

## 外泌体负载的 *miR-520a-5p* 对胎鼠宫内生长受限妊娠结局的改善作用及其机制

相萌<sup>1,2</sup>, 徐冰<sup>3</sup>, 王培莎<sup>2</sup>, 刘思旗<sup>2</sup>, 张少华<sup>3</sup>

(1. 西安医学院临床医学院妇产科教研室, 陕西 西安 710021; 2. 西安医学院临床医学院西安肿瘤早诊创新转化重点实验室, 陕西 西安 710021; 3. 西安医学院第一附属医院妇产科, 陕西 西安 710021)

**[摘要]** **目的:** 探讨外泌体 (Exos) 负载的微小RNA-520a-5p (*miR-520a-5p*) 对胎鼠宫内生长受限 (FGR) 妊娠结局的影响, 并阐明其作用机制。**方法:** 体外培养小鼠胎盘间充质干细胞 (MSCs), 并利用 *miR-520a-5p* 腺病毒载体 (Ad-*miR-520a-5p*) 转染获得高负载 *miR-520a-5p* 的 Exos (miR-520a-5p-MSCs-Exos) 并进行鉴定。C57BL/6 小鼠按照雌雄 2:1 的比例合笼交配成功妊娠, 将 40 只怀孕小鼠分为对照组、FGR 组、NC-MSCs-Exos 组和 miR-520a-5p-MSCs-Exos 组, 每组 10 只。除对照组外, 其余组小鼠采用孕期过度暴露地塞米松 (DEX) 诱发妊娠期母体小鼠的 FGR 模型。检测胎鼠出生体质量和生后 1、2、3 及 4 周体质量, 采用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 法检测各组小鼠胎盘组织中 *miR-520a-5p*、DNA 甲基转移酶 3b (*DNMT3b*) 和血管内皮生长因子 (*VEGF*) mRNA 表达水平, Western blotting 法检测各组小鼠胎盘组织中 DNMT3b 和 VEGF 蛋白表达水平, 甲基化特异性 PCR (MSP) 分析各组小鼠胎盘组织中 VEGF 启动子甲基化率, 双荧光素酶报告基因实验验证 *miR-520a-5p* 与 *DNMT3b* 之间的靶向关系。**结果:** 透射电子显微镜 (TEM) 和纳米粒子追踪分析 (NTA) 分析, Exos 呈球形, 粒径集中在 100 nm 附近; Western blotting 法, Exos 表面生物标志物 CD63 和 CD81 均呈阳性表达; RT-qPCR 法, 与 NC-MSCs-Exos 和 Ad-NC-MSCs-Exos 比较, Ad-*miR-520a-5p*-MSCs-Exos 中 *miR-520a-5p* 表达水平升高 ( $P < 0.001$ )。4 组子代小鼠出生体质量和生后 1、2 及 3 周体质量比较差异均有统计学意义 ( $F = 36.084$ ,  $F = 19.851$ ,  $F = 77.755$ ,  $F = 103.223$ ;  $P < 0.001$ )。与对照组比较, FGR 组子代小鼠出生体质量和生后 1、2 及 3 周体质量均降低 ( $P < 0.05$ ); 与 FGR 组和 NC-MSCs-Exos 组比较, miR-520a-5p-MSCs-Exos 组子代小鼠出生体质量和生后 1、2 及 3 周体质量均升高 ( $P < 0.05$ )。单因素方差分析, 4 组小鼠胎盘组织中 *miR-520a-5p*、*DNMT3b* 和 *VEGF* mRNA 表达水平比较差异有统计学意义 ( $F = 103.224$ ,  $F = 856.460$ ,  $F = 214.563$ ;  $P < 0.001$ ); 组间两两比较, 与对照组比较, FGR 组小鼠胎盘组织中 *miR-520a-5p* 和 *VEGF* mRNA 表达水平降低 ( $P < 0.05$ ), *DNMT3b* mRNA 表达水平升高 ( $P < 0.05$ ); 与 FGR 组和 NC-MSCs-Exos 组比较, miR-520a-5p-MSCs-Exos 组小鼠胎盘组织中 *miR-520a-5p* 和 *VEGF* mRNA 表达水平升高 ( $P < 0.05$ ), *DNMT3b* mRNA 表达水平降低 ( $P < 0.05$ )。单因素方差分析, 4 组小鼠胎盘组织中 DNMT3b 和 VEGF 蛋白表达水平比较差异有统计学意义 ( $F = 245.601$ ,  $F = 149.360$ ;  $P < 0.001$ ); 组间两两比较, 与对照组比较, FGR 组小鼠胎盘组织中 DNMT3b 蛋白水平升高 ( $P < 0.05$ ), VEGF 蛋白表达水平降低 ( $P < 0.05$ ); 与 FGR 组和 NC-MSCs-Exos 组比较, miR-520a-5p-MSCs-Exos 组小鼠胎盘组织中 DNMT3b 蛋白表达水平降低 ( $P < 0.05$ ),

[收稿日期] 2024-10-30

[录用日期] 2024-12-19

[基金项目] 陕西省科技厅自然科学基金基础研究计划项目 (2022JQ-804); 陕西省西安市科技局医学研究一般项目 (24YXYJ0197)

[作者简介] 相萌 (1983—), 女, 陕西省西安市人, 副教授, 医学博士, 主要从事妇产科学基础和临床方面的研究。

[通信作者] 张少华, 教授, 主任医师, 硕士研究生导师 (E-mail: zhangshaohua72@163.com);

相萌, 副教授 (E-mail: xjtuxm@126.com)

