

# 唐氏综合征胎儿羊水外泌体与胎盘差异 miRNA 的联合分析

张亚勤<sup>1</sup>, 马忠蕊<sup>2</sup>, 钱源<sup>3</sup>, 李俊君<sup>4</sup>, 邓兴力<sup>4</sup><sup>1</sup> 普洱市人民医院生殖遗传中心, 普洱 665000; <sup>2</sup> 昆明医科大学第一附属医院产科, 昆明 650032;<sup>3</sup> 云南大学附属医院精准诊疗中心, 昆明 650021; <sup>4</sup> 昆明医科大学第一附属医院神经内科, 昆明 650032)

**摘要** 目的 分析唐氏综合征(DS)胎儿羊水外泌体 miRNA 差异表达谱,为寻找新的 DS 产前诊断标志物提供依据。方法 收集 DS 胎儿和染色体正常胎儿羊水,分别提取羊水外泌体进行高通量测序。筛选出差异表达 miRNA,使用 Targetscan、miRanda 进行靶基因预测,筛选出定位在 21 号染色体上的靶基因,用 GeneCards、HGNC、NCBI Gene、UniProtKB/Swiss-Prot、Ensembl、OMIM 等数据库查询靶基因相关的生物学功能及相关疾病等。对富集基因的生物学功能进行 GO、KEGG 分析。结果 共检出 59 个差异表达的 miRNA,其中 31 个上调,28 个下调。以  $P < 0.05$  为条件对测序结果进行筛选,在变化倍数大于 2 的差异 miRNA 中,根据表达丰度从高到低分别筛选出 10 个上调 miRNA,9 个下调 miRNA。hsa-let-7b-5p、hsa-let-7c-5p、hsa-let-7b-3p\_1ss22CT 和 hsa-miR-199b-5p 是其中的焦点 miRNA, *BACH1* 和 *IFNARI* 是它们的交集靶基因。GO 分析发现,富集的靶基因主要功能与蛋白质结合、金属离子结合、转移酶活性、DNA 结合、RNA 聚合酶 II 对转录调控、核苷酸结合等相关。KEGG 富集分析结果表明,靶基因主要参与的信号通路包括代谢通路、肿瘤相关通路、PI3K-Akt 信号通路、Rap1 信号通路等。结论 DS 胎儿羊水外泌体 miRNA 表达与正常核型胎儿存在差异。联合 DS 胎盘 miRNA 分析,发现 hsa-miR-199b-5p 是 DS 羊水与胎盘共同存在的差异 miRNA。推测 hsa-miR-199b-5p 与 hsa-let-7b-5p、hsa-let-7c-5p、hsa-let-7b-3p\_1ss22CT 共同的靶基因 *BACH1* 和 *IFNARI* 可能参与了 DS 的病理过程。

**关键词** 唐氏综合征;miRNA;测序;羊水;胎盘

**中图分类号** R 714.5

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2025)06-1140-09

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.06.024

唐氏综合征(Down syndrome, DS)是由 21 号染色体三体导致的常染色体非整倍体疾病,表现为智力障碍、生活能力低下、特殊面容和多种先天畸形,涉及肌肉骨骼、神经及心血管等多个系统<sup>[1]</sup>。此外,DS 患者常伴严重的免疫失调,自身免疫和感染频率也较高<sup>[2]</sup>,其发病机制尚未完全阐明。由于 DS 缺少有效的治疗手段,主要采取产前筛查和诊断的方式来进行预防。目前临床上仍以羊水细胞染色体核型为产前诊断的主要依据,同时也在不断探索应用新的产前技术,如 CNV-seq、CMA、FISH 等<sup>[3]</sup>。核型分析是传统的产前诊断方法,可检测显著的核型

数目和结构异常,但无法检出小于 5 Mb 的结构异常,且存在技术门槛高、周期长的不足。新技术如 CNV-seq、CMA、FISH 等在检测微小片段异常、精准定位方面具有优势,但各有其局限性,需多种技术联合应用以提高诊断准确性,但也增加了成本。

miRNA 是一类由 17~25 个核苷酸组成的非编码 RNA,参与调控几乎所有细胞过程<sup>[4]</sup>。已有研究关注 DS 中 miRNA 的表达,但多集中于单一类型样本,结果差异较大,不利于统一结论。课题组前期进行了 DS 胎盘差异 miRNA 的表达谱分析<sup>[5]</sup>,该研究将联合分析 DS 羊水与胎盘中的 miRNA 表达差异,明确 miRNA 在胎盘和羊水中存在的异同,以探讨其作为产前诊断标志物的潜力。

## 1 材料与方法

**1.1 病例资料** 收集同期在普洱市人民医院生殖遗传中心经产前诊断确诊的孕妇 7 例,其中 4 例为 DS 胎儿,纳入 DS 组;3 例为染色体核型正常胎儿,纳入对照组。纳入标准:单胎妊娠,孕周(17~22 周),孕妇无其他身体疾病,无遗传病家族史。排除标准:不良妊娠史;辅助生殖手段受孕;双胎妊娠;孕

2025-04-14 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:82360261);昆明医科大学生物资源数字化开发应用(2022 年度)项目(编号:202002AA100007);云南省“兴滇英才支持计划”青年拔尖人才专项(编号:KYQY20210816);云南省生殖妇产疾病临床医学中心开放课题(编号:2022LCZXXK-SZ14)

作者简介:张亚勤,女,硕士,主治医师;

钱源,女,主任技师,博士,博士生导师,通信作者, E-mail: yuanqian2x@hotmail.com;

邓兴力,男,主任医师,博士,博士生导师,通信作者, E-mail: kmmudxl@126.com

妇有肿瘤、糖尿病、心血管疾病、遗传病家族史等。本研究通过医院伦理委员会审批(批号:2023-011-01)。孕妇均被提供遗传咨询并签署知情同意书。

**1.2 羊水核型检测分析** B超引导下,经羊膜腔穿刺术,抽取羊水约20 ml,经1 000 r/min离心10 min后,收集上清液,将沉淀用羊水培养基重悬后转移至培养瓶中,置37 ℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱培养9~10 d。向培养瓶中加入100 mg/L的秋水仙素150 μl,作用15 min之后收集上清液,用生理盐水清洗培养瓶2遍,加入0.25%的EDTA胰酶消化贴壁细胞2 min后,加入上清液中止消化并收集细胞悬液。经1 000 r/min离心10 min后,弃上清液,用0.075 mol/L浓度的KCl溶液重悬羊水细胞进行低渗7 min。将离心后的细胞沉淀用新鲜的卡诺固定液(甲醇:冰乙酸=3:1)固定2次。然后将收获的细胞悬液制片,在80 ℃的鼓风干燥箱中老化3 h,最后用GTG显带法对中期染色体进行吉姆萨染色。染色后的玻片在显微镜下进行扫描后分析核型,每例样本至少计数30个分裂相,至少分析7个完整核型。

