

孤立性侧脑室扩张胎儿孕妇羊水外泌体 miRNA 差异表达谱

李粉霞, 林浩生, 黎一琳, 朱雯倩, 孙元洁, 黄源, 袁毓雯, 秦霞, 常清贤
南方医科大学南方医院妇产科, 广东 广州 510515

摘要:目的 探讨孤立性侧脑室扩张胎儿孕妇羊水外泌体中的微小RNA(miRNA)的差异表达,对其靶基因进行预测分析。方法 收集2021年9月~2024年5月在南方医科大学南方医院产前超声诊断为胎儿中度孤立性侧脑室扩张的孕妇羊水样本9例,和由于高龄或唐筛高风险行羊水穿刺的正常胎儿对照组的孕妇羊水样本8例。分离羊水外泌体,运用miRNA测序技术筛选两组羊水外泌体中的差异表达miRNA,并从中挑选3个在对照和样本组中的表达差异显著,且文献报道参与的信号通路和侧脑室关联的miRNA进行qPCR验证测序结果。对显著差异表达的TOP 40个miRNA进行靶基因预测及功能分析(GO)和信号通路分析(KEGG)。通过双荧光素酶报告基因技术验证miR-122-5p对预测靶基因AKT3和CCDC88C的调控。结果 与对照组相比,侧脑室扩张组中存在272个显著差异表达miRNA,其中表达上调的有43个,表达下调的有229个。GO分析发现靶基因主要功能与转录因子结合、转运蛋白活性、神经系统过程、跨膜运输等有关。KEGG通路分析发现富集显著的功能通路包括有MAPK信号通路、Wnt信号通路、配体-受体神经活性相互作用和细胞因子-细胞因子受体相互作用等。qPCR验证结果发现,与对照组相比,miR-122-5p表达显著下降($P<0.05$),与测序结果一致;而let-7b-5p的表达病例组较对照组下调,与测序结果相反。双荧光素酶报告基因检测结果显示miR-122-5p不调控AKT3和CCDC88C的表达。结论 羊水外泌体中高丰度差异表达的miRNAs可能通过参与MAPK信号通路、PI3K-Akt信号通路、Wnt信号通路和cGMP-PKG通路在胎儿侧脑室扩张的发生发展中发挥作用。关键词:孤立性侧脑室扩张;羊水;外泌体;微小RNA

Differential expression profile of miRNAs in maternal amniotic fluid exosomes in fetuses with isolated ventriculomegaly

LI Fenxia, LIN Haosheng, LI Yilin, ZHU Wenqian, SUN Yuanjie, HUANG Yuan, QIU Yuwen, QIN Xia, CHANG Qingxian
Department of Obstetrics and Gynecology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To investigate the role of miRNAs in maternal amniotic fluid exosomes in development of isolated ventriculomegaly (VM) in fetuses. **Methods** Amniotic fluid samples were collected from 9 cases of moderate isolated VM and 8 normal control cases to extract exosomal miRNA, and miRNA sequencing technique was used to identify differentially expressed miRNAs between the two groups. Three miRNAs with significant differential expression between the two groups, whose high expression was associated with VM, were selected for verification with RT-qPCR. Dual luciferase reporter assays were used to verify the regulatory effect of miR-122-5p on its predicted target genes AKT3 and CCDC88C. Gene ontology (GO) and KEGG pathway analyses were performed to explore the possible roles of the top 40 significant differential miRNAs in the pathophysiology of VM. **Results** We identified a total of 272 differentially expressed miRNAs in VM cases, including 43 up-regulated and 229 down-regulated miRNAs. The target genes of these differential miRNAs were associated with DNA and transcription factor binding, transmembrane transporter and nucleic acid binding transcription factor activity, and cell developmental process. These miRNAs were mostly enriched in the MAPK, cGMP-PKG and Wnt signaling pathways. Verification with RT-qPCR showed that miR-122-5p expression level was significantly lower in VM group than in the control group ($P<0.05$), which was consistent with miRNA sequencing results; let-7b-5p expression level was significantly lower in VM group, which was contrary to miRNA sequencing result. Dual luciferase reporter assays showed that miR-122-5p was not capable of regulating AKT3 or CCDC88C expressions. **Conclusions** The highly abundant differentially expressed miRNAs in maternal amniotic fluid exosomes play important roles in the occurrence of fetal VM possibly by regulating the MAPK, PI3K-Akt, Wnt and cGMP-PKG signaling pathways.

Keywords: fetal isolated ventriculomegaly; amniotic fluid; exosomes; miRNA

侧脑室扩张(VM)是胎儿发育中大脑侧脑室液体过量所致^[1],它是产前超声检查中最常见的脑部异常,是胎儿脑发育异常的标志之一^[2]。正常侧脑室宽度在中晚期较稳定,为6~8 mm,产前超声检测侧脑室内径 ≥ 10 mm时,称为侧脑室扩张^[3]。胎儿侧脑室扩张的发病率为0.78%~2.20%,其原因多样,感染、畸形、染色体异常、脑

脊液循环障碍、脑室周围损伤都会导致胎儿脑室扩张。孤立性侧脑室扩张是指产前超声检查中除侧脑室扩张外未发现任何其他颅内或颅外畸形^[4]。目前研究显示^[5],侧脑室严重扩张者和持续进展的侧脑室扩张者易合并其他颅内畸形和染色体疾病,是造成胎儿流产和死产的原因之一,出生后神经系统发育异常的风险也明显增高。

外泌体广泛存在于外周血液、唾液、尿液、脑脊液、腹水等人体各种体液中,含量较高且容易获取。外泌体携带的蛋白质,微小RNA(miRNA)和其它RNA片段,能够参与细胞之间的物质传导和信号交流^[6]。自2007

收稿日期:2024-05-27

基金项目:广州市科技计划(202002020010)

