

变应性鼻炎中 lncRNA-miRNA-mRNA 网络构建与相关程序性细胞死亡基因的分析

王宇婷,姜辉,王嘉玺

(北京中医药大学东方医院 耳鼻咽喉科,北京 100078)

摘 要: **目的** 本研究旨在探讨 lncRNA 介导的 ceRNA 网络在变应性鼻炎 (AR) 病理生理过程中的作用及其在程序性细胞死亡 (PCD) 中的潜在调控功能。**方法** 纳入 AR 患者与正常人,取全血进行 RNA 测序分析,筛选差异表达的 lncRNA、miRNA 和 mRNA 用于构建基于 ceRNA 理论的 lncRNA-miRNA-mRNA 调控网络。采用基因本体 (GO) 和 KEGG 富集分析来预测 ceRNA 网络中 mRNA 的潜在生物学功能。随后,将差异表达的 mRNA 与 PCD 相关基因相互取交集,并依据交集 mRNA 构建新的 ceRNA 网络,同时对 ceRNA 网络中 mRNA 进行靶器官定位网络分析。**结果** 基于生物信息学分析,共提取 5 个 lncRNA、4 个 miRNA 和 46 个 mRNA,构建 AR 中 lncRNA 介导的上调及下调的 ceRNA 网络。功能富集分析显示其在“钙信号通路”、“PI3K/AKT 信号通路”及“ERK1 和 ERK2 级联”等中显著富集。并对 AC008394.1 及人类组织相容性白细胞抗原复合物 P5 (HCP5) 2 个 lncRNA 构建 PCD 相关 ceRNA 调控网络。在对 ceRNA 网络中 mRNA 进行靶器官定位分析中发现,它们多在神经免疫相关器官中表达。**结论** 本研究构建了 AR 中新 ceRNA 网络,初步探索了 HCP5 介导的 ceRNA 网络可能通过影响细胞凋亡对 AR 发挥作用。为 AR 发病机制的研究提供了新的见解和潜在的研究方案。

关 键 词: 变应性鼻炎; lncRNA; ceRNA 网络; 程序性细胞死亡; 人类组织相容性白细胞抗原复合物 P5
中图分类号: R765.21

Construction of lncRNA-miRNA-mRNA network and analysis of programmed cell death-related genes in allergic rhinitis

WANG Yuting, JIANG Hui, WANG Jiayi

(Department of Otolaryngology, Dongfang Hospital of Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100078, China)

Abstract: **Objective** To investigate the role of lncRNA-mediated ceRNA network in pathophysiology of allergic rhinitis (AR) and its potential regulatory functions in programmed cell death (PCD). **Methods** AR patients and normal subjects were included. Their whole blood samples were obtained for RNA sequencing analysis, and differentially expressed lncRNA, miRNA and mRNA were screened to construct a lncRNA-miRNA-mRNA regulatory network based on ceRNA theory. GO and KEGG enrichment analyses were employed to predict the potential biological functions of mRNAs in the ceRNA network. Subsequently, the differentially expressed mRNAs interacted with PCD related genes, and a new ceRNA network was constructed, and target organ localization network analysis was performed on mRNAs in the network. **Results** Based on bioinformatics analysis, a total of 5 lncRNAs, 4 miRNAs and 46 mRNAs were extracted, and the ceRNA network of lncRNA-mediated up-regulation and down-regulation in AR was constructed. Functional enrichment analysis showed that it was significantly enriched in “calcium signaling pathway”, “PI3K/AKT signaling pathway” and “ERK1 and ERK2 cascade”. Next, a PCD related ceRNA regulatory network for two lncRNAs, AC008394.1 and HCP5, was constructed. In the target organ localization analysis of mRNAs in the ceRNA network, it was found that they were mostly expressed in neuroimmune-related organs. **Conclusion** A new ceRNA network in AR is successfully constructed and preliminarily exploration reveals that HCP5-mediated ceRNA network may play a role in AR by affecting apoptosis, which provides new insights and potential research options for the study of AR pathogenesis.

Keywords: Allergic rhinitis; lncRNA; ceRNA network; Programmed cell death; HCP5

基金项目:2021 年度北京中医药大学附属医院校级课题(2021-BUCMXJKY010)。
第一作者简介:王宇婷,女,硕士,主治医师。
通信作者:王嘉玺, Email: wangjiayi910@163.com

变应性鼻炎(allergic rhinitis, AR)是耳鼻咽喉科常见疾病之一,属于机体免疫系统疾病。然而其发病机制的研究仍有不明之处,导致其诊断及针对性治疗存在一定的困难。因此,我们迫切的需要进一步研究,并且对 AR 的生物学机制有更深入的了解。非编码 RNA(ncRNA),包括 microRNA(miRNA)、长链非编码 RNA(lncRNA)和环状 RNA(circRNA),在表观遗传学、转录调控和转录后调控中发挥重要作用^[1]。越来越多的研究表明 lncRNA 广泛参与 AR 的发生发展过程。lncRNA-miRNA-mRNA 所形成的内源竞争 RNA(competing endogenous RNA, ceRNA)调控网络在免疫疾病中已有广泛研究。然而, ceRNA 网络与 AR 的发生发展之间的关系仍不清楚。

Zhang 等^[2]研究表明 FOXD3-AS1 在 AR 患者鼻黏膜中下调,其抑制鼻黏膜上皮细胞(nasal mucosa epithelial cells, NEC)中白细胞介素-25(interleukin-25, IL-25)的表达和分泌,从而调节 AR 中的辅助性 T 淋巴细胞 2(helper T lymphocytes, Th2)的功能。然而,也有证据表明 lncRNA 不独立发挥调节功能,而通过与某些 ncRNA 竞争性结合相互作用,构建动态的调节网络,这以前被称为竞争。ceRNA 网络被认为是解释转录后调控的重要机制^[3]。有学者^[4]研究发现在 AR 患者的鼻黏膜组织和 IL-13 处理的 NEC 中 LINC00632 表达下调,并负调节 miR-498,从而降低其靶基因白介素 1 受体拮抗剂(interleukin1 receptor antagonist, IL1RN)的表达,以此来调节巨噬细胞集落刺激因子、嗜酸性粒细胞趋化因子等的表达。然而 AR 的研究不仅限于此,考虑到程序性细胞死亡(programmed cell death, PCD)在 AR 中的重要作用,我们根据构建的 ceRNA 网络进一步对 AR 的调控机制进行探讨。

