

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2024.11.010

血清 miRNA-146、LPS、ROS 在早期妊娠胚胎丢失患者中的水平及临床意义*

何凤屏^{1,2}, 张咏梅^{1△}, 陈陆静¹, 郭义红¹, 邹恒¹,甘众芷¹, 郑颖纯¹, 郭艳乐², 刘玉兰²

1. 广东省东莞市妇幼保健院生殖科, 广东东莞 523002; 2. 粤北人民医院检验科, 广东韶关 512000

摘要:目的 探讨血清微小 RNA(miRNA)-146、脂多糖(LPS)和活性氧(ROS)在早期妊娠胚胎丢失(EPEL)患者中的水平及临床意义。方法 选取 2021 年 3 月至 2023 年 3 月广东省东莞市妇幼保健院收治的 100 例 EPEL 患者作为研究组, 另外选取同期在广东省东莞市妇幼保健院就诊的 100 例正常妊娠女性作为对照组, 检测并比较研究组和对照组血清指标水平。培养 HTR-8/SVneo 细胞, 按照不同转染方式分成 miRNA-146 抑制剂组、miRNA-146 模拟物组及 NC 组。比较 miRNA-146 抑制剂组、miRNA-146 模拟物组 Toll 样受体 4 (TLR4)蛋白和核因子- κ B(NF- κ B)蛋白水平, 比较 NC 组、miRNA-146 模拟物组和 miRNA-146 抑制剂组 miRNA-146 水平及 HTR-8/SVneo 细胞的凋亡率, 比较不同水平 LPS 处理的 HTR-8/SVneo 细胞生长活力。采用 Pearson 相关分析 EPEL 患者 miRNA-146 水平与 ROS、LPS、白细胞介素(IL)-6、肿瘤坏死因子(TNF)- α 、TLR4 蛋白和 NF- κ B 蛋白水平的相关性。结果 研究组 LPS、ROS、IL-6 和 TNF- α 水平高于对照组, 且雌二醇、孕酮、miRNA-146 水平低于对照组, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。miRNA-146 模拟物组 miRNA-146 水平高于 miRNA-146 抑制剂组和 NC 组, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。miRNA-146 模拟物组 TLR4 蛋白、NF- κ B 蛋白水平低于 miRNA-146 抑制剂组, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。不同水平 LPS(8、12、16、20 μ g/mL)处理的 HTR-8/SVneo 细胞生长活力低于 20 μ g/mL LPS+miRNA-146 模拟物处理的 HTR-8/SVneo 细胞生长活力, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。miRNA-146 抑制剂组 HTR-8/SVneo 细胞的凋亡率高于 NC 组和 miRNA-146 模拟物组, 且 NC 组高于 miRNA-146 模拟物组, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。Pearson 相关分析结果显示, EPEL 患者 miRNA-146 水平与 ROS、LPS、IL-6、TNF- α 、TLR4 蛋白和 NF- κ B 蛋白水平呈负相关($r = -0.737$ 、 -0.614 、 -0.712 、 -0.729 、 -0.739 、 -0.708 , $P < 0.05$)。结论 EPEL 患者血清中 miRNA-146 水平明显下降, 并与 LPS、ROS、IL-6、TNF- α 的水平呈负相关, 可能是 EPEL 发生的影响因素之一, 有望为临床预测孕妇发生 EPEL 提供新思路。

关键词:不明原因复发性流产; 微小 RNA-146; 脂多糖; 活性氧; 早期妊娠胚胎丢失

中图分类号:Q492.6;R446.1

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2024)11-1552-06

Levels and clinical significance of serum miRNA-146, LPS and ROS in patients with early pregnancy embryo loss*

HE Fengping^{1,2}, ZHANG Yongmei^{1△}, CHEN Lujing¹, GUO Yihong¹, ZOU Heng¹,Gan Zhongzhi¹, ZHENG Yingchun¹, GUO Yanle², LIU Yulan²

1. Department of Reproductive Medicine, Dongguan Maternal and Child Health Hospital, Dongguan, Guangdong 523002, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Yuebei People's Hospital, Shaoguan, Guangdong 512000, China

Abstract: Objective To investigate the levels and clinical significance of serum microRNA(miRNA)-146, lipopolysaccharide (LPS) and reactive oxygen species (ROS) in patients with early pregnancy embryo loss (EPEL). **Methods** A total of 100 EPEL patients admitted to Dongguan Maternal and Child Health Hospital from March 2021 to March 2023 were selected as the study group, and 100 normal pregnant women admitted to Dongguan Maternal and Child Health Hospital during the same period were selected as the control group. The levels of serum indicators in the study group and the control group were detected and compared. HTR-8/SVneo cells were cultured and divided into miRNA-146 inhibitor group, miRNA-146 mimic group and NC group according to different transfection methods. The levels of Toll-like receptor 4 (TLR4) protein and nu-

