

本文引用：丁素玲，张志伟，杨茜洋，等. 单核苷酸多态 rs386585341 影响 miR-499a-3p 下游调控免疫和血管新生的网络[J]. 中国动脉硬化杂志, 2022, 30(4): 295-303.

[文章编号] 1007-3949(2022)30-04-0295-09

· 动脉粥样硬化与免疫炎症专栏 ·

单核苷酸多态 rs386585341 影响 miR-499a-3p 下游调控免疫和血管新生的网络

丁素玲¹, 张志伟², 杨茜洋¹, 朱宝玲³, 张伟伟¹, 王翔飞¹, 杨向东^{1,3,4}

(1. 复旦大学附属中山医院心血管研究所, 2. 复旦大学附属中山医院生殖医学中心, 3. 复旦大学生物医学研究院, 上海市 200032; 4. 复旦大学附属中山医院吴淞医院心内科, 上海市 200940)

[关键词] 单核苷酸多态性；微小 RNA-499a；生物信息学；靶基因

[摘要] 目的 发生在 microRNA 基因前体或成熟序列或靶基因 3' 非翻译区结合位点的单核苷酸多态性 (SNP) 可能通过影响 microRNA 对靶基因的识别调控过程, 参与许多疾病如肿瘤、神经系统疾病、肌肥大、心血管疾病等的发生发展过程。本研究采用生物信息学技术分析位于 miR-499a-3p 种子序列第 4 位的 SNP rs386585341 A>G 可能影响生物学过程及信号通路。方法 应用 RNAfold 数据库预测 rs386585341 A>G 是否影响 pre-miR-499a 的二级结构, 分别构建 pre-miR-499a-A 和 pre-miR-499a-G 过表达质粒检测 rs386585341 A>G 是否影响成熟 miR-499a 的表达, 利用基因表达谱芯片和生物信息学分析 rs386585341 A>G 对 miR-499a-3p 功能的影响, 取差异基因表达谱和 TargetScan 靶基因交集, 分析 rs386585341 不同等位点 miR-499a-3p-A 和 miR-499a-3p-G 靶基因差异。结果 rs386585341 A>G 不影响 pre-miR-499a 的二级结构, 也不影响成熟 miR-499a-5p 和 miR-499a-3p 的表达水平, 但影响成熟 miR-499a-3p 调控的靶基因网络。取差异表达基因 (DEG) 谱行 GO 和 pathway 分析, 发现 miR-499a-3p-A 和 miR-499a-3p-G 展示不同的生物学功能, miR-499a-3p-A 的下游基因网络主要富集在免疫调控方面, 而 miR-499a-3p-G 的下游基因网络主要富集在血管新生方面; 下调表达基因和 TargetScan 靶基因交集分析得到 4 个 miR-499a-3p-A 直接靶基因 (Spry2、Penx1、Ndufa5 及 Tcf7l2), 而未能得到 miR-499a-3p-G 直接靶基因, 提示 miR-499a-3p 种子区域第 4 号位由 A 转换成 G 后, 调控靶基因方式可能由促进靶基因 mRNA 的降解转换为仅抑制靶基因的蛋白翻译。结论 rs386585341 A>G 可能通过影响 miR-499a-3p 下游调控网络在免疫和血管新生方面发挥功能。

[中图分类号] Q81

[文献标识码] A

Single nucleotide polymorphism rs386585341 affects the downstream network of miR-499a-3p on immunity and angiogenesis

DING Suling¹, ZHANG Zhiwei², YANG Xiyang¹, ZHU Baoling³, ZHANG Weiwei¹, WANG Xiangfei¹, YANG Xiang-dong^{1,3,4}

(1. Institute of Cardiovascular Diseases, Affiliated Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China; 2. Reproductive Medicine Centre, Zhongshan Hospital, Affiliated Fudan University, Shanghai 200032, China; 3. Fudan University Institute of Biomedical Science, Shanghai 200032, China; 4. Department of Cardiology, Wusong Hospital, Affiliated Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200940, China)

[KEY WORDS] single nucleotide polymorphism; microRNA-499a; bioinformatics; target gene

[ABSTRACT] Aim Single nucleotide polymorphisms (SNP) occurring in the precursor or mature sequences of microRNA or in their binding sites on 3' untranslated region of target genes may participate in the occurrence and development of many diseases, such as tumor, nervous system diseases, muscle hypertrophy, cardiovascular diseases and so on. In this study, bioinformatics technology was used to analyze the biological processes and signal pathways that may be affected

[收稿日期] 2021-12-11

[修回日期] 2022-02-07

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81970214, 82170258); 上海市科委基础研究项目(19JC1411400); 上海市科委实验动物研究领域项目(19140902000)

[作者简介] 丁素玲, 博士, 副研究员, 研究方向为心血管疾病分子机制研究, E-mail 为 dingsuling1984@163.com。通信作者杨向东, 博士, 研究员, 研究方向为心血管疾病分子机制和防治研究, E-mail 为 yangxiangdong_zs@163.com。

by SNP rs386585341 A>G located at the fourth position of miR-499a-3p seed sequence. was used to predict whether rs386585341 A>G would affect the secondary structure of pre-miR-499a. Pre-miR-499a-A and pre-miR-499a-G overexpression plasmids were constructed respectively to detect whether rs386585341 A>G would affect the expression of mature miR-499a. Gene expression microarray and bioinformatics were used to analyze the effect of rs386585341 A>G on the function of miR-499a-3p, then take the intersection of differential gene expression profile and TargetScan target gene, and analyze the divergence of target genes of miR-499a-3p with different alleles of rs386585341 A>G.

