

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2022.10.001

miR-27a 在原发性痛风关节炎患者中的表达水平及生物信息学分析^{*}苟海梅^{1,2}, 陈莹¹, 徐磊³, 李九龙⁴, 郭晓兰^{1,2,3}, 钟晓武^{1,2,3△}

1. 川北医学院附属医院检验科, 四川南充 637000; 2. 川北医学院检验系, 四川南充 637000; 3. 川北医学院转化医学研究中心, 四川南充 637000; 4. 南充市第五人民医院检验科, 四川南充 637100

摘要:目的 检测 miR-27a 在原发性痛风性关节炎(PGA)患者的表达水平,运用生物信息学方法研究 miR-27a 及其靶基因在 PGA 发生、发展过程中的作用。**方法** 采用实时荧光定量 PCR 检测 miR-27a 在 PGA 患者外周血单个核细胞中的表达水平,应用 UCSC 基因组在线软件分析 miR-27a 在不同物种间的保守性,采用 TargetScan、miRDB 和 RNA22 数据库进行靶基因预测,并结合 GeneCards 数据库,对痛风相关的靶基因进行 GO 富集分析和 KEGG 信号通路分析。**结果** miR-27a 在 PGA 患者中表达明显降低,其核苷酸序列在多物种间呈高度保守性。受 miR-27a 调控,且与 PGA 疾病相关的潜在靶基因包括 MAPK14、RFX3、ABCA1、HS2ST1、ENPEP 和 CACNA2D3 等。GO 富集分析发现,miR-27a 的靶基因参与细胞代谢调节及对外界刺激的反应等多种生物学功能。KEGG 信号通路分析发现,miR-27a 的靶基因显著富集在 MAPK 信号通路、细胞因子-细胞因子受体相互作用、糖尿病通路和醛固酮控制的钠盐重吸收通路等。**结论** miR-27a 可能通过调控多个与痛风发病相关的靶基因,参与多条信号通路的调节,从而参与痛风炎症免疫反应机制。

关键词: miR-27a; 痛风; 靶基因; GO 富集; KEGG 信号通路**中图分类号:** R589.7**文献标志码:** A**文章编号:** 1672-9455(2022)10-1297-05**MiR-27a expression and bioinformatics analysis of its predicted target genes in primary gouty arthritis^{*}**GOU Haimei^{1,2}, CHEN Ying¹, XU Lei³, LI Jiulong⁴, GUO Xiaolan^{1,2,3}, ZHONG Xiaowu^{1,2,3△}

1. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan 637000, China; 2. Department of Laboratory Medicine, North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan 637000, China; 3. Translational Medicine Research Center, North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan 637000, China; 4. Department of Clinical Laboratory, Nanchong Fifth People's Hospital, Nanchong, Sichuan 637100, China

Abstract: Objective To detect expression level of miR-27a in patients with primary gouty arthritis (PGA), and to explore the role of miR-27a and its target genes by bioinformatics analysis. **Methods** Expression level of miR-27a in peripheral blood mononuclear cells of PGA patients was detected by quantitative RT-PCR. UCSC genome browser was used to analyze the conservation of miR-27a among different species. Combining with the gout related genes of GeneCards, TargetScan, miRDB and RNA22 database were used to predict the intersection target genes of miR-27a. Then GO enrichment and KEGG signal pathway enrichment of miR-27a target genes were further analyzed. **Results** MiR-27a expression was significantly reduced in PGA patients, and its sequence was conserved highly among species. These target genes were predicted to be regulated by miR-27a and associated with gout, including MAPK14, RFX3, ABCA1, HS2ST1, ENPEP, CACNA2D3 and other genes. GO enrichment analysis revealed that the target genes of miR-27a were involved in a variety of biological functions such as cell metabolic regulation and response to external stimuli. KEGG signal pathway analysis showed that the target genes of miR-27a were significantly enriched in a series of signaling pathways including MAPK signaling pathway, cytokine-cytokine receptor interaction, diabetes pathway and aldosterone-regulated sodium reabsorption pathway. **Conclusion** MiR-27a maybe directly regulate its target molecules associated with gouty arthritis, mediate various signal pathway networks, thus participate in mechanism of inflammatory immune response in gouty arthritis.

