

论著·临床研究

## 基于生物信息学分析 microRNA-495-5p 在早产儿支气管肺发育不良中的表达及其临床意义

孙祎璠 马俐 龚小慧 洪文超 蔡成

(上海市儿童医院 / 上海交通大学附属儿童医院新生儿科, 上海 200062)

**[摘要]** **目的** 探讨支气管肺发育不良(BPD)早产儿血清中 microRNA-495-5p(miRNA-495-5p)的表达变化并对其进行生物信息学分析,为深入研究 miRNA-495-5p 与 BPD 的关系提供理论依据。**方法** 收集 2015 年 1 月至 2016 年 12 月 NICU 住院治疗早产儿的一般临床资料,选取具有早期 BPD 临床表现的 20 例患儿为 BPD 组,无早期 BPD 临床表现的 20 例患儿为对照组。采集两组患儿末梢外周血,每组各随机选取 5 例患儿,应用 miRNA 芯片技术筛选两组患儿血清中差异性表达的 miRNAs; 每组各随机选取 6 例患儿,采用 RT-PCR 技术再次验证其差异性表达。应用 TargetScan、miRDB、miRWalk 数据库对 miRNA-495-5p 进行靶基因预测; 采用 DAVID 数据库对靶基因进行基因功能富集分析和信号转导通路富集分析。**结果** 与对照组患儿相比, BPD 组患儿血清 miRNA-495-5p 表达显著上调 ( $P < 0.05$ )。通过 3 种数据库预测 miRNA-495-5p 的靶基因共有 117 个,其靶基因功能分别富集于转录调节活性、转录激活活性、转录辅助激活活性等分子功能,代谢过程的调控、依赖 DNA 的转录调控、血管模式等生物学过程,以及核质、膜组分、不溶性组分等细胞组分上 ( $P < 0.05$ ); 信号转导通路则显著富集于 mTOR 信号通路中 ( $P < 0.05$ )。**结论** miRNA-495-5p 可能通过调控新生血管生成、干细胞分化、细胞凋亡及自噬等参与 BPD 的发生发展,为后续深入研究其在 BPD 中的作用及功能机制提供了重要线索。

[中国当代儿科杂志, 2020, 22(1): 24-30]

**[关键词]** 支气管肺发育不良; microRNA-495-5p; 生物信息学; 早产儿

### Expression of microRNA-495-5p in preterm infants with bronchopulmonary dysplasia: a bioinformatics analysis

SUN Yi-Fan, MA Li, GONG Xiao-Hui, HONG Wen-Chao, CAI Cheng. Department of Neonatology, Shanghai Children's Hospital/Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200062, China (Cai C, Email: caicheng2004@163.com)

**Abstract: Objective** To study the expression of microRNA-495-5p(miRNA-495-5p) in the serum of preterm infants with bronchopulmonary dysplasia (BPD) based on a bioinformatics analysis, and to provide a theoretical basis for further research on the association between miRNA-495-5p and BPD. **Methods** A total of 40 preterm infants who were admitted to the neonatal intensive care unit from January 2015 to December 2016 were enrolled. Among these infants, 20 with early clinical manifestations of BPD were enrolled as the BPD group, and 20 without such manifestations were enrolled as the control group. Peripheral blood samples were collected. The miRNA microarray technique was used to screen out differentially expressed miRNAs in serum between the two groups. RT-PCR was used for validation of results. TargetScan, miRDB, and miRWalk databases were used to predict the target genes of miRNA-495-5p. The DAVID database was used to perform gene ontology (GO) analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway analysis of the target genes. **Results** Compared with the control group, the BPD group had a significant increase in the expression of miRNA-495-5p in serum ( $P < 0.05$ ). A total of 117 target genes of miRNA-495-5p were predicted by the above three databases and they were involved in several molecular functions (including transcriptional regulatory activity, transcriptional activation activity, and transcription cofactor activity), biological processes (such as metabolic regulation, DNA-dependent transcriptional regulation, and vascular pattern), and cell components (including

