

## 妊娠期糖尿病患者胎盘微核糖核酸 (RNA) 水平的评估

### PECULIARITIES OF PLACENTAL MICRORNA EXPRESSION IN PREGNANCIES COMPLICATED BY GESTATIONAL DIABETES MELLITUS AND PREECLAMPSIA

© V.S. Pakin, E.S. Vashukova, R.V. Kapustin, O.N. Arzhanova, A.S. Glotov, V.S. Baranov

FSBSI "The Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology named after D.O. Ott", Saint Petersburg, Russia

For citation: Journal of Obstetrics and Women's Diseases. 2017;66(3):110-115. doi: 10.17816/JOWD663110-115

Received: 17.04.2017

Accepted: 19.05.2017

■ 新一代全基因组测序 (NGS) 方法对子痫前期胎盘微RNA水平的变化进行了比较分析, 这取决于是否存在妊娠糖尿病 (GDM)。GDM背景下发生子痫前期患者的his-miR-45a ( $p < 0.0001$ , FDR = 0.0050) 表达与未发生GDM的子痫前期患者相比, 差异有统计学意义。子痫前期妊娠与GDM妊娠时胎盘中三种微RNA水平的变化: hsa-miR-4532 ( $p < 0.0001$ , FDR = 0.0008)、hsa-miR-34c-5p ( $p < 0.0001$ , FDR = 0.0083)、hsa-miR-193b-5p ( $p < 0.0001$ , FDR = 0.0139)。研究表明GDM和子痫前期胎盘组织中微RNA含量的变化, 使我们可以考虑将其作为子痫前期和GDM联合发展的潜在生物标志物。需要进一步的研究来阐明这些生物标志物在GDM和子痫前期发展的分子遗传学和表观遗传学机制中的作用。

■ **关键词:** 妊娠期糖尿病 (GDM); 子痫前期; 妊娠中毒; 微RNA; 下一代测序 (NGS)。

■ The aim of study was to determine feasible changes of placental miRNAs expression profiles revealed by next generation sequencing (NGS) in pregnancies with GDM complicated or not with PE. Out of 27 miRNAs, studied expression was significantly different (FDR < 0.05) only for his-miR-45a. Comparative analysis of revealed reliable differences in expression of hsa-miR-4532 ( $p < 0.0001$ , FDR = 0.0008), hsa-miR-34c-5p ( $p < 0.0001$ , FDR = 0.0083), and hsa-miR-193b-5p ( $p < 0.0001$ , FDR = 0.0139) in pregnancy complicated by PE, without of GDM. The present results suggest that GDM and PE are associated with specific alterations in the placental miRNA expression profiles. Further studies are needed to verify the role of these microRNA in molecular mechanisms underlying GDM and PE pathogenesis.

■ **Keywords:** Gestational diabetes mellitus; preeclampsia; gestosis; miRNA; next-generation sequencing (NGS).

## 研究现实性

妊娠期糖尿病 (GDM) 是世界范围内严重的医学和社会问题 [1, 2]。先兆子痫是GDM常见的妊娠并发症之一, 对围产期发病率和死亡率有重要影响 [3]。GDM孕妇的代谢变化在一定程度上可能与胎盘转运和调节功能的破坏有关。这些疾病的分子遗传机制尚不清楚。许多研究已经注意到微RNA在GDM [4] 和子痫前期 [5] 发病机制中的作用。

微RNA是一类小的非编码单链RNA, 长度为21-27个核苷酸, 起翻译抑制子的作用。它们通过RNA干扰机制参与基因表达调控, 在正常和病理胚胎发生过程中发挥重要作用。

