

# 早期停育胚胎的滋养层细胞相关基因与特征分析

张悦<sup>1</sup>, 冯颖<sup>2</sup>, 马芳<sup>1,3</sup>

1. 四川大学华西第二医院教育部“妇科疾病与出生缺陷”重点实验室, 成都 610041
2. 四川大学华西基础医学与法医学院, 成都 610041
3. 四川大学华西第二医院妇产科, 成都 610041

**摘要:** 滋养层细胞对维持正常胚胎植入、生长发育有重要作用。研究停育胚胎的滋养层细胞的基因表达差异有助于了解胚胎发育停止或不良妊娠结局的发生发展机制。本研究通过对 26 例正常妊娠、胚胎停育妇女的绒毛组织进行全转录组测序和初步生物信息学分析, 发现胚胎停育组存在 436 个差异基因, 其中 406 个 mRNA 为显著上调基因, 32 个 mRNA 为显著下调基因。基因富集分析显示这些基因显著富集于免疫相关功能、细胞间黏附等方面, 如淋巴细胞激活、髓系细胞激活、细胞外基质及胶原连接等, 其潜在调控通路富集到补体及凝血级联反应和细胞外基质降解等条目。此外, 本研究利用 WGCNA 共表达分析得到和差异基因存在共表达关系的 lncRNA。根据模块功能不同, 绘制了两个网络图, 可得 4 个关键基因, 分别为 *VSIG4*、*CIQC*、*CD36* 和 *SPPI*。本研究得到的这些差异基因可作为对胚胎停育具有潜在影响的关键分子, 所富集到的条目可为深入了解胚胎发育停止或不良妊娠结局的病因及机制提供理论依据及方向。

**关键词:** 滋养层细胞; RNA 测序; 富集分析; 基因特征

## Related genes and characteristic analysis of trophoblast cells during early embryo developmental cessation

Yue Zhang<sup>1</sup>, Ying Feng<sup>2</sup>, Fang Ma<sup>1,3</sup>

1. Gynecologic and Pediatric Diseases and Birth Defects of Ministry of Education, West China Second University Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China
2. West China School of Basic Medical Sciences & Forensic Medicine, Chengdu 610041, China
3. Department of Obstetrics and Gynecology, West China Second University Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

**Abstract:** Trophoblast cells play essential roles in the maintenance of normal embryo implantation, growth and development. The study of abnormal gene changes in trophoblastic cells from arrested embryos is helpful to understand the developmental mechanism of embryo developmental cessation or adverse pregnancy outcomes. In this study, we sequenced and analyzed the transcriptomes of the villi from ten women who have undergone abortion with either normal pregnancy or

收稿日期: 2020-08-08; 修回日期: 2020-10-02

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 31771662)和国家科技重大专项(编号: 2018YFC1002803-3)资助[Supported by the National Nature Science Foundation of China (No. 31771662), and the National Science and Technology Major Project (No. 2018YFC1002803-3)]

作者简介: 张悦, 在读硕士研究生, 专业方向: 母婴医学。E-mail: zhangyue@stu.scu.edu.cn

通讯作者: 马芳, 教授, 研究方向: 糖生物学与生殖医学。E-mail: mafangmed@126.com

DOI: 10.16288/j.ycz.20-144

网络出版时间: 2020/10/20 15:15:00

URI: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20201019.1300.003.html>

embryo development cessation. We found that there were 436 differentially expressed genes, of which 406 mRNA were significantly up-regulated and 32 mRNA were significantly down-regulated. Gene enrichment analysis showed that these genes were significantly enriched in immune-related functions and intercellular adhesion, such as lymphocyte activation, myeloid cell activation, extracellular matrix and collagen junction. And their potential regulatory pathways were enriched in terms of complement and coagulation cascade, extracellular matrix degradation. In addition, in this study the co-expression analysis of WGCNA was used to obtain the lncRNA with co-expression relationship with the differential genes. According to the different functions of the modules, two network diagrams were drawn, and four key genes were obtained, namely *VSIG4*, *CIQC*, *CD36* and *SPPI*. These differential genes obtained in this study can be used as key molecules with potential effects on embryo development cessation. The enriched entries can provide a theoretical basis and new direction for further understanding of the etiology and mechanism of embryo development cessation or adverse pregnancy outcomes.

**Keywords:** trophoblast; RNA-seq; enrichment analysis; genetic traits

早期绒毛组织的细胞构成主要指滋养层细胞(trophoblast)<sup>[1]</sup>。根据细胞功能及形态的特点,滋养层细胞可分为细胞滋养层、合体滋养层和绒毛外滋养层细胞。其中,细胞滋养层分化为合体滋养层参与营养、分泌、代谢等功能<sup>[2]</sup>,而绒毛外滋养层细胞主要参与迁移、侵袭作用入侵子宫内膜及血管,建立母胎循环及启动血管重塑<sup>[3]</sup>。绒毛滋养层细胞作为直接和母体子宫内膜接触的细胞,目前认为对维持胚胎正常发育有 3 大功能:侵袭迁移功能、内分泌功能(包括自分泌及旁分泌)及免疫调节功能。绒毛外滋养层细胞通过分泌黏附因子(整合素、钙黏素、选择素及免疫球蛋白超家族<sup>[4]</sup>)对子宫内膜上皮细胞进行识别及黏附,并通过分泌水解酶(基质金属蛋白酶、纤维蛋白酶等)降解植入部位的细胞外基质进行迁移、浸润,以完成正常的胚胎植入。其中,整合素家族和子宫内膜容受性密切相关,整合素  $\alpha\beta 3$  表达不足会降低子宫内膜容受性,导致胚胎着床能力低下,引起流产或胚胎发育迟滞<sup>[5]</sup>。而过高的水解酶会导致滋养层细胞过度浸润,引起妊娠期高血压、侵入性胎盘疾病等病理妊娠<sup>[6]</sup>。滋养层细胞还通过分泌细胞因子(如表皮生长因子 EGF<sup>[7]</sup>、转化生长因子 TGF<sup>[8]</sup>及集落刺激因子 CSF-1<sup>[9]</sup>等)调节自身增殖分化、能量代谢及侵袭功能等。其中,EGF 表达异常可能造成滋养层细胞侵袭不足、胎盘血管重铸障碍,最终引起流产<sup>[7]</sup>。TGF 的表达不足影响滋养层细胞分化,造成胎盘发育不良<sup>[8]</sup>。此外,滋养层细胞可分泌激素(人绒毛膜促性腺激素 hCG、孕酮等)维持早期胚胎发育及妊娠。hCG 能维持及促进母体

卵巢分泌雌、孕激素,并作为早孕时判断胚胎发育停止的指标之一。因此,绒毛滋养层细胞对胚胎植入、发育及胎盘生长、妊娠结局等均有重要影响,而绒毛滋养层细胞的异常形态及功能障碍往往提示胚胎停育或不良妊娠结局。据报道<sup>[9]</sup>,普通光学显微镜下观察可发现停育胚胎的绒毛组织形态异常,出现绒毛间质水肿,合体滋养层核固缩等病理改变。经凋亡小体检测发现,停育胚胎的绒毛滋养层细胞中细胞凋亡数目明显增多<sup>[10]</sup>。考虑到目前胚胎停育的病因复杂,且部分患者未能找到病因,深入研究异常滋养层细胞变化能在一定程度上对胚胎停育及不良妊娠结局做出解释。本研究借助全转录组测序技术,对停育胚胎的绒毛组织进行大规模的基因筛选及挖掘,寻找异常变化的基因,预测其变化对滋养层细胞生物学功能的潜在影响,为临床上不明原因性胚胎停育的病因及分子生物学机制做出一定解释。

## 1 材料与方法

### 1.1 样本收集及制备

26 例患者的绒毛组织均来自华西第二医院门诊手术室,其中 10 例用于转录组测序,其中 5 例为无生育要求进行人工流产的患者(对照组),5 例患者为经 B 超检测确诊胚胎停育进行清宫术的患者(胚胎停育组)。剩余 16 例用于验证测序结果,其中 9 例为无生育要求进行人工流产的患者(对照组),7 例患者为经 B 超检测确诊胚胎停育进行清宫术的患者

(胚胎停育组)。两组别中对照组患者平均年龄 29.2 岁, 孕周 46.4 d, 胚胎停育组患者平均年龄 30.6 岁, 孕周 60.2 d, 患者临床信息(参与转录组测序的临床样本)见表 1。患者术后的绒毛组织立即置于 4℃ 冰盒中防止 RNA 降解。加入 10% 中性福尔马林固定 12 h, 依次通过 50% 酒精、70% 酒精梯度脱水, 进行石蜡包埋。所有的总 RNA 提取、逆转录、扩增、文库构建由南京极光基因科技有限公司完成。本研究通过了四川大学华西第二医院伦理委员会的审查, 参与研究的所有患者均签署了知情同意书。

