doi:10.11659/jjssx.06E022038

·基础研究·

# 早发型重度子痫前期血浆外泌体miRNAs表达谱分析

欧海蔚[1],尤共平[2],孙鸿彩[1],于海鸥[1] (1.儋州市人民医院产科,海南 儋州 571900;2.儋州市人民医院妇科,海南 儋州 571900)

[摘 要] **目的** 通过比较早发型重度子痫前期(EOPE)患者与正常妊娠妇女血浆外泌体源性miRNAs表达谱的差异,初步探讨EOPE的发病机制。**方法** 收集于我院产检并最终诊断为EOPE的孕妇血浆(EOPE组,$n$=4)及正常妊娠妇女血浆(对照组,$n$=4);对外泌体进行鉴定,提取血浆外泌体中的miRNAs进行测序,对差异表达的miRNAs进行生物信息学分析。分别利用3个靶基因预测网站进行靶基因预测,利用Venn图绘制数据库所预测的靶基因交集。使用在线分析网站DAVID分析2组差异表达蛋白中的GO功能注释结果,然后进行KEGG通路富集分析。用RT-PCR检测胎盘及血浆外泌体miRNAs水平。**结果** 检测到的颗粒直径为30~180 nm,峰值为112.8 nm;外形为茶状或椭圆形;2组均显著表达TSG101和CD63。测序结果显示:与对照组相比,EOPE组中共筛查出27个有显著表达差异的miRNAs,其中15个表达上调,12个表达下调;表达差异最显著的上调miRNA为miR-152。在线数据库网站预测所有差异表达miRNAs靶基因共8 414个,经生物信息学分析显示其靶基因在补体、凝血级联、MMPs信号通路及TLR4信号通路等10个信号通路中富集程度最高。RT-PCR检测发现,与对照组相比,EOPE组中miR-152在胎盘及血浆外泌体中均表达上调($P$<0.05)。**结论** EOPE患者血浆外泌体中miRNAs表达谱发生显著改变,这些差异表达的miRNAs可能参与了子痫前期的发生与发展,同时miR-152作为子痫前期的关键miRNA值得进一步研究。

[关键词] 早发型重度子痫前期;外泌体;miRNA;高通量测序

[中图分类号] R714.2 [文献标识码] A [收稿日期] 2022-06-14

## Analysis of plasma exosomal miRNAs expression profile in early-onset severe preeclampsia

OU Hai-wei[1], YOU Gong-ping[2], SUN Hong-cai[1], YU Hai-ou[1] (1. Department of Obstetrics, Danzhou People's Hospital, Danzhou Hainan 571900, China; 2. Department of Gynecology, Danzhou People's Hospital, Danzhou Hainan 571900, China)

**Abstract: Objective** To investgate the pathogenesis of early-onset severe preeclampsia (EOPE) by comparing the expression of plasma exosomes-derived miRNAs from patients with EOPE and normal pregnant women. **Methods** The plasma samples from pregnant women who underwent antenatal examination and finally diagnosed as EOPE (the EOPE group, $n$=4) and normal pregnant women (the control group, $n$=4) in our hospital were collected. The identification of exosomes were conducted and the miRNAs from plasma exosomes were extracted for sequencing, and bioinformatics analysis was performed on differentially expressed miRNAs. Three target gene prediction websites were used for the prediction of target genes, and the target gene intersection predicted by the database was drawn by the Venn map. The annotation results of GO function in the two groups of differentially expressed proteins were analyzed by the online analysis website DAVID and the KEGG pathway enrichment analysis was carried out. The levels of miRNAs in placenta and plasma exosomes were detected by RT-PCR. **Results** The detected particle was 30 to 180 nm in diameter, with the peak value of 112.8 nm, and the shape was tea-like or oval. TSG101 and CD63 were significantly expressed in both two groups. The sequencing results showed that a total of 27 differentially expressed miRNAs were screened in the EOPE group compared with the control group, of which 15 were up-regulated and 12 were down-regulated, and miR-152 was the most significantly up-regulated miRNA. A total of 8 414 differentially expressed miRNAs target genes were predicted by online database websites, and bioinformatics analysis showed that their target genes were most enriched in 10 signaling pathways, including complement and coagulation cascade, MMPs signaling pathway and TLR4 signaling pathway. The RT-PCR showed that the expression of miR-152 in placenta and plasma exosomes of the EOPE group was up-regulated compared with the control group ($P$<0.05). **Conclusion** The expression profile of miRNAs in plasma exosomes of EOPE patients changed significantly, and these differentially expressed miRNAs may be involved in the occurrence and development of preeclampsia. miR-152 is a key miRNA of preeclampsia, which deserves further study.

