

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2022.22.009

miR-566 与 miR-1183 靶向抑制 RHD 基因表达的研究^{*}

王 琳¹, 张印则², 吴宗勇¹, 岳贺佳¹, 刘瑞琪², 蔡佩佩¹,
陈家倪¹, 杨翠红¹, 齐 军^{1△}

1. 国家癌症中心/国家肿瘤临床医学研究中心/中国医学科学院北京协和医学院
肿瘤医院深圳医院输血科, 广东深圳 518116; 2. 深圳大学总医院输血科, 广东深圳 518055

摘 要:目的 探讨 Rh 血型系统 RHD 基因表达相关微小 RNA(miRNA), 及其在干预 RHD 基因表达中的作用。方法 利用生物信息学软件 TargetScan, PicTar 和 miRWalk 预测靶向作用于 RHD 基因的 miRNA, 综合 3 个数据库的结果选取靶标率最高的 5 个 miRNA 进行研究。聚合酶链反应(PCR)扩增 RHD 基因 3'-非编码区(3'-UTR)序列, 插入到双酶切的双荧光素酶报告基因载体中, 将报告基因载体与 miRNA 共转染细胞, 通过相对荧光素酶活性分析测定 miRNA 对 RHD 基因的靶向作用。采用实时荧光定量 PCR 检测 miRNA 在 RhD 阳性及“弱 D”表型样本中的表达。结果 成功构建 RHD 基因 3'-UTR 双荧光素酶报告基因载体。该报告基因载体与 miRNA-566, miR-1183 和 miR-1207 共转染细胞的相对荧光素酶活性与对照比较分别下降了 37%($P<0.05$)、13%($P<0.05$)和 14%($P<0.05$), 提示 miRNA-566, miR-1183 和 miR-1207 潜在靶向调控 RHD 基因。miRNA-566 和 miR-1183 在“弱 D”表型样本中的相对表达量显著高于 RhD 阳性样本($P<0.05$)。结论 RHD 基因 3'-UTR 双荧光素酶报告基因载体构建成功。miR-566 和 miR-1183 对 RHD 基因有靶向抑制作用。

关键词: RHD 基因; 双荧光素酶报告基因载体; 微小 RNA; 3'-非编码区; 弱 D

中图法分类号: R457.1+1

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2022)22-3058-04

miR-566 and miR-1183 targeted inhibiting the expression of RHD gene^{*}

WANG Lin¹, ZHANG Yinze², WU Zongyong¹, YUE Hejia¹, LIU Ruiqi², CAI Peipei¹,
CHEN Jiani¹, YANG Cuihong¹, QI Jun^{1△}

1. National Cancer Center/National Clinical Research Center for Cancer/Department of Blood Transfusion, Cancer Hospital & Shenzhen Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Shenzhen, Guangdong 518116, China; 2. Department of Blood Transfusion, Shenzhen University General Hospital, Shenzhen, Guangdong 518055, China

Abstract: Objective To explore the microRNA (miRNA) related to RHD gene expression in Rh blood group system and their roles in the intervention of RHD gene expression. **Methods** The bioinformatics software TargetScan, PicTar and miRWalk were used to predict miRNA targeting RHD genes. Based on the results of three databases, five miRNAs with the highest target rate were selected for research. The 3'-UTR sequence of RHD gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and inserted into the double luciferase reporter gene vector, the reporter gene vector and miRNA were co-transfected into cells, and the targeting effect of miRNA on RHD gene was determined by relative luciferase activity analysis. The expression of miRNA in RhD positive and "weak D" samples was detected by real-time fluorescent quantitative PCR. **Results** The RHD gene 3'-UTR double luciferase reporter gene vector was successfully constructed. The relative luciferase activity of cells co-transfected with this reporter gene vector and miRNA-566, miR-1183 and miR-1207 decreased by 37% ($P<0.05$), 13% ($P<0.05$) and 14% ($P<0.05$) respectively compared with the control, suggesting that miRNA-566, miR-1183 and miR-1207 potentially targeted RHD genes. The relative expression of miRNA-566 and miR-1183 in "weak D" samples was significantly higher than that in RhD positive samples ($P<0.05$). **Conclusion** The RHD gene 3'-UTR double luciferase gene reporter vector is successfully constructed. miR-566 and miR-1183 have targeted inhibition effect on RHD gene.

