

· 实验研究 ·

复发性流产肾虚证小鼠子宫蜕膜组织 miRNA 表达谱检测及生物信息学分析

王瑞雪,董小鹏,储继军

(安徽中医药大学第一附属医院,安徽 合肥 230031)

[摘要]目的 探讨微小 RNA(microRNA, miRNA)在复发性流产(repeated spontaneous abortion, RSA)肾虚证小鼠子宫蜕膜组织中的表达特征。**方法** 运用基因芯片技术对所采集的正常对照组和 RSA 小鼠蜕膜组织进行 miRNA 检测,运用 Genespring 软件对 miRNA 进行筛选及功能分析。应用生物信息学方法分析差异表达的 miRNA 及其靶向基因在 RSA 发生、发展中的作用。**结果** 芯片检测结果显示正常对照组和 RSA 肾虚证组筛选出差异表达的 miRNA 共有 63 条(22 条上调、41 条下调),实时荧光定量 PCR 验证的 miRNA 的表达情况与 miRNA 芯片结果一致。京都基因与基因组百科全书通路富集分析及基因本体分析显示,其差异表达的 miRNA 涉及到 PI3K-Akt 信号通路、细胞吞噬通路、癌症通路、黏着斑通路、肌动蛋白细胞骨架调控通路、轴突导向信号、MAPK 信号通路、PAP-1 信号通路等。**结论** RSA 肾虚证小鼠子宫蜕膜组织中存在差异表达的 micro RNA,可能涉及 RSA 肾虚证的发生、发展。

[关键词]复发性流产;miRNA;差异表达;肾虚证;靶基因

[中图分类号]R741.21 **[DOI]**10.3969/j.issn.2095-7246.2019.04.018

复发性流产(repeated spontaneous abortion, RSA)是指 3 次或 3 次以上妊娠 28 周之前的胚胎或胎儿丢失。中医学称之为“数堕胎”或“滑胎”。RSA 是一种常见妊娠并发症,据估计,人类妊娠中自然流产的发生率为 50%~60%,RSA 在育龄妇女中发

病率为 1%~5%^[1]。RSA 已经成为严重影响妇女生殖健康与安全的疾病,流产次数越多其复发风险越高。引起 RSA 的原因较多,可能包括先天遗传、女性解剖异常、内分泌紊乱、盆腔感染因素、男性因素、心理因素及免疫因素等,但其确切机制尚未明了。细胞的功能起始于基因的表达,转录组概念上是指在某一时间阶段个体细胞内所有基因转录形成的 RNA 的总称^[2]。对转录组的分析可以获得高通

基金项目:安徽省自然科学基金青年基金项目(1608085QH221)

作者简介:王瑞雪(1982-),女,博士,主治医师

[Abstract] **Objective** To investigate the clinical effect of double-needle hanging needling combined with mild-warm moxibustion and suspended moxibustion at Yifeng point in the treatment of the acute stage of peripheral facial paralysis. **Methods** A total of 60 patients who met the diagnostic criteria for the acute stage of peripheral facial paralysis were enrolled and randomly divided into observation group and control group, with 30 patients in each group. The patients in the observation group were treated with double-needle hanging needling combined with mild-warm moxibustion and basic pharmacotherapy, and those in the control group were treated with mild-warm moxibustion and basic pharmacotherapy. After 7 days of treatment, both groups were given conventional acupuncture; each course of treatment was 7 days, and the two groups were treated for 3 courses. The two groups were compared in terms of facial nerve function score and clinical outcome before treatment and on days 7 and 21 of treatment. **Results** Based on facial nerve function score, the observation group had a significantly better outcome than the control group ($P < 0.05$). On days 7 and 21 of treatment, both groups had a significant increase in facial nerve function score ($P < 0.05$), and the observation group had a significantly higher score than the control group ($P < 0.05$). **Conclusion** In the acute stage of peripheral facial paralysis, double-needle hanging needling combined with mild-warm moxibustion can effectively restore the nerve function of the affected side, and improve patient prognosis.