### 1.1 样本收集及测序

以 Trizol 法提取总 RNA, 每个样本取 3 μg 的总 RNA 作为起始量构建文库, 使用试剂盒 Ribo-Zero™ GoldKits (北京 New England Biolabs 公司) 去除样品中的 rRNA, 并在两端添加测序引物结合位点, 在 Illumina HiSeq2000 平台上进行测序。测序结束后, 通过去除低质量序列, 去接头污染, 去除 rRNA 后得到高质量序列(clean reads), 后续分析基于高质量序列。采取 HiSAT2 将过滤后的 RNA-seq 数据同人基因组(hg19)进行比对。

### 1.2 差异 mRNA 的筛选

采用 FPKM (fragments per kilobase per million mapped fragments) 定量估计基因的总表达量, 采用 R 包 ggplot2 对总基因数绘制箱式图进行比较。采用

DEseq 进行差异表达分析, 定义  $P$  值  $\leq 0.05$  或者  $|\log_2 \text{ratio}| \geq 1$  的基因为差异 mRNA。采用 R 包 ggplot2 对差异 mRNA 绘制火山图, 采用 R 包 pheatmap 对差异 mRNA 绘制热图。

### 1.3 差异 mRNA 的注释及富集分析

采用 omicshare 在线平台(<https://www.omicshare.com/tools/home/soft/getsoft.html>) 对筛选出的基因进行了 GO 基因功能(gene ontology, GO) 和 KEGG 通路 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes) 的富集分析, 以  $FDR < 0.05$  作为显著性的阈值。

### 1.4 加权共表达网络分析 WGCNA 筛选核心 lncRNA

使用 R 包 WGCNA 构建加权基因共表达网络并进行模块划分<sup>[11]</sup>。首先准备基因矩阵, 将差异 mRNA 按差异倍数(fold change, FC) 排序, 选择前 20 个差异 mRNA 及所有 lncRNA 纳入分析。同时, 剔除了平均表达量低于 0.5 的低质量 RNA, 并利用函数 hclust 进行聚类, 剔除了离群样本。采用 pick soft threshold 计算权重值, 采用 power=9, 使用 blockwiseModules 构建无尺度网络<sup>[12]</sup>, 对基因进行模块分析。每个模块的最低基因容量为 50, 利用函数 plot dendro and colors 绘制树状图并对每个模块进行颜色可视化。最后, 确定了差异 mRNA 所在的两个模块作为目标模块, 进行后续分析。

表 1 患者临床信息(参与转录组测序的临床样本)

Table 1 Clinic information of the patients (clinical samples involved in transcriptome sequencing)

序号	临床诊断	年龄(岁)	孕产次	孕周(d)	是否可探胎心	$\beta$ -HCG(mIU/mL)
1	人工流产	24	G2P0 <sup>+1</sup>	42	胎芽不清	—
2	人工流产	34	G4P0 <sup>+3</sup>	43	胎芽不清	—
3	人工流产	29	G3P1 <sup>+1</sup>	49	可见胎心搏动	—
4	人工流产	31	G2P1	47	可见胎心搏动	—
5	人工流产	28	—	51	可见胎心搏动	—
6	胚胎停育	30		55	未见胎心	11,951.4
7	胚胎停育	36	G2P1	50	未见胎心	12,612.1
8	胚胎停育	27	G1P0	57	未见胎心	69,220
9	胚胎停育	27	G1P0	80	未见胎心	—
10	胚胎停育	33	G1P0	59	未见胎心	32,594.4

—: 因患者未进行此项检查, 数据缺失。

### 1.5 差异 mRNA 及 lncRNA 共表达网络的构建

选择 WGCNA 中富集到的两个模块, 根据关联强度(weight)和关联数(edge)筛选最有可能和差异 mRNA 互作的 lncRNA。lncRNA 筛选标准为 weight 值>0.6 且和差异 mRNA 至少存在一条直接连接。使用 cytoscape 软件绘制网络图。

### 1.6 差异表达 mRNAs 和 lncRNAs 实时荧光定量 PCR 验证

为了验证测序结果的可靠性, 选取了 10 个 mRNAs (包括后续分析所得模块中的核心 mRNA, *VSIG4*、*CIQC*、*CD36* 和 *SPP1*)和 4 个 lncRNA 进行实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR)验证。纳排标准与前期测序的样本一致, 能有效保证实验结果的可靠性。根据 Ensemble (<http://asia.ensembl.org/index.html>)提供的序列, 使用在线引物设计网站 Primer3Plus (<http://www.primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>)设计引物, 并通过 BLAST ([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome))进行引物特异性验证。以 Trizol 法提取总 RNA, 使用逆转录试剂盒(大连 TaKaRa 公司)反转录为 cDNA。以此 cDNA 为模板进行实时荧光定量 PCR

(美国 Thermo Fisher 公司), 引物序列见表 2。以 GAPDH 作为内参基因, 使用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算两组中差异表达 mRNAs 和 lncRNAs 的相对表达量。

### 1.7 统计学方法

采用 R 语言(3.6.1)进行算法分析及可视化图形。患者的临床信息采用描述性统计, 两组别间所有 mRNA 采用独立样本 *t* 检验, 所有数据分析采用双侧检验, 以  $P\leq 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 正常与胚胎停育组绒毛组织存在 436 个差异 mRNA、41 个差异 lncRNA

经高通量测序、数据过滤后, 10 例绒毛样本的基因总体表达值(图 1A),  $\log_2(\text{FPKM}+1)$ 值集中于 2~3, 说明各样本间基因数均一, 测序质量良好, 具有良好的可比性。经过差异表达分析后, 发现有 436 个 mRNA 在两组间具有统计学差异, 胚胎停育组相较于正常对照有 406 个 mRNA 显著上调, 32 个 mRNA 显著下调(图 1B)。此外, 发现 41 个 lncRNA 在两组间具有统计学差异, 胚胎停育组相较于正常对照有 28 个 lncRNA 显著上调, 13 个 lncRNA 显著下调

表 2 实时荧光定量 PCR 引物序列表

Table 2 Primer sequences used in quantitative real-time (qRT-PCR) validation

序列	类型	基因名称	上游序列(5'→3')	下游序列(5'→3')
1	mRNA	<i>CIQC</i>	ATCCTGGGAAAAATGGCCCC	GAGGACCGCGTTGAATCTGA
2		<i>VSIG4</i>	TCCAGCAGGCAAAGTACCAG	GTTTCTGGACACGGAGCTCA
3		<i>SPP1</i>	GATGACCATGTGGACAGCCA	AACCACACTATCACCTCGGC
4		<i>CD36</i>	GACCGAGGAAGCCACTTTGA	TAAGCAGGTCTCCAAGTGGC
5		<i>NCKAP1L</i>	TGTCTTCCACTCCCGAATGC	TGCAGTGGACAAAAGTGAGCA
6		<i>FGD2</i>	TGCTACGCATTCCTCACTGG	ATAGAGCACGAGGGGGTTCAT
7		<i>LILRB5</i>	ACCCTGCTGTGTCAGTCATG	GTAGGACCTGATTGCGCTGT
8		<i>FOLR2</i>	GCACCACAAGACAAAGCCAG	CAGGTTGGGTGAGCACTCAT
9		<i>DPPA3</i>	CCAGGGTCTCCACAAATGCT	ATTTCCCTGAGGACTGCTGC
10		<i>MX1</i>	TCGGAGGCTACAGGAAGACT	TTTGCGATGTCCACTTCGGA
11	lncRNA	<i>CLRN1-AS1</i>	GAAAGTCTGAAGCCAGGCCT	CTTTGGGCTTGACAGTCAC
12		<i>AC104809.4</i>	CGTGGGCTCGTCTAAGTGTT	GCACTGAGCTGTTGCAGTC
13		<i>LINC01136</i>	ACCTCAGAGGCTACCCACAT	AGAAGAAATCCAGGGGCTGC
14		<i>USP27X-AS1</i>	TGCAACCAGAGGAAGTCAA	AGGTGGACCTATGGGCTTCT