作者简介:李粉霞,博士,助理研究员,E-mail: lifenxia123@qq.com

通信作者:常清贤,博士,主任医师,E-mail:1614268071@qq.com

年 Valadi 等^[7]首次报道外泌体中的 miRNA 和转运 RNA (mRNA) 是细胞间遗传交换的一种新机制以来, 学者对外泌体 miRNA 的研究逐渐深入。相比较 mRNA, 富集于外泌体中的 miRNA 更稳定, 不容易被内源性核糖核酸酶降解, 这些特性使外泌体 miRNA 可作为最佳的生物标志物。在孕妇妊娠过程中, 脐血, 胎盘, 羊水和羊膜都可以分泌外泌体, 可作为孕期新的诊断标志物和治疗靶标^[8]。羊水是羊膜腔内包围胎儿的动态的生物液体, 是胎儿胃肠道、肺部、胎盘和羊膜细胞的分泌物, 为胎儿提供所需的机械保护和营养^[9], 羊水的转录组学可作为潜在的胎儿疾病的指导^[10]。外泌体是重要的生物学功能的介质, 可以反映亲本细胞的健康状况。因此, 羊水外的外泌体可提供重要的诊断信息^[11]。近年来, 虽然外泌体的研究已广泛开展, 但羊水外泌体 miRNA 的研究还非常有限。目前报道的有对唐氏综合症胎儿孕妇羊水外泌体 miRNA 的差异表达谱分析^[12, 13], 对先天性肾盂积水孕妇羊水外泌体 miRNA 的研究^[14, 15], 室间隔缺损胎儿孕妇羊水外泌体的全转录组分析^[16], 对子痫和正常妊娠孕妇的羊水外泌体标志物表达的检测来探讨子痫表型和羊水外泌体 miRNA 的关联^[17], 及对严重先天性膈疝胎儿患者的孕妇羊水和胎儿气管液体外泌体 miRNA 的特征及与产后结局的关联分析^[18], 目前国内尚未发现侧脑室扩张胎儿孕妇羊水外泌体 miRNA 的相关研究报道。侧脑室扩张可以影响胎儿或新生儿神经发育及预后, 它是评估神经系统功能的重要指标之一。侧脑室扩张胎儿的临床转归和神经发育预后是临床关注的热点, 目前的研究主要集中在产前诊断、遗传学原因, 妊娠结局和出生后的神经发育, 侧脑室扩张胎儿在产前胎儿发育过程中的发病机制的研究还很少。由于羊水外的外泌体 miRNA 可以反映胎儿的疾病情况, 且人体 miRNA 中 70% 为神经源性 miRNA, 其与中枢神经系统的关联非常密切^[19]。本研究对侧脑室扩张和正常胎儿孕妇羊水外泌体的 miRNA 表达谱进行分析, 筛选差异表达 miRNA, 采用实时定量 qPCR 技术验证差异表达, 并利用双荧光素酶活性检测技术分析目的 miRNA 和靶基因的调控关系, 为进一步研究胎儿侧脑室扩张的发病机制及转归提供理论基础和新思路。

1 资料和方法

1.1 研究对象

羊水标本收集于南方医科大学南方医院, 患者为 2021 年 9 月~2024 年 5 月在我院胎儿医学门诊就诊的孕妇, 均具有行羊膜腔穿刺术的指征。纳入标准: 病例组为产前超声检查提示胎儿侧脑室中度扩张 ≥ 12 mm 的单胎妊娠孕妇, 对照组为穿刺原因仅为唐筛高风险或高龄的孕妇。排除标准为: 双胎妊娠; 合并其他脑部发育异

常; 孕妇具妊娠合并症及并发症; 染色体核型和基因芯片检测染色体异常; 羊水检测 TORCH 感染阳性。研究对象共 17 例, 病例组 9 例(年龄 25.5 ± 3.8 岁, 孕周 28.5 ± 2.8 周), 对照组 8 例(年龄 31.3 ± 7.6 岁, 孕周 19.4 ± 2.0 周)。本研究经南方医科大学南方医院伦理委员会批准(伦理批号: NFEC-202109-K15), 所有参与者均已签署知情同意书。

1.2 研究方法

1.2.1 羊水外泌体的分离 超净工作台中取实验组和对照组羊水样本 8 mL, $2000 \times g$, $4^\circ C$, 20 min 离心; 取上清, $10\ 000 \times g$, $4^\circ C$, 30 min 离心; 取上清, 过 $0.45\ \mu m$ 滤膜; 过滤液 $100\ 000 \times g$, $4^\circ C$, 70 min 离心; 去掉上清, 10 mL 预冷的 PBS 重悬, 然后 $100\ 000 \times g$, $4^\circ C$, 70 min 再次离心; 去掉上清, 150 μL 预冷的 PBS 重悬; 所得即为外泌体溶液。

1.2.2 羊水外泌体的鉴定

1.2.2.1 磷钨酸负染透射电子显微镜法观察外泌体形态 移液器吸取 10 μL 外泌体悬液样本到 Parafilm 封口膜上, 载膜铜网正面朝下, 自然吸附悬液 10~15 min, 滤纸条吸除多余液滴, 晾干; 移液器吸取 2% 磷钨酸溶液 10 μL , 滴于封口膜上, 吸附完成的铜网正面倒扣在染色液上静置 3~5 min; 滤纸条吸除多余液滴, 白炽灯下晾干; 透射电子显微镜下观察拍照。

1.2.2.2 ZetaView 纳米颗粒跟踪分析技术检测外泌体的粒径和浓度 纯水清洗样本池, 标准品聚苯乙烯微球 (100 nm PS beads) 校准, 校准完成后 $1 \times PBS$ 清洗样本池, 样本用 $1 \times PBS$ 稀释后加入到样本池, ZetaView Particle Matrix (PMX-120) 观察外泌体颗粒实时动态影像。

1.2.2.3 蛋白质免疫印迹检测外泌体标志蛋白 外泌体与 RIPA 裂解液按体积 1:1 混匀, 冰上裂解 10 min, $4^\circ C$ 以 $12\ 000\ g$ 离心 5 min 取上清, 按照 BCA 蛋白测定试剂盒 (Beyotime, 增强型) 说明书检测外泌体总蛋白。取 15 μL 上清约 15 μg 总蛋白上样, 行 SDS-PAGE (10%), 电泳结束后转移蛋白至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭 1 h, 分别加入 TSG101 (DLM 1:1000); CD9 (DLM 1:500); CD63 (DLM 1:2000); 和 CD81 (Proteintech 1:1000) 抗体, $4^\circ C$ 摇床孵育过夜。第 2 天用 TBST 洗膜后加入辣根过氧化物酶标记的 II 抗 HRP-conjugated Affinipure Goat Anti-Mouse IgG (H+L) (Proteintech 1:6000), 室温孵育 30 min, TBST 洗膜 3 次, 5 min/次, ECL (Share-bio, SB-WB011) 发光成像。Image Lab 图像分析软件对每个条带灰度值进行定量分析。

1.2.3 羊水外泌体的 miRNA 测序和生物信息学分析 采用 HiPure 总 RNA 小量抽提试剂盒 (美基生物) 提

取外泌体总 RNA。miRNA 测序文库制备用 QIAseq™ miRNA Library Kit 文库制备试剂盒 (QIAGEN)。文库制备完成后,对构建好的文库使用 illuminaNovaSeq6000 进行测序,测序读长为双端 2×150 bp。通过对原始数据过滤得到可信的目标序列,对这些序列的质量、长度及样品间公共序列进行统计。对样本组和对照组表达 miRNA 做归一化处理,使其表达水平在同一量级,即归一化表达量 (TPM), TPM=(miRNA 表达量/标本总表达量)×10⁶。采用 ANOVA 对实验组和对照组对已知 miRNA 进行差异表达分析,阈值 log₂FC 的绝对值大于 1 和 P<0.05 判断两组样品之间的表达量是否存在显著性差异。对高表达的显著上下调前 20 个已知 miRNA 采用 targetscan, miRanda 和 PITA 软件预测靶基因。对目的 miRNA 靶基因的集合进行 Gene Ontology 富集分析,包括基因的分子功能,细胞组成和参与的生物过程。并对候选靶基因进行 KEGG 代谢通路分析,通过信号通路显著性富集分析,确定候选靶基因参与的最主要生化代谢途径和信号转导途径。