[Key words] Acute stage of peripheral facial paralysis; Double-needle hanging needling; Mild-warm moxibustion

量基因表达的 RNA 相关信息,从而揭示基因表达与某种生命现象之间的关系^[3]。中医的“证”,是对疾病过程中机体整体动态的阶段性病理特征之概括,是人体整体病理状态的实时反映,而这种状态又是复杂多变的^[4-5]。研究认为微小 RNA (microRNA, miRNA) 表达具有时序性、特异性,这种表达特点与中医证候的上述特性相吻合,miRNA 表达异常引起的相应基因网络调控紊乱常常是导致疾病发生的重要内在原因^[6]。因此,从 miRNA 调控角度研究正常妊娠和 RSA 肾虚证 miRNA 表达之间的相关性,探索 RSA 肾虚证和正常妊娠小鼠子宫蜕膜组织的 miRNA 差异表达谱,可能为该病的中医辨证分型更加规范和客观化提供依据。

1 材料

1.1 动物 采用 SPF 级 CBA/J 小鼠,6~7 周龄,体质量(25±5)g,共 25 只;SPF 级 DBA/2 小鼠,6~7 周龄,体质量(25±5)g,共 10 只;SPF 级 BALB/c 小鼠,6~7 周龄,体质量(25±5)g,共 3 只。以上小鼠均由重庆恩斯维尔生物科技有限公司[实验动物生产许可证号:SCXK(渝)2017-0003]提供,在 SPF 级实验室适应 1 周。

1.2 主要试剂和仪器 高速台式离心机(BACKMAN CS-15R):美国 Beckman 公司;实时荧光定量 PCR 仪:加拿大 Funglyn Biotech;电泳仪:美国 Bio-rad;凝胶成像仪稳压 DNA 电泳仪:美国 Tianneng;GDS8000 凝胶扫描系统:美国 UVP;高速台式离心机(BACKMAN CS-15R):美国 Beckman 公司;水合氯醛:上海 Aladdin;羟基脲:齐鲁制药有限公司;补肾安胎冲剂:安徽中医药大学第一附属医院院内制剂。

2 方法

2.1 模型复制 采用具有隐性、反复性和父系特异性特征的 DBA/2 小鼠×CBA/J 小鼠的 Clark 经典 RSA 小鼠模型^[7]。RSA 模型复制方法:将雌性 CBA/J 小鼠与雄性 DBA/2 按 2:1 的比例于拟交配日 18:00 合笼,次日早上 8:30 检查阴道栓。正常妊娠模型复制方法:将雌性 CBA/J 小鼠与 BALB/c 小鼠按 2:1 的比例于拟交配日 18:00 合笼,次日早上 8:30 检查阴道栓,肉眼观察阴道口有无乳白色、固态胶状物,发现明显阴栓者为阳性。检出阴栓的 CBA/J 小鼠计为妊娠第 0 天,进入下一步实验。模型复制成功后小鼠分为两组:正常对照组(正常妊娠小鼠):予 10 μL/g NaCl 灌胃;模型组(RSA 肾虚证小鼠):妊娠第 1~7 天每日给予羟基脲 450 mg/kg 灌胃(药物浓度为 45 mg/mL,灌胃剂量 10 mL/kg)+10

mL/kg NaCl 灌胃;每组小鼠 5 只,共 10 只。注意观察各组 CBA/J 小鼠一般状态,每 4 d 称量体质量,测量饮水和饲料 1 次并记录。各组 CBA/J 小鼠腹腔注射麻醉并解剖后观察子宫形态、颜色、宫口、宫腔内变化并记录数据,剖视子宫观察胚胎丢失情况并计算流产率;分离出各组子宫蜕膜组织,冰 PBS 缓冲液洗净,-80℃保存用于后续检测。