Key words: RHD gene; double luciferase reporter gene vector; microRNA; 3'-UTR; weak D

^{*} 基金项目: 广东省深圳市医疗卫生三名工程项目(SZSM201812062)。

作者简介: 王琳, 女, 主管技师, 主要从事临床输血工作及研究。 △ 通信作者, E-mail: qijun5610@126.com。

Rh 血型系统由 1p34.3-1q36.1 控制编码,有 54 种抗原,是仅次于 ABO 血型的具有重要临床意义的血型系统^[1-2]。RhD 蛋白在 Rh 血型系统中免疫原性最强,因此在临床输血及母婴同种免疫中起着重要作用^[3]。D 抗原的变异型包括“弱 D”“部分 D”“DEL 型”等。其中“弱 D”的特征是红细胞表面 D 抗原位点显著性减少,但其免疫反应性不变^[4]。因此,明确“弱 D”表型发生的分子机制,对于准确鉴定 RhD 血型,指导临床输血与预防新生儿溶血病等均有重要意义。有学者发现,大部分“弱 D”表型与 RHD 基因结构相关^[5],HOURIA 等^[6]认为“弱 D”表型 D 抗原低水平是由于低水平 RHD 基因转录所致。

研究表明,微小 RNA(miRNA)通过干预基因表达,可调节细胞的新陈代谢、分化、增殖、凋亡,其在基因的表达调控中起着重要的作用^[7-8]。本研究以 3 例 Rh“弱 D”表型样本和 6 例 RhD 阳性样本为研究对象,通过生物信息学的方法筛选与调控 RHD 基因表达相关的 miRNA,构建双荧光素酶报告基因载体,探索 miRNA 与 RHD 基因表达的关系,以期进一步研究“弱 D”表型的分子机制与 miRNA 的关系。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料来源 6 例 RhD 阳性及 3 例“弱 D”表型血液样本均来源于深圳市血液中心,于 -80℃ 冰箱保存备用。

1.2 仪器与试剂 Dual-Glo-luciferase Assay system (美国 Promega 公司,批号:0000129139);293T 细胞株(深圳博奥康生物科技有限公司);NotI 限制性内切酶(美国 Thermo 公司,批号:00155534)、XhoI 限制性内切酶(美国 Thermo 公司,批号:00209345);质粒提取试剂盒(美国 Omega 公司,批号:00D6943020000C19O091);miRNA mimics 和 miRNA mimics 的空白对照(广州锐博生物科技有限公司);DMEM 培养基(美国 Gibco 公司,批号:8116402);Lipofectamine 2000(美国 Invitrogen 公司,批号:136719);SYBR® Premix Ex Taq™(2×)[宝生物工程(大连)有限公司,批号:AK9204];primeSTAR HS(primix)[宝生物工程(大连)有限公司,批号:1603057];PrimeScript™ RT reagent Kit 反转录试剂盒[宝生物工程(大连)有限公司,批号:00382191];psicheck2 vector(美国 Promega 公司,批号:0000095842);miRNeasy Serum/Plasma kit (美国 Qiagen 公司,批号:154023933)。

1.3 生物信息学预测调控 RHD 基因表达的 miRNA 利用生物信息学软件 TargetScan、PicTar 和 miRWalk,在线搜索可作用于 RHD 基因的 miRNA,选择靶标率靠前的 5 个 miRNA 进行分析。

1.4 双荧光素酶报告基因载体的构建

1.4.1 引物 根据 Pubmed Genbank ID 6007 确定 RHD 基因 3'-非编码区(3'-UTR),采用 Oligo 8.0 软

件设计聚合酶链反应(PCR)引物,RHD-3UTR-F: CCCTCGAGCCGCTGCATTTG-TACGTGAG; RHD-3UTR-R: GAATGCGGCCGACAAGCACT-GCCACGTTTAC(上海生工生物科技有限公司合成)。

