

miRNA-494调控PI3K/AKT/mTOR通路促进滋养细胞增殖和迁移

刘玉兰¹, 何凤屏^{2*}, 郭义红², 马秋林², 张咏梅², 陈陆静², 刘珮瑜², 范舒舒¹, 郭艳乐¹

¹汕头大学医学院附属粤北人民医院, 产前诊断中心, 广东 汕头

²东莞市妇幼保健院, 生殖遗传研究所, 广东 东莞

收稿日期: *****

摘要

目的: 探讨不明原因复发性流产(unexplained recurrent spontaneous abortion, uRSA)小鼠模型的微小RNA (miRNA)-494、PI3K/AKT/mTOR [哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)]的表达和促进胎盘滋养细胞增殖和迁移以及调节子宫和胎盘的炎症反应和免疫功能的作用机制。方法: 首先构建了miRNA-494的过表达载体, 实验分成miRNA-494模拟物组、模拟物对照组、miRNA-494抑制剂组、抑制剂对照组, 采用脂质体2000分别转染miRNA-494模拟物(50 nmol/L)、miRNA-494抑制剂(50 nmol/L), 使用实时荧光定量PCR 技术检测miRNA-494模拟物组、模拟物对照组、miRNA-494抑制剂组、抑制剂对照组的表达水平; 采用克隆形成实验检测各组胎盘滋养细胞的增殖能力, transwell法检测各组胎盘滋养层细胞的迁移程度, western blot检测各组胎盘滋养层细胞PI3K、AKT、mTOR的表达水平。结果: miRNA-494转染48 h后, miRNA-494模拟物组滋养细胞的miRNA-494表达水平明显高于模拟物对照组、抑制剂对照组和miRNA-494抑制剂组($P < 0.001$); 反之miRNA-494抑制剂组滋养细胞的miRNA-494表达水平明显低于对照组和miRNA-494模拟物组($P < 0.001$); miRNA-494抑制剂组的PI3K/AKT和mTOR表达水平明显低于抑制剂对照组、模拟物对照组和miRNA-494模拟物组($P < 0.001$); miRNA-494抑制剂组的滋养细胞增殖和迁移比例显著低于抑制剂对照组、模拟物对照组和miRNA-494模拟物组($P < 0.01$)。结论: miRNA-494通过调节Akt/PI3K/mTOR基因的表达, 可以促进胎盘滋养细胞增殖和迁移, 并参与调节子宫和胎盘的炎症反应和免疫功能, 表明了调节miRNA-494的表达水平可能作为uRSA的预防和治疗的新靶点。

关键词

miRNA-494, PI3K/AKT/mTOR, 滋养细胞, 不明原因复发性流产

MiRNA-494 Regulates the PI3K/AKT/mTOR Pathway to Promote Trophoblast Proliferation and Migration

*通讯作者。

文章引用: 刘玉兰, 何凤屏, 郭义红, 马秋林, 张咏梅, 陈陆静, 刘珮瑜, 范舒舒, 郭艳乐. miRNA-494 调控PI3K/AKT/mTOR 通路促进滋养细胞增殖和迁移[J]. 生物医学, 2024, 14(3): 369-378. DOI: 10.12677/hjbm.2024.143041

Yulan Liu¹, Fengping He^{2*}, Qiulin Ma², Yongmei Zhang², Hong Zeng², Lujing Chen²,
Peiyu Liu², Yihong Guo², Shushu Fan¹, Yanle Guo¹

¹Prenatal Diagnosis Center, Shantou University School of Medicine Affiliated Yuebei People's Hospital, Shantou Guangdong

²Institute of Reproductive Genetics, Dongguan Maternal and Child Health Hospital, Dongguan Guangdong

Received: Apr. 15th, 2024; accepted: May 31st, 2024; published: Jun. 12th, 2024

Abstract

Objective: To investigate the expression of miRNA-494, PI3K/AKT/mTOR [mammalian target of rapamycin, mTOR] in a mouse model of unexplained recurrent spontaneous abortion (uRSA), and their mechanisms in promoting placental trophoblast proliferation and migration, as well as regulating inflammation and immune function in the uterus and placenta. **Method:** Firstly, an over-expression vector of miRNA-494 was constructed, and the experiment was divided into miRNA-494 mimic group, mimic control group, miRNA-494 inhibitor group, and inhibitor control group. Liposome 2000 was used to transfect miRNA-494 mimic group (50 nmol/L) and miRNA-494 inhibitor group (50 nmol/L), respectively. Real time fluorescence quantitative PCR technology was used to detect miRNA-494 mimic group, mimetic control group, and miRNA-494 inhibitor group. The expression level of the inhibitor control group; The proliferation ability of placental trophoblast cells in each group was detected using clone formation experiments, the migration degree of placental trophoblast cells in each group was measured using Transwell method, and the expression levels of PI3K, AKT, and mTOR in placental trophoblast cells in each group were detected using Western blot. **Result:** After 48 hours of miRNA-494 transfection, the expression level of miRNA-494 in the trophoblast cells of the miRNA-494 mimic group was significantly higher than that of the mimic control group, inhibitor control group, and miRNA-494 inhibitor group ($P < 0.001$); On the contrary, the expression level of miRNA-494 in trophoblast cells in the miRNA-494 inhibitor group was significantly lower than that in the control group and miRNA-494 mimic group ($P < 0.001$); The expression levels of PI3K/AKT and mTOR in the miRNA-494 inhibitor group were significantly lower than those in the inhibitor control group, mimic control group, and miRNA-494 mimic group ($P < 0.001$); The proportion of trophoblast proliferation and migration in the miRNA-494 inhibitor group was significantly lower than that in the inhibitor control group, mimic control group, and miRNA-494 mimic group ($P < 0.01$). **Conclusion:** miRNA-494 can promote the proliferation and migration of placental trophoblasts by regulating the expression of Akt/PI3K/mTOR genes, and participate in regulating the inflammatory response and immune function of the uterus and placenta, indicating that regulating the expression level of miRNA-494 may serve as a new target for the prevention and treatment of uRSA.

