

miR-200、miR-155 及血管新生因子与 复发性流产的相关性分析

刘慧¹, 王文珠², 张璐¹, 胥兴丽², 王静静³

1. 青岛市妇女儿童医院, 山东 青岛 266034; 2. 青岛市市立医院, 山东 青岛 266034;

3. 青岛市海慈医疗集团, 山东 青岛 266034

摘要: **目的** 研究 miR-200、miR-155 及血管新生因子与原因不明复发性流产 (unexplained recurrent spontaneous abortion, URSA) 的相关性分析。 **方法** 选择 2015 年 3 月—2018 年 1 月在青岛市妇女儿童医院妇产科就诊的 URSA 患者作为 URSA 组、要求终止妊娠的正常早孕患者作为对照组, 检测绒毛组织中微小 RNA (microRNA, miR) miR-200、miR-155、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、可溶性 FMS 样酪氨酸激酶 1 (soluble FMS like tyrosine kinase-1, sFlt-1) 的表达量及血清中 VEGF、sFlt-1 的含量, 对 miR-200、miR-155 靶向结合 VEGF、sFlt-1 进行生物信息学分析。 **结果** URSA 组的绒毛组织中 miR-200 (1.78 ± 0.32 vs. 0.91 ± 0.15), sFlt-1 (1.87 ± 0.35 vs. 1.06 ± 0.21) 的相对表达量及血清中 sFlt-1 的含量 [(12.39 ± 2.31) ng/ml vs. (6.51 ± 0.95) ng/ml] 均高于对照组, 差异有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。绒毛组织中 miR-155 相对表达量 (0.60 ± 0.10 vs. 0.93 ± 0.16)、VEGF mRNA 相对表达量 (0.59 ± 0.09 vs. 1.02 ± 0.16) 及蛋白表达量 (0.62 ± 0.07 vs. 1.04 ± 0.18)、血清中 VEGF 的含量 [(601.25 ± 94.39) ng/ml vs. (935.12 ± 132.47) ng/ml] 低于对照组, 差异有统计学意义 (均 $P < 0.05$); URSA 组患者绒毛组织中 miR-200 的表达量与血清中 VEGF 的含量、绒毛组织中 VEGF 的表达量均呈负相关, 绒毛组织中 miR-155 的表达量与血清中 sFlt-1 的含量和绒毛组织中 sFlt-1 的表达量均呈负相关; miR-200、miR-155 分别靶向结合 VEGF、sFlt-1 基因的 3' UTR。 **结论** miR-200 表达增多、miR-155 表达减少与 URSA 发生有关, miR-200 靶向 VEGF、miR-155 靶向 sFlt-1 是介导该过程的可能机制。

关键词: 复发性流产; miR-200; miR-155; 血管新生因子

中图分类号: R714.21 文献标识码: A 文章编号: 1006-3110(2020)11-1341-04 DOI: 10.3969/j.issn.1006-3110.2020.11.015

Correlation of miR-200, miR-155 and angiogenesis factors with recurrent spontaneous abortion

LIU Hui¹, WANG Wen-zhu², ZHANG Lu¹, XU Xing-li², WANG Jing-jing³

1. Qingdao Women and Children's Hospital, Qingdao, Shandong 2660342, China;

2. Qingdao Municipal Hospital, Qingdao, Shandong 266034, China;

3. Qingdao Haici Medical Group, Qingdao, Shandong 266034, China

Corresponding author: XU Xing-li, E-mail: xuxl201307@126.com

Abstract: **Objective** To analyze the correlation of miR-200, miR-155 and angiogenic factor with unexplained recurrent spontaneous (URSA). **Methods** URSA patients were selected from Department of Gynecology and Obstetrics, Qingdao Women and Children's Hospital from March 2015 to January 2018 to serve as the URSA group, and normal early pregnancy patients who required termination of pregnancy were considered as the control group. The expression of miR-200, miR-155, vascular endothelial growth factor (VEGF) and soluble FMS like tyrosine kinase-1 (sFlt-1) in villus tissue and the content of serum VEGF and sFlt-1 were analyzed. Bioinformatics analysis of miR-200 and miR-155 targeting VEGF and sFlt-1 was carried out.