2007年, 利用实时微阵列技术和聚合酶链反应技术首次发现了人类胎盘特异性的微RNA。根据不同的作者, 在一个成熟的人胎盘中, 特定的微RNA的数量在300到600之间 [5]。2008年, Chim等人比较了胎盘组织和孕妇静脉血中157个微RNA的表达水平 [6]。鉴定出34个微RNA, 胎盘组织中的微RNA水平比产妇静脉血高出10倍以上。在进一步的研究中, 这些微RNA中有4个 (miR-141、miR-149、miR-299-5p和miR-135b) 在分娩后母血中未检测到。还注意到, 许多微RNA的水平取决于胎龄 [7]。妊娠不同阶段胎盘组织中各种微RNA模式的含量变化被认为是保

证胎盘正常发育的重要调控分子遗传机制之一。提示某些微RNA表达的定量变化可以作为妊娠期、妊娠糖尿病、慢性胎盘功能不全等重大妊娠并发症的生物标志物。因此，在妊娠16-19周时，在随后发生GDM的孕妇血液中检测到三种微RNA (mir-29a、mir-222和miR-132) 的浓度显著下降[4]。

本研究采用新一代测序方法 (NGS) 对比分析了GDM存在或不存在时子痫前期孕妇胎盘中的微RNA含量。

## 材料与方法

**群体的形成。**研究纳入了患者组：第I组—无糖代谢受损的先兆子痫孕妇 ( $n = 5$ )；第II组—GDM背景下子痫前期孕妇 ( $n = 4$ ) 和GDM无子痫前期孕妇 ( $n = 2$ )，构成第III组。收集了所有患者的详细病史；采用临床、实验室和分子遗传学研究方法。所有妇女都接受了产科和妇科检查。一位内分泌学家，治疗师为孕妇提供咨询。胎盘组织的活检样本是在Research Institute Obstetrics Gynecology and Reproduction named after D. O. Ott联邦预算科学机构 (圣彼得堡)。每位妇女都对这项研究表示知情同意。

第一组纳入了经诊断为子痫前期的孕妇，根据在全《母亲与儿童》俄罗斯妇产医师论坛上批准的妊娠分级标准 (G. Savelieva, 2005)。采用G. Savelyeva等人 (2001) 修订的Goek量表来确定妊娠中毒的严重程度。诊断时妊娠期超过20周。

妊娠期糖尿病的诊断是基于空腹静脉血糖或口服葡萄糖耐量试验。诊断依据俄罗斯国家共识《妊娠糖尿病：诊断、治疗、产后监测》[8]给出的标准。将具有子痫前期和GDM入选标准的孕妇选择为GDM背景下的子痫前期组。所有女性都是

单胎妊娠。排除标准：1型和2型糖尿病；决定有症状的糖尿病的疾病是甲状腺功能亢进、肾上腺素亢进、生长激素、嗜铬细胞瘤；严重躯体病理学；肿瘤疾病；多胞胎怀孕；妊娠20周前诊断为高血压或动脉性高血压；病人拒绝参加研究计划。纳入研究的孕妇是有计划的剖宫产分娩，没有分娩。

剖宫产术中获得的胎盘组织样本用预先冷冻的生理盐水 (0.9% NaCl, 4°C) 洗涤。然后，在视觉控制下使用Leica M125显微镜 (Leica Microsystems, Wetzlar, 德国)，从血块中选取胎盘绒毛 (~30 mg) 进行清洗。随后，为了稳定RNA，将样品放入RNAlater (Qiagen, Inc., Valencia, CA, 美国) 中，在70°C保存，直到RNA分离。

## 小RNA的分离和RNA文库的制备

使用PureLink miRNA Isolation Kit试剂盒 (Life Technologies, 美国) 按照制造商的标准协议从胎盘组织中进行微RNA提取。使用Qubit 2.0荧光计 (Invitrogen, 美国) 和RNA BR Assay Kit试剂盒 (Thermo Fisher Scientific Inc., 美国) 测定RNA浓度。使用2200 Tape Station Instrument毛细管电泳系统 (Agilent Technologies, 美国)，使用RNA ScreenTape芯片和RNA ScreenTape Sample Buffer试剂，RNA ScreenTape Ladder (Agilent Technologies, 美国) 评估RNA质量。