VEGF 蛋白表达水平升高 ( $P < 0.05$ )。单因素方差分析, 4 组小鼠胎盘组织中 VEGF 启动子甲基化率比较差异有统计学意义 ( $F = 687.096, P < 0.001$ ); 组间两两比较, 与对照组比较, FGR 组小鼠胎盘组织中 VEGF 启动子甲基化率升高 ( $P < 0.05$ ); 与 FGR 组和 NC-MSCs-Exos 组比较, miR-520a-5p-MSCs-Exos 组小鼠胎盘组织中 VEGF 启动子甲基化率降低 ( $P < 0.05$ )。双荧光素酶报告基因实验, 与 miR-NC 组比较, miR-520a-5p 组 DNMT3b-WT 报告载体细胞的荧光素酶活性明显降低 ( $P < 0.05$ ); 与 miR-NC 组比较, miR-520a-5p 组 DNMT3b-MUT 报告载体细胞的荧光素酶活性无明显改变, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。结论: 高负载 *miR-520a-5p* 的 MSCs 来源的 Exos 可能通过靶向下调 DNMT3b 表达, 抑制 VEGF 甲基化, 促进 VEGF 表达, 改善 FGR 胎鼠妊娠结局。

[关键词] 胎鼠宫内生长受限; 外泌体; 间充质干细胞; 微小 RNA-520a-5p; DNA 甲基转移酶 3b; 血管内皮生长因子

[中图分类号] R715.5 [文献标志码] A

## Effect of exosomes loaded with *miR-520a-5p* on pregnancy outcomes in fetal mice with intrauterine growth restriction and its mechanism

XIANG Meng<sup>1,2</sup>, XU Bing<sup>3</sup>, WANG Peisha<sup>3</sup>, LIU Siqu<sup>2</sup>, ZHANG Shaohua<sup>3</sup>

(1. Department of Obstetrics and Gynecology, School of Clinical Medicine, Xi'an Medical University, Xi'an 710021, China; 2. Xi'an Key Laboratory for Innovative Translation of Early Cancer Diagnosis, School of Clinical Medicine, Xi'an Medical University, Xi'an 710021, China; 3. Department of Obstetrics and Gynecology, First Affiliated Hospital, Xi'an Medical University, Xi'an 710021, China)

**ABSTRACT Objective:** To discuss the effect of exosomes (Exos) loaded with microRNA-520a-5p (*miR-520a-5p*) on the pregnancy outcomes in fetal mice with intrauterine growth restriction (FGR), and to clarify its mechanism. **Methods:** The mouse placental mesenchymal stem cells (MSCs) were cultured *in vitro* and transfected with miR-520a-5p adenovirus vector (Ad-miR-520a-5p) to obtain the Exos with high *miR-520a-5p* load (miR-520a-5p-MSCs-Exos), which were then identified. The C57BL/6 mice were mated in cages at a female: male ratio of 2:1 to achieve successful pregnancy. Forty pregnant mice were divided into control group, FGR group, NC-MSCs-Exos group, and miR-520a-5p-MSCs-Exos group, with 10 mice in each group. Except for control group, the mice in other groups were exposed to excessive dexamethasone (DEX) during pregnancy to induce FGR models in the pregnant mice. The body weights of the fetal mice at birth and at 1, 2, 3, and 4 weeks after birth were detected; real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) method was used to detect the expression levels of *miR-520a-5p*, DNA methyltransferase 3b (*DNMT3b*), and vascular endothelial growth factor (*VEGF*) mRNA in placenta tissue of the mice in various groups; Western blotting method was used to detect the expression levels of DNMT3b and VEGF proteins in placenta tissue of the mice in various groups; methylation-specific PCR (MSP) was used to analyze the methylation rates of VEGF promoter in placenta tissue of the mice in various groups; dual-luciferase reporter gene assay was used to verify the targeting relationship between *miR-520a-5p* and *DNMT3b*. **Results:** The results of transmission electron microscope (TEM) and nanoparticle tracking analysis (NTA) showed that the Exos were spherical with particle size concentrated near 100 nm; the Western blotting method results showed that the surface biomarkers CD63 and CD81 of Exos were positively expressed. The RT-qPCR results showed that compared with NC-MSCs-Exos and Ad-NC-MSCs-Exos, the expression level of *miR-520a-5p* in Ad-miR-520a-5p-MSCs-Exos was increased ( $P < 0.001$ ). The differences in birth body weight and the body weights at 1, 2, and 3 weeks after birth of

the fetal mice among four groups were statistically significant ( $F=36.084$ ,  $F=19.851$ ,  $F=77.755$ ,  $F=103.223$ ;  $P<0.001$ ). Compared with control group, the birth body weight and the body weights at 1, 2, and 3 weeks after birth of the fetal mice in FGR group were decreased ( $P<0.05$ ); compared with FGR group and NC-MSCs-Exos group, the birth body weight and the body weights at 1, 2, and 3 weeks after birth of the fetal mice in miR-520a-5p-MSCs-Exos group were increased ( $P<0.05$ ). The One-way ANOVA results showed that the differences in the expression levels of *miR-520a-5p*, *DNMT3b*, and *VEGF* mRNA in placenta tissue of the mice among four groups were statistically significant ( $F=103.224$ ,  $F=856.460$ ,  $F=214.563$ ;  $P<0.001$ ). The pairwise comparison between groups showed that compared with control group, the expression levels of *miR-520a-5p* and *VEGF* mRNA in placenta tissue of the mice in FGR group were decreased ( $P<0.05$ ), and the expression level of *DNMT3b* mRNA was increased ( $P<0.05$ ); compared with FGR group and NC-MSCs-Exos group, the expression levels of *miR-520a-5p* and *VEGF* mRNA in placenta tissue of the mice in miR-520a-5p-MSCs-Exos group were increased ( $P<0.05$ ), and the expression level of *DNMT3b* mRNA was decreased ( $P<0.05$ ). The One-way ANOVA results showed that the differences in the expression levels of DNMT3b and VEGF proteins in placenta tissue of the mice among four groups were statistically significant ( $F=245.601$ ,  $F=149.360$ ;  $P<0.001$ ). The pairwise comparison between groups showed that compared with control group, the expression level of DNMT3b protein in placenta tissue of the mice in FGR group was increased ( $P<0.05$ ), and the expression level of VEGF protein was decreased ( $P<0.05$ ); compared with FGR group and NC-MSCs-Exos group, the expression level of DNMT3b protein in placenta tissue of the mice in miR-520a-5p-MSCs-Exos group was decreased ( $P<0.05$ ), and the expression level of VEGF protein was increased ( $P<0.05$ ). The One-way ANOVA results showed that the difference in the methylation rate of VEGF promoter in placenta tissue of the mice among four groups was statistically significant ( $F=687.096$ ,  $P<0.001$ ). The pairwise comparison between groups showed that compared with control group, the methylation rate of VEGF promoter in placenta tissue of the mice in FGR group was increased ( $P<0.05$ ); compared with FGR group and NC-MSCs-Exos group, the methylation rate of VEGF promoter in placenta tissue of the mice in miR-520a-5p-MSCs-Exos group was decreased ( $P<0.05$ ). Dual-luciferase reporter gene assay results showed that compared with miR-NC group, the luciferase activity in the cells containing DNMT3b-WT reporter vector in miR-520a-5p group was decreased ( $P<0.05$ ); compared with miR-NC group, the luciferase activity in the cells containing DNMT3b-MUT reporter vector in miR-520a-5p group had no change, no significant difference was observed ( $P>0.05$ ). **Conclusion:** The MSCs-derived Exos highly loaded with *miR-520a-5p* may improve the pregnancy outcomes of FGR fetal mice by targeting and down-regulating the expression of DNMT3b, inhibiting VEGF methylation, and promoting VEGF expression.

