

# Vogt-小柳原田综合征患者血浆中 microRNA 表达谱的初步研究

张新桥, 王 红

基金项目:北京市自然科学基金(No.7122042)

作者单位:(100730)中国北京市,首都医科大学附属北京同仁医院 北京同仁眼科中心 北京市眼科学与视觉科学重点实验室

作者简介:张新桥,在读硕士研究生,研究方向:眼科学。

通讯作者:王红,毕业于中山大学眼科中心,博士,主任医师,研究方向:葡萄膜炎学. wanghongyk@sina.com

收稿日期:2016-01-12 修回日期:2016-03-15

## Preliminary research on plasma microRNA profiling in patients with Vogt-Koyanagi-Harada syndrome

Xin-Qiao Zhang, Hong Wang

Foundation item: Natural Science Foundation of Beijing (No. 7122042)

Beijing Ophthalmology & Visual Sciences Key Lab, Beijing Tongren Eye Center, Beijing Tongren Hospital, Capital Medical University, Beijing 100730, China

Correspondence to: Hong Wang. Beijing Ophthalmology & Visual Sciences Key Lab, Beijing Tongren Eye Center, Beijing Tongren Hospital, Capital Medical University, Beijing 100730, China. wanghongyk@sina.com

Received:2016-01-12 Accepted:2016-03-15

### Abstract

• AIM: To explore the differences of expression pattern of microRNA (miRNA) in plasma from Vogt-Koyanagi-Harada (VKH) syndrome patients and normal controls, searching for diseases-relating biomarkers.

• METHODS: Blood samples from 10 cases of VKH patients and 10 cases of normal control were collected to extract total RNA in plasma. The cDNA was synthesized by reverse transcription, and then underwent real time PCR in a 96 well plate from miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR panels. Original Ct value was obtained. The Exiqon GenEx qPCR analysis software was used to analyse the original data and the differential miRNAs was obtained and analyzed by bioinformatics.

• RESULTS: The panels contained 179 miRNAs classes from human individuals. In comparison with the healthy controls, there were 20 differential miRNAs, in which 12 miRNAs were up regulated and 8 miRNA were down regulated (all  $P < 0.05$ ). These microRNAs participated in the regulation of various signaling pathways.

• CONCLUSION: The VKH patients and healthy controls have significantly different expression profiles of microRNA. The differential expression of microRNA may

be involved in the pathogenesis of VKH.

• KEYWORDS: Vogt-Koyanagi-Harada syndrome; microRNA; plasma; profiling

Citation: Zhang XQ, Wang H. Preliminary research on plasma microRNA profiling in patients with Vogt-Koyanagi-Harada syndrome. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2016;16(4):625-629

### 摘要

目的:检测 Vogt-小柳原田综合征(VKH)患者和正常对照人群血浆中 miRNAs 差异表达谱,探讨 miRNAs 在 VKH 发病中的作用,寻找疾病相关的血浆生物标记物。

方法:采集 10 例 VKH 患者和 10 例正常对照组的血液样本,提取血浆中的总 RNA,先进行 RNA 逆转录合成 cDNA,然后在 96 孔板中利用 miRNA 实时定量 PCR 芯片进行 Real-time PCR 扩增和溶解曲线分析。获得原始的 Ct 值,应用 Exiqon GenEx qPCR analysis software 分析原始数据获得差异表达 miRNA,并对差异表达 miRNA 进行生物信息学分析。

结果:miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR 芯片一共有 179 个人类来源的 miRNAs,共筛选出 20 个差异表达的 miRNAs,其中在 VKH 组中高表达者有 12 个,低表达者有 8 个。差异表达 miRNAs 参与多种信号通路。

结论:Vogt-小柳原田综合征患者血浆中存在多个 microRNA 异常表达,异常表达的 miRNAs 可能通过某种信号通路参与 VKH 的发病。

关键词:Vogt-小柳原田综合征;microRNA;血浆;表达差异  
DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2016.4.09

