

# 原发性干燥综合征患者外周血环状 RNA 表达谱研究

竺红<sup>1</sup>, 罗云霞<sup>2</sup>, 周艳<sup>1</sup>, 杨亚珊<sup>2</sup>

( 1. 宁夏医科大学总医院 风湿科, 宁夏 银川 750004; 2. 宁夏医科大学 临床医学院, 宁夏 银川 750004)

**【摘要】**目的: 探讨原发性干燥综合征( pSS) 患者外周血环状 RNA( circRNA) 的差异性表达及其与发病机制的相关性。方法: 首先对 4 例 pSS 患者及 4 例健康对照者外周血的 circRNA 采用 circRNA 芯片进行筛查, 然后使用 Gene Spring 软件对实验数据进行归一化及后续处理, 通过 Fold Change 和 P 值筛选, 对比两组间 circRNA 表达的差异性并对差异性进行生物学分析。结果: circRNA 芯片筛查结果提示: 病例组和对照组之间有 437 个 circRNA 差异具有统计学意义, 其中上调 circRNA 365 个、下调 circRNA 72 个。通过对这 437 个 circRNA 相关基因进行基因本体论( GO) 和通路( Pathway) 分析, 结果显示: GO 分析表明这些基因主要参与生物调节、细胞组分、代谢及酶活性的调节等, KEGG Pathway 分析表明这些基因主要参与氨基酸的降解与合成。并对具有差异性表达的 circRNA 靶 miRNA 进行预测, 预测结果发现其中有 1 个 circRNA( hsa-circRNA12807-10) 中的 1 个 miRNA( hsa-miR-181a-5p) 在有关文献中得到了验证。结论: pSS 患者外周血中具有多个差异性表达 circRNA, 同时这些差异性表达的 circRNA 可能与 pSS 的发病机制有关。

**【关键词】**原发性干燥综合征; 环状 RNA; 靶基因; 生物学分析

**【中图分类号】**R 593.2 **【文献标志码】**A

**【DOI】**10.3969/j.issn.1002-0217.2018.05.006

## Expression of circRNA in the peripheral blood of patients with primary Sjogren’s syndrome

ZHU Hong, LUO Yunxia, ZHOU Yan, YANG Yashan

Department of Rheumatology, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China

**【Abstract】Objective:** To investigate the role of circRNA in the pathogenesis of primary Sjogren’s syndrome( pSS) . **Methods:** The circRNA microarray was performed to screen the circRNA in the peripheral blood from 4 patients with pSS and another 4 healthy controls. The experimental data were normalized and processed by Gene Spring software. The Fold Change and P-value were used to compare the circRNA expression between groups, and the expression difference was analyzed by bioinformatics. **Results:** Microarray indicated significant difference between the case group and control group in a total of 437 circRNAs, in which 365 were up-regulated, and 72 down-regulated. Analysis by gene ontology( GO) and KEGG pathway showed that these genes were mainly involved in the regulation of biological regulation, cell composition, metabolism and enzyme activity as well as in the degradation and synthesis of amino acids. Differentially expressed circRNA target miRNAs were further predicted, and one of miRNAs( hsa-miR-181a-5p) targeted by a circRNA( hsa-circRNA12807-10) was confirmed in the literature. **Conclusion:** Several circRNAs are differentially expressed in the peripheral blood of patients with pSS, suggesting that these differentially expressed genes may be involved in the pathogenesis of pSS.

**【Key words】**pSS; circRNA; target gene; biological analysis

原发性干燥综合征( primary Sjogren’s syndrome, pSS) 是一种以侵犯外分泌腺为主的弥漫性结缔组织病, 其特异性抗体有抗核抗体( anti-nuclear antibody, ANA)、抗 SSA 抗体及抗 SSB 抗体, pSS 患者中抗 SSA/Ro 抗体和抗 SSB/La 抗体的阳性率分别为 75% 和 40%<sup>[1]</sup>, 灵敏度较低。pSS 的发病机制尚未明确, 大多数学者认为感染、遗传、内分泌等多因素共同参与了本病的发生和进展; 同时, 易感人群感染某些病毒后通过分子模拟机制也可诱发该自身