**1.3 样本收集与处理** 羊膜腔穿刺术取得羊水后,在1 h内经1 000 r/min离心10 min后,收集约15 ml上清液,冻存于-80 ℃冰箱进行保存。

**1.4 羊水外泌体分离及鉴定** 从-80 ℃冰箱取出冻存的羊水上清液(约15 ml),放入4 ℃冰箱解冻。将解冻的羊水上清液放入离心管中,配平后5 000 r/min,4 ℃离心10 min,取上清液转移至新的15 ml离心管中;将收集的上清液配平后13 000 r/min,4 ℃离心10 min,取上清液转移至超速离心机配套的离心管中;配平超离管中的上清液后30 000 r/min,4 ℃离心30 min,取上清液转移至超速离心机配套的超离管中;配平超离管中的上清液后95 000 r/min,4 ℃离心70 min,取透明沉淀,并用200 μl的PBS重悬;所得即为外泌体溶液;按实验检测的要求分装后-80 ℃冰箱保存。

将提取的外泌体样本从-80 ℃冰箱取出后置于冰盒中,溶解后稍离心,使用移液枪吸取15 μl的外泌体样本于铜网上静置1 min。使用滤纸将铜网上的外泌体样本吸干,然后使用移液枪吸取15 μl的2%醋酸双氧铀染色液室温染色1 min。使用滤纸将铜网上的外泌体样本吸干,将染色完成的样本放于灯下烤10 min,观察拍照,保存图片。

对外泌体进行纳米流式荧光分析检测。取适量外泌体稀释至90 μl,取30 μl稀释外泌体分别加入20 μl荧光标记的抗体(IgG、CD9、CD81),混匀后避

光37 ℃孵育30 min,加入1 ml预冷的PBS,选择超速转子于4 ℃下100 000 r/min超速离心70 min,去除上清液以50 μl预冷的PBS重悬,用标准品进行仪器性能测试合格后方可进行外泌体样本上样,样本检测获得NanoFCM仪器检测蛋白指标结果。

**1.5 羊水外泌体 miRNA 测序及数据分析** 实验流程按照Illumina提供的标准步骤执行,包括制备文库和测序实验,sRNA测序文库制备采用TruSeq Small RNA Sample Prep Kits(Illumina, San Diego, USA)试剂盒。文库制备工作完成后,对构建好的文库使用Illumina HiSeq 2000/2500进行测序,测序读长为单端50 bp(SE50)。

使用ACGT101-miR(v 4.2)分析miRNA数据,首先过滤原始数据,去除3'接头和垃圾序列,获取Clean Data,然后进行长度筛选,保留碱基长度在18~26 nt(动物)的序列进入下游分析。比对各种RNA数据库序列(不包含miRNA序列),比如参考基因组mRNA序列库、RFam数据库(包含rRNA、tRNA、snRNA、snoRNA等)和Rfam数据库(重复序列数据库),并进行过滤,最后获得的数据即有效数据。使用ACGT101-miR对有效数据进行miRNA的鉴定,包括序列比对miRBase数据库,选择物种的前体和成熟体,比对样本的参考基因组,使用11条原则预测发夹结构在基因组上的前体,从而鉴定可能的miRNA。然后进行定量并进行组间miRNA表达量的标准化。使用TargetScan、miRanda两款软件对显著性差异的miRNA分别进行靶基因预测。对两款软件预测出的靶基因分别按照每款软件的评分标准进行筛选。TargetScan算法中去除context score percentile小于50的靶基因,miRanda算法中去除最大自由能(Max Energy)大于-10的靶基因。最后取此两款软件的交集作为差异miRNA的最终靶基因。利用DAVID对靶基因进行基因功能GO分析和信号通路pathway分析。

**1.6 联合分析** 胎盘组织取自昆明市妇幼保健院产前诊断为DS的产妇。提取胎盘组织总RNA后采用高通量测序技术进行miRNA测序。将胎盘测序数据与本研究羊水外泌体测序数据进行联合分析。采用了韦恩交集图分析胎盘和羊水之间的共有和特异性数据。

## 2 结果

**2.1 产前诊断结果分析** DS组产前诊断羊水细胞核型为47, XN, +21。对照组羊水细胞核型为46,

XN。两组均未见其他染色体异常。见图1。

**2.2 羊水外泌体鉴定** 超速离心羊水提取的上清液中外泌体在电镜下的检测结果如图2A,平均粒径为76.24 nm,符合外泌体的形态特征。检测浓度为 $9.3 \times 10^{11}$  Particles/ml,满足测序需求。纳米流式检测外泌体表面CD9、CD81、IgG蛋白表达阳性率分别为11.6%、0%、5.6%。见图2B。

**2.3 DS与对照组羊水外泌体中miRNA差异表达情况** 以 $P < 0.05$ 为条件对测序结果进行筛选,DS与对照组存在59个差异表达的miRNA。其中31个miRNA上调,28个miRNA下调。在变化倍数大于2的差异miRNA中,根据表达丰度从高到低分别筛选出10个上调miRNA,9个下调miRNA。见表1。

**2.4 羊水差异表达miRNA对应的HSA21上靶基因** 通过TargetScan、miRanda两款软件,对差异表达的miRNA进行靶基因预测。经过对靶基因的筛选,发现这些miRNA几乎都能靶向到21号染色体上的相关基因。见表2。

**2.5 靶基因对应的miRNA及其相关生物学功能**

汇总筛选出的靶基因,这些靶基因绝大多数位于21q22.1~22.3区域,即唐氏综合征关键区(Down syndrome critical region, DSCR)。再整理它们对应的miRNA,同时有5种以上miRNA共同靶向的基因有BACH1、SYNJ1、IFNARI、DYRK1A、TTC3、BACE2。通过GeneCards、HGNC、NCBI Gene、UniProtKB/Swiss-Prot、Ensembl、OMIM等数据库,查询靶基因相关的生物学功能及相关疾病等。这些靶基因的生物学功能很多与神经系统生长发育及免疫功能等相关。见表3。

