

子痫前期患者血清微小 RNAs 的差异表达研究*

厉 倩, 龙安雄, 姜连生, 蔡雷鸣, 谢 骊, 顾继安, 谭龙益[△] (上海市第一人民医院宝山分院 检验科 200940)

【摘要】 目的 探讨子痫前期患者血清微小 RNAs(miRNAs)不同的表达水平,分析子痫前期相关标志物。**方法** 选择 10 个子痫前期患者胎盘中差异表达的 miRNA,分别收集该院 30 例子痫前期患者和 30 例正常妊娠孕妇产早期(12~14 周)、孕中期(20~24 周)和孕晚期(28~32 周)血清 miRNAs,采用 SYBR Green qRT-PCR 法检测血清中 10 个 miRNAs 的表达量。**结果** 子痫前期胎盘中高表达的 3 个 miRNAs(miR-152、miR-183、miR-210)在子痫前期孕中、晚期血清中表达显著升高,而胎盘中高表达的 miR-182 仅在子痫前期孕晚期表达显著升高;子痫前期胎盘中低表达的 6 个 miRNAs(miR-1、miR-328、miR-363、miR-377、miR-500、miR-584)在子痫前期各个孕期的表达,差异均无统计学意义($P>0.05$)。**结论** miR-152、miR-183、miR-210 在子痫前期孕中、晚期血清中表达显著升高,可能是预测子痫前期发生的良好生物标志物。

【关键词】 子痫前期; miRNAs; 血清; 生物标志物

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2015.12.013 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2015)12-1692-03

Study on the differential expression of microRNAs in the preeclampsia serum* LI Qian, LONG An-xiong, JIANG Lian-sheng, CAI Lei-ming, XIE Li, GU Ji'an, TAN Long-yi[△] (Department of Clinical Laboratory, Baoshan Branch of Shanghai First People's Hospital, Shanghai 200940, China)

【Abstract】 Objective To study the differential expression of serum microRNAs in preeclampsia(PE) patients so as to find some serum biomarkers related to PE. **Methods** Ten microRNAs were selected according to their reported differential expression in PE placenta. 30 PE patients and 30 normal pregnancy were recruited in the study. The expression of these 10 microRNAs in serum from the differnt trimesters were determined by SYBR Green quantitative reverse transcription-PCR(qRT-PCR). **Results** Compared with control, the expression of miR-152, miR-183, miR-210 were higher in both second and third trimester, the expression of miR-182 was only higher in third trimester. While the expression of 6 miRNAs were downregulated in PE placenta, namely miR-1, miR-328, miR-363, miR-377, miR-500, miR-584, showed no significant difference between PE patients and normal pregnancy throughout the three trimesters. **Conclusion** The expression of serum miR-152, miR-183, miR-210 elevated since the second trimester, indicating their potential role as serum biomarkers for forecasting PE.

【Key words】 preeclampsia; microRNA; serum; biomarker

子痫前期(PE)是一种常见的孕妇多系统紊乱综合征,是孕妇和胎儿发病率(5%)和病死率最高的疾病之一,全球每年大约 800 万人受到影响,7 万孕妇病死^[1]。其主要表现为在怀孕 20 周后出现高血压和蛋白尿,部分患者出现水肿、头痛,严重者发生子痫、肝功能和凝血障碍,成人呼吸窘迫综合征和胎儿发育障碍等,发生过子痫的孕妇其后患高血压、心血管疾病的风险概率也增加。胎儿分娩和胎盘剥离是目前唯一的治疗手段,但早期对高危孕妇进行干预,可减少子痫的发生及减轻危害,具有一定的临床价值。

子痫前期的病因和病理学机制尚不清楚,且缺乏较理想的早期诊断指标^[2]。有研究报道在子痫前期胎盘中发现了异常表达的微小 RNAs(miRNAs, miRNAs),这为该研究开辟了一个新方向^[3]。目前的相关研究表明 miRNAs 与子痫前期的发生密切相关,已发现多个与子痫前期有关的差异表达 miRNAs,但多数都是在胎盘中进行检测^[3-5]。现通过检测子痫前期患者不同孕周外周血 miRNAs,分析某变化规律,探讨 miRNAs 作为子痫前期预测因子的临床价值。报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2011 年 1 月至 2013 年 12 月该院分娩的 30

