

DOI:10.7499/j.issn.1008-8830.2013.12.017

论著·临床研究

特发性矮身材儿童循环 microRNA 表达水平的研究

赵莎¹ 钟燕¹ 蒋耀辉¹ 易著文²

(1. 南华大学儿科学院 / 湖南省儿童医院儿童保健所, 湖南 长沙 410007;
2. 中南大学湘雅二医院儿科, 湖南 长沙 410007)

【摘要】 目的 研究特发性矮身材 (ISS) 患儿循环 miRNA 表达水平, 初步建立 ISS 循环 miRNA 表达谱, 为进一步探索 miRNA 与 ISS 发生、发展及寻找新的生物标记物提供理论依据。方法 选取 20 例 ISS 患儿和 20 例健康对照儿童, 提取血清总 RNA, 利用 microRNA microarray 技术比较 ISS 患儿与对照儿童血清 miRNA 的表达差异; 实时荧光定量 PCR 技术验证芯片结果, 生物信息学分析软件对筛选出的具有显著差异表达的 miRNA 进行靶基因预测。结果 ISS 组与对照组对比共有 40 个差异表达的 miRNA, 其中表达上调的 miRNA 有 24 个; 表达下调的有 16 个; 实时荧光定量 PCR 对其中 2 个表达上调 (miR-185 和 miR-574-5p) 和 2 个表达下调 (miR-497 和 miR-15a) 的 miRNA 进行验证, ISS 患儿血清中 miR-185 较对照组明显上调 ($P<0.05$), miR-497 明显下调 ($P<0.05$)。结论 ISS 患儿与健康对照血清 miRNA 表达存在显著差异, 提示血清 miRNA 可能与 ISS 的发生发展有密切的关系。 [中国当代儿科杂志, 2013, 15 (12): 1104-1108]

【关键词】 循环 miRNAs; 特发性矮身材; miRNA 芯片; 聚类分析; 实时荧光定量 PCR; 儿童

Circulating microRNA expression in children with idiopathic short stature

ZHAO Sha, ZHONG Yan, JIANG Yao-Hui, YI Zhu-Wen. Department of Child Health Care, Hunan Children's Hospital (Paediatric Academy of University of South China), Changsha 410007, China (Yi Z-W, Email: yizhuwen@163.com)

Abstract: Objective To study the role of circulating microRNAs (miRNA) in the pathogenesis of idiopathic short stature (ISS) through detecting miRNA expression profile in plasma of children with ISS. **Methods** Plasma miRNA expression was determined by microarray in 20 children with ISS and 20 healthy children. Altered microRNAs were verified by real-time PCR. The online miRNA target gene prediction software was used to predict and screen miRNA differentially expressed target genes. **Results** According to the microarray, there were 40 differentially expressed miRNAs in the ISS group compared with the control group, including 24 up-regulated miRNAs and 16 down-regulated miRNAs. Real-time PCR verified two up-regulated (miR-185 and miR-574-5p) and two down-regulated miRNAs (miR-497 and miR-15a) and confirmed that plasma miR-185 expression was significantly up-regulated ($P<0.05$) and miR-497 expression was significantly down-regulated ($P<0.05$) in children with ISS. **Conclusions** Plasma miRNA expression levels in children with ISS are significantly different from healthy controls, suggesting that plasma miRNA is associated with the pathogenesis of ISS. [Chin J Contemp Pediatr, 2013, 15(12): 1104-1108]

Key words: Circulating miRNAs; Idiopathic short stature; miRNA microarray; Cluster analysis; Real-time PCR; Child

特发性矮身材 (idiopathic short stature, ISS) 在非生长激素缺乏性矮小中最为常见, 约占所有矮身材儿童的 60%~80%^[1-2]。不但严重影响儿童生长发育与生活质量, 而且给心理健康造成极大影响。ISS 发病机制尚不清楚, 目前诊断仅依靠排除法, 早期发现、早期诊断是改善 ISS 终身高的关键。

