

· 临床研究 ·

血浆外泌体源性 miRNA 在复发性流产患者中的表达初探

凌钟慧, 沈 嵘

南京医科大学附属妇产医院妇产科, 江苏 南京 210004

[摘要] 目的:通过提取复发性流产(recurrent spontaneous abortion, RSA)患者与正常妊娠女性血浆外泌体中 miRNA,运用 miRNA 测序技术筛选出差异常表达的 miRNA,以探讨其在复发性流产患者中的表达情况。方法:复发性流产患者及年龄、停经天数相匹配的早期妊娠行人工流产女性各3例,收集其清宫术后的肘前静脉血,提取血浆,对血浆外泌体中的 miRNA 进行提取、测序,分析 miRNA 表达谱,并对表达差异较大的 miRNA 进行靶基因预测及功能分析和信号通路分析。结果:复发性流产患者与正常妊娠女性相比,血浆外泌体中有24个 miRNA 存在差异表达,其中表达下调的 miRNA 有11个,表达上调的 miRNA 有13个。生物功能分析表明这些差异表达 miRNA 的靶基因可能参与某些妊娠过程从而发挥其功能。结论:复发性流产患者的血浆外泌体中表达的 miRNA 种类及数量与正常妊娠相比存在差异,此可作为 RSA 预防诊治中的分子标记物之一,得进一步研究。

[关键词] 复发性流产;外泌体;miRNA;测序

[中图分类号] R714.21

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2019)12-1769-05

doi:10.7655/NYDXBNS20191214

The expression of plasma exosomal miRNA in recurrent spontaneous abortion

Ling Zhonghui, Shen Rong

Department of Obstetrics and Gynecology, Nanjing Maternity and Child Health Care Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 210004, China

[Abstract] **Objective:** To analyze the differential expression of exosomal miRNAs deriving from plasma between recurrent spontaneous abortion (RSA) and healthy-control subjects. **Methods:** This study enrolled 3 patients with RSA who were admitted to Nanjing Maternity and Child Health Care Hospital, and a cohort of 3 age and gestation-matched healthy-control subjects. Peripheral blood samples were collected on the first day after curettage surgery. Transmission electron microscopy was used to identify exosomes derived from plasma samples. Sequencing was performed to identify the differentially expressed exosomal miRNAs between the RSA group and the control group. Target gene prediction, gene ontology analysis, and pathway analysis were performed for miRNAs with significant differential expression. All subjects provided written informed consent for their participation in the study. **Results:** By comparing with the control group, 24 significantly differential expressed exosomal miRNAs were screened in RSA group, of which 11 were down-regulated and 13 up-regulated. **Conclusion:** The exosomes contain abundant miRNAs which expressions are significantly different. These exosomal differential miRNAs may be a promising biomarker in the activation of RSA, needing further investigation.

[Key words] recurrent spontaneous abortion; exosome; miRNA; sequencing

[J Nanjing Med Univ, 2019, 39(12): 1769-1773]

复发性流产(recurrent spontaneous abortion, RSA)是指育龄女性与同一性伴侣连续发生3次及以上的自然流产^[1],其病因复杂,包括遗传因素、内分泌因素、解剖异常、免疫因素、感染、环境因素等。此外,仍有约50%的RSA患者病因不明^[2],治疗效果欠佳。因此提出复发性流产新的诊治方向非常重要。

miRNA是高度保守的内源性非编码小分子单链RNA,长度为20~25 nt。miRNA作用于靶基因调控细胞生物学过程。目前认为外周循环中的miRNA的存在形式包括合并高密度脂蛋白^[3],包裹在循环外泌体内,或是结合于囊泡外的RNA结合蛋白^[4]。

