

miRNA 靶基因 3'-UTR 单核苷酸多态性在缺血性脑卒中的研究进展

王彬茹, 马英

川北医学院附属医院神经内科, 四川 南充 637000

摘要:缺血性脑卒中 (IS) 是脑组织缺血坏死引起的神经功能障碍性疾病, 其发生发展是遗传因素和环境危险因素共同作用的结果。微小 RNA (miRNA) 通过与靶基因 mRNA 3'端非编码区 (3'-UTR) 碱基配对, 引起靶基因 mRNA 的降解或翻译抑制, 在转录后水平调控基因表达。IS 相关基因 miRNA 靶区存在的单核苷酸多态性 (SNPs) 与 IS 的遗传易感性和预后有关。该文拟对 miRNAs 靶基因 (VEGF、IL-1、NLRP3、MTHFR、PON1、BDNF、CRP、HDAC9) 3'-UTR SNPs 与 IS 遗传易感性和预后的关联做一综述。

关键词:缺血性脑卒中; 微小 RNA; 单核苷酸多态性; 3'端非编码区

中图分类号: R743.3

DOI: 10.16636/j.cnki.jinn.2020.03.022

Research progress in single nucleotide polymorphisms in the 3'-UTR of miRNA target gene in ischemic stroke

WANG Bin-Ru, MA Ying. Department of Neurology, the Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan 637000, China

Corresponding author: MA Ying, Email: yingma1314@126.com

Abstract: Ischemic stroke (IS) is a neurological dysfunction caused by the avascular necrosis of brain tissues, and its development and progression are the result of both genetic and environmental factors. MicroRNA (miRNA) regulates gene expression at the post-transcriptional level through pairing with the 3'-untranslated region (3'-UTR) of the target gene mRNA, which leads to degradation or translation inhibition of the target gene mRNA. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the miRNA target regions of IS-related genes are associated with genetic susceptibility and prognosis of IS. This article reviews the association between the SNPs in the 3'-UTRs of miRNA target genes (VEGF, IL-1, NLRP3, MTHFR, PON1, BDNF, CRP, and HDAC9) and genetic susceptibility and prognosis of IS.

Key words: ischemic stroke; microRNA; single nucleotide polymorphisms; 3'-untranslated region

缺血性脑卒中 (ischemic stroke, IS) 是最常见的卒中类型, 具有发病率高、死亡率高、致残率高、复发率高等特点, 其发病受多基因遗传因素影响^[1]。中枢神经系统存在大量微小 RNAs (microRNAs, miRNAs), 参与神经细胞的发育、分化和生理功能调控^[2]。miRNAs 的表达失调与 IS 的炎症、兴奋性毒性、氧化应激、凋亡、血脑屏障损伤、血管生成等病理生理过程相关^[3]。单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphisms, SNPs) 是基因组水平上因单个核苷酸的变异/突变所引起的 DNA 序列多

态性, 是人类基因组最普遍的基因突变。IS 相关基因 3'端非编码区 (3'-untranslated region, 3'-UTR) 的 SNPs 影响 miRNAs 与靶基因相互作用, 这些 SNPs 与 IS 易感性及预后存在关联。因此, 对 IS 相关基因 3'-UTR 的 SNPs 进行研究, 探索其在 IS 发生、发展过程的作用以及其治疗和对预后影响, 对明确 IS 遗传分子学机制、制定防治策略具有重要意义。

1 miRNA 靶位点的 SNPs

miRNAs 是一组内源性非编码小分子单链 RNA, 其生物合成过程包括微处理复合物的加工、

基金项目:国家自然科学基金 (81400966); 四川省教育厅科研基金重点项目 (15ZA0209); 南充市研发资金项目 (NSMC20170427)

收稿日期:2020-01-10; **修回日期:**2020-04-13

作者简介:王彬茹 (1991-), 女, 研究生在读, 研究方向: 脑血管疾病。

通信作者:马英 (1979-), 女, 教授, 博士, 硕士研究生导师, 研究方向: 脑血管疾病。Email: yingma1314@126.com。

核输出和 Dicer 酶处理,成熟的 miRNA 与 AGO (Argonaute) 蛋白形成 RNA 诱导的沉默复合物 (RNA induced silencing complex, RISC)。miRNAs 可与基因启动子区域结合,对组蛋白进行修饰,在转录水平上调控基因表达;通过 RISC 与靶 mRNA 3'-UTR 区完全或不完全互补配对,使靶 mRNA 降解,从而引起靶基因翻译抑制,最终参与调控下游分子信号通路。已有研究证实靶基因 3'-UTR 存在 SNPs,这些 SNPs 通过改变原有 miRNAs 的结合位点或产生新结合位点,影响 miRNAs 对基因的转录后调控,导致相关基因的表型改变^[4]。