2.2 小鼠子宫蜕膜组织提取及 RNA 芯片处理 对正常妊娠小鼠(样本编号 A)及 RSA 肾虚证小鼠子宫蜕膜组织(样本编号 B)RNA 的提取及纯化步骤按 AMBION 抽提试剂盒使用说明书进行,样品检测结果均为 A 级合格,可进行下一步实验。

2.3 RNA 标记与芯片杂交 取 100 ng 总 RNA,定容至 2 μL。①配制去磷酸化混合液(CIP Master Mix)。PCR 反应:37℃,30 min;样品变性:在每管样品中添加 2.8 μL 100% DMSO 混匀离心,将上述反应混合液置于 100℃PCR 仪中 5~10 min,再迅速转入冰水浴中冷却;连接标记:将 10×T4 RNA Ligase Buffer 置于 37℃温育并间隔涡旋,直至沉淀全部溶解,然后将其冷却至室温备用。②配制连接反应混合液(Ligation Master Mix)。PCR 反应:16℃温育 2 h;标记后 RNA 纯化,纯化后样品抽干,准备 10×阻滞剂(Blocking Agent)。③配置反应体系(Hybridization Mix)。反应条件设置:100℃,5 min;冰水 5 min;上芯片,55℃20 h,20 r/min 滚动杂交。④芯片洗涤:取出芯片洗涤,洗脱后利用 Agilent Scanner G2505C(Agilent Technologies)扫描得到原始图像。

2.4 实时荧光定量 PCR (quantitative real time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 验证筛选出的 miRNA 采用相对定量法对结果进行比较分析,以 U6 RNA 作为内参。首先进行 RNA 的提取,按照 qRT-PCR 的操作步骤,进行反转录反应条件设置:25℃10 min,42℃50 min,85℃5 min;荧光定量 PCR 扩增条件设置:94℃4 min;94℃20 s,60℃30 s,72℃30 s,共循环 35 次,72℃检测信号。每个标本均采用 3 个复孔。

2.5 生物信息学分析方法 采用 Feature Extraction 软件 (Version 10.7.1.1, Agilent Technologies) 处理原始图像,提取原始数据。然后利用 Genespring 软件 (Version 13.1, Agilent Technologies) 进行标准化过滤数据和后续数据统计。将至少有一组 100% 标记为“Detected”的探针筛选保留做下一步分析,对于无生物学重复者仅利用差异倍数进行筛选,标准是差异倍数≥2.0。然后应用

3 个数据库 (Targets can, microRNA org, pita) 共同对差异 miRNA 进行靶基因预测,接着对所预测的靶基因进行京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 富集分析和基因本体 (Gene Ontology, GO) 分析,以判定差异 miRNA 所影响的细胞分子通路或者生物学功能。qRT-PCR 验证结果采用 SPSS 17.0 软件进行两个独立样本 *t* 检验,若 $P < 0.05$ 则视为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 RSA 肾虚证小鼠子宫蜕膜组织表达上调倍数 ≥ 2 的 miRNA 与正常对照组比较,模型组子宫蜕膜组织表达上调倍数 ≥ 2 的 miRNA 共有 22 条。见表 1。

