引用本文:肖欢,张志安,梅军华,等.母体血清微RNA-146a-5p联合三联法检测在孕中期唐氏综合征筛查中的意义[J].安徽医药,2023,27(6):1231-1234.**DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2023.06.040.**
◇临床医学◇

母体血清微RNA-146a-5p联合三联法检测在孕中期唐氏综合征筛查中的意义

肖欢[1],张志安[1],梅军华[1],张仙[2]
作者单位:[1]黄冈市中心医院妇产科,湖北 黄冈438000;
[2]湖北省妇幼保健院妇产科,湖北 武汉430000
通信作者:张仙,女,副主任医师,研究方向为妇产科疾病诊疗,Email:leqing201011@sina.com

摘要: **目的** 探讨母体血清微RNA-146a-5p(miR-146a-5p)联合三联法检测在孕中期唐氏综合征筛查中的意义。**方法** 选取2017年1月至2020年8月于黄冈市中心医院孕中期行唐氏综合征筛查结果为阳性的孕妇65例(病例组),同期选择本院健康的妊娠孕妇65例(对照组)。使用化学发光免疫分析仪检测孕妇血清甲胎蛋白(AFP),人绒毛膜促性腺激素(β-hCG)以及游离雌三醇(uE3)指标。实时荧光定量PCR法检测血清中miR-146a-5p的水平。采用受试者操作特征(ROC)曲线分析母体血清miR-146a-5p联合三联法对孕中期唐氏综合征的预测价值。采用Pearson法分析miR-146a-5p相对表达水平与血清AFP、uE_3、β-hCG中位数的倍数(MOM)值的相关性。**结果** 与对照组(1.89±0.32)U/mL、(1.63±0.36)μg/L、1.03±0.24、(2.41±0.28)μg/L相比,病例组孕妇血清AFP MOM值(2.84±0.27)U/mL、β-hCG MOM值(2.84±0.25)μg/L及血清miR-146a-5p相对表达水平3.07±0.95较高($P<0.05$),uE_3 MOM值(1.71±0.19)μg/L较低($P<0.05$)。Pearson法分析显示,miR-146a-5p与AFP、β-hCG呈正相关($P<0.05$),与uE_3呈负相关($P<0.05$)。ROC曲线结果显示,AFP+uE_3+β-hCG预测孕中期唐氏综合征的曲线下面积(AUC)为0.85,灵敏度分别为83.10%,特异度分别为75.40%;miR-146a-5p预测孕中期唐氏综合征的AUC为0.86,灵敏度为81.50%,特异度为87.70%;miR-146a-5p+AFP+uE3+β-hCG预测子孕中期唐氏综合征的AUC为0.91,灵敏度为86.20%,特异度为80.00%,miR-146a-5p联合三联法检测对孕中期唐氏综合征筛查价值高于三联法检测($P<0.05$)。**结论** 母体血清miR-146a-5p联合三联法对孕中期唐氏综合征的预测效能具有较高的临床价值,可为孕中期唐氏综合征筛查提供一种新途径。

关键词: 唐氏综合征; 微RNA-146a-5p; 新生儿筛查; 妊娠中期; 甲胎蛋白类; 绒毛膜促性腺激素,β亚单位,人;雌三醇

Significance of maternal serum miR-146a-5p combined with triple assay in screening for Down´s syndrome in the midtrimester

XIAO Huan[1],ZHANG Zhian[1],MEI Junhua[1],ZHANG Xian[2]
Author Affiliations:[1]*Obstetrics and Gynecology of Huanggang Central Hospital, Huanggang, Hubei* 438000, *China;*
[2]*Obstetrics and Gynecology of Hubei Maternal and Child Health Hospital, Wuhan, Hubei* 430000, *China*