本研究选取 AR 患者与正常人全血样本进行 RNA 测序,构建 lncRNA 介导的 ceRNA 网络,对网络中的 mRNA 进行基因本体(gene ontology, GO)和 KEGG 功能富集分析。然后,我们将 ceRNA 网络中差异表达的 mRNA 与 PCD 相关的基因进行交互作用,并构建 lncRNA 介导的 ceRNA 网络中的 PCD 相关调控网络,分析相关基因的靶器官定位。该研究进一步深入挖掘 AR 发病的新的分子机制,特别是 lncRNA 介导的 ceRNA 调控网络与程序性死亡之间的相互作用。

1 材料和方法

lncRNA 介导的 ceRNA 网络(lncRNA-miRNA-mRNA)的构建及相关 PCD 基因分析流程如图 1

所示。

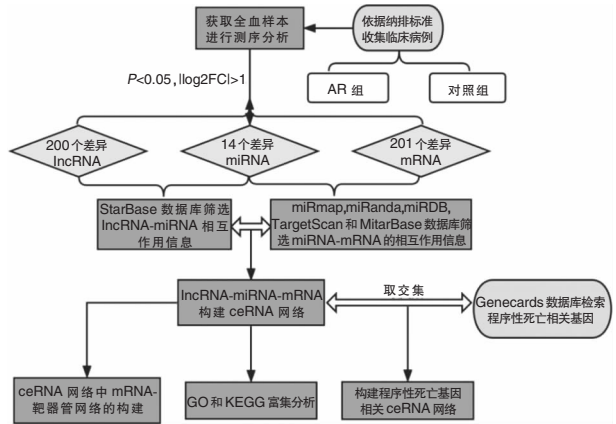


图 1 ceRNA 网络的构建与分析流程图 注:AR(变应性鼻炎);GO(基因本体)。下同。

1.1 患者和样本收集

1.1.1 一般资料 本研究纳入 4 例 AR 患者,其中男 1 例,女 3 例;平均年龄 29.3 岁,平均病程 2.4 年。对照组 4 例,男 2 例,女 2 例;平均年龄 30.3 岁。两组均于 2021 年 3 月—2021 年 4 月就诊于北京中医药大学东方医院耳鼻咽喉科门诊,8 例患者均久居于北京市。所有对照组均为变应原特异性 IgE 阴性。研究对象均进行常规检查及静脉血采集,所有的血液样本都取自肘部静脉。该研究所用标本通过北京中医药大学东方医院伦理委员会批准,并征得患者知情同意。

1.1.2 纳入及排除标准 纳入标准:①年龄 18 ~ 55 岁;②符合国内《变应性鼻炎诊断和治疗指南》(2015 年)中制定的 AR 诊断标准^[5];③免疫印迹法进行的血清变应原特异性 IgE(specific IgE, sIgE)检测阳性,主要对尘螨、动物皮屑、蟑螂或霉菌过敏;④AR 病史 ≥ 1 年;⑤同意参与本研究并签署知情同意书者。同时符合以上 5 条者方可纳入。

排除标准:①近 2 周内患呼吸道感染或急性鼻窦炎;②慢性鼻窦炎病史或影像学显示鼻窦炎;鼻腔手术史或鼻腔器质性病变;③近 3 个月曾接受过西药抗过敏治疗、中药治疗,可能影响本临床研究的观察治疗测定者;④合并全身免疫系统疾病、严重呼吸系统疾病、血液循环系统疾病、造血系统疾病者;⑤恶性肿瘤患者;⑥精神病患者;⑦妊娠期妇女;符合上述任意一条者均不能入组。

1.1.3 全血样本采集和保存 应用 PAXgene 血液 RNA 管(preanagen, Venlo, 荷兰)采集全血 2.5 mL, PAXgene 采血管内含能够稳定体内基因转录性状的

抗凝剂以避免 RNA 快速降解,稳定细胞内 RNA。将 PAXgene 试管小心倒置 8~10 次,可确保管内保护剂和血液充分混合均匀,在室温下放置 2 h 后,大体积干冰运输至深圳微科盟科技集团有限公司实验室进行检测,以减少 RNA 降解。

1.2 RNA 测序分析

1.2.1 全血总 RNA 提取 在 RNA 提取前,从干冰中取出试管后,室温解冻并在孵育 2 h。RNA 纯化按照 PAXgene 血液 RNA 试剂盒手册中的方案进行。利用 NanoDrop2000 仪(NanoDrop 技术公司,威尔明顿,DE,美国)对所提 RNA 的浓度和纯度进行检测,琼脂糖凝胶电泳测 RNA 完整性,电泳图片显示 3 条清晰的条带(28 s/18 s/5 s),RNA 完整性良好。Qubit 测定浓度。单次建库要求 RNA 总量 ≥ 1 μ g,浓度 ≥ 100 ng/ μ L,OD260/280 ≥ 1.8 ,OD260/230 ≥ 1.0 。

1.2.2 RNA 测序实验 测序实验采用 Illumina Truseq TM RNA sample prep Kit 方法进行链特异文库构建,包括去除 rRNA, RNA 片段化,反转成 cDNA,连接 adaptor 即在双链的 cDNA 在 3' 末端加上一个 A 碱基,连接 Y 字形的接头,UNG 酶消化 cDNA 二链,文库富集即 PCR 扩增,纯化得到最终文库,并由 illumina 平台上机测序。lncRNA 是一类转录本长度超过 200 nt,不编码 lncRNA 的 RNA 分子。我们基于转录组拼接结果,根据 lncRNA 的结构特点以及不编码 lncRNA 的功能特点,设置一系列严格的筛选条件,将筛选所得 lncRNA 进行后续分析。使用 StringTie-eB 软件对 lncRNA 的转录本进行定量分析,得到各样本的转录本 readcount 及 FPKM 信息。同时对测序结果中的 mRNA 及 miRNA 进行定量分析,得到 readcount 及 FPKM 值。

1.3 筛选差异表达 lncRNA、miRNA 和 mRNA

采用 R 软件中的“DESeq2”软件包,对 AR 患者与对照组之间的 lncRNA、miRNA 和 mRNA 进行差异表达分析。用 $P < 0.05$ 和 $|\log_2 FC| > 1$ 作为基因表达显著性差异的筛选阈值。通过使用 R 软件中的“ggplot2”、“pheatmap”和“ggrepel”软件包生成热图和火山图来进行差异基因的可视化。

1.4 lncRNA-miRNA-mRNA 网络的构建

lncRNA-miRNA-mRNA 网络基于 ceRNA 假设构建:①应用 miRmap, miRanda, miRDB, TargetScan 和 MitaBase 数据库提取 miRNA-mRNA 的相互作用信息,应用 StarBase 数据库提取 miRNA-lncRNA 相互作用的信息;②如果 lncRNA 和 mRNA 都被同一

