

• 诊治分析 •

miRNA-432-5p在复发性流产患者绒毛组织中的表达及临床意义

林枝, 蔡易臻, 叶瑾, 季敬璋, 白微

【关键词】 复发性流产; 绒毛组织; 微小RNA; 受试者工作曲线

doi:10.3969/j.issn.1671-0800.2024.08.016

【中图分类号】 R714.21 【文献标志码】 A 【文章编号】 1671-0800(2024)08-1043-04

依据我国最新版专家共识《复发性流产诊治专家共识(2022)》^[1],复发性流产(recurrent spontaneous abortion, RSA)被定义为与同一配偶连续发生2次及以上在妊娠28周之前的妊娠丢失,包括生化妊娠。RSA的病因非常复杂,一类与母体相关,一类与胎儿相关,但其致病机制尚不清楚^[2]。微小RNA(miRNA)是一类微小核糖核酸,长度为20~25 nt的非编码RNA,涉及对身体发育和功能至关重要的几个过程,包括细胞分裂和分化、组织重塑及妊娠终止等^[3]。多个最新研究证实miRNAs在RSA中表达失调^[4],通过影响蜕膜细胞因子微生态环境^[5]、抑制滋养层增殖迁移^[6]和胎盘血管生成^[7]等机制调控RSA的发生发展。miRNA-432-5p是较早发现的与肿瘤相关的miRNA,近来有报道在先兆子痫患者中表达升高^[8-9]。本研究拟对RSA患者流产物绒毛组织中的miRNAs进行高通量测序分析,选取miRNA-432-5p进行表达量检测,分析其临床意义和机制,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集2018年6月至2022年9月在浙江中医药大学附属温州市中医院妇产科就诊的因稽留流产行人工流产术的早期RSA患者为病例组。同期因个人因素自愿行人工流产术的经产妇为对照组。两组对象通过采集病史和随访的方式,记录年龄、孕周、现病史、既往史及检验结果等信息。本研究获得温州市中医院伦理委员会批准,所有研究对

象均自愿参加本研究并签署书面知情同意书。

病例组即RSA组依据《复发性流产诊治专家共识(2022)》^[1]确定纳入及排除标准,纳入标准:(1)连续发生2次或以上妊娠丢失;(2)RSA期间配偶未发生更换;(3)血液检查人绒毛膜促性腺激素(HCG)升高,超声影像学检查可见妊娠囊和胎心搏动。对照组纳入及排除标准:(1)生育过1个及以上健康胎儿;(2)血液检查HCG升高,超声影像学检查可见妊娠囊和胎心搏动;(3)排除宫外孕、生化妊娠、意外流产及自然流产等不良妊娠史;(4)排除高血压、糖尿病、肝肾及内分泌等全身性或基础性疾病。

1.2 方法

1.2.1 样本采集 绒毛组织通过人工流产术收集,用医用0.9%氯化钠注射液彻底冲洗干净,去除蜕膜及血液组织后,投入无菌无酶冻存管中,迅速放入液氮中冷冻,冷冻过夜后保存于一80℃冰箱,用于后续检测。

1.2.2 miRNA谱测序及富集分析 从收集的样本中随机选取病例组和对照组样本各3例,送往广州吉赛生物有限公司进行高通量测序分析。对差异表达的miRNA相关靶基因进行基因本体论(GO)基因功能分析,包括生物学过程(BP)、分子功能(MF)及细胞组成(CC);利用京都基因与基因组百科全书(KEGG)数据库对靶基因所富集的信号通路进行分析和筛选,获得有统计学意义的信号通路。

1.2.3 miRNA引物设计 利用茎环法对miRNA进行检测,逆转录和PCR引物均由上海咖沐生物科技有限公司合成,以U6作为内参,引物合成序列见表1。

1.2.4 总RNA提取 使用南京诺唯赞生物科技股份有限公司RNA-easyIsolationReagent提取组织样

基金项目: 温州市基础性科研项目(Y20210740)

作者单位: 325000 浙江省温州,浙江中医药大学附属温州市中医院(林枝、叶瑾、白微);温州医科大学(蔡易臻、季敬璋)

