

环状 RNA 在孕妇 18-三体综合症的鉴定与分析

邹耀霜^{1,2} 晏强² 眭维国² 欧明林² 陈洁晶² 汤冬娥³ 赵鑫³ 廖秋燕³ 戴勇^{3*}

(1. 广西师范大学生命科学学院, 广西 桂林 541004;

2. 解放军第一八一医院 肾脏科、全军器官移植与透析治疗中心、

广西代谢性疾病研究重点实验室, 广西 桂林 541002;

3. 暨南大学第二临床医学院深圳市人民医院 临床医学研究中心, 广东 深圳 518020)

【摘要】 目的 环状 RNA(circular RNA, circRNA)是一种可以调节基因的共价闭合非编码 RNA,主要在真核生物中表达。有证据表明, circRNA 具有组织细胞特异性表达, 并与之生理发育和各种疾病相关。18-三体综合症(18-trisomy syndrome)的侵入性产前筛查对胎儿健康和母亲造成一定的健康风险, 因此, 创建新的无创产前筛查, 寻找 18-三体综合症产前诊断的标志物十分重要。**方法** 本研究通过母血进行全基因组测序, 选择性分析 18-三体综合症孕妇血清中 circRNA 差异性表达。**结果** 共有 13278 个 circRNA 差异性表达, 包括 5007 个上调, 8271 个下调。**结论** 研究发现 hsa_circ_0001649 在 18-三体综合症和正常人对表达差异显著, 可能成为 18-三体综合症潜在的产前诊断的标志物。

【关键词】 circRNA; 18-三体综合症; 产前诊断

【中图分类号】 R714.55 **【文献标识码】** A

【Abstract】 Objective Circular RNA (circular RNA, circRNA) is a covalently-closed, non-coding RNA that regulates genes and is mainly expressed in eukaryotes. There is evidence that circRNA has tissue-cell-specific expression associated with its physiological development and various diseases. Intrusive prenatal screening of 18-trisomy syndrome poses a certain health risk to fetal health and mothers, thus create a new noninvasive prenatal screening that looks for prenatal trisomy 18 Diagnostic markers are very important. **Method** In this study, whole genome sequencing was performed in maternal blood to selectively analyze the differential expression of circRNA in serum of pregnant women with 18-trisomy syndrome. **Results** A total of 13278 circRNAs were differentially expressed, including 5007 up-regulated and 8271 down-regulated. **Conclusions** The study found that hsa_circ_0001649 has significant difference in 18-trisomy syndrome between normal contrast expression, it may be a potential prenatal diagnosis of 18-trisomy syndrome markers.

【Key words】 circRNA; 18-trisomy; prenatal diagnosis

环状 RNA(circular RNAs, circRNAs)是一类通过反向剪接(backsplice)方式形成的非编码 RNA(non-coding RNA, ncRNA), 大量存在于生物中^[1,2]。1976 年首次在类病毒中发现了环状

RNA 分子的形成^[3]。20 世纪 90 年代初期, 发现 circRNA 是由许多基因的转录产生的, 如肿瘤抑制基因 DCC, 原癌基因 est-1 和睾丸 Sry^[4,5]。然而, 这些 circRNA 通常被认为是低丰度的, 可能代表拼接错误。circRNA 在不同物种中具有保守性, 而且存在组织表达差异, 可以作为竞争性内源 RNA(ceRNA)结合 miRNA, 阻断 miRNA 对靶基因的抑制作用, 具有开发疾病新型诊断与治

DOI: 10.13470/j.cnki.cjpd.2018.01.004

基金项目: 广西科技计划(1598012-25); 广东省科技计划(2017B020209001); 桂林市研究与技术开发计划项目(20170109-34)

