

稽留流产患者绒毛组织 miR-19b 与 PTEN 的表达及临床意义

徐 丹,谢 君,刘 佳,龚 洁,彭宇婷,唐 芳,邹 顺,薛 青
(岳阳市人民医院产科,湖南 岳阳 414000)

摘要:目的 检测稽留流产患者绒毛组织 miR-19b 与 PTEN 的表达水平并分析其临床意义。方法 选取 2022 年 1 月-5 月在本院诊断治疗的稽留流产患者 30 例作为试验组,同期选取 30 例正常早孕并要求终止妊娠妇女为对照组,比较两组绒毛组织中 miR-19b、PTEN 的表达水平及相关性。结果 试验组 miR-19b 相对表达量(1.792 ± 0.905)高于对照组(0.538 ± 0.443),PTEN mRNA 相对表达量(1.909 ± 1.099)低于对照组(6.316 ± 2.597),PTEN 蛋白相对表达量(0.036 ± 0.016)低于对照组(0.084 ± 0.013) ($P < 0.05$)。相关性分析显示,对照组绒毛组织中 miR-19b 与 PTEN 的表达呈负相关($r = -0.584$, $P = 0.001$)。结论 稽留流产患者绒毛组织 miR-19b 表达升高,可能通过调控 PTEN 影响滋养细胞的增殖、凋亡及侵袭。

关键词:稽留流产;绒毛组织;miR-19b;PTEN

中图分类号:R714.21

文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.1006-1959.2024.12.018

文章编号:1006-1959(2024)12-0085-04

Expression and Clinical Significance of miR-19b and PTEN in Villus Tissue of Patients with Missed Abortion

XU Dan,XIE Jun,LIU Jia,GONG Jie,PENG Yu-ting,TANG Fang,ZOU Shun,Xue Qing

(Department of Obstetrics,Yueyang City People's Hospital,Yueyang 414000,Hunan,China)

Abstract: **Objective** To detect the expression levels of miR-19b and PTEN in villus tissues of patients with missed abortion and analyze their clinical significance. **Methods** A total of 30 patients with missed abortion diagnosed and treated in our hospital from January to May 2022 were selected as the experimental group, and 30 normal early pregnant women who required termination of pregnancy were selected as the control group. The expression levels and correlation of miR-19b and PTEN in villus tissues of the two groups were compared. **Results** The relative expression of miR-19b was (1.792 ± 0.905) in the experimental group, which was higher than (0.538 ± 0.443) in the control group; the relative expression of PTEN mRNA was (1.909 ± 1.099) in the experimental group, which was lower than (6.316 ± 2.597) in the control group; and the relative expression of PTEN protein was (0.036 ± 0.016) in the experimental group, which was lower than (0.084 ± 0.013) in the control group ($P < 0.05$). Correlation analysis showed that there was a negative correlation between the expression of miR-19b and PTEN in villus tissues of control group ($r = -0.584$, $P = 0.001$). **Conclusion** The expression of miR-19b in villus tissue of patients with missed abortion is increased, which may affect the proliferation, apoptosis and invasion of trophoblast cells by regulating PTEN.

Key words: Missed abortion;Villous tissue;miR-19b;PTEN

稽留流产是一种特殊类型的自然流产,发生在妊娠 12 周之前为早期自然流产。该病发生的原因众多,包括染色体异常、生殖道畸形、内分泌失调、感染因素、血栓前状态、自身免疫因素等,但发病者中仍有半数以上原因未明。微小 RNA (microRNA, miRNA) 是由 21~24 个核苷酸组成的内源性非编码小 RNA,与 mRNA 的 3' 非翻译区(3'UTR)结合,通过诱导目标 mRNA 的降解介导转录调节^[1]。研究表

明^[2,3],miRNA 参与多种细胞生物学活动,如细胞分化、增殖、迁徙、侵袭和凋亡,其异常表达与流产密切相关。已有研究表明^[4],不明原因复发性流产(URSA)患者胎盘组织中可检测到多种与正常患者差异表达的 miRNA,其中一些 miRNA 已被证明能够通过参与靶基因的调控来影响 URSA 的发生及发展。目前研究 miRNA 在复发性流产中的作用主要包括促进滋养细胞凋亡,抑制增殖;改变免疫因素;通过单核苷酸多态性(SNPs)或单倍体以及调控血管内皮,增加流产的易感性,促进机体对胚胎的吸收,进而参与流产的发生发展。PTEN 是一种抑癌基因,参与调节多种细胞的凋亡,PTEN 可通过 PI3K/AKT 信号通过在细胞周期、生长、迁移和凋亡中发挥重要作用^[5]。既往的报道显示,PTEN 基因在各种