个 miRNA 靶向,并且该 miRNA 与 lncRNA 及 mRNA 表达负相关,则该 lncRNA-miRNA-mRNA 组被确定为共表达竞争三联体,故构建相应的 ceRNA 调控网络。应用 cytoscape 3.7.1 软件对 ceRNA 调控网络进行可视化。

1.5 GO 和 KEGG 功能富集分析

对上述步骤中得到的 ceRNA 网络中的 mRNA 进行潜在的生物学功能富集分析。GO 富集分析分为分子功能(molecular function, MF)、生物过程(biological process, BP)和细胞组成(cellular component, CC)3 个部分;KEGG 分析是应用 KEGG(京都基因和基因组百科全书)数据库进行 mRNA 相关通路的富集分析,利用 R 软件中的“clusterprofiler”包预测 ceRNA 网络中的 mRNA 潜在的生物学功能。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。KEGG 分析应用 R 软件中“GOplot”包筛选 GO 中 3 个部分的前 20 个基因集绘制柱状图进行可视化;并筛选具有显著差异的 KEGG 基因集进行圈图绘制。

1.6 ceRNA 网络中 PCD 相关基因的筛选

首先 genecards 数据库(<https://www.genecards.org>)中与 PCD 相关的基因,包括“程序性细胞死亡”、“细胞凋亡”、“细胞焦亡”相关基因。然后,将 ceRNA 网络中差异表达的 mRNA 与 PCD、细胞凋亡和细胞焦亡相关的基因相互取交集。结果通过在线工具 Venny 2.1.0(<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>)生成的 Venny 图进行可视化。

1.7 PCD 相关基因的 ceRNA 网络构建

依据 ceRNA 假设构建 PCD 相关 lncRNA-miRNA-mRNA 网络,并应用 Cytoscape 3.7.1 软件对 ceRNA 调控网络进行可视化。

1.8 ceRNA 网络中 mRNA 与靶器官网络的构建

AR 作为免疫系统疾病其发病机制尚有不明之处,可能多个组织和器官参与疾病的发生进展。因此,应用 BioGPS 数据库(<https://biogps.org>)在器官组织水平上检测每个 mRNA 的表达谱信息^[6]。该数据库提供了通过微阵列分析直接测量基因表达而获得的基因表达数据^[7]。我们首先得到 84 个器官和组织中每个 mRNA 表达的分布数据,然后计算每个组织中每个 mRNA 的平均值和所有组织中的总体平均值^[8]。最后,提取 mRNA 表达量高于总体平均值的相关器官和组织中的前 14 个靶器官与 mRNA 通过 Cytoscape 3.7.1 建立 mRNA-靶器官定位网络。

2 结果

2.1 差异表达的 lncRNA、miRNA 及 mRNA 的鉴定

对 AR 组及对照组全血样本测序,并对已知序列的 lncRNA、miRNA 和 mRNA 进行定量分析,以 $P < 0.05$ 和 $|\log_2FC| > 1$ 为阈值筛选差异表达的 lncRNA、miRNA 和 mRNA。共鉴定出 200 个差异表达 lncRNA(98 个上调,102 个下调);201 个差异表达 mRNA(92 个上调,109 个下调);14 个差异表达 miRNA(7 个上调,7 个下调)。差异表达的 lncRNA、miRNA 和 mRNA 的热图和火山图如图 2 所示。

2.2 lncRNA、miRNA、mRNA 间 ceRNA 网络的分析

我们根据碱基序列和表达水平分别预测了 lnc-

RNA-miRNA 和 miRNA-mRNA 对。基于 ceRNA 网络构建思路,在 lncRNA 介导的上调 ceRNA 网络中鉴定出 4 对 miRNA-lncRNA 和 22 对 miRNA-mRNA,包括 3 个 lncRNA 节点、2 个 miRNA 节点和 22 个 mRNA 节点;在 lncRNA 介导的下调 ceRNA 网络中鉴定出 3 对 miRNA-lncRNA 和 24 对 miRNA-mRNA,2 个 lncRNA 节点、2 个 miRNA 节点和 24 个 mRNA 节点。见图 3。

2.3 ceRNA 网络中差异表达 mRNA 功能富集分析

为了进一步探索 lncRNA 介导的 ceRNA 网络相关的潜在功能,应用 R 中的“clusterprofiler”对 ceRNA 网络中的 mRNA 进行功能富集分析。GO 分析结果将显著富集($P < 0.05$)的前 20 个 GO 条目绘制成柱状图(图 4A)。结果表明,参与 ceRNA 网络中

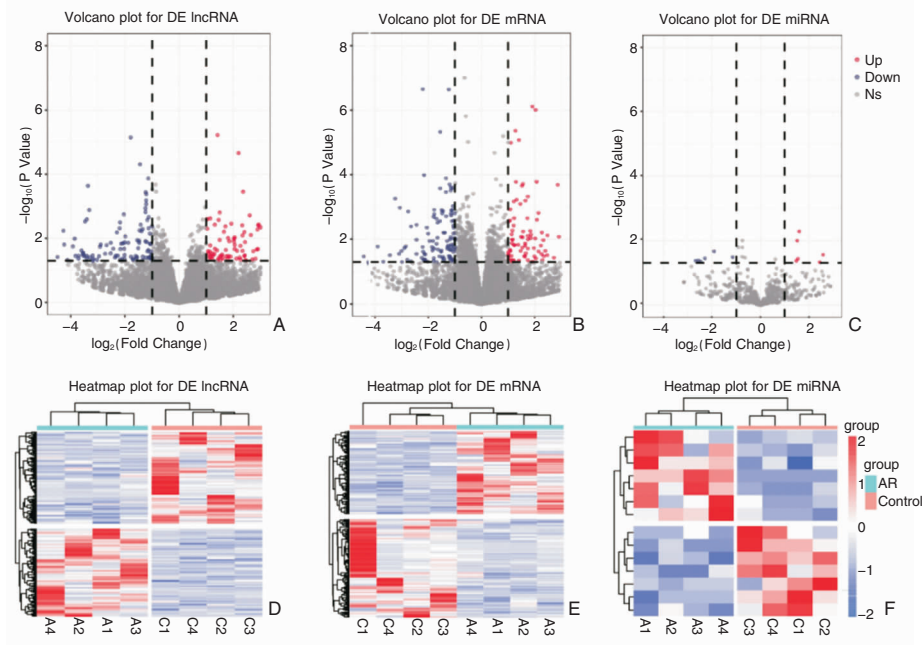


图 2 差异表达的 lncRNA、mRNA 和 miRNA 的火山图和聚类热图 A:差异表达 lncRNA 火山图; B:差异表达 mRNA 火山图; C:差异表达 miRNA 火山图; D:200 个差异表达 lncRNA 聚类热图; E:201 个差异表达 mRNA 聚类热图; F:14 个差异表达 miRNA 聚类热图 注:红色表示上调的基因,蓝色表示下调的基因;浅绿色表示对照组,淡红色代表 AR 组。