免疫反应。目前, 有学者通过引入全基因组关联分析研究( GWAS) 发现 pSS 具有多个易感基因<sup>[2]</sup>, 因此, pSS 的发病可能与遗传因素密切相关。近年来, 环状 RNA( circRNA) 已成为 RNA 领域研究的最新热点, 它是一类通过特殊剪切机制形成的并能在真核细胞中广泛表达的具有闭合环状结构的非编码 RNA。研究表明, circRNA 通过与疾病关联的微小 RNA( miRNA) 相互作用, 在肿瘤、炎症、神经退行性等疾病的发生发展中发挥着重要的调控作用<sup>[3-4]</sup>。

基金项目: 宁夏回族自治区自然科学基金项目( NZ16160, 2018AAC03145)

收稿日期: 2017-12-21

作者简介: 竺红( 1970-), 女, 主任医师, 硕士生导师, ( 电话) 13639574890, ( 电子信箱) nxzhuh@126.com;

罗云霞, 女, 2015 级硕士研究生, ( 电话) 17795062995, ( 电子信箱) 734503725@qq.com, 共同第一作者。

目前,有关 circRNA 参与调控 pSS 进程的研究报道较少,本文旨在探讨 pSS 的 circRNA 谱是否存在差异表达,为进一步探讨 circRNA 在 pSS 发病机制中的作用提供依据。

### 1 资料与方法

1.1 临床资料 纳入标准:病例组为宁夏医科大学总医院风湿科 2017 年住院患者,均符合 2002 年 pSS 国际分类(诊断)标准,其中女性 3 例,男性 1 例,年龄 27~52 岁。对照组为本院同期健康体检者,均为女性,年龄 22~29 岁。排除标准:合并其他自身免疫性疾病、感染及器质性病变的患者。以上病例均获得患者的知情同意及宁夏医科大学总医院伦理委员会的批准(2017-053)。

1.2 血样的采集和处理 EDTA 抗凝管采集受试者静脉全血 10 mL 混匀,采用百泰克裂解 buffer(TRI-pure LS Reagent)裂解处理,充分混匀后存放于-80℃冰箱中保存。

1.3 circRNA 芯片筛查 首先对受试者的全血进行 RNA 提取,并对提取的 RNA 进行质控管理,按照试剂盒操作说明,对每份受试样本的总 RNA 采用随机引物扩增,反转录为荧光标记的 cRNA,然后在 circRNA 芯片上进行杂交、洗片、扫描。采用 Feature

Extraction 提数软件预处理分析,然后采用 GeneSpring GX 软件计算基因表达的差异性及统计学差异性。差异倍数(Fold Change,FC)≥2.0 为表达具有差异性,P<0.05 为差异具有统计学意义。

1.4 生物学分析 通过 miRanda 软件预测 miRNA 可能结合的 circRNA,对差异的 circRNA 对应的线性 mRNA 转录本进行基因本体论(GO)和通路(Pathway)分析。采用 miRNAWalk 2.0 在线预测 miRNA 靶基因(网址: <http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk2/mir-mir-self.html>)。

1.5 统计分析 采用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行分析。计量资料用均数±标准差表示,两组间差异性比较用两独立样本 t 检验;P<0.05 为差异有统计学意义。

### 2 结果

2.1 病例组与对照组 circRNA 表达谱比较 病例组与对照组共检测到 157 778 个 circRNA 靶点。通过比较发现 437 个 circRNAs 表达具有差异性(FC≥2.0,P<0.05),其中上调 circRNA 365 个,下调 circRNA 72 个。表 1、2 分别总结了其 FC 值排序前 10 个上调和下调的 circRNA、FC 值、P 值、所在染色体、circRNA 所在链、涉及的基因、结合 miRNA 数量。

表 1 通过倍数变化(FC)选择前十位 pSS 患者外周血中上调的 circRNA 的表达改变

circRNA	差异倍数变化 (FC)	t	P	所在染色体	circRNA 所在链	涉及的 基因	结合 miRNA 数量
hsa_circ_0129312	5.015 8	6.788	0.000 5	chr5	+	IPO11	27
hsa_circ_0140744	4.029 0	5.959	0.001 0	chrY	+	USP9Y	42
hsa_circ_15004-6	3.577 0	3.769	0.009 3	chr7	-	MICALL2	100
hsa_circ_0077860	3.555 2	4.737	0.003 2	chr6	+	ENPP1	2
hsa_circ_11242-1	3.541 7	2.572	0.042 2	chr16	-	FANCA	100
hsa_circ_0098539	3.341 4	2.933	0.026 2	chr12	-	CNTN1	4
hsa_circ_5462-6	3.330 0	3.966	0.007 4	chr3	+	KAT2B	94
hsa_circ_0004887	3.327 0	4.182	0.005 8	chr20	-	AURKA	23
hsa_circ_0118905	3.318 3	3.272	0.017 0	chr2	+	ZDBF2	83
hsa_circ_0071537	3.303 6	3.187	0.018 9	chr4	+	PRIMPOL	26

