

·论 著·

血清胞外囊泡 miR-331-5p 在早发性帕金森病患者中表达水平的研究

刘郁 张静静 吕荣祥 王文盛

[摘要] 目的 探讨早发性帕金森病(EOPD)及晚发性帕金森病(LOPD)患者血清胞外囊泡差异表达的 miRNAs 及潜在生物学功能。方法 收集帕金森病患者 18 例,分为 EOPD 组(发病年龄 ≤ 50 岁)7 例及 LOPD 组(发病年龄 > 50 岁)11 例,收集两组患者血清并提取胞外囊泡 RNA。选择 11 个在 EOPD 及 LOPD 患者外周血中差异表达的 miRNAs,通过 qRT-PCR 方法检验在两组患者血清胞外囊泡中的相对水平,TargetScan 数据库用于 miRNA 靶基因分析,String 数据库用于靶基因的基因本体(GO)分析和蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)分析,预测胞外囊泡中差异表达的 miRNAs 可能调控的关键靶基因及参与的生物学功能。结果 与 LOPD 组患者相比,miR-214、miR-30b、miR-141、miR-146b-5p 在 EOPD 患者血清胞外囊泡中表达水平下调(t 分别=-7.12、-6.84、-3.61、-3.52, P 均 < 0.05),miR-193a-3p 和 miR-331-5p 在 EOPD 患者胞外囊泡中表达水平上调(t 分别=23.14、25.22, P 均 < 0.05),其中以 miR-331-5p 上调最为明显。GO 分析发现 miR-331-5p 靶基因中有 181 个基因参与神经系统发育,在其构成的 PPI 网络中,节点数最高的前 20 个互作蛋白中 MAPK1 和 PTEN 又与神经元组成有关。结论 EOPD 患者血清胞外囊泡 miR-331-5p 表达水平上调,其可能通过靶向 PTEN 和 MAPK1 影响神经元功能,进而调节 EOPD 的发生发展。

[关键词] 胞外囊泡; miR-331-5p; 早发性帕金森病; 神经元

Serum extracellular vesicles-derived miR-331-5p in patients with early-onset Parkinson's disease LIU Yu, ZHANG Jingjing, LYU Rongxiang, et al. Department of Neurology, Ningbo Sixth Hospital, Ningbo 315000, China.

[Abstract] **Objective** To investigate the differentially expressed miRNAs in serum extracellular vesicles of patients with early-onset (EOPD) and late-onset (LOPD) Parkinson's disease and potential biological function. **Methods** Eighteen patients with PD were collected and divided into two groups according to the age of onset: EOPD group (age ≤ 50) with 7 cases and LOPD group (age > 50) with 11 cases. The patient's serum was collected and extracellular vesicles were extracted. Eleven miRNAs with significant differences in the expression levels of EOPD and LOPD peripheral blood were selected, the levels of differentially expressed miRNAs in serum extracellular vesicles were verified by qRT-PCR. For finding key target genes regulated by extracellular vesicles miRNA, the TargetScan database was used for the analysis of miRNA target genes, and the String database was used for gene ontology (GO) and protein-protein interaction (PPI) analyses of target genes. **Results** Compared with the LOPD group, the miR-214, miR-30b, miR-141, and miR-146b-5p in extracellular vesicles were down-regulated in patients with early-onset Parkinson's disease (t = -7.12, -6.84, -3.61, -3.52, P < 0.05), and miR-193a-3p and miR-331-5p in extracellular vesicles were up-regulated in patients with early-onset Parkinson's disease (t = 23.14, 25.22, P < 0.05), among which extracellular vesicles derived miR-331-5p was most significantly up-regulated. GO analysis showed that 181 target genes of miR-331-5p participated in the development of nervous system. Among of the top 20 interacting proteins, MAPK1 and PTEN were related to formation of neurons. **Conclusion** The expression level of extracellular vesicles derived miR-331-5p in serum of EOPD patients was up regulated, which may affect the function of neurons by targeting PTEN and MAPK1, and then regulate the occurrence and development of EOPD.

