

• 临床研究 •

儿童肝移植术后药物代谢差异相关 mRNA 及 lncRNA 的高通量测序分析

秦天 顾向前 郑建新 刘金川 唐元家 薛峰 夏强

上海交通大学医学院附属仁济医院肝脏外科 200127

通信作者:薛峰,Email:liversurgery6108_rj@sjtu.edu.cn

【摘要】 目的 用高通量二代测序(next generation sequencing, NGS)分析儿童肝移植供肝标本的长链非编码 RNA(lncRNAs)及 mRNA 的表达情况,寻找差异表达的 lncRNA 以及药物代谢基因 mRNA,为儿童肝移植免疫抑制剂个体化指导提供依据。方法 收集 2016 年 10 月至 2017 年 12 月亲属活体肝移植的供肝组织标本 10 例,根据术后药物代谢情况分为快代谢和慢代谢两组(各 5 例),进行 mRNA 和 lncRNA 高通量测序。对差异基因进行功能通路分析,并通过靶基因预测筛选关键基因。结果 慢代谢组与快代谢组中有 908 个 mRNA 和 1 228 个 lncRNA 的表达差异有统计学意义($P < 0.05$),其中表达丰度高且差异显著的药物代谢相关 mRNA 有 40 个,22 个上调,18 个下调;lncRNA 有 37 个,13 个上调,24 个下调。除经典药物代谢相关基因 CYP3A5 之外,我们还发现 CYP2C19、CYP1A2、UGT1A1 可能对他克莫司的代谢产生影响作用。同时 lncRNA 中 NONHSAT108 617.2 可能靶向调节 CYP3A5 基因的表达。结论 本研究全面分析了儿童亲属活体肝移植供肝标本中 lncRNA 及 mRNA 的表达特征,其中一些差异的药物代谢相关基因可能共同作用影响他克莫司体内代谢,进而对术后免疫抑制剂用药产生影响。

【关键词】 肝移植;长链非编码 RNA;药物代谢

基金项目:国家自然科学基金(81670602)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1785.2019.04.007

Next generation sequencing analysis of drug metabolism related lncRNA in children after living donor liver transplantation

Qin Tian, Gu Xiangqian, Zheng Jianxin, Liu Jinchuan, Tang Yuanjia, Xue Feng, Xia Qiang
Department of Liver Surgery, Affiliated Renji Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200127, China

Corresponding author: Xue Feng, Email: liversurgery6108_rj@sjtu.edu.cn

【Abstract】 **Objective** To employ high-throughput next generation sequencing (NGS) for analyzing the expression of lncRNAs and mRNAs in donor samples from pediatric living donor liver transplantation and search differentially expressed lncRNAs and drug metabolic gene for individualized guidance of immunosuppressive agents. **Methods** Between October 2016 and December 2017, 10 liver tissue specimens from living donor liver transplantation children were collected and divided into fast and slow metabolic groups ($n = 5$ each) according to the postoperative profiles of drug metabolism. Samples were assayed for high-throughput NGS. Target analysis was used for functional pathways and screening target genes prediction. **Results** There were differentially expressed 908 mRNAs and 1228 lncRNAs between slow metabolic and fast metabolic groups ($P < 0.05$). According to the abundance and difference, 22 up-regulated and 18 down-regulated mRNAs, 13 up-regulated and 24 down-regulated lncRNAs were selected. In addition to CYP3A5, CYP2C19, CYP1A2 and UGT1A1 might affect the metabolism of tacrolimus. At the same time, NONHSAT108617.2 in differentially expressed lncRNAs might regulate the expression of CYP3A5 gene. **Conclusions** This study has comprehensively analyzed the expression of lncRNAs in donor liver from pediatric liver transplantation. Some differentially expressed drug metabolism related genes may affect tacrolimus metabolism in vivo and thus the postoperative use of immunosuppressive drugs.

【Key words】 Liver transplantation; Long noncoding RNA; Drug metabolism

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81670602)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1785.2019.04.007

