

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.001618

唐氏综合征患儿外周血全基因组 miRNA 表达谱
及染色体分布研究李武县¹, 陈红³, 罗婷婷¹, 李秋红¹, 徐勇², 戴勇²

(1. 重庆市妇幼保健院检验科, 重庆 400013; 2. 暨南大学第二临床医学院(深圳市人民医院)临床医学研究中心, 深圳 518020; 3. 重庆市第七人民医院检验科, 重庆 400054)

【摘要】目的:分析唐氏综合征(Down syndrome, DS)患儿与健康儿童外周血单个核细胞 miRNA 表达谱及其染色体分布特征。**方法:**采用 Illumina 测序技术分别对 6 例 DS 患儿(DS 组)和 6 例健康儿童(对照组)外周血单个核细胞全基因组 miRNA 表达谱进行差异表达和染色体分布特征分析,并用 Stem-loop qRT-PCR 对差异表达 miRNA 的测序结果进行验证。**结果:**两样本共表达 911 个 miRNA,编码于 738 个 miRNA 基因,在两样本中的染色体分布趋于一致,但表达丰度染色体分布却不同,DS 组主要分布于 7、13 和 21 号染色体,而对照组主要分布于 7 和 13 号染色体。此外,911 个 miRNA 中有 114 个 miRNA 在两样本中差异表达显著(差异倍数 ≥ 2 且 $P \leq 0.001$),其中 DS 组有 103 种高表达,包括 21 号染色体编码的 5 个 miRNA(miR-99a、let-7c、miR-125b、miR-155 和 miR-802);11 种低表达。**结论:**DS 患儿外周血单个核细胞具有其特定的 miRNA 表达谱和染色体分布特征,两样本表达丰度差异分布染色体编码 miRNA 的差异表达可能与 DS 患者免疫缺陷等相关临床症状的形成有关。

【关键词】微小 RNA;唐氏综合征;外周血单个核细胞;Illumina 深度测序**【中图分类号】**R392.2;R394.4**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2016-11-17Global miRNA expression profiles and chromosome distribution on
peripheral blood in Down Syndrome childrenLi Wuxian¹, Chen Hong³, Luo Tingting¹, Li QiuHong¹, Xu Yong², Dai Yong²

(1. Department of Clinical Laboratory, Chongqing Health Center for Women and Children; 2. Clinical Medical Research Center, the Second Clinical Medical College of Jinan University(Shenzhen People's Hospital); 3. Department of Clinical Laboratory, The Seventh People's Hospital of Chongqing)

【Abstract】Objective:To investigate the global miRNA expression profiles and chromosome distribution characteristics in peripheral blood mononuclear cells(PBMC) of children with Down syndrome(DS) and without DS. **Methods:**Illumina deep sequencing technology was used to analyze the global miRNA expression profiles and chromosome distribution in 6 pairs of PBMC samples from DS children(DS group) and non-DS children(control group). Stem-loop qRT-PCR was employed to verify the results of Illumina deep sequencing technology. **Results:**There were 911 miRNAs expressed that were encoded by 738 miRNA genes, which had the same chromosome distribution in both groups. However, the expressive abundance of chromosome distribution was different; DS group was mainly scattered in 7, 13 and 21 chromosomes, while the control group was majorly scattered in 7 and 13 chromosomes. Furthermore, 114 of 911 miRNAs were significantly differentially expressed in both groups(difference multiple ≥ 2 , $P < 0.001$). In the DS group, 11 miRNAs were low expression and 103 miRNAs were high expression, including 5 miRNAs encoded by 21 chromosome(miR-99a, let-7c, miR-125b, miR-155, miR-802). **Conclusion:** PBMCs of DS children have specific miRNA expression profiles and chromosome distribution characteristics. Differences of expressive abundance of miRNAs encoded by the chromosome may be associated with clinical symptoms in DS patients, such as immune deficiency.