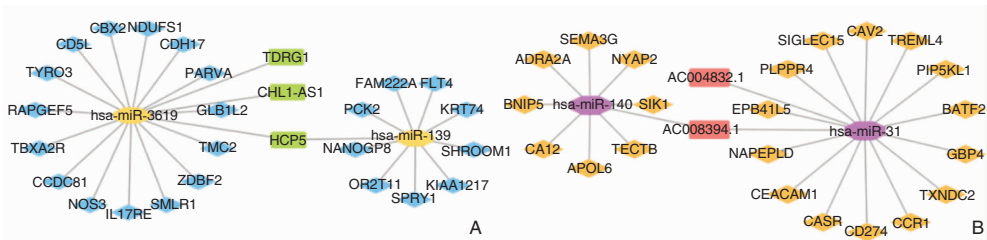


图 3 lncRNA 介导的 ceRNA 调控网络的构建 A:lncRNA 介导的上调 ceRNA 网络; B:lncRNA 介导的下调 ceRNA 网络 注:绿色表示 lncRNA 上调,红色表示 lncRNA 下调;淡黄色表示 miRNA 下调,紫色代表 miRNA 上调;蓝色代表 mRNA 上调,橘黄色代表 mRNA 下调。

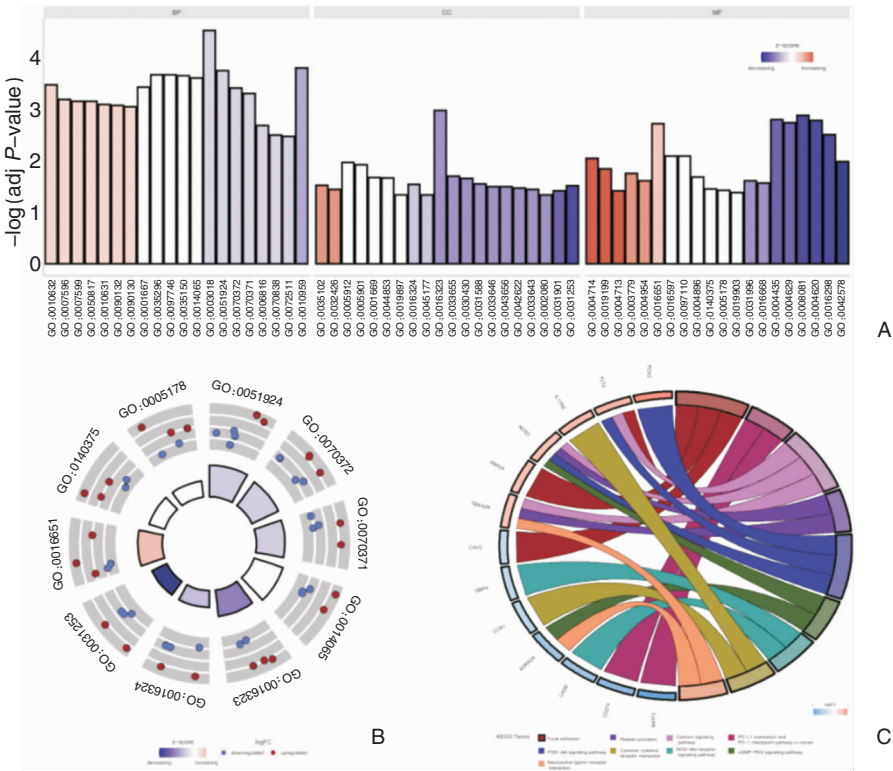
的差异表达 mRNA 尤其富集于 GO:0051924(钙离子转运的调节);GO:0070372(ERK1 和 ERK2 级联的调节);GO:0070371(ERK1 和 ERK2 级联);GO:0014065(磷脂酰肌醇 3-激酶信号传导)等生物学进程中。GO:0016323(基底外侧质膜);GO:0016324(顶端质膜);GO:0031253(细胞投射膜)等细胞成分中。GO:0016651[作用于 NAD(P)H 的氧化还原酶活性];GO:0140375(免疫受体活性);GO:0005178(整合素结合)等分子功能。见图 4B。另外 KEGG 通路分析表明,ceRNA 网络中 mRNA 的功能主要富集于 hsa04510(粘附斑激酶通路);hsa05235(在癌症中 PD-L1 的表达和 PD-1 检查点通路);hsa04020(钙信号通路);hsa04611(血小板活化通路);hsa04151(PI3K-Akt 信号通路);hsa04022(cGMP-PKG 信号通路);hsa04621(NOD 样受体信号通路);hsa04060(细胞因子与受体间相互作用);hsa04080(神经活性配体-受体相互作用)。见图 4C。

2.4 ceRNA 网络中 PCD 相关基因的鉴定及 PCD 相关基因的 ceRNA 网络分析

我们将 ceRNA 网络中的 46 个差异表达的 mRNA 与 GeneCards 数据库中检索到 14 004 个自噬相关基因相互作用,鉴定出 ceRNA 网络中存在 25 个自噬相关基因,于 13 473 个 PCD 相关基因相互作用,共获得 25 个交集基因;与 184 个焦亡相关基因相互作用,鉴定出 1 个交集基因(图 5)。然后,我们对构建了 AC008394.1 及人类组织相容性白细胞抗原复合物 P5(human histocompatibility leukocyte antigen comple P5,HCP5)2 个 lncRNA 所介导的 ceRNA 调控网络,探索其对 PCD 的调控作用,结果如图 6 所示。

2.5 ceRNA 网络中 mRNA 与靶器官定位网络分析

基因表达数据是基于 B 和 GPS 数据库中的基因表达芯片分析所得。在查找相关 mRNA 在 BioGPS 数据库的表达谱中,NANOGP8 和 CD247 没有 mRNA 表达谱。故我们分析了 44 个 mRNA 靶蛋



白在 84 个组织和器官中的表达谱,选取前 14 个靶器官与相应的 mRNA 构建 mRNA-靶器官定位网路,14 个靶器官包括小脑、颞叶、松果体、下丘脑、背根神经节、骨髓、CD34⁺ 等以神经免疫系统为主的相关组织器官。网络中包含 32 个节点和 328 条边。大多数靶标同时在多个器官和组织中高表达,表明这些器官与 PCD 相关 ceRNA 网络密切相关,提示其相关作用机制可能与神经、免疫等功能相关。见图 7。

