

临床检验

【文章编号】1006-6233(2020)07-1229-04

男性 miR-221/222 基因多态性与心力衰竭的关系

樊春红, 陈晓宁

(北京大学人民医院检验科, 北京 100044)

【摘要】目的:探讨男性 miR-221/222 基因多态性对其表达的影响,并初步分析该基因与心力衰竭的关系。**方法:**分别收集男性心力衰竭患者及健康对照外周血,分离血细胞和血浆。提取外周血白细胞基因组 DNA,经 PCR 扩增目的 DNA 片段、Sanger 测序等分别统计相应 SNP 基因型在各组中的分布差异。分别提取各组血浆 miRNA,采用 TaqMan 探针法检测 miR-221/222 的表达强度在心力衰竭及对照组中的差异。分别按照 miR-221/222 基因簇 SNP 位点进行分组,观察心力衰竭患者中这些变异位点对血浆 miR-221/222 表达水平的影响。**结果:**miR-221/222 基因簇周围 SNP 位点 rs2858059、rs2858060、rs2858061 及 rs34678647 的各基因型在心衰及对照组中分布无显著差异。rs113054794 位点在所有观察对象中仅有 C/- 基因型。miR-221/222 靶基因 p27 及 DDIT4 的 3'非翻译区 miR-221/222 结合区 SNP 位点 rs182069485 及 rs72808106 在所有观察对象中均分别为 G/G 基因型和 A/A 基因型,无显著多态性。血浆 miR-221/222 在心衰患者中均升高,且 miR-222 基因 rs34678647 位点 T/- 基因型患者 miR-222 表达水平较 G/- 基因型更高。**结论:**血浆 miR-221/222 在男性心衰患者中升高,miR-222 基因 rs34678647 的 SNP 位点与血浆 miR-222 水平有关。

【关键词】 miR-221; miR-222; 多态性; 心力衰竭

【文献标识码】 A **【doi】**10.3969/j.issn.1006-6233.2020.07.041

Relationship between MiR-221/222 Gene Polymorphism and Heart Failure in Men

FAN Chunhong, CHEN Xiaoning

(Peking University People's Hospital, Beijing 100044, China)

【Abstract】Objective: To investigate the regulation of miR-221/222 on the expression and the relation with heart failure. **Methods:** The peripheral blood samples from male heart failure patients and healthy volunteers were collected and separated for blood cells and plasma, respectively. The genome DNA was extracted, amplified and sequenced for analyzing the distribution of SNP genotypes in the heart failure patients and healthy controls. The plasma miRNA was extracted and the expression of miR-221/222 was detected with a TaqMan assay. The plasma levels of miR-221/222 were analyzed according to the SNP genotypes in heart failure. **Results:** The distribution of SNP genotypes of rs2858059、rs2858060、rs2858061 and rs34678647 were all comparable between heart failure patients and healthy controls. The genotype of rs113054794 was only C/- in all of the study subjects. The rs182069485 and rs72808106 in the 3'UTR of p27 and DDIT4 encoding genes showed no polymorphism in all of the subjects. The plasma levels of miR-221 and miR-222 were increased in heart failure patients. More importantly, we observed that the T/- genotype of rs34678647 in miR-222 was related with the increase of plasma miR-222 in heart failure patients. **Conclusion:** Plasma miR-221/222 levels are increased in male heart failure patients. The genotype of rs34678647 is related with the plasma miR-222 levels in heart failure patients.

【Key words】 miR-221; miR-222; Polymorphism; Heart failure

心血管疾病是人类健康的巨大威胁,特别在老年患者中,各种原因导致的心肌重塑最终均可转变为心

力衰竭。而当心力衰竭出现后,其病死率显著增加。然而,由于缺乏较好的心力衰竭预测指标,常不能在心衰发生前采取有效的干预措施。因此,发现新的心衰预测标志物,对于预防心力衰竭的发生有重要意义。微小RNA(microRNA, miRNA)是一类有调控作用的非编码RNA,通常有21~23个核苷酸组成。它们通过与靶基因的3'非翻译区(3'UTR)结合而发挥其负性调控作用。近来研究发现,多种miRNA参与心肌重塑及心力衰竭的调控。已有研究发现,miR-221/222在心肌重塑动物模型过程中发挥着重要作用^[1]。然而miR-221/222表达的调控及其与人心力衰竭的关系并不清楚。单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)广泛存在于基因组中。体内SNP位点的变异在多种疾病的发生、发展及治疗过程中有重要的调控作用。因此,某些有关键功能基因的SNP位点常用于相应疾病的检测及用药指导^[2,3]。SNP对于miRNA的功能也有重要影响。一方面,miRNA自身编码基因出现的SNP可影响其剪切及结合;另一方面,发生在靶基因结合位点的SNP也可影响其结合作用。因此,本研究以miR-221/222为目标,分析SNP对其表达的影

