

印记基因H19单核苷酸多态性与不明原因复发性流产的相关性研究

于彬彬¹, 徐志彦¹, 于潇涵¹, 张萍^{2*}

¹青岛大学附属威海市立第二医院, 山东 威海

²青岛大学附属青岛市立医院, 山东 青岛

收稿日期: 2022年1月23日; 录用日期: 2022年2月14日; 发布日期: 2022年2月24日

摘要

目的: 探讨印记基因H19单核苷酸多态性(SNP)与不明原因复发性流产(URSA)发生的相关性。方法: 随机选取2010年1月至2021年3月本院34例不明原因复发性流产患者绒毛组织和42例正常流产患者的绒毛组织为研究对象, 提取研究对象基因组DNA, SNP测序分析URSA组与对照组患者H19多个SNP位点的差异, 分析单核苷酸多态性与疾病的关系。结果: URSA组和对照组的H19基因rs217727位点基因型、等位基因的分布情况差异有统计学意义($p < 0.05$); H19基因rs2107425、rs3741219位点基因型、等位基因的分布情况差异无统计学意义($p > 0.05$)。结论: H19基因rs217727位点单核苷酸多态性可能与URSA相关。

关键词

不明原因复发性流产, 印记基因H19, 单核苷酸多态性

Correlation Study between Genomic Imprinting H19 Single Nucleotide Polymorphism and Unexplained Recurrent Spontaneous Abortion

Binbin Yu¹, Zhiyan Xu¹, Xiaohan Yu¹, Ping Zhang^{2*}

¹Weihai Municipal Second Hospital Affiliated to Qingdao University, Weihai Shandong

²Qingdao Municipal Hospital Affiliated to Qingdao University, Qingdao Shandong

Received: Jan. 23rd, 2022; accepted: Feb. 14th, 2022; published: Feb. 24th, 2022

Abstract

Objective: To investigate the correlation between imprinted gene H19 single nucleotide polymor-

*通讯作者。

文章引用: 于彬彬, 徐志彦, 于潇涵, 张萍. 印记基因 H19 单核苷酸多态性与不明原因复发性流产的相关性研究[J]. 临床医学进展, 2022, 12(2): 1407-1412. DOI: 10.12677/acm.2022.122204

phism (SNP) and the occurrence of unexplained recurrent spontaneous abortion (URSA). Methods: Chorionic villus tissues of 34 patients with unexplained recurrent spontaneous abortion and 42 patients with normal miscarriage in our hospital from January 2010 to March 2021 were randomly selected for the study, and the genomic DNA of the study subjects was extracted and SNP sequencing was analyzed. SNP sequencing was used to analyze the differences of *H19* SNP loci between URSA group and control group, and to analyze the relationship between single nucleotide polymorphism and disease. **Results:** The differences in genotype and allele distribution of *H19* gene rs217727 locus between URSA group and control group were statistically significant ($p < 0.05$); the differences in genotype and allele distribution of *H19* gene rs2107425 and rs3741219 locus were not statistically significant ($p > 0.05$). **Conclusion:** *H19* gene rs217727 locus single nucleotide polymorphism may be associated with URSA.

Keywords

Unexplained Recurrent Spontaneous Abortion, Genomic Imprinting *H19*, Single Nucleotide Polymorphism

Copyright © 2022 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. 前言

自然流产(spontaneous abortion, SA)是临床常见的异常妊娠,反复自然流产极大地影响着育龄妇女的身心健康。复发性流产(recurrent spontaneous abotion, RSA)是指妊娠早期连续三次(包括三次)以上的自然流产,其发生率逐年上升,目前占所有女性发生自然流产的15%~20% [1]。导致流产的因素非常复杂,除最常见的遗传因素、内分泌因素、免疫因素、感染性疾病及血栓性疾病等之外,尚有约半数患者流产原因不明,称不明原因复发性流产(unexplained recurrent spontaneous abortion, URSA) [2] [3] [4] [5] [6]。URSA的病因病机复杂多样,现代医学的发展必须从全新的领域探索复发性流产的发病机制。

*H19*就是人类最早发现的印记基因之一,父源印记而母源表达,参与染色体沉默及修饰、基因组印记印象、转录激活等,进而影响了许多重要的生物过程。本研究通过比较URSA患者的绒毛组织和正常妊娠者的绒毛组织二者印迹基因*H19*单核苷酸多态性方面的差异,从而深入地探讨URSA的发病机理,为临床诊治开拓新的思路。