【Key words】microRNA; Down syndrome; peripheral blood mononuclear cells; illumina deep sequencing**作者介绍:**李武县, Email: liwuxiancqmu@aliyun.com,

研究方向:遗传与分子生物化学方向。

通信作者:戴勇, Email: daiyong22@aliyun.com。**基金项目:**广东省科技计划资助项目(编号:2012B032000008);深圳市
科技创新计划资助项目(编号:CXZZ20130321090846345)。**优先出版:**http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180408.1534.078.html
(2018-04-08)

唐氏综合征(Down syndrome, DS)即 21-三体综合征,是人类常染色体非整倍体疾病中最常见的可存活的一种 3 染色体性疾病,常伴有智力低下、特殊面容、白血病、自身免疫性疾病、细胞早衰等 80 多种临床特征^[1]。与健康儿童相比,DS 患儿易感染、易患白血病和自身免疫性疾病^[1]。目前对 DS 患儿相关临床症状的形成机制主要有两种假说:“基因剂量效应”和“发育不平衡学说”,但 21 号 3 染色体如何导致 DS 患者异常发育的机制仍未达成共识^[2]。微小 RNA (microRNA, miRNA)是一种在转录后水平可负向调控靶基因表达的重要调控因子,其编码基因可位于蛋白质编码基因的内含子区域,也可位于非蛋白编码基因的内含子或外显子区域,在基因的表达调控和基因间的相互作用过程中具有重要作用,已被证明与多种疾病的发生发展有关^[3]。因此,鉴别 DS 患者全基因组差异表达 miRNA 和临床症状相关 miRNA 基因在染色体上的分布对理解其在基因间相互作用以及相关临床症状形成的潜在分子机制具有重要作用。

1 材料和方法

1.1 研究对象

本实验用标本由暨南大学第二临床医学院临床医学研究中心遗传室提供,其中标准核型 DS 儿童和完全配对健康儿童外周血标本各 6 例(2 男 4 女),年龄在 5~12 岁之间,平均(7.5 ± 2.4)岁,分别设为 DS 组和对照组。该实验经暨南大学第二临床医学院伦理委员会批准,且征得所有监护人知情同意。

1.2 方法

1.2.1 样本的处理 根据单个核细胞提取步骤,运用淋巴细胞分离液(Invitrogen)提取所得外周血标本的单个核细胞,并将其溶于 1 mL TRIzol 试剂(Invitrogen)充分混匀,分成两份置于冻存管中,存于 -80°C 备用,1 份用于 Illumina 测序分析,1 份用于 PCR 验证。

1.2.2 总 RNA 提取 根据 TRIzol 试剂盒(Invitrogen)说明书提取总 RNA。运用 Agilent 2000 Bioanalyzer 分析仪鉴定其质量合格后($\text{RIN} \geq 8.0$ 和 $28\text{S}/18\text{S} > 1.5$),可用于 small RNA 建库测序分析。

1.2.3 small RNA 文库构建和 Illumina 测序 分别等量混合 DS 组和对照着儿童外周血单个核细胞 RNA(总量 $\geq 10 \mu\text{g}$),构建 Small RNA 文库。然后运用 Illumina HiSeq™ 2000 测序仪进行测序分析。文库的构建和测序均在深圳华大基因研究院的协助下完成。

1.2.4 small RNA 数据处理和信息分析 将 Illumina HiSeq™ 2000 测序所得序列行去接头、去污染、去冗余、去低质量等处理,获得 18~30 nt 长度的高质量干净序列;再用 SOAP2.0 软件^[4]将所得干净序列与人基因组序列(<http://genome.ucsc.edu>)进行比对分析(碱基错配 ≤ 2),然后再将匹配序列按照 GenBank 数据库>Rfam10.0 数据库>miRBase17.0 数据库>repeat 序列>exon 序列>intron 序列的优先级顺序进行分类注释。

1.2.5 miRNA 编码基因和表达丰度的染色体分布 根据 miRBase21.0(<http://www.mirbase.org>)人类 miRNA 注释基因,对 DS 组和对照组表达 miRNA 作如下处理分析:①归一化处理各表达 miRNA,使其表达水平在同一量级[公式:归一化表达量(transcripts parts per million, TPM)=(miRNA 表达量/样品总表达量) $\times 10^6$],对归一化表达量 $> 10\text{TPM}$ 的 miRNA 进行编码基因表达丰度的染色体分布分析;②剔除多位点 miRNA 编码基因;③对单染色体多位点 miRNA 编码基因,分析 miRNA 表达丰度时只计算 1 次;④若 miRNA 基因同时表达 miRNA -5p 和 miRNA -3p(分别位于 miRNA 基因的 5' 和 3' 端),分析表达丰度时取两者中高值进行统计。

1.2.6 miRNA 编码基因集簇分析 根据国外学者 Vaz 等^[5]的研究结论,相距 20 kb 范围内的 miRNA 基因可形成 1 个 miRNA 基因集簇。为使统计数据具有可行性和可比性,对可形成基因集簇的 miRNA 做如下处理分析:①剔除由不同 miRNA 前体基因编码且位于不同基因集簇的 miRNA,如 mir-215/194-1 和 mir-192/194-2 两个基因集簇中的 mir-194-1 和 mir-194-2 前体基因均可编码 miR-194,故剔除分析。②剔除未表达或虽有表达但表达水平 $< 10\text{TPM}$ 的 miRNA 基因集簇。