* 基金项目:广东省基础与应用基础研究基金项目(2022A1515140097)。

作者简介:何凤屏,女,教授,主要从事生殖免疫学方向的研究。△ 通信作者, E-mail: watering@aliyun.com。

clear factor- κ B (NF- κ B) protein were compared between the miRNA-146 inhibitor group and the miRNA-146 mimic group. The miRNA-146 expression level and apoptosis rates of HTR-8/SVneo cells in NC group, miRNA-146 mimic group and miRNA-146 inhibitor group were compared, and the growth activity of HTR-8/SVneo cells treated with different levels of LPS was compared. Pearson correlation was used to analyze the correlation between miRNA-146 level and ROS, LPS, interleukin (IL)-6, tumor necrosis factor (TNF)- α , TLR4 protein and NF- κ B protein levels in EPEL patients. **Results** The levels of LPS, ROS, IL-6 and TNF- α in the study group were higher than those in the control group, and the levels of estradiol, progesterone and miRNA-146 in the study group were lower than those in the control group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). The level of miRNA-146 in miRNA-146 mimic group was higher than that in miRNA-146 inhibitor group and NC group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). The levels of TLR4 protein and NF- κ B protein in miRNA-146 mimics group were lower than those in miRNA-146 inhibitor group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). The growth activity of HTR-8/SVneo cells treated with different levels of LPS (8, 12, 16, 20 μ g/mL) were lower than those of HTR-8/SVneo cells treated with 20 μ g/mL LPS+miRNA-146 mimic, respectively, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). The apoptosis rate of HTR-8/SVneo cells in miRNA-146 inhibitor group was higher than that in NC group and miRNA-146 mimic group, and that in NC group was higher than that in miRNA-146 mimic group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). Pearson correlation analysis showed that the level of miRNA-146 was negatively correlated with the levels of ROS, LPS, IL-6, TNF- α , TLR4 protein and NF- κ B protein in EPEL patients ($r = -0.737, -0.614, -0.712, -0.729, -0.739, -0.708, P < 0.05$). **Conclusion** The serum miRNA-146 level in EPEL patients is significantly decreased and negatively correlated with LPS, ROS, IL-6 and TNF- α levels, which may be one of the influence factors of EPEL. It may provide a new idea for clinical prediction of EPEL in pregnant women.

Key words: unexplained recurrent spontaneous abortion; microRNA-146; lipopolysaccharide; reactive oxygen species; early pregnancy embryo loss

不明原因复发性流产(uRSA)在复发性流产中占60%,有80%的uRSA患者为早期妊娠胚胎丢失(EPEL)。EPEL是当今临床诊治的难点,还是严重危害女性生育功能的疑难杂症^[1],更是在体外受精-胚胎移植治疗中难以突破的瓶颈^[2]。由于EPEL的病因及发病机制尚不明确,目前临床上缺乏诊断EPEL的生物标志物及治疗EPEL的有效手段^[3]。在正常妊娠过程中,机体内氧化损伤和抗氧化损伤互相制约,进而达到平衡状态。如果该平衡被打破,则易发生EPEL和妊娠期高血压等妊娠疾病^[4]。已有研究表明,氧化应激与反复性流产密切相关,过量的活性氧(ROS)可以导致机体进入氧化应激状态^[5]。有研究表明,病原微生物通过母-胎界面感染胎儿是导致EPEL的重要发病机制^[6]。脂多糖(LPS)是革兰阴性菌细胞壁外壁的组成成分,LPS高表达可以诱导生殖系统发生氧化应激反应和增加ROS产生,甚至影响生殖细胞的质量^[7],其具体病理机制尚不明确。LPS可以刺激ROS大量产生,加重氧化应激反应^[8]。微小RNA(miRNA)是一类新型非编码RNA,它通过与靶向信使RNA(mRNA)特异性结合,降解靶向mRNA或抑制其翻译过程,从而参与疾病的发生、发展过程。既往研究表明,miRNA在胎盘细胞和生殖细胞中均有表达^[9]。近期有研究表明,miRNA-210通过