3 讨论

AR 是一种复杂的疾病,随着空气质量日益恶化,人们生活工作压力的增加及饮食不规律等原因,使得患病人数逐年增加,且部分患者伴发哮喘等下呼吸道疾病,严重影响生活质量^[9]。虽然常年性 AR 患者较少存在生存问题,但疾病所产生的附加影响,如对情绪、睡眠及经济成本的影响仍值得我们去研究。然而,AR 的分子机制尚不清楚,这为疾病

的早期诊断及针对性治疗带来困难。

为了更好地认识 AR 的发病机制和发现潜在的生物标志物,本研究利用转录组测序技术对其进行了定量和全面的分析,包括编码和非编码转录组。结果显示,常年性 AR 患者与正常人中 miRNA、lncRNA 和 mRNA 的表达模式存在显著差异,而 DEmiRNA、DELncRNA 和 DEmRNA 的动态变化也存在显著差异。近年来,ncRNA 被发现与广泛的生物调节功能相关^[10]。然而,本研究获得的 DELncRNA 大多功能未知,这主要是由于对它们的研究较少。因此,我们构建了常年性 AR 由 lncRNA 介导的 ceRNA 调控网络。基于 ceRNA 理论构建了 2 个 lncRNA-miRNA-mRNA 调控网络,包括 5 个 lncRNA、4 个 miRNA 和 46 个 mRNA。lncRNA AC004832.1、AC008394.1、TDRG1、HCP5 和 CHL1-AS1 均首次在 AR 患者外周血中被鉴定为差异表达的 lncRNA。GO 和 KEGG 富集分析表明,参与 ceRNA 网络的 DEmRNA 在“钙离子转运的调节”、“PI3K-Akt 通路”和“免疫受体活性”等中显著富集。在 ceRNA

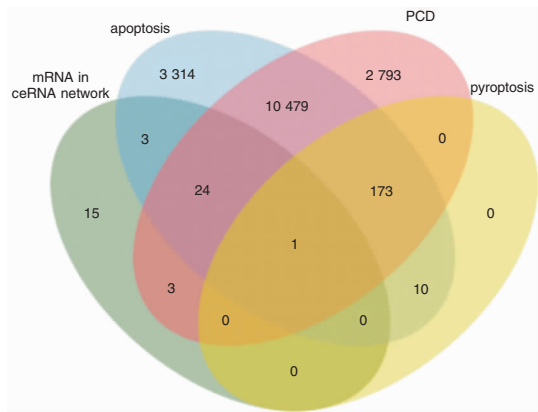


图5 韦恩图, ceRNA 网络中差异表达的 mRNA 与 PCD、细胞凋亡、细胞焦亡相关的 mRNA 之间的相互作用 注: PCD (程序性细胞死亡)。下同。

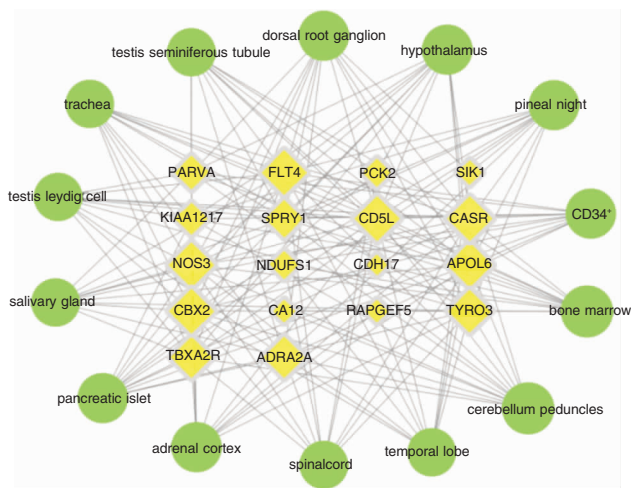


图7 ceRNA 网络中 mRNA 与靶器官定位网络的构建 注:黄色代表基因;绿色代表靶器官。节点大小由 degree 值决定。

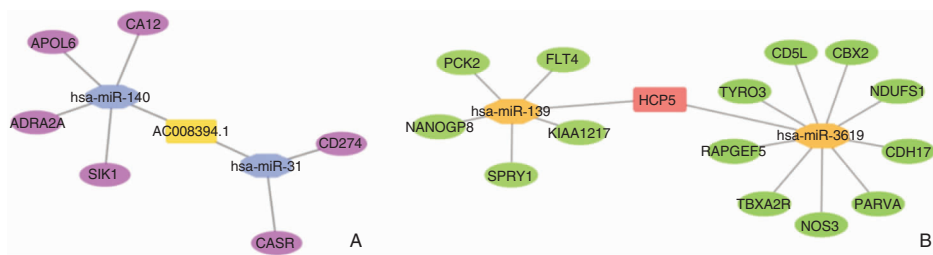


图6 PCD 相关基因 ceRNA 调控网络的构建 A:lncRNA 介导的下调 ceRNA 网络; B:lncRNA 介导的上调 ceRNA 网络 注:黄色表示 lncRNA 下调,红色表示 lncRNA 上调;浅蓝色表示 miRNA 上调,橘黄色代表 miRNA 下调;紫色代表 mRNA 下调,绿色代表 mRNA 上调。

网络与PCD相关基因相互作用后,鉴定到20个lncRNA介导的ceRNA调控通路。另外,将鉴定到的ceRNA网络中的mRNA进行靶器官定位分析发现,大多数靶标在神经免疫系统为主的相关组织器官中表达。

在上述ceRNA调控通路中,有几个枢纽节点已被证明在AR及相关免疫细胞中发挥关键作用。人类主要组织相容性复合体(human major histocompatibility complex, MHC),也被称为人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA),覆盖人类基因组的0.13%,跨越6号染色体短臂6p21位置,该区域包含超过250个注释基因和假基因^[11], *lncRNA HCP5*基因位于6p21.33区域中,人白细胞抗原HLA I类 β 区域内的ERV16元件中^[12]。在一项关于HCP5与转录因子相互作用的研究中,Warner等^[13]通过敲除*NF- κ B1*基因失活的研究中发现,HCP5、NOD2和IL-8与细胞活力下降密切相关。同时*NF- κ B1*(位于chr4上)调控他一些MHC基因的表达,从而影响多种生物学功能,包括与炎症疾病相关的错误激活、不适当的免疫细胞发育和细胞生长延迟。且它可以独立于大多数基因被激活或抑制。另外在探讨细胞因子对HCP5表达的影响时发现,在外周血单核细胞中IL-10能够下调HCP5的表达^[14],而IL-10在AR中低表达^[15],故推测HCP5可能在AR中表达增高,这与本研究结果一致。