[收稿日期] 2019-08-29; [接受日期] 2019-12-23

[基金项目] 国家自然科学基金(81571467)。

[作者简介] 孙祎璠,女,硕士,住院医师。

[通信作者] 蔡成,男,主任医师。Email: caicheng2004@163.com。

nucleoplasm, membrane components, and insoluble components) ( $P<0.05$ ). As for signaling pathways, these genes were significantly enriched in the mTOR signaling pathway ( $P<0.05$ ). **Conclusions** MiRNA-495-5p may be involved in the development and progression of BPD by regulating angiogenesis, stem cell differentiation, apoptosis, and autophagy, which provides clues for further research on the role and functional mechanism of miRNA-495-5p in BPD.

[Chin J Contemp Pediatr, 2020, 22(1): 24-30]

**Key words:** Bronchopulmonary dysplasia; microRNA-495-5p; Bioinformatics; Preterm infant

支气管肺发育不良 (bronchopulmonary dysplasia, BPD) 是早产儿中常见的慢性肺疾病 (chronic lung disease, CLD)。尽管在过去的几十年中中国产医学技术已得到飞速的发展, 但 BPD 的发病率并没有显著下降, 严重影响早产儿的存活率和生活质量<sup>[1]</sup>。目前更为常见的是一种“新型”BPD, 主要病理特征是异常炎症反应刺激下引起晚期肺发育受阻, 导致肺泡结构简单化和肺血管发育异常。肺发育是一个复杂的生物学过程, 受到多种因素的影响与调节, 包括糖皮质激素、催乳素和生长因子等<sup>[2-4]</sup>。而 microRNAs (miRNAs) 作为一类基因转录后调控其水平表达的非编码 RNA, 主要作用是通过促进 mRNA 降解或干扰 mRNA 翻译来抑制基因翻译。近年来, 越来越多的研究发现 miRNAs 在包括肺发育在内的多种生物学过程中具有重要作用<sup>[5]</sup>。目前已有多种 miRNAs 被报道与肺发育过程密切相关, 包括 miRNA-127、miRNA-26a、miRNA-106b 等<sup>[6-8]</sup>。但是, 随着对肺发育及肺发育相关疾病机制理解的加深, 更多有意义的 miRNAs 尚待发现和研究的。

miRNA-495 作为 miRNAs 中的一员, 被报道参与调控细胞发育、凋亡、免疫及炎症反应, 并与肿瘤细胞的增殖、侵袭、转移和耐药有关<sup>[9]</sup>。Yang 等<sup>[10]</sup> 研究发现 miRNA-495 在肺发育中具有重要的作用, 可能参与调控肺发育的不同阶段。因此, 本研究推测 miRNA-495 可能与肺发育及肺发育相关疾病密切相关。本文基于生物信息学分析, 探讨 miRNA-495-5p 在早产儿 BPD 中的表达及其临床意义, 为研究 miRNA-495-5p 在 BPD 发生发展中的作用提供功能与机制的线索。

## 1 资料与方法

### 1.1 观察对象

2015年1月至2016年12月收集在本院 NICU 住院治疗的早产儿的一般临床资料。BPD 的早期症状通常表现为在机械通气过程中出现呼吸机

依赖或停氧困难超过 10~14 d<sup>[11]</sup>。结合目前国内 BPD 的诊断标准<sup>[11]</sup>, 本研究中 BPD 组患儿纳入标准为在机械通气过程中出现呼吸机依赖, 或鼻导管吸氧过程中停氧困难超过 28 d, 具有早产儿 BPD 早期临床表现 (共 20 例; 其中 14 例行机械通气, 6 例行空气、氧气混合鼻导管吸氧)。对照组早产儿无用氧史或无长时间用氧史, 没有早期 BPD 临床表现 (共 20 例; 均行空气、氧气混合鼻导管吸氧, 吸入氧浓度 <30%, 用氧时间 <3 d)。BPD 组患儿胎龄  $28.8 \pm 4.3$  周, 出生体重  $1570 \pm 335$  g; 对照组患儿胎龄  $29.1 \pm 2.5$  周, 出生体重  $1620 \pm 289$  g。所有入组患儿的基础疾病均为早产儿或伴有新生儿呼吸窘迫综合征, 均无围生期感染, 入院时间均在生后 12 h 以内。采集末梢外周血时间, BPD 组患儿为用氧 28 d 以后, 对照组患儿为生后 3 d 左右。两组患儿的一般临床资料进行比较差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。本研究经伦理委员会批准并家属签署知情同意。

