

miR-518d 在正常妊娠及妊娠期糖尿病患者胎盘及血清中的表达研究

薛璇,王琪,石中华,赵纯*

(南京医科大学附属南京妇幼保健院产科,南京 江苏 210004)

[摘要] 目的:检测正常妊娠及妊娠期糖尿病患者胎盘及血清中 microRNA518d(miR-518d)的表达,探讨其在妊娠期糖尿病发病及诊断中的作用。方法:选择无妊娠并发症和合并症的足月剖宫产分娩产妇 20 例及妊娠期糖尿病足月剖宫产分娩产妇 20 例。分别收集两组的新鲜胎盘组织及母体血清,用 Taqman 实时荧光定量 PCR 方法检测两组 miRNAs 的变化。结果:miR-518d 在妊娠期糖尿病胎盘中的表达(4.35 ± 0.88)显著高于对照组(1.04 ± 0.73)($P < 0.01$),而其在妊娠期糖尿病血清中的表达水平(2.43 ± 1.07)也明显高于对照组(0.96 ± 0.88)($P < 0.05$),生物信息学预测过氧化物酶体增殖物激活受体 α(PPARα)3'UTR 区含有 miR-518d 的结合位点,且胎盘 miR-518d 表达水平和血清雌二醇水平呈正相关($R^2 = 0.759, r = 0.871$)。结论:miR-518d 可能通过调控 PPARα 基因参与妊娠期糖尿病的发病,有望成为妊娠期糖尿病的潜在诊断指标。

[关键词] miR-518d;妊娠期糖尿病;雌二醇;胎盘;过氧化物酶体增殖物激活受体 α

[中图分类号] R714

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)11-1572-04

doi:10.7655/NYDXBNS20131121

Investigation on the expression of miR-518d in the placenta and serum of gestational diabetes mellitus and normal pregnant women

Xue Xuan, Wang Qi, Shi Zhonghua, Zhao Chun*

(Department of Gynecology, Nanjing Maternity and Child Health Hospital Affiliated to NJMU, Nanjing 210004, China)

[Abstract] **Objective:**To investigate the expression level of miR-518d in the placenta and maternal serum of gestational diabetes mellitus and normal pregnant women. **Methods:**The expression of miR-518d in placenta and serum was measured by Taqman RT-PCR in 20 women with GDM and 20 women with normal term pregnancy. **Results:**Expression of miR-518d in placenta was significantly up-regulated in GDM group(4.35 ± 0.88)compared to control group(1.04 ± 0.73)($P < 0.01$). Expression of miR-518d in serum was also up-regulated in GDM group (2.43 ± 1.07)compared to control group (0.96 ± 0.88)($P < 0.05$). We also showed that PPARα was a direct target of miR-518d with a specific binding site at the seed sequence. And expression of miR-518d in the placenta was significantly positive correlated with the expression of serum E2 ($R^2=0.759, r = 0.871$). **Conclusion:**miR-518d is related with the mechanism of GDM and we suggest that upregulation of miR-518d may be associated with the pathogenesis of GDM via an effect on the regulation of PPARα expression.

[Key words] miR-518d;GDM;estradiol;placenta; PPARα

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(11): 1572-1575]

妊娠期糖尿病(GDM)是产科常见的妊娠并发症,是指妊娠期首次发现或发生不同程度的糖代谢异常。GDM 与孕妇及围产儿的一些严重并发症的发生密切相关,如羊水过多、巨大儿、新生儿呼吸窘迫

综合征等^[1]。近年来,GDM 患病人数在不断增加,在我国孕产妇中,其发生率约占妊娠的 5%~6%。然而 GDM 发病具体的分子机制至今尚不十分清楚。因此有必要深入研究 GDM 的发病机制,寻找有效的诊断指标。

近年来研究发现,一些 miRNA 在人胎盘中高表达或特异表达,并且它们能够被胎盘滋养细胞分泌进入母体外周血循环中^[2]。研究表明,miR-517、miR-

[基金项目] 国家自然科学基金(81000258,81100436);江苏省自然科学基金(BK2010586)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: zhaochun2008@yeah.net

