

微小 RNA-548z 与 CD147 基因 3'UTR 结合对急性心肌梗死患者 CD147 表达的影响

梁 潇, 严金川, 王翠平, 王中群, 刘培晶, 袁 伟

(江苏大学附属医院心内科, 江苏省镇江市 212001)

[关键词] miR-548z; CD147; 急性心肌梗死; 基因多态性

[摘要] 目的 探讨微小 RNA-548z(miRNA-548z, miR-548z)与 CD147 基因 3'非翻译区单核苷酸多态性位点 rs8259 T/A 结合对急性心肌梗死(AMI)患者 CD147 表达的影响。方法 以 30 例 AMI 患者及 13 例正常人作为研究对象,应用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)技术检测 CD147 基因 rs8259 位点的基因型。外周血单个核细胞(PBMC)中 miR-548z 及 CD147 mRNA 的表达采用荧光定量聚合酶链反应(qPCR)法检测,CD147 蛋白表达应用 Western Blot 法。双荧光素酶报告基因验证 miR-548z 与 rs8259 T/A 的相互作用。结果 AMI 患者 AA 型和 TT 型 PBMCs 中 miR-548z 的表达水平无差异,并与正常对照组无统计学意义($P>0.05$);AMI 患者 AA 型和 TT 型 PBMCs 中 CD147 mRNA 的表达水平无差异($P>0.05$);而 AMI 患者 AA 型组 CD147 蛋白的表达水平明显高于 TT 型组;双荧光素酶报告基因结果显示,mimic miR-548z 能够抑制携带 CD147 基因 rs8259 位点 T 等位基因载体的荧光素酶活性,呈剂量依赖性。结论 miR-548z 能与 AMI 患者 CD147 基因 3'UTR rs8259 的 T 等位基因结合,从而调控 CD147 蛋白的表达。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

The Effect on the Expression of CD147 in Acute Myocardial Infarction Patients as MicroRNA-548z Binding to the CD147 Gene 3' Untranslated Region

LIANG Xiao, YAN Jin-Chuan, WANG Cui-Ping, WANG Zhong-Qun, LIU Pei-Jing, and YUAN Wei

(Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212001, China)

[KEY WORDS] miR-548z; CD147; Acute Myocardial Infarction; Polymorphism

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect on the expression of CD147 in acute myocardial infarction (AMI) patients as microRNA-548z (miR-548z) binding to the single nucleotide polymorphism (SNP) sites rs8259 T / A at CD147 gene 3'untranslated region (UTR). **Methods** Samples for the study were from 30 patients with AMI and 13 healthy people. Genotype of rs8259 sites on CD147 gene was detected by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method. Quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was used to detect the relative expression levels of miR-548z and CD147 mRNA in peripheral blood mononuclear cells (PBMC). The expression of CD147 protein in PBMCs was detected by Western Blot. The interaction between miR-548z and rs8259 different alleles was proved by luciferase reporter gene assay. **Results** The expression of miR-548z in AA and TT AMI patients, as well as in normal people appeared no significant difference ($P>0.05$). There was no significant difference between AA and TT patients with AMI in the expression levels of CD147 mRNA in PBMCs ($P>0.05$). The level of CD147 protein in AMI patients with AA genotype was significantly higher than the TT genotype group. The luciferase reporter gene assay showed that mimic miR-548z could dose-dependently reduce the relative luciferase activity of constructs carrying the T allele.

Conclusion MiR-548z could bind to rs8259 bearing T alleles on the 3'UTR of CD147 gene and negatively regulate the ex-

[收稿日期] 2015-01-30

[修回日期] 2015-03-20

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81170279,81370409),江苏省六大人才高峰项目(WS074),江苏省 333 高层次人才项目(BRA2014162),江苏省科教兴卫工程(LJ201116),镇江市心血管病重点实验室项目(SS2012002)

[作者简介] 梁潇,硕士研究生,主要从事动脉粥样硬化研究。通讯作者严金川,博士,教授,博士研究生导师,主要从事急性冠状动脉综合征基础与临床研究,E-mail 为 yanjinchuan@hotmail.com。王中群,博士,讲师,硕士研究生导师,主要从事动脉粥样硬化研究。

pression of CD147 protein in AMI patients.

