

内分泌专题

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.001720

糖尿病肾病相关 miR-130b-3p 靶点的生物信息学预测

常 凯¹, 江忠勇¹, 任俊龙¹, 熊怡淞¹, 王艳艳¹, 叶雨笙², 朱紫衣², 熊 杰¹

(1. 中国人民解放军成都军区总医院检验科, 成都 610083; 2. 西南医科大学临床医学院, 泸州 646000)

【摘要】目的:预测 miR-130b-3p 靶基因, 并对靶基因的分子功能、生物学进程和信号通路进行富集分析, 为深入研究糖尿病肾病相关 miR-130b-3p 的靶基因功能提供理论基础。**方法:**通过 NCBI 和 miRbase 数据库检索基因。应用 Vector NTI 软件进行 miR-130b-3p 序列分析, 应用 TargetScan, picTar, RNA22, PITA 和 miRanda 软件预测靶基因, 通过 DAVID 和 KEGG 数据库进行靶基因功能与信号通路富集分析。**结果:**已知成熟的不同物种 miR-130b-3p 核酸序列高度保守。靶基因主要富集在核质和细胞溶质, 分子功能主要富集在蛋白结合和转录因子激活。经典的 miR-130b-3p 靶基因集合明显富集于 KEGG 数据库中的 TGF- β 、AMPK 和 内吞作用等 7 个信号转导通路。疾病富集分析与糖尿病高度相关。**结论:**成功预测 miR-130b-3p 靶基因, 部分靶基因参与的功能及信号通路与糖尿病肾病发生发展过程密切相关。

【关键词】miR-130b-3p; 糖尿病肾病; 靶点预测; 信号通路; 富集分析

【中图分类号】R394.3

【文献标志码】A

【收稿日期】2017-07-06

Bioinformatics prediction of miR-130b-3p target genes
associated with diabetic nephropathyChang Kai¹, Jiang Zhongyong¹, Ren Junlong¹, Xiong Yisong¹, Wang Yanyan¹, Ye Yusheng², Zhu Ziyi², Xiong Jie¹

(1. Department of Clinical Laboratory, Chengdu Military General Hospital of PLA;

2. Department of Clinical Medicine, Southwest Medical University)

【Abstract】Objective: To predict miR-130b-3p target genes by bioinformatic analysis and enrichment analysis for its molecular function, biological process and signal pathway, so as to provide a theoretical basis for the further study of miR-130b-3p associated with diabetic nephropathy. **Methods:** Database of target gene was retrieved from the NCBI and miRbase database. The sequences of miR-130b-3p were analyzed with Vector NTI, and miR-130b-3p target genes were predicted using TargetScan, picTar, RNA22, PITA and miRanda. Functional enrichment analysis of target genes and signal pathway enrichment analysis were carried out using DAVID and KEGG database. **Results:** The sequence of miR-130b-3p was highly conserved among various species. GO analysis showed that miR-130b-3p was mainly enriched in nucleoplasm and cytosol. Molecular function was mainly enriched in protein binding and transcription factor activation. Classic miR-130b-3p was enriched in seven signal transduction pathways in KEGG database, including TGF- β , AMPK and endocytosis. The disease enrichment of target genes was highly relevant to diabetic nephropathy. **Conclusion:** The function and signaling pathway of miR-130b-3p target genes are closely related with the development and progression of diabetic nephropathy.

【Key words】miR-130b-3p; diabetic nephropathy; target prediction; signal pathway; enrichment analysis

MicroRNA(miRNA)是在真核生物体内发现的长度 20~24 个核苷酸的内源性小型非编码 RNA。其能够通过识别特定的目标 mRNA, 在转录后水平通

作者介绍: 常 凯, Email: ck8148@126.com,

研究方向: 继发性肾病的分子机制研究。

通信作者: 熊 杰, Email: xiongjie_mail@126.com。

基金项目: 四川省科技厅应用基础研究资助项目(编号: 2013JY0173)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180522.0941.004.html>

(2018-05-23)