通信作者: 白微, Email: bwwz9613@163.com

表1 RT-PCR引物序列

引物	序列
hsa-miR-432-5p RT	5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACCCACCC-3'
hsa-miR-432-5p F	5'-CGCGTCTTGGAGTAGGTCATT-3'
hsa-miR-432-5p R	5'-AGTGCAGGGTCCGAGGTATT-3'
U6 F	5'-CTCGCTTCGGCAGCACACA-3'
U6 R	5'-AACGTTACGAATTTGCGT-3'

本中总 RNA, 按试剂说明书操作。提取后使用 NanoDropOne 分光光度计检测 RNA 纯度和浓度, 以无酶水作为对照, $A_{260}/A_{280} \geq 1.8$ 表明符合纯度要求, RNA 浓度位于 $800 \sim 1\ 500\ \text{ng}/\mu\text{l}$ 符合要求。将合格的总 RNA 储存于 $-80\ ^\circ\text{C}$ 备用。

1.2.5 miRNA 逆转录 采用 Biosharp 科技有限公司提供的逆转录试剂盒, 按试剂说明书操作。如表 2 所示配制逆转录体系, 用移液器轻轻吹打混匀。逆转录反应条件设置: $25\ ^\circ\text{C}, 10\ \text{min}; 42\ ^\circ\text{C}, 45\ \text{min}; 85\ ^\circ\text{C}, 5\ \text{min}$ 。

1.2.6 实时荧光定量 PCR 采用 Biosharp 科技有限公司提供的试剂盒, 按试剂说明书操作。如表 3 所示配制 PCR 反应体系, 用移液器轻轻吹打混匀。PCR 反应条件设置: 预变性 $95\ ^\circ\text{C}, 10\ \text{min}; 40$ 个循环: $95\ ^\circ\text{C}, 15\ \text{s}; 60\ ^\circ\text{C}, 30\ \text{s}$, 同时采集荧光信号。以 U6 为内参, 用 $\Delta\Delta\text{Ct}$ 的方法计算 miRNA 的相对表达量。

1.3 统计方法 采用 SPSS 22.0、GraphPad prism9 软件进行数据分析, 符合正态分布的计量资料以均数 \pm 标准差表示, 采用 t 检验; 非正态分布计量资料比较采用非参数检验。使用 EdgeR 程序鉴定差异表达基因, 依照 $P < 0.05, \log_2(\text{FC}) > 1.5$ 或 < -1.5 进行差异筛选。采用受试者工作特征 (ROC) 曲线分析诊断的特异度与灵敏度。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料 共纳入 RSA 患者 28 例, 平均年龄 (31.1 ± 3.8) 岁。对照组 17 例, 平均年龄 (30.3 ± 5.5) 岁。

2.2 miRNA 测序筛查结果

2.2.1 miRNA 差异表达分析 共测出 382 个 miRNAs, 依照条件进行差异筛选, 其中差异表达 36 个, 表达上调 16 个 (miR-340-3p、miR-432-5p、miR-543 等), 表达下调 20 个 (miR-320a-5p、miR-486-5p、miR-140-3p 等), 见图 1。

2.2.2 GO 基因功能分析 对差异表达的 miRNA 靶基因进行 GO 基因功能分析, 发现主要涉及细胞对肽类的反应、解剖结构调节、血管生成等生物学过

程; 囊泡膜、细胞质囊泡膜、神经元细胞体等细胞组分; SH3/SHE2、信号衔接因子等分子功能。

2.2.3 KEGG 信号通路分析 对相关靶基因进行 KEGG 信号通路分析发现, 主要涉及 PI3k-Akt、MAPK、Ras 等信号通路, 见图 2。

2.3 两组 miRNA 相对表达量比较 RSA 组 miRNA-432-5p 相对表达量高于对照组 ($P < 0.05$), 见图 3。

2.4 ROC 曲线分析 ROC 曲线分析显示 miRNA-432-5p 作为诊断标志物的曲线下面积为 0.716 ($95\%CI$ 为 $0.565 \sim 0.868, P < 0.05$), 见图 4。

3 讨论

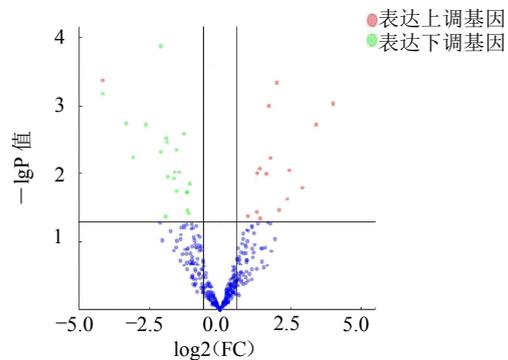
妊娠丢失是临床上一大难题, $25\% \sim 30\%$ 的妊

表2 miR-432-5p 逆转录的反应体系

试剂	容量
5×RTMix	10 μl
miRNA RT primer	1 μl
Total RNA	1 μl
RNasefree ddH ₂ O	Up to 20 μl