引用:张新桥,王红. Vogt-小柳原田综合征患者血浆中 microRNA 表达谱的初步研究. *国际眼科杂志* 2016;16(4):625-629

### 0 引言

Vogt-小柳原田综合征(Vogt-Koyanagi-Harada, VKH)是一种累积全身多系统的自身免疫性疾病,主要以双侧肉芽肿性全葡萄膜炎为特征,常伴有听力障碍、脑膜刺激征、毛发变白或脱落、白癜风<sup>[1]</sup>,是国内最常见的葡萄膜炎类型之一,其发病快、进展快、反复发作、致盲率高<sup>[2]</sup>。截至目前,有关 VKH 的病因与发病机制尚不完全清楚<sup>[3]</sup>。microRNA(简称 miRNA)是一类新发现、短序列、非编码的小分子 RNA,参与基因组转录后水平的调节。miRNA 在转录后水平通过与 mRNA 不完全结合调控基因表达,从而在真核生物基因调控过程中起到重要的作用<sup>[4]</sup>,截至目前有超过 1 000 个人类微小 RNA 调控人类约 1/3 的基因表达。miRNA 参与固有和适应免疫应答,有越来越多的证据提示 miRNA 能够成为 VKH 患者新的生物标记物以

及治疗的靶点,但 miRNAs 在 VKH 发生发展过程中的确切作用迄今尚不明确。因此本文应用 miRNAs PCR 芯片技术检测 VKH 患者与正常人群的 miRNAs 差异表达谱,从而探讨 miRNAs 在 VKH 发病中的意义。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 主要试剂与设备 miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR 芯片及配套试剂,丹麦 Exiqon 公司;miRNA 抽提试剂 The miRCURY™ RNA Isolation Kit 提取总 RNA,丹麦 Exiqon 公司。美国 Bio-Rad iQ5 实时定量 PCR 仪。

1.1.2 实验对象 选取 10 例发病期 Vogt-小柳原田综合征患者,排除其他免疫性疾病及全身其他系统疾病,VKH 诊断标准采取国际公认诊断标准。对照组选取体检中心体检正常人群 10 例。所有人员均知情同意并签署知情同意书。

### 1.2 方法

1.2.1 血浆标本收集与 miRNA 提取 应用 EDTA-K<sub>2</sub> 抗凝管采集静脉血 8mL,3000r/min 离心 10min,将上层血浆分装至离心管中。应用 The miRCURY™ RNA Isolation Kit 血浆 miRNA 抽提试剂,抽提总 miRNA。

1.2.2 RNA 质量检测 为了确认 RNA 提取效果,RNA 提取时加入 MS2 RNA (Roche,10165948001,937.5ng),通过 OD 值测定计算回收率,根据检测结果选取回收率>50% 样本。另外在 RNA 提取时加入 RNA Spike-in kit (Exiqon, E23203) 中的 control RNA UniSp2、UniSp4、UniSp5 spike-in Template,在 microRNA QC PCR Panel (Exiqon, E203887) 中检测提取质量。

1.2.3 PCR 芯片检测与分析 根据 Exiqon 公司提供的标准操作流程进行 cDNA 合成和实时定量 PCR,利用配套软件 Exiqon GenEx qPCR analysis software 对 VKH 组与健康对照组 miRNA 进行差异分析,采用 *t* 检验取  $P < 0.05$  及差异倍数 >2 或 <0.5 为差异有统计学意义。

1.2.4 生物信息学分析 通过搜索 TargetScan, Miranda 数据库得到差异 miRNA 调控的所有靶基因;随后通过对差异 miRNA 对应靶基因进行 GO 显著性功能分析,得到具有显著性、低误判率、靶向性的 GO 功能集以及对应的靶基因;同样为了进一步阐明异常表达的 miRNA 参与的信号通路,我们对差异 miRNA 对应的靶基因进行 KEGG Pathway 显著性分析,得到具有显著性、低误判率、靶向性的 KEGG Pathway 以及对应的靶基因;随后通过对靶基因的显著性 GO 功能集分析和显著性 Pathway 分析,将 GO 和 Pathway 所包含的靶基因取交集;最后根据以上步骤得到的靶基因构建差异 miRNA 与靶基因的调控网络,得到网络中起核心调控作用的 miRNA 和被 miRNA 调控的关键靶基因。

## 2 结果

2.1 分光光度计检测结果 分光光度计检测样品液量为 50μL,检测样品浓度 11.8 ~ 18.5ng/μL 不等, RNA 总量为 590 ~ 925ng 不等,回收率 59% ~ 92.5% 不等,均 >50%,可取。

2.2 microRNA QC PCR Panel 检测结果 QC PCR Panel 中包括多数组织中稳定表达的 hsa-miR-103、hsa-miR-191、hsa-miR-23a;在红细胞中特异的 hsa-miR-451 (用于判定血浆样品的溶血情况);以及在 RNA 提取时添加的合成 RNA UniSp2、UniSp4、UniSp5 (用于判定 RNA 提取效