**2.6 羊水差异miRNA靶基因功能富集分析结果**

GO分析发现,富集的靶基因主要功能与蛋白质结合、金属离子结合、转移酶活性、DNA结合、RNA聚合酶II对转录调控、核苷酸结合等相关。KEGG富集分析结果表明,靶基因主要参与的信号通路包括代谢通路、肿瘤相关通路、PI3K-Akt信号通路、Rap1信号通路等。见图3。

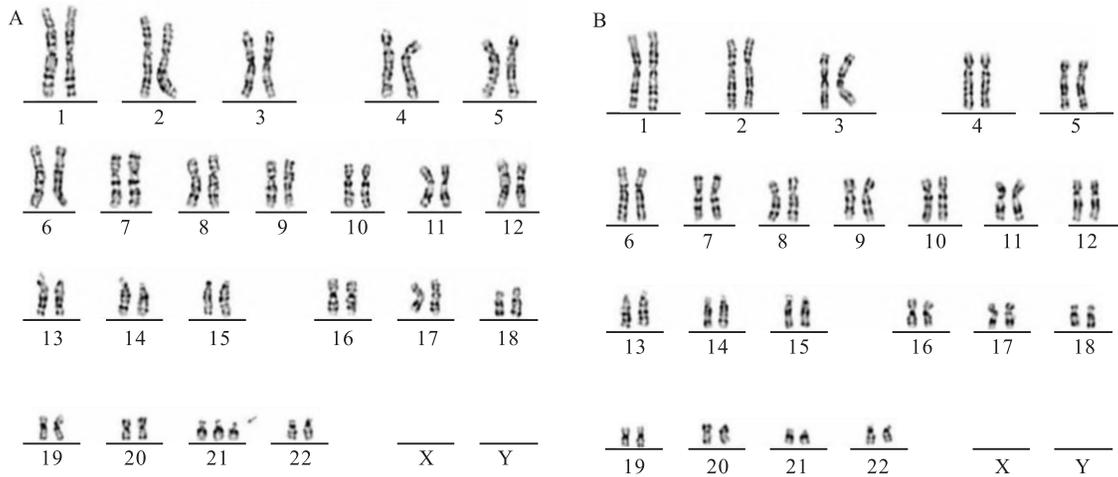


图1 产前诊断羊水细胞染色体核型图

Fig.1 Prenatal diagnosis of karyogram of amniotic fluid cells

A: karyotype: 47, XN, +21; B: karyotype: 46, XN.

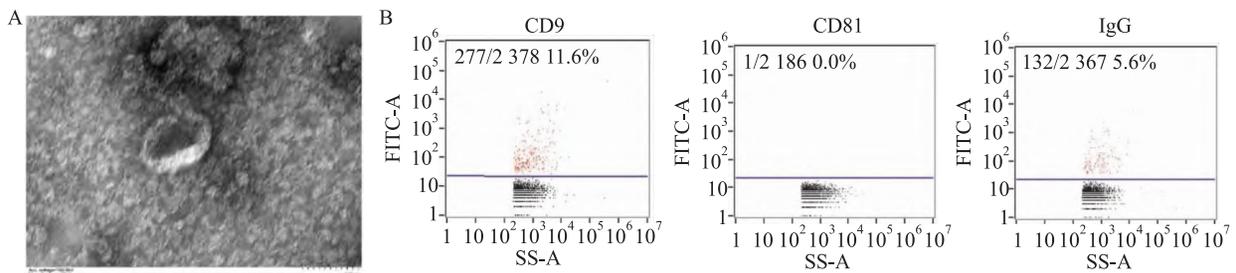


图2 羊水外泌体的鉴定

Fig.2 Identification of amniotic fluid exosomes

A: Electron microscopy images of amniotic fluid exosomes; B: The expression of CD9, CD81, and IgG protein on the surface of exosomes.

表 1 两组羊水外泌体中 miRNA 表达差异

Tab. 1 Difference of miRNA expression in amniotic fluid exosomes between the two groups

No.	miR_name	Fold_change	Location	P value( <i>t</i> -test)	Up/Down
1	hsa-miR-199b-5p	2.53	chr9	0.040 5	Up
2	hsa-let-7b-5p	2.49	chr22	0.012 4	Up
3	hsa-let-7c-5p	2.60	chr21	0.005 2	Up
4	hsa-miR-199a-5p	13.03	chr1	0.015 7	Up
5	hsa-miR-199a-3p_R-1	7.15	chr19	0.014 9	Up
6	hsa-miR-4488_R + 1	2.33	chr11	0.048 5	Up
7	hsa-miR-3065-5p	2.16	chr17	0.017 6	Up
8	hsa-miR-3960_1 ss12AC	2.34	chr9	0.038 0	Up
9	hsa-let-7b-3p_1 ss22CT	2.38	chr22	0.047 2	Up
10	hsa-miR-642a-3p	2.22	chr19	0.021 7	Up
11	hsa-miR-196b-5p	0.40	chr7	0.011 2	Down
12	hsa-miR-3154	0.38	chr9	0.019 9	Down
13	hsa-miR-129-2-3p	0.20	chr11	0.005 1	Down
14	hsa-miR-4787-3p_R-1	0.37	chr3	0.004 8	Down
15	hsa-miR-212-3p_R + 1	0.43	chr17	0.045 3	Down
16	hsa-miR-1224-3p_R + 1	0.35	chr3	0.010 4	Down
17	hsa-miR-541-5p	0.39	chr14	0.046 4	Down
18	hsa-miR-548av-3p_L + 2	0.42	chr18	0.002 0	Down
19	hsa-miR-502-5p_L + 1R + 2	0.20	chrX	0.004 4	Down