过降解靶 mRNA 或抑制翻译过程而对靶基因进行负调控, 参与转录后水平调控^[1]。miRNA 几乎参与了所有生命活动的调节, 与细胞增殖与凋亡、器官发育、肿瘤发生等生物进程密切相关^[2]。研究发现 miR-130b-3p 可能参与糖尿病肾病发生及发展, 与糖尿病肾病早期肾损伤及肾损伤程度相关。现有研究多数集中于 miR-130b-3p 作用的下游靶基因及其与疾病的联系, 而对 miR-130b-3p 靶基因生物功能及

参与上游信号转导通路的研究较为缺乏^[3]。本研究拟通过对已有的关于 miR-130b-3p 的研究进行梳理,结合信息生物学分析方法对 miR-130b-3p 及靶基因进行分析,探讨其参与的生物学进程和相关信号转导通路,分析其调控糖尿病肾病发展进程的潜在作用靶点,提高对 miR-130b-3p 靶基因的整体认识,为今后在糖尿病肾病方向的进一步研究奠定基础。

1 材料与方法

以 miR-130b-3p 为关键词在数据库 miRbase (<http://www.mirbase.org/>) 和 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中收集已有 13 个物种(智人、小家鼠、褐鼠、扁颈眼镜蛇、山羊、大西洋鲑鱼、短尾负鼠、灰地鼠、绿蜥蜴、斑胸草雀、鸭嘴兽、猕猴、原鸡)的成熟 miR-130b-3p 序列,应用 Vector NTI 对该序列在各物种之间进行同源性分析^[4]。采用 TargetScan (<http://www.targetscan.org/>)、picTar (<http://www.mdc-berlin.de/>)、RNA22 (<http://cm.jefferson.edu/rna22/>)、PITA (<http://genie.weizmann.ac.il/>) 和 miRanda (<http://www.microrna.org/microrna/home.do>) 5 个在线数据库预测 miR-130b-3p 的靶基因及转录因子。各数据库的检索标准为测序实验数 ≥ 1 , 本文研究的靶基因入选标准为 ≥ 4 个数据库同时具有测序实验数 ≥ 1 的靶基因,以排除由于各数据库入组标准不一可能造成的假目标基因的可能性。

采用 GO (<http://www.geneontology.org/>) 和 DAVID 数据库 (<http://david.ncifcrf.gov/>) 对 miR-130b-3p 预测的靶基因集合进行富集分析和基于 KEGG 数据库 (<http://www.genome.jp/kegg/>) 的信号转导通路富集分析^[5-6]。以 $P < 0.05$ 为显著性阈值,得到基因集合相对于背景具有统计学意义的信号转导和疾病通路。基于 KEGG 数据库利用 Chemoffice 软件绘制信号转导交互图。

2 结果

2.1 定位及同源性分析

miR-130b-3p 定位于 22 号染色体,应用 miRbase 检索得到智人、小家鼠、褐鼠、扁颈眼镜蛇等 13 个不同物种的成熟 miRNA 序列(图 1)。应用 VectorNTI 进行同源性比对发现共 22 个碱基中 16 个碱基高度保守,6 个碱基相对保守^[7]。



图 1 miR-130b-3p 基因序列的保守性分析

Fig.1 Conservative analysis of miR-130b-3p gene sequence

2.2 靶基因预测

应用 TargetScan、picTar、RNA22、PITA 和 miRanda 5 个数据库抓取的靶基因分别为 776、1 560、446、600 和 2 076 个。5 个数据库共同交集 31 个,超过 4 个数据库的共同交集 272 个。

2.3 靶基因的 GO 分析

将大于 4 个数据库预测得到的 272 个靶基因进行 GO 分析,发现 miR-130b-3p 的靶基因主要富集在核质、细胞溶质、生长锥和细胞核等 12 个区域($P < 0.01$, $EP > 100$)。分子功能主要富集在蛋白绑定、转录因子激活、RNA 聚合酶转录和特异性 DNA 结合等 12 个分子功能中($P < 0.01$, $EP > 50$)。涉及转录调节、内噬作用、蛋白绑定和核酸绑定等 27 个主要生物学进程($P < 0.01$, $EP > 100$)(表 1)。将 GO 富集分析后的生物学对应事件进行比例分析如图 2 所示。

2.4 靶基因的相关代谢通路富集分析

基于 KEGG pathway 方法对 miR-130b-3p 靶基因进行富集分析。结果具有显著生物学效应的代谢通路为 7 条(表 2)。其中转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF-