表 1 VKH 患者血浆中差异表达的 miRNA

miRNA	<i>P</i>	倍数
上调 miRNA		
Hsa-miR-424-5p	0.002	5.4
Hsa-miR-106b-3p	0.002	4.2
Hsa-miR-629-5p	0.0003	4.5
Hsa-miR-133a-3p	0.0004	5.2
Hsa-miR-130b-3p	0.0004	5.2
Hsa-miR-200c-3p	0.001	6.2
Hsa-miR-376a-3p	0.005	4.9
Hsa-miR-376c-3p	0.007	8.1
Hsa-miR-374a-5p	0.01	9.9
Hsa-miR-126-5p	0.02	6.6
Hsa-miR-33a-5p	0.03	3.4
Hsa-miR-10b-5p	0.04	5.2
下调 miRNA		
Hsa-miR-324-3p	0.002	0.32
Hsa-miR-365a-3p	0.001	0.20
Hsa-miR-423-5p	0.01	0.41
Hsa-miR-382-5p	0.0005	0.34
Hsa-miR-584-5p	0.002	0.22
Hsa-miR-877-5p	0.007	0.19
Hsa-miR-93-5p	0.02	0.49
Hsa-miR-146a-5p	0.03	0.24

表 2 20 个异常表达的 microRNA 预测的靶基因数量

MicroRNA	预测靶基因数	模型
hsa-miR-106b-3p	174	up
hsa-miR-10b-5p	261	up
hsa-miR-126-5p	25	up
hsa-miR-130b-3p	617	up
hsa-miR-133a-3p	620	up
hsa-miR-200c-3p	466	up
hsa-miR-33a-5p	387	up
hsa-miR-374a-5p	648	up
hsa-miR-376c-3p	238	up
hsa-miR-424-5p	1212	up
hsa-miR-629-5p	184	up
hsa-miR-146a-5p	213	down
hsa-miR-324-3p	326	down
hsa-miR-365a-3p	119	down
hsa-miR-382-5p	206	down
hsa-miR-423-5p	174	down
hsa-miR-584-5p	142	down
hsa-miR-877-5p	115	down
hsa-miR-93-5p	1174	down

率)。经检测所有样本 hsa-miR-103、hsa-miR-191、hsa-miR-23a 均稳定表达;各样品 ΔCq (miR-23a ~ miR-451a) 差异在 7 以内,符合样品无溶血的判定标准;各样品间 UniSp2、UniSp4、UniSp5 差异均在 3 以内,符合样品判定标准。