表 2 差异表达 miRNA 对应的 HSA21 上靶基因

Tab. 2 Target genes on HSA21 corresponding to differentially expressed miRNAs

No.	miRNA	Target gene/location
1	hsa-miR-199b-5p	TIAM1, SYNJI, IFNARI, SLC5A3, DYRK1A, GATD3, BACH1, GRIKI
2	hsa-let-7c-5p	IL10RB, IFNARI, DYRK1A, BACE2, TRAPPC10, BACH1
3	hsa-miR-199a-5p	TIAM1, SYNJI, IFNARI, SLC5A3, TTC3, DYRK1A, GATD3, BACH1, GRIKI
4	hsa-miR-199a-3p_R-1	SYNJI, IFNAR2, RUNX1, BACE2, ZBTB21
5	hsa-let-7b-5p	IL10RB, IFNARI, DYRK1A, BACE2, TRAPPC10, BACH1
6	hsa-miR-4488_R + 1	RUNX1, KCNJ6, BACE2, SIK1, ICOSLG
7	hsa-miR-3065-5p	SLC5A3, MORC3, DYRK1A, PKNOX1, TRAPPC10
8	hsa-miR-3960_1 ss12AC	PSMG1
9	hsa-let-7b-3p_1 ss22CT	BACH1, IFNGR2, IFNAR2, ETS2, IFNARI
10	hsa-miR-642a-3p	PKNOX1, ZBTB21, APP, SLC5A3, NCAM2, GATD3, KCNJ6
11	hsa-miR-196b-5p	IFNARI, TTC3, DYRK1A, BACE2, TRAPPC10, BACH1
12	hsa-miR-3154	SCAF4, SYNJI, CBRI, HMGNI, BACE2, MX1, HSF2BP, TRAPPC10, KRTAP10-7, APP
13	hsa-miR-129-2-3p	TIAM1, TTC3, DYRK1A, ZBTB21
14	hsa-miR-4787-3p_R-1	-
15	hsa-miR-212-3p_R + 1	DSCAM, NCAM2
16	hsa-miR-1224-3p_R + 1	TTC3, DYRK1A, ETS2, PSMG1, DSCAM, PDXK, KRTAP10-7
17	hsa-miR-541-5p	URB1, SYNJI, SIM2, ZBTB21
18	hsa-miR-548av-3p_L + 2	TIAM1, SCAF4, SYNJI, PIGP, DYRK1A, BACE2, CSTB, NCAM2, BACH1
19	hsa-miR-502-5p_L + 1R + 2	TTC3, DYRK1A, KCNJ6, WDR4, SIK1, GATD3

表 3 羊水差异表达 miRNA 的主要靶基因及其相关生物学功能

Tab. 3 Major target genes of differentially expressed miRNAs in amniotic fluid and their associated biological functions

Genes	Location	miRNAs	Biological function	Associated disease	References
NCAM2	21q21.1	hsa-miR-642a-3p, hsa-miR-212-3p_R + 1, hsa-miR-548av-3p_L + 2	May play important roles in selective fasciculation and zone-to-zone projection of the primary olfactory axons	Epilepsy, Familial Temporal Lobe, 7 and Lissencephaly 3	PMID:9226371

表 3 (续)  
Tab. 3 (continue)

Genes	Location	miRNAs	Biological function	Associated disease	References
<i>BACH1</i>	21q21.3	hsa-miR-199b-5p, hsa-let-7b-5p, hsa-let-7c-5p, hsa-miR-199a-5p, hsa-let-7b-3p_1ss 22CT, hsa-miR-196b-5p, hsa-miR-548av-3p_L+2	DNA-binding transcription factor activity and heme binding	Beta-Thalassemia and Breast Cancer	PMID;31257027
<i>TIAM1</i>	21q22.11	hsa-miR-199b-5p, hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-129-2-3p, hsa-miR-548av-3p_L+2	guanyl-nucleotide exchange factor activity and guanyl-nucleotide exchange factor activity	Neurodevelopmental Disorder With Language Delay And Seizures and Non-Specific Syndromic Intellectual Disability.	PMID;35240055
<i>SYNJ1</i>	21q22.11	hsa-miR-199b-5p, hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-199a-3p_R-1, hsa-miR-3154, hsa-miR-541-5p, hsa-miR-548av-3p_L+2	nucleic acid binding and nucleotide binding	Developmental And Epileptic Encephalopathy 53 and Parkinson Disease 20, Early-Onset	PMID;27435091
<i>IFNARI</i>	21q22.11	hsa-miR-199b-5p, hsa-let-7b-5p, hsa-let-7c-5p, hsa-miR-199a-5p, hsa-let-7b-3p_1ss 22CT, hsa-miR-196b-5p	interferon receptor activity and type I interferon receptor activity	Immunodeficiency 106 Viral Infections and Primary Immunodeficiency With Predisposition To Severe Viral Infection	PMID; 2153461, 7813427, 10049744
<i>SLC5A3</i>	21q22.11	hsa-miR-199b-5p, hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-3065-5p, hsa-miR-642a-3p	transporter activity and myo-inositol; sodium symporter activity	Intellectual Developmental Disorder, Autosomal Recessive 59 and Down Syndrome	PMID; 24595108, 28793216, 27217553
<i>IFNAR2</i>	21q22.11	hsa-miR-199a-3p_R-1, hsa-let-7b-3p_1ss22CT	protein kinase binding and type I interferon binding	Immunodeficiency 45 and Primary Immunodeficiency With Post-Measles-Mumps-Rubella Vaccine Viral Infection	PMID; 8181059, 7665574, 7759950
<i>RUNX1</i>	21q22.12	hsa-miR-199a-3p_R-1, hsa-miR-4488_R+1	DNA-binding transcription factor activity and protein homodimerization activity	Platelet Disorder, Familial, With Associated Myeloid Malignancy and Leukemia, Acute Myeloid	PMID; 17431401, 17377532
<i>DYRK1A</i>	21q22.13	hsa-miR-199b-5p, hsa-let-7b-5p, hsa-let-7c-5p, hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-3065-5p, hsa-miR-196b-5p, hsa-miR-129-2-3p, hsa-miR-1224-3p_R+1, hsa-miR-548av-3p_L+2, hsa-miR-502-5p_L+1R+2	identical protein binding and protein kinase activity	Intellectual Developmental Disorder, Autosomal Dominant 7 and Dyrk1a-Related Intellectual Disability Syndrome	PMID; 21127067, 8769099, 30773093, 20981014, 23665168
<i>TTC3</i>	21q22.13	hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-196b-5p, hsa-miR-129-2-3p, hsa-miR-1224-3p_R+1, hsa-miR-502-5p_L+1R+2	ligase activity and ubiquitin-protein transferase activity	Chromosomal Duplication Syndrome	PMID; 20059950, 30696809
<i>KCNJ6</i>	21q22.13	hsa-miR-4488_R+1, hsa-miR-642a-3p, hsa-miR-502-5p_L+1R+2	inward rectifier potassium channel activity and G-protein activated inward rectifier potassium channel activity	Keppen-Lubinsky Syndrome and Epilepsy	PMID; 25620207, 31099984
<i>DSCAM</i>	21q22.2	hsa-miR-212-3p_R+1, hsa-miR-1224-3p_R+1	Nervous system development and Netrin-1 signaling	Developmental Malformations-Deafness-Dystonia Syndrome and Epilepsy	PMID; 10925149, 18585357, 19196994
<i>BACE2</i>	21q22.2-22.3	hsa-let-7b-5p, hsa-let-7c-5p, hsa-miR-199a-3p_R-1, hsa-miR-4488_R+1, hsa-miR-196b-5p, hsa-miR-3154, hsa-miR-548av-3p_L+2	aspartic-type endopeptidase activity	Down Syndrome and Alzheimer's Disease	PMID; 10591213, 11083922, 11423558, 15857888, 16816112
<i>GATD3</i>	21q22.3	hsa-miR-199b-5p, hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-642a-3p, hsa-miR-502-5p_L+1R+2	This gene encodes a potential mitochondrial protein that is a member of the DJ-1/Pfp1 gene family	Down Syndrome and Granulomatous Orchitis	PMID;9205129
<i>TRAPPC10</i>	21q22.3	hsa-let-7b-5p, hsa-let-7c-5p, hsa-miR-3065-5p, hsa-miR-3154	sodium ion transmembrane transporter activity	Neurodevelopmental Disorder With Microcephaly, Short Stature, And Speech Delay and Primary Autosomal Recessive Microcephaly	PMID; 11805826, 31467083, 35298461
<i>ZBTB21</i>	21q22.3	hsa-miR-199a-3p_R-1, hsa-miR-642a-3p, hsa-miR-129-2-3p, hsa-miR-541-5p	methyl-CpG binding	Coffin-Siris Syndrome 1 and Intellectual Developmental Disorder, Autosomal Dominant 7	PMID;15629158