急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI) 是冠状动脉不稳定斑块的破裂导致血管闭塞, 从而引起心肌缺血坏死^[1]。研究表明, 多种炎症介质能够影响冠状动脉斑块的进展及稳定性^[2]。CD147, 又被称为细胞外基质金属蛋白酶诱导因子 (matrix metalloproteinase inducer, EMMPRIN), 是人类免疫球蛋白超家族的成员, 它广泛地表达于人体各种组织细胞中。大量的研究显示 CD147 能够促进粥样斑块的形成, 并且可以刺激基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) 分泌, 从而导致斑块的稳定性降低^[3-6], 并最终引起 AMI。我们前期研究表明, CD147 基因 3' 非翻译区 (3' untranslated region, 3' UTR) 的单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 位点 rs8259 能够影响 AMI 的发病风险。AMI 患者 CD147 表达增加并受 rs8259T/A 多态性影响^[7-8], 但其具体机制不明。众所周知, 靶基因 3' UTR 与微小 RNA (microRNA, miRNA) 种子序列结合能抑制相关蛋白质翻译, 而靶基因的 SNP 能影响这一结合^[9-12]。我们推测, 存在某个 miRNA 能够与 CD147 基因 3' UTR 位点 rs8259 结合影响 CD147 的表达, 从而影响 AMI 的发病风险。生物信息学预测显示: CD147mRNA 的 3' UTR 存在多个 miRNA 结合位点, 通过与 NCBI 数据库比对发现, miR-548z 的种子序列与 rs8259 结合。因此, 我们在前期研究基础上进一步探讨 miR-548z 是否能与 rs8259 不同等位基因结合并影响 CD147 表达。

1 材料与方法

1.1 研究对象的选择及标本留取

根据 2007 年 ESC 对 AMI 的定义标准, 选择江苏大学附属医院 2013 年 12 月至 2014 年 10 月住院, 确诊为 AMI 且排除其他炎症性疾病的患者 30 人。另选 13 名经冠状动脉造影排除冠状动脉病变, 并排除其他炎症性疾病的正常人。所有受试者均在冠脉造影时抽取桡动脉血 4 mL, 乙二胺四乙酸抗凝。取其中的 2 mL 全血提取基因组 DNA, -20℃ 冻存, 用于分析 CD147 基因多态性, 另 2 mL 全血提取单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cells, PBMC), 加 800 μ L Trizol 试剂, -70℃ 冻存, 用于提取总 RNA。

1.2 PCR 扩增及扩增产物的限制性酶切

CD147 的 PCR 扩增反应体系为 15 μ L, 含 10 \times PCR 缓冲液 1.6 μ L, 引物 P1、P2 各 0.2 μ L (引物的设计与合成由上海生工生物公司完成), dNTP1.2 μ L, 5 \times 10⁶ U/L 的 TaqDNA 聚合酶 0.2 μ L (Takara, 日本), 基因组 DNA 模板 50 ~ 100 ng, 不足体积用灭菌双蒸水补至 15 μ L。PCR 反应条件为: 94℃ 预变性 5 min, 再按以下程序循环 36 次: 即 94℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 45 s; 末次循环后, 72℃ 延伸 10 min。取 PCR 扩增产物 10 μ L, 加限制性内切酶 Mbo I (Thermo Fisher Scientific, 美国) 1 μ L, 10 \times buffer 2 μ L, 并用无核酸酶处理水补足至 30 μ L, 37℃ 孵育 5 min。反应终止后取消消化片段在 2.5% 的琼脂糖凝胶上电泳 1 h, 溴乙锭 (ethidium bromide, EB) 染色, 染色后在凝胶成像系统上判断结果。