2. 资料与方法

2.1. 标本来源

选取2020年1月~2021年3月在本院就诊的URSA患者再次妊娠胚胎停育行人工流产术的患者34例(观察组),同期要求行人工流产术正常早期妊娠者42例(对照组)。观察组纳入标准:①有3次及3次以上自然流产史,②单胎妊娠,③2次及以上B超证实宫内胚胎无心血管搏动。④女方无基础疾病:例如高血压病、糖尿病、肾脏系统疾病、心脑血管系统疾病、甲状腺疾病、自身免疫性疾病;前1月内未患感染性疾病,亦未服用过任何药物;无生殖道畸形;无生殖道感染;内分泌激素均正常;月经周期规律,有正常的排卵;抗子宫内抗体、抗精子抗体、抗磷脂抗体、抗核抗体等阴性。⑤妊娠前3个月未进行免疫治疗和疫苗接种。⑥男方精液检查正常。夫妻双方染色体核型分析正常,无家族遗传病史。

⑦ 流产绒毛染色体检查正常。对照组纳入标准：① 同期在我院妇科就诊的健康妇女，均排除以上疾病，且无不良孕史。② 至少有 1 次或以上正常分娩史。③ 均经盆腔 B 超检查证实。④ 无妊娠高危因素，自愿要求终止妊娠。

本研究经本院伦理委员会审核并批准。所有研究对象及家属均签署知情同意书。

2.2. 标本采集及处理

上述患者均于人工流产时留取绒毛组织，尽早行基因组 DNA 提取或 -80°C 冰箱保存。

DNA 提取采用：TIANNamp Genomic DNA Kit 基因组 DNA 提取试剂盒，购自天根生化科技有限公司，目录号 DP304，采用可以特异性集合 DNA 的离心吸附柱和缓冲液系统。提取基因组 DNA，溶解于保存液(dd H₂O)，置 -20°C 冰箱保存。

2.3. 基因型分析

利用 Taqman 探针实时荧光 PCR 分型等位基因技术(ABI 公司)分析上述基因 SNP 位点。PCR 反应和基因分型在荧光定量 PCR 仪上完成 PCR 反应体系。

2.4. 统计学处理

采用 SPSS19.0 软件进行统计学分析，计数资料采用 χ^2 检验，以 $p < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3. 结果

3.1. 受试者临床基础指标

URSA 组及对照组患者年龄、孕周及 BMI 均无明显差异($p > 0.05$ ，表 1)。

Table 1. Basic clinical indexes of subjects

表 1. 受试者临床基础指标

	URSA 组	对照组
样本量	34	42
年龄(岁)	31.2 ± 2.5	32.1 ± 2.0
孕周	8.4 ± 0.7	8.1 ± 0.7
BMI (kg/m ²)	23.2 ± 2.4	24.4 ± 2.5
先前怀孕次数	3.5 ± 0.8	0
先前流产孕周	8.5 ± 1.5	0

3.2. Hardy-Weinberg 平衡检验

URSA 组及对照组的 *H19* 基因 rs217727、rs2107425、rs3741219 位点的检测结果显示：满足 Hardy-Weinberg 平衡定律，差异无统计学意义($p > 0.05$)，证明研究对象具有样本代表性。

3.3. *H19* 基因 rs217727 位点情况分析

URSA 组 *H19* 基因 rs217727 GG 基因型频率为 55.8%，高于对照组 26.2%，G 等位基因频率为 74.6%，同样高于对照组 50%，两组人群中该位点基因型、等位基因分布情况差异具有统计学意义($p < 0.05$)。*H19* 基因 rs2107425、rs3741219 位点基因型、等位基因的分布情况差异无统计学意义($p > 0.05$)。见表 2。

Table 2. Comparison of genotype and allele frequency of SNP locus of *H19* gene between the two groups
表 2. 两组 *H19* 基因 SNP 位点基因型及等位基因型频率的比较

基因	位点	GT/AT	URSA 组 例数/频率	对照组 例数/频率	χ^2	P 值
<i>H19</i>	Rs217727	AA	3 (8.8)	11 (26.2)	7.951	0.019
		AG	12 (35.2)	20 (47.6)		
		GG	19 (55.9)	11 (26.2)	8.708	0.003
		A	18 (26.4)	42 (50)		
		G	50 (74.6)	42 (50)		
<i>H19</i>	rs2107425	CC	14 (41.2)	15 (35.7)	1.491	0.475
		CT	15 (44.1)	16 (38.1)		
		TT	5 (14.7)	11 (26.2)	1.112	0.292
		C	43 (63.2)	46 (54.8)		
		T	25 (36.8)	38 (45.2)		
<i>H19</i>	rs3741219	AA	16 (47.1)	18 (42.9)	3.221	0.200
		AG	18 (52.9)	21 (50)		
		GG	0	3 (7.1)	1.911	0.167
		A	50 (73.5)	57 (67.9)		
		G	18 (26.5)	27 (32.1)		