外泌体是一种含双层脂质膜的细胞外囊泡,内

含蛋白质、RNA、DNA等多种成分^[5],一般认为直径30~100 nm,也有文献报道在50~200 nm^[6]。外泌体可由不同类型的细胞释放^[7],双层脂质膜结构使其内的miRNA在各种体液中保持良好的稳定性,可以作为远距离递送载体参与多种细胞活动,在疾病的诊断治疗中具有广泛的应用潜能。例如人脐带间充质干细胞来源的外泌体不会引起人血的溶血反应,可以作为递送药物治疗各项疾病的理想载体^[8]。目前已有多项研究表明外泌体miRNA与各种疾病的发生和发展密切相关,但尚无关于复发性流产外泌体miRNA的研究报道。故本研究拟借助RNA测序技术从血浆外泌体中筛选出差异表达的miRNA,探讨外泌体中miRNA与RSA发生的关系,为RSA的诊断和治疗提供分子基础。

1 对象和方法

1.1 对象

选取2019年6—7月在本院就诊的RSA患者和早期妊娠要求终止妊娠的健康女性各3例。RSA的入组者此次确定为宫内妊娠,既往至少发生2次自然流产。排除感染、内科疾病、解剖异常,既往无妇科手术史,无特殊用药、毒物、高强辐射接触史,未接受过主动免疫治疗。同期健康女性既往至少有1个正常胎儿出生,既往无异常孕产史,本次妊娠无先兆流产症状体征,B超提示胚胎发育正常,无吸烟、饮酒、服药、病毒感染史、精神类疾病及其他内科疾病。所有入组者年龄在20~35岁,停经7~14周。本研究通过南京医科大学附属妇产医院伦理审批,并获得研究对象知情同意。

1.2 方法

1.2.1 血浆制备

收集入组者清宫术后第1天的肘前静脉血6 mL,置于含有2%乙二胺四乙酸的一次性真空管中,根据标准方案制备血浆。将全血样品于4℃条件下以3 000 r/min转速离心10 min,用移液枪吸取上清液血浆转移到新的离心管中,将血浆在4℃以12 000 r/min离心10 min去除黏附在细胞残片上的细胞核酸,吸取上清液分装到2 mL的离心管中,-80℃保存。将收取的血浆样本送至测序公司进行外泌体全转录组测序。

1.2.2 血浆外泌体提取

使用ExoQuick外泌体沉淀试剂盒(Systembio公司,美国)提取外泌体。步骤详见试剂盒说明书,简单步骤如下,将血浆以3 000 g转速离心15 min,吸

取上清液转移至新的离心管中,按4:1的比例加入外泌体沉淀试剂,充分混匀后于4℃静置30 min,将样品以1 500 g离心30 min后去除上清液,再次以1 500 g离心5 min,去除上清,管底可见淡黄色至白色外泌体沉淀,加入无菌PBS试剂重悬沉淀。Tecnai G2 Spirit Bio TWIN透射电子显微镜(Tecnai公司,美国)观察外泌体形态,ZetaView纳米颗粒跟踪分析仪(Particle Metrix公司,德国)检测外泌体浓度粒径。

1.2.3 外泌体miRNA测序

使用miRNeasy Micro Kit(Qiagen公司,美国)提取出外泌体中总RNA。通过NEBNext Ultra小RNA文库制备试剂盒(New England Biolabs公司,英国)构建测序文库。使用生物分析仪Agilent 2100(北京安捷伦科技有限公司)进行文库质量评价。通过TruSeq PE簇生成试剂盒v3-cBot-HS(Illumina公司,美国)在cBot群集生成系统上对索引编码样本进行富集,并于Illumina HiSeq平台上对其进行测序。过滤原始测序序列获得高质量序列。使用Bowtie短序列比对软件,将过滤后的序列与Silva数据库、Rfam数据库、Rebase数据库和GtRNadb数据库进行比对,获得包含miRNA的未注释序列。Bowtie软件可以获取未注释序列在参考基因组上的位置信息。将比对上参考基因组的序列在miRNA数据库miR-Base(v21)中比对,鉴定出已知miRNA。对于未鉴定到的新miRNA序列,通过miRDeep2软件进行预测。