**Keywords:** early-onset severe preeclampsia; exosome; miRNA; high-throughput sequencing

子痫前期是一种妊娠高血压疾病,其临床表现为血压升高并伴多器官功能障碍或胎儿并发症[1]。既往研究发现,患有重度子痫前期的孕产妇其围产儿的预后与发病时间密切相关[2],子痫前期出现越早,则产妇病情越严重,同时围产儿病死率也越高[2]。因此,了解早发型重度子痫前期(early-onset severe preeclampsia, EOPE)的发病机制对于早期防治、降低母胎病死率具有重要意义。

[基金项目] 海南省卫生计生行业科研项目(19A200181)

近年来,越来越多的研究相继发现子痫前期患者胎盘及循环中的miRNAs相较正常对照组存在显著差异表达,其中部分miRNAs已被证明可通过调控下游靶基因从而参与子痫前期的发生发展[3-4]。外泌体作为细胞间信号传导载体,负责体液中胞质蛋白、脂质及各种RNA的物质交换[5]。相较于血浆中的miRNAs,外泌体源性miRNAs表达更丰富且稳定性更高。目前关于EOPE患者外泌体miRNAs表达谱的研究鲜有报道,本研究通过高通量测序技术,首次比较了EOPE及正常孕妇血浆源性外泌体miRNAs表达谱的差异,以探讨EOPE的发病机制并对关键miRNAs进行验证。

## 1 材料与方法

### 1.1 标本搜集

收集2021年2~8月于我院产检并最终诊断为EOPE的孕妇空腹血浆(EOPE组,$n$=4)。胎盘娩出后,立即采集新鲜胎盘,无菌条件下在胎盘母体面4个象限中心各取1块大小为1 cm×1 cm×1 cm的胎盘组织,PBS冲洗2次后冻存于-70 ℃冰箱。纳入标准:①年龄≥18岁;②符合《妇产科学》(第8版)中EOPE的相关诊断标准[6];③首次妊娠。排除标准:①合并感染性疾病;②妊娠期糖尿病;③双胎或多胎妊娠;④合并慢性肾病。另收集无高血压的正常妊娠妇女的空腹血浆(对照组,$n$=4),排除感染性疾病、妊娠期糖尿病、双胎或多胎妊娠、慢性肾病。EOPE组年龄(30.7±4.6)岁,孕周(32.1±2.2)周;对照组年龄(29.8±3.4)岁,孕周(32.8±2.7)周。2组年龄、孕周均衡可比。本研究已经我院医学伦理委员会批准(2020-021),受试者均对本研究知情并签署知情同意书。

### 1.2 方法

1.2.1 血浆外泌体提取鉴定及miRNA测序 使用ExoQuick外泌体沉淀试剂盒(北京Biomars公司)提取血浆外泌体,利用透射电子显微镜(荷兰Philips公司)观察外泌体形态,并使用ZetaView纳米颗粒跟踪分析仪(德国Particle Metrix公司)检测外泌体颗粒直径与浓度分布。Western blot检测外泌体标志物TSG101和CD63的表达。使用miRNeasy Micro Kit(德国Qiagen公司)提取外泌体总RNA后于IlluminaHiSeq平台对其进行测序。通过每千碱基记录本算法将表达量进行标准化处理。以差异倍数(fold change,FC)绝对值≥1.5且$P$<0.05为标准筛选差异表达的miRNAs,并对差异表达的miRNAs进行整体层次聚类分析。

1.2.2 miRNAs靶基因预测及生物信息学分析 分别利用3个靶基因预测网站miRDB、TargetScan、miRTarBase对选中的miRNAs进行靶基因预测,利用Venn图绘制数据库所预测的靶基因交集,以保证数据的准确性。使用在线分析网站DAVID(https://david.ncifcrf.gov/)分析2组差异表达蛋白中的GO功能注释结果。KEGG通路富集分析差异表达蛋白在某一通路上是否出现过及其出现频率,采用Kobas软件对2组差异表达蛋白谱进行KEGG通路富集分析。