微小核糖核酸 (miRNA) 在不同生理、病理状态下具有特定的表达水平和模式, 有助于疾病的早期诊断^[3-4]。近年来研究发现, 血清或血浆中含有多种稳定存在的 miRNA, 在正常人和肿瘤、组织损伤、感染等疾病患者体内, 循环 miRNAs 的表达谱存在明显的差异^[5-10], 预示着循环 miRNA 的

[收稿日期] 2013-10-31; [修回日期] 2013-11-05

[基金项目] 湖南省博士后科研资助专项计划项目 (No.2011RS4083)。

[作者简介] 赵莎, 女, 博士, 主治医师。

[通信作者] 易著文, 教授。

变化与疾病发生、发展有关。本研究利用高通量 microRNA microarray 技术检测 ISS 患者和健康对照者循环 miRNA 表达水平,旨在建立 ISS 患者循环 miRNA 表达谱,筛查差异表达 miRNAs,寻找 ISS 相关循环 miRNA 分子标志物。

1 资料与方法

1.1 研究对象

收集 2010 年 10 月至 2012 年 10 月在我院儿童保健所门诊就诊的 ISS 患儿 20 例作为病例组,其中男 11 例,女 9 例,平均年龄 8.7 ± 2.2 岁。ISS 入选标准^[1]: (1) 身高低于同性别、同年龄、同地区、同种族正常参考值平均数 -2 SD; (2) 出生时身长和体重正常,而且身材匀称; (3) 无明显的慢性器质性疾病(肝、肾、心、肺、内分泌代谢病和骨骼发育障碍); (4) 无心理和严重的情感障碍,摄食正常; (5) 生长速率稍慢或正常,一般每年生长速率 <5 cm; (6) 染色体正常; (7) 生长激素(GH)激发试验的 GH 峰值 ≥ 10 ng/mL 并具有正常的 IGF- I 浓度; (8) 骨龄正常或延迟。另选取行健康体检的 20 例儿童为健康对照,其中男 11 例,女 9 例,平均年龄 9.0 ± 2.0 岁。本研究经本院伦理委员会批准,所有标本获取均经家长同意,并签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 标本采集及处理 ISS 组和对照组均于清晨空腹抽取外周静脉血 2 mL 于 EDTA 抗凝真空采血管,2 h 内在室温下 1500 g 离心 5 min,去除残留的血细胞并收集血清,然后将收集的血清在 4℃ 条件下,以 12000 g 离心 5 min,进一步吸取上层血清分别装入无酶 EP 管, -80°C 保存备用。

1.2.2 血清总 RNA 提取 采用 TRIzol 及 miRNeasy Mini Kit 试剂盒,根据操作手册中的步骤提取血清总 RNA。

1.2.3 混合样品 采用混合样本池法检测 ISS 患者的循环 miRNA 表达。本实验将 10 例 ISS 患者和 10 例健康对照者的样本按照样品浓度,每个样本各取 1 μg 混合到一起,浓缩至反应起始体系,进行芯片上样检测。

1.2.4 miRNA 芯片杂交 本实验在上海康成生物公司完成。采用由 Exiqon 公司提供的商品化第 5 代 miRCURY LNATM 寡核苷酸芯片,所含 miRNA 探针共计 1891 个。miRNA 的标记与芯片杂交采用 miRCURYTM Hy3TM/Hy5TM Power 标记试剂盒,按说明书将盒内试剂与样本 RNA 混合均匀、

孵育,反应充分后加入标记缓冲液和荧光标记物(Hy3),再行孵育后,加入杂交缓冲液及核酸酶释放缓冲液。将载玻片和芯片按说明组合后放入热压缩袋,使加热收缩后注入备好的杂交液,旋转孵育过夜。次日以配套缓冲液冲洗后进行芯片扫描。

1.2.5 芯片数据统计分析 图像经扫描后输入 GenePix Pro 软件(Axon),进行网格定位和数据提取、转化及标准化处理。采用 Fold Change 法筛选 ISS 组与健康对照组的差异表达 miRNA。采用 MEV4.6 软件对 ISS 组与健康对照组差异表达 miRNA 进行聚类分析。