通过TPM算法将表达量进行标准化处理。以差异倍数(Fold Change)的绝对值|FC| \geq 1.5且P值 $<$ 0.05作为筛选标准,根据样本有无生物学重复,分别用DESeq软件和edgeR软件筛选差异表达的小RNA。对筛选出的miRNA进行层次聚类分析。

1.2.4 测序结果生物信息学分析

使用miRanda和targetscan软件对筛选出的miRNA的靶基因进行预测,使用R包clusterProfiler对靶基因进行功能分析(gene ontology, GO)和信号通路分析(Pathway),通过统计分析计算其中最为显著的靶基因。P \leq 0.05作为显著靶基因的阈值。

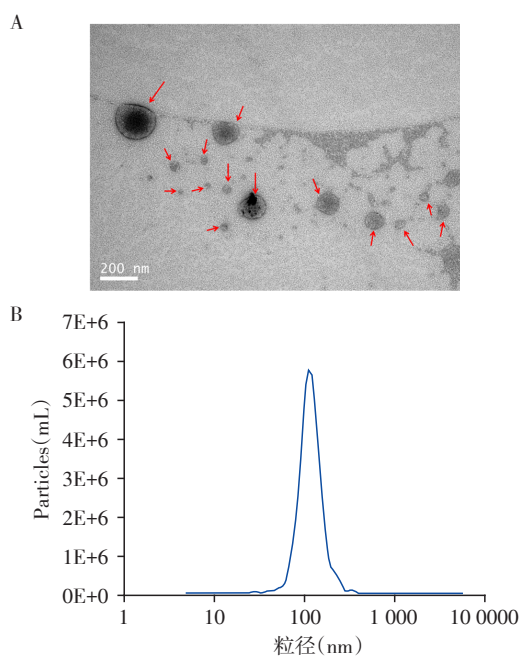
2 结果

2.1 一般资料

实验中收集到的研究对象年龄27~35岁,停经天数78~91 d。比较两组间的年龄、体重指数(BMI)、既往月经周期及停经天数均无统计学差异(P $>$ 0.05)。

2.2 外泌体鉴定

透射电子显微镜下观察外泌体直径约为100 nm,由脂质膜包裹大小不一形态类圆形类似茶托(图1A),ZetaView纳米颗粒跟踪分析仪结果显示其粒径分布峰值位于115.6 nm(图1B)。上述结果符合外泌体正常特征。



A:透射电子显微镜下外泌体形态(箭头所示);B:外泌体粒径分布。

图1 外泌体的形态及粒径特征

Figure 1 Morphology and particle size of exosome

2.3 血浆外泌体中miRNA的差异表达情况

测序结果显示,与对照组相比,RSA患者血浆中存在24个差异表达的miRNA(表1),其中11个表达下调,13个表达上调(表1,图2)。

2.4 两组差异表达miRNA的生物信息学分析

通过 miRanda 和 targetsan 软件对差异表达的miRNA进行靶基因预测,一共预测到4 521个靶基因。对差异表达miRNA的靶基因进行GO分析,可见靶基因富集的生物学功能包括胚胎肢体发生(embryo digit morphogenesis)、胶原蛋白代谢(collagen catabolic process)及血管形成(sprouting angiogenesis)等(图3)。通过进一步Pathway分析,发现富集相对显著的功能通路:Hippo信号通路(Hippo signaling pathway)、丝裂原活化蛋白激酶信号通路(MAPK signaling pathway)、血小板活化信号通路(Platelet activation)、钙离子信号通路(Calcium signaling pathway)、mTOR信号通路(mTOR signaling pathway)等(图4)。