表 1 RSA 肾虚证小鼠子宫蜕膜组织
表达上调倍数 ≥ 2 的 miRNA

miRNA 名称	差异倍数	碱基序列
mmu-miR-7235-5p	47.82	GCCCAGACCCCTC
mmu-miR-34b-5p	36.75	ACAATCAGCTAATTAC ACTGCC
mmu-miR-328-5p	22.70	CCCTGAGCCCTC
mmu-miR-5119	17.89	CCAGCCCAGGATG
mmu-miR-7218-5p	5.80	CCCTCTACACTAAACCC
mmu-miR-1971	5.78	TCTCAGCCCAGCCT
mmu-miR-6924-3p	5.43	CTGAAGGGTGGGGA
mmu-miR-7088-5p	4.70	GTTTCCCCTCTCAC
mmu-miR-700-3p	4.62	GGTGGACTCGGTTC
mmu-miR-483-5p	4.42	CTCCCTTCTCTTC
mmu-miR-7221-3p	3.27	CCAGTCCCCAGCC
mmu-miR-129-1-3p	3.21	ATACTTTTTGGGG TAAGGG
mmu-miR-8102	3.19	TCTTCTCGTTCCCC
mmu-miR-6418-5p	2.85	GCATCTCTCCCTTCC
mmu-miR-6976-3p	2.84	CTGGGGAGTTGGGA
mmu-miR-129b-5p	2.62	GGAAGCCCTTACCCC
mmu-miR-6918-5p	2.55	AGAACCTAATCCCGTCC
mmu-miR-155-5p	2.52	ACCCCTATCACAATTAGC
mmu-miR-504-3p	2.35	GAAACCCTGCCCTG
mmu-miR-328-3p	2.29	ACGGAAGGGCA GAGAGGG
mmu-miR-34c-5p	2.21	GCAATCAGCTAA CTACACTG
mmu-miR-6904-5p	2.19	CCACTCAACTCTAACCC

3.2 RSA 肾虚证小鼠子宫蜕膜中表达下调倍数 ≥ 2 的 miRNA 与正常对照组比较,模型组小鼠蜕膜中表达下调倍数 ≥ 2 的 miRNA 共 41 个。见表 2。

3.3 靶基因预测 从检测出的差异表达的 miRNA 中选取变化较为明显的 14 个 miRNA (mmu-

miR-7235-5p, mmu-miR-146a-5p, mmu-miR-155-5p, mmu-miR-185-5p, mmu-miR-192-5p, mmu-miR-202-3p, mmu-miR-328-3p, mmu-miR-34b-5p, mmu-miR-34c-5p, mmu-miR-483-5p, mmu-miR-676-3p, mmu-miR-700-3p, mmu-miR-872-5, mmu-miR-92b-3p), 通过 3 个数据库 (Targets can, microRNA org, pita), 共同对差异 miRNA 进行靶基因预测,结合既往自然流产基因检测研究中证实的相关基因,共筛选出 3 401 个预测靶基因;分别选取其中上调的 3 个 miRNA、下调的 3 个 miRNA,列出其预测的部分靶基因。见表 3。

3.4 qRT-PCR 验证结果 根据 miRNA 表达谱芯片检测的结果,选取 miR-92b-3p 用实时荧光定量 PCR 再次验证,逆转录引物: GCGCGTGAGCAG-GCTGGAGAAATTAACCACGCGCGGAGGC, 结果显示其变化趋势与芯片法的结果是吻合的,表明 miRNA 芯片检测结果真实有效;熔解曲线显示单峰者表明产物特异性良好。见表 4。

3.5 GO 分析 应用 GO 数据库,针对靶基因作进一步功能富集分析,获得差异 miRNA 靶基因总数,对应的靶基因的显著性基因功能的筛选以 $P < 0.01$ 为标准,富集积分 (enrichment score) = $-\log_{10}(P \text{ 值})^{[8]}$ 。这些靶基因主要富集在转录调控、DNA 模板化、RNA 聚合酶 II 启动子转录的阳性调控、多细胞生物发育、RNA 聚合酶 II 启动子转录的负调控以及蛋白转导等多个生物过程方面。

3.6 KEGG 通路富集分析 对这些靶基因进行调控通路分析,计算的结果会返回一个富集显著性的 P 值,越小的 P 值表明靶基因在该通路中富集表达。以 $P < 0.01$ 为标准, Enrichment Score = $-\log_{10}(P \text{ 值})$ 。排列在前 20 个显著富集的 KEGG 通路表明,这些 miRNA 的异常表达可能与癌症通路、PI3K-Akt 信号通路、细胞吞噬、肌动蛋白细胞骨架调控、黏着斑、轴突导向信号通路、MAPK 信号通路、PAP-1 信号通路等的激活有关。

