNA 功能分析筛选标准为:① miRNA 在样本间的表达量具有显著差异,即  $P_{edgeR} < 0.05$  且  $P_{DESeq2} < 0.05$ ;②在人与小鼠中高度保守;③该 miRNA 靶基因富集通路可能参与 URSA 的发生过程。

#### 1.2.3 差异表达 miRNAs 验证

取适量绒毛组织,采用 TRIzol 试剂盒(Invitrogen 公司,美国)抽提 RNA。运用超微量分光光度计(NanoDrop2000)测定吸光度和 RNA 浓度。利用逆转录试剂盒(TaKaRa 公司,日本)在 PCR 扩增仪上反转录为 cDNA,反应条件为:42 °C, 15 min; 85 °C, 5 s, 4 °C, ∞。利用 SYBR Green Master 试剂在 7900 型荧光定量 PCR 仪上进行 DNA 扩增,反应条件为:50 °C, 2 min; 95 °C, 10 min; 95 °C 15 s, 60 °C 1 min (40 个循环); 95 °C 15 s。记录各样本荧光扩增曲线图及熔解曲线图,以及每条反应管中的 Ct 值,  $\Delta Ct = Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{内参基因}}$ ,采用  $2^{-\Delta Ct}$  处理 PCR 结果。PCR 引物序列见表 1。

#### 1.2.4 差异表达 miRNAs 功能检索和靶基因预测

通过 PubMed 对获得的差异表达 miRNAs 进行功能检索;运用 miRDB、Target scan 等软件预测差异表达 miRNAs 所调控的靶基因;利用 DAVID 软件对靶基因进行 GO 分析(功能富集分析)和 Pathway 分析(信号通路分析),再从功能或信号通路上分析 miRNA 可能的作用靶标,以此深入分析 miRNA 在 URSA 中的作用。靶基因表达水平检测方法同 1.2.3。

表 1 RT-PCR 引物及序列

Table 1 The primer and its sequence of RT-PCR

miRNAs	引物序列 (5'→3')
U6	RT: CTCAACTGGTGTCTGTGGA F: CTCGCTTCGGCAGCACA;R: AACGCTTCACGAATTTGCGT
hsa-let-7f-5p	RT:GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCCGACTGGATACGACAACATAT F:GCGGCGGTGAGGTAGTAGATTG;R: ATCCAGTGCAGGTCCGAGG
GAPDH	F:GGATCTCGTCTCTGGAAGATG;R: GGGAACACAAAAGACCTCTTCTGG
MDM-X	F: TGATTGTCTGAAGAACCATTTCGG;R: TGCAGGGATCAAAAAGTTTGGAG
MDM2	F: GAATCATCGGACTCAGGTACATC;R:TCTGTCTCACTAATTGCTCTCCT
p53	F: CCCAAGCAATGGATGATTTGA;R: GGCATTCTGGGAGCTTCATCT

1.3 统计学方法

实验结果以均数±标准误( $\bar{x} \pm s$ )表示,应用 STA-TA11.0 统计软件进行数据分析,组间差异采用单因素方差分析(One-way ANOVA)进行比较,以  $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义,数据采用 GraphPad Prism5.0 作图。

2 结果

2.1 测序质量控制

测序质量控制结果显示此次测序中 95% 的样本达到 Q30(图 1A),碱基读取稳定性好(图 1B)。综上,此次测序质量良好,结果可信。

2.2 URSA 绒毛组织中差异表达的 miRNAs

经测序分析,URSA 绒毛组织中差异表达的 miRNAs 共有 18 条,有 4 条 miRNAs 表达量下调,14 条

miRNAs 表达量上调,其中人与小鼠同源的有 10 条(表 2)。通过文献检索这 10 条 miRNAs 的功能,发现仅 hsa-let-7f-5p 与流产有关。

2.3 独立人群验证差异表达 miRNA

采用实时荧光定量 PCR,独立人群中验证 hsa-let-7f-5p 表达水平。结果发现 hsa-let-7f-5p 在病例组绒毛组织中表达量显著上升( $P < 0.001$ ,图 2),与测序检测结果基本一致,表明测序检测结果是真实可靠的。