[Key words] extracellular vesicles; miR-331-5p; early-onset Parkinson disease; neuron

DOI:10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2021.006.006

作者单位:315000 浙江宁波,宁波市第六医院神经内科

早发性帕金森病(early-onset Parkinson's disease, EOPD)是一种与年龄有关的中枢神经系统退行性病变,可于50岁前出现首发症状^[1,2],且EOPD具有特殊的临床特征^[3],目前区分EOPD和晚发性帕金森病(late-onset Parkinson's disease, LOPD)的分子检测手段仍有限^[4]。本次研究对比分析EOPD和LOPD患者中血清胞外囊泡的差异表达miRNAs水平^[5],借助生物信息工具挖掘其靶基因及网络互作。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集2018年2月至2019年12月于宁波市第六医院神经内科就诊的帕金森病患者18例,其中男性10例、女性8例;年龄42~73岁,平均年龄(52.21±3.24)岁。所有患者均符合帕金森病诊断标准(2016版中国帕金森病诊断标准)^[6];排除标准为:①已知原因引起的继发性帕金森病,如药物、创伤或其他脑血管疾病;②有自身免疫性疾病或其他系统性疾病;③近期接受过药物治疗;④既往严重基础性疾病;⑤患有精神类疾病,不能够配合研究。根据患者起病年龄,将患者分为EOPD组(≤50岁)7例和LOPD组(>50岁)11例。EOPD组男性4例、女性3例;平均年龄(55.29±10.03)岁;LOPD组男性6例、女性5例,平均年龄(50.27±3.60)岁。两组患者的性别、年龄比较,差异均无统计学意义(P 均>0.05)。

1.2 方法

1.2.1 胞外囊泡RNA提取 用血清管收集受试者患者外周血5 ml,在离心机上以1 500 r/min离心5 min后收集血清。采用exoRNeasy Serum/Plasma Maxi Kit试剂盒(由德国QIAGEN公司生产)通过膜亲和离心柱血清胞外囊泡。将预先过滤的血清与Buffer XBP进行混合并结合在exoEasy膜亲和离心柱上。对结合的囊泡小体使用Buffer XWP进行清洗,并使用400 μl Buffer XE进行洗脱,收集洗脱液。参考生产商说明,采用该试剂盒对血清囊泡中总RNA进行提取,并保存在-20℃冰箱备用。

1.2.2 胞外囊泡miRNA水平 根据PubMed数据库检索已报道与EOPD相关的异常表达miRNAs,遴选出11个相关的miRNAs(miR-1、miR-22、miR-29a、miR-331-5p、miR-141、miR-146b-5p、miR-193a-3p、miR-214、miR-103a、miR-30b、miR-3134)^[7]。血清样本提取的胞外囊泡RNA经定量后,采用qRT-PCR方法分析miRNAs相对水平。根据miRNA第一链

cDNA合成加尾法逆转录RNA。将cDNA用作RT-PCR模板,使用Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix试剂(由美国Applied Biosystems生产),ABI 7500实时PCR检测系统(由美国Applied Biosystems生产)进行实时定量PCR。miRNA引物由Invitrogen公司(由美国Thermo Fisher Scientific生产)合成。所有反应独立重复3次,U6作为内对照,以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 进行相对定量分析,以确定囊泡miRNA的相对表达水平。将差异表达最显著的miRNA做为研究对象,研究其可能的生物学功能。

1.2.3 miRNA靶基因的本体分析(gene ontology, GO) 在TargetScan数据库(http://www.targetscan.org/vert_72/)输入筛选miRNA后下载靶基因数据,使用String数据库(<https://string-db.org/>)对Cumulative weighted context score<-0.2的靶基因进行GO分析,找到与神经系统发育相关的靶基因,并分析这些基因所参与的生物学过程、分子功能和细胞成分,以 $P<0.05$ 表示结果差异具有统计学意义。