儿童肝移植术是治疗儿童终末期肝病的最有效的方法。但免疫排斥和感染仍然是影响儿童移植术

后生存质量的主要因素^[1]。目前临床常用的免疫抑制剂他克莫司(TAC)属于钙神经蛋白抑制剂类药物

(calcineurin inhibitors, CNI), 通过阻止 IL-2 介导的 T 淋巴细胞增殖, 抑制移植器官排斥反应。但是 CNI 在临床应用中, 其生物利用度显著的个体差异和狭窄的治疗范围是临床面临的两个重要问题^[2]。在临床实践中, 维持不同个体治疗浓度所需的药物剂量通常存在巨大差异, 这些差异是由药物代谢相关的多种因素引起, 而参与药物代谢相关的基因表达水平则是关键因素之一^[3-4]。细胞色素 P450 (cytochrome P450, CYP450) 酶家族, 能催化外源性药物的羟基化, 脱烷基化, 脱卤化或其他氧化或还原修饰^[5]。在肝脏 CYP 酶中, CYP1A2、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1 和 CYP3A4 是 CYP450 最主要的 6 种亚型, 其含量约占肝脏内 CYP450 酶总量的 80%, 且参与 90% 以上的临床药物代谢^[6]。目前的研究发现, 长链非编码 RNA (lncRNAs) 是一类多功能调控的 RNA, 可以在生命的各个分支中参与多个生物过程, 包括调节细胞的增殖、分化、凋亡等, 广泛参与基因的表达调控^[7]。lncRNAs 的长度在 200~2 000 nt 左右, 不具备蛋白质编码功能, 虽然最初被认为是不编码蛋白质的 mRNA 样转录物, 是基因组的转录“噪音”。但最近的研究揭示了 lncRNAs 的特征, 这些特征进一步将它们与 mRNA 区分开来^[8]。虽然近年来关于 lncRNA 的研究进展迅速, 但是绝大多数已发现的 lncRNA 的功能还需进一步研究, 其调控功能仍是目前研究的热点、难点。同时 lncRNA 在药物代谢方面的研究尚属空白。本研究选取儿童肝移植术后长期随访的典型快代谢和慢代谢患儿的供体肝脏样本, 通过高通量二代测序 (next generation sequencing, NGS) 分析, 发现差异表达的 lncRNA 以及 mRNA, 并整合分析两者之间的相互关系, 探讨差异 RNA 所涉及的信号通路, 有利于阐明非编码 RNA 对药物代谢基因的作用机制, 更好地为儿童肝移植术后免疫抑制剂的应用提供个体化指导。

资料与方法

一、一般资料

收集 2016 年 10 月至 2017 年 12 月期间亲属活体肝移植中减体积肝移植的供肝组织标本 10 例, 并且满足受者术后在本院进行随访至少 6 个月以上。肝组织标本在肝移植外科手术中获得后立即置于干冰中急速冷冻, 并于 -80℃ 冰箱保存。根据供肝对应的肝移植受者 (10 例) 术后免疫抑制剂他克莫司浓度/剂量比值 (C/D) 分为快代谢 5 例 (组 A)、慢代谢 5 例 (组 B) 两组进行测序对比^[9]。他克莫司浓度/

剂量比值明显较高则为慢代谢组, 比值较低为快代谢组。所有纳入研究的受者原发肝脏疾病均为胆道闭锁, 除他克莫司浓度/剂量比值以外的其他临床参数也同时详细记录。以术后随访 6 个月以上受者正常恢复的药物浓度水平纳入计算, 排除感染、腹泻等会影响药物体内代谢状态的药物浓度水平数据。本研究经过医院伦理委员会审核和批准。

二、RNA 抽提与质检

采用 mir Vana™ miRNA Isolation kit (Cat # AM1561, Ambion) 并且根据生产厂商提供的标准操作流程进行样品的总 RNA 抽提, 抽提所得的总 RNA 经 Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent technologies, Santa Clara, CA, US) 电泳质检合格后使用 RNA Clean XP Kit (Cat # A63987, Beckman Coulter, Inc. Kraemer Boulevard Brea, CA, USA) 和 RNase-Free DNase Set (Cat # 79254, QIAGEN, GmbH, Germany) 纯化总 RNA。总 RNA 经 Nano-Drop ND-2000 分光光度计及 Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent technologies, Santa Clara, CA, US) 进行质检, 质检合格的 RNA 可进行后续的测序实验。质控标准为数据量约 10G/样本, 每项碱基质量大于 20(Q20) 的比例不少于 90%。

二、文库构建及测序

RNA 建库测序由上海伯豪生物技术有限公司进行。对纯化后的总 RNA 进行 rRNA 去除、片段化、第一链 cDNA 合成、末端修复、3' 末端加 A、连接接头、富集等步骤, 完成测序样本文库构建。所建文库使用 Qubit® 2.0 Fluorometer 检测浓度, Agilent 2100 检测文库的大小。按照 cBot User Guide 所示相应流程, 在 Illumina 测序仪配套的 cBot 上完成 Cluster 生成和第一向测序引物杂交。按照 Illumina User Guide 准备测序试剂, 将携有 cluster 的 flow cell 上机。选用 paired-end 程序, 进行双端测序。测序过程由 Illumina 提供的 data collection software 进行控制, 并进行实时数据分析。

三、测序数据分析

过滤 Raw Reads 中的可能含有总体质量较低、含有测序引物、末端质量偏低等不合格的 Reads, 得到可用于数据分析的 clean Reads。

应用 edgeR^[10] 进行样本间差异基因分析, 得出 P 值后进行多重假设检验校正, 通过控制 FDR (False Discovery Rate) 来决定 P 值的阈值, 校正后的 P 值即 Q 值。同时, 我们根据 FPKM (Fragments Per Kilobase of exon model per Million mapped reads) 值计算

