

miRNA-223-3p 在不明原因复发性流产患者绒毛组织中表达以及在血管生成中的作用

高玉霞¹,董学彩¹,王文翔¹,盛修贵²

(1. 新乡市中心医院妇科,河南 新乡 453000;2. 山东省肿瘤医院妇科,山东 济南 250100)

摘要:目的 探讨 miRNA-223-3p 在不明原因复发性流产患者绒毛组织中表达以及在血管生成中的作用及可能机制。**方法** 选取 57 例不明原因复发性流产患者,其中,流产 2~3 次 36 例,≥4 次 21 例,同期,选取正常早孕行人工流产术患者 42 例作为对照组,利用实时荧光定量 PCR 技术检测绒毛组织中 miRNA-223-3p、Rps6kb1、缺氧诱导因子-1α(HIF-1α)和血管内皮生长因子(VEGF)表达,免疫组化法检测绒毛组织中微血管密度(MVD)。**结果** 不明原因复发性流产患者绒毛组织中 miRNA-223-3p 表达量高于对照组,而 Rps6kb1 mRNA、HIF-1α mRNA 和 VEGF mRNA 表达量均低于对照组,≥4 次不明原因复发性流产患者 miRNA-223-3p 表达量高于 2~3 次和对照组,而 Rps6kb1 mRNA、HIF-1α mRNA 和 VEGF mRNA 表达量低于 2~3 次和对照组,均差异有统计学意义($P < 0.05$);免疫组化结果显示,不明原因复发性流产患者绒毛组织中 MVD 为 (23.3 ± 6.1) 个,远低于对照组的 (41.6 ± 5.3) 个,≥4 次不明原因复发性流产患者绒毛组织中 MVD 低于 2~3 次,均差异有统计学意义($P < 0.05$);Pearson 相关分析显示,不明原因复发性流产患者绒毛组织中 miRNA-223-3p 表达量与 HIF-1α mRNA 和 VEGF mRNA 表达量及 MVD 均呈负相关($r = -0.496$ 、 -0.638 和 -0.597 , $P < 0.001$),HIF-1α mRNA 表达量与 VEGF mRNA 表达量和 MVD 均呈正相关($r = 0.584$ 、 0.439 , $P < 0.001$);VEGF mRNA 表达量与 MVD 呈正相关($r = 0.600$, $P < 0.001$)。**结论** miRNA-223-3p 在不明原因复发性流产患者绒毛组织中表达上调,可能与 Rps6kb1/HIF-1α 信号通路有关。

关键词:不明原因复发性流产;绒毛组织;miRNA-223-3p;缺氧诱导因子-1α

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2018.02.013

Expressions of miRNA-223-3p in villi of unexplained recurrent spontaneous abortion and the role in angiogenesis

GAO Yuxia¹, DONG Xuecai¹, WANG Wenxiang¹, SHEN Xiugui²

(1. Department of Gynecology, Xinxiang Central Hospital, Xinxiang, Henan 453000, China;

