

. 实验研究 .

维吾尔族烟雾病病人血清 miRNA 的异常表达及其基因分析

李海蒙 周广平 水 政 俞 辉 孙育海 洪 波

【摘要】目的 探讨我国新疆地区维吾尔族(简称维族)烟雾病病人血清异常表达的 miRNA。**方法** 收集 2017 年 2 月至 2018 年 8 月新疆莎车县人民医院救治的 8 例维族烟雾病与 8 例维族健康者(对照组)的血样,运用高通量全基因芯片技术检测血清 miRNA,筛选差异表达水平大于 1.5 倍的 miRNA,然后利用 targetscan 软件进行靶基因的预测和分析。**结果** 发现 54 个差异表达的 miRNA,选择表达水平变化倍数 R 在 0.67~1.5 的差异表达 miRNA 共 4 个,其中显著上调 3 个(miR-188-5p、miR-4284 及 miR-5100),显著下调 1 个(miR-6277-3p)。靶基因生物学分析结果显示维吾尔族烟雾病可能与某类锌指蛋白有关。**结论** 维族烟雾病病人血清 miRNA 有异常表达,通过生物信息学分析,其致病基因可能某类锌指蛋白有关。

【关键词】 烟雾病;miRNA;维吾尔族;基因表达
【文章编号】 1009-153X(2021)01-0032-03 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 743; Q 786

Abnormal expression of serum miRNA in Uyghur patients with moyamoya disease

LI Hai-meng^{1,2}, ZHOU Guang-ping¹, SHUI Zheng¹, YU Hui³, SUN Yu-hai³, HONG Bo². 1. Department of Neurosurgery, Shache People's Hospital, Xinjiang Uygur Autonomous Region, Shache 844710, China; 2. Department of Neurosurgery, Changhai Hospital, Naval Medical University, PLA, Shanghai 200433, China; 3. Department of Neurosurgery, Zhoupu Hospital, Pudong New District, Shanghai 201318, China

【Abstract】 Objective To analyze the abnormal expression of serum miRNA in Uyghur patients with moyamoya disease in Xinjiang Uygur Autonomous Region, China. **Methods** The serum miRNAs of 8 Uyghur patients with moyamoya disease who were treated in Shache People's Hospital from February 2017 to August 2018 and of 8 health Uyghur people by high-throughput whole-genome technology. The miRNAs with differential expression levels greater than 1.5 times were screened for target gene prediction and analysis using targetscan software. **Results** A total of 54 differentially expressed miRNAs was selected. A change in expression level R between 0.67 and 1.5 was found in 4 differentially expressed miRNAs, of which 3 miRNAs were significantly up-regulated (miR-188-5p, miR-4284 and miR-5100), and 1 was significantly down-regulated (miR-6277-3p). The biological analysis of target genes showed that Uyghur patients with moyamoya disease may be related to a certain type of zinc finger protein. **Conclusions** There are abnormal expressions of miRNA in the serum of Uyghur patients with moyamoya disease. The bioinformatics analysis results suggest that the pathogenic genes may be related to a certain type of zinc finger protein.

【Key words】 Moyamoya disease; MicroRNA; Uyghur patients; Xinjiang Uygur Autonomous Region

烟雾病是一种原因不明、以颅内大动脉闭塞伴颅底异常血管网生成为特点的疾病^[1]。烟雾病的发生是多种因素共同作用的结果,具有易感基因的人群,在感染、炎症在内的多种因素作用下,导致颅内大动脉内膜增厚伴纤维增生,最终导致相关血管狭窄甚至闭塞,并促使代偿血管异常扩张、增生,其中相关血清 miRNA 的表达在其发生过程中起重要的

作用。由于烟雾病的发病率具有明显的地区和种族差异,提示不同种族的致病基因和发病机制存在多样性^[2]。目前,关于烟雾病的研究对象多集中在东亚人种^[3],而维吾尔族(简称维族)人群烟雾病的基因研究仍处于空白阶段。本文以维族烟雾病病人为研究对象,通过 miRNA 芯片技术筛选烟血清异常表达的 miRNA,随后通过生物信息学方法分析跟烟雾病相关的基因,为维族烟雾病的诊治提供参考。