目前对于HCP5通过ceRNA机制发挥作用的研究主要集中在肿瘤研究中,Cheng等^[16]在结直肠癌的研究中,应用荧光素酶报告基因分析,结果表明miR-139-5p是HCP5的直接靶点,HCP5通过激活ZEB1并与miR-139-5p相互作用,参与上皮-间充质转化。Zhang等^[17]研究发现HCP5通过靶向miR-140-5p/IGF1R通路促进透明细胞肾细胞癌的增殖和转移,HCP5作为一种相互竞争的内源性RNA,通过在ccRCC中海绵化miR-140-5p来调节IGF1R的表达。如在肺腺癌的研究中发现蛋白编码基因*CTSS*、*FGL2*和*PDL2*,*miR-106b-5p*和*miR-17-5b*及*lncRNA HCP5*形成了调控网络,从而HCP5通过与免疫检查点基因*PDL2*和抑制癌变的治疗靶点*FGL2*竞争,参与了肺癌的发生过程^[18]。HCP5通过海绵化miR-22-3p、miR-186-5p和miR-216a-5p发挥ceRNA功能,激活*ST6GAL2*,调节滤泡性甲状腺癌细胞的增殖、迁移、侵袭性和血管生成能力,从而促进滤泡性甲状腺癌进展^[19]。

ceRNA网络中的miRNA是重要的节点,Zhou

等^[20]通过qRT-PCR检测患者和小鼠鼻黏膜中miR-31的表达水平发现在AR患者中miR-31水平升高。Çeşmeci等^[21]对鼻息肉组织与邻近的正常鼻黏膜相比,发现鼻息肉组织中miR-31的平均水平升高,且在气道上皮细胞中高表达^[22]。另有miR-31对免疫细胞作用机制的研究,用miR-31转染CD4⁺T细胞可降低IL-2和IL-4的表达水平^[23],上述在AR及气道炎症中对于miR-31的研究结果,与本研究结果相同。在花粉季节期间和之外获取SAR患者CD4⁺T细胞,使用微阵列分析发现miR-139为差异表达的miRNA,结合共表达分析结果显示miR-139可能通过调节FOS和JUN影响SAR^[24]。另外,来自季节性AR患者的CD4⁺T细胞,应用芯片分析,结果提示miR-139-3p和miR-223可以发挥互补作用,靶向改变Th2细胞功能,影响Th2细胞因子的释放^[25]。既往对于miR-140的研究发现,在AR患者鼻黏膜中应用qRT-PCR检测*lnc-GAS5*、其靶基因miR-21和miR-140及干扰素- γ 、IL-2、IL-4和IL-10,结果显示在AR患者中*lnc-GAS5*升高,而miR-21和miR-140显著下调,干扰素- γ 和IL-2与*lnc-GAS5*呈正相,结果提示miR-140与AR的疾病风险、症状严重程度和Th1/Th2失衡相关^[26]。该研究结果与本研究不同,可能为选取检测组织样本不同,使得miR-140的表达存在差异,更需要进一步的验证。

ceRNA网络中的mRNA是最终发挥效应的主要节点,既往研究发现,血栓素A2受体(thromboxane A2 receptor, TBXA2R)是与慢性气道炎症有关的基因。多项研究都提示TBXA2R与呼吸道疾病哮喘间存在密切关系^[27-28],且TBXA2R中的rs8113232 SNP位点与哮喘儿童鼻炎之间存在关联^[29]。NOS3缺失导致卵清蛋白致敏小鼠出现中等强度的气道高反应。除了气道反应性的差异,在气道炎症程度、卵清蛋白特异性IgE水平方面没有差异^[30]。

为了进一步探讨AR中差异表达的mRNA生物学功能,我们对ceRNA中46个差异表达mRNA进行了GO和KEGG通路分析,我们发现这些mRNA在“钙信号通路”和“PI3K/AKT信号通路”中显著富集,这与之前的观点一致。免疫细胞中的钙信号通路参与细胞分化,基因转录和效应器功能的调节。细胞内钙离子水平(Ca^{2+})的增加是由于免疫感受器的参与,例如T细胞受体,B细胞受体和Fc受体,以及趋化因子和共刺激受体。诱导淋巴细胞中细胞内 Ca^{2+} 水平增加的主要途径是通过储存操作的钙

进入和钙释放激活的钙通道^[31]。肥大细胞通过释放组胺和炎症因子在 AR 的过敏性炎症中起关键作用,这一过程称为脱颗粒^[32],蛋白激酶 C 激活和胞质 Ca^{2+} 浓度升高的水平这两种途径可能共同激活肥大脱颗粒作用,故胞质 Ca^{2+} 浓度增加对肥大细胞脱颗粒有重要意义^[33]。Nian 等^[34]在研究过敏原激发的 NEC 与 AR 中肥大细胞脱颗粒之间的关联时发现,IL-33 及其受体 ST2 的表达在 NEC 中升高;同时在肥大细胞中 IL-33 降低了 LC3- I / II 和 Beclin-1 水平,增加了 p62 水平,表明 LAD2 细胞的自噬受到抑制,并验证了 IL-33 是通过 ST2/PI3K/mTOR 介导的自噬来促进 AR 中肥大细胞的脱颗粒。此外,构建的 ceRNA 网络中的 mRNA 在“ERK1 和 ERK2 级联”中显著富集。ERK2/ERK1 (也被称为 p42/p44MAPK,正式命名为 MAPK1 和 3),是两种细胞外信号调节激酶(ERK)的异构体,属于丝裂原活化蛋白激酶家族成员^[35]。Qin 等^[36]研究发现 AR 患者血清中 IL-36 和 Th17 细胞因子(IL-17 和 IL-23)的表达显著上调。而 IL-36 α 可通过介导 ERK 和 PI3K/AKT 通路,显著增加 Th17 细胞的转录因子 ROR γ t 的表达,并上调 PBMCs 对 IL-17 和 IL-23 的产生。且 IL-17 和 IL-23 可以促进 IL-36 α 的产生,形成一个正反馈回路,从而对 AR 发挥调控作用。另外有研究称 Ras/Raf/ERK 通路可诱导细胞凋亡,其作用机制包括调节 Bcl-2 蛋白家族控制细胞色素 c 的释放及促进 caspase-8 信号传导和激活等^[37]。因此,我们有理由假设,新构建的 ceRNA 网络可能通过调节 Ca^{2+} 转运在免疫细胞及细胞因子相互作用在 AR 中发挥作用。