4 讨论

RSA 是一种常见的妊娠并发疾病,其确切发病机制尚不十分明确。miRNAs 是一组内源性的非编码性 RNA,是一类新发现的生物基因表达调控因子,其长度为 19~24 个核苷酸^[9]。人类基因组中总共有 1 048 条 miRNA,这些 miRNA 可以调控超过 30% 的基因,从而参与调控机体生长发育等许多复杂的生命过程。也就是说,一个 mRNA 可以接受多个 miRNA 调控,单个 miRNA 也可以调控多个 mRNA^[10]。这种现象表明 miRNA 分子是基因调

表2 RSA肾虚证小鼠子宫蜕膜组织
表达下调倍数 ≥ 2 的miRNA

miRNA 名称	差异倍数	碱基序列
mmu-miR-202-3p	-40.01	TCTTCCCATGCGCTA
mmu-miR-7117-3p	-33.58	CTGGGGGAAAGAGAA
mmu-miR-6968-3p	-32.93	CTGGAGGGGAGACA
mmu-miR-7050-5p	-32.55	TCTCTCACCCCTTC
mmu-miR-6980-3p	-32.18	CTGGGGTGGGAAGGC
mmu-miR-6392-3p	-31.51	AGAGGACCCGGCA
mmu-miR-6897-3p	-30.61	CTGGGGGAAGAACAC
mmu-miR-146a-5p	-24.19	AACCCATGGAATT CAGTTC
mmu-let-7f-1-3p	-23.73	GGGAAGGCAATAG ATTGTAT
mmu-miR-185-5p	-21.51	TCAGGAACTGCCTTTCT
mmu-miR-872-5p	-21.32	CCTGAACTAACAAGTA- ACCT
mmu-miR-676-3p	-20.61	AGCTCAACAACCTCAGGA
mmu-miR-30e-3p	-20.25	GCTGTAAACATCCGACTG
mmu-miR-195a-3p	-20.15	GGAGCAGCACAGCC
mmu-miR-6987-5p	-19.44	CTCACCTGTCACCC
mmu-miR-192-5p	-19.21	GGCTGTCAATTC ATAGGTC
mmu-miR-28c	-18.26	TCAATAGACTGT GAGCTC
mmu-miR-6238	-15.68	CATTTCTCCACTGAC
mmu-miR-3620-5p	-8.76	TGCTTCCCAGCCCA
mmu-miR-362-3p	-8.16	TGAATCCTTGAAC AGGTGTG
mmu-miR-374c-5p	-7.81	CACTTAGCAGGTT GTATT
mmu-miR-7052-3p	-7.55	CTGGGAAGGAGGGG
mmu-miR-8103	-7.47	GGGAGAACAGAGAACA
mmu-miR-290a-3p	-7.42	GGGCTTAAACTA GGCGGC
mmu-miR-92b-3p	-6.09	GGAGCCGGGACG
mmu-miR-7020-5p	-4.17	CTGGTCACCTCTCC
mmu-miR-290b-3p	-4.12	TACTCAAATAT GGGGGC
mmu-miR-1188-3p	-4.08	GCAGGGTGTGGTGG
mmu-miR-466m-3p	-4.08	TGCGTGTGTATGTGTG
mmu-miR-31-5p	-4.04	CAGCTATGCCAGCATCT
mmu-miR-340-3p	-3.73	GCTATAAAGTAACTG AGACGGA
mmu-miR-1839-5p	-3.72	CAAGACCTGTTCT ATCTAC
mmu-miR-7241-3p	-3.69	GCTCTCCCATGAGTATC
mmu-miR-7226-5p	-3.64	CCCTCACACAATCAAC
mmu-miR-193a-5p	-3.52	TCATCTTGCCCGCA
mmu-miR-298-5p	-3.49	GGGAAGAACAGCCCTC
mmu-miR-338-5p	-3.49	CACTCAGCACCAGGA

