

## 子痫前期患者血清及尿液中 miR-125a/b-5p 的表达及相关临床研究<sup>\*</sup>

甘露<sup>1a,2</sup>, 刘西玲<sup>1b</sup>, 王婷<sup>1c</sup>, 刘晓英<sup>1a</sup>, 陈丽宏<sup>1a</sup>, 魏明<sup>3</sup>, 张欣<sup>1b</sup>

(1. 陕西省人民医院 a. 妇科; b. 神经内三科; c. 西院一病区, 西安 710068;

2. 暨南大学附属第一医院妇产科, 广州 510632; 3. 西安医学院药理学教研室, 西安 710021)

**摘要:**目的 了解 miR-125a/b-5p 在子痫前期患者外周血血清、尿液中的表达, 探讨外周循环 miR-125a/b-5p 在子痫前期发病中的作用。方法 收集子痫前期患者( $n=20$ )及正常妊娠组( $n=20$ )的外周血血清及尿液, miR-125a/b-5p 的表达采用基于茎环的 qRT-PCR 检测, 同时结合临床资料进行分析。结果 血清 miR-125b-5p 在子痫前期组中的表达与正常妊娠组比较显著降低, 差异有统计学意义( $Z=-2.272, P=0.023$ ); 血清 miR-125a-5p 在两组间比较, 差异无统计学意义( $Z=-0.622, P=0.547$ ); 尿液 miR-125a/b-5p 在两组间比较, 差异均无统计学意义( $Z=-0.663, -0.189, P>0.05$ ); 在子痫前期患者中, 舒张压与尿 miR-125b-5p 存在负相关( $r=-0.513, P=0.021$ ); 正常妊娠者中, 尿素氮与血清 miR-125b-5p 呈正相关( $r=0.472, P=0.036$ ); 收缩压与尿液 miR-125b-5p, 尿液 miR-125a-5p 呈正相关( $r=0.526, 0.502, P=0.017, 0.024$ )。结论 血清 miR-125b-5p 的降低与子痫前期的发病相关。

**关键词:**子痫前期; 血清; 尿液; miR-125a/b-5p

中图分类号: R714.245; R392.11 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2017)06-032-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2017.06.009

## Expression of miR-125a/b-5p in Serum and Urine of Preeclampsia and Related Clinical Studies

GAN Lu<sup>1a,2</sup>, LIU Xi-ling<sup>1b</sup>, WANG Ting<sup>1c</sup>,

LIU Xiao-ying<sup>1a</sup>, CHEN Li-hong<sup>1a</sup>, WEI Ming<sup>3</sup>, ZHANG Xin<sup>1b</sup>

(1a. Department of Gynecology; 1b. the Third Department of Neurology; 1c. Department of Geriatrics, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068, China; 2. Department of Gynaecology and Obstetrics, the First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou 510632, China; 3. Department of Pharmacology, Xi'an Medical University, Xi'an 710021, China)

**Abstract: Objective** To detect miR-125a/b-5p expression in serum and urine of patients with preeclampsia, explore the role of miR-125a/b-5p in peripheral circulation on the pathogenesis of preeclampsia. **Methods** Samples of serum and urine of patients with preeclampsia ( $n=20$ ), and the normal pregnancy group ( $n=20$ ) were collected and the expression of miR-125a/b-5p was detected by stem-loop-based real-time fluorescence quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction. **Results** The expression of miR-125b-5p in the serum of patients with preeclampsia were significantly decreased compared with the normal pregnancy ( $Z=-2.272, P=0.023$ ). There were no statistically differences of the expression of miR-125a-5p in serum between the two groups ( $Z=-0.622, P=0.547$ ). The differences of urinary miR-125a/b-5p between patients with preeclampsia and normal pregnancy were not statistically significant ( $Z=-0.663, -0.189, P>0.05$ ). Urinary miR-125b-5p was negatively correlated with diastolic blood pressure in preeclampsia group ( $r=-0.513, P=0.021$ ). Serum miR-125b-5p was positively correlated with urea nitrogen in normal pregnancy group ( $r=0.472, P=0.036$ ). Urinary miR-125a/b-5p were positively correlated with systolic blood pressure in normal pregnancy group ( $r=0.526, 0.502, P=0.017, 0.024$ ). **Conclusion** The decrease of serum miR-125b-5p was associated with the pathogenesis of preeclampsia.