Results rs386585341 A>G did not affect the secondary structure of pre-miR-499a, nor the expression levels of mature miR-499a-5p and miR-499a-3p, but affected the target gene network regulated by mature miR-499a-3p. The results of GO and pathway analysis of differentially expressed genes (DEG) showed that miR-499a-3p-A and miR-499a-3p-G showed different biological functions. The downstream gene network of miR-499a-3p-A was mainly enriched in immune regulation, while the downstream gene network of miR-499a-3p-G was mainly enriched in angiogenesis. The 4 target genes of miR-499a-3p-A including Spry2, Pcnx, Ndufa5 and Tcf7l2, were obtained by intersect analysis of down-regulated genes and TargetScan target genes, but the direct target genes of miR-499a-3p-G were not obtained. It indicated that after the miR-499a-3p seed region fourth was converted from A to G by rs386585341, the target gene formula of miR-499a-3p could be transformed from the degradation of target gene mRNA to the protein translation that only inhibits target genes.

Conclusion rs386585341 A>G may play important roles in immune differentiation and angiogenesis by affecting the downstream network of miR-499a-3p.

微小 RNA (microRNA, miRNA) 是长度约 20~24 bp 的非编码 RNA, 其 5' 端第 2~7 个核苷酸(种子序列)通过与 mRNA 3' 非编码区 (3' untranslated region, 3'UTR) 序列完全互补识别靶基因进入 RNA 诱导沉默复合物 (RNA induced silencing complex, RISC), 诱导靶基因 mRNA 降解和/或翻译抑制, 是细胞内一种重要的在转录后水平调控基因表达的方式^[1]。miRNA 分布广泛, 参与细胞基因组上 30% 编码基因的转录后调控, 涉及体内一系列的复杂生物学过程。因此, 研究 miRNA 的功能及作用机制有重要意义, 已成为生物医学领域中一个重要的研究方向。

遗传变异包括从单个核苷酸引起的变异到染色体异常。随着大规模全基因组扫描技术的发展, 遗传标记单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 被发现可通过调控基因表达引起个体在生理、药理和病理上的表现差异, 导致个体对疾病不同的易感性, 与许多疾病都存在显著的相关性^[2-3]。但以往多数研究主要关注的是位于编码基因序列上的 SNP 与疾病的关系。近年越来越多的研究表明, 发生在基因 3'UTR 的 SNP 与人类疾病密切相关, 其分子机制在于它位于 miRNA 参与转录后调控的结合位点^[4-5], 结合 miRNA 的作用方式, 提示 miRNA 基因内的 SNP 和靶基因 mRNA 与 miRNA 结合位点序列的 SNP 可能通过影响基因的转录后调控参与人类疾病的发生发展进程。SNP 可以发生在 miRNA 基因的任何地方, 如编码成熟 miRNA、pre-miRNA 或 pri-miRNA 基因组的 DNA 序列中^[6]。

Methods RNAfold database

Pre-miR-499a-A

Pre-miR-499a-G

TargetScan target gene

Differential gene expression profile

rs386585341 A>G

GO and pathway analysis

Differentially expressed genes (DEG)

miR-499a-3p-A and miR-499a-3p-G

miR-499a-5p and miR-499a-3p

Spry2, Pcnx, Ndufa5 and Tcf7l2

rs386585341

miR-499a-3p

target gene formula

target gene mRNA

protein translation

inhibits target genes

其中发生在成熟 miRNA 种子区域 (第 2~7 位核苷酸) 的 SNP 可能会导致生成新的 miRNA 或影响 miRNA 与靶基因结合, 减弱 miRNA 对靶基因的抑制效应, 使其生物学功能发生改变。可见, miRNA 碱基序列的完整和精确对 miRNA 的剪切成熟和功能行使都至关重要。因此, 研究位于 miRNA 序列上的 SNP 具有重要的潜在生物学意义。

pre-miR-499a 基因序列在哺乳动物中高度保守, 其转录后被剪切形成 miR-499a-5p 和 miR-499a-3p 发挥功能, miR-499a-5p 已被报道在心肌和肿瘤中具有抗凋亡作用^[7-9], 但 miR-499a-3p 的功能尚不清楚。有研究发现 miR-499a-3p 水平在不稳定型心绞痛患者血清中增高^[10], 但其升高的效应和机制不详。rs386585341 是一个位于 hsa-miR-499a-3p 种子区域第 4 位的 SNP, 其是否参与了人类心血管疾病的发生发展目前尚未有探讨, 探索其对 hsa-miR-499a 剪切和 miR-499a-3p 功能的影响将有助于找到其潜在关联的疾病, 为可能与 rs386585341 相关疾病的精准医疗提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

人胚肾 293T 细胞 (HEK293 细胞) 和大鼠心肌细胞系 (H9c2) 购自美国 ATCC 细胞库; 成熟 miR-499a-3p-A 和 miR-499a-3p-G 购自上海吉玛生物科技有限公司; pSilencer 4.1-CMV neo 载体购自 Invitrogen 公司; 转染试剂 Lipofectamine²⁰⁰⁰ 购自

Thermo Fisher Scientific 公司; 荧光定量 PCR 仪购自瑞士 Roche 公司;cDNA 合成[Hifair® III 1st Strand cDNA Synthesis Kit(gDNA digester plus)]和荧光定量试剂(Hifair® qPCR SYBR® Green Master Mix)购于上海翊圣生物科技有限公司。

1.2 hsa-pre-miR-499a rs386585341 位点不同基因型过表达载体的构建

根据人源 pre-miR-499a 基因的序列及 rs386585341 多态性位点的序列, 分别合成携带等位基因 A 和 G 的 pre-miR-499a 及其 5' 和 3' 侧翼区域(50 bp)的 222 bp DNA 片段, 插入到 pSilencer 4.1-CMV neo 载体 BamH I 和 Hinf III 位点, 构建 has-pre-miR-499a 基因 rs386585341 A 和 G 位点的过表达载体, 分别标记为 pS4. 1-pre-miR-499a-A、pS4. 1-pre-miR-499a-G, 测序验证两种过表达载体的序列正确且区别仅在 SNP 位点。