表3 miR-432-5p PCR 检测的反应体系

试剂	容量
2×Universal SYBR qPCR Mix	10 μl
Forward primer(10 μmol)	1 μl
Reverse primer(10 μmol)	1 μl
模板 DNA	1 μl
灭菌蒸馏水	Up to 20 μl



注: 蓝色为非差异 miRNA, 红色为上调显著差异 miRNA, 绿色为下调显著差异 miRNA; X 轴为 $\log_2(\text{FC})$ 的展示, Y 轴方向为 $-\lg P$ 值的展示

图1 miRNA 差异筛查火山图

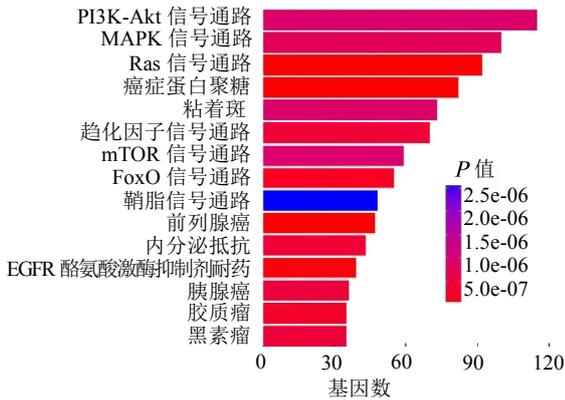


图2 KEGG 信号通路富集分析

娠妇女经历过流产,发生2次及以上妊娠丢失即RSA的概率是1%左右^[10]。在我国,RSA的发生率约为5%,80%发生在早期妊娠。RSA的病因较为复杂,甚至有约50%的患者原因不明。既往研究提示miRNA在RSA中可能发挥了重要作用^[11-14]。比如miRNA-23b-3p在RSA患者蜕膜中表达水平显著高于正常人,其靶基因富集于Wnt信号通路^[15]。miRNA-148a、miRNA-517-3p等miRNAs通过调控NK细胞参与RSA的发病^[16-19],因此深入研究RSA中miRNA的潜在机制对临床诊疗具有重要价值。

本研究对RSA患者绒毛组织进行了miRNA高通量测序,发现有36个miRNAs差异表达,表达上调16个,表达下调20个,其中有部分miRNA已被研究证实与RSA有关,比如miR-486-5p^[20]、miR-183-5p等^[21]。GO功能分析发现这些有表达差异的miRNAs有涉及血管生成的生物学过程和囊泡膜、细胞质囊泡膜等细胞组分。KEGG分析涉及的PI3k-Akt、MAPK、Ras信号通路与复杂的细胞程序如增殖、分化、发育和凋亡等有关,而PI3k-Akt信号通路在血管生成中发挥作用。这些生物学过程、细胞组分和信号通路与绒毛组织的发育是相关的,胚胎发育早期正是细胞增殖、分化的过程,血供丰富的丛密绒毛膜是组成胎盘的重要部分,若绒毛内的血管发育不良或血供不足将导致胚胎发育迟缓或死亡。

本研究选取miR-432-5p来验证绒毛组织中的表达量,与对照组比较,miR-432-5p在RSA组中的相对表达量增高($P < 0.05$),这表明其可能与RSA相关。经过ROC曲线分析发现miR-432-5p可能具有一定的临床诊断价值。miR-432-5p是一种多功能miRNA,目前的研究显示其主要在肿瘤发生和肿瘤