2.3 VKH 患者血浆差异表达的 miRNA 经检测发现 VKH 患者与正常对照相比有 12 个 miRNA 表达上调,有 8 个 miRNA 表达下调(表 1)。

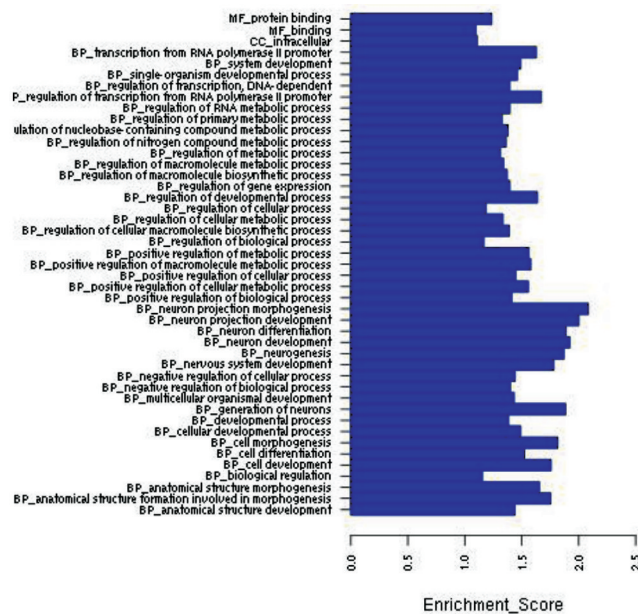


图1 上调 microRNA 靶基因显著性的 GO 分析结果。

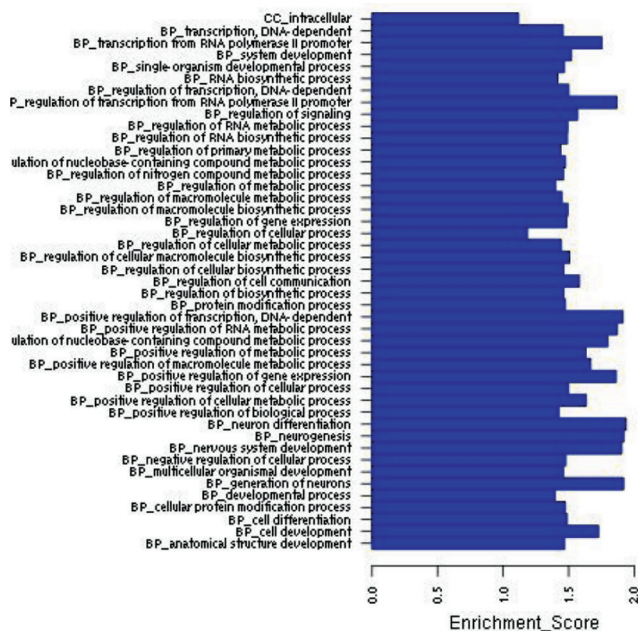


图2 下调 microRNA 靶基因显著性的 GO 分析结果。

2.4 差异表达的 miRNA 潜在靶基因生物信息学分析 20 个异常表达的 miRNA 在 TargetScan, Miranda 数据库中共同的预测靶基因共得到 7 415 个, 其中表达上调 miRNA 中靶基因最多的为 sa-miR-424-5p 靶基因数量最多, 靶基因预测数量最少的为 hsa-miR-126-5p; 表达下调的 miRNA 中靶基因预测数量最多的为 hsa-miR-93-5p, 最少的为 hsa-miR-877-5p(表 2)。

### 2.5 差异表达的 microRNA 的 GO 及 KEGG 分析结果

基于 Gene Ontology 数据库对差异表达 microRNA 进行 GO 显著性分析, 得到具有显著性、低误判率、靶向性的 GO 功能集以及对应的靶基因; 基于 KEGG 数据库对差异表达的 microRNA 进行 KEGG Pathway 显著性分析, 筛选 GO、KEGG 显著性的标准是  $P < 0.001$ , 而假阳性率  $< 0.05$ 。

Vogt-小柳原田综合征是一种自身免疫性疾病, 那么我们根据图 1~2 排除不相关的基因功能如神经发育、神经传导后发现, 差异表达的 miRNA 的显著功能分析结果主