1.3 miR-548z 及 CD147mRNA 表达水平的检测

选取经酶切和测序 (DNA 测序由上海生工生物公司完成) 证实的纯合子 (AA, TT) 个体对应的 PBMCs-Trizol 样本, 抽提总 RNA。采用“加尾法”对抽提的总 RNA 进行逆转录 (试剂由日本 Takara 公司提供), cDNA 用以检测 miR-548z 和 CD147mRNA 的表达水平。选用 U6 作内参, 参照 PrimeScript miRNA qPCR Starter Kit (Takara, 日本) 推荐的 Real-time PCR 反应的条件进行实验。以 U6 的 CT 值对成熟 miR-548z 及 CD147mRNA 的相对表达水平进行标准化, 利用 $\Delta\Delta$ CT 值比较不同组间的 miR-548z 及 CD147mRNA 表达水平。

1.4 Western blot 检测 CD147 蛋白的表达

选取纯合子 (AA, TT) 个体对应的 PBMC 样本, 采用含有蛋白酶抑制剂 (PMSF) 的放射免疫沉淀 (RIPA) 缓冲液直接冰上提取总蛋白。使用 BCA Protein 检测试剂盒 (Thermo Fisher Scientific) 对蛋白浓度进行定量。取等量蛋白样品进行 10% SDS-PAGE 电泳, 然后转移到 PVDF 膜上。使用稀释为 1:1000 的兔抗人 CD147 IgG 单克隆抗体 (Proteintech, 编码: bc009040), 检测一抗与标记有 HRP (1:10000) 的种属特异性二抗 (Aldrich 公司), 并通过增强的 ECL 试剂盒 (通用电气公司) 可视化。最后, 用 Alpha 化学发光凝胶成像系统 (Proteinsimple 钴) 对膜进行扫描成像。用 AlphaView 软件对蛋白条带的灰度值进行计算, 并计算 CD147 与 β -actin (内参) 的比值。

1.5 构建 CD147 基因 3'UTR 荧光素酶报告载体

设计特异性引物 (引物的合成由上海生工生物

公司完成) 分别对正常人基因型为 rs8259AA 和 rs8259TT 纯合子个体的 DNA 样本进行扩增,目的片段的两端分别为 XhoI 和 BamHI 酶切位点。用 T4 连接酶(Thermo Fisher Scientific)将 PCR 产物连接到 pLUC 质粒(Promega)海肾荧光素酶基因下游的 XhoI 和 BamHI 位点之间。通过直接测序的方法确定携带 CD147 基因 3'UTR rs8259-T 等位基因(设为 pLUC-BSG-T)和 rs8259-A(设为 pLUC-BSG-A)等位基因的载体(载体的测序由上海生工生物公司完成)。

1.6 细胞转染和荧光素酶活性检测

将不同浓度的 mimic hsa-miR-548z 与携带 CD147 基因多态性位点 rs8259 不同等位基因(T/A)的双荧光素酶报告载体瞬时共转染 293T 细胞,48 h 后裂解细胞,用荧光素酶检测试剂盒(Promega, 美国)检测双荧光素酶活性,以萤火虫荧光素酶活

性值作为内参,将海肾荧光素酶活性与萤火虫荧光素酶活性的比值作统计分析。

1.7 统计分析

数据应用 SPSS 19.0 软件进行分析。其中,计量资料的比较均采用双侧 Student's t 检验,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。miR-548z 的相对表达和与之对应的 CD147 蛋白水平的相关分析运用 Pearson 法。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 生物信息学预测结果

运用 TargetScan 在线软件预测显示,CD147 基因 3'UTR 存在多个 miRNA 结合位点。再与 NCBI 数据库进行比对,发现 CD147 基因 3'UTR 的 SNP 位点 rs8259 恰好位于 miR-548z 结合的种子区(图 1)。