1.2.4 蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI) 和关键靶基因筛选使用String数据库对神经系统发育相关的靶基因构建PPI网络图,使用R软件统计各基因间蛋白质相互作用节点数,并筛选节点数最多的前20个基因与神经元成分相关基因取交集以筛选关键靶基因。

1.3 统计学方法 采用SPSS 23.0及GraphPad Prism 5统计软件。正态分布的计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两组间比较采用独立样本 t 检验;计数资料以百分率表示,两组间比较采用 χ^2 检验。设 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 差异miRNAs在LOPD和EOPD患者血清胞外囊泡中的表达水平见图1

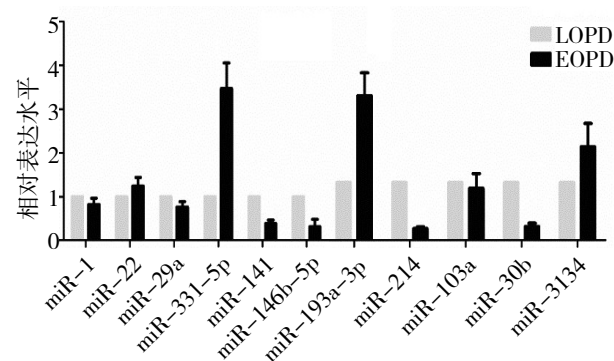


图1 差异miRNAs在LOPD和EOPD患者血清胞外囊泡中的表达水平

由图1可见, miR-214、miR-30b、miR-141、miR-146b-5p、miR-193a-3p、miR-331-5p在两组患者血清胞外囊泡中存在表达差异,与LOPD组患者相比,EOPD患者的miR-214、miR-30b、miR-141及miR-146b-5p表达下调(t 分别=-7.12、-6.84、-3.61、-3.52, P 均<0.05),而miR-193a-3p和miR-331-5p表达上调(t 分别=23.14、25.22, P 均<0.05),miR-331-5p在所有差异表达的miRNAs中变化水平最显著。

2.2 miR-331-5p靶基因GO分析 TargetScan数据库获得miR-331-5p靶基因数2 235, String数据库进行GO分析,见表1~3。

表1 神经系统相关基因的生物学过程分析

编号	描述	基因数	P
GO.0007399	神经系统发育	181	4.32E-191
GO.0048731	系统发育	159	6.46E-100
GO.0007275	多细胞组织发展	156	4.00E-86
GO.0048856	解剖结构发育	154	5.35E-83
GO.0032502	发育过程	152	2.66E-72
GO.0044767	单组织发育过程	151	1.42E-71
GO.0022008	神经形成	102	3.45E-71
GO.0048699	神经元产生	99	1.53E-69
GO.0007417	中枢神经系统发育	74	3.33E-53
GO.0044707	单-多细胞生物过程	143	1.02E-52

由表1可见,靶基因主要参与神经系统发育、神经形成、神经元产生以及中枢神经系统发育等生物学过程,其中181个靶基因与神经系统发育有关。

表2 神经系统相关基因的分子功能分析

编号	描述	基因数	P
GO.0005488	结合	133	4.64E-10
GO.0005515	蛋白质结合	76	2.06E-07
GO.0003674	分子功能	139	7.28E-06
GO.0043565	特异性DNA序列结合	24	0.000205
GO.0044212	DNA转录调控结合区	20	0.000323
GO.0043167	离子结合	80	0.000706
GO.0019899	酶结合	29	0.000706
GO.0005102	受体结合	26	0.000706
GO.0005057	信号受体蛋白活性	9	0.000706
GO.0097367	碳水化合物衍生物结合	39	0.002

由表2可见,其靶基因主要功能是参与蛋白质结合及DNA连接。

表3 神经系统相关基因的细胞成分分析

编号	描述	基因数	P
GO.0043005	传递神经元	42	2.25E-14
GO.0097458	神经元成分	38	3.09E-14
GO.0042995	细胞突起	49	6.38E-13
GO.0036477	神经元胞质和突起	28	9.64E-11
GO.0030424	轴突	18	5.15E-07
GO.0043025	神经元胞体	19	5.15E-07
GO.0044297	细胞体	20	5.15E-07
GO.0030425	树突	19	9.19E-07
GO.0045202	突触	22	3.25E-06
GO.0044459	质膜成分	45	3.69E-06

