

• 综 述 •

微小 RNA 与复发性流产研究进展*

涂许许¹, 赵小萱¹综述, 冯晓玲^{2△}审校1. 黑龙江中医药大学研究生院, 黑龙江哈尔滨 150040; 2. 黑龙江中医药大学
附属第一医院妇科二科, 黑龙江哈尔滨 150040

摘要:妊娠是人类发展过程中巧妙而精密的过程, 在妊娠过程中人类面临着许多挑战, 复发性流产(RSA)是一种常见的不良妊娠结局, 影响约 5% 的育龄期女性。微小 RNA(miRNA)是一种非编码 RNA, 可通过靶向信使 RNA(mRNA)发挥其生物学功能。许多研究已经发现, miRNA 通过参与血管生成、细胞凋亡、免疫反应等多种生物学事件参与 RSA 进程。RSA 与 miRNA 的研究既有助于探寻 RSA 病因多样化背后的机制, 也为 RSA 的治疗提供了更多新思路。

关键词:复发性流产; 微小 RNA; 信使 RNA**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2021.22.024**中图法分类号:**R714.21**文章编号:**1673-4130(2021)22-2799-05**文献标志码:**A

Research progress of micro ribonucleic acid and recurrent spontaneous abortion*

TU Xuxu¹, ZHAO Xiaoxuan¹, FENG Xiaoling^{2△}

1. Graduate School, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin, Heilongjiang 150040, China; 2. the Second Department of Gynaecology, the First Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin, Heilongjiang 150040, China

Abstract: Pregnancy is an ingenious and precise process in the procedure of human development. During pregnancy, human beings are faced with many challenges, recurrent spontaneous abortion (RSA) is a common adverse pregnancy outcome. Micro ribonucleic acid (miRNA) is a kind of non-coding RNA, which can play its biological function by targeting messenger ribonucleic acid (mRNA). Many studies have found that miRNA participates in RSA through angiogenesis, apoptosis, immune response and other events. The study of RSA and miRNA can not only help to explore the mechanism behind the diversification of RSA etiology, but also provide more new ideas for the treatment of RSA.

Key words: recurrent spontaneous abortion; micro ribonucleic acid; messenger ribonucleic acid

复发性流产(RSA)是指妊娠 20 周之前的自然流产在同一配偶中出现 2 次或 2 次以上^[1], 发病率约为 5%, 病因包括解剖学异常、染色体异常、内分泌异常、感染、环境污染、自身免疫机制等, 但仍有 40%~50% 的 RSA 病因不明, 被称为不明原因的复发性流产(URSA)^[2]。RSA 严重影响患病女性的身心健康, 使患者及其家庭对生育丧失信心, 同时也增加了家庭的经济负担。

微小 RNA(miRNA)是一种由 22 个左右核苷酸构成的非蛋白编码短单链 RNA, 通过与靶向信使 RNA(mRNA)的 3' 未翻译区域(3' UTR)结合介导基因沉默^[3]。miRNA 的经典产生途径中, 细胞核中

DNA 被转录为初级 miRNA(pri-miRNA), RNase III 内切核酸酶 Drosha 对其切割和处理, 并释放 60~100 nt 的茎环中间体, 称为 miRNA 前体(pre-miRNA)。pre-miRNA 还可通过非 Drosha 依赖的 mirtron 途径产生。随后 Ran-GTP 和输出受体 Exportin-5 将 pre-miRNA 从细胞核主动转运至细胞质。在细胞质中 RNase III 内切核酸酶 Dicer 对 pre-miRNA 进行加工, 使其成为 miRNA 双链, 包含了成熟 miRNA(15~22 nt)。随后链体解开, 成熟 miRNA 通过 Watson-Crick 碱基配对机制与 mRNA 的 3' UTR 互补序列结合, 组装成 RNA 诱导沉默复合物, 调控靶基因的表达^[4]。它们在多种生物学过程中发挥作用, 包括发育、分化、

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81973894)。

△ 通信作者, E-mail: doctorfxl@163.com。

本文引用格式: 涂许许, 赵小萱, 冯晓玲. 微小 RNA 与复发性流产研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(22): 2799-2803.