基于对 ceRNA 网络中 mRNA 生物学功能的分析,结果提示相关机制与自噬及凋亡存在一定联系,故我们将 46 个 mRNA 与 PCD 相关基因相互取交集,探究特征性 PCD 在调节 AR 中发挥的作用。细胞死亡根据可控性分为 PCD 和非 PCD 两大类。炎症的发生多于 PCD 相关,但近年来的研究显示多种细胞死亡也受到程序性控制,多种 PCD 也与炎症发生相关。PCD 包括凋亡、自噬、坏死性凋亡、焦亡、铁死亡及细胞衰老等形式^[38]。在我们的研究中发现 ceRNA 网络中的 mRNA 主要与凋亡关系密切。凋亡在形态上会出现细胞皱缩、染色质凝集、凋亡小体形成和细胞骨架解离等特征。线粒体凋亡途径受控于 BCL2 蛋白家族,死亡受体途径受死亡受体的介导。而线粒体凋亡在特定条件下对炎症^[39]和天然免疫^[40]产生影响。既往研究发现,凋亡与 AR 相

关,包括对中性粒细胞凋亡^[41]、嗜酸性粒细胞^[42]、嗜碱性粒细胞^[43]和鼻上皮细胞凋亡^[44]等与 AR 发生间关系的研究。HCP5 与 miR-3619-5p 相互作用以调节胃癌(gastric cancer,GC)细胞的凋亡^[45]。新构建的 ceRNA 网络中的 mRNA,如巨噬细胞凋亡抑制剂又称 CD5L,主要由巨噬细胞分泌,其可在炎症反应和免疫抑制相关病理过程中重要发挥作用^[46],故我们推测 HCP5 可能通过 ceRNA 机制调节细胞凋亡从而对 AR 产生影响。最后,我们将新构建的 ceRNA 中的 mRNA 进行靶器官定位网路分析,显示 mRNA 主要在神经免疫系统为主的相关组织器官中表达,提示与神经、免疫等功能有关。

本研究通过 RNA 测序确定了来自 AR 组及对照组中差异表达的 lncRNA、miRNA 和 mRNA 数据,并构建了 ceRNA 网络,初步探索出 HCP5 介导的 ceRNA 网络可能通过影响细胞凋亡对 AR 发挥作用。研究仍存在一些局限性,首先选取的样本量较少,可能会影响结果的质量,且暂未对测序结果进行相关表达量及功能验证,进一步研究应扩大样本量并进行相关试验验证。其次,研究选取外周血成分相对复杂,结合既往研究,未来可针对相关免疫细胞进行筛选和验证。这些实验可能有助于了解 AR 的病理机制,帮助寻找 AR 治疗的潜在药物靶点。

参考文献:

- [1] Fico A, Fiorenzano A, Pascale E, et al. Long non-coding RNA in stem cell pluripotency and lineage commitment: functions and evolutionary conservation[J]. Cell Mol Life Sci, 2019,76(8):1459-1471.
- [2] Zhang H, Zhu X, Liu X, et al. Long non-coding RNA FOXD3-AS1 regulates the expression and secretion of IL-25 in nasal epithelial cells to inhibit Th2 type immunoreaction in allergic rhinitis [J]. Mol Cell Biochem,2020,473(1-2):239-246.
- [3] Sen R, Ghosal S, Das S, et al. Competing endogenous RNA; the key to posttranscriptional regulation[J]. Scientific World J,2014,2014:896206.
- [4] Yue L, Yin X, Hao F, et al. Long noncoding RNA Linc00632 inhibits interleukin-13-induced inflammatory cytokine and mucus production in nasal epithelial cells[J]. J Innate Immun,2020,12(1):116-128.
- [5] 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志编辑委员会鼻科组,中华医学会耳鼻咽喉头颈外科学分会鼻科学组. 变应性鼻炎诊断和治疗指南(2015 年,天津)[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志,2016,51(1):6-24.
- [6] Zhang W, Tao Q, Guo Z, et al. Systems pharmacology dissection of the integrated treatment for cardiovascular and gastrointestinal

