

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.001707

先天性巨结肠肠管 lncRNA-mRNA 共表达谱芯片初步筛查研究

罗 波¹, 刘远梅², 冯莎莎³, 金 祝², 刘 毅², 汤成艳², 王红宇¹

(1. 自贡市第一人民医院儿科, 自贡 643000; 2. 遵义医学院附属医院小儿普胸泌外科, 遵义 563003;

3. 自贡市第一人民医院检验科, 自贡 643000)

【摘要】目的:研究先天性巨结肠(Hirschsprung's disease, HD)病变段肠管与正常段肠管 lncRNA-mRNA 表达谱的差异。**方法:**采用 lncRNA-mRNA 共表达谱芯片筛查 5 例 HD 肠管和 5 例配对的正常肠管差异表达的 lncRNA 和 mRNA, 并以 17 对样本对其中显著差异的 5 个 lncRNA 进行 qRT-PCR 验证, 同时应用生物信息学的方法构建 lncRNA-mRNA 共表达网络, 预测差异 lncRNA 的靶基因, 并对预测的靶基因进行基因本体论(gene ontology, GO)分析和通路(pathway)分析。**结果:**lncRNA-mRNA 共表达谱芯片筛查出 HD 肠管中存在 353 个表达上调, 474 个下调的 lncRNA, 以及 865 个上调, 461 个下调的 mRNA。并验证出 5 个差异表达的 lncRNA。lncRNA 与 mRNA 相互关联, 通过调控相应的靶 mRNA, 参与包括细胞增殖、分化和迁移等多种生物学过程, 与 HD 的发病有一定相关性。**结论:**HD 肠管中存在大量差异表达的 lncRNA 和 mRNA。lncRNA 和 mRNA 之间具有广泛的联系, 形成共表达网络, lncRNA 可能是通过调控相应的靶 mRNA 参与 HD 的发病。

【关键词】先天性巨结肠; lncRNA; mRNA**【中图分类号】**R726.1**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2017-01-11

Preliminary screening of lncRNA-mRNA coexpression microarray in Hirschsprung's disease

Luo Bo¹, Liu Yuanmei², Feng Shasha³, Jin Zhu², Liu Yi², Tang Chengyan², Wang Hongyu¹

(1. Department of Paediatrics, Zigong First People's Hospital; 2. Department of Pediatric Surgery, the Affiliated Hospital of Zunyi Medical College; 3. Department of Clinical Laboratory, Zigong First People's Hospital)

【Abstract】Objective: To analyze the expression profile of lncRNA-mRNA in lesion and normal intestines of Hirschsprung's diseases (HD). **Methods:** The lncRNA-mRNA microarray was used to screen the differentially expressed lncRNA and mRNA in 5 HD intestines and 5 paired normal intestines. Seventeen groups of samples were used to do the quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) on 5 lncRNAs with significant differences. Gene co-expression network was constructed by bioinformatics methods. **Results:** There were 353 up-regulated and 474 down-regulated expression of lncRNA, and 865 up-regulated and 461 down-regulated expression of mRNA. lncRNA played a role in the pathogenesis of HD, by regulating the corresponding target mRNA, participating in various biological processes like cell proliferation, differentiation, migration et al. **Conclusion:** There are many differentially expressed lncRNA and mRNA in HD intestines. mRNA and lncRNA are closely related, forming co-expression network. lncRNA may participate in the pathogenesis of HD through regulating the corresponding target mRNA.

