

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.15.014

文章编号: 1005-8982(2016)15-0076-05

论著

MicroRNA-126 和血管内皮生长因子在胚胎停育绒毛组织中的表达及相关性研究*

彭燕¹, 莫吉祥¹, 王新²

(1.湘潭职业技术学院 妇产科教研室,湖南 湘潭 411100;2.中南大学湘雅二医院 妇产科,湖南 长沙 410011)

摘要:目的 通过分析孕早期胚胎停育与正常胚胎绒毛组织中 microRNA-126(miR-126)、血管内皮生长因子(VEGF)的表达差异,探讨其在早期胚胎停育中的相关性。**方法** 收集孕早期胚胎停育和正常胚胎绒毛组织各 28 例作为胚胎停育组和对照组,采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测两组 miR-126 和 VEGF mRNA 表达水平的变化。**结果** ①两组绒毛组织中均有 miR-126 表达,胚胎停育组绒毛组织中 miR-126 的表达高于对照组,但差异无统计学意义。②胚胎停育组绒毛组织中 VEGF 的表达低于对照组,差异有统计学意义。③胚胎停育组绒毛组织中 miR-126 与 VEGF 的表达呈负相关;对照组绒毛组织中 miR-126 与 VEGF 的表达呈正相关。**结论** ①胚胎停育绒毛组织中 VEGF 的表达低于正常胚胎。②VEGF 的表达变化与胚胎停育的发生有一定的相关性。

关键词: 胚胎停育;绒毛组织;microRNA-126;血管内皮生长因子

中图分类号: R715.3

文献标识码: A

Expressions of microRNA-126 and VEGF in chorionic villi of growth-arrest early embryo and their correlation*

Yan Peng¹, Ji-xiang Mo¹, Xin Wang²

(1. Department of Obstetrics and Gynecology, Xiangtan Vocational and Technical College, Xiangtan, Hunan 411100, China; 2. Department of Obstetrics and Gynecology, the Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, Hunan 410011, China)

Abstract: Objective To investigate the expressions of microRNA-126 (miR-126) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in the chorionic villi of growth-arrest early embryo group and the chorionic villus of normal control group, and analyze the different expressions of miR-126 and VEGF between them so as to explore their relationship in early embryo growth arrest. **Methods** The chorionic villi of 28 cases in early embryo growth arrest group and 28 cases in control group were collected. Using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), the expression levels of miR-126 and VEGF mRNA in the two groups were detected. **Results** miR-126 was expressed in the chorionic villi of the early embryo growth arrest group and the control group. The expression of miR-126 in the chorionic villi of the early embryo growth arrest group was higher than that of the control group, but the difference was not significant. The expression of VEGF in the chorionic villi of the early embryo growth arrest group was significantly lower than that of the control group, the difference was statistically significant. A negative correlation was found between miR-126 and VEGF in the chorionic villi of the early embryo growth arrest group, while a positive correlation was found between miR-126 and VEGF in the chorionic villi of the control group. **Conclusions** The expression of VEGF

收稿日期:2015-11-24

* 基金项目:湖南省教育厅科学研究项目(No:14C1111)

in the chorionic villi of growth-arrest early embryo is lower than that in normal chorionic villi. There is a certain correlation between the change of VEGF expression and the early embryo growth arrest.

Keywords: early embryo growth arrest; chorionic villus; miR-126; vascular endothelial growth factor

胚胎停止发育是指妊娠早期因某种原因引起胚胎发育停止、胚胎死亡,最终结局常表现为稽留流产和不全流产。近年来,胚胎停育发病率有逐年增加的趋势。有学者认为,胎盘形成过程中血管功能不全可能是导致胚胎停育的众多原因之一^[1]。

