

miR-19a 在正常妊娠及重度子痫前期患者胎盘中的表达 *

王桂锋¹ 王晓红¹ 尹国武¹ 朱晓明¹ 姚元庆^{2△}

(1 第四军医大学唐都医院妇产科 陕西 西安 710038 2 解放军总医院妇产科 北京 100039)

摘要 目的 :通过检测正常妊娠及重度子痫前期患者胎盘组织中 miR-19a 的表达,探讨其与子痫前期发病的关系。**方法 :**收集 10 例重度子痫前期患者胎盘组织(实验组)和 10 例正常产妇胎盘组织(对照组),应用荧光实时定量 PCR (Real Time PCR)的方法检测两组 miR-19a 的表达差异。**结果 :**重度子痫前期患者胎盘组织中 miR-19a 表达升高($P<0.05$)。**结论 :**子痫前期患者胎盘组织中存在差异表达的 miRNA ,miR-19a 在胎盘组织中的高表达可能与子痫前期的发病有关。

关键词 :子痫前期 ,微小 RNA ,胎盘

中图分类号 :R714.245 **文献标识码 :**A **文章编号 :**1673-6273(2011)12-2335-03

Expression of MiR-19a in Placentas From Women with Preeclampsia and Normal Pregnancy*

WANG Gui-feng¹ , WANG Xiao-hong¹ , YIN Guo-wu¹ , ZHU Xiao-ming¹ , YAO Yuan-qing^{2△}

(1 Department of Obstetrics and Gynecology, Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China ;

2.Department of Obstetrics and Gynecology 301 Hospital of PLA ,Beijing 100039 ,China)

ABSTRACT Objective: To study the relationship of the pathogenesis of preeclampsia with miR-19a by measuring the expression of miR-19a in normal pregnancy and preeclampsia placenta. **Methods:** 10 cases of severe preeclampsia (experimental group) and 10 normal placenta maternal placenta (control) were collected, fluorescent Real-Time quantitative PCR method was used to detect the expression of miR-19a in two different groups. **Results:** miR-19a expression in patients with severe preeclampsia placenta increased significantly comparing with those in normal placenta. **Conclusion:** miR-19a expression increased significantly in preeclampsia placenta, and there exist an connection between high expression of miR-19a and the pathogenesis of preeclampsia.

Key words: Preeclampsia; MiRNA; Placenta

Chinese Library Classification(CLC): R714.245 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2011)12-2335-03

前言

微小 RNA (miRNA)是一类长 19-25nt 的小分子 RNA ,广泛存在于真核生物中 ,是一组不编码蛋白质的单链 RNA ,在生物发育过程中发挥着包括早期发育、细胞分化、细胞凋亡、肿瘤生成等多方面的重要作用^[1]。子痫前期(Preeclampsia)是妊娠期高血压疾病分类中最常见的一型 ,严重影响母婴健康 ,其病因及发病机制仍不清楚。Pineles BL 首次验证了在子痫前期(合并或不合并胎儿宫内发育迟缓)病人的胎盘中有特异的 miRNA 增强表达^[2]。Hromadní ková I 研究发现子痫前期患者外周血中也存在差异表达 miRNA ,并且指出差异表达的 miRNA 来源于胎盘^[3]。本文采用荧光定量 RT-PCR 技术检测 miR-19a 在正常妊娠与子痫前期患者胎盘组织中的表达 ,以探讨其在妊娠期高血压疾病发病中的作用。

1 材料与方法

1.1 一般资料

参照乐杰主编的《妇产科学》第 6 版子痫前期诊断标准^[4] ,选取 2009.10-2010.04 唐都医院妇产科行择期剖宫产重度子痫前期患者 10 例 ,正常妊娠者 10 例。所有病例均为单胎妊娠 ,未进入产程 ,排除合并先心病、慢性高血压、慢性肾炎、糖尿病等妊娠合并症。重度子痫前期组和正常妊娠组临床资料比较差别无统计学意义($P>0.05$)(见表 1)。

表 1 患者临床特征

Table 1 Clinical Features

Clinical Features	Severe Preeclampsia	Control
	(n=10)	(n=10)
Age (y)	28.1± 4.6	27.3± 3.1
Gestationl age (wk)	37.5± 2.3	39.1± 1.8
Fetal weight (g)	2586± 350	3274± 358
Systolic blood pressure(mmHg)	158.6± 10.7	109.4± 8.7
Diastolic blood pressure(mmHg)	105.8± 6.7	71.5± 6.3
Urine protein(+)	2± 1	0