1.2.6 反转录合成 cDNA 应用 TaqMan[®] MicroRNA Reverse Transcription Kit 和 TaqMan[®] MicroRNA Assays 试剂盒中特异性的茎-环状反转录引物,进行反转录反应,配置反应液的所有操作均在冰上进行。将反应的混合液置于以 cDNA 合成的温度进行预热后的热循环仪上,立即开始逆转录反应。反应体系为 15 μL ,逆转录反应条件为: 16°C 30 min, 42°C 30 min, 85°C 10 min。

1.2.7 实时荧光定量 PCR 应用 TaqMan[®] MicroRNA Assays 试剂盒中的 PCR 引物探针混合液进行 PCR 扩增及荧光检测,在美国 Applied Biosystems 公司 7900 荧光定量 PCR 仪上进行反应。以 U6 为内参基因进行校正和标准化。反应条件为: 95°C 预变性 3 min; 95°C 变性 15 s, 55°C 退火 30 s, 72°C 延伸 30 s,循环 40 次。建立各标本 miR-185、miR-574-5p、miR-497、miR-15a 及 U6 PCR 产物的标准曲线和熔解曲线,分别测量出 20 例健康对照和 20 例 ISS 患者标本的 Ct 值,数据用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 表示目的基因相对表达量。

1.2.8 生物信息学分析 采用 TargetScans、miRanda 在线软件进行生物信息学分析,输出差异表达 miRNA 的预测靶基因。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 16.0 统计软件对数据进行统计学分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组数据若符合正态分布和方差齐性,则采用独立样本 t 检验进行比较;若为非正态分布计量资料,则采用非参数检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 总 RNA 质量评价

所有样品提取所获得的 RNA 经电泳鉴定,均可见 28S 和 18S 的清晰条带,且亮度比(28S:18S) ≥ 2 ,表明 RNA 质量可靠,可用于检测 miRNA 的

芯片实验。

2.2 芯片实验检测结果

采用 FoldChange 法将校正后的 miRNA 芯片数据进行差异基因筛选。按照目前 microRNA 谱系研究常用的标准, 差异倍数 >2 为明显上调, 差异倍数 <0.5 为明显下调, 共筛选出 40 个与 ISS 相关的 miRNA (表 1)。结果显示 ISS 组与健康对照组比较, 表达上调的 miRNA 共 24 个 (miR-185、miR-670、miR-574-5p、miR-10a、miR-1252、miR-320、miR-620 等), 表达下调的 miRNA 共 16 个 (miR-874、miR-497、miR-635、miR-15a、miR-511、miR-942 等)。应用聚类分析方法将上述 40 种 miRNA 芯片数据导入 MeV4.6. 得到聚类分析图。见图 1。