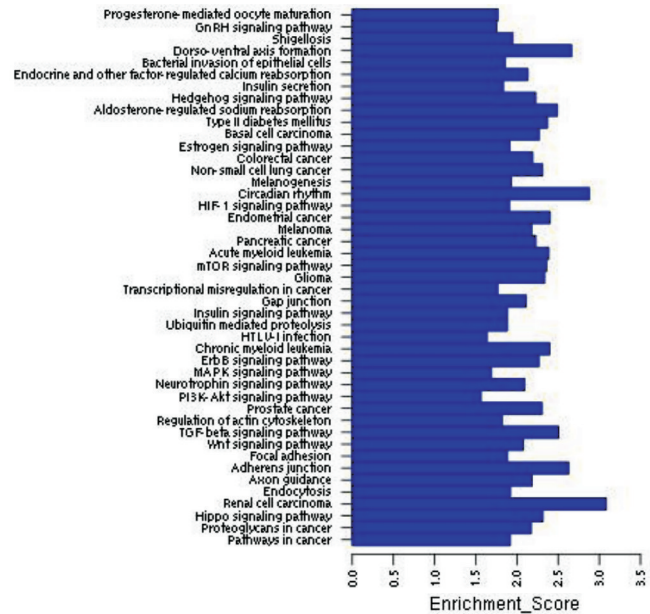


图3 上调 microRNA 调控的显著性信号通路分析。

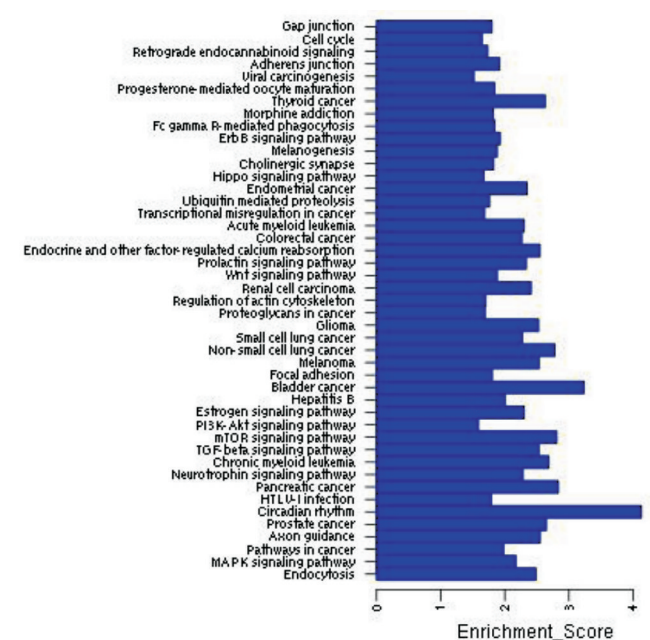


图4 下调 microRNA 调控的显著性信号通路分析。

要包括细胞分化、细胞周期、信号传导等。根据图 3 得出上调 miRNA 具有显著性的信号传导通路包括 TGF- $\beta$  通路、Wnt 信号通路、MAPK 信号通路、T 细胞信号通路、P53 信号通路等; 如图 4 得出下调 miRNA 具有显著性的信号传导通路主要包括 MAPK 信号通路、TGF- $\beta$  通路、mTOR 信号通路、Wnt 信号通路、TNF 信号通路等。通过图 5 差异表达 miRNA 与靶基因调控网络图, 可以得出处于核心位置的 miRNA 与靶基因, 其中 miR-106b、miR-130b 等处处于较为核心位置。

### 3 讨论

microRNA 是一类新发现的、约 22 个核苷酸长度的单链 RNA, 在动植物转录后水平参与基因表达调控, miRNA 通过与靶分子 mRNA 碱基配对降解 mRNA 或阻碍其翻译<sup>[4]</sup>。有研究表明 miRNA 在免疫细胞中广泛表达, 并影响免疫反应的各个阶段; miRNA 在免疫系统性疾病发病中起重要作用<sup>[5]</sup>。一系列研究表明, miRNA 在免疫系统