1.3 细胞转染

取对数生长期 HEK293 细胞, 以 2×10^5 个/皿接种至 6 cm 细胞培养皿, 置于 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱培养。随机将细胞分为对照组、pS4. 1-pre-miR-499a-A 组、pS4. 1-pre-miR-499a-G 组, 当细胞生长汇合 70% 以上时, 按 Lipofectamine²⁰⁰⁰ 说明, 分别转染 3 ng pS4. 1-pre-miR-499a-A、pS4. 1-pre-miR-499a-G 质粒, 对照组除无质粒外其他操作同步, 置于 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱继续培养, 8 h 后更换新的培养基, 继续培养 24 h 后收集细胞, Trizol 法提取 RNA。取对数生长期 H9c2 细胞, 以 3×10^5 个/皿接种至 6 cm 细胞培养皿, 置于 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱培养。随机将细胞分为 miRNA-NC 组 (CON 组)、miR-499a-3p-A 组、miR-499a-3p-G 组, 当细胞生长汇合 70% 以上时, 按 Lipofectamine²⁰⁰⁰ 说明, 分别转染 40 nmol/L miRNA-NC、miR-499a-3p-A、miR-499a-3p-G, 置于 37°C、5% CO₂ 的细胞培养箱继续培养, 8 h 后更换新的培养基, 继续培养 36 h 后收集细胞, Trizol 法提取 RNA。

1.4 实时荧光定量 PCR 检测 miR-499a-5p 和 miR-499a-3p 表达水平

使用 Trizol 法提取总 RNA 后, 按 Hifair® III 1st Strand cDNA Synthesis Kit(gDNA digester plus)说明书步骤, 先去除 gDNA(在 RNase-free 离心管中加入 3 μL 5×gDNA digester Mix、1 μg Total RNA, 补充 RNase-free ddH₂O 至 15 μL, 42 °C 处理 2 min), 再将待测 RNA 反转录成 cDNA。反转录体系: 15 μL 上一步的反应液、2 μL 10×Hifair® III Super Buffer、

1 μL Hifair® III RT Enzyme Mix、1 μL 反转录引物(50 μmol/L), 补充 RNase-free ddH₂O 至 20 μL。反应程序: 25 °C、5 min, 55 °C、15 min, 85 °C、5 min。反转录完毕后储存在 -20 °C 冰箱中备用。以此 cDNA 为模板, 用 Hifair® qPCR SYBR® Green Master Mix 进行实时荧光定量 PCR。反应体系: 10 μL 2×Hieff® qPCR SYBR Green Master Mix 5、0.4 μL Forward Primer (10 μmol/L)、0.4 μL Reverse Primer (10 μmol/L)、1 μL 模板 cDNA, 补充无菌超纯水至 20 μL。PCR 程序: 95 °C、5 min, 95 °C、10 s, 60 °C、30 s, 40 个循环。以 U6 为内参, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值表示 miRNA 的相对表达水平。实验重复 3 次。miR-499a-5p 反转录引物序列为 5'-GTCGTATCCAGT-GCGTGTGAGTCGGCAATTGCACTGGATAACGA CAAACATC-3', qPCR 正向引物序列为 5'-CTTGCA GTGATGTTGTCG-3', 反向引物序列为 5'-CTGAG-GTGCTGTGCGTGA-3'; miR-499a-3p 反转录引物序列为 5'-GTCGTATCCAGTGCCTGCGTGGAGTCGG CAATTGCACTGGATAACGACAGCACAG-3', qPCR 正向引物序列为 5'-AAGTCTGTGCTGCGTATCC-3', 反向引物序列为 5'-CTGAGGTGCTGTGCGTGA-3'; U6 正向引物序列为 5'-GCTTCGGCAGCACATATA CTAA-3', 反向引物序列为 5'-AACGCTTCACGAATT TGCCT-3'。

1.5 表达谱芯片实验及数据分析

细胞分别转染 miRNA-NC、miR-499a-3p-A、miR-499a-3p-G 到时间点后, 按操作规程提取细胞总 RNA, 紫外线分光光度计测定样本 RNA 在 230 nm、260 nm 和 280 nm 处的吸光度(absorbance, A)值, 得到其 $A_{260\text{ nm}/280\text{ nm}}$ 值、 $A_{260\text{ nm}/230\text{ nm}}$ 值, 以计算样本浓度并评估纯度; 并使用琼脂糖凝胶电泳检测样本 RNA 的纯度及完整性。RNA 反转录生成 cDNA, Cy3 标记 cDNA; 基因芯片杂交与洗涤; 共聚焦扫描 Phalanx 表达谱芯片结果, 原始数据用 Command Console Software 4.0 读取, 质控合格的数据归一化处理采用 Gene Spring Software 11.0 以 RMA 法计算。差异基因筛选标准为上调或下调倍数变化值 ≥ 2.0 且 $P \leq 0.05$ 。实验由上海卓立生物科技有限公司完成。各组之间的差异表达基因(differentially expressed genes, DEG) 使用在线数据分析和可视化平台 <http://www.bioinformatics.com.cn> 行 GO 功能和 KEGG 信号通路富集分析。该平台依据 GO 分析网站和 DAVID 数据库对基因集进行功能富集分析, 依据 KEGG 数据库进行信号通路富集分析, 得到基因集在 GO 类别上的高频率注释及 $P < 0.05$ 的信号

通路。

1.6 miR-499a-3p-A、miR-499a-3p-G 靶基因预测

从 http://www.targetscan.org/cgi-bin/targetscan/data_download.cgi?db=vert_50 下载 TargetScan 软件, 将解压后的文件利用 xftp 传到服务器 xshell 使用, 根据 miR-499a-3p-A、miR-499a-3p-G 不同的种子区域序列, 分别获得其潜在调控的靶基因列表。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件对数据进行分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间两两比较采用 LSD-t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 rs386585341 A>G 不影响成熟 miR-499a-5p 和 miR-499a-3p 的表达