Abstract: **Objective** To explore the significance of maternal serum microRNA-146a-5p (miR-146a-5p) combined with a triple assay in screening for Down′s syndrome in the midtrimester.**Methods** A total of 65 pregnant women who had positive results of Down′s syndrome screening performed in the midtrimester at Huanggang Central Hospital from January 2017 to August 2020 were selected (case group), and 65 healthy pregnant women from the hospital during the same period were selected (control group). A chemiluminescence immunoassay analyzer was used to detect serum alpha-fetoprotein (AFP), β-human chorionic gonadotropin (β-hCG) and free estriol (uE_3) indicators in pregnant women. A real-time fluorescent quantitative PCR assay was performed to detect the serum miR-146a-5p levels. The receiver operating characteristic (ROC) curve was used to analyze the predictive value of maternal serum miR-146a-5p combined with the triple assay for Down′s syndrome in the midtrimester. The Pearson method was used to analyze the correlation between the relative expression levels of miR-146a-5p and the serum AFP, uE_3, and β-hCG multiple of the median (MOM) values.**Results** Compared with the control group (1.89±0.32) U/mL, (1.63±0.36) μg/L, 1.03±0.24 and (2.41±0.28) μg/L, the serum AFP MOM (2.84±0.27) U/mL, β-hCG MOM values (2.84±0.25) μg/L and the relative serum miR-146a-5p level 3.07±0.95 were higher in pregnant women in the case group ($P<0.05$), and the uE_3 MOM value (1.71±0.19) μg/L was lower ($P<0.05$). Pearson analysis showed that miR-146a-5p was positively correlated with AFP and β-hCG ($P<0.05$) and negatively correlated with uE_3 ($P<0.05$). The ROC curve results showed that the area under the curve (AUC) of AFP+uE_3+β-hCG for predicting Down′s syndrome in the midtrimester was 0.85, with a sensitivity of 83.10% and a specificity of 75.40%; the AUC of miR-146a-5p for predicting Down's syndrome in the midtrimester was 0.86, with a sensitivity of 81.50% and a specificity of 87.70%. The AUC of miR-146a-5p+AFP+uE_3+β-hCG for predicting Down's syndrome in midtrimester was 0.91, with a sensitivity of 86.20% and a specificity of 80.00%. The value of miR-146a-5p combined with the triple assay was higher than that of the triple assay for screening Down's syndrome in midtrimester (P<0.05). **Conclusion** The maternal serum miR-146a-5p combined with triple assay has high clinical value in predicting the efficacy of Down's syndrome in the midtrimester and may provide a new way of screening for Down's syndrome in the midtrimester.

Key words: Down's syndrome; miR-146a-5p; Neonatal screening; Midtrimester; Alpha-fetoprotein class; Chorionic gonadotropin, beta subunit, human; Estriol

唐氏综合征是染色体异常造成的先天性疾病，又称为21-三体综合征。终止妊娠是最有效的方法[1-2]。羊水穿刺是唐氏综合征产前筛查的主要手段，但可引发1.0%胎儿流产，且仅限于唐氏综合征高危孕妇筛查。目前国内孕中期唐氏综合征胎儿筛查方法多为甲胎蛋白(AFP)+人绒毛膜促性腺激素(β-hCG)+游离雌三醇(uE3)三联法[3]。有学者发现三联法检测(AFP+β-hCG+uE3)仍然存在一定程度的假阳性率[4]从而只能作为筛查方法。近年来，研究发现唐氏综合征病儿胎盘合体滋养层细胞可脱落RNA产物至母体血液中，因此母体血液中miRNA可能存在唐氏综合征疾病标志物[5]。微RNA-146a-5p(miR-146a-5p)是参与天然免疫的调控因子，具有调控滋养层细胞的增殖能力。有研究显示巨噬细胞分泌的miR-146a-5p高表达时，抑制滋养细胞侵袭和迁移[6]。因此，本研究将探讨母体血液miR-146a-5p表达水平联合三联法对孕中期唐氏综合征的诊断价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取2017年1月至2020年8月于黄冈市中心医院孕中期行唐氏综合征筛查结果为阳性的孕妇65例(病例组)，孕周范围15~20周，年龄范围24~38岁，年龄(32.18±4.32)岁。同期选择本院健康的妊娠孕妇65例(对照组)，孕周范围15~20周，年龄范围24~38，年龄(31.91±4.41)岁。纳入标准：(1)唐氏综合征产前筛查为高风险，并在终止妊娠后经病理检测证实为唐氏综合征胎儿；(2)单胎妊娠；(3)既往无不良妊娠史。排除标准：(1)合并妊娠期糖尿病、妊娠期高血压、妊娠期甲状腺功能异常者；(2)合并妊娠期肝病、肾病并发症；(3)存在唐氏综合征家族史；(4)存在无脑儿、肾变性、脑积水等胎儿畸形。本研究对象或其近亲属签署知情同意书，且经黄冈市中心医院伦理委员会审核批准(批号20161109)。