1.2.7 miRNA 的差异表达分析 对两样本表达 miRNA 作归一化处理后,运用 Audic and Claverie test 统计学方法^[6]比较 2 组样本 miRNA 表达的差异,并计算 P 值。对归一化后表达量 $< 10\text{TPM}$ 的 miRNA 不纳入差异表达分析。若 miRNA 在两样本间的差异 ≥ 2 且 $P \leq 0.001$,则认为该 miRNA 在两样本间的表达差异显著。

1.2.8 Stem-loop qRT-PCR 验证 运用 SYBR Green Real-time PCR 对 Illumina 测序结果进行验证。miRNA 茎环逆转录引物和 PCR 扩增引物分别由上海吉玛制药技术有限公司和上海生工生物工程有限公司提供(附表 1),以 rRNA U6 为内参。miRNA 的逆转录和 PCR 过程分别按照 M-MLV 反转录试剂盒(Promega 公司)和 SYBR Green Real-time PCR Kit 试剂盒(TOYOBO 公司)步骤进行。

1.3 统计学处理

除运用 Audic and Claverie test 统计学方法分析 Illumina HiSeq™ 2000 测序结果外,其他所有资料均采用 SPSS 21.0 统计分析软件进行处理,所得数值以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两样本表达 miRNA 构成比的统计学分析采用四格表资料的卡方检验,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 DS 组和对照组样本 Illumina 测序结果

2 样本总共检测到有 911 种 miRNA 表达,其中 DS 组有 751 种,对照组有 845 种。归一化处理后,对照组和 DS 组表达量>10TPM 的 miRNA 分别占 23.9%和 25.7%(表 1),差异无统计学意义($\chi^2=0.624, P=0.430$)。

表 1 2 组样本所得 911 种 miRNA 表达丰度统计

Tab.1 The expressive abundance level of 911 identified

miRNAs in both groups		
表达丰度	对照组	DS 组
Identified miRNAs	751 (100.0) ^a	845 (100.0) ^a
TPM < 1	409 (54.5)	409 (48.4)
TPM 1-10	162 (21.6)	219 (25.9)
TPM 10-100	94 (12.5)	108 (12.8)
TPM 100-1000	47 (6.3)	63 (7.5)
TPM 1000-10000	31 (4.1)	35 (4.1)
TPM > 10000	8 (1.0)	11 (1.3)

注:a,在各样本总表达 miRNA 中占的百分比

2.2 2 样本表达 miRNA 基因的染色体分布

2 样本表达 911 种 miRNA 由 738 个 miRNA 基因编码,图 1 是 DS 组和对照组表达 miRNA 基因在染色体上的分布。两样本可纳入 miRNA 表达丰度染色体分布分析的编码基因共有 163 个(图 2)。

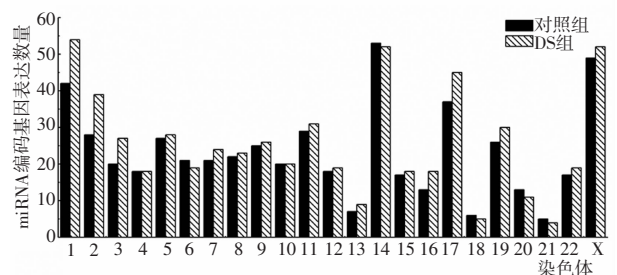


图 1 miRNA 表达基因染色体分布图

Fig.1 The chromosomal distribution diagram of expressed gene in both groups

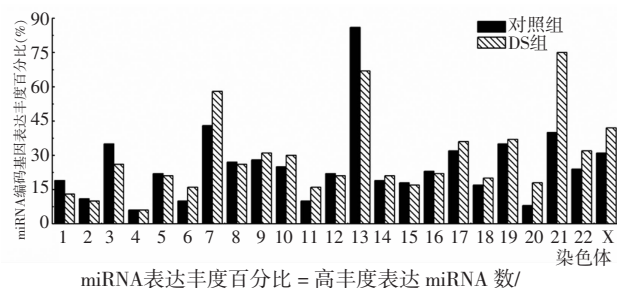


图 2 miRNA 表达丰度染色体分布图

Fig.2 The chromosomal distribution diagram of expressive abundance in both two groups