从 Gene 数据库调取 hsa-pre-miR-499a 的 DNA

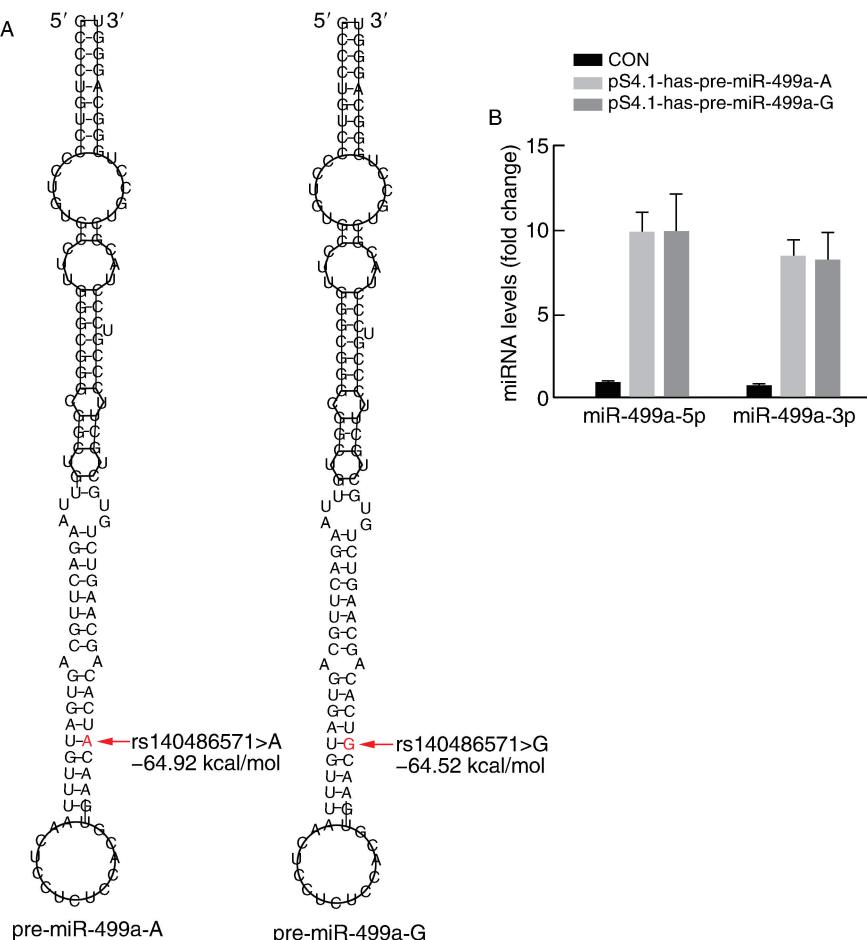


图 1. rs386585341 不影响 miR-499a 的剪切成熟

Figure 1. rs386585341 did not affect the shear and maturation of miR-499a

序列, 使用 RNAfold 预测 rs386585341 A>G 是否影响 hsa-pre-miR-499a 的二级结构。如图 1A 所示, rs386585341 A>G 并不影响 hsa-pre-miR-499a 的二级结构, has-pre-miR-499a-A 和 has-pre-miR-499a-G 的最低自由能也没有显著差异。分别构建含 rs140486571>A 或>G 位点的过表达 hsa-pre-miR-499a 的载体 pS4.1-pre-miR-499a-A 和 pS4.1-pre-miR-499a-G, 取 3 ng 使用转染试剂 lipofectamine²⁰⁰⁰ 分别转入汇合度长到 70% 的 HEK293T 细胞中, 8 h 后更换新鲜培养基, 继续培养 24 h, Trizol 法提取 RNA, 经实时荧光定量 PCR 分别检测 miR-499a-5p 和 miR-499a-3p 在对照组、pS4.1-pre-miR-499a-A 组和 pS4.1-pre-miR-499a-G 组的表达水平。结果显示, miR-499a-5p 在 pS4.1-pre-miR-499a-A 组和 pS4.1-pre-miR-499a-G 组的表达水平无明显差异, miR-499a-3p 的表达同样无明显差异(图 1B)。

2.2 rs386585341 A>G 影响成熟 miR-499a-3p 调控的下游基因网络

miRNA 主要通过其 5' 端第 2 ~ 7 位种子区域序列识别靶基因,而 rs386585341 A>G 位于 miR-499a-3p 编码序列 5' 端第 4 位,为验证 rs386585341 A>G 是否影响 miR-499a-3p 的功能,40 nmol/L 的 miR-499a-3p-A 和 miR-499a-3p-G 分别使用 lipofectamine²⁰⁰⁰ 转入汇合度长到 70% 的 H9c2 细胞中,8 h 后更换新鲜培养基,继续培养 36 h,Trizol 法提取 RNA,送上海卓立

生物科技有限公司行基因表达谱芯片检测。结果显示,rs386585341 A>G 对成熟 miR-499a-3p 的下游基因表达谱有显著影响(图 2A)。与对照组 mimic-NC (CON) 相比,miR-499a-3p-A 组有 26 个基因表达上调,35 个基因表达下调;miR-499a-3p-G 组有 33 个基因表达上调,134 个基因表达下调。miR-499a-3p-G 组与 miR-499a-3p-A 组相比,基因表达谱同样有显著变化,其中 66 个基因表达上调,125 个基因表达下调(图 2B 和 2C)。