凋亡和癌变^[5]。基于外周血、绒毛和蜕膜的研究已经发现, RSA 患者 miRNA 表达存在显著差异^[6], 但对于 miRNA 参与 RSA 发生的可能机制仍处于探索阶段, 以下将对此做一综述。

1 miRNA 介导血管生成参与 RSA 的发生

在较为稳定的成年人血管网络中, 血管的新生是一个相对罕见的事件, 但在特殊情况下, 例如胚胎的着床和发育中, 血管网络可以扩张和重塑以适应不断变化的条件, 此过程被称为血管生成, 该过程包括 3 个阶段: 启动、增殖-侵袭和成熟-分化^[7]。子宫内血管生成及受其影响的蜕膜化是胚胎植入成功及成功妊娠的前提。血管生成与胎盘正常发育也有密切联系, 胎盘是母体与胎儿进行物质交换的重要场所, 胎盘的血管生成有助于建立丰富的血液循环及促进其自身发育, 使其更好地实现为胎儿提供营养及排出废物的功能。大多数以流产为结局的妊娠被认为是由于母体螺旋动脉缺乏生理变化而导致胎盘缺陷引起的, 胎盘血管发育缺陷及血管内皮功能受损可能导致 RSA, 血管生成水平受相关细胞因子调节, miRNA 可通过影响血管生成相关因子导致 RSA 的发生^[8]。

血管内皮生长因子(VEGF)是关键的血管生成启动因子, 来源于绒毛滋养层和绒毛间质巨噬细胞, 在妊娠早期蜕膜细胞中高表达, 促进血管发育和维持稳定。肖碧如等^[9]发现, URSA 患者绒毛中 miR-29a 水平与 VEGF 及微血管密度(MVD)呈负相关。还有一些研究也发现了 RSA 中 miRNA 与 VEGF 的关系, 如 URSA 患者绒毛中高水平 miR-200 抑制 VEGF, 而低水平 miR-155 降低了血管新生因子 sFlt-1 的对抗, 使血管生成状态发生改变^[10]; miR-150 抑制 VEGF 表达^[11]; RSA 患者的 miR-575 水平与 VEGF 呈负相关^[6]。

从妊娠早期开始, 高度不成熟的血管内皮即使不断膨胀也无法完全满足不断生长的胚胎/胎儿的氧气和营养需要, 导致胚胎发育在低氧环境中进行。缺氧诱导因子(HIF)对细胞氧浓度非常敏感, 低氧浓度下积累的 HIF-1 蛋白与 HIF-1 二聚为有效的转录激活剂, 与特定的 DNA 序列结合, 在海绵状滋养细胞的形成中起关键作用, 调控胎盘的形成过程。miRNA 对 HIF 有调控作用, URSA 患者绒毛中 miRNA-223-3p 表达水平升高, 而 Rps6kb1 mRNA、HIF-1 α mRNA、VEGF mRNA 表达水平及 MVD 均降低^[12]。miRNA-223-3p 可能通过抑制 Rps6kb1/HIF-1 α 信号通路而使 HIF-1 α 和 VEGF 表达水平下降, 影响血管生成过程, 导致绒毛及胎盘血管发育不良, 无法供应胚胎及其附属物的发育而导致流产。URSA 女性绒毛中 miR-210 表达水平也被发现与 HIF-1 α 、VEGF、

MVD 呈负相关^[13], 提示 miRNA 作用于血管生成过程参与 RSA 的发生。

2 miRNA 介导细胞凋亡、增殖参与 RSA 的发生

细胞凋亡是一种程序性调控的主动死亡过程, 是妊娠期的正常生理过程, 胎盘绒毛组织的细胞凋亡水平影响胎盘重塑, 调节胎盘生长, 而蜕膜化的内膜是母胎界面的重要组成部分, 参与构成母体与胎儿物质交换的通道, 绒毛和蜕膜的凋亡水平异常都可导致流产的发生, miRNA 通过对多个信号通路的作用影响细胞凋亡水平, 导致 RSA 的发生^[14]。