* 基金项目 国家“973”项目基金(2007CB948102)资助

作者简介 王桂锋(1982-) 男 ,硕士研究生 ,主要研究方向 妊娠症发病的分子机制。电话 :15029979414,

E-mail :wangguifeng1982@126.com

△通讯作者 姚元庆 教授 E-mail :yqyao@hotmail.com

(收稿日期 2011-03-05 接受日期 2011-03-30)

1.2 方法

1.2.1 胎盘采集 胎盘娩出后立即剪取胎盘母面正中部位约 1 cm³ 大小组织,剪取时避开钙化区及出血点,冲洗,放入冻存管,迅速放入液氮罐中,4 小时后于 -80 ℃ 冰箱中保存。

1.2.2 胎盘 RNA 提取 剪取 100 mg 作用胎盘组织,放入研钵中,倒入液氮研磨至粉末状,按照 mirVana™ miRNA Isolation Kit(Ambion 公司)说明书提取胎盘总 RNA。

1.2.3 反转录 按照 PrimeScript • RT reagent Kit (TAKARA 公司)说明书,取 50 ng 总 RNA 为模板,以特异的 has-miR-19a 反转录引物进行反转录,引物为 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGACTGGATACGACTCAGTT-3' (北京奥科生物技术公司合成)。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 用 SYBR® Premix Ex Taq™II (TAKARA 公司)试剂和 ABI PRISM 7500 荧光定量 PCR 仪 (Applied Biosystems 公司)进行 PCR 扩增。has-miR-19a 上游引物 5'-ACGTGTGCAAATCTATGCAAAAC-3',下游引物 5'-GTGCAGGTCCGAGGT-3',以管家基因 U6 做内参。按照试剂盒

说明书配制 PCR 反应液,反应体系为 20 ul,PCR 条件:95 ℃ 30 s,95 ℃ 5 s,60 ℃ 34 s,95 ℃ 15 s,60 ℃ 60 s,95 ℃ 15 s,40 个循环,每个样品设 3 个平行复孔,以无 RNA 酶的水作阴性对照。在实验结束后进行溶解曲线分析,以鉴定产物是否单一。

1.2.5 验证 PCR 产物 用 3 %琼脂糖凝胶,70 V 电泳 40 分钟,紫外线扫描分析,观察扩增片段大小及特异性。

1.2.6 统计学分析 采用 SPSS16.0 统计软件进行统计学分析,研究结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异性用独立样本比较的秩和检验。

2 结果

2.1 产物特异性 每个用品的 3 个平行复孔间 Ct 差值均小于 0.5,阴性对照均无阳性扩增,结果可靠。内参基因 U6 和目的基因 miR-19a 引物溶解曲线均仅一个峰,其峰点分别在 81.3℃ 和 80℃,峰形窄而尖(图 1),说明扩增产物为单一片段,特异性好。

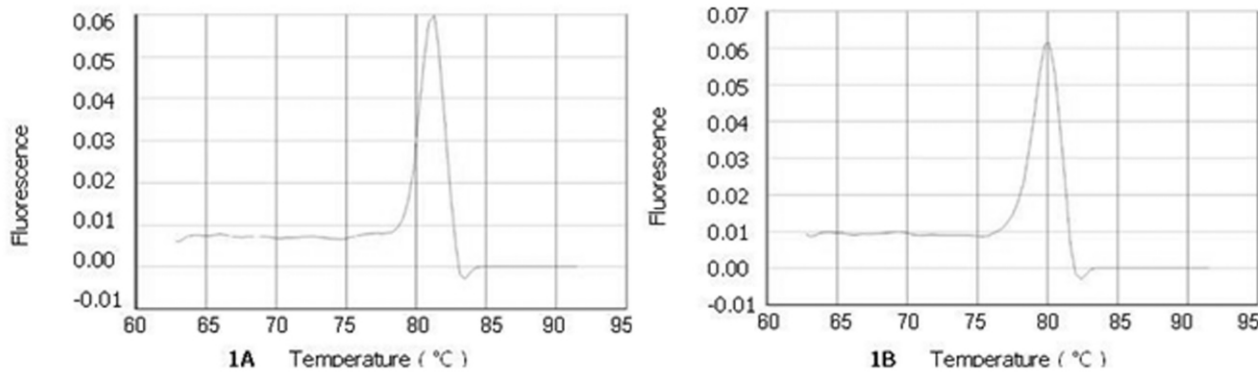


图 1 实时荧光定量 PCR 引物溶解曲线 :1A 内参基因 u6 ;1B miR-19a
Fig. 1 Real time PCR primer melting curve :1A internal reference gene U6 ; 1B miR-19a