1.2 唐氏综合征临床筛查方法 在孕妇空腹状态下采集静脉血3~4 mL，使用美国贝克曼库尔特Access 2化学发光免疫分析仪检测AFP，β-hCG以及uE3等指标，依据血清uE3、β-hCG、AFP水平换算为中位数的倍数(multiple of the median，MOM)，唐氏综合征高风险评估界限，即β-hCG MOM>2.5；AFP MOM值>2.5；uE_3 MOM值≤2.0[7]。

1.3 实时荧光定量PCR法检测孕妇血清中miR-146a-5p的水平 病例组、对照组孕妇入院行唐氏筛查时采取静脉血3~4 mL，离心，留上清液装于采血管中，提取总RNA，依据Rever Tra Ace Qpcr RT Kit(日本Takara公司)指导书反转录得到互补DNA。采用7500实时荧光定量PCR仪(美国ABI公司)对miR-146a-5p及内参U6进行扩增反应。用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算miR-146a-5p相对表达量。miR-146a-5p、U6引物由上海生工合成。

1.4 统计学方法 采用软件SPSS 21.0对数据进行分析，计量资料以$\bar{x} \pm s$表示，两组间比较采用独立样本t检验；计数资料用例(%)表示，采用χ^2检验。采用受试者操作特征(ROC)曲线分析母体血清miR-146a-5p联合三联法对孕中期唐氏综合征的预测价值。采用Pearson法分析miR-146a-5p相对表达水平与血清AFP、uE_3、β-hCG MOM值的相关性，P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组一般资料比较 病例组、对照组年龄、孕周等项均差异无统计学意义(P>0.05)，见表1。

2.2 两组血清miR-146a-5p相对表达水平及血清AFP、uE_3、β-hCG MOM值 与对照组相比，病例组血清AFP、β-hCG MOM值及血清miR-146a-5p相对表达水平较高(P<0.05)，uE_3 MOM值较低(P<0.05)，见表2。

2.3 血清miR-146a-5p相对表达水平与血清AFP、uE_3、β-hCG MOM值相关性分析 Pearson法分析显示，miR-146a-5p与AFP、β-hCG呈正相关(r=0.41，r=0.46，均P<0.001)，与uE_3呈负相关(r=−0.57，P<0.001)，见图1。

2.4 miR-146a-5p联合三联法对孕中期唐氏综合征的预测价值分析 以因变量对照组定义为0，孕中期唐氏综合征定义为1，自变量分别为miR-146a-5p、AFP+uE_3+β-hCG(三联)及miR-146a-5p联合三联的预测概率(经miR-146a-5p、AFP、uE_3、β-hCG二

表1 两组孕妇一般资料比较

项目	对照组（n=65）	病例组（n=65）	χ^2（t）值	P值
年龄（岁，$\bar{x} \pm s$）	31.91±4.41	32.18±4.32	（0.35）	0.725
孕周/（周，$\bar{x} \pm s$）	16.93±3.76	17.84±3.18	（1.49）	0.139
产妇类型/例			0.68	0.410
初产	59	56		
经产	6	9		
孕妇体质量/（kg，$\bar{x} \pm s$）	57.42±9.05	59.88±9.48	（1.51）	0.133
受教育程度/例			1.24	0.539
初中及以下	7	11		
高中、中专	42	37		
大专及以上	16	17		
流产史/例			1.88	0.170
有	5	10		
无	60	55		
高血压史/例			2.97	0.085
有	15	24		
无	50	41		
规律服用叶酸/例			2.61	0.106
是	44	35		
否	21	30		