**KEYWORDS** Fetal growth restriction; Exosome; Mesenchymal stem cell; MicroRNA-520a-5p; DNA methyltransferase 3b; Vascular endothelial growth factor

胎儿宫内生长受限 (fetal growth restriction, FGR) 也称为胎儿宫内生长迟缓, 是指胎儿在子宫内的生长未达到其遗传潜能, 通常表现为胎儿体质量低于同孕龄平均体质量的第10百分位<sup>[1]</sup>。研究<sup>[2]</sup>显示: FGR的发生可能与表观遗传学改变有关, 包括DNA甲基化模式异常。DNA甲基化是调控基因表达最重要的表观遗传机制之一, 可通过影响基因的表达和功能, 参与调控胎儿生长和发育过程<sup>[3-4]</sup>。DNA甲基转移酶3b (DNA methyltransferase 3b, DNMT3b) 是哺乳动物体内

的DNA重新甲基化酶之一, 主要负责“从头甲基化”, 其异常表达或功能改变可能导致DNA甲基化模式的紊乱, 进而影响基因表达, 调控胎儿生长和发育过程<sup>[5-6]</sup>。

微小RNA (microRNA, miR) 作为一类重要的表观遗传调控因子, 在胎盘发育和功能调控中发挥重要作用, 可用于早期诊断和治疗FGR及其相关并发症<sup>[7]</sup>。miR-520a来自人miR-520家族, 该家族定位于人第19号染色体中, 在多种肿瘤中发挥抑癌作用。研究<sup>[8]</sup>显示: FGR妊娠的孕妇在孕早

期即出现血清外泌体(exosomes, Exos) *miR-520a-5p* 表达水平下调。此外, 有研究<sup>[9]</sup>显示: 表观调控异常引起的血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF) 启动子的高甲基化与 FGR 的发生有密切关联。本课题组前期采用 miRNA 目标基因预测软件发现 *miR-520a-5p* 与 *DNMT3b* 存在结合位点, 提示 *DNMT3b* 可能是 *miR-520a-5p* 的下游潜在靶基因; 据此推测 *miR-520a-5p* 可能通过调控胎盘内 *DNMT3b* 的影响胎盘生长发育和血管形成, 进一步影响胎儿宫内发育, 导致 FGR 发生。干细胞分泌的 Exos 包含的 miRNA 在调节细胞增殖代谢有一定作用, 且不会出现排斥反应<sup>[10-11]</sup>。本研究利用 *miR-520a-5p* 腺病毒载体 (Ad-miR-520a-5p) 转染间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs), 获得高负载 *miR-520a-5p* 的 Exos, 探讨其在 FGR 中的作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物、主要试剂和仪器

50 只雌性和 25 只雄性 SPF 级 C57BL/6 小鼠, 8~10 周龄, 体质量 30~40 g, 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司, 动物生产许可证号: SCXK(沪) 2022-0004, 无病原体条件下饲养在温度和湿度受控的房间内, 保持 12 h 光照/12 h 黑暗循环。地塞米松(dexamethasone, DEX) 注射液(国药准字 H31021298, 上海通用药业), 小鼠胎盘 MSCs(武汉普诺赛公司), *miR-520a-5p* 腺病毒载体(Ad-miR-520a-5p) 及其对照空载体(Ad-NC)(上海 Genechem 公司), 兔源一抗 CD63、CD81、*DNMT3b* 和 VEGF(美国 Thermo Scientific 公司), Exos 提取试剂盒和双荧光素酶报告基因检测试剂盒(北京百奥莱博公司), 逆转录试剂盒(日本 TaKaRa 公司), EZ DNA 甲基化试剂盒(美国 ZYMO RESEARCH 公司)。Coulter Optima™ L-80XP 超速离心机(美国 Beckman 公司), Hitachi H-600 透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)(日本 Hitachi 公司), 纳米粒子追踪分析(nanoparticle tracking analysis, NTA) 仪(英国 Malvern Panalytical 公司), Synergy LX 多功能酶标仪(美国 BioTek 公司), 7500 实时荧光定量 PCR(real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR) 仪(美国 Applied Biosystems 公司)。