差异表达倍数,即差异倍数(Fold-change)。在转录组测序中,Reads 数除了与基因表达水平成正比外,还与基因本身的长度、测序的数据量有关。为了使不同基因、不同样本间的基因表达水平具有可比性,将 Reads 转化成 FPKM 进行基因表达量的标准化^[11]。

差异基因筛选条件如下:① $P < 0.05$;②差异倍数 ≥ 2 或 ≤ 0.5 。

四、统计学处理

SPSS 23.0 统计软件进行统计分析。计量资料进行正态性检验。两组计量资料比较时,不符合正态分布的采用非参数检验 Mann-Whitney U 检验;符合正态分布的,采用独立样本 t 检验。两组计数资料比较时,采用卡方检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

结 果

一、差异表达基因筛选

选取的快代谢(组 A)和慢代谢(组 B)之间的他克莫司浓度/剂量比值差异有统计学意义($P < 0.0001$)。两组中供体受体的性别、年龄、体重等其他指标无明显差异(表 1)。

测序数据的质量满足质控标准,即 mRNA 数据量约 10G/样本以上,每项碱基质量大于 20(Q20)的比例不小于 90%(表 2),说明样本质量可靠,保证后续高级分析的正常进行。

快代谢和慢代谢组相比,共发现 908 个基因表达存在差异($P < 0.05$)且差异倍数 ≥ 2 (上调大于等于 2 倍)或差异倍数 ≤ 0.5 (下调大于等于 2 倍),差异倍数 = 组 A 平均表达量/组 B 平均表达量,即 $(A1 + A2 + A3 + A4 + A5)/(B1 + B2 + B3 + B4 + B5)$ 。其中 644 个上调,264 个下调;最后将各组内文献证实^[12]可能与他克莫司药物代谢有关的基因筛选出来,从 908 个 mRNA 中筛选出 40 个差异基因,其中 22 个(UGT2B17、SLC5A6、CYP4X1、CYP4Z2P、SLC25A18、CYP21A1P、UGT1A7、CYP4Z1、SLC38A1、SLC6A20、SLC13A2、SLC4A11、ABCG4、SLC16A11、SLC39A1、SLC25A25-AS1、SLC8A2、SLC2A9、SLC22A13、SLC35B4、SLC16A6P1)上调,18 个(SLC4A1、SLC30A10、CYP2C19、ABCC2、SLC23A1、UGT1A1、SLC6A2、

UGT2A2、CYP1A2、UGT1A10、CYP51A1、SLC5A3、SLC11A2、CYP3A5、CYP2D7、SLC2A4RG、CYP1B1、SLC22A9)下调,且差异具有统计学意义($P < 0.05$)。表 3 中同时列出了基因 ID 及基因名。

二、差异基因功能分析

使用 GO(基因体富集分析)、KEGG(全基因组及代谢途径数据库)、DAVID(<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>)等功能通路分析工具,研究差异基因的分布状况,阐明两组样本差异在基因功能上的体现。GO 分为 3 类:生物学过程(biological process),分子功能(molecular function)和细胞成分(cellular component)。以散点图方式展示分析结果(图 1)。图中只展示 Rich Factor 排名前 30 的 GO 条目。排除组织特异性,发现富集程度较高的 GO 条目包括分子功能的钙离子结合(calcium ion binding, rich factor 2.62, $P = 7.88E-08$)、生物过程的氧运输(oxygen transport, rich factor 12.88, $P = 8.25E-05$),类黄酮代谢过程(flavonoid metabolic process, rich factor 6.23, $P = 0.0015$)等。

生物体内不同基因相互协调行使其生物学功能,通过 pathway 显著性富集分析能够确定差异基因参与的最主要的生化代谢途径和信号转导途径。KEGG 是有关生物学 pathway 的主要公共数据库。

差异基因 KEGG 富集分析结果以散点图展示(图 2)。差异明显的包括 Wnt 信号通路、色氨酸代谢通路等经典通路,同时还有与药物代谢相关的药物代谢-细胞色素 P450 通路、药物代谢-其他酶通路、细胞色素 P450 对异种生物的代谢通路等等。这一结果为我们对药物代谢的研究提供了可能的依据。