**Keywords:** preeclampsia; serum; urine; miR-125a/b-5p

microRNA(miRNA)是一类非编码单链小分子RNA, 通过与靶基因 mRNA 3' 端非翻译区(3'-UTR)的结合, 在转录后水平调控基因的表

达<sup>[1,2]</sup>。miRNAs 在血清及血浆中, 即使反复冻融及长期保存, 都能非常稳定的表达。子痫前期(preeclampsia, PE)是产科常见的并发症, 以妊娠

<sup>\*</sup> 基金项目: 陕西省自然科学基金研究计划项目(2014JQ2-8055, 2016JM8046); 陕西省卫生科研项目重点支持项目(2014A); 陕西省社会发展科技公关项目(2016SF-181)。

作者简介: 甘露(1982-), 女, 博士, 主治医师, 从事子痫前期发病机理研究, E-mail: ganlu-789@163.com。

通讯作者: 张欣, 博士, 主治医师, 从事心脑血管疾病研究, E-mail: smily23@126.com。

20周以后出现高血压、蛋白尿为主要临床表现。其发病机制目前尚不明确,该病的早期诊断方法欠缺且临床治疗效果欠佳。因此,本研究旨在检测 miR-125a/b-5p 在子痫前期(PE)患者外周循环(血清及尿液)中表达量的变化,分析其与患者临床病理特征的相关性,从而探讨外周循环 miR-125a/b-5p 在子痫前期发病中的作用。

## 1 材料与方法

1.1 研究对象 收集2015年1月~2016年1月暨南大学附属第一医院的PE患者20例及同期正常妊娠孕妇20例的外周血及尿液(经医院伦理委员会批准,取得患者的知情同意)。PE诊断标准以《妇产科学》第8版为准。上述研究对象均取分娩前外周血3ml,分离血清及收集中段尿,置-80℃保存。PE组平均年龄 $28.95 \pm 4.16$ 岁,正常妊娠组平均年龄 $30.05 \pm 4.22$ 岁,上述所有研究对象既往无高血压、糖尿病及肾炎等慢性疾病史。

1.2 试剂和仪器 Trizol LS Reagent 试剂(美国 Invitrogen 公司);氯仿、无水乙醇、异丙醇(广州化学试剂厂)和 DEPC 水(广州一科生物科技有限公司);反转录试剂盒(美国 Promega);荧光定量 PCR 试剂盒(日本 TOYOBO);ABI Prism 7500 荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)。

## 1.3 方法

1.3.1 总 RNA 的提取及质量检测:每份样本取血清 250  $\mu$ l,参照 TRIZOL LS 试剂(Invitrogen)说明书的步骤进行。总 RNA 的浓度及纯度应用紫外分光光度计测定。引物的设计与合成:根据 miRBase 数据库 miR-125a/b-5p 序列,设计特异性逆转录引物和 PCR 扩增引物(由广州锐博科技有限公司合成)。逆转录引物序列:miR-125b-5p: CTCAACTGGTGTCTGTTGGAGTCGG, CAATTC

AGTTGAGTCACAAGTT; miR-125a-5p: CTCAACTGGTGTCTGTTGGAGTCGG, CAATTCAGTTGAGTCACAGGTT; U6: AACGCTTCACGAATTGCGT。PCR 引物序列:miR-125b-5p-F: 5'-ACACTCCAGCTGGGTCCCTGAGACCCTAAC T; miR-125a-5p-F: 5'-ACACTCCAGCTGGGTCC TGAGACCCTTTAACC; miRNA-R: 5'-CTCAACTGGTGTCTGTTGGAGTCGG, CAATTCAGTTGAGTCACAGGTT; U6-F: 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA; U6-R: 5'-AACGCTTCACGAATTGCGT。

1.3.2 实时荧光定量 PCR 检测 miRNA 的表达:逆转录反应条件为 85℃ 5 min, 42℃ 60 min, 85℃ 10 min。PCR 反应条件为 95℃ 5 min, [95℃ 15 s, 60℃ 15 s, 72℃ 32s] 共 40 个循环。 $\Delta C_{t\text{sample}} = C_{t\text{sample}} - C_{tU6\text{ sample}}$ , miRNA 的相对表达水平用  $2^{-\Delta C_t}$  形式表示。每个样本重复三次。

1.4 统计学分析 用 SPSS16.0 软件进行统计学分析。符合正态分布的数据,两组间比较采用两独立样本 *t* 检验。不符合正态分布的数据,两组间比较采用秩和检验;采用 Spearman 等级相关分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 miR-125b-5p 在血清及尿液中的表达

2.1.1 miR-125b-5p 在血清中的表达:PE 患者血清中 miR-125b-5p 的表达与正常妊娠者比较显著降低,差异有统计学意义 ( $Z = -2.272$ ,  $P = 0.023$ ),见图 1。