Keywords

miRNA-494, PI3K/AKT/mTOR, Trophoblast Cell, Unexplained Recurrent Spontaneous Abortion

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

在复发性流产中 uRSA 占 60%，uRSA 患者并发早期妊娠胚胎丢失(early pregnancy embryo loss,

EPEL), 是当今临床诊治的难点, 更是严重危害妇女生育功能和临床迫切需要解决的疑难杂症[1]。由于 uRSA 病因不清楚, 其发病机制也未阐明, 所以目前缺乏诊断 EPEL 的标志物和有效的治疗手段[2] [3]。在正常妊娠过程中, 母胎免疫耐受达到平衡状态; 如果该平衡被打破, 则发生 EPEL、uRSA 和妊娠期高血压等病理性妊娠疾病[4]。近年来研究 miRNAs 在免疫细胞的生长发育、免疫应答的调控等过程中发挥重要的作用, 尤其是 miRNA 参与调节胚胎发育其作用机制及调节特点在免疫系统中具有独特性[3]。miRNA 在胚胎发育过程中起着关键作用, 其失调也会导致不良妊娠事件的发生。在不同的组织中观察到 miRNA 整体表达量的差异, 这表明精确的 miRNA 剂量控制在生物体发育中都发挥重要作用[5]。microRNAs (miRNAs) 是一类长度为 18~24 个核苷酸的非编码小分子 RNA, 对多种生物学过程具有重要的调控作用。miRNA 参与了机体的各种的生理病理过程, 如生长、发育、分化、炎症、肿瘤的发生[6]。近期研究表明, miRNA-494 在妊娠胎盘功能调节和母体对胎儿免疫反应中起关键作用, miRNA-494 异常表达导致流产等不良妊娠结局[7]。miRNA 的表达异常可能参与不良妊娠和妊娠并发症的进展, 并作为母-胎对话的重要媒介参与调控巨噬细胞极化, 进一步驱动蜕膜巨噬细胞炎症反应和免疫功能。已有研究表明, 在不良妊娠疾病中, miRNA 可通过影响 NF- κ B、STAT1 等信号转导调控蜕膜巨噬细胞极化表型及其功能, 从而参与疾病的发生发展[8]。miRNA 参与调控滋养细胞增殖、迁移、侵袭、凋亡、血管生成, 以及在复发性流产的发生机制中发挥重要作用[4] [5]。

最新研究显示 mTORC1 在小鼠蜕膜基质细胞和滋养细胞中均有表达, mTOR 基因通过上游 Akt/PI3K 基因调控参与 uRSA 的发病机制[9] [10]。本文拟研究 miRNA-494 促进滋养细胞增殖和迁移, 是否对 Akt/PI3K/mTOR 基因表达有调控影响胎盘功能的作用, 为 miRNA-494 在 uRSA 中的作用提供新的理论基础。

2. 材料与方法

2.1. 实验材料

2.1.1. 细胞

滋养层细胞系 HTR-8/SVneo 购自上海帛科生物公司。

2.1.2. 主要试剂及设备

胎牛血清(FBS)、RPMI-1640 培养基购自上海帛科生物公司; DMEM 培养基购自上海雅吉; 引物及探针由广州市锐博生物公司提供; cDNA Synthesis Kit、SYBR Green PCR Master Mix Kit、Applied Biosystems ABI 7500 均购自美国 Applied Biosystems 公司; Lipofec-tamine 2000 购自福州奕澜瑞生物公司; RIPA 裂解液、0.25%的胰蛋白酶、电化学发光检测试剂盒购自上海爱必信; BCA 蛋白检测试剂盒购自美国赛默飞; Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒购自北京 Biosea; FL 流式细胞仪购自美国贝克曼库尔特; TLR4、NF- κ B、白介素 6 (IL-6)、TNF- α 鼠抗兔单克隆抗体和辣根过氧化物酶酶标二抗均购自英国 Abcam 公司; miRNA-146、TLR4、NF- κ B、TNF- α 、IL-6 和内参 GAPDH 引物及探针由广州市锐博生物有限公司提供; miRNA-146 抑制剂(50 nmol/L)、miRNA-146 抑制剂对照、miRNA-146 模拟物(50 nmol/L)和 miRNA-146 模拟物均购自上海生工基因公司。

