

• 论 著 •

血浆 miR-130a-3p 在高原低氧环境中表达的研究*

闫 岩,袁云龙[△]

南京医科大学附属苏州医院/苏州市立医院医学检验科,江苏苏州 215000

摘要:目的 探讨人血浆中 miR-130a-3p 在高原低氧环境中的表达情况。方法 分别采集 150 例长期居住在平原地区的健康汉族人(平原汉组)和 80 例从平原地区移居到高原地区的健康汉族人(高原汉组)血浆样本,采用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)法检测两组人群血浆 miR-130a-3p 表达水平,分析 miR-130a-3p 表达水平与血液学指标的相关性,采用生物信息学分析软件预测其存在的靶基因。结果 高原汉组血浆 miR-130a-3p 表达水平高于平原汉组,差异有统计学意义($Z = -5.318, P < 0.05$)。血浆 miR-130a-3p 表达水平与红细胞计数($r = 0.58, P < 0.001$)、血红蛋白($r = 0.59, P < 0.001$)、血细胞比容($r = 0.69, P < 0.001$)均呈正相关,而与血小板计数($r = -0.21, P = 0.0014$)呈负相关。生物信息学分析发现 miR-130a-3p 存在一些与缺氧、红细胞生成、巨核细胞增殖与分化相关的靶基因。结论 高原低氧环境能够影响血浆中 miR-130a-3p 的表达,miR-130a-3p 可作为机体应对缺氧环境的一个循环因子。

关键词:miR-130a-3p; 血浆; 低氧

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2021.18.016

中图法分类号:R594.3

文章编号:1673-4130(2021)18-2245-04

文献标志码:A

Expression level of plasma miR-130a-3p in high altitude hypoxia environment*

YAN Yan, YUAN Yunlong[△]

Department of Clinical Laboratory, the Suzhou Hospital Affiliated to Nanjing Medical University/Suzhou Municipal Hospital, Suzhou, Jiangsu 215000, China

Abstract: Objective To investigate the expression level of miR-130a-3p in human plasma in high altitude hypoxia environment. **Methods** Plasma samples were collected from 150 healthy Han people who lived in plain area for a long time (plain Han group) and 80 healthy Han people who migrated from plain area (plateau Han group), respectively. The expression level of miR-130a-3p in plasma was detected by qRT-PCR. The correlation between the expression level of miR-130a-3p and hematological indexes was analyzed. The target genes of miR-130a-3p were predicted by bioinformatics analysis software. **Results** The expression level of miR-130a-3p in plasma of plateau Han group was higher than that of plain Han group, the difference was statistically significant ($Z = -5.318, P < 0.05$). The expression level of miR-130a-3p was positively correlated with RBC count ($r = 0.58, P < 0.001$), hemoglobin content ($r = 0.59, P < 0.001$) and hematocrit ($r = 0.69, P < 0.001$), and negatively correlated with platelet count ($r = -0.21, P = 0.0014$). Bioinformatics analysis showed that miR-130a-3p had some target genes related to hypoxia, erythropoiesis, megakaryocyte proliferation and differentiation. **Conclusion** High altitude hypoxia environment can affect the expression of miR-130a-3p in plasma, and miR-130a-3p can be used as a circulating factor in response to hypoxia environment.

Key words: miR-130a-3p; plasma; hypoxia

微小核糖核酸(miRNA)是一类长度约 22 个核苷酸的小的非编码 RNA,它们能够通过转录后水平降低或阻断信使 RNA 的翻译来调节基因的表达,从而参与多种生理、病理过程^[1]。miRNA 稳定存在于多种体液中,并且可作为许多疾病的潜在生物标志

物^[2-3]。缺氧或低氧张力,是一种独特的环境压力,能够引起转录因子和信号蛋白的广泛变化以协调细胞在代谢、增殖、DNA 修复和凋亡中的适应。机体调控细胞适应缺氧的过程是复杂且不完全相同的。一些证据表明,miRNA 通过转录后机制调节基因的表达

* 基金项目:江苏省苏州市产业技术创新专项(SYSD2018125)。

作者简介:闫岩,女,主管技师,主要从事临床检验诊断学研究。△ 通信作者,E-mail:yunlong0722@126.com。

本文引用格式:闫岩,袁云龙. 血浆 miR-130a-3p 在高原低氧环境中表达的研究[J]. 国际检验医学杂志,2021,42(18):2245-2248.