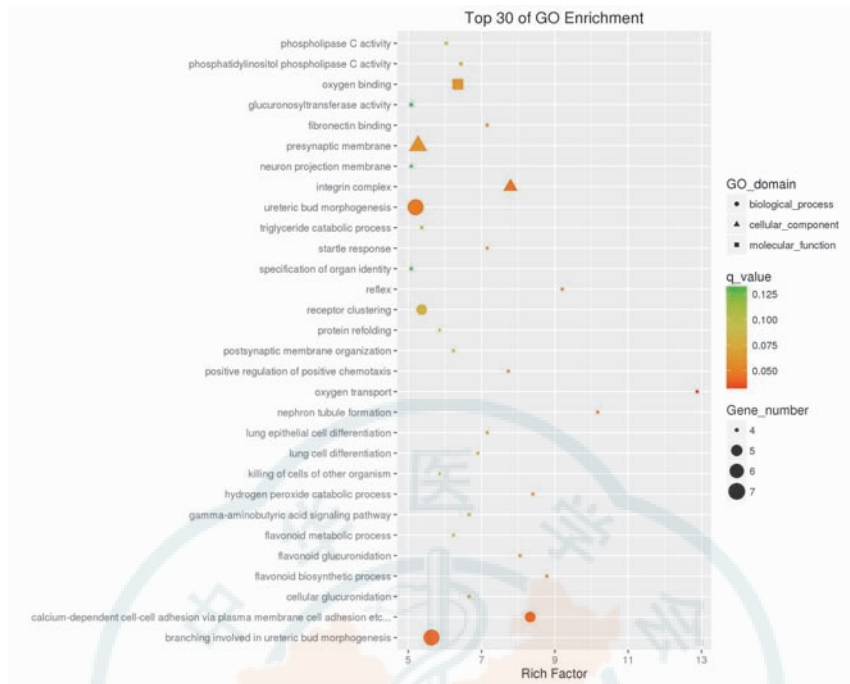
三、lncRNA 测序结果与分析

对测序结果比对和归一化处理后、快代谢组和慢代谢对照组相比,有 1228 个 lncRNA 表达差异有统计学意义($P < 0.05$)且差异倍数 ≥ 2 (上调大于等于 2 倍)或差异倍数 ≤ 0.5 (下调大于等于 2 倍),差异倍数 = A 组平均表达量/B 组平均表达量,即 $(A1 + A2 + A3 + A4 + A5)/(B1 + B2 + B3 + B4 + B5)$ 。进一步通过 Q 值校正以及组内差异比较剔除之后,差异 lncRNA 中 13 个显著上调,24 个显著下调(表 4)。

表 1 纳入测序实验的肝脏标本其供者及相关临床信息

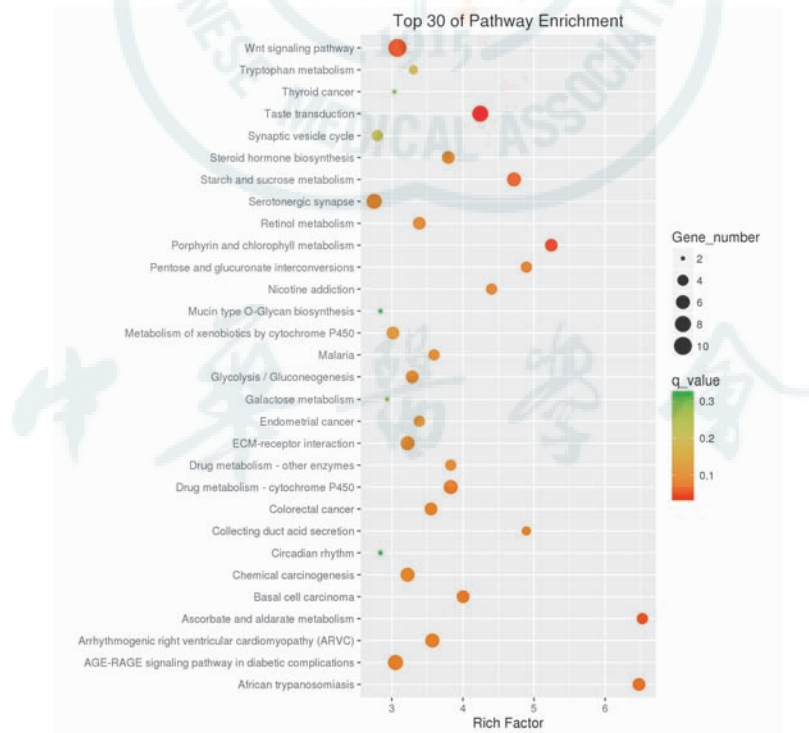
分组	供者					受者			
	性别(男:女)	年龄(年)	身高(cm)	体重(kg)	供肝体积(g)	性别(男:女)	手术年龄(月)	身高(cm)	他克莫司浓度/剂量比 ^a
快代谢	1:4	28±8	161±8	55±9	231±24	2:3	6±1	78±2	15±2
慢代谢	1:4	30±7	163±7	59±13	205±43	4:1	7±3	81±6	89±20
P 值	1	0.771	0.608	0.549	0.284	0.519	0.21	0.299	<0.0001

注:^a他克莫司浓度/剂量比即以血他克莫司浓度(ng/ml)除以每公斤体重的他克莫司用量(mg/kg)



注:Rich Factor=(某个 GO term 中差异基因的数目/能够对应到 GO 数据库中的所有差异基因的数目)/(某个 GO term 中包含的基因数目/能够对应到 GO 数据库中的总的基因数目),Rich Factor 越大,表示富集的程度越大。Q 值是多重假设检验校正之后的 P 值,值越小表示富集越显著

图 1 差异表达基因的 GO 富集散点图



注:Rich Factor=(某个 GO term 中差异基因的数目/能够对应到 GO 数据库中的所有差异基因的数目)/(某个 GO term 中包含的基因数目/能够对应到 GO 数据库中的总的基因数目),Rich Factor 越大,表示富集的程度越大。Q 值是多重假设检验校正之后的 P 值,值越小表示富集越显著