2.2. 实验方法

2.2.1. 滋养细胞培养

HTR-8/SVneo 滋养细胞株培养于含 10% 灭活胎牛血清、100 U/mL 青霉素的 RPMI-1640 培养基中, 放置于 CO₂ 培养箱, 5% CO₂, 37.0°C 和 100% 湿度条件下培养。稳定传代后收集对数生长期细胞进行后

续实验。

2.2.2. miRNA-494 过表达载体的构建

首先利用 Primer 5.0 设计包含 miRNA-494 前体序列的上下游引物，再在上游引物的 5'端前面加上保护碱基和 BamH Ⅰ 顶切位点序列(CGGGATCC)，下游引物的 5'端加上保护碱基和 EcoR Ⅰ 顶切位点序列(CGGAATTC)。引物委托上海生工生物有限公司进行合成，其序列见表 1 所示：

Table 1. Target genes and primer sequences

表 1. 目标基因及引物序列

基因	引物序列
miRNA-494	上游：5'-TGAAACATACACGGGATCCACTC-3' 下游：5'-GCGAGCACAACGGAATTCACGAC-3'
TLR4	上游：5'-CGCTTTCACCTCTGCCTTCACTACAG-3' 下游：5'-ACACTACCACAATAACCTTCCGGCTC-3'
NF-κB	上游：5'-CTGAACCAGGGCATACTGT-3' 下游：5'-GAGAAGTCCATGTCCGCAAT-3'
IL-6	上游：5'-GAGAAGGGGGACCAACTCAG-3' 下游：5'-GGTCTGTTGGGAGTGGTATCC-3'
TNF-α	上游：5'-CACACAAGTCTCCGCTAT-3' 下游：5'-GTGCGATCCAGTCGCG-3'
GAPDH	上游：5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3' 下游：5'-GGCATGGACTGTGGTGATGAG-3'

2.2.3. qRT-PCR 检测 miRNA-494 和 miRNA-494 转染和分组

采用 qRT-PCR 检测 miRNA-494 的表达，在碾碎组织中加入 Trizol 以提取血清中总 RNA，使用逆转录试剂盒进行反转录，其间严格按说明书进行操作。miRNA-494 正向和反向引物见表 1，内参 U6 引物及探针由广州市锐博生物有限公司提供，U6 正向引物为 CGCTTCGG CAGCACATATACTA，反向引物为 AACGCTTCACGAATTTGCGTAC。

miRNA-494 转染：VSMC 消化离心后以合适密度接种到培养板，24 h 后细胞融合到 60%~70%时按照 Lipofec-tamine2000 说明书进行操作，分成 miRNA-494 模拟物组和模拟物阴性对照组、miRNA-494 抑制剂组和抑制剂阴性对照组，分别转染 miRNA-494 模拟物(50 nmol/L)、miRNA-494 抑制剂(50 nmol/L)，模拟物阴性对照组和抑制剂阴性对照组加入同等剂量 lipofectamine2000 及 PBS，5 h 后换成完全培养基，荧光显微镜观察转染效率。

2.2.4. 酶联免疫吸附法

采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测血清 IL-6 和 TNF-α 的表达水平，在 Thermo Scientific Varioskan LUX 全自动酶标仪上进行操作，IL-6 和 TNF-α 的 ELISA 试剂盒由广州市锐博生物科技有限公司提供。

2.2.5. 化学发光技术

在小鼠模型的尾静脉取 1~3 ml 外周血，放置不抗凝干燥管，常温下离心 10~15 分钟，收取血清检测雌激素、孕激素等。采用 Cobas 601 化学发光仪检测血清雌激素和孕激素水平，购自罗氏(中国)投资有限

公司。

2.2.6. 滋养细胞生长活力的实验

采用 MTT [3-(4, 5-二甲基噻唑-2-基)-2, 5-二苯基-2-四唑溴化[3-(4,5)-dimethylthiaziazolo (-z-y1)-3, 5-di-phenyltetrazolium bromide, MTT]比色法测定滋养细胞生长的活力。miRNA-494 转染滋养细胞接种于密度为 1×10^3 个细胞/孔。磷酸盐缓冲盐水冲洗两次后, 10 μ L MTT 溶液稀释为 5 mg/mL, 加到每一孔中。将培养皿在 37 $^{\circ}$ C 下培养 10 分钟 4 h, 然后添加 150 μ L 的二甲基亚砷, 置摇床上低速震荡 10 分钟后, 使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪 OD 490 nm 处测量各孔的吸光值。

2.2.7. 滋养细胞增殖和凋亡实验

采用细胞克隆实验检测滋养细胞增殖能力, 在生长期细胞加入 0.25% 的胰蛋白酶, 消化后吹打为单个细胞, 实验评价滋养细胞的增殖能力。取对数生长期的细胞, 用 0.25% 的胰蛋白酶消化并吹打为单个细胞, 离心后计数, 取需要的细胞量(200~500 个/孔)重悬于对应的培养基, 接种于细胞培养皿里。于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 及饱和湿度的细胞培养箱内培养 2~3 周, 在显微镜下能观察细胞克隆的情况。

