

基于 RNA-seq 技术对重度子痫前期孕妇胎盘组织差异性表达 circRNA 的研究

周芝熠^{1, 2} 李晓娟¹ 蒋国庆¹ 钱源^{3, 4, 5}

摘要 研究环状 RNA 在重度子痫前期患者胎盘组织与正常胎盘组织中表达的差异性。选取重度子痫前期(sPE)患者、正常妊娠孕妇的胎盘组织各 3 例,应用高通量测序技术检测两组样本中环状 RNA 的表达情况,使用 miRanda 软件对筛选出的环状 RNA 进行 miRNA 靶基因预测。有 3 007 个环状 RNA 在实验组与对照组中均有表达,其中差异表达的环状 RNA 共有 89 个,包含 44 个上调基因和 45 个下调基因。多数筛选出的差异表达环状 RNA 具有 has-let-7、miR-100、miR-101、miR-103 家族成员的结合位点。研究表明胎盘组织中环状 RNA 的表达失调可能参与了 sPE 的发生发展过程。

关键词 环状 RNA; 高通量测序技术; 重度子痫前期; 胎盘; 差异表达

中图分类号 R-331; R 714. 259

文献标志码 A 文章编号 1000 - 1492(2020) 05 - 0804 - 04
doi: 10. 19405/j. cnki. issn1000 - 1492. 2020. 05. 030

子痫前期(preeclampsia, PE) 是以新发高血压、蛋白尿为主要临床表现、全身小动脉痉挛为主要病理特点的妊娠期特有疾病,可导致母婴死亡率和发病率增加,其发病机制尚未完全明确,已有的研究^[1]表明是多种因素共同作用的结果。其中,胎盘异常在 PE 发病机制中起重要作用这一观点已被普遍接受。胎盘具有物质合成、交换、代谢以及防御功能,在维持妊娠过程发挥着重要作用。当胎盘功能出现异常时,如螺旋动脉血管重铸不足引起的胎盘“浅着床”;或胎盘源性生物物质分泌调节异常,引起新陈代谢、炎症反应、血管生成的调控失调等,都可促使 PE 的发生^[2]。

环状 RNA(circRNA) 是一种特殊类型的非编码 RNA,广泛存在于生物体。不同于传统的线性 RNA, circRNA 来源于“反向剪接”过程,形成了既不具有极性也不具有多聚腺苷酸尾的从 5 到 3 端的共价闭环结构^[3],这使得它比线性 RNA 更稳定。circRNA 在不同个体具有高度的组织特异性、细胞特异性,并有稳定的表达水平。此外,除少数 circRNA 外,其中大多数在物种之间具有高度保守的序列^[4]。这些特征使 circRNA 的异常表达有潜在的介导某些特殊疾病发生的可能性。circRNA 可能通过以下 5 种方式发挥其生物学功能: miRNA 海绵、作为翻译模板、调控基因转录、与 RNA 结合蛋白作用、整合蛋白质^[4-5]。circRNA 与人类多种疾病的发病机制有密切关系,但有关 circRNA 对 PE 作用的研究较少。因此,该研究检测了 sPE 胎盘 circRNA 的表达水平并预测了这些 circRNA 的靶 miRNA,想由此提供一种新的研究 PE 发病机制和检测手段的途径。

1 材料与方法

1.1 病例资料 本研究纳入的 6 例胎盘组织来自于昆明医科大学第一附属医院分娩的单胎初产妇,其中 sPE 患者 3 例(实验组);正常妊娠妇女 3 例(对照组)。sPE 组纳入标准:符合 sPE 诊断标准:sPE 定义为轻度 PE 和一个或多个以下其他不良特征的综合:①收缩压 $\geq 21. 33$ kPa 和(或)舒张压 $\geq 14. 67$ kPa; ②蛋白尿 ≥ 5 g/24 h 或随机蛋白尿(卅); ③其他临床上的妊娠综合征(包括脑神经症状、乳酸脱氢酶 > 600 IU/U,天冬氨酸转氨酶或丙氨酸转氨酶 > 70 IU/U,血小板数量 $< 100 \times 10^9$ 个细胞/L 等)。对照组纳入标准:符合正常妊娠诊断标准:①妊娠经过顺利; ②血压 $< 18. 67/12$ kPa; ③无蛋白尿。排除标准:排除合并心血管疾病、肝肾疾病、糖尿病、急慢性感染性疾病及胎儿染色体异常或发育畸形等妊娠合并症病史。每位患者被告知胎盘用途,并签署知情同意。