### 1.2 miRNA 芯片

使用 TRIzol 法提取血清 RNA, 使用 NanoDrop ND-1000 测量纯化后的 RNA 浓度, 电泳检测 RNA 完整性。抽提的 RNA 通过质检后, 使用 miRCURY™ Array Power Labeling Kit (Cat #208032-A, 丹麦 Exiqon 公司) 对 miRNA 进行标记; 然后将样品与 miRCURY™ LNA Array (v.18.0, 丹麦 Exiqon 公司) 芯片杂交, 实验方法参照说明书进行。最后使用 Axon GenePix 4000B 芯片扫描仪扫描芯片。

### 1.3 RT-PCR 检测

提取血清总 RNA 后, 参考逆转录试剂盒说明书进行逆转录反应, 获得 cDNA 样品。由上海康成生物有限公司设计并合成目的基因及内参基因的引物序列 (表 1)。RT-PCR 反应体系:  $2 \times$  MasterMix 5  $\mu$ L, 10  $\mu$ mol/L 上、下游引物各 0.5  $\mu$ L, cDNA 模板 2  $\mu$ L, DEPC 水 2  $\mu$ L。于 RT-PCR 仪上进行 PCR 反应: 95  $^{\circ}$ C 10 min; 95  $^{\circ}$ C 10 s, 60  $^{\circ}$ C 60 s, 40 个循环; 扩增反应结束后,

95℃ 10 s, 60℃ 60 s, 95℃ 15 s, 并从60℃缓慢加热到95℃(仪器自动进行,速度为0.075℃/s)。最终数据采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算并表示。

表1 PCR引物序列

基因	引物序列
U6	F: 5'-GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT-3' R: 5'-CGCTTACGAATTTGCGTGCAT-3'
miRNA-495-5p	GSP: 5'-GGGGAAGTTGCCCATGTTA-3' R: 5'-GTGCGTCTCGTGGAGTCG-3'

注: GSP是具有茎环结构的miRNA特异上游引物。

### 1.4 靶基因预测

利用miRNA靶标基因数据库TargetScan、miRDB、miRWalk进行靶基因预测,得到有关miRNA-495-5p的靶基因,取此3种软件预测结果的交集作为差异miRNA的最终靶基因。

### 1.5 Gene Ontology分析

Gene Ontology(GO)分析针对靶基因进行功能富集分析,包含GO注释中的分子功能(molecular function)、生物学过程(biological process)及细胞组分(cellular component)。

### 1.6 统计学分析

miRNA芯片扫描图输入GenePix Pro6.0软件中进行数据分析,使用差异倍数(fold change)和P值筛选差异性表达的miRNA。将PCR数据结果录入GraphPad Prism软件中,呈正态分布的计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组间比较采用两样本t检验。利用DAVID数据库(<https://david.ncifcrf.gov/>)对靶基因进行KEGG信号转导通路富集分析及GO分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 miRNA芯片及RT-PCR验证结果

随机选取两组各5例患儿血清样本行miRNA芯片筛查,BPD组胎龄 $29.8 \pm 2.1$ 周,出生体重 $1386 \pm 285$ g,对照组胎龄 $30.9 \pm 1.8$ 周,出生体重 $1467 \pm 101$ g,两组患儿胎龄及出生体重比较差异均无统计学意义(分别 $t = -0.93$ 、

$-0.60$ ,  $P > 0.05$ ); miRNA芯片结果显示,与对照组患儿( $0.21 \pm 0.06$ )相比,BPD组患儿血清miRNA-495-5p( $0.41 \pm 0.17$ )表达上调( $t = 2.44$ ,  $P < 0.05$ ),差异表达倍数(BPD组/对照组)为1.92。