1 材料与方法

1.1 标本来源 收集 2017 年 2 月至 2018 年 8 月新疆莎车县人民医院救治的 8 例维族烟雾病与 8 例维族健康者(对照组)的血样。烟雾病均由脑血管造影证

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2021.01.011
作者单位:844710 新疆,莎车县人民医院神经外科(李海蒙、周广平、水 政);200433 上海,海军军医大学附属长海医院神经外科(李海蒙、洪 波);201318,上海浦东新区周浦医院神经外科(俞 辉、孙育海)

实且为双侧颈内动脉病变,排除文献已证明可以伴有烟雾病综合征的疾病(中枢神经系统感染、结缔组织病等)。两组性别、年龄及白细胞计数、血沉、血胆固醇水平等均无统计学差异($P>0.05$,表 1),但烟雾病组血糖水平明显高于对照组($P<0.05$,表 1)。8 例烟雾病临床表现见表 2。本研究获得新疆喀什地区莎车县人民医院伦理委员会通过。

1.2 检测方法

1.2.1 采血 采集外周静脉全血约 5 ml,30 min 内以 4 000 转/min 离心 15 min,缓慢吸取上层血浆立即放置于-80 ℃冰箱保存后待测。

1.2.2 建立血清池 完成所有血浆收集后,每个标本取 150 μl 血浆充分混匀,形成 1.2 ml 血清池。

1.2.3 提取血清总 RNA 从血清池中取 500 μl 样本,加入 500 μl TRIzol(美国 Invitrogen 公司)充分旋涡震荡后室温静置 5 min,使其充分裂解;再加入 200 μl 异丙醇,充分混匀,4 ℃、12 000 转/min 离心 15 min 后,吸取上清液 1 ml;加入 500 μl 氯仿,摇匀,旋涡震荡 30 s,室温静置 3 min,然后 4 ℃、12 000 转/min 离心 15 min,吸取上层清液,加 0.75 体积的异丙醇,摇匀后室温静置 10 min,4 ℃、12 000 转/min 离心 10 min;收集含 RNA 的沉淀,用 75%乙醇重悬沉淀,4 ℃、8 000 转/min 离心 5 min,收集含 RNA 的沉淀,用 300 μl DEPC 水(美国 Sigma 公司)重悬沉淀待测。

1.2.4 测定 RNA 浓度 取 1 μl 含 RNA 的提取液,加入 99 μl 的 DEPC 水稀释。采用 SMA3000 光度计检测,

选择“RNA”,将 RNA 稀释倍数设定为 100。使用双蒸水反复清洗比色杯 3 次,加入 100 μl 的 DEPC 水调零。加入稀释好的 RNA 提取液,开始检测,分别测量 A280 nm 和 A260 nm 的光密度(optic density, OD)值,A260/A280 值在 1.8~2.0,以保提取 RNA 的纯度。

1.2.5 miRNA 测序及筛选 采用 Exiqon miRCURY LNA microRNA 芯片(丹麦 Exiqon 公司)高通量技术检测 miRNA 表达谱。应用小芯片构建单分子阵列,桥式 PCR 扩增检测信号。PCR 每个循环中将四种荧光标记的 dNTP 和 DNA 聚合酶添加到单分子阵列中,激光激发与 dNTP 结合的标记荧光信号,并使用计算机化分析系统将光信号转换为测序碱基信息。通过标准化比较分析确定 miRNA 的最终读数。

1.3 生物信息学分析 使用 GenePix pro V6.0 软件进行相关数据分析,通过每个探针点获得初始荧光强度值。标准化比较芯片之间的数据,重复芯片之间的数据分析,最终筛选出差异表达水平大于 1.5 或小于 0.67 倍的 miRNA($P<0.05$)。将筛选出的差异表达的 miRNA 利用 targetscan 软件进行靶基因的预测和分析。得出的靶基因通过 david 网站进行基因功能诠释和聚类分析、功能富集分析。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 19.0 软件处理,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 t 检验;计数资料采用 χ^2 检验;检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 差异表达 miRNA 的筛选 根据 miRNA 表达芯片的分析数据,初步结果发现 54 个 miRNA 位点存在差异表达,其中上调 28 个,下调 26 个。结合相关文献报道,我们选择表达水平变化倍数 R 在 0.67~1.5 筛选差异表达的 miRNA,筛选出差异明显的 4 个 miRNAs,其中显著上调 3 个,分别是 miR-188-5p、miR-4284 及 miR-5100;显著下调 1 个,为 miR-6277-3p。火山图显示明显差异表达的 miRNA(图 1)。