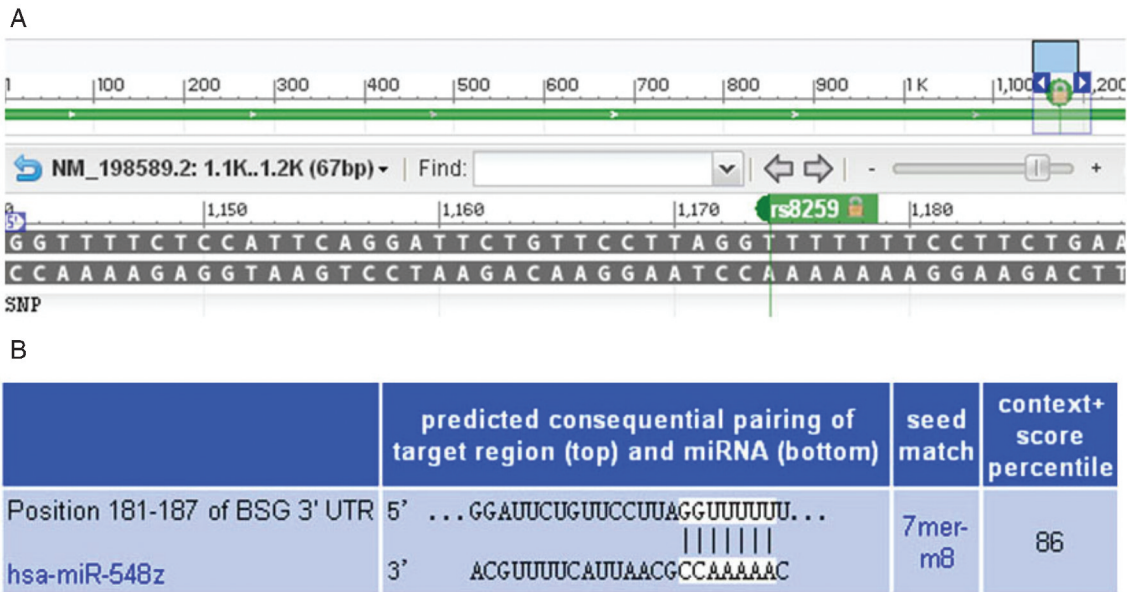


图 1. 生物信息学软件预测结果 A: miR-548z 与 CD147 基因 3'UTR 结合示意图。其中 miR-548z 5' 端第 2~8 个核苷酸序列为其种子序列。B:rs8259 在 CD147 基因 3'UTR 上的位置示意图。

Figure 1. Bioinformatics software analysis

2.2 CD147 基因型分析

CD147 基因 rs8259 位点多态性分析,PCR 扩增产物片段大小为 162 bp。根据限制性内切酶 Mbo I 酶切片段的情况,基因型有 3 种,TT 型(162 bp 一条带)、AT 型(162、137、25 bp 三条带)和 AA 型(137、25 bp 两条带)(图 2),因 25 bp 的条带分子量小在电泳时显示不明显。PCR 产物测序结果证实 PCR RFLP 基因分型真实可靠(图 3)。

2.3 PBMC 中 miR-548z 的表达水平

比较 AMI 患者(15 例)与正常人(13 例)PBMC

中 miR-548z 的相对表达水平,结果显示差异无显著性(8.317 ± 1.017 比 8.615 ± 0.830 , $P = 0.825$;图 4A)。挑选 AMI 患者中 rs8259 基因型为纯合子的个体(AA 型 7 例和 TT 型 6 例),以同样的方法比较 AA 型和 TT 型 AMI 患者 PBMC 中 miR-548z 的相对表达水平,结果显示并无统计学差异(8.688 ± 1.326 比 7.150 ± 1.955 , $P = 0.518$;图 4B)。

2.4 rs8259 不同等位基因对 AMI 患者 PBMCs 中 CD147 表达水平的影响

仍然选取上述的 13 个纯合子基因型个体,以

U6 作为内对照,比较 AA 型和 TT 型 AMI 患者 PB-MCs 中 CD147 mRNA 的相对表达水平,结果显示并无统计学差异(4.870 ± 1.300 比 4.045 ± 1.102 , $P=0.645$;图 5A)。半定量分析对应的 CD147 蛋白表达水平,其结果显示 AA 型组 CD147 蛋白的表达水平明显高于 TT 型组(图 5B 和图 5C)。

