

miR-455 在原因不明复发性流产病人绒毛组织中表达及意义

杨晓杰,宋俊霞,杜增利,王青

(焦作煤业(集团)有限责任公司中央医院,河南 焦作 454000)

摘要:目的 探讨 miR-455 在原因不明复发性流产(URSA)病人绒毛组织中表达及意义。方法 72 例 URSA 病人根据自然流产次数分为 2~3 次者($n=45$)和 ≥ 4 次者($n=27$),同期,选取要求终止妊娠的正常早孕者 40 例作为对照组,留取绒毛组织,利用实时荧光定量 PCR 技术检测绒毛组织中 miR-455、血管内皮生长因子(VEGF)和可溶性血管内皮生长因子受体-1(sFlt-1)基因表达,免疫组化 SP 法检测绒毛组织中微血管密度(MVD)。结果 URSA 病人绒毛组织中 miR-455 和 sFlt-1 mRNA 表达量均高于对照组,而 VEGF mRNA 表达量低于对照组,URSA 中 2~3 次者 miR-455 和 sFlt-1 mRNA 表达量均低于 ≥ 4 次者,而 VEGF mRNA 表达量高于 ≥ 4 次者,均差异有统计学意义($P<0.05$);免疫组化结果显示,URSA 病人绒毛组织中 MVD 为(9.9 ± 3.2)条,低于对照组的(21.5 ± 3.8)条,URSA 中 2~3 次者绒毛组织中 MVD 为(13.4 ± 3.1)条,高于 ≥ 4 次者的(7.2 ± 2.4)条,均差异有统计学意义($P<0.05$);Pearson 相关分析显示,URSA 病人绒毛组织中 miR-455 表达量与 VEGF mRNA 表达量和 MVD 均呈负相关($r = -0.452$ 、 -0.433 , $P<0.05$),而与 sFlt-1 mRNA 表达量呈正相关($r = 0.539$, $P<0.05$)。结论 miR-455 在 URSA 病人绒毛组织中呈高表达,且与 sFlt-1 表达呈正相关,与 VEGF 表达和 MVD 均呈负相关,提示可能通过促进 sFlt-1 表达而抑制 VEGF 信号通路活性,从而抑制绒毛组织中血管新生。

关键词:原因不明复发性流产;miR-455;血管内皮生长因子;可溶性血管内皮生长因子受体-1

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2017.08.015

Expression and significance of miR-455 in villi tissues of patients with unexplained recurrent spontaneous abortion

YANG Xiaojie, SONG Junxia, DU Zengli, WANG Qing

(The Central Coal (Group) Hospital of Jiaozuo, Jiaozuo, Henan 454000, China)

Abstract: Objective To investigate the expression and significance of miR-455 in villi tissues of patients with unexplained recurrent spontaneous abortion(URSA). **Methods** 72 cases of URSA patients were divided into 2 or 3 times($n=45$) group and ≥ 4 times($n=27$) group according to the natural frequency of abortion. Over the same period, 40 cases of the normal pregnancy of terminate were selected as the control group. The expressions of miR-455, VEGF and sFlt-1 genes in villi tissues were detected by real-time PCR technology. The MVD in villi tissues was tested by immunohistochemical SP method. **Results** The expression levels of miR-455 and sFlt-1 mRNA in villus tissues of URSA patients were higher than the control group, while the expression levels of VEGF mRNA were lower than the control group. The expression levels of miR-455 and sFlt-1 mRNA in villus tissues of 2 to 3 times URSA patients were lower than the ≥ 4 times, while the expression levels of VEGF mRNA were higher than the ≥ 4 times. The differences were statistically significant($P<0.05$). The results of immunohistochemistry showed that the MVD in villi tissues of URSA patients was(9.9 ± 3.2), which was lower than(21.5 ± 3.8) in the control group. The MVD of 2 to 3 times URSA patients was(13.4 ± 3.1), which was higher than

基金项目:国家卫生计生委医药卫生科技发展基金(W2016CWHNB08)

好更快的适应社会。精神分裂症病人在药物治疗消除症状后,应重视心理康复、社会功能的康复,尽早回归社会。

参考文献

- [1] 沈渔邨. 精神病学[M]. 4 版. 北京:人民卫生出版社,2005:767-768.
- [2] 徐晖,李峥. 精神疾病患者病耻感的研究进展[J]. 中华护理杂志,2007,42(5):455-458.
- [3] 刘寒,蔡军. 社会独立技能训练程式在精神康复中的应用和效

果评价[J]. 中国康复医学杂志,2013,28(2):184-187.