p53 是细胞凋亡和细胞周期的关键调控因子, p53 基因编码在 DNA 修复中起重要作用的 53kd 磷酸蛋白, p53 可以感应 DNA 损伤并介导下游靶基因而实现调控功能, 包括阻滞细胞周期、引起细胞衰老、诱导细胞凋亡、修复 DNA 等^[15]。有研究发现, URSA 女性绒毛组织中高表达的 let-7f-5p 可能通过调控 p53 信号通路中的 MDM-X/MDM2/p53 基因, 促进细胞凋亡并参与 URSA 的发生^[16]。ZHAO 等^[17]发现, URSA 患者蜕膜中 miRNA-365 高表达, 靶向细胞凋亡抑制因子 SGK1 下调 MDM2 及上调 p53, 造成 G1 期细胞周期停滞, 并诱导细胞凋亡。miRNA 也可通过其他通路调节细胞凋亡。

此外, miRNA 调节 DNA 损伤反应(DDR)相关因子, 从而影响细胞凋亡水平。DONG 等^[18]研究发现, RSA 患者的绒毛中高表达的 miR-520 与多聚腺苷二磷酸核糖聚合酶 1(PARP1)呈负相关。过表达 miR-520 的体外人滋养细胞中观察到 PARP1 水平降低和以 DNA 损伤为特点的细胞凋亡, 而 PARP1 过表达可恢复凋亡水平。PARP1 被认为是 DDR 中的关键物质, DDR 是一种复杂的信号转导途径, 响应 DNA 损伤而被触发, 是保持基因组稳定的基础。另一项研究指出, miR-520 诱导滋养细胞凋亡的机制可能通过作用于内质网应激通路而实现^[19]。

3 miRNA 介导免疫耐受参与 RSA 的发生

妊娠是一种复杂的生理过程, 胎儿携带父系基因及父系人类白细胞抗原(HLA)而不受到母体免疫系统的攻击, 是因为建立了良好的免疫耐受, RSA 的发生与免疫异常相关^[20]。

HLA-G 是主要组织相容性复合物(MHC) I b 类抗原, 组织表达分布集中, 几乎仅在母胎界面处绒毛外滋养细胞中表达, 其与自然杀伤细胞受体结合并传递抑制信号, 从而使胎儿免受母体淋巴细胞的免疫性攻击, 这些现象反映了 HLA-G 可使胎儿免受母体免疫系统的排斥^[21]。WANG 等^[22]研究发现, 正常核型 RSA 绒毛中 miR-133a 表达水平显著升高, 可能通过结合 HLA-G 3'UTR 阻断翻译过程, 从而降低 HLA-

G 水平。

母胎微环境中 Th1/Th2 平衡在正常妊娠中必不可少,ZHAO 等^[23]发现,URSA 患者蜕膜中低水平 miR-146a-5p 通过 TLR/白细胞介素(IL)-1R 信号转导途径,产生过量的 γ -干扰素(IFN- γ),破坏 Th1/Th2 平衡,从而引发 URSA。RSA 患者 miR-155 表达水平降低,并与升高的 TIM3(Th1 的调节蛋白)、IL-4、IL-13 及降低的 IFN- γ 水平具有相关性,提示 miR-155 可能作用于 Th1/Th2 平衡而参与 RSA^[24]。小鼠实验证明了低水平 miR-155 将导致调节性 T 细胞(Treg)不足而造成反复的胎儿丢失^[25]。

4 影响 miRNA 表达的因素

4.1 表观遗传修饰影响 miRNA 的表达水平 表观遗传学包括一系列不涉及基因组改变且易受环境影响的可遗传性进程,如 DNA 甲基化、非编码 RNA 等。表观遗传学不仅影响细胞分化、发育等生理进程,也被证实参与许多疾病的发生发展过程^[26]。

