

非编码 RNA 与复发性流产关系的研究进展

袁慧慧 曹泽宁 肖扬 叶莺

【摘要】 非编码 RNA 是一类不直接参与编码蛋白质的 RNA,包括环状 RNA、微小 RNA 和长链非编码 RNA 等。研究显示,非编码 RNA 通过参与胚胎发育和种植过程影响妊娠,与反复流产的发生有关。本文就非编码 RNA 参与复发性流产的机制作一综述,为诊断和治疗该疾病提供理论基础。

【关键词】 非编码 RNA 长链非编码 RNA 环状 RNA 微小 RNA 复发性流产

非编码 RNA(non-coding RNA,ncRNA)是指不直接参与编码蛋白质的 RNA,可以通过重塑染色体、转录基因等方式调控生理活动,在生命起源和进化等方面起到重要作用^[1]。胚胎着床和发育作为人类生命起始,在生长过程中有着举足轻重的地位。然而,有许多胚胎在孕早中期发生自然流产,临床表现为生化妊娠、空孕囊或胚胎发育停止。有些患者甚至发生多次的自然流产,被称作复发性流产(recurrent spontaneous abortion,RSA),其发病率为 1%~5%^[2],给患者及其家庭带来了严重的经济负担和身心伤害。各国关于 RSA 的定义略有不同,英国皇家妇产科医师协会定义 RSA 为与同一配偶连续发生 3 次或 3 次以上妊娠 24 周前的胎儿丢失,美国生殖医学学会定义其为 2 次及以上的临床妊娠丢失。我国既往定义 RSA 为与同一配偶发生 3 次及以上的妊娠 28 周前的胎儿丢失,但因 2 次和 3 次自然流产病因构成比相似,大多数专家认为应该将连续发生 2 次或 2 次以上的自然流产定义为 RSA。RSA 病因复杂,包括遗传因素、解剖因素、内分泌因素、免疫因素等^[3]。目前已有研究表明 ncRNA 与妊娠期糖尿病、子宫内膜异位症等疾病有关^[4],但涉及 RSA 的文献较少,故本文就 ncRNA 参与 RSA 的机制作一综述,为诊断和治疗该疾病提供理论基础。

1 ncRNA 的生物学特点

真核生物中只有 2%左右的基因会被转录翻译成蛋白质,其余大部分基因转录产物是 ncRNA。ncRNA 根据其形状可分为线性 RNA 和环状 RNA(circular RNA,circRNA)^[5],线性 RNA 根据其长度又可分为长链非编码 RNA(long non-coding RNA,lncRNA)和短链 RNA,后者包括微小 RNA(microRNA,miRNA)、核糖体 RNA、转运 RNA 等。

lncRNA 是指长度>200 个核苷酸的线性 RNA,根据其所在基因组的位置可细分为基因间 RNA(inter-genic lncRNA)、正义 RNA(sense lncRNA)、反义 RNA(antisense lncRNA)和双向 RNA(bidirectional lncRNA)^[6]。lncRNA 可以通过碱基互补配对或形成 3 级结构发挥信号、支架和诱饵等功能^[7]。

miRNA 是指长度为 18~25 个核苷酸的 miRNA,作为一种广泛存在于生物体内的单链 RNA,可调控人类约 30% 的基因。茎环结构的初级 miRNA 被 Drosha-DGCR8 复合体剪切后成为长约 70 nt 的前体 miRNA^[8],由输出蛋白 5 从细胞核转运至细胞质中^[9],随后被 Dicer 剪切并解链成成熟的 miRNA^[9]。miRNA 通过与沉默复合体(RNA-induced silencing complex,RISC)结合,形成 miRNA 核糖核蛋白复合体发挥作用;若其与靶蛋白 3' 非编码区不完全配对,RISC 抑制 mRNA 翻译,沉默特定基因;若与靶基因完全匹配,则降解靶蛋白的表达^[10]。

circRNA 是一组缺乏 5' 末端帽子和 3' 末端尾巴的共价闭环。根据其成环机制,有 3 种类型:(1)内含子环状 RNA(circular intronic RNA,ciRNA):内含子独