表2 两组孕妇血清miR-146a-5p水平及血清AFP、uE_3、β-hCG MOM值比较/$\bar{x} \pm s$

组别	例数	miR-146a-5p/U6	AFP MOM值/（U/mL）	uE_3 MOM值/（μg/L）	β-hCG MOM值/（μg/L）
对照组	65	1.03±0.24	1.89±0.32	2.41±0.28	1.63±0.36
病例组	65	3.07±0.95	2.84±0.27	1.71±0.19	2.84±0.25
t值		16.79	18.29	16.68	22.26
P值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注：miR-146a-5p为微RNA-146a-5p，AFP为血清甲胎蛋白，MOM为中位数倍数，uE_3为游离雌三醇，β-hCG为人绒毛膜促性腺激素。

元logistic回归得到），进行ROC曲线分析，结果显示，AFP、uE_3、β-hCG预测孕中期唐氏综合征的曲线下面积（AUC）及其95%CI分别为0.74（0.66，0.83）、0.78（0.70，0.86）、0.76（0.67，0.84）；AFP+uE_3+β-hCG预测孕中期唐氏综合征的AUC及其95%CI为0.85（0.78，0.92）；miR-146a-5p预测孕中期唐氏综合征的AUC及其95%CI为0.86（0.79，0.93）；miR-146a-5p+AFP+uE3+β-hCG预测孕中期唐氏综合征的AUC及其95%CI为0.91（0.86，0.96），灵敏度为86.20%，特异度为80.00%。其中miR-146a-5p+AFP+uE3+β-hCG预测AUC值高于AFP+uE3+β-hCG预测AUC值（Z=1.79，P<0.05），见表3。

表3 miR-146a-5p联合三联法对孕中期唐氏综合征的预测价值分析

项目	AUC	95%CI	灵敏度/%	特异度/%
AFP	0.74	（0.66，0.83）	78.50	72.30
uE_3	0.78	（0.70，0.86）	78.50	73.80
β-hCG	0.76	（0.67，0.84）	70.80	80.00
AFP+uE_3+β-hCG	0.85	（0.78，0.92）	83.10	75.40
miR-146a-5p	0.86	（0.79，0.93）	81.50	87.70
miR-146a-5p+AFP+uE_3+β-hCG	0.91	（0.86，0.96）	86.20	80.00

注：miR-146a-5p为微RNA-146a-5p，AUC为曲线下面积，AFP为血清甲胎蛋白，uE_3为游离雌三醇，β-hCG为人绒毛膜促性腺激素。

3 讨论

随着优生优育政策的全面普及，孕产妇产前筛查意识逐渐增强。AFP、uE_3、β-hCG三联是目前临床上应用较为广泛的血清联合筛查物，具有较高的安全性[8]。AFP由胎儿肝脏和卵黄囊分泌的糖蛋白，通过胎儿的泌尿系统被排泄到羊水中，羊水中AFP可被转运到母体血液中[9]。正常妊娠女性血液中AFP浓度随孕周增加而逐步升高。若胎儿肝脏发育不全，母体血液中AFP浓度会相应下降[10]。uE_3是由胎儿及胎盘分泌，其表达水平随孕周增加逐渐上升，大约在孕90 d时达到峰值[11]。uE3可在胎儿宫内发育过程中具有较好的调节作用[12]。hCG主要由胎盘、滋养层细胞分泌的孕期激素。hCG可吸附在滋养层细胞表面而阻止母体淋巴细胞攻击胚胎滋养层细胞[13]。在孕周范围14~20周时，hCG浓度将随着孕周增加而逐渐下降，但唐氏综合征病儿由于胎盘发育速度较慢，导致hCG下降速度较为缓慢，由此发现唐氏综合征孕妇血清中hCG水平较同