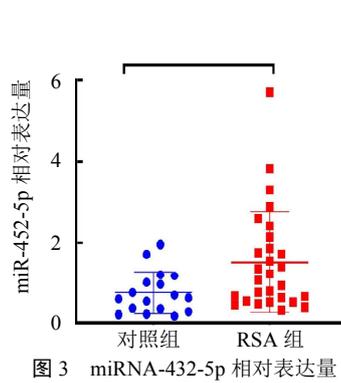


图3 miRNA-432-5p 相对表达量

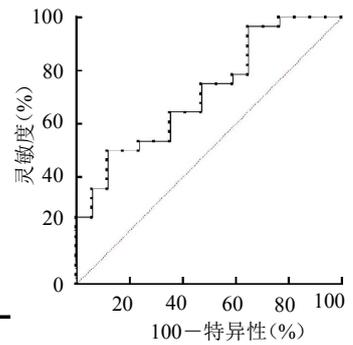


图4 miRNA-432-5p 的ROC曲线

进展中起重要作用^[22-24]。而成长过程中的胎盘和肿瘤都有早期侵袭能力,因此,它们之间可能具有类似的机制。在早期先兆子痫孕妇胎盘和血清中发现miR-432-5p表达升高^[9],在重度先兆子痫中表达水平高于轻度先兆子痫^[8]。这表明miR-432-5p参与妊娠常见并发症中,且与疾病的严重程度相关。本研究提示高表达的miR-432-5p可能参与细胞的增殖和凋亡,降低细胞存活率,影响滋养层细胞的发育,进而影响早期胎盘形成。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

参 考 文 献

- [1] 中华医学会妇产科学分会产科学组, 复发性流产诊治专家共识编写组. 复发性流产诊治专家共识(2022)[J]. 中华妇产科杂志, 2022,57(9):653-667.
- [2] OMELJANIUK W J, LAUDANSKI P, MILTYK W. The role of miRNA molecules in the miscarriage process[J]. Biol Reprod, 2023, 109(1): 29-44.
- [3] NEMLICH Y, GREENBERG E, ORTENBERG R, et al. MicroRNA-mediated loss of ADAR1 in metastatic melanoma promotes tumor growth[J]. J Clin Invest, 2013, 123(6): 2703-2718.
- [4] 袁慧慧,曹泽宁,肖扬,等.非编码RNA与复发性流产关系的研究进展[J].浙江医学,2022,44(3):320-323.
- [5] YE H X, LIL, DONG Y J, et al. MiR-146a-5p improves the decidual cytokine microenvironment by regulating the toll-like receptor signaling pathway in unexplained spontaneous abortion[J]. Int Immunopharmacol, 2020, 89: 107066.
- [6] LU Y B, ZHANG X L, LI X Y, et al. MiR-135a-5p suppresses trophoblast proliferative, migratory, invasive, and angiogenic activity in the context of unexplained spontaneous abortion[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2022, 20(1): 82.
- [7] ZHU Y, LU H, HUO Z, et al. MicroRNA-16 inhibits fetomaternal angiogenesis and causes recurrent spontaneous abortion by targeting vascular endothelial growth factor[J]. Sci Rep, 2016, 6: 35536.
- [8] 尹学敬,杨占辉.子痫前期患者血清中miR-423-5p和miR-204-5p的表达及临床意义[J].实用医学杂志,2019,35(21):3312-3315, 3321.
- [9] TIMOFEEVA A V, GUSAR V A, KANN E, et al. Identification of