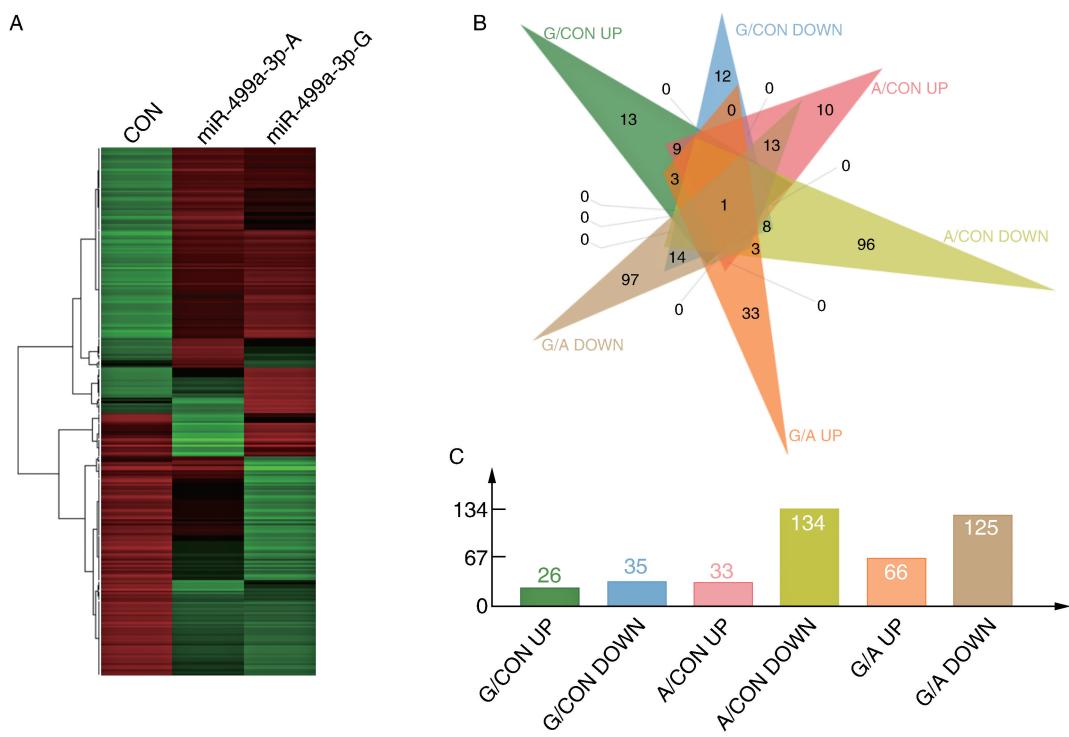


图 2. 基因表达谱芯片检测 rs386585341 A>G 对 miR-499a-3p 下游调控基因表达的影响

Figure 2. The effect of rs386585341 A>G on the expression of downstream regulatory genes of miR-499a-3p was detected by gene expression profiling chip

2.3 差异表达基因经 GO 功能和 KEGG 信号通路分析预测 miR-499a-3p-A 和 miR-499a-3p-G 的潜在功能

与对照组相比,miR-499a-3p-A 组差异基因 GO 功能主要富集在对外界刺激反应的积极调节、单核细胞趋化性的正调控、ERK1 和 ERK2 级联反应通路、一氧化氮代谢过程的正调控($P < 0.05$; 图 3A)。与对照组相比,miR-499a-3p-G 组差异基因 GO 功能主要富集在血管生成、肽酰酪氨酸磷酸化及血管发育的正调控等生物学过程和功能上($P < 0.05$; 图 3B)。对差异基因集进行 KEGG 信号通路富集分析,结果显示,miR-499a-3p-A 组差异基因富集在类

风湿性关节炎、阿米巴病、疟疾、利什曼病、吞噬体、白细胞经内皮迁移、造血细胞系、金黄色葡萄球菌感染、FcγR 介导吞噬作用、细胞黏附分子等通路中($P < 0.05$),而 miR-499a-3p-G 组差异基因富集在 RNA 降解、造血细胞系、类风湿性关节炎、阿米巴病四条通路中($P < 0.05$; 图 3C 和 3D)。

2.4 差异表达基因 GO 功能和 KEGG 信号通路分析 miR-499a-3p-A 和 miR-499a-3p-G 的功能差别

GO 功能富集分析发现,miR-499a-3p-A 组与 miR-499a-3p-G 组差异表达基因主要富集在对病毒的防御反应、RNA 聚合酶Ⅲ对转录的调控、细胞对 α 干扰素的反应、负离子转运的负调控、蛋白多糖生

物合成过程等生物学过程和功能上 ($P < 0.05$; 图 4A)。KEGG 信号通路富集分析发现, miR-499a-3p-A 组与 miR-499a-3p-G 组差异基因主要富集在糖胺聚糖生物合成硫酸肝素/肝素、糖胺聚糖生物合