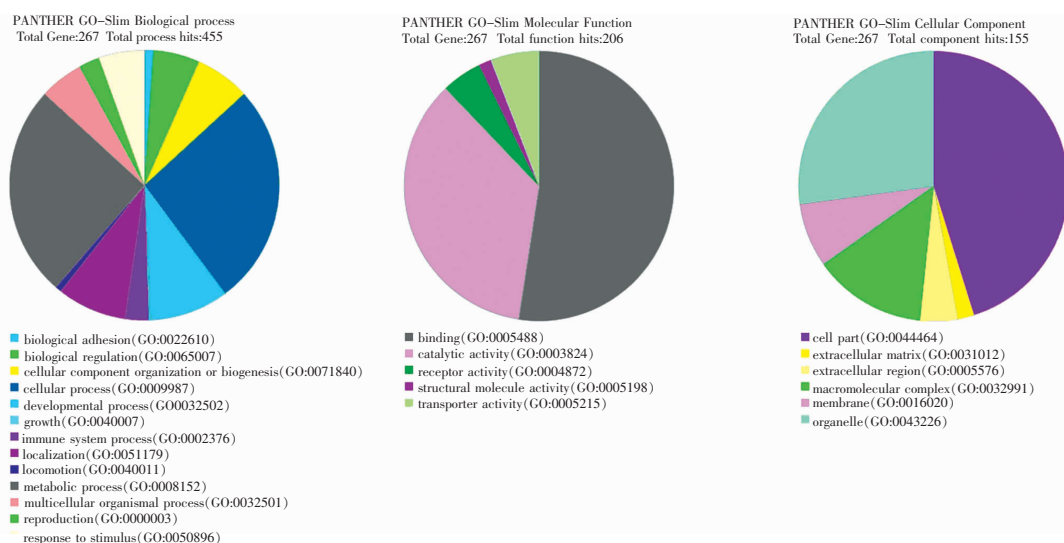


图 2 miR-130b-3p 靶基因的 GO 富集分析分布图

Fig.2 Diagrams of GO enrichment analysis of miR-130b-3p target genes

β)信号转导通路与糖尿病肾病肾间质纤维化密切相关,其机制为通过肾小管上皮细胞向间充质细胞转分化起主要作用^[9]。在 miR-130b-3p 靶基因中 ACVR1、TGFB2、SMAD5、ZFYE9、PPP2R1B 和 BMP2 直接参与 TGF- β 信号通路。与糖尿病肾病纤维化密切相关的 AMPK 信号通路中包含 CREB5、PRKAA1、TSC1、PPP2R1B、PFKFB3 和 PPARG,其中 PRKAA1 和 PPARG 为通路的关键基因^[9]。基于 KEGG 数据库,利用 Chemoffice 软件绘制上述信号转导通路交互图(图 3)。可见上述通路相

互交错,通过细胞循环、凋亡等生物过程共同调控糖尿病肾病的发生发展进程。

2.5 靶基因的相关疾病富集分析

基于 GAD disease 和 OMIM disease 两个疾病数据库,对 miR-130b-3p 靶基因进行富集分析($P<0.05$),结果见表 3。其中 2 型糖尿病涉及基因 47 个,覆盖比例为 17.15%。如 MPHOSPH9 (HS.577404)、TGFB2 (HS.82028)、PTEN (HS.500466)等基因表现出与糖尿病肾病发生的强关联性^[10-12]。