1.4.2 PCR 合成 RHD 基因 3'-UTR 片段 以人基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增,反应体系为 50 μL: 2×primeSTAR HS(primix) 25 μL,模板 100 ng,上游引物(100 μmol/L)0.4 μL,下游引物(100 μmol/L)0.4 μL,加双蒸水(ddH₂O)至 50 μL。设置 PCR 反应条件为:98℃ 变性 10 s,55℃ 退火 10 s,72℃ 延伸 75 s,30 个循环。

1.4.3 载体构建 将上述 PCR 产物纯化后进行 NotI/XhoI 双酶切,与双荧光素酶报告基因载体 psi-check2 连接,然后转化至 DH5α 感受态细胞。随机挑取克隆放大培养后提取质粒 DNA。

1.4.4 酶切验证及测序 把提取的质粒 DNA 用 NotI 和 XhoI 做双酶切处理,用琼脂糖凝胶电泳验证 RHD 基因 3'-UTR 序列是否成功插入载体;选取酶切验证正确的克隆进行测序。

1.5 报告基因载体与 miRNA mimics 共转染细胞 用 DMEM 培养基于 37℃,5% CO₂ 的条件下培养 293 T 细胞。96 孔板,100 微升/孔,1.5×10⁴ 个/孔,培养 24 h。取浓度为 10 μmol/L 的 5 个 miRNA mimics 和 miRNA mimics 的空白对照(miRNA-NC)各 1 μL,分别与 9 μL OPTI-MEM 培养基混合;取 100 ng/μL 的靶基因 3'-UTR 报告基因载体 2 μL,与 13 μL OPTI-MEM 培养基混合;取 1 μL Lipofectamin 2000 与 24 μL OPTI-MEM 培养基混合。5 min 后三者混合,共 50 μL。轻轻摇匀静置 20 min,然后加至细胞内。做 3 个平行孔。转染 48 h 后加入底物,测定荧光值。

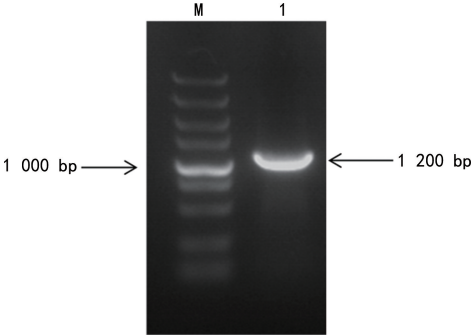
1.6 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测 miRNA 的表达 提取 9 个样本的 RNA,将 RNA 反转录为 cDNA,以 cDNA 为模板,荧光定量检测 miRNA 的表达量。正向引物为:miRNA566-GGGCGCCTGTGATCCCAAC,miRNA1183-CACTGTAGGTGATGGTGAGAGTG,miRNA1207-TGGCAGGGAGGCTGGGAG。20 μL 反应体系:SYBR® Premix Ex Taq™(2×) 10 μL,正向引物(10 μmol/L)0.4 μL,反向通用引物(10 μmol/L)0.4 μL,ROX Reference Dye II 0.4 μL,cDNA 模板 0.4 μL,ddH₂O 8.4 μL。PCR 反应条件为:94℃ 2 min,94℃ 12 s,60℃ 34 s,40 个循环,每个样本及内参(U6)进行 3 次重复,阴性对照以 ddH₂O 代替 cDNA 模板进行熔解曲线检测。miRNA 相对表达量的计算采用 2^{-ΔΔC_t} 法计算。

1.7 统计学处理 用 SPSS19.0 统计软件进行数据处理及统计分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

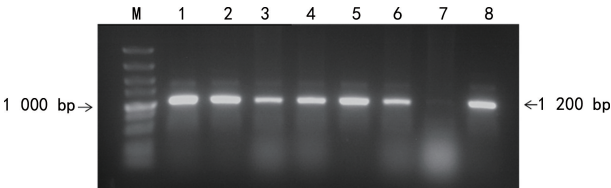
2.1 调控 RHD 基因表达的 miRNA 生物信息学预测的靶标率靠前的 5 个调控 RHD 基因表达的 miRNA 分别为 miR-566、miR-939、miR-1183、miR-1207 和 miR-1222。