表 2 通过倍数变化(FC)选择前十位 pSS 患者外周血中下调的 circRNA 的表达改变

circRNA	差异倍数变化 (FC)	t	P	所在染色体	circRNA 所在链	涉及的 基因	结合 miRNA 数量
hsa_circ_0117844	4.098 3	3.037	0.022 9	chr2	+	SLC4A10	19
hsa_circ_0117845	3.961 6	2.745	0.033 5	chr2	+	SLC4A10	25
hsa_circ_0117829	3.910 7	3.778	0.009 2	chr2	+	SLC4A10	100
hsa_circ_0117836	3.427 6	3.007	0.023 8	chr2	+	SLC4A10	64
hsa_circ_0117832	3.229 7	3.367	0.015 1	chr2	+	SLC4A10	100
hsa_circ_0081953	3.009 5	3.760	0.009 4	chr7	-	NRCAM	16
hsa_circ_0117835	2.894 7	3.147	0.019 9	chr2	+	SLC4A10	90
hsa_circ_0126481	2.819 5	2.472	0.048 3	chr4	-	GNPDA2	100
hsa_circ_12807-10	2.774 4	2.809	0.030 8	chr2	-	CALCRL	27
hsa_circ_0133007	2.745 9	2.500	0.046 5	chr7	-	NRCAM	17

2.2 染色体中 circRNA 的异常表达 将具有差异性表达的 circRNA 进行分类。结果表明: 这些 circRNAs 广泛分布于所有染色体, 其中包括性染色体。pSS 患者中上调的 circRNAs 约 10.14% 来自染色体 1( chr 1)、7.95% 来自 chr 2, 而来自其他染色体的上调 circRNA 的百分比均 < 7% (图 1)。表达下调的 circRNA 的前 3 个染色体分别为 chr 2( 22.2%)、chr 1( 15.28%)、chr 12( 13.89%) (图 2)。

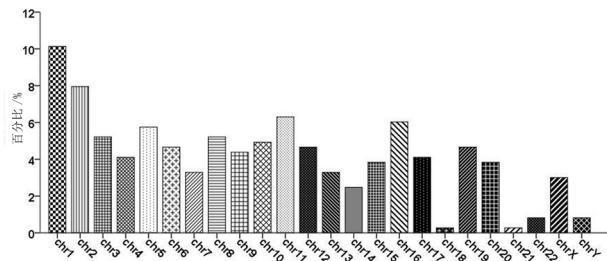


图 1 表达上调的 circRNAs 染色体分布

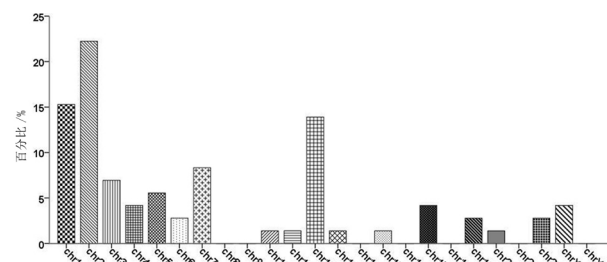


图 2 表达下调的 circRNAs 染色体分布

2.3 circRNA( hsa-circRNA12807-10) 的作用靶 miRNA( hsa-miR-181a-5p) -mRNA/基因相互作用网络预测 依据 circRNA 与其作用靶 miRNA 结合的紧密程度及种子序列配对碱基的多少, 将每个 circRNA 预测出靶 miRNA。其中表达下调的前十位 circRNA 有 1 个 circRNA( hsa-circRNA12807-10) 的预测结果中有 1 个 miRNA( hsa-miR-181a-5p) 与有关文献中报道的结果一致。

### 3 讨论

circRNA 是 RNA 在剪切过程中产生的主要由外显子和(或)内含子组成的闭合环状 RNA 分子, 广泛存在于真核细胞中, 其在真核转录组中具有相对无阻碍的框架<sup>[5]</sup>, 具有很强的稳定性、物种保护及细胞和组织的特异性<sup>[6]</sup>。circRNA 可在转录或转录后通过结合 miRNA 或其他分子<sup>[7-8]</sup> 调控基因的表达水平。研究发现: circRNA 能够竞争性结合 miRNA, 降低 miRNA 对其作用靶的抑制, 即 miRNA 的海绵作用, 进而调控 miRNA 的功能<sup>[9]</sup>。因此, circRNA 可能成为新的生物标志物和治疗靶点<sup>[10]</sup>。