1.2.3 RT-PCR检测胎盘及血浆外泌体miRNAs水平 采用总RNA提取试剂盒(北京中科雷鸣科技有限公司)提取总RNA,严格按试剂盒说明书操作,检测并分离miR-152。使用miRCURY LNATMRT试剂盒将RNA样品(10 ng/μL)反转录成cDNA。使用TaqManPri-miRNA Assays(美国Invitrogen公司)建立PCR扩增体系,使用RT-PCR仪(美国ABI QuantStudio5型)检测miR-152表达水平。

## 2 结果

### 2.1 血浆外泌体鉴定结果

纳米粒子轨迹分析结果显示,检测到的粒子直径为30~180 nm,其峰值主要集中在112.8 nm(图1a)。Western blot结果显示,2组外泌体均显著表达TSG101和CD63(图1b)。通过透射电子显微镜观察EOPE组血浆外泌体,其外形为茶状或椭圆形(图1c)。上述特征表明本实验分离的囊泡是外泌体。

### 2.2 血浆外泌体差异miRNAs的表达情况

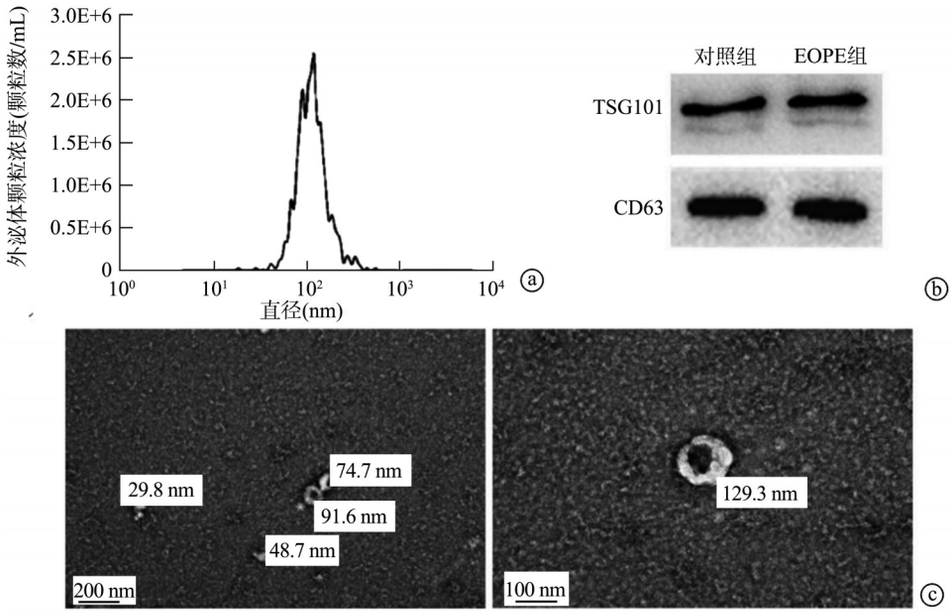
测序结果显示,与对照组相比,EOPE组中共筛查出27个有显著表达差异的miRNAs,其中15个表达上调,12个表达下调,2组差异表达miRNAs整体层次聚类图见图2。EOPE患者血浆差异表达前20的miRNAs见表1。

### 2.3 2组差异表达miRNAs的生物信息学分析

分别选择miRDB、TargetScan及miRTarbase在线数据库网站对已知的差异表达miRNAs进行靶基因的预测,并对上述结果绘制Venn图取交集,共得到8 414个预测靶基因。GO功能富集分析结果显示,其靶基因主要富集于核膜、内体膜等10个细胞成分;参与细胞大分子生物合成过程、基因表达调控等10个生物学过程;显著富集于DNA结合、金属离子结合等10个分子功能。对miRNAs靶基因进行KEGG通路富集分析显示,其靶基因在MMPs信号通路、TLR4信号通路及补体和凝血级联等10个信号通路中富集程度最高。