作者简介:徐丹(1991.11-),女,湖南岳阳人,硕士,主治医师,主要从事妇产科相关工作

通讯作者:谢君(1982.6-),女,湖南岳阳人,本科,副主任医师,主要从事妇产科相关工作

肿瘤组织中表达缺失或突变^[6],并且在正常胎盘组织、子宫内膜和蜕膜中也有表达^[7]。一些研究表明^[8],PTEN在胚胎发育过程中可能是必不可少的,改变PTEN的表达可能与自然流产有关。本研究通过分析稽留流产患者绒毛组织 miR-19b 与 PTEN 的表达及其相关性,探讨 miR-19b 可能通过 PTEN 参与滋养细胞增殖、凋亡过程,探寻自然流产的病因机制,旨在为自然流产的治疗提供更多思路。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取2022年1月-5月在岳阳市人民医院接受治疗的稽留流产患者30例纳入试验组,符合早期妊娠稽留流产诊断标准,患者年龄22~35岁,平均年龄(28.53±3.51)岁;停经6~11周,平均停经时间(8.00±1.20)周;孕次1~5次,平均孕次(2.23±1.19)次;产次0~3次,平均产次(0.57±0.77)次;体重指数(BMI)18.4~26.8kg/m²,平均BMI(22.06±2.56)kg/m²。另同期选取30例正常早孕并要求终止妊娠妇女为对照组,对照组所有对象经临床检查显示为正常宫内早孕,且宫内胚胎发育正常。年龄22~34岁,平均年龄(28.67±3.28)岁;停经6~11周,平均停经时间(8.07±1.17)周;孕次1~6次,平均孕次(2.37±1.47)次;产次0~2次,平均产次(0.53±0.63)次;BMI 17.6~26.4kg/m²,平均BMI(21.39±2.52)kg/m²。两组年龄、孕周、孕次、产次及BMI比较,差异无统计学意义($P>0.05$),可比较。两组研究对象在标本获取前均无激素类药物服用史,无染色体异常,无生殖道畸形,无生殖器感染性疾病,无自身免疫性疾病,无内分泌异常,无内外科合并症,无有害物质接触史,无吸烟、酗酒、吸毒等不良生活习惯。本研究并经医院伦理委员会批准,所有患者均签署知情同意书。

1.2 人绒毛组织的收集及处理 所有患者均行米非司酮+米索前列醇药物流产,妊娠组织物排出后,采集绒毛组织标本,在生理盐水中反复漂洗至无血色,每个样本被分为3管,2管在液氮中保存24h后移至-80℃冰箱保存用于实时荧光定量PCR(qPCR)实验,1管在4%多聚甲醛中固定24h后实施常规脱水处理,石蜡包埋切片。

1.3 实验方法

1.3.1 qPCR检测 miR-19b 和 PTEN 表达 Trizol 法(美国 Thermo)提取绒毛组织中总 RNA 后测 RNA 的浓度及纯度,按照中国北京康为世纪公司试剂盒

(CW2569,CW2141)说明进行逆转录反应,以 GAPDH 作为内参,用 2^{-ΔΔCt} 法计算目的基因 mRNA 的相对表达量。

1.3.2 免疫组织化学法(Immunohistochemical, IHC)检测 PTEN 的表达 将石蜡标本切片后二甲苯脱蜡,100%到75%乙醇梯度水化,于高压枸橼酸盐缓冲液(pH6.0)中进行抗原修复。用1%高碘酸灭活内源性酶,滴加适当稀释的一抗(PTEN),4℃过夜,再滴加50~100 μl 抗-兔-IgG 抗体-HRP 多聚体37℃孵育30min。再使用DAB溶液显色,经过苏木精复染、脱水、透明和封片等处理后显微镜下观察 PTEN 的染色情况。结果判定:细胞质或细胞核中有棕黄色颗粒沉着为 PTEN 蛋白阳性表达。高倍镜下按随机数字表法选取5个400倍视野,采用 Image-Pro plus 6.0 分析平均光密度(average optical density, AOD)值。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 13.0 软件对数据进行统计分析,计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用独立样本 t 检验;采用 Pearson 相关分析统计数据相关性,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组绒毛组织内 miR-19b 的表达比较 qPCR 检测结果显示,试验组绒毛组织 miR-19b 相对表达量为(1.792±0.905),高于对照组的(0.538±0.443),差异有统计学意义($t=6.816, P=0.000$),见图1。