2.1.2 miR-125b-5p 在尿液中的表达:PE 患者尿液中 miR-125b-5p 的表达与正常妊娠者比较,差异无统计学意义 ( $Z = -0.663$ ,  $P = 0.512$ ),见图 2。

### 2.2 miR-125a-5p 在血清及尿液中的表达

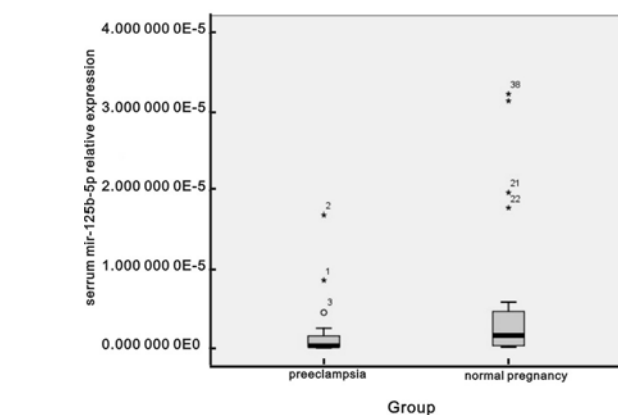


图1 血清 miR-125b-5p 在 PE 患者和正常妊娠孕妇中的表达

2.2.1 miR-125a-5p 在血清中的表达:PE 患者血清中 miR-125a-5p 的表达与正常妊娠者比较,差异无统计学意义 ( $Z = -0.622$ ,  $P = 0.547$ ),见图 3。

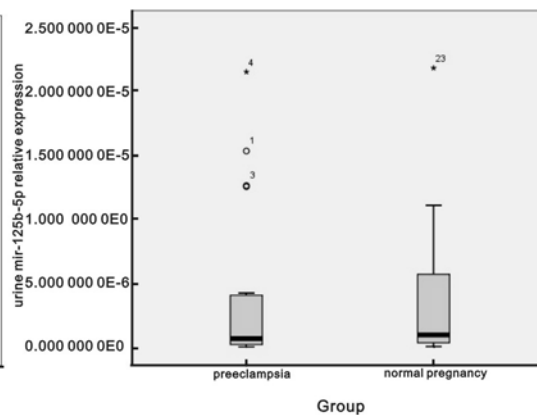


图2 尿液 miR-125b-5p 在 PE 患者和正常妊娠孕妇中的表达

2.2.2 miR-125a-5p 在尿液中的表达:PE 患者尿液中 miR-125a-5p 的表达与正常妊娠者比较,差异无统计学意义 ( $Z = -0.189$ ,  $P = 0.862$ ),见图 4。

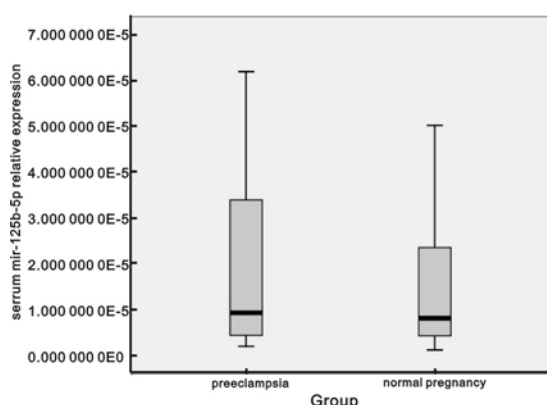


图3 血清 miR-125a-5p 在 PE 患者和正常妊娠孕妇中的表达

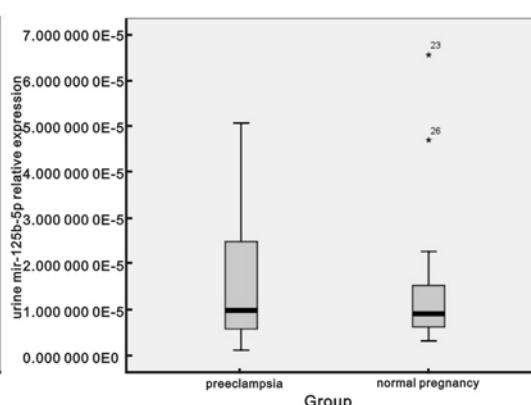


图4 尿液 miR-125a-5p 在 PE 患者和正常妊娠孕妇中的表达

## 2.3 miRNAs 与临床资料相关性比较 见表1, 表2。

表1 20例PE患者 miRNAs 与临床指标的相关系数

项 目	miR-125b-5p				miR-125a-5p			
	血 清		尿 液		血 清		尿 液	
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
收缩压	0.039	0.871	-0.236	0.317	0.031	0.898	-0.069	0.773
舒张压	-0.222	0.346	-0.513	0.021	-0.120	0.615	-0.259	0.27
肌 酐	-0.159	0.502	-0.093	0.696	0.032	0.892	0.096	0.689
尿素氮	-0.138	0.561	-0.215	0.363	-0.137	0.565	-0.137	0.565