DOI:10.12056/j.issn.1006-2785.2022.44.3.2021-3128

基金项目:浙江省中医药科技计划项目(2016ZA006)

作者单位:310053 杭州,浙江中医药大学第二临床医学院(袁慧慧、曹泽宁、肖扬);浙江省立同德医院生殖免疫科(叶莺)

通信作者:叶莺,E-mail:jxgmaill@163.com

立环化形成 ciRNA, 主要存在于细胞核中; (2) 外显子环状 RNA: 通过以下 2 种机制成环: ① 外显子两侧的内含子通过碱基配对诱导环化; ② 前体 RNA 部分折叠导致外显子跳跃(exon skipping)形成套索(intra-lariat), 套索内部通过拼接成环; (3) 外显子-内含子环状 RNA: 由外显子和保留其中的内含子环化形成^[11]。由于其特殊的环状结构, circRNA 难以被核酸外切酶催化, 且表达水平相较于同源线性 RNA 更高。circRNA 可通过碱基互补配对的方式与 miRNA 结合, 削弱后者对靶基因的抑制作用, 因此其被称作“miRNA 的分子海绵”^[12]。同时, circRNA 与 RNA 结合蛋白结合形成复合物, 调控基因转录^[14]。

lncRNA、miRNA 和 circRNA 在内分泌、肿瘤、心血管等多种疾病发挥重要作用。同时, 上述 RNA 也可以通过调节胚胎发育、子宫内膜容受性、滋养层细胞功能、血管生成和炎症因子分泌等影响胚胎质量、子宫内膜功能及两者相互作用, 从而导致流产的发生。

2 lncRNA 与 RSA

2.1 lncRNA 与胚胎干细胞 lncRNA 是妊娠的重要调节因子^[6], 具有调节胚胎干细胞的作用。Jain 等^[13]发现 lncPRESS1 作为一种受 p53 调控的 lncRNA, 可通过破坏沉默信息调节因子 6 活性来保护胚胎干细胞。同时, lncKdm2b 可通过激活转录因子锌指和 BTB 结构域蛋白 3 的表达来促进胚胎干细胞的自我更新和早期胚胎的发育^[14]。此外, 有学者研究发现, 对小干扰 RNA 沉默的小鼠胚胎干细胞予以相关的 lncRNA 可导致胚胎损伤甚至流产^[15]。上述研究均说明 lncRNA 是调控胚胎干细胞发育的重要因子, 在胚胎植入前进行 lncRNA 筛查可以降低移植失败和流产的风险。

2.2 lncRNA 与子宫内膜容受性 lncRNA 通过调节母体子宫内膜容受性影响胚胎种植过程。子宫内膜容受性是指子宫内膜接受胚胎植入的能力。研究发现, 与成功妊娠妇女相比, 反复妊娠失败患者的子宫内膜中存在大量表达异常的 lncRNA, 包括 132 个 lncRNA 上调和 65 个下调^[16]。其中, lncRNA H19 通过与 let-7 结合下调整合素 $\beta 3$ 的表达, 影响细胞和基底膜的结合, 降低子宫内膜容受性, 从而导致胚胎丢失^[17]。

2.3 lncRNA 与滋养层细胞 当胚泡植入子宫内膜后, 滋养层细胞迅速分化增殖侵袭, 为胚胎和胎盘的发育奠定了基础。研究人员在 RSA 患者的绒毛组织发现了 1 449 个表达异常的 lncRNA^[18]。进一步研究发现 lncRNA 通过直接作用于 lncRNA 浆细胞瘤变异易

位基因 1 启动子调节转录, 降低滋养层细胞的侵袭能力^[19]。Wang 等^[20]研究发现, RSA 患者 lncRNA 核富集转录体 1 和人肺腺癌转移相关转录本 1 (metastasis associated in lung denocarcinoma transcript 1, MALAT1) 水平相对于正常妇女均显著降低, 并且敲除 MALAT1 基因可导致滋养层细胞增殖、迁移、侵袭能力下降和凋亡。说明 lncRNA 可通过调节滋养层细胞功能影响胎盘形成, 诱导流产的发生。