【Key words】Hirschsprung's disease; lncRNA; mRNA

先天性巨结肠(Hirschsprung's disease, HD)又称肠无神经节细胞症, 是小儿最常见的消化道畸形

之一, 主要病理改变是在胚胎发育过程中的第 5~12 周, 神经嵴细胞迁移障碍导致末端肠壁区域神经节细胞缺失或功能异常^[1]。研究发现, HD 相关易感基因组主要有酪氨酸激酶受体(ret proto-oncogene, RET)、胶质细胞源性神经营养因子(glial cell derived neurotrophic factor, GDNF)、神经营养因子(neurturin, NRTN)、人类内皮素转化酶-1(endothelin converting

作者介绍: 罗 波, Email: 499164009@qq.com,

研究方向: 小儿先天性巨结肠病。

通信作者: 刘远梅, Email: yuanmei116@aliyun.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 81650029)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180517.1541.022.html>
(2018-05-18)

enzyme 1, ECE1)、内皮素 B 受体(endothelin receptor type B, EDNRB)、内皮素-3(endothelin 3, EDN3)、性别决定区 Y 基因相关高可变区基因-10(SRY related high mobility group-BoX gene10, SOX10)等^[2], 与 HD 密切相关的是 RET-GDNF 和 EDN3-EDNRB^[3-4]系统。这些因子共同作用形成了肠神经嵴细胞(gut neural crest cell, GNCC)迁移过程中复杂的调控网络^[5]。而长链非编码 RNA(lncRNA)作为近几年研究的热点, 已被证实细胞迁移、分化等过程中起着重要作用, 并参与神经细胞分化, 调控神经系统的生长发育^[6], 研究发现 lncRNA 可通过调控相关靶基因参与到神经干细胞分化和神经细胞的再生, 对神经细胞形态和特征的维持有着重要作用^[7], 而 HD 是与肠神经细胞迁移和分化密切相关的疾病, lncRNA 极有可能通过调控相关靶基因而参与 HD 的发病发展, 本研究就是通过芯片筛查及 qRT-PCR 验证 HD 中差异表达的 lncRNA 和 mRNA, 并进行生物信息学分析其参与 HD 发病的可能机制及临床意义。

1 材料和方法

1.1 标本收集

选取 2013 年 10 月至 2015 年 9 月就诊于遵义医学院附属医院小儿普胸泌外科, 年龄 ≤ 14 岁, 且术后病理结果诊断为 HD 的 17 名患儿的病变段以及相应的邻近段正常肠管标本, 术中切下的 HD 病变肠管及邻近段正常肠管放入液氮罐中转运, 后立即存放入 -80°C 冰箱中长期储存。本研究获得本院伦理委员会批准, 并征得患者及家属同意。

1.2 主要试剂与耗材

1.2.1 lncRNA-mRNA 共表达谱芯片 TRIzol Reagent(美国 Invitrogen 公司); 晶芯®生物芯片通用标记试剂盒(北京 CapitalBio); Cy3-dCTP、Cy5-dCTP(美国 GE Healthcare)等。

1.2.2 qRT-PCR Agilent one-color RNA Spike-in kit、Agilent two-color RNA Spike-in kit(美国 Agilent); miRNeasy Mini Kit(德国 QIAGEN); miScript II RT Kit(德国 QIAGEN); miScript SYBR Green PCR Kit(德国 QIAGEN)等。

1.3 试验方法

1.3.1 lncRNA-mRNA 共表达谱芯片 选用包含 40 914 条 lncRNA 检测探针和 34 235 条 mRNA 检测探针的晶芯人类 lncRNA V4.0 芯片。芯片探针囊括 GENCODE/ENSEMBL、lncRNAs、RefSeq、UCSC、NRED、RNA database 等主流 lncRNA 数据库。芯片筛查部分的 RNA 提取、探针设计、图像采集和数据分析等由北京博奥生物有限公司完成。

1.3.2 qRT-PCR 验证

1.3.2.1 总 RNA 提取及 cDNA 制备 将冻存的组织剪成绿豆大小, 在确保研钵中一直有液氮的状态下将标本研磨成粉, 加入 TRIzol 继续研磨, 恢复室温后转入玻璃匀浆器匀浆 3~5 min 后移至离心管, 参照 miRNeasy Mini Kit 标准操作进行提取总 RNA。提取完成后, 采用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性, Nanodrop1000 核酸蛋白测量仪检测总 RNA 浓度和纯度, 保证提取的 RNA 可以用于后续实验。之后按照 miScript II RT Kit 操作程序将总 RNA 全部逆转录为 cDNA, 长期保存于 -80°C 冰箱。