调节成纤维细胞生长因子1表达,从而增强细胞增殖和侵袭能力^[10]。miRNA-146、LPS和ROS均参与生殖系统氧化应激反应。本研究探讨了血清miRNA-146、LPS、ROS在EPEL患者中的水平及临床意义。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取2021年3月至2023年3月广东省东莞市妇幼保健院收治的100例EPEL患者作为研究组,另外选取同期在广东省东莞市妇幼保健院就诊的100例正常妊娠女性作为对照组。研究组平均年龄为(27.87 $\pm$ 3.34)岁,对照组平均年龄为(26.35 $\pm$ 2.56)岁。两组年龄比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。纳入标准:(1)符合文献[3]中EPEL的诊断标准,且经超声检查确诊为EPEL。(2)年龄 >18 岁。排除标准:(1)因染色体异常、子宫解剖结构异常、感染、内分泌异常、抗磷脂综合征和自身免疫性疾病导致的EPEL;(2)多胎妊娠;(3)存在认知障碍;(4)合并异位妊娠、葡萄胎、异常子宫出血、盆腔炎、子宫肌瘤、子宫腺肌症、子宫内膜异位症等妇科疾病;(5)既往有体外受精-胚胎移植手术史;(6)孕期合并妊娠并发症。本研究经广东省东莞市妇幼保健院医学伦理委员会审批(伦审批2022第85号),且所有研究对象均知情同意并签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 检测血清指标 采用实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测 miRNA-146 水平。采集所有研究对象的清晨肘静脉血 5~6 mL,置于不抗凝干燥管,在常温下以 3 000 r/min 的速度离心 10~15 min,取上层血清,加入 Trizol 试剂,按照试剂盒说明书(生产厂家:广州市锐博生物有限公司)提取血清中的总 RNA,并进行反转录,随后进行 qRT-PCR 检测。miRNA-146 的正向引物序列为 5'-CACACAAGTCTCCGCTAT-3',反向引物序列为 5'-GTGCGATCCAGTCGCG-3';U6 内参正向引物序列为 5'-CTCGCTTCGGCAGCAC-3',U6 内参反向引物序列为 5'-ACGCTTCACGAATTTGCGT-3'。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因的相对水平。qRT-PCR 参数:95 ℃ 10 s,循环 1 次;95 ℃ 5 s,60 ℃ 30 s,循环 40 次。Toll 样受体 4(TLR4)和核因子- κ B(NF- κ B)和内参 GAPDH 引物及探针均由广州锐博生物有限公司提供。在 Thermo Scientific Varioskan LUX 全自动酶标仪(生产厂家:美国赛默飞世尔科技公司;型号:Varioskan™ LUX)上采用酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(生产厂家:广州锐博生物科技有限公司)检测血清 ROS、LPS、白细胞介素(IL)-6 和肿瘤坏死因子(TNF)- α 水平。采用 Cobas 601 电化学发光仪[生产厂家:罗氏(中国)投资有限公司;型号:Cobas 601]检测血清雌二醇(E₂)、孕酮水平。

1.2.2 培养 HTR-8/SVneo 细胞 HTR-8/SVneo 细胞株购自美国典型菌种保藏中心,培养于含有 10 mL 10%胎牛血清(美国西格玛奥德里奇公司)、100 U/mL 青霉素 G(上海生物工程有限公司)、100 μ g/mL 链霉素(上海生物工程有限公司)和 2 mL 2~4 mmol/L 谷氨酰胺(广州锐博生物技术有限公司)的 DMEM 培养基中(美国西格玛奥德里奇公司)。在 24 h 无血清条件下,用不同水平的(8、12、16、20 μ g/mL)LPS(上海生物工程有限公司)及 20 μ g/mL LPS+模拟物处理 HTR-8/SVneo 细胞。置于 37 ℃、100%湿度且含有 5% CO₂ 的培养箱中进行细胞培养。稳定传代后收集对数生长期细胞进行后续实验。

1.2.3 转染 miRNA-146 将 HTR-8/SVneo 细胞消化离心后以合适密度接种到培养板,培养 24 h,当细胞融合率达到 60%~70%时,按照脂质体 2000 转染试剂(上海博耀生物科技有限公司)说明书进行操作。按照不同转染方式将 HTR-8/SVneo 细胞分成 miRNA-146 抑制剂组、miRNA-146 模拟物组及 NC 组。miRNA-146 抑制剂组是将 50 nmol/L miRNA-146 抑制剂转染于细胞,miRNA-146 模拟物组是将 50 nmol/L miRNA-146 模拟物转染于细胞,NC 组是加入同等剂量脂质体 2000 转染试剂及磷酸盐缓冲液(PBS)。5 h 后换成完全培养基,采用荧光显微镜观