Key words: miR-27a; gouty arthritis; target gene; GO enrichment; KEGG signal pathway

^{*} 基金项目: 四川省卫生健康委员会科研项目(19PJ200); 四川省南充市市校科技战略合作项目(18SXHZ0513); 川北医学院附属医院科技发展计划项目(2020JC001, 2020ZD022)。

作者简介: 苟海梅, 女, 技师, 主要从事临床检验研究。△ 通信作者, E-mail: zwx_strive@163.com。

网络首发 https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1167.R.20220418.1348.004.html(2022-04-20)

痛风是机体嘌呤代谢紊乱、血尿酸水平持续升高而导致单钠尿酸盐(MSU)晶体析出并沉积于组织或器官而引起反复发作性炎症疾病^[1]。近年来,随着生活水平不断提高,痛风的发病率逐年呈上升趋势,已成为临床常见病、多发病,且痛风发病年龄有向低龄化发展趋势^[2]。MSU 晶体的沉积是痛风发生的重要物质基础,但痛风发病机制及炎症自限的确切分子机制尚未完全阐明,仍是目前亟待解决的问题。

微小 RNA(miRNA)是一类由 22~24 个核苷酸组成的高度保守性内源性非编码小 RNA,它通过与 mRNA 的 3' 非翻译区(3' UTR)特异性结合降解靶 mRNA 和(或)抑制靶 mRNA 的表达及翻译,进行转录后调控^[3]。多项研究表明,miRNA 在痛风发病机制中有关键性调控作用^[4-6]。miR-27a 在骨性关节炎^[7]及系统性红斑狼疮^[8]中均表达异常呈下调趋势,提示 miR-27a 与炎症反应负调控相关。已有研究表明,miR-27a 在痛风患者中存在异常表达,其可能作为炎症负性调控因子参与痛风的炎症免疫反应^[9],但其与痛风发生相关的确切靶分子机制尚不清楚。本研究运用生物信息学分析方法预测 miR-27a 作用的靶基因,对其靶基因进行 GO 富集分析、KEGG 信号通路富集分析,为痛风炎症免疫反应研究提供理论依据及数据支持。

1 资料与方法

1.1 一般资料 将川北医学院附属医院风湿免疫科就诊的 20 例男性原发性痛风性关节炎(PGA)患者纳入 PGA 组,将 20 例体检健康男性纳入健康对照组。其中,PGA 组平均年龄(44.30±13.27)岁,健康对照组平均年龄(47.70±12.65)岁,两组年龄比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。

1.2 方法

1.2.1 miRNA 检测 采用人外周血淋巴细胞分离液(天津灏洋公司)对人外周血单个核细胞(PBMC)进行分离,并用 Trizol 试剂盒(美国 Invitrogen 公司)一

步法提取人外周血单个核细胞总 RNA,同时用紫外分光光度仪进行浓度测定。采用 TaqMan MicroRNA Assays 试剂盒(美国 Life Technologies 公司)将 miR-27a 逆转录为 cDNA,并采用实时荧光定量 PCR 进行扩增及荧光检测,以 U6 为内参,严格按照说明书指示完成检测操作。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析 miRNA 的相对表达量。

1.2.2 miR-27a 在人类基因组中的位置及保守性分析 应用 UCSC 基因组在线软件工具(<http://genome.ucsc.edu/>)分析 miR-27a 在人类基因组中的位置,查找不同物种间的成熟序列并分析其保守性。

1.2.3 miR-27a 靶基因筛选 应用 TargetScan (<http://www.targetscan.org/>)数据库,miRDB(<http://mirdb.org/>)数据库和 RNA22 (<https://cm.jefferson.edu/rna22/precomputed/>)数据库分别预测 miR-27a 靶基因,同时运用 GeneCards 数据库(<http://www.genecards.org/>)查询与痛风发病相关的疾病基因。为了增加预测结果的可靠性,将 4 种数据库的预测结果取交集作为与痛风发病相关的 miR-27a 靶基因。

1.2.4 miR-27a 靶基因的功能注释 应用 DAVID 数据库(<https://david.ncifcrf.gov/>)对 miR-27a 预测靶基因集合进行 GO 富集分析和 KEGG 通路富集分析。GO 富集分析包括生物过程、细胞组分和分子功能。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件对数据进行统计分析,符合正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 miR-27a 在人类基因组中的位置及保守性分析 应用 UCSC 基因组在线软件获取 miR-27a 在人类基因组中的位置(图 1),miR-27a 定位于人类 19q13.12 染色体上 chr19:13 836 440—13 836 517 位置,长度共 78 bp,其核苷酸序列在人、黑猩猩、大猩猩、猕猴、狒狒、小鼠、狗、大象物种中呈高度保守。