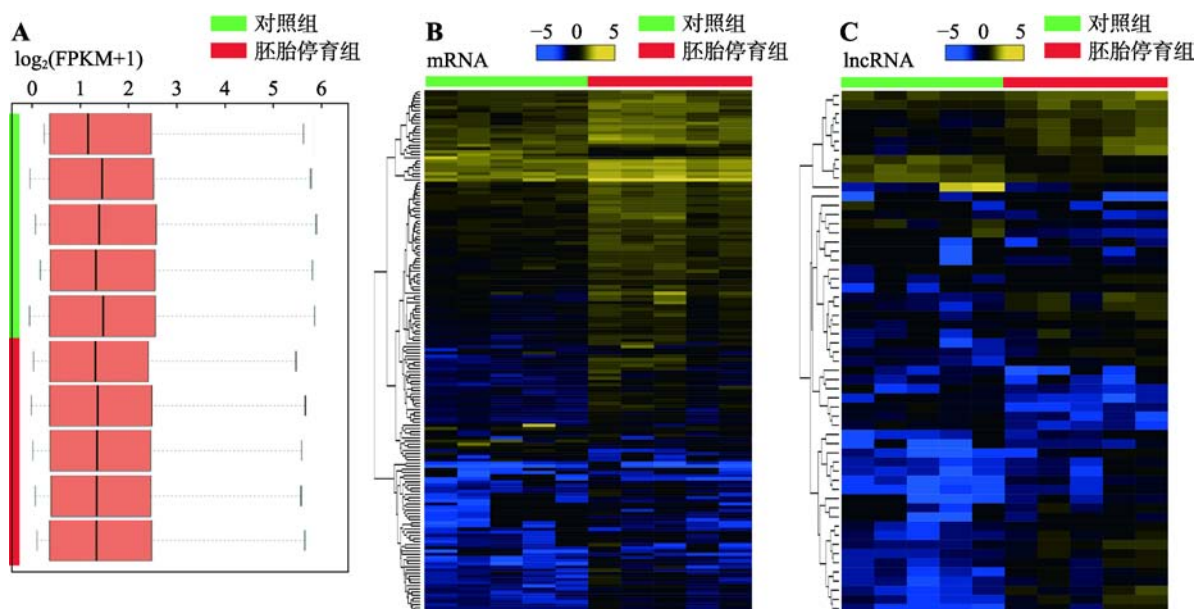


图 1 差异基因的表达情况

Fig. 1 Expression of differential genes

A: 10 例样本的基因总体表达量(箱式图); B: 两组别的差异 mRNA 分析(热图); C: 两组别的差异 lncRNA 分析(热图)。

(图 1C)。对差异 mRNA 及 lncRNA 进行表达聚类分析, 从蓝到黄表示表达水平从低到高, 发现各组均可形成独立的簇, 说明两组别间生物学重复较好。

## 2.2 代表性差异 mRNA 及 lncRNA 的 qRT-PCR 验证结果与转录组结果一致

为了确定测序结果的正确性, 分别选择了 10 个 mRNA (包括后续分析所得模块中的核心 mRNA, *VSIG4*、*CIQC*、*CD36* 和 *SPPI*) 和 4 个 lncRNA 进行实时荧光定量 PCR (图 2)。图 2A、B 结果是通过转录组测序所得的差异 mRNA 和 lncRNA 相对表达量。在胚胎停育组中, *CIQC*、*VSIG4*、*SPPI*、*CD36*、*NCKAP1L*、*FGD2*、*LILRB5*、*FOLR2* 基因的 mRNA 水平显著高于对照组, *DPPA3*、*MXI* 基因的 mRNA 水平显著低于对照组。对于 lncRNA 而言, *CLRN1-AS1*、*AC104809.4*、*LINC01136*、*USP27X-AS1* 的水平显著高于对照组。图 2C、D 结果是通过实时荧光定量 PCR 所得的差异 mRNA 和 lncRNA 相对表达量。在胚胎停育组中, *CIQC*、*VSIG4*、*SPPI*、*CD36*、*NCKAP1L*、*FGD2*、*LILRB5*、*FOLR2* 基因的 mRNA 水平显著高于对照组, *DPPA3*、*MXI* 基因的 mRNA 水平显著低于对照组。对于 lncRNA 而言, *CLRN1-*

*AS1*、*AC104809.4*、*LINC01136*、*USP27X-AS1* 的水平显著高于对照组。此结果与转录组测序结果相符合。为了更为直观地比较两种方法所得结果的一致性, 计算了两组间的相对表达比值(胚胎停育组相对于对照组的差异倍数)(图 2, E 和 F), 在转录组结果中显著上调/下调的 mRNA 和 lncRNA 在实时荧光定量 PCR 中也呈现显著上调/下调的趋势。由此推断, 这些差异 mRNA 及 lncRNA 在 qRT-PCR 中的表达模式与转录组结果一致, 说明本研究的测序结果具有一定的可信度。

## 2.3 差异 mRNA 功能富集于细胞外基质黏附、免疫功能类别

为了深入分析差异 mRNA 的具体功能, 选择 436 个 mRNA 进行 GO 分析, 共富集到 54 个条目 ( $FDR < 0.05$ ) (图 3A)。其中, 分别富集到生物学过程 (biological process, BP)、细胞组分 (cellular component, CC) 和分子功能 (molecular function, MF) 的基因数分别为 26 条、17 条及 11 条。在 BP 条目下的富集程度最高前 3 个的条目为细胞内过程 (cellular process)、生物调节 (biological regulation) 和生物学过程调节 (regulation of biological process)。在 CC 条目



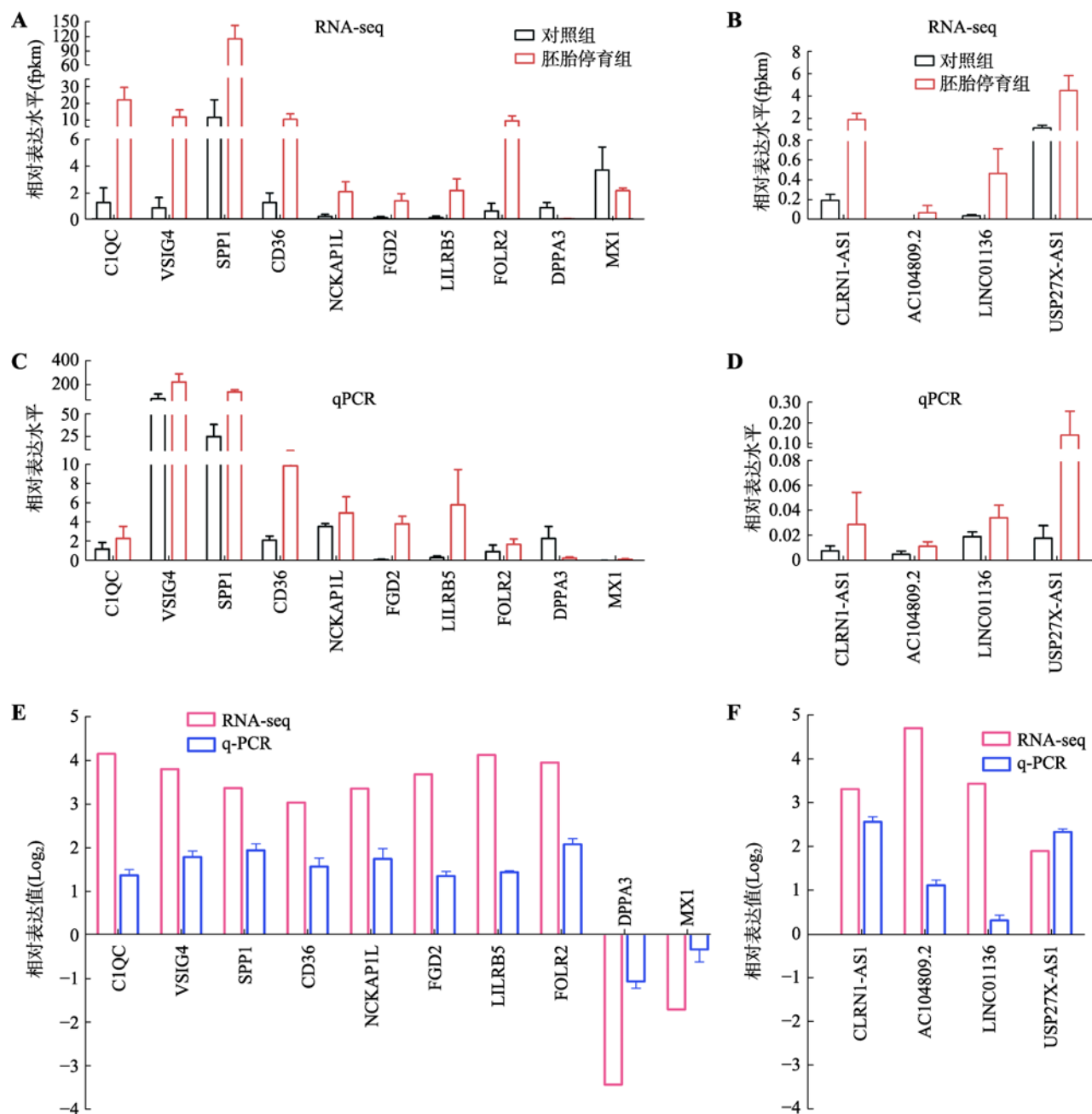


图 2 差异 mRNA 及 lncRNA 的 qRT-PCR、转录组验证结果

Fig. 2 qRT-PCR and transcriptome validation among differential mRNAs and lncRNAs

A: 两组别间差异 mRNA 相对表达量(转录组测序); B: 两组别间差异 lncRNA 相对表达量(转录组测序); C: 两组别间差异 mRNA 相对表达量(实时荧光定量 PCR); D: 两组别的差异 lncRNA 相对表达量(实时荧光定量 PCR); E: 差异 mRNA 相对表达比值=胚胎停育组/对照组(取  $\log_2$  对数后); F: 差异 lncRNA 相对表达比值=胚胎停育组/对照组(取  $\log_2$  对数后)。