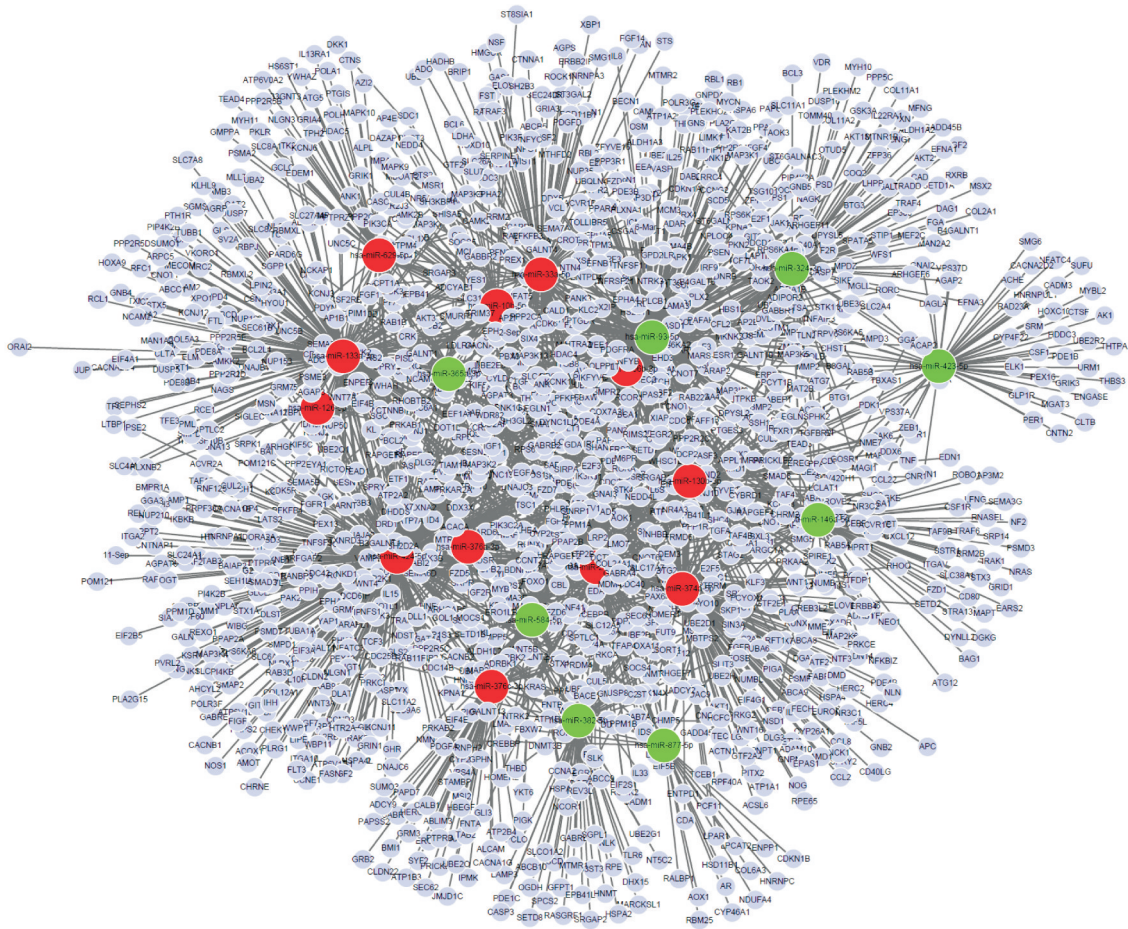


图5 上调和下调 microRNA 与靶基因的调控网络。

中发挥着重要的调节作用,能调控多种免疫过程,包括粒细胞发育、T 和 B 细胞的成熟与分化、抗原递呈过程、Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLR) 的信号级联、细胞因子的产生和 T 细胞受体信号等<sup>[6]</sup>。循环 miRNA 可丰富而稳定地存在于体液中,因此在疾病状态下,循环 miRNA 的表达谱有特征性的改变,因此循环中 miRNA 可作为一种无创性生物标志物,有助于疾病的预测、诊断和预后。研究表面特异表达的 miRNA 可能与自身免疫性葡萄膜炎的发病有关。Guo<sup>[7]</sup>应用微阵列芯片技术发现实验性自身免疫性葡萄膜炎小鼠与正常小鼠相比 PBMCs 有 36 个 miRNAs 上调,31 个 miRNAs 下调,且应用生物信息分析发现这些 miRNAs 可能通过 T 细胞受体信号通路、B 细胞信号通路、Toll 受体信号通路等免疫信号通路参与发病。Qi<sup>[8]</sup>发现活动期 Behcet 病患者 CD4<sup>+</sup>T 细胞中 miR-23b 显著低表达,进一步研究发现转染了 miR-23b 的 CD4<sup>+</sup>T 中 Notch 受体胞内区 (Notch intracellular domain, NICD) 被抑制以及炎症因子 IL-17、IFN- $\gamma$  呈显著低表达,则 Behcet 病患者低表达的 miR-23b 能够激活 Notch 信号途径并进而促进 Th17 细胞分化。

本研究应用 PCR 芯片技术检测 VKH 患者血浆中 miRNA 表达谱,与正常对照相比有 12 个 miRNAs 上调,有 8 个 miRNAs 下调。有研究发现<sup>[9]</sup>,miR-424-5p 参与肝细胞癌的转移与发展。Jingushi<sup>[10]</sup>研究发现 mi-629 通过 TGF- $\beta$  信号通路加速肾细胞癌的发展,而本实验中上调和下调表达的 miRNA 均部分通过 TGF- $\beta$  信号通路影响 VKH 的发病。有研究表明<sup>[11]</sup>,miR-106b 通过影响上皮细

胞自噬功能参与炎症性肠道疾病的发病。De Santis<sup>[12]</sup>发现 miR-106b 通过调控 TGF- $\beta$  信号通路参与多发性硬化的发病,而提示本研究中异常表达的 miR-106b 抑或通过某种途径调控 TGF- $\beta$  信号通路而影响 VKH 的发病。Wang<sup>[13]</sup>应用微阵列芯片等技术发现上调表达的 miR-130b-3p 与早期狼疮性肾炎的蛋白尿量与上皮间质转化有关,提示 miR-130b-3p 参与早期狼疮性肾炎患者的发病与发展,提示我们异常表达 miR-130b-3p 亦或通过某种途径参与 VKH 发病。miR-126 通过核转录 KappaB 信号通路参与炎症性肠道疾病的发病<sup>[11]</sup>,又有文章提示 miR-126 参与系统性红斑狼疮的发病<sup>[14]</sup>,这亦提示我们 miR-126 参与多种自身免疫性疾病的发病,也就证实本文中 VKH 患者血浆中异常表达的 miR-126 通过某种途径参与其发病。miR-93 通过抑制 Th17 细胞的分化参与多种自身免疫疾病的发生、发展,而 Th17 细胞已被证实参与小柳原田综合症的发病<sup>[15]</sup>。Watanabe<sup>[16]</sup>研究发现,自身免疫性葡萄膜视网膜炎小鼠模型的视网膜中阻止 miR-146a 表达水平升高,且与疾病的临床表现程度评分以及 IL-1/MCP-1 比例呈正相关,而本文 miR-146a 在 VKH 患者血浆中表达水平降低可能与 miRNA 的组织特异性以及发病机制不同有关;类风湿关节炎<sup>[17]</sup>、系统性红斑狼疮<sup>[18]</sup>患者 miR-146a 均有不同程度的表达水平降低,通过某种机制参与其发病。