例 PE 患者(病例组)和 30 例正常妊娠产妇(对照组)。PE 诊断标准依据妇产科学(第 7 版)^[3],即妊娠 20 周后收缩压大于或等于 140 mm Hg 和(或)舒张压大于或等于 90 mm Hg,伴蛋白尿大于或等于 0.3 g/24 h,或随机蛋白尿阳性。所有研究对象都是单胎妊娠,对照组和病例组的年龄、孕前体质量指数(BMI)等一般资料比较,差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。收集对照组孕早期(12~14 周)、孕中期(20~24 周)和孕晚期(28~32 周)血清 30 例,收集病例组孕早期血清 14 例、孕中期 30 例、孕晚期 30 例。见表 1。

表 1 2 组研究对象临床资料结果比较

项目	病例组(n=30)	对照组(n=30)
中位年龄(岁)	30(23~37)	28(22~35)
孕前 BMI(kg/m ²)	22.6±3.1	21.3±2.6
PE 诊断孕周	35.3±2.7	无

1.2 样本采集、处理及保存 采用分离胶真空采血管采集空

* 基金项目:上海市宝山区科委科研项目(11-E-15)。

作者简介:厉倩,女,硕士,主管技师,主要从事妊娠相关疾病的实验室诊断研究。 △ 通讯作者,E-mail:sybspy1163.com。

腹血样 3~5 mL, 静置 20 min 后离心, 1 200 r/min, 离心 10 min。首次离心后收集上清液并高速(12 000 r/min)离心 10 min, 置上清液于无 RNA 酶的无菌 Eppendorf 管中, -80 °C 冻存备用。

1.3 RNA 抽提 使用 miRNeasy Serum/Plasma kit(德国 Qiagen 公司)提取血清总 RNA, 严格按照说明书进行操作: 200 μ L 血清加入 1 mL Qiazol 溶解液, 充分混匀, 室温放置 5 min, 加入 3.5 μ L 的 Cel miR-39(1.6~108/ μ L, Qiagen)作为 RNA 抽提质量指标, 然后加入 200 μ L 的氯仿, 充分混匀, 室温放置 3 min, 后置于低温离心机(美国 Sigma 公司)内 12 000 r/min 离心 15 min, 将 550 μ L 上层澄清萃取液转移到新的 1.5 mL 无菌 Eppendorf 管中, 加入 1.5 倍(825 μ L)的无水乙醇, 充分混匀, 分 2 次将混合液过洗脱柱, 弃去滤过液, 洗脱柱分别用 700 μ L RWT、RPE 缓冲液和 80%乙醇溶液洗涤, 末次洗涤后洗脱柱高速(12 000 r/min)离心 5 min 以干燥柱内膜, 最后加入 14 μ L 无 RNA 酶水洗脱总 RNA。

1.4 cDNA 第 1 链合成 应用 miScript II 逆转录试剂盒(德国 Qiagen)合成 cDNA 第 1 链(加尾法), 操作步骤: 150 μ L PCR 反应管中加入 2 μ L 10 \times RT mix, 2 μ L 10 \times nucleics mix, 8 μ L 无 RNA 酶水, 4 μ L 5 \times hispec Buffer 和 4 μ L 总 RNA, 充分混匀并低速(1 200 r/min)离心 1 min 后置于扩增仪(Bioer)中, 36 °C 1 h, 95 °C 5 min。

1.5 荧光定量 PCR 采用 miScript SYBR green PCR 试剂盒(德国 Qiagen 公司)和 ABI 7500 扩增仪(美国 ABI 公司)进行荧光实时定量。反应体系: 10 μ L 2 \times master mix, 2 μ L 10 \times 通