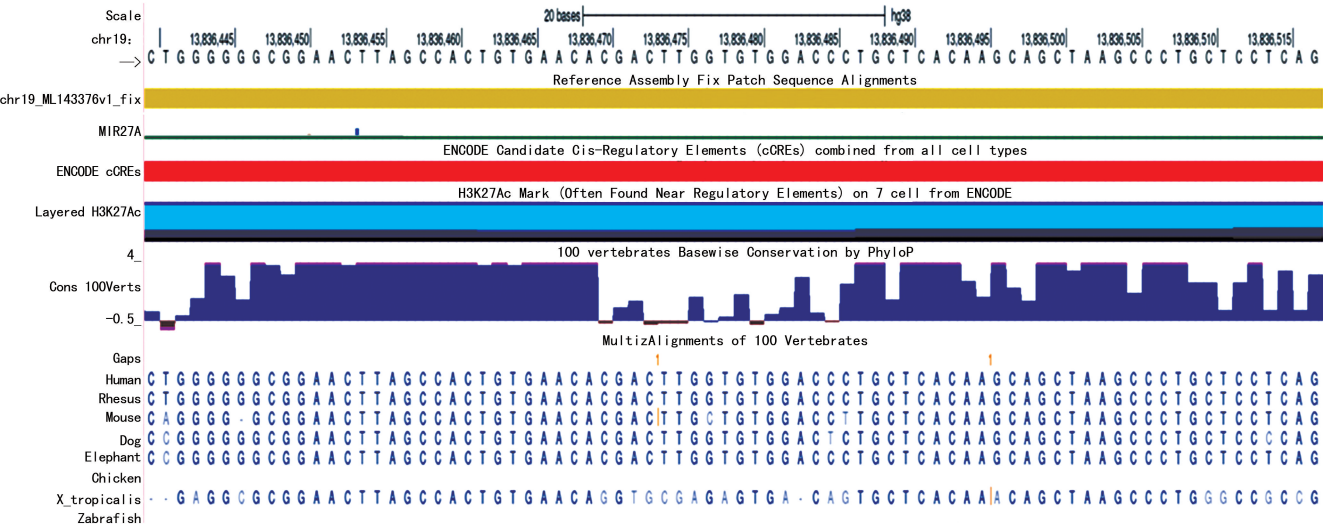


图 1 miR-27a 在基因组中的位置和保守性分析

2.2 miR-27a 在 PGA 患者中的表达 应用实时荧光定量 PCR 法检测 PGA 组和健康对照组 PBMC 中 miR-27a 的相对表达水平,结果显示,miR-27a 在 PGA 组患者中的相对表达水平明显低于健康对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见图 2。

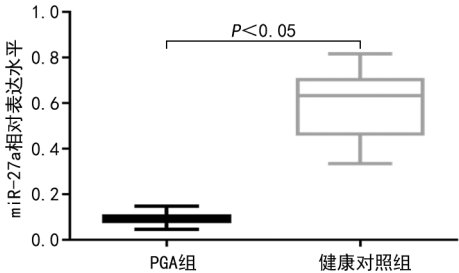


图 2 miR-27a 在 PGA 组和健康对照组中的表达水平

2.3 筛选与痛风发病相关的 miR-27a 靶基因 应用 TargetScan、miRDB 和 RNA22 数据库分别预测 miR-27a 的靶基因,然后对 miR-27a 靶基因结果取交集,共得到 585 个潜在调控靶基因。此外,在 GeneCards 数据库中查询与痛风发病相关基因共 980 个基因。将 GeneCards 数据库所得基因与 585 个潜在调控靶基因再次取交集,最终得到 MAPK14、RFX3、ABCA1、HS2ST1、ENPEP 和 CACNA2D3 等共 33 个与痛风发病相关的 miR-27a 靶基因。见图 3。

2.4 预测靶基因的 GO 富集分析 对与痛风发病相关的 miR-27a 靶基因进一步进行 GO 富集分析,GO 富集分析结果显示:miR-27a 的靶基因显著富集到生

物过程调节、细胞过程调节、有机物代谢过程、多细胞生物过程、生物过程正调控、对外界刺激的反应、主要代谢调节等多个生物学过程中;富集到质膜的外侧、细胞表面、血影蛋白细胞骨架及细胞膜的细胞组分;富集有机环化合物结合、蛋白结合、催化活性、离子结合等分子功能。见表 1。