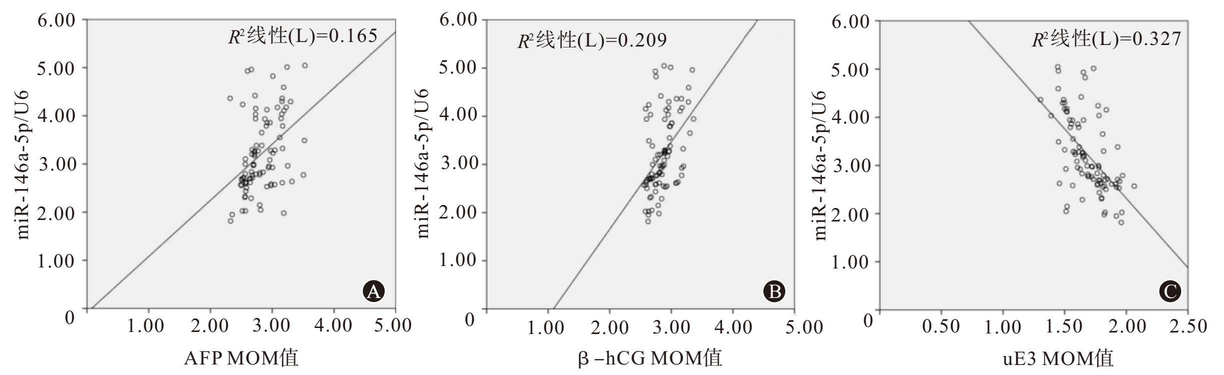

图1 孕中期唐氏综合征的孕妇微RNA-146a-5p（miR-146a-5p）与甲胎蛋白（AFP）、人绒毛膜促性腺激素（β-hCG）、游离雌三醇（uE3）相关性分析：A为AFP相关性分析；B为β-hCG相关性分析；C为uE3相关性分析

孕周的正常孕妇高[14]。本研究发现病例组血清AFP、β-hCG MOM值水平较对照组高，uE_3 MOM值较对照组低（P<0.05），AFP+uE_3+β-hCG预测孕中期唐氏综合征的AUC为0.85，灵敏度为83.10%，特异度为75.40%，提示三联法对预测孕中期唐氏综合征具有预测价值。

妊娠期胎盘可表达独特的miRNA，其中滋养层miRNA可被微粒体携带进而被大量释放到母体血液中，参与细胞增殖和分化，由此猜测miRNA可能与妊娠期疾病发生相关[15-16]。母胎细胞间通信依赖于滋养层的侵袭和迁移。许多研究已经阐明了miRNA在滋养层细胞进展中的重要作用。miR-146a是位于人染色体5q34上，可通过靶向多个基因从而在机体中发挥作用。miR-146a-5p参与细胞的增殖、侵袭和迁移。陈芳荣等[17]研究显示，子痫前期胎盘组织中miR-146a-3p高表达，miR-146a-3p是通过影响滋养层细胞而参与子痫前期疾病发生。miR-146a-5p对乳腺癌细胞的增殖、侵袭和迁移能力有抑制作用[18]。Peng等[19]研究显示，子痫前期胎盘组织中miR-146a-5p呈高表达，且miR-146a-5p过表达会抑制滋养层细胞增殖和侵袭，从而介导子痫前期疾病发生。本研究发现病例组血清miR-146a-5p表达水平较对照组高，提示miR-146a-5p可能影响唐氏综合征发生。猜测miR-146a-5p可能通过影响胚胎滋养层细胞增殖而影响hCG表达水平变化最终影响唐氏综合征疾病发生。本研究发现miR-146a-5p预测孕中期唐氏综合征的AUC为0.86，灵敏度为81.50%，特异度为87.70%，miR-146a-5p与AFP、β-hCG呈正相关，与uE_3呈负相关，ROC分析显示，miR-146a-5p+AFP+uE3+β-hCG预测子孕中期唐氏综合征的AUC为0.91，诊断价值高于三联法。

综上所述，母体血清中miR-146a-5p对唐氏综合征的诊断效能优于AFP、uE_3、β-hCG单独诊断效能，miR-146a-5p联合三联法对孕中期唐氏综合征的诊断效能具有较高的临床价值。但本研究样本来源单一，样本数量有限，后续仍需扩大样本中心，对本研究进行深入探讨。

参考文献

[1] 王晶，姜文，尚丽新. 唐氏筛查在产前筛查及诊断中的应用进展[J]. 人民军医，2021，64(8)：793-796.

[2] 汤冬玲，李栋，韩瑞玲. 孕妇外周血游离DNA检测联合孕中期三联筛查在唐氏综合征中的应用[J]. 中国优生与遗传杂志，2019，27(12)：1465-1466，1469.