图 2 差异表达基因的 KEGG 富集散点图

表 2 测序数据质控结果

样本分组	mRNA 原始数据量 (G)	miRNA 原始读取数	Q20 比例 (%)
A1	17.6	24 453 729	96.60
A2	17.2	25 802 966	96.55
A3	14.2	30 121 865	96.50
A4	11.7	47 677 065	96.72
A5	20.2	42 815 594	95.91
B1	11.7	58 729 917	96.73
B2	11.9	37 705 533	96.23
B3	19.8	47 273 027	95.83
B4	19.2	37 525 892	96.08
B5	12.4	38 474 014	96.53

表 3 快代谢组与慢代谢组表达差异的 mRNA 分析结果

基因 ID	基因名称	差异倍数	P 值	Q 值
ENSG00000197888	UGT2B17	12.600 355	0.000 985	0.096 035
ENSG00000138074	SLC5A6	1.824 974	0.000 386	0.132 406
ENSG0000004939	SLC4A1	0.238 980	0.000 595	0.205 108
ENSG00000137869	CYP19A1	—	0.000 470	0.241 316
ENSG00000186377	CYP4X1	2.062 589	0.011 984	0.281 154
ENSG00000196660	SLC30A10	0.645 925	0.024 941	0.416 654
ENSG00000154198	CYP4Z2P	5.000 618	0.027 791	0.423 770
ENSG00000182902	SLC25A18	1.462 735	0.029 416	0.428 938
ENSG00000165841	CYP2C19	0.391 851	0.037 889	0.462 503
ENSG00000204338	CYP21A1P	1.875 489	0.041 967	0.474 619
ENSG00000244122	UGT1A7	3.133 469	0.041 976	0.474 619
ENSG0000023839	ABCC2	0.752 472	0.071 017	0.601 146
ENSG00000186160	CYP4Z1	2.156 162	0.073 656	0.618 468
ENSG00000170482	SLC23A1	0.631 158	0.106 657	0.718 154
ENSG00000111371	SLC38A1	1.518 560	0.131 449	0.766 292
ENSG00000241635	UGT1A1	0.630 932	0.132 822	0.769 248
ENSG00000163817	SLC6A20	9.529 957	0.134 376	0.771 235
ENSG00000103546	SLC6A2	0.216 256	0.015 652	0.813 135
ENSG00000271271	UGT2A2	0.068 649	0.175 376	0.836 330
ENSG00000007216	SLC13A2	3.080 442	0.190 929	0.857 480
ENSG00000140505	CYP1A2	0.587 270	0.209 140	0.879 877
ENSG00000242515	UGT1A10	0.236 136	0.217 238	0.889 528
ENSG00000088836	SLC4A11	2.687 881	0.227 893	0.905 098
ENSG00000001630	CYP51A1	0.725 910	0.241 696	0.925 407
ENSG00000172350	ABCG4	3.287 205	0.245 149	0.931 185
ENSG00000174326	SLC16A11	1.781 742	0.288 701	0.961 972
ENSG00000198743	SLC5A3	0.727 781	0.320 074	0.972 709
ENSG00000143570	SLC39A1	1.701 053	0.332 491	0.982 309
ENSG00000234771	SLC25A25-AS1	1.454 673	0.338 431	0.982 309
ENSG00000110911	SLC11A2	0.749 707	0.361 191	0.990 274
ENSG00000118160	SLC8A2	3.536 803	0.376 248	1
ENSG00000106258	CYP3A5	0.742 611	0.386 514	1
ENSG00000205702	CYP2D7	0.589 933	0.387 860	1
ENSG00000125520	SLC2A4RG	0.784 921	0.390 785	1
ENSG00000109667	SLC2A9	1.612 409	0.406 532	1
ENSG00000138061	CYP1B1	0.743 145	0.411 131	1
ENSG00000149742	SLC22A9	0.752 142	0.460 669	1
ENSG00000172940	SLC22A13	2.516 597	0.490 673	1
ENSG00000205060	SLC35B4	1.392 274	0.492 458	1
ENSG00000232457	SLC16A6P1	2.267 317	0.495 362	1

注:差异倍数=(A1+A2+A3+A4+A5)/(B1+B2+B3+B4+B5)

