

1 型糖尿病小鼠心肌组织 miR-142-3p 的 lncRNA 和 circRNA 靶标分析

孟哲颖 胡兵 陈翠 曹洪丽 王静怡 申锬

【摘要】 目的:利用生物信息学对 1 型糖尿病小鼠心肌组织中微小 RNA(miR)-142-3p 进行长链非编码 RNA(lncRNA)和环状 RNA(circRNA) 靶标预测。 方法:22 只 C57 小鼠随机分为糖尿病模型组($n=15$)和对照组($n=7$),糖尿病模型组小鼠经腹腔一次性注射链脲佐菌素(STZ)建立 1 型糖尿病小鼠模型,对照组注射柠檬酸缓冲液。建模 8 周后终止实验,检测左室质量指数(LVWI)和心脏功能,HE 染色结合定量分析软件检测心肌细胞大小;通过 miRNA 表达谱芯片技术甄别 miRNAs 的差异性,qRT-PCR 确定差异表达;采用微小 RNA 靶标分析软件 miRanda 和 TargetScan 进行靶标预测,对预测到的 circRNA 宿主基因(host gene)进行基因功能聚类解析。 结果:(1)糖尿病模型组心肌组织中 miR-142-3p 表达显著降低;(2)在高严谨条件下,用 miRanda 和 TargetScan 能够同时预测到 miR-142-3p 的靶标 lncRNA 有 35 个、circRNA 有 14 个;(3)宿主基因功能预测显示 miR-142-3p 参与糖代谢相关的信号通路。 结论:miR-142-3p 可能通过调控部分 lncRNA 和 circRNA,参与糖尿病心肌病的发生。

【关键词】 糖尿病;miR-142-3p;心肌;生物信息学

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2018.04.007

Bioinformatics analysis of lncRNA and circRNA targeting miR-142-3p in type 1 diabetic mice MENG Zheyang¹, HU Bing¹, CHEN Cui¹, CAO Hongli², WANG Jingyi², SHEN E². 1. Department of Ultrasound in Medicine, Shanghai Jiao Tong University Affiliated Sixth People's Hospital, Shanghai Institute of Ultrasound in Medicine, Shanghai 200233; 2. Department of Ultrasound in Medicine, Tongren Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200366, China

【Abstract】 Objective: To predict new long non-coding RNA (lncRNA) and circular RNA (circRNA) targeting miR-142-3p in type 1 diabetic mice myocardium by bioinformatics. **Methods:** A total of 22 C57 mice were randomly divided into type 1 diabetes group ($n=15$) and control group ($n=7$). Type 1 diabetes mice were modeled by once intraperitoneal injection of streptozotocin, while the control mice were injected with citric acid buffer. Eight weeks after modeling, the left ventricular mass index (LVWI) and cell morphology of the myocardium and the quantitative analysis of cell area were detected respectively by Echocardiography and HE staining. Target mapping was performed with miRanda and TargetScan analysis software. Genetic function clustering was performed by GO and KEGG analysis. **Results:** MiR-142-3p expression was decreased in type 1 diabetic mice hearts. The prediction

基金项目:国家自然科学基金(81270208);上海市长宁区科学技术委员会重点项目(CNKW2017Z03)

作者单位:200233 上海交通大学附属第六人民医院超声医学科,上海超声医学研究所(孟哲颖,胡兵,陈翠);200336 上海交通大学医学院附属同仁医院超声医学科(曹洪丽,王静怡,申锬)

通信作者:申锬,Email:shene2008@163.com

of 35 lncRNAs and 14 circRNAs was found by miRanda and TargetScan under high stringency conditions. Furthermore, the signaling pathways related to sugar metabolism were disclosed by GO and KEGG analysis. **Conclusions:** MiR-142-3p may be involved in the development of diabetic cardiomyopathy by regulating certain lncRNAs and circRNAs.