近年来对 circRNA 的研究已成为热点, 但对于 circRNA 在 pSS 发病机制中的作用研究尚少。本研

究中, 我们利用 circRNA 微阵列获得病例组及对照组的 circRNA 表达谱, 其中病例组外周血中具有统计学差异, 上调和下调 circRNAs 分别有 365 个和 72 个, 产生这些差异性表达的 circRNA 的基因广泛分布于包括性染色体在内的所有染色体中。同时, 病例组中下调的 circRNA 主要从 chr 2( 22.2%)、chr 1( 15.28%) 及 chr 12( 13.89%) 转录, 而上调的 circRNA 在染色体中的分布相对比较均匀。因此, 染色体中 circRNA 的分布状态可能与其参与的生物过程有关, 因为 circRNA 的序列在很大程度上决定了它所结合目标, 所以 circRNA 可能与 pSS 的发病机制有关。

circRNA-miRNA-mRNA 调控轴中的海绵 miRNA 如 ciRS-7、CDR1as 是 circRNA 的公认功能之一。目前, 大量研究已经证实 miRNAs 参与生物体的生长、发育、衰老、凋亡的调控及遗传背景的稳定<sup>[11-12]</sup>, 并广泛应用于多种疾病领域研究。本研究对 circRNA 产生的相关基因进一步做了生物信息学分析。使用 miRanda 软件预测 miRNA 可能结合的 circRNA, 对具有统计学差异性的 circRNA 相关线性 miRNA 转录体进行 GO 和 Pathway 分析。GO 生物学过程提示: 这些基因主要参与生物调节过程、细胞组分、代谢及酶活性调节等; KEGG Pathway 分析提示: circRNA 主要参与氨基酸的降解及合成。值得注意的是预测过程中发现: circRNA 中有一个靶 miRNA( hsa-miR-181a-5p) 曾在文献中有过报道<sup>[13]</sup>, 即其在 pSS 患者血清中呈现上调, 且与 ANA 的滴度表现为正相关。miR-181a 参与 T、B 细胞发育及 T 细胞的活化、分化<sup>[14]</sup>, 然而在研究过程中发现其预测的上游调节子 hsa-circRNA12807-10 却在 pSS 中下调, 这意味着它可能会使 miRNA-181a-5p 海绵化, 影响 T、B 细胞的生物学过程。因此我们对 circRNA ( hsa-circRNA12807-10) 在 circRNA ( hsa-circRNA 12807-10) -miRNA ( hsa-miR-181a-5p) -mRNA/基因相互作用网络中的地位进行了预测。推测它可能通过影响靶 miRNA 的活性或者竞争结合靶 miRNA 来调节 miRNA 与靶 mRNA 或者靶基因的作用。

本研究主要通过分析 pSS 中 circRNA 表达谱的差异性, 为阐明 pSS 的发生、发展机制, 寻找新的临床诊断标志物提供新思路。但仍需进一步的实验验证, 具体可通过观察 circRNA 吸附特定 miRNA 进而对 mRNA 表达的影响, 结合 circRNA 与 mRNA 表达谱联合分析, 探讨 circRNA、miRNA、mRNA 三者之间的关系及 miRNA 海绵作用机制, 进而明确 pSS 中 circRNA 的功能。

【参考文献】

[1] ROUTSIAS JG ,TZIOUFAS AG. Sjögren’s syndrome study of autoantigens and autoantibodies [J]. Clinical reviews in allergy & immunology 2007 ,32( 3) : 238–251.

[2] 李永哲. 新的中国汉族人群原发性干燥综合征的易感基因 [J]. 中华内科杂志 2014 ,53( 11) : 901.

[3] BARRETT SP ,SALZMAN J. Circular RNAs: analysis ,expression and potential functions [J]. Development 2016 ,143( 11) : 1838–1847.

[4] SALZMAN J. Circular RNA expression: its potential regulation and function [J]. Trends Genet 2016 ,32( 5) : 309–316.

[5] CHEN LL ,YANG L. Regulation of circRNA biogenesis [J]. RNA biology 2015 ,12( 4) : 381–388.

[6] EBBESEN KK ,HANSEN TB ,KJEMS J. Insights into circular RNA biology [J]. RNA biology 2017 ,14( 8) : 1035–1045.