518 和 miR-519 家族均位于 19q 染色体上,它们随着妊娠的进展,在母体循环中的表达越来越高,有研究者推测它们有望成为妊娠相关疾病的诊断指标^[3]。前期工作中,分析比较了 4 个正常妊娠胎盘和 5 个 GDM 孕妇病理胎盘中 667 个已知 miRNAs 的表达情况,miRNA 的表达水平以 U6 snRNA 作为内参进行标准化。芯片结果显示包括 miR-518d 在内的数十个 miRNAs 在 GDM 胎盘中表达发生异常,其中 miR-518d 的表达在 GDM 胎盘中明显上调。因此本研究拟通过检测 miR-518d 在妊娠期糖尿病胎盘及母体血清中的表达,来探讨其在妊娠期糖尿病发生及诊断中的作用。

1 对象和方法

1.1 对象

分别选择本院 2011 年 1 月~2012 年 1 月收治的剖宫产分娩 GDM 产妇和剖宫产分娩的正常产妇各 20 例作为研究组及对照组,排除高血压、肝肾病、糖尿病等病史。所有 GDM 患者符合《妇产科学》第 6 版诊断标准,研究组年龄(28.5 ± 3.4)岁,孕周(38.5 ± 0.7);对照组年龄(27.2 ± 3.1)岁,孕周(38.5 ± 0.6)周。研究对象的样本及资料采集均经患者知情同意,并获南京市妇幼保健院伦理委员会批准。

人雌激素 ELISA 试剂盒(上海逸峰);RNAiso for Small RNA 试剂盒(TaKaRa Code:D340A,日本);miRNeasy kit(Qiagen,德国);Trizol 试剂(Invitrogen,美国);逆转录试剂盒和 Taqman 检测试剂盒、miR-518d 及 U6 特异性检测引物(Applied Biosystems Inc,美国)。

1.2 方法

1.2.1 标本处理

剖宫产术娩出胎盘,采集母体面中央处(避开钙化区及出血点)大小约 $1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$ 组织块,用生理盐水清洗,干净纱布吸干水分后放入液氮中速冻,后置于液氮保存。同时抽取相应患者空腹外周静脉全血 5 ml,立即 $5\,000 \text{ r/min}$ 离心 3 min,吸取上层血清,置 -80°C 低温冰箱备用。

1.2.2 样品 RNA 提取

液氮取出保存的胎盘组织,剪取 100 mg 左右,倒入液氮研磨至粉末状,应用 RNAiso for Small RNA 进行 Small RNA 的提取,步骤严格按照说明书操作。最后加入 50 μl 无 RNA 酶水溶解 RNA,取 1 μl 样品分光光度计测量 RNA 浓度,RNA 溶液 -80°C 冷冻保存。

取 100 μl 血清,加 3 倍体积的 TRIzol 室温放置

15 min,然后加入与血浆等体积的氯仿,震荡 50 s,室温 15 min, $14\,000 \text{ r/min}$, 4°C ,离心 15 min;将水相转移到新的 15 ml 离心管,加入 1.5 倍水相体积的无水乙醇,充分混匀;用 QIAGEN 公司的 miRNeasy kit 富集 RNA,步骤严格按照说明书操作。最后加入 50 μl 无 RNA 酶水溶解 RNA,取 1 μl 样品分光光度计测量 RNA 浓度,RNA 溶液 -80°C 冷冻保存。

1.2.3 ELISA 法测定血清雌激素水平

从室温平衡 20 min 后的铝箔袋中取出所需板条,在待测样本孔中先加入样本稀释液 40 μl ,再加待测样本 10 μl ,标准孔中加入不同浓度标准品 50 μl ,随后在样本孔和标准品孔中加入 HRP 标记的检测抗体 100 μl ,封板膜封住反应孔, 37°C 孵育 60 min,弃去各孔液体,洗板机重复洗 5 遍,所有孔加入底物 A、B 液各 50 μl , 37°C 孵育 15 min,所有孔加入终止液 50 μl ,15 min 内,450 nm 波长处测定各孔吸光度值。按照标准品浓度计算标准曲线,从而计算出血清雌激素的水平。