* 通讯作者: 戴勇, E-mail: daiyong22@aliyun.com

疗方法的巨大潜力^[6,7]。最近,由于高通量 RNA 测序和新的计算方法的发展,已经在各种细胞系和不同物种中成功鉴定了大量的 circRNA。近来人们使用全基因组测序学方法来研究人类三体征(包括 13-三体、18-三体和 21-三体综合征),以鉴定这些特定非整倍性条件中的每一个的基因表达特征。染色体畸变与产前期和婴儿早期的显著发病率和死亡率有关^[8]。18-三体综合征又称为爱德华综合征(Edwards syndrome),是常见的染色体三体征,是由于人类 18 号染色体增多 1 条造成的染色体畸变,此类患儿临床特征差异大,可从重度先天畸形到近似正常,严重的临床特征为神经系统发育受阻、脸部异常、生长较慢、骨骼反常、心脏和肾脏畸形等^[9]。由于 18-三体综合征患儿在胎儿期即存在较高的自然流产率,故新生儿 18-三体综合征的患病率为 1/8000~1/6000^[10],不能适应社会生活和缺乏正常劳动能力,对家庭及社会造成经济压力。因此,探索新的无创性产前筛查诊断指标和方法具有重要的临床意义和商业价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2016 年期间在 181 医院和深圳市人民医院产前筛查提示胎儿异常高风险,以及就诊于优生遗传门诊具有产前诊断指征为 18-三体综合征的 2 位孕妇的外周血以及脐带血为实验组,对照组为正常的相同孕周的孕妇外周血和脐带血,年龄 30~40 岁,孕周 28 周和 32 周,混合血样提取 RNA 进行全基因组测序。

1.2 实验方法 孕妇了解穿刺存在的危险后并签署知情同意书,在 B 超引导下脐带穿刺抽取胎儿脐血 1~2ml,分析血红蛋白成份鉴定为脐血后,按常规方法培养制片,加 1ml 血液接种于培养基,37℃ 培养 72 小时,加秋水仙素,滴低渗液破碎细胞,加固定液固定离心,去上清加 1ml 成悬浮液,滴片,显微镜下观察进行核型分析。常规计数 30 个分裂相,手绘分析 4 个核型。如遇异常核型则分析计数 50 个核型以上。

1.3 测序方法 取诊断为怀有 18-三体综合征

胎儿的母亲的外周血用 Trizol 法提取 RNA,每个样品总量为 5 个样品总量作为 RNA 样品制备的材料,使用 NanoDrop 2000c 分光光度计(Nano-drop Technologies, Wilmington, DE)测定分离的 RNA 样品的纯度和产量。使用 HiSeq PE Cluster Kit v4 cBot(Illumina)根据制造商的说明在 cBot 簇生成系统上进行索引编码样品的聚类。簇生成后,在 Illumina HiSeq 2500 平台上对文库制备物进行测序。

2 结果

通过对比图 1 和图 2,发现图 1 第 18 号多出 1 条染色体,经染色体核型分析图 1 诊断为 18-三体综合征,图 2 核型分析母亲的外周血核型图。测序得到的原始数据经过删除、过滤低质量数据之后,获得了有效数据。对比图 3 和图 4 可以看出,两组主要的基因类型主要分布在编码蛋白质上,其他的无明显变化。值得注意的是, lincRNA 对比正常组有上升 0.2%,在唐氏综合征中鉴定出大量 lincRNAs 差异表达,与蛋白质编码基因相比, lincRNA 表达显著增强(Kolmogorov-Smirnov 检验, $P < 0.05$),表明 lincRNAs 在唐氏综合征中发挥更重要的作用^[11]。 lincRNA 的升高(如图 4)是否与 18-三体综合征的 ceRNA 的网络调控有关系? 值得进一步探索。反义 RNA 可通过与靶位序列互补而与之结合的 RNA,或者直接阻止靶序列功能,或改变靶部位构象而影响其功能^[12]。 misc-RNA 具有多种功能,包括一些类似酶的催化,参与 RNA 的形成过程,这些小 RNA 中的一些也可能作为开关,开启和关闭基因,破坏 mRNA 来沉默基因^[13]。