响,并探讨与心力衰竭的关系,旨在发现新的心衰预测指标,为本病的防治提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象:分别取自2010年至2018年在本院住院且经诊断为心力衰竭的男性患者共100例,平均年龄 64.2 ± 5.2 岁;对照组为同期体检的健康男性,经年龄匹配后共入组100例,平均年龄 59.5 ± 8.7 岁,经统计学分析,两组间年龄无显著性差异。

1.2 样品采集:所有研究对象均采用EDTA-K2真空采血管取晨间空腹静脉血4mL。经2500转/分离心后分别分离血细胞和血浆,均冻存于-80℃冰箱备用。

1.3 DNA提取、PCR扩增及测序:采用酚-氯仿-异戊醇法抽提外周血白细胞,经琼脂糖凝胶电泳鉴定合格后,采用NaNo Drop测定浓度,取部分基因组DNA,并稀释至50ng/ μ L用于PCR扩增反应。采用PCR法对待测部分片段进行扩增,详细信息见表1。依据表1中的信息进行PCR扩增,通过琼脂糖凝胶电泳判断扩增结果,并将PCR产物采用Sanger法测序,通过所获取的测序图分别判断SNP情况。

表1 本研究所采用的的引物序列及条件

| 位点 | 基因 | 上游引物 | 下游引物 | 扩增长度 | 退火温度(℃) |
|--------------------------------|-------------|------------------------------|----------------------------|--------|---------|
| rs34678647,rs2858060,rs2858059 | miR-221/222 | 5'-GAGACCCAGTAGCCAGAT-3' | 5'-GAATAAAGCACGCAGAAG-3' | 843 bp | 50 |
| rs113054794,rs2858061 | miR-221/222 | 5'-CTTTCCTGCGGTCCTTTC-3' | 5'-ATGGCATCTTCTAGCTTCTG-3' | 968 bp | 53 |
| rs182069485 | p27 | 5'-GTCGCAATCTATTCAATCTTTC-3' | 5'-CCCAGAACTTAGCCTTACC-3' | 680 bp | 50 |
| rs72808106 | DDIT4 | 5'-AGTCCCTCCAAGACAGA-3' | 5'-AAACCACCTCCACGACCT-3' | 409 bp | 57 |

1.4 血浆miRNA提取及表达检测:将血浆样品从冰箱取出、冰上自然融化。采用mirVana血浆miR提取试剂盒(Life technologies公司)提取血浆miRNA。在提取时,每个样品中均加入线虫Cel-miR-39类似物作为内参一并提取。采用NaNoDrop对提取的RNA进行定量测定和质量鉴定,并将其稀释至5ng/ μ L。之后,将提取出的血浆总miRNA采用ABI公司microRNA逆转录试剂盒分别将各组样品中的miR-221、miR-222和Cel-miR-39进行逆转录。采用ABI公司的特异性TaqMan探针Real-time PCR法试剂盒检测各样品中的miR-221、miR-222及Cel-miR-39的Ct值,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算miR-221及miR-222在各组间的差

异。

1.5 统计学分析:正态分布数据采用($\bar{x} \pm s$)表示,统计学分析采用t检验。偏态分布数据以M(Q1, Q3)表示,统计学分析采用秩和检验。计数资料采用 χ^2 检验以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-221/222基因簇SNP位点在心力衰竭中的分布:为探讨miR-221/222基因簇SNP位点于心力衰竭的关系,我们首先分析了该基因簇的序列特点,筛选出rs2858059、rs2858060、rs2858061、rs113054794和rs34678647共5个候选SNP位点,经测序结果见表2。

表 2 miR-221/222 基因簇 SNP 位点各基因型在心衰及对照组中分布 (n)

| SNP 位点 | 突变 | 对照组基因型 | 心衰组基因型 |
|-------------|-----|-------------|-------------|
| rs2858061 | C>G | C(75);G(25) | C(70);G(30) |
| rs2858060 | G>C | G(79);C(21) | G(72);C(28) |
| rs2858059 | T>C | T(79);C(21) | T(72);C(28) |
| rs113054794 | C>A | C(100);A(0) | C(100);A(0) |
| rs34678647 | G>T | G(96);T(4) | G(90);T(10) |