表3 RSA肾虚证小鼠差异表达倍数 ≥ 2 的
miRNA 及其预测靶基因

miRNA 名称	差异倍数	预测靶基因
mmu-miR-34b-5p	36.75	ACSI4, NOL3, STK381, RTN4RL1, ZFP872, USP49 etc.
mmu-miR-7235-5p	47.82	SF1, PCGF2, VASH2, COX15, ZNA, YAP1, etc.
mmu-miR-328-3p	2.29	ANKRDLL, VBE2Z, GDA, CENPO, RSL, GCHL, etc.
mmu-miR-202-3p	-40.01	DCUNLD4, ESRRG, SLC16A9, FGD4, GOLGA4, CALU, etc.
mmu-miR-146a-5p	-24.19	GABPA, PFKFB2, SUS6, NF2, PIGC, POGK, etc.
mmu-miR-92b-3p	-6.09	FOXN2, BCAT2, PCMTDL, LHFPI2, LATS2, LUZPL, etc.

表4 正常妊娠小鼠与RSA肾虚证小鼠蜕膜
miR-92b-3p 表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	miR-92b-3p 的 Ct 值	内参 Ct 值	ΔCt	相对比值
正常对照	3	24.16 \pm 1.01	20.46 \pm 0.97	3.71 \pm 0.09	0.070 \pm 0.004
模型	3	25.47 \pm 0.64	19.87 \pm 0.61	5.60 \pm 0.10*	0.020 \pm 0.001*

注: $\Delta Ct =$ 目的基因 Ct - 内参基因 Ct; 相对表达量 = $2^{(-\Delta Ct)}$; 相对比值 = 目的基因相对拷贝数/内参基因相对拷贝数; 与正常对照组比较, * $P < 0.05$

控网络中的核心组成部分。最近的研究更进一步发现 miRNA 失调与人类癌症发生之间有密切的联系^[11]。而胚胎携带父系遗传物质, 相对于母体属于“外来的”半同种移植物却可被母体容受, 胚胎着床于子宫的过程类似于肿瘤对机体的侵袭过程。有研究证明, 在胚胎发育过程中 miRNA 具体重要作用^[12]。如谭彬等^[13]检测了自然流产模型小鼠与正常妊娠小鼠子宫蜕膜组织差异表达的 miRNAs, 利用 miRNAs 芯片数据发现小鼠流产蜕膜组织和正常蜕膜组织之间有 13 个 miRNAs 存在明显表达差异, 预测软件显示 miR-21 和 miR-26a 的靶基因分别是和妊娠相关的金属蛋白酶抑制因子 RECK 和白血病抑制因子 (leukemia inhibitory factor, LIF) 两个因子, 因此认为小鼠子宫蜕膜组织 miR-21 和 miR-26a 的差异性表达可能在小鼠胚胎自然流产过程中具体关键作用。李怡等^[14]研究认为, miR-10b 可能促进了滋养细胞浸润功能, 参与了早期自然流产的病理过程。WANG 等^[15]发现 miR-133a 在自然流产中具体重要作用, 推测 miR-133a 可能是通过抑制 HLA-G 的翻译过程而参与了自然流产这一事件的发生。HU Y 等^[16]研究报道, pri-miR-125a 的 A-T 单体型突变降低了 miR-125a 表达量, 从而减弱了对靶基因 LIF 受体和 ERBB2 的有效抑制, 可

能与习惯性流产患者易患性有关。余秋波等^[17]利用 U133 plus 2.0 芯片对自然流产绒毛和正常绒毛组织中绒毛外滋养细胞 EVT 的基因表达谱进行检测,发现与正常 EVT 相比,在自然流产 EVT 中,发现显著上调基因 219 个,下调基因 293 个,认为与滋养层细胞粘附、免疫应答、水解酶及凋亡等相关基因的差异表达可能与滋养细胞侵袭行为变化及自流产有关。miRNA 及其调节的特性与中医治病求本机制有着密切的关联性^[18]。