表 4 快代谢组与慢代谢组表达差异的 lncRNA 分析结果

lncRNA_ID	P 值	Q 值	差异倍数	差异关系
NONHSAT047869.2	4.93E-12	0.000 161	0.106 887	下调
NONHSAT137376.2	1.47E-09	0.000 748	236.88 526	上调
NONHSAT005430.2	8.54E-09	0.000 748	0.040 555	下调
NONHSAT161735.1	6.00E-08	0.003 282	22.609 678	上调
NONHSAT092691.2	1.70E-07	0.008 289	0.850 039	下调
NONHSAT056661.2	7.30E-07	0.024 698	96.141 480	上调
ENST00000558071	7.33E-07	0.024 698	0.193 255	下调
NONHSAT162640.1	1.50E-06	0.047 017	0.421 047	下调
ENST00000528207	2.89E-06	0.074 970	0.137 318	下调
NONHSAT159417.1	4.92E-06	0.113 466	362.97 702	上调
NONHSAT094345.2	6.69E-06	0.146 397	0.096 346	下调
NONHSAT068981.2	7.23E-06	0.150 664	0.129 957	下调
NONHSAT084854.2	7.82E-06	0.153 239	0.131 022	下调
NONHSAT076517.2	8.05E-06	0.153 239	0.554 737	下调
NONHSAT180113.1	9.97E-06	0.170 522	0.053 078	下调
NONHSAT108617.2	1.01E-05	0.170 522	0.074 782	下调
NONHSAT207800.1	1.08E-05	0.174 552	66.503 649	上调
NONHSAT204489.1	1.36E-05	0.205 414	0.449 475	下调
NONHSAT016408.2	1.60E-05	0.216 695	114.45 799	上调
NONHSAT094233.2	1.70E-05	0.216 695	26.370 982	上调
NONHSAT007345.2	1.73E-05	0.216 695	0.777 779	下调
NONHSAT166306.1	1.82E-05	0.220 724	0.134 509	下调
NONHSAT054728.2	2.31E-05	0.255 168	0.129 158	下调
NONHSAT096873.2	2.33E-05	0.255 168	0.579 652	下调
MSTRG_53563.1	2.81E-05	0.285 225	0.232 977	下调
NONHSAT175752.1	3.38E-05	0.308 681	34.419 877	上调
NONHSAT080955.2	3.63E-05	0.324 010	0.104 957	下调
ENST00000502437	4.58E-05	0.385 902	0.845 287	下调
NONHSAT137215.2	5.44E-05	0.432 491	0.726 338	下调
NONHSAT192253.1	5.64E-05	0.432 491	0.184 982	下调
NONHSAT061303.2	5.91E-05	0.436 693	0.100 591	下调
NONHSAT022132.2	6.13E-05	0.436 693	0.190 571	下调
NONHSAT160133.1	6.18E-05	0.436 693	4.914 562	上调
NONHSAT031451.2	6.52E-05	0.453 382	51.518 368	上调
ENST00000507582	6.85E-05	0.468 765	42.192 072	上调
NONHSAT040991.2	7.09E-05	0.477 612	77.369 682	上调
NONHSAT183489.1	7.37E-05	0.481 352	7.684 869	上调

注:差异倍数=(A1+A2+A3+A4+A5)/(B1+B2+B3+B4+B5)

四、基因间调控关系网络构建及功能分析

主要针对药物代谢基因及通路中的基因进行分析。获取各组间差异表达的 lncRNA、mRNA 后通过采用 Trans 反式调控以及 Cis 顺式调控进行靶基因预测。可以发现在差异 mRNA 中, CYP3A5、CYP2C19、CYP1A2、UGT1A1 均为药物代谢基因, 并且表达丰度较高, 推测可能在他克莫司的代谢过程中起到协同作用。差异 lncRNA 中 NONHSAT108617.2 预测对他克莫司代谢相关基因 CYP3A5 产生调节作用。其他还有 ADH5(alcohol dehydrogenase 乙醇脱氢酶)、SLC35A5(solute carrier, 溶质载体)基因也可能被相应 NONHSAT092691.2 及 NONHSAT005430.2 进行调控。

讨 论

目前 lncRNA 的研究主要依赖于基因芯片技术以及高通量测序(NGS)来测定 lncRNA 的表达。NGS 是一种能够从核酸标本中产生大量序列数据的技术,正在迅速取代微阵列芯片作为量化和注释 lncRNA 的首选技术^[13-14]。深度测序具有捕获整个转录组的完整性和复杂性的卓越能力。微阵列芯片只能检测已知序列的 lncRNA 特征,而 NGS 能发现新的 lncRNA。此外,微阵列芯片缺乏检测和量化低丰度转录物的能力,但 NGS 可以检测到低于芯片可检测阈值的 lncRNA。因此,NGS 的高灵敏度和高精度使其在寻找新信息的能力上远高于基因芯片技术。

本研究利用 NGS 技术全面分析了儿童肝移植患儿供肝组织中 lncRNA 和 mRNA 的表达特征。肝脏组织相比较外周血等样本,能提供更多关于药物代谢相关基因表达情况、药物酶活性水平等信息,虽然存在获得困难的缺点,但其包含的 RNA 数据能为药物代谢相关研究提供更精确的数据。研究中差异明显且表达丰度高的 mRNA 共有 40 个。通过 GO 分析,得出差异较显著的 GO 富集项目包括钙离子结合、氧转运、细胞膜黏附分子与细胞黏附等;KEGG 分析发现差异显著的通路有药物代谢-细胞色素、Wnt 信号通路、叶啉与叶绿素代谢、抗坏血酸与醛酸代谢等。测序发现表达丰度高且稳定的 37 个具有显著差异 lncRNA。我们在差异基因中发现与药物代谢有关的细胞色素 P450 (cytochrome P450, CYP450) 酶家族成员 CYP3A5、CYP2C19、CYP1A1 基因以及葡萄糖醛酸转移酶(UDP-glucuronosyltransferase)家族中 UGT1A1 基因表达丰富较高且差异明显。