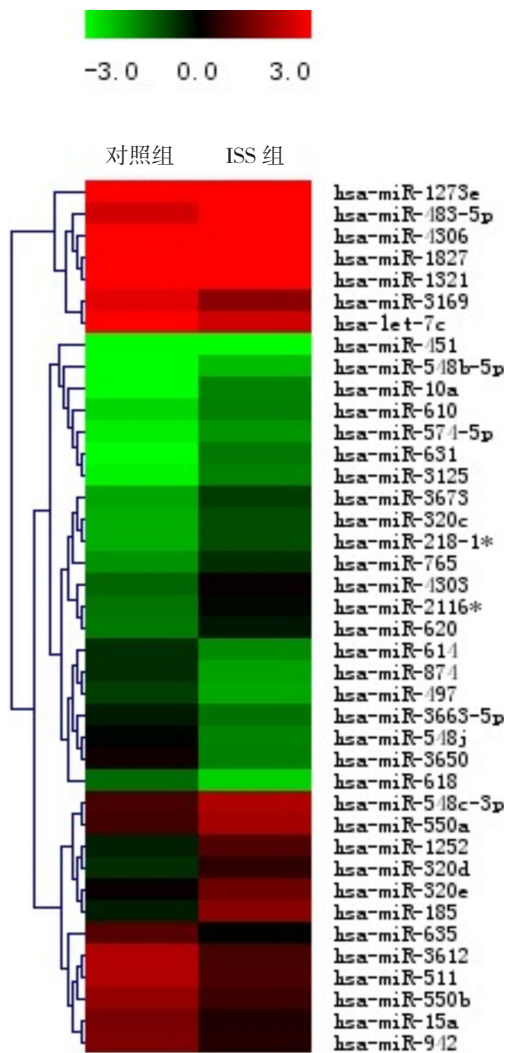


图1 两组差异表达循环 microRNAs 聚类图

表1 ISS 患者血清中差异表达的 miRNAs

表达上调的 miRNAs	倍数变化	表达下调的 miRNAs	倍数变化
hsa-miR-1252	2.47	hsa-miR-548j	0.35
hsa-miR-10a	3.54	hsa-miR-3169	0.48
hsa-miR-4306	2.19	hsa-miR-874	0.37
hsa-miR-574-5p	2.06	hsa-miR-614	0.47
hsa-miR-320c	2.22	hsa-miR-3663-5p	0.48
hsa-miR-3673	2.34	hsa-miR-1273e	0.38
hsa-miR-631	3.08	hsa-miR-635	0.48
hsa-miR-2116*	2.40	hsa-miR-497	0.41
hsa-miR-548b-5p	2.08	hsa-miR-15a	0.48
hsa-miR-610	2.05	hsa-let-7c	0.48
hsa-miR-548c-3p	2.33	hsa-miR-3612	0.41
hsa-miR-218-1*	2.22	hsa-miR-3650	0.30
hsa-miR-550a	2.27	hsa-miR-511	0.43
hsa-miR-4303	2.43	hsa-miR-618	0.43
hsa-miR-483-5p	2.14	hsa-miR-550b	0.49
hsa-miR-320e	2.30	hsa-miR-942	0.47
hsa-miR-1827	2.75		
hsa-miR-765	2.26		
hsa-miR-451	2.02		
hsa-miR-320d	2.18		
hsa-miR-185	3.87		
hsa-miR-1321	2.37		
hsa-miR-3125	2.55		
hsa-miR-620	2.23		

2.3 实时荧光定量 PCR 验证结果

根据 miRNA 芯片及生物信息学分析筛选出 ISS 患者血清中异常表达的 miRNA, 利用实时荧光定量 PCR 方法, 进一步验证 20 例 ISS 患儿及 20 例健康对照儿童血清 miR-185、miR-574-5p、miR-497 和 miR-15a 的表达水平。结果表明, 与正常对照组相比, ISS 患儿血清中 miR-185 表达明显上调 ($P<0.05$), miR-497 表达明显下调 ($P<0.05$); 而 ISS 患儿血清中 miR-574-5p、miR-15a 表达水平与正常组比较差异无统计学意义 (均 $P>0.05$)。见图 2。

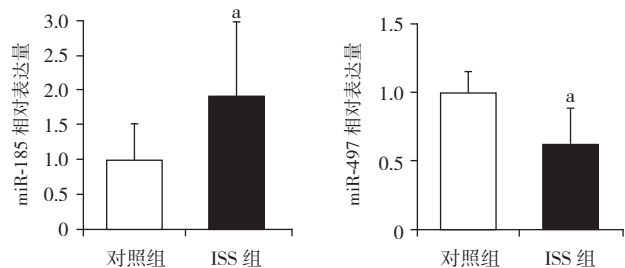


图2 ISS 组和健康对照组血清 miR-185 及 miR-497 实时荧光定量 PCR 结果比较 ($n=20$, 左图 miR-185, 右图 miR-497) a: 与对照组比较, $P<0.05$ 。

2.4 差异表达 miRNA 靶基因预测结果

利用 TargetScans、miRanda 等最常用和最权威的预测 miRNA 靶基因的在线软件进行生物信息学分析,对差异表达的 miRNAs (miR-185、miR-574-5p、miR-497 和 miR-15a) 的靶基因进行预测并筛选。miR-185 的靶基因为胰岛素样生长因子-2 受体 (insulin-like growth factor 2 receptor, IGF-2R); miR-574-5p 的靶基因为信号传导与激活转录因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3); miR-497 及 miR-15a 的靶基因均为胰岛素样生长因子-1 受体 (insulin-like growth factor 1 receptor, IGF-1R)。