### 2.4 血浆外泌体差异表达miRNA的验证

miRNA高通量测序结果显示,上调最显著的是miR-152;RT-PCR进一步验证,结果显示,miR-152在EOPE组血浆外泌体中表达上调,与测序结果一致;同时miR-152在胎盘组织外泌体中也表达上调(图3)。




a:血浆外泌体颗粒直径与浓度分布;b:CD63与TSG101蛋白表达;c:透射电子显微镜下血浆外泌体的形态

**图1　血浆外泌体鉴定结果**

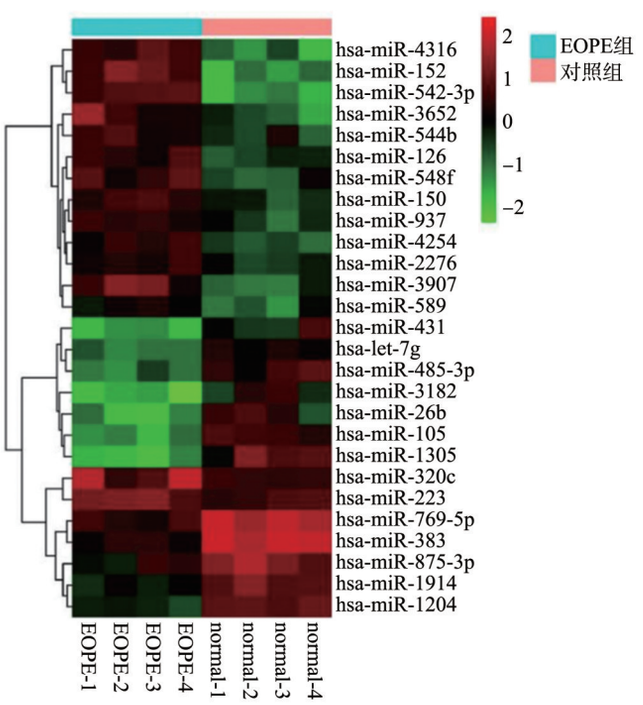
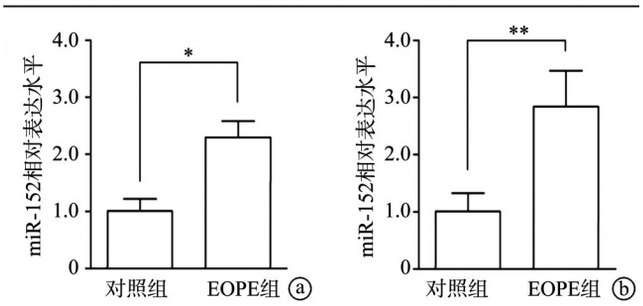



**图2　2组血浆外泌体差异表达miRNAs整体层次聚类图**

**表1　EOPE患者血浆外泌体miRNAs差异表达**

| miRNAs | *P* | *log*FC | 调控方向 |
|---|---|---|---|
| hsa-miR-152 | 0.000 639 | 5.57 | 上调 |
| hsa-miR-542-3p | 0.000 818 | 5.14 | 上调 |
| hsa-miR-3652 | 0.008 937 | 4.25 | 上调 |
| hsa-miR-3907 | 0.034 057 | 3.89 | 上调 |
| hsa-miR-4254 | 0.021 169 | 2.66 | 上调 |
| hsa-miR-150 | 0.049 055 | 2.57 | 上调 |
| hsa-miR-4316 | 0.007 991 | 2.48 | 上调 |
| hsa-miR-2276 | 0.002 333 | 2.12 | 上调 |
| hsa-miR-544b | 0.000 241 | 1.96 | 上调 |
| hsa-miR-126 | 0.042 901 | 1.61 | 上调 |
| hsa-miR-769-5p | 0.010 291 | −1.67 | 下调 |
| hsa-miR-485-3p | 0.026 036 | −1.85 | 下调 |
| hsa-miR-1204 | 0.018 597 | −1.93 | 下调 |
| hsa-miR-26b | 0.003 298 | −2.64 | 下调 |
| hsa-miR-431 | 0.006 516 | −2.81 | 下调 |
| hsa-miR-875-3p | 0.004 645 | −2.88 | 下调 |
| hsa-miR-383 | 0.034 066 | −3.28 | 下调 |
| hsa-miR-105 | 0.018 072 | −4.25 | 下调 |
| hsa-miR-1305 | 0.003 854 | −4.39 | 下调 |
| hsa-miR-3182 | 0.016 117 | −6.01 | 下调 |