【Key words】 Diabetes; MiR-142-3p; Heart; Bioinformatics

糖尿病心肌病是指发生于糖尿病患者,同时又不同于高血压心脏病、动脉粥样硬化心脏病、心脏瓣膜病等心脏病的心肌病变^[1]。糖尿病心肌病的主要的危害是常引起突发的心脏死亡。该病的病理改变主要表现为心肌细胞凋亡、心肌细胞肥大、心肌间质纤维化等^[2]。糖尿病患者心血管发病率较非糖尿病患者高 2~3 倍,非缺血性心力衰竭是糖尿病患者最主要的死亡原因,因此探索糖尿病心肌病发生发展的分子机制以及治疗靶点意义重大。

微小 RNA (microRNA, miRNA) 是约含 22 个核苷酸的高度保守的内源性非编码 RNA,它通过与靶基因的 3' 非翻译区 (3' UTR) 互补配对来调控靶基因的表达,1 个 miRNA 可以调控数个甚至上百个长链 RNA 的表达^[3]。我们前期建立了稳定的 1 型糖尿病 C57 小鼠模型,利用基因芯片技术筛选糖尿病小鼠心肌组织中 miRNAs 的差异表达谱,并经实时定量 PCR 发现 miR-142-3p 表达下调^[4]。但 miR-142-3p 在糖尿病心肌病的发生机制中起的作用还有待研究。本研究采用生物信息学方法预测 miR-142-3p 与长链非编码 RNA (lncRNA) 和环状 RNA (circRNA) 的结合位点,探索在糖尿病心肌病发生机制中 miR-142-3p 对两类 RNA 的调控作用,以期为临床治疗提供新靶点。

1 材料与方法

1.1 动物及分组

22 只 8 周龄雄性 C57 小鼠,体质量 23~25 g。随机分为糖尿病模型组 ($n=15$) 和对照组 ($n=7$)。C57 小鼠由中国科学院上海实验动物中心提供,动物生产许可证和使用许可证号码分别为 SCXK(沪)2007-0005 和 SCXK(沪)2006-0010。

1.2 主要试剂和仪器

链脲佐菌素 (streptozocin, STZ)、TRIzol 试剂 (Sigma, 美国); 小动物用高分辨超声仪 (Vevo2100, VisualSonics 公司, 加拿大); TaqMan® MicroRNA Assays、miRNA Isolation Kit (Ambion, 美国); 荧光标记、芯片杂交及结果检测在北京奥博生物公司实

验室完成; LuxScan 10K/A 双通道激光扫描仪、LuxScan 3.0 图像分析软件、基因芯片显著性分析 (Significance analysis of Microarrays, SAM) 软件 (SAM3.02) 由北京博奥公司提供。

1.3 方法

1.3.1 建立 1 型糖尿病小鼠模型 C57 小鼠单次腹腔注射 STZ (150 mg/kg) 制备 1 型糖尿病动物模型。注射 STZ 48 h 后,以 Onetouch II 血糖仪检测尾静脉血,随机血糖 >16.7 mmol/L 即认为建模成功^[5]。对照组小鼠单次腹腔注射等量柠檬酸缓冲液。

1.3.2 心脏功能检测 建模 8 周后,对小鼠行超声心动图测量,按照高分辨小动物超声成像系统的操作说明操作。采用 1.5% 戊巴比妥钠 0.1 mL/20 g 腹腔注射麻醉小鼠,然后将小鼠置于 37 °C 恒温垫上,用 4 个电极连接其四肢末端并固定。仰卧略向左倾斜位固定小鼠,获取胸骨旁短轴切面 M 型超声图像,测量以下指标: (1) 左室射血分数 (LVEF) 和左室短轴缩短率 (FS); (2) 左室质量指数 (LVWI), 小鼠处死前后分别称量体质量和左室质量, $LVWI = \text{左室质量} / \text{体质量}$ 。

1.3.3 心肌组织学检测 剪去小鼠心脏的心房、右室及大血管组织,取左室心肌组织,用 10% PBS 中性甲醛固定液固定,脱水、清洗、石蜡包埋后制成切片,HE 染色后光学显微镜观察心肌细胞形态学改变; 摄片并结合 QLAB 图像分析软件 (Leica, 德国) 定量测量心肌细胞面积。

1.3.4 靶标预测 分别使用 TargetScan 和 miRanda 软件对 miRNA-142-3p 进行 lncRNA 和 circRNA 的靶标预测。对两种软件预测出的靶基因分别按照每种软件的评分标准进行筛选。TargetScan 软件根据种子区 (seed region) 原则,将 miRNA 5' 端的第 2~8 位碱基与目标分子的一段 7nt 序列进行完成互补配对,同时结合偏好特点进行评分,得出综合预测结果。miRanda 算法以碱基互补 (如 A=U, G=C 等) 构建打分矩阵,允许 G=U 错配,为体现

miRNA 3'端和 5'端与靶基因作用过程中的不对称性,软件给出了 scale 参数。TargetScan 算法中去除 context score percentile < 50 的靶基因, miRanda 算法中去除最大自由能(max energy)> -10的靶基因。最后取此两种软件的交集作为差异 miRNA 的最终靶基因。高严谨筛查条件设定为 TargetScan_score≥90, miranda_Energy≤-40。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析,计量资料用均数±标准差表示,组间比较采用单因素方差分析。以 P<0.05 为差异有统计学意义。