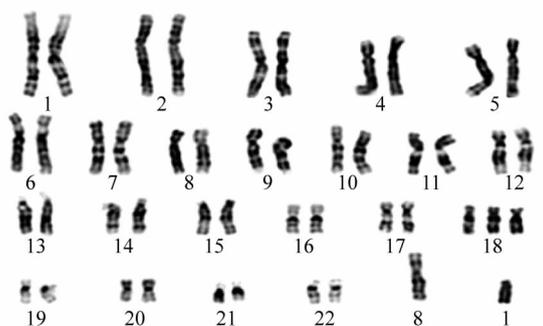


图 1 18-三体综合征胎儿脐带血染色体核型分析

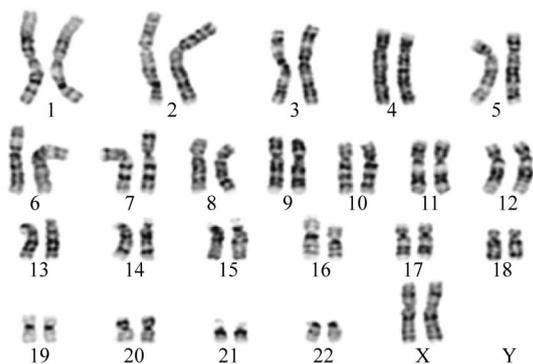


图 2 18-三体综合征孕妇外周血染色体核型分析

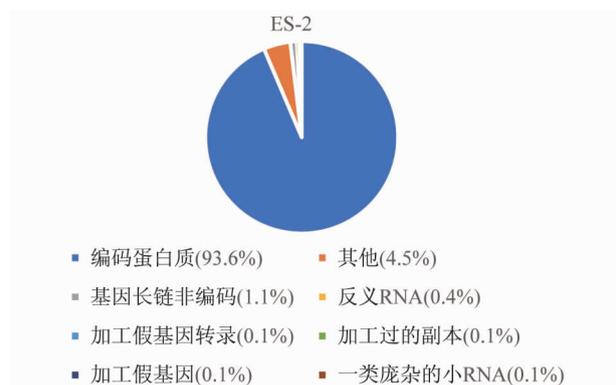


图 3 怀有 18-三体综合征的孕妇母血在已知基因类型的分布情况图(位图)

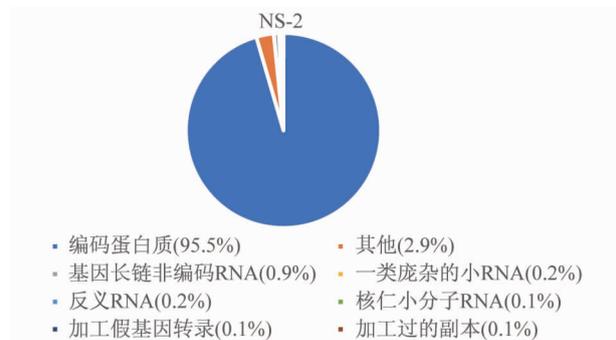


图 4 正常孕妇母血在已知基因类型的分布情况图(位图)

图 3、图 4 结果文件说明,在已知基因类型的分布情况。采用 HTSeq 或 Hisat2 软件对该物种样品不同已知基因类型进行覆盖度分析,使用的模型为维恩图(union)。根据表达量统计样品中各类型基因的表达分布,得到 reads 在已知基因类型上的分布情况。

在 circRNA 的生物成因中,有几种被提出的模型,包括剪接的依赖循环路径(图 5)。18-三体样本的环状 RNA 的总数比正常对照组多,大概是 1.3 倍,由图 5 可知,circRNA 来源 intergenic 占 63.20%,比正

常人的 38.80%多,正常人的 circRNA 来自外显子占 41.90%,而 18-三体样本才占 2.30%,这与环状 RNA 绝大多数来源于外显子,少部分由内含子直接环化形成的特征有关。

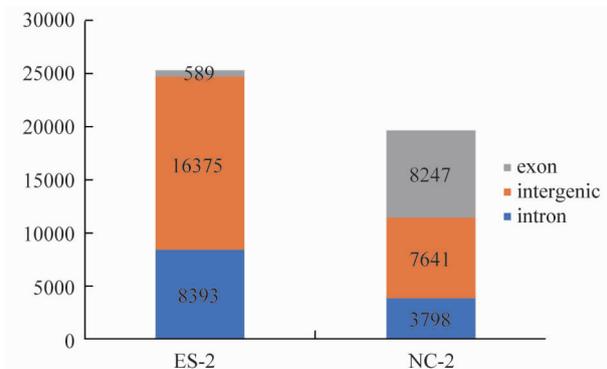


图 5 样本的 circRNA 的来源

注: exon:环状 RNA 位于已知基因的某一个外显子内,其序列由 breakpoint 之间的所有碱基构成;intergenic:环状 RNA 位于已知基因的之间,其序列由 breakpoint 之间的所有碱基构成;intron:环状 RNA 位于已知基因的某一个内含子内,其序列由 breakpoint 之间的所有碱基构成

图 5 统计了样本的 circRNA 的来源: circRNA 可以来源于 exon 或 intron 的剪接。

所有 circRNA 的差异分析结果显示(图 6),样本和对照组 circRNA 差异性表达共有 13 278 个,其中包括 5007 个上调,8271 个下调。从中筛选出 log₂(Fold change)差异系数大于或者等于 5 的共有 7718 个,差异系数最大(10.826)的为 hg38_circ_0028679,以及 hsa_circ_0005152、hg38_circ_0028661、hsa_circ_0001649 与 hsa_circ_0003570 等也有明显的差异表达。