滋养细胞凋亡实验使用 Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒(北京 Biosea 生物技术有限公司)进行滋养细胞凋亡检测、鉴定和定量滋养凋亡细胞。将 miRNA 转染的细胞接种在密度为 1×10^5 个细胞/孔的 6 孔板中, 用冷磷酸盐缓冲盐水洗涤处理细胞两次, 并将其重新悬浮在含有 10 μ L 膜联蛋白 V 和 5 μ L PI 的 200 μ L 结合缓冲液中。将贴壁细胞和漂浮细胞结合, 按照说明操作, 使用 FL 流式细胞仪(美国贝克曼库尔特)测量百分比, 以区分凋亡细胞(膜联蛋白 V 阳性和 PI 阴性)和坏死细胞(膜联蛋白 V 和 PI 阳性)。

2.2.8. 滋养细胞迁移实验

采用 transwell 小室实验评估胎盘滋养细胞的迁移能力。按照 1×10^5 /ml 的比例将滋养细胞悬液加入 transwell 上室内, 每孔 100 μ l 在下室中加入 200 μ l 含 20% FBS 的 DMEM 培养基, 放入 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 细胞培养箱中孵育 12 h, 用 PBS 清洗后, 加入甲醛固定 20 min, 2.5% 的结晶紫染色 15 min, 用棉签轻轻拭去小室内侧细胞, 在倒置显微镜下观察记录小室内 5 个视野内的细胞数量。

2.2.9. western blotting 检测

采用 western blotting 检测 Akt、PI3K、mTOR、NF- κ B、IL-6 和 TNF- α 蛋白的表达水平, 抗体购置 Abcam。采用超敏 ECL 化学发光液试剂盒(上海爱必信生物科技有限公司)进行发光显影, 用 Imagequant TL 软件分析蛋白条带。

2.3. 统计学分析

SPSS21.0 软件进行统计学数据分析, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组比较采用 t 检验, 计数资料用例或百分率表示, 采用 Spearman 分析小鼠模型 miRNA-494 表达与 Akt、PI3K 和 mTOR 水平的相关性, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3. 结果

3.1. 两组性激素 E2、P、miRNA-494、IL-6、TNF- α 水平比较比较

与对照组相比, uRSA 模型组的雌二醇(E2)水平显著下降[92.27 ± 10.29 vs. 36.59 ± 7.22 ($P < 0.001$)], 孕激素(P)水平也下降, 66.31 ± 8.78 vs. 13.53 ± 3.12 ($P < 0.001$)。

与对照组比较, uRSA 小鼠的 miRNA-494 表达水平下调分别为[1.51 ± 0.47 vs. 5.83 ± 1.86 ($P < 0.001$)]。uRSA 组炎症因子白介素(IL6)肿瘤坏死因子(TNF)- α 的表达水平明显升高, 与对照组比较分别为: IL-6 为

20.13 ± 5.79 vs. 109 ± 18.73 ($P < 0.001$), TNF- α 13.27 ± 5.79 vs. 86.74 ± 13.85 ($P < 0.001$), 见表 2。miRNA-494 表达水平显著下调 [(1.51 ± 0.47)% 比 (5.83 ± 1.86)%], $P < 0.001$]; BeWo 细胞转染 miRNA-494 mimics 24 h 后的细胞增殖的百分数显著高于对照组 [(17.2 ± 3.2)% 比 (5.1 ± 1.8)%] 和 miRNA-494 inhibitors 组 [(17.2 ± 3.2)% 比 (2.5 ± 0.7)%],

Table 2. Comparison of serum miRNA-494, IL-6, and TNF- α levels between two groups ($\bar{x} \pm s$)

表 2. 两组血清 miRNA-494、IL-6、TNF- α 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数(n)	miRNA-494 相对表达量	IL-6 (ng/ml)	TNF- α (ng/ml)
对照组	10	5.83 ± 1.86	20.13 ± 5.79	13.27 ± 5.79
uRSA 组	10	1.51 ± 0.47	109 ± 18.73	86.74 ± 13.85
T	-	10.431	59.146	48.689
P	-	0.001	0.000	0.000

3.2. miRNA-494 过表达载体的构建

实验所克隆的 miRNA-494 前体大小为 560 bp, 扩增的目的片段与预期大小一致, 且条带单一、无杂带。提取质粒经测序比对, 结果与预期相符, 无杂峰干扰, 所提取的质粒经核酸蛋白浓度测定仪检测质粒浓度高、质量好, 可用于细胞转染实验。

3.3. miRNA-494 分别与 IL-6、TNF- α 进行相关分析

uRSA 患者血清中 miRNA-494 表达水平明显下调, IL-6 和 TNF- α 表达水平也升高。miRNA-494 分别与 IL-6 和 TNF- α 呈负相关, 分别为 $r = -0.683$, $r = -0.721$, 均为 $P < 0.01$ 。

3.4. miRNA-494 在滋养细胞的表达

结果显示, miRNA-494 模拟物组在滋养细胞中呈高水平表达, miRNA-494 抑制物组在滋养细胞中呈低水平表达, 见图 1(a)。

3.5. miRNA-494 过表达水平与滋养细胞增殖能力

细胞克隆实验显示, miRNA-494 模拟物增加滋养细胞的克隆形成, 提示上调 miRNA-494 过表达具有促进滋养细胞增殖的能力; 相反 miRNA-494 抑制物抑制滋养细胞的克隆形成, 抑制滋养细胞的增殖, 详见(图 1(b))。