随机选取两组各6例患儿血清样本行RT-PCR检测,BPD组胎龄 $29.6 \pm 1.9$ 周,出生体重 $1296 \pm 330$ g,对照组胎龄 $31.4 \pm 1.8$ 周,出生体重 $1507 \pm 127$ g,两组患儿胎龄及出生体重比较差异均无统计学意义(分别 $t = -1.73$ 、 $-1.46$ ,  $P > 0.05$ ); RT-PCR结果显示,BPD组患儿miRNA-495-5p表达水平( $2.56 \pm 0.83$ )高于对照组( $1.05 \pm 0.35$ )( $t = 3.77$ ,  $P < 0.05$ ),与芯片结果一致。

### 2.2 靶基因预测结果

利用miRNA靶标基因数据库TargetScan、miRDB、miRWalk进行靶基因预测并取交集,结果得到miRNA-495-5p的靶基因共117个,其中部分靶基因见表2。

表2 miRNA-495-5p经3个软件预测所得的靶基因交集

基因ID	基因名称	基因ID	基因名称	基因ID	基因名称
57491	AHRR	84159	ARID5B	55183	RIF1
1639	DCTN1	23440	OTP	4148	MATN3
10293	TRAIP	389677	RBM12B	3708	ITPR1
9132	KCNQ4	83999	KREMEN1	51151	SLC45A2
29855	UBN1	6262	RYR2	2634	GBP2
57448	BIRC6	51719	CAB39	4170	MCL1
79718	TBL1XR1	122830	NAA30	149420	PDIK1L
29915	HCFC2	5926	ARID4A	23014	FBXO21
9798	IST1	1398	CRK	51091	SEPSECS
1999	ELF3	26054	SENP6	58506	SCAF1

### 2.3 GO分析结果

以上117个靶基因通过GO注释描述共得到55个基因的GO生物学过程注释信息、27个基因的GO分子功能注释信息及23个基因的GO细胞组分注释信息。结果显示miRNA-495-5p的预测靶基因分别富集在代谢过程的调控、依赖DNA的转录调控、血管模式等生物学过程,转录调节活性、转录激活活性、转录辅助激活活性等分子功能,以及核质、模组分、不溶性组分等细胞组分上( $P < 0.05$ ),见表3~5。