2.4 lncRNA 与免疫 与成功妊娠妇女相比, 自然流产患者体内感染和免疫相关的 lncRNA 表达显著增加^[21]。Huang 等^[22]研究发现不明原因 RSA 患者绒毛中 lnc-SLC4A1-1 高表达, 并且可通过 NF- κ B/CXC 趋化因子配体 8 轴激活免疫反应。此外, 研究人员发现 lncRNA 与 TNF 信号通路、toll 样 4 受体信号通路相关^[23]。

3 miRNA 与 RSA

3.1 miRNA 与滋养层细胞 众所周知, 滋养细胞的增殖和凋亡处于一种动态平衡的过程。如果这种状态失衡, 就会影响胎盘功能, 引起胚胎发育异常甚至流产。与成功妊娠妇女相比, RSA 患者蜕膜和外周血中 miR-184 表达增强, 且进一步研究发现 miR-184 可通过野生型 p53 诱导基因 1 上调 Fas 表达诱导滋养层细胞凋亡^[24]。研究发现 miR-365 和 miR-520 能分别通过血清和糖皮质激素调节蛋白激酶 1^[25]和多聚腺苷二磷酸核糖聚合酶 1^[26], 引起滋养层细胞周期停滞导致细胞凋亡, 从而参与 RSA 的发生。

3.2 miRNA 与胎盘 胎盘是胚胎与母体交换物质的重要器官, 胎盘植入和血管发育是胚胎生过程中重要的环节, 滋养层细胞侵袭活性下降和血管发育异常容易引起胚胎停育。Ding 等^[27]发现 RSA 患者体内 miR-27a-3p 显著增加, 促使泛素特异性蛋白酶 25 表达减少, 下调了滋养层细胞的迁移和侵袭能力。亦有研究证实 RSA 患者 miR-93 表达显著升高, 不仅可促进滋养层细胞凋亡, 也能影响其侵袭活性^[28]。同时, 有研究者发现 RSA 患者体内 lncRNA 与 miR-375、miR-205、miR-15 和 miR-383 相互作用调节细胞的增殖和侵袭, 并可影响母胎界面血管的形成^[29]。RSA 患者绒毛和蜕膜组织中 miR-16 表达增高, 且体外实验证实 miR-16 可通过下调血管内皮生长因子的表达来抑制胎盘的生成和发育, 参与 RSA^[30]。上述研究均说明 RSA 不但受多种 ncRNA 调控, 且这些 ncRNA 彼此相互影响作用于滋养细胞功能和血管生长发育等环节。

4 circRNA 与 RSA

4.1 circRNA 与子宫内膜容受性 Zhang 等^[31]通过微阵列技术发现早期妊娠小鼠子宫内膜中未种植位点与植入位点相比,75 个 circRNA 下调,101 个上调。研究人员对反复妊娠失败妇女进行子宫内膜活检也发现有 856 个 circRNA 表达异常^[32],说明 circRNA 与妊娠失败存在一定联系。进一步研究发现 circ8073 可作为 miR-181a 的分子海绵增加凋亡抑制因子的表达,促进子宫内膜增生,改善容受性,诱导胚胎着床^[33],说明不同的 circRNA 对于子宫内膜容受性的影响不同。目前关于 circRNA 和子宫内膜容受性的研究大多聚焦在动物实验上,RSA 患者体内这两者的关系仍有待进一步研究。