下的富集程度最高前 3 个的条目为细胞(cell)、细胞组分(cell part)和细胞器(organelle)。在 MF 条目下的富集程度最高前 3 个的条目为连接(binding)、催化过程(catalytic activity)和分子传导过程(molecular transducer activity)。436 个 mRNA 进行 KEGG 富集

分析, 共富集到 36 个条目( $FDR < 0.05$ ) (图 3B)。其中, 代谢相关通路富集程度最高的是脂质代谢(lipid metabolism)和碳水化合物代谢(carbohydrate metabolism), 其他二级信号通路富集程度最高前 3 个分别是免疫系统(immune system)、感染性疾病(infectious

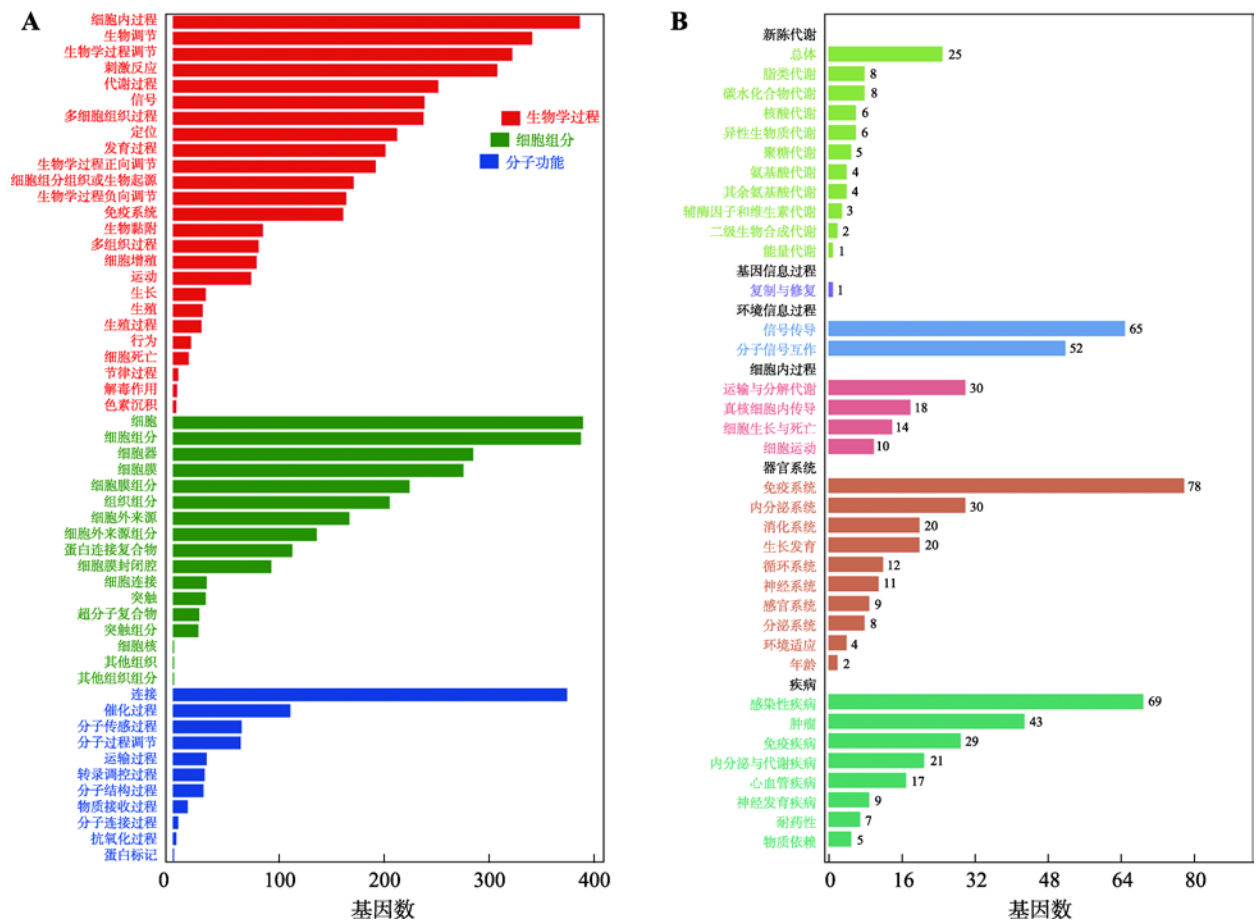


图 3 差异 mRNA 的 GO 功能和 KEGG 通路富集分析

Fig. 3 GO function enrichment and KEGG pathway analysis of differential mRNAs

A: 两组别差异 mRNA 的 GO 功能分析; B: 两组别差异 mRNA 的 KEGG 功能分析。

diseases)和信号传导(signal transduction)。为进一步明确二级信号通路下属的具体条目,按置信度从低到高将所有信号通路进行排列,列出了前 10 条富集程度最高的信号通路(表 3)。从表 3 可知,胚胎停育组中差异基因富集于补体及凝血级联反应、细胞外基质、吞噬体、血小板活及微生物感染相关的通路。已有的研究已经表明,过度的补体系统激活<sup>[13]</sup>、凝血系统激活<sup>[14]</sup>、细胞外基质降解<sup>[15]</sup>、血小板激活<sup>[16]</sup>均引起免疫系统过度攻击胚胎并导致流产的发生,而富集于微生物感染相关通路可能是由于免疫失衡后,机体对胚胎的攻击和感染性疾病类似,且胚胎停育后植入部位易引起感染。

#### 2.4 筛选细胞外基质黏附、免疫功能模块下具有共表达关系的 6 个核心 lncRNA

为筛选和差异 mRNA 有共表达关系的 lncRNA,

采用加权共表达网络 WGCNA (weighted gene co-expression network analysis)分析差异 mRNA 及 lncRNA 的相关性。WGCNA 是基于待测基因间的共表达关系对基因进行模块分类,从而呈现基因的全局表达规律,并通过寻找与样本性状相关的模块和候选基因,为下游机制方面的研究提供方向。

在本研究中,根据差异 mRNA 及 lncRNA 的共表达关系,可聚类为 4 个聚类树,树的一个分支代表一簇表达量高度相关的基因模块(图 4A)。通过动态剪切树法对各模块进行区分,并根据模块相似度(0.8)合并相似模块,最终得到 4 个模块,分别为 Blue 模块(1236 个)、Brown 模块(1227 个)、Green 模块(642 个)和 Turquoise 模块(1292 个)(图 4B)。在 Brown 和 Turquoise 这两个模块中,按照筛选标准:连接程度大于 0.6 且和差异 mRNA 至少存在一条直接连接,确定了两个模块中的 lncRNA,并对其进行网络图的

表 3 差异 mRNA 的 KEGG 富集分析(置信度最高的前 10 条信号通路)

Table 3 KEGG enrichment analysis of differential mRNAs (the top 10 signaling pathways with the highest confidence)