察细胞转染情况并计算转染率。

1.2.4 HTR-8/SVneo 细胞生长活力实验 采用二苯基四氮唑溴盐(MTT)比色法测定 HTR-8/SVneo 细胞的生长活力。将 miRNA-146 模拟物转染 HTR-8/SVneo 细胞接种于 6 孔细胞培养板(1×10^5 /孔)中,加入 20 μ g/mL LPS 静置 24 h,用 PBS 冲洗 2 次后,将 5 mg/mL MTT 溶液加到 6 孔细胞培养板中。将细胞板置于 37 ℃ 环境下培养 10 min,静置 4 h 后加入 150 μ L 5%~15%的二甲基亚砜,置于摇床上以 1 000 r/min 的速度震荡 10 min,使结晶物充分溶解。采用酶标仪(深圳华科瑞科技有限公司)测量 490 nm 处各孔的吸光度(A)。

1.2.5 检测 HTR-8/SVneo 细胞的凋亡率 采用膜联蛋白 V 双标记流式细胞术/碘化丙啶(PI)凋亡检测试剂盒(北京 Biosea 生物技术有限公司)检测凋亡 HTR-8/SVneo 细胞。将 miRNA-146 模拟物和 miRNA-146 抑制剂分别转染的细胞接种在 6 孔细胞培养板(1×10^5 /孔)中,用预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次,并将其重新悬浮在 200 μ L 含有 10 μ L 1 mg/mL 膜联蛋白 V 和 5 μ L 13 μ g/mL PI 的结合缓冲液中。将贴壁细胞和漂浮细胞结合,使用流式细胞仪(美国贝克曼库尔特公司)计算百分比,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)。

1.2.6 检测 TLR4 蛋白和 NF- κ B 蛋白水平 采用 RIPA 裂解液裂解各组细胞,以 3 000 r/min 的速度离心 10 min 提取细胞总蛋白。使用二辛可宁酸蛋白浓度测定试剂盒(上海吉至生化科技有限公司)测定 TLR4 蛋白和 NF- κ B 蛋白水平,加入 $5 \times$ 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳蛋白上样缓冲液后煮沸,进行蛋白质变性处理。每孔上样量为 30 μ g,进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,将蛋白转移至聚偏二氟乙烯膜上,以 5%胎牛血清进行封闭,在摇床上放置 2 h。采用 Tris-HCl 缓冲盐(TBST)溶液洗涤 3 次,加入 TLR4 和 NF- κ B 一抗(工作浓度均为 1:1 000),置于 4 ℃ 环境中孵育过夜。用 TBST 溶液洗涤 3 次,加入辣根过氧化物酶标二抗(工作浓度为 1:3 000),室温孵育 2 h,再用 TBST 溶液洗涤 3 次。采用超敏电化学发光液试剂盒发光显影,用 Imagequant TL10.2 图像分析系统分析目的条带 A 与内参条带 A 的比值,计算 TLR4 蛋白和 NF- κ B 蛋白水平。剩余细胞置于-80 ℃ 冰箱中保存备用。TLR4 和 NF- κ B 鼠抗兔单克隆抗体和辣根过氧化物酶标二抗均购自英国 Abcam 公司。

1.3 统计学处理 采用 SPSS21.0 统计软件分析数据。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,多组间两两比较采用 LSD-*t* 检验,两组间比较采用独立样本 *t* 检验;计数资料以例数或百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验。采

用 Pearson 相关分析 EPEL 患者 miRNA-146 水平与 ROS、LPS、IL-6、TNF- α 、TLR4 蛋白和 NF- κ B 蛋白水平的相关性。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 研究组和对照组血清指标水平比较 研究组 LPS、ROS、IL-6 和 TNF- α 水平高于对照组,且 E₂、孕酮、miRNA-146 水平低于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

表 1 研究组和对照组血清指标水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	miRNA-146	ROS(ng/mL)	LPS(ng/mL)	IL-6(ng/mL)	TNF- α (ng/mL)	E ₂ (pmol/L)	孕酮(pmol/L)
对照组	100	3.68 $\pm$ 1.82	12.62 $\pm$ 2.82	8.59 $\pm$ 3.61	20.13 $\pm$ 5.79	13.27 $\pm$ 5.79	92.27 $\pm$ 10.29	66.31 $\pm$ 8.78
研究组	100	1.63 $\pm$ 0.43	62.56 $\pm$ 8.43	36.27 $\pm$ 7.54	109.00 $\pm$ 18.73	86.74 $\pm$ 13.85	36.59 $\pm$ 7.22	13.53 $\pm$ 3.12
<i>t</i>		-10.431	33.387	22.516	59.146	48.689	-42.6113	-36.283
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