- disorders by traditional Chinese medicine[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 32400.
- [7] Prevorsek Z, Gorjanc G, Paigen B, et al. Congenic and bioinformatics analyses resolved a major-effect Fob3b QTL on mouse Chr 15 into two closely linked loci[J]. *Mamm Genome*, 2010, 21(3-4): 172-185.
- [8] Suh SY, An WG. Systems pharmacological approach of Pulsatillae radix on treating crohn's disease[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2017, 2017: 4198035.
- [9] Pakkasela J, Ilmarinen P, Honkamäki J, et al. Age-specific incidence of allergic and non-allergic asthma[J]. *BMC Pulm Med*, 2020, 20(1): 9.
- [10] 王宇婷, 王嘉玺. 长链非编码 RNA 在变应性鼻炎中的生物学机制研究进展[J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2022, 28(1): 58-64.
- [11] Shiina T, Hosomichi K, Inoko H, et al. The HLA genomic loci map: expression, interaction, diversity and disease[J]. *J Hum Genet*, 2009, 54(1): 15-39.
- [12] Shiina T, Tamiya G, Oka A, et al. Nucleotide sequencing analysis of the 146-kilobase segment around the IkbL and MICA genes at the centromeric end of the HLA class I region[J]. *Genomics*, 1998, 47(3): 372-382.
- [13] Warner N, Burberry A, Pliakas M, et al. A genome-wide small interfering RNA (siRNA) screen reveals nuclear factor- κ B (NF- κ B)-independent regulators of NOD2-induced interleukin-8 (IL-8) secretion[J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(41): 28213-28224.
- [14] Teles RMB, Graeber TG, Krutzik SR, et al. Type I interferon suppresses type II interferon-triggered human anti-mycobacterial responses[J]. *Sci*, 2013, 339(6126): 1448-1453.
- [15] Boonpiyathad T, Tantilipikorn P, Ruxrungtham K, et al. IL-10-producing innate lymphoid cells increased in patients with house dust mite allergic rhinitis following immunotherapy[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2021, 147(4): 1507-1510.
- [16] Yang C, Sun J, Liu W, et al. Long noncoding RNA HCP5 contributes to epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer through ZEB1 activation and interacting with miR-139-5p[J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(2): 953-963.
- [17] Zhang YJ, Lu C. Long non-coding RNA hep5 promotes proliferation and metastasis of clear cell renal cell carcinoma via targeting mir-140-5p/igf1r pathway[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(1): 2965-2975.
- [18] Wei Y, Yan Z, Wu C, et al. Integrated analysis of dosage effect lncRNAs in lung adenocarcinoma based on comprehensive network[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(42): 71430-71446.
- [19] Liang L, Xu J, Wang M, et al. LncRNA HCP5 promotes follicular thyroid carcinoma progression via miRNAs sponge[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(3): 372.
- [20] Zhou F, Liu P, Lv H, et al. miR-31 attenuates murine allergic rhinitis by suppressing interleukin-13-induced nasal epithelial inflammatory responses[J]. *Mol Med Rep*, 2021, 23: 42.
- [21] Çeşmeci E, Erkul E, Çekin E, et al. The expression levels of microRNA-31, microRNA-125a and microRNA-125b in chronic rhinosinusitis with nasal polyp[J]. *Hamidiye Med J*, 2020, 1(3): 101-105.
- [22] Ramachandran S, Karp PH, Jiang P, et al. A microRNA network regulates expression and biosynthesis of wild-type and Δ F508 mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(33): 13362-13367.
- [23] Heide VV, Möhnle P, Rink J, et al. Down-regulation of microRNA-31 in CD4⁺ T cells contributes to immunosuppression in human sepsis by promoting TH2 skewing[J]. *Anesthesiology*, 2016, 124(4): 908-922.
- [24] Liu Y, Shi J, Chen X. Identification of novel targets for seasonal allergic rhinitis during and outside the pollen season by microarray analysis[J]. *Acta Otolaryngol*, 2015, 135(12): 1330-1336.
- [25] Chavali S, Bruhn S, Tiemann K, et al. MicroRNAs act complementarily to regulate disease-related mRNA modules in human diseases[J]. *RNA*, 2013, 19(11): 1552-1562.
- [26] Song J, Wang T, Chen Y, et al. Long non-coding RNA growth arrest-specific 5 and its targets, microRNA-21 and microRNA-140, are potential biomarkers of allergic rhinitis[J]. *J Clin Lab Anal*, 2021, 35(10): e23938.
- [27] Kim JH, Lee SY, Kim HB, et al. TBXA2R gene polymorphism and responsiveness to leukotriene receptor antagonist in children with asthma[J]. *Clin Exp Allergy*, 2008, 38(1): 51-59.
- [28] Buroker NE. TBXA2R rSNPs, transcriptional factor binding sites and asthma in Asians[J]. *J Pediatr*, 2014, 4(2): 46470.
- [29] Kavalir MS, Balantic M, Silar M, et al. Association of ORMDL3, STAT6 and TBXA2R gene polymorphisms with asthma[J]. *Int J Immunogenet*, 2012, 39(1): 20-25.
- [30] De Sanctis GT, MacLean JA, Hamada K, et al. Contribution of nitric oxide synthases 1, 2, and 3 to airway hyperresponsiveness and inflammation in a murine model of asthma[J]. *J Exp Med*, 1999, 189(10): 1621-1630.
- [31] Feske S. Calcium signalling in lymphocyte activation and disease[J]. *Nat Rev Immunol*, 2007, 7(9): 690-702.
- [32] Amin K. The role of mast cells in allergic inflammation[J]. *Respir Med*, 2012, 106(1): 9-14.
- [33] Vig M, Kinet JP. Calcium signaling in immune cells[J]. *Nat Immunol*, 2009, 10(1): 21-27.
- [34] Nian JB, Zeng M, Zheng J, et al. Epithelial cells expressed IL-33 to promote degranulation of mast cells through inhibition on ST2/PI3K/mTOR-mediated autophagy in allergic rhinitis[J]. *Cell Cycle*, 2020, 19(10): 1132-1142.
- [35] Ramos JW. The regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in mammalian cells[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008, 40(12): 2707-2719.
- [36] Qin X, Zhang T, Wang C, et al. IL-36 α contributes to enhanced T helper 17 type responses in allergic rhinitis[J]. *Cytokine*, 2020, 128: 154992.
- [37] Cagnol S, Chambard JC. ERK and cell death: mechanisms of ERK-induced cell death-apoptosis, autophagy and senescence[J]. *FEBS J*, 2010, 277(1): 2-21.
- [38] Yang Y, Jiang G, Zhang P, et al. Programmed cell death and its

role in inflammation[J]. Mil Med Res,2015,2;12.

[39] McArthur K, Whitehead LW, Heddleston JM, et al. BAK/BAX macropores facilitate mitochondrial herniation and mtDNA efflux during apoptosis[J]. Science,2018,359(6378):eaa06047.

[40] Giampazolias E, Zunino B, Dhayade S, et al. Mitochondrial permeabilization engages NF-κB-dependent anti-tumour activity under caspase deficiency[J]. Nat Cell Biol,2017,19(9):1116 – 1129.

[41] Kim EH, Lee JS, Lee NR, et al. Regulation of constitutive neutrophil apoptosis due to house dust mite allergen in normal and allergic rhinitis subjects[J]. PLoS One,2014,9(9):e105814.

[42] Zeng Q, Zeng Y, Tang Y, et al. Effect of IL-35 on apoptosis, adhesion, migration and activation of eosinophils in allergic rhinitis [J]. Pediat Allerg Immunol,2021,33(2):e13717.

[43] Wang H, Mobini R, Fang Y, et al. Allergen challenge of peripheral blood mononuclear cells from patients with seasonal allergic rhinitis increases IL-17RB, which regulates basophil apoptosis and degranulation[J]. Clin Exp Allergy,2010,40(8):1194 – 1202.

[44] Fan Y, Tang Z, Sun J, et al. MicroRNA-29a promotes the proliferation of human nasal epithelial cells and inhibits their apoptosis and promotes the development of allergic rhinitis by down-regulating FOS expression[J]. PloS One,2021,16(8):e0255480.

[45] Wu H, Liu B, Chen Z, et al. MSC-induced lncRNA HCP5 drove fatty acid oxidation through miR-3619-5p/AMPK/PGC1α/CEBPB axis to promote stemness and chemo-resistance of gastric cancer [J]. Cell Death Dis,2020,11(4):233.

[46] Gao X, Yan X, Yin Y, et al. Therapeutic targeting of apoptosis inhibitor of macrophage/CD5L in sepsis[J]. Am J Resp Cell Mol, 2019,60(3):323 – 334.

(收稿日期:2022 – 02 – 08)

本文引用格式:王宇婷,姜辉,王嘉玺. 变应性鼻炎中 lncRNA-miRNA-mRNA 网络构建与相关程序性细胞死亡基因的分析[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志,2023,29(3):54 – 63. DOI:10. 11798/j. issn. 1007 – 1520. 202322041

Cite this article as;WANG Yuting, JIANG Hui, WANG Jiayi. Construction of lncRNA-miRNA-mRNA network and analysis of programmed cell death-related genes in allergic rhinitis[J]. Chin J Otorhinolaryngol Skull Base Surg, 2023,29(3):54 – 63. DOI:10. 11798/j. issn. 1007 – 1520. 202322041