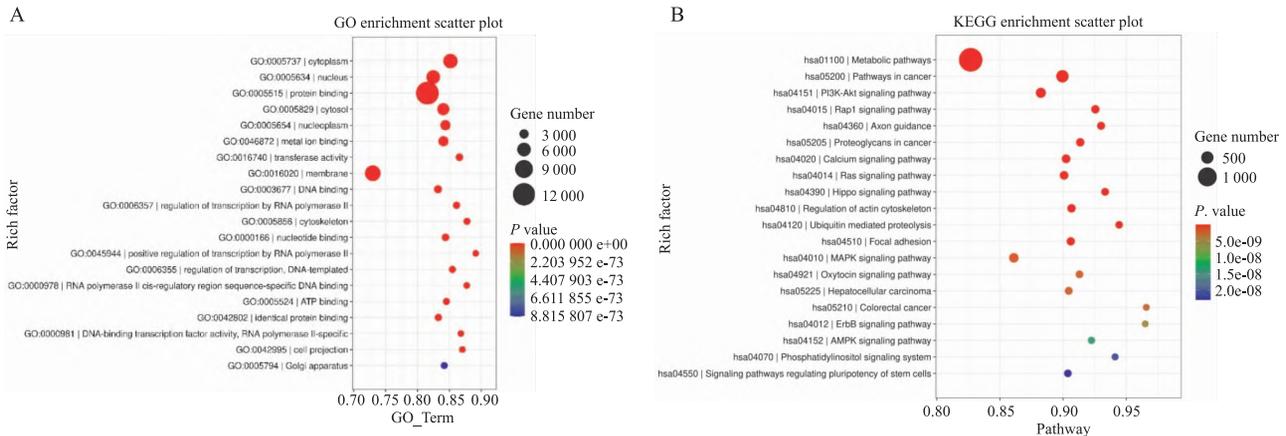


图3 差异表达 miRNA 靶基因功能富集分析结果

Fig.3 Functional enrichment analysis results of differentially expressed miRNA target genes

A: GO enrichment analysis scatter; B: KEGG enrichment analysis scatter.

**2.7 DS 羊水与胎盘差异表达 miRNA 的交集** 将前期 DS 胎盘测序结果分析获得的 10 个差异 miRNA 与本次 DS 羊水外泌体中的 19 个差异 miRNA 绘制韦恩交集图进行分析,获得了 1 个交集差异 miRNA: hsa-miR-199b-5p。见图 4。

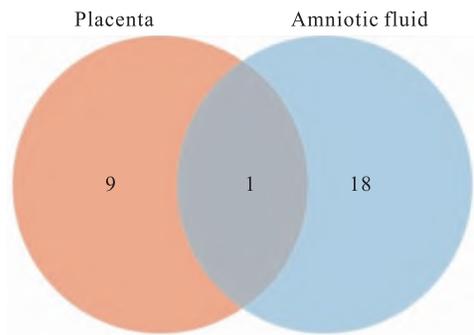


图4 DS 羊水与胎盘差异表达 miRNA 的韦恩交集图

Fig.4 Wayne diagram of differentially expressed miRNAs between amniotic fluid and placenta in DS

**2.8 hsa-let-7 与 hsa-miR-199b-5p 靶基因交集基因** 将研究结果中 hsa-let-7 家族的 hsa-let-7b-5p、hsa-let-7c-5p、hsa-let-7b-3p\_1ss22CT 和 hsa-miR-199b-5p 预测的 21 号染色体上靶基因绘制了韦恩图,获得了两个交集基因: *BACH1* 和 *IFNARI*。见图 5。

3 讨论

胎盘是胎儿特有的组织,而羊水是产前诊断中最易获得的胎儿样本,含有少量白细胞、胎儿脱落细胞以及胎儿相关的 DNA、RNA 和蛋白质片段<sup>[6]</sup>。