2.3 不同水平 LPS 处理的 HTR-8/SVneo 细胞生长活力比较 MTT 比色法结果显示,不同水平 LPS(8、12、16、20 μ g/mL)处理的 HTR-8/SVneo 细胞生长活力分别为(58.48 $\pm$ 11.37)、(40.63 $\pm$ 8.49)、(23.48 $\pm$ 4.36)、(7.75 $\pm$ 1.83),而 20 μ g/mL LPS+miRNA-146 模拟物处理的 HTR-8/SVneo 细胞生长活力为(82.94 $\pm$ 22.74)。不同水平 LPS 处理的 HTR-8/SVneo 细胞生长活力比较,差异有统计学意义($F=39.05, P<0.05$)。20 μ g/mL LPS+miRNA-146 模拟物处理的 HTR-8/SVneo 细胞生长活力高于 8、12、16、20 μ g/mL LPS 处理的 HTR-8/SVneo 细胞生长活力($t=6.07, 9.24, 12.54, 19.85, P<0.05$)。

2.4 NC 组、miRNA-146 模拟物组和 miRNA-146 抑制剂组 HTR-8/SVneo 细胞的凋亡率比较 NC 组、miRNA-146 模拟物组和 miRNA-146 抑制剂组 HTR-8/SVneo 细胞的凋亡率比较,差异有统计学意义($F=129.47, P<0.05$)。miRNA-146 抑制剂组 HTR-8/SVneo 细胞的凋亡率[(81.52 $\pm$ 18.46)%]高于 NC 组[(18.46 $\pm$ 5.19)%]和 miRNA-146 模拟物组[(4.69 $\pm$ 1.43)%],且 NC 组高于 miRNA-146 模拟物组,差异均有统计学意义($t=6.84, 10.57, 23.83, P<0.05$)。

2.5 miRNA-146 模拟物组和 miRNA-146 抑制剂组 TLR4 蛋白和 NF- κ B 蛋白水平比较 miRNA-146 模拟物组 TLR4 蛋白(35.82 $\pm$ 9.78)、NF- κ B 蛋白(21.14 $\pm$ 4.66)水平分别低于 miRNA-146 抑制剂组 TLR4 蛋白(93.45 $\pm$ 18.34)、NF- κ B 蛋白(62.57 $\pm$ 14.18)水平,差异均有统计学意义($t=47.35, 28.46, P<0.05$)。见图 1。

2.6 EPEL 患者 miRNA-146 水平与 ROS、LPS、IL-6、TNF- α 、TLR4 蛋白和 NF- κ B 蛋白水平的相关性分析 Pearson 相关分析结果显示,EPEL 患者 miRNA-

2.2 miRNA-146 模拟物组和 miRNA-146 抑制剂组及 NC 组 miRNA-146 水平比较 miRNA-146 模拟物组和 miRNA-146 抑制剂组及 NC 组 miRNA-146 水平比较,差异有统计学意义($F=26.68, P<0.05$)。miRNA-146 模拟物组 miRNA-146 水平(6.87 $\pm$ 1.59)高于 miRNA-146 抑制剂组(1.33 $\pm$ 0.48)和 NC 组(3.07 $\pm$ 1.12),差异均有统计学意义($t=5.28, 3.39, P<0.05$)。

146 水平与 ROS、LPS、IL-6、TNF- α 、TLR4 蛋白和 NF- κ B 蛋白水平呈负相关($r=-0.737, -0.614, -0.712, -0.729, -0.739, -0.708, P<0.05$)。