- [4] 陈学全,汪凯,董毅,等. 精神分裂症患者敌意归因偏向与共情能力及精神症状的关系[J]. 安徽医科大学学报,2013,48(8):949-953.
- [5] 陈华林. 社会技能训练对精神分裂症患者临床结局的研究[J]. 现代诊断与治疗,2014,25(10):2309.
- [6] 刘玉莲,闻利红. 护理干预对肝癌介入术后患者并发症及生活质量的影响[J]. 安徽医药,2014,18(11):2205-2206.

(收稿日期:2017-02-10,修回日期:2017-03-10)

(7.2 ± 2.4) in the ≥ 4 times. The differences were statistically significant ($P < 0.05$). Pearson correlation analysis showed that the expression levels of miR-455 in villi tissues of URSA patients were negatively correlated with the expression levels of VEGF mRNA and MVD ($r = -0.452$ and -0.433 , $P < 0.05$), and were positively correlated with the expression levels of sFlt-1 mRNA ($r = 0.539$, $P < 0.05$). **Conclusion** miR-455 was highly expressed in villus tissues of URSA patients, and was positive correlated with the expression of sFlt-1 while negatively correlated with the expressions of VEGF and MVD. Suggesting that it may inhibit the VEGF signaling pathway activity by promoting sFlt-1 expression, thereby inhibiting angiogenesis in villi tissues.

Key words: Unexplained recurrent miscarriage; miR-455; Vascular endothelial growth factor; Soluble vascular endothelial growth factor receptor-1

复发性流产(RSA)是育龄妇女连续2次或2次以上出现自然流产,发生率约占妊娠总数的1%~5%^[1],RSA病因较为复杂,包括遗传因素、生殖器官结构异常、内分泌因素、免疫因素、感染等^[2],然而,仍有一半的病人无法明确病因,临床上统称为不明原因复发性流产(URSA),由于此类流产病因不明,机制复杂,给临床治疗带来很大挑战。近年来,研究发现,胎盘组织中血管新生增生减少及胚胎供血不足与URSA发生密切相关。微小RNA(miRNA)作为一种高度保守的短小RNA,广泛存在于生物体内,在细胞增殖、分化、凋亡、组织器官发育、免疫等多种生物学功能中发挥重要作用^[3],miR-455是miRNA重要类型,有研究指出^[4-5],miR-455可通过调控血管内皮生长因子(VEGF)信号通路而参与宫颈癌组织中血管新生。可溶性血管内皮生长因子受体-1(sFlt-1)作为VEGF受体,与VEGF结合后可抑制其促血管新生的作用^[6]。本研究拟对miR-455在URSA病人绒毛组织中表达进行分析,探讨其与VEGF及sFlt-1表达相关性,明确miR-455在绒毛组织血管新生中的意义,以期对URSA机制研究提供基础资料。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取2013年12月—2015年12月在焦作煤业(集团)有限责任公司中央医院就诊的URSA病人72例,年龄21~35岁,平均年龄(28.4 ± 4.7)岁,孕龄52~63 d,出现阴道出血或腹痛症状,B超检查未发现原始心管搏动,临床确诊难免流产,自然流产连续发生2次及以上,排除遗传、生殖器官结构异常、内分泌、免疫、感染等方面的因素,其中,连续流产2~3次者45例, ≥ 4 次者27例。同期,选取要求终止妊娠的正常早孕者40例作为对照组,年龄20~34岁,平均年龄(27.8 ± 4.4)岁,孕龄49~61 d,血人绒毛膜促性腺激素检查正常,B超检查为正常宫内早孕、胚胎发育正常,未出现先兆流产症状,同时排除遗传、生殖器官结构异常、内分泌、免疫、感染等方面的因素。所有病人行清宫

术后留取绒毛组织,用生理盐水进行反复冲洗,将每份标本一分为二,一份保存于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中以备检,一份用10%甲醛固定12 h,脱水、石蜡包埋后切片低温保存。本研究经焦作煤业(集团)有限责任公司中央医院医学伦理委员会批准,病人均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂及设备 Trizol总RNA提取试剂盒购自南京赛泓瑞生物科技有限公司,逆转录试剂盒和PCR试剂盒均由上海研卉生物科技有限公司提供,miR-455、VEGF、sFlt-1及内参引物均由上海生工生物公司设计合成,鼠抗人CD34单克隆抗体、HRP标记山羊抗小鼠IgG二抗和免疫组化试剂盒均购自北京中衫金桥生物技术有限公司,7500型实时荧光定量PCR仪由美国ABI公司提供。