### 1.2 MSCs 来源 Exos 的提取和鉴定

#### 1.2.1 *miR-520a-5p* 腺病毒转染 取生长状况良

好的第 4 代小鼠胎盘 MSCs(调整细胞浓度为  $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ ), 接种于 6 孔细胞培养板中, 待生长至 80% 融合时, 将含 10% 胎牛血清的完全培养基更换为含有 *miR-520a-5p* 腺病毒载体(Ad-miR-520a-5p) 及其对照空载体(Ad-NC) 的培养基。孵育 12 h 后, 更换为含 10% 胎牛血清的完全培养基, 48 h 后采用含  $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  嘌呤霉素的培养基筛选稳定转染细胞。

1.2.2 Exos 的提取 收集稳定转染 Ad-miR-520a-5p、Ad-NC 和正常培养的 MSCs 的细胞培养液,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 、300 g 离心 10 min 和 2 000 g 离心 10 min, 去除死细胞和细胞碎片。2 000 g 离心 30 min 收集上清; 20 000 g 离心 60 min 取上清, 然后在超速离心机中以 100 000 g 离心 60 min 收集沉淀物。将沉淀物重新悬浮在 2 mL 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS) 中, 并在超速离心机中以 100 000 g 再次超速离心 60 min。最后, 将沉淀物重悬于 200  $\mu\text{L}$  PBS 缓冲液中, 即为 Ad-miR-520a-5p-MSCs-Exos、Ad-NC-MSCs-Exos 和 NC-MSCs-Exos, 在  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  下保存用于后续实验。

1.2.3 Exos 的鉴定 ① TEM 和 NTA 观察 Exos 形态表现, 测量 Exos 的浓度和尺寸。② Western blotting 法检测 Exos 表面标志物 CD63 和 CD81 表达。采用蛋白质分离试剂盒提取 Exos 中蛋白质, BCA 法测定 Exos 中蛋白质浓度, 然后在 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 上分离等量蛋白, 并转膜, 室温下封闭膜 2 h 后, 在  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  下与一抗 CD63 和 CD81 孵育过夜, 加入二抗(1:5 000) 孵育 1 h。采用 Image J 软件定量分析 Exos 表面 CD63 和 CD81 表达水平。

### 1.3 模型制备和分组

将雌性小鼠与雄性小鼠按照 2:1 的比例合笼交配。次日清晨对雌性小鼠进行阴道涂片, 并置于显微镜下观察, 若镜下可见阴栓, 则为受孕成功, 记为妊娠第 0.5 天。将 40 只怀孕小鼠分为对照组、FGR 组、NC-MSCs-Exos 组和 *miR-520a-5p*-MSCs-Exos 组, 每组 10 只。除对照组外, 其余组小鼠采用孕期过度暴露 DEX 诱发妊娠期母体小鼠的 FGR 模型<sup>[12-13]</sup>: 怀孕小鼠于妊娠 14.5 d 时连续 5 d 腹腔注射 DEX ( $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ); 对照组小鼠于相同时间给予相同量生理盐水腹腔注射。*miR-520a-5p*-MSCs-Exos 组和 NC-MSCs-Exos 组小鼠在妊娠第

13天时分别给予0.2 mL负载 *miR-520a-5p* 的MSCs来源 Exos (Ad-*miR-520a-5p*-MSCs-Exos) 悬液和正常培养的MSCs来源 Exos (NC-MSCs-Exos) 腹腔注射, 连续7 d。

#### 1.4 妊娠结局

在妊娠第19.5天, 剖宫产获取胎鼠及其胎盘组织; 称量胎鼠体质量, 小鼠出生后每周称量体质量至出生后4周。

#### 1.5 RT-qPCR法检测各组小鼠胎盘组织中 *miR-520a-5p*、*DNMT3b* 和 *VEGF* mRNA 表达水平

使用 TRIzol 试剂从胎盘中提取总 RNA。使用逆转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA。使用 SYBR Green 预混液在 RT-qPCR 仪上对 cDNA 进行扩增检测靶基因的表达。收集靶基因的循环阈值 (Ct) 值并将其标准化为 U6 或  $\beta$ -actin 的循环阈值, 采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算目的基因表达水平。引物序列见表 1。

表1 RT-qPCR引物序列

Tab. 1 Primer sequences of RT-qPCR

Primer	Sequence (5'-3')
MiR-520a-5p	Forward: TCGGCAGGCUCACAGAGGGAAGU
	Reverse: CACTCAACTGGTGTCTGCGTGA
DNMT3b	Forward: AGGGAAGACTCGATCCTCGTC
	Reverse: GTGTGTAGCTTAGCAGACTGG
VEGF	Forward: GCAGGCTGCTGTAACGATGA
	Reverse: GCATGATCTGCATGGTGATGTT
U6	Forward: CTCGCTTCGGCAGCACA
	Reverse: AACGCTTCACGAATTTGCGT
$\beta$ -actin	Forward: GGCATCCTCACCTGAAGTA
	Reverse: TAGCACAGCCTGGATAGCAA

#### 1.6 Western blotting法检测各组小鼠胎盘组织中 *DNMT3b* 和 *VEGF* 蛋白表达水平

使用预冷的 RIPA 裂解缓冲液从胎盘组织中分离总蛋白, 并使用二辛可宁酸法进行定量分析。采用 10% SDS-PAGE 分离蛋白质 (30  $\mu$ g) 并转移到 PVDF 膜上, 然后用 5% 脱脂牛奶在室温下封闭 2 h。随后, 将膜与一抗 *DNMT3b*、*VEGF* (1:1 000 稀释) 和  $\beta$ -actin (1:2 000 稀释) 在 4  $^{\circ}$ C 下孵育过夜。孵育 12 h 后, 将膜进一步在室温下与 HRP 标记的二抗 (1:5 000 稀释) 孵育 1 h。最后, 使用增强化学发光法 (enhanced chemiluminescence, ECL) 对免疫印迹进行可视化, 采用 Image J (v1.8.0.112) 软件进行定量分析, 计算目的蛋白表达水平。目的