通路二级分类(B 类)	通路	<i>P</i> 值	<i>q</i> 值	通路号	富集到的基因
免疫系统 (immune system)	补体及凝血级联反应 (complement and coagulation cascades)	3.70E-07	9.07E-05	ko04610	<i>C7</i> , <i>CLU</i> , <i>F13A1</i> , <i>VSIG4</i> , <i>C1QC</i> , <i>ITGB2</i> , <i>ITGAM</i> , <i>C3AR1</i> , <i>C1QB</i> , <i>C1QA</i> , <i>C5AR1</i> , <i>CFD</i> , <i>CR1</i>
信号分子与相互作用 (signaling molecules and interaction)	细胞外基质 (cell adhesion molecules)	3.78E-07	1.16E-03	ko04514	<i>ITGAL</i> , <i>SPP1</i> , <i>CD4</i> , <i>PTPRC</i> , <i>SIGLEC1</i> , <i>NRCAM</i> , <i>MAG</i> , <i>CD36</i> , <i>LRRC4</i> , <i>VTCN1</i> , <i>ITGB2</i> , <i>NFASC</i> , <i>ITGAM</i> , <i>HLA-DOA</i> , <i>HLA-DRA</i> , <i>HLA-C</i> , <i>HLA-G</i> , <i>HLA-A</i> , <i>HLA-B</i>
运输和分解代谢 (transport and catabolism)	吞噬体 (phagosome)	2.54E-06	2.07E-04	ko04145	<i>MSR1</i> , <i>CORO1A</i> , <i>COMP</i> , <i>NCF2</i> , <i>CD36</i> , <i>TLR2</i> , <i>FCGR2A</i> , <i>FCGR1A</i> , <i>PLA2R1</i> , <i>ITGB2</i> , <i>CTSS</i> , <i>CYBB</i> , <i>ITGAM</i> , <i>CD14</i> , <i>HLA-DOA</i> , <i>HLA-DRA</i> , <i>HLA-C</i> , <i>HLA-G</i> , <i>HLA-A</i> , <i>HLA-B</i> , <i>MRC1</i> , <i>RAB7B</i>
感染性疾病 (infectious diseases)	金黄色葡萄球菌感染 ( <i>Staphylococcus aureus</i> infection)	3.84E-06	2.35E-04	ko05150	<i>ITGAL</i> , <i>FCGR2A</i> , <i>FCGR1A</i> , <i>C1QC</i> , <i>ITGB2</i> , <i>ITGAM</i> , <i>FPR2</i> , <i>FPR1</i> , <i>C3AR1</i> , <i>C1QB</i> , <i>C1QA</i> , <i>C5AR1</i> , <i>CFD</i> , <i>HLA-DOA</i> , <i>HLA-DRA</i>
感染性疾病 (infectious diseases)	阿米巴病 (amoebiasis)	6.45E-06	3.16E-04	ko05146	<i>GNA15</i> , <i>LAMB4</i> , <i>LAMA1</i> , <i>TLR2</i> , <i>PLCB2</i> , <i>ITGB2</i> , <i>CXCL1</i> , <i>PRKCB</i> , <i>ITGAM</i> , <i>CD14</i> , <i>PIK3CD</i> , <i>RAB7B</i>
免疫系统 (immune system)	血小板激活 (platelet activation)	1.59E-05	6.48E-04	ko04611	<i>LCP2</i> , <i>PTGS1</i> , <i>P2RX1</i> , <i>PLCB2</i> , <i>PIK3R5</i> , <i>FCGR2A</i> , <i>FCER1G</i> , <i>PTGIR</i> , <i>GUCY1A3</i> , <i>SYK</i> , <i>PIK3CD</i> , <i>RASGRP1</i> , <i>PLCG2</i>
感染性疾病 (infectious diseases)	肺结核 (tuberculosis)	3.59E-05	1.16E-03	ko05152	<i>CD74</i> , <i>CORO1A</i> , <i>LSP1</i> , <i>TLR2</i> , <i>FCGR2A</i> , <i>FCGR1A</i> , <i>PLA2R1</i> , <i>FCER1G</i> , <i>ITGB2</i> , <i>CTSS</i> , <i>SYK</i> , <i>ITGAM</i> , <i>CD14</i> , <i>TLR1</i> , <i>CR1</i> , <i>HLA-DOA</i> , <i>HLA-DRA</i> , <i>MRC1</i>
免疫系统 (immune system)	FcγR 介导的吞噬作用 (Fc gamma R-mediated phagocytosis)	2.01E-04	2.07E-04	ko04666	<i>WAS</i> , <i>PTPRC</i> , <i>HCK</i> , <i>DOCK2</i> , <i>BIN1</i> , <i>FCGR2A</i> , <i>FCGR1A</i> , <i>PLPP3</i> , <i>SYK</i> , <i>PRKCB</i> , <i>PIK3CD</i> , <i>PLCG2</i>
生长发育 (development)	破骨细胞分化 (osteoclast differentiation)	0.000123966	3.37E-03	ko04380	<i>TYROBP</i> , <i>LCP2</i> , <i>SPI1</i> , <i>TREM2</i> , <i>LILRB1</i> , <i>LILRB5</i> , <i>NCF2</i> , <i>FCGR2A</i> , <i>FCGR1A</i> , <i>SYK</i> , <i>PIK3CD</i> , <i>CSF1</i> , <i>PLCG2</i> , <i>LILRA6</i>
感染性疾病 (infectious diseases)	疟疾 (malaria)	0.000277305	6.79E-03	ko05144	<i>ITGAL</i> , <i>COMP</i> , <i>CCL2</i> , <i>CD36</i> , <i>TLR2</i> , <i>ITGB2</i> , <i>CR1</i>

绘制(图 5)。图 5A 是 Brown 模块的网络图, 包括 58 个节点(node)和 201 条边(edge)。蓝色圆形符号包括差异基因 *TFEC*、*IGSF6*、*GPR34*、*NCF2*、*TYROBP*、*VSIG4*、*CYTH4*、*C1QC*、*LILRB5* 和 *FOLR2*, 红色矩形符号代表与其相连的 lncRNA, 其中连接度最高的 lncRNA 是 RP11-212I21.4、LINC00954、RP11-327J17.9。图 5B 是 Turquoise 模块的网络图, 包括 55 个节点(node)和 285 条边(edge)。蓝色圆形符号包括差异基因 *WDFY4*、*CD36*、*HAVCR2*、*CTSS*、*TIMD4*、*SPP1*、*MS4A4A*、*MPEG1*、*DOCK2* 和 *NCKAP1L*,

红色矩形符号代表与其相连的 lncRNA, 其中连接度最高的 lncRNA 是 CTD-2201G3.1、RP11-147L13.11、RP11-541N10.3。

Brown 模块以 *VSIG4* 和 *C1QC* 为核心基因, 根据表 3 可知, *VSIG4* 和 *C1QC* 是 KEGG 富集分析中补体及凝血级联反应(complement and coagulation cascades,  $P=3.70E-07$ )通路下的基因, 故本研究推测 *VSIG4* 和 *C1QC* 可能协同该模块其他基因及共表达 lncRNA 介导补体及凝血级联反应。已有的研究表明<sup>[17,18]</sup>, 生理状态下的补体成分激活对妊娠及胎儿



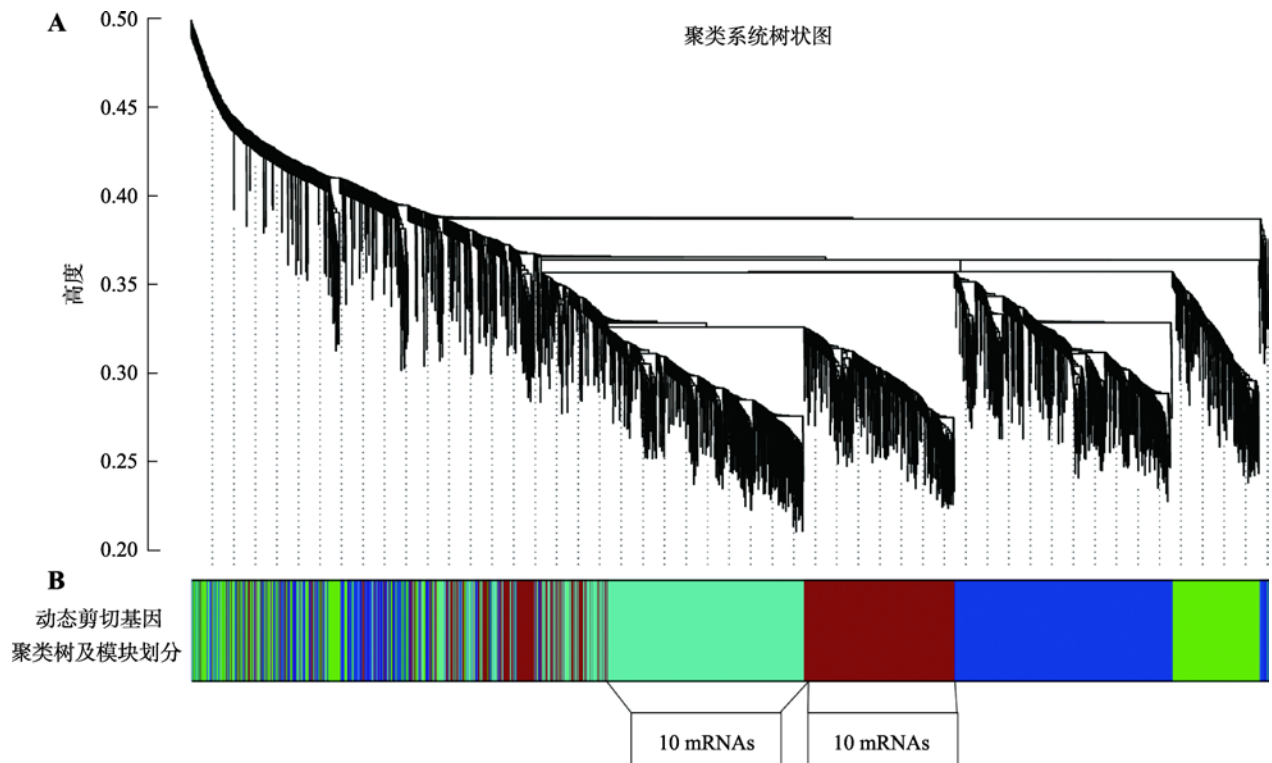


图 4 基因聚类系统树状图及模块划分

Fig. 4 Gene cluster dendrograms and module division

A: 基于拓扑重叠网络的聚类树; B: 动态剪切法得到的基因模块。每一个颜色代表一类表达程度相似的基因, 共 4 个模块, 分别为 Blue 模块(1236 个基因)、Brown 模块(1227 个基因)、Green 模块(642 个基因)和 Turquoise 模块(1292 个基因)。