Results The relative expression of miR-200 (1.78 ± 0.32 vs. 0.91 ± 0.15) and sFlt-1 (1.87 ± 0.35 vs. 1.06 ± 0.21) in villus tissue and the content of serum sFlt-1 ((12.39 ± 2.31) ng/ml vs. (6.51 ± 0.95) ng/ml) in the URSA group were higher than those of the control group, with statistically significant differences (both $P < 0.05$). The relative expression of miR-155 (0.60 ± 0.10 vs. 0.93 ± 0.16), the relative expression of VEGF mRNA (0.59 ± 0.09 vs. 1.02 ± 0.16) and protein expression (0.62 ± 0.07 vs. 1.04 ± 0.18) in villus tissue, and the serum content of VEGF ((601.25 ± 94.39) ng/ml vs. (935.12 ± 132.47) ng/ml) in the URSA group were all lower than those of the control group, showing statistically significant differences (all $P < 0.05$). In the URSA group, the expression

作者简介: 刘慧 (1977-), 女, 本科, 主管技师, 研究方向: 医学检验。

通信作者: 胥兴丽, E-mail: xuxl201307@126.com。

of miR-200 in villus tissue was negatively correlated with serum content of VEGF and expression of VEGF in villus tissue, while the expression of miR-155 was negatively correlated with serum content of sFlt-1 and sFlt-1 expression in villus tissue. miR-200 and miR-155 targeted the 3'-untranslated region (UTR) of VEGF and sFlt-1, respectively. **Conclusions** The increased expression of miR-200 and the decreased expression of miR-155 are related to the occurrence of URSA, and the targeting of miR-200 to VEGF and miR-155 to sFlt-1 is the possible mechanism.

Key words: recurrent spontaneous abortion; miR-200; miR-155; angiogenesis factor

复发性流产 (recurrent spontaneous abortion, RSA) 是指连续发生 3 次或 3 次以上自然流产, 流行病学资料显示 RSA 的发生率占育龄期女性的 1%~5%, 随着流产次数的增加, RSA 的发生率也呈增加趋势^[1]。在排除染色体异常、生殖道畸形及感染、内分泌等因素引起的 RSA 后, 这类患者被称为不明原因 RSA (unexplained recurrent spontaneous abortion, URSA), 发病机制复杂且未完全阐明。在正常妊娠过程中, 胚胎的着床和发育依赖于胎盘绒毛新生血管的形成, 尤其是在胚胎发育早期的相对缺氧环境下, 新生血管的建立能够为胚胎的着床和发育提供血流灌注^[2-3]。血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 和可溶性 FMS 样酪氨酸激酶 1 (soluble FMS like tyrosine kinase-1, sFlt-1) 是参与胎盘血管新生过程调控的两种因子, 前者促进血管新生、后者拮抗血管新生。已有研究报道, 在 URSA 的绒毛组织中, VEGF 的表达明显减少、而 sFlt-1 的表达明显增多^[4], 但调控 VEGF、sFlt-1 表达的机制并未明确。微小 RNA (microRNA, miR) 是近年来发现的具有广泛生物学作用的非编码小分子 RNA, 能够结合靶基因 mRNA 的 3' 非翻译区 (3'-untranslated region, 3' UTR) 并对靶基因的表达产生负性调控。MiR-200 和 miR-155 是两种已知与胚胎着床有关的 miR, 对胎盘绒毛滋养细胞的增殖、侵袭、血管新生等多个生物学环节均有调控作用^[5-7]。为了明确 miR-200、miR-155 在 URSA 发生中的作用, 本研究具体分析了绒毛组织中 miR-200、miR-155 表达与复发性流产的相关性及其靶向血管新生因子 VEGF、sFlt-1 的作用。