在应对缺氧反应中起关键作用,此外缺氧在对 miRNA 的生成、活性等方面也有重要的调节作用^[4-5]。多项研究表明在缺氧条件下或与缺氧相关的疾病中 miR-130a-3p 在细胞或组织内的表达水平发生变化^[6-7]。但是高原低氧环境能否影响循环 miR-130a-3p 表达的报道较为少见。本研究采用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)法,对移居到我国高原地区的健康汉族人和长期居住在平原地区的健康汉族人群血浆中 miR-130a-3p 水平进行比较分析。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集包括从江苏省、安徽省、上海市移居到海拔 3 560 m 的高原地区 1~2 年(平均 17 个月)的健康汉族人(高原汉组)的血浆,高原汉组中男性 55 例,女性 25 例,平均年龄为(36.13±11.70)岁;同时收集与移居到高原地区个体年龄、性别相匹配的 150 例长期居住在海拔高度 8.9 m 的平原地区健康汉族个体(平原汉组)的血浆作为对照。平原汉组中男性 88 例,女性 62 例,平均年龄为(34.87±9.40)岁,所有入选对象均经病史询问,排除血液系统疾病、全身免疫性疾病、急慢性感染性疾病、高血压、心脏病、肿瘤等干扰性疾病。

1.2 仪器与试剂 2720 型 PCR 仪(美国 Applied Biosystem 公司),7300 型实时荧光定量 PCR 仪(美国 Applied Biosystem 公司),5418 型高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司),XE-2100 全自动血液分析仪(日本 Sysmex 公司);Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司),异丙醇、氯仿、无水乙醇(国药集团试剂公司),人工合成 pcu-MIR2911、miR-130a-3p 的引物和探针(美国 Applied Biosystem 公司);逆转录反应体系及 qRT-PCR 反应体系所用试剂(日本 TaKaRa 公司)。

1.3 方法

1.3.1 标本采集 所有受试者均空腹 8~10 h,清晨采集 2 mL 静脉血于乙二胺四乙酸二钾抗凝真空采血管中,15 min 内上机进行血常规检测。剩余血液迅速用室温离心机 1 500×g 离心 10 min。收集分离出的血浆于 Eppendorf(EP)管中,置于-80℃保存。

1.3.2 血浆 RNA 提取 采用苯酚氯仿抽提法进行,将上述收集的血浆样本室温融化混匀后,各取 100 μL 血浆样本于新的除酶的 EP 管中,再加 300 μL DEPC 水稀释混匀血浆标本;每管中各加入 200 μL 水饱和酚,充分涡旋混匀,然后每管加入 20 μL 人工合成的外源性植物 miRNA MIR2911(MIR2911 序列:5'-GGC CGG GGG ACG GGC UGG GA-3')以控制样本提取纯化过程中的差异,涡旋混匀,室温静置 5 min;每管中各加入 200 μL 氯仿,充分涡旋混匀,室温静置 5 min;室温,16 000×g,离心 20 min;取离心后的上清液于新的除酶 EP 管中;每管加入 1/10 倍上清

液体积的乙酸钠(浓度=3 mol/L,pH=5.3)和 2 倍上清液体积的异丙醇。涡旋颠倒混匀数次,置于-20℃沉淀 60 min;沉淀结束后,4℃,16 000×g,离心 20 min;离心后去除上清液,保留沉淀,每管加 1 mL 75% DEPC 水乙醇洗涤沉淀;4℃,16 000×g,离心 20 min。离心后弃去上清液,保留沉淀,将 EP 管倒置,室温干燥沉淀;沉淀晾干后,每管加入 20 μL DEPC 水溶解沉淀,将溶解好的 RNA 置于-80℃冰箱备用。

1.3.3 qRT-PCR 检测 采用基于 TaqMan 探针的 qRT-PCR 方法检测所有受试者血浆标本中 miR-130a-3p 表达水平。逆转录反应体系(10 μL 体系):DEPC 水 3.5 μL,5×反转录缓冲液 2.0 μL,10 mmol/L dNTP 1.0 μL,AMV 反转录酶 0.5 μL,miR-130a-3p 反转录引物 1.0 μL,RNA 标本 2.0 μL。反应条件:16℃ 30 min,42℃ 30 min,85℃ 5 min,4℃ 保存,1 个循环;qRT-PCR 总反应体系(20 μL 体系),ddH₂O 14.77 μL,10×PCR buffer 2 μL,10 mmol/L dNTP 0.4 μL,25 mmol/L MgCl₂ 1.2 μL,Taq 酶 0.3 μL,探针及上、下游引物 0.33 μL,cDNA 1 μL。以 DEPC 水作为阴性对照,每个样本均设 3 个复孔,阴性对照的 cDNA 与待测样本的 cDNA 同时进行扩增,95℃ 5 min;95℃ 15 s,60℃ 1 min,共 40 个循环。血浆中 miRNA 表达水平采用相对定量的方法进行计算。用样本中待测 miRNA 的 C_q 值减去相应样本中参考基因 C_q 值得到 ΔC_q 值,即 ΔC_q=C_q(miR-130a-3p)-C_q(MIR2911)。待测 miRNA 相对于参考基因的表达水平用 2^{-ΔC_q} 表示。