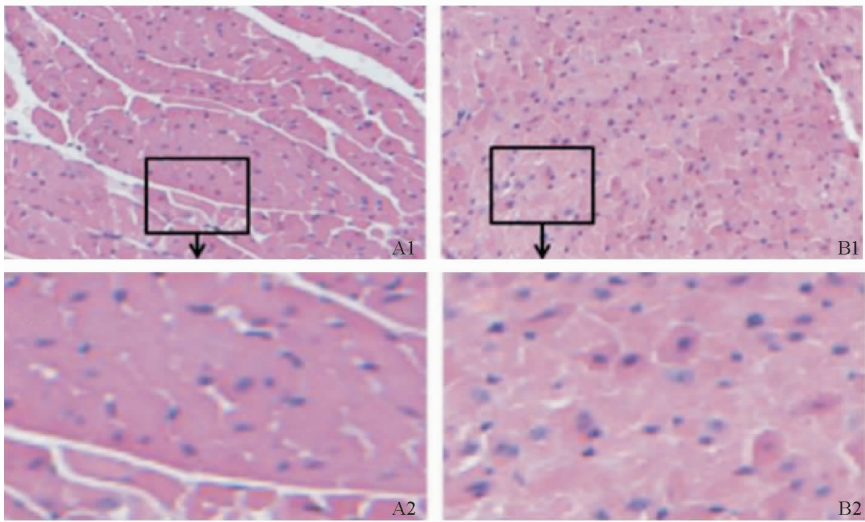
2 结果

2.1 两组小鼠生存率、心脏功能及心肌组织学改变
模型组与对照组小鼠生存率分别为 86.7% (13/15)和 100%(7/7),两组间比较差异有统计学意义(P<0.05)。超声心动图检查结果显示,与对照组相比,模型组小鼠 LVWI 增加,LVEF 和左室 FS 减小(P<0.05,见表 1);心肌组织学检查结果显示,与对照组相比,模型组小鼠心肌细胞肥大、排列紊乱、细胞核增大并深染(图 1);定量分析表明,模型组小鼠心肌细胞面积(389±19) μm² 明显大于对照组(200±14) μm², P<0.05。

表 1 各组小鼠生存率及心脏功能改变

组别	生存率/%	LVMI	LVEF/%	FS/%
对照组	100(7/7)	3.80±0.07	81.38±3.04	50.86±3.86
模型组	86.7(13/15) ⁽¹⁾	4.83±0.10 ⁽¹⁾	56.03±2.81 ⁽¹⁾	29.31±3.19 ⁽¹⁾

注:与对照组相比,⁽¹⁾ P<0.05



注:A 为对照组,A2 为 A1 局部放大;B 为模型组,B2 为 B1 局部放大

图 1 小鼠心肌细胞形态改变

2.2 1 型糖尿病小鼠心肌组织 miR-142-3p 表达改变

前期实验利用基因芯片技术筛选糖尿病小鼠心肌组织中 miRNAs 的差异表达谱,并经实时定量 PCR 验证发现糖尿病小鼠心肌组织中 17 个差异表达的 miRNA: miR-195、miR-199a-3p、miR-700、miR-24、miR-21、miR-221、miR-499-3p、miR-208、miR-705 表达上调,miR-142-3p、miR-29a、miR-182、miR-1、miR-373、miR-143、miR-20a、miR-220b 表达下调。与对照组(1.58±0.29)相比,糖尿病小鼠心肌组织中 miR-142-3p mRNA 相对表达水平明显下

调(0.33±0.18 对 1.5±0.29, P<0.05),提示 miR-142-3p 与糖尿病心肌病发生相关。

2.3 miR-142-3p 的 lncRNA 靶标和 circRNA 靶标分析

软件预测到的 miRNA 的靶分子常常有很多,而多个软件同时预测能够提高靶分子的成功率。这里我们选用常见的 miRanda 和 TargetScan 软件来同时预测 miR-142-3p 的靶基因,我们预测到 877 个 lncRNA 靶标分子和 223 个 circRNA 靶标分子。这么多数量的分子对将来的验证带来了极大的困难。为了使实验验证更加具有的可行性和方