2. Department of Gynecology, Cancer Hospital, Jinan, Shandong 250100, China)

Abstract: Objective To investigate the expressions of miRNA-223-3p in villi of unexplained recurrent spontaneous abortion and the role in angiogenesis and possible mechanisms. **Methods** 57 cases of unexplained recurrent spontaneous abortion were selected, among which, abortion 2 or 3 times were 36 cases and ≥4 times were 21 cases. Over the same period, 42 cases of normal pregnancy induced abortion seemed as control group were selected. The expressions of miRNA-223-3p, Rps6kb1, HIF-1α and VEGF in villi were detected by using real-time PCR technology. The MVD in villi were tested by using immunohistochemistry. **Results** The expression levels of miRNA-223-3p in villi of unexplained recurrent spontaneous abortion were higher than the control group, while the expression levels of Rps6kb1 mRNA, HIF-1α mRNA and VEGF mRNA were lower than the control group, the expression levels of miRNA-223-3p in villi of ≥4 times were higher than the 2 to 3 times and the control group, while the expression levels of Rps6kb1 mRNA, HIF-1α mRNA and VEGF mRNA were lower than the 2 or 3 times and the control group, the differences were statistically significant ($P < 0.05$). Immunohistochemistry results showed that the MVD in villi of unexplained recurrent spontaneous abortion patients was (23.3 ± 6.1) , which was much lower than the control group, which was (41.6 ± 5.3) , the MVD in villi of ≥4 times of unexplained recurrent spontaneous abortion was less than 2 or 3 times, the differences were statistically significant ($P < 0.05$). Pearson correlation analysis showed that the expression levels of miRNA-223-3p in villi of unexplained recurrent spontaneous abortion were negatively correlated with the expression levels of HIF-1α mRNA and VEGF mRNA ($r = -0.496$, -0.638 and -0.597 , $P < 0.001$), the expression levels of HIF-1α mRNA were positively correlated with the expression levels of VEGF mRNA and MVD ($r = 0.584$ and 0.439 , $P < 0.001$), and the expression levels of VEGF mRNA was positively correlated with MVD ($r = 0.600$, $P < 0.001$). **Conclusion** The expression of miRNA-223-3p was upregulated in villi of unexplained recurrent spontaneous abortion. It might be related with the Rps6kb1/HIF-1α signaling pathway.

Keywords: unexplained recurrent spontaneous abortion; in villi; miRNA-223-3p; HIF-1α

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81372778)

作者简介:高玉霞,女,硕士研究生

通信作者:盛修贵,男,教授,硕士生导师,研究方向:妇科肿瘤, E-mail:2967939793@qq.com

不明原因复发性流产是指在排除染色体、解剖、感染、免疫、内分泌等因素后,育龄期妇女与同一性伴侣连续发生自然流产超过 2 次,约占复发性流产的 40% ~ 80%^[1],该病发生机制较为复杂,涉及多因素、多步骤,目前尚未研究清楚。研究表明^[2],绒毛血管增生、滋养细胞增殖、侵袭对正常妊娠至关重要,妊娠早期胚胎发育在相对乏氧环境中进行,乏氧可对滋养细胞侵袭及绒毛血管生成进行调节。因此,乏氧可能在不明原因复发性流产中发挥重要作用。微小 RNA(miRNA)作为一种短小单链非编码 RNA,在调控细胞增殖、分化、组织和器官发育、血管生成等多种生物学功能中发挥重要作用^[3],miRNA-223-3p 作为 miRNA 重要类型之一,P70 核蛋白体激酶(Rps6kb1)可能是其潜在靶基因或直接作用基因^[4],而 Rps6kb1 亦是 mTOR 信号通路下游重要的传递分子^[5],研究表明^[6],mTOR 信号通路在调控缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)表达中发挥重要作用。HIF-1 α 是调控缺氧环境下血管新生中发挥关键性作用^[7]。本研究拟对不明原因复发性流产患者绒毛组织中 miRNA-223-3p 表达进行检测,分析其对 Rps6kb1/HIF-1 α 信号通路的影响,以期为发生不明原因复发性流产发生的可能机制提供线索。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2013 年 5 月—2015 年 6 月在新乡市中心医院不明原因复发性流产患者 57 例,年龄 23 ~ 34 岁,平均年龄(27.6 $\pm$ 4.2)岁,孕龄 51 ~ 69 d,临床表现阴道出血或腹痛,B 超提示无原始心管搏动,临床确诊为难免流产,排除解剖结构异常、染色体异常、感染、免疫、内分泌等原因引起的流产,均连续出现自然流 2 次及以上,其中,2 ~ 3 次 36 例, $\geq$ 4 次 21 例。同期,选取正常早孕行人工流产术患者 42 例作为对照组,年龄 24 ~ 36 岁,平均年龄(28.2 $\pm$ 4.5)岁,孕龄 48 ~ 63 d,B 超检查及血绒毛膜促性腺激素检查均正常,无先兆流产症状,均排除解剖结构异常、染色体异常、感染、免疫、内分泌等疾病。所有患者行清宫术后留取绒毛组织,每份标本分成 2 份,1 份用生理盐水冲洗后保存于 -70 $^{\circ}$ C 冰箱中以备检,另 1 份用甲醛固定后,脱水、包埋、切片,保存于 4 $^{\circ}$ C 条件下。本研究通过医院伦理委员会批准,所有患者均知情同意。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂和设备 TRIzol 总 RNA 提取试剂盒由宝生物工程(大连)有限公司提供,逆转录试剂盒和 PCR 试剂盒均由天根生化科技(北京)有限公