表3 miRNA-495-5p 预测靶基因 GO 生物学过程分类

GOID	生物学过程	P 值	基因数量 [n(%)]	涉及基因
0051252	代谢过程的调控	0.0001	27(2.50)	ELF3、ARID4A、CASK、HCFC2、OTP、AHRR、PAX7、MED26、HNRNPF、POU4F2 等
0006355	依赖 DNA 的转录调控	0.0004	25(2.31)	ELF3、ARID4A、CASK、HCFC2、OTP、AHRR、PAX7、MED26、POU4F2、ZNF281 等
0001569	血管模式	0.0085	3(0.28)	SEMA5A、NRP1、VEGFA
0006357	RNA 聚合酶 II 启动子的转录调控	0.0087	12(1.11)	ZNF281、ATXN1、TBL1XR1、NCOA2、MED26、VEGFA、CASK、POU4F2、HCFC2 等
0007389	模式指定过程	0.0087	7(0.65)	SEMA5A、NOTCH2、NRP1、PAX7、VEGFA、PBX3、FRS2
0045449	转录调控	0.0092	28(2.59)	ELF3、ARID4A、BDP1、ZXDC、CASK、HCFC2、OTP、AHRR、PAX7、MED26 等
0010557	大分子生物合成过程的正调控	0.0114	11(1.02)	ATXN1、TBL1XR1、NCOA2、PCBD1、VEGFA、ZXDC、CASK、POU4F2、PIAS2、FAM129A 等
0016071	mRNA 的代谢过程	0.0116	8(0.74)	SCAF1、CNOT6L、PAIP1、HNRNPF、VEGFA、CDC40、CPSF6、SNRPF
0001654	眼发育	0.0116	5(0.46)	TWSG1、MYO7A、VEGFA、POU4F2、FRS2
0006916	抗凋亡	0.0121	6(0.56)	NOTCH2、BRAF、MCL1、PAX7、VEGFA、BIRC6
0045941	转录正调控	0.0126	10(0.93)	ATXN1、TBL1XR1、NCOA2、PCBD1、VEGFA、ZXDC、CASK、POU4F2、PIAS2、SMARCA2
0010628	基因表达的正调控	0.0150	10(0.93)	ATXN1、TBL1XR1、NCOA2、PCBD1、VEGFA、ZXDC、CASK、POU4F2、PIAS2、SMARCA2
0031328	细胞生物合成过程的正调控	0.0154	11(1.02)	ATXN1、TBL1XR1、NCOA2、PCBD1、VEGFA、ZXDC、CASK、POU4F2、PIAS2、FAM129A 等
0009891	生物合成过程的正调控	0.0169	11(1.02)	ATXN1、TBL1XR1、NCOA2、PCBD1、VEGFA、ZXDC、CASK、POU4F2、PIAS2、FAM129A 等
0007423	感觉器官的发育	0.0183	6(0.56)	TWSG1、KCNQ4、MYO7A、VEGFA、POU4F2、FRS2
0048863	干细胞分化	0.0191	3(0.28)	NOTCH2、RIF1、PAX7
0045935	碱基、核苷、核苷酸和核酸代谢过程的正调控	0.0228	10(0.93)	ATXN1、TBL1XR1、NCOA2、PCBD1、VEGFA、ZXDC、CASK、POU4F2、PIAS2、SMARCA2
0010604	大分子代谢过程的正调控	0.0265	12(1.11)	ATXN1、TBL1XR1、NCOA2、PCBD1、VEGFA、ZXDC、CASK、POU4F2、PIAS2、SKP1 等
0030182	神经元分化	0.0266	8(0.74)	SEMA5A、NRP1、PAX7、MYO7A、VEGFA、POU4F2、PBX3、OTP
0051173	氮化合物代谢过程的正调控	0.0272	10(0.93)	ATXN1、TBL1XR1、NCOA2、PCBD1、VEGFA、ZXDC、CASK、POU4F2、PIAS2、SMARCA2
0045892	依赖 DNA 的转录负调控	0.0313	7(0.65)	ZNF281、TBL1XR1、NCOA2、ARID4A、ARID5B、POU4F2、SMARCA2
0016481	转录负调控	0.0331	8(0.74)	ZNF281、ATXN1、TBL1XR1、NCOA2、ARID4A、ARID5B、POU4F2、SMARCA2
0051253	RNA 代谢过程的负调控	0.0335	7(0.65)	ZNF281、TBL1XR1、NCOA2、ARID4A、ARID5B、POU4F2、SMARCA2
0043010	相机型眼发育	0.0344	4(0.37)	TWSG1、VEGFA、POU4F2、FRS2
0030001	金属离子的运输	0.0352	8(0.74)	SLC12A6、KCNQ4、SLC23A2、SLC9A4、SLC39A12、RYR2、SCN8A、ITPR1
0045944	RNA 聚合酶 II 启动子的转录正调控	0.0371	7(0.65)	ATXN1、TBL1XR1、NCOA2、VEGFA、CASK、POU4F2、SMARCA2
0045893	依赖 DNA 的转录正调控	0.0395	8(0.74)	ATXN1、TBL1XR1、NCOA2、VEGFA、CASK、POU4F2、PIAS2、SMARCA2
0051254	RNA 代谢过程的正调控	0.0410	8(0.74)	ATXN1、TBL1XR1、NCOA2、VEGFA、CASK、POU4F2、PIAS2、SMARCA2
0032989	细胞组分形态发生	0.0489	7(0.65)	SEMA5A、CAP2、NRP1、OPA1、MYO7A、POU4F2、LAMC1