图 1 HTR-8/SVneo 细胞中 TLR4 蛋白和 NF- κ B 蛋白的表达

3 讨 论

母体胎盘免疫功能对胎儿的精细免疫调控是保障妊娠正常进行的必要条件,在这个过程中,任何影响母-胎界面微环境的因素都有可能致母胎免疫耐受失衡,最终发生 EPEL 等不良妊娠结局^[6-10]。最新研究表明,细菌定植胎盘导致 EPEL 与以往认为子宫是无菌环境的观点有所不同^[11]。已知 50% 以上的 EPEL 是由子宫内感染引起的,所以病原微生物及代谢产物作为极其重要的致病因子诱导、破坏母胎的免疫耐受平衡^[12]。目前胎盘病原菌的来源尚未清楚,可能与阴道上行感染、胎盘垂直传播及血液感染有关。LPS 是革兰阴性菌的主要成分,但是作为非特异性免疫抗原,当进入机体微循环后与宿主效应细胞(主要为单核细胞、巨噬细胞和中性粒细胞)相互作用,分泌 TNF- α 、IL-6、ROS、一氧化氮(NO)等生物活性分子,使机体内环境处于紊乱状态,引起内毒素血症、脓毒血症、生殖系统炎症等^[13]。OHTSUA 等^[14]研究发现 LPS 在巨噬细胞中促进 IL-6 分泌,可能是通过激活 TLR4/NF- κ B 信号通路产生 ROS,造成妊娠期免疫反应,从而影响母胎免疫耐受平衡,导致 EPEL,提示 LPS 参与 EPEL 发生、发展的病理

过程。

本研究采用 miRNA-146 模拟物或 miRNA-146 抑制剂转染 HTR-8/SVneo 细胞,然后分别评估了不同水平 LPS 处理的 HTR-8/SVneo 细胞生长活力,以及 NC 组、miRNA-146 模拟物组及 miRNA-146 抑制剂组 HTR-8/SVneo 细胞的凋亡率。结果显示,不同水平 LPS(8、12、16、20 $\mu\text{g/mL}$) 处理的 HTR-8/SVneo 细胞生长活力低于 20 $\mu\text{g/mL}$ LPS+miRNA-146 模拟物处理的 HTR-8/SVneo 细胞生长活力。这提示上调 miRNA-146 的水平对 LPS 损伤的 HTR-8/SVneo 细胞具有保护作用,其机制是 miRNA-146 上调 LPS 诱导抑制 TLR4/NF- κB 信号通路,体现出 TLR4/NF- κB 信号通路在生殖细胞增殖、分化和生长中发挥重要作用^[15]。miRNA-146 模拟物组 HTR-8/SVneo 细胞的凋亡率明显低于 NC 组和 miRNA-146 抑制剂组,提示 miRNA-146 具有抗炎症和抗凋亡的作用^[16]。有研究表明,miRNA 在 M1 巨噬细胞和滋养层细胞之间的通讯中起到重要作用,M1 巨噬细胞是母-胎界面的重要免疫细胞,可以抑制滋养层细胞的上皮-间质转化,揭示了 miRNA 通过影响 M1 巨噬细胞调节滋养层的潜在机制^[17]。但是目前尚不明确 miRNA-146 负性调控 LPS/TLR4/NF- κB 信号通路是否参与了 HTR-8/SVneo 细胞增殖、生长和凋亡过程。

本研究还发现,研究组 LPS、ROS、IL-6 和 TNF- α 水平高于对照组,且 E_2 、孕酮、miRNA-146 水平低于对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。同时本研究结果显示,miRNA-146 模拟物组 TLR4 蛋白、NF- κB 蛋白水平低于 miRNA-146 抑制剂组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。该结果与文献[12-14]的研究结果趋势一致,从临床血清标本的角度佐证了细胞层面的研究。笔者认为,EPEL 患者由于 LPS 水平升高,以及雌激素、孕激素水平紊乱,促使机体产生过多的 ROS,诱发母-胎界面氧化应激和炎症反应。同时,LPS 会刺激生成大量 ROS,加重母-胎界面氧化应激和氧化损伤。本课题组前期研究证实,在雌激素水平紊乱的情况下,LPS 会刺激机体产生大量 ROS,从而加重氧化应激和卵泡细胞的损伤^[18]。WANG 等^[19]研究表明 LPS 上调 NF- κB 蛋白和 NO 的水平,增加睾丸炎症负荷,诱导的睾丸产生 ROS,导致生殖细胞增殖率和存活率下降,最终导致生殖细胞凋亡。本研究结果显示,miRNA-146 水平与 LPS、ROS 水平呈负相关($P < 0.05$),提示下调 miRNA-146 负性调控 TLR4/NF- κB 信号通路诱导 LPS 和 ROS 水平升高,导致母-胎界面发生氧化应激反应、炎症反应,诱导胎盘血管内皮功能紊乱,使胎盘血流下降而缺血、缺氧,最终导致 EPEL 发生^[20]。本研究结果显示,通过上调 miRNA-146 激活 TLR4/NF- κB 信号通路促进 HTR-