司提供,miRNA-223-3p、Rps6kb1、HIF-1 α 、血管内皮生长因子(VEGF)及内参引物序列均由生工生物工程(上海)股份有限公司设计合成,鼠抗人血管内皮细胞 CD34 单克隆抗体、HRP 标记山羊抗鼠二抗和免疫组化 SP 法染色试剂盒由北京中杉金桥生物技术有限公司提供,紫外分光光度计购自上海谱元仪器有限公司,实时荧光定量 PCR 仪购自美国 ABI 公司。

1.2.2 利用实时荧光定量 PCR 技术检测绒毛组织中 miRNA-223-3p、Rps6kb1、HIF-1 α 和 VEGF 表达 取绒毛组织,研磨后加入细胞裂解液裂解,用 TRIzol 总 RNA 提取试剂盒对总 mRNA 进行提取,并用紫外分光光度计检测纯度,以 A₂₆₀/A₂₈₀ $\geq$ 1.80 作为合格样品。用逆转录试剂盒将总 mRNA 逆转录为单链模板链 cDNA,以 cDNA 为模板用 PCR 反应试剂盒进行 PCR,引物序列见表 1。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 60 s,94 $^{\circ}$ C 45 s,56 $^{\circ}$ C 45 s,74 $^{\circ}$ C 30 s,连续进行 38 个循环,以内参为对照,用 2^{- $\Delta\Delta$ C_t}法获得绒毛组织中 miRNA-223-3p、Rps6kb1、HIF-1 α 和 VEGF 表达量。

表 1 引物序列

基因	序列
miRNA-223-3p	上游:5'-GGGGTGTCTCAGTTTGTCAA-3'
	下游:5'-TGCCTGTCTCGGAGTC-3'
U6	上游:5'-GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT-3'
	下游:5'-CGCTTCACGAATTTGCGTGTCTAT-3'
Rps6kb1	上游:5'-TGCTGGACTCTGGGAGCAT-3'
	下游:5'-TGTGTGAGGTAGGGAGGCCAA-3'
HIF-1 α	上游:5'-CGGAACTGAAGACCAACAAC-3'
	下游:5'-CAGAGGCAGGTAATGGAGACA-3'
VEGF	上游:5'-CTTGAGTTGGGAGGAGGATG-3'
	下游:5'-TGGCAGGCAAACAGACTTC-3'
β -actin	上游:5'-TGGCACCCAGCACAAATGAA-3'
	下游:5'-CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA-3'

1.2.3 免疫组化法检测绒毛组织中微血管密度(MVD) 取绒毛组织切片,脱蜡、水化后,进行抗原修复,加入 3% H₂O₂ 以使内源性过氧化物没失活。将鼠抗人血管内皮细胞 CD34 单克隆抗体(1:500 稀释)加入,4 $^{\circ}$ C 下过夜孵育,以 PBS 代替一抗作为阴性对照,将 HRP 标记山羊抗鼠二抗(1:800)加入,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,PBS 冲洗 3 次,DAB 显色 30 min,苏木素复染,中性树胶封片,于高倍镜下观察。微血管阳性判定标准:血管内皮细胞或细胞簇出现棕黄色染色,管腔由 8 个以上红细胞组成,有肌层的不