用引物, 2 μ L 10 \times 特异性引物, 4 μ L 无 RNA 酶水和 2 μ L 100 倍稀释的 cDNA 模板。扩增条件: 95 °C 变性 15 min, 循环条件 94 °C 15 s, 55 °C 30 s, 70 °C 34 s, 延伸阶段采集荧光信号, 共 40 个循环。内参基因为血清中稳定存在的 miR-16。目标 miRNA, miR-16 和 Cel miR-39 分别在不同的反应孔中进行扩增。所有荧光定量 PCR 反应在 96 孔反应板内进行。使用 SDS1.3(Applied Biosystems)软件分析 Ct 值, 每个标本都做 3 个平行复孔, 取 Ct 平均值。将目标 miRNAs 的平均 Ct 值减去内参 miR-16 Ct 值作为 Δ Ct 值, Δ Ct 值越低, 则表达水平越高, 计算标准化后的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值表示 miRNA 的组间表达倍数变化。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析, 组间两两比较使用 Student's *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 外周血清 miRNAs 的检测 比较 各组血清中均能检测到 Cel miR-39、miR-16 及 10 种目标 miRNAs, 其中 Cel miR-39 在各组中的含量非常稳定, 说明实验中的 RNA 抽提、逆转录和扩增条件控制较好, miR-16 在各组的表达量稳定, 表明 miR-16 可作为内参基因。见表 2。

2.2 血清中 10 种 miRNAs 在不同孕期的表达量比较 与正常妊娠同孕期比较, PE 患者孕早期(12~14 周)血清中 10 种 miRNAs 的表达量, 差异无统计学意义($P > 0.05$), PE 患者孕中期(20~24 周)miR-152、miR-183、miR-210 的表达量升高, PE 患者孕晚期(28~32 周)miR-152、miR-182、miR-183、miR-210 的表达量升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 3。

表 2 血清中 12 种 miRNAs 的检测结果比较(Ct, $\bar{x} \pm s$)

miRNAs 类型	正常妊娠孕早期	正常妊娠孕中期	正常妊娠孕晚期	PE 孕早期	PE 孕中期	PE 孕晚期
miR-16	20.3 \pm 1.6	20.8 \pm 1.5	20.6 \pm 1.5	20.7 \pm 1.5	20.4 \pm 1.7	20.8 \pm 1.4
miR-39	22.1 \pm 1.3	21.9 \pm 1.1	22.2 \pm 1.1	22.0 \pm 1.1	22.2 \pm 1.1	21.8 \pm 1.2
miR-152	30.1 \pm 2.6	30.6 \pm 2.7	29.1 \pm 2.7	28.9 \pm 2.6	27.5 \pm 2.5	26.5 \pm 2.6
miR-182	31.4 \pm 2.9	30.6 \pm 2.7	31.9 \pm 2.9	30.5 \pm 2.2	30.2 \pm 2.8	29.9 \pm 2.8
miR-183	35.2 \pm 2.6	35.1 \pm 2.8	34.5 \pm 2.7	34.4 \pm 2.7	31.4 \pm 2.8	32.1 \pm 2.7
miR-210	32.0 \pm 2.5	31.7 \pm 2.7	32.3 \pm 2.9	30.8 \pm 2.7	27.3 \pm 2.4	28.1 \pm 2.6
miR-1	32.5 \pm 2.8	32.9 \pm 3.2	31.7 \pm 2.9	33.1 \pm 2.6	32.4 \pm 2.0	32.8 \pm 2.9
miR-328	29.3 \pm 2.4	28.9 \pm 2.7	27.8 \pm 2.8	28.9 \pm 2.1	27.8 \pm 2.8	28.5 \pm 2.8
miR-363	28.7 \pm 2.6	28.5 \pm 2.8	28.6 \pm 2.6	28.3 \pm 2.7	28.9 \pm 2.8	28.3 \pm 2.6
miR-377	31.2 \pm 2.8	30.3 \pm 2.1	31.4 \pm 2.6	30.9 \pm 2.9	31.5 \pm 2.7	31.8 \pm 2.8
miR-500	30.6 \pm 2.8	29.1 \pm 2.5	30.3 \pm 2.8	30.8 \pm 2.9	29.5 \pm 2.8	29.1 \pm 2.9
miR-584	32.3 \pm 2.8	32.1 \pm 2.4	31.8 \pm 2.9	31.9 \pm 2.6	32.1 \pm 2.7	32.4 \pm 2.5