8/SVneo 细胞生长,其作用机制可能为绕过下丘脑-垂体-卵巢轴对早期丢失胚胎发挥胎盘保护作用。最后,本研究还探讨了 miRNA-146 与炎症因子 IL-6 和 TNF- α 的关系,miRNA-146 水平与 IL-6 和 TNF- α 水平呈负相关($P < 0.05$),由此可见 miRNA-146 可能对母-胎界面的炎症反应具有一定的调控作用,可能是 miRNA-146 通过 LPS/ROS/NF- κB 信号通路发挥调控作用,使得 IL-6 和 TNF- α 的水平下降,其作用机制可能与下游的炎症因子释放有密切关联。

综上所述,本研究提出 miRNA-146 负性调控 LPS 和 ROS,并参与 EPEL 发生、发展过程。在本研究中,EPEL 患者 miRNA-146 水平与 LPS、ROS、IL-6、TNF- α 水平呈负相关,可能是下调 miRNA-146 诱导 LPS 和 ROS 通过调控 TLR4/NF- κB 信号通路使母-胎界面发生氧化应激和炎症反应,导致发生 EPEL。本研究结果显示,调节 miRNA-146 可能是预防和治疗 EPEL 的一个新靶点。

参考文献

- [1] PLACAIS L, KOLANSKA K, KRAIEM Y, et al. Intralipid therapy for unexplained recurrent miscarriage and implantation failure: case-series and literature review[J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2020, 252: 100-104.
- [2] TY L, LI R, ZENG L, et al. In vitro fertilization-embryo transfer in patients with unexplained recurrent pregnancy loss[J]. Chin Med J (Engl), 2021, 134(20): 2421-2429.
- [3] SATO T, SUGIURA O M, OZAWA F, et al. Preimplantation genetic testing for aneuploidy: a comparison of live birth rates in patients with recurrent pregnancy loss due to embryonic aneuploidy or recurrent implantation failure[J]. Hum Reprod, 2019, 34(12): 2340-2348.
- [4] Annual Capri Workshop Group. Early pregnancy loss: the default outcome for fertilized human oocytes[J]. J Assist Reprod Genet, 2020, (5): 1057-1063.
- [5] GOUTAMI L, JENA S, SWAIN A, et al. Pathological role of reactive oxygen species on female reproduction[J]. Adv Exp Med Biol, 2022, 1391: 201-220.
- [6] JASAREVIC E, HILL E, KANE P, et al. The composition of human vaginal microbiota transferred at birth affects offspring health in a mouse model[J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 6289.
- [7] HIRATA Y, SHIMAZAKI S, SUZUKI S, et al. β -hydroxybutyrate suppresses NLRP3 inflammasome-mediated placental inflammation and lipopolysaccharide-induced fetal absorption[J]. J Reprod Immunol, 2021, 148: 103433.
- [8] PARK S, SHIN J, BAE J, et al. SIRT1 alleviates LPS-induced IL-1 β production by suppressing NLRP3 inflammasome activation and ROS production in trophoblasts[J]. Cells, 2020, 9(3): 728.
- [9] HUANG Q, DING J, GONG M, et al. Effect of miR-30e regulating NK cell activities on immune tolerance of ma-

ternal-fetal interface by targeting PRF1[J]. Biomed Pharmacother, 2019, 109: 1478-1487.

[10] LI L, HUANG X, HE Z, et al. MiRNA-210-3p regulates trophoblast proliferation and invasiveness through fibroblast growth factor 1 in selective intrauterine growth restriction[J]. J Cell Mol Med, 2019, 23(6): 4422-4433.

[11] NYANGAHU D, JASPAN H. Influence of maternal microbiota during pregnancy on infant immunity[J]. Clin Exp Immunol, 2019, 198(1): 47-56.

[12] ROSINI A, TEIXEIRA S, MILIANIC B, et al. LPS-mediated activation of TLR4 controls toxoplasma gondii growth in human trophoblast cell (BeWo) and human vilous explants in a dependent-manner of TRIF, MyD88, NF- κ B and cytokines[J]. Tissue Cell, 2022, 78: 101907.

[13] ZHANG Y, LIU W, ZHONG Y, et al. Metformin corrects glucose metabolism reprogramming and NLRP3 inflammasome-induced pyroptosis via inhibiting the TLR4/NF- κ B/PFKFB3 signaling in trophoblasts; implication for a potential therapy of preeclampsia[J]. Oxid Med Cell Longev, 2021, 11: 1806344.

[14] OHTSUA, SHIBUTANI Y, SENO K, et al. Advanced glycation end products and lipopolysaccharides stimulate interleukin-6 secretion via the RAGE/TLR4-NF- κ B-ROS pathways and resveratrol attenuates these inflammatory responses in mouse macrophages[J]. Exp Ther Med, 2017, 14(5): 4363-4370.