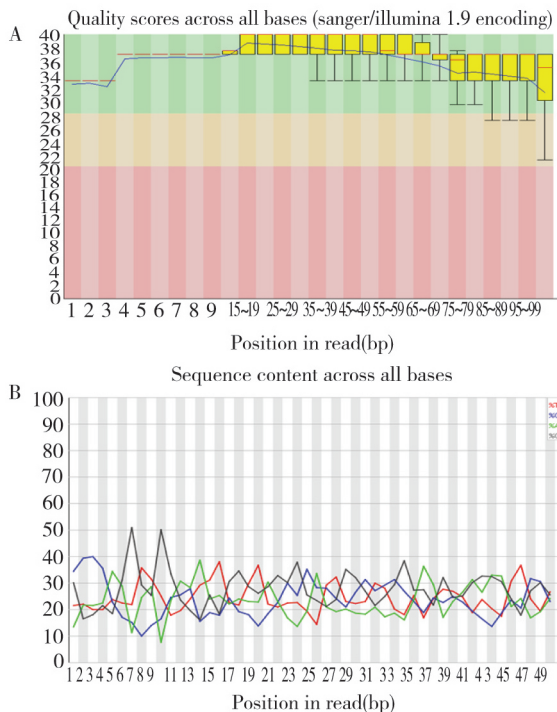
2.4 hsa-let-7f-5p 靶基因预测及信号通路分析

通过软件对所获得的差异表达 hsa-let-7f-5p 进行靶基因预测和信号通路分析,发现靶基因富集于 p53 信号通路,采用实时荧光定量 PCR 在独立人群中检测 p53 信号通路中靶基因 MDM-X 及其下游靶标 MDM2 和 p53 的表达水平。荧光定量 PCR 结果显示,靶基因 MDM-X 表达水平在病例组绒毛组织中表达量显著下降( $P < 0.05$ ,图 3),其下游靶标促生长基因 MDM2 表达量显著下降( $P < 0.05$ ,图 3),促凋亡基因 p53 表达量显著上升( $P < 0.05$ ,图 3),揭示 hsa-let-7f-5p 可能调控 p53 信号通路中 MDM-X/MDM2/p53 基因,从而在细胞凋亡中扮演了较关键的角色。

3 讨论

URSA 作为一种病理性妊娠,其病因和发病机制一直是生殖领域的研究热点。传统观点认为,50%~60% 早期 URSA 与免疫因素有关<sup>[11]</sup>,如母体免疫抑制功能减弱或丧失,导致其对胚胎排斥,最终引发 URSA,但是免疫抑制剂治疗(如环孢素 A)的临床治疗效果甚微<sup>[12]</sup>。

近年研究发现,绒毛组织中细胞功能的异常是 URSA 发生的重要环节,包括细胞增殖能力减低,细胞过度凋亡、促血管新生能力减弱等<sup>[13-14]</sup>。越来越多的文献报道表明,凋亡相关基因(如 p53、FasL、TNF- $\alpha$ 、Bcl-2 等)的异常表达是 URSA 发生的重要机



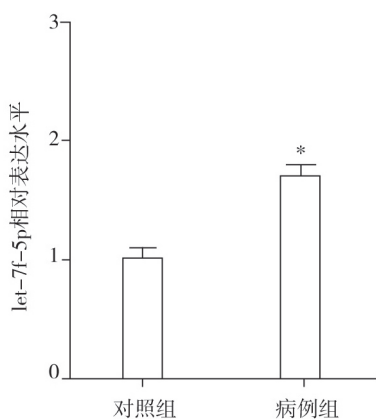
A: 测序中 95% 样本达到 Q30; B: 碱基读取稳定性好。

图 1 测序质量控制

Figure 1 Quality control of sequencing

表 2 URSA 流产绒毛中差异表达的 miRNAs  
Table 2 The differently expressed miRNAs in URSA placental villous