基因附近或内部胞嘧啶-磷酸-鸟苷酸(CpG)甲基化水平的改变可引起基因表达水平的改变,在 miRNA 基因的表达中也不例外^[27]。马天仲等^[28]发现,URSA 患者绒毛 CpG 甲基化位点与健康女性存在差异。DNA 甲基化水平影响 miR-133a-3p 表达,RSA 患者中高水平 miR-133a 可能通过抑制细胞增殖而导致 RSA 的发生。

长链非编码 RNA(lncRNA)可通过直接作用于 miRNA 影响其表达水平。崔进等^[29]研究发现,RSA 患者胚胎中 lncRNA H19 水平升高。H19 在胎盘转录物中的水平位于第 2,是第一批被发现的 lncRNA 之一。H19 位点通过 miR-675 调节胰岛素样生长因子 2(IGF2)及其受体胰岛素样生长因子受体(IGF1R)的水平,IGF1R 与 IGF2 共同影响绒毛的增殖发育过程,参与流产的发生。此外,H19 还可影响 miRNA-675 的靶蛋白 NMO1,从而影响滋养细胞增殖,影响妊娠进程。另一种 lncRNA-miRNA 的作用方式是“分子海绵”机制。“分子海绵”指 lncRNA 作为竞争性内源 RNA(ceRNA)与 miRNA 结合,影响 miRNA 与编码蛋白质的 mRNA 结合,使 miRNA 表达水平下降。RSA 患者中 miR-34a 表达水平升高而 lncRNASNHG7 呈现低水平,lncRNASNHG7 可与 miR-34a 结合,从而降低 miR-34a 对滋养细胞增殖和侵袭的抑制作用^[30]。

除 lncRNA 外,环状 RNA(circRNA)也具有 ceRNA 的能力,QIAN 等^[31]发现,RSA 患者绒毛中有 8 种与健康妊娠期女性差异表达的 circRNA,而已有证据显示 circRNA 可调控 miRNA,表明 circRNA 可能通过 ceRNA 机制调节 miRNA,从而参与 RSA 的

发生^[32]。

4.2 基因多态性影响 miRNA 表达水平 单核苷酸多态性或 miRNA 编码区突变可能改变 miRNA 的表达及成熟情况。而这种现象在多个国家的 RSA 患者中被证实。miRNA-27a rs895819 A/G 多态性中的 GA+GG 和 G 等位基因与埃及女性对 RSA 的易感性增加有关^[33]。有学者发现,韩国 RSA 女性中,miR-27a 变体 G 等位基因风险较低,而 miR-449b 变体 G 等位基因与高风险相关^[34]。另一项基于韩国女性的研究提示,miR-25 C>T 和 miR-222 G>T 的组合与 RSA 的发生有关^[35]。在针对中国女性的研究中发现,miR-196a-2 中的 miR-196a-2 rs11614913 T/T 可能通过破坏成熟 miR-196a-3p 的产生和增强二氢叶酸还原酶(DHFR)的表达而导致 RSA 的遗传易感性^[36]。另一项研究证实,pri-miR-125a 编码区的 A>G 突变使汉族 RSA 患者成熟 miR-125a 表达降低^[37]。

5 miRNA 检验技术的应用与挑战

生物标志物应提供正常生理状态或病理过程的关键信息,稳定性好,容易通过非侵入性手段获得,可通过简单和廉价的方法检测,且具有良好的特异度。miRNA 基本符合这些标准,已被发现在肿瘤、神经系统疾病、心血管系统疾病、病毒感染等疾病中存在变化,从而成为不同细胞事件和疾病诊断、预后和治疗监测的有效生物标志物^[38]。