计在内。每个切片均取 5 个视野进行计数,取均值作为 MVD。

1.3 统计学方法 利用 SPSS 21.0 统计分析软件进行统计学处理。观测资料主要为正态计量资料,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。此外利用 Pearson 相关分析对变量间相关关系进行分析。 $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者绒毛组织中 miRNA-223-3p、Rps6kb1、HIF-1 α 和 VEGF 表达比较 不明原因复发性流产患者绒毛组织中 miRNA-223-3p 表达量高于对照组,而 Rps6kb1 mRNA、HIF-1 α mRNA 和 VEGF mRNA 表达量均低于对照组,均差异有统计学意义($t = 17.058, 11.947, 10.477$ 和 $13.383, P < 0.05$); ≥ 4 次不明原因复发性流产患者 miRNA-223-3p 表达量高于 2~3 次和对照组,而 Rps6kb1 mRNA、HIF-1 α mRNA 和 VEGF mRNA 表达量低于 2~3 次和对照组,均差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

2.2 两组患者绒毛组织中 MVD 比较 免疫组化结果显示,不明原因复发性流产患者绒毛组织中血管发育不良,血管数量减少,管腔变小或消失,见图 1。不明原因复发性流产患者绒毛组织中 MVD 为 (23.3 ± 6.1) 个,远低于对照组的 (41.6 ± 5.3) 个,差异有统计学意义($t = 15.476, P < 0.001$), ≥ 4 次不明原因复发性流产患者绒毛组织中 MVD 为

(18.5 ± 3.7) ,低于 2~3 次的 (26.8 ± 4.1) ,差异有统计学意义($t = 7.034, P < 0.001$)。

2.3 不明原因复发性流产患者绒毛组织中 miRNA-223-3p 表达量与 HIF-1 α 和 VEGF 表达量及 MVD 相关性 Pearson 相关分析显示,不明原因复发性流产患者绒毛组织中 miRNA-223-3p 表达量与 HIF-1 α mRNA 和 VEGF mRNA 表达量及 MVD 均呈负相关($r = -0.496, -0.638$ 和 $-0.597, P < 0.001$);HIF-1 α mRNA 表达量与 VEGF mRNA 表达量和 MVD 均呈正相关($r = 0.584$ 和 $0.439, P < 0.001$);VEGF mRNA 表达量与 MVD 呈正相关($r = 0.600, P < 0.001$)。

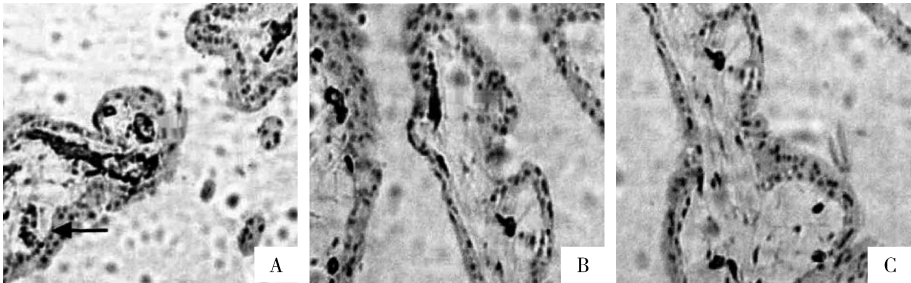
3 讨论

复发性流产作为妇产科常见的疾病,发生率约为 1%~5%,且随着流产次数增加而再次发生的风险随之增加^[8],目前,大部分复发性流产患者不能找到明确原因,对于这部分患者主要采取注射免疫球蛋白、抗凝血等免疫治疗手段,但仍有 20%~30% 患者无效^[9],提示不明原因复发性流产患者仍存在其他病因和机制。研究表明^[10],妊娠早期胚胎在相对缺氧的环境中进行,局部氧分压变化可通过调节滋养细胞侵袭能力及绒毛血管生成而影响胚胎发育。HIF-1 α 作为受氧浓度调节的转录因子,是缺氧环境下诱导血管生成的关键性调控因子^[11],VEGF 作为调控血管生成的中枢性物质,可促进血管内皮细胞及滋养细胞增殖而加速血管生成^[12]。