根据制造商的协议，使用Ion Total RNA-seq Kit v2 试剂盒 (Life Technologies, 美国) 制备微RNA文库。使用2200 TapeStation Instrument (Agilent Technologies, 美国) 测定条形码库的摩尔浓度，使用High Sensitivity D1K ScreenTape芯片和高High Sensitivity D1K Reagents试剂。

## 样品分析 Ion Torrent 基因组测序器

按照试剂试剂盒 Ion One touch 200-template kit 试剂盒 (Life Technologies, 美国) 说明书进行乳液聚合酶链反应和微球富集。

使用试剂盒和 Ion 318™ Chip 芯片进行测序。该仪器是根据 Ion Personal Genome Machine® System 说明书推出的。

## 接收的数据分析

通过比对 hg19 参考基因组 (Genome Reference Consortium GRCh37) [9] 的核苷酸序列进行数据分析。然后用 miRDeep2 评估微RNA表达水平。所得数据使用 Statistica 10.0 软件 (StatSoft Inc., 美国) 进行统计处理。错误发现率 (FDR) 采用 Benjamini 方法计算 [10]。微RNA表达水平有显著差异,  $p < 0.01$ ,  $FDR < 0.05$ 。

## 结果

子痫前期组平均妊娠年龄为  $35.0 \pm 4.7$  岁, GDM 背景下子痫前期组为  $31.0 \pm 4.24$  岁, GDM 组为  $33.5 \pm 3.5$  岁。在被研究的妇女中分娩的数量没有显著的差异。两组在年龄、种族、分娩方法和时间、新生儿体重和身高方面具有可比性 ( $p > 0.05$ )。同时, 第 I、II 组孕妇血压与 III 组比较, 差异有统计学意义 ( $p < 0.05$ )。收缩压最高指标为孕前组 ( $160.0 \pm 8.9$  毫米汞柱)。GDM 背景下子痫前期组为  $150.0 \pm 21.6$  毫米汞柱, 未发生子痫前期的 GDM 组收缩压最低 ( $117.5 \pm 10.6$  毫米汞柱)。第 I 组舒张压为  $100.0 \pm 5.5$  毫米汞柱, 第 II 组为  $93.33 \pm 5.77$  毫米汞柱, 第 III 组平均为  $77.50 \pm 10.6$  毫米汞柱。在第 I-II 组中, 明显多于第 III 组 ( $p < 0.05$ )。

蛋白尿 ( $0.6 \pm 0.4$ ;  $1.2 \pm 0.5$  和  $0$  克/公升), 有无水肿 (第 I-II 组均为孕妇, 第 III 组为 1 例孕妇)。

对于所有组的样本, 在对应微RNA基因的基因组区域绘制的读数最多。子痫前期组的微RNA 占有测序序列的 73.9%, 而 GDM 背景下子痫前期组为 72.4%, GDM 组为 70.2%。绘制到微RNA基因的计数读数使得通过微RNA 表达比较子痫前期、GDM 和子痫前期与 GDM 的胎盘样本成为可能。

子痫前期胎盘微RNA 水平与 GDM 存在程度的比较分析显示, 27 个微RNA 水平存在差异, 其中 hsa-miR-451a 的表达差异 ( $p < 0.0001$ ,  $FDR = 0.0050$ ) 具有统计学意义 (图 1)。比较分析小分子核糖核酸的水平在怀孕期间, 胎盘复杂化子痫前期和怀孕复杂化 GDM 透露 53 微RNA 水平的差异, 变化的三个水平的微RNA 是统计学意义: hsa-miR-4532 ( $p < 0.0001$ ,  $FDR = 0.0008$ ), hsa-miR-34c-5p ( $p < 0.0001$ ,  $FDR = 0.0083$ ) 和 hsa-miR-193b-5p ( $p < 0.0001$ ,  $FDR = 0.0139$ ) (图 2)。