蛋白表达水平 = 目的蛋白条带灰度值 /  $\beta$ -actin 蛋白条带灰度值。

#### 1.7 甲基化特异性 PCR (methylation specific PCR, MSP) 分析各组小鼠胎盘组织中 *VEGF* 启动子甲基化率

采用 DNA 提取试剂盒从胎盘组织中分离总 DNA。采用甲基化试剂盒对 DNA 进行亚硫酸氢盐处理, 采用 PCR 扩增 1  $\mu$ g 修饰 DNA。甲基化和非甲基化 DNA 引物由上海吉凯基因医学科技股份有限公司合成。DNA 扩增反应体系为 25  $\mu$ L: 5  $\mu$ L 10 $\times$  PCR 缓冲液、15  $\mu$ L 25 mmol $\cdot$ L $^{-1}$  MgCl $_2$ 、2.5  $\mu$ L 25 mmol $\cdot$ L $^{-1}$  脱氧核苷酸三磷酸、正反向引物各 1  $\mu$ L (300 mg $\cdot$ L $^{-1}$ ) 和 0.5  $\mu$ L DNA 聚合酶。PCR 在热循环仪中进行 35 个循环 (95  $^{\circ}$ C 变性 1 min, 56  $^{\circ}$ C 退火 2 min, 72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min), 然后 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物在 2% 琼脂糖凝胶中分离, 凝胶成像系统成像, 使用 BioQ 软件分析各组小鼠胎盘组织中 *VEGF* 启动子甲基化程度, 并计算甲基化率。甲基化率 = (甲基化样本荧光信号值 / 未甲基化样本荧光信号值)  $\times$  100%。

#### 1.8 双荧光素酶报告基因实验验证 *miR-520a-5p* 与 *DNMT3b* 之间的靶向关系

将含有 *miR-520a-5p* 结合位点的野生型 (WT) *DNMT3b* 3'-UTR 片段和突变型 (MUT) *DNMT3b* 3'-UTR 片段插入 psiCHECK2 荧光素酶报告载体, 得到 *DNMT3b*-WT 和 *DNMT3b*-MUT 报告载体。在报告基因检测中, 使用 Lipofectamine<sup>®</sup> 2000 将产生的 WT 或 MUT 报告载体和 *miR-520a-5p* mimics/NC 共转染到 HEK293T 细胞中, 转染后细胞分为 *miR*-NC 组和 *miR*-520a-5p 组。2 d 后使用双荧光素酶报告分析系统检测 2 组细胞荧光素酶活性。荧光素酶活性 = 萤火虫荧光素酶活性 / 海肾荧光素酶活性。

#### 1.9 统计学分析

采用 SPSS 25.0 和 GraphPad Prism 8.0 统计软件进行统计学分析。各组小鼠出生体质量, 生后 1、2 和 3 周体质量, 小鼠胎盘组织中 *miR-520a-5p*、*DNMT3b* 和 *VEGF* mRNA 表达水平, 胎盘组织中 *DNMT3b* 和 *VEGF* 蛋白表达水平及胎盘组织中 *VEGF* 启动子甲基化率均符合正态分布和方差齐性, 以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间样本均数比较采用单因素方差分析, 组间样本均数两两比较采用 SNK- $q$  检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 MSCs-Exos 表征和 *miR-520a-5p* 表达

TEM 和 NTA 分析结果显示: Exos 呈球形, 粒径集中在 100 nm 附近。见图 1A 和 1B。Western blotting 检测结果显示: Exos 表面生物标志物 CD63 和 CD81 均呈阳性表达。见图 1C。RT-qPCR 检测结果显示: 与 NC-MSCs-Exos ( $1.00 \pm 0.12$ ) 和 Ad-NC-MSCs-Exos ( $1.02 \pm 0.14$ ) 比较, Ad-*miR-520a-5p*-MSCs-Exos 中 *miR-520a-5p* 表达水平 ( $8.07 \pm 0.21$ ) 明显升高 ( $P < 0.001$ )。

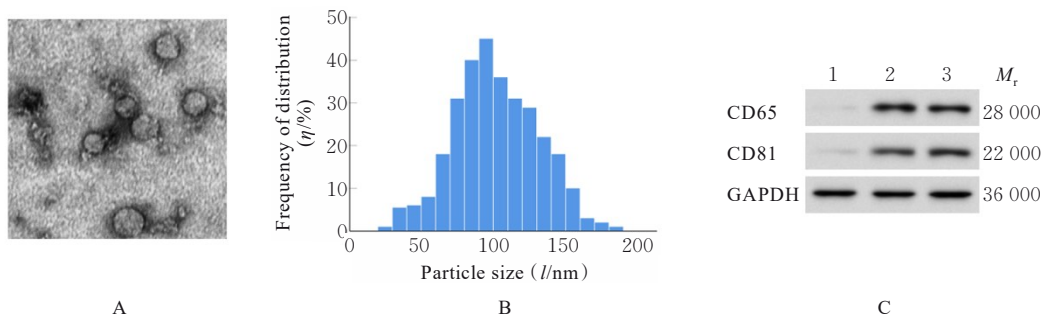


图 1 外泌体表征  
A: Morphology of Exos; B: Particle size distribution of Exos; C: Expression of Exos surface markers CD63 and CD81 (Lane 1: MSCs; Lane 2: Ad-NC-MSCs-Exos; Lane 3: Ad-*miR-520a-5p*-MSCs-Exos).