1 对象与方法

1.1 研究对象 选择 2015 年 3 月—2018 年 1 月在青岛市妇女儿童医院妇产科就诊的早孕患者作为研究对象, 包括 50 例 URSA 患者 (URSA 组) 及 50 例要求终止妊娠的正常早孕患者 (对照组)。URSA 组纳入标准: 符合 URSA 诊断; 连续流产 3 次以上; 现已妊娠、孕 6~12 周; 经 B 超检查未发现原始心管搏动, 结合 hCG 检测后临床诊断为难免流产; 留取绒毛组织样本; 无心

脑血管、内分泌、免疫系统疾病史; 近期无药物、手术治疗病史。对照组纳入标准: B 超证实宫内早孕, 孕 6~12 周; 要求终止妊娠; 留取绒毛组织样本; 无流产病史; 无心脑血管、内分泌、免疫系统疾病史。两组患者均取得知情同意并签署相关同意书, 本研究经医院伦理委员会批准。

1.2 血清指标检测 URSA 患者入院后采集肘静脉血 2 ml, 对照组终止妊娠前采集肘静脉血 2 ml, 静置 1 h 凝血, 而后 2 000 r/分离心 10 min, 分离上层血清后采用酶联免疫吸附法试剂盒检测血管新生因子 VEGF、sFlt-1 的含量。

1.3 绒毛组织检测 流产后, 取 2 组患者的绒毛组织, 用生理盐水清洗后在液氮内冷冻 1 h, 而后放入 -80 ℃ 冰箱保存。①采用 miRNA 提取试剂盒提取绒毛组织中的 miRNA, 采用 miRNA cDNA 第一链合成试剂盒将绒毛组织中提取得到的 miRNA 反转录为 cDNA, 采用 miRNA 荧光定量 PCR 检测试剂盒对 miR-200、miR-155、U6 进行扩增, 软件自动生成扩增循环曲线及循环阈值 (Ct), 以 U6 为内参、按照公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算 miR-200、miR-155 的相对表达量。②采用超纯 RNA 提取试剂盒提取绒毛组织中的 RNA, 采用 SuperRT cDNA 第一链合成试剂盒将绒毛组织中提取得到的 RNA 反转录为 cDNA, 采用 UltraSYBR Mixture 试剂盒对 VEGF、sFlt-1、 β -actin 进行扩增, 软件自动生成扩增循环曲线及循环阈值 (Ct), 以 β -actin 为内参、按照公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算 VEGF、sFlt-1 的 mRNA 相对表达量。③采用 RIPA 裂解液裂解绒毛组织, 采用 BCA 试剂盒计算裂解液中总蛋白的含量, 取 30 μ g 总蛋白, 与上样缓冲液混合后加入 SDS-PAGE, 电泳、电转至 NC 膜后将 NC 膜放入 5% 脱脂牛奶中、封闭 2 h, 而后将 NC 膜放入 1:1 000 稀释的 VEGF 一抗或 1:5 000 稀释的 β -actin 一抗, 4 ℃ 孵育过夜; 次日, NC 膜放入二抗中、室温孵育 2 h, 最后用 ECL 显影得到蛋白条带, 根据条带的灰度值计算 VEGF 的相对表达量。1.4 统计学处理 采用 SPSS 21.0 软件对实验数据进行处理, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间的分析采用 *t* 检验, 进行双侧检验, 以 $\alpha=0.05$ 为检

验水准。

2 结果

2.1 两组一般资料比较 两组间年龄、孕周、产次的比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),见表 1。

表 1 两组患者一般资料的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	年龄(岁)	孕周(周)	产次(次)
URSA 组	50	28.69±5.22	9.39±1.25	0.81±0.12
对照组	50	27.96±6.18	9.10±1.34	0.85±0.15
<i>t</i> 值		0.638	1.119	1.472
<i>P</i> 值		0.525	0.266	0.144

2.2 两组绒毛组织中 miR-200, miR-155 的相对表达量 URSA 组的绒毛组织中 miR-200 的表达量高于对照组,miR-155 的表达量低于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$),见表 2。

表 2 两组绒毛组织中 miR-200, miR-155 表达的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	miR-200	miR-155
URSA 组	50	1.78±0.32	0.60±0.10
对照组	50	0.91±0.15	0.93±0.16
<i>t</i> 值		17.407	12.367
<i>P</i> 值		0.000	0.000