表4 miRNA-495-5p 预测靶基因 GO 分子功能分类

GOID	分子功能	P 值	基因数量 [n(%)]	涉及基因
0030528	转录调节活性	0.0002	23(2.13)	ZNF281、TBL1XR1、ELF3、ARID4A、PCBD1、ARID5B、ZXDC、FOXN2、HCFC2 等
0016563	转录激活活性	0.0014	10(0.93)	ZNF281、TBL1XR1、NCOA2、ELF3、PCBD1、MED26、ZXDC、PIAS2、HCFC2、SMARCA2
0003713	转录辅助激活活性	0.0028	7(0.65)	NCOA2、ELF3、PCBD1、MED26、PIAS2、HCFC2、SMARCA2
0060090	衔接分子活性	0.0096	4(0.37)	SH3BGRL、AHRR、CRK、FRS2
0003712	转录辅助因子活性	0.0096	8(0.74)	TBL1XR1、NCOA2、ELF3、PCBD1、MED26、PIAS2、HCFC2、SMARCA2
0016564	转录抑制因子活性	0.0174	7(0.65)	ZNF281、ATXN1、TBL1XR1、NCOA2、ELF3、ARID4A、ARID5B
0043565	序列特异性 DNA 结合	0.0449	9(0.83)	ZNF281、TBL1XR1、ELF3、ETV3L、PAX7、FOXN2、POU4F2、PBX3、OTP

表5 miRNA-495-5p 预测靶基因 GO 细胞组分分类

GOID	细胞组分	P 值	基因数量 [n(%)]	涉及基因
0005654	核质	0.0036	13(1.20)	ATXN1、TBL1XR1、ARID4A、MCL1、HNRNPF、MED26、CPSF6、PIAS2、SKP1、PBX3 等
0005624	膜组分	0.0372	10(0.93)	SLC12A6、SLC23A2、KREMEN1、CLEC2D、CASK、BIRC6、RYSR2、RPS6KB1 等
0005626	不溶性组分	0.0452	10(0.93)	SLC12A6、SLC23A2、KREMEN1、CLEC2D、CASK、BIRC6、RYSR2、RPS6KB1 等

## 2.4 KEGG 通路分析结果

在 GO 注释分类的基础上, 利用已有生物通路数据, 对基因集合中的 117 个基因进行生物通

路富集分析。结果显示, miRNA-495-5p 显著富集于哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 信号通路中 ( $P < 0.05$ ), 见表 6。

表6 miRNA-495-5p 预测靶基因的 KEGG 通路数据库富集分析

KEGG 通路	P 值	基因数量 [n(%)]	涉及基因
mTOR 信号通路	0.0028	4(0.37)	BRAF、VEGFA、RPS6KB1、CAB39

## 3 讨论

早产儿肺发育不成熟, 而 BPD 的本质是各种因素对不成熟肺导致的肺损伤, 及损伤后的异常修复。目前 BPD 作为影响早产儿存活率及预后的常见 CLD, 已成为新生儿重症监护病房最为棘手的问题之一, 但确切机制尚未完全阐明。因此, 探讨 BPD 的发病机制及防治措施具有重大的临床意义。

miRNAs 是约含 22 个核苷酸的高度保守的非编码小分子 RNA, 通过对靶基因的转录后调控, 改变靶蛋白的表达水平, 最终影响多种生理和病

理过程, 与生物体发育、细胞增殖、分化和凋亡、肿瘤发生发展及炎症反应等生物学过程密切相关<sup>[12]</sup>。近年来, 多项研究结果表明 miRNAs 在肺发育及肺发育相关疾病中具有重要作用。本研究采用 miRNA 芯片技术筛选在 BPD 患儿血清中差异性表达的 miRNAs, 并利用 RT-PCR 技术确定其差异性表达, 拟从 miRNA 的角度探讨 BPD 的发病机制。结果表明, 相比于对照组患儿, BPD 组患儿血清 miRNA-495-5p 表达上升, 差异有统计学意义。进一步查阅文献可知, 在胎肺发育过程中, miRNA-495 在小管期向囊泡期发育的过程中表达上升, 而在随后的囊泡期向肺泡期发育过程