1.3.2.2 qRT-PCR 操作 采用 primer5.0 软件设计 5 个 lncRNA 引物, 并由广州吉赛公司进行验证并合成引物, 选取人 GAPDH 基因作为内参基因进行 qRT-PCR 验证。按 miScript SYBR Green PCR Kit 操作程序制备 qRT-PCR 的反应液, ABI7500 快速实时荧光定量仪进行扩增, 其扩增条件为: 90°C , 15 min 进行预热。 94°C 变性 5 s, 55°C 退火 30 s, 70°C 延伸 30 s(此步收集荧光), 循环 40 次。在此步骤中, 为保证结果可信, 每个 96 孔反应板均设置有试剂空白和水空白, 每个标本的每个 lncRNA 及内参基因检测均重复 3 孔, 并加做溶解曲线, 以确保没有非特异扩增现象, 保证 3 孔间 Ct 值差小于 0.05, 取 3 孔平均值, 不符合要求则重复实验。

1.4 数据处理和统计分析

1.4.1 芯片结果分析 采用 Agilent GeneSpring 软件进行层次聚类分析, 并以相关性 >0.99 或者相关性 <-0.99 , 并且 $P < 0.05$ 为标准筛选显著关联基因。应用 Cytoscape 软件生成共表达网络图, 再进行 lncRNA 靶基因预测, 采用 Gene Ontology 数据库对靶基因进行 GO 分析; 采用 KEGG、Biocarta 和 Pathway 等数据库对靶基因进行通路分析。

1.4.2 qRT-PCR 验证分析 应用 Excel 2007 对 qRT-PCR 结果进行数据处理, 其中 $C_t \text{ 目的基因} = (C_{t1} + C_{t2} + C_{t3})/3$ (复管), $\Delta C_t = C_t \text{ 目标基因} - C_t \text{ GAPDH}$, 以 $2^{-\Delta C_t}$ 代表 lncRNA 的相对表达量。

1.5 统计学处理

应用 SPSS 20.0 统计软件, 以中位数(四分位数)即 $[M(P_{25}, P_{75})]$ 表示 lncRNA 的表达水平, 采用两相关样本 Wilcoxon 符号秩和检验进行统计学分析, 检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 HD 肠管中差异表达的 lncRNA 和 mRNA

2.1.1 HD 肠管中存在大量差异表达的 lncRNA 和 mRNA 对 5 例 HD 病变肠管及与其配对的 5 例正常段肠管进行 lncRNA-mRNA 共表达谱芯片筛查, 以 Fold change(FC) >2 , $P < 0.05$ 为标准, 共筛选出 353 个表达上调, 474 个表达下调的 lncRNA, 部分差异表达 lncRNA 见表 1。同样, 以 $FC > 2$, $P < 0.05$ 为标准, 筛选出 865 个表达上调, 461 个表达下调的 mRNA, 部分差异表达 mRNA 见表 2。

表 1 表达上调前 5 位 lncRNA 及下调前 5 位的 lncRNA

lncRNA 名称	FC 值	P 值
上调 lncRNA		
TCONS_00029197	9.088	0.017
ENST00000458468.1	8.116	0.026
ENST00000438136.1	6.385	0.038
ENST00000445908.1	5.830	0.002
CDR1AS	5.811	0.004
下调 lncRNA		
XR_254335.1	5.187	0.002
XR_428160.1	4.770	0.010
uc022bvt.1	4.751	0.002
ENST00000579378.1	4.560	0.008
XR_109820.2	4.227	0.012