1.4 统计学处理 采用 SPSS26.0 统计软件对数据进行分析。正态分布数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,非正态分布数据以 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示。数据分析前各组数据均以 Kolmogorov-Smirnov 法检验其分布特征,偏态分布数据先对其进行对数转换再行分析。正态分布数据多组间比较采用单因素方差分析,偏态分布数据各组间比较采用 Mann-Whitney *U* 检验。各组之间的性别分布比较采用 χ^2 检验。Target Scan、miRanda、PicTar3 种软件联合起来用于靶基因的预测,取 3 种软件预测到的靶基因的交集作为 miRNA 潜在的靶基因,以降低靶基因预测的假阳性率。miRNA 表达水平与其他指标的相关性分析采用 Spearman 相关性分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组临床基本信息 两组人群的年龄、性别比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。与平原汉组比较,高原汉组血液中红细胞计数(RBC)、血红蛋白(Hb)、血细胞比容(Hct)、平均血红蛋白含量(MCH)均显著升高,而血小板计数(PLT)则显著降低,差异有统计

学意义 ($P < 0.05$); 两组血液中平均血红蛋白浓度 (MCHC) 比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 两组临床基本信息

变量	平原汉组 ($n=150$)	高原汉组 ($n=80$)	P
年龄($\bar{x} \pm s$, 岁)	34.87 ± 9.40	36.13 ± 11.70	0.415
性别(n)			0.119
男	88	55	
女	62	25	
血液学参数			
RBC($\bar{x} \pm s$, $\times 10^{12}/L$)	4.83 ± 0.49	5.55 ± 0.66	<0.001
Hb($\bar{x} \pm s$, g/L)	143.51 ± 15.40	175.95 ± 19.00	<0.001
Hct($\bar{x} \pm s$, %)	39.92 ± 6.96	53.10 ± 6.31	<0.001
MCH($\bar{x} \pm s$, pg)	29.75 ± 1.84	32.07 ± 3.41	<0.001
MCHC($\bar{x} \pm s$, g/L)	329.96 ± 11.50	331.62 ± 10.80	0.320
PLT($\bar{x} \pm s$, $\times 10^9/L$)	224.32 ± 46.69	170.49 ± 45.24	<0.001

2.2 两组血浆外源性 MIR2911 表达水平比较 采用 qRT-PCR 技术分别检测 150 例平原汉组及 80 例高原汉组血浆中的 MIR2911 表达水平, 用 Cq 值表示。两组血浆中外源性 MIR2911 表达水平比较, 差异无统计学意义 ($P = 0.0871$), 见图 1。

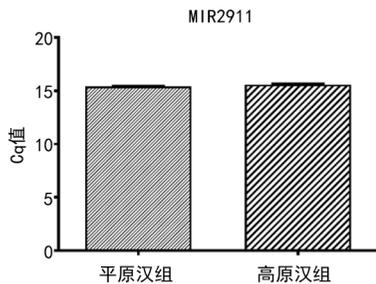


图 1 两组血浆外源性 MIR2911 表达水平比较

2.3 血浆 miR-130a-3p 的 qRT-PCR 检测结果 高原汉组血浆 miR-130a-3p 表达水平为 $[323.12(209.46, 618.54)] \times 10^{-5}$ 高于平原汉组血浆 miR-130a-3p 表达水平 $[210.51(158.18, 274.98)] \times 10^{-5}$, 差异有统计学意义 ($Z = -5.318, P < 0.05$)。