[15] CHAN H, MOLDNHAUER L, GROOME H, et al. Toll-like receptor-4 null mutation causes fetal loss and fetal growth restriction associated with impaired maternal immune tolerance in mice[J]. Sci Rep, 2021, 11 (1): 16569.

[16] GAO M, WANG X, ZHANG X, et al. Attenuation of cardiac dysfunction in polymicrobial sepsis by microRNA-146a is mediated via targeting of IRAK1 and TRAF6 expression[J]. J Immunol, 2015, 195(2): 672-82.

[17] WANG L, WANG H, LUO J, et al. Decorin promotes decidual M1-like macrophage polarization via mitochondrial dysfunction resulting in recurrent pregnancy loss[J]. Theranostics, 2022, 12(17): 7216-7236.

[18] FENGPING H, YANHUI L, TANG L, et al. MicroRNA-146 attenuates lipopolysaccharide induced ovarian dysfunction by inhibiting the TLR4/NF- κ B signaling pathway[J]. Bioengineered, 2022, 13: (5), 11611-11623.

[19] WANG G, CHENG S, ZHANG S, et al. LPS impairs steroidogenesis and ROS metabolism and induces PPAR transcriptional activity to disturb estrogen/androgen receptor expression in testicular cells[J]. Mol Biol Rep, 2020, 47(2): 1045-1056.

[20] WANG Z, ZHAO G, ZIBRILA A, et al. Acetylcholine ameliorated hypoxia-induced oxidative stress and apoptosis in trophoblast cells via p38 MAPK/NF- κ B pathway[J]. Mol Hum Reprod, 2021, 27(8): gaab045.

(收稿日期: 2023-12-10 修回日期: 2024-03-05)

(上接第 1551 页)

[7] 李晴, 刘玄长, 祝芬, 等. 原发性高血压患者心脏电重构与血压控制效果的关系[J]. 天津医药, 2021, 49(9): 968-973.

[8] 中国高血压防治指南修订委员会高血压联盟(中国), 中华医学会心血管病学分会, 中国医师协会高血压专业委员会, 等. 中国高血压防治指南(2018 年修订版)[J]. 中国心血管杂志, 2019, 24(1): 24-56.

[9] 李依朔, 刘宁, 杨明, 等. 心肌纤维化在高血压心脏病中的研究进展[J]. 心血管病学进展, 2023, 44(7): 627-630.

[10] GUO D L, YU M F, LIU Q H, et al. Ventricular hypertrophy amplifies transmural dispersion of repolarization by preferentially increasing the late sodium current in endocardium[J]. J Electrocardiol, 2014, 47(5): 642-648.

[11] TSE G, GONG M, WONG W T, et al. The T_{peak} - T_{end} interval as an electrocardiographic risk marker of arrhythmic and mortality outcomes: a systematic review and meta-analysis[J]. Heart Rhythm, 2017, 14(8): 1131-1137.

[12] 韩英, 龚瑾, 蔡文钦, 等. 厄贝沙坦或贝那普利联合地尔硫卓对轻中度原发性高血压患者左心室肥厚和无症状性心肌缺血的影响[J]. 中华高血压杂志, 2018, 26(6): 546-552.

[13] 房莉, 张建业. 高血压左室肥厚患者 T 波峰-末间期的改变[J]. 实用医学杂志, 2012, 28(10): 1626-1628.

[14] WEBER T, WASSERTHEURER S, SCHMIDTTRUCK-SÄSS A, et al. Relationship between 24-Hour ambulatory central systolic blood pressure and left ventricular mass: a prospective multicenter study[J]. Hypertension, 2017, 70(6): 1157-1164.

[15] 朱广旋, 左建丽, 许林, 等. 中药有效成分逆转左室心肌肥厚的研究进展[J]. 中国实验方剂学, 2017, 23(17): 228-234.

[16] 胡慧英, 李志刚. 老年冠状动脉狭窄伴高血压患者降压对 T 波峰末间期的影响[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2016, 18(1): 12-15.

[17] GUPTA P, PATEL C, PATEL H, et al. T(p-e)/QT ratio as an index of arrhythmogenesis[J]. J Electrocardiol, 2008, 41(6): 567-574.

[18] SRINIVASAN N T, MBCHB, ORINI M, et al. Differences in the upslope of the precordial body surface ECG T wave reflect right to left dispersion of repolarization in the intact human heart[J]. Heart Rhythm, 2019, 16(6): 943-951.

(收稿日期: 2023-11-15 修回日期: 2024-02-20)