3.6. miRNA-494 与滋养细胞生长活力

MTT 结果显示, 在 miRNA-494 模拟物(100 nmol/L)的作用下提高滋养细胞生长活力、且呈高水平表达($P < 0.001$); 相反 miRNA-494 抑制物(100 nmol/L)的作用下抑制滋养细胞生长活力($P < 0.01$) (见图 1(c))。

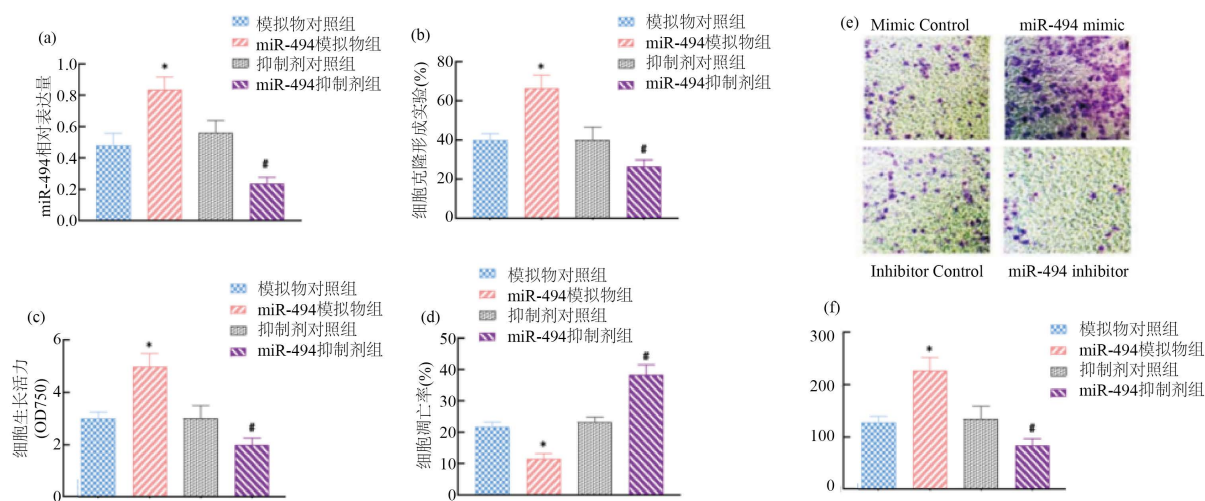
3.7. miRNA-494 的表达与滋养细胞凋亡

与对照组相比, miRNA-494 模拟物组显著降低细胞凋亡率($P < 0.001$), miRNA-494 抑制剂组显著增加细胞凋亡率(图 1(d))。

3.8. miRNA-494 过表达与滋养细胞迁移能力

Transwell 实验结果显示, HTR-8/SVneo 细胞经 miRNA-494 转染后, miRNA-494 模拟物组的滋养细

胞生长和迁移能力显著高于对照组和 miRNA-494 抑制剂组(图 1(e)和图 1(f)); miRNA-494 过表达促进滋养细胞的生长和迁移($P < 0.001$), 相反, 下调 miRNA-494 表达水平抑制滋养细胞的生长和迁移($P < 0.01$), 见图 1(e)和图 1(f)。



(a): miR-494 模拟物、抑制剂通过 PCR 检测滋养细胞和对照组 miRNA-494 的表达水平* $P < 0.01$, # $P < 0.01$; (b): miR-494 模拟物、抑制剂通过克隆实验检测滋养细胞增殖; * $P < 0.05$, # $P < 0.01$; (c): miR-494 模拟物、抑制剂通过 MTT 检测滋养细胞的生长活性; * $P < 0.001$, # $P < 0.01$; (d): 采用使用 Annexin V-FITC/PI 凋亡检测颗粒细胞凋亡的百分率; * $P < 0.001$; (e): 转染 miRNA-494 促进滋养细胞生长能力, mimic control 为模拟物对照组滋养细胞的生长结果; miR-494 mimic 组为 HTR-8/SVneo 细胞经 miRNA-494 模拟物转染后的滋养细胞的生长结果; inhibitor control 为抑制剂对照组滋养细胞的生长结果, miR-494 inhibitor 为 HTR-8/SVneo 细胞经 miRNA-494 抑制物转染后的的滋养细胞生长结果; (f)为 HTR-8/SVneo 细胞经 miRNA-494 模拟物和抑制物转染后的滋养细胞迁移能力, * $P < 0.001$, # $P < 0.01$ 。

Figure 1. Effects of miRNA-494 on proliferation, growth, migration, and apoptosis of trophoblast cells