经分析发现,上述 SNP 位点均符合 Hardy-Weinberg 平衡,其中 rs2858059、rs2858060 两个 SNP 位点存在显著连锁,且它们在两组间分布均无差异 ($P > 0.05$)。rs113054794 位点在所测的 200 例研究对象中仅发现 C/- 基因型。rs34678647 位点在对照组中的比例为 4%,在心衰组中占 10%,两组间分布无差异 ($P > 0.05$)。

2.2 miR-221/222 靶基因结合位点 SNP 在心力衰竭中的分布: p27 及 DDIT4 为 miR-221/222 的已知靶基因^[4,5],其 3'UTR 区的 SNP 位点很可能影响 miR-221/222 的结合而调控心力衰竭。通过分析其结合序列发现, p27 基因 3'UTR 区的 rs182069485 (G>T) 位点以及 DDIT4 基因的 rs72808106 (A>G) 位点很可能影响 miR-221/222 与该区域结合。然而,经过测序发现,位于 p27 基因的 rs182069485 在 200 例研究对象中全为 G/G 基因型,位于 DDIT4 基因的 rs72808106 在 200 例研究对象中全部为 A/A 基因型,两者均未检测到多态性。

2.3 血浆 miR-221/222 水平与心力衰竭的关系: 通过 real-time PCR 分别检测心衰患者血浆 miR-221 及 miR-222 的差异。结果发现,两者在心衰患者中均显著升高 ($P < 0.01$),见图 1。

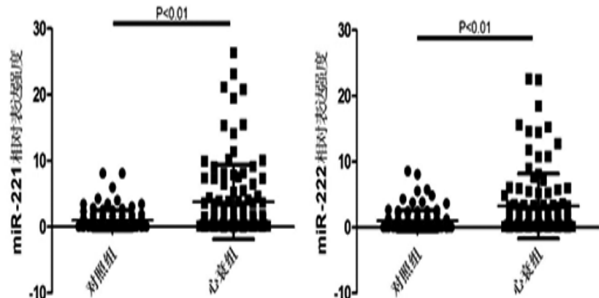


图 1 miR-221/222 在心衰患者血浆中的表达
图中相对表达强度数据均以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, $n = 100/\text{组}$

2.4 miR-221/222 基因多态性对血浆表达水平的影响: 我们在心衰患者中,分别按照 rs2858061、rs2858060 (因与 rs2858059 连锁仅分析其中 1 个) 和 rs34678647 基因型进行分组,观察血浆 miR-221/222 的表达强度。研究发现,rs2858061、rs2858060 两个 SNP 位点按照各基因型分组,其患者血浆 miR-221/222 均无显著差异 ($P > 0.05$)。按 rs34678647 位点基因型分组,miR-221 表达在两组间无显著差异 ($P > 0.05$),但 miR-222 的表达在 T/- 基因型中显著高于 G/- 基因型,其强度分别为 3.97 (1.19, 12.65) 和 0.75 (0.28, 3.40)。由此提示,rs34678647 位点多态性很可能与心衰患者血浆 miR-222 的表达有关,见图 2。

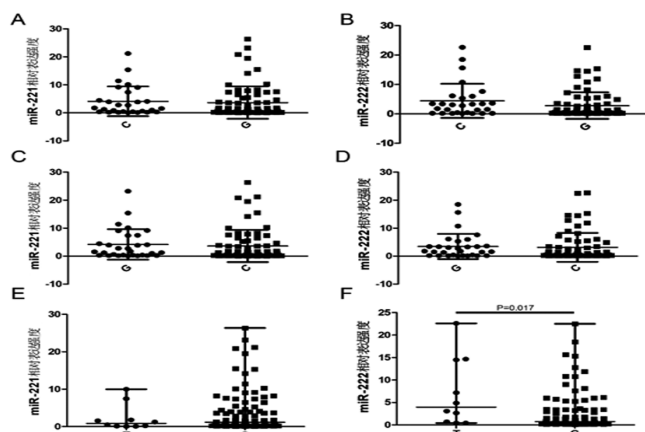


图 2 心衰患者 miR-221/222 基因簇 SNP 位点对其表达的影响

在心衰患者中分别按 rs2858060 (A, B)、rs2858061 (C, D) 和 rs34678647 (E, F) 位点基因型分组,检测各组血浆 miR-221/222 的表达水平。图 A-D 以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,图 E、F 以 M (range) 表示