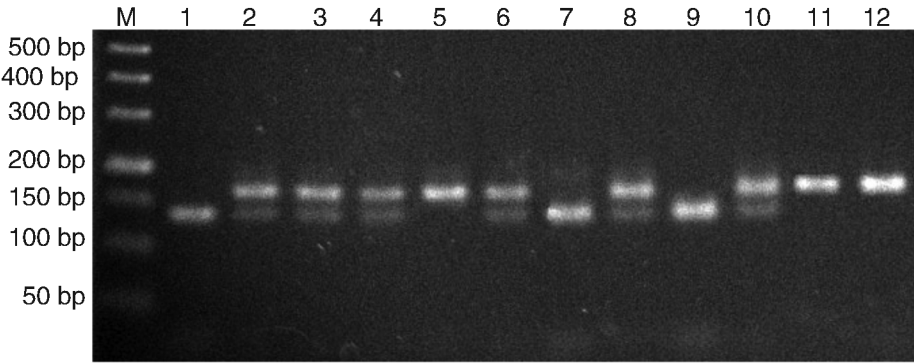


图 2. CD147 基因 rs8259 多态性位点 3%琼脂糖凝胶电泳结果 M 为 marker,5、11、12 为 TT 型,1、7、9 为 AA 型,2、3、4、6、8、10 为 AT 型。

Figure 2. 3% agarose gel electrophoretical result of CD147 gene rs8259 polymorphism

