

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2004071

论著 · 实验研究

环状 RNA 在小鼠肺发育中的连续表达及功能预测

付雪 杨洋 沈艳青 周晓光 周晓玉

(南京医科大学附属儿童医院新生儿医疗中心, 江苏 南京 210008)

[摘要] **目的** 探讨环状 RNA (circRNA) circ4:150439343|150477468 和 circ15:73330849|73343359 在小鼠肺发育中的连续表达及潜在功能。**方法** 根据肺发育分期, 取孕 16.5 d (E16.5 d)、孕 18.5 d (E18.5 d) 及生后 2 d (P2 d) 胎鼠及新生小鼠的肺组织, 利用苏木精-伊红染色观察肺组织形态学; 利用 qRT-PCR 技术检测晚期肺发育过程中 circ4:150439343|150477468 和 circ15:73330849|73343359 的表达情况; 应用 miRanda 和 TargetScan 软件预测 circRNA 的靶向 miRNA, 然后对靶基因进行 GO 和 KEGG 分析并预测相应 circRNA 功能。**结果** 在 E16.5 d 小鼠肺组织切片中观察到 II 型肺泡上皮细胞, 且逐渐增多, P2 d 时肺泡迅速扩张, 间质变薄, 肺泡结构逐渐成熟; qRT-PCR 结果显示 circ4:150439343|150477468 相对表达量随时间推移持续上调 ($P<0.05$), circ15:73330849|73343359 的相对表达量先下调再上调 ($P<0.05$); 宿主基因功能预测显示 circRNA 可参与 Notch、PI3K-Akt 和 NF- κ B 等信号通路。**结论** circ4:150439343|150477468 和 circ15:73330849|73343359 可通过 Notch 等信号通路参与肺发育的调控。**[中国当代儿科杂志, 2020, 22(10): 1125-1130]**

[关键词] 肺发育; 环状 RNA; 生物信息学分析; 小鼠

Continuous expression and functional prediction of circular RNA in mouse lung development

FU Xue, YANG Yang, SHEN Yan-Qing, ZHOU Xiao-Guang, ZHOU Xiao-Yu. Neonatal Medical Center, Children's Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing 210008, China (Zhou X-Y, Email: xyzhou161@163.com)

Abstract: Objective To study the continuous expression and potential function of circular RNA (circRNA), circ4:150439343|150477468 and circ15:73330849|73343359, in mouse lung development. **Methods** According to the stage of lung development, lung tissue samples were collected from mice on embryonic day 16.5 (E16.5), embryonic day 18.5 (E18.5), and postnatal day 2 (P2). Hematoxylin and eosin staining was performed to observe the morphology of lung tissue. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was used to measure the mRNA expression of circ4:150439343|150477468 and circ15:73330849|73343359 during late lung development; miRanda and TargetScan were used to predict the target miRNAs of circRNAs, and then GO and KEGG analysis was performed for the target genes to predict the potential function of circRNAs. **Results** Type II alveolar epithelial cells were observed in the lung slices of E16.5 mice, with a gradual increase in number. On P2, the pulmonary alveoli expanded rapidly, the pulmonary interstitium became thinner, and the alveolar structure gradually became mature. The results of qRT-PCR showed that the relative expression of circ4:150439343|150477468 was continuously upregulated over time and the relative expression of circ15:73330849|73343359 was first downregulated and then upregulated ($P<0.05$). The KEGG and GO analysis showed that circRNAs were involved in the Notch, PI3K-Akt, and NF- κ B signaling pathways. **Conclusions** Circ4:150439343|150477468 and circ15:73330849|73343359 can participate in lung development through the Notch signaling pathway. **[Chin J Contemp Pediatr, 2020, 22(10): 1125-1130]**

Key words: Lung development; Circular RNA; Bioinformatics analysis; Mice

[收稿日期] 2020-04-10; **[接受日期]** 2020-08-26

[作者简介] 付雪, 女, 硕士研究生。

[通信作者] 周晓玉, 女, 主任医师, 教授。Email: xyzhou161@163.com。

随着新生儿诊疗技术的进步,极早产儿的存活率大幅提高,然而部分早产儿仍会发展为支气管肺发育不良(bronchopulmonary dysplasia, BPD),其主要病理学特征是肺泡简单化、结构异常、肺血管发育异常,可导致呼吸道感染加重及终身肺功能下降,中-重度BPD预后差^[1-2]。因此,阐明正常肺发育的生理机制对于研究肺发育疾病具有重要意义。