钙神经蛋白抑制剂他克莫司是器官移植后标准免疫抑制方案的重要组成部分。然而,他克莫司的临床使用存在很大挑战。由于他克莫司治疗窗狭窄,多种因素都会影响其代谢,包括合并用药(激素、抗真菌药)、受者年龄和种族、术后时间、饮食规律等,对目前移植术后免疫监控提出了很高的要求。而参与药物代谢和转运的相关基因表达水平是影响他克莫司代谢的重要因素^[3,12]。目前公认参与他克莫司代谢的药物代谢酶主要为 CYP3A5,其他还有 CYP3A4 和 ABCB1(P-gp)参与^[15-17]。然而,研究表明参与他克莫司代谢的重要代谢酶 CYP3A5 可能仅参与其 40%~50%的代谢^[12]。根据相关文献可

知,差异基因 CYP2C19 是一种主要在肝脏中表达的重要药物代谢酶,主要参与药物在体内的羟基化反应,参与了 10% 的临床药物代谢^[18]。尽管一些药物代谢基因 CYP3A5 影响免疫抑制剂在肝移植术后代谢的影响已被证实,但没有对整个可能影响术后免疫抑制剂代谢网络的基因研究,尤其是肝移植术后免疫抑制剂代谢的 lncRNA 方向的研究少见。国外研究人员推测 CYP2C19、NGAL、KIM 等基因能够帮助确定移植后免疫抑制治疗的最佳生物标志物^[19],且有临床研究证实 CYP2C19 多态性可能通过影响下游其他可能与他克莫司互相作用药物,来间接影响他克莫司的临床代谢情况^[20-21]。国内已有针对 CYP3A5 以外其他药物代谢基因,包括 CYP2C19、CYP2C9 多态性对肝移植术后复杂药物的临床研究^[22]。这些结果提示我们临床实际影响他克莫司代谢的除了 CYP3A5 以外,还有其他相关基因也会起到协同的作用。我们后续也打算通过临床随访、一系列基础实验(包括 PCR 验证,药物代谢模型构建)等来验证我们的发现。

儿童肝移植术后免疫抑制剂的使用个体差异较大,为避免术后排异和感染等并发症的发生,建立合理的用药范围至关重要。而研究证明快代谢的儿童相比较慢代谢的儿童而言,术后免疫抑制剂用药剂量大且术后并发症较多,如何调控这一药物代谢过程对改善这部分儿童的预后有着重要意义。目前我们研究发现的差异 lncRNA 中 NONHSAT108617.2 可能对经典他克莫司代谢基因 CYP3A5 产生调节作用,这为我们下一步 lncRNA 层面的研究指明了方向。