1.2.4 qPCR 验证测序结果 挑选 3 个在对照和样本组间显著差异表达,具高表达,经文献检索可能和胎儿侧脑室扩张相关的基因及信号通路有关联的 miRNA 进行 qPCR 验证,包括 let-7b-5p, miR-122-5p 和 miR-146a-5p。使用 Trizol 提取外泌体总 RNA,根据 TaqMan™ 的 miRNA 逆转录试剂盒说明反转录为 cDNA,根据 miRNA qRT-PCR TB Green® 说明书进行定量分析,以 rRNA-U6 为内参,采用 2^{-ΔΔCT} 法计算各组 miRNA 的相对表达量。目的 miRNAs 和 U6 的引物序列如下: let-7b-5p, CGTGAGGTTAGTAGGTTGTGTGGTT; miR-146a-5p, CGTGAGAACTGAATTCCATGGGTT; miR-122-5p, CGTGGAGTGTGACAATGTGTTTTG; miRNA 通用反向引物, AGTGCAGGGTC CGAGGTATT; U6-S, CTCGCTTCGGCAGCACA, U6-A, AACGCTTCACGAATTTGCGT。

1.2.5 通过双荧光报告基因系统检测 miR-122-5p 对 AKT3 和 CCD88C 的调控作用 采用生物学软件预测,结合文献检索与脑室扩张相关的基因及全转录组测序的实验结果,预测 miR-122-5p 可能调控的靶基因有 AKT3 和 CCDC88C,评估 miR-122-5p 靶向调控这两个基因的可能性。根据预测的启动子区域结合位点,分别设计 AKT3 3'UTR WT、AKT3 3'UTR mut、CCDC88C 3'UTR WT 和 CCDC88C 3'UTR mut 序列,克隆至双荧光素酶报告载体 pmirGLO 的 BglIII-SalI 双酶切位点中进行酶连接。连接产物转化至 EPI400 感受态细胞,挑选阳性克隆进行酶切验证和一代测序验证。荧光素酶活性鉴定是采用 Lipo2000 转染重组质粒,复苏 293T 细

胞,接种于 6 孔板中,37 °C,5% CO₂ 培养箱中培养过夜,使之第 2 天能达到 70%~90% 汇合度。采用 miR-122-5p 体外模拟物 (mimics) 转染,构建 miR-122 上调表达模型。miR-122-5p mimics 及其阴性对照物 (NC), AKT3-3' UTR-WT/mut、CCDC88C-3' UTR-WT/mut (赛索飞生物)。将 miR-122-5p mimics/ mimics NC 分别与重组载体 AKT3 WT/mut, CCDC88C WT/mut 共转染 293T 细胞,转染分组为 mimics NC+AKT3-WT, miR-122-5p mimics+AKT3-WT, mimics NC+AKT3-mut, miR-122-5p mimics+AKT3-mut; mimics NC+CCDC88C-WT, miR-122-5p mimics+CCDC88C-WT, mimics NC+CCDC88C-mut 和 miR-122-5p mimics+CCDC88C-mut。转染 48 h 后,参照 Duo-Luciferase Assay Kit 说明书进行荧光素酶活性检测。miR-122-5p 序列与 AKT3 和 CCDC88C 基因的 3'UTR 野生型和突变型的合成序列见表 1。

表 1 miR-122-5p 和 ATK3, CCDC88C 的合成序列

Tab.1 Synthesized sequences of miR-122, ATK3, and CCDC88C for dual luciferase reporter assays

Name	Sequence
miR-122-5p	3' gtT-TGTG-GTAACAGTGTGAGGt 5'
AKT3 3'UTR-WT	5' acATACACGCA-AAT-ACACTCCa 3'
AKT3 3'UTR-mut	5' actTtCtCcCt-AtT-tCtCaCgA 3'
CCDC88C 3'UTR-WT	5' agAAGATGAGTTGTACACTCCc 3'
CCDC88C 3'UTR-mut	5' agtAGATGAGaTcTgAgAgTgCg 3'

1.2.6 统计学分析 所有数据均采用均数±标准差表示,两样本构成比的统计学分析采用四格表资料的卡方检验,采用 SPSS 21.0 统计学软件分析处理。两组样本均数比较采用两个独立样本的 t 检验,多变量采用 F 检验,采用 GraphPad Prism8 进行分析,以 P<0.05 表示差异有统计学意义。所有的实验都是独立重复 3 次。

2 结果

2.1 羊水外泌体鉴定

透射电镜下,外泌体的形态学特征为小囊泡,大小不等,具有明显的脂质双分子层,直径约为 30~100 nm,透射电镜下,负染色显示对照和样本中检测到茶托状的外泌体 (图 1A)。Western blotting 检测两组羊水外泌体标志蛋白,结果发现两组羊水外泌体均表达 CD9、CD63、CD81、TSG101,且表达水平一致 (图 1B)。纳米颗粒检测,对照样本 C2 的颗粒检测浓度为 3.0×10⁷/mL,稀释倍数 30 000,原始浓度为 9.1×10¹¹/mL,Median(×50)为 153.0nm。实验样本 AFS042 的颗粒检测浓度为 2.9×10⁷/mL,稀释倍数 10 000,原始浓度为 2.9×10¹¹/mL,Median(×50)为 145.8 nm (图 1C)。