2.2 琼脂糖凝胶电泳结果

miRNA 特异扩增产物大小为 90bp,PCR 产物经 3 %琼脂糖凝胶电泳后,miR-19a 和 U6 在 90bp 处可见清晰电泳带,与理论值大小一致(图 2)。

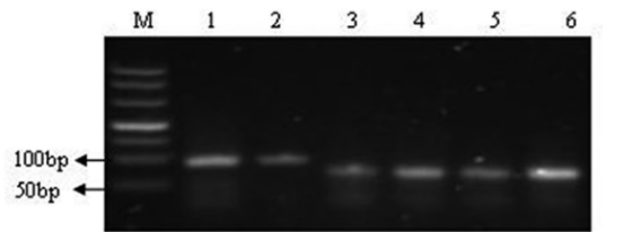


图 2 实时荧光定量 PCR 产物质量检测 M:Marker; 1:正常组 U6 ;2:子病前期组 U6 ;3,5:正常组 miR-19a ;4,6:子病前期组 miR-19a
Fig.2 Real time PCR product M: Marker; 1:controlU6; 2: Preeclampsia U6 ;3,5: control miR-19a; 4,6: Preeclampsia miR-19a

2.3 miR-19a 相对表达量

实时荧光定量 PCR 结果用比较 Ct 法 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法)^[5] 进行分析,用内参 U6 的表达量进行归一化,计算公式: $\Delta Ct = Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{内参基因}}$; $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{重度子病前期组}} - \Delta Ct_{\text{正常妊娠组}}$ miR-19a 相对表达量 $= 2^{-\Delta\Delta Ct}$,miR-19a 在重度子病前期患者胎盘中表达增

高,表达量是正常妊娠胎盘的 1.964 倍(表 2)。由于实验结果 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值不符合正态分布,以两个独立样本秩和检验进行统计学分析,差异有统计学意义($P < 0.05$)(图 3)。

表 2 miR-19a 相对表达量 Table 2 Relative miR-19a level		
	Severe Preeclampsia(n=10)	Control(n=10)
Ct	18.583± 0.427	21.318± 0.385
ΔCt	-1.014± 0.526	-0.041± 0.402
$\Delta\Delta Ct$	-0.974± 0.526	0± 0.402
Relative level	1.964(0.713-5.408)	1(0.461-2.168)

3 讨论

子病前期 - 子病是指妊娠 20 周以后出现的以高血压、蛋白尿为主要临床表现的一组临床症候群,在我国其发病率是 9.4 %。由于其可以引起严重的母儿并发症,是导致孕产妇和围生儿死亡的主要原因之一^[6]。子病前期的病因非常复杂,其病理根源在于胎盘,胎盘滋养细胞功能障碍是子病前期一系列临床症状的基础^[7],主要与胎盘浅着床、胎盘缺氧、血管内皮的广泛

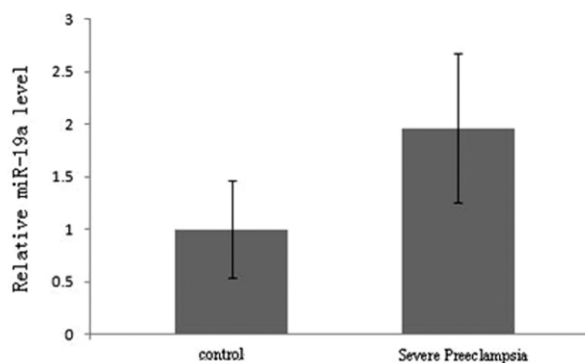


图3 miR-19a 的相对表达量

Fig. 3 Relative miR-19a level

损伤、基因的遗传背景、母婴免疫失衡等因素有关。人类白细胞抗原-G(HLA-G)是一种重要的免疫耐受分子,研究表明母胎界面的免疫耐受平衡主要通过 HLA-G 维持,子痫前期患者胎盘组织中 HLA-G 的表达缺陷可能导致母胎间产生免疫排斥反应,使滋养细胞浸润母体能力受损、胎盘浅着床^[8]。胎盘浅着床使得滋养细胞缺血、缺氧,直接或间接损伤血管内皮,血管对缩血管物质敏感性增加,导致子痫前期的发病^[9,10]。