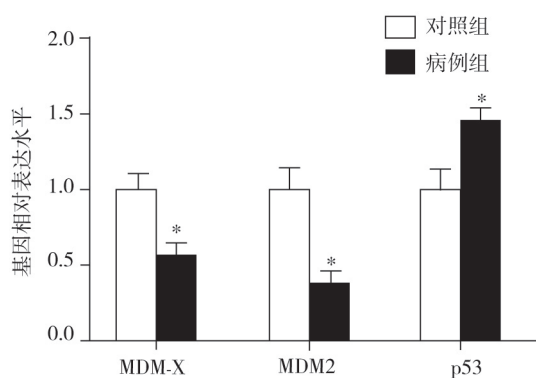
miRNAs 名称	P 值		表达量 (上/下调)	同源性	
	Pdeseq	Pedger		人	小鼠
hsa-let-7a-3p	4.72×10 <sup>-2</sup>	3.88×10 <sup>-3</sup>	上调	✓	×
hsa-let-7f-1-3p	4.52×10 <sup>-2</sup>	1.07×10 <sup>-3</sup>	上调	✓	✓
hsa-let-7f-5p	4.72×10 <sup>-2</sup>	3.38×10 <sup>-4</sup>	上调	✓	✓
hsa-let-7i-5p	4.98×10 <sup>-2</sup>	8.31×10 <sup>-4</sup>	上调	✓	✓
hsa-miR-132-3p	2.29×10 <sup>-2</sup>	7.29×10 <sup>-4</sup>	上调	✓	✓
hsa-miR-196a-3p	3.32×10 <sup>-2</sup>	5.13×10 <sup>-4</sup>	上调	✓	×
hsa-miR-21-3p	1.70×10 <sup>-2</sup>	5.19×10 <sup>-4</sup>	上调	✓	×
hsa-miR-21-5p	2.75×10 <sup>-3</sup>	2.21×10 <sup>-6</sup>	上调	✓	×
hsa-miR-210-3p	3.32×10 <sup>-2</sup>	1.47×10 <sup>-2</sup>	上调	✓	✓
hsa-miR-29a-5p	3.32×10 <sup>-2</sup>	2.17×10 <sup>-3</sup>	上调	✓	✓
hsa-miR-29b-3p	4.98×10 <sup>-2</sup>	4.17×10 <sup>-3</sup>	上调	✓	✓
hsa-miR-3656	3.25×10 <sup>-5</sup>	3.94×10 <sup>-7</sup>	下调	✓	×
hsa-miR-4488	8.23×10 <sup>-4</sup>	1.46×10 <sup>-5</sup>	下调	✓	×
hsa-miR-5100	2.75×10 <sup>-3</sup>	1.44×10 <sup>-4</sup>	下调	✓	✓
hsa-miR-7977	1.85×10 <sup>-2</sup>	1.11×10 <sup>-2</sup>	下调	✓	×
hsa-miR-95-3p	1.70×10 <sup>-2</sup>	5.82×10 <sup>-5</sup>	上调	✓	×
hsa-miR-98-3p	4.72×10 <sup>-2</sup>	7.96×10 <sup>-4</sup>	上调	✓	✓
hsa-miR-98-5p	1.70×10 <sup>-2</sup>	9.69×10 <sup>-5</sup>	上调	✓	✓



与对照组比较,\*P<0.001。

图 2 hsa-let-7f-5p 表达水平分析

Figure 2 Analysis of has-let-7f-5p expression



与对照组比较,\*P<0.05。

图 3 基因表达水平分析

Figure 3 Analysis of gene expression

制之一。但是,关于细胞凋亡的上游调节机制仍未阐明。

近年来随着生命科学技术的迅猛发展,miRNA 的研究在各个领域最为活跃,极大拓宽了人们对生物发育、疾病发生发展的认识,miRNAs 可调控超过 30%的功能基因<sup>[15]</sup>。鉴于 miRNA 一对多、多对一的特殊作用方式,本研究通过对 URSA 绒毛组织进行全基因组水平 miRNA 测序,全面探讨 miRNAs 与

URSA 的关系。通过 miRNA 测序初步筛选,发现 18 条差异表达的 miRNAs;通过人鼠同源性和文献检索对初步筛选所得 miRNAs 进一步分析,最终以 hsa-let-7f-5p 为切入点,研究 hsa-let-7f-5p 在不明原因复发性流产绒毛组织中的表达及其功能。

作为 let-7 家族一员,let-7f 参与细胞周期、细胞增殖和细胞侵袭等过程的调控,从而在肿瘤发生、炎症反应、代谢性疾病中表达具有特异性改变<sup>[16-17]</sup>。



Wang 等<sup>[18]</sup>研究发现, let-7f-5p 富集于蜕膜组织, 在自发性流产者蜕膜组织中的表达水平远低于正常怀孕者, 这揭示了 let-7f-5p 对维持妊娠有重要意义。本研究通过信号通路分析发现, let-7f-5p 的靶基因富集于 p53 信号通路。而 p53 信号通路是细胞凋亡的重要机制之一, 滋养层细胞过度凋亡不仅能破坏其细胞结构的完整性, 而且加重或导致细胞功能障碍, 是推进 URSA 发生发展的关键事件<sup>[19]</sup>。随后, 在基因水平进一步分析细胞凋亡机制, 检测了通路中靶基因 MDM-X, 其下游靶标促生长基因 MDM2 和促凋亡基因 p53 表达水平, 结果发现, URSA 绒毛组织中 MDM-X 和 MDM2 表达量显著下降, 而 p53 表达量显著上升, 这揭示 hsa-let-7f-5p 可能调控 p53 信号通路中 MDM-X/MDM2/p53 基因, 促进细胞凋亡, 最终导致 URSA 发生发展。