4.2 circRNA 与滋养层细胞 研究人员发现,相比于正常妇女,早期反复妊娠失败妇女蜕膜中有 123 个异常表达的 circRNA,包括 78 个表达过高的 circRNA 和 45 个表达过低的 circRNA^[34],说明 circRNA 与妊娠失败有关。有研究发现 circ-ZUFSP 通过 miR-203 调控 STOX1 表达调控滋养层细胞的侵袭活性^[35]。且 circR-NAhsa_circ_0088227 通过 miR-384/信号传导及转录激活蛋白 3 信号通路不但能抑制滋养层细胞增殖还能影响其侵袭活性^[36]。

4.3 circRNA 与炎症 研究发现 circRNA 可以通过促进炎症的发生介导流产,如 Zhu 等^[37]发现 RSA 患者胎盘中 circPUM1 降低,并其可通过 miR-30a-5p/JUNB 促进滋养层细胞凋亡及 TNF- α 、IL-6 和 IL-8 等促炎因子的分泌。但目前关于 circRNA 和炎症在 RSA 中的研究较少,其具体机制仍有待进一步探讨。

5 小结及展望

综上所述,ncRNA 主要通过调控胚胎发育、子宫内膜容受性、滋养层细胞功能、诱导炎症和胎盘血管发育等参与流产,这为临床诊治 RSA 提供了新方向。研究发现,血浆中 miRNA-23a-3p、miRNA-27a-3p、miRNA-29a-3p、miRNA-100-5p、miRNA-127-3p 和 miRNA-486-5p 这 6 种 RSA 患者体内表达异常的 miRNA 联合检测对诊断 RSA 的灵敏度为 100%,特异度为 83.3%;血清中这几类 miRNA 联合检测诊断 RSA 的灵敏度为 78.3%,特异度为 93.1%^[38]。这提示 miRNA 可以作为预测反复流产的生物标志物。不过临床中采集的 ncRNA 样本仅代表当时的状态^[39],故持续的动态监测必不可少。且因其研究大多处于体外和动物实验

阶段,以 ncRNA 为基础的治疗安全性和有效性未知,仍有待进一步研究。

6 参考文献

- [1] Zhu L, Li N, Sun L, et al. Non-coding RNAs: The key detectors and regulators in cardiovascular disease[J]. Genomics, 2021, 113(1-2):1233-1246. DOI:10.1016/j.ygeno.2020.10.024.
- [2] 自然流产诊治中国专家共识编写组. 自然流产诊治中国专家共识(2020 年版)[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2020, 36(11):1082-1090. DOI:10.19538/j.fk2020110113.
- [3] 中华医学会妇产科学分会产科学组. 复发性流产诊治的专家共识[J]. 中华妇产科杂志, 2016(1):3-9. DOI:10.3760/cma.j.issn.0529-567x.2016.01.002.
- [4] Liu K, Pan F, Mao X, et al. Biological functions of circular RNAs and their roles in occurrence of reproduction and gynecological diseases[J]. Am J Transl Res, 2019, 11(1):1-15.
- [5] 陈全, 杨晓葵. 反复种植失败相关非编码 RNA 的功能及其研究进展[J]. 国际生殖健康/计划生育杂志, 2020, 39(5):4. DOI:10.3969/j.issn.1674-1889.2020.05.016.
- [6] Bouckenheimer J, Assou S, Riquier S, et al. Long non-coding RNAs in human early embryonic development and their potential in ART[J]. Hum Reprod Update, 2016, 23(1):19-40. DOI:10.1093/humupd/dmw035.
- [7] Quinn JJ, Chang HY. Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function[J]. Nat Rev Genet, 2016, 17(1):47-62. DOI:10.1038/nrg.2015.10.
- [8] Lee Y, Ahn C, Han J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing[J]. Nature, 2003, 425(6956):415-419. DOI:10.1038/nature01957.
- [9] Lund E, Güttinger S, Calado A, et al. Nuclear export of microRNA precursors[J]. Science, 2004, 303(5654):95-98. DOI:10.1126/science.1090599.
- [10] Schjenken JE, Moldenhauer LM, Zhang B, et al. MicroRNA miR-155 is required for expansion of regulatory T cells to mediate robust pregnancy tolerance in mice[J]. Mucosal Immunol, 2020, 13(4):609-625. DOI:10.1038/s41385-020-0255-0.
- [11] Ebbesen KK, Kjems J, Hansen TB. Circular RNAs: Identification, biogenesis and function[J]. Biochim Biophys Acta, 2016, 1859(1):163-168. DOI:10.1016/j.bbtagrm.2015.07.007.
- [12] Hansen TB, Wiklund ED, Bramsen JB, et al. miRNA-dependent gene silencing involving ago2-mediated cleavage of a circular antisense RNA[J]. EMBO J, 2011, 30(21):4414-4422. DOI:10.1038/emboj.2011.359.
- [13] Jain AK, Xi Y, McCarthy R, et al. LncPRESS1 is a p53-regulated lncRNA that safeguards pluripotency by disrupting SIRT6-mediated de-acetylation of histone H3K56[J]. Mol Cell, 2016, 64(5):967-981. DOI:10.1016/j.molcel.2016.10.039.
- [14] Ye B, Liu B, Yang L, et al. LncKdm2b controls self-renewal of embryonic stem cells via activating expression of transcription factor Zbtb3[J]. EMBO J, 2018, 37(8):e97174. DOI:10.15252/emboj.201797174.