2 IS 相关基因 3'-UTR 的 SNPs

随着生物遗传信息学的发展及全新的检测手段,目前已有许多关于 IS 相关基因编码区 SNPs 的功能性研究,但位于 miRNAs 结合位点 3'-UTR SNPs 与 IS 关联性 & 功能性研究相对较少。现已报道与 IS 相关且 3'-UTR 存在 SNPs 的基因有血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、白细胞介素-1 (interleukin-1, IL-1)、NOD 样受体家族蛋白 3 (nod-like receptor protein 3, NLRP3)、亚甲基四氢叶酸还原酶 (methylenetetrahydrofolate reductase, MTHFR)、对氧磷酶 1 (paraoxonase 1, PON1)、脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、C 反应蛋白 (C-reaction protein, CRP) 和组蛋白去乙酰化酶 9 (recombinant histone deacetylase 9, HDAC9)。

2.1 VEGF

VEGF 是血管生成和内皮细胞增殖的主要调节因子,参与神经保护、神经发生、血管生成、血管修复^[5-6]。VEGF 基因 3'-UTR 存在多个 SNPs,包括 rs3025040、rs3025039、rs10434、rs3025053,其中 rs3025040、rs3025039 已被证实与 IS 相关。有研究表明,rs3025039 与 VEGF 的表达水平相关^[7],Binod 等^[8]的病例对照研究发现 rs3025039 与 IS 风险增加相关。而 Zhao 等^[9]的研究结果表明,rs3025039 基因型与 IS 的易感性及卒中严重程度无显著关联,但 rs3025039 TC + TT 基因型与 CC 基因型相比预后不良的风险增加 1.99 倍。该研究观察到 rs3025040 与 rs3025039 表现出很强的连锁不平衡 ($r_2 = 1.0$)。进一步荧光素酶分析发现,rs3025040 T 等位基因显著降低 4 种细胞的荧光素酶活性,表明 rs3025039 影响 miR-199a 和 miR-199b 与 rs3025040 多态位点 VEGF mRNA 的结合,

导致 VEGF 的低水平表达,从而增加 IS 预后不良的风险。

2.2 IL-1

IL-1 是脑缺血损伤后关键的炎症调节因子,主要通过 IL-1 α 和 IL-1 β 两种亚型起作用^[10]。Wang 等^[11]的病例对照研究发现年龄、高血压、血清总胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白、rs3783553 ins/ins 基因型是 IS 的独立危险因素。进一步实验证明,rs3783553 影响 miR-122 与 IL-1 α mRNA 的结合,导致 IL-1 α 水平升高,最终增加 IS 的患病风险。Yang 等^[12]通过病例对照研究和体外细胞实验发现,IL-1 β -511 TT/CC 基因型通过调节 NF- κ B miRNA、iNOS、MMP-2 和 Bax 蛋白表达影响 IS 的发病风险。

2.3 NLRP3

NLRP3 炎症体在小胶质细胞、星形胶质细胞、神经元、内皮细胞等细胞中多样性表达,可通过激活免疫炎症反应参与动脉粥样硬化、心肌梗死和 IS 的病理生理过程^[13-14]。据报道 NLRP3 mRNA 3'-UTR 中含有 miR-223 结合位点,在小胶质细胞激活过程中 miR-223 可下调 NLRP3 表达,通过 Caspase-1 和 IL-1 抑制炎症反应、减轻脑水肿及改善神经功能^[15]。rs10754558 多态性位于 NLRP3 的 3'-UTR, Zhu 等^[16]发现, NLRP3 rs10754558 G 等位基因可能干扰 miR-223 主要的结合位点,影响 mRNA 与 miR-223 结合,从而上调 NLRP3 的转录。该实验结果表明, NLRP3 rs10754558 可能影响中国汉族人群的 IS 的患病风险,但缺乏在其他人群复制研究和体内功能学实验验证。