1.2 方法

2019 - 11 - 13 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81760273); 云南省应用基础研究计划面上项目(编号: 2017FB107)

作者单位:¹ 昆明医科大学第一附属医院产科,昆明 650032

² 四川大学华西广安医院,广安 638500

³ 云南省检验医学重点实验室,昆明 650032

⁴ 云南省内设研究机构实验诊断研究所,昆明 650032

⁵ 昆明医科大学第一附属医院医学检验科,昆明 650032

作者简介:周芝熠,女,硕士研究生;

钱源,女,博士,副主任技师,硕士生导师,责任作者,E-mail: 549978781@qq. com

1.2.1 标本采集 顺产胎盘娩出后,在胎盘母体面和胎儿面无钙化区和出血点的部位采集数块面积约 $1\text{ cm} \times 1\text{ cm} \times 1\text{ cm}$ 的胎盘组织,并在生理盐水中反复漂洗去除血污,干纱布吸除水分后加入 RNA later $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的冰箱保存,准备进行组织中的 RNA 提取。

1.2.2 circRNA-seq 检测 按 TRIzol 说明书提取胎盘组织总 RNA。采用 RNA 完整性和纯度检测合格的 RNA,通过去除 rRNA,合成双链 DNA,末端修复、连接测序接头,片段选择、降解第二链 cDNA,PCR 富集、文库质检等过程,再对富集的 cDNA 进行高通量测序。对测序质量合格的 circRNA 进行鉴定,将测序序列数目 (read count) ≥ 2 的候选 circRNA 作为鉴定的 circRNA。接着对候选 circRNA 进行差异表达分析, circRNA 差异表达的输入数据为 circRNA 表达水平分析中得到的 readcount 数据。从差异倍数和校正后的显著水平两个水平进行评估,对差异 circRNA 进行筛选。

1.2.3 靶基因预测 利用 miRanda 软件对筛选获得的差异性 circRNA 进行下游 miRNA 预测。

1.3 统计学处理 采用 Illumina Casava 1.8 版本测序平台对原始数据进行测序,使用 find_circ 软件鉴定 circRNA 和 TPM 进行表达量归一化处理,用 DEGseq 进行 circRNA 差异分析。差异 circRNA 筛选默认筛选条件为: $q\text{value} < 0.01$ && $|\log_2(\text{fold-change})| > 1$ 。

2 结果

2.1 circRNA 在子痫前期患者胎盘中的表达情况

共检测出 12 000 个 circRNA,其中有 3 007 个在对照组和实验组中均有表达(图 1)。比较这 3 007 个 circRNA,发现 89 个差异性表达的 circRNA,其中上调的 circRNA 有 44 个,下调的 circRNA 有 45 个(图 2)。上调和下调的 circRNA 差异倍数在 5 倍以上的