20例PE患者及正常孕妇 Spearman 等级相关检验。在PE患者中,舒张压与尿 miR-125b-5p 存在负相关,等级相关系数  $r = -0.513$ ,  $P = 0.021$ ;正常妊娠者中,尿素氮与血清 miR-125b-5p

呈正相关,等级相关系数  $r = 0.472$ ,  $P = 0.036$ ;收缩压与尿液 miR-125a/b-5p 呈正相关,等级相关系数  $r = 0.526$ ,  $P = 0.017$  和等级相关系数  $r = 0.502$ ,  $P = 0.024$ 。

表2 20例正常孕妇 miRNAs 与临床指标的相关系数

项 目	miR-125b-5p				miR-125a-5p			
	血 清		尿 液		血 清		尿 液	
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
收缩压	-0.100	0.674	0.526	0.017	0.369	0.109	0.502	0.024
舒张压	-0.213	0.366	-0.162	0.495	-0.229	0.331	-0.146	0.538
肌 酐	-0.066	0.783	-0.334	0.150	-0.197	0.405	-0.422	0.064
尿素氮	0.472	0.036	-0.132	0.580	0.152	0.523	0.156	0.510

注:血清、尿液 miR-125b-5p, miR-125a-5p 非正态分布,采用 Spearman 等级相关检验。

3 讨论 PE 是产科常见的并发症,该病是造成孕产妇和围生儿患病和死亡的主要原因之一。在发展中国家因 PE 或子痫导致的死亡占孕产妇死亡的 15%~20%<sup>[3]</sup>。有关 miRNAs 在 PE 发病中的作用已经成为目前研究的热点,而循环 miRNA 在 PE 中的作用研究才刚刚起步,相关报道较少<sup>[4]</sup>。

miR-125a 和 miR-125b 具有相同的靶基因,它们的不同点在于它们在基因组中的定位不相同。研究证实内皮素-1 (Endothelin-1, ET-1) 是 miR-125a/b 共同的靶基因<sup>[5]</sup>。ET-1 是一种心血管活性多肽,是目前已知的最强烈的血管收缩物质之一<sup>[6]</sup>。ET-1 分布广泛,在心血管疾病中发挥重要的调控功能。血管内皮细胞是 ET-1 主要来源之

一,在一些病理状态下,如缺氧、血管紧张素、氧化低密度脂蛋白刺激等,ET-1 的表达显著增加。研究发现,氧化低密度脂蛋白可以使血管内皮细胞 miR-125b-5p 下调,而 ET-1 显著增加,在内皮细胞中过表达 miR-125b-5p,氧化低密度脂蛋白诱导血管内皮细胞 ET-1 表达升高效应被显著减弱<sup>[5]</sup>。

研究证实 miR-125b 可以靶向调控 TNFAIP3 的表达<sup>[7]</sup>。炎症刺激主动脉内皮细胞 miR-125b 显著降低<sup>[8]</sup>。同时 miR-125b-5p 是细胞死亡的调节因子,它能减弱小鼠和人类肝细胞中对乙酰氨基酚诱导的急性肝损伤<sup>[9]</sup>。我们的前期研究发现,采用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 干预脐静脉血管内皮细胞,细胞内 miR-125b-5p 水平降低,通过靶基因 (下转 38 页)

(上接 34 预测软件,发现 Smad4 是 miR-125b-5p 的靶基因,检测细胞内 Smad4 蛋白表达增加,结果提示 miR-125b-5p 可能通过调控 Smad4 对氧化应激血管内皮细胞起重要作用<sup>[10]</sup>。本研究发现 miR-125a-5p 在 PE 患者和正常妊娠者的血清和尿液中无统计学差异,但 miR-125b-5p 在 PE 患者血清中显著低于正常妊娠者。miR-125b-5p 降低,可能意味着它的负调控靶基因 ET-1 和 TNF- $\alpha$  的增高。由于 TNF- $\alpha$  对血管内皮细胞的损伤作用及 ET-1 对于血压调控的重要功能以及高血压等疾病中的重要作用,我们推测 miR-125b-5p 也参与了 PE 血管内皮细胞的损伤过程。而最新的一项研究发现 miR-125b 在 PE 患者胎盘组织中显著降低,miR-125b 的过表达显著降低 SGPL1 表达,同时荧光素酶化验证实 SGPL1 是 miR-125b 的靶基因,提示 miR-125b 可能在 PE 中起重要作用<sup>[11]</sup>。通过与临床资料分析,正常妊娠者中,血清 miR-125b-5p 与尿素氮呈正相关,尿液 miR-125a/b-5p 与收缩压呈正相关,但 PE 患者中却没有这种相关性,说明 miR-125a/b-5p 可能参与了 PE 的发病过程,具体机制有待进一步研究。