表 1 miR-130b-3p 靶基因的 GO 富集分析结果

Tab.1 Results of GO enrichment analysis of miR-130b-3p target genes

GO 编号	项目	P 值	UniGene 编号
生物学过程			
GO:0045944	核糖核酸酶 II 启动子转录的正向调控	0.000	HS.292949, HS.484423, HS.431009...
GO:0006351	转录, DNA 模板	0.000	HS.167700, HS.284217, HS.608111...
GO:0006366	RNA 聚合酶 II 启动子的转录	0.000	HS.484423, HS.709709, HS.170019...
GO:0009952	前/后模式规范	0.000	HS.258855, HS.709709, HS.659337...
GO:0006897	内噬作用	0.000	HS.713554, HS.213289, HS.646508...
GO:0006355	转录调控, DNA 模板	0.000	HS.434418, HS.91531, HS.333503...
GO:0045892	负转录调控, DNA 模板	0.000	HS.484423, HS.431009, HS.744843...
GO:0045893	转录的正调控, DNA 模板	0.000	HS.484423, HS.470316, HS.171061...
GO:0060412	心室中隔形态	0.000	HS.470316, HS.82028, HS.431009...
GO:0007165	信号转导	0.001	HS.138860, HS.167700, HS.645009...
细胞成分			
GO:0005654	核质	0.000	HS.464585, HS.79411, HS.333503...
GO:0005829	细胞溶质	0.000	HS.138860, HS.491351, HS.167700...
GO:0030426	生长锥	0.000	HS.633514, HS.87889, HS.468442...
GO:0005634	细胞核	0.000	HS.79411, HS.510324, HS.333503...
GO:0000932	细胞质 mRNA 降解体	0.000	HS.408461, HS.22867, HS.645009...
GO:0005769	早期胞饮小体	0.001	HS.518417, HS.157659, HS.29189
GO:0048471	胞核周区	0.003	HS.518417, HS.656905, HS.138860
GO:0030904	后曲复合体	0.003	HS.713554, HS.249591, HS.192326
GO:0030424	轴突	0.004	HS.87889, HS.471200, HS.713539
GO:0043025	神经元细胞体	0.005	HS.633514, HS.323833, HS.567968
分子功能			
GO:0005515	蛋白结合	0.000	HS.150107, HS.510324, HS.79411...
GO:0003700	转录因子活性, 序列特异性 DNA 结合	0.000	HS.484423, HS.434418, HS.170019...
GO:0001105	RNA 聚合酶 II 转录辅激活因子的活性	0.000	HS.744234, HS.709709, HS.431009...
GO:0043565	序列特异性 DNA 结合	0.000	HS.484423, HS.709709, HS.436975...
GO:0004535	Poly A 特异性核糖核酸酶活性	0.000	HS.608380, HS.645009, HS.645015...
GO:0018024	组蛋白赖氨酸甲基转移酶活性	0.002	HS.632120, HS.258855, HS.522639...
GO:0047485	蛋白质 N 末端结合蛋白	0.003	HS.743987, HS.171061, HS.522639...
GO:0004842	泛素蛋白转移酶活性	0.004	HS.150107, HS.108332, HS.129683...
GO:0008270	锌离子结合	0.009	HS.348921, HS.434418, HS.156231...
GO:0017124	SH3 结构域结合	0.009	HS.138860, HS.510324, HS.594351...

表 2 miR-130b-3p 靶基因的相关信号通路富集分析结果

Tab.2 Results of enrichment analysis of miR-130b-3p-related signal pathway

KEGG 编号	项目	基因数	P 值	UniGene 编号
hsa04144	内噬作用	11	0.005	HS.82028, HS.157659, HS.713554...
hsa00310	赖氨酸降解	5	0.008	HS.632120, HS.258855, HS.522639...
hsa04350	TGF- β 信号转导通路	6	0.008	HS.470316, HS.82028, HS.167700...
hsa04962	抗利尿激素调节重吸收	4	0.028	HS.437075, HS.157659, HS.720595...
hsa03018	RNA 降解	5	0.028	HS.408461, HS.608380, HS.645009...
hsa04925	醛固酮合成与分泌	5	0.033	HS.437075, HS.213289, HS.468442...
hsa04152	AMPK 信号转导通路	6	0.036	HS.437075, HS.43322, HS.370854...