环状RNA(circular RNA, circRNA)是一类在真核生物中广泛存在的RNA分子,通常由前1个外显子的“首部”和后1个外显子的“尾部”发生反向剪接以共价键的方式形成封闭的共价环状结构^[3]。近些年, circRNA的生物学功能逐渐被揭示,包括:(1)miRNA海绵: circRNA包含miRNA靶位点,竞争性结合miRNA,起到miRNA海绵的作用,从而解除miRNA对靶基因的抑制作用,增加靶基因的表达水平;(2)与RNA结合蛋白(RNA binding protein, RBP)结合;(3)被翻译成肽^[4-5]。随着高通量测序技术和生物信息学的发展,最近在植物、昆虫和哺乳动物中发现了丰富

的circRNA^[6-8]。本课题组前期研究中通过对Sprague-Dawley大鼠和C57BL/6J小鼠肺组织的circRNA表达谱进行差异筛选^[9],验证了多条circRNA在肺发育过程中存在差异表达,其中circ4:150439343|150477468和circ15:73330849|73343359是本课题组在C57BL/6J小鼠胎肺组织中发现并验证的差异表达倍数较大的两条circRNA(表1)。然而目前有关这两条circRNA的具体作用仍不清晰。有鉴于此,本研究选择肺发育3个关键代表时间点,即孕16.5 d(E16.5 d)、孕18.5 d(E18.5 d)及生后2 d(P2 d)进行研究,其分别代表小鼠肺发育的小管期、囊泡期和肺泡期。应用qRT-PCR检测circ4:150439343|150477468和circ15:73330849|73343359在这3个时间点的相对表达量的变化趋势,并通过GO和KEGG进一步分析它们的生物学功能和信号通路,探讨这两条circRNA在小鼠肺发育中的作用及病理生理机制,以期为新生儿肺部相关疾病的诊断和治疗提供新的干预靶点。

表1 circ4:150439343|150477468和circ15:73330849|73343359相关测序结果

circRNA名称	基因名称	染色体位置	P值	log2差异倍数	趋势
circ4:150439343 150477468	<i>Rere</i>	4:150439343 150477468	0.000047	6.081709207	UP
circ15:73330849 73343359	<i>Ptk2</i>	15:73330849 73343359	0.00000101	-6.951012182	DOWN

1 资料与方法

1.1 实验动物与取材

健康成年C57BL/6J小鼠36只(6~8周),由南京大学南京生物医学研究所提供,饲养于SPF级环境中。将雌鼠与雄鼠按照1:2比例合笼,次日上午检查时发现阴道栓记为雌鼠妊娠第0.5天。在E16.5 d、E18.5 d及P2 d,用4%水合氯醛麻醉(0.1 mL/10 g)孕鼠,快速取出胎鼠,采用颈椎脱臼法处死胎鼠及新生小鼠,快速取出肺组织。每组取1份左肺组织放入4%多聚甲醛中,其余肺组织经液氮速冻后储存在-80℃冰箱中。

1.2 苏木精-伊红染色

向胎鼠及新生小鼠肺组织中加入4%多聚甲醛固定24 h。包埋在石蜡中,切片厚度为4 μm;二甲苯脱蜡3次;100%乙醇脱水3次,95%乙醇

脱水3次,蒸馏水冲洗5 min;苏木素染色5 min,用流水稍冲洗5 min;1%盐酸乙醇分化30 s,自来水冲洗30 s,蒸馏水过水5 s;5%伊红染色3 min;80%乙醇-95%乙醇-无水乙醇彻底脱水;用二甲苯透明,最后中性树胶封盖,用Pannoramic MIDI扫描切片。

1.3 qRT-PCR法检测circ 4:150439343|150477468及circ15:73330849|73343359相对表达量

用TRIzol提取肺组织总RNA, RNA质控合格后进行逆转录(Q232-02, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司)。按照PCR试剂盒(Low Rox Premixed, Q131-01, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司)说明书步骤测定肺组织中circ4:150439343|150477468和circ15:73330849|73343359相对表达量。qRT-PCR反应体系(10 μL): SYBR Green 5 μL, 上下游

引物各 0.2 μL , DEPC 水 3.6 μL , cDNA 1 μL 。
qRT-PCR 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$
15 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 40 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。

以 GAPDH 为内参, 计算 circRNA 的相对表达量 =
 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}[10]}$ 。引物由锐博生物科技有限公司设计并
合成 (表 2)。