成硫酸软骨素/硫酸皮肤素、半乳糖代谢、白细胞经内皮迁移、大肠癌、丙型肝炎、PPAR 信号通路等方面 ($P < 0.05$; 图 4B)。

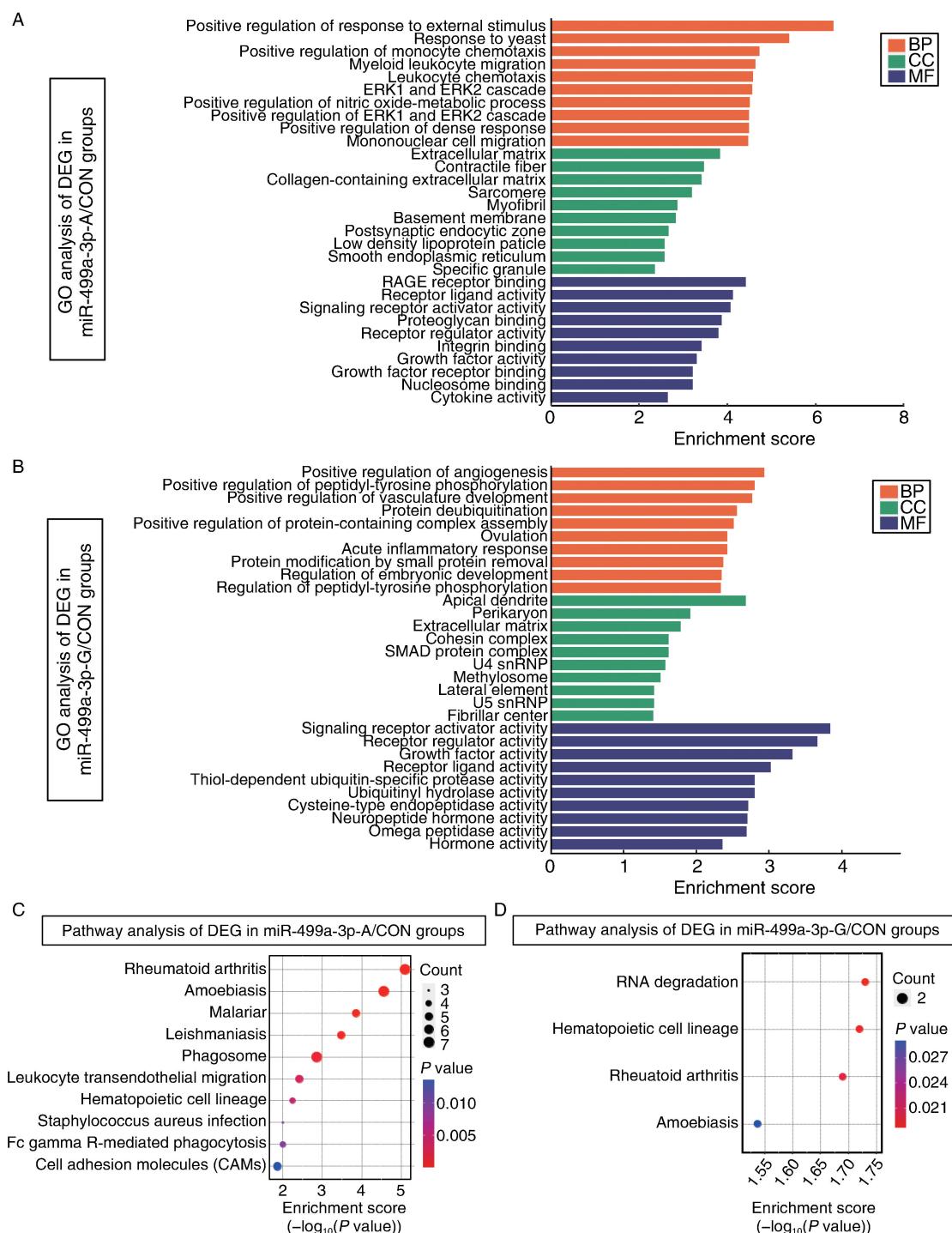


图 3. GO 功能和 KEGG 通路富集分析 miR-499a-3p-A 和 miR-499a-3p-G 的差异调控基因

Figure 3. GO function and KEGG pathway enrichment analysis of different expressed genes regulated by miR-499a-3p-A and miR-499a-3p-G

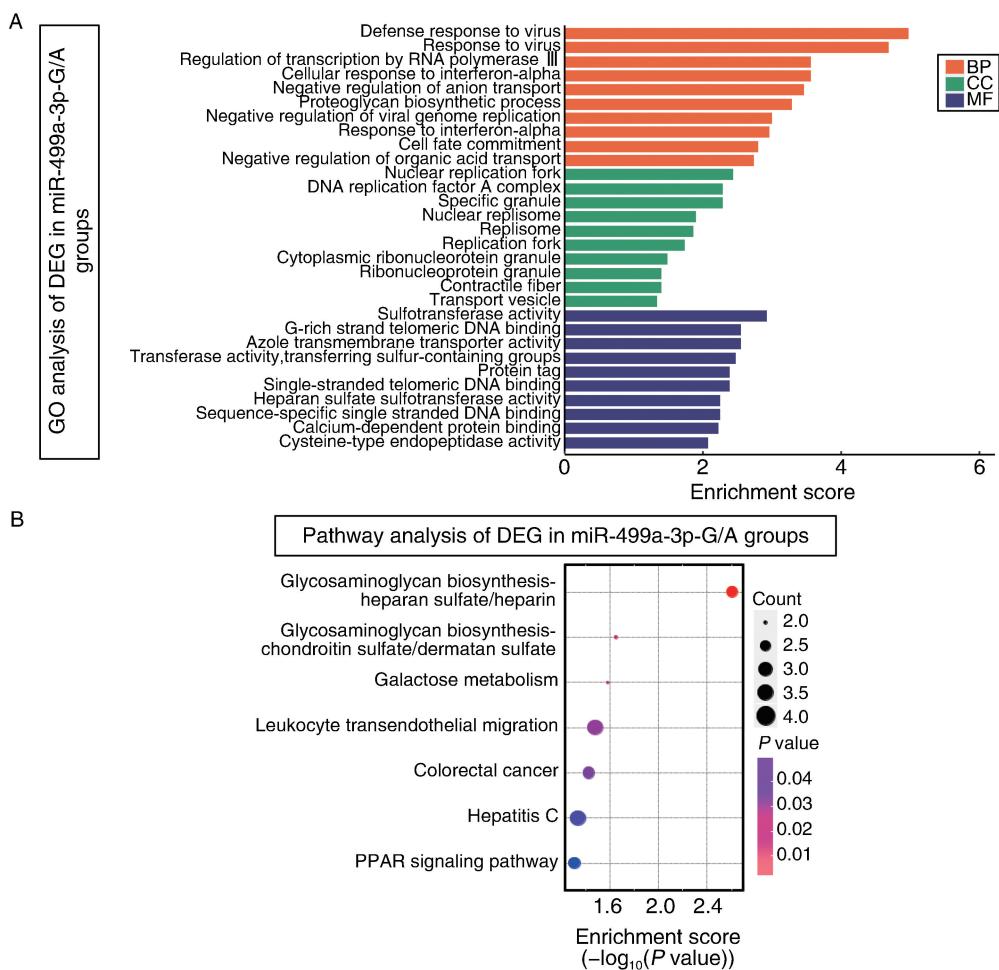


图 4. GO 功能和 KEGG 信号通路富集分析 miR-499a-3p-A 和 miR-499a-3p-G 之间差异调控基因

Figure 4. GO function and KEGG signal pathway enrichment analysis of different regulated genes between miR-499a-3p-A and miR-499a-3p-G