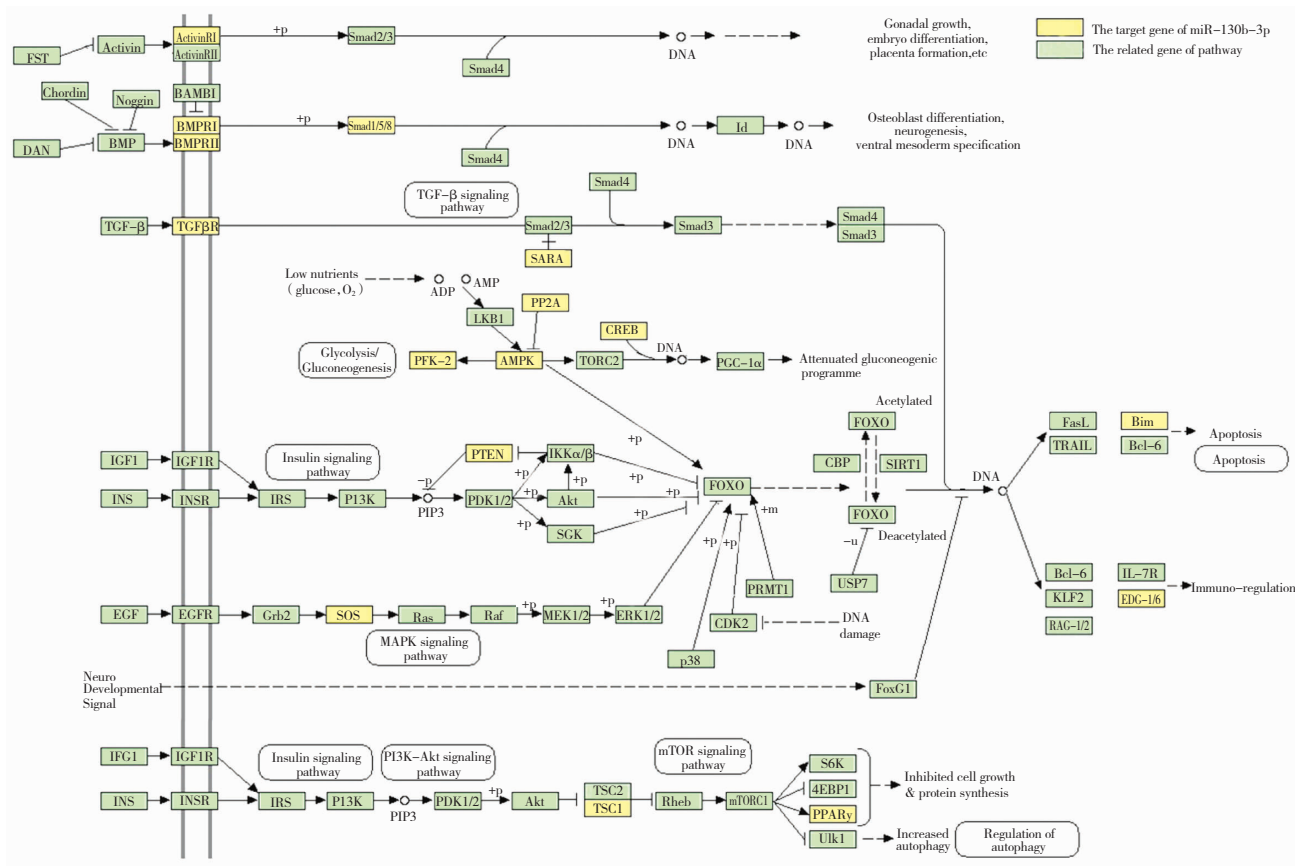


图 3 miR-130b-3p 靶基因 KEGG 富集分析合成图

Fig.3 Diagrams of KEGG pathway enrichment analysis of miR-130b-3p target genes

表 3 miR-130b-3p 靶基因的相关疾病富集分析结果

Tab.3 Results of enrichment analysis of miR-130b-3p-related diseases

编号	项目	基因数	P 值	UniGene 编号
1	精神分裂症	25	0.000	HS.82028, HS.434418, HS.595541...
2	体质量	15	0.004	HS.201623, HS.156231, HS.510324...
3	阿尔茨海默病	13	0.005	HS.213289, HS.129683, HS.594351...
4	唇/腭裂	14	0.007	HS.484423, HS.82028, HS.213289...
5	2型糖尿病/水肿/罗格列酮	47	0.014	HS.577404, HS.82028, HS.171061...