准确、可靠、灵敏的检测方法是 miRNA 作为新一代生物标志物的前提。目前,分析 miRNA 最常用的方法都存在其优势和一定的局限性。qRT-PCR 灵敏度高,应用广泛,但缺乏多路复用和全基因组覆盖,而且作为基于指数扩增的方法,其中的偏差或错误也会指数级扩增而影响实验结果^[39]。印迹杂交(Northern blotting)可用于检测非扩增的 miRNA,但其要求原料量大、放射性强,且灵敏度低、耗时长、劳动强度大^[40]。原位杂交可展示细胞或组织切片中的时空分布,但技术难度高、费时,且结果不具体^[41]。微阵列技术提供全基因组覆盖,但需要特定的探头和专门的设备,数据规范化困难,缺乏不同平台之间的重现性^[42]。新一代测序提供全基因组覆盖,识别新的 miRNA 和 miRNA 中的单核苷酸多态性,但其需要专门的设备、熟练的生物信息学家且数据分析复杂^[43]。等温指数放大灵敏度高,信号放大效率高,不需要热循环设备,但需要包括切割酶在内的多种酶,且探针设计复杂^[44]。DNA 四面体、DNA 折纸、DNA 器件和基元等 DNA 纳米技术可直接检测 miRNA,从而消除任何基于扩增的错误,弥补了 qRT-PCR 和 Northern blotting 中缺乏多路复用的不足,一些纳米技术还可通过

对设备、培训需求的降低从而降低成本和复杂性^[38]。

一些 miRNA 可以在多种不同疾病中朝着相似的方向改变。例如, miR-21 表达水平在一些疾病中发生改变,包括心血管疾病、炎症,以及一些癌症,包括乳腺癌、宫颈癌、结肠直肠癌、胶质母细胞瘤、肝癌、肺癌、胰腺癌和皮肤癌^[45-46]。因此,需要对循环的 miRNA 进行全局筛选,以生成针对特定疾病或癌症类型的 miRNA 特征,从而提高生物标志物的特异度。年龄、性别、既往治疗方案等因素也必须加以考虑。此外,数据再现性是检测方法、分析方法及数据处理标准化和优化可能产生的另一个主要问题^[47-48]。在 miRNA 可以用作新一代人类疾病的生物标志物之前,miRNA 诊断的前景必须与仍然存在挑战的现实相适应。

6 小 结

综上所述,miRNA 可能通过参与对于妊娠极其重要的血管生成、细胞侵袭和凋亡、免疫平衡及耐受等过程,从而导致 RSA 的发生,miRNA 受表观遗传、基因多态性等因素的影响而参与 RSA 进程。尽管 miRNA 有希望被应用于临床,但仍存在许多问题。现有研究大多数集中于 miRNA 在 RSA 中的差异表达,但标本处理方式、孕周、标本类型差异较大,还需要更多实验来确定 miRNA 参与 RSA 诊断及治疗的具体应用方案。此外,RSA 的发病机制及类型较为复杂,对 RSA 发生发展过程的进一步研究对于 miRNA 的临床应用也具有重要意义。希望通过后续研究,可以将 miRNA 应用于临床,在 RSA 的治疗方面发挥重要作用。