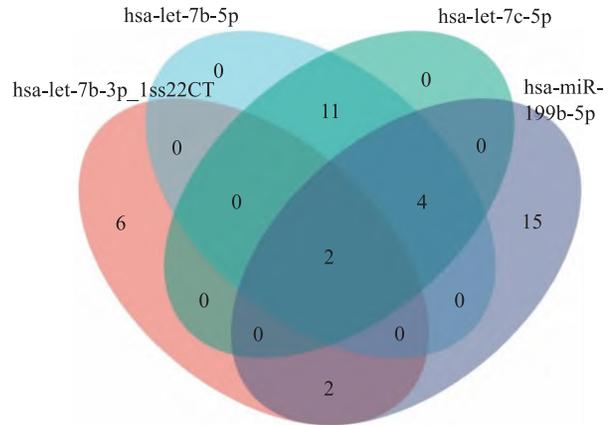


图5 hsa-let-7 与 hsa-miR-199b-5 预测靶基因韦恩图

Fig.5 Wayne diagram of predicted target genes of hsa-let-7 and hsa-miR-199b-5

miRNA 在胎盘和羊水中均有表达,且可以从胎盘进入羊水中,但其组成模式及对胎儿生长发育的影响机制尚不清楚。本研究首次联合分析了 DS 胎儿羊水与胎盘中的差异表达 miRNA,对比二者异同并筛选其靶基因,为探索 DS 发病机制和寻找潜在产前诊断标志物提供了新思路。

关于 DS 表型的发生机制,目前主要有基因剂量效应和发育不稳定性两种假说。基因剂量效应假说认为,21 号染色体(HSA21)上剂量敏感基因表达增加可能导致神经发育障碍<sup>[7]</sup>。研究表明,DS 羊水中高倍数差异 miRNA 几乎全部靶向 HSA21 上的基因,特别是集中在 DSCR,这些基因与 DS 患者的神经发育障碍和免疫异常密切相关<sup>[8]</sup>。

在课题组既往的 DS 胎盘 miRNA 研究中,发现了 hsa-miR-199b-5p、hsa-miR-125b-2-3p、hsa-miR-

654-5p 等显著差异表达的 miRNA<sup>[5]</sup>,而本研究在 DS 羊水外泌体中检测到 hsa-let-7 和 hsa-miR-199 家族多成员表达上调。比对胎盘和羊水的 miRNA 测序结果,hsa-miR-199b-5p 是二者共同的显著差异表达 miRNA。

近年来,有研究<sup>[9]</sup>表明,DS 羊水外泌体中存在 15 个差异表达的 miRNA,其中 hsa-let-7d-5p 可能通过调控 BACH1 表达促进胎儿大脑氧化应激事件。本研究结果也显示 DS 与对照组 miRNA 存在差异,但在差异 miRNA 的数量和种类上有所不同,可能与样本量和个体差异相关,需进一步研究。另有研究<sup>[10]</sup>报告 DS 患者血浆中 hsa-miR-199 和 let-7 家族表达上调,与本研究结果一致。此外,DS 胎儿绒毛组织研究发现 7 个上调 miRNA,其中 3 个位于 21 号染色体上(miR-99a、miR-125b 和 let-7c),可能与胎盘异常发育相关<sup>[11]</sup>。综上,hsa-let-7 和 hsa-miR-199 家族成员在 DS 不同样本中的高频出现及一致性,为寻找新的 DS 产前诊断标志物提供了可能。

let-7 家族是高度保守的 miRNA 家族之一。本研究检测到 DS 羊水中的 hsa-let-7b-5p、hsa-let-7c-5p 和 hsa-let-7b-3p\_1ss22CT 上调,它们靶向 *IL10RB*、*IFNARI*、*BACH1* 等基因,其中 *DYRK1A*、*BACE2* 等与神经发育相关,*IL10RB*、*IFNARI* 等与免疫功能密切相关。这些靶基因的异常调控可能同时影响 DS 患者的神经发育和免疫系统功能。在癌细胞中,let-7 家族通常作为肿瘤抑制因子发挥作用,抑制肿瘤的生长和转移。流行病学数据显示,除了血液系统恶性肿瘤外,实体瘤在 DS 人群中发生的可能性较小<sup>[12]</sup>。已经有不少研究证实 DS 患者的癌症低发病率。有研究<sup>[13]</sup>表明,在非小细胞肺癌中,GRP78 表达显著上调,miR-495 和 miR-199a-5p 表达下调。因此,*DSCR* 基因也被认为是实体瘤的肿瘤抑制因子。据此,DS 的 let-7、miR-199a-5p 表达显著上调似乎正好可以用来解释为何 DS 与实体肿瘤之间存在着相反的共病关系。这为理解 DS 以及这些癌症的分子机制提供了新的方向。然而,*DSCR* 基因对实体瘤的保护作用尚未阐明。对一些癌症和 DS 之间反向共病的研究可能会导致新的癌症预防和治疗策略产生。

基于以上 let-7 与 miR-199 在 DS 中存在的特别现象,为进一步分析 let-7 与 miR-199 在 DS 中是否存在共同作用的靶基因,除了筛选出的羊水和胎盘的共同差异 miRNA-hsa-miR-199b-5p 外,本研究将羊水中检测到的 3 个 let-7 家族 miRNA 进行靶基因

预测,并通过交集分析找出了它们位于 21 号染色体上的共同靶基因:*BACH1* 和 *IFNARI*。*BACH1* 是抗氧化反应调节的重要因子,在 DS 中其表达可能通过抑制抗氧化基因诱导加剧脑组织氧化应激损伤<sup>[14]</sup>,在 DS 胎儿大脑皮质中,*BACH1* 蛋白是显著表达的,据此推测,可能在 DS 胎儿早期大脑发育中,已经发生了脑组织的氧化应激损伤。*IFNARI* 是干扰素信号的重要组成部分,其剂量效应可能导致 DS 患者免疫激活与免疫抑制并存的现象<sup>[15]</sup>。DS 患者的病毒感染较少,但当受到感染时,他们会患上更严重的疾病。*IFNARI* 和 *IFNAR2* 基因剂量效应的评估是一个新兴的领域,有望帮助理解 DS 患者为何易患有严重免疫功能障碍,甚至可能延伸到对其他 DS 特征发生机制的揭示,如神经缺陷和发育延迟。