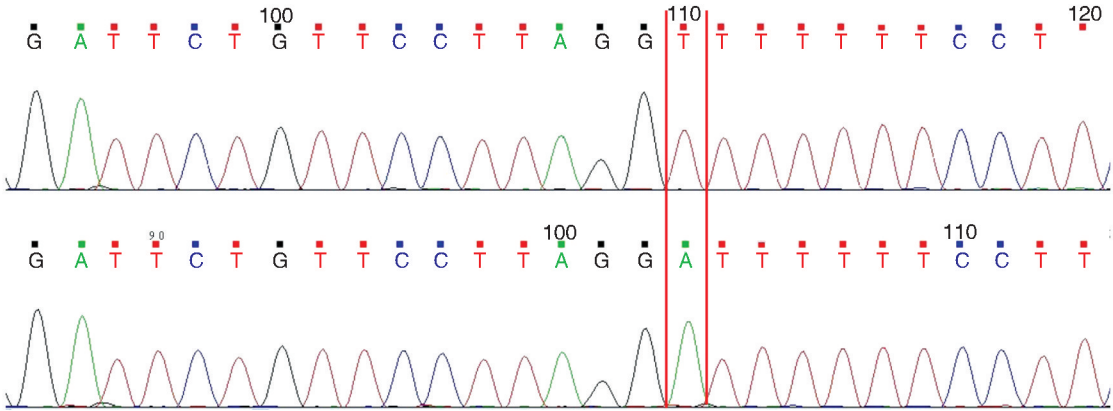


图 3. 纯合子基因型 PCR 产物测序图谱 图上红色框内所示,上图为 TT 型,下图为 AA 型。

Figure 3. Sequencing results of the PCR products of homozygotes

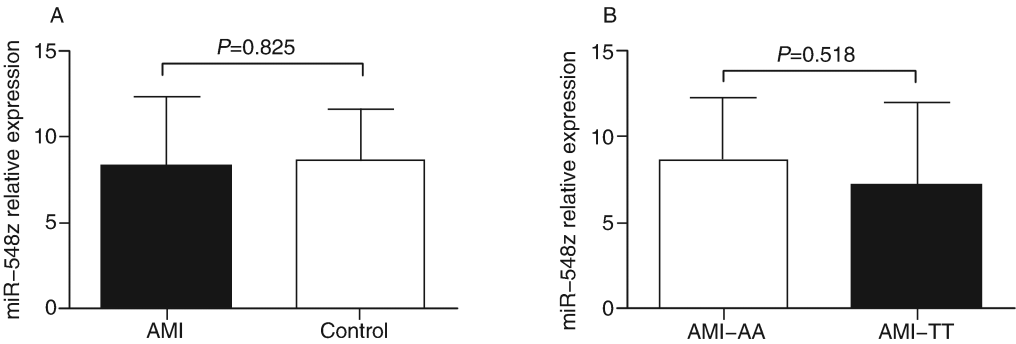


图 4. PBMC 中 miR-548z 的表达水平 A 为 AMI 患者(15 例)与正常人(13 例)PBMC 中 miR-548z 的相对表达水平,两组间无统计学意义($P=0.825$);B 为 AA 型和 TT 型 AMI 患者 PBMC 中 miR-548z 的相对表达水平,其结果无统计学意义($P=0.518$)。

Figure 4. The level of miR-548z in PBMC

2.5 荧光素酶活性分析

根据生物信息学预测结果,rs8259 位点 T 等位基因比携带 A 等位基因可以更好地与 miR-548z 的种子

序列配对结合。与对照组相比,mimic miR-548z 能够抑制携带 CD147 基因 rs8259 位点 T 等位基因载体的荧光素酶活性,并且该效应呈剂量依赖性(其中 100 nmol/L

浓度下,荧光素酶活性被抑制 30% 以上);而携带 CD147 基因 rs8259 位点 A 等位基因载体的荧光素酶活

性并不能被 mimic miR-548z 抑制(图6)。

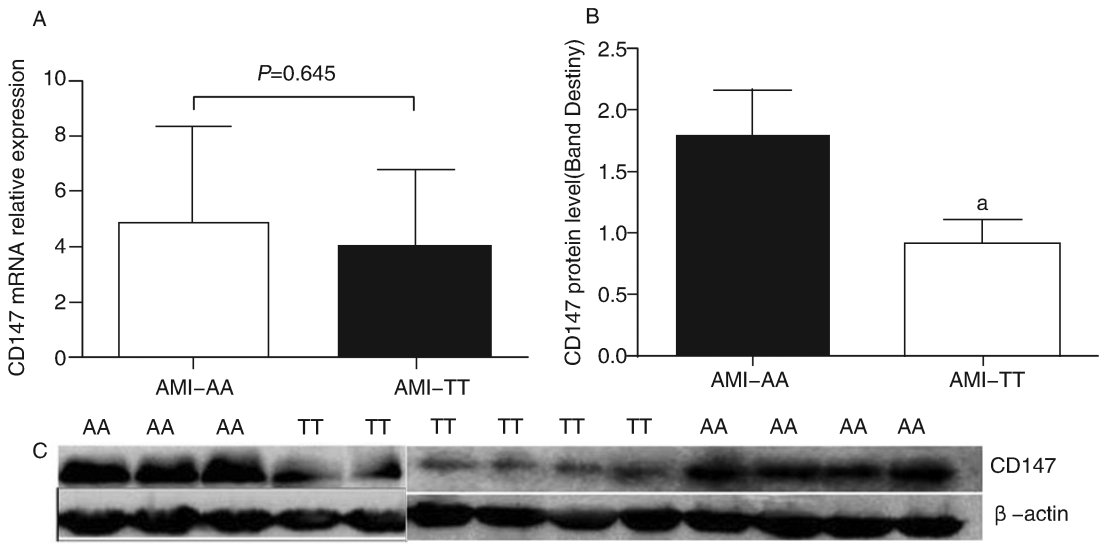


图 5. PBMC 中 CD147 的表达水平 A 为 AA 型和 TT 型 AMI 患者 PBMCs 中 CD147 mRNA 的相对表达水平,并无差异。B、C 为 AA 型和 TT 型 AMI 患者 CD147 蛋白的表达水平,AA 型 CD147 蛋白的表达量明显高于 TT 型(a 为 $P=0.003$)。