2.4 MTHFR

MTHFR 是同型半胱氨酸 (homocysteine, Hcy) 和叶酸代谢的关键酶,降低 MTHFR 酶活性可增加血浆 Hcy 水平,降低血浆叶酸水平,促进卒中的发展。Jung 等^[17]通过病例对照研究发现, MTHFR 3'-UTR rs4846049 和 rs4846048 与心源性 IS 的患病风险显著相关 (MTHFR rs4846049 CC vs CA + AA: $OR = 2.145$, 95% $CI = 1.203 \sim 3.827$, $P = 0.010$; MTHFR rs4846048 TT vs CC: $OR = 10.146$, 95% $CI = 1.297 \sim 79.336$, $P = 0.027$)。He 等^[18]以 500 名 IS 患者和 600 名健康对照者为研究对象,检测 MTHFR 3'-UTR 五个 SNPs,发现其中 rs868014 TC/CC 基因型与 IS 的患病风险和短期不良预后显著相关。进一步实验证明, MTHFR rs868014 TC/

CC 基因型可促进 miR-1203 结合,导致 MTHFR 在细胞中低水平表达,增加罹患 IS 的风险。Shi 等^[19]研究发现,MTHFR rs141884651 GA/AA 基因型与 IS 的患病风险显著相关(GA 基因型 $OR = 0.68$, $95\% CI = 0.22 \sim 0.87$, $P = 0.02$; AA 基因型 $OR = 0.45$, $95\% CI = 0.29 \sim 0.58$, $P = 0.001$), A 等位基因为 IS 保护因素($OR = 0.57$, $95\% CI = 0.29 \sim 0.69$, $P = 0.002$)。根据双荧光素酶测定,rs141884651 减弱 let-7f 和 miR-196a 与靶基因 mRNA 的结合,从而负向调节 MTHFR 表达。

2.5 PON1

PONs 是钙依赖性水解酶家族,主要由 PON1、PON2 和 PON3 基因组成,PON1 基因多态性占个体间变异的 60% 以上^[20],PON1 的 SNPs 与冠状动脉疾病、糖尿病、IS 等多种疾病相关^[21-22]。Liu 等^[23]研究发现,PON1 rs3735590 不同基因型(CC、CT、TT)的 miR-616 和 PON1 的结合存在差异,C 等位基因通过干扰 mRNA-miRNA 结合导致 PON1 的低表达,从而增加 IS 的患病风险。

2.6 BDNF

BDNF 是神经营养蛋白家族成员,参与调节正常神经元活性和卒中后恢复,包括细胞增殖和分化、轴突和树突生长、突触可塑性、血管生成以及周围和中枢神经元的发生^[24]。Liu 等^[25]通过病例对照研究发现,BDNF 3'-UTR rs712442 与 IS 的短期预后相关,利用荧光素酶测定证实,rs712442 多态性改变 miR-922 与 BDNF mRNA 的结合,使得 TC 或 CC 基因型患者相对 TT 基因型的 BDNF 的表达水平升高,从而帮助神经功能的恢复,其结果表明 rs712442 可能是 IS 短期预后的保护因素。

2.7 CRP

CRP 是由肝脏合成的血浆蛋白,通常被认为是一种炎性标记物,是 IS 功能预后的独立预测因子^[26]。Elena 等^[27]通过生物信息学分析选取了 30 个炎症相关基因的 68 个 SNPs,在 1987 例 IS 患者和 698 例健康对照中进行筛查,发现,包括 CRP 3'-UTR rs1205 在内的 3 个 SNPs 与心源性卒中相关。而 Wu 等^[28]实验表明,rs1205 杂合子携带者的 IS 患病风险显著低于野生纯合基因型。Zhang 等^[29]纳入 378 例 IS 患者和 613 例健康对照组进行研究,检测包括 rs1205 在内的 4 个 CRP SNPs,结果显示其中 3 个 SNPs(rs876537、rs1205 和 rs3093059)与血浆 CRP 水平显著相关。以上实验

均对 CRP rs1205 做了人群的基因分型研究,但缺乏其机制的实验证据。

2.8 HDAC9

HDAC9 主要介导调节乙酰化和去乙酰化,通常在脑和骨骼肌中高水平表达,可通过增加炎症反应、细胞凋亡、内皮细胞通透性障碍以及降低紧密连接蛋白的表达,导致氧-葡萄糖剥夺,从而诱导脑微血管内皮细胞功能障碍^[30]。最近的几项全基因组关联分析(genome-wide association study, GWAS)数据已经确定,HDAC9 基因多态性与大血管 IS 密切相关^[31]。Rainer 等^[32]通过分析来自欧洲、澳大利亚和南亚共 3127 例 IS 患者和 9778 例正常对照的基因,确认 HDAC9 是大动脉粥样硬化型脑梗死(large-artery atherosclerosis stroke, LAS)的主要危险基因,并发现 3'-UTR rs2023938 与 LAS 相关。