微小 RNA (miRNA) 是一类长 19-25nt 的小分子非编码 RNA,其前体(pre-miRNA)约 70nt,在包质中在切酶(dicer)作用下产生成熟的 miRNA^[11,12]。成熟的 miRNA 通过其 5' 端的 5~8 个核苷酸,识别并与靶 mRNA 3'-UTR 区(非翻译区)进行完全互补或不完全互补配对,引起靶 mRNA 的降解或翻译抑制,达到调控目的基因表达的作用^[13]。miR-19a 位于 13q31 染色体,是 miR-17-92 簇成员,与发育及肿瘤发生有密切关系^[14]。研究表明子痫前期患者胎盘中有特异的 miRNA 差异表达,本实验应用实时荧光定量 PCR 技术,成功检测重度子痫前期患者胎盘中 miR-19a 表达增高。有研究指出 HLA-G 3'-UTR 区 +3142 胞嘧啶/鸟嘌呤单核苷酸多态性位点^[15]与特定的 miRNA 结合,诱导 HLA-G mRNA 降解或翻译抑制,调节转录后基因表达。HLA-G 3'-UTR 区 +3142 位点的鸟嘌呤增强 miR-19a 与 HLA-G mRNA 的结合力^[16]。由此可见,子痫前期患者胎盘中高表达的 miR-19a 可能通过与 HLA-G 3'-UTR 区结合,抑制 HLA-G 表达,从而导致子痫前期的发生。

研究表明在缺氧条件下,miR-17-92 簇表达增高,miR-17-92 簇抑制内皮细胞生成^[17]。此外,miR-19a 调节脐静脉内皮细胞细胞周期蛋白 D1 (cyclin D1) 表达,cyclin D1 是 miR-19a 在内皮细胞中的靶基因,其结合部位为 cyclin D1 基因 1778-1785 核苷酸位点,过表达的 miR-19a 下调 cyclin D1 的表达^[12]。cyclin D1 基因是新近发现并被公认的原癌基因,定位于染色体 11q13,其编码的蛋白产物 cyclin D1 是细胞进入细胞周期合成的第一个细胞周期蛋白,主要在细胞周期 G1→S 关卡中发挥正性调控作用,促进细胞增殖^[18]。胎盘形成的关键特征是细胞滋养层细胞侵入螺旋动脉,子痫前期患者滋养层细胞侵入蜕膜功能减退,导致胎盘缺血缺氧,进而造成弥漫性血管内皮细胞损伤。内皮细胞损伤在子痫前期发病中发挥重要作用^[19],子痫前期患者胎盘缺血缺氧,miR-19a 表达增高,可能通过抑制 cyclin D1 表达,从而抑制内皮细胞增殖^[20],降低内皮细胞

损伤修复能力,参与子痫前期发病与发展。

本研究验证了 miR-19a 在重度子痫前期患者胎盘中表达增高,miR-19a 可能通过多种途径参与子痫前期的发病,但其功能及确切机制还需要进一步研究分析。

参考文献(References)