表 2 用于 qRT-PCR 的引物序列

circRNA 名称	引物序列
circ4:150439343 150477468	F: 5'-GATACAACCCTGAGACAAGGTCCA-3' R: 5'-ATGGTCCCTCTTACTCCCTCCA-3'
circ15:73330849 73343359	F: 5'-CACCCACCAGAGGACTGGAA-3' R: 5'-GGTGACTCTTACTACTCGAAGTGG-3'
GAPDH	F: 5'-GGTTGTCTCTCGGACTTCA-3' R: 5'-TGGTCCAGGGTTTCTTACTCC-3'

1.4 生物信息学分析

用 miRanda (<http://www.microrna.org/microrna/home.do>) 和 TargetScan (<http://www.targetscan.org>) 软件预测差异表达的 circRNA 的靶向 miRNA。用 Gene Ontology (GO, <http://www.geneontology.org/>) 和 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG, <http://www.genome.jp/>) 分析亲本基因来预测 circRNA 功能。采用序列比对方法与 circBase 数据库中的环状序列进行比较, 如果两者相似度过 90%, 则认为两者是同 1 个 circRNA^[11]。

1.5 统计学分析

使用 SPSS 17.0 统计软件和 GraphPad Prism 6.0 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, 多组间比较采用方差分析, 组间两两比较采用 SNK- q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠肺发育光镜观察

在 E16.5 d, 可见细支气管管腔被覆多层柱状上皮细胞, 开始出现肺泡 II 型及部分肺泡 I 型上皮细胞; 在 E18.5 d, 支气管管腔数量增加且明显扩张, 间质变薄, 肺泡 II 型及部分肺泡 I 型上皮细胞较前增多; 在 P2 d, 肺泡上皮逐渐变薄, 薄壁肺泡隔清晰可见, 提示肺泡结构更加成熟。见图 1。

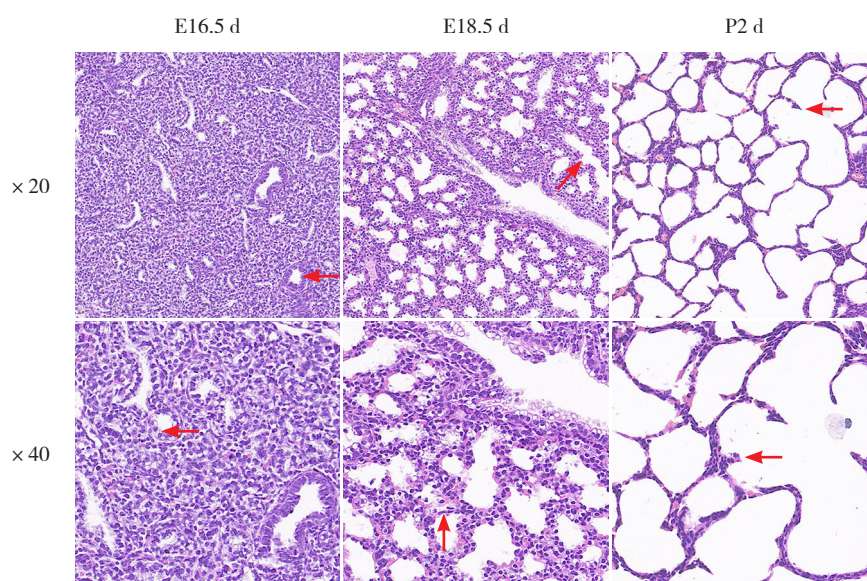


图 1 肺发育过程中小鼠肺发育的形态学变化 E16.5 d: 20 倍镜下可见细支气管管腔 (箭头所示), 40 倍镜下可见管腔被覆柱状上皮细胞 (箭头所示); E18.5 d: 20 倍镜下可见支气管管腔明显扩大, 肺泡 II 型上皮细胞明显增多 (箭头所示), 40 倍镜下可见少许肺泡 I 型上皮细胞 (箭头所示); P2 d: 可见肺泡隔及次级间隔 (箭头所示)。

2.2 circRNA 在小鼠胎肺组织中的表达

在晚期肺发育的 3 个关键时期, 即 E16.5 d、E18.5 d 和 P2 d 这 3 个时间 点, circ4:150439343|150477468 的相对表达量连续上调 ($P<0.05$); circ15:73330849|73343359 的相对表达量先下调再上调, P2 d 的表达量明显高于其他两个时间点 ($P<0.05$)。见表 3。

表 3 qRT-PCR 法检测小鼠肺发育过程中肺组织 circ4:150439343|150477468、circ15:73330849|73343359 表达水平 ($n=4$)