2.2 两组绒毛组织内 PTEN mRNA 的表达比较 qPCR 检测结果显示,试验组绒毛组织 PTEN mRNA 相对表达量为(1.909±1.099),低于对照组的(6.316±2.597),差异有统计学意义($t=8.559, P=0.000$),见图2。

2.3 两组绒毛组织内 PTEN 蛋白的表达比较 免疫组化显示,PTEN 在稽留流产滋养细胞胞质中少量表达,呈浅棕黄色,绒毛间质少许染色,PTEN 在正常妊娠滋养细胞胞质和细胞核及绒毛间质中均有表达,表达量较多,呈深棕色,见图3。平均光密度值显示,试验组绒毛组织 PTEN 蛋白相对表达量(0.036±0.016)低于对照组绒毛组织(0.084±0.013),差异有统计学意义($t=-7.156, P=0.000$),见图4。

2.4 两组绒毛组织中 miR-19b 与 PTEN 表达的相关性分析 将组内绒毛组织中 miR-19b 与 PTEN 表达进行 Pearson 相关性分析,显示正常妊娠组中 miR-19b 与 PTEN 的表达呈显著负相关性($r=-0.584, P=0.001$),见图5。

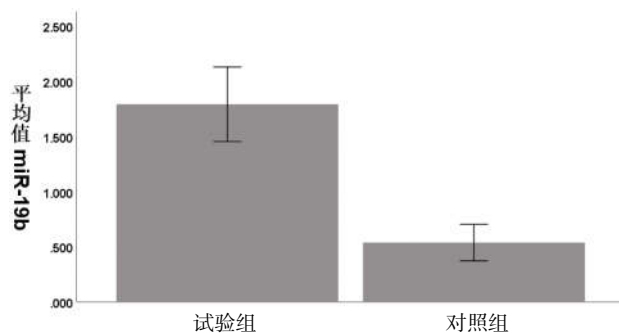


图 1 miR-19b mRNA 在两组绒毛组织中的表达情况

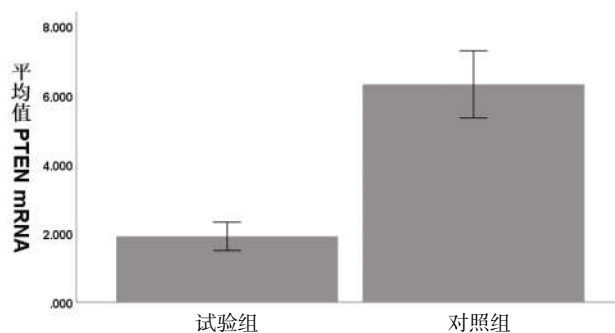
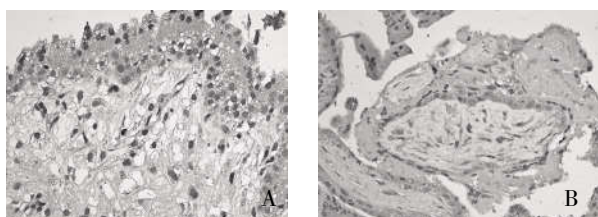


图 2 PTEN mRNA 在两组绒毛组织中的表达情况



注:A 试验组;B 对照组。

图 3 PTEN 蛋白在两组绒毛组织中的表达(×400)