## 讨论

增加 miR-451a 的水平在胎盘指出这项研究体育与 GDM 孕妇的存在会导致抑制 PI3K/AKT 的活动/mTOR 信号通路 [11] 和 VEGF-间接的血管生成响应中断的氧化过程在高血糖条件 [12]。VEGF 表达降低导致胎盘营养功能受损、胎盘血流量不足和普遍内皮功能障碍的发生。

胎盘中 miR-4532 含量的增加抑制 I 型胶原链 (COL1A1) 的  $\alpha$ -1 基因的表达 [13]。该基因在早期子痫前期孕妇胎盘中的表达降低, 证实 miR-4532 参与了该病的发病机制。

胎盘组织中 miR-193b 水平的升高会抑制尿激酶纤溶酶原激活物 PLAU 的翻译 [14]。同时, 妊娠期 PLAU 的降低

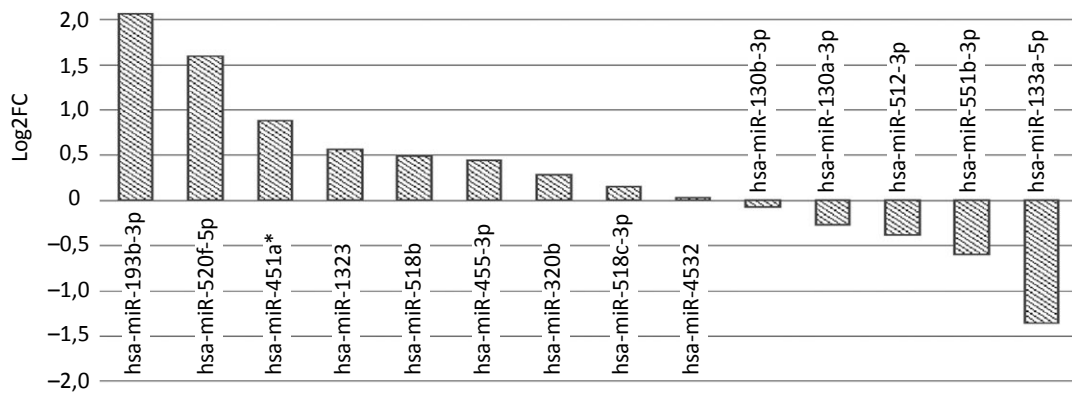


图 1。子痫前期胎盘样本中14个微RNA水平变化的多样性值取决于GDM的存在 ( $p < 0.01$ )。注: Log2FC (FC - fold change) 反映了子痫前期和GDM患者胎盘RNA含量与未发生GDM的子痫前期患者相比的多样性变化

Fig. 1. Placental miRNAs detected as differentially expressed in pregnancies complicated by PE with GDM, when compared with those in the PE ( $p < 0.01$ ). Log2FC (FC - fold change) reflects of changes in RNA content in the placenta of patients with PE and GDM compared to PE without GDM