时间	circ4:150439343 150477468	circ15:73330849 73343359
E16.5 d	0.570 ± 0.077	1.100 ± 0.047
E18.5 d	1.145 ± 0.037 ^a	0.421 ± 0.007 ^a
P2 d	1.606 ± 0.182 ^{a,b}	2.175 ± 0.156 ^{a,b}
<i>F</i> 值	19.94	88.84
<i>P</i> 值	<0.001	<0.001

注: a 示与 E16.5 d 相比, $P<0.05$; b 示与 E18.5 d 相比, $P<0.05$ 。

2.3 信息学分析

经过与 circBase 数据库进行比对, 发现 circ4:150439343|150477468、circ15:73330849|73343359 分别对应 mmu_circ_0001213 和 mmu_circ_0005897。通过 miRanda 和 TargetScan 软件预测结果表明, circ4:150439343|150477468 可能与 miR-3102-5p、2-5p 结合, circ15:73330849|73343359 可能与 miR-6769b-5p 和 miR-6989-3p 结合。这两条 circRNA 从生物学过程而言, 主要富集于通过质膜黏附分子黏附同质细胞、对信息素的反应、细胞间信号传导、细胞外基质组织等; 从细胞成分而言, 主要富集于蛋白质细胞外基质、细胞骨架、受体复合体、基底膜等; 从分子功能而言, 主要富集于信息素结合、信息素受体活性、细胞外基质结构成分、染色质结合等 (图 2)。KEGG 通路分析主要涉及 Notch、PI3K-Akt、NF- κ B、甲状腺激素、胰岛素、内分泌抵抗等信号通路 (图 3)。

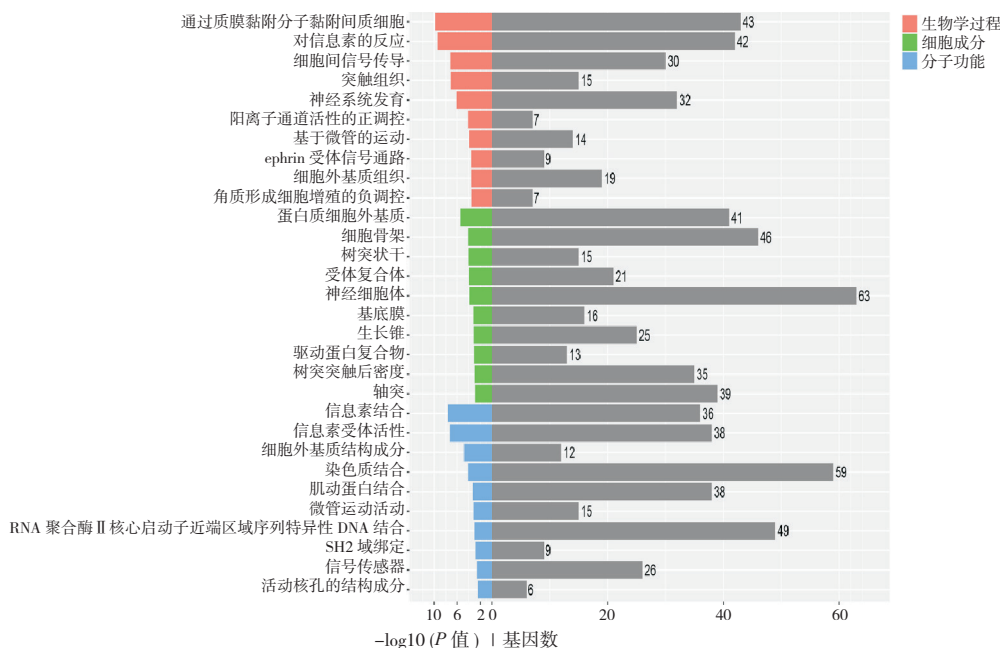


图 2 与 circ4:150439343|150477468、circ15:73330849|73343359 相互作用的 miRNA 靶基因的 GO 功能富集分析图 橘色代表生物学过程, 绿色代表细胞成分, 蓝色代表分子功能。各绘制出排名前 10 的 GO 功能。