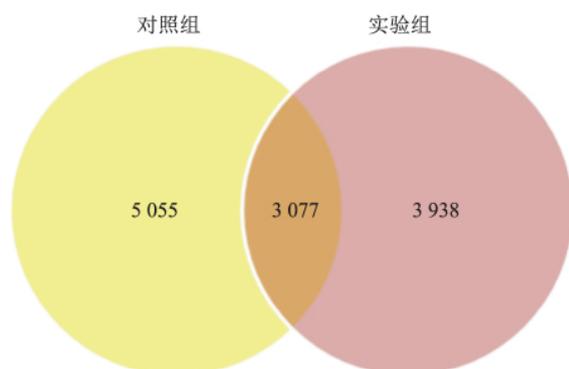


图 1 circRNA 的维恩图

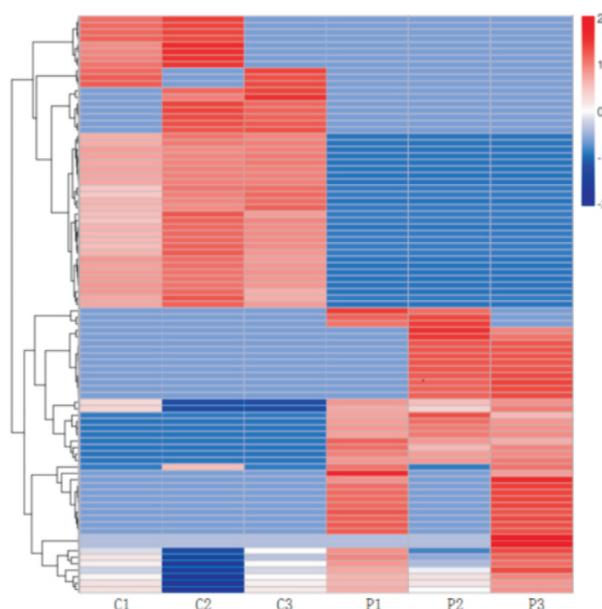


图 2 差异性表达 circRNA 聚类图

红色代表上调基因;蓝色代表下调基因;C: 对照组;P: 实验组

分别为 4 个、10 个。表 1 列出了上调和下调倍数最明显的十个基因的基本信息。

表 1 上调/下调倍数前十的差异性表达 circRNA

基因名	实验组	对照组	log ₂ Fold Change	pval
	readcount	readcount		
hsa_circ_0004383	1 154.530 000	0	10.772	7.77E - 12
hsa_circ_0004366	34.363 100	0	6.439 1	0.000 459
hsa_circ_0004449	9.756 834	0	5.117 3	0.007 974
hsa_circ_0004692	8.510 636	0	5.034	0.009 055
hsa_circ_0009370	7.798 573	0	4.949 6	0.010 514
hsa_circ_0001741	7.196 243	0	4.854	0.012 510
hsa_circ_0004376	7.018 374	0	4.796 9	0.013 922
hsa_circ_0004447	104.349 500	0	4.780 3	0.020 453
hsa_circ_0005168	190.133 500	0	4.750 9	0.021 561
hsa_circ_0009433	6.398 984	0	4.703 6	0.016 292
hsa_circ_0005094	0	29.295 610	-6.041 6	0.001 194
hsa_circ_0004860	0	17.446 890	-5.892 2	0.001 202
hsa_circ_0001775	0	13.128 410	-5.562 5	0.002 607
hsa_circ_0000645	0	10.198 050	-5.276 5	0.004 827
hsa_circ_0005093	0	13.192 010	-5.274 4	0.005 730
hsa_circ_0004912	0	9.993 283	-5.257 1	0.005 011
hsa_circ_0010079	0	12.418 540	-5.218 4	0.006 360
hsa_circ_0000294	0	9.484 965	-5.195 7	0.005 689
hsa_circ_0008810	0	11.340 480	-5.126 5	0.007 558
hsa_circ_0009801	0	8.375 546	-5.044 8	0.007 726

2.2 circRNA 靶基因预测结果

在筛选出的 89 个 circRNA 中,发现有 75 个 circRNA 具有 has-let-7 家族成员的结合位点,与 miR-100、miR-101、miR-103 家族成员有结合位点的 circRNA 个数分别是 49、53

和 65 个。与这 4 种 miRNA 均有合位点的 circRNA 有 40 个。其中,hsa_circ_0004383、hsa_circ_0000294、hsa_circ_0000645、hsa_circ_0010783、hsa_circ_0011179、hsa_circ_0011828、hsa_circ_0011962 这七个差异性表达在 5 倍以上的 circRNA 与这四种 miRNA 皆有结合位点(图 3)。