- potential early biomarkers of preeclampsia[J]. *Placenta*, 2018, 61: 61-71.
- [10] WHO: recommended definitions, terminology and format for statistical tables related to the perinatal period and use of a new certificate for cause of perinatal deaths. Modifications recommended by FIGO as amended October 14, 1976[J]. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 1977, 56(3):247-253.
- [11] 方紫璇, 余楠. 不明原因复发性流产中 Th17/Treg 免疫平衡机制研究进展[J]. *中国免疫学杂志*, 2021, 37(21):2657-2663.
- [12] 袁柔刚, 赵晓丽, 张欣文. 复发性自然流产过程中蜕膜自然杀伤细胞相关受体的作用机制研究进展[J]. *生殖医学杂志*, 2023, 32(9): 1439-1445.
- [13] D'IPPOLITO S, TICCONI C, TERSIGNI C, et al. The pathogenic role of autoantibodies in recurrent pregnancy loss[J]. *Am J Reprod Immunol*, 2020, 83(1):e13200.
- [14] ZHOU X, XU Y, REN S, et al. Trophoblast PR-SET7 dysfunction induces viral mimicry response and necroptosis associated with recurrent miscarriage[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2023, 120(25): e2216206120.
- [15] 包福玲, 莎如拉, 萨日娜, 等. miRNA-23b-3p 在不明原因复发性流产蜕膜组织中的表达及作用机理研究[J]. *内蒙古医学杂志*, 2023, 55(5):513-518.
- [16] MANASTER I, GOLDMAN-WOHL D, GREENFIELD C, et al. MiRNA-mediated control of HLA-G expression and function[J]. *PLoS One*, 2012, 7(3): e33395.
- [17] HUANG Q, DING J L, GONG M, et al. Effect of miR-30e regulating NK cell activities on immune tolerance of maternal-fetal interface by targeting PRF1[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109: 1478-1487.
- [18] CHAIWANGYEN W, MURRIETA-COXCA J M, FAVARO R R, et al. MiR-519d-3p in trophoblastic cells: Effects, targets and transfer to allogeneic immune cells via extracellular vesicles[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(10): E3458.
- [19] KAMBE S, YOSHITAKE H, YUGE K, et al. Human exosomal placenta-associated miR-517a-3p modulates the expression of PRKG1 mRNA in Jurkat cells[J]. *Biol Reprod*, 2014, 91(5): 129.
- [20] YANG Q, GU W W, GU Y, et al. Association of the peripheral blood levels of circulating microRNAs with both recurrent miscarriage and the outcomes of embryo transfer in an in vitro fertilization process[J]. *J Transl Med*, 2018, 16(1): 186.
- [21] MO Y, CHEN Z, LIU X, et al. Long non-coding RNA small nucleolar RNA host gene 1 alleviates the progression of recurrent spontaneous abortion via the microRNA-183-5p/ZEB2 axis[J]. *Reprod Biol*, 2022, 22(1): 100611.
- [22] LUO M, HU Z, KONG Y, et al. MicroRNA-432-5p inhibits cell migration and invasion by targeting CXCL5 in colorectal cancer[J]. *Exp Ther Med*, 2021, 21(4): 301.
- [23] CHEN H, CHI Y, CHEN M, et al. Long intergenic non-coding RNA LINC00885 promotes tumorigenesis of cervical cancer by upregulating MACC1 expression through serving as a competitive endogenous RNA for microRNA-432-5p[J]. *Cancer Manag Res*, 2021, 13: 1435-1447.
- [24] WANG Z, LI Y, YANG J, et al. Circ-TRIO promotes TNBC progression by regulating the miR-432-5p/CCDC58 axis[J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(9): 776.

收稿日期: 2024-05-02
(本文编辑: 陈志翔)

超声骨刀微创拔牙与胶原蛋白海绵植入在拔牙后牙槽骨吸收中的应用

邹锦波, 刘伟淞, 徐会

【关键词】 微创拔牙; 超声骨刀; 胶原蛋白海绵; 种植修复; 牙槽骨吸收

doi:10.3969/j.issn.1671-0800.2024.08.017

【中图分类号】 R782.1 【文献标志码】 A 【文章编号】 1671-0800(2024)08-1046-04

种植牙修复是近年来口腔科常见治疗手段, 通过修复缺损牙齿能改善患者咀嚼功能, 提升生活质量^[1]。但临床研究中明确, 拔牙术后残留牙槽骨易发生不可逆、进行性吸收, 从而导致牙槽嵴高度降低、宽度减小等生理变化, 影响临床种植牙修复效果, 严

重者甚至对术后咀嚼功能及牙齿美观度等造成较大负面影响^[2-3]。为此, 临床种植牙修复中, 有效改善牙槽骨吸收情况对提升种植牙修复效果至关重要。超声骨刀利用一种高强度聚焦超声技术, 对牙龈组织进行选择性切除, 能有效减少其余健康牙龈受到损害, 提升取骨精确性^[4]。胶原蛋白海绵是由酸碱膨胀的胶原蛋白液经冻干制备而成的多孔生物学材料, 在止血、软硬组织修复等方面具有重要意义^[5]。本研

基金项目: 丽水市科技计划项目(2022SJC038)

作者单位: 323000 浙江省丽水, 丽水市中医院

通信作者: 徐会, Email: 247837712@qq.com