参考文献

- [1] Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss; a committee opinion [J]. Fertil Steril, 2020,113(3):533-535.
- [2] 赵爱民,李聪聪. 复发性流产的诊治现状与未来[J]. 中国实用妇科与产科杂志,2020,36(11):1033-1035.
- [3] GEBERT L F R, MACRAE I J. Regulation of microRNA function in animals [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2019, 20 (1):21-37.
- [4] BERNARDO B C, CHARCHAR F J, LIN R C, et al. A microRNA guide for clinicians and basic scientists: background and experimental techniques [J]. Heart Lung Circ, 2012, 21(3):131-142.
- [5] 陈玲玲,冯珊珊,范祖森,等. 非编码 RNA 研究进展[J]. 中国科学(生命科学),2019,49(12):1573-1605.
- [6] 赵亚民,徐国宜,尹永仁. 反复自然流产患者血清、绒毛和蜕膜中 microRNA-575 的表达及意义[J]. 中国医师杂志, 2020,22(2):278-280.
- [7] 朱颖,成章金,务秋蕾,等. 沉默血管生成素-1 对人绒毛膜外滋养细胞增殖迁移及侵袭能力的影响[J]. 中国妇幼保健,2020,35(22):4356-4359.
- [8] 柏青,黄尤光,李涓,等. HIF-1 α 信号通路参与胎盘内皮增生的可能机制[J]. 西南国防医药,2018,28(12):1142-1145.
- [9] 肖碧如,孙蓉蓉,陈秋月,等. 原因不明复发性流产患者绒毛组织中 miR-29a 的表达及其调控机制[J]. 中华妇产科杂志,2018,53(11):776-778.
- [10] 刘慧,王文珠,张璐,等. miR-200、miR-155 及血管新生因子与复发性流产的相关性分析[J]. 实用预防医学, 2020,27(11):1341-1344.
- [11] 申利,高啸,雷超,等. miR-150 在胎盘表达与复发性流产的关系研究[J]. 生物医学工程与临床,2020,24(2):189-196.
- [12] 高玉霞,董学彩,王文翔,等. miRNA-223-3p 在不明原因复发性流产患者绒毛组织中表达以及在血管生成中的作用[J]. 安徽医药,2018,22(2):242-245.
- [13] 李本英,赵翠红,魏剑红,等. 不明原因复发性流产患者绒毛组织中 miR-210 表达及其与血管新生因子的关系[J]. 现代妇产科进展,2017,26(5):353-356.
- [14] 孙莉,陈琳,马继红. 妊娠早期复发性流产患者妊娠组织增殖与凋亡的研究[J]. 临床误诊误治,2017,30(1):94-97.
- [15] 王伟,赵小萱,古玥儒,等. p53 介导蜕膜化受损致复发性流产的研究进展[J]. 国际生殖健康/计划生育杂志, 2018,37(5):430-434.
- [16] 梁婕,韩莉,梁健,等. let-7f-5p 在不明原因复发性流产绒毛组织中的表达及其功能研究[J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2017,37(8):971-975.
- [17] ZHAO W, SHEN W W, CAO X M, et al. Novel mechanism of miRNA-365-regulated trophoblast apoptosis in recurrent miscarriage [J]. J Cell Mol Med, 2017, 21(10): 2412-2425.
- [18] 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.
- [19] 陈欣,郭端英,付振琳,等. miR-520 激活内质网应激导致滋养细胞凋亡的相关研究[J]. 生殖医学杂志, 2020, 29 (8):1067-1073.
- [20] 郑晶,崔慧,孙丽,等. 同种免疫型复发性流产的病因学研究及治疗进展[J]. 中国生育健康杂志, 2020, 31(6):590-593.
- [21] AL-KHUNAIZI N R, TABBARA K S, FARID E M. Is there a role for HLA-G in the induction of regulatory T cells during the maintenance of a healthy pregnancy? [J]. Am J Reprod Immunol, 2020, 84(2):e13259.
- [22] WANG X, LI B, WANG J, et al. Evidence that miR-133a causes recurrent spontaneous abortion by reducing HLA-G expression [J]. Reprod Biomed Online, 2012, 25 (4):