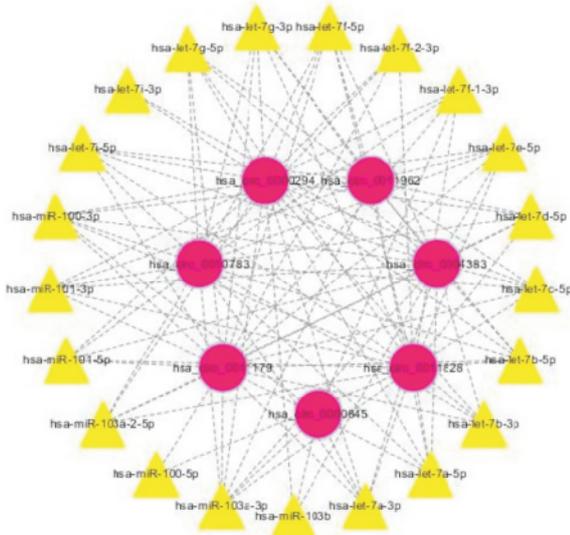


图 3 差异性表达在 5 倍以上的 circRNA 与其靶 miRNA 的网络图
红色(圆形) : circRNA; 黄色(三角形) : miRNA

3 讨论

PE 是孕产妇常见的特有疾病,严重威胁母婴健康,目前缺乏精准的检测标准,因此,深入研究 PE 的发病机制,找到能够实现早期诊断及有效治疗的分子靶标有着重要意义。CircRNA 的报道^[4]从 1990 年代初开始,由于技术水平的制约,近几年才成为研究热点。CircRNA 可通过多种方式发挥其生物学功能,而了解较全面的是其能够作为 miRNA 海绵竞争内源性 RNA,从而参与疾病的发病机制中。有研究小组提出并验证了心脏相关的 circRNA 可作为内源性 miR-223 海绵来抑制 miR-223 活性,促进心肌细胞肥大与凋亡,或作为 miR-7a 海绵,通过降低 miR-7a 的活性和提高 miR-7a 靶标的表达来促进心肌梗死的发展,从而参与心血管疾病的发生^[5-6]。Wang et al^[7]发现 circRNA 可抑制 miR-7 导致其不能诱导任何胰腺 β 细胞增殖,从而引起糖尿病发生。此外,circRNA 还与肿瘤、神经系统疾病、肝炎等疾病的发生有关^[8]。

然而,有关 circRNA 在妇产科疾病中的作用研究甚少。此次研究分析了 circRNA 在 PE 患者和正常妊娠妇女胎盘组织中的表达水平,发现 44 个 circRNA 在实验组中高表达,45 个 circRNA 低表达。这 89 个 circRNA 中有 75 个 circRNA 与 has-let-7 家族成员有结合位点,且大多数还可以和 miR-100 或 miR-101、miR-103 家族成员结合。

Let-7 是一种低氧反应型 miRNA,在缺氧条件下,let-7 的表达增加,通过相关的调控通路,调节机体的适应能力,维持机体正常的生理状态。Let-7 与内皮细胞的很多生物学过程密切相关,如促进炎症反应发生、抑制细胞免疫应答,增强内皮通透性影响血管形成,参与细胞增殖与凋亡、调节脂质代谢^[9],还可通过调控 III 型转化生长因子-β 受体 3 来影响细胞的迁移和侵袭能力^[10]。Let-7 在 PE 患者胎盘中高表达,上调的 Let-7 可以通过靶向调控 ephrin-B2/Eph 受体 B4 系统影响滋养细胞侵袭过程,从而加速 PE 进程^[11],说明 let-7 家族成员在 PE 中的异常表达可能与 PE 的病理过程存在一定相关性。

有研究^[12-13]显示 miR-100、miR-101、miR-103 在 PE 患者胎盘组织中表达水平低于正常妊娠妇女。MiR-100 被认为是一种新型上皮-间质转化诱导物,可诱导上皮-间质转化过程,但它又能抑制肿瘤发生、迁移和侵袭。如 miR-100 通过靶向 HOXA1 抑制乳腺癌细胞迁移和侵袭^[14]。MiR-100-5p 可以通过环氧化酶 2 抑制血管生成^[15]。此外,Cao et al^[16]发现 miR-100 可通过靶向 CXCR7 抑制癌细胞增殖。PE 过程中伴随着胎盘滋养细胞凋亡数的增加,有研究表明干扰 miR-101 表达后凋亡细胞数量显著增加。进一步实验发现 miR-101 在内质网应激期间参与调节一些凋亡蛋白,通过在 PE 中靶向内质网蛋白 44 来调节滋养层 HTR-8 / SVneo 细胞的凋亡过程^[13]。MiR-103 是一种原癌基因,过表达的 miR-103a 通过下调 p57 来激活 mTOR 通路,进而促进细胞的增殖、迁移、侵袭并抑制凋亡^[17]。

因此,circRNA 可能通过与 let-7、miR-100、miR-101 以及 miR-103 结合,抑制其生物学功能,从而参与到 PE 的发病机制中。但是,circRNA 如何通过调控 miRNA 来影响 PE 的发生发展,其具体机制还有待进一步的研究。当然,此次研究也存在很多不足之处。① 实验样本量过少,代表性不够,后续研究还需扩大样本量来加以论证;② 样本来自同一地

区,可能有地域性差异。

综上所述,胎盘组织 circRNA 表达的失调可能与 PE 发病和病理生理过程有关。本研究为深入了解 PE 的发病机理提供了新的线索,并为改善 PE 的预防与诊疗水平提供了理论与实验依据。