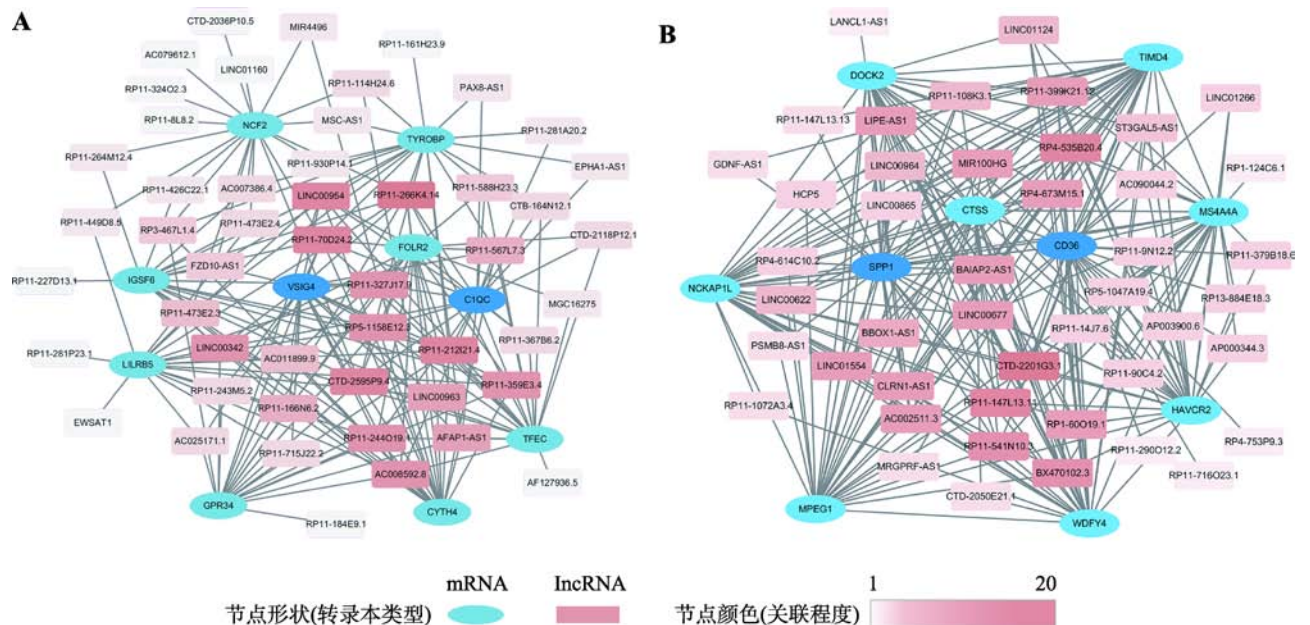


图 5 候选 mRNA 及相关 lncRNA 共表达网络

Fig. 5 Co-expression networks of candidate mRNAs and related lncRNAs

A: Brown 模块所富集到的差异 mRNA 及共表达 lncRNA; B: Turquoise 模块所富集到的差异 mRNA 及共表达 lncRNA。节点椭圆形为 mRNA, 长方形为 lncRNA。节点颜色越深表示关联程度越高。

发育是有利的, 但是过度激活可导致炎症损伤, 免疫紊乱。因此, 滋养层细胞中过度升高的 *VSIG4* 和 *CIQC* 可能协同该模块其他基因过度激活了补体系统, 可能导致植入部位免疫应激状态, 最后引起母胎免疫耐受失衡。同时, 凝血系统的激活容易引发凝血-抗凝机制或纤溶活性失衡, 引起微血栓形成, 使得绒毛或胎盘发育受限。

Turquoise 模块以 *CD36* 和 *SPP1* 为核心基因, 根据表 3 可知, *CD36* 和 *SPP1* 是 KEGG 富集分析中细胞外基质(cell adhesion molecules,  $P=3.78E-07$ )通路下的基因, 因此推测 *CD36* 和 *SPP1* 可能协同该模块其他基因及共表达 lncRNA 对胚胎停育时细胞外基质的分泌和降解有关。细胞外基质对于维持植入部位的正常细胞间连接及细胞-基质黏附非常重要, 同时也是调节免疫应答的场所, 过度的细胞外基质降解不利于绒毛的早期发育和免疫耐受的建立, 可能引起妊娠丢失。

### 3 讨论

目前研究发现, 滋养层细胞对胚胎发育早期有重要作用, 承担内分泌、迁移侵入及免疫调节等多种功能<sup>[19,20]</sup>, 且和宫内生长受限<sup>[21]</sup>、妊娠期高血压、子痫<sup>[22]</sup>和早产<sup>[23]</sup>等妊娠疾病密切相关。在胚胎发育早期, 滋养层细胞的结构或功能异常可能引起胚胎植入失败、胚胎发育停止, 可能导致流产的发生<sup>[24,25]</sup>。但目前胚胎停育原因复杂, 具体机制未明。通过研究滋养层细胞的异常变化可以帮助理解胚胎停育的发生机制, 找到可能对胚胎停育存在潜在影响的关键分子。因此, 本研究通过收集临床胚胎停育患者的绒毛组织, 寻找可能引起滋养层细胞功能改变的重要的基因, 共筛选到 436 个差异基因, 并通过 GO、KEGG 富集分析对差异基因进行功能注释及信号通路预测, 发现停育胚胎的绒毛组织中存在过度的补体反应和细胞外基质降解不足的情况, 可能引起母体对胎儿细胞的过度攻击或胚胎发育障碍, 从而导致胚胎停育。同时, 为了寻找可能对 mRNA 存在调控的 lncRNA, 本研究利用加权共表达网络进行分析, 发现 Green 和 Turquoise 模块富集到了较多的差异 mRNA, 并找到了和差异 mRNA 呈高共表达关系的 lncRNA。

通过差异表达分析, 本研究在对照组和胚胎停育组间共发现了 436 个差异基因, 胚胎停育组相较于正常对照显著上调的基因较多, 406 个 mRNA 显著上调, 32 个 mRNA 显著下调。基于此进行文献回顾后发现, Yang 等<sup>[26]</sup>通过对绒毛组织全转录组测序发现早期胚胎丢失(early embryonic arrest, EEA)相较于对照组也存在大量 mRNA 上调的情况。Pan 等<sup>[27]</sup>的研究显示通过对妊娠丢失患者绒毛的蛋白组学发现早期胚胎丢失相较于对照组存在大量蛋白上调的情况。由此可知, 本研究结果和以往类似研究结果趋势一致, 说明本研究结果具有一定可信度。其中 *FBNI*、*VSIG4*、*CD180*、*NCF2* 均被报道和胚胎停育、母胎界面免疫异常或滋养层细胞功能障碍有关<sup>[28]</sup>。本研究发现这些基因和以往研究相类似, 说明本研究结果较为可信。通过对差异 mRNA 进行 GO 富集分析发现, 在细胞组分条目下差异 mRNA 显著富集于细胞外基质、胶原连接等, 富集到该条目的基因有 *ADAMTSL2*、*CDON*、*COL12A1*、*ELN*、*LAMA1*、*MMP9* 等。在分子功能条目下, 差异 mRNA 显著富集于淋巴细胞激活、髓系细胞激活等, 说明当发生胚胎停育时, 绒毛组织中存在过度免疫反应, 可能和母胎免疫耐受失衡、启动流产发生有关, 富集到该条目的基因有 *TYROBP*、*PTPRC*、*NLRP3*、*FTL*、*CYBB* 等。

通过 KEGG 的信号通路分析, 本研究发现差异 mRNA 显著富集在免疫系统中的信号通路数目较多, 包括补体及凝血级联反应、血小板激活, FcγR 介导的吞噬作用等(表 3), 提示停育后的绒毛组织中存在母胎免疫耐受异常和过度免疫炎症反应。本研究筛选高置信度的前 20 个基因, 发现其中 2 个基因可能和绒毛组织中的免疫反应密切相关, 分别是 *VSIG4*、*CIQC*。其中 *VSIG4* ( $\log_2FC=3.791$ ,  $P=0.016$ )和 *CIQC* ( $\log_2FC=4.142$ ,  $P=0.011$ )在胚胎停育组中表达水平较对照组显著升高, 且富集到补体及凝血级联反应这一信号通路中。*VSIG4* 是免疫球蛋白结构域遏制蛋白 4, 和 B7 家族共抑制分子具有一定的同源性, 主要表达于肺、胎盘组织中。目前主要认为 *VSIG4* 可作为 T 细胞受体的负向调节靶点<sup>[29]</sup>, 同时在清除补体调理的病原或其他颗粒如自体成分<sup>[30]</sup>中发挥作用。*VSIG4* 被报道和免疫抑制密切相关, 在胚胎停育组织中异常升高提示可能介导母胎界面的免疫抑制紊