2.4 miR-130a-3p 与血液学指标的相关性 为了验证 miR-130a-3p 与机体适应高原低氧环境相关, 进一步利用 Spearman 秩相关分析了 miR-130a-3p 与 RBC、Hb、Hct、PLT 之间的相关性。miR-130a-3p 与 RBC ($r = 0.58, P < 0.001$)、Hb ($r = 0.59, P < 0.001$)、Hct ($r = 0.69, P < 0.001$) 均呈正相关, 而与 PLT ($r = -0.21, P = 0.0014$) 呈负相关。

2.5 miR-130a-3p 的靶基因预测 为了探讨 miR-130a-3p 在应对高原低氧环境中的作用及潜在的分子学机制, 利用 TargetScan, miRanda 和 PicTar 靶基因

预测软件预测了其潜在的靶基因, 发现 miR-130a-3p 存在一些与缺氧相关 (DDX6、EGLN3、FOSL1、EDN1、CHRN2、PRKA1、I7PR1、PXDN、TGFB1、TGFB2、UCP3 等)、红细胞生成相关 (SMAD5、SP1 等)、巨核细胞系统增殖与分化 (MAFB、HOXD1、CX-DCL2、CBFA、MYB、PDGFRA、MAFG、HOXA3) 等相关的靶基因。

3 讨论

miRNA 可作为多种疾病的潜在生物标志物, 但是环境等非病理因素对 miRNA 表达的影响研究很少。为了将 miRNA 更好地应用到疾病的诊断、预测中去, 必须了解非病理因素对 miRNA 表达的影响。缺氧发生在许多病理生理过程中, 例如组织的快速生长、急慢性缺血及处于高海拔地区等。当平原地区的居民移居到高原环境中时将面对缺氧的威胁, 而身体在高原发生缺氧的生理变化很复杂, 涉及一系列的生理机制^[8-9]。有研究发现, 在缺氧情况下机体、细胞中的一些 miRNA 的表达水平会发生变化, 除此之外在与缺氧相关的疾病中一些 miRNA 的表达水平也会发生变化^[5-7]。然而这些研究主要集中在组织或细胞层面的 miRNA 的表达水平上。考虑到 miRNA 是应对缺氧的关键因素, 推测高原低氧环境可能对循环 miRNA 的表达也存在影响。

红细胞的生理功能是将氧气从肺部毛细血管运输到组织毛细血管进行气体交换, 红细胞生成过程受到包括氧含量在内的多种因素的影响。当平原地区居民移居到高海拔地区时不能很好地适应高原低氧的环境, 为了获得充分的气体交换, 机体内 RBC、Hb、Hct 等会升高^[10]。本研究发现, 与一直居住在平原地区的人群相比, 从平原地区移居到高原地区的人群的 RBC、Hb、Hct 都显著升高, 与其他研究报道结果一致^[9-10]。进一步分析了 miR-130a-3p 与这些血液学指标的关系, 发现 miR-130a-3p 与 RBC、Hb、Hct 呈正相关。这些结果提示 miR-130a-3p 可能通过调节红细胞的生成、分化等参与机体对低氧环境的适应过程。

另外, 通过分析生物信息学技术预测了 miR-130a-3p 的靶基因, 发现 miR-130a-3p 的部分靶基因与氧代谢及氧敏感度有关。如预测到 miR-130a-3p 的靶基因 DDX6, miR-130a-3p 能够通过靶向调节 DDX6 进而增强缺氧诱导因子 1 α (HIF-1 α) 的作用来调节细胞对缺氧的反应^[11]。此外, miR-130a-3p 还存在一些与红细胞生成、巨核细胞分化相关的靶基因。例如, SMAD5^[12] 和 SP1^[13] 是与红细胞生成有关的靶基因, MAFB^[14] 和 MYB^[15] 是在巨核细胞分化过程中起重要作用的转录因子。以上结果进一步说明 miR-130a-3p 可能通过参与红细胞的生成和巨核细胞的分

化来调节机体对高原低氧环境的适应过程。但是,在本研究中并未涉及 miR-130a-3p 在机体应对低氧环境中的具体分子机制,在之后的试验中有待更深入的研究。

综上所述,高原低氧环境能够影响血浆 miR-130a-3p 表达水平,miR-130a-3p 可作为应对缺氧环境的一个循环因子。本研究进一步分析了 miR-130a-3p 与血细胞指标的相关性并预测了 miR-130a-3p 的一些潜在的靶基因。以上研究结果为研究人类适应高原环境的分子机制提供了新视角,miR-130a-3p 可能参与这一适应过程。