3 讨论

糖尿病肾病是糖尿病最严重的慢性并发症之一,多由糖尿病微血管病变引起,以肾小球硬化为主要特征,最新统计资料表明约 30%的 1 型糖尿病和 20%的 2 型糖尿病会发展为糖尿病肾病^[13]。TGF-β 信号途径是糖尿病肾病发生发展的重要中介。且该途径在糖尿病肾病诊断与治疗中的角色逐渐受到重视^[14]。TGF-β 可通过以下方面作用于糖尿病肾病:TGF-β 是引起足细胞凋亡的重要细胞因子,足细胞损伤会最终可导致肾小球硬化^[15];TGF-β 可通过介导结缔组织生长因子,在糖尿病肾病中引起系膜细胞增殖^[16];TGF-β 可诱导内皮细胞的增生与迁移致使肾小球肥大^[17]。同时,TGF-β 也可通过炎症

反应致使肾小管减少和肾小管损伤。AMPK 作为重要的蛋白激酶,通过调节 NAD(P)H 氧化酶的活性来调节 ROS 的产生,参与糖尿病肾病的发生发展。高糖可通过 AMPK 抑制作用活化 mTOR 通路,促进肾小球基底膜增厚和系膜基质堆积^[18]。

本研究 GO 富集结果表明 miR-130b-3p 靶基因众多且生物学功能多样,相关代谢通路富集主要集中在内噬作用、赖氨酸降解、TGF-β、抗利尿激素调节重吸收、RNA 降解、醛固酮合成分泌和 AMPK 信号转导通路中。而上述 7 个信号通路均与糖尿病肾病的发生息息相关。内噬作用和 RNA 降解参与整个生命周期与进程,内噬作用在一定程度上能够保护足细胞,自噬的缺乏导致足细胞损伤及肾小球硬化加重^[19]。Knecht 等^[20]研究发现糖尿病与赖氨酸衍生物及其代谢水平有显著相关性。醛固酮参与糖尿

病肾病肾间质转分化而引起肾脏损伤^[21]。TGF- β 和 AMPK 信号转导通路更是与糖尿病肾病密不可分。由此可见,miR-130b-3p 可通过靶基因调控多条通路进而影响糖尿病肾病的发生与发展^[22]。疾病富集分析结果表明 miR-130b-3p 靶基因与 2 型糖尿病、水肿、罗格列酮和体质量等疾病具有强关联。基于上述分析及 KEGG 数据库汇总了 miR-130b-3p 与糖尿病肾病相关的信号转导通路图。图中可见很多靶基因处于信号途径的限速步骤或关键基因。值得注意的是 FOXO 虽非 miR-130b-3p 靶基因但却具有重要作用,研究发现 FOXO 的表达能够明显改善糖尿病状态下的系膜细胞增殖,这能够有效抑制肾纤维化进程^[23]。

新近研究发现 miR-130b 在糖尿病肾病的组织中也呈现出较高的表达量^[24],研究者关注了临床中 miR-130b 与下游基因表达及糖尿病肾病肾小管间质纤维化的关系,但并未进一步对其作用靶点及上游的可能信号转导通路进行研究。本文对 miR-130b-3p 的靶基因进行富集分析,提供了研究糖尿病肾病的上游信号通路的潜在靶点,为上游研究的开展提供参考。然而为进一步确定靶基因的重要性还需要开展大量的基因功能性研究。