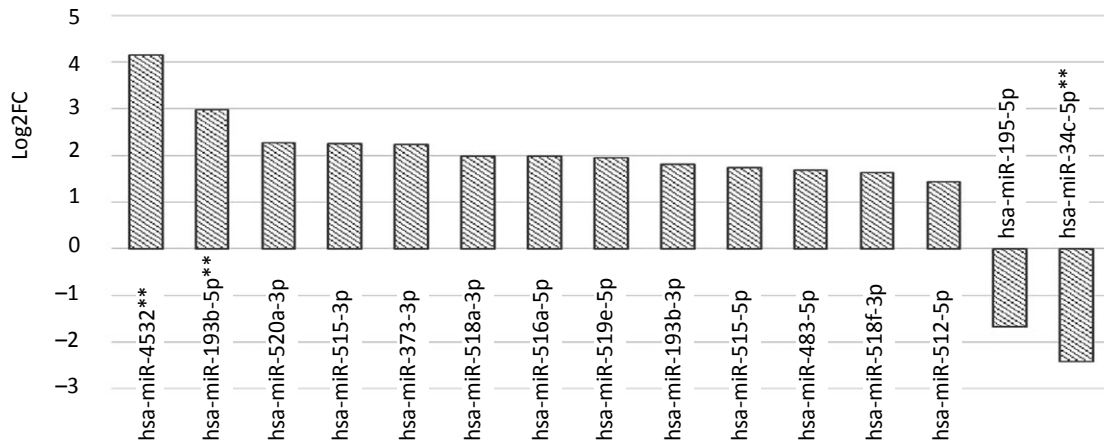


图 2。子痫前期妊娠与GDM妊娠胎盘微RNA表达差异 ( $p < 0.01$ )。注: Log2FC (FC - fold change) 反映了子痫前期与GDM患者胎盘RNA含量的变化

Fig. 2. Placental miRNAs detected as differentially expressed in pregnancies complicated by PE, when compared with those in the GDM ( $p < 0.01$ ). Log2FC (FC - fold change) reflects of changes in RNA content in the placenta of patients with PE compared to GDM

会导致纤溶过程的抑制和血液流变学特性的紊乱, 这也有助于子痫前期的发生[15, 16]。

胎盘组织中miR-34c水平的降低导致PAI1基因表达的增加[17]。导致妊娠早期滋养细胞浸润减少, 凝血增加, 导致子宫胎盘血流恶化, 纤维蛋白沉积在子宫血管和胎盘微血管中, 导致子痫前期的发生。

获得的有关妊娠并发症(如子痫前期和GDM)期间胎盘微RNA含量变化的数据,

需要使用替代的分子遗传学方法在更大样本的患者中进一步验证。

### 结论

该分析使得分离出微小RNA(miR-451a)成为可能, 其在子痫前期患者胎盘样本中的含量因GDM的不同而不同。所得数据证实了妊娠期高血糖与胎盘组织微RNA含量变化的关系。Hsa-miR-4532、

hsa-miR-34c-5p、hsa-miR-193b-5p等胎盘微RNA含量的改变可导致滋养细胞浸润受损、内皮功能障碍和高凝，这一过程是子痫前期发病机制的基础。但目前，其中部分靶基因尚不清楚，其在子痫前期和GDM发病机制中的作用尚只能推测。

在妊娠早期寻找新的生物标记物，对于及时识别妊娠高危人群发生GDM和子痫前期似乎很有希望。对这些标记物的检测将有助于采取有效的预防措施，并在出现并发症的情况下，评估疾病的进展，以纠正违规行为，改善妊娠结局。