2.5 下调表达基因与预测靶基因进行交集分析 miR-499a-3p-A 和 miR-499a-3p-G 靶基因

为分析 miR-499a-3p-A 和 miR-499a-3p-G 下游直接靶基因, 将 TargetScan 软件 7.1 本地化, 分别输入 miR-499a-3p-A 和 miR-499a-3p-G 5' 端第 2 ~ 7 位种子区域序列预测靶基因, 得到 miR-499a-3p-A 和 miR-499a-3p-G 的潜在靶基因列表。miRNA 促进靶基因 mRNA 降解或抑制其翻译, 为获得 miR-499a-3p-A 靶基因, 将 miR-499a-3p-A 与对照组相比下调的基因集、miR-499a-3p-A 与 miR-499a-3p-G 组相比下调的基因集和 TargetScan 预测得到的 miR-499a-3p-A 靶基因集三集取交集, 结果发现 Spry2 (sprouty RTK signaling antagonist 2)、Pcnx1 (pecanex 1)、Ndufa5 (NADH: ubiquinone oxidoreductase subunit A5) 和 Tcf7l2 (transcription factor 7 like 2) 等 4 个基因。同样, 将 miR-499a-3p-G 与对照组相比下调的基因集、miR-499a-3p-G 与 miR-499a-3p-A 组相比下

调的基因集和 TargetScan 预测得到的 miR-499a-3p-G 靶基因集三集取交集, 未得到任何基因, 这可能是因为 miR-499a-3p-G 对其靶基因的调控方式并不是促进 mRNA 降解而是抑制蛋白的翻译。综上可见, rs386585341 A > G 基因的转换使 miR-499a-3p 的功能发生了显著改变(图 5)。

3 讨 论

SNP 是由单个核苷酸的变异所引起的一种 DNA 序列多态性, 在疾病发生、抗药性或药物过敏反应中扮演着极其重要的角色, 已逐步成为疾病分子诊断、临床检验、新药研发的重要手段^[11-12]。自 miRNA、lncRNA 等非编码基因的生物学功能在哺乳动物细胞中被描述以来, 位于其序列上的 SNP 功能研究也逐渐受到重视^[13-14], 但仍有许多 miRNA 及其

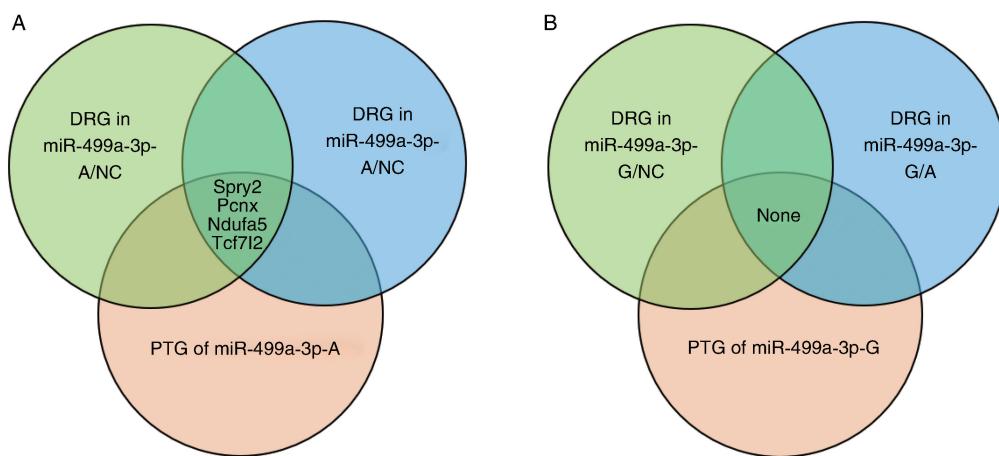


图 5. 韦恩图示 miR-499a-3p-A(A) 和 miR-499a-3p-G(B) 下调基因与 Targetscan 预测靶基因交集

Figure 5. Taking an interaction of down-regulated genes (DRG) and predicted target genes (PTG) to screening out target genes of miR-499a-3p-A (A) and miR-499a-3p-G (B)

序列上 SNP 的潜在功能未被定义。pre-miR-499a 是一个在哺乳动物中序列十分保守的非编码基因, 其在细胞内经剪切后可生成 miR-499a-5p 和 miR-499a-3p 两个成熟的 miRNA。目前有关 miR-499a-5p 的生物学功能已有诸多研究, 主要报道的是其在心肌中的抗凋亡作用, 但 miR-499a-3p 的生物学功能尚不完全清楚。rs386585341 A > G 位于 miR-499a-3p 种子序列 5' 第 4 号位点, 其是否会影响 miR-499a-3p 的生物学功能尚不知。一个 miRNA 的表达或序列发生变化后, 可以通过其直接靶基因引起下游一系列基因级联网络的变化, 使其功能研究比较复杂, 所以通过结合比较基因组学实验结果和靶基因预测工具, 对 miRNA 进行潜在的功能分析, 对确定 miRNA 的研究方向并指导生物实验尤为重要。本研究通过分析携带 rs386585341 A>G 不同位点的 miR-499a-3p 的基因表达谱差异, 结合 GO、KEGG 功能分析及靶基因预测, 探索 miR-499a-3p 的生物学功能及 rs386585341 A>G 可能参与调控的生理病理方向。

miR-499a-5p 在心肌中的抗凋亡功能早年就已获得广泛的关注, 但与其一起产生的 miR-499a-3p 的相关研究还非常少。本研究在大鼠心肌细胞中过表达 miR-499a-3p, 行基因表达谱芯片检测, GO 功能和 KEGG 通路分析其功能, 结果并没有发现 miR-499a-3p 在心肌中的抗凋亡功能, 提示 miR-499a-3p 可能与 miR-499a-5p 有不同的功能。内皮细胞和血管平滑肌细胞的增殖和迁移是动脉粥样硬化的重要过程^[15-18]。最近有研究显示, miR-135b-5p 和 miR-499a-3p 在动脉粥样硬化患者血清中的水