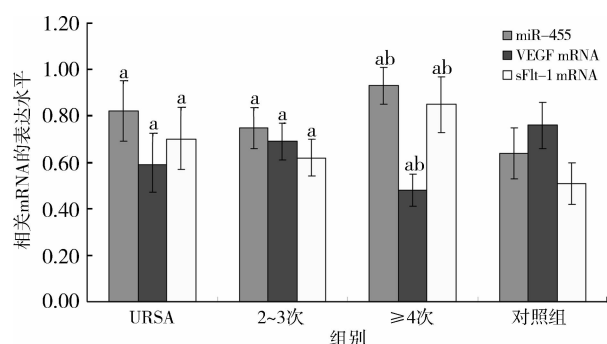
1.2.2 利用实时荧光定量PCR技术检测绒毛组织中miR-455、VEGF和sFlt-1基因表达 取绒毛组织,研磨后,用Trizol总RNA提取试剂盒对组织中总RNA进行提取,利用紫外分光光度计对总RNA纯度进行检测,取 $A_{260}/A_{280} \geq 1.80$ 样品作为合格样品。用逆转录试剂盒将总RNA进行逆转录为单链模板链cDNA,以cDNA为模板,用PCR试剂盒进行PCR。miR-455引物:上游:5'-GAACTGCAGTCCATGGGCATA-3',下游:5'-GCAGGGTCCGAGGTATTCT-3'; VEGF引物:上游:5'-GATCCTGCCCTGTCTCTCTG-3',下游:5'-TCCTCACACCATTGAAACCA-3'; sFlt-1引物:上游:5'-AGAGGAGGCTCAAAATGGAGAAC-3',下游:5'-TCCCAAAGGCACATAAAGGACTA-3'; GAPDH引物:上游:5'-AACTCCCTCAAGATTGTCAGCAA-3',下游:5'-GTG-GTCATGAGCCCTTCCA-3'。PCR反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 60 s,92 $^{\circ}\text{C}$ 45 s,56 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,74 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,连续进行40个循环,每个样品均设置3个平行反应复孔。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法获得绒毛组织中miR-455、VEGF和sFlt-1基因表达量。

1.2.3 免疫组化 SP 法检测绒毛组织中微血管密度(MVD) 取绒毛组织切片,脱蜡后,PBS 液浸泡 3 次,浸泡于含有四乙酸二氨基乙烷(EDTA)的高压锅中,加入枸橼酸钠,加热 2min 进行抗原修复,将一抗鼠抗人 CD34 单克隆抗体按 1:200 稀释后加入,以 PBS 代替一抗作为空白对照,4℃ 过夜孵育,加入 1:600 稀释的二抗 HRP 标记山羊抗小鼠 IgG,孵育 25 min,PBS 冲洗 3 次,DAB 进行显色,复染、封片、观察。CD34 阳性判定标准:血管内皮细胞胞浆中出现棕黄色颗粒状物质;微血管判定标准:依据 CD34 标记情况,将孤立的棕黄色内皮细胞簇或管腔面积 <8 个红细胞,且管壁未见肌层作为一条微血管。于高倍镜下,每个切片取 5 个视野对微血管进行计数,取均值作为 MVD。

1.3 统计学方法 利用 SPSS21.0 统计分析软件进行统计学处理。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析或 t 检验。利用 Pearson 相关分析对变量间相关关系进行分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同组病人绒毛组织中 miR-455、VEGF 和 sFlt-1 基因表达比较 URSA 病人绒毛组织中 miR-455 和 sFlt-1 mRNA 表达量均高于对照组 ($t = 6.514, 10.390, P < 0.05$),而 VEGF mRNA 表达量低于对照组 ($t = 8.408, P < 0.05$),URSA 中 2~3 次者 miR-455 和 sFlt-1 mRNA 表达量均低于 ≥4 次者,而 VEGF mRNA 表达量高于 ≥4 次者,均差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见图 1。