- [15] Hamazaki N, Uesaka M, Nakashima K, et al. Gene activation-associated long noncoding RNAs function in mouse preimplantation development [J]. *Development*, 2015, 142(5): 910–920. DOI:10.1242/dev.116996.
- [16] Fan L, Han H, Guan J, et al. Aberrantly expressed long non-coding RNAs in recurrent implantation failure: a microarray related study[J]. *Syst Biol Reprod Med*, 2017, 63(4):269–278. DOI:10.1080/19396368.2017.1310329.
- [17] He D, Zeng H, Chen J, et al. H19 regulates trophoblastic sphere adhesion by competitively binding to let-7[J]. *Reproduction*, 2019, 157(5):423–430. DOI:10.1530/REP-18-0339.
- [18] Wang L, Tang H, Xiong Y, et al. Differential expression profile of long noncoding RNAs in human chorionic villi of early recurrent miscarriage[J]. *Clin Chim Acta*, 2017, 464:17–23. DOI:10.1016/j.cca.2016.11.001.
- [19] Yang D, Ding J, Wang Y, et al. YY1–PVT1 affects trophoblast invasion and adhesion by regulating mTOR pathway-mediated autophagy[J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(10):6637–6646. DOI: 10.1002/jcp.29560.
- [20] Wang Y, Liu H, Liu Y, et al. Disordered p53–MALAT1 pathway is associated with recurrent miscarriage[J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2019, 35(2):87–94. DOI:10.1002/kjm2.12013.
- [21] Chen J, Ao L, Yang J. Long non-coding RNAs in diseases related to inflammation and immunity[J]. *Ann Transl Med*, 2019, 7(18):494. DOI:10.21037/atm.2019.08.37.
- [22] Huang Z, Du G, Huang X, et al. The enhancer RNA Inc-SLC4A1–1 epigenetically regulates unexplained recurrent pregnancy loss (URPL) by activating CXCL8 and NF- κ B pathway[J]. *EBioMedicine*, 2018, 38: 162–170. DOI:10.1016/j.ebiom.2018.11.015.
- [23] Chen M, Liao G, Zhou B, et al. Genome-wide profiling of long noncoding RNA expression patterns in women with repeated implantation failure by RNA sequencing[J]. *Reprod Sci*, 2019, 26(1):18–25. DOI:10.1177/1933719118756752.
- [24] Zhang Y, Zhou J, Li MQ, et al. MicroRNA-184 promotes apoptosis of trophoblast cells via targeting WIG1 and induces early spontaneous abortion[J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(3):223. DOI:10.1038/s41419-019-1443-2.
- [25] Zhao W, Shen W, Cao X, et al. Novel mechanism of miRNA-365-regulated trophoblast apoptosis in recurrent miscarriage [J]. *J Cell Mol Med*, 2017, 21(10):2412–2425. DOI:10.1111/jcmm.13163.
- [26] Dong X, Yang L, Wang H. miR-520 promotes DNA-damage-induced trophoblast cell apoptosis by targeting PARP1 in recurrent spontaneous abortion (RSA)[J]. *Gynecol Endocrinol*, 2017, 33(4):274–278. DOI:10.1080/09513590.2016.1266476.
- [27] Ding J, Cheng Y, Zhang Y, et al. The miR-27a-3p/USP25 axis participates in the pathogenesis of recurrent miscarriage by inhibiting trophoblast migration and invasion[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(11):19951–19963. DOI:10.1002/jcp.28593.