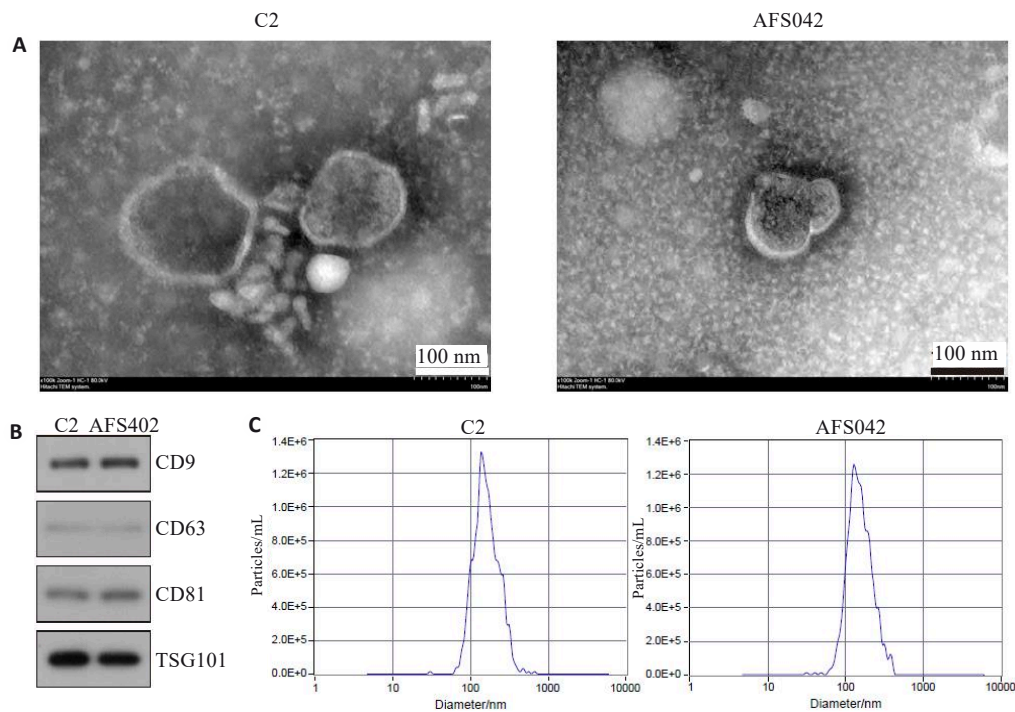


图1 羊水外泌体鉴定

Fig.1 Identification of exosomes in maternal amniotic fluid. A: Exosome morphology under transmission electron microscope. B: Protein expressions of exosome markers CD9, CD63, CD81 and TSG101 detected by Western blotting. C: Particle size of the exosomes.

2.2 两组羊水外泌体 miRNA 差异表达情况

测序结果显示,侧脑室扩张和对照组存在 272 个差异表达的 miRNA,其中 43 个 miRNA 上调,229 个 miRNA 下调;对照平均表达量大于 20 TPM 的有 90 个差异表达 miRNA,21 个上调,69 个下调。表达量上调的 TOP20 和下调的 TOP 20 个,共 40 个 miRNAs 在对照和病例组中的表达丰度热图,红色为上调,蓝色为下调(图 2)。

2.3 qPCR 验证测序结果

侧脑室扩张组的 miR-122-5p 较对照组显著降低 ($P=0.028$),与测序结果一致。miR-146a-5p 较对照组上调,与测序组结果一致,但差异没有统计学意义 ($P=0.693$)。let-7b-5p 较对照组下调,差异没有统计学意义 ($P=0.249$),与测序结果相反(图 3)。

2.4 双荧光素酶报告基因检测结果

重组质粒共转染 48 h 后,荧光素酶活性检测结果(图 4)。在 293T 细胞中,miR-122-5p 过表达对 AKT3 3'UTR-WT 荧光素酶的活性与空白对照组(mimics NC+AKT3-WT)差异无统计学意义 ($P=0.958$);miR-122-5p 过表达对 AKT3 3'UTR-mut 荧光素酶的活性与空白对照组(mimics NC+AKT3-mut)差异无统计学意义 ($P=0.093$);miR-122-5p 过表的 AKT3-WT 和 AKT3-mut 荧光素酶活性差异无统计学意义 ($P=0.929$)。对于 CCDC88C,miR-122-5p 过表达对 CCDC88C 3'UTR-WT

荧光素酶的活性与空白对照组(mimics NC+CCDC88C-WT)差异无统计学意义 ($P=0.836$);miR-122-5p 过表达对 CCDC88C 3'UTR-mut 荧光素酶的活性与空白对照组(mimics NC+CCDC88C-mut)差异无统计学意义 ($P=0.170$);miR-122-5p 过表的 CCDC88C-WT 和 CCDC88C-mut 荧光素酶活性差异无统计学意义 ($P=0.418$)。

2.5 TOP40 差异表达 miRNAs 靶基因预测和生物学功能

对于 TOP40 差异表达 miRNAs 的调控靶基因进行 GO 和 KEGG 分析,发现归属 GO 条目里富集显著的有:细胞组分上的质膜(GO:0005886),膜(GO:0016020)和细胞外围(GO:0071944);发挥的分子功能有核酸结合转录因子活性(GO:0001071),跨膜转运蛋白活性(GO:0022857),转运蛋白活性(GO:0005215),DNA 结合(GO:0003677)和转录因子结合(GO:0008134)相关;参与的生物学过程中有定位(GO:0051179),发育过程(GO:0032502),移动(GO:0040011),细胞分化、迁移、定位和发育过程(GO:0030154,0048870,0051674,0048869),神经系统过程(GO:0050877),跨膜运输(GO:0055085)等。KEGG 信号通路显著性分析显示前 20 的通路主要包括:MAPK 信号通路、cGMP-PKG 信号通路,趋化因子信号通路、钙信号通路、配体-受体神经活性互作、神经营养因子信号通路、细胞粘附分子、Wnt 信号通路、轴突引导即神经发育过程中轴突生长的方向

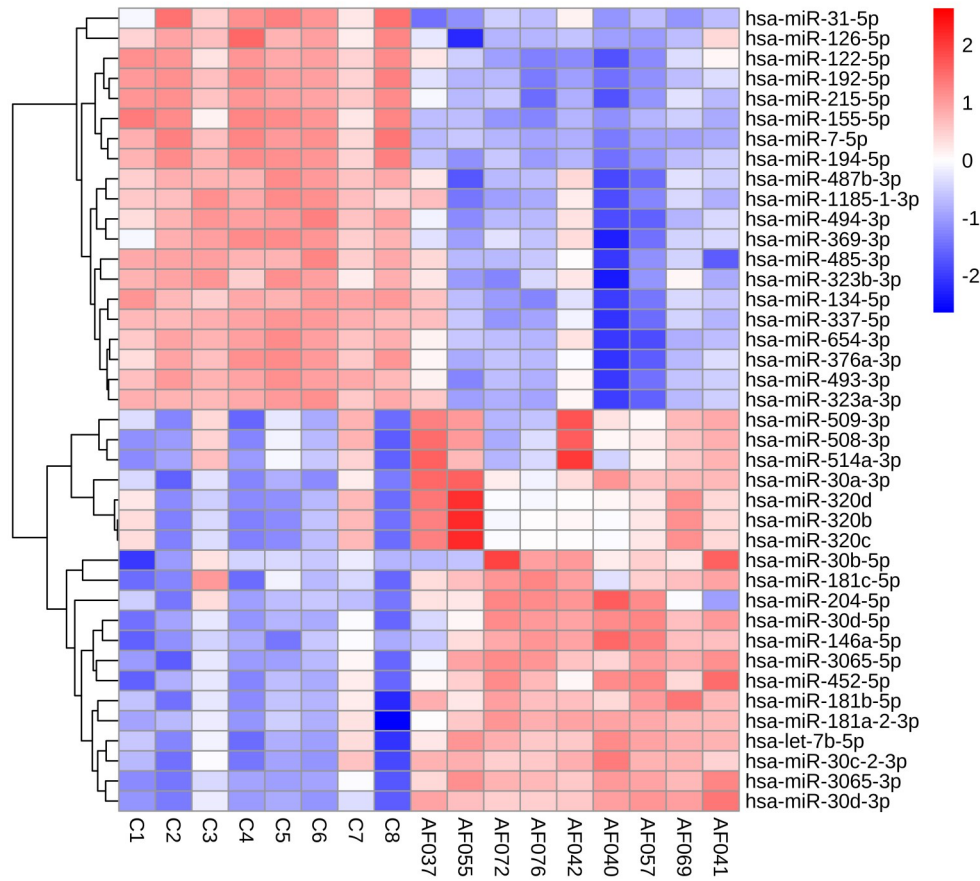


图2 羊水外泌体在侧脑室扩张样本和对照组中差异表达的miRNA的丰度热图

Fig.2 Heat map of the differentially expressed miRNAs between ventriculomegaly and control groups. Red and blue indicates up-regulated and down-regulated miRNAs, respectively.