参 考 文 献

- [1] Fiore R, Siegel G, Schrott G. MicroRNA function in neuronal development, plasticity and disease[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1779(8): 471-478.
- [2] Zhang Y, Wang Z, Gemeinhart RA. Progress in microRNA delivery[J]. *J Control Release*, 2013, 172(3): 962-974.
- [3] Lü C, Zhou YH, Wu C, et al. The changes in miR-130b levels in human serum and the correlation with the severity of diabetic nephropathy[J]. *Diabetes Metab Res Rev*, 2015, 31(7): 717-724.
- [4] Li JH, Liu S, Zhou H, et al. starBase v2.0: decoding miRNA-ceRNA, miRNA-ncRNA and protein-RNA interaction networks from large-scale CLIP-Seq data[J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(Database issue): 92-97.
- [5] Wagner A, Mayr C, Bach D, et al. MicroRNAs associated with the efficacy of photodynamic therapy in biliary tract cancer cell lines[J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(11): 20134-20157.
- [6] Maere S, Heymans K, Kuiper M. BiNGO: a cytoscape plugin to assess over representation of Gene Ontology categories in Biological Networks[J]. *Bioinformatics*, 2005, 21(16): 3448-3449.
- [7] Lan X, Chang K, Zeng L, et al. Engineering salidroside biosynthetic pathway in hairy root cultures of *rhodiola crenulata* based on metabolic characterization of tyrosine decarboxylase[J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): e75459.
- [8] Mou X, Zhou DY, Zhou DY, et al. Serum TGF- β 1 as a biomarker for type 2 diabetic nephropathy: a meta-analysis of randomized controlled trials[J]. *PLoS One*, 2016, 11(2): e0149513.
- [9] He T, Xiong J, Nie L, et al. Resveratrol inhibits renal interstitial fibrosis in diabetic nephropathy by regulating AMPK/NOX4/ROS pathway[J]. *J Mol Med(Berl)*, 2016, 94(12): 1359-1371.
- [10] Imamura M, Takahashi A, Yamauchi T, et al. Genome-wide association studies in the Japanese population identify seven novel loci for type 2 diabetes[J]. *Nat Commun*, 2016, 7(4): 10531.
- [11] Patterson CC, Savage DA, Amy MK, et al. Resequencing of genes for transforming growth factor β 1 (TGFB1) type 1 and 2 receptors (TGFBR1, TGFBR2), and association analysis of variants with diabetic nephropathy[J]. *BMC Med Genet*, 2007, 8: 5.
- [12] Butler M, McKay RA, Popoff IJ, et al. Specific inhibition of PTEN expression reverses hyperglycemia in diabetic mice[J]. *Diabetes*, 2002, 51(4): 1028-1034.
- [13] Chang K, Jiang Z, Liu C, et al. The effects of CYP2C19 genotype on the susceptibility for nephrosis in cardio-cerebral vascular disease treated by anticoagulation[J]. *Medicine(Baltimore)*, 2016, 95(38): e4954.
- [14] Jiang Z, Liu X, Chang K, et al. Allyl isothiocyanate inhibits the proliferation of renal carcinoma cell line GRC-1 by inducing an imbalance between Bcl2 and Bax[J]. *Med Sci Monit*, 2016, 22: 4283-4288.
- [15] Lee HS. Pathogenic role of TGF- β in the progression of podocyte diseases[J]. *Histol Histopathol*, 2011, 26(1): 107-116.
- [16] Wolf G, Sharma K, Chen Y, et al. High glucose-induced proliferation in mesangial cells is reversed by autocrine TGF- β [J]. *Kidney Int*, 1992, 42(3): 647-656.
- [17] Ezequiel DG, Costa MB, Chaoubah A, et al. Weight loss improves renal hemodynamics in patients with metabolic syndrome[J]. *J Bras Nefrol*, 2012, 34(1): 36-42.
- [18] Salatto CT, Miller RA, Cameron KO, et al. Selective activation of AMPK b1-containing isoforms improves kidney function in a rat model of diabetic nephropathy[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2017, 361(2): 303-311.
- [19] Sasaki Y, Hidaka T, Ueno T, et al. Sorting Nexin 9 facilitates podocin endocytosis in the injured podocyte[J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 43921.
- [20] Knecht KJ, Dunn JA, McFarland KF, et al. Effect of diabetes and aging on carboxymethyllysine levels in human urine[J]. *Diabetes*, 1991, 40(2): 190-196.
- [21] Diah S, Zhang GX, Nagai Y, et al. Aldosterone induces myofibroblastic transdifferentiation and collagen gene expression through the Rho-kinase dependent signaling pathway in rat mesangial cells[J]. *Exp Cell Res*, 2008, 314(20): 3654-3662.
- [22] Husi H, Sanchez-Niño MD, Delles C, et al. A combinatorial approach of proteomics and systems biology in unravelling the mechanisms of acute kidney injury (AKI): involvement of NMDA receptor GRIN1 in murine AKI[J]. *BMC Syst Biol*, 2013, 7(1): 110.
- [23] Yang C, Ye C, Zhang Y, et al. Cyclic helix B peptide inhibits ischemia reperfusion-induced renal fibrosis via the PI3K/Akt/FoxO3a pathway[J]. *J Transl Med*, 2015, 13: 355.
- [24] Bai X, Geng J, Zhou Z, et al. MicroRNA-130b improves renal tubulointerstitial fibrosis via repression of snail-induced epithelial-mesenchymal transition in diabetic nephropathy[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 20475.

(责任编辑:冉明会)