2.3 两组血清中 VEGF、sFlt-1 的含量 URSA 组血清中 VEGF 的含量低于对照组,sFlt-1 的含量高于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$),见表 3。

表 3 两组血清中 VEGF、sFlt-1 含量的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	VEGF (ng/ml)	sFlt-1 (ng/ml)
URSA 组	50	601.25±94.39	12.39±2.31
对照组	50	935.12±132.47	6.51±0.95
<i>t</i> 值		14.513	16.646
<i>P</i> 值		0.000	0.000

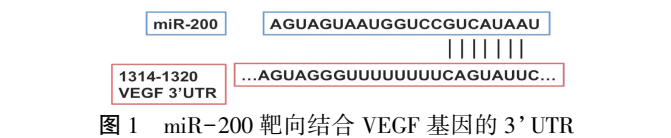
2.4 两组绒毛组织中血管新生因子 VEGF、sFlt-1 的相对表达量 URSA 组的绒毛组织中 VEGF 的 mRNA 表达量及蛋白表达量低于对照组,sFlt-1 的 mRNA 表达量高于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$),见表 4。

表 4 两组绒毛组织中 VEGF、sFlt-1 表达的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	VEGF 的 mRNA 表达量	VEGF 的蛋白表达量	sFlt-1 的 mRNA 表达量
URSA 组	50	0.59±0.09	0.62±0.07	1.87±0.35
对照组	50	1.02±0.16	1.04±0.18	1.06±0.21
<i>t</i> 值		16.563	15.377	14.032
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000

2.5 miR-200 靶向 VEGF 的生物信息学及相关性分析 经 targetsan 网站进行生物信息分析,miR-200 能够靶向结合 VEGF 基因 3' UTR 中第 1 314-1 320 位碱

基,具体见图 1;经 Pearson 检验进行相关性分析,绒毛组织中 miR-200 的表达量与血清中 VEGF 的含量、绒毛组织中 VEGF 的 mRNA 表达量及蛋白表达量均呈负相关, r 分别为-0.241、-0.289、-0.307。



2.6 miR-155 靶向 sFlt-1 的生物信息学及相关性分析 经 targetsan 网站进行生物信息分析,miR-155 能够靶向结合 sFlt-1 基因 3' UTR 中第 1 221-1 227 位碱基,具体见图 2;经 Pearson 检验进行相关性分析,绒毛组织中 miR-155 的表达量与血清中 sFlt-1 的含量、绒毛组织中 sFlt-1 的 mRNA 表达量均呈负相关, r 分别为-0.295、-0.316。

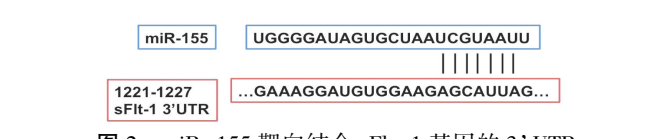


图 2 miR-155 靶向结合 sFlt-1 基因的 3' UTR

3 讨论

URSA 的发病机制至今仍未阐明,胎盘绒毛组织中血管新生障碍可能是该病发生的机制之一。在胚胎发育的早期阶段,胚胎局部处于相对缺氧的环境,此时需要绒毛组织中新生血管的形成来为胚胎发育提供血流灌注,进而使绒毛滋养细胞不断增殖并向子宫蜕膜侵袭、有利于胚胎的着床及发育;当绒毛组织中血管新生发生障碍时,胚胎发育早期持续处于缺氧状态、绒毛滋养细胞无法顺利向子宫蜕膜侵袭,进而造成了流产的发生^[8-9]。