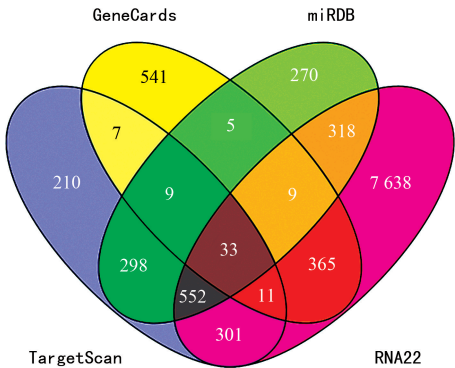


图 3 miR-27a 靶基因预测

2.5 预测靶基因的 KEGG 信号通路分析 对与痛风发病相关的 miR-27a 靶基因进一步进行 KEGG 功能富集分析,KEGG 信号通路分析显示,miR-27a 的靶基因显著富集于 MAPK 信号通路、癌症相关通路、Rap1 信号通路、细胞因子-细胞因子受体相互作用、干细胞多能性调节信号通路、青少年成人起病型糖尿病通路和醛固酮控制的钠盐重吸收通路。见表 2。

表 1 miR-27a 预测靶基因 GO 富集分析结果

GO 编号	名称	n	基因	P
生物学过程				
GO:0065007	生物调节	29	ABCA1、RFX3、MAPK14 等	0.009
GO:0050789	生物过程调节	27	ABCA1、RFX3、MAPK14 等	0.022
GO:0050794	细胞过程调节	25	ABCA1、RFX3、MAPK14 等	0.044
GO:0071704	Organic substance metabolic process	24	ABCA1、RFX3、MAPK14 等	0.021
GO:0048518	Positive regulation of biological process	23	ABCA1、RFX3、MAPK14 等	<0.001
GO:0032501	Multicellular organismal process	23	ABCA1、RFX3、MAPK14 等	0.001
GO:0050896	Response to stimulus	23	ABCA1、ANK1、MAPK14 等	0.009
GO:0006807	Nitrogen compound metabolic process	23	ABCA1、RFX3、MAPK14 等	0.017
GO:0044238	Primary metabolic process	23	ABCA1、RFX3、MAPK14 等	0.028
GO:0043170	Macromolecule metabolic process	22	ABCA1、CREBRF、RFX3 等	0.013
细胞组分				
GO:0009897	External side of plasma membrane	5	ABCA1、ENPEP、IL6ST 等	0.009
GO:0009986	Cell surface	7	ABCA1、ACVR2A、ENPEP 等	0.010
GO:0014731	Spectrin-associated cytoskeleton	2	ANK1、EPB41	0.010
GO:0098552	Side of membrane	6	ABCA1、ENPEP、EPB41 等	0.010
分子功能				
GO:0005488	结合	32	ABCA1、RFX3、MAPK14 等	<0.001

续表 1 miR-27a 预测靶基因 GO 富集分析结果

GO 编号	名称	<i>n</i>	基因	<i>P</i>
GO:0097159	Organic cyclic compound binding	23	ABCA1、RFX3、MAPK14 等	<0.001
GO:1901363	Heterocyclic compound binding	23	ABCA1、RFX3、MAPK14 等	<0.001
GO:0043167	Ion binding	21	ABCA1、ACVR2A、MAPK14 等	0.001
GO:0005515	Protein binding	21	ABCA1、ACVR2A、MAPK14 等	0.003
GO:0003824	Catalytic activity	16	ABCA1、ACVR2A、MAPK14 等	0.050
GO:0043168	Anion binding	15	ABCA1、ACVR2A、MAPK14 等	<0.001
GO:0000166	Nucleotide binding	12	ABCA1、ACVR2A、MAPK14 等	0.001
GO:0097367	Carbohydrate derivative binding	12	ABCA1、ACVR2A、MAPK14 等	0.001
GO:0003676	Nucleic acid binding	12	CREBRF、CTCF、RFX3 等	0.032

表 2 miR-27a 预测靶基因 KEGG 信号通路分析

通路编号	名称	<i>n</i>	基因	<i>P</i>
hsa04010	MAPK 信号通路	5	CACNA2D3、HGF、INSR、MAPK14、PDGFRA	0.015
hsa05200	癌症相关通路	5	HGF、IL6ST、LRP6、NCOA1、PDGFRA	0.038
hsa04015	Rap1 信号通路	4	HGF、INSR、MAPK14、PDGFRA	0.022
hsa04060	细胞因子-细胞因子受体相互作用	4	ACVR2A、HGF、IL6ST、PDGFRA	0.038
hsa04550	干细胞多能性调节信号通路	3	ACVR2A、IL6ST、MAPK14	0.038
hsa04950	青少年成人起病型糖尿病通路	2	HNF4G、NR5A2	0.038
hsa04960	醛固酮控制的钠盐重吸收通路	5	INSR、KCNJ1	0.038