注:与对照组相比,^a $P < 0.05$;与 2~3 次相比,^b $P < 0.05$ 。

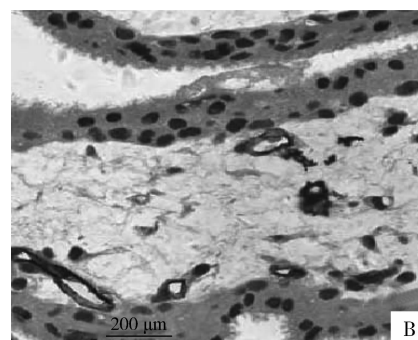
图1 两组病人绒毛组织中 miR-455、VEGF 和 sFlt-1 基因表达比较

2.2 不同组病人绒毛组织中 MVD 计数 免疫组化结果显示,URSA 病人绒毛组织中血管数目减少、发育不佳,管腔出现消失或缩小,见图 2。URSA 病人绒毛组织中 MVD 为 (9.9 ± 3.2) 条,低于对照组

的 (21.5 ± 3.8) 条,差异有统计学意义 ($t = 11.350, P < 0.05$),URSA 中 2~3 次者绒毛组织中 MVD 为 (13.4 ± 3.1) 条,高于 ≥4 次者的 (7.2 ± 2.4) 条,差异有统计学意义 ($t = 4.568, P < 0.05$)。



A. URSA 病人



B. 对照组

图2 免疫组化 SP 法检测绒毛组织中 MVD(SP×400)

2.3 URSA 病人绒毛组织中 miR-455 表达与 VEGF、sFlt-1 和 MVD 相关性 Pearson 相关分析显示,URSA 病人绒毛组织中 miR-455 表达量与 VEGF mRNA 表达量和 MVD 均呈负相关 ($r = -0.452, -0.433, P < 0.05$),而与 sFlt-1 mRNA 表达量呈正相关 ($r = 0.539, P < 0.05$);URSA 病人绒毛组织中 VEGF mRNA 表达量与 sFlt-1 mRNA 表达量呈负相关 ($r = -0.624, P < 0.05$),而与 MVD 呈正相关 ($r = 0.658, P < 0.05$)。

3 讨论

研究表明^[7],胚胎生长发育离不开良好的血液供应,胎盘血管生成机制不全及血管通透性改变等因素均可导致自然流产的发生。miR-455 定位于人染色体 9q32 区脆性位点,与肿瘤组织中血管新生密切相关^[8]。研究表明^[9],抑制 miR-455 可通过影响 PI3K/Akt 信号通路而上调低氧诱导因子-1α 表达,从而启动 VEGF 表达而促进血管新生。本研究显示,URSA 病人绒毛组织中 miR-455 表达量均高于对照组,且 URSA 中 2~3 次者 miR-455 表达量低于 ≥4 次者,说明 miR-455 在 URSA 病人绒毛组织中表达上调,且随着自然流产次数的增多呈上升趋势。

势,提示 miR-455 可能与 URSA 有关。

VEGF 作为最强的促血管生长因子,在促进血管生成、增加静脉血管通透性等方面中发挥重要作用^[10],研究表明^[11],胎盘绒毛滋养细胞及基质巨噬细胞能够产生 VEGF,可促使血管内皮细胞增殖、分化,增加静脉血管通透性。亦有研究指出^[12],VEGF 在胎盘绒毛中表达降低可对胎盘血管重构及滋养细胞浸润产生影响。sFlt-1 主要由胎盘滋养细胞合成分泌,是可溶性 VEGF 跨膜受体,与 VEGF 具有高度亲和力,可阻断 VEGF 信号通路介导的生物学活性^[13]。有研究指出^[14],在早期胎盘缺氧状态下,sFlt-1 表达升高可抑制 VEGF 在促血管生成中的作用,从而引起胚胎因缺乏血供而发育停止。本研究显示,URSA 病人绒毛组织中 sFlt-1 mRNA 表达量均高于对照组,而 VEGF mRNA 表达量低于对照组,URSA 中 2~3 次者 sFlt-1 mRNA 表达量均低于 ≥ 4 次者,而 VEGF mRNA 表达量高于 ≥ 4 次者,说明 sFlt-1 在 URSA 病人绒毛组织中表达上调,而 VEGF 表达被抑制,且这种情况与病人发生自然流产次数有关。免疫组化结果显示,URSA 病人绒毛组织中血管数目减少、发育不佳,管腔出现消失或缩小,URSA 病人绒毛组织中 MVD 低于对照组,URSA 中 2~3 次者绒毛组织中 MVD 高于 ≥ 4 次者,说明 URSA 病人绒毛组织中出现血管生成减少,可能与 sFlt-1 表达上调抑制 VEGF 介导的血管生成作用有关。Pearson 相关分析显示,URSA 病人绒毛组织中 miR-455 表达量与 VEGF mRNA 表达量和 MVD 均呈负相关,而与 sFlt-1 mRNA 表达量呈正相关,进一步提示 miR-455 可能通过促进 sFlt-1 表达而抑制 VEGF 介导的生物学作用,从而减少绒毛组织中血管新生。