2.3 2 样本表达 miRNA 基因集簇分析

根据实验结果,本研究满足要求的 miRNA 基因集簇有 33 个,分布于 14 条染色体上(图 3,表 2)。在这些 miRNA 基因集簇当中,miR-143/145 (Chr5)、miR-30d/30b (Chr8)和 miR-191/425 (Chr3)表达丰度较高;而集簇 miR-191/425 (Chr3)、miR-183/96/182(Chr7)、miR-3154/199b(Chr9)、miR-301a/454(Chr17)、miR-99b/let-7e/125a-5p(Chr19)、miR-99a/let-7c (Chr21)、miR-221/222 (ChrX) 和 miR-452/224 (ChrX) 在 2 样本中的差异表达具有统计学意义($P<0.001$)。

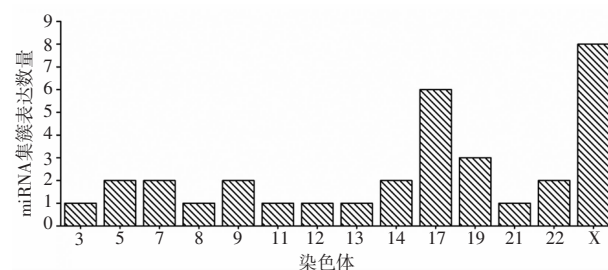


图 3 miRNA 基因集簇的染色体分布

Fig.3 The chromosomal distribution of 33 identified miRNA clusters in the both two groups

2.4 2 组样本 miRNA 的差异表达分析

2 组样本 miRNA 差异表达显著的有 114 种(表 2),其中有 103 种 miRNA 在 DS 组中高表达,11 种低表达。表 3 是表达丰度>1000TPM 的差异表达 miRNA。21 号染色体编码 miRNA 本实验中只检测到 7 种。PCR 验证结果如图 4 所示。

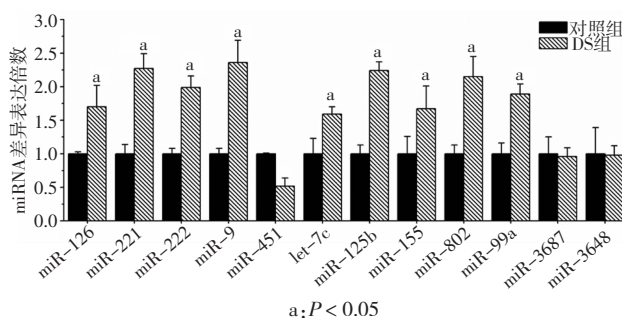


图 4 差异表达 miRNA 和 21 号染色体编码 miRNA 的 Stem-loop qRT-PCR 验证结果

Fig.4 Verification results of Stem-loop qRT-PCR for differential expression of miRNAs and Has21-derived miRNAs in both two groups

3 讨论

miRNA 是一种 19~23 个核苷酸长的内源性非编码 RNA。通过与靶基因 mRNA 的 3'-UTR 端特异性结合,在转录后水平调控基因的表达和翻译,在

表 2 两样本中差异表达的 114 个 miRNA

Tab.2 The 114 significantly differentially expressed miRNAs in the control and DS samples.