中医辨证论治因其确切稳定的疗效,被广泛应用于滑胎的治疗。肾藏精,主生殖,为“先天之本”,肾气肾精充足旺盛对女性生殖能力至关重要,是胞胎能够在子宫正常着床发育的前提。张锡纯《医学衷中参西录》云:“男女生育,皆赖肾气作强,肾旺自能荫胎也。”故“肾可系胎”,肾气肾精亏虚常常引起自然流产甚至 RSA。中医公认肾虚证是滑胎的主要证型,现代著名中医妇科医家罗颂平亦认为肾虚不能固摄、肾气亏虚是导致滑胎的主要病因,气血、冲任二脉的耗损是其主要病机。

本研究通过差异基因筛选寻找出 63 条表达显著的差异基因,由于本研究中异常调节的 miRNA 所调控的靶基因较多,通过对 miRNA 所调控的靶基因进行 GO 分析,构建 RSA 蜕膜组织差异 miRNA 与靶基因功能调控网络,得出处于网络核心调控位置的 miRNA 所调控的靶基因进行 GO 分析,构建 RSA 蜕膜组织差异 miRNA 与靶基因功能调控网络,得出处于网络核心调控位置的 miRNA、被调控的核心靶基因以及多个关键性基因功能。上述差异基因表达产物通过各种方式影响了转录调控、DNA 模板化、RNA 聚合酶 II 启动子转录的阳性调控、多细胞生物发育、RNA 聚合酶 II 启动子转录的负调控、蛋白转导等多种生物学过程,其中又涉及多种信号通路的改变,如癌症通路、PI3K-Akt 信号通路、细胞吞噬、肌动蛋白细胞骨架调控、黏着斑、轴突导向信号通路、MAPK 信号通路、PAP-1 信号通路等。这一结果证实了 RSA 肾虚证的形成可能是由其基因表达异常,进一步引起机体多种细胞生物学反应的复杂化多样化过程。

本研究从基因水平展开研究,结果初步显示两个证型间存在着差异表达基因谱,这也说明中医临床证型的分类具有特定的生理指标和特定的差异表达基因的依据^[2]。因本研究的样本量仍不够大,其结果还有待下一步扩大样本量进行验证,从而为阐明中医“证”本质提供更加客观的生物学标志物,亦有利于深入了解中药在 RSA 治疗中的分子和基因

调控机制。

参考文献:

- [1] KUON R J, WALLWIENER L M, GERMEYER A, et al. Establishment of a standardized immunological diagnostic procedure in RM patients[J]. *J Reprod Immunol*, 2012, 94(1): 55.
- [2] 杨婵娟, 刘宏伟, 王丽春. 慢性乙型肝炎肝郁脾虚证和脾胃湿热证患者的差异表达基因研究初探[J]. *中国中西医结合杂志*, 2012, 32(8): 1032-1037.
- [3] 史硕博, 陈涛, 赵学明. 转录组平台技术及其在代谢工程中的应用[J]. *生物工程学报*, 2010, 26(9): 1187-1198.
- [4] 刘平, 胡义杨, 倪力强. 从辨证论治的思维特征探索证候分类研究的比较参考系[J]. *中国中西医结合杂志*, 2006, 26(5): 451-454.
- [5] 杨裕华, 李震. 肾虚证及其“以药测证”的基因芯片研究进展[J]. *天津中医药*, 2008, 25(4): 348-350.
- [6] 郭蕾, 王永炎, 张志斌. 关于证候概念的诠释[J]. *北京中医药大学学报*, 2003, 22(2): 57.
- [7] 曹晓梅. 补肾安胎冲剂对复发性流产小鼠蜕膜组织 VEGF、VEGFR2、RAS、MAPK 蛋白表达影响的实验研究[D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2016.
- [8] 曹海明, 武哲丽, 叶小卫. 基于生物信息学方法分析不同证型组肝癌组织中差异表达 MicroRNA[J]. *时珍国医国药*, 2015, 26(10): 2549-2552.
- [9] GARZON R, FABBRI M, CIMMINO A, et al. MicroRNA expression and function in cancer[J]. *Trends Mol Med*, 2006, 12(12): 580.
- [10] KOZOMARA A, GRIFFITHS-JONES S. miR Base: integrating microRNA annotation and deep sequencing data[J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39: 152-157.
- [11] WONG C M, KAI A K, TSANG F H, et al. Regulation of hepatocarcinogenesis by microRNAs[J]. *Front Biosci (Elite Ed)*, 2013, 18(P1/398): 49-60.
- [12] JIN H, YU Y, CHRISLER W B, et al. Delivery of MicroRNA-10b with polylysine nanoparticles for inhibition of breast cancer cell wound healing[J]. *Breast Cancer (Auckl)*, 2011(6): 9.
- [13] 谭彬, 何俊琳, 刘学庆. 自然流产模型小鼠子宫蜕膜组织 miRNAs 的表达[J]. *第三军医大学学报*, 2010, 32(15): 1663-1665.
- [14] 李怡, 吴涛, 栾丽霞. 早期自然流产绒毛组织 miR-10b 表达及意义[J]. *现代生物医学进展*, 2013, 13(4): 620-623.
- [15] WANG X, LI B, WANG J, et al. Evidence that miR-133a causes recurrent spontaneous abortion by reducing HLA-G expression[J]. *Reprod Biomed Online*, 2012, 25(4): 415-424.
- [16] HU Y, LIU C M, QI L, et al. Two common SNPs in pri-miR-125a alter the mature miRNA expression and

associate with recurrent pregnancy loss in a Han-Chinese population[J]. *RNA Biol*, 2011, 8(5):861-872.

[17] 余秋波, 胡建刚, 王应雄. 自然流产患者绒毛 EVT 的基因芯片初步分析[J]. *重庆医科大学学报*, 2010, 35

(1):18-21.

[18] 虞桂, 王阶. miRNA 及其调控网络与中医治病求本机制研究[J]. *中华中医药杂志*, 2012, 7(11): 2789-2791.

(收稿日期:2019-01-23;编辑:曹健)

MicroRNA Expression Profile in Decidual Tissue of the Uterus in Mice with Recurrent Spontaneous Abortion with Kidney Deficiency Syndrome and a Bioinformatics Analysis

WANG Rui-xue, DONG Xiao-peng, CHU Ji-jun

(The First Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine, Anhui Hefei 230031, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expression characteristics of microRNAs (miRNAs) in the decidual tissue of the uterus in mice with recurrent spontaneous abortion (RSA) with kidney deficiency syndrome. **Methods** The gene microarray technique was used to measure miRNAs in decidual tissue samples collected from normal mice and RSA mice, and Genespring software was used for miRNA screening and functional analysis. A bioinformatics analysis was performed to investigate the role of differentially expressed miRNAs and their targeted genes in the development and progression of RSA. **Results** Microarray results showed 63 differentially expressed miRNAs between normal mice and RSA mice with kidney deficiency syndrome, among which 22 were upregulated and 41 were downregulated, and the expression of miRNAs was further verified by quantitative real-time PCR. The KEGG pathway enrichment analysis and the gene ontology analysis showed that the differentially expressed miRNAs were mainly involved in the PI3K-Akt signaling pathway, cytophagy pathways, cancer pathways, focal adhesion pathways, actin cytoskeleton regulatory pathways, axon guidance signals, the MAPK signaling pathways, and the PAPI signaling pathways. **Conclusion** Differentially expressed miRNAs are observed in the decidual tissue of the uterus between normal mice and RSA mice with kidney deficiency syndrome, which may be involved in the development and progression of RSA with kidney deficiency syndrome.

[Key words] Recurrent spontaneous abortion; MicroRNA; Differential expression; Kidney deficiency syndrome; Target gene