综上所述,miR-455 在 URSA 病人绒毛组织中表达上调,且与 sFlt-1 表达呈正相关,与 VEGF 表达和 MVD 呈负相关,提示其可能通过促进 sFlt-1 表达而抑制 VEGF 信号通路活性,从而抑制绒毛组织中血管新生。

参考文献

- [1] SUI Y, CHEN Q, SUN X. Association of skewed X chromosome inactivation and idiopathic recurrent spontaneous abortion: a systematic review and meta-analysis [J]. *Reprod Biomed Online*, 2015, 31(2):140-148.
- [2] GRANTZ KL, HINKLE SN, MENDOLA P, et al. Differences in risk factors for recurrent versus incident preterm delivery [J]. *Am J Epidemiol*, 2015, 182(2):157-167.
- [3] WANG L, YUE Y, WANG X, et al. Function and clinical potential of microRNAs in hepatocellular carcinoma [J]. *Oncol Lett*, 2015, 10(6):3345-3353.
- [4] 李平, 宋鉴清, 王学梅, 等. miR-455 在宫颈癌中的表达及其与 MVD、VEGF 表达的相关性研究 [J]. *现代肿瘤医学*, 2013, 21(9):2058-2061.
- [5] 宋鉴清, 曹伟, 吕昊玥. miR-455-3p 在胃癌中的表达及其与 MVD 和 VEGF 表达的相关性研究 [J]. *临床肿瘤学杂志*, 2014, 19(3):208-211.
- [6] STEPAN H, HERRAIZ I, SCHLEMBACH D, et al. Implementation of the sFlt-1/PIGF ratio for prediction and diagnosis of pre-eclampsia in singleton pregnancy: implications for clinical practice [J]. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2015, 45(3):241-246.
- [7] ALMASRY SM, ELMANSY RA, ELFAYOMY AK, et al. Ultrastructure alteration of decidual natural killer cells in women with unexplained recurrent miscarriage: a possible association with impaired decidual vascular remodelling [J]. *J Mol Histol*, 2015, 46(1):67-78.
- [8] CHAI J, WANG S, HAN D, et al. MicroRNA-455 inhibits proliferation and invasion of colorectal cancer by targeting RAF proto-oncogene serine/threonine-protein kinase [J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(2):1313-1321.
- [9] 张康. miR-455 对宫颈癌 SiHa 细胞生物学特性的影响及其机制 [D]. 北京:中国人民解放军医学院, 2013.
- [10] OSAADON P, FAGAN XJ, LIFSHTITZ T, et al. A review of anti-VEGF agents for proliferative diabetic retinopathy [J]. *Eye (Lond)*, 2014, 28(5):510-520.
- [11] GARNIER V, TRAHOULSI W, SALOMON A, et al. PPAR γ controls pregnancy outcome through activation of EG-VEGF: new insights into the mechanism of placental development [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2015, 309(4):E357-E369.
- [12] FAN X, RAI A, KAMBHAM N, et al. Endometrial VEGF induces placental sFLT1 and leads to pregnancy complications [J]. *J Clin Invest*, 2014, 124(11):4941-4952.
- [13] BECKMANN R, HOUBEN A, TOHIDNEZHAD M, et al. Mechanical forces induce changes in VEGF and VEGFR-1/sFlt-1 expression in human chondrocytes [J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(9):15456-15474.
- [14] ZHAO Y, ZHENG YF, LUO QQ, et al. Edaravone inhibits hypoxia-induced trophoblast-soluble Fms-like tyrosine kinase 1 expression: a possible therapeutic approach to preeclampsia [J]. *Placenta*, 2014, 35(7):476-482.

(收稿日期:2016-09-21,修回日期:2017-06-06)