2.2 双荧光素酶报告基因载体的构建 成功构建了 RHD 基因 3'-UTR 双荧光素酶报告基因载体,将该报告基因载体命名为 priR-RB-REPORT-RHD-3'-UTR。PCR 合成的 RHD 基因 3'-UTR 序列,经琼脂糖凝胶电泳鉴定结果见图 1,扩增片段 1 200 bp 与理论值相符。克隆后挑取 6 个单菌落经 PCR 验证,片段长度为 1 200 bp,证明目的片段已成功插入载体,结果见图 2。在 6 个单菌落中选取 3 个单菌落扩大培养提取质粒 DNA,双酶切 priR-RB-REPORT-RHD-3'-UTR,得到 2 个条带,RHD 基因 3'-UTR 片段与预期大小相符,见图 3。priR-RB-REPORT-RHD-3'-UTR 的测序图显示其 RHD 基因 3'-UTR 序列与参考序列完全一致。



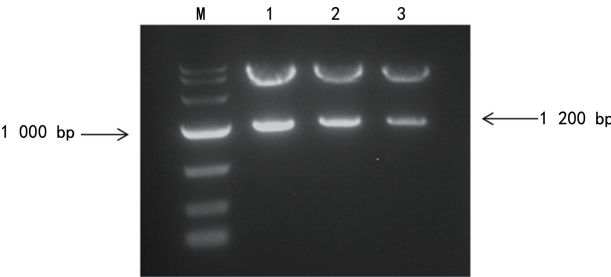
注:M 为 Marker;1 为 PCR 扩增产物。

图 1 PCR 合成的 RHD 基因 3'-UTR 片段



注:M 为 marker;1~6 为 6 个菌落的 PCR 产物;7 为阴性对照;8 为阳性对照。

图 2 PCR 验证重组载体克隆后单菌落中的目的片段

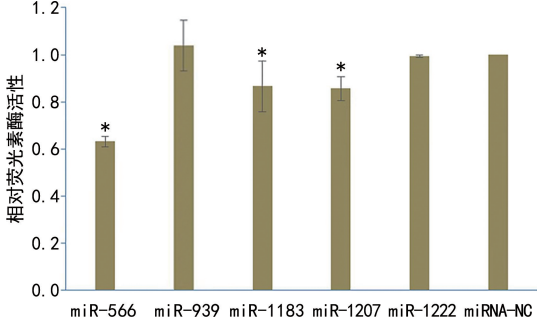


注:M 为 marker;1~3 为 priR-RB-REPORT-RHD-3'-UTR 的双酶切产物。

图 3 双酶切 priR-RB-REPORT-RHD-3'-UTR 得到的 RHD 基因 3'-UTR 片段

2.3 miRNA 与 RHD 基因的靶点验证结果 priR-

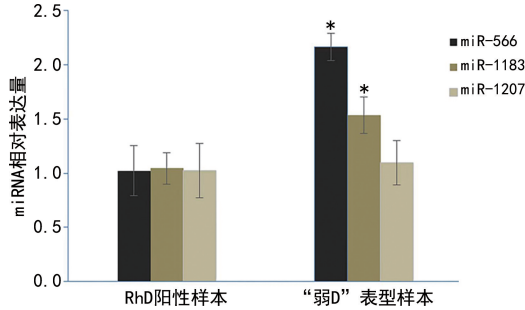
RB-REPORT-RHD-3'-UTR 与 miR-566、miR-939、miR-1183、miR-1207、miR-1222 共转染细胞的相对荧光素酶活性分别为 0.63 ± 0.02 、 1.08 ± 0.18 、 0.87 ± 0.11 、 0.86 ± 0.05 、 0.99 ± 0.01 。转染 miR-566、miR-1183、miR-1207 可以使 priR-RB-REPORT-RHD-3'-UTR 的相对荧光素酶活性较 miRNA-NC 分别降低 37%、13%、14% ($P < 0.05$),而 miR-939 与 miR-1222 没有使该载体的相对荧光素酶活性降低。见图 4。