4. 讨论

目前, 由于我国许多城市均出现人口负增长, 因此降低复发性流产的发生率势在必行, 然而, 目前尚无明确的预测复发性流产的指标, 以及有效提高治疗成功率、预防复发性流产的方法。因此, 基因干预已成为学者的研究热点之一。

印记基因在人类生长发育过程中起着重要作用。以往研究证实, 印记基因在胚胎生长和肿瘤发生中起重要作用。目前, 印记基因在自然流产机制研究中的作用已受到重视。印记基因不符合孟德尔遗传学的规律, 是仅依赖单亲的基因进行相关表达。相关研究表明, 印记基因在哺乳动物胚胎发育进程中起到重要作用, 印记基因功能异常很容易导致胎儿发育不良, 严重者易导致死产。

印记基因 *H19* 属于长链非编码 RNA, 位于人类染色体 11p15.5, 在胚胎发育过程中, 主要在内胚层和中胚层来源的组织中表达, 出生后主要表达于心肌、骨骼肌、乳腺、子宫、卵巢和睾丸[7]。既往关于印记基因 *H19* 的研究, 多集中在恶性肿瘤的发生、发展和代谢等方面。WU 等[8]与赖慧超等[9]研究结果均提示 LncRNA *H19* 的高表达可能与上皮性卵巢癌的发生与进展密切相关。通过相海云等[10]的研究, 发现 *H19* 在宫颈癌组织中高表达, 可通过抑制 *H19* 的表达从而抑制宫颈癌细胞的增殖和侵袭能力。

许多研究指出, *H19* 还与精子及胚胎的生长发育有关。Clealon MA 等[11]在动物实验中敲除胚胎的 *H19* 基因, 导致胚胎死亡, 进而得出胚胎发育及胎盘形成均可能与 *H19* 有关等结论。精子和卵子都是胚胎发育过程中不可缺少的部分, 任何一方异常均能极大地影响胚胎发育, 所以部分关于 *H19* 的研究围绕精子进行。例如李建波等[12]发现精子浓度及畸形率会影响 *H19* 甲基化水平, *H19* 可通过影响精子质量从而调控胚胎生长发育。Santi 等[13]通过分析 18 项临床研究, 发现不育患者精液中 *H19* 甲基化平均水平

明显低于正常对照, 这表明 *H19* 可能在精子发生中扮演重要角色。

近年来, *H19* 引起了越来越多的关注, 很多研究表明 *H19* 基因在复发性流产中的作用不容忽视。Bai Ruxia 等[14]通过多种实验发现长链非编码 RNA *H19* 通过调节 Bcl-2、Bax 和磷脂过氧化氢谷胱甘肽过氧化物酶的表达促进细胞凋亡, 从而在 SA 中发挥重要作用。崔进等[15]的研究结果显示, LncRNA *H19* 在 RSA 患者的胚胎组织中的高表达, 引起了基因表达缺陷、细胞增殖异常等, 从而导致 RSA 发生。然而 He [16]等的研究结果却与之相反, 他们发现在 RSA 患者绒毛组织中, *H19* 和 ITGB3 的表达均下降, 故总结出 *H19* 的低表达是导致胚胎植入受阻和不良妊娠结局发生的原因之一。

上述证据表明印记基因 *H19* 可能在胚胎生长发育过程中扮演积极的角色, 本研究结果中自表 2 可以看出, rs217727 GG 基因型频率为 55.8%, 高于对照组(26.2%), G 等位基因频率为 74.6%, 同样高于对照组(50%), 两组人群中该位点基因型、等位基因分布情况差异具有统计学意义($p < 0.05$)。 *H19* 基因 rs2107425、rs3741219 位点基因型、等位基因的分布情况差异无统计学意义($p > 0.05$)。故考虑 *H19* 基因 rs217727 位点 SNP 可能与不明原因的复发性流产发生相关。由此分析, *H19* 基因 rs217727 位点对流产的发生具有一定的相关性, *H19* 基 rs2107425 位点、rs3741219 位点与流产发生的暂无明显相关性。故得出结论: *H19* 基因的单核苷酸多态性可能在 URSA 中发挥着重要作用。

目前关于 *H19* 与 URSA 相关性的报道多集中于相关性观察, 对于妊娠结局的改善研究不足, 但随着研究的深入, *H19* 的作用机制将更加明确, 将为 URSA 的诊断及治疗提供有效依据[17]。绝大多数关于复发性流产的诊断均侧重于病因诊断, 故治疗前应进行系统全面的病因筛查, *H19* 基因的 SNP 筛查可考虑用于原因不明的流产人群, 对于存在基因异常者进行个性化治疗。但本研究标本量较少, 且并未明确相关具体机制, 今后还需加强研究, 进行更入的调查分析。