- [28] Liu H, Tang X, Wang X, et al. MiR-93 inhibits trophoblast cell proliferation and promotes cell apoptosis by targeting BCL2L2 in recurrent spontaneous abortion[J]. *Reprod Sci*, 2020, 27(1): 152–162. DOI:10.1007/s43032-019-00003-w.
- [29] Wang Y, Liu H, Liu Y, et al. Downregulated MALAT1 relates to recurrent pregnancy loss via sponging miRNAs[J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2018, 34(9):503–510. DOI:10.1016/j.kjms.2018.04.006.
- [30] Zhu Y, Lu H, Huo Z, et al. MicroRNA-16 inhibits feto-maternal angiogenesis and causes recurrent spontaneous abortion by targeting vascular endothelial growth factor[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 35536. DOI:10.1038/srep35536.
- [31] Zhang S, Ding Y, He J, et al. Altered expression patterns of circular RNAs between implantation sites and interimplantation sites in early pregnant mice[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(6): 9862–9872. DOI:10.1002/jcp.27675.
- [32] Liu L, Li L, Ma X, et al. Altered circular RNA expression in patients with repeated implantation failure[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 44(1):303–313. DOI:10.1159/000484887.
- [33] Zhang L, Liu X, Che S, et al. Endometrial epithelial cell apoptosis is inhibited by a ciR8073–miR181a–neurotensin pathway during embryo implantation[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2019, 14: 262–273. DOI:10.1016/j.omtn.2018.12.005.
- [34] Li C, Chen X, Liu X, et al. CircRNA expression profiles in decidual tissue of patients with early recurrent miscarriage[J]. *Genes Dis*, 2020, 7(3):414–423. DOI:10.1016/j.gendis.2019.06.003.
- [35] Li Z, Zhou G, Tao F, et al. circ-ZUFSP regulates trophoblasts migration and invasion through sponging miR-203 to regulate STOX1 expression[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 531(4):472–479. DOI:10.1016/j.bbrc.2020.06.117.
- [36] Zhou W, Wang H, Yang J, et al. Down-regulated circPAPPA suppresses the proliferation and invasion of trophoblast cells via the miR-384/STAT3 pathway[J]. *Biosci Rep*, 2019, 39(9): BSR20191965. DOI:10.1042/BSR20191965.
- [37] Zhu L, Shi L, Ye W, et al. Circular RNA PUM1(CircPUM1) attenuates trophoblast cell dysfunction and inflammation in recurrent spontaneous abortion via the MicroRNA-30a-5p (miR-30a-5p)/JUNB axis[J]. *Bioengineered*, 2021, 12(1):6878–6890. DOI:10.1080/21655979.2021.1973207.
- [38] Yang Q, Gu WW, Gu Y, et al. Association of the peripheral blood levels of circulating microRNAs with both recurrent miscarriage and the outcomes of embryo transfer in an in vitro fertilization process[J]. *J Transl Med*, 2018, 16(1):186. DOI:10.1186/s12967-018-1556-x.
- [39] May JM, Bylicky M, Chopra S, et al. Long and short non-coding RNA and radiation response: a review[J]. *Transl Res*, 2021, 233:162–179. DOI:10.1016/j.trsl.2021.02.005.

(收稿日期:2021-10-22)

(本文编辑:俞骏文)