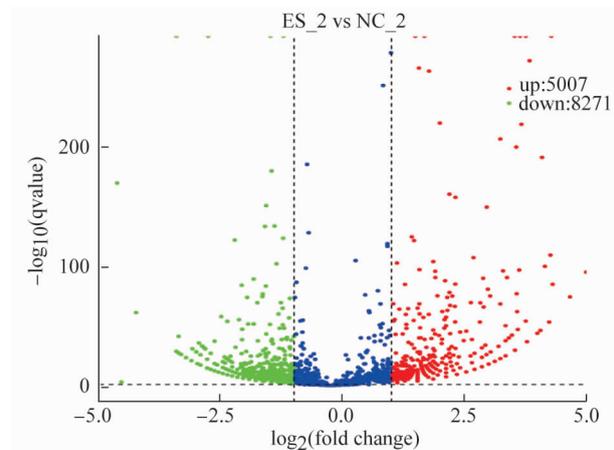


图 6 实验组与对照组的差异表达的 circRNA

3 讨论

研究表明 hsa_circ_0001649 在胃癌(GC)、肝癌(HCC)中显著差异表达,并可能成为诊断 GC 的新的潜在生物标志物^[14-16]。hsa_circ_0001649 在 18-三体综合征与对照组中的显著差异性表达上调具有非常重要的意义,极有可能为 18-三体产前诊断的潜在生物标记物。此外,hsa_circ_0001649 被认为可能具有包含 miR-1283、miR-4310、miR-182-3p、miR-888-3p、miR-4502、miR-6811-5p、miR-6511b-5p 和 miR-1972 的作用^[17]。值得注意的是,18-三体细胞(包括干细胞和祖细胞)的增殖速率受损^[18,19],这可能部分与怀孕早期的流产有关,18-三体征胎儿的流产率高达 72%^[20,21]。大鼠差异表达基因的比较分析,基于通路的富集分析显示,18-三体性显示 PI3K / AKT 途径失调,细胞周期 G2/M DNA 损伤检查点调节以及细胞死亡和存活,如以及抑制上游调节剂 TP53^[22]。通过基因组富集分析和双聚类,我们还发现大多数差异表达 lncRNA 与线粒体功能密切相关。目前对环状 RNA 功能的研究主要集中在竞争性内源性 RNA (ceRNA)上。circRNA 影响转录后调控的功能主要通过被当做海绵吸附 miRNA 来实现的^[23]。

我们使用了全基因组测序的方法选择性分析了怀有 18-三体综合征的孕妇的外周血中 circRNA 的差异性表达,对 18-三体综合征和正常细胞增殖控制中的作用,涉及增殖控制和细胞凋亡的过程对三体征息息相关。值得注意的是,hsa_circ_0001649 的表达在 18-三体与对照组的比对显著上升,极有可能是 18-三体综合征的产前诊断标记物,可能与 18-三体综合征的激活体系相关,为无创性的 18-三体产前诊断提供一定的依据。Koide K 等^[24]比较了孕 18-三体母细胞和整倍体胎儿的羊水中的无细胞胎儿 RNA 的全球 GE(基因表达),并发现在 18-三体样品中与细胞死亡网络相关的基因被下调。越来越多的证据表明组蛋白乙酰化参与染色质重塑,进而影响生物学过程,包括细胞凋亡^[25]。

18-三体综合征的检测仍然是产前筛查的主要

目的,circRNA 是一个长期被忽略的 RNA 种类,最近在新兴的非编码 RNA 家族中得到了关注。新一代测序和生物信息学技术的进步已经揭示了人类细胞中的一万多个 circRNAs。虽然大多数这些 circRNA 的调节和功能仍然难以捉摸,但是研究开始探索它们的作用以及某些 circRNA 的临床意义。此外,许多 circRNA 在癌症和正常组织之间差异表达,表明这些 circRNA 可能在癌症中具有潜在功能和临床相关性。然而,circRNA 在产前诊断中的研究尚处于起步阶段,关于它们的生物发生,调节和功能还有许多尚未解答的问题。而 circRNA 的作用机制还远未完全了解。circRNA 可能在多个水平上调节基因表达。由于大部分的 circRNA 是由前体 mRNAs 产生的,主要被加工成成熟的 mRNA,因此 circRNAs 与其宿主基因之间是否存在不同的调控和功能是一个值得探讨的课题。此外,这一领域为产前诊断和环状 RNA 治疗开辟了新的可能性。