2.2 生物信息学分析 将上述差异表达的 miRNA 分别在 targetscan 网站上寻找靶基因,目标积分 80 以上的靶基因及功能。将靶基因做交集分析后,得出相互交集的靶基因有 7 个,分别为 MEX3A、FBXL18、FZD2、AAK1、KAT7、CACLR、PLA2R1。根据交集和靶标评分靠前的原则,锁定 25 个靶基因,经 David 软件 GO 分析出前 10 个靶基因(表 3)。这些基因主要参与细胞和酶的代谢、活化、转运及感染和炎症反应,具体包括 X 染色体的激活、锌指蛋白、锌离子的结合、细胞内吞、蛋白代谢等。参考文献后发

表 1 两组基线资料比较

| 基线资料 | 烟雾病组 | 对照组 | P 值 |
|--------------------------|----------|----------|------|
| 男性(例) | 3 | 4 | 0.61 |
| 年龄(岁) | 32.8±9.6 | 35.2±7.0 | 0.56 |
| 白细胞计数($\times 10^9/L$) | 6.4±0.9 | 6.4±1.0 | 0.76 |
| 血沉(mm/h) | 6.9±3.7 | 6.6±2.3 | 1.00 |
| 血糖(mmol/L) | 6.3±1.1 | 5.0±1.2 | 0.04 |
| 胆固醇(mmol/L) | 4.4±0.7 | 4.9±0.6 | 0.19 |

表 2 8 例烟雾病临床表现

| 病例 | 分型 | 临床表现 | Suzuki 分级 |
|------|-----|-------------|-----------|
| 病例 1 | 出血型 | 脑室内出血 | 3 级 |
| 病例 2 | 缺血型 | 短暂性脑缺血发作 | 4 级 |
| 病例 3 | 缺血型 | 短暂性脑缺血发作、癫痫 | 3 级 |
| 病例 4 | 缺血型 | 局灶性梗死 | 4 级 |
| 病例 5 | 缺血型 | 无症状 | 3 级 |
| 病例 6 | 出血型 | 蛛网膜下腔出血 | 4 级 |
| 病例 7 | 缺血型 | 短暂性脑缺血发作 | 2 级 |
| 病例 8 | 出血型 | 丘脑、脑室内出血 | 3 级 |

现,某些锌指蛋白和血管增生及新生血管形成有关,推测维吾尔族烟雾病发病可能和锌指蛋白有一定的相关性。

3 讨论

本文结果发现的 miR-4284 是近年来新发现的 miRNA,其表达水平上调可能预示颈内动脉狭窄。miR-4284 在下肢动脉硬化闭塞症病人血浆和血管组织中均明显上调,在缺氧缺血诱导的主动脉平滑肌细胞中明显下调,缺氧缺血诱导的脐静脉内皮细胞中明显上调^[4]。

本文结果显示维族烟雾病病人 miR-6722-3p 表

表 3 生物信息学分析筛选出的主要靶基因名称及代码

| 基因编号 | 基因名称 |
|--------|--|
| 3358 | 5- hydroxytryptamine receptor 2C (HTR2C) |
| 22848 | AP2 associated kinase 1(AAK1) |
| 11144 | DNA meiotic recombinase 1(DMC1) |
| 80028 | F-box and leucine rich repeat protein 18 (FBXL18) |
| 94103 | ORMDL sphingolipid biosynthesis regulator 3(ORMDL3) |
| 9185 | RALBP1 associated Eps domain containing 2(REPS2) |
| 6595 | SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 2(SMARCA2) |
| 286128 | ZFP41 zinc finger protein(ZFP41) |
| 80829 | ZFP91 zinc finger protein(ZFP91) |
| 51582 | antizyme inhibitor 1(AZIN1) |