1.2.4 实时荧光定量 PCR

使用 TaqMan microRNA 探针试剂和 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪进行逆转录和 PCR 扩增。按照说明书先进行 RNA 逆转录反应得到 cDNA,反应步骤为 16°C 孵育 30 min, 42°C 反应 30 min, 85°C 孵育 5 min。得到 cDNA 后,再根据说明书进行 q-PCR。PCR 的反应条件是: 95°C 5 min 进行 1 循环 \rightarrow 95°C 、15 s, 60°C 、1 min 进行 45 个循环。Has-miR-518d 上游引物: 5'-ACACTCCAGCTGGGCAAAGCGCTTCCCTT-3',下游引物: 5'-CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGCTCCAAA-3',以 U6 做内参。

1.2.5 PCR 产物的质量检测

取 PCR 产物 4 μl 加入 1 μl 6 \times Loading Buffer 混匀后上样,电泳液用 1 \times TBE;150 V 电泳 60 min 后紫外投射仪下观察。

1.3 统计学方法

Real-time PCR 反应刚刚进入对数期时,原始模板浓度及体系等差异尚未被放大,扩增的目的片段的量可以近似地看作只与起始浓度和扩增效率相关。个体 miRNAs 检测的不同表达水平以 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 表示,其中 $\Delta\text{Ct}=\text{Ct}_{\text{样本}}-\text{Ct}_{\text{U6}}$ 。采用 SPSS16.0 软件统计分析,所有数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用 t 检验进行两组的比较。

2 结果

2.1 两组临床资料比较

两组孕妇年龄、孕周均无统计学差异，然而GDM组孕妇BMI、血清雌二醇水平、胎盘重量及新生儿体重均显著高于对照组($P < 0.05$,表1)。

2.2 两组胎盘及血清中 miR-518d 的表达

GDM组胎盘中 miR-518d 的表达(4.35 ± 0.88)显著高于对照组($1.04 \pm 0.73, P < 0.01$);GDM组血清中 miR-518d 的表达(2.43 ± 1.07)也显著高于对照组($0.96 \pm 0.88, P < 0.05$,图1)。

表1 两组临床资料比较

Table 1 The clinical characteristics of GDM group and control group

组别	例数	孕周(w)	年龄(岁)	血清雌二醇(pg/ml)	BMI(kg/m ²)	新生儿体重(g)	胎盘重量(g)
GDM	20	38.5 ± 0.7	28.5 ± 3.4	291.70 ± 23.42	29.2 ± 2.1	3 752 ± 417	656 ± 101
Control	20	38.5 ± 0.6	27.2 ± 3.1	251.85 ± 25.37	27.1 ± 1.8	3 265 ± 579	534 ± 92
<i>P</i>		> 0.05	> 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.001

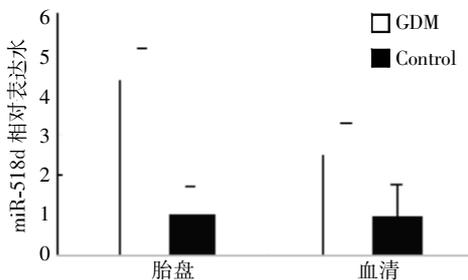


图1 妊娠期糖尿病孕妇及正常孕妇胎盘和母体血清中 miR-518d 的表达情况

Figure 1 The expression of miR-518d in the placenta and serum of GDM and normal pregnant women

2.3 生物信息学预测 PPAR α 是 miR-518d 靶基因

通过3个 miRNA 靶基因预测软件(TargetScan、PicTar 和 miRanda) 共同发现在过氧化物酶体增殖物激活受体 α (PPAR α) 基因的3'UTR区有1个 miR-518d 的结合位点(图2)。