表 3 血清中 10 种 miRNAs 的表达量结果比较(Δ Ct, $\bar{x} \pm s$)

miRNAs 类型	正常妊娠孕早期	正常妊娠孕中期	正常妊娠孕晚期	PE 孕早期	PE 孕中期	PE 孕晚期
miR-152	8.9 \pm 0.8	9.1 \pm 1.2	7.7 \pm 1.0	8.1 \pm 0.6	6.7 \pm 1.3	5.5 \pm 1.2
miR-182	10.2 \pm 1.1	9.3 \pm 1.0	10.5 \pm 0.9	9.2 \pm 0.9	8.9 \pm 0.8	8.6 \pm 1.0
miR-183	14.0 \pm 1.0	13.8 \pm 1.1	12.1 \pm 1.2	13.1 \pm 1.1	10.1 \pm 1.2	10.2 \pm 1.1
miR-210	10.8 \pm 1.5	10.4 \pm 1.3	10.9 \pm 1.2	9.5 \pm 1.7	6.9 \pm 1.2	6.8 \pm 1.4
miR-1	11.3 \pm 0.8	11.6 \pm 0.7	10.3 \pm 0.7	11.8 \pm 0.6	11.1 \pm 0.7	11.5 \pm 0.6
miR-328	8.1 \pm 1.5	7.6 \pm 1.2	6.4 \pm 0.9	7.6 \pm 0.8	5.8 \pm 1.8	7.2 \pm 1.7
miR-363	7.5 \pm 0.6	7.2 \pm 1.0	7.2 \pm 0.6	6.9 \pm 0.9	7.6 \pm 0.8	7.0 \pm 0.9
miR-377	10.0 \pm 0.9	9.0 \pm 0.7	10.0 \pm 1.1	9.6 \pm 0.7	10.2 \pm 1.2	10.5 \pm 0.7
miR-500	9.4 \pm 1.1	7.8 \pm 0.8	8.9 \pm 1.2	9.5 \pm 0.7	8.2 \pm 0.8	7.8 \pm 0.9
miR-584	11.1 \pm 1.3	10.8 \pm 0.9	10.4 \pm 0.7	10.6 \pm 0.8	10.8 \pm 0.8	11.1 \pm 0.7

2.3 PE 患者妊娠中、晚期 miR-152、miR-182、miR-183、miR-210 与正常妊娠表达倍数变化 miR-152、miR-183、miR-210 在妊娠中期 PE 患者血清中的表达分别为正常妊娠的 5.28、12.99、11.1 倍,而 miR-182 在妊娠晚期 PE 患者血清中的表达为正常妊娠的 3.73 倍。见表 4。

表 4 2 组研究对象表达升高的 miRNAs 的倍数值 (相对倍数变化, $2^{-\Delta\Delta Ct}$)

miRNAs 类型	PE 孕中期/正常妊娠孕中期	PE 孕晚期/正常妊娠孕晚期
miR-152	5.28	4.59
miR-182	1.32	3.73
miR-183	12.99	3.73
miR-210	11.31	17.15

3 讨 论

miRNAs 是一类全长为 19~25 个核糖核苷酸的非编码调控单链小分子 RNA,由一段具有发卡环结构的单链 RNA 前体剪切后生成,通过与目标 mRNA 分子的 3'端非编码区域(3' UTR)互补配对使目标 mRNA 分子的翻译受到抑制,从而在转录后对靶基因的表达水平进行调控^[6]。生物信息分析显示,只占人类基因组 1%~3%的 miRNA 调控着高达 30%的人类基因。近年来的研究表明 miRNA 在细胞增殖、分化、凋亡,肿瘤形成,心血管疾病等生理和病理过程中都起非常重要的作用。

miRNAs 不仅存在于组织细胞中,在血浆或血清中也非常稳定,这为 miRNAs 进行临床疾病研究提供了依据^[7]。Gilad 等^[7]发现采用 qRT-PCR 技术可对人体的尿液、唾液、羊水及胸水 miRNAs 进行定量,这些体液中的 miRNAs 表达异常可能预示机体功能的改变。已有多项研究显示血清 miRNAs 表达谱与多种肿瘤相关,可能在肿瘤的诊断及预后判断方面具有重要价值。

目前多数文献报道 PE 胎盘中异常表达的 miRNAs,有关血清 miRNAs 表达谱与子痫前期的关系尚未明确。本组通过分析 2001~2011 年 PubMed 数据库文献,确定 10 个在 2 个或 2 个以上研究中均表明在胎盘组织中表达上调或下调的 miRNAs,其中表达上调的是 miR-210、miR-182、miR-183、miR-152,表达下调的是 miR-1、miR-328、miR-363、miR-377、miR-500、miR-584,使用 SYBR Green qRT-PCR 技术检测 PE 患者不同孕期血清中 10 个 miRNAs 的表达水平。