图 1. miRNA-494 对滋养细胞增殖、生长、迁移和凋亡的影响

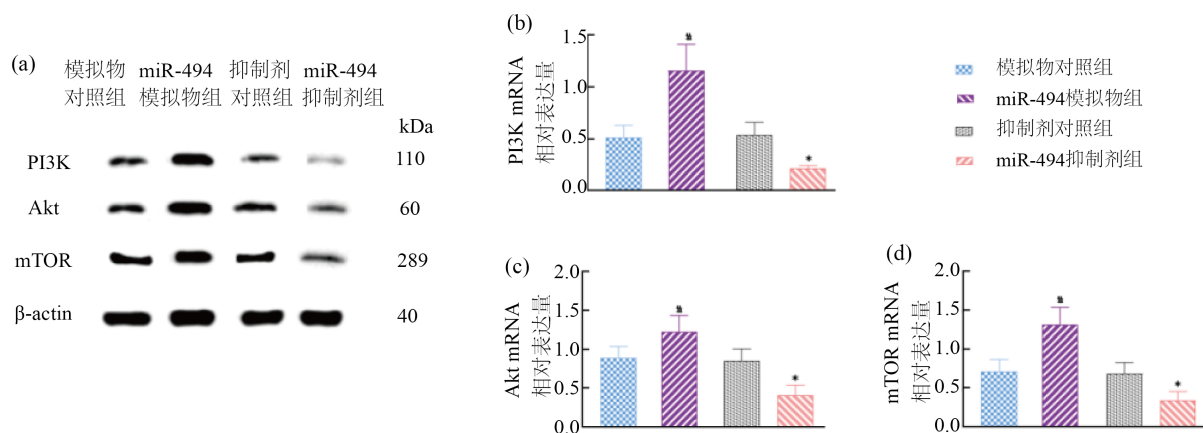
3.9. miRNA-494 过表达对 Akt、PI3K 和 mTOR 蛋白表达的影响

采用 westrn blotting 检测 Akt、PI3K 和 mTOR 蛋白, 与对照组比较, miRNA-494 过表达可显著提高 Akt、PI3K 和 mTOR 的表达水平($P < 0.01$, $P < 0.001$), 反之可显著降低 Akt、PI3K 和 mTOR 的表达水平(图 2(a)~(c)), 且 miRNA-494 水平与 Akt 和 PI3K 和水平分别呈正相关($r = 0.699$, $r = 0.736$, $P < 0.01$), 与 mTOR 水平也呈正相关($r = 0.725$, $P < 0.01$)。

4. 讨论

人类胎盘与胎儿和母体环境相连接, 滋养层位于胎盘绒毛表面, 与母体血液直接接触, 在滋养层细胞表达并被称为“滋养层细胞”的独特 miRNAs 在正常和病理妊娠期间可能表现出特殊功能[11]。胎盘 miRNAs 包装在外泌体能够向母体和/或胎儿组织传递独特的信号[12], 在建立和维持母-胎免疫耐受机制。近年来, 在生殖领域中 miRNA 对疾病发生发展的调节作用越来越受重视, 生理状态下 miRNA 参与调控内膜容受性建立、滋养层细胞侵袭、母-胎交互对话等胚胎植入过程中的重要生物学行为来维持妊娠[8]。妊娠期间滋养细胞来源的外泌体转运 miRNA 并诱导单核细胞募集和分化来调节母体免疫, 而巨噬细胞外泌体也通过携带外源性 miRNA 参与调控滋养层细胞的生物学功能, 从而实现母-胎对话[5]。

mTOR 基因定位于人类染色体 1p36.2, 其表达产物哺乳动物雷帕霉素靶蛋白是一种丝氨酸/苏氨酸蛋



(a)为采用 western blotting 分析小鼠模型 **miRNA-494** 与 **Akt**、**PI3K** 和 **mTOR** 通路蛋白的表达水平；(b)为 PCR 技术检测 **PI3K** 在小鼠模型的表达水平，* $P < 0.001$ ，# $P < 0.01$ ；(c)为 PCR 技术检测 **Akt** 在小鼠模型的表达水平，* $P < 0.001$ ，# $P < 0.01$ ；(d)为 PCR 技术检测 **mTOR** 在小鼠模型的表达水平，* $P < 0.001$ ，# $P < 0.01$ 。

Figure 2. Expression analysis of miRNA-494 and Akt, PI3K, and mTOR proteins

图 2. miRNA-494 与 Akt、PI3K 和 mTOR 蛋白表达分析

白激酶，通过磷酸化信号通路将下游效应器调控大量的生命过程，包括转录、翻译和核糖体的生物组合等，是调控细胞生长、分化、增殖、血管形成的关键通路；**mTOR** 通路影响胚胎干细胞及早期胚胎发育，并在小鼠囊胚的活化与胚胎着床中起到至关重要的作用[13]；已有研究证实 **mTOR** 在小鼠蜕膜基质细胞和滋养细胞中均有表达，在胚胎种植、生长和发育过程中发挥极其重要的作用[14]。**mTOR/RPS6KB1** 通路调控滋养细胞蛋白翻译，**mTOR** 基因缺陷的囊胚外层滋养细胞功能异常。本文细胞实验显示，**miRNA-494** 过表达上调 **mTOR** 蛋白促进滋养细胞增殖和分化，提示 **mTOR** 在早期妊娠维持中发挥重要的作用，但是有关 **miRNA-494** 调控 **Akt/PI3K/mTOR** 信号通路与人类妊娠和胚胎方面等研究目前未见报道。