注:与 miRNA-NC 比较,* $P < 0.05$ 。

图 4 priR-RB-REPORT-RHD-3'-UTR 与 miRNA 共转染细胞的相对荧光素酶活性分析

2.4 qRT-PCR 定量测定 miRNA 的差异表达 双荧光素酶报告基因实验发现,miR-566、miR-1183 和 miR-1207 对 RHD 基因 3'-UTR 有靶向作用,于是检测 miR-566、miR-1183 和 miR-1207 在 RhD 阳性及“弱 D”表型样本中的相对表达量。结果显示,miR-566 和 miR-1183 在“弱 D”表型样本中的相对表达量明显高于 RhD 阳性样本 ($P < 0.05$),见图 5。



注:与 RhD 阳性样本比较,* $P < 0.05$ 。

图 5 miR-566、miR-1183、miR-1207 在 RhD 阳性及“弱 D”表型样本中的相对表达量

3 讨 论

miRNA 是由 20~25 个核苷酸组成的非编码小分子 RNA,它能够通过碱基互补配对方式识别靶信使 RNA(mRNA),并且根据互补程度的不同指导沉默复合体阻遏靶 mRNA 的翻译或者降解靶 mRNA,进而发挥相应的生物学作用^[9]。每个 miRNA 可以有多个靶基因,而几个 miRNA 也可以有同一个靶基因。这种复杂的调节网络既可以通过一个 miRNA 来调控多个基因的表达,也可以通过几个 miRNA 的组合来精细调控某个基因的表达。miRNA 参与多种调节途径,包括发育、造血过程、病毒防御、脂肪代谢、器官形成、细胞增殖和凋亡等^[10]。

Rh 血型系统是人类红细胞血型系统中最复杂、最重要也是最富有多态性的一个系统,D 抗原是人 RHD 基因表达的最重要的抗原。RHD 基因变异较多,其中“弱 D”是其编码 D 抗原数量较少^[11-12]。miRNA 可以通过部分互补结合到目的 mRNA 的 3'-UTR,以一种未知方式诱发蛋白质翻译抑制,进而抑制蛋白质合成,因而可能成为调控 Rh 血型系统的“弱 D”表型表达的关键分子。

本研究利用生物信息学方法分析预测潜在靶向调节 RHD 基因表达的 miRNA。在此基础之上,笔者构建了 RHD 基因 3'-UTR 双荧光素酶报告基因载体 priR-RB-REPORT-RHD-3'-UTR,将预测的 miR-566、miR-939、miR-1183、miR-1207、miR-1222 和 priR-RB-REPORT-RHD-3'-UTR 共转染 293 T 细胞,研究其相对荧光素酶活性变化。结果表明,miR-566 能使 priR-RB-REPORT-RHD-3'-UTR 的相对荧光素酶活性降低 37%,对其有明显的抑制作用($P < 0.05$),miR-1183、miR-1207 亦使 priR-RB-REPORT-RHD-3'-UTR 的相对荧光素酶活性分别降低 13% ($P < 0.05$) 和 14% ($P < 0.05$),说明 miR-566、miR-1183 和 miR-1207 潜在靶向调控 RHD 基因 3'-UTR。于是笔者在 RhD 阳性及“弱 D”表型两组样本中检测了 miR-566、miR-1183、miR-1207 的表达,发现 miR-566 和 miR-1183 在“弱 D”表型样本中的相对表达量明显高于 RhD 阳性样本($P < 0.05$)。因而推测 miR-566、miR-1183 能下调 RHD 基因的表达,这可能是使 Rh 血型系统“弱 D”表型出现的相关分子机制。但为什么 miR-1207 在“弱 D”表型和 RhD 阳性样本中的相对表达量差异无统计学意义还有待进一步研究^[13]。此外,有报道称,miR-566 通过调控 WNT6 而影响乳腺癌的进展^[14];而 miR-1183 对胶质瘤细胞可能存在调控作用^[15]。

miR-566 与 miR-1183 在“弱 D”和 RhD 阳性标本中的相对表达量的显著差异,为在 miRNA 水平研究 Rh 血型中“弱 D”表型的分子机制奠定了基础,同时为 RhD 阳性与“弱 D”表型间的鉴别提供了新的分子检测方法。