总之,本研究应用高通量二代测序技术,初步建立了儿童肝移植术后免疫抑制剂代谢差异的基因和 lncRNA 表达谱,这些基因可能共同影响小儿肝移植术后用药及预后。但下一步临床应用还需要更多大样本的临床验证。本研究对测序结果提出早期设想,需进一步深入的实验证实。接下来我们将进一步通过体外实验和动物实验对 miRNA 相关信号通路和靶基因的作用机制进行阐明。本次研究的创新点在于首次利用高通量测序来筛选临床上肝移植术后儿童中差异表达的 lncRNA 及 mRNA,并探索其在药物代谢差异中可能产生的影响,目前 lncRNA 作为热门的研究对象,如何进一步探索其通过药物代谢基因调控对临床免疫抑制剂用药的影响是一个崭新的研究方向。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] Leonis MA, Balistreri WF. Evaluation and management of end-stage liver disease in children[J]. *Gastroenterology*, 2008, 134(6):1741-1751. DOI: 10.1053/j.gastro.2008.02.029.
- [2] Jalil MH, Hawwa AF, McKiernan PJ, et al. Population pharmacokinetic and pharmacogenetic analysis of tacrolimus in paediatric liver transplant patients[J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2014, 77(1):130-140. DOI: 10.1111/bcp.12174.
- [3] Kasahara M, Umeshita K, Inomata Y, et al. Long-term outcomes of pediatric living donor liver transplantation in Japan; an analysis of more than 2200 cases listed in the registry of the Japanese Liver Transplantation Society[J]. *Am J Transplant*, 2013, 13(7):1830-1839. DOI: 10.1111/ajt.12276.
- [4] Provenzano A, Santeusano A, Mathis E, et al. Pharmacogenetic considerations for optimizing tacrolimus dosing in liver and kidney transplant patients[J]. *World J Gastroenterol*, 2013, 19(48):9156-9173. DOI: 10.3748/wjg.v19.i48.9156.
- [5] Lin J, Schyschka L, Muhl-Benninghaus R, et al. Comparative analysis of phase I and II enzyme activities in 5 hepatic cell lines identifies Huh-7 and HCC-T cells with the highest potential to study drug metabolism[J]. *Arch Toxicol*, 2012, 86(1):87-95. DOI: 10.1007/s00204-011-0733-y.
- [6] Masek V, Anzenbacherova E, Etrych T, et al. Interaction of N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide copolymer-doxorubicin conjugates with human liver microsomal cytochromes P450; comparison with free doxorubicin[J]. *Drug Metab Dispos*, 2011, 39(9):1704-1710. DOI: 10.1124/dmd.110.037986.
- [7] Quinn JJ, Chang HY. Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function[J]. *Nat Rev Genet*, 2016, 17(1):47-62. DOI: 10.1038/nrg.2015.10.
- [8] Jarroux J, Morillon A, Pinskaya M. History, discovery, and classification of lncRNAs[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 1008:1-46. DOI: 10.1007/978-981-10-5203-3_1.
- [9] Schutte-Nutgen K, Tholking G, Suwelack B, et al. Tacrolimus - Pharmacokinetic Considerations for Clinicians[J]. *Curr Drug Metab*, 2018, 19(4):342-350. DOI: 10.2174/13892002196661801104159.
- [10] Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR; a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data[J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(1):139-140. DOI: 10.1093/bioinformatics/btp616.
- [11] Mortazavi A, Williams BA, McCue K, et al. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq[J]. *Nat Methods*, 2008, 5(7):621-628. DOI: 10.1038/nmeth.1226.
- [12] Yu M, Liu M, Zhang W, et al. Pharmacokinetics, pharmacodynamics and pharmacogenetics of tacrolimus in kidney transplantation[J]. *Curr Drug Metab*, 2018, 19(6):513-522. DOI: 10.2174/1389200219666180129151948.
- [13] McCormick KP, Willmann MR, Meyers BC. Experimental design, preprocessing, normalization and differential expression analysis of small RNA sequencing experiments[J]. *Silence*, 2011, 2(1):2. DOI: 10.1186/1758-907x-2-2.
- [14] Wittmann J, Jack HM. New surprises from the deep—the family of small regulatory RNAs increases[J]. *Scientific World Journal*, 2010, 10:1239-1243. DOI: 10.1100/tsw.2010.101.
- [15] Yang TH, Chen YK, Xue F, et al. Influence of CYP3A5 genotypes on tacrolimus dose requirement; age and its pharmacological interaction with ABCB1 genetics in the Chinese paediatric liver transplantation[J]. *Int J Clin Pract Suppl*, 2015, 183:53-62. DOI: 10.1111/ijcp.12667.
- [16] Ji E, Choi L, Suh KS, et al. Combinational effect of intestinal and hepatic CYP3A5 genotypes on tacrolimus pharmacokinetics in recipients of living donor liver transplantation[J]. *Transplantation*, 2012, 94(8):866-872. DOI: 10.1097/TP.0b013e318263700a.
- [17] Gomez-Bravo MA, Apellaniz-Ruiz M, Salcedo M, et al. Influence of donor liver CYP3A4 * 20 loss-of-function genotype on tacrolimus pharmacokinetics in transplanted patients[J]. *Pharmacogenetics and genomics*, 2018, 28(2):41-48. DOI: 10.1097/fpc.0000000000000321.
- [18] Zanger UM, Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism; regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation[J]. *Pharmacol Ther*, 2013, 138(1):103-141. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2012.12.007.
- [19] Fu R, Tajima S, Suetsugu K, et al. Biomarkers for individualized dosage adjustments in immunosuppressive therapy using calcineurin inhibitors after organ transplantation[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2019, 40(2):151-159. DOI: 10.1038/s41401-018-0070-2.
- [20] Iwamoto T, Monma F, Fujieda A, et al. Effect of genetic polymorphism of CYP3A5 and CYP2C19 and concomitant use of voriconazole on blood tacrolimus concentration in patients receiving hematopoietic stem cell transplantation[J]. *Ther Drug Monit*, 2015, 37(5):581-588. DOI: 10.1097/ftd.0000000000000182.
- [21] Vanhove T, Bouwsma H, Hilbrands L, et al. Determinants of the magnitude of interaction between tacrolimus and voriconazole/posaconazole in solid organ recipients[J]. *Am J Transplant*, 2017, 17(9):2372-2380. DOI: 10.1111/ajt.14232.
- [22] Zhu L, Liao S, Wang N, et al. Dose regimens for Chinese adult liver transplant recipients according to the genetic polymorphisms of CYP2C9, CYP2C19, and CYP3A5 in recipients and donors[J]. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 2016, 54(8):587-596. DOI: 10.5414/cp202490.

(收稿日期:2018-10-04)