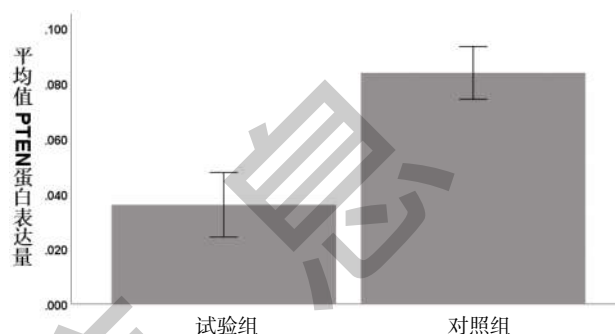


图 4 PTEN 蛋白在两组绒毛组织中的表达

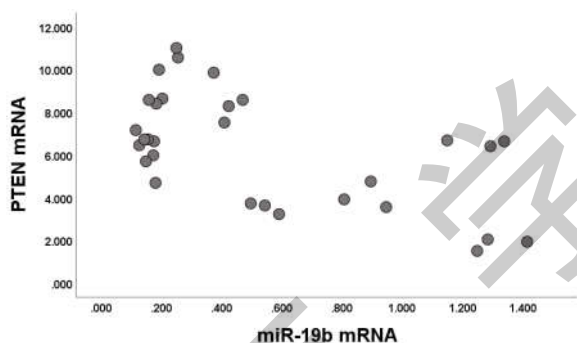


图 5 正常妊娠组 miR-19b 与 PTEN 表达的相关性分析

3 讨论

近年来,稽留流产的发病率呈上升趋势,极大的影响女性身心健康。因此,寻找确切的病因以及有效的诊断标志物,对于稽留流产的诊断以及治疗具有非常重要的临床意义。目前稽留流产的发病机制尚不清楚,其研究多集中于滋养细胞侵袭力下降及过度凋亡、胎盘血管生成障碍、母胎界面免疫耐受平衡失调,以及基因多态性改变等。

已有研究证实^[9-11],miRNAs 调节许多生化途径,如细胞增殖、分化和凋亡,miRNAs 表达失调与许多疾病有关,包括不孕症、子宫内膜异位症、先兆子痫、肿瘤发生以及神经、心血管和代谢疾病。自然流产胎盘绒毛组织中存在 miRNA 的异常表达^[4],这些异

常表达通过细胞增殖、凋亡及免疫调节参与了流产的发生发展。研究发现,过表达 miRNA-23-3p、miRNA-29a-3p 可抑制滋养细胞 HTR8/SVneo 侵袭性^[3],miRNA-149-3p 可能通过上调 MAPK 信号通路和 Notch 信号通路影响细胞的增殖、分化和凋亡,干扰胚胎发育、血管生成和胎盘血管等生理变化^[12]。Liu HN 等^[13]通过原位杂交发现与正常女性相比,复发性流产患者绒毛组织中 miRNA-93 显著升高,进一步实验证明上调 miRNA-93 可通过靶向调节因子 BCL2L2,抑制滋养细胞增殖、迁徙以及侵袭。Ding J 等^[14]实验发现在复发性流产患者中 miRNA-27a-3p 通过负性调控 USP25 表达,抑制滋养细胞上皮间充质转化、侵袭和迁移能力,参与复发性流产的发生。本研究显示,试验组绒毛组织 miR-19b 表达升高,而 miR-19b 有报道在多种肿瘤细胞中高表达^[15],参与肿瘤细胞的增殖、侵袭与凋亡,妊娠前 3 个月人类滋养细胞和肿瘤细胞具有相似的内在侵袭特性。因此,推测 miR-19b 可能参与了滋养细胞增殖、侵袭和凋亡过程,进而参与了稽留流产的发生发展。

PTEN 参与了许多细胞增殖和凋亡过程,许多 miRNAs 与 PTEN 有功能性相互作用,并抑制其表达。在卵巢癌中,miR-19b 的过表达显著降低了

PTEN 的表达^[16]。miR-19b 可以靶向 PTEN 来调节宫颈癌细胞的增殖、侵袭和自噬^[17]。miR-19b 通过靶向 PTEN 抑制多发性骨髓瘤细胞凋亡,促进增殖^[18]。除了肿瘤相关疾病外,miR-19b 与 PTEN 在其他疾病中也存在相互作用。miR-19b 可通过下调 PTEN 激活 AKT 信号通路,保护心肌细胞凋亡^[19]。研究表明绒毛滋养层的 PTEN 表达随着妊娠的进展而减少。本研究显示试验组绒毛组织 PTEN mRNA 及蛋白表达下降,证明 PTEN 参与了滋养细胞的异常作用。先前在动物实验中显示,PTEN 基因缺失的小鼠表现出异常的外胚层和中胚层,以及有缺陷的胎盘形成^[20]。此外,异常的 PTEN 表达可能通过与其 miRNA 的互补序列结合而参与 miRNA 的调节。本研究显示 miR-19b 与 PTEN 呈负相关,因此推测 miRNA 可能通过靶向 PTEN 调节滋养细胞增殖、侵袭和凋亡,从而参与了稽留流产的发生。

综上所述,稽留流产患者绒毛组织 miR-19b 过表达,PTEN 低表达,呈负相关,miR-19b 可能通过 PTEN 参与了滋养细胞增殖、凋亡过程。

参考文献:

- [1]Lu TX,Rothenberg ME.MicroRNA[J].J Allergy Clin Immunol, 2018,141(4):1202-1207.
- [2]Dong F,Zhang Y,Xia F,et al.Genome-wide miRNA profiling of villus and decidua of recurrent spontaneous abortion patients[J].Reproduction,2014,148(1):33-41.
- [3]Yang Q,Gu WW,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.
- [4]Qin W,Tang Y,Yang N,et al.Potential role of circulating microRNAs as a biomarker for unexplained recurrent spontaneous abortion[J].Fertil Steril,2016,105(5):1247-1254.e3.
- [5]Hu M,Zhu S,Xiong S,et al.MicroRNAs and the PTEN/PI3K/Akt pathway in gastric cancer (Review) [J].Oncol Rep, 2019,41(3):1439-1454.
- [6]Álvarez-García V,Tawil Y,Wise HM,et al.Mechanisms of PTEN loss in cancer: It's all about diversity[J].Semin Cancer Biol,2019,59:66-79.
- [7]Chen H,Ye D,Xie X,et al.PTEN promoter methylation and protein expression in normal early placentas and hydatidiform moles[J].J Soc Gynecol Investig,2005,12(3):214-217.
- [8]Tokyol C,Aktepe F,Hüsniye Dilek F,et al.Comparison of placental PTEN and beta1 integrin Expression in early spontaneous abortion, early and late normal pregnancy [J].Ups J Med Sci,2008,113(2):235-242.
- [9]Raja MHR,Farooqui N,Zuberi N,et al.Endometriosis, infertility and MicroRNA's: A review [J].J Gynecol Obstet Hum Reprod,2021,50(9):102157.
- [10]Lv Y,Lu C, Ji X,et al.Roles of microRNAs in preeclampsia [J].J Cell Physiol,2019,234(2):1052-1061.
- [11]Ali Syeda Z,Langden SSS,Munkhzul C,et al.Regulatory Mechanism of MicroRNA Expression in Cancer [J].Int J Mol Sci,2020,21(5):1723.
- [12]Tang L,Gao C,Gao L,et al.Expression profile of micro-RNAs and functional annotation analysis of their targets in human chorionic villi from early recurrent miscarriage [J].Gene, 2016,576(1 Pt 2):366-371.
- [13]Liu HN,Tang XM,Wang XQ,et al.MiR-93 Inhibits Trophoblast Cell Proliferation and Promotes Cell Apoptosis by Targeting BCL2L2 in Recurrent Spontaneous Abortion [J].Reprod Sci,2020,27(1):152-162.
- [14]Ding J,Cheng Y,Zhang Y,et al.The miR-27a-3p/USP25 axis participates in the pathogenesis of recurrent miscarriage by inhibiting trophoblast migration and invasion [J].J Cell Physiol, 2019,234(11):19951-19963.
- [15]Hu X,Liu H,Li C.MiRNA-19b-3p downregulates the endothelin B receptor in gastric cancer cells to prevent angiogenesis and proliferation[J].Acta Biochim Pol,2023,70(2):363-370.
- [16]Liu DT,Yao HR,Li YY,et al.MicroRNA-19b promotes the migration and invasion of ovarian cancer cells by inhibiting the PTEN/AKT signaling pathway [J].Oncol Lett,2018,16 (1):559-565.
- [17]Wang W,Liu L,Tian Y.miR-19-3p Targets PTEN to Regulate Cervical Cancer Cell Proliferation,Invasion,and Autophagy[J].Genet Res (Camb),2023,2023:4784500.
- [18]Yuan J,Su Z,Gu W,et al.MiR-19b and miR-20a suppress apoptosis, promote proliferation and induce tumorigenicity of multiple myeloma cells by targeting PTEN [J].Cancer Biomark, 2019,24(3):279-289.
- [19]Xu J,Tang Y,Bai Y,et al.miR-19b attenuates H₂O₂-induced apoptosis in rat H9C2 cardiomyocytes via targeting PTEN[J].Oncotarget,2016,7(10):10870-10878.
- [20]Di Cristofano A,Pesce B,Cordon-Cardo C,et al.Pten is essential for embryonic development and tumour suppression [J].Nat Genet,1998,19(4):348-355.

收稿日期:2023-07-06;修回日期:2023-07-17

编辑/肖婷婷