便性,我们提高了软件预测指标的标准,在设定高严谨筛查条件下,预测 lncRNA 靶标和 circRNA 靶标分子分别有 35 个(ENSMUST00000191309、194500、189111、191487、191974、195482、189397、194784、186457、187822、185619、186901、192169、189003、188732、192820、190034、190828、192308、189473、190559、189803、191129、195661、195871、191442、186502、195452、187703、194662、204274、189796、189123、192697、192583)和 14 个(mmu_circ_0002083、0000450、0002554、0001460、0001560、0001800、0001801、0002281、0000614、0000888、0000911、0003729、0000827、0003865)。

2.4 miR-142-3p 的 circRNA 靶标相关宿主基因功能分析

由于我们预测的 lncRNA 分子没有转录本信息作为背景参考,不能分析其可能的功能。对于 circRNA,我们可以根据其宿主基因的相关功能通路来进行功能预测,从而,可以为进一步的研究指明方向。我们采用 GO 分析,发现靶标 circRNA 可能在细胞质、质膜、细胞核、高尔基体、内质网、外泌体等细胞结构中发挥重要作用,可能参与代谢、氧化还原、Notch 信号通路、酶催化、蛋白加工、蛋白糖基化、小 RNA 出核、脂肪酸 B 氧化、糖原加工等生物学过程,具有与金属离子结合、与钙离子结合、氧化还原酶活性、异构酶活性、甘露糖苷酶活性、视黄醛脱氢酶、茛菪醇脱氢酶、糖苷键水解酶等分子功能。这表明 miR-142-3p 能调控多种生物学过程,可能与心肌病的发生有一定的相关性,尚有待实验进一步证实。

进一步用 KEGG 对靶标 circRNA 进行宿主基因功能分析,发现 mmu_circ_0001460 通过宿主基因 Akr1b8,参与果糖和甘露糖代谢、半乳糖代谢、戊糖与葡萄糖酸酯转换、甘油酯代谢;mmu_circ_0001800 和 mmu_circ_0001801 通过宿主基因 Aph1b,参与阿尔茨海默病和 Notch 信号通路;mmu_circ_0002281 通过宿主基因 Man1a,参与糖原生物合成和内质网蛋白加工。上述 circRNA 是否通过行使这些功能参与心肌病的发展,还有待后续实验证明。

3 讨论

糖尿病心肌病的机制非常复杂,可能与钙离子稳态受损、肾素-血管紧张素系统激活、活性氧增加

所致氧化应激、线粒体功能受损、心肌糖脂及能量代谢异常等有关^[6-7]。

miRNA 在人类基因中虽然仅占 3%,但是控制着近 30% 的基因表达,既参与调节组织器官的形成、细胞增殖、代谢、造血等生理过程^[8],也在各种疾病尤其是心血管疾病的发生和发展过程中发挥重要作用^[9]。研究发现,miRNA 参与调控运动所致的生理性左心室肥厚,其调控机制与病理性左心室肥厚并无差异,提示 miRNA 可能在转录水平调控致心肌细胞肥大的关键基因的表达^[10]。我们前期实验利用基因芯片技术筛选糖尿病小鼠心肌组织中 miRNA 的差异表达谱,发现 miR-142-3p 表达下调,也说明 miR-142-3p 可能与糖尿病心肌病发生有关联。

lncRNA 是长度 > 200 个核苷酸的非编码 RNA^[11],用以区别小的非编码 RNA^[11-12]。已证明 lncRNA 可参与调控细胞内多种生物学过程^[13],但其他分子功能还有待揭示。本研究预测出 miR-142-3p 最有可能调控的 lncRNA 有 35 个,但由于这些靶分子未知功能,所以关于其是否参与心肌病还有待验证。

CircRNA 是 2012 年才发现的一类不具有 5' 帽子和 3' poly(A) 尾巴,由共价键连接的环状 RNA 结构,绝大部分功能当前未知,推测其功能可能与其来源相关的宿主基因相关。circRNA 可参与心肌病的发生^[14-15]。本研究预测 miR-142-3p 最有可能调控的 circRNA 有 14 个,根据其宿主基因 GO 和 KEGG 分析推测其功能,着重关注与糖尿病相关的代谢通路,为进一步的实证研究指明了方向。