表 2 两组患者绒毛组织中 miRNA-223-3p、Rps6kb1、HIF-1 α 和 VEGF 表达比较 $\sqrt{x \pm s}$

组别	例数	miRNA-223-3p	Rps6kb1 mRNA	HIF-1 α mRNA	VEGF mRNA
对照组	42	1.24 $\pm$ 0.12	1.83 $\pm$ 0.15	1.71 $\pm$ 0.14	1.65 $\pm$ 0.13
不明原因复发性流产					
2~3 次	36	1.76 $\pm$ 0.15 [*]	1.47 $\pm$ 0.14 ^a	1.45 $\pm$ 0.09 ^a	1.42 $\pm$ 0.09 ^a
≥ 4 次	21	2.14 $\pm$ 0.13 ^{ab}	1.21 $\pm$ 0.10 ^{ab}	1.19 $\pm$ 0.12 ^{ab}	1.14 $\pm$ 0.07 ^{ab}
三组比较	<i>F</i> 值	337.783	118.909	103.257	226.954
	<i>P</i> 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

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



A. 对照组 B. 不明原因复发性流产 2~3 次 C. 不明原因复发性流产 ≥ 4 次

图 1 两组患者绒毛组织中 MVD (SP 法 $\times 400$)

有研究指出^[13],早孕期宫腔缺氧可诱导滋养细胞表达 HIF-1 α , HIF-1 α 可通过促使 VEGF 等的表达而促进滋养层细胞增殖及血管生成,以维持胚胎发育所需营养物质供应。本研究显示,不明原因复发性流产患者绒毛组织中 HIF-1 α mRNA 和 VEGF mRNA 表达量均低于对照组, ≥ 4 次不明原因复发性流产患者 HIF-1 α mRNA 和 VEGF mRNA 表达量低于 2~3 次和对照组,说明不明原因复发性流产患者早孕期绒毛组织中 HIF-1 α 和 VEGF 表达量降低,且随着流产次数增多这种抑制作用越强,提示不明原因复发性流产可能与绒毛组织中 HIF-1 α 和 VEGF 表达下调有关。

miRNA-223-3p 定位于 Xq12,可通过调控其靶基因而调节细胞增殖、凋亡过程,与多种恶性肿瘤发生及侵袭、转移过程有关^[14]。研究表明^[15],miRNA-223-3p 可作为抑癌基因而发挥作用,可通过调控 Artemin、IGF-1R 等靶点而抑制实体肿瘤的增殖及侵袭、转移。亦有研究指出^[16],miRNA-223-3p 可直接调控 IGF-1R 下游 Akt/mTOR/Rps6kb1 信号通路而调控细胞增殖。本研究显示,不明原因复发性流产患者绒毛组织中 miRNA-223-3p 表达量高于对照组, ≥ 4 次不明原因复发性流产患者 miRNA-223-3p 表达量高于 2~3 次和对照组,说明 miRNA-223-3p 在不明原因复发性流产患者绒毛组织中表达上调,且与流产次数有关,提示 miRNA-223-3p 表达上调可能与不明原因复发性流产有关。本研究显示,不明原因复发性流产患者绒毛组织中 Rps6kb1 mRNA 表达量均低于对照组, ≥ 4 次患者 Rps6kb1 mRNA 表达量低于 2~3 次和对照组,说明不明原因复发性流产患者绒毛组织中 Rps6kb1 信号分子被抑制,Pearson 相关分析显示,不明原因复发性流产患者绒毛组织中 miRNA-223-3p 表达量与 HIF-1 α mRNA 和 VEGF mRNA 表达量均呈负相关($r = -0.496$ 、 -0.638 , $P < 0.001$),免疫组化结果亦显示,不明原因复发性流产患者绒毛组织中 MVD 远低于对照组,提示不明原因复发性流产患者绒毛组织中高表达 miRNA-223-3p 可能通过抑制 Rps6kb1/HIF-1 α 信号通路而使 HIF-1 α 和 VEGF 表达降低,使绒毛组织对低氧环境耐受性降低,使血管生成数量减少,导致 MVD 降低,而使滋养层及胎盘血供不足,使早孕儿血循环障碍而导致流产发生。