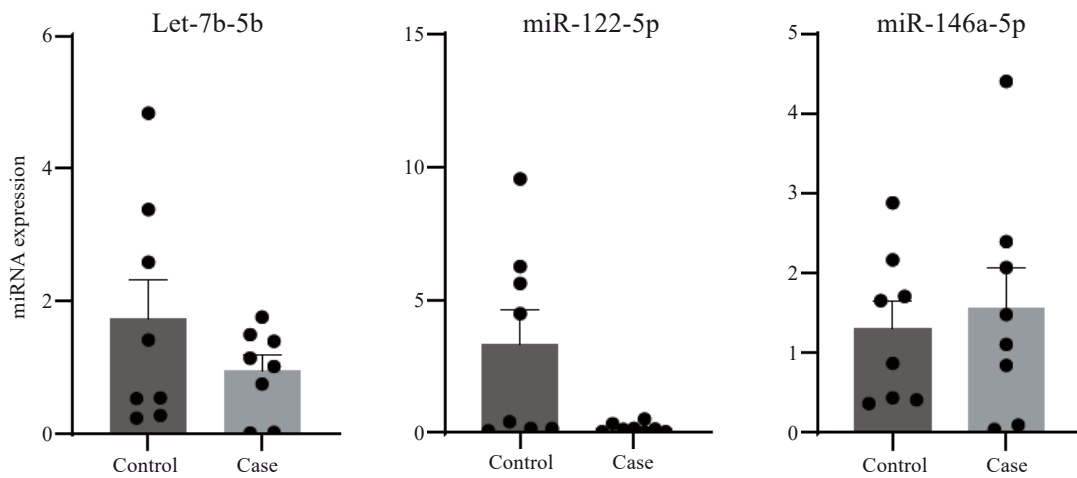


图3 qPCR检测两组羊水外泌体中let-7b-5p,miR-122-5p和miR-146a-5p表达水平

Fig.3 Expression levels of let-7b-5p, miR-122-5p and miR-146a-5p in amniotic fluid exosomes from the two groups detected by RT-qPCR.

和路径的调控过程等(图5)。

3 讨论

miRNA是一类高度保守的内源性小RNA,miRNA的种类非常有限,人体中大约有2654种成熟的人类miRNA,每个miRNA可以识别并沉默多个mRNA,而

多个miRNA也可以沉默同一个mRNA。miRNA最经典的调控方式是直接结合到mRNA 3'端非翻译区,导致mRNA降解,在转录后翻译水平调节蛋白质的表达。外泌体中转运的miRNA非常安全稳定,miRNA到达靶细胞仍能保持功能活性。目前人体外泌体miRNA的研究主要集中在肿瘤、神经系统疾病和心血管疾病^[20]。丁凯

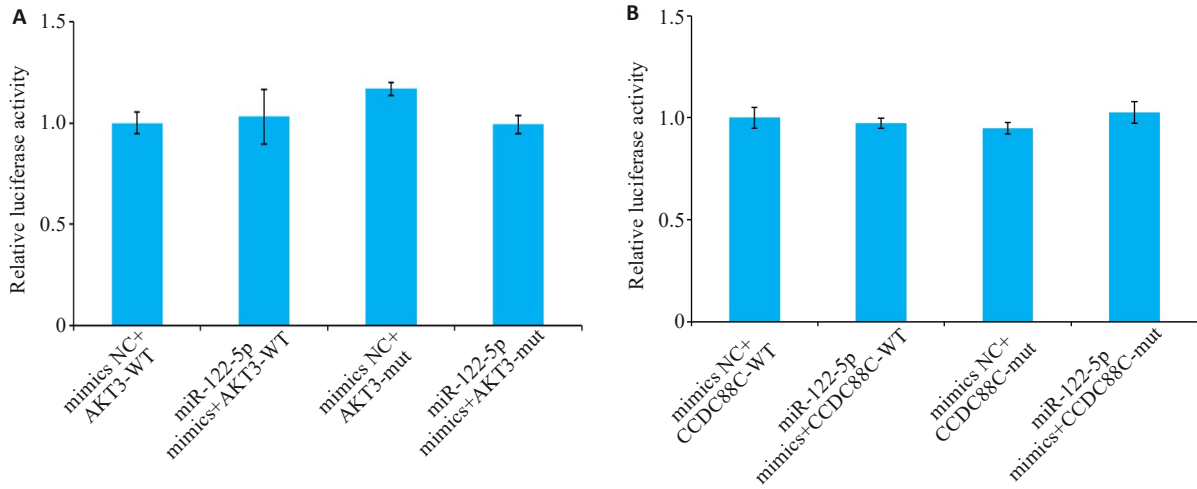


图4 miR-122-5p 的预测靶基因荧光素酶活性测定结果
 Fig.4 Result of 3'UTR luciferase report system for assessing interactions between miRNA-122-5p and its predicted target genes. A: Luciferase assays with AKT3 3'UTR-WT/mut. B: Luciferase assays with CCDC88C 3'UTR-WT/mut.

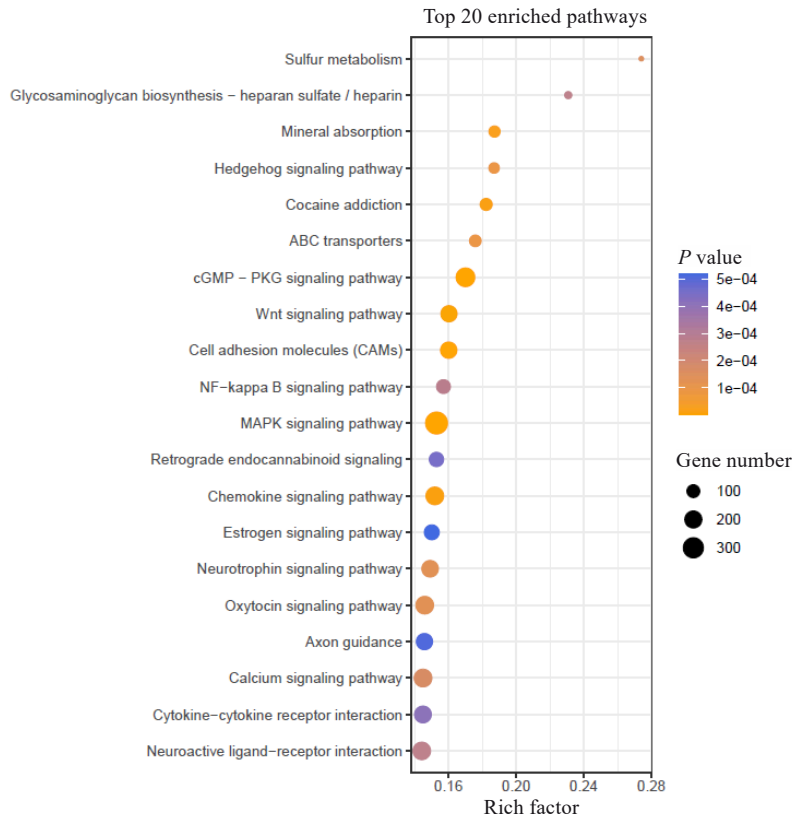


图5 KEGG信号通路分析TOP40差异表达miRNA的靶基因功能
 Fig.5 KEGG pathway analysis of the top 40 significant differential miRNAs in the exosomes for biological functions of their target genes.