VEGF 和 sFlt-1 是调控血管新生过程中的两种因子^[10]。前者具有促血管新生作用,作用于血管内皮细胞膜上的受体后能够刺激细胞增殖及迁移,进而诱导新生血管形成^[11-13];后者是 VEGF 受体的可溶形式,具有抗血管新生作用,能够与血管内皮细胞膜上的受体竞争性结合 VEGF、削弱 VEGF 刺激内皮细胞增殖及迁移的作用,进而阻碍新生血管形成^[14]。已有研究报道,URSA 患者血清中 VEGF 的含量及绒毛组织中 VEGF 的表达量明显减少,而血清中 sFlt-1 的含量及 sFlt-1 的表达量明显增加^[15-16]。本研究对 URSA 患者血清及绒毛组织中 VEGF、sFlt-1 的分析结果与已有的研究报道一致。因为 Flt-1 的抗体无法区分模型 VEGF 受体及可溶性 VEGF 受体 sFlt-1,而编码模型 VEGF 受体及可溶性 VEGF 受体 sFlt-1 的 mRNA 序列有差异,因此本研究采用 PCR 对绒毛中 sFlt-1 的

mRNA 表达量进行测定,能够准确反应绒毛中 sFlt-1 表达量的变化,结合分析结果说明促血管新生因子 VEGF 的减少、抗血管新生因子 sFlt-1 的增多与 URSA 的发生有关。

VEGF 及 sFlt-1 表达的调控机制复杂,其中 miR 是近年来新发现的表观遗传学调控机制,miR 与靶基因 mRNA 的 3' UTR 结合后能够使 mRNA 发生降解、进而引起靶基因表达的下调。本实验的分析已经证实,URSA 绒毛组织中 VEGF 及 sFlt-1 的 mRNA 表达均发生了改变,说明两种血管新生因子的表达可能受到了 miR 的调控。URSA 相关的 miR 基因芯片研究已经发现,miR-200 和 miR-155 两种 miR 的表达在 URSA 绒毛中发生显著变化^[17-19],本研究采用荧光定量 PCR 对 URSA 绒毛组织中两种 miR 表达的变化进行了验证,结果显示:URSA 绒毛组织中 miR-200 的表达明显增多、miR-155 的表达明显减少,与 miR 芯片的研究结果一致,说明 miR-200 的高表达及 miR-155 的低表达与 URSA 的发生有关。

在明确 URSA 患者中 miR-200、miR-155 及血管新生因子 VEGF、sFlt-1 均发生了变化后,本研究在此基础上对 miR-200 及 miR-155 进行了生物信息学分析,miR-200 能够靶向结合 VEGF 基因 3' UTR 中第 1314-1320 位碱基,miR-155 能够靶向结合 sFlt-1 基因 3' UTR 中第 1221-1227 位碱基,提示 miR-200 能够靶向抑制 VEGF 的表达、miR-155 能够靶向 sFlt-1 的表达。URSA 绒毛组织中高表达的 miR-200 能够使 VEGF 表达减少、低表达的 miR-155 则能使 sFlt-1 的表达增多。经相关性检验对 miR-200 与 VEGF、miR-155 与 sFlt-1 关系进行验证,URSA 患者绒毛组织中 miR-200 的表达量与血清中 VEGF 的含量、绒毛组织中 VEGF 的表达量均呈负相关,绒毛组织中 miR-155 的表达量与血清中 sFlt-1 的含量、绒毛组织中 sFlt-1 的表达量均呈负相关,结合生物信息学分析提示在绒毛组织中 miR-200 靶向 VEGF、miR-155 靶向 sFlt-1,URSA 绒毛中 miR-200、miR-151 表达的改变可能影响 VEGF、sFlt-1 的表达,进而影响血管新生、导致流产发生。

综上所述,miR-200 表达增多、miR-155 表达减少与 URSA 发生有关,miR-200 靶向 VEGF、miR-155 靶向 sFlt-1 是两种 miR 参与疾病发生发展的可能机制。今后可进一步设计细胞实验,在离体培养的绒毛滋养细胞中验证 miR-200 对 VEGF 的靶向作用、miR-155 对 sFlt-1 的靶向作用。