表 2 FC 表达上调前 5 位的 mRNA 和下调前 5 位的 mRNA

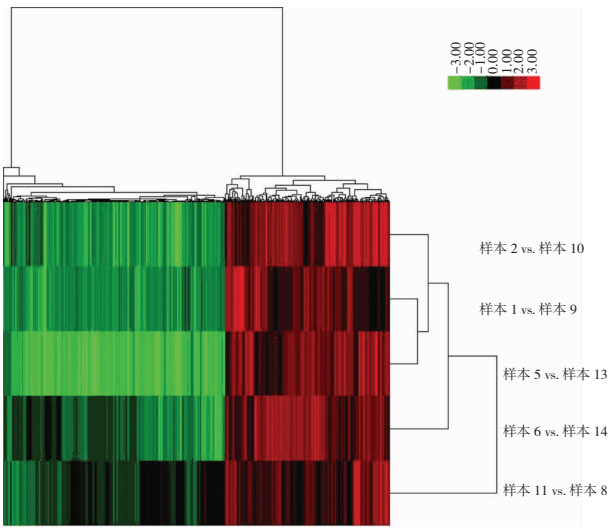
mRNA 名称	FC 值	P 值
上调 mRNA		
apolipoprotein D	16.165	0.000
microfibrillar associated protein 5	15.770	0.001
mucin 4, cell surface associated	15.254	0.038
insulin-like growth factor 2	10.604	0.038
calpain 6	10.492	0.036
下调 mRNA		
keratin associated protein 4-11	5.013	0.005
otopetrin 1	4.722	0.005
dopamine receptor D5	4.209	0.010
tripartite motif-containing 51	4.003	0.009
harakiri, BCL2 interacting protein	3.691	0.005

2.1.2 qRT-PCR 验证出 5 个在 HD 中差异表达的 lncRNA 从芯片筛查中,随机选择 5 个差异表达显著的 lncRNA,以 17 例病变肠管和与其相配对的 17 例正常段肠管为样本,进行 qRT-PCR 验证,数据分析采用两相关样本 Wilcoxon 符号秩和检验,结果见表 3。5 个 lncRNA 中,1 个下调的 lncRNA (ENST00000579378.1),4 个上调的 lncRNA (ENST00000455286.1、ENST00000445908.1、TCONS_00029197 和 ENST00000438136)的 P 值均小于 0.01,差异具有统计学意义。

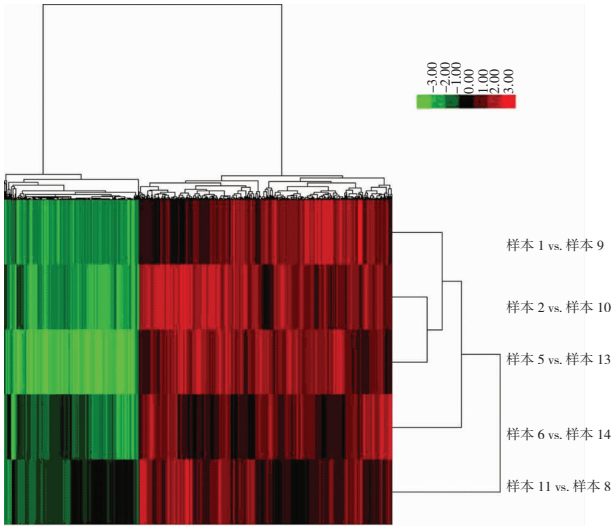
2.2 HD 肠管中的 lncRNA 和 mRNA 的聚类分析结果

分别对 lncRNA-mRNA 共表达谱芯片中差异表达的

lncRNA 和 mRNA 进行层次聚类分析,这些纳入研究的 lncRNA 和 mRNA 分别被分为两个部分,左边以低表达基因(绿色表示)为主,右边以高表达(红色表示)为主,且 $FC>2$, $P<0.05$,黑色代表 $P<0.05$ 的基因。其热图如图 1 所示,可以看出两相关样本差异较大,且同组样本间基因表达趋势一致。