综上所述,本研究成功构建了 RHD 基因 3'-UTR 的双荧光素酶报告基因载体,同时初步证明 RHD 基因的 3'-UTR 与 miR-566、miR-1183 和 miR-1207 有结合靶点,且在“弱 D”表型样本中发现 miR-566 和 miR-1183 的高表达,初步证明了 miR-566 和 miR-1183 能调控 RHD 基因的表达,为进一步研究调控 RHD 基因表达的分子机制提供了理论依据。

参考文献

[1] 张印则,徐华,周华友.红细胞血型原理与检测策略[M].北京:人民卫生出版社,2014:3-5.
[2] MARYAM S S P, SAEED S, NARGES G, et al. A case

report of a rare Rh phenotype: D[J]. Indian J Hematol Blood Transfus, 2019, 35(2): 402-404.
[3] BRITTA R, GREGOR B, WIEBKE S, et al. Targeted antenatal anti-D prophylaxis for RhD negative pregnant women: a systematic review[J]. BMC Pregnancy Childbirth, 2020, 20(83): 1-10.
[4] SHI J, LUO Y. Effects of RHD gene polymorphisms on distinguishing weak D or DEL from RhD-in blood donation in a Chinese population[J]. Mol Genet Genomic Med, 2019, 7(6): e00681.
[5] GERALD S, LEONARD N C, WILLY A F. Serological weak D phenotypes: a review and guidance for interpreting the RhD blood type using the RHD genotype[J]. Br J Haematol, 2017, 179(1): 10-19.
[6] HOURIA E H, MARIAM E W, ZAINAB O, et al. Comprehensive phenotypic and molecular investigation of RhD and RhCE variants in Moroccan blood donors[J]. Blood Transfus, 2019, 17(2): 151-156.
[7] KIOOMARS S, HAMID R K, SHAHRAD S F, et al. An overview of microRNAs: biology, functions, therapeutics, and analysis methods[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(5): 5451-5465.
[8] SEOK H Y, HAM J Y, JANG E S, et al. MicroRNA target recognition: insights from transcriptome-wide non-canonical interactions[J]. Mol Cell, 2016, 39(5): 375-381.
[9] ABADI A J, ZARRABI A, GHOLAMI M H, et al. Small in size, but large in action: microRNAs as potential modulators of PTEN in breast and lung cancers[J]. Biomolecules, 2021, 11(2): 304.
[10] MICHELLE M J M, MOHSEN G. Cell cycle regulation of stem cells by microRNAs[J]. Stem Cell Rev Rep, 2018, 14(3): 309-322.
[11] LUO X D, MARGARET A K, LAN J, et al. Strategies to identify candidates for D variant genotyping[J]. Blood Transfus, 2018, 16(3): 293-301.
[12] YOUNES S, NASER A, AREZOO O, et al. RHD genotyping of Rh-negative and weak D phenotype among blood donors in Southeast Iran[J]. Int J Hematol Oncol Stem Cell Res, 2021, 15(4): 213-220.
[13] YOU L, WANG H Y, YANG G, et al. Gemcitabine exhibits a suppressive effect on pancreatic cancer cell growth by regulating processing of PVT1 to miR1207[J]. Mol Oncol, 2018, 12(12): 2147-2164.
[14] ZHAO M C, ZHANG M M, LI T, et al. MiR-566 protects the malignant progression of cancer by negatively regulating WNT6[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020, 24(11): 6185-6194.
[15] ZHU C B, MAO X H, ZHAO H, et al. The circ VCAN with radioresistance contributes to the carcinogenesis of glioma by regulating microRNA-1183 [J]. Medicin, 2020, 99(8): e19171.