基金项目

山东省医药卫生科技发展计划项目。

参考文献

- [1] 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, 51(1): 3-9.
- [2] Branch, D.W., Gibson, M., Silver, R.M. (2010) Recurrent Miscarriage. *New England Journal of Medicine*, **363**, 1740-1747. <https://doi.org/10.1056/NEJMcp1005330>
- [3] Zong, S.S., Li, C.Q., Luo, C.F., et al. (2016) Dysregulated Expression of IDO May Cause Unexplained Recurrent Spontaneous Abortion through Suppression of Trophoblast Cell Proliferation and Migration. *Scientific Reports*, **6**, Article No. 19916. <https://doi.org/10.1038/srep19916>
- [4] Singh, N., Prasad, P., Singh, L.C., et al. (2016) Expression of Prostaglandin Receptors in *Chlamydia trachomatis*-Infected Recurrent Spontaneous Aborters. *Journal of Medical Microbiology*, **65**, 476-483. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000256>
- [5] Leach, M., Aitken, R.J. and Sacks, G. (2015) Sperm DNA Fragmentation Abnormalities in Men from Couples with a History of Recurrent Miscarriage. *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology*, **55**, 379-383. <https://doi.org/10.1111/ajo.12373>
- [6] Triggianese, P., Perricone, C., Perricone, R., et al. (2015) Prolactin and Natural Killer Cells: Evaluating the Neuroendocrine-Immune Axis in Women with Primary Infertility and Recurrent Spontaneous Abortion. *American Journal of Reproductive Immunology*, **73**, 56-65. <https://doi.org/10.1111/aji.12335>
- [7] Jarroux, J., Morillon, A. and Pinskaya, M. (2017) History, Discovery, and Classification of lncRNAs. In: Rao, M., Eds., *Long Non Coding RNA Biology*, Springer, Singapore, 1-46. https://doi.org/10.1007/978-981-10-5203-3_1
- [8] Wu, Y., Zhou, Y., He, J., et al. (2019) Long Non-Coding RNA *H19* Mediates Ovarian Cancer Cell Cisplatin-Resistance and Migration during EMT. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, **12**, 2506-2515.
- [9] 赖慧超, 肖婷婷, 刘剑英, 黄雪梅, 徐敏娟. LncRNAH9、P2 在上皮性卵巢癌中的表达及其临床意义[J]. 中国免疫学杂志, 2021, 37(16): 2000-2004.

-
- [10] 相海云, 姚露露, 张婕. 长链非编码 RNAH19 靶向 Bcl2 的表达调控宫颈癌细胞的侵袭转移行为[J]. 西部医学, 2019, 31(1): 36-42.
- [11] Clealon, M.A., Edwards, C.A. and Ferguson-Smith, A.C. (2014) Phenotypic Outcomes of Imprinted Gene Models in Mice: Elucidation of Pre and Postnatal Functions of Imprinted Genes. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, **15**, 93-126.
- [12] 李建波, 李博, 梁新新, 等. 父源印记基因 H19 印记控制区域 DNA 甲基化与少、弱精子症相关性分析[J]. 中华男科学杂志, 2013, 19(6): 511-517.
- [13] Santi, D., De Vincentis, S., Magnani, E., *et al.* (2017) Impairment of Sperm DNA Methylation in Male Infertility: A Meta-Analytic Study. *Andrology*, **5**, 695-703. <https://doi.org/10.1111/andr.12379>
- [14] Bai, R.X. and Tang, Z.Y. (2021) Long Non-Coding RNA H19 Regulates Bcl-2, Bax and Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase Expression in Spontaneous Abortion. *Experimental and Therapeutic Medicine*, **21**, Article No. 41. <https://doi.org/10.3892/etm.2020.9473>
- [15] 崔进, 张秀娟, 吴宏, 等. LncRNA 与复发性流产相关性研究[J]. 中国优生与遗传杂志, 2019, 27(5): 569-570.
- [16] He, D., Zeng, H., Chen, J., *et al.* (2019) H19 Regulate Strophoblastic Spheroid Adhesion by Competitively Binding to Let-7. *Reproduction*, **157**, 423-430. <https://doi.org/10.1530/REP-18-0339>
- [17] 孙大林, 金保方, 蔡滨, 邓伟民. 长链非编码 RNAH19 在生殖系统中的研究进展[J]. 生殖医学杂志, 2021, 30(1): 125-130.