[3] 高春利，薛晓丽，窦娟. AFP、β-hCG和uE3联合检测在孕中期产前出生缺陷筛查中的应用价值[J]. 中国实验诊断学，2020，24(5)：727-729.

[4] 张敏波，汪锋平，王小红. 抑制素A在孕中期唐氏综合征产前筛查中的参考价值分析[J]. 中国优生与遗传杂志，2019，27(1)：38-40.

[5] 张青，邹春艳，肖志强. 母体血液指标miR-200C，hsA-miR-124A-3p与常规血清标志物在孕中期唐氏综合征筛查中的随机对照研究[J]. 中国优生与遗传杂志，2020，28(11)：1321-1344.

[6] DING JL，ZHANG Y，CAI XP，et al. Extracellular vesicles derived from M1 macrophages deliver miR-146a-5p and miR-146b-5p to suppress trophoblast migration and invasion by targeting TRAF6 in recurrent spontaneous abortion [J]. Theranostics，2021，11(12)：5813-5830.

[7] 夏乐莎. 孕中期唐氏筛查与产前诊断对预防出生缺陷的临床应用价值[J]. 当代医学，2019，25(27)：25-27.

[8] 高荣理，陈兴壮，王海等. 血清AFP、β-HCG及uE3在高龄孕妇孕中期唐氏综合征筛查中的临床应用价值[J]. 中国优生与遗传杂志，2020，28(12)：1444-1446.

[9] 陈赛，叶大增，陈飞红，等. 孕期AFP、β-hCG、inhibitin A及μE_3水平检测对胎儿唐氏综合征的诊断价值[J]. 中国妇幼保健，2020，35(18)：3442-3444.

[10] 张丽霞，罗雅丽，余文友. 孕中期血清绒毛膜促性腺激素、甲胎蛋白及游离雌三醇水平联合检测筛查唐氏综合征的效果观察[J]. 实用医技杂志，2020，27(1)：55-57.

[11] 柴鸥，侯志敏. 亚甲基四氢叶酸还原酶基因MTHFR多态性与唐氏综合征风险的相关性研究[J]. 河北医药，2020，42(6)：879-881，885.

[12] ALLDRED SK，TAKWOINGI Y，GUO B，et al. First trimester ultrasound tests alone or in combination with first trimester serum tests for Down's syndrome screening[J/CD]. Cochrane Database Syst Rev，2017，3(3)：CD012600. DOI：10.1002/14651858.CD012600.

[13] 朱艳菊，阚长利，肖艳平，等. 孕中期四联筛查唐氏综合征的参考价值[J]. 河北医学，2020，26(4)：615-619.

[14] 杨瑰艳，陈求珠，石秀凤，等. 早孕与中孕期唐氏综合征产前血清学筛查方法及评价[J]. 中国优生与遗传杂志，2017，25(11)：70-72.

[15] ARENA A，IYER AM，MILENKOVIC I，et al. Developmental expression and dysregulation of miR-146a and miR-155 in Down's syndrome and mouse models of Down's syndrome and Alzheimer's disease[J]. Curr Alzheimer Res，2017，14(12)：1305-1317.

[16] ALEXANDROV PN，PERCY ME，LUKIW WJ. Chromosome 21-encoded microRNAs (mRNAs)：impact on Down's syndrome and trisomy-21 linked disease[J]. Cell Mol Neurobiol，2018，38(3)：769-774.

[17] 陈芳荣，郑林媚，吴栋才，等. lncRNA KCNQ1OT1和miR-146a-3p在子痫前期胎盘组织中的表达及调控机制的初步研究[J]. 中华妇产科杂志，2020，55(8)：535-543.

[18] LONG JP，DONG LF，CHEN FF，et al. miR-146a-5p targets interleukin-1 receptor-associated kinase 1 to inhibit the growth，migration，and invasion of breast cancer cells [J]. Oncol Lett，2019，17(2)：1573-1580.

[19] PENG PP，SONG HM，XIE CH，et al. miR-146a-5p-mediated suppression on trophoblast cell progression and epithelial-mesenchymal transition in preeclampsia [J]. Biol Res，2021，54(1)：30-42.

（收稿日期：2021-12-24，修回日期：2022-01-29）