3 其他 IS 相关基因 miRNAs 靶位点的 SNPs

目前仍有许多卒中相关基因待确定,最近一项 GWAS 研究共总结了 214 个基因,其中包括 120 个卒中相关基因,62 个可能导致卒中但暂无卒中患者人群研究的相关基因以及来自 GWAS 最新报道的 32 个卒中相关的基因可用于临床表型描述^[33]。国际卒中遗传学联盟发起一项超过 52 万人的队列研究,该研究鉴定了 32 个与卒中发病机制密切相关的基因,其中 10 个在国际研究中曾被报道,而其余 22 个是既往未经报道的卒中相关的基因区域^[34]。但目前的研究重点多放在全基因组测序和对外显子的检测,非编码区(包括 3'-UTR)的多态性尚未被重视,卒中相关基因 3'-UTR SNPs 与 IS 易感功能性研究也有待进一步探索。

4 miRNAs 及其结合位点 SNPs 在 IS 的治疗

miRNA 与靶基因结合可能改变药物反应蛋白的表达,影响药物的吸收、代谢以及分布,miRNAs 结合位点的 SNPs 可能导致耐药或药物敏感^[35]。Sennblad 等^[36]利用计算机模拟预测工具设计了 4 个 FXI 3'-UTR SNPs 单倍型,探索 miR-145 或 miR-181 对 FXI 调节机制,其实验结果显示 miR-145 或 miR-181 的过表达可显著降低含有 FXI 3'-UTR 质粒转染细胞的荧光素酶活性,表明 miR-145 或 miR-181 通过靶向 F11 mRNA 的 3'-UTR 调节 FXI 的表达水平,但未发现这些 SNPs 对 miRNA-mRNA 的结合具有功能性作用。该研究结果为预防血栓提供新的治疗方向,使 miRNAs 拮抗剂治疗 IS 成为可能。

5 结语与展望

目前对 miRNAs 靶基因 3'-UTR 的 SNPs 与 IS 的研究主要包括关联性分析和功能验证两方面,通过将人群研究与体内外实验研究相结合,以期发现 SNPs 与 IS 关联的同时探索其分子生物学机制。但是一个 miRNA 可以调控多个靶基因,一个基因也可受到多个 miRNAs 的调控;miRNAs 靶基因可参与 IS 的不同信号通路,形成复杂的调控网络。目前有关 miRNAs 的研究主要集中在单个 miRNA 与其靶基因及 SNPs 之间的功能验证上,然而对 miRNAs 的调控网络进行探索才能详细了解其复杂的转录后调控机制,以期为 IS 的诊断、治疗、预后提供更有价值的科学依据。

参 考 文 献

- [1] Wu S, Wu B, Liu M, et al. Stroke in China: advances and challenges in epidemiology, prevention, and management [J]. *Lancet Neurol*, 2019, 18(4): 394-405.
- [2] Quinlan S, Kenny A, Medina M, et al. MicroRNAs in Neurodegenerative Diseases[J]. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2017, 334: 309-343.
- [3] Li G, Morris-Blanco KC, Lopez MS, et al. Impact of microRNAs on ischemic stroke: From pre- to post-disease[J]. *Progr Neurobiol*, 2017, 163-164: 59-78.
- [4] Mullany LE, Herrick JS, Wolff RK, et al. Single nucleotide polymorphisms within MicroRNAs, MicroRNA targets, and MicroRNA biogenesis genes and their impact on colorectal cancer survival[J]. *Genes Chrom Cancer*, 2017, 56(4): 285-295.
- [5] Jean Leblanc N, Guruswamy R, Elali A. Vascular Endothelial Growth Factor Isoform-B Stimulates Neurovascular Repair After Ischemic Stroke by Promoting the Function of Pericytes via Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1[J]. *Mol Neurobiol*, 2018, 55(5): 3611-3626.
- [6] Geiseler SJ, Morland C. The Janus Face of VEGF in Stroke[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(5): 1362.
- [7] Klimontov