Figure 5. CD147 level in PBMC

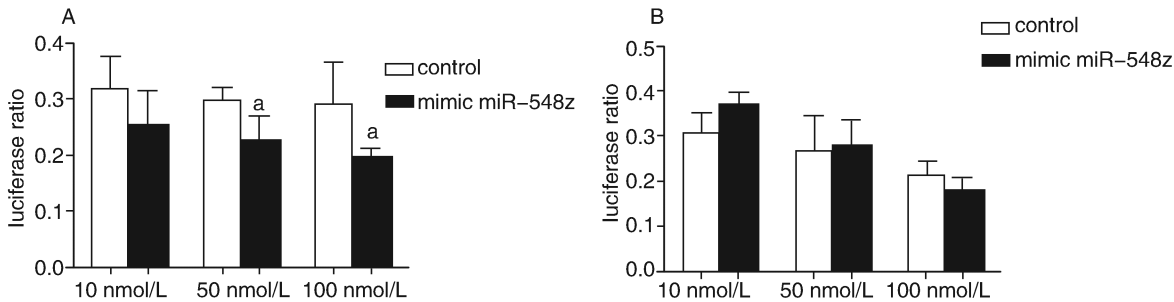


图 6. 双荧光素酶报告基因检测结果 A 为与对照组相比,mimic miR-548z 能够抑制携带 CD147 基因 rs8259 位点 T 等位基因载体的荧光素酶活性,并且该效应呈剂量依赖性(a 为 $P=0.045$);B 为携带 CD147 基因 rs8259 位点 A 等位基因载体的荧光素酶活性,并不能被 mimic miR-548z 抑制。

Figure 6. The result of luciferase reporter gene assay

3 讨论

冠心病 (coronary atherosclerotic heart disease, CHD) 是目前威胁人类健康的头号杀手,其中 AMI 是其最严重类型。AMI 的发病机制主要是冠状动脉粥样硬化不稳定斑块破裂,继而导致冠状动脉远段闭塞,引起心肌供血不足^[1]。多种炎症因子参与了这一过程,CD147 就是其中一种重要的炎症因子。它能够促进单核细胞向血管壁内迁移^[3];还可以调控 MMP 活性,使斑块表面的纤维帽降解,导致斑块稳定性下降^[6]。但从遗传学角度阐述 CD147 与 AMI 发病关系的研究目前还很有限。我们的前

期研究已证实 CD147 3'UTR 基因多态性能够影响 AMI 的发病风险^[7]。结合现有的文献资料,位于 CD147 基因 3'UTR 的 SNP 很可能通过与 MicroRNA 特异性结合从而影响蛋白的表达,进而影响 AMI 的发病。MicroRNAs 是一类长约 22 个核苷酸的小分子非编码 RNA,通常认为它们的作用是转录后调控 mRNA 的降解或者仅仅抑制 mRNA 的翻译。MiRNAs 与 mRNA 的结合遵循 Watson-Crick 配对原则,即 miRNA 5'端的第 2~8 个核苷酸与靶 mRNA 完全连续互补配对,miRNA 的这一段核苷酸序列就是所谓的“种子区”^[9-11]。通过生物信息学方法可以找出可能与已知基因相结合的 miRNAs。从预测结果

可以看出,CD147 基因 3'UTR 确实存在多个 miRNA 结合位点,其中 miR-548z 的种子区刚好位于我们之前研究的 SNP 位点 rs8259,因此选择 miR-548z 作为研究影响 CD147 基因 rs8259 位点生物学效应的切入点。