- [1] Poy MN, Eliasson L, Krutzfeldt J, et al. A pancreatic isletspecific microRNA regulates insulin secretion [J]. *Nature*, 2004, 432:226-230
- [2] Pineles BL, Romero R, Montenegro D, et al. Distinct subsets of microRNAs are expressed differentially in the human placentas of patients with preeclampsia [J]. *Obstet Gynecol*, 2007, 196:261-266
- [3] Hromadníková I, Kotlabová K, Jirásek JE, et al. Detection of placenta-specific microRNAs in maternal circulation [J]. *Ceska Gynekol*, 2010, 75(3):252-256
- [4] 乐杰. 妇产科学[M]. 第 6 版. 北京:人民卫生出版社, 2004, 99-104
- [5] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta Ct) Method [J]. *Methods*, 2001, 25(4):402-408
- [6] Redman CW, Sargent IL. Latest advances in understanding preeclampsia [J]. *Science*, 2005, 308(5728): 1592-1594
- [7] Rigoud VT, Chelbi S, Vaiman D. Preeclampsia [J]. *AM J Med Sci*. 2008, 24(12):1017-1019
- [8] Hackmon R, Koifman A, Hyobo H, et al. Reduced third-trimester levels of soluble human leukocyte antigen G protein in severe preeclampsia [J]. *Obstet Gynecol*, 2007, 197(3):255-260
- [9] Coelho TM, Sass N, Camano L, et al. Microvessel density in the placental bed among preeclampsia patients [J]. *Sao Paulo Med J*, 2006, 124(2): 96-100
- [10] Rodrigues RF, Carter AM, Ambrosio CE, et al. The sub placenta of the red-rumped agouti (*Dasyprocta leporina* L.) [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2006, 4(1):31-36
- [11] Zeng Y, Yi R, Cullen BR. Recognition and cleavage of primary microRNA precursors by the nuclear processing enzyme Drosha [J]. *EMBO J*, 2005, 24: 138-148
- [12] Jiang F, Ye X, Liu X, et al. Dicer-1 and R3D1-L catalyze microRNA maturation in *Drosophila* [J]. *Genes Dev*, 2005, 19: 1674-1679
- [13] Zhao Y, Srivastava D. A developmental view of micro RNA function [J]. *Trends Biochem Sci*, 2007, 32(4):189-197
- [14] Koga Y, Yasunaga M, Takahashi A, et al. MicroRNA expression profiling of exfoliated colonocytes isolated from feces for colorectal cancer screening [J]. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2010, 3(11):1435-1442
- [15] Tan Z, Randall G, Fan J, et al. Allele-specific targeting of microRNAs to HLA-G and risk of asthma [J]. *Hum Genet*, 2007, 121: 829-834
- [16] Castelli EC, Moreau P, Oya e Chiromatzo A, et al. In silico analysis of microRNAs targeting the HLA-G 3' untranslated region alleles and haplotypes [J]. *Hum Immunol*, 2009, 70(12):1020-1025
- [17] Doebele C, Bonauer A, Fischer A, et al. Members of the microRNA-17-92 cluster exhibit a cell-intrinsic antiangiogenic function in endothelial cells [J]. *Blood*, 2010, 115(23):4944-4950

(下转第 2303 页)

(14.5%)、SCC3 例 (3.9%)，说明 TCT 检查具有较高的检出率；TCT 检查阳性病例与宫颈活检诊断结果间的符合率为：SIL 符合率 44.4% (8/18)，HSIL 符合率 81.8% (9/11)，SCC 符合率 100.0% (4/4)，说明 TCT 检查具有较高检出率的同时，也具有较高的符合率；同时，通过对比发现，HSIL 组、SCC 组与 LSIL 组符合率比较，差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)，说明当 TCT 检查结果提示 HSIL 或 SCC 时，此结果具有很高的符合率，应引起临床医生的极高度重视。

参考文献(References)

- [1] 郎景和. 迎接子宫颈癌预防的全球挑战和机遇[J]. 中华妇产科杂志, 2002, 37(3): 129-131
Lang Jin-he. Cervical cancer prevention to meet the global challenges and opportunities [J]. Chinese Journal of Obstetrics and Gynecology, 2002, 37(3): 129-131
- [2] 崔艳萍, 王文. ThinPrep 液基细胞学在宫颈癌筛查中的临床应用[J]. 赣南医学院学报, 2006, 26(2): 186-188
Cui Yan-ping, Wang Wen. Value of ThinPrep liquid-based cytology for the diagnosis of cervical cancer screening [J]. Journal of Gannan Medical University, 2006, 26(2): 186-188
- [3] 罗思红, 罗晓红, 段朝晖. 薄层液基细胞学在宫颈癌筛查中的应用价值[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(8): 1466-1467
Luo Si-hong, Luo Xiao-hong, Duan Chao-hui. Value of ThinPrep cytological test for cervical carcinoma screening [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2007, 17(8): 1466-1467
- [4] Solomon D, Darcy D, Kurman R, et al. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology [J]. JAMA, 2002, 287(16): 2114-2119
- [5] 杨德兴, 杨文勇, 许慧. 薄层液基细胞学检测在宫颈病变诊断中的应用[J]. 肿瘤基础与临床, 2009, 22(6): 529-530
Yang De-xing, Yang Wen-yong, Xu Hui. Thin-layer liquid-based cytology in the diagnosis of cervical lesions [J]. Journal of Basic and Clinical Oncology, 2009, 22(6): 529-530
- [6] Setia N, Goulart RA, Leiman G, et al. Cytomorphology of cervicovaginal melanoma: ThinPrep versus conventional Papanicolaou tests [J]. Cytojournal, 2010, 31(7): 25
- [7] Luu MH, Fischer AH, Pisharodi L, et al. Improved preoperative definitive diagnosis of papillary thyroid carcinoma in FNAs prepared with both ThinPrep and conventional smears compared with FNAs prepared with ThinPrep alone [J]. Cancer Cytopathol, 2011, 119(1): 68-73
- [8] 吴瑾, 唐良菖. 薄层液基细胞学技术与宫颈癌及癌前病变[J]. 重庆医