MicroRNA(miR)是近年来新发现的一类进化上非常保守、稳定性好的内源性非编码小分子 RNA,已成为生物学一个研究的热点。miR-126 在血管内皮细胞中特异性表达,具有促进胚胎新生血管形成并维持管壁完整性的作用^[2-3]。有资料表明,miR-126 过表达能明显增加内皮先祖细胞的集落形成、增殖,减少细胞凋亡^[4]。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)是目前所知道的作用最强的促血管生成因子,在血管内皮细胞中特异性表达^[5]。

miR-126 和 VEGF 作为两种对内皮细胞起作用的因子,在妊娠过程中的重要性是显而易见的。通过生物信息学分析发现,VEGF 是 miR-126 的预测靶基因之一。但目前国内外在 miR-126 对 VEGF 的相关性方面研究较少,并且主要集中在肿瘤方面的研究,而在胚胎停育方面的研究未见报道。本课题采用逆转录-聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction,RT-PCR)法分析胚胎停育绒毛组织中 miR-126、VEGF mRNA 的表达,进而探讨两者与胚胎停育发病的相关性,为进一步研究其发病机制提供新思路。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取 2012 年 11 月 1 日-2013 年 1 月 31 日在中南大学湘雅二医院妇产科门诊就诊的胚胎停育和正常妊娠要求人工流产患者的绒毛组织各 28 例。其中,年龄 19~33 岁;孕周 7~10 周,均为汉族。纳入标准:初孕妇,既往月经规则,停经 49~70 d,近 3 月未服用激素类药物,妊娠期间无明显感染病史,血常规、凝血功能正常,白带常规无明显异常。排除标准:无生殖系统解剖结构、内分泌异常,询问无糖尿病、心血管疾病、系统性红斑狼疮、甲状腺功能异常

等其他全身性疾病病史,否认家族遗传性疾病,近期无用药、手术创伤史,无不良的生活习惯。参照 GUO 等^[6]的诊断依据,收集胚胎停育患者绒毛组织标本 28 例作为胚胎停育组;同时收集早期正常妊娠自愿要求行人工流产手术患者绒毛组织标本 28 例作为对照组。

1.2 实验方法

1.2.1 绒毛组织总 RNA 提取和质量检测 将两组绒毛组织各 100 mg 匀浆研磨,Trizol 一步法提取组织总 RNA。每组各取样品用紫外分光光度计测定其在 260 和 280 nm 波长的光密度值(optical density, OD)。经电泳观察条带。

1.2.2 引物的设计 miR-126 及内参 U6 引物购自广州复能公司(HmiRQ0098)(见表 1)。VEGF 及内参 β -actin 从美国国立生物技术信息中心下载,引物设计采用 Primer 5.0 软件(见表 2)。

表 1 miR-126 及内参 U6 的引物序列

基因	引物序列
U6	正向引物:5'-CTTCGGCAGCACATATACTAAAAT-3'
	反向引物:5'-CGCTTCACGAATTTGCGTGCAT-3'
miR-126	正向引物:5'-GGGGTCGTACCGTGAGT-3'
	反向引物:5'-CAGTGCCTGTCGTGGAGT-3'

表 2 VEGF 和内参 β -actin 的引物序列

基因	引物序列
VEGF	正向引物:ATGACGAGGGCCTGGAGTGTG
	反向引物:CCTATGTGCTGGCCTTGGTGAG
β -actin	正向引物:AGGGGCCGACTCGTCATACT
	反向引物:GGCGGCACCACCATGTACCCT

1.2.3 cDNA 的合成 采用美国 Fermentans 公司的逆转录试剂盒进行 cDNA 的合成。

1.2.4 RT-PCR 检测 采用日本 Toyobo 公司的 SYBR Green qPCR Mix 试剂盒,按说明书操作步骤进行 PCR 扩增,反应体系总体积为 20 μ l。

1.3 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析实验结果

本研究的 RT-PCR 数据结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行分析,用内参 U6/ β -actin 对目的基因的表达量进行归一化处理。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 对所有数据进行正态性检验和方差齐性检验, 对非正态分布的计量资料经自然对数转换后再行统计分析; 两组间的比较行 t 检验, 数据间的相关性分析用 Pearson 相关分析法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