大量流行病学研究发现,PE 患者未来发生高血压、冠心病等心血管疾病的几率显著增加<sup>[12~14]</sup>,miR-125b-5p 是否能作为 PE 患者未来罹患高血压及冠心病的预测指标,有待进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] Meijer HA, Kong YW, Lu WT, et al. Translational repression and eIF4A2 activity are critical for microRNA-mediated gene regulation[J]. Science, 2013, 340(6128):82-85.
- [2] 贾亚旭,王成,张春妮.血清 miR-193a-3p,miR-377-5p 和 miR-483-5p 在食管鳞状细胞癌诊断和预后中的应用[J].现代检验医学杂志,2017,32(2):5-9.  
Jia YX, Wang C, Zhang CN. Application of serum miR-193a-3p, miR-377-5p and miR-483-5p in the diagnosis and prognosis of esophageal squamous cell carcinoma[J]. J Mod Lab Med, 2017, 32(2):5-9.
- [3] Wu L, Zhou H, Lin H, et al. Circulating microRNAs are elevated in plasma from severe preeclamptic pregnancies[J]. Reproduction, 2012, 143(3):389-397.
- [4] Munaut C, Tebache L, Blacher S, et al. Dysregulated circulating miRNAs in preeclampsia[J]. Biomed Rep, 2016, 5(6):686-692.
- [5] Li D, Yang P, Xiong Q, et al. MicroRNA-125a/b-5p inhibits endothelin-1 expression in vascular endothelial cells[J]. J Hypertens, 2010, 28(8):1646-1654.
- [6] Yang Q, Lu J, Wang S, et al. Application of next-generation sequencing technology to profile the circulating microRNAs in the serum of preeclampsia versus normal pregnant women[J]. Clin Chim Acta, 2011, 412(23/24):2167-2173.
- [7] Haemmig S, Baumgartner U, Glück A, et al. miR-125b controls apoptosis and temozolomide resistance by targeting TNFAIP3 and NKIRAS2 in glioblastomas[J]. Cell Death Dis, 2014, 5(6):e1279.
- [8] Rippe C, Blimline M, Magerko KA, et al. MicroRNA changes in human arterial endothelial cells with senescence; relation to apoptosis, eNOS and inflammation[J]. Exp Gerontol, 2012, 47(1):45-51.
- [9] Yang D, Yuan Q, Balakrishnan A, et al. MicroRNA-125b-5p mimic inhibits acute liver failure[J]. Nat Commun, 2016(7):11916.
- [10] 魏明,甘露,杨晓梅,等.过氧化氢处理的脐静脉血管内皮细胞 miR-125b-5p 水平降低但 Smad4 表达增加[J].细胞与分子免疫学杂志,2016,32(8):1088-1093.  
Wei M, Gan L, Yang XM, et al. The down-regulation of miR-125b-5p and up-regulation of Smad4 expression in human umbilical vein endothelial cells treated with hydrogen peroxide[J]. Chin J Cell Mol Immunol, 2016, 32(8):1088-1093.
- [11] Yang WW, Wang AN, Zhao CL, et al. miR-125b enhances IL-8 production in early-onset severe preeclampsia by targeting sphingosine-1-phosphate lyase 1[J]. PLoS One, 2016, 11(12):e0166940.
- [12] Skjaerven R, Wilcox AJ, Klungsoyr K, et al. Cardiovascular mortality after pre-eclampsia in one child mothers: prospective, population based cohort study[J]. BMJ, 2012(345):e7677.
- [13] Chen CW, Jaffe IZ, Karumanchi SA. Pre-eclampsia and cardiovascular disease[J]. Cardiovasc Res, 2014, 101(4):579-586.
- [14] Johnson MP, Brennecke SP, East CE, et al. Genetic dissection of the pre-eclampsia susceptibility locus on chromosome 2q22 reveals shared novel risk factors for cardiovascular disease[J]. Mol Hum Reprod, 2013, 19(7):423-437.

收稿日期:2017-06-12

修回日期:2017-07-11