图 1 外泌体表征

Fig. 1 Characterizations of Exos

表 2 各组子代小鼠体质量

Tab. 2 Body weights of fetal mice in various groups

( $n=10, \bar{x} \pm s, m/g$ )

Group	Body weight				
	Birth	1 week	2 week	3 week	4 week
Control	$1.41 \pm 0.12$	$5.15 \pm 0.23$	$9.26 \pm 0.25$	$13.38 \pm 0.31$	$17.05 \pm 0.36$
FGR	$1.03 \pm 0.08^*$	$4.58 \pm 0.17^*$	$8.01 \pm 0.22^*$	$11.52 \pm 0.27^*$	$16.84 \pm 0.41$
NC-MSCs-Exos	$1.01 \pm 0.09$	$4.53 \pm 0.20$	$7.94 \pm 0.21$	$11.47 \pm 0.29$	$16.76 \pm 0.39$
<i>miR-520a-5p</i> -MSCs-Exos	$1.22 \pm 0.10^{\Delta\#}$	$4.90 \pm 0.22^{\Delta\#}$	$8.83 \pm 0.24^{\Delta\#}$	$12.79 \pm 0.31^{\Delta\#}$	$17.02 \pm 0.40$

\* $P < 0.05$  vs control group;  $\Delta P < 0.05$  vs FGR group;  $\# P < 0.05$  vs NC-MSCs-Exos group.

### 2.3 各组小鼠胎盘组织中 *miR-520a-5p*、*DNMT3b* 和 *VEGF* mRNA 表达水平

单因素方差分析结果显示: 4 组小鼠胎盘组织中 *miR-520a-5p*、*DNMT3b* 和 *VEGF* mRNA 表达水平比较差异有统计学意义 ( $F=103.224$ ,  $F=856.460$ ,  $F=214.563$ ;  $P < 0.001$ )。组间两两比较结果显示: 与对照组比较, FGR 组小鼠胎盘组织中 *miR-520a-5p* 和 *VEGF* mRNA 表达水平降低 ( $P < 0.05$ ), *DNMT3b* mRNA 表达水平升高 ( $P < 0.05$ ); 与 FGR 组和 NC-MSCs-Exos 组比较, *miR-520a-5p*-MSCs-Exos 组小鼠胎盘组织中 *miR-520a-*

### 2.2 各组小鼠妊娠结局

单因素方差分析结果显示: 4 组子代小鼠出生体质量和生后 1、2 及 3 周体质量比较差异均有统计学意义 ( $F=36.084$ ,  $F=19.851$ ,  $F=77.755$ ,  $F=103.223$ ;  $P < 0.001$ )。与对照组比较, FGR 组子代小鼠出生体质量和生后 1、2 及 3 周体质量均降低 ( $P < 0.05$ ); 与 FGR 组和 NC-MSCs-Exos 组比较, *miR-520a-5p*-MSCs-Exos 组子代小鼠出生体质量和生后 1、2 及 3 周体质量均升高 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

*5p* 和 *VEGF* mRNA 表达水平升高 ( $P < 0.05$ ), *DNMT3b* mRNA 水平降低 ( $P < 0.05$ )。见表 3。

### 2.4 各组小鼠胎盘组织中 *DNMT3b* 和 *VEGF* 蛋白表达水平

单因素方差分析显示: 4 组小鼠胎盘组织中 *DNMT3b* 和 *VEGF* 蛋白表达水平比较差异有统计学意义 ( $F=245.601$ ,  $F=149.360$ ;  $P < 0.001$ ); 组间两两比较显示: 与对照组比较, FGR 组小鼠胎盘组织中 *DNMT3b* 蛋白表达水平升高 ( $P < 0.05$ ), *VEGF* 蛋白表达水平降低 ( $P < 0.05$ ); 与 FGR 组和 NC-MSCs-Exos 组比较, *miR-520a-5p-*

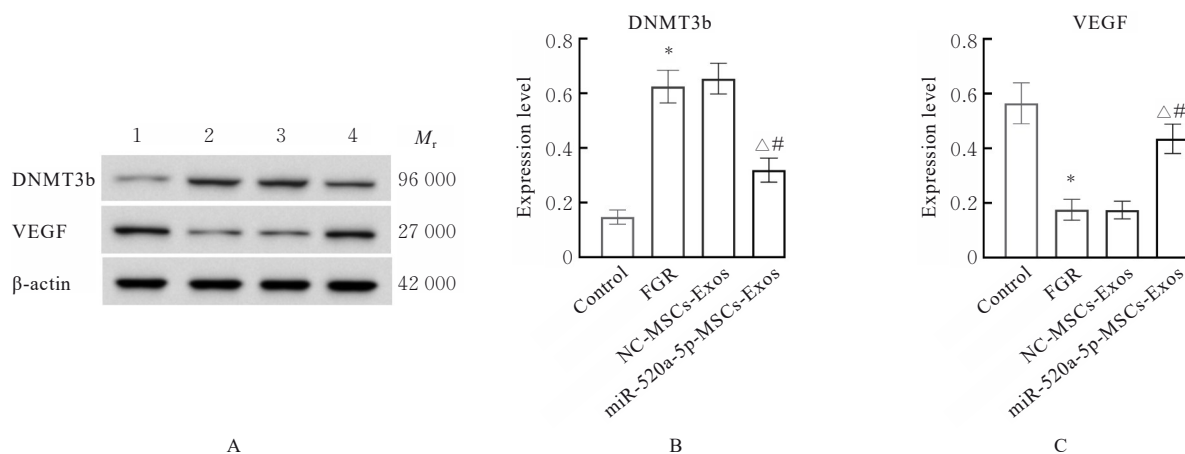
表3 各组小鼠胎盘组织中 *miR-520a-5p*、*DNMT3b* 和 *VEGF* mRNA 表达水平

Tab. 3 Expression levels of *miR-520a-5p*, *DNMT3b*, and *VEGF* mRNA in placenta tissue of mice in various groups

( $n=10, \bar{x} \pm s$ )

Group	<i>miR-520a-5p</i>	<i>DNMT3b</i>	<i>VEGF</i>
Control	1.00±0.11	1.03±0.14	1.01±0.10
FGR	0.48±0.07*	4.32±0.22*	0.32±0.05*
NC-MSCs-Exos	0.45±0.06	4.38±0.20	0.30±0.06
MiR-520a-5p- MSCs-Exos	0.89±0.10 <sup>△#</sup>	2.07±0.15 <sup>△#</sup>	0.76±0.08 <sup>△#</sup>

\* $P<0.05$  vs control group; <sup>△</sup> $P<0.05$  vs FGR group; <sup>#</sup> $P<0.05$  vs NC-MSCs-Exos group.