Vogt-小柳原田综合征的具体发病机制尚不明确,miRNA 与 VKH 发病的关系亦不清楚,miRNA 已被证实参与多种疾病如癌症、自身免疫疾病的发病,本文应用

Exiqon 公司的 PCR 芯片筛选出 VKH 患者与健康人差异的 miRNA 表达谱,通过生物信息分析得出差异表达 miRNAs 可能通过 TGF- $\beta$  等通路参与发病。本研究为进一步研究 VKH 的发病提供了依据,但差异表达 miRNA 的调控机制尚不明确,仍需进一步研究。

#### 参考文献

- 1 Pan D, Hirose T. Vogt-Koyanagi-Harada syndrome: review of clinical features. *Semin Ophthalmol* 2011;26(4-5):312-315
- 2 杨培增. 关注我国葡萄膜炎的病因和类型的变化. *中华眼科杂志* 2008;44(10):865-866
- 3 Burkholder BM. Vogt - Koyanagi - Harada disease. *Curr Opin Ophthalmol* 2015;26(6):506-511
- 4 Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004;116(2):281-297
- 5 O'Connell RM. Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2010;10(2):111-122
- 6 Pauley KM, Cha S, Chan EK. MicroRNA in autoimmunity and autoimmune diseases. *J Autoimmun* 2009;32(3-4):189-194
- 7 Guo D. Characterization of microRNA expression profiling in peripheral blood lymphocytes in rats with experimental autoimmune uveitis. *Inflamm Res* 2015;64(9):683-696
- 8 Qi J. Increased Notch pathway activation in Behcet's disease. *Rheumatology(Oxford)* 2014;53(5):810-820
- 9 Zhang Y. MiR-424-5p reversed epithelial-mesenchymal transition of anchorage-independent HCC cells by directly targeting ICAT and suppressed HCC progression. *Sci Rep* 2014;4:6248

- 10 Jingushi K. miR-629 Targets TRIM33 to Promote TGFbeta/Smad Signaling and Metastatic Phenotypes in ccRCC. *Mol Cancer Res* 2015;13(3):565-574
- 11 Chen WX, Ren LH, Shi RH. Implication of miRNAs for inflammatory bowel disease treatment: Systematic review. *World J Gastrointest Pathophysiol* 2014;5(2):63-70
- 12 De Santis G. Altered miRNA expression in T regulatory cells in course of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2010;226(1-2):165-171
- 13 Wang W. Up-regulation of Serum MiR-130b-3p Level is Associated with Renal Damage in Early Lupus Nephritis. *Sci Rep* 2015;5:12644
- 14 Jeffries MA, Sawalha AH. Epigenetics in systemic lupus erythematosus; leading the way for specific therapeutic agents. *Int J Clin Rheumatol* 2011;6(4):423-439
- 15 Honardoost MA. Integrative computational mRNA-miRNA interaction analyses of the autoimmune-deregulated miRNAs and well-known Th17 differentiation regulators: An attempt to discover new potential miRNAs involved in Th17 differentiation. *Gene* 2015;572(2):153-162
- 16 Watanabe T. MicroRNAs in retina during development of experimental autoimmune uveoretinitis in rats. *Br J Ophthalmol* 2016;100(3):425-431
- 17 Zhou Q. Decreased expression of miR-146a and miR-155 contributes to an abnormal Treg phenotype in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2015;74(6):1265-1274
- 18 Wang G. Serum and urinary cell-free MiR-146a and MiR-155 in patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2010;37(12):2516-2522