A. lncRNA 聚类分析图



B. mRNA 聚类分析图

图 1 lncRNA 和 mRNA 的层次聚类图

表 3 5 个 lncRNA 的验证结果 [$M(P_{25}, P_{75})$]

lncRNA 名称	HD 肠管	正常肠管	Z 值	P 值
ENST00000579378.1	0.110 (0.015, 0.256)	0.413 (0.103, 0.888)	-3.621	0.000
ENST00000455286.1	0.448 (0.134, 0.610)	0.055 (0.032, 0.105)	-3.621	0.000
ENST00000445908.1	0.815 (0.218, 1.581)	0.146 (0.022, 0.262)	-3.621	0.000
TCONS_00029197	0.389 (0.197, 0.760)	0.122 (0.049, 0.374)	-3.479	0.001
ENST00000438136.1	0.468 (0.149, 0.956)	0.181 (0.056, 0.460)	-3.243	0.001

2.3 芯片结果的生物信息学分析

2.3.1 lncRNA-mRNA 共表达网络的构建 以相关性>0.99 或者<-0.99,且 $P<0.05$ 为筛选标准,筛选出显著的共表达基因对,通过 Cytoscape 软件生成最终的共表达网络图(图 2),其中黄色的圆点表示 lncRNA,绿色的圆点表示 mRNA,圆点的大小表示该基因在网络中的度(邻居个数),红线表示正相关关系,蓝线表示负相关关系。可见 lncRNA 与 mRNA 相互作用,形成复杂的调控网络,其中 RNA147811p0915_imsncRNA 740 具有最多的 mRNA 相关个数,与 43 个 mRNA 相联系。

2.3.2 lncRNA 的靶基因预测 在 lncRNA 与 mRNA 共表达网络图(相关性>0.99 或者<-0.99,且 $P<0.05$)的基础上,寻找基因组位置在 10 kb 之内的 lncRNA-mRNA 对(cis-预测),利用 blat 工具对 lncRNA 和 mRNA(3'UTR)序列进行比对(trans-预测),共筛选出 10 对序列相似的 lncRNA-mRNA,见表 4。

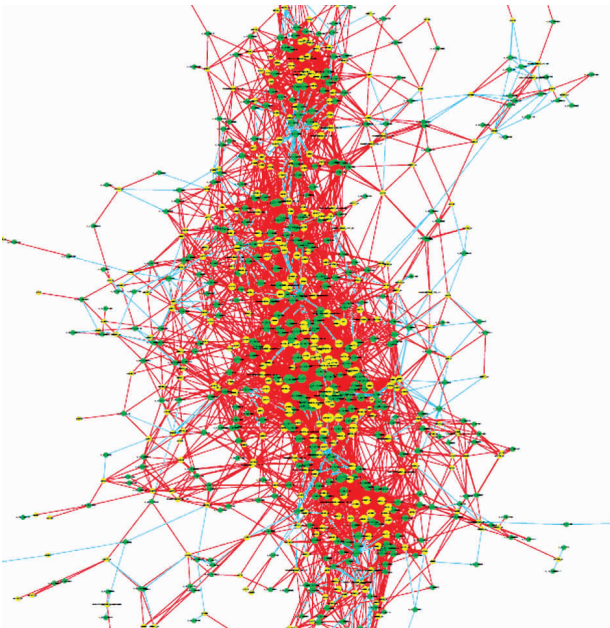


图 2 lncRNA-mRNA 共表达网络结构

2.3.3 预测靶基因的 GO 分析和通路分析 对这 10 个 lncRNA 的预测靶基因进行 GO 分析,即分析其分子功能(molecular function)、细胞组分(cellular component)及生物学过程(biological process),最终得出富集最显著的 30 个 GO 条目,如图 2 所示,包括色素颗粒定域的确立、谷胱甘肽衍生物的生物合成、谷氨酸代谢、受体再循环、谷胱甘肽衍生物的代谢、多肽的生物合成进程,这些过程与细胞的增殖、分化和迁移等密不可分。采用 KOBAD(KEGG Orthology Based Annotation System)软件对靶基因进行通路分析,该软件对 7 个通路数据库(KEGG Pathway、PID Curated、PID BioCarta、PID Reactome、BioCyc、Reactone 和 Panther)进行了分析,最终富集到硫氨基酸代谢途径、 γ -谷氨酸循环途径、谷胱甘肽合成和循环途径谷胱甘肽结合途径、抗利尿激素依赖的水重吸收途径和谷胱甘肽代谢途径、 γ -谷氨酰(基)转肽酶途径、5-羟脯氨酸酶缺乏途径、高蛋白血症途径、腺苷酸活化蛋白激酶途径(AMPK 信号途径)等通路。