3 讨论

微小核糖核酸 (miRNA) 是一类内源性单链非编码小 RNA, 通过与配对的靶基因 mRNA 3'-非编码区域结合位点结合, 抑制靶基因 mRNA 翻译成蛋白或降解 mRNA, 在转录后水平对基因表达进行调控^[12]。miRNA 在细胞增殖、分化、发育和凋亡、胰岛素分泌、胚胎发育等过程中发挥重要作用^[13]。在不同生理、病理状态下, miRNA 表达谱不同, 这种特性使得 miRNA 可能成为反映人体各种生理、病理状况的理想的候选生物标志物。目前研究表明, 循环 miRNA 具有良好的稳定性、检测方便、无创性、可重复性等优势, 可作为新的分子标记物用于疾病的早期诊断、预后预测和治疗靶点研究。本研究应用 microarray 芯片技术筛选得到 ISS 患者和健康对照者血清中差异表达的 40 个 miRNA, 其中 24 个 miRNA 表达上调, 16 个 miRNA 表达下调。研究结果证实了 ISS 患者与健康对照血清 miRNA 表达谱存在显著差异, 提示血清 miRNA 可能与 ISS 的发生发展有着密切的关系。为验证芯片检测结果, 本研究选择 2 个上调的 miRNA (miR-185、miR-574-5p) 和 2 个下调的 miRNA (miR-497、miR-15a) 进行实时荧光定量 PCR 验证, 结果显示 microarray 芯片和实时荧光定量 PCR 方法检测 miRNAs 表达水平基本一致, 证实芯片检测结果的可靠性。本研究发现, 在 ISS 患儿血清中存在差异表达的循环 miRNA 分子, 这一现象提示循环 miRNA 可以作为 ISS 无创性诊断的一种有效的方法, miRNA 可能参与 ISS 病理生理过程。

ISS 的病因目前尚不清楚, 认为与遗传、环境、自身免疫机制有关^[14]。虽有已知的基因、信号通路参与其发病机制, 但其中许多关键环节尚未阐

明。研究结果显示, 在 ISS 患者血清中 miR-185 表达上调, miR-497 表达下调, 其表达上调或下调的原因可能是受上游某因素调控作用 (甲基化修饰, 杂合性缺失等) 的影响, 或下游调控哪些靶基因或信号通路等是下一步重点研究方向。miRNA 通过对靶基因的表达调控而发挥作用。根据文献报道及结合生物信息学方法预测 miRNA 在转录后或翻译水平的靶基因, 筛选出与生长发育有关的靶基因, 如 IGF-1R、IGF-2R 和 STAT3。生长激素/胰岛素样生长因子 (growth hormone/insulin-like growth factors, GH/IGFs) 轴是调节儿童生长发育中最重要的神经内分泌轴, 因而试图着手从这一轴中的激素、生长因子及信号传递途径, 探讨 ISS 的病因。IGF-1R 是调节该轴的激素受体级联反应的效应分子, 其结构和功能异常可能会影响靶基因 IGF-1 与其结合, 从而引起生长障碍。研究显示, ISS 存在 GH 不敏感、IGF-1 抵抗等现象, 均提示可能与 IGF-1R 基因异常有关^[15]。IGF-IGF-1R 系统敲除大鼠模型显示 IGF-1R 单个基因敲除后可表现出严重的生长迟缓^[16]。IGF-1R 可介导 IGF-1 及 IGF-2 促生长作用, 其信号转导通路还与其他生长因子和受体的信号转导通路相互作用^[17]。JAK2/STAT 途径介导了 GH 的受体后信号传递, 基因敲除研究已表明 STAT 激酶在生长中发挥着重要的作用^[18]。miRNA 靶基因预测为进一步研究差异表达的 miRNA 在 ISS 发生中的作用机制提供了实验基础。