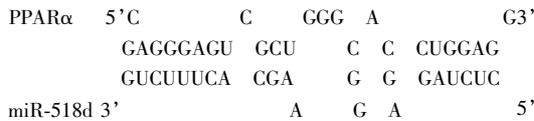


图2 miR-518d 与过氧化物酶体增殖物激活受体 α 基因3' UTR 区的结合模拟图

Figure 2 Schematic diagram of the miR-518d binding site in the 3'-UTR region of the PPAR α gene

2.4 胎盘 miR-518d 的表达水平与孕妇血清雌二醇水平的相关性

胎盘 miR-518d 的表达水平与血清雌二醇水平呈显著正相关($R^2 = 0.759, r = 0.871$,图3)。

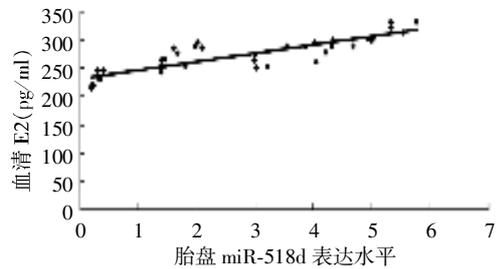


图3 胎盘 miR-518d 与血清雌二醇水平的相关性

Figure 3 The correlation between the expression level of placenta miR-518d and serum E2 level

度保守性。miRNA 的主要功能是调节生物体内在的与机体生长、发育、疾病发生过程有关的基因表达。近年来,miRNA 与疾病的关系已经成为研究的热点和重点,已经发现某些 miRNAs 在胎盘的发育过程中发挥重要的功能,miRNAs 的表达异常和一些胎盘疾病相关^[3-4]。近年来多个研究者均发现在子痫前期患者的胎盘中有特异 miRNA 的异常表达,这些 miRNA 与子痫前期的发病密切相关^[5-7]。然而目前尚无关于妊娠期糖尿病孕妇胎盘中 miRNA 表达的研究。

前期工作中,通过 Taqman 低密度芯片比较了正常孕妇胎盘和妊娠期糖尿病孕妇胎盘,发现 miR-518d 是其中的一个差异 miRNA。本研究首先通过 real-time PCR 方法比较 miR-518d 在妊娠期糖尿病孕妇胎盘及正常孕妇胎盘中的表达水平,结果发现 miR-518d 在妊娠期糖尿病孕妇胎盘中显著高表达。进一步通过 miRNA 靶基因预测软件(TargetScan、PicTar 和 miRanda) 发现 PPAR α 的3'UTR 区有 miR-518d 的结合位点。已有的文献报道,PPAR α 具有多种生物学功能,如增强机体对胰岛素的敏感性、参与体内糖平衡的调节等^[8-9],且 PPAR α 在 GDM 胎盘中表达水平明显低于正常孕妇^[10]。miR-518d 在 GDM 孕妇胎盘中高表达且 PPAR α 在 GDM 孕妇胎

3 讨论

microRNAs(即 miRNAs)是近年来分子生物学研究领域的热点,它的成熟状态是一类长约19~23个核苷酸的小单链 RNA 分子,进化上具有高

盘中低表达,提示 miR-518d 可能通过调控 PPAR α 基因在妊娠期糖尿病发生发展中发挥重要的作用。

雌激素是一种妊娠过程中重要的性激素,在胎盘和外周血清中维持较高的浓度水平,妊娠期间雌二醇水平随妊娠进展逐步升高^[11],且 GDM 孕妇在 37~38 孕周时血浆雌二醇比正常对照组高^[12]。尽管雌激素本身对抗胰岛素的作用较弱,但文献报道雌激素能通过基因组或非基因组效应调节一些基因,从而导致孕妇胰岛素抵抗水平增加^[13]。可见雌激素在妊娠期糖尿病的发生中具有重要的作用。本研究意外发现胎盘 miR-518d 的表达与血清雌二醇的水平呈正相关,提示雌激素有可能促进胎盘 miR-518d 的表达,但仍需要进一步的功能实验验证。