表1 两组miRNA的差异表达情况

miRNA	PValue	log2FC	regulated
hsa-miR-4791	0.024 6	8.461 3	down
hsa-miR-493-3p	0.038 4	0.978 1	down
hsa-miR-183-5p	0.048 7	0.821 2	up
hsa-miR-483-5p	0.049 7	-1.304 5	down
hsa-miR-206	0.040 7	-1.877 3	up
hsa-miR-615-3p	0.045 5	-2.452 6	down
hsa-miR-149-5p	0.035 2	-2.724 7	up
hsa-miR-1299	0.003 2	-2.891 3	down
hsa-miR-5096	0.018 9	-4.920 4	down
hsa-miR-5585-3p	0.018 8	-8.583 7	down
novel_miR_1076	0.032 1	-8.398 8	down
novel_miR_1154	0.000 3	12.517 4	up
novel_miR_1164	0.038 6	-3.929 4	down
novel_miR_1196	0.000 3	1.956 6	up
novel_miR_1204	0.035 3	8.336 8	up
novel_miR_1279	0.038 9	8.659 4	up
novel_miR_1282	0.029 3	8.821 0	up
novel_miR_152	0.001 4	11.711 0	up
novel_miR_219	0.026 9	-4.226 0	down
novel_miR_269	0.014 8	8.483 5	up
novel_miR_279	0.020 2	-3.451 9	down
novel_miR_291	0.044 7	8.166 9	up
novel_miR_820	0.028 7	5.350 1	up
novel_miR_92	0.043 9	8.537 3	up

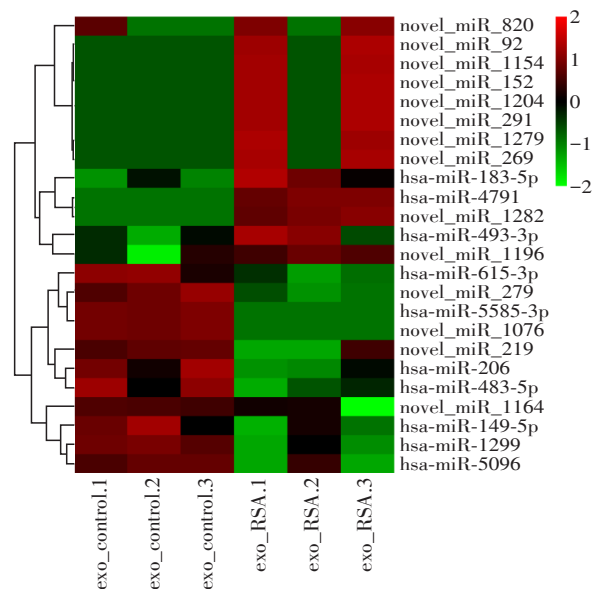


图2 Exo_control和exo_RSA组外泌体中差异表达的miRNA的热图

Figure 2 Heat map of differentially expressed miRNA between exo_control and exo_RSA exosomes

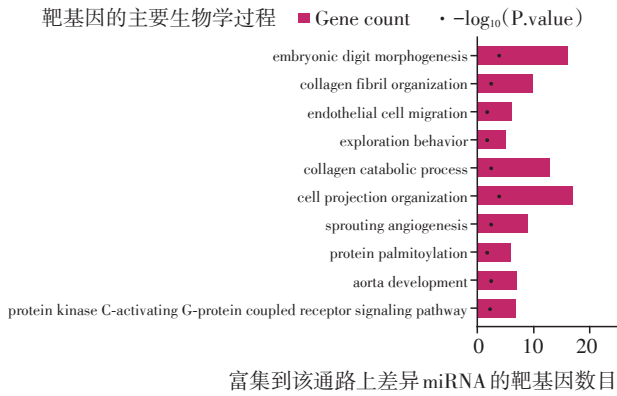


图3 差异表达miRNA靶基因的GO分析
Figure 3 GO analysis of target gene function of exosomal miRNA