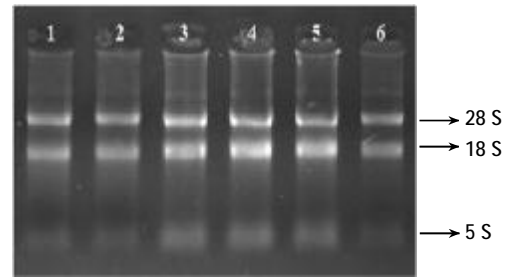
2 结果

2.1 总 RNA 结果

两组绒毛组织中总 RNA 呈乳白色半透明状, 经 1% 变性琼脂糖凝胶电泳后紫外灯下观察, 可见 3 条明显电泳条带: rRNA 28 S, rRNA 18 S, rRNA 5 S (见图 1)。rRNA 28 S 和 rRNA 18 S 两条带明显、清晰、无任何拖尾条带出现, 并且 28 S 条带的亮度明显亮于 18 S 条带, 紫外分光光度仪测定其 OD260/OD280 比值为 1.8 ~ 2.0, 提示本实验所提取的 RNA 纯度高、完整性好, 可以满足 RT-PCR 实验的需要。

2.2 两组绒毛组织中 miRNA-126 的表达

miR-126 在两组绒毛组织中均有表达, 且两组



1, 2, 3: 对照组; 4, 5, 6: 胚胎停育组
图 1 总 RNA 琼脂糖凝胶电泳图

miR-126 表达比较差异无统计学意义 ($P = 0.571$)。见表 3。

2.3 两组绒毛组织中 VEGF 的表达

VEGF 在两组绒毛组织中均有表达。胚胎停育组 VEGF 的表达低于对照组, 差异有统计学意义 ($t = 13.874, P = 0.000$)。见表 4。

2.4 胚胎停育组绒毛组织中 miR-126、VEGF 表达的相关性分析

Pearson 直线相关分析结果表明, 胚胎停育组绒毛组织中 miR-126 与 VEGF 的表达呈负相关, 对照组绒毛组织中 miR-126 与 VEGF 的表达呈正相关。

表 3 两组绒毛组织中 miR-126 的表达比较

组别	例数	miR-126 平均 Ct 值	U6 平均 Ct 值	Δ Ct	miR-126 表达量 ($2^{-\Delta\Delta Ct}, \bar{x} \pm s$)	P 值
胚胎停育组	28	24.33	19.17	5.16	1.173 ± 0.182	0.571
对照组	28	24.58	19.21	5.37	1.014 ± 0.175	

表 4 两组绒毛组织中 VEGF 的表达比较

组别	例数	VEGF 平均 Ct 值	β -actin 平均 Ct 值	Δ Ct	VEGF 平均相对表达量 ($2^{-\Delta\Delta Ct}, \bar{x} \pm s$)	P 值
胚胎停育组	28	25.67	14.56	11.11	$0.335 0 \pm 0.075 6$	0.000
对照组	28	23.27	13.32	9.95	$1.029 9 \pm 0.198 6$	