A: Electrophoregram (Lane 1: Control group; Lane 2: FGR group; Lane 3: NC-MSCs-Exos group; Lane 4: MiR-520a-5p-MSCs-Exos group); B, C: Histograms (\* $P<0.05$  compared with control group; <sup>△</sup> $P<0.05$  compared with FGR group; <sup>#</sup> $P<0.05$  compared with NC-MSCs-Exos group).

图2 各组小鼠胎盘组织中DNMT3b和VEGF蛋白表达电泳图(A)及直条图(B和C)

Fig. 2 Electrophoregram (A) and histograms (B, C) of expressions of DNMT3b and VEGF proteins in placenta tissue of mice in various groups

## 2.6 *miR-520a-5p*与*DNMT3b*之间的靶向关系

利用在线软件 TargetScan ([http://www.targetscan.org/vert\\_72/](http://www.targetscan.org/vert_72/)) 搜索 miRNA 对于靶基因 *DNMT3b* 的作用位点, 预测的 *miR-520a-5p* 与 *DNMT3b* 互补结合序列 (7个结合位点) 见图4。

双荧光素酶实验结果显示: 与 miR-NC 组 (1.00±0.09) 比较, miR-520a-5p 组 DNMT3b-WT 报告载体细胞的荧光素酶活性 (0.41±0.07) 明显降低 ( $P<0.05$ ); 与 miR-NC 组 (1.01±0.12) 比较, miR-520a-5p 组 DNMT3b-MUT 报告载体细胞的荧光素酶活性 (0.98±0.10) 无明显变化, 差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。

MSCs-Exos 组小鼠胎盘组织中 DNMT3b 蛋白水平降低 ( $P<0.05$ ), VEGF 蛋白表达水平升高 ( $P<0.05$ )。见图2。

## 2.5 各组小鼠胎盘组织中 VEGF 启动子甲基化率

单因素方差分析显示: 4组小鼠胎盘组织中 VEGF 启动子甲基化率比较差异有统计学意义 ( $F=687.096, P<0.001$ )。组间两两比较显示: 与对照组比较, FGR 组小鼠胎盘组织中 VEGF 启动子甲基化率升高 ( $P<0.05$ ); 与 FGR 组和 NC-MSCs-Exos 组比较, miR-520a-5p-MSCs-Exos 组小鼠胎盘组织中 VEGF 启动子甲基化率降低 ( $P<0.05$ )。见图3。

## 3 讨论

FGR 是妊娠的主要并发症, 也是围产期死亡和发病的最重要原因之一<sup>[14]</sup>。胎盘是胎儿与母体之间物质交换的重要器官, 胎儿在子宫中发育依靠胎盘从母体获取营养, 胎盘也负责合成多种激素、酶和细胞因子等以维持正常妊娠<sup>[15]</sup>。Exos 是一种可通过多种途径介导细胞间物质及信息传导的微型囊泡, 通过胞吐作用从细胞内分泌到细胞外环境并稳定存在。研究<sup>[16-17]</sup>显示: 母体循环中存在胎盘来源的 Exos, 调控母体全身器官妊娠期的功能改变, 以适应妊娠需求, 若这一调控过程发生异常, 则会引起妊娠疾病的发生, 包括 FGR。因此, 深



的MSCs来源Exos可能通过靶向下调DNMT3b的表达改善FGR胎鼠妊娠结局。

VEGF是参与胎盘血管生成的重要因子,对胚胎和胎儿的发育起重要作用,其能够促进血管内皮细胞增殖和迁移及血管形成,从而维持正常妊娠过程。研究<sup>[25-26]</sup>显示:FGR孕妇血清中VEGF水平较健康孕妇降低,与FGR的发生呈负相关关系,对FGR具有一定的预测价值。研究<sup>[27]</sup>显示:妊娠Balb/c小鼠感染伯氏疟原虫可导致胎盘细胞凋亡增多及VEGF表达降低,从而造成FGR,提示VEGF水平降低可能与FGR发生发展有关。研究<sup>[9]</sup>显示:VEGF的DNA甲基化水平与FGR胎儿出生体质量呈负相关关系,与FGR妊娠呈正相关关系。本研究结果显示:FGR孕鼠胎盘组织中VEGF启动子的DNA甲基化率升高,VEGF mRNA和蛋白表达水平均降低;高负载miR-520a-5p的MSCs来源Exos干预孕鼠后,胎盘组织中VEGF mRNA和蛋白表达水平均升高,且VEGF启动子的DNA甲基化率降低,提示高负载miR-520a-5p的MSCs来源Exos可能通过靶向下调DNMT3b表达,抑制VEGF甲基化,促进VEGF表达,改善FGR胎鼠妊娠结局。

综上所述,高负载miR-520a-5p的MSCs来源Exos可能通过靶向下调DNMT3b表达抑制VEGF甲基化,促进VEGF表达,改善FGR胎鼠妊娠结局。本研究为FGR治疗提供了新思路。然而,目前关于Exos与FGR关系的研究仍处于初步阶段,需要更多的基础和临床研究来进一步验证和完善相关理论。