3 讨 论

miRNA 作为调控分子,可同时调节多个靶基因,参与生物体细胞信号转导通路调节,从而对细胞特定功能和表型进行有效调控,发挥生物学功能^[3]。现有研究表明,miRNA 与免疫功能失调、多种慢性炎症或自身免疫病等相关^[10-11]。通过 UCSC 基因组在线软件分析,miR-27a 核苷酸序列在多个物种中呈高度保守,提示其发生突变的概率低,有潜在的重要生物学功能。本研究对 PGA 组和健康对照组中 miR-27a 基因表达进行了检测,发现在 PGA 组中 miR-27a 基因表达水平较健康对照组明显降低,与李宁宁等^[9]研究结果一致,进一步提示 miR-27a 可能作为炎症负性调控因子在痛风的炎症免疫反应过程中起到重要作用。

为进一步分析 miR-27a 参与痛风炎症免疫反应相关的靶分子机制,准确预测其靶基因,本研究运用 TargetScan、RNA22 和 miRDB 3 个使用较多的靶基因预测软件,取 3 个软件共同预测的靶基因作为结果,利用不同软件、不同算法从多角度分析,以增强预测结果的可靠性。本研究再将生物信息学方法预测的靶基因和 GeneCards 数据库中与痛风相关的基因联合分析,取交集最终得到 MAPK14、RFX3、ABCA1、HS2ST1、ENPEP、CACNA2D3 等 33 个潜在的靶基因。MAPK14(即 p38α)是 p38MAPK 最重要的

亚型之一,p38MAPK 信号通路与炎症反应调控密切相关。有研究显示,p38MAPK 信号通路参与调控 MSU 诱导的单核细胞 IL-8 表达,进而参与痛风性关节炎的炎症反应^[12]。在中国人群全基因组关联分析(GWAS)研究中发现,RFX3 是中国人群特有的原发性痛风易感基因^[13]。RFX3 由胰岛 β 细胞分泌,可结合到葡萄糖激酶基因的启动子区域,调控其表达,从而影响胰岛 β 细胞的功能^[14]。胰岛 β 细胞主要参与血糖的调节,糖代谢的紊乱不仅直接影响嘌呤的代谢及尿酸的合成,而且影响尿酸的排泄^[15]。因此,RFX3 突变可能引起胰岛 β 细胞功能缺陷,从而直接或间接引起高尿酸血症和痛风。

GO 富集分析表明,miR-27a 靶基因存在细胞代谢调节及对外界刺激的反应等多种生物学功能。痛风属于代谢性风湿病范畴,与嘌呤代谢紊乱及尿酸排泄减少所致的高尿酸血症相关,高尿酸血症所致的 MSU 沉积可作为外界刺激反复引起炎症反应。KEGG 通路富集分析显示,miR-27a 可能通过调控 MAPK 信号通路、细胞因子-细胞因子受体相互作用和醛固酮控制的钠盐重吸收通路等发挥生物学功能。MAPK 信号通路是一类苏氨酸蛋白激酶,可以被细胞外信号或刺激等激活,包括 ERK1/2 MAPK、JNK MAPK、p38MAPK 等活化途径。目前研究发现,

ERK1/2 MAPK、JNK MAPK 和 p38MAPK 通路可诱导前炎症细胞因子 IL-8 的产生,且参与调控 MSU 诱导的单核细胞 IL-8 表达^[14,16-17]。在体外 MSU 诱导的单核细胞模型中发现,中性粒细胞趋化活性 90% 来自 IL-8,而大量中性粒细胞浸润到关节腔并介导炎症反应是痛风性关节炎的核心病理机制^[14]。MAPK14 是 miR-27a 预测靶基因,故笔者推测痛风性关节炎经 MSU 刺激后,miR-27a 基因表达水平降低,且作为炎症负性调控因子靶向作用于 MAPK14,MAPK14 在痛风性关节炎呈高表达,MAPK14 经 p38MAPK 通路诱导单核细胞 IL-8 表达,IL-8 激活中性粒细胞并浸润到关节腔介导痛风炎症反应。近年来的研究发现,IL-1、IL-8、IL-10 等细胞因子在痛风性关节炎的发生、发展过程中发挥重要作用^[14],miR-27a 参与细胞因子-细胞因子受体相互作用,因此 miR-27a 可能通过细胞因子-细胞因子受体相互作用参与痛风性关节炎的发病机制。醛固酮控制的钠盐重吸收系统失衡会引起肾脏的损伤,进而影响嘌呤的代谢及尿酸的合成,而且影响尿酸的排泄,miR-27a 也可能通过参与醛固酮控制的钠盐重吸收直接或间接引起高尿酸血症和痛风。