[7] GUO JU ,AGARWAL V ,GUO H ,et al. Expanded identification and characterization of mammalian circular RNAs [J]. Genome Biol 2014 ,15( 7) : 409.

[8] NAIR AA ,NIU N ,TANG X ,et al. Circular RNAs and their associ-

ations with breast cancer subtypes [J]. Oncotarget 2016 ,7( 49) : 80967–80979.

[9] KULCHESKI FR ,CHRISTOFF AP ,MARGIS R. Circular RNAs are miRNA sponges and can be used as a new class of biomarker [J]. Journal of biotechnology 2016 238: 42–51.

[10] CORTES-LOPEZ M ,MIURA P. Emerging Functions of Circular RNAs [J]. The Yale journal of biology and medicine ,2016 ,89( 4) : 527–537.

[11] BARTEL DP. MicroRNAs: genomics ,biogenesis ,mechanism ,and function [J]. Cell 2004 ,116( 2) : 281–297.

[12] BRENNER JL ,JASIEWICZ KL ,FAHLEY AF ,et al. Loss of individual microRNAs causes mutant phenotypes in sensitized genetic backgrounds in *C. elegans* [J]. Current Biology 2010 ,20( 14) : 1321–1325.

[13] 彭琳一. 原发性干燥综合征 microRNA 的表达谱研究 [D]. 北京: 北京协和医学院中国医学科学院 2013.

[14] ZHOU X ,JEKER LT ,FIFE BT ,et al. Selective miRNA disruption in T reg cells leads to uncontrolled autoimmunity [J]. Journal of Experimental Medicine 2008 ,205( 9) : 1983–1991.

(上接第 421 页)

节肢动物线粒体控制区一般具有较高的 AT 含量,作为复制起点的识别信号 poly-T/A 和形成潜在的茎环结构等<sup>[10]</sup>。伯氏嗜木螨 LNR 的 AT 含量高,且形成多个潜在的茎环结构。因此,我们推测伯氏嗜木螨线粒体 LNR 为其线粒体基因组的控制区。本研究测序获得伯氏嗜木螨线粒体基因组全序列,为推动蜱螨分子系统学的研究提供了基础信息。

【参考文献】

[1] 李朝品,沈兆鹏. 中国粉螨概论 [M]. 北京: 科学出版社, 2016: 248–255.

[2] DERMAUW W ,LEEUWEN TV ,VANHOLME B ,et al. The complete mitochondrial genome of the house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus* (Trouessart) : a novel gene arrangement among arthropods [J]. BMC Genomics ,2009 ,10( 1) : 107.

[3] WEBSTER LMI ,THOMAS RH ,MCCORMACK GP. Molecular systematics of *Acarus siro* s. lat. , a complex of stored food pests [J]. Molecular Phylogenetics & Evolution ,2004 ,32( 3) : 817.

[4] SIMON C ,BUCKLEY T R ,FRATI F ,et al. Incorporating molecular evolution into phylogenetic analysis , and a new compilation of

conserved polymerase chain reaction primers for animal mitochondrial DNA [J]. Annual Review of Ecology Evolution & Systematics ,2006 ,37( 37) : 545–579.

[5] SUN ET ,LI CP ,NIE LW ,et al. The complete mitochondrial genome of the brown leg mite *Aleuroglyphus ovatus* (Acari: Sarcopitiformes) : evaluation of largest non-coding region and unique tRNAs [J]. Exp Appl Acarol 2014 ,64( 2) : 141–157.

[6] LOWE TM ,EDDY SR. tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence [J]. Nucleic Acids Res ,1997 ,25: 955–964.

[7] LASLETT D ,CANBACK B. ARWEN , a program to detect tRNA genes in metazoan mitochondrial nucleotide sequences [J]. Bioinformatics 2008 ,24: 172–175

[8] ZUKER M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction [J]. Nucleic Acids Res 2003 ,31: 3406–3415.

[9] SUN E ,LI C ,LI S ,et al. Complete mitochondrial genome of *Caloglyphus berlesii* (Acaridae: Astigmata) : The first representative of the genus *Caloglyphus* [J]. Journal of Stored Products Research ,2014 ,59: 282–284.

[10] ZHANG DX ,HEWITT GM. Insect mitochondrial control region: A review of its structure , evolution and usefulness in evolutionary studies [J]. Biochem Syst Ecol ,1997 ,25: 99–120.