总之, 本研究在国内外首先报道 ISS 儿童循环 miRNA 的表达水平, 为进一步研究 miRNA 在 ISS 发生发展中的作用及机制提供了新的方向和新的思路。由于 miRNA 对机体的调控作用不是单一的, 还需进一步深入研究差异 miRNA 的功能。下一步将就在 ISS 中差异表达 miRNA 的靶基因及其下游作用的信号通路及机制进行深入探索。

[参 考 文 献]

- [1] Cohen P, Rogol AD, Deal CL, Saenger P, Reiter EO, Ross JL, et al. Consensus statement on the diagnosis and treatment of children with idiopathic short stature: a summary of the growth hormone research society, the lawson wilkins pediatric endocrine society, and the European society for paediatric endocrinology workshop[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2008, 93(11): 4210-4217.
- [2] 黄慧, 杨玉, 王伟, 杨利, 谢理玲, 王莹, 等. 特发性矮小患儿胰岛素样生长因子受体基因单核苷酸多态性研究[J]. 中国当代儿科杂志, 2011, 13(12): 955-958.
- [3] Brase JC, Wuttig D, Kuner R, Sultmann H. Serum microRNAs as non-invasive biomarkers for cancer[J]. Molecular Cancer, 2010,

- 9:306.
- [4] Gilad S, Meiri E, Yagev Y, Benjamin S, Lebanony D, Yerushalmi N, et al. Serum microRNAs are promising novel biomarkers[J]. PLoS One, 2008, 3(9): 3148.
- [5] Gui J, Tian Y, Wen X, Zhang W, Zhang P, Gao J, et al. Serum microRNA characterization identifies miR-885-5p as a potential marker for detecting liver pathologies[J]. Clin Sci(Lond), 2011, 120(5): 183-193.
- [6] Ma Y, Wang X, Jin H. Methylated DNA and microRNA in Body Fluids as Biomarkers for Cancer Detection[J]. Int J Mol Sci, 2013, 4(5): 10307-10331.
- [7] Ji X, Takahashi R, Hiura Y, Hirokawa G, Fukushima Y, Iwai N. Plasma miR-208 as a biomarker of myocardial injury[J]. Clin Chem, 2009, 55(11): 1944-1949.
- [8] Wang K, Zhang S, Marzolf B, Troisch P, Brightman A, Hu Z, et al. Circulating microRNAs, potential biomarkers for drug-induced liver injury[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(11): 4402-4407.
- [9] Vasilescu C, Rossi S, Shimizu M, Tudor S, Veronese A, Ferracin M, et al. MicroRNA fingerprints identify miR-150 as a plasma prognostic marker in patients with sepsis[J]. PLoS One, 2009, 4(10): e7405.
- [10] Kirschner MB, Edelman JJ, Kao SC, Vallely MP, van Zandwijk N, Reid G. The impact of hemolysis on cell-free microRNA biomarkers[J]. Front Genet, 2013, 4: 94.
- [11] 颜纯, 王慕逖. 小儿内分泌学 [M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2006, 127-129.
- [12] Djuranovic S, Nahvi A, Green R. A parsimonious model for gene regulation by miRNAs[J]. Science, 2011, 331(6017): 550-553.
- [13] Stefani G, Slack FJ. Small non-coding RNAs in animal development[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008, 9(3): 219-230.
- [14] 杨凡. 特发性矮小的诊治进展 [J]. 中国儿童保健杂志, 2013, 21(3): 227-229.
- [15] Lettre G. Genetic regulation of adult stature[J]. Curr Opin Pediatr, 2009, 21(4): 515-522.
- [16] Klammt J, Kiess W, Pfaffle R. IGF1R mutations as cause of SGA[J]. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2011, 25(1): 191.
- [17] Papaconstantinou J. Insulin/IGF-1 and ROS signaling pathway cross talk in aging and longevity determination[J]. Mol Cell Endocrinol, 2009, 299(1): 89-100.
- [18] Hwa V, Little B, Adiyaman P, Kofoed EM, Pratt KL, Ocal G, et al. Severe growth hormone insensitivity resulting from total absence of signal transducer and activator of transcription 5b[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2005, 90(7): 4260-4266.
- (本文编辑: 万静)