miRNA 的异常改变也与不良妊娠的发生发展有关。来源于 M1 巨噬细胞的细胞外小泡递送 **miR-146a-5p** 和 **miR-146b-5p**，通过靶向 **TRAF6** 抑制复发性自然流产中滋养层的迁移和侵袭，**miR-146a-5p** 和 **miR-146b-5p** 低水平表达会导致不良妊娠结局[15]。**miR-206** 的异常表达通过调节 **Wnt** 信号传导诱导先兆子痫和不良妊娠的发生[16]。**MiR-148a-3p** 可能通过调节 **HOXC8** 而导致复发性植入失败的蜕膜化缺陷和不良妊娠结局[17]。Liu 等人证实 **miRNA-100-5p** 下调并激活 **JAK/STAT** 信号通路促进子痫前期和不良妊娠事件的进展[18]。本文的研究发现，**miRNA-494** 过表达提高 **Akt/PI3K** 和 **mTOR** 的表达水平，同时也影响雌激素和孕激素水平升高，反之，抑制剂组 **miRNA-494** 表达水平的下调、**Akt/PI3K** 和 **mTOR** 表达水平下调，雌激素和孕激素水也下降，提示 **miRNA-494** 低水平表达与雌激素和孕激素水下降有密切关系。本文认为，**uRSA** 患者由于 **miRNA-494** 低表达水平和雌、孕激素水平紊乱，促使体内的 **Akt/PI3K** 和 **mTOR** 水平下调，诱发母胎界面氧化应激和炎症反应，推测 **miRNA-494** 可能是一个妊娠免疫适应的关键调节因子，对免疫巨噬细胞的募集起到至关重要的作用。可见，**miRNA-494** 在免疫系统和炎症反应中发挥重要的调节作用，其调节特点在免疫系统中具有独特性。本研究前期成功构建了 **miRNA-494** 的过表达载体，与模拟物对照组和抑制剂对照组比较，过表达 **miRNA-494** 明显提高滋养细胞生长活力，**miRNA-494** 抑制剂组显著降低滋养细胞生长活力[19]；同时，过表达 **miRNA-494** 也加快滋养细胞增殖速度、降低滋养细胞凋亡率，反之滋养细胞增殖速度减慢和增加滋养细胞凋亡率。体现出 **miRNA-494** 在生殖细胞中发挥的调节作用，其机制可能是 **miRNA-494** 异常表达诱导胎盘滋养细胞过早衰老和凋亡，导致不良妊娠结局

[20]。

本文进一步研究 miRNA-494 与炎症因子 IL-6 和 TNF- α 的研究。过表达 miRNA-494 下调 IL-6 和 TNF- α 的表达水平，它们之间显示负性相关，由此可见 miRNA-494 可能通过 mTOR 通路参与抑制炎症因子表达、并对母胎界面的免疫反应具有一定的调控作用，正如与 mTOR 相关的通路，如信号转导因子和转录激活因子 3 signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) 信号通路也参与免疫细胞活化和胎盘形成，STAT3 表达和功能异常影响胎盘形成，STAT3 基因 rs1053023 多态性与 uRSA 风险相关[21]，可能是通过 Akt/PI3K/mTOR 信号通路发挥调控作用，其机制可能与下游的炎症因子参与免疫反应有密切关联。miRNA-494、miRNA-155 和 miRNA-124 均从不同方式参与介导母-胎界面 STAT1/STAT3 对胎盘免疫细胞的调节功能，均佐证本文的实验结果。

综上所述，本研究成功构建了 miRNA-494 的过表达载体，并发现 miRNA-494 低表达可能参与早期流产和不良妊娠的进展。miRNA-494 通过促进 Akt/PI3K/mTOR 基因的表达，参与调节子宫和胎盘的炎症反应和免疫功能，可以减少不良妊娠事件的发生，表明了调节 miRNA-494 的表达水平可能作为 uRSA 的预防和治疗的新靶点。

基金项目

- 1) 广东省基础与应用基础研究基金区域(粤莞)联合基金培育项目，编号(2021B1515140035)和(2022A1515140097)；
- 2) 广东省韶关市卫生计生科研项目编号(Y23077)。