泽等^[12]对唐氏综合征羊水miRNA的特征表达谱分析发现15个差异表达miRNA,其中有4个miRNA在本研究也发现差异表达,包括miR-30a, miR-323a-3p, miR-329-3p和与let-7e同属let-7家族的let-7d。柯买春等^[13]的研究在唐筛综合征胎儿孕妇羊水中验证的5种21号染色体编码的外泌体miRNA中也包含了3种本研究检测发现的let-7,miR-155和miR-802。Xie等^[14]对胎儿先

天性肾阻塞病例羊水外泌体miRNA研究中表达显著下降的miR-122-5p,miR-299-3p,miR-299-5p,miR-320a,miR-379-5p,miR-493-5p,miR-548t和miR-585,在本研究中都有显著下调,除了miR-30a上调。Fabietti等^[18]在胎儿先天性膈疝病例的羊水外泌体中检测到的显著增加的miR-190-5p,miR-379-5p和miR-889-3p,在本研究也有显著差异表达,说明miRNA在羊水外泌体广

泛存在,并且有一些共同的差异表达miRNAs,这些共性miRNAs可能在胎儿的发育中具广泛调控机体生物学功能的特点,包括细胞分化、凋亡、炎症及免疫反应,结合孕妇血清中miRNA的研究,有潜力作为临床诊断胎儿疾病及孕妇妊娠期疾病的生物标志物。脑室扩张外泌体miRNA的研究,目前已报道的有先天性脑积水,但都是在脑脊液中的研究^[21,22]。胎儿侧脑室后角宽度>15 mm时为脑积水。Chen等^[21]对脑积水的病人和对照的脑脊液外泌体进行分离和表达谱测序分析,发现31个差异表达miRNAs,26个上调5个下调,其中包括本研究的羊水外泌体中也存在显著差异表达的miR-130b-3p, miR-134-5p, miR-136-5p, miR-137, miR-181a, miR-320a, miR-320b, miR-320c, miR-320d, miR-1298和let-7,表明羊水和脑脊液的外泌体具有共同的显著差异表达miRNAs,个别miRNA在脑脊液和羊水外泌体中的表达上下调不一致,可能是由于样本例数和个体差异导致,特别是异质性比较高的疾病。脑脊液的样本在产前无法获得,而羊穿已成为成熟而广泛使用的产前诊断技术。虽然脑脊液更能反映脑室扩张miRNA的表达情况,但从羊水中挖掘寻找出和脑脊液外泌体中共同作用的相关miRNAs,可为进一步探讨产前胎儿脑室扩张的分子作用机制提供更便捷的研究载体。

本研究发现的TOP40差异表达miRNA,let-7是细胞分化的关键调节因子,作为一个远古的致死miRNA,在动物的生存进化史上对生存和发育起着必需的作用。let-7已被发现靶向调控*Trim71*基因,是先天性脑积水的致病基因^[23]。let-7和本研究的另一个TOP40差异表达miR-155参与的生物学通路都是对BACH1活性起调节作用,BACH1在大多数哺乳动物组织中广泛表达,BACH1活性的增加可以激活AKT/mTOR信号通路^[24],PI3K-AKT-mTOR通路参与神经元和胶质细胞增殖、凋亡等过程,在神经系统中普遍存在且发挥重要作用,有研究表明PI3K/Akt通路的过度激活可导致小鼠脑室的过度扩张继而导致脑积水^[25]。miR-181c作用的生物学通路是NOTCH的前转录和翻译,miR-181c在高度甲基化时,会导致NOTCH2/4和KRAS的表达增加^[26],上调的NOTCH信号通路促进室管膜细胞的增殖,从而导致导水管狭窄和脑积水^[27]。miR-181c还可能参与MAPK调节通路^[28],p38 MAPK是神经细胞凋亡调控的重要通路,其表达强弱与神经细胞存活密切相关,而ERK/MAPK通路的激活可以触发星形胶质细胞的增生,星形胶质细胞的增生可能会引起脑积水的发生^[29,30]。miR-215参与的生物学通路是调节RUNX1的表达活性,RUNX1基因是miR-215的直接靶点,miR-215的异常表达会降低RUNX1启动子的荧光素酶活性,下调RUNX1的表

达。RUNX1作为一个转录因子,它能直接或间接调节多个信号通路,包括TGF- β 信号通路,BMP信号通路和Wnt信号通路^[31]。TGF- β 通路在脑积水形成过程中起重要的作用,活化后可以启动胞内一系列信号级联反应,使得多种胶原等细胞外基质合成增多及脑膜纤维化^[32]。Wnt信号通路则在多种组织细胞活化及纤维化中起重要作用,有研究报道在脑积水大鼠模型中Wnt/ β -catenin通路活性增高,抑制 β -catenin的表达可以减轻大鼠模型反应胶质的增生,减缓脑积水的形成^[33]。miR-452的直接靶基因是血管内皮生长因子A(*VEGFA*)^[34],*VEGFA*已被证明是脑积水患者脑脊液中的炎症标志物之一^[35]。miR-134则是一种富集于大脑的miRNA,参与细胞生长、分化、突触可塑性、神经炎症和凋亡等多种过程,在各种神经过程中起重要的作用。miR-134-5p已报道的靶基因也是*VEGFA*^[36],它参与的信号通路有miR-134-5p/*Itgb1*/MAPK通路^[37]和*ITGB1*/*MMP2*/*PI3K*/*Akt*通路^[38]。此外,Chen等^[21]的研究指出,上调的hsa-miR-130b-3p可能介导与脑积水相关的磷酸酶和张力蛋白同源基因(*PTEN*)的下调。

本研究采用qPCR对显著差异的miRNA中高表达的3个miRNA进行验证,miRNA-122-5p和miRNA-146a-5p与测序结果一致,而let-7b-5p与测序结果相反,原因可能是由于测序和qPCR是两种不同的技术方法,原理和计算公式均不同。qPCR检测目标miRNA的表达是利用茎环状引物进行miRNA的反转录,然后再进行实时定量PCR。测序法是通过miRNA文库构建、簇生成及上机测序,一次获得数百万条miRNA序列,然后再将reads比对到参考基因组、miRBase上,计算miRNA表达量。qPCR是靶向检测一种miRNA,测序是同时检测多个miRNA,受文库和测序深度影响,且本研究有些样本在全转录测序实验中已经用完,验证只做了其中的8个样本和8个对照,临床样本个体差异较大,两种检测方法的结果会出现不一致的情况。