## References

1. Петрухин В.А., Бурмукулова Ф.Ф. Гестационный сахарный диабет // Архив акушерства и гинекологии им. В.Ф. Снегирева. – 2014. – № 1. – С. 48–51. [Petrukhin VA, Burumkulova FF. Gestatsionnyi sakharnyi diabet. *Arkhiv akusherstva i ginekologii im. VF Snegireva*. 2014;1(1):48-51. (In Russ.)]
2. American Diabetes Association. Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care*. 2016;39(Suppl1):S13-S22.
3. Айламазян Э.К., Мозговая Е.В. Гестоз: теория и практика. – М.: А36 МЕДпресс-информ, 2008. [Aylamazyan EK, Mozgovaya EV. Gestoz: teoriya i praktika. Moscow: MEDpress inform; 2008. (In Russ.)]
4. Zhao C, Dong J, Jiang T, et al. Early second-trimester serum miRNA profiling predicts gestational diabetes mellitus. *Public Library of Science*. 2011;6(8):23925. doi: 10.1371/journal.pone.0023925.
5. Zhao Z, Moley KH, Gronowski AM. Diagnostic potential for miRNAs as biomarkers for pregnancy-specific diseases. *Clin Biochem*. 2013;46(10-11):953-60. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2013.01.026.
6. Chim SS, Shing TK, Hung EC, et al. Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma. *Clin Chem*. 2008;54(3):482-490. doi: 10.1373/clinchem.2007.097972.
7. Gu Y, Sun J, Groome LJ, Wang Y. Differential miRNA expression profiles between the first and third trimester human placentas. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2013;304(8):836-43. doi: 10.1152/ajpendo.00660.2012.
8. Дедов И.И., Краснопольский В.И., Сухих Г.Т. Российский национальный консенсус «Гестационный сахарный диабет: диагностика, лечение, послеродовое наблюдение» // Сахарный диабет. – 2012. – № 4. – С. 4–10. [Dedov II, Krasnopol'skii VI, Sukhikh GT. Rossiiskii natsional'nyi konsensus "Gestatsionnyi sakharnyi diabet: diagnostika, lechenie, poslerodovoe nablyudenie". *Sakharnyi diabet*. 2012;(4):4-10. (In Russ.)]
9. Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol*. 2009;10(3):R25.1-R25.10. doi: 10.1186/gb-2009-10-3-r25.
10. Benjamini Y, Drai D, Elmer G, et al. Controlling the false discovery rate in behavior genetics research. *Behav Brain Res*. 2001;125:279-284.
11. Li T, Mo X, Fu L, Xiao B, Guo J. Molecular mechanisms of long noncoding RNAs on gastric cancer. *Oncotarget*. 2016;7:8601-8612. doi: 10.18632/oncotarget.6926.
12. Madsen H, Ditzel J. Blood-oxygen transport in first trimester of diabetic pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 1984;63:317-320.
13. He P, Shao D, Ye M, Zhang G. Analysis of gene expression identifies candidate markers and pathways in pre-eclampsia. *J Obstet Gynaecol*. 2015;35(6):578-84. doi: 10.3109/01443615.2014.990430.
14. Ikeda Y, Tanji E, Makino N. MicroRNAs associated with mitogen-activated protein kinase in human pancreatic cancer. *Mol Cancer Res*. 2012;10(2):259-69. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-11-0035.
15. Buchholz T, Lohse P, Rogenhofer N, et al. Polymorphisms in the ACE and PAI-1 genes are associated with recurrent spontaneous miscarriages. *Hum Reprod*. 2003;18(11):2473-2477.
16. Lam KW, Chiu CN, Chung MK, et al. Glycodelin-A as a modulator of trophoblast invasion. *Hum Reprod*. 2009;24(9):2093-2103. doi: 10.1093/humrep/dep205.
17. Savarimuthu Francis SM, Davidson MR, Tan ME, et al. MicroRNA-34c is associated with emphysema severity and modulates SERPINE1 expression. *BMC Genomics*. 2014;15:88. doi: 10.1186/1471-2164-15-88.

## 通信作者的地址 (Information about the authors)

Vladimir S. Pakin — PhD student. FSBSI "The Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology named after D.O. Ott", Saint Petersburg, Russia. **E-mail:** pakins@list.ru.

Elena S. Vashukova — scientist. FSBSI "The Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology named after D.O. Ott", Saint Petersburg, Russia. **E-mail:** vi\_lena@list.ru.

*Roman V. Kapustin* — PhD. FSBSI “The Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology named after D.O. Ott”, Saint Petersburg, Russia. **E-mail:** kapustin.roman@gmail.com.

*Olga N. Arzhanova* — head of the Department Pathology of pregnancy, professor. FSBSI “The Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology named after D.O. Ott”, Saint Petersburg, Russia. **E-mail:** arjanova\_olga@mail.ru.

*Andrey S. Glotov* — senior researcher of the Laboratory prenatal diagnosis of hereditary and congenital diseases. FSBSI “The Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology named after D.O. Ott”, Saint Petersburg, Russia. **E-mail:** anglotov@mail.ru.

*Vladislav S. Baranov* — head of the Laboratory prenatal diagnosis of hereditary and congenital diseases, Corr. RAS, Professor. FSBSI “The Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology named after D.O. Ott”, Saint Petersburg, Russia. **E-mail:** baranov@vb2475.spb.ed.