由表3可见,靶基因主要参与神经元、轴突、树突和突触的组成。

2.3 PPI网络图、节点数统计及基因交集 应用String数据库对181个与神经系统发育靶基因进行PPI分析,并对整个PPI网络中节点数最多的前20个基因进行统计,见图2~3。

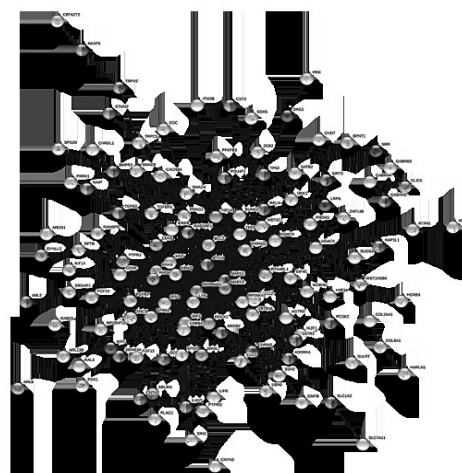


图2 PPI网络图

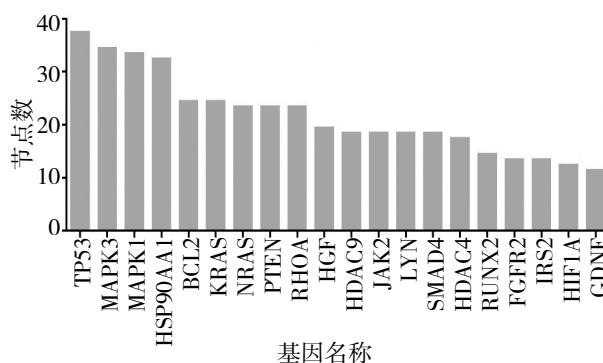


图3 miR-331-5p靶基因构建的PPI网络中节点数最多的前20个基因

由图3可见,在整个PPI网络中节点数最多的前20个基因分别是TP53、MAPK3、MAPK1、HSP90AA1、BCL2、KRAS、NRAS、PTEN、RHOA、HGF、HDAC9、JAK2、LYN、SMAD4、HDAC4、RUNX2、FGFR2、IRS2、HIF1A以及GDNF,进一步对上述基因和GO分析结果中作为神经元细胞成分的38个关键基因取交集,结果发现PTEN和MAPK1既是miR-331-5p的关键靶基因,又参与调控神经元细胞组成。

3 讨论

帕金森病是一种与年龄相关的神经系统退行性疾病,根据发病年龄可将其分为EOPD和LOPD,两组患者具有不同的生物学背景。Pandey等^[8]用PCR-Sanger测序法发现基因PRKN在80%EOPD患者中为杂合变异,而在尼日利亚Milanowski等^[9]发现PRKN、PINK1、DJ1、SNCA、LRRK2在EOPD患者中异常,张长国等^[10]发现清除幽门螺杆菌能改善帕金森病患者运动功能,以上这些证据表明:种族、家族史、遗传学改变及环境因素是EOPD发生的危险因素,但其发病原因及机制尚未完全明确,需进一步探索。