综上, 本研究以 miRNAs 为切入点, 发现 hsa-let-7f-5p 表达水平在 URSA 绒毛组织中显著上升。通过信号通路分析, 发现 hsa-let-7f-5p 可能调控 p53 信号通路中 MDM-X/MDM2/p53 基因, 促进细胞凋亡, 最终导致 URSA 发生发展。本研究为 URSA 的发生机制提供了新的视角, 为临床上 URSA 患者的治疗提供了新思路。

#### [参考文献]

- [1] Li D, Li J. Association of miR-34a-3p/5p, miR-141-3p/5p, and miR-24 in decidual natural killer cells with unexplained recurrent spontaneous abortion[J]. *Med Sci Monit*, 2016, 22: 922-929
- [2] Li TC, Makris M, Tomsu M, et al. Recurrent miscarriage: aetiology, management and prognosis[J]. *Hum Reprod Update*, 2002, 8(5): 463-481
- [3] Cohen M, Bischof P. Factors regulating trophoblast invasion[J]. *Gynecol Obstet Invest*, 2007, 64(3): 126-130
- [4] Gu PQ, Gao LJ, Li L, et al. Endocrine disruptors, polychlorinated biphenyls-induced gC1qR-dependent apoptosis in human trophoblast cell line HTR-8/SVneo[J]. *Reprod Sci*, 2012, 19(2): 181-189
- [5] Haider S, Meinhardt G, Velicky P, et al. Notch signaling plays a critical role in motility and differentiation of human first-trimester cytotrophoblasts[J]. *Endocrinology*, 2014, 155(1): 263-274
- [6] Nguyen T, Robinson N, Allison SE, et al. IL-10 produced by trophoblast cells inhibits phagosome maturation leading to profound intracellular proliferation of *Salmonella enterica* Typhimurium[J]. *Placenta*, 2013, 34(9): 765-774
- [7] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297
- [8] Bushati N, Cohen SM. microRNA functions[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2007, 23(1): 175-205
- [9] 黄仲英, 李尚为. 滋养细胞生物学功能异常相关疾病的微小 RNA 调控 [J]. *中华临床医师杂志*, 2013, 7(4): 1715-1718
- [10] Wang X, Li B, Wang J, et al. Evidence that miR-133a causes recurrent spontaneous abortion by reducing HLA-G expression[J]. *Reprod Biomed Online*, 2012, 25(4): 415-424
- [11] 张 健. 反复早期自然流产的病因探讨[J]. *中国临床医学*, 2003, 10(4): 573-575
- [12] 方利元, 李珠玉, 李银广, 等. 不明原因复发性自然流产患者蜕膜组织中 miR-21 和 miR-31 的表达及其与 FOXP3 的相关性研究[J]. *新医学*, 2015, 46(2): 77-81
- [13] Hasuike Y, Nagai T, Yorifuji S, et al. The mitochondrial protein frataxin is downregulated in hemodialysis patients [J]. *Clini and Exp Nephrol*, 2013, 17(3): 424-430
- [14] Ikee R, Tsunoda M, Sasaki N, et al. Clinical factors associated with serum copper levels and potential effect of sevelamer in hemodialysis patients[J]. *Int Urol Nephrol*, 2013, 45(3): 839-845
- [15] Chen DB, Wang W. Human placental microRNAs and preeclampsia[J]. *Biol Reprod*, 2013, 88(5): 130
- [16] Tao WY, Liang XS, Liu Y, et al. Decrease of let-7f in low-dose metronomic paclitaxel chemotherapy contributed to upregulation of thrombospondin-1 in breast cancer[J]. *Int J Biol Sci*, 2015, 11(1): 48-58
- [17] Yan S, Han X, Xue H, et al. Let-7f inhibits glioma cell proliferation, migration, and invasion by targeting Periostin[J]. *J Cell Biochem*, 2015, 116(8): 1680-1692
- [18] Wang Y, Lv Y, Wang L, et al. MicroRNAome in decidua: a new approach to assess the maintenance of pregnancy [J]. *Fertil Steril*, 2015, 103(4): 980-989
- [19] Pang W, Zhang Y, Zhao N, et al. Low expression of Mfn2 is associated with mitochondrial damage and apoptosis in the placental villi of early unexplained miscarriage[J]. *Placenta*, 2013, 34(7): 613-618

[收稿日期] 2016-10-17