参考文献

- [1] SALIMINEJAD K, KHORSHID H R K, FARD S S, et al. An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(5):5451-5465.
- [2] SARAH B, HUGH S T. MicroRNAs in endometriosis: biological function and emerging biomarker candidates [J]. *Biol Reprod*, 2019, 100(5):1135-1146.
- [3] 朱莹,王亚南. 血清 microRNA-224-3p 在结直肠癌中的表达及临床研究[J]. *国际检验医学杂志*, 2019, 40(13):1548-1551.
- [4] HE C, WANG L B, ZHANG J T, et al. Hypoxia-inducible microRNA-224 promotes the cell growth, migration and invasion by directly targeting RASSF8 in gastric cancer [J]. *Molecular Cancer*, 2017, 16(1):35.
- [5] KANCHANA V B, MICHEAL Z M, JONATHAN M G. MicroRNA biogenesis in hypoxia [J]. *Microna*, 2017, 6(2):80-96.
- [6] PHILIPPE C, EKATERINA L, JONAS G, et al. Hypoxia drives cardiac miRNAs and inflammation in the right and left ventricle[J]. *J Mol Med (Berl)*, 2019, 97(10):1427-1438.
- [7] SHI J, WANG H, FENG W, et al. MicroRNA-130a targeting

hypoxia-inducible factor 1 alpha suppresses cell metastasis and Warburg effect of NSCLC cells under hypoxia[J]. *Life Sci*, 2020, 255(1):117826.

- [8] MURRAY A J, MONTGOMERY H E, FEELISCH M, et al. Metabolic adjustment to high-altitude hypoxia: from genetic signals to physiological implications[J]. *Biochem Soc Trans*, 2018, 46(3):599-607.
- [9] XIN J X, ZHANG H, HE Y X, et al. Chromatin accessibility landscape and regulatory network of high-altitude hypoxia adaptation[J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1):4928.
- [10] 赵锋仓,景蕴华,王萍,等. 移居高原汉族、高原返回平原汉族、平原汉族红细胞系统指标比较分析[J]. *吉林医学*, 2014, 35(25):5697-5699.
- [11] JASENKA G F, EDOARDO P, JUDITH L, et al. miR-130a activates the VEGFR2/STAT3/HIF1 α axis to potentiate the vasoregenerative capacity of endothelial colony-forming cells in hypoxia[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2021, 23(1):968-981.
- [12] WANG C Y, CORE A B, CANALI S, et al. Smad1/5 is required for erythropoietin-mediated suppression of hepcidin in mice[J]. *Blood*, 2017, 130(1):73-83.
- [13] ALESSIA F, NICOLETTA B, ENRICA F, et al. Erythroid induction of K562 cells treated with mithramycin is associated with inhibition of raptor gene transcription and mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) functions[J]. *Pharmacol Res*, 2015, 91(1):57-68.
- [14] SHIRIN H, MICHAEL M, PEGGIE C, et al. Terminal Maturation of orthochromatic erythroblasts is impaired in burn patients[J]. *J Burn Care Res*, 2018, 39(2):286-294.
- [15] BIANCHI E, BULGARELLI J, RUBERTI S, et al. MYB controls erythroid versus megakaryocyte lineage fate decision through the miR-486-3p-mediated downregulation of MAF[J]. *Cell Death Differ*, 2015, 22(12):1906-1921.

(收稿日期:2021-02-08 修回日期:2021-08-20)

(上接第 2244 页)

- [20] 安娟,潘元明,康倩,等. 胃癌患者血清 mi R-181d 与 PD-CD4 的表达及意义[J]. *肿瘤防治研究*, 2019, 46(2):131-137.
- [21] 姚育红,廖爱军,陈娟,等. miR-181a、miR-181b 在人胃癌细胞和组织中的表达[J]. *世界华人消化杂志*, 2015, 23(1):30-36.
- [22] JIANG F, SHEN X B. miRNA and mRNA expression profiles in gastric cancer patients and the relationship with circRNA[J]. *Neoplasma*, 2019, 66(6):879-886.
- [23] BELAIR C, DARFEUILLE F, STAEDEL C. Helicobacter pylori and gastric cancer: possible role of microRNAs in

this intimate relationship[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2009, 15(9):806-812.

- [24] VOLINIA S, CALIN G A, LIU C G, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(7):2257-2261.
- [25] SAITO M, OKAYAMA H, SAITO K, et al. CDX2 is involved in microRNA-associated inflammatory carcinogenesis in gastric cancer[J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(5):6184-6190.

(收稿日期:2020-11-13 修回日期:2021-07-09)