#### 利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

#### 作者贡献声明:

相萌参与研究设计、动物实验和论文撰写,徐冰、王培莎和刘思旗参与实验操作及数据获取,张少华参与实验指导和数据分析。

#### [参考文献]

- [1] GIOULEKA S, TSAKIRIDIS I, MAMOPOULOS A, et al. Fetal growth restriction: a comprehensive review of major guidelines[J]. *Obstet Gynecol Surv*, 2023, 78(11): 690-708.
- [2] SALMERI N, CARBONE I F, CAVORETTO P I, et al. Epigenetics beyond fetal growth restriction: a comprehensive overview[J]. *Mol Diagn Ther*, 2022, 26(6): 607-626.
- [3] FUJIOKA K, NISHIDA K, ASHINA M, et al. DNA methylation of the Rtl1 promoter in the placentas with fetal growth restriction[J]. *Pediatr Neonatol*, 2019, 60(5): 512-516.
- [4] LEE S, KIM Y N, IM D, et al. DNA Methylation and gene expression patterns are widely altered in fetal growth restriction and associated with FGR development[J]. *Anim Cells Syst*, 2021, 25(3): 128-135.
- [5] ANDREWS S, KRUEGER C, MELLADO-LOPEZ M, et al. Mechanisms and function of *de novo* DNA methylation in placental development reveals an essential role for DNMT3B[J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 371.
- [6] XU P, WU Z Q, XI Y, et al. Epigenetic regulation of placental glucose transporters mediates maternal cadmium-induced fetal growth restriction[J]. *Toxicology*, 2016, 372: 34-41.
- [7] KOCHHAR P, VUKKU M, RAJASHEKHAR R, et al. microRNA signatures associated with fetal growth restriction: a systematic review [J]. *Eur J Clin Nutr*, 2022, 76(8): 1088-1102.
- [8] HRMADNIKOVA I, DVORAKOVA L, KOTLABOVA K, et al. The prediction of gestational hypertension, preeclampsia and fetal growth restriction via the first trimester screening of plasma exosomal C19MC microRNAs[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(12): 2972.
- [9] SELCEN CEBE F, NUR TOLA E, ASLAN KOŞAR P, et al. DNA methylation profiles of genes associated with angiogenesis in the samples of placenta in pregnancies complicated by intrauterine growth restriction[J]. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2021, 34(17): 2854-2862.
- [10] HADE M D, SUIRE C N, SUO Z C. Mesenchymal stem cell-derived exosomes: applications in regenerative medicine[J]. *Cells*, 2021, 10(8): 1959.
- [11] LIU H D, ZHANG X, ZHANG M T, et al. Mesenchymal stem cell derived exosomes repair uterine injury by targeting transforming growth factor- $\beta$  signaling[J]. *ACS Nano*, 2024, 18(4): 3509-3519.
- [12] ARIAS A, SCHANDER J A, BARIANI M V, et al. Dexamethasone-induced intrauterine growth restriction modulates expression of placental vascular growth factors and fetal and placental growth[J]. *Mol Hum Reprod*, 2021, 27(3): gaab006.
- [13] CHEN W, LIU N N, SHEN S J, et al. Fetal growth restriction impairs hippocampal neurogenesis and cognition via Tet1 in offspring[J]. *Cell Rep*, 2021,

- 37(5): 109912.
- [14] LAWN J E, OHUMA E O, BRADLEY E, et al. Small babies, big risks: global estimates of prevalence and mortality for vulnerable newborns to accelerate change and improve counting[J]. *Lancet*, 2023, 401(10389): 1707-1719.
- [15] KHORAMI-SARVESTANI S, VANAKI N, SHOJAEIAN S, et al. Placenta: an old organ with new functions[J]. *Front Immunol*, 2024, 15: 1385762.
- [16] NGUYEN C M, SALLAM M, ISLAM M S, et al. Placental exosomes as biomarkers for maternal diseases: current advances in isolation, characterization, and detection[J]. *ACS Sens*, 2023, 8(7): 2493-2513.
- [17] 陈陆静, 钱 坤, 马秋林, 等. 血清外泌体miR-494水平与妊娠期胎儿生长受限的关系[J]. *山东医药*, 2024, 64(17): 75-78.
- [18] 徐瑞雪, 王 宇. 外泌体在调控肿瘤细胞铁死亡中的作用[J]. *中南大学学报(医学版)*, 2024, 49(10): 1683-1691.
- [19] GALLAGHER L T, BARDILL J, SUCHAROV C C, et al. Dysregulation of miRNA-mRNA expression in fetal growth restriction in a caloric restricted mouse model[J]. *Sci Rep*, 2024, 14: 5579.
- [20] 徐欣然, 王妍平, 刘沙沙. miR-520a-5p在子痫前期及胎儿生长受限中的研究进展[J]. *医学信息*, 2024, 37(6): 171-174.
- [21] XU X R, CHENG L, WANG Y P. Prediction of severe preeclampsia and intrauterine growth restriction based on serum placental exosome miR-520a-5p levels during the first-trimester[J]. *Medicine*, 2024, 103(20): e38188.
- [22] NORTON C, CLARKE D, HOLMSTROM J, et al. Altered epigenetic profiles in the placenta of preeclamptic and intrauterine growth restriction patients [J]. *Cells*, 2023, 12(8): 1130.
- [23] SHI D Y, ZHOU X Y, CAI L Y, et al. Placental DNA methylation analysis of selective fetal growth restriction in monozygotic twins reveals aberrant methylated *CYP11A1* gene for fetal growth restriction [J]. *FASEB J*, 2023, 37(10): e23207.
- [24] 王晓辉, 张彩丽, 刘艳丽, 等. SALL4和DNMT3b在子痫前期胎盘组织中的表达及临床意义[J]. *海南医学*, 2023, 34(24): 3582-3586.
- [25] 于雪梅, 方建红, 梁金丽, 等. 妊娠期高血压疾病患者孕晚期血清FGF2和VEGF表达与胎儿生长受限的相关性分析[J]. *标记免疫分析与临床*, 2024, 31(4): 698-702, 735.
- [26] 钟双飞, 沈 娜, 黄满仙. 妊娠晚期血清维生素D及血管内皮生长因子与子痫前期及胎儿生长受限的相关性分析[J]. *中华全科医学*, 2024, 22(1): 82-85.
- [27] MARDHIYYAH K, HARIYANTO T, SARDJONO T W, et al. Fetal growth retardation is associated with high apoptotic cells and low VEGF expression in placenta of malarial pregnant mice[J]. *Med Arch*, 2023, 77(4): 258-262.