见图 2、3。

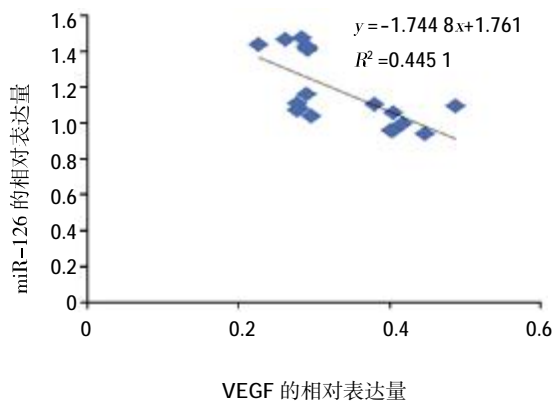


图 2 胚胎停育组 miR-126、VEGF 表达的相关性

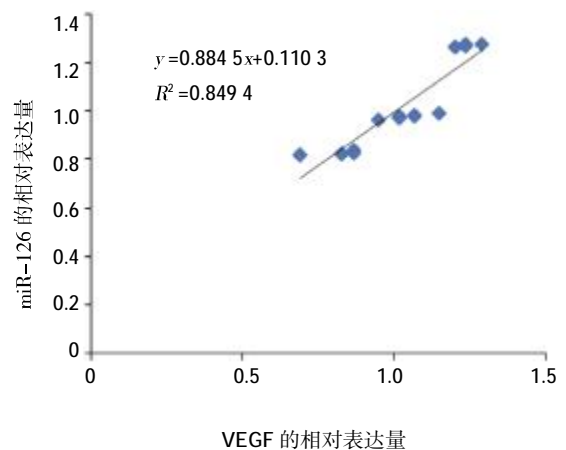


图 3 对照组 miR-126、VEGF 表达的相关性

3 讨论

3.1 miR-126 与胚胎停育的相关性

胚胎/胎儿的生长发育与滋养细胞的有效侵入及胎盘绒毛血管发育关系密切,而胎盘绒毛血管的形成过程实际上就是血管内皮细胞的生长发育过程。miR-126 基因组定位于表皮生长因子样结构域 7 (epidermal growth factor-like domain 7, EGFL7) 基因的第 7 个内含子中,而 EGFL7 本身就是血管内皮特异性表达的基因,因而两者共同作用对血管的形成、发育及功能起调控作用^[7]。SEHMIDT 等^[8]研究发现,将小鼠的 EGFL7 基因敲除后,部分胚胎死于血管发育缺陷及异常的胚胎干细胞聚集,提示在实验中可能不仅敲除 EGFL7 基因,还敲除编码 miR-126 的基因^[9]。本实验用 RT-PCR 检测胚胎停育组和对照组绒毛组织中 miR-126 的表达水平。结果表明 miR-126 在两组中均有表达,胚胎停育组的相对表达量是对照组的 1.16 倍,但差异无统计学意义。可能的原因为:①血管新生可能受多种 miR 的共同调控。②miR-126 在早期胚胎发育过程中可能并未直接参与调节绒毛血管的形成。③本次实验样本量较少,可能对实验造成一定的局限性。

3.2 VEGF 与胚胎停育的相关性

VEGF 又称血管调理素或血管通透因子,是至今为止发现的最有力的血管生成因子,在妊娠中发挥重要作用^[10]。近年来研究表明,VEGF 功能及表达异常可引起胚胎植入及胎盘血管网形成障碍,提示 VEGF 是造成自然流产的重要原因之一^[11]。本实验应用 RT-PCR 检测胚胎两组绒毛组织中 VEGF mRNA 的相对表达水平。结果显示,胎停育组绒毛组织中 VEGF 的表达明显低于对照组,这提示胚胎停育发病机制之一是绒毛组织内 VEGF 表达水平下降,结合 VEGF 生理作用及其在妊娠中的调节作用,推测其可能原因为:①VEGF 表达下降,可减弱内皮细胞迁移、增殖功能,导致蜕膜血管、绒毛血管等生成减少,造成绒毛内血流量减少,影响到胚胎的正常发育,最终导致胚胎停育;②VEGF 表达下降,导致绒毛组织植入子宫内膜过浅,形成绒毛滋养细胞浅着床,导致流产或母胎间营养交换障碍,胚胎停止发育;③VEGF 表达下降,能下调与血管通透性相关的活性物质的表达,影响母胎间的营养交换,导致胚胎生长发育受阻,甚至胚胎停育。

3.3 miR-126、VEGF 在胚胎停育中的相关性

通过生物信息学技术分析发现,EGF、Spred1 是

miR-126 众多预测靶基因中的 2 个基因^[12]。miR-126 在早期胚胎发育方面是否存在对 VEGF 的调节,尚不清楚。FISH 等^[13]研究发现,在小鼠静脉内皮细胞生长发育方面,miR-126 可通过抑制 Spred1 和 PIK3R2 mRNA 水平表达,提高内皮细胞对 VEGF 和碱性成纤维因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) 的敏感性,参与胚胎新生血管形成,并维持血管的完整性。由此可以看出,miR-126 与 VEGF 呈正相关。但是 LIU 等^[14]研究 miR-126 在肺癌中的表达发现,上调 miR-126 可以明显抑制 VEGF 的表达,对肿瘤的生长和转移起抑制作用。从 LIU 的研究中可以看出,miR-126 与 VEGF 呈负相关。本实验为进一步探讨 miR-126 和 VEGF 在胚胎发育方面的相关性,对两组绒毛组织中 miR-126 与 VEGF 的表达进行相关性分析,发现两者在胚胎停育组中呈负相关,提示 miR-126 与 VEGF 在胚胎停育的发生、发展中有负向调节作用。这与 LIU^[14]和张昱等^[15]的实验结果基本一致。而两者在对照组中却呈正相关,提示 miR-126 与 VEGF 在胚胎正常的发育过程中有正向调节作用。这与 FISH 等^[13]的实验结果一致。因此笔者推测,同一种 miRNA 在不同的生理、病理过程中,可以通过调控不同的靶基因而发挥不同的作用。miR-126 在正常妊娠时可通过抑制 Spred1 基因,提高内皮细胞对 VEGF 和 bFGF 的敏感性,参与胚胎血管的新生并维持血管的完整性。而在胚胎停育时,miR-126 则可能通过直接抑制 VEGF 基因的表达,从而使胚胎血管发育减少或功能异常。