- 415-424.
- [23] ZHAO L, LI J, HUANG S. Patients with unexplained recurrent spontaneous abortion show decreased levels of microRNA-146a-5p in the deciduae[J]. *Ann Clin Lab Sci*, 2018, 48(2):177-182.
- [24] 温海燕, 王靖, 钱敏, 等. miR-155 在复发性流产患者绒毛组织中的表达及与 TIM3 水平的关系[J]. *中华全科医学*, 2020, 18(3):438-441.
- [25] SCHJENKEN J E, MOLDENHAUER L M, 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.
- [26] 丁勇, 许超, 吴季辉, 等. 表观遗传学研究进展[J]. *中国科学(生命科学)*, 2017, 47(1):3-15.
- [27] ORTIZ I, BARROS-FILHO M C, DOS REIS M B, et al. Loss of DNA methylation is related to increased expression of miR-21 and miR-146b in papillary thyroid carcinoma[J]. *Clin Epigenetics*, 2018, 10(1):144.
- [28] 马天仲, 牛艳茹, 韦冰. 原因不明复发性流产绒毛 DNA 全基因组甲基化芯片结果的分析[J]. *广东医学院学报*, 2015, 33(6):661-664.
- [29] 崔进, 张秀娟, 吴宏, 等. lncRNA-H19 表达的升高与复发性流产的关系[J]. *当代医药论丛*, 2019, 17(3):61-63.
- [30] XIANG H, YAN H, SUN B, et al. Decreased expression of long non-coding RNA SNHG7 cause recurrent spontaneous abortion through suppression proliferation and invasion of trophoblast cells via miR-34a[J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(1):463-472.
- [31] QIAN Y, WANG X, RUAN H, et al. Circular RNAs expressed in chorionic villi are probably involved in the occurrence of recurrent spontaneous abortion[J]. *Biomed Pharm*, 2017, 88:1154-1162.
- [32] RUAN Z B, WANG F, YU Q P, et al. Integrative analysis of the circRNA-miRNA regulatory network in atrial fibrillation[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1):20451.
- [33] SHAKER M, SHALABI T, GABER K R, et al. Association of miRNA-27a and leptin polymorphisms with recurrent pregnancy loss in Egyptian women[J]. *Meta Gene*, 2020, 24:100617.
- [34] RAH H, CHUNG K W, KO K H, et al. miR-27a and miR-449b polymorphisms associated with a risk of idiopathic recurrent pregnancy loss[J]. *PLoS One*, 2017, 12(5):e0177160.
- [35] LEE J Y, KIM J O, PARK H S, et al. Study of the association between microRNA (miR-25 T>C, miR-32 C>A, miR-125 C>T, and miR-222 G>T) polymorphisms and the risk of recurrent pregnancy loss in Korean women [J]. *Genes (Basel)*, 2020, 11(4):354.
- [36] WANG X, ZHANG L, GUAN C, et al. The polymorphism of rs11614913 T/T in pri-miR-196a-2 alters the miRNA expression and associates with recurrent spontaneous abortion in a Han-Chinese population[J]. *Am J Transl Res*, 2020, 12(5):1928-1941.
- [37] HU Y, HUO Z H, LIU C M, et al. Functional study of one nucleotide mutation in pri-miR-125a coding region which related to recurrent pregnancy loss[J]. *PLoS One*, 2014, 9(12):e114781.
- [38] CHANDRASEKARAN A R, PUNNOOSE J A, ZHOU L, et al. DNA nanotechnology approaches for microRNA detection and diagnosis[J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(20):10489-10505.
- [39] CHEN C, RIDZON D A, BROOMER A J, et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR[J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(20):e179.
- [40] VÁRALLYAY E, BURGÁN J, HAVELDA Z. microRNA detection by northern blotting using locked nucleic acid probes[J]. *Nat Protoc*, 2008, 3(2):190-196.
- [41] KLOOSTERMAN W P, WIENHOLDS E, DE BRUIJN E, et al. In situ detection of miRNAs in animal embryos using LNA-modified oligonucleotide probes [J]. *Nat Methods*, 2006, 3(1):27-29.
- [42] DUAN D, ZHENG K X, SHEN Y, et al. Label-free high-throughput microRNA expression profiling from total RNA[J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(22):e154.
- [43] BECKERS M, MOHORIÁNU I, STOCKS M, et al. Comprehensive processing of high-throughput small RNA sequencing data including quality checking, normalization, and differential expression analysis using the UEA sRNA workbench[J]. *RNA*, 2017, 23(6):823-835.
- [44] CHEN J, ZHOU X, MA Y, et al. Asymmetric exponential amplification reaction on a toehold/biotin featured template: an ultrasensitive and specific strategy for isothermal microRNAs analysis[J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(15):e130.
- [45] CALIN G A, CROCE C M. microRNA signatures in human cancers[J]. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6(11):857-866.
- [46] KUMARSWAMY R, VOLKMANN I, THUM T. Regulation and function of miRNA-21 in health and disease [J]. *RNA Biol*, 2011, 8(5):706-713.
- [47] MEYER S U, PFAFFL M W, ULBRICH S E. Normalization strategies for microRNA profiling experiments: a 'normal' way to a hidden layer of complexity? [J]. *Bio-technol Lett*, 2010, 32(12):1777-1788.
- [48] WITWER K W. Circulating microRNA biomarker studies: pitfalls and potential solutions[J]. *Clin Chem*, 2015, 61(1):56-63.