miRNA	归一化表达量		倍比值	P 值	miRNA	归一化表达量		倍比值	P 值
	对照组	DS组				对照组	DS组		
hsa-miR-628-3p	0.18	19.84	110.33	0.000	hsa-miR-3605-5p	7.19	38.74	3.40	0.000
hsa-miR-34c-5p	3.54	361.42	102.22	0.000	hsa-miR-335	19.12	24.37	3.39	0.000
hsa-miR-10b	1.56	66.96	42.97	0.000	hsa-miR-19a	170.79	64.28	3.36	0.000
hsa-miR-184	3.00	116.40	38.85	0.000	hsa-miR-183	5.51	560.08	3.28	0.000
hsa-miR-3154	0.48	17.51	36.52	0.000	hsa-miR-486-3p	1 273.78	17.98	3.26	0.000
hsa-miR-139-3p	6.23	208.84	33.51	0.000	hsa-miR-126	237.61	4 068.86	3.19	0.000
hsa-miR-508-3p	0.54	15.18	28.15	0.000	hsa-miR-10a	4.91	743.96	3.13	0.000
hsa-miR-3614-5p	2.88	61.90	21.52	0.000	hsa-miR-548j	33.38	14.95	3.04	0.000
hsa-miR-221-3p	237.13	4 964.36	20.94	0.000	hsa-miR-320b	9.11	100.00	3.00	0.000
hsa-miR-2110	11.75	219.89	18.72	0.000	hsa-miR-199b-5p	9.53	25.77	2.83	0.000
hsa-miR-423-5p	1 003.64	18 695.50	18.63	0.000	hsa-miR-2355-3p	8.75	26.00	2.73	0.000
hsa-miR-25-3p	7.55	131.24	17.38	0.000	hsa-miR-99a	47.28	23.39	2.67	0.000
hsa-miR-503	2.16	32.46	15.05	0.000	hsa-miR-130a	170.85	126.23	2.67	0.000
hsa-miR-203	0.96	12.57	13.11	0.000	hsa-miR-342-5p	489.65	445.25	2.61	0.000
hsa-miR-320a	238.33	2 999.07	12.58	0.000	hsa-miR-27a	37.39	1 270.07	2.59	0.000
hsa-miR-1270	1.20	12.22	10.19	0.000	hsa-miR-3647-3p	4.25	96.91	2.59	0.000
hsa-miR-485-5p	1.38	13.73	9.96	0.000	hsa-miR-421	4.37	10.53	2.47	0.000
hsa-miR-7	367.65	3 443.97	9.37	0.000	hsa-miR-548d-5p	3 794.45	10.76	2.46	0.000
hsa-miR-548e	4.55	40.90	8.98	0.000	hsa-miR-30d	14.68	9 326.63	2.46	0.000
hsa-miR-148b	548.62	4 854.59	8.85	0.000	hsa-miR-18a	17.92	35.25	2.40	0.000
hsa-miR-330-3p	23.13	190.22	8.22	0.000	hsa-miR-340-3p	1 671.51	42.99	2.40	0.000
hsa-miR-877	1.32	10.59	8.03	0.000	hsa-miR-151-3p	6.35	4 002.60	2.39	0.000
hsa-let-7e	66.82	516.45	7.73	0.000	hsa-miR-660	26.31	15.18	2.39	0.000
hsa-miR-584	41.65	310.58	7.46	0.000	hsa-miR-107	5.27	61.95	2.35	0.000
hsa-miR-185	122.97	815.69	6.63	0.000	hsa-miR-4504	6.29	12.33	2.34	0.000
hsa-miR-17-3p	16.66	110.00	6.60	0.000	hsa-miR-452	21.27	14.66	2.33	0.000
hsa-miR-3177-3p	2.04	13.09	6.42	0.000	hsa-miR-1285	165.64	49.56	2.33	0.000
hsa-miR-152	68.85	440.65	6.40	0.000	hsa-miR-221	49.26	381.20	2.30	0.000
hsa-miR-125b	12.94	75.86	5.86	0.000	hsa-miR-222	77.18	110.64	2.25	0.000
hsa-miR-125a-5p	21.69	123.38	5.69	0.000	hsa-miR-181a-2-3p	34.46	170.74	2.21	0.000
hsa-let-7b	2 913.54	16 394.27	5.63	0.000	hsa-miR-223-3p	47.34	76.03	2.21	0.000
hsa-miR-30a-3p	10.01	55.32	5.53	0.000	hsa-miR-19b	9.41	104.19	2.20	0.000
hsa-miR-224	2.64	13.90	5.27	0.000	hsa-miR-196a	28.05	20.59	2.19	0.000
hsa-miR-941	8.69	45.78	5.27	0.000	hsa-miR-454	41.11	61.37	2.19	0.000
hsa-miR-96	2.22	11.40	5.14	0.000	hsa-miR-22	8.03	89.70	2.18	0.000
hsa-miR-199a-5p	11.69	59.39	5.08	0.000	hsa-miR-500a-3p	26.91	17.28	2.15	0.000
hsa-let-7c	236.41	1 179.33	4.99	0.000	hsa-miR-9	138.55	57.47	2.14	0.000
hsa-miR-33a	2.04	10.01	4.91	0.000	hsa-miR-28-5p	7.43	290.40	2.10	0.000
hsa-miR-671-5p	2.16	10.47	4.85	0.000	hsa-miR-21-3p	167.01	15.42	2.07	0.000
hsa-miR-4446-3p	56.21	270.97	4.82	0.000	hsa-miR-200c	151.43	344.96	2.07	0.000
hsa-miR-664-3p	20.08	93.19	4.64	0.000	hsa-miR-99b	1 259.58	311.98	2.06	0.000
hsa-miR-1268	3.72	16.35	4.40	0.000	hsa-miR-182	682.38	2 587.91	2.05	0.000
hsa-miR-103a	9 228.77	40 194.79	4.36	0.000	hsa-let-7d	14.38	1 387.47	2.03	0.000
hsa-miR-1268b	3.90	16.81	4.32	0.000	hsa-miR-4772-5p	159.28	29.09	2.02	0.000
hsa-miR-301a	4.85	20.36	4.19	0.000	hsa-miR-425	14.08	321.46	2.02	0.000
hsa-miR-340	314.07	1 316.84	4.19	0.000	hsa-let-7d-3p	2 040.66	28.33	2.01	0.000
hsa-miR-139-5p	6.83	28.56	4.18	0.000	hsa-miR-486-5p	17.50	935.29	0.46	0.000
hsa-miR-30a	66.22	263.11	3.97	0.000	hsa-miR-190	52 684.69	7.16	0.41	0.000
hsa-miR-2115-3p	3.42	12.86	3.76	0.000	hsa-miR-143	4 173.00	18 578.98	0.35	0.000
hsa-miR-100	23.13	85.28	3.69	0.000	hsa-miR-144-3p	59.87	1 334.12	0.32	0.000
hsa-miR-150-3p	25.89	95.17	3.68	0.000	hsa-miR-151b	25.59	18.67	0.31	0.000
hsa-miR-1307	14.56	53.46	3.67	0.000	hsa-miR-144	17.26	7.62	0.30	0.000
hsa-miR-128	19.90	72.19	3.63	0.000	hsa-miR-720	9 204.86	3.03	0.18	0.000
hsa-miR-193a-5p	4.79	17.39	3.63	0.000	hsa-miR-451	242.76	1 555.87	0.17	0.000
hsa-miR-191	2 401.11	8 310.42	3.46	0.000	hsa-miR-3653	48.84	21.52	0.09	0.000
hsa-miR-126-3p	78.26	270.68	3.46	0.000	hsa-miR-629	110.32	0.93	0.02	0.000
hsa-miR-27b	147.78	509.07	3.44	0.000	hsa-miR-1246	7.19	1.22	0.01	0.000