目前发现EOPD与LOPD患者的脑组织^[11]、脑脊液^[12]及外周血^[13]中miRNAs表达存在差异,然而对胞外囊泡miRNA的差异表达研究十分有限。血清胞外囊泡中miRNAs稳定性好、不易降解,有较好临床应用前景^[14,15],已成为多种疾病诊断及预后研究热点^[16]。本研究发现外周血游离11个经文献报道差异表达miRNAs中,仅有6个miRNAs(miR-193a-3p、miR-214、miR-30b、miR-331-5p、miR-141、miR-146-5p)在血清胞外囊泡中存在同样差异,且除miR193a-3p外,其余5个miRNA变化趋势一致,运用生物信息学重点挖掘181个与神经系统发育有关的miR-331-5p靶基因,GO分析发现这些靶基因参与神经调节的多个方面,如调节中枢神经系统发育,调控神经元、轴突、树突及突触生成,此外靶基因还参与蛋白质及DNA间连接。本研究结合PPI网络图结果,进一步发现PTEN和MAPK1既是神经系统发育互作最显著基因,又参与调节神经元组成。PTEN是胰岛素信号级联反应负调节因子,其在帕金森病患者脑组织中表达水平显著升高,降低PTEN核蓄积可改善帕金森病患者的神经退行性变^[17],MAPK激活可阻止神经元死亡^[18]。事实上,PTEN能抑制接头蛋白磷酸化及对MAPK通路上游的RAS活化。由于帕金森病发生

发展与大脑神经元损伤密切相关^[19],而胞外囊泡又易穿透血脑屏障将分子特异递送至中枢神经系统^[20],因此推测胞外囊泡miR-331-5p很可能通过靶向MAPK1与PTEN参与EOPD进展调节。

综上所述,EOPD患者血清胞外囊泡中miR-331-5p相对水平明显高于LOPD患者,初步揭示了MAPK1和PTEN为其关键靶基因,胞外囊泡miR-331-5p可能通过上述基因参与EOPD发生与发展,但存在一定的局限性,仍需要大样本的体内和体外验证及采用全外显子测序技术进行深度的分子机制研究。

参考文献

- 1 Videnovic A. Disturbances of sleep and alertness in Parkinson's disease[J]. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2018, 18(6):29.
- 2 Ascherio A, Schwarzschild MA. The epidemiology of Parkinson's disease: risk factors and prevention[J]. *Lancet Neurol*, 2016, 15(12):1257-1272.
- 3 Ferguson LW, Rajput AH, Rajput A. Early-onset vs. late-onset Parkinson's disease: A clinical-pathological study[J]. *Can J Neurol Sci*, 2016, 43(1):113-119.
- 4 Arshad AR, Sulaiman SA, Saperi AA, et al. MicroRNAs and target genes as biomarkers for the diagnosis of early onset of Parkinson disease[J]. *Front Mol Neurosci*, 2017, 10:352.
- 5 Yang TT, Liu CG, Gao SC, et al. The serum exosome derived microRNA-135a, -193b, and -384 were potential Alzheimer's disease biomarkers[J]. *Biomed Environ Sci*, 2018, 31(2):87-96.
- 6 中华医学会神经病学分会帕金森病及运动障碍学组, 中国医师协会神经内科医师分会帕金森病及运动障碍专业委员会. 中国帕金森病的诊断标准(2016版)[S]. *中华神经科杂志*, 2016, 49(4):268-271.
- 7 Khodadadian A, Hemmati-Dinarvand M, Kalantary-Charvadeh A, et al. Candidate biomarkers for Parkinson's disease[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 104(8):699-704.
- 8 Pandey S, Tomar LR, Kumar S, et al. Expanding the canvas of PRKN mutations in familial and early-onset Parkinson disease[J]. *Parkinsonism Relat Disord*, 2019, 66(9):216-219.
- 9 Milanowski LM, Oshinaike O, Broadway BJ, et al. Early-onset Parkinson disease screening in patients from Nigeria[J]. *Front Neurol*, 2021, 11(1):594927.
- 10 张长国, 冯耀耀, 李兰兰. 清除幽门螺杆菌对帕金森病运动功能影响[J]. *全科医学临床与教育*, 2020, 18(8):702-704.