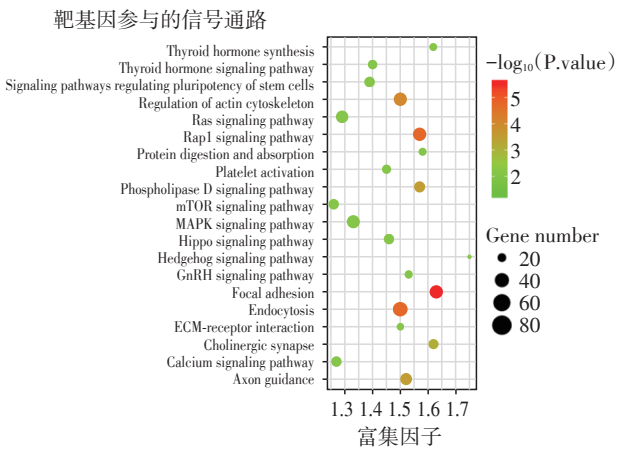


图4 差异表达miRNA靶基因的Pathway分析
Figure 4 Pathway analysis of target gene function of exosomal miRNA

3 讨论

复发性流产因其病因和发病机制复杂,目前尚没有明确的临床诊疗方案,近年来随着工作环境及生活方式的改变,复发性流产发生率逐年攀升,是国内重要的公共卫生问题。

发生复发性流产重要的病理生理机制包括胎盘早期着床过浅、滋养细胞迁移与侵袭能力受损、胎盘微血管形成障碍等。近期研究报道外泌体在疾病发生和疗效监测中具有重要作用^[9]。已有研究表明外泌体参与滋养层细胞的增殖、凋亡、迁移、侵袭及胎盘血管生成过程,其浓度或含量的变化可能对诊断胎盘功能障碍具有临床意义^[10]。研究发现初级人胎盘滋养细胞分泌的外泌体中的主要miRNA种类是19号染色体的miRNA簇C19MC^[11],而C19MC通常只在胎盘的滋养层中表达^[12],并与表观遗传修饰相关^[13]。另有研究发现胎盘间充质干细

胞在低氧条件下外泌体释放增多,这些外泌体可以促进内皮细胞迁移和胎盘内血管生成^[14]。

本研究首次通过比较复发性流产和正常妊娠人群外泌体内携带miRNA表达谱的差异,探索在RSA发生发展过程中可能起调控作用的外泌体miRNA。测序结果显示,与正常妊娠人群相比,RSA患者血浆外泌体中的miRNA表达谱改变,其中13个miRNA表达上调,11个表达下调。文献报道这些miRNA在胚胎发育早期具有重要作用。其中miR-149-5p是最丰富的胎盘特异性miRNA之一,对人类滋养层细胞系HTR-8/SVneo细胞的侵袭能力具有很强的促进作用,在先兆子痫的发病过程中产生重要影响^[15]。周期蛋白依赖性激酶1(CDK1)是细胞周期唯一必需的周期蛋白依赖性激酶,在胚胎发育的早期阶段至关重要,研究显示,用miR-5096和miR-3609的模拟物转染细胞会导致CDK1表达下调^[16],然而缺少CDK1胚胎将无法发育成桑椹胚和囊胚^[17]。miR-1299是著名的肿瘤抑制因子,而人类胎盘滋养层细胞与肿瘤细胞具有相似的细胞增殖和侵袭特性。进一步研究发现,这些差异表达miRNA靶基因的功能富集通路的异常将影响胎盘滋养细胞增殖、侵袭,或是引起胎盘浅着床、胎盘血管形成障碍等。值得一提的是,其中部分通路已被证实与RSA发病相关。通过研究RSA患者绒毛组织,发现活化的胞浆蛋白1(NOD1)受体、胞浆蛋白2(NOD2)受体可以通过MAPK/p53信号通路降低滋养细胞的侵袭性^[18]。mTOR通路调节脂质代谢,自噬,蛋白质合成等多种生物过程,该通路在妊娠早期胚胎着床中起着关键作用^[19]。

本研究初步探讨RSA患者与正常妊娠人群的血浆外泌体miRNA确实存在差异,生物信息学结果显示这些差异表达miRNA可能参与RSA的发生,此为疾病的诊断和治疗提供了新的思路。由于样本量少,我们将在后续实验中进一步验证以上结果,并进行相关的信号通路研究,为RSA的临床诊治提供潜在的分子靶标。

[参考文献]