与胎盘中 miRNAs 研究结果相一致^[3-5]。PE 患者孕晚期血清中 miR-210、miR-182、miR-183、miR-152 的表达均高于正常妊娠者,其中 miR-210、miR-183、miR-152 在孕中期即已经高于正常妊娠者,提示孕中期 miR-210、miR-182、miR-152 可作为 PE 的风险预测因子。PE 患者血清中 miR-210 表达升高已有报道^[8]。而 miR-182、miR-183、miR-152 在 PE 患者血清中表达升高尚未见相关报道。胎盘中升高的 miRNAs 可能通过外排体(exosome)的形式分泌到血液中,进而影响到血清、血浆 miRNA 表达谱。

与正常妊娠者比较,miR-1、miR-328、miR-363、miR-377、miR-500、miR-584 在胎盘研究中表达下调的 miRNAs,在 PE 患者血清中的表达,差异无统计学意义($P>0.05$),这可能是受到了其他目前未知的干扰因素影响,因为这些 miRNAs 不是胎盘的特异性,其他组织、细胞也可能分泌。Yang 等^[9]应用

下一代测序技术比较了 2 例 PE 重度、2 例 PE 轻度和 1 例正常妊娠孕妇在分娩前血清 miRNAs 表达谱,结果只发现 3 个与其他胎盘 miRNAs 表达谱研究报道一致的结果,这可能是由于血清受到其他更多干扰因素的影响,胎盘与血清中的结果并不总是正相关。胎盘特异性 miRNAs 由于只在胎盘组织表达,其在胎盘组织和外周血中的相关性可能会更好,这可能是未来外周血 PE 相关 miRNAs 的研究热点^[10-11]。

综上所述,本研究结果表明,PE 患者孕中期 miR-210、miR-183、miR-152 表达升高,并维持至孕晚期,miR-182 在 PE 孕晚期表达升高,提示 miR-210、miR-183、miR-152 可能是预测子痫前期发生的良好生物标志物。

参考文献

- [1] Pennington KA, Schlitt JM, Jackson DL, et al. Preeclampsia: multiple approaches for a multifactorial disease[J]. Dis Model Mech, 2012, 5(1): 9-18.
- [2] Young BC, Levine RJ, Karumanchi SA. Pathogenesis of preeclampsia[J]. Annu Rev Pathol, 2010, 10(5): 173-192.
- [3] Pineles BL, Romero R, Montenegro D, et al. Distinct subsets of miRNAs are expressed differentially in the human placentas of patients with preeclampsia[J]. Am J Obstet Gynecol, 2007, 196(261): 156-160.
- [4] Zhu XM, Han T, Sargent IL, et al. Differential expression profile of miRNAs in human placentas from preeclamptic pregnancies vs normal pregnancies[J]. Am J Obstet Gynecol, 2009, 200(54): 6611-6617.
- [5] Enquobahrie DA, Abetew DF, Sorensen TK. Placental miRNAs expression in pregnancies complicated by preeclampsia[J]. Am J Obstet Gynecol, 2011, 204(178): 8812-8821.
- [6] Kloosterman WP, Plasterk HA. The diverse functions of miRNAs in animal development and disease[J]. Dev Cell, 2006, 11(4): 441-450.
- [7] Gilad S, Meiri E, Yegorov Y, et al. Serum miRNAs are promising novel biomarkers[J]. PLoS ONE, 2008, 3(9): 31-48.
- [8] Zhang Y, Fei M, Xue G, et al. Elevated levels of hypoxia-inducible miRNAs-210 in pre-eclampsia: new insights into molecular mechanisms for the disease [J]. J Cell Mol Med, 2012, 16(2): 249-259.
- [9] Yang Q, Lu J, Wang S, et al. Application of next-generation sequencing technology to profile the circulating miRNAs in the serum of preeclampsia versus normal pregnant women[J]. Clin Chim Acta, 2011, 412(24): 2167-2173.
- [10] Liang Y, Ridzon D, Wong L, et al. Characterization of miRNAs expression profiles in normal human tissues[J]. BMC Genomics, 2007, 33(8): 166-171.
- [11] Hromadnikova I, Kotlabova K, Doucha J, et al. Absolute and relative quantification of placenta-specific micrornas in maternal circulation with placental insufficiency-related complications[J]. J Mol Diagn, 2012, 14(2): 160-167.