本研究通过生物信息学分析挖掘 miR-27a 在痛风炎症免疫反应相关的靶分子机制,结果表明 miR-27a 可能通过调控多个与痛风发病相关的靶基因,影响多条信号通路的网络调节,从而参与痛风炎症免疫反应机制,进一步为 miR-27a 调控痛风炎症免疫反应机制及痛风治疗靶点提供了新的依据。

参考文献

[1] DALBETH N, MERRIMAN T R, STAMP L K. Gout [J]. Lancet, 2019, 5(1): 68.

[2] GUO J, ZHAO S, RHEUMATOLOGY D O. Necessity of health management in the treat-to-target therapy of hyperuricemia and gout[J]. J New M, 2017, 48(6): 365-368.

[3] FRIEDMAN R C, FARH K K, BURGE C B, et al. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs [J]. Genome Res, 2009, 19(1): 92-105.

[4] DALBETH N, POOL B, SHAW O M, et al. Role of miR-146a in regulation of the acute inflammatory response to monosodium urate crystals[J]. Ann Rheum Dis, 2015, 74(4): 786-790.

[5] JIN H M, KIM T J, CHOI J H, et al. MicroRNA-155 as a proinflammatory regulator via SHIP-1 down-regulation in acute gouty arthritis[J]. Arthritis Res Ther, 2014, 16(2): R88.

[6] 朱丹, 李玲琴, 张全波, 等. 原发性痛风中微小 RNA-223 表达变化及其临床意义[J]. 中华风湿病学杂志, 2017, 21(3): 167-171.

[7] 何仁豪, 王维山, 董金波, 等. miR-27a、miR-146a 在骨性关节炎患者滑膜组织中的表达及临床意义[J]. 实用医学杂志, 2013, 29(9): 1416-1419.

[8] ZHANG H, HUANG X, YE L, et al. B cell-related circulating microRNAs with the potential value of biomarkers in the differential diagnosis, and distinguishment between the disease activity and lupus nephritis for systemic lupus erythematosus[J]. Front Immunol, 2018, 9(2): 1473.

[9] 李宁宁, 戴冰冰, 雷蕾, 等. 原发性痛风性关节炎患者 miR-23a、miR-24-2 和 miR-27a 的表达水平及调节机制[J]. 河北医学, 2019, 25(8): 1233-1237.

[10] ESTEVEZ-GARCIA I O, GALLEGOS-NAVA S, VERA-PEREZ E, et al. Levels of cytokines and microRNAs in individuals with a-symptomatic hyperuricemia and ultrasonographic findings of gout: a bench-to-bedside approach [J]. Arthrit Care Res, 2018, 70(12): 1814-1821.

[11] 王继成, 易智. miRNA 与骨关节炎病理发展过程的相关性[J]. 中国组织工程研究, 2019, 23(24): 3875-3881.

[12] 万春平, 李兆福, 徐翔峰, 等. 急性痛风性关节炎免疫学发病机制研究进展[J]. 风湿病与关节炎, 2012, 1(4): 52-55.

[13] LI C, LI Z, LIU S, et al. Genome-wide association analysis identifies three new risk loci for gout arthritis in Han Chinese[J]. Nat Commun, 2015, 6: 7041.

[14] AIT-LOUNIS A, BONAL C, SEGUÍN-ESTÉVEZ Q, et al. The transcription factor Rfx3 regulates beta-cell differentiation, function, and glucokinase expression[J]. Diabetes, 2010, 59(7): 1674-1685.

[15] 郑敏, 麻骏武. 高尿酸血症和痛风的遗传学研究进展[J]. 遗传, 2016, 38(4): 300-313.

[16] 李贤. 巨噬细胞微粒通过激活 MAPK 信号通路诱导 THP-1 细胞产生 IL-8[D]. 衡阳: 南华大学, 2015.

[17] LIU R, AUPPERLE K, TERKELTAUB R. Src family protein tyrosine kinase signaling mediates monosodium urate crystal-induced IL-8 expression by monocytic THP-1 cells[J]. J Leukoc Biol, 2001, 70(6): 961-968.