a:miR-152在血浆外泌体中的表达;b:miR-152在胎盘组织外泌体中的表达　*:*P*<0.05;**:*P*<0.01

**图3　血浆及胎盘组织外泌体中miR-152的表达**

## 3　讨论

子痫前期是威胁母胎安全的妊娠并发症之一,常表现为孕20周后出现高血压,同时出现蛋白尿甚至母体终末器官功能受损等临床表现。EOPE则以妊娠中晚期出现难以控制的高血压及大量蛋白尿为特点,同时合并严重的靶器官损伤。相较于晚发型子痫前期相对缓和的病情进展,EOPE一旦发病,发展更为迅猛,甚至出现孕产妇及围产儿死亡[7]。

2007年Gammill等[8]提出了子痫前期发病机制的

“二元论”假说。随着研究深入,Redman[9]将其细化为“六阶段模式”,其中第四阶段即妊娠后半段,各种胎盘源性的损伤因子进入母体循环,引起血管内皮损伤及各种炎症反应的激活。在正常妊娠中,胎盘组织分泌的外泌体可于妊娠6周在母体血液循环中被发现,其含量也随着孕周的延长而增加。这提示母体血液循环中外泌体miRNAs的表达可以很好地反映胎盘组织中相关miRNAs表达的变化。本研究测序结果显示,与对照组相比,EOPE组中共筛查出27个有显著表达差异的miRNAs,其中15个表达上调,12个表达下调。

miRNAs可负性调控一个或多个靶基因的表达从而发挥其生物学功能[10]。为了解外泌体miRNAs调控EOPE的分子机制,且更精确地筛选其靶基因,本研究利用miRDB、TargetScan及miRTarbase等3个靶基因预测网站分别预测差异表达miRNAs靶基因。其中miRTarBase网站是一个主要从已发表文章中收集并整理miRNAs靶基因的数据库,其预测靶基因数目较少,但可靠性较高。利用Venn图绘制3个数据库预测靶基因交集,本研究共得到8 414个预测靶基因。

本研究生物信息学分析显示,预测得到的靶基因在补体和凝血级联、MMPs信号通路及TLR4信号通路中富集程度最高。正常孕妇体内的“生理性高凝状态”能够预防产时及产后出血。早期子痫前期患者尚能维持凝血平衡,但随着病情进展,子痫前期胎盘血管内皮损伤等各种因素联合作用,导致胎盘组织内凝血活酶释放,加速凝血级联激活[11]。正常妊娠妇女胎盘中存在大量补体裂解产物,但补体系统的激活对母体与胎儿并没有显著影响。这是因为正常妊娠时机体针对补体激活具有有效的调节措施。目前的研究显示,补体系统的异常激活可导致子痫前期的发生[12]。由此推测,补体和凝血级联异常是EOPE的重要发病机制。母胎界面中TLR4具有免疫激活的作用,TLR4及其信号通路在子痫前期发生发展中有重要作用[13]。TLR4于子痫前期胎盘滋养细胞中表达异常增加,提示其发生与TLR4介导的炎症免疫激活密切相关[14]。子痫前期孕妇胎盘组织中MMP2、MMP9的表达水平下调,TIMP1、TIMP2及TIMP3的表达水平上调,出现MMPs/TIMPs失衡,目前普遍认为MMPs信号通路介导的滋养细胞侵袭能力下降为子痫前期尤其是胎盘源性EOPE可能的发病机制[15]。本研究发现,外泌体miR-152于EOPE患者胎盘及血浆中表达均显著上调。徐曼等[16]的研究也发现,抑制miR-152能促进子痫前期患者滋养细胞的增殖和侵袭,并抑制其凋亡,其作用可能是通过调控MMPs信号通路实现的。

综上,本研究首次通过比较正常孕妇与EOPE孕妇血浆源性外泌体miRNAs表达谱的差异,并通过生物信息学分析发现这些差异表达的miRNAs可能参与调控补体和凝血级联、MMPs信号通路及TLR4信号通路,进而影响EOPE的病理生理过程。此外,本研究还发现,miR-125在胎盘及血浆外泌体中均表达上调,其可能成为EOPE的生物标志物,未来需要进一步研究。

## [参考文献]


[1] Rambaldi M, Weiner E, Mecacci F, et al. Immunomodulation and preeclampsia[J]. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2019, 60: 87-96. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2019.06.005.