参考文献

- [1] Plaçaïs, L., Kolanska, K., Kraiem, Y.B., *et al.* (2020) Intralipidtherapy for Unexplained Recurrent Miscarriage and Implantation Failure: Case-Series and Literature Review. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, **252**, 100-104. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2020.06.017>
- [2] Li, T.Y., Li, R., Zeng, L., *et al.* (2021) *In Vitro* Fertilization-Embryo Transfer in Patients with Unexplained Recurrent Pregnancy Loss. *Chinese Medical Journal*, **134**, 2421-2429. <https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000001657>
- [3] Annual Capri Workshop Group (2020) Early Pregnancy Loss: The Default Outcome for Fertilized Human Oocytes. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, **37**, 1057-1063. <https://doi.org/10.1007/s10815-020-01749-y>
- [4] Lee, J.Y., Kim, J.O., Park, H.S., Ryu, C.S., Kim, J.H., Kim, Y.R., Lee, W.S., Lee, J.R. and Kim, N.K. (2020) Study of the Association between MicroRNA (MiR-25T > C, MiR-32C > A, MiR-125C > T, and MiR-222G > T) Polymorphisms and the Risk of Recurrent Pregnancy Loss in Korean Women. *Genes*, **11**, Article 354. <https://doi.org/10.3390/genes11040354>
- [5] Cui, Y.Z., Lyu, X.H., Ding, L., *et al.* (2021) Global miRNA Dosage Control of Embryonic Germ Layer Specification. *Nature*, **593**, 602-606. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03524-0>
- [6] Li, L., Huang, X., He, Z., Xiong, Y., *et al.* (2019) MiRNA-210-3p Regulates Trophoblast Proliferation and Invasiveness through Fibroblast Growth Factor 1 in Selective Intrauterine Growth Restriction. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, **23**, 4422-4433. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14335>
- [7] Tian, S., Yu, J., Zhang, Y.C., *et al.* (2020) Overexpression of PTEN Regulated by MiR-19b and MiR-494 in the Villous of Recurrent Spontaneous Abortion Patients. *Journal of Reproductive Immunology*, **140**, Article ID: 103133. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2020.103133>
- [8] 杨静, 琳琳, 赵玉林, 等. 母-胎界面 miRNA 对蜕膜巨噬细胞极化的调控作用[J]. 中华生殖与避孕杂志, 2023, 43(9): 974-981.
- [9] Liao, W., Deng, X., Chen, G., *et al.* (2023) MiR-150-5p Contributes to Unexplained Recurrent Spontaneous Abortion by Targeting VEGFA and Downregulating the PI3K/AKT/MTOR Signaling Pathway. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, **41**, 63-77. <https://doi.org/10.1007/s10815-023-02959-w>
- [10] Yang, Y., Cheng, L.Y., Deng, X.H., *et al.* (2018) Expression of GRIM-19 in Unexplained Recurrent Spontaneous Abortion and Possible Pathogenesis. *Molecular Human Reproduction*, **24**, 366-374. <https://doi.org/10.1093/molehr/gay020>

-
- [11] Stefanski, A.L., Martinez, N., *et al.* (2019) Murine Trophoblast-Derived and Pregnancy-Associated Exosome-Enriched Extracellular Vesicle microRNAs: Implications for Placenta Driven Effects on Maternal Physiology. *PLOS ONE*, **14**, e0210675. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210675>
- [12] Li, H., Ouyang, Y., Sadovsky, E., *et al.* (2020) Unique microRNA Signals in Plasma Exosomes from Pregnancies Complicated by Preeclampsia. *Hypertension*, **75**, 762-771. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.14081>
- [13] Ning, S., Li, Z., Ji, Z., *et al.* (2020) MicroRNA-494 Suppresses Hypoxia/Reoxygenation-Induced Cardiomyocyte Apoptosis and Autophagy via the PI3K/AKT/MTOR Signaling Pathway by Targeting SIRT1. *Molecular Medicine Reports*, **22**, 5231-5242. <https://doi.org/10.3892/mmr.2020.11636>
- [14] Hao, K., Wang, J., Li, Z., *et al.* (2022) PPAR γ /MTOR Regulates the Synthesis and Release of Prostaglandins in Ovine Trophoblast Cells in Early Pregnancy. *Veterinary Sciences*, **9**, Article 649. <https://doi.org/10.3390/vetsci9110649>
- [15] Ding, J., Zhang, Y., Cai, X., *et al.* (2021) Extracellular Vesicles Derived from M1 Macrophages Deliver MiR-146a-5p and MiR-146b-5p to Suppress Trophoblast Migration and Invasion by Targeting TRAF6 in Recurrent Spontaneous Abortion. *Theranostics*, **11**, 5813-5830. <https://doi.org/10.7150/thno.58731>
- [16] Schlosser, K., Kaur, A., Dayan, N., *et al.* (2020) Circulating MiR-206 and Wnt-Signaling Are Associated with Cardiovascular Complications and a History of Preeclampsia in Women. *Clinical Science*, **134**, 87-101. <https://doi.org/10.1042/CS20190920>
- [17] Zhang, Q., Ni, T., Dang, Y., *et al.* (2020) MiR-148a-3p May Contribute to Flawed Decidualization in Recurrent Implantation Failure by Modulating HOXC8. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, **37**, 2535-2544. <https://doi.org/10.1007/s10815-020-01900-9>
- [18] Liu, S., Xie, X., Lei, H., *et al.* (2019) Identification of Key CircRNAs/LncRNAs/MiRNAs/MRNAs and Pathways in Preeclampsia Using Bioinformatics Analysis. *Medical Science Monitor*, **25**, 1679-1693. <https://doi.org/10.12659/MSM.912801>
- [19] 郭义红, 何凤屏, 马秋林, 等. MiRNA-494 在不明原因复发性流产绒毛组织中的表达及其对滋养细胞增殖和凋亡的影响[J]. 现代消化及介入诊疗杂志, 2022, 27(S1): 1275-1276.
- [20] Su, S., Zhong, L., Huang, S., *et al.* (2023) MiRNA-494 Induces Trophoblast Senescence by Targeting SIRT1. *Hypertension in Pregnancy*, **42**, Article ID: 2219774. <https://doi.org/10.1080/10641955.2023.2219774>
- [21] Han, D., Jiang, L., Gu, X., *et al.* (2020) SIRT3 Deficiency Is Resistant to Autophagy-Dependent Ferroptosis by Inhibiting the AMPK/MTOR Pathway and Promoting GPX4 Levels. *Journal of Cellular Physiology*, **235**, 8839-8851. <https://doi.org/10.1002/jcp.29727>