本研究经qPCR验证在脑室扩张样本组中显著下降的miR-122是一种在肝组织中高峰表达度的miRNA^[39],但近年来研究发现miR-122-5p调控神经细胞,有研究表明大鼠颅脑受伤后脑组织miR-122-5p表达下降,神经元凋亡增加,神经功能受损^[40]。有研究发现^[41],在创伤性脑外伤小鼠模型中,miR-122-5p的表达显著下调,而NLRP3炎症小体表达显著上调;在细胞模型中,miR-122-5p抑制剂减轻小胶质细胞凋亡,显著促进小胶质细胞从M1(促炎)向M2(抗炎)表型转化;抑制miR-122-5p的表达,可以抑制NLRP3炎症小体激活和NF- κ B磷酸化,这两个都是典型的炎症信号通路,与神经毒性有关。有研究报道miR-122可以通过靶向RUNX2促进线粒体凋亡通路的激活,促进神经胶质瘤

细胞凋亡^[42]。另有研究发现,脑出血小鼠模型中 miR-122-5p 通过破坏 MLLT1/PI3K/AKT 信号通路的破坏促进外周和中枢神经系统的炎症^[43]。本研究通过生物信息学分析,结合文献报道的脑室扩张相关信号通路,预测 miR-122-5p 可能靶向 *AKT3*, *CCDC88C* 基因。*AKT3* 是 AKT 激酶家族之一,AKT 激酶是细胞信号中响应胰岛素和生长因子的调控因子。*AKT3* 在大脑中广泛存在,其缺失可以造成小头畸形,重复可造成巨头畸形^[44]。研究报道体内实验敲除 miR-122-5p,通过 MLLT1/PI3K/AKT 信号通路,降低脑出血小鼠外周血和中枢神经系统的神经功能受损和炎症^[43],但作用的靶基因是 *MLLT1*。*CCDC88C* 是 Wnt 信号通路的负调控因子,Wnt 信号通路在胚胎发育、组织维持和肿瘤进展中发挥重要作用。*CCDC88C* 基因突变是已知的导致胎儿先天性脑积水致病基因,但具体作用机制不明^[45]。本研究的荧光素酶活性测定结果,在 AKT3-WT 组中,miR-122 过表达转染细胞后的荧光素酶活性较 NC 组无显著差异;在 AKT3-mut 组中,过表 miR-122 的细胞素酶活性与 NC 组也无显著差异的改变,说明 miR-122-5p 不靶向 AKT3 的 3'端非翻译区。在 *CCDC88C*-WT 组中,转染 miR-122 过表达后细胞荧光素酶活性较 NC 组下降,但差异不显著;在 *CCDC88C*-mut 组中,过表达 miR-122 后细胞荧光酶活性较 NC 组也无明显改变,说明 miR-122-5p 也不靶向于 *CCDC88C* 的 3'端非翻译区。虽然本研究未找到 miR-122-5p 的靶向基因,但提示 miR-122-5p 不靶向 *AKT3* 和 *CCDC88C*,在以后的研究需更进一步的生物学信息学分析和更多的实验验证。

综上所述,本研究首次报道了侧脑室扩张胎儿和正常胎儿羊水外泌体中的显著差异表达 miRNAs,发现了在侧脑室扩张胎儿发育过程中可能起调控作用的外泌体 miRNAs,包括 let-7, miR-122, miR-130, miR-134, miR-145, miR-155, miR-181c, miR-215 和 miR-452,这些差异表达 miRNAs 主要通过 MAPK, PI3K-Akt 和 Wnt 信号通路参与脑室扩张的发病过程,具体的靶基因和调控作用的途径和机制仍需进一步的实验。其次,对比分析了胎儿其它病种孕妇羊水外泌体,及脑积水病人在脑脊液和孕妇羊水外泌体中的差异表达 miRNAs。脑室扩张胎儿孕妇羊水外泌体中这些高峰期差异显著 miRNAs 的发现为 miRNA 调控胎儿脑室扩张的分子机制研究奠定了基础,并提供了新的思路和方向。

参考文献:

[1] Gaglioti P, Oberto M, Todros T. The significance of fetal ventriculomegaly: etiology, short- and long-term outcomes[J]. Prenat Diagn, 2009, 29(4): 381-8.

- [2] Griffiths PD, Reeves MJ, Morris JE, et al. A prospective study of fetuses with isolated ventriculomegaly investigated by antenatal sonography and *in utero* MR imaging[J]. AJNR Am J Neuroradiol, 2010, 31(1): 106-11.
- [3] Salomon LJ, Bernard JP, Ville Y. Reference ranges for fetal ventricular width: a non-normal approach[J]. Ultrasound Obstet Gynecol, 2007, 30(1): 61-6.
- [4] 彭奕贤,黄莉萍,黎静,等.孤立性侧脑室扩张胎儿的结局及其影像学随访的结果[J].中华妇产科杂志,2018,53(5):294-8.
- [5] McKechnie L, Vasudevan C, Levene M. Neonatal outcome of congenital ventriculomegaly[J]. Semin Fetal Neonatal Med, 2012, 17(5): 301-7.
- [6] van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2018, 19(4): 213-28.
- [7] Valadi H, Ekström K, Bossios A, et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells[J]. Nat Cell Biol, 2007, 9(6): 654-9.
- [8] Ghafourian M, Mahdavi R, Akbari Jonoush Z, et al. The implications of exosomes in pregnancy: emerging as new diagnostic markers and therapeutics targets[J]. Cell Commun Signal, 2022, 20(1): 51.
- [9] Bardanzellu F, Fanos V. The choice of amniotic fluid in metabolomics for the monitoring of fetus health - update[J]. Expert Rev Proteomics, 2019, 16(6): 487-99.
- [10] Zwemer LM, Bianchi DW. The amniotic fluid transcriptome as a guide to understanding fetal disease[J]. Cold Spring Harb Perspect Med, 2015, 5(4): a023101.
- [11] Ebert B, Rai AJ. Isolation and characterization of amniotic fluid-derived extracellular vesicles for biomarker discovery[J]. Methods Mol Biol, 2019, 1885: 287-94.
- [12] 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.
- [13] 柯买春,王小中,袁素珍,等.羊水外泌体 21 号染色体源性 miRNAs 检测在唐氏综合征产前诊断中的意义[J].江西医药,2022,57(9):1270-5.
- [14] Xie JT, Zhou Y, Gao WZ, et al. The relationship between amniotic fluid miRNAs and congenital obstructive nephropathy[J]. Am J Transl Res, 2017, 9(4): 1754-63.
- [15] Li JZ, Fu Y, Liu QS, et al. Multiomics-based study of amniotic fluid small extracellular vesicles identified Moesin as a biomarker for antenatal hydronephrosis[J]. Clin Transl Med, 2023, 13(8): e1360.
- [16] Yang HN, Yang SP, Shen HL, et al. Construction of the amniotic fluid-derived exosomal ceRNA network associated with ventricular septal defect[J]. Genomics, 2021, 113(6): 4293-302.
- [17] Gebara N, Scheel J, Skovronova R, et al. Single extracellular vesicle analysis in human amniotic fluid shows evidence of phenotype alterations in preeclampsia[J]. J Extracell Vesicles, 2022, 11(5): e12217.
- [18] Fabietti I, Nardi T, Favero C, et al. Extracellular vesicles and their miRNA content in amniotic and tracheal fluids of fetuses with severe congenital diaphragmatic hernia undergoing fetal intervention[J]. Cells, 2021, 10(6): 1493.
- [19] Nowak JS, Michlewski G. miRNAs in development and pathogenesis of the nervous system[J]. Biochem Soc Trans, 2013,