中表达下降,提示 miRNA-495 的表达变化可能参与调控肺发育的不同阶段<sup>[10]</sup>。据此,本研究推测 miRNA-495 与肺发育密切相关,并可能促进 BPD 的发病。目前已有研究报道 miRNA-495 表达变化与肺癌、慢性哮喘、缺血后新生血管形成等疾病有关,但其在 BPD 中的功能及机制尚未见相关报道<sup>[13-15]</sup>。

本研究中 GO 分析可见 miRNA-495-5p 靶基因集合功能富集于转录调节活性、转录激活活性等分子功能,代谢过程调控、依赖 DNA 的转录调控等生物学过程,以及核质、模组分等细胞组分上,以上结果均提示 miRNA-495-5p 在新生血管生成、干细胞分化等细胞器官发育过程中发挥着重要作用,这可能是 miRNA-495-5p 参与调控肺发育不同阶段的重要作用机制。值得注意的是,作为一类具有自我更新及多向分化潜能的细胞,干细胞是参与器官损伤后组织修复再生的主要外源干细胞之一。目前已有大量的体内外实验证明骨髓间充质干细胞可通过增加肺上皮细胞的数量,减轻肺上皮细胞损伤并修复功能障碍<sup>[16-18]</sup>,这可能作为 miRNA-495-5p 参与调控 BPD 等肺发育相关疾病的重要作用机制,并为 BPD 的防治提供新的思路。

mTOR 是一种高度保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,属磷脂酰肌醇激酶相关激酶家族,主要调控细胞生长、增殖、凋亡和自噬,与心血管疾病、葡萄糖和脂质代谢相关疾病及自身免疫性疾病等密切相关<sup>[19]</sup>。本研究在 GO 注释分类的基础上对集合基因进行生物通路富集分析,结果显示 miRNA-495-5p 显著富集于 mTOR 信号通路中。特异性阻断 P13K/mTOR 信号通路可抑制体外血管内皮生长因子(VEGF)诱导的细胞增殖、生存和体内 VEGF 诱导的血管生成<sup>[20]</sup>。已有报道称 miRNA-495 可通过 mTOR 信号通路促进软骨细胞凋亡、衰老及导致骨关节炎的进展<sup>[9]</sup>;参与调节胃癌细胞的凋亡及转移,增加胃癌对化疗药物的敏感性等<sup>[21]</sup>。以上研究结果提示 miRNA-495-5p 可能通过调节 mTOR 信号通路活性参与肺发育不同阶段的细胞增殖、凋亡及血管生成等生物学过程。Sureshbabu 等<sup>[22]</sup>进一步发现在高氧环境中抑制 mTOR 可限制自噬性肺损伤,减少细胞凋亡的发生,改善肺组织结构,增加小鼠存活率。这可能是 miRNA-495-5p 促进 BPD 发生发展的重要作用机制,即 miRNA-495-

5p 可能通过激活 mTOR 信号通路导致肺部异常炎症反应,促进 BPD 的发生发展。

综上所述,本研究应用生物信息学方法对 miRNA-495-5p 进行系统性描述,结果显示 miRNA-495-5p 在 BPD 发生发展过程中可能发挥着重要作用,且有可能是通过调控新生血管生成、干细胞分化、细胞凋亡及自噬等方面实现的。但本研究尚未在细胞水平及体内实验进行相关验证,缺乏相关实验数据支持,故应谨慎对待。本研究的推论或为今后 miRNA-495-5p 与 BPD 相关性研究提供一定的数据支持和理论指导。