[1] 谢 幸,孔北华,段 涛,等. 妇产科学[M]. 9版. 北京: 人民卫生出版社,2018:72
 [2] Yang Y, Cheng L, Deng X, et al. Expression of GRIM-19 in unexplained recurrent spontaneous abortion and possible pathogenesis [J]. Mol Hum Reprod, 2018, 24 (7) : 366-374
 [3] Cuesta Torres LF, Zhu W, Ohrling G, et al. High-density

- lipoproteins induce miR - 223 - 3p biogenesis and export from myeloid cells: Role of scavenger receptor BI-mediated lipid transfer[J]. *Atherosclerosis*, 2019, 286(1): 20-29
- [4] Zhao X, Jia Y, Chen H, et al. Plasma-derived exosomal miR-183 associates with protein kinase activity and may serve as a novel predictive biomarker of myocardial ischemic injury[J]. *Exp Ther Med*, 2019, 18(1): 179-187
- [5] Feng W, Dean DC, Hornicek FJ, et al. Exosomes promote pre-metastatic niche formation in ovarian cancer[J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 124
- [6] Paggetti J, Haderk F, Seiffert M, et al. Exosomes released by chronic lymphocytic leukemia cells induce the transition of stromal cells into cancer-associated fibroblasts[J]. *Blood*, 2015, 126(9): 1106-1117
- [7] Vidal M. Exosomes: revisiting their role as 'garbage bags' [J]. *Traffic*, 2019, 20(11): 815-828
- [8] 杨玮杰, 李佳翌, 陈良键, 等. 人脐带间充质干细胞外泌体的分离鉴定及其溶血性能研究[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2019, 39(2): 165-170
- [9] Samanta S, Rajasingh S, Drosos N, et al. Exosomes: new molecular targets of diseases [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2018, 39(4): 501-513
- [10] Kurian NK, Modi D. Extracellular vesicle mediated embryo - endometrial cross talk during implantation and in pregnancy[J]. *J Assist Reprod Genet*, 2019, 36(2): 189-198
- [11] Donker RB, Mouillet JF, Chu T, et al. The expression profile of C19MC microRNAs in primary human trophoblast cells and exosomes [J]. *Mol Hum Reprod*, 2012, 18(8): 417-424
- [12] Hromadnikova I, Dvorakova L, Kotlabova K, et al. The prediction of gestational hypertension, preeclampsia and fetal growth restriction via the first trimester screening of plasma exosomal C19MC microRNAs [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(12): E2972
- [13] Noguier-Dance M, Abu-Amero S, Al-Khtib M, et al. The primate-specific microRNA gene cluster (C19MC) is imprinted in the placenta [J]. *Hum Mol Genet*, 2010, 19(18): 3566-3582
- [14] Salomon C, Ryan J, Sobrevia L, et al. Exosomal signaling during hypoxia mediates microvascular endothelial cell migration and vasculogenesis [J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e68451
- [15] Xiaobo Z, Qizhi H, Zhiping W, et al. Down-regulated miR-149-5p contributes to preeclampsia via modulating endoglin expression [J]. *Pregnancy Hypertens*, 2019, 15: 201-208
- [16] Fitzpatrick C, Bendek MF, Briones M, et al. Mitochondrial ncRNA targeting induces cell cycle arrest and tumor growth inhibition of MDA - MB - 231 breast cancer cells through reduction of key cell cycle progression factors [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(6): 423
- [17] Santamaria D, Barriere C, Cerqueira A, et al. Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle [J]. *Nature*, 2007, 448(7155): 811-815
- [18] Wang Z, Liu M, Nie X, et al. NOD1 and NOD2 control the invasiveness of trophoblast cells via the MAPK/p38 signaling pathway in human first - trimester pregnancy [J]. *Placenta*, 2015, 36(6): 652-660
- [19] Huang F, Sun Y, Gao H, et al. Carbon disulfide induces embryo loss by perturbing the expression of the mTOR signalling pathway in uterine tissue in mice [J]. *Chem Biol Interact*, 2019, 300(1): 8-17

[收稿日期] 2019-07-13