- 41(4): 815-20.
- [20] Li SJ, Lv DQ, Yang H, et al. A review on the current literature regarding the value of exosome miRNAs in various diseases[J]. *Ann Med*, 2023, 55(1): 2232993.
- [21] Chen SY, Li H, Zheng JC, et al. Expression profiles of exosomal microRNAs derived from cerebrospinal fluid in patients with congenital *Hydrocephalus* determined by microRNA sequencing [J]. *Dis Markers*, 2022, 2022: 5344508.
- [22] Spaull R, McPherson B, Gialeli A, et al. Exosomes populate the cerebrospinal fluid of preterm infants with post-haemorrhagic hydrocephalus[J]. *Int J Dev Neurosci*, 2019, 73: 59-65.
- [23] Duy PQ, Furey CG, Kahle KT. Trim71/Lin-41 links an ancient miRNA pathway to human congenital *Hydrocephalus*[J]. *Trends Mol Med*, 2019, 25(6): 467-9.
- [24] Wang CM, Zhang L, Cao MQ, et al. Thioredoxin facilitates hepatocellular carcinoma stemness and metastasis by increasing BACH1 stability to activate the AKT/mTOR pathway[J]. *FASEB J*, 2023, 37(6): e22943.
- [25] Mirzaa GM, Rivière JB, Dobyns WB. Megalencephaly syndromes and activating mutations in the PI3K-AKT pathway: MPPH and MCAP[J]. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 2013, 163C(2): 122-30.
- [26] Hashimoto Y, Akiyama Y, Otsubo T, et al. Involvement of epigenetically silenced microRNA-181c in gastric carcinogenesis [J]. *Carcinogenesis*, 2010, 31(5): 777-84.
- [27] Lin X, Liu BH, Yang XS, et al. Genetic deletion of Rnd3 results in aqueductal stenosis leading to hydrocephalus through up-regulation of Notch signaling[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(20): 8236-41.
- [28] Magnelli L, Schiavone N, Staderini F, et al. MAP kinases pathways in gastric cancer[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(8): 2893.
- [29] Mandell JW, VandenBerg SR. ERK/MAP kinase is chronically activated in human reactive astrocytes[J]. *Neuroreport*, 1999, 10(17): 3567-72.
- [30] Xu H, Zhang SL, Tan GW, et al. Reactive gliosis and neuroinflammation in rats with communicating hydrocephalus[J]. *Neuroscience*, 2012, 218: 317-25.
- [31] Li N, Zhang QY, Zou JL, et al. MiR-215 promotes malignant progression of gastric cancer by targeting RUNX1 [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(4): 4817-28.
- [32] Yan H, Chen YJ, Li LY, et al. Decorin alleviated chronic hydrocephalus via inhibiting TGF- β 1/Smad/CTGF pathway after subarachnoid hemorrhage in rats[J]. *Brain Res*, 2016, 1630: 241-53.
- [33] Xu H, Xu B, Wang ZX, et al. Inhibition of Wnt/ β -catenin signal is alleviated reactive gliosis in rats with hydrocephalus[J]. *Childs Nerv Syst*, 2015, 31(2): 227-34.
- [34] Mo JS, Park WC, Choi SC, et al. MicroRNA 452 regulates cell proliferation, cell migration, and angiogenesis in colorectal cancer by suppressing VEGFA expression[J]. *Cancers*, 2019, 11(10): 1613.
- [35] Lolansén SD, Rostgaard N, Oerbo EK, et al. Inflammatory markers in cerebrospinal fluid from patients with *Hydrocephalus*: a systematic literature review[J]. *Dis Markers*, 2021, 2021: 8834822.
- [36] Ma Z, Li K, Chen P, et al. MiR-134, mediated by IRF1, suppresses tumorigenesis and progression by targeting VEGFA and MYCN in osteosarcoma[J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2020, 20(10): 1197-208.
- [37] Huang M, Wang Y, Wang ZN, et al. MiR-134-5p inhibits osteoclastogenesis through a novel miR-134-5p/Itgb1/MAPK pathway[J]. *J Biol Chem*, 2022, 298(7): 102116.
- [38] Yan L, Zhou RH, Feng Y, et al. MiR-134-5p inhibits the malignant phenotypes of osteosarcoma via ITGB1/MMP2/PI3K/Akt pathway [J]. *Cell Death Discov*, 2024, 10(1): 193.
- [39] Amr KS, Elmawgoud Atia HA, Elazeem Elbnhawy RA, et al. Early diagnostic evaluation of miR-122 and miR-224 as biomarkers for hepatocellular carcinoma[J]. *Genes Dis*, 2017, 4(4): 215-21.
- [40] 刁波, 杨前, 王刚, 等. 大鼠颅脑损伤后脑组织 miR-122-5p 含量变化及其对神经功能的影响[J]. *中国临床神经外科杂志*, 2018, 23(4): 250-3.
- [41] 康璐璐, 龙小兵, 王静, 等. MiR-122-5p 调节创伤性脑外伤后小胶质细胞极化减弱炎症反应[J]. *中华急诊医学杂志*, 2022, 31(8): 1077-84.
- [42] 杨才弟, 王丽娟, 曾鼎华, 等. MiR-122 通过靶向 RUNX2 诱导胶质瘤细胞凋亡的实验研究[J]. *临床肿瘤学杂志*, 2019, 24(2): 124-8.
- [43] Yu N, Tian WB, Liu C, et al. MiR-122-5p promotes peripheral and central nervous system inflammation in a mouse model of intracerebral hemorrhage via disruption of the MLLT1/PI3K/AKT signaling[J]. *Neurochem Res*, 2023, 48(12): 3665-82.
- [44] Nellist M, Schot R, Hoogeveen-Westerveld M, et al. Germline activating AKT3 mutation associated with megalencephaly, polymicrogyria, epilepsy and hypoglycemia[J]. *Mol Genet Metab*, 2015, 114(3): 467-73.
- [45] Marguet F, Vezain M, Marcorelles P, et al. Neuropathological hallmarks of fetal hydrocephalus linked to CCDC88C pathogenic variants[J]. *Acta Neuropathol Commun*, 2021, 9(1): 104.

(编辑: 经 媛)