功能富集分析显示,差异 miRNA 靶基因主要参与代谢、肿瘤相关及 PI3K-Akt 信号通路,这些通路在 DS 的线粒体功能障碍和神经发育异常中起重要作用。既往研究表明,DS 患者血液中的代谢物浓度发生变化,尤其是某些氨基酸水平异常;而线粒体功能障碍则可能通过 RUNX1 的过表达激活 PI3K/Akt 信号通路,进一步影响神经发育<sup>[16]</sup>。

近年来,关于 DS 相关 miRNA 的研究逐渐增多,但样本量小、个体差异大仍是限制因素。本研究首次明确了 hsa-miR-199b-5p 作为 DS 胎盘与羊水中共同的差异表达 miRNA,并发现 hsa-let-7 和 hsa-miR-199 家族成员在多种 DS 样本类型中均高频出现。这一发现为进一步研究 DS 的分子机制及其产前诊断标志物提供了有力支持。

综上所述,该研究表明 DS 胎儿羊水外泌体 miRNA 表达与正常胎儿存在显著差异,其中 hsa-let-7 和 hsa-miR-199 家族成员及其靶基因 *BACH1* 和 *IFNARI* 可能是 DS 发病的重要分子因素。此类 miRNA 的功能及其在产前诊断中的潜在应用价值有待进一步研究。

#### 参考文献

- [1] Ramba M, Bogunovic D. The immune system in down syndrome: Autoimmunity and severe infections [J]. Immunol Rev, 2024, 322(1): 300-10. doi:10.1111/imr.13296.
- [2] Ghezzi M, Garancini N, De Santis R, et al. Recurrent respiratory infections in children with down syndrome: a review [J]. Children (Basel), 2024, 11(2): 246. doi:10.3390/children11020246.
- [3] 徐晶晶,胡月,刘文,等.低深度全基因组测序技术联合核型分析在无创产前检测高风险孕妇产前诊断中的应用 [J].安徽医科大学学报,2021,56(4):619-23. doi:10.19405/j.

- cnki. issn1000-1492. 2021. 04. 022.
- [3] Xu J J, Hu Y, Liu W, et al. Combined application of low-pass whole genome sequencing and karyotyping in prenatal diagnosis of pregnant women with high risk in non-invasive prenatal testing [J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2021, 56(4): 619-23. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.04.022.
- [4] Chen L, Heikkinen L, Wang C, et al. Trends in the development of miRNA bioinformatics tools [J]. *Brief Bioinform*, 2019, 20(5): 1836-52. doi:10.1093/bib/bby054.
- [5] 何建萍, 唐健, 苏虹, 等. 唐氏综合征胎盘差异 miRNA 表达谱分析: 基于全转录组测序分析技术[J]. *南方医科大学学报*, 2022, 42(3): 418-24. doi:10.12122/j.issn.1673-4254.2022.03.15.
- [5] He J P, Tang J, Su H, et al. Whole-transcriptome sequencing analysis of placental differential miRNA expression profile in Down syndrome[J]. *J South Med Univ*, 2022, 42(3): 418-24. doi:10.12122/j.issn.1673-4254.2022.03.15.
- [6] Vain N E, Batton D G. Meconium "aspiration" (or respiratory distress associated with meconium-stained amniotic fluid?) [J]. *Semin Fetal Neonatal Med*, 2017, 22(4): 214-9. doi:10.1016/j.siny.2017.04.002.
- [7] Delabar J M, Theophile D, Rahmani Z, et al. Molecular mapping of twenty-four features of Down syndrome on chromosome 21 [J]. *Eur J Hum Genet*, 1993, 1(2): 114-24. doi:10.1159/000472398.
- [8] Pelleri M C, Cicchini E, Locatelli C, et al. Systematic reanalysis of partial trisomy 21 cases with or without Down syndrome suggests a small region on 21q22.13 as critical to the phenotype [J]. *Hum Mol Genet*, 2016, 25(12): 2525-38. doi:10.1093/hmg/ddw116.
- [9] 丁凯泽, 余蕾, 黄智, 等. 唐氏综合征胎儿羊水外泌体 miRNA 差异表达谱分析 [J]. *南方医科大学学报*, 2022, 42(2): 293-9. doi:10.12122/j.issn.1673-4254.2022.02.18.
- [9] Ding K Z, Yu L, Huang Z, et al. Differential expression profile of miRNAs in amniotic fluid exosomes from fetuses with Down syndrome [J]. *J South Med Univ*, 2022, 42(2): 293-9. doi:10.12122/j.issn.1673-4254.2022.02.18.
- [10] Zbucka-Kretowska M, Niemira M, Paczkowska-Abdulsalam M, et al. Prenatal circulating microRNA signatures of foetal Down syndrome [J]. *Sci Rep*, 2019, 9: 2394. doi:10.1038/s41598-018-35876-5.
- [11] Svobodová I, Korabečná M, Calda P, et al. Differentially expressed miRNAs in trisomy 21 placentas [J]. *Prenat Diagn*, 2016, 36(8): 775-84. doi:10.1002/pd.4861.
- [12] Xavier A C, Ge Y, Taub J W. Down syndrome and malignancies: a unique clinical relationship A paper from the 2008 William Beaumont hospital symposium on molecular pathology [J]. *J Mol Diagn*, 2009, 11(5): 371-80. doi:10.2353/jmol.2009.080132.
- [13] Ahmadi A, Khansarinejad B, Hosseinkhani S, et al. miR-199a-5p and miR-495 target GRP78 within UPR pathway of lung cancer [J]. *Gene*, 2017, 620: 15-22. doi:10.1016/j.gene.2017.03.032.
- [14] Chillappagari S, Garapati V, Mahavadi P, et al. Defective BACH1/HO-1 regulatory circuits in cystic fibrosis bronchial epithelial cells [J]. *J Cyst Fibros*, 2021, 20(1): 140-8. doi:10.1016/j.jcf.2020.05.006.
- [15] Malle L, Bogunovic D. Down syndrome and type I interferon: not so simple [J]. *Curr Opin Immunol*, 2021, 72: 196-205. doi:10.1016/j.coi.2021.06.006.
- [16] Liu Y, Zhang Y, Ren Z, et al. RUNX1 upregulation causes mitochondrial dysfunction *via* regulating the PI3K-Akt pathway in iPSC from patients with down syndrome [J]. *Mol Cells*, 2023, 46(4): 219-30. doi:10.14348/molcells.2023.2095.