表 3 DS 组 and 对照组 20 个归一化表达量 >1000TPM 的差异表达 miRNA
Tab.3 The differentially expressed miRNA of 20 normalized expressions >1000TPM in two groups

miRNA	归一化表达量		倍比值	P 值	miRNA	归一化表达量		倍比值	P 值
	对照组	DS组				对照组	DS组		
hsa-miR-221-3p	237.13	4 964.36	20.94	0.000	hsa-miR-126	1 273.78	4 068.86	3.19	0.000
hsa-miR-423-5p	1 003.64	18 695.50	18.63	0.000	hsa-miR-27a	489.65	1 270.07	2.59	0.000
hsa-miR-320a	238.33	2 999.07	12.58	0.000	hsa-miR-30d	3 794.45	9 326.63	2.46	0.000
hsa-miR-7	367.65	3443.97	9.37	0.000	hsa-miR-151-3p	1 671.51	4 002.60	2.39	0.000
hsa-miR-148b	548.62	4 854.59	8.85	0.000	hsa-miR-182	1 259.58	2 587.91	2.05	0.000
hsa-let-7b	2 913.54	16 394.27	5.63	0.000	hsa-let-7d	682.38	1 387.47	2.03	0.000
hsa-let-7c	236.41	1179.33	4.99	0.000	hsa-miR-486-5p	2 040.66	935.29	2.18	0.000
hsa-miR-103a	9 228.77	40 194.79	4.36	0.000	hsa-miR-143	52 684.69	18 578.98	2.84	0.000
hsa-miR-340	314.07	1 316.84	4.19	0.000	hsa-miR-144-3p	4 173.00	1 334.12	3.13	0.000
hsa-miR-191	2 401.11	8310.42	3.46	0.000	hsa-miR-451	9 204.86	1 555.87	5.92	0.000

细胞的增殖、分化、发育以及凋亡过程中具有重要作用^[7]。自第一个 miRNA 即 lin-4 被发现以来,目前在人体组织和细胞中已发现 1 881 个 miRNA 编码基因,可编码 2 813 种成熟 miRNA。其中 21 号染色体 miRNA 编码基因有 29 个,可编码 39 种成熟 miRNA 分子^[7]。