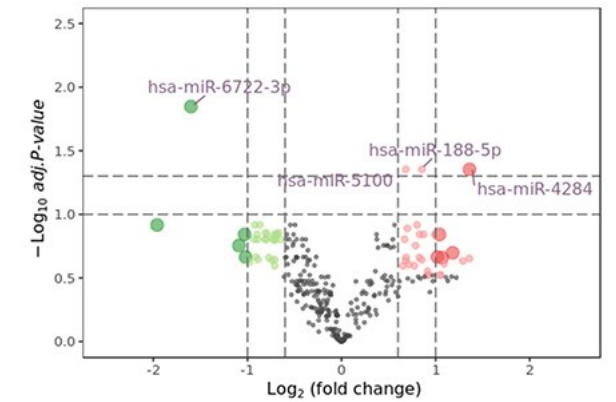


图 1 8 例烟雾病差异表达 miRNA 的火山图
有颜色的点代表表达显著的 miRNA,红点代表上调,绿点代表下调;纵轴为 $-\log_{10}(P)$,横轴为 $-\log_2(\text{Fold Change})$;在 1.3 处水平虚线表示 $P=0.05$, 竖直虚线由左至右分别表示倍数改变为 0.5、0.67、1.5 及 2

达下调。有研究报道烟雾病病人血浆 hsa-mir-6722-3p 和 hsa-mir-328-3p 的差异表达^[5],基因分析和传导通路分析显示在烟雾病发病过程中,可通过 miRNA-基因表达网络调节内皮细胞生物学功能。

锌指蛋白含有短的我自折叠“指状”结构,并通过与 Zn^{2+} 结合而稳定。本文筛选出的靶基因中包含 2 种锌指基因,为 ZFP91 和 ZFP41,其中 ZFP91 更值得关注,含有 5 个锌指结构域,同时具有转录因子特征性结构基序^[6]。Xu 等^[7]报道 ZFP91 是一种 E3 泛素连接酶,负责 Lys 185 的 hnRNP 的泛素化以及蛋白酶体降解。此外,ZFP91 可以促进 pro-IL-1 β 的产生和 IL-1P 的分泌^[8]。我们推测,某种锌指基因(如 ZFP91 等)可能是维族烟雾病发病的靶基因,通过激活或抑制 miRNA(如 miR-188-5p 等),在烟雾病的炎症反应过程或血管内皮增生过程中,起着某种促进作用,但具体作用机制需进一步深入研究。

总之,遗传因素和环境因素可能通过复杂的机制在维族烟雾病发病中发挥重要作用。希望未来能制造出整合这些因素的烟雾病动物模型,进一步证实。此外,烟雾病相关基因 miRNA 等在循环血液中的变化仅特异性地累及颈内动脉系统,而全身其他血管却不受累,这种现象目前还无法完全解释。

【参考文献】

[1] Fukui M. Guidelines for the diagnosis and treatment of spontaneous occlusion of the circle of Willis (Moyamoya disease) [J]. Clin Neurol Neurosurg, 1997, 99: 238-240.

[2] Kuriyama S, Kusaka Y, Fujimura M, et al. Prevalence and clinic epidemiological features of moyamoya disease in Japan: findings from a nationwide epidemiological survey [J]. Stroke, 2008, 39(1): 42-47.

[3] Li H, Zhang ZS, Liu W, et al. Association of a functional polymorphism in the MMP-3 gene with Moyamoya Disease in the Chinese Han population [J]. Cerebrovasc Dis, 2010, 30(6): 618-625.

[4] Ikushima H, Miyazono K. TGFbeta signalling: a complex web in cancer progression [J]. Nat Rev Cancer, 2010, 10: 415-424.

[5] Paschke L, Jopek K, Szyszka M, et al. ZFP91: A Noncanonical NF-kappaB signaling pathway regulator with oncogenic properties is overexpressed in prostate cancer [J]. Biomed Res Int, 2016, 2016: 6963582.