参考文献

- [1] Li W, Hao N, Xiao Y, et al. Clinical characteristics and pregnancy outcomes of new onset epilepsy during pregnancy [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2019, 98(27):e16156.
- [2] Bazer FW, Burghardt RC, Johnson GA, et al. Mechanisms for the establishment and maintenance of pregnancy: synergies from scientific collaborations [J]. *Biol Reprod*, 2018, 99(1):225-241.
- [3] Wen WF, Tsao PN, Lee H, et al. Intentional endometrial injury increases embryo implantation potentials through enhanced endometrial angiogenesis [J]. *Biol Reprod*, 2019, 100(2):381-389.
- [4] Pang L, Wei Z, Li O, et al. An increase in vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF soluble receptor-1 (sFlt-1) are associated with early recurrent spontaneous abortion [J]. *PLoS One*, 2013, 8(9):e75759.
- [5] Zheng Q, Zhang D, Yang YU, et al. MicroRNA-200c impairs uterine receptivity formation by targeting FUT4 and $\alpha 1,3$ -fucosylation [J]. *Cell Death Differ*, 2017, 24(12):2161-2172.
- [6] Jimenez PT, Mainigi MA, Word RA, et al. miR-200 regulates endometrial development during early pregnancy [J]. *Mol Endocrinol*, 2016, 30(9):977-987.
- [7] Robertson SA, Zhang B, Chan H, et al. MicroRNA regulation of immune events at conception [J]. *Mol Reprod Dev*, 2017, 84(9):914-925.
- [8] Olive EL, Xiao E, Natale DR, et al. Oxygen and lack of oxygen in fetal and placental development, feto-placental coupling, and congenital heart defects [J]. *Birth Defects Res*, 2018, 110(20):1517-1530.
- [9] Eddy AC, Chapman H, George EM. Acute hypoxia and chronic ischemia induce differential total changes in placental epigenetic modifications [J]. *Reprod Sci*, 2019, 26(6):766-773.
- [10] Relji M, Porovi A. Maternal serum levels of angiogenic markers and markers of placentation in pregnancies conceived with fresh and vitrified-warmed blastocyst transfer [J]. *J Assist Reprod Genet*, 2019, 36(7):1489-1495.
- [11] Abulata NN, Shaheen IA, Osman OM, et al. The prevalence of combined vascular endothelial growth factor, endothelial nitric oxide synthase and thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor genetic polymorphisms among Egyptian patients with recurrent spontaneous abortion [J]. *J Obstet Gynaecol Res*, 2019, 45(6):1106-1113.
- [12] Bagheri A, Kumar P, Kamath A, et al. Association of angiogenic cytokines (VEGF-A and VEGF-C) and clinical characteristic in women with unexplained recurrent miscarriage [J]. *Bratisl Lek Listy*, 2017, 118(5):258-264.
- [13] Gupta K, Sirohi VK, Kumari S, et al. Sorcin is involved during embryo implantation via activating VEGF/PI3K/Akt pathway in mice [J]. *J Mol Endocrinol*, 2018, 60(2):119-132.
- [14] 林莉, 杨慧霞. sFlt-1 基因的表达调控及作为子痫前期治疗靶点的研究进展 [J]. *中华妇产科杂志*, 2019, 54(4):271-275.
- [15] 杨桦, 韩肖燕, 陈田. 复发性流产影响生命全程保健的免疫病因学研究——可能与抗层粘连蛋白-1 抗体、血管内皮生长因子及其可溶性受体相关 [J]. *中国老年保健医学*, 2019, 17(1):28-31.
- [16] 陈汉华. 血管内皮生长因子和妊娠相关蛋白 A 的表达与复发性流产的相关性分析 [J]. *中国性科学*, 2018, 27(12):81-84.
- [17] Hosseini MK, Gunel T, Gumusoglu E, et al. MicroRNA expression profiling in placenta and maternal plasma in early pregnancy loss [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(4):4941-4952.
- [18] Dong F, Zhang Y, Xia F, et al. Genome-wide miRNA profiling of villus and decidua of recurrent spontaneous abortion patients [J]. *Reproduction*, 2014, 148(1):33-41.
- [19] Amin-Beidokhti M, Mirfakhraie R, Zare-Karizi S, et al. The role of parental microRNA alleles in recurrent pregnancy loss: an association study [J]. *Reprod Biomed Online*, 2017, 34(3):325-330.

收稿日期:2019-12-20