[2] 苟文丽,薛 燕. 妊娠期高血压疾病国际指南与中国实践[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2017, 33(6): 559-563. doi: 10.19538/j.fk2017060103.

[3] Mavreli D, Lykoudi A, Lambrou G, et al. Deep sequencing identified dysregulated circulating microRNAs in late onset preeclampsia[J]. In Vivo, 2020, 34(5): 2317-2324. doi: 10.21873/invivo.12044.

[4] Lykoudi A, Kolialexi A, Lambrou GI, et al. Dysregulated placental microRNAs in early and late onset preeclampsia[J]. Placenta, 2018, 61: 24-32. doi: 10.1016/j.placenta.2017.11.005.

[5] 涂成城,陶 峰,储 斌,等. 子痫前期相关miR-23b-5p靶基因的预测及生物信息学分析[J]. 南昌大学学报(医学版), 2021, 61(4): 1-6. doi: 10.13764/j.cnki.ncdm.2021.04.001.

[6] 谢 幸,苟文丽. 妇产科学[M]. 第8版. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 64-70.

[7] Rana S, Lemoine E, Granger J, et al. Preeclampsia: pathophysiology, challenges, and perspectives[J]. Circ Res, 2019, 124(7): 1094-1112. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.118.313276.

[8] Gammill HS, Roberts JM. Emerging concepts in preeclampsia investigation[J]. Front Biosci, 2007, 12: 2403-2411. doi: 10.2741/2242.

[9] Redman C. The six stages of pre-eclampsia[J]. Pregnancy Hypertension, 2014, 4(3): 246. doi: 10.1016/j.preghy.2014.04.020.

[10] Zhao X, He Q, Wu Z, et al. Down-regulated miR-149-5p contributes to preeclampsia via modulating endoglin expression[J]. Pregnancy Hypertens, 2019, 15: 201-208. doi: 10.1016/j.preghy.2019.01.002.

[11] Dusse LM, Godoi LC, Gomes KB, et al. Tissue factor-dependent pathway in severe preeclampsia revisited: a Brazilian cohort study[J]. Blood Coagul Fibrinolysis, 2016, 27(4): 436-440. doi: 10.1097/MBC.0000000000000507.

[12] 孙文苑,马利娟,吴思沂,等. 孕中期血清sFlt-1、PlGF和补体系统激活因子对子痫前期危险因素孕妇发生子痫前期的预测价值[J]. 中国妇产科临床杂志, 2020, 21(5): 489-491. doi: 10.13390/j.issn.1672-1861.2020.05.014.

[13] 卜春艳,王 颖,王 微,等. 复方丹参注射液联合硫酸镁对早发型重度子痫前期患者TLR4的影响及机制探讨[J]. 中国计划生育学杂志, 2019, 27(12): 1667-1670. doi: 10.3969/j.issn.1004-8189.2019.12.024.

[14] Fan M, Li X, Gao X, et al. LPS induces preeclampsia-like phenotype in rats and HTR8/SVneo cells dysfunction through TLR4/p38 MAPK pathway[J]. Front Physiol, 2019, 10: 1030. doi: 10.3389/fphys.2019.01030.

[15] Li Q, Zhang J, Su D, et al. lncRNA TUG1 modulates proliferation, apoptosis, invasion, and angiogenesis via targeting miR-29b in trophoblast cells[J]. Human Genomics, 2019, 13(1): 50. doi: 10.1186/s40246-019-0237-z.

[16] 徐 曼,安泓润,郝媛媛. 抑制miR-152对低氧诱导子痫前期滋养细胞增殖凋亡侵袭能力的影响及机制[J]. 山东医药, 2021, 61(13): 37-41. doi: 10.3969/j.issn.1002-266X.2021.13.010.


(编辑:龙小芬)