平升高, 两者可通过抑制 MEF2C 表达共同促进内皮细胞和血管平滑肌细胞增殖和迁移, 在调节心血管系统的细胞表型中起着重要作用^[19]。另有研究显示, 在血管内皮细胞过表达 miR-499a-3p 能通过抑制 ADAM10 的表达进而抑制细胞迁移和增殖并诱导细胞凋亡^[20]。本研究结果显示, miR-499a-3p-G 调控的基因主要富集在血管新生和血管发育, 同样提示 miR-499a-3p 会在血管生成发育相关细胞中有重要调控作用; rs386585341 A>G 有可能与血管新生和发育相关疾病密切相关, 为下一步研究 rs386585341 A>G 在疾病中的角色指明了方向, 有望为动脉粥样硬化等血管相关疾病找到新的个性化的诊断和治疗靶点。

miRNA 可能同时调控多个靶基因起作用, 单纯仅依靠软件预测筛选靶基因对 miRNA 功能研究有很大的局限性。本研究通过基因表达谱差异基因结合 TargetScan 软件预测靶基因集, 取交集双重保证了靶基因筛选的可靠性。本研究发现 miR-499a-3p-A 的靶基因可能有 Spry2、Pcnx1、Ndufa5 和 Tcf7l2, 其中 Ndufa5 是线粒体氧化磷酸化复合物 I 的核编码结构亚单位^[21], 提示 miR-499a-3p-A 可能参与线粒体氧化磷酸化活力的调控过程; 而 rs386585341 A>G 碱基转化导致 miR-499a-3p-G 不再靶向 miR-499a-3p-A 的靶基因, 使得 miR-499a-3p-G 具备与 miR-499a-3p-A 不同的生物学功能, 基因表达谱的 GO 和 KEGG 分析也印证了这一点。本研究对进一步研究 miR-499a-3p 及 rs386585341 在心血管疾病发生中的作用具有指导意义, 也为研究 SNP 在人类疾病中的作用及个性化精准治疗提供了新的思路。

[参考文献]

- [1] LA ROCCA G, KING B, SHUI B, et al. Inducible and reversible inhibition of miRNA-mediated gene repression in vivo [J]. *Elife*, 2021, 10: e70948.
- [2] MUKHTAR M, SARGAZI S, BARANI M, et al. Application of nanotechnology for sensitive detection of low-abundance single-nucleotide variations in genomic dna: a review [J]. *Nanomaterials (Basel)*, 2021, 11(6):1384.
- [3] 黎珊珊, 钟国强, 蒋智渊, 等. 人类微小 RNA-208a 的靶基因预测及生物学过程和信号通路的生物信息学分析[J]. 广西医学, 2016, 38: 4.
- [4] ZHAO Y, YUAN X, ZHONG Y, et al. Single-nucleotide polymorphisms in the 3' untranslated region of CORIN associated with cardiovascular diseases in a Chinese Han population: a case-control study [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2021, 8: 625072.
- [5] 冯伟, 张幼怡. MicroRNA 基因及其靶位点的单核苷酸多态性与疾病易感性 [J]. 生理科学进展, 2010, 41: 3.
- [6] LI Y, LI C, LIU S, et al. The associations and roles of microRNA single-nucleotide polymorphisms in cervical cancer [J]. *Int J Med Sci*, 2021, 18: 2347-2354.
- [7] LI Y, LU J, BAO X, et al. MiR-499-5p protects cardiomyocytes against ischaemic injury via anti-apoptosis by targeting PDCD4[J]. *Oncotarget*, 2016, 7: 35607-35617.
- [8] SHI Y, HAN Y, NIU L, et al. MiR-499 inhibited hypoxia/reoxygenation induced cardiomyocytes injury by targeting SOX6[J]. *Biotechnol Lett*, 2019, 41: 837-847.
- [9] LONG J, PI X. lncRNA-MEG3 suppresses the proliferation and invasion of melanoma by regulating CYLD expression mediated by sponging miR-499-5p [J]. *Biomed Res Int*, 2018, 2018: 2086564.
- [10] 陈英, 曾志羽, 郑慧蕾, 等. 血清 miR-499a-3p 在不稳定型心绞痛中的表达 [J]. 特别健康, 2018. DOI:10.3969/j.issn.2095-6851.2018.16.009.
- [11] CHENG W, RAMACHANDRAN S, CRAWFORD L. Estimation of non-null SNP effect size distributions enables the detection of enriched genes underlying complex traits [J]. *PLoS Genet*, 2020, 16: e1008855.
- [12] CHADAEVA I V, PONOMARENKO P M, RASSKAZOV D A, et al. Candidate SNP markers of reproductive potential are predicted by a significant change in the affinity of TATA-binding protein for human gene promoters [J]. *BMC Genomics*, 2018, 19(Suppl 3): 0.
- [13] WANG Y, RU J, MENG X, et al. Role of SNPs in the biogenesis of mature miRNAs [J]. *Biomed Res Int*, 2021, 2021: 2403418.
- [14] LE C T, NGUYEN T L, NGUYEN T D, et al. Human disease-associated single nucleotide polymorphism changes the orientation of DROSHA on pri-miR-146a [J]. *RNA*, 2020, 26: 1777-1786.
- [15] GROOTAERT M O J, BENNETT M R. Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis: time for a re-assessment [J]. *Cardiovasc Res*, 2021, 117: 2326-2339.
- [16] LEE D Y, CHIU J J. Atherosclerosis and flow: roles of epigenetic modulation in vascular endothelium [J]. *J Biomed Sci*, 2019, 26: 56.
- [17] 瞿凯, 邱菊辉, 王贵学. 血管内皮细胞屏障功能的血流动力学调控及其与动脉粥样硬化的关系 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2020, 28(1): 1-6.
- [18] 李赫宁, 陈临溪. Apelin/APJ 系统: 动脉粥样硬化治疗新靶点 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2019, 27(7): 553-561.
- [19] XU Z, HAN Y, LIU J, et al. MiR-135b-5p and miR-499a-3p promote cell proliferation and migration in atherosclerosis by directly targeting MEF2C [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 12276.
- [20] ZHENG H, LI J, CHEN Y, et al. Effect of lentivirus-mediated miR-499a-3p on human umbilical vein endothelial cells [J]. *Biomed Res Int*, 2020, 2020: 1-13.
- [21] MARUI T, FUNATOGAWA I, KOISHI S, et al. The NADH-ubiquinone oxidoreductase 1 alpha subcomplex 5 (NDUFA5) gene variants are associated with autism [J]. *Acta Psychiatr Scand*, 2011, 123: 118-124.

(此文编辑 文玉珊)