miR-548 是一个庞大的低度保守的灵长类种属特异性 miRNA 基因家族,已经发现该基因家族有 69 个成员^[13]。目前对该家族成员的研究还比较有限。本文第一次用实验证实了 miR-548z 的作用位点之一是 CD147 基因 3'UTR 的 SNP 位点 rs8259。双荧光素酶报告基因实验表明,携带 T 等位基因的载体,由于可以与 miR-548z 发生相互作用,荧光素酶的活性明显被抑制(图 6),并且该抑制效应对 miR-548z 呈剂量依赖性;而携带 A 等位基因的载体,即使在高浓度(100nmol/L)的 mimic miR-548z 的刺激下,其荧光素酶活性也没有被明显抑制。可以认为,rs8259T > A 这一突变打破了 miR-548z 与 CD147 基因 3'UTR 的结合。AA 型和 TT 型 AMI 患者 CD147 mRNA 的相对表达量无统计学意义,而 CD147 蛋白的表达有着明显差异,AA 型患者 CD147 蛋白的相对表达量明显高于 TT 型患者(图 5),结合双荧光素酶报告基因结果,可以推测,TT 型患者 CD147 蛋白表达下调部分是由于 miR-548z 的作用,miR-548z 可能仅仅抑制了 CD147 蛋白的翻译过程而并未降解 mRNA。正常对照组与 AMI 组的 miR-548z 表达量无差异,提示在 AMI 的病理过程似乎并不能影响外周血 PBMCs 中 miR-548z 表达,AMI 患者 PBMCs 中处于基础表达水平的 miR-548z 已能够发挥调节 CD147 表达的功能。

综上所述,可以得出:miR-548z 能与 AMI 患者 CD147 基因 3'UTR rs8259 的 T 等位基因结合,从而调控 CD147 蛋白的表达。由于一个基因含有多个 miRNA 的结合位点,一个 miRNA 也可以作用于多个基因。因此,在体内影响 CD147 表达的主导遗传学因素尚待相关实验证实。

[参考文献]

[1] Hamm CW, Bassand JP, Agewall S, et al. ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute coronary syndromes (ACS) in patients presenting without persistent ST-segment

elevation of the European Society of Cardiology (ESC) [J]. Eur Heart J, 2011, 32(23): 2 999-3 054.

[2] Kher N, Marsh JD. Pathobiology of atherosclerosis--a brief review [J]. Semin Thromb Hemost, 2004, 30 (6): 665-672.

[3] Schulz C, Von Brühl ML, Barocke V, et al. EMMPRIN (CD147/basigin) mediates platelet-monocyte interactions invivo and augments monocyte recruitment to the vascular wall[J]. J Thromb Haemost, 2011, 9(5): 1 007-019.

[4] Joghetaei N, Stein A, Byrne RA, et al. The Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer (EMMPRIN, CD147)-a potential novel target in atherothrombosis prevention [J]. Thromb Res, 2013, 131(6): 474-480.

[5] Liu H, Yang L, Guo RW, et al. Functional blockage of EMMPRIN ameliorates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice [J]. Int J Cardiol, 2013, 168 (4): 3 248-253.

[6] Schmidt R, Bultmann A, Ungerer M, et al. Extracellular matrix metalloproteinase inducer regulates matrix metalloproteinase activity in cardiovascular cells: implications in acute myocardial infarction [J]. Circulation, 2006, 113 (6): 834-841.

[7] 毛郁, 严金川, 王翠平, 等. CD147 基因型及血浆水平与 ST 段抬高型心肌梗死的相关性[J]. 中国动脉硬化杂志, 2014, 22(7): 695-700.

[8] 毛郁, 严金川, 王翠平, 等. 急性冠脉综合征患者 CD147 表达水平及其 rs8259 T/A 基因多态性分析[J]. 中华心血管病杂志, 2014, 42(7): 566-570.

[9] Saunders MA, Liang H, Li WH. Human polymorphism at microRNAs and microRNA target sites[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(9): 3 300-305.

[10] Cai Y, Yu X, Hu S, et al. A Brief Review on the Mechanisms of miRNA Regulation [J]. Genomics Proteomics Bioinformatics, 2009, 7(4): 147-154.

[11] Brennecke J, Stark A, Russell RB, et al. Principles of microRNA-target recognition [J]. PLoS Biol, 2005, 3 (3): e85.

[12] Khraiweh B, Arif MA, Seumel GI, et al. Transcriptional control of gene expression by microRNAs [J]. Cell, 2010, 140(1): 111-122.

[13] Liang T, Guo L, Liu C. Genome-Wide Analysis of mir-548 Gene Family Reveals Evolutionary and Functional Implications [J]. J Biomed Biotechnol, 2012, 2012: 679 563.

(此文编辑 李小玲)