3 讨论

本实验通过 lncRNA-mRNA 共表达芯片筛选出 HD 病变肠管中存在大量差异表达的 lncRNA 和 mRNA,并通过 qRT-PCR 验证了 5 个差异表达的 lncRNA。如此多差异表达的 lncRNA 和 mRNA 在 HD 病变肠管中出现,说明 lncRNA 和 mRNA 之间具有广泛的联系,形成复杂的共表达网络,lncRNA 可能通过调控相应的靶 mRNA,影响肠细胞的增殖、分化和迁移等多种生物学功能参与 HD 的发病。此外,鉴于 HD 受多因素调控,发病原因复杂,需要从整体上进行研究,找出差异中的共同点来进一步研究。其中芯片筛查高表达的 mRNA:人类母系表达基因-3(maternally expressed 3,MEG3)被认为是一种抑癌基因,在多种侵袭性肿瘤组织中表达量明显

表 4 lncRNA 靶基因预测结果

lncRNA	靶 mRNA	相关性	P 值
CTD-2377D24.6	Hs.599877/ENST00000492522	0.990	0.001
uc021uof.1	RAB11B	0.997	0.000
BDNF-AS	GCLM	0.990	0.001
NR_110073.1	LINC00454	0.997	0.000
ENST00000445808.1	LOC101930240	0.999	0.000
ENSG00000225559.1	Hs.583543/ENST00000413567	1.000	0.000
ENST00000412295.2	Hs.628674/ENST00000412295	1.000	0.000
TCONS_00029706	PAPL	0.991	0.001
ENST00000529488.1	KRTAP9-6	0.993	0.001
CTD-2619J13.14	LOC102723931	0.997	0.000

降低甚至缺失,可以在体外抑制肿瘤细胞生长^[8],但目前未见该基因在 HD 中表达情况的报道。而芯片中高表达的 lncRNA,即叉头蛋白相邻非编码 RNA (FOXF1 adjacent non-coding developmental regulatory RNA, FENDRR),有报道发现其在胃癌组织和胃癌细胞系中表达较正常胃组织明显下调,并且其低表达和胃癌的侵袭性、淋巴转移都有显著关系^[9]。可见 MEG3 和 FENDRR 在 HD 中的高表达,可能通过影响肠神经节细胞的增殖、分化和迁移等功能参与 HD 的发病,但仍需要进一步实验来证实。而 lncRNA-mRNA 共表达网络图显示出 lncRNA 和 mRNA 间存在广泛联系, lncRNA 可能通过调控靶 mRNA 参与 HD 的发病。其中,脑源性神经营养因子反义 RNA (BDNF Antisense RNA, BDNF-AS) 的预测靶基因为谷氨酸半胱氨酸连接酶修饰亚基 (glutamate-cysteine ligase modifier subunit, GCLM),有报道显示 GCLM 表达的沉默可以提升细胞内的活性氧,进而影响细胞的凋亡和坏死^[10],但其参与 HD 发病的具体机制仍需进一步研究。而 BDNF 是已被证实的 BDNF-AS 靶基因^[11], BDNF 表达的改变可以影响神经活性, BDNF 及其周围的基因印记与抑郁症、精神分裂症、帕金森病等人类精神异常疾病相关^[12]。