- 11 Wake C, Labadorf A, Dumitriu A, et al. Novel microRNA discovery using small RNA sequencing in post-mortem human brain[J]. *BMC Genomics*, 2016, 17(1): 776.
- 12 Schirinzi T, Di Lazzaro G, Sancesario GM, et al. Young-onset and late-onset Parkinson's disease exhibit a different profile of fluid biomarkers and clinical features[J]. *Neurobiol Aging*, 2020, 90(1): 119–124.
- 13 Yilmaz SG, Geyik S, Neyal AM, et al. Hypothesis: Do miRNAs targeting the leucine-rich repeat kinase 2 gene (LRRK2) influence Parkinson's disease susceptibility? [J]. *OMICS*, 2016, 20(4): 224–228.
- 14 Giudice V, Banaszak LG, Gutierrez-Rodriguez F, et al. Diagnostic and prognostic roles of circulating exosomal microRNAs in acquired aplastic anemia and myelodysplastic syndromes[J]. *Haematologica*, 2018, 103(7): 1150–1159.
- 15 Barcelo M, Mata A, Bassas L, et al. Exosomal microRNAs in seminal plasma are markers of the origin of azoospermia and can predict the presence of sperm in testicular tissue[J]. *Hum Reprod*, 2018, 33(6): 1087–1098.
- 16 Xu Q, Zhu Q, Zhou Z, et al. MicroRNA-876-5p inhibits epithelial-mesenchymal transition and metastasis of hepatocellular carcinoma by targeting BCL6 corepressor like 1[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 103: 645–652.
- 17 Sekar S, Taghibiglou C. Elevated nuclear phosphatase and tensin homolog (PTEN) and altered insulin signaling in substantia nigral region of patients with Parkinson's disease[J]. *Neurosci Lett*, 2018, 666: 139–143.
- 18 Torra A, Parent A, Cuadros T, et al. Overexpression of TFEB drives a pleiotropic neurotrophic effect and prevents parkinson's disease-related neurodegeneration[J]. *Mol Ther*, 2018, 26(6): 1552–1567.
- 19 Lang AE, Espay AJ. Disease modification in Parkinson's disease: Current approaches, challenges, and future considerations[J]. *Mov Disord*, 2018, 33(5): 660–677.
- 20 Osier N, Motamedi V, Edwards K, et al. Exosomes in acquired neurological disorders: New insights into pathophysiology and treatment[J]. *Mol Neurobiol*, 2018, 55(12): 9280–9293.

(收稿日期 2020-12-08)

(本文编辑 蔡华波)

(上接第492页)

- 13 Slaby O, Laga R, Sedlacek O. Therapeutic targeting of non-coding RNAs in cancer[J]. *Biochem J*, 2017, 474(24): 4219–4251.
- 14 Xu J, Cao J, Wang Y, et al. Novel preoperative nutritional assessment tool and prognostic model for ESCC patients [J]. *J Cancer*, 2019, 10(17): 3883–3892.
- 15 Wang WW, Wei CG, Li P, et al. Integrative analysis of mRNA and lncRNA profiles identified pathogenetic lncRNAs in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Gene*, 2018, 661: 169–175.
- 16 Zhao ZH, Wang WW, Niu LH, et al. P53-induced long non-coding RNA PGM5-AS1 inhibits the progression of esophageal squamous cell carcinoma through regulating miR-466 /PTEN axis[J]. *UBMB Life*, 2019, 71(10): 1492–1502.
- 17 Uzozie AC, Selevsek N, Wahlander A, et al. Targeted proteomics for multiplexed verification of markers of colorectal tumorigenesis[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2017, 16(3): 407–427.
- 18 Ji P, Diederichs S, Wang W, et al. MALAT-1, a novel noncoding RNA, and thymosin β 4 predict metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer [J]. *Oncogene*, 2003, 22(39): 8031–8041.
- 19 夏前林, 单孟林, 丁滔, 等. 前列腺癌差异表达基因的筛选及相互作用的生物信息学分析[J]. *中国癌症杂志*, 2017, 27(3): 169–176.
- 20 Zhang X, Zhuang J, Liu L, et al. Integrative transcriptome data mining for identification of core lncRNAs in breast cancer [J /OL]. *Peer J*, 2019[2019-11-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC31608179>.

(收稿日期 2020-11-30)

(本文编辑 蔡华波)