过去的研究发现,21 号染色体编码 5 个 miRNA (miR-99a、let-7c、miR-125b-2、miR-155 和 miR-802)的异常表达与 DS 患者智力障碍、心脏疾病、免疫缺陷、儿童白血病等临床症状的形成有关^[1]。miR-155 和 miR-802 在 DS 患儿脑和心脏组织中高表达,可抑制 CpG 甲基化结合蛋白 (methyl-CpG-binding protein, MeCP2) 的表达,引起 DS 患者的神经发育障碍致智力缺陷^[8]。miR-99a 和 let-7c 高表达可使 DS 胎儿心肌胚胎干细胞发育分化异常,与 DS 患者先天性心脏病的形成有关^[9]。miR-125b-2 的高表达可抑制淋巴细胞和粒细胞的分化与凋亡,在 DS 淋巴细胞白血病和粒细胞白血病的形成过程中具有重要作用^[10]。在本实验中,21 号染色体编码 miRNA 分子有 7 种表达(表 3 和图 4)。除 miR-3687 和 miR-3648 表达无统计学差异外,其他 5 个 miRNA (miR-99a、let-7c、miR-125b-2、miR-155 和 miR-802)在 DS 患儿外周血单个核细胞中均高表达。有意义的是,在本课题组对 DS 胎儿脐带血单个核细胞全基因组 miRNA 表达谱的研究中,除 miR-802 高表达外,miR-99a、let-7c、miR-125b-2 和 miR-155 均低表达^[11]。说明 miRNA 的表达具有时空特异性。

针对 DS 患者相关临床症状的形成机制,“基因剂量效应”假说认为是由 21 号染色体编码 DS 特定

临床症状基因的表达失衡引起;而“发育不平衡学说”认为 DS 特定临床症状的形成是 21 号 3 染色体扰乱全基因组表达形成的结果^[2]。以往的研究证明 21 号染色体 q22.2 区域内基因的高表达与 DS 主要临床症状的形成有关,包括智力低下、特殊面容、先天性心脏缺陷、免疫缺陷等^[3]。然而,国内外学者通过对 DS 患者和 DS 模型小鼠不同组织细胞全基因组基因表达谱的研究发现,21 号染色体编码基因并未都达到预期的 1.5 倍升高(上调基因占 9%~13%),而是大部分的基因在 1.1~1.37 倍之间变化,相对二倍体呈非线性升高,甚至有的与二倍体相比表达量也无明显差异(如本实验中 21 号染色体编码 miR-3687 和 miR-3648),说明 DS 非整倍体组织细胞可能存在一种基因间相互作用的剂量补偿效应,比如 miRNA 对基因表达的负向调控作用^[12-13]。

通过对 DS 组和对照组儿童 miRNA 表达基因编码染色体座位分析发现,2 组样本表达 miRNA 均主要分布于 1、14、17、X 染色体上(图 1),但高丰度表达 miRNA 的分布却不一致,DS 组主要分布于 7、13 和 21 号染色体,与对照组主要分布于 7 和 13 号染色体高丰度表达 miRNA 的数量具有明显的差异(图 2)。该结果说明 21 号三染色体对二倍体 miRNA 基因的表达具有一定的影响作用。值得一提的是,在 DS 胎儿脐带血中,高丰度表达的 miRNA 则主要分布于 8、16、17 和 21 号染色体^[14]。说明 21 号 3 染色体在不同的发育阶段对二倍体 miRNA 基因编码染色体的影响不同,具有时间特异性和组织特异性。此外对 miRNA 基因染色体编码座位分析发现,有较多 miRNA 基因在染色体一个多顺反子内呈一集

簇排列。这在国内外学者对 miRNA 的研究中也有阐述。1 个 miRNA 集簇可由 2 个或多个 miRNA 基因组成,它在 1 个调控网络中可协同调节 1 个或多个 mRNAs,在多种生物学过程中发挥协同调节作用^[15],集簇 miRNA 的异常表达在 DS 患儿相关临床症状形成过程中具有重要作用。在本实验获得高表达的 miRNA 集簇中,miR-301a/miR-454 集簇可通过调节 IL-2 的生成,控制 NF- κ B 的活化来调节免疫反应^[16];miR-221/miR-222 集簇在活化的树突状细胞中高表达,可抑制细胞的增殖,可通过部分抑制细胞循环抑制因子 p27(kip1)来调控细胞循环,与固有免疫的调节有关^[17];miR-183/miR-96/miR-182 集簇的高表达可抑制视黄酸 γ -受体基因(retinoic acid receptor gamma,RARG)的表达,导致细胞过早衰老^[18];miR-125a-5p/miR-99b/let-7e 和 miR-125b/miR-99a/let-7c 集簇分别位于 19 和 21 号染色体,与干细胞的自我更新和分化有关,在白血病细胞的形成过程中具有重要作用^[19-20]。