#### [参 考 文 献]

- [1] Kalikkot Thekkeveedu R, Guaman MC, Shivanna B. Bronchopulmonary dysplasia: a review of pathogenesis and pathophysiology[J]. *Respir Med*, 2017, 132: 170-177.
- [2] Bancalari E, Jain D. Bronchopulmonary dysplasia: 50 years after the original description[J]. *Neonatology*, 2019, 115(4): 384-391.
- [3] Ballard PL. Hormonal regulation of pulmonary surfactant[J]. *Endocr Rev*, 1989, 10(2): 165-181.
- [4] Gross I. Regulation of fetal lung maturation[J]. *Am J Physiol*, 1990, 259(6 Pt 1): L337-L344.
- [5] Herriges M, Morrisey EE. Lung development: orchestrating the generation and regeneration of a complex organ[J]. *Development*, 2014, 141(3): 502-513.
- [6] Bhaskaran M, Wang Y, Zhang H, et al. MicroRNA-127 modulates fetal lung development[J]. *Physiol Genomics*, 2009, 37(3): 268-278.
- [7] Sun YF, Kan Q, Yang Y, et al. Knockout of microRNA26a promotes lung development and pulmonary surfactant synthesis[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(4): 5988-5995.
- [8] Nana-Sinkam SP, Karsies T, Riscili B, et al. Lung microRNA: from development to disease[J]. *Expert Rev Respir Med*, 2009, 3(4): 373-385.
- [9] Zhao X, Wang T, Cai B, et al. MicroRNA-495 enhances chondrocyte apoptosis, senescence and promotes the progression of osteoarthritis by targeting AKT1[J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(4): 2232-2244.
- [10] Yang Y, Pu XD, Qing K, et al. Identification of differentially expressed microRNAs and the possible role of miRNA-126\* in Sprague-Dawley rats during fetal lung development[J]. *Mol Med Rep*, 2013, 7(1): 65-72.
- [11] 邵肖梅, 叶鸿瑁, 邱小汕. 实用新生儿学[M]. 第4版. 人民卫生出版社, 2018: 416-422.
- [12] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297.
- [13] Ahmadi A, Khansarinejad B, Hosseinkhani S, et al. miR-199a-5p and miR-495 target GRP78 within UPR pathway of lung cancer[J]. *Gene*, 2017, 620: 15-22.
- [14] Welten SM, Bastiaansen AJ, de Jong RC, et al. Inhibition of

- 14q32 microRNAs miR-329, miR-487b, miR-494, and miR-495 increases neovascularization and blood flow recovery after ischemia[J]. *Circ Res*, 2014, 115(8): 696-708.
- [15] Collison A, Herbert C, Siegle JS, et al. Altered expression of microRNA in the airway wall in chronic asthma: miR-126 as a potential therapeutic target[J]. *BMC Pulm Med*, 2011, 11: 29.
- [16] Sun C, Zhang S, Wang J, et al. EPO enhances the protective effects of MSCs in experimental hyperoxia-induced neonatal mice by promoting angiogenesis[J]. *Aging (Albany NY)*, 2019, 11(8): 2477-2487.
- [17] Leeman KT, Pessina P, Lee JH, et al. Mesenchymal stem cells increase alveolar differentiation in lung progenitor organoid cultures[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 6479.
- [18] Mei Y, Chen C, Dong H, et al. Treatment of hyperoxia-induced lung injury with lung mesenchymal stem cells in mice[J]. *Stem Cells Int*, 2018, 2018: 5976519.
- [19] 宋晓红, 刘明明. mTOR 信号通路及相关疾病的研究进展 [J]. *微循环学杂志*, 2018, 28(3): 64-70.
- [20] Liu Y, Pejchinovski M, Wang X, et al. Dual mTOR/PI3K inhibition limits PI3K-dependent pathways activated upon mTOR inhibition in autosomal dominant polycystic kidney disease[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 5584.
- [21] Wang J, Feng W, Dong Y, et al. MicroRNA-495 regulates human gastric cancer cell apoptosis and migration through Akt and mTOR signaling[J]. *Oncol Rep*, 2018, 40(6): 3654-3662.
- [22] Sureshababu A, Syed M, Das P, et al. Inhibition of regulatory-associated protein of mechanistic target of rapamycin prevents hyperoxia-induced lung injury by enhancing autophagy and reducing apoptosis in neonatal mice[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2016, 55(5): 722-735.

( 本文编辑: 万静 )