参考文献

- [1] El-Sayed A A F. Preeclampsia: a review of the pathogenesis and possible management strategies based on its pathophysiological derangements[J]. *Taiwan J Obstet Gynecol* 2017, 56(5): 593–8.
- [2] 孙雯, 陈敦金. 胎盘功能与子痫前期的研究进展[J]. 2013, 2(1): 51–4.
- [3] Abu N, Jamal R. Circular RNAs as promising biomarker: a mini-review[J]. *Front Physiol* 2016, 7: 355.
- [4] Cortés-López M, Miura P. Emerging functions of circular RNAs[J]. *Yale J Biol Med* 2016, 89(4): 527–37.
- [5] Fan X, Weng X, Zhao Y, et al. Circular RNAs in cardiovascular disease: an overview[J]. *Biomed Res Int* 2017, 2017: 5135781.
- [6] Wang K, Long B, Liu F, et al. A circular RNA protects the heart from pathological hypertrophy and heart failure by targeting miR-223[J]. *Eur Heart J*, 2016, 37(33): 2602–11.
- [7] Wang Y, Liu J, Liu C. MicroRNA-7 regulates the mTOR pathway and proliferation in adult pancreatic β -cells[J]. *Diabetes* 2013, 62(3): 887–95.
- [8] 付丽云, 胡耀仁, 郭俊明. 环状 RNA 与人类疾病[J]. *中国生物化学与分子生物学报* 2015, 31(8): 771–8.
- [9] 胡迎晗. let-7e 影响内皮细胞功能的网络调控分析[D]. 济南: 山东大学 2016.
- [10] Zuckerwise L, Li J, Lu L, et al. H19 long noncoding RNA alters trophoblast cell migration and invasion by regulating T β R3 in placenta with fetal growth restriction[J]. *Oncotarget* 2016, 7(25): 38398–407.
- [11] Chen D B, Wang W. Human placental microRNAs and preeclampsia[J]. *Biol Reprod* 2013, 88(5): 130.
- [12] Hromadnikova I, Kotlabova K, Hympanova L, et al. Gestational hypertension, preeclampsia and intrauterine growth restriction induce dysregulation of cardiovascular and cerebrovascular disease associated microRNAs in maternal whole peripheral blood[J]. *Thromb Res* 2016, 137: 126–40.
- [13] Zou Y, Jiang Z, Yu X, et al. MiR-101 regulates apoptosis of trophoblast HTR-8 SVneo cells by targeting endoplasmic reticulum (ER) protein 44 during preeclampsia[J]. *J Hum Hypertens*, 2014, 28(10): 610–6.
- [14] Chen D, Sun Y, Yuan Y, et al. MiR-100 induces epithelial-mesenchymal transition but suppresses tumorigenesis, migration and invasion[J]. *PLoS Genet* 2014, 10(2): e1004177.
- [15] Liu Y, Li H, Zhao C, et al. MicroRNA-101 inhibits angiogenesis via COX-2 in endometrial carcinoma[J]. *Mol Cell Biochem*, 2018, 448(1–2): 61–9.
- [16] Cao Y, Song J, Ge J, et al. MicroRNA-100 suppresses human gastric cancer cell proliferation by targeting CXCR7[J]. *Oncol Lett* 2018, 15(1): 453–8.
- [17] Wang X, Lin Y, Peng L, et al. MicroRNA-103 promotes proliferation and inhibits apoptosis in spinal osteosarcoma cells by targeting p57[J]. *Oncol Res* 2018, 26(6): 933–40.

Analysis of differently expressed circRNA in placental tissue of severe preeclampsia by RNA sequencing

Zhou Zhiyi^{1,2}, Li Xiaojuan¹, Jiang Guoqing¹, et al

(¹Dept of Obstetrics, The First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650032;

²West China-Guang'an Hospital, Sichuan University, Guang'an 638500)

Abstract To investigate the expression difference of circRNA in placentas between normal pregnant women and patients with severe preeclampsia (sPE). Placental tissues were obtained from three pregnant women with sPE and three normal pregnant women. The expression of circRNA in the two groups was detected by RNA-seq technique analysis. The miRNA targets of circRNAs were predicted using miRanda software. There were 3 007 circRNAs expressed in both the experimental group and the control group. Among them, 89 circRNAs were differentially expressed, including 44 up-regulated genes and 45 down-regulated genes. Most of these differentially expressed circRNAs had binding sites for has-let-7, miR-100, miR-101, and miR-103 family members. The results indicate that these dys-regulation of circRNA in placental tissue may be involved in the pathogenesis and pathophysiology of sPE.

Key words circRNA; RNA-seq; severe preeclampsia; placenta; differential expression