循环 lncRNA 作为近几年来研究的热点,由组织细胞分泌、凋亡、坏死等释放入体液中,其表达具有时空特异性,且不受内源性 Rnase 降解,具有取材方便、无创、易临床推广等优点^[13-14]。本实验充分证实了 HD 病变肠管组织中存在大量差异表达的 lncRNA,而其在体液,尤其是血液中的表达尚未进行研究,在以后的实验中,将进一步研究 lncRNA 在外周血中的表达情况,以便发掘 HD 早期诊断、病情评估、治疗及预后的生物标志物。本实验从一种新的视角对 HD 的发病进行了探索,但欠缺对更多 lncRNA 和 mRNA 在更大样本上的验证。实验通过生物信息学得出分析,但未进行功能验证。课题组将会进一步从差异明显的 lncRNA 和 mRNA 中筛选出与 HD 发病机制联系更紧密、特异性更高的进行表达量验证和功能探索,扩大样本检测 lncRNA 并建立诊断模型,深层次地研究 lncRNA 在 HD 中的作用机制。同时检测外周血中 lncRNA 的表达情况,评估其作为生物标志物的特异性和敏感性。

参 考 文 献

- [1] 向磊,李娜萍,武海燕,等. 先天性巨结肠及其同源病诊断热点讨论[J]. 中华小儿外科杂志,2016,35(7):248-252.
- [2] Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*[J]. Cell, 1993, 75(5):855-862.
- [3] Zamore PD, Haley B. Ribo-gnome: the big world of small RNAs[J]. Science, 2005, 309(5740):1519-1524.
- [4] Uhlmann S, Zhang JD, Schwäger A, et al. miR-200bc/429 cluster targets PLC gamma1 and differentially regulates proliferation and EGF-driven invasion than miR-200a/141 in breast cancer[J]. Oncogene, 2010, 29(30):4297-4306.
- [5] Korpai M, Lee ES, Hu G, et al. The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cell migration by direct targeting of E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2[J]. J Biol Chem, 2008, 283(22):14910-14914.
- [6] Haemmerle M, Gutschner T. Long non-coding RNAs in cancer and development: where do we go from here?[J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(1):1395-1405.
- [7] Williamson KA, Hever AM, Rainger J, et al. Mutations in SOX2 cause anophthalmia-esophageal-genital (AEG) syndrome[J]. Hum Mol Genet, 2006, 15(9):1413-1422.
- [8] Zhang X, Zhou Y, Mehta KR, et al. A pituitary-derived MEG3 isoform functions as a growth suppressor in tumor cells[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2003, 88(11):5119-5126.
- [9] Xu TP, Huang MD, Xia R, et al. Decreased expression of the long non-coding RNA FENDRR is associated with poor prognosis in gastric cancer and FENDRR regulates gastric cancer cell metastasis by affecting fibronectin expression[J]. J Hematol Oncol, 2014, 7:63.
- [10] Liu M, Zhao Y, Zhang X. Knockdown of glutamate cysteine ligase catalytic subunit by siRNA causes the gold nanoparticles-induced cytotoxicity in lung cancer cells[J]. PLoS One, 2015, 10(3):e0118870.
- [11] Pruunsild P, Kazantseva A, Aid T, et al. Dissecting the human BDNF locus: bidirectional transcription, complex splicing, and multiple promoters[J]. Genomics, 2007, 90(3):397-406.
- [12] Liu QR, Walther D, Drögen T, et al. Human brain derived neurotrophic factor (BDNF) genes, splicing patterns, and assessments of associations with substance abuse and Parkinson's Disease[J]. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, 2005, 134B(1):93-103.
- [13] El-Hefnawy T, Raja S, Kelly L, et al. Characterization of amplifiable, circulating RNA in plasma and its potential as a tool for cancer diagnostics[J]. Clin Chem, 2004, 50(3):564-573.
- [14] García JM, García V, Peña C, et al. Extracellular plasma RNA from colon cancer patients is confined in a vesicle-like structure and is mRNA-enriched[J]. RNA, 2008, 14(7):1424-1432.

(责任编辑:方 济)