参考文献

- [1] 邓齐文,许晔琼,王书奎.长链非编码 RNA 多态性与肿瘤相关性的研究[J].医学研究生学报,2014,27(3):303-306.
- [2] 张腾飞,黄修燕.环状 RNA 在肿瘤中的研究近况[J].世界肿瘤研究,2017,7(4):99-104.
- [3] Sanger HL, Klotz G, Riesner D, et al. Viroids are single-stranded covalently closed circular RNA molecules existing as highly base-paired rod-like structures[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1976, 73(11): 3852-3856.
- [4] Nigro JM, Cho KR, Fearon ER, et al. Scrambled exons[J]. Cell, 1991, 64(3): 607-613.
- [5] Capel B, Swain A, Nicolis S. Circular transcripts of the testis-determining gene Sry in adult mouse testis [J]. Cell, 1993, 73(5): 1019-1030.
- [6] 刘军强,吴慧,朱诗琪,等.环状 RNA 研究进展[J].江苏师范大学学报(自然科学版),2016,34(01):47-52.
- [7] Chen B. Circular RNA: An emerging non-coding RNA as a regulator and biomarker in cancer[J]. Cancer Lett, 2018, 1(418):41-50.
- [8] Torres EM, Williams BR, Amon A. Aneuploidy: Cells losing their balance[J]. Genetics, 2008, 179(2), 737 - 746.
- [9] 王培林.遗传病学[M].北京:人民卫生出版社,2000:771-772.
- [10] 吴梓梁.小儿内科学[M].郑州:郑州大学出版社,2003,

- 1183-1190.
- [11] Qiu JJ, Liu YN, Ren ZR, et al. Dysfunctions of mitochondria in close association with strong perturbation of long non-coding RNAs expression in down syndrome[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2017, 92: 115-120.
- [12] 潘正军, 孟广红. 生物体内 RNA 的种类和功能概述[J]. *济南职业学院学报*, 2005, 6: 51-53.
- [13] Umu SU, Langseth H, Bucher-Johannessen C, et al. A comprehensive profile of circulating RNAs in human serum[J]. *RNA Biol*, 2017, 8: 1-9.
- [14] Li P, Chen S, Chen H, et al. Using circular RNA as a novel type of biomarker in the screening of gastric cancer[J]. *Clin Chim Acta*, 2015, 444: 132-136.
- [15] Li WH. Decreased expression of hsa_circ_00001649 in gastric cancer and its clinical significance[J]. *Dis Markers*, 2017, 2017:4587698.
- [16] Yao T, Chen Q, Fu L, et al. Circular RNAs: Biogenesis, properties, roles, and their relationships with liver diseases [J]. *Hepatol Res*, 2017, 47(6): 497-504.
- [17] Qin M, Liu G, Huo X, et al. Hsa_circ_0001649: A circular RNA and potential novel biomarker for hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Biomark*, 2016, 16(1): 161-169.
- [18] Hibaoui Y, Grad I, Letourneau A, et al. Modelling and rescuing neurodevelopmental defect of Down syndrome using induced pluripotent stem cells from monozygotic twins discordant for trisomy 21[J]. *EMBO Mol Med*, 2014, 6(2):259-277.
- [19] Liu B, Filippi S, Roy A, et al. Stem and progenitor cell dysfunction in human trisomies[J]. *EMBO Rep*, 2015, 16(1): 44-62.
- [20] Morris JK, Savva GM. The risk of fetal loss following a prenatal diagnosis of trisomy 13 or trisomy 18[J]. *Am J Med Genet A*, 2008, 146A(7): 827-832.
- [21] Witters G, Van Robays J, Willekes C, et al. Trisomy 13, 18, 21, Triploidy and Turner syndrome: The 5T's. Look at the hands[J]. *Facts Views Vis Obgyn*, 2011, 3(1): 15-21.
- [22] Volk M, Maver A, Hodžič A, et al. Transcriptome profiling uncovers potential common mechanisms in fetal trisomies 18 and 21[J]. *OMICS*, 2017, 21(10): 565-570.
- [23] Kartha RV, Subramanian S. Competing endogenous RNAs (ceRNAs): new entrants to the intricacies of generegulation [J]. *Frontiers in genetics*, 2014, 5: 8.
- [24] Koide K, Slonim DK, Johnson KL, et al. Transcriptomic analysis of cell-free fetal RNA suggests a specific molecular phenotype in trisomy 18[J]. *Hum Genet*, 2011, 129(3): 295-305.
- [25] Fullgrabe J, Hajji N, Joseph B. Cracking the death code: apoptosis-related histone modifications [J]. *Cell Death Differ*, 2010, 17(8):1238-1243.

(收稿日期:2018-01-23)

编辑:熊诗诣