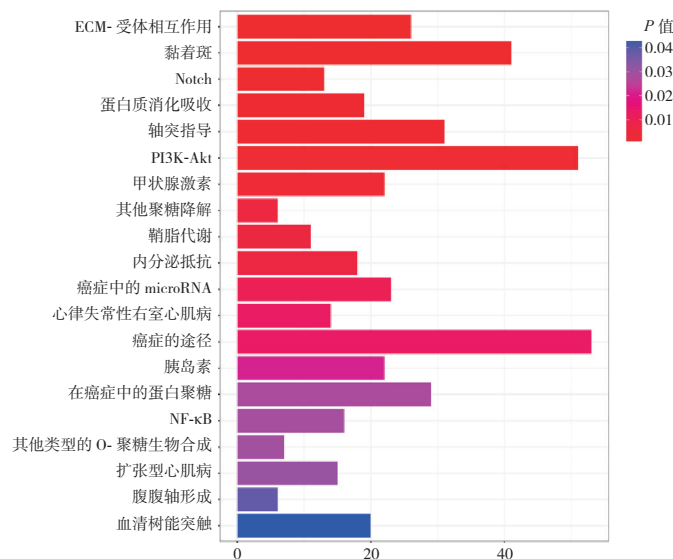


图 3 与 circ4:150439343|150477468、circ15:73330849|73343359 相互作用的 miRNA 靶基因的 KEGG 富集分析图 横坐标代表 miRNA 靶基因注释在通路中的基因数, 纵坐标代表通路。图中绘制出排名前 20 的信号通路。

3 讨论

随着产前激素和肺泡表面活性物质的应用, 新生儿呼吸窘迫综合征患儿的存活率明显改善。但 BPD 在 NICU 中仍有较高的发病率和病死率, 其病理生理学机制仍不明确, 且缺乏有效的治疗方法^[12]。因此继续探索正常肺部发育的分子机制, 促进肺发育、修复和再生, 或可发现治疗肺发育疾病的新靶标。circRNA 是一类成环的非编码小 RNA, 具有 miRNA 海绵作用, 即 circRNA 竞争性结合 miRNA, 解除 miRNA 对下游靶基因的抑制, 增加靶基因的表达^[3]。虽然已经报道了一些疾病模型的 circRNA 表达谱, 但与小鼠肺发育相关的 circRNA 尚未报道。因此本课题组将着力于探索 circRNA 在小鼠肺发育过程中的具体作用。

本次研究发现在小鼠肺发育的 3 个代表性时间点 (E16.5 d、E18.5 d、P2 d), circ4:150439343|150477468 的相对表达量连续上调; circ15:73330849|73343359 的相对表达量先下调再上调, P2 d 时表达水平显著高于 E16.5 d 及 E18.5 d 时, 这可能与小鼠出生后肺发育已基本成熟有关。

我们预测 circ4:150439343|150477468 可能与 miR-3102-5p、2-5p 结合, circ15:73330849|73343359 可能与 miR-6769b-5p 和 miR-6989-3p 结合。目前尚未有文献报道 circ4:150439343|150477468 和 circ15:73330849|73343359 的表达情况和功能。目

前存有的报道表明 miR-6769b-5p 在白色念珠菌感染的巨噬细胞中明显下调, 可能与炎症反应有关^[13]。KEGG 分析结果则显示, 这两条 circRNA 主要涉及 Notch、PI3K-Akt、NF-κB、甲状腺激素、胰岛素、内分泌抵抗等信号通路。而 Notch、PI3K-Akt、NF-κB 信号通路正与肺发育密切相关^[14-15]。例如, Notch 信号通路是高度保守的细胞间信号传导途径, 它通过直接接触将信号传输至相邻细胞, 适合短距离细胞通信。在器官发育和组织再生过程中, Notch 信号通路在调节细胞增殖和分化中起重要的作用^[16]。肺泡发育是由远端肺的内皮细胞、上皮细胞和间质基质协调发生的。Notch 信号在血管和实质间隔的细胞分化中发挥关键作用, 以协调肺泡和微血管系统的发育^[17]。在肺发育过程中, 肺血管中 Notch 基因的表达量逐渐升高, 表明 Notch 信号通路在肺泡微血管系统发育过程中发挥重要作用^[18]。在胎肺中, Notch 信号通路介导神经内分泌、纤毛细胞的分化及肺泡 I 型和 II 型上皮细胞的生成^[19]。对 Notch 缺陷型小鼠进行生后存活分析表明, Notch2 信号是肺泡 II 型上皮细胞增殖和成熟所必需的^[20]。Tsao 等^[21]研究表明, 肺泡上皮细胞上的 Notch 信号通过上皮-间质相互作用影响远端细支气管和肺泡的形态发生。因此, 我们推测这两条 circRNA 很可能通过 Notch 信号通路参与肺泡上皮细胞及肺血管系统的形成及成熟, 与肺发育密切相关, 影响肺发育的机制还需后续