乱。*CIQC* 是 *C1Q* 的其中一个亚基,而 *C1Q* 是经典补体系统的重要组成部分,能够通过激活补体下游成分,诱导免疫复合物介导的杀伤作用并提高吞噬作用<sup>[31]</sup>。补体广泛分布于体内,在滋养层细胞表面有高水平的表达<sup>[32]</sup>。具有凝血酶的 *C5* 组分可直接激活补体系统,介导炎症损伤,影响胚胎及胎盘发育障碍,最终导致妊娠失败<sup>[33]</sup>。在动物实验中,补体过度活化可引起小鼠胎盘病理改变、炎症因子增加和血栓形成<sup>[34]</sup>。由此推测,绒毛细胞中差异基因 *VSIG4* 和 *CIQC* 可能介导了过度的补体激活,引起免疫耐受失衡,从而导致胚胎损伤,引起发育停止<sup>[35]</sup>。

同时, *CD36* ( $\log_2FC=3.026$ ,  $P=0.006$ )和 *SPPI* ( $\log_2FC=3.357$ ,  $P=0.002$ )作为本研究中置信度相对较高的基因,在 KEGG 分析中被富集到细胞外基质这一信号通路,提示可能滋养层细胞对子宫内膜细胞外基质降解出现异常,可能存在组织蛋白酶、金属蛋白酶分泌异常的情况<sup>[36]</sup>。*CD36* 是广泛表达于单核细胞、巨噬细胞等多种血细胞表面的一类跨膜糖蛋白受体<sup>[37]</sup>,可作为脂类受体、血小板受体及胶原受体调控多种生物学功能,如免疫调节<sup>[38]</sup>、炎症<sup>[39]</sup>、癌症<sup>[40]</sup>的发生与转移等。*SPPI* 又称骨桥蛋白,主要参与细胞黏附、细胞间基质附着或免疫调节等多种生物学过程,是母胎界面粘附和信号转导所需的重要分子<sup>[41]</sup>。正常的胚胎着床和黏附需要多种基质酶促使植入部位的子宫内膜疏松而富有粘性<sup>[42]</sup>。当胎儿的滋养层细胞分泌能力下降时,植入部位的细胞外基质可能因过于致密导致植入失败或胚胎发育障碍,从而导致胚胎停育或流产的发生<sup>[43]</sup>。在研究复发性流产时, *SPPI* 可作为评价子宫内膜容受性的指标,其水平的异常提示植入失败或胚胎发育障碍。

此外,本研究还发现差异 mRNA 集中于炎症反应和感染性疾病中,富集到了金黄色葡萄球菌感染、阿米巴病和肺结核等的信号通路中,推测原因可能是胚胎发育异常、停育后母胎免疫逐渐失衡,母体免疫系统开始将绒毛组织作为外来物进行强烈的免疫排斥,并启动免疫反应开始攻击胎儿,此时的绒毛组织中也存在大量炎症反应及免疫因子,这种胚胎停育后的攻击状态和感染性疾病类似。

同时,本研究通过 WGCNA 算法构建了共表达模块,寻找了和差异 mRNA 具有相关性的 lncRNA。在 Brown 模块的网络图中,连接度最高的是 RP11-

212I21.4、LINC00954 和 RP11-327J17.9;在 Turquoise 模块的网络图,连接度最高的是 CTD-2201G3.1、RP11-147L13.11 和 RP11-541N10.3。这 6 个 lncRNA 和核心基因具有相类似的表达模式,其机制可能是由于差异 mRNA 及 lncRNA 共同参与了某条通路或者受到同样的调控,有可能协同发挥同一生物学功能。目前,由于大部分 lncRNA 的功能未明确,通过 WGCNA 共表达分析探究和差异 mRNA 具有相关性的 lncRNA 能从一定程度上预测其功能,同时从 lncRNA 的角度对两组间出现的差异 mRNA 做出解释,例如 lncRNA 通过选择性剪切模式改变 mRNA 的亚型种类及表达水平或合成内源性 siRNA 进行转录干扰,从而影响 mRNA 的转录水平<sup>[44,45]</sup>。

本研究也存在些许不足。首先,本次研究样本量有限,仅纳入 14 例人工流产患者作为对照和 12 例胚胎停育患者。因此本研究的结果还需要进一步的大样本测序结果来验证。本研究对于筛选到的 lncRNA 的功能未进一步研究,希望在今后能开展相关实验,以深入分析 lncRNA 对差异基因的确切的调控机制。其次,本研究使用的转录组测序流程依次为:首先去除 rRNA,进行文库构建(mRNA 片段化、逆转录、双链合成、末端补齐、末尾加 A、加测序接头、PCR 富集)和 Illumina 测序,最后采用 FPKM 对转录本进行相对定量分析<sup>[46,47]</sup>。但由于文库 PCR 扩增偏好性,可能存在所有序列不会被同比例放大的情况,可能对结果带来一定程度的偏倚。

综上所述,本研究通过全转录测序及初步生物信息学分析,发现了数个可能对滋养层细胞的生物学功能存在潜在影响的重要差异基因及相关 lncRNA 网络。深入研究这些基因能从母胎免疫失衡和滋养层细胞植入不足等原因对胚胎停育出一定解释,并为不明原因流产提供新的思路 and 方向。

## 参考文献(References):

- [1] Staud F, Karahoda R. Trophoblast: The central unit of fetal growth, protection and programming. *Int J Biochem Cell Biol*, 2018, 105: 35–40. [DOI]
- [2] Moser G, Windsperger K, Pollheimer J, de Sousa Lopes SC, Huppertz B. Human trophoblast invasion: new and unexpected routes and functions. *Histochem Cell Biol*, 2018, 150(4): 361–370. [DOI]