有研究发现,miRNAs 能够稳定存在于血清中,并且可以作为一些疾病的诊断指标^[14]。Chim 等^[15]发现,胎盘来源的 miRNA 在孕期母体血清中高表达,且其在血清中的浓度随着妊娠的进展而增高,其稳定性高于胎盘催乳素等孕期血清标志物。因此,本研究也检测了妊娠期糖尿病孕妇及正常孕妇血清中 miR-518d 的表达水平,发现 miR-518d 在妊娠期糖尿病孕妇血清中 miR-518d 水平明显也高于正常孕妇。因此,miR-518d 可能成为妊娠期糖尿病的诊断指标。

综上所述,雌二醇可能通过某些机制促进胎盘 miR-518d 表达,而 miR-518d 高表达可能通过抑制 PPAR α 基因表达从而降低 GDM 孕妇胰岛素敏感性,促进胰岛素抵抗,从而参与妊娠期糖尿病的发病,且血清 miR-518d 有望成为妊娠期糖尿病的潜在诊断指标,但其功能及具体机制还需要进一步研究分析。

[参考文献]

[1] 孙平平,李华萍,赵 芳. 妊娠期糖代谢异常导致巨大儿发生的危险因素分析[J]. 实用妇产科杂志,2012,28(1):64-67

[2] Luo SS,Ishibashi O,Ishikawa G,et al. Human villous trophoblasts express and secrete placenta-specific microRNAs into maternal circulation via exosomes [J]. Biol Reprod,2009,81(4):717-729

[3] Kotlabova K,Doucha J,Hromadnikova I. Placental-specific microRNA in maternal circulation-identification of appro-

priate pregnancy-associated microRNAs with diagnostic potential.[J]. J Reprod Immunol,2011,89(2):185-191

[4] Seitz H,Royo H,Bortolin ML,et al. A large imprinted microRNA gene cluster at the mouse Dlk1-Gtl2 domain [J]. Genome Res,2004,14(9):1741-1748

[5] 朱晓民,李 怡,姜 锋,等. 子痫前期与正常胎盘组织中微小 RNA 的表达差异及其临床意义 [J]. 现代医药卫生,2011,27(1):3-4

[6] 王桂锋,王晓红,尹国武,等. miR-19a 在正常妊娠及重度子痫前期患者胎盘中的表达 [J]. 现代生物医学进展,2011,11(12):2335-2337

[7] 朱晓明,尹国武,王晓红,等. 子痫前期胎盘组织中 miR-376c 与 miR-210 的表达及其临床意义[J]. 实用妇产科杂志,2010,26(5):380-382

[8] 吕 妍,徐金娥. PPAR 与糖尿病脂代谢的相关性[J]. 齐鲁医学杂志,2013,28(3):277-279

[9] 陆 莹,杜文聪,李 倩,等. 应用 BP 人工神经网络探讨 PPAR- γ 和 RXR- α 基因多态性与汉族人群 2 型糖尿病遗传易感性的关系[J]. 南京医科大学学报:自然科学版,2011,31(1):1-7

[10] Holdsworth-Carson SJ,Lim R,Mitton A,et al. Peroxisome proliferator-activated receptors are altered in pathologies of the human placenta: Gestational diabetes mellitus, intrauterine growth restriction and preeclampsia [J]. Placenta,2010,31:222-229

[11] 赵俊丽,李鹏飞,侯亚义. 17 β -雌二醇调节 JEG-3 细胞的 microRNA 表达研究[J]. 南京晓庄学院学报,2010,3(1):52-56

[12] 张宏秀,陈文玮,孙丽洲. 妊娠期糖尿病胰岛素抵抗的研究进展[J]. 中国妇产科临床杂志,2011,12(2):154-156

[13] Gambino YP,Maymo JL,Perez-perez A,et al. 17beta-estradiol enhances leptin expression in human placenta cells through genomic and nongenomic actions [J]. Biol Reprod,2010,83(1):42-51

[14] Michell PS,Parkin RK,Kroh EM,et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection[J]. Proc Natl Acad Sci U S A,2008,105(30):10513-10518

[15] Chim SS,Shing TK,Hung EC,et al. Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma [J]. Clin Chem,2008,54(3):482-490

[收稿日期] 2013-06-07