参 考 文 献

- [1] Rubler S, Dlugash J, Yuceoglu YZ, et al. New type of cardiomyopathy associated with diabetic glomerulosclerosis [J]. Am J Cardiol, 1972, 6(30):595-602.
- [2] Huynh K, Bernardo BC, McMullen JR, et al. Diabetic cardiomyopathy: mechanisms and new treatment strategies targeting antioxidant signaling pathways [J]. Pharmacol Ther, 2014, 142(3):375-415.
- [3] Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight[J]. Nat Rev Genet, 2008, 9(2):102-114.
- [4] 孟哲颖, 王玉, 林艳端, 等. 微小 RNA-182 通过靶基因 Rac1 调控高糖诱导的心肌细胞肥大[J]. 中华心血管病杂志, 2015, 43(7):619-624.
- [5] 孟哲颖, 王玉, 南淑良, 等. MiR-182 模拟物提高 1 型糖尿病

小鼠的心脏功能[J]. 中国实验动物学报, 2014, (4):1-5.

[6] Boudina S, Abel ED. Diabetic cardiomyopathy revisited[J]. Circulation, 2007, 115(25):3213-3223.

[7] Mihalik SJ, Michaliszyn SF, de las Heras J, et al. Metabolomic profiling of fatty acid and amino acid metabolism in youth with obesity and type 2 diabetes: evidence for enhanced mitochondrial oxidation[J]. Diabetes Care, 2012, 35(3):605-611.

[8] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell, 2004, 116(2):281-297.

[9] Afjeh SSA, Ghaderian SMH. The role of microRNAs in cardiovascular disease[J]. Int J Mol Cell Med, 2013, 2(2): 50-57.

[10] Martinelli NC, Cohen CR, Santos KG, et al. An analysis of the global expression of microRNAs in an experimental model of physiological left ventricular hypertrophy[J]. PLoS One, 2014, 9(4):e93271.

[11] Perkel JM. Visiting "noncodarnia"[J]. Biotechniques, 2013, 54(6):301, 303-304.

[12] Ma L, Bajic VB, Zhang Z. On the classification of long non-coding RNAs[J]. RNA Biol, 2013, 10(6):925-933.

[13] Gomes CPC, Spencer H, Ford KL, et al. The Function and Therapeutic Potential of Long Non-coding RNAs in Cardiovascular Development and Disease [J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2017, 8:494-507.

[14] Fan X, Weng X, Zhao Y, et al. Circular RNAs in Cardiovascular Disease: An Overview[J]. Biomed Res Int, 2017, 2017:5135781.

[15] Ottaviani L, da Costa Martins PA. Non-coding RNAs in cardiac hypertrophy [J]. J Physiol, 2017, 595 (12): 4037-4050.

(收稿:2017-11-20 修回:2017-12-21)
(本文编辑:丁媛媛)

发表学术论文“五不准”

1. 不准由“第三方”代写论文。科技工作者应自己完成论文撰写,坚决抵制“第三方”提供论文代写服务。
 2. 不准由“第三方”代投论文。科技工作者应学习、掌握学术期刊投稿程序,亲自完成提交论文、回应评审意见的全过程,坚决抵制“第三方”提供论文代投服务。
 3. 不准由“第三方”对论文内容进行修改。论文作者委托“第三方”进行论文语言润色,应基于作者完成的论文原稿,且仅限于对语言表达方式的完善,坚决抵制以语言润色的名义修改论文的实质内容。
 4. 不准提供虚假同行评审人信息。科技工作者在学术期刊发表论文如需推荐同行评审人,应确保所提供的评审人姓名、联系方式等信息真实可靠,坚决抵制同行评审环节的任何弄虚作假行为。
 5. 不准违反论文署名规范。所有论文署名作者应事先审阅并同意署名发表论文,并对论文内容负有知情同意的责任;论文起草人必须事先征求署名作者对论文全文的意见并征得其署名同意。论文署名的每一位作者都必须对论文有实质性学术贡献,坚决抵制无实质性学术贡献者在论文上署名。
- 本“五不准”中所述“第三方”指除作者和期刊以外的任何机构和个人;“论文代写”指论文署名作者未亲自完成论文撰写而由他人代理的行为;“论文代投”指论文署名作者未亲自完成提交论文、回应评审意见等全过程而由他人代理的行为。