综上所述,miRNA-223-3p 在不明原因复发性流产患者绒毛组织中表达上调,可能与 Rps6kb1/HIF-1 α 信号通路有关。

参考文献

- [1] ATA B,TAN SL,SHEHATA F,et al. A systematic review of intra-venous immunoglobulin for treatment of unexplained recurrent miscarriage[J]. Fertil Steril,2011,95(3):1080-1085.
- [2] CÖL-MADENDAG I,MADENDAG Y,ALTINKAYA SÖ,et al. The role of VEGF and its receptors in the etiology of early pregnancy loss[J]. Gynecol Endocrinol,2014,30(2):153-156.
- [3] CHEN L,ZHANG BY,FENG GD,et al. The mechanism of miRNA-mediated PGR signaling pathway in regulating female reproduction[J]. Hereditas,2016,38(1):40-51.
- [4] 戴国华,宋宪波,马培泽,等. 微小 RNA-223-3p 通过调节 Rps6kb1/HIF-1 α 信号通路抑制缺血心肌微血管内皮细胞血管新生[J]. 中华心血管病杂志,2014,42(12):1039-1047.
- [5] 郑宜文,王春梅,高学军,等. 奶牛乳腺组织 RPS6KB1 基因启动子甲基化分析[J]. 中国生物化学与分子生物学报,2013,29(5):469-474.
- [6] 何桂钧,朱宏,施瑞华. 雷帕霉素对食管癌细胞缺氧诱导因子-1 α 和糖酵解途径的影响[J]. 肿瘤预防与治疗,2013,26(4):187-191,200.
- [7] MASOUD GN,LI W. HIF-1 α pathway:role,regulation and intervention for cancer therapy[J]. Acta Pharm Sin B,2015,5(5):378-389.
- [8] SESHADRI S,SUNKARA SK. Natural killer cells in female infertility and recurrent miscarriage:a systematic review and meta-analysis[J]. Hum Reprod Update,2014,20(3):429-438.
- [9] 尹璐,金志春. 复发性流产相关免疫因素及作用机制的研究进展[J]. 中西医结合研究,2015,7(3):158-161.
- [10] GRAZUL-BILSKA AT,JOHNSON ML,BOROWICZ PP,et al. Placental development during early pregnancy in sheep:effects of embryo origin on vascularization[J]. Reproduction,2014,147(5):639-648.
- [11] GUO Y,FENG L,ZHOU Y,et al. Systematic review with meta-analysis:HIF-1 α attenuates liver ischemia-reperfusion injury[J]. Transplant Rev (Orlando),2015,29(3):127-134.
- [12] CELLA CA,MINUCCI S,SPADA F,et al. Dual inhibition of mTOR pathway and VEGF signalling in neuroendocrine neoplasms:from bench to bedside[J]. Cancer Treat Rev,2015,41(9):754-760.
- [13] CINDROVA-DAVIES T,VAN PATOT MT,GARDNER L,et al. Energy status and HIF signalling in chorionic villi show no evidence of hypoxic stress during human early placental development[J]. Mol Hum Reprod,2015,21(3):296-308.
- [14] 鲁晓静,江倩,黄鹏丽,等. 直接 RT-PCR 扩增法研究 miR-223 在儿童急性淋巴细胞白血病血浆中的异常表达[J]. 中国实验血液学杂志,2013,21(1):68-72.
- [15] HANEKLAUS M,GERLIC M,O'NEILL LA,et al. miR-223;infection,inflammation and cancer[J]. J Intern Med,2013,274(3):215-226.
- [16] LI G,CAI M,FU D,et al. Heat shock protein 90B1 plays an oncogenic role and is a target of microRNA-223 in human osteosarcoma[J]. Cell Physiol Biochem,2012,30(6):1481-1490.

(收稿日期:2016-12-20,修回日期:2017-02-24)