胚胎停育发病因素复杂,发病机制尚未明确,相信随着胚胎停育方面 miR 研究的逐渐深入,有望通过干扰 miR-126 的调控作用而减少胚胎停育的发生,并且为临床早期监测胚胎发育及治疗胚胎停育提供新的靶点。

参 考 文 献:

- [1] 叶玲玲,张碧云,曹文丽. 子宫颈支原体感染与胚胎停止发育的关系[J]. 中华妇产科杂志, 2004, 39(2): 83-85.
- [2] HARRIS T A, YAMAKUCHI M, FERLITO M, et al. Micro RNA-126 regulates endothelial expression of vascular cell adhesion molecule 1[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(5): 1516-1521.
- [3] CAPORALI A, EMANUELI C. MicroRNA regulation in angiogenesis[J]. Vascul Pharmacol, 2011, 55(4): 79-86.
- [4] MENG S, CAO J T, ZHANG B, et al. Downregulation of micro RNA-126 in endothelial progenitor cells from diabetes patients,

- impairs their functional properties, via target gene Spred-1[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2012, 53(1): 64-72.
- [5] BUCHLER P, REBER H A, BUCHLER M W, et al. VEGF-R II influences the prognosis of pancreatic cancer[J]. *Ann Surg*, 2002, 236(6): 728-749.
- [6] GUO J, ZOU L. Correlation of RECK with matrix metalloproteinase-2 in regulation of trophoblast invasion of early pregnancy[J]. *Huazhong Univ Sci Technol Med Sci*, 2006, 26(6): 738-740.
- [7] 王雪婷, 罗明. 微小 RNA-126 在血管内皮细胞中的生物学功能[J]. *国际心血管病杂志*, 2014, 41(1): 4-6.
- [8] SEHMIDT M, PAES K, DE MAZIÈRE A, et al. EGFL7 regulates the collective migration of endothelial cells by restricting their spatial distribution[J]. *Development*, 2007, 134(16): 2913-2923.
- [9] KUHNERT F, MANCUSO M R, HAMPTON J, et al. Attribution of vascular phenotypes of the murine *Egfl7* locus to the microRNA miR-126[J]. *Development*, 2008, 135(24): 3989-3993.
- [10] 吴英, 陈丹, 王波. 可溶性血管内皮生长因子受体 1 与子痫前期的关系研究进展[J]. *国际妇产科学杂志*, 2012, 39(6): 560-563.
- [11] 杜丽荣, 徐素欣. 血管内皮生长因子在自然流产领域的研究进展[J]. *中国医药导报*, 2007, 2(4): 18-20.
- [12] ALEXIOU P, VERGOULIS T, GLEDITZSCH M, et al. miR Gen 2.0: a database of micro RNA genomic information and regulation[J]. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38: 137-141.
- [13] FISH J E, SANTORO M M, MORTON S U, et al. MiR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity [J]. *Dev Cell*, 2008, 15(2): 272-284.
- [14] LIU B, PENG X C, ZHENG X L, et al. MiR-126 restoration down-regulate VEGF and inhibit the growth of lung cancer cell lines in vitro and in vivo[J]. *Lung Cancer*, 2009, 66: 169-175.
- [15] 张昱. 靶向 VEGF 的 miR-126 在结直肠癌侵袭和血管生成过程中的调控作用[D]. 广州: 南方医科大学, 2012.

(申海菊 编辑)