综上所述,DS 患儿外周血单个核细胞具有其特定的 miRNA 表达谱和染色体分布特征。差异表达的 miRNA 可能与 DS 患儿的免疫缺陷以及白血病的形成有关。2 样本表达丰度差异分布染色体编码 miRNA 的差异表达,可能与 21 号 3 染色体扰乱二倍体基因的表达有关,但具体的调控作用机制还有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Elton TS,Sansom SE,Martin MM. Trisomy-21 gene dosage over-expression of mirnas results in the haploinsufficiency of specific target proteins[J]. RNA Biol,2010,7(5):540-547.
- [2] Patterson D. Molecular genetic analysis of down syndrome[J]. Human Genetics,2009,126(1):195-214.
- [3] Piletic K,Kunej T. Microrna epigenetic signatures in human disease[J]. Arch Toxicol,2016,90(10):2405-2419.
- [4] Li R,Yu C,Li Y,et al. Soap2:an improved ultrafast tool for short read alignment[J]. Bioinformatics,2009,25(15):1966-1967.
- [5] Vaz C,Ahmad HM,Sharma P,et al. Analysis of microrna transcriptome by deep sequencing of small RNA libraries of peripheral blood[J]. BMC Genomics,2010,11:288-306.
- [6] Audic S,Claverie JM. The significance of digital gene expression profiles[J]. Genome Res,1997,7(10):986-995.
- [7] Kozomara A,Griffiths-Jones S. Mirbase:annotating high confidence micrnas using deep sequencing data[J]. Nucleic Acids Res,2014,42(Database issue):68-73.
- [8] Kuhn DE,Nuovo GJ,Terry AV Jr,et al. Chromosome 21-derived micrnas provide an etiological basis for aberrant protein expression in human down syndrome brains[J]. J Biol Chem,2010,285(2):1529-1543.
- [9] Coppola A,Romito A,Borel C,et al. Cardiomyogenesis is controlled by the mir-99a/let-7c cluster and epigenetic modifications[J]. Stem Cell Res,2014,12(2):323-337.
- [10] Shaham L,Binder V,Gefen N,et al. Mir-125 in normal and malignant hematopoiesis[J]. Leukemia,2012,26(9):2011-2018.
- [11] 李武县,徐 勇,李紫薇,等. 唐氏综合征胎儿脐带血单个核细胞 microRNA 差异表达研究[J]. 第三军医大学学报,2012,34(19):1944-1948.
- [12] Ait Yahya-Graison E,Aubert J,Dauphinot L,et al. Classification of human chromosome 21 gene-expression variations in down syndrome:impact on disease phenotypes[J]. Am J Hum Genet,2007,81(3):475-491.
- [13] Li CM,Guo M,Salas M,et al. Cell type-specific over-expression of chromosome 21 genes in fibroblasts and fetal hearts with trisomy 21[J]. BMC Med Genet,2006,7:24-39.
- [14] 李武县,梁勤东,董晋豫,等. 唐氏综合征胎儿全基因组 miRNA 表达谱特征及其染色体分布[J]. 基础医学与临床,2013,33(8):935-940.
- [15] Ding P,Luo J,Xiao Q,et al. A path-based measurement for human mirna functional similarities using mirna-disease associations[J]. Sci Rep,2016,6:32533.
- [16] Yang Y,Wang JK. The functional analysis of micrnas involved in NF- κ B signaling[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci,2016,20(9):1764-1774.
- [17] Corsten M,Heggermont W,Papageorgiou AP,et al. The microrna-221/-222 cluster balances the antiviral and inflammatory response in viral myocarditis[J]. Eur Heart J,2015,36(42):2909-2919.
- [18] Abdelmohsen K,Gorospe M. Noncoding rna control of cellular senescence[J]. Wiley Interdiscip Rev RNA,2015,6(6):615-629.
- [19] Gerrits A,Walasek MA,Olthof S,et al. Genetic screen identifies microRNA cluster 99b/let-7e/125a as a regulator of primitive hematopoietic cells[J]. Blood,2012,119(2):377-387.
- [20] Kandi R,Gutti U,Saladi RG,et al. MiR-125b and miR-99a encoded on chromosome 21 co-regulate vincristine resistance in childhood acute megakaryoblastic leukemia[J]. Hematol Oncol Stem Cell Ther,2015,8(2):95-97.

(责任编辑:方 济)