- [3] Baines KJ, Renaud SJ. Transcription factors that regulate trophoblast development and function. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2017, 145: 39–88. [DOI]
- [4] Harris LK, Jones CJ, Aplin JD. Adhesion molecules in human trophoblast - a review. II. extravillous trophoblast. *Placenta*, 2009, 30(4): 299–304. [DOI]
- [5] Chung TW, Park MJ, Kim HS, Choi HJ, Ha KT. Integrin  $\alpha V\beta 3$  and  $\alpha V\beta 5$  are required for leukemia inhibitory factor-mediated the adhesion of trophoblast cells to the endometrial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 469(4): 936–940. [DOI]
- [6] Huppertz B. Traditional and new routes of trophoblast invasion and their implications for pregnancy diseases. *Int J Mol Sci*, 2019, 21(1): 289. [DOI]
- [7] Malik A, Pal R, Gupta SK. Interdependence of JAK-STAT and MAPK signaling pathways during EGF-mediated HTR-8/SVneo cell invasion. *PLoS One*, 2017, 12(5): e0178269. [DOI]
- [8] Huang ZY, Li SW, Fan W, Ma QH. Transforming growth factor  $\beta 1$  promotes invasion of human JEG-3 trophoblast cells via TGF- $\beta$ /Smad3 signaling pathway. *Oncotarget*, 2017, 8(20): 33560–33570. [DOI]
- [9] Chitu V, Stanley ER. Regulation of embryonic and postnatal development by the CSF-1 receptor. *Curr Top Dev Biol*, 2017, 123: 229–275. [DOI]
- [10] Ding JL, Yin TL, Yan NN, Cheng YX, Yang J. FasL on decidual macrophages mediates trophoblast apoptosis: A potential cause of recurrent miscarriage. *Int J Mol Med*, 2019, 43(6): 2376–2386. [DOI]
- [11] Shaik R, Ramakrishna W. Genes and Co-Expression modules common to drought and bacterial stress responses in arabidopsis and rice. *PLoS One*, 2013, 8(10): e77261. [DOI]
- [12] Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 2010, 26(1): 139–140. [DOI]
- [13] Takeshita A, Kusakabe KT, Hiyama M, Kuniyoshi N, Kondo T, Kano K, Kiso Y, Okada T. Dynamics and reproductive effects of complement factors in the spontaneous abortion model of CBA/J $\times$ DBA/2 mice. *Immunobiology*, 2014, 219(5): 385–391. [DOI]
- [14] Huang J, Qin H, Yang YH, Chen XY, Zhang JM, Laird S, Wang CC, Chan TF, Li TC. A comparison of transcriptomic profiles in endometrium during window of implantation between women with unexplained recurrent implantation failure and recurrent miscarriage. *Reproduction*, 2017, 153(6): 749–758. [DOI]
- [15] Yurdakan G, Ekem TE, Bahadır B, Gun BD, Kuzey GM, Ozdamar SO. Expression of adhesion molecules in first trimester spontaneous abortions and their role in abortion pathogenesis. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 2008, 87(7): 775–782. [DOI]
- [16] Soylu Karapınar O, Benk Şilfeler D, Dolapçioğlu K, Keskin Kurt R, Beyazıt A. The effect of molar pregnancies on platelet parameters. *J Obstet Gynaecol*, 2016, 36(7): 912–915. [DOI]
- [17] Girardi G, Salmon JB. The role of complement in pregnancy and fetal loss. *Autoimmunity*, 2003, 36(1): 19–26. [DOI]
- [18] Kouser L, Madhukaran SP, Shastri A, Saraon A, Ferluga J, Al-Mozaini M, Kishore U. Emerging and novel functions of complement protein C1q. *Front Immunol*, 2015, 6: 317. [DOI]
- [19] Liu FL, Zhou J, Zhang W, Wang H. Epigenetic regulation and related diseases during placental development. *Hereditas (Beijing)*, 2017, 39(4): 263–275. 刘福林, 周瑾, 张蔚, 汪晖. 胎盘发育过程中的表观遗传学改变及其相关疾病. *遗传*, 2017, 39(4): 263–275. [DOI]
- [20] Lai XM, Wang YX. Trophoblastic invasion and its regulatory factors. *Chin J Birth Heal Hered*, 2007, 15(3): 1–3. 赖雪梅, 王应雄. 滋养层侵袭力及其调控因素. *中国优生与遗传杂志*, 2007, 15(3): 1–3. [DOI]
- [21] Burton GJ, Jauniaux E. Pathophysiology of placental-derived fetal growth restriction. *Am J Obstet Gynecol*, 2018, 218(2S): S745–S761. [DOI]
- [22] James-Allan LB, Whitley GS, Leslie K, Wallace A, Cartwright JE. Decidual cell regulation of trophoblast is altered in pregnancies at risk of pre-eclampsia. *J Mol Endocrinol*, 2018. [DOI]
- [23] Zadrozna M, Nowak B, Marcinek A, Duc J. Villous trophoblast cell turnover in placentas from preterm pregnancy and pregnancy complicated by intrauterine growth restriction (IUGR). *Folia Biol (Krakow)*, 2009, 58(1–2): 79–83. [DOI]
- [24] Check JH, Aly J, Chang E. Improving the chance of successful implantation-Part I-Embryo attachment to the endometrium and adequate trophoblast invasion. *Clin Exp Obstet Gynecol*, 2016, 43(6): 787–791. [DOI]
- [25] Burton GJ, Jauniaux E. The cytotrophoblastic shell and complications of pregnancy. *Placenta*, 2017, 60: 134–139. [DOI]
- [26] Yang WM, Lu ZY, Zhi ZF, Liu LL, Deng LJ, Jiang XL, Pang LH. High-throughput transcriptome-Seq and small

- RNA-Seq reveal novel functional genes and microRNAs for early embryonic arrest in humans. *Gene*, 2019, 697: 19–25. [DOI]
- [27] Pan HT, Ding HG, Fang M, Yu B, Cheng Y, Tan YJ, Fu QQ, Lu BB, Cai HG, Jin X, Xia XQ, Zhang T. Proteomics and bioinformatics analysis of altered protein expression in the placental villous tissue from early recurrent miscarriage patients. *Placenta*, 2018, 61: 1–10. [DOI]
- [28] Atanasova MA, Konova EI, Aleksovska TA, Todorova KN, Georgieva MN, Lukanov TH. Anti-fibrillin-1 autoantibodies in normal pregnancy and recurrent pregnancy loss. *Autoimmun Rev*, 2011, 10(3): 131–136. [DOI]
- [29] Vogt L, Schmitz N, Kurrer MO, Bauer M, Hinton HI, Behnke S, Gatto D, Sebbel P, Beerli RR, Sonderegger I, Kopf M, Saudan P, Bachmann MF. VSIG4, a B7 family-related protein, is a negative regulator of T cell activation. *J Clin Invest*, 2006, 116(10): 2817–2826. [DOI]
- [30] Helmy KY, Katschke KJ, Gorgani NN, Kljavin NM, Elliott JM, Diehl L, Scales SJ, Ghilardi N, van Lookeren Campagne M. CR1g: A macrophage complement receptor required for phagocytosis of circulating pathogens. *Cell*, 2006, 124(5): 915–927. [DOI]
- [31] Kim DD, Miwa T, Kimura Y, Schwendener RA, van Lookeren Campagne M, Song WC. Deficiency of decay-accelerating factor and complement receptor 1-related gene/protein y on murine platelets leads to complement-dependent clearance by the macrophage phagocytic receptor CR1g. *Blood*, 2008, 112(4): 1109–1119. [DOI]
- [32] Mascarell L, Airouche S, Berjont N, Gary C, Gueguen C, Fourcad G, Bellier B, Togbe D, Ryffel B, Klatzmann D, Baron-Bodo V, Moingeon P. The regulatory dendritic cell marker C1q is a potent inhibitor of allergic inflammation. *Mucosal Immunol*, 2016, 10(3): 695–704. [DOI]
- [33] Girardi G. Complement inhibition keeps mothers calm and avoids fetal rejection. *Immunol Invest*, 2008, 37(5): 645–659. [DOI]
- [34] Girardi G, Prohászka Z, Bulla R, Tedesco F, Scherjon S. Complement activation in animal and human pregnancies as a model for immunological recognition. *Mol Immunol*, 2011, 48(14): 1621–1630. [DOI]
- [35] Teirilä L, Heikkinen-Eloranta J, Kotimaa J, Meri S, Lokki AI. Regulation of the complement system and immunological tolerance in pregnancy. *Semin Immunol*, 2019, 45: 101337. [DOI]
- [36] Sun J, Jin L. Trophinin, tastin, bystin complex binds to embryo initiation. *Chin J Birth Heal Hered*, 2005, 13(5): 113–114.  
孙虹, 靳镭. Trophinin, tastin, bystin 复合体与胚胎起始黏附. *中国优生与遗传杂志*, 2005, 13(5): 113–114. [DOI]
- [37] Oz HS, Ebersole JL, de Villiers WJS. The macrophage pattern recognition scavenger receptors SR-A and CD36 protect against microbial induced pregnancy loss. *Inflamm Res*, 2011, 60(1): 93–97. [DOI]
- [38] Silverstein RL, Febbraio M. CD36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior. *Sci Signal*, 2009, 2(72): re3. [DOI]
- [39] Abumrad NA, Goldberg IJ. CD36 actions in the heart: Lipids, calcium, inflammation, repair and more? *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1861(10): 1442–1449. [DOI]
- [40] Wang JC, Li YS. CD36 tango in cancer: signaling pathways and functions. *Theranostics*, 2019, 9(17): 4893–4908. [DOI]
- [41] Johnson GA, Burghardt RC, Bazer FW, Spencer TE. Osteopontin: Roles in implantation and placentation. *Biol Reprod*, 2003, 69(5): 1458–1471. [DOI]
- [42] Yu QB, Wang YX. Cell adhesion molecules to the embryo implantatio. *Chin J Birth Heal Hered*, 2005, 13(1): 6–8.  
余秋波, 王应雄. 细胞粘附分子与胚胎着床. *中国优生与遗传杂志*, 2005, 13(1): 6–8. [DOI]
- [43] Nardo LG, Nikas G, Makrigiannakis A. Molecules in blastocyst implantation. Role of matrix metalloproteinases, cytokines and growth factors. *J Reprod Med*, 2003, 48(3): 137–147. [DOI]
- [44] Gonzalez I, Munita R, Agirre E, Dittmer TA, Gysling K, Misteli T, Luco RF. A lncRNA regulates alternative splicing via establishment of a splicing-specific chromatin signature. *Nat Struct Mol Biol*, 2015, 22(5): 370–376. [DOI]
- [45] Lieberman J. Tapping the RNA world for therapeutics. *Nat Struct Mol Biol*, 2018, 25(5): 357–364. [DOI]
- [46] Pérez-Palacios R, Fauque P, Teissandier A, Bourc'his D. Deciphering the early mouse embryo transcriptome by Low-Input RNA-Seq. *Methods Mol Biol*, 2021, 2214: 189–205. [DOI]
- [47] Svensson V, Natarajan KN, Ly LH, Miragaia RJ, Labalette C, Macaulay IC, Cvejic A, Teichmann SA. Power analysis of single-cell RNA-sequencing experiments. *Nat Methods*, 2017, 14(4): 381–387. [DOI]