进一步研究。

综上,本次研究发现这两条 circRNA 在肺发育的3个代表性时间点差异表达,且生物信息学结果亦表明可能与肺发育密切相关。但是 circRNA 研究尚处于起步阶段,这两条 circRNA 尚未有文献报道其相关功能,在后续研究中本课题组将探讨这两条 circRNA 对肺发育的调节作用及其机制,为有效治疗新生儿肺部疾病提供新思路。

[参 考 文 献]

- [1] Revhaug C, Bik-Multanowski M, Zasada M, et al. Immune system regulation affected by a murine experimental model of bronchopulmonary dysplasia: genomic and epigenetic findings[J]. *Neonatology*, 2019, 116(3): 269-277.
- [2] Baker CD. Long-term ventilation for children with chronic lung disease of infancy[J]. *Curr Opin Pediatr*, 2019, 31(3): 357-366.
- [3] Kristensen LS, Andersen MS, Stagsted LVW, et al. The biogenesis, biology and characterization of circular RNAs[J]. *Nat Rev Genet*, 2019, 20(11): 675-691.
- [4] Du WW, Zhang C, Yang W, et al. Identifying and characterizing circRNA-protein interaction[J]. *Theranostics*, 2017, 7(17): 4183-4191.
- [5] Rong D, Sun H, Li Z, et al. An emerging function of circRNA-miRNAs-mRNA axis in human diseases[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(42): 73271-73281.
- [6] Sun P, Li G. CircCode: a powerful tool for identifying circRNA coding ability[J]. *Front Genet*, 2019, 10: 981.
- [7] Zhang G, Diao S, Zhang T, et al. Identification and characterization of circular RNAs during the sea buckthorn fruit development[J]. *RNA Biol*, 2019, 16(3): 354-361.
- [8] Hu X, Zhu M, Liu B, et al. Circular RNA alterations in the Bombyx mori midgut following B. mori nucleopolyhedrovirus infection[J]. *Mol Immunol*, 2018, 101: 461-470.
- [9] Shen YQ, Pan JJ, Sun ZY, et al. Differential expression of circRNAs during rat lung development[J]. *Int J Mol Med*, 2019, 44(4): 1399-1413.
- [10] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-delta delta C(T)) method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [11] Langmead B, Trapnell C, Pop M, et al. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome[J]. *Genome Biol*, 2009, 10(3): R25.
- [12] Morty RE. Recent advances in the pathogenesis of BPD[J]. *Semin Perinatol*, 2018, 42(7): 404-412.
- [13] Wu CX, Cheng J, Wang YY, et al. MicroRNA expression profiling of macrophage line raw264.7 infected by candida albicans[J]. *Shock*, 2017, 47(4): 520-530.
- [14] Kiyokawa H, Morimoto M. Notch signaling in the mammalian respiratory system, specifically the trachea and lungs, in development, homeostasis, regeneration, and disease[J]. *Dev Growth Differ*, 2020, 62(1): 67-79.
- [15] Espín-Palazón R, Traver D. The NF-κB family: key players during embryonic development and HSC emergence[J]. *Exp Hematol*, 2016, 44(7): 519-527.
- [16] Liu J, Sato C, Cerletti M, et al. Notch signaling in the regulation of stem cell self-renewal and differentiation[J]. *Curr Top Dev Biol*, 2010, 92(10): 367-409.
- [17] Hussain M, Xu C, Ahmad M, et al. Notch signaling: linking embryonic lung development and asthmatic airway remodeling[J]. *Mol Pharmacol*, 2017, 92(6): 676-693.
- [18] Taichman DB, Loomes KM, Schachtner SK, et al. Notch1 and jagged1 expression by the developing pulmonary vasculature[J]. *Dev Dyn*, 2002, 225(2): 166-175.
- [19] Liu Y, Sadikot RT, Adami GR, et al. FoxM1 mediates the progenitor function of type II epithelial cells in repairing alveolar injury induced by Pseudomonas aeruginosa[J]. *J Exp Med*, 2011, 208(7): 1473-1484.
- [20] Xu K, Nieuwenhuis E, Cohen BL, et al. Lunatic fringe-mediated notch signaling is required for lung alveogenesis[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2010, 298(1): L45-L56.
- [21] Tsao PN, Matsuoka C, Wei SC, et al. Epithelial notch signaling regulates lung alveolar morphogenesis and airway epithelial integrity[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(29): 8242-8247.

(本文编辑: 万静)