学, 2005, 9(34): 1425

Wu-jing, Tang Liang-xian. TCT Technology in the cervical cancer and precancerous lesions [J]. Chongqing Medicine, 2005, 9(34): 1425

- [9] 赵艳梅, 刘颖新, 王洪英, 等. 液基薄层细胞学检查、HPV 检测筛查宫颈病变的价值[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2009, 30(15): 1832-1833
Zhao Yan-mei, Liu Yin-xin, Wang Hong-ying, et al. The value of screening for cervical lesions by the ThinPrep cytology and HPV testing [J]. Journal of Qiqihar Medical College, 2009, 30(15): 1832-1833
- [10] Giorgadze T, Kanhere R, Pang C, et al. Small cell carcinoma of the cervix in liquid-based Pap test: Utilization of split-sample immunocytochemical and molecular analysis [J]. Diagn Cytopathol, 2010, 10(1): 30-33
- [11] Castle PE, Bulten J, Confortini M, Klinkhamer P, et al. Age-specific patterns of unsatisfactory results for conventional Pap smears and liquid-based cytology: data from two randomised clinical trials [J]. BJOG, 2010, 117(9): 1067-1073
- [12] Juric D, Mahovlic V, Rajhvajn S, Ovanin-Rakic A, et al. Liquid-based cytology--new possibilities in the diagnosis of cervical lesions [J]. Coll Antropol, 2010, 34(1): 19-24
- [13] Abulafia O, Pezzullo JC, Sheere DM. Performance of thinprep liquid-based cervical cytology in comparison with conventionally prepared Papanicolaou smears a quantitative survey [J]. Gynecol Oncol, 2003, 90(1): 137
- [14] 常青. 盆腔动脉结扎在产后出血的应用[J]. 中国应用妇科与产科杂志, 2009, 25(2): 109
Chang-qing. Application of pelvic artery ligation to treating postpartum hemorrhage [J]. Chinese Journal of Practical Gynecology and Obstetrics, 2009, 25(2): 109
- [15] Setia N, Goulart RA, Leiman G, et al. Cytomorphology of cervicovaginal melanoma: ThinPrep versus conventional Papanicolaou tests [J]. Cytojournal, 2010, 31(7): 25
- [16] Kenyon S, Sweeney BJ, Happel J, et al. Comparison of BD Surepath and ThinPrep Pap systems in the processing of mucus-rich specimens [J]. Cancer Cytopathol, 2010, 118(5): 244-249
- [17] Rossi ED, Morassi F, Santeusano G, et al. Thyroid fine needle aspiration cytology processed by ThinPrep: an additional slide decreased the number of inadequate results. [J]. Cytopathology, 2010, 21(2): 97-102
- [18] Benevolo M, Vocaturo A, Mottolise M, et al. Clinical role of p16IN-K4a expression in liquid-based cervical cytology: correlation with HPV testing and histologic diagnosis [J]. Am J Clin Pathol, 2008, 129(4): 606-612

(上接第 2337 页)

- [18] Qin X, Wang X, Wang Y, et al. MicroRNA-19a mediates the suppressive effect of laminar flow on cyclin D1 expression in human umbilical vein endothelial cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(7): 3240-3244
- [19] Collino F, Bussolati B, Gerbaudo E, et al. Preeclamptic sera induce

nephrin shedding from podocytes through endothelin-1 release by endothelial glomerular cells [J]. Physiol Renal Physiol, 294(5): 1185-1194

- [20] Knudsen KE, Diehl JA, Haiman CA, et al. Cyclin D1: Polymorphism, aberrant splicing and cancer risk [J]. Oncogene, 2006, 25: 1620-1628