## Combined analysis of differential miRNAs between amniotic fluid exosomes and placenta in Down syndrome fetuses

Zhang Yaqin<sup>1</sup>, Ma Zhongrui<sup>2</sup>, Qian Yuan<sup>3</sup>, Li Junjun<sup>4</sup>, Deng Xingli<sup>4</sup>

<sup>1</sup>*Reproductive Genetics Center of Puer People's Hospital, Puer 665000;*

<sup>2</sup>*Dept of Obstetrics, The First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650032;*

<sup>3</sup>*Precision Diagnosis and Treatment Center, Affiliated Hospital of Yunnan University, Kunming 650021;*

<sup>4</sup>*Dept of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650032*

**Abstract Objective** To analyze the differential expression profile of miRNAs in amniotic fluid exosomes of fetuses with Down syndrome (DS) and provide insights for identifying novel biomarkers for the prenatal diagnosis of DS. **Methods** Amniotic fluid samples were collected from fetuses with DS and chromosomally normal fetuses. Exosomes were isolated from the amniotic fluid and subjected to high-throughput sequencing. Differentially expressed miRNAs were identified, and target genes were predicted using TargetScan and miRanda. Target genes located on chromosome 21 were selected, and their biological functions and associated diseases were analyzed using GeneCards, HGNC, NCBI Gene, UniProtKB/Swiss-Prot, Ensembl, and OMIM databases. GO and KEGG enrichment analyses were performed to investigate the biological functions of the enriched genes. **Results** A total of 59 differentially expressed miRNAs were identified, including 31 upregulated and 28 downregulated miRNAs. Based on a fold change >2 and  $P < 0.05$ , 10 upregulated and 9 downregulated miRNAs with the highest expression levels were

selected. Key miRNAs included hsa-let-7b-5p, hsa-let-7c-5p, hsa-let-7b-3p\_1ss22CT, and hsa-miR-199b-5p, with *BACH1* and *IFNARI* identified as their shared target genes. GO analysis revealed that the enriched target genes were primarily involved in protein binding, metal ion binding, transferase activity, DNA binding, transcriptional regulation by RNA polymerase II, and nucleotide binding. KEGG pathway analysis indicated that the target genes were mainly associated with metabolic pathways, cancer-related pathways, the PI3K-Akt signaling pathway, and the Rap1 signaling pathway. **Conclusion** Differential expression of miRNAs in amniotic fluid exosomes was observed between DS fetuses and those with normal karyotypes. Combined analysis with placental miRNAs revealed hsa-miR-199b-5p as a common differentially expressed miRNA in both DS amniotic fluid and placenta. It is hypothesized that *BACH1* and *IFNARI*, shared target genes of hsa-miR-199b-5p, hsa-let-7b-5p, hsa-let-7c-5p, and hsa-let-7b-3p\_1ss22CT, may play a role in the pathogenesis of DS.

**Key words** Down syndrome; miRNA; sequencing; amniotic fluid; placenta

**Fund programs** National Natural Science Foundation of China (No. 82360261); Digital Development and Application of Biological Resources Project [2022] of Kunming Medical University (No. 202002AA100007); High-level Talent Support Program of Yunnan Province (Young Top Talent Special Project) (No. KYQY20210816); The Open Project of the Clinical Medical Center for Reproductive Gynecological Diseases of Yunnan Province (No. 2022LCZXKF-SZ14)

**Corresponding authors** Qian Yuan, E-mail: yuanqian2x@hotmail.com; Deng Xingli, E-mail: kmmudxl@126.com

(上接第 1139 页)

combination group was significantly lower than that in the ETV monotherapy group ( $P < 0.05$ ), and was similar to the HBV DNA levels in the TDF, TAF, and TMF groups ( $P > 0.05$ ). At 48 weeks, the HBV DNA levels in the ETV + TDF combination therapy group was significantly lower than those in all monotherapy groups ( $P < 0.05$ ). The HBV DNA levels in the TDF, TAF, and TMF monotherapy groups were similar ( $P > 0.05$ ). The HBV DNA level in the ETV group was higher than those in the remaining four groups ( $P < 0.05$ ). The HBV DNA suppression rates of the ETV, TDF, TAF, TMF and ETV + TDF groups were 31.82%, 51.11%, 52.94%, 56.00%, and 78.87%, respectively, the HBV DNA suppression rate in the ETV + TDF combination therapy group was significantly better than those in all monotherapy groups ( $P < 0.05$ ), the rates of HBV DNA suppression were similar among the TDF, TAF, and TMF groups, and all were superior to that of the ETV monotherapy group ( $P < 0.05$ ). Multivariate analysis revealed that low baseline HBsAg levels ( $OR = 0.430$ ,  $P = 0.004$ ), high baseline ALT levels ( $OR = 2.389$ ,  $P < 0.001$ ), and the combination therapy regimen ( $OR = 6.239$ ,  $P < 0.001$ ) were independent predictors of HBV DNA suppression at 48 weeks of treatment. The reduction in HBsAg levels in the ETV + TDF group was significantly greater than that in the ETV monotherapy group [ $(3.65 \pm 0.85)$  vs  $(3.88 \pm 0.64)$ ,  $P < 0.05$ ]. The HBsAg clearance rate in the ETV + TDF group was 1.41% (1/71), while the HBsAg clearance rates in the other groups were all 0%. There were no statistically significant differences in HBeAg seroconversion rates, blood Scr levels, and eGFR levels among the groups ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** For HBeAg-positive chronic hepatitis B (CHB) patients with high viral load, the combination therapy of ETV and TDF significantly enhances viral suppression compared to monotherapy, without increasing the risk of renal adverse events. This suggests that the combination therapy can be considered a preferred strategy for this specific patient population.

**Key words** chronic hepatitis B; high viral load; nucleoside (acid) drugs; monotherapy; combination therapy; antiviral therapy

**Fund program** National Science and Technology Major Project (No. 2018ZX10302-206)

**Corresponding author** Yin Huafa, E-mail: yhf163.good@163.com