3 讨论

miRNA-221/222 是心肌重塑的关键调控分子。

前期研究以转基因动物为模型,分别研究了 miR-221 及 miR-222 对心肌重塑和心力衰竭的调控作用^[1]。但其是否可作为人心力衰竭的预警标志物仍然不清楚。本研究通过 SNP 联合血浆 miRNA 表达强度的方法,分析了 miR-221/222 在心力衰竭中的调控状态,并发现血浆 miR-221 及 miR-222 的表达均在心衰患者中上调,且 miR-222 的表达可能受该基因簇 SNP 位点 rs34678647 调控。

人类 miR-221/222 基因簇位于 X 染色体,miR-221 与 miR-222 编码基因约相距 700bp 左右,而其编码序列并不相同。在前期研究中也发现,心肌特异性过表达 miR-221 及 miR-222 后两者的表型并不完全相同,且 miR-222 过表达后心肌重塑及心衰程度更为严重。本研究发现,心衰患者血浆 miR-221 及 miR-222 均升高,提示 miR-221/222 很可能是心衰新的预测分子。

本研究还研究了 miR-221/222 基因簇的 SNP 位点在心衰中的关系,结果发现所研究的 5 个 SNP 位点基因型分布在心衰及对照组中均无差异,表明上述 5 个 SNP 位点可能均不能作为心衰的预测位点。但是本研究发现,rs34678647 位点的 T 基因型可显著增强 miR-222 基因的表达水平,与 G 基因型相比,其血浆 miR-222 表达强度显著升高。rs34678647 位点距离 miR-222 编码基因约 186bp,而距离 miR-221 编码基因约为 1022bp。由于该位点距离 miR-222 基因较近,其很可能通过影响 miR-222 的生成调控其在血浆中的表达水平。然而,要明确该位点对 miR-222 表达的影响,仍需进一步通过功能研究加以验证。

p27 及 DDIT4 基因均为 miR-221 和 miR-222 的已知靶点^[6],且 miR-221/222 可通过与其靶基因 3' UTR 结合而调控其表达。其结合区域 SNP 位点的变异可显著引起其结合强度的变化而影响 miR-221/222 对心肌重塑和心衰的调控作用。本研究也检测了 p27 及 DDIT4 基因的两个已知 SNP 位点,但发现这两个

SNP 位点在所观察的研究对象中均无多态性。本研究也存在一定的局限性。首先,由于 miR-221/222 基因簇位于 X 染色体,本研究仅在男性人群中观察了相应的变化,并不能代表其调控在女性人群中的作用。其次,部分 SNP 位点如 rs34678647,其 T 基因型所占比例较少,本结果仍需在大样本研究中进行验证。

综上所述,血浆 miR-221/222 在心衰男性患者中升高,其可能是新的心衰预测指标。SNP 位点 rs34678647 可影响心衰患者血浆 miR-222 的表达水平,其中 T 基因型患者血浆 miR-222 表达水平显著上调,可能为心衰的预测提供一定依据。

【参考文献】

- [1] Verjans R, Peters T, Beaumont FJ, et al. MicroRNA-221/222 family counteracts myocardial fibrosis in pressure overload-induced heart failure [J]. Hypertension, 2018, 71(2): 280~288.
- [2] Liu J, Xu Z, Li Y, et al. Comparison between massARRAY and pyrosequencing for CYP2C19 and ABCB1 gene variants of clopidogrel efficiency genotyping [J]. Mol Membr Biol, 2019, 35(1): 1~8.
- [3] Ndazda A, Cindi Z, Makambwa E, et al. Warfarin dose and CYP2C gene cluster: an african ancestral-specific variant Is a strong predictor of dose in black south african patients [J]. OMICS, 2019, 23(1): 36~44.
- [4] Ni HZ, Liu Z, Sun LL, et al. Metformin inhibits angiogenesis of endothelial progenitor cells via miR-221-mediated p27 expression and autophagy [J]. Future Med Chem, 2019, 11(17): 2263~2272.
- [5] Li Z, Yu Z, Meng X, et al. Long noncoding RNA GAS5 impairs the proliferation and invasion of endometrial carcinoma induced by high glucose via targeting miR-222-3p/p27 [J]. Am Transl Res, 2019, 11(4): 2413~2421.
- [6] Liu J, Yu J, Jiang W, et al. Targeting of CDKN1B by miR-222-3p may contribute to the development of intervertebral disc degeneration [J]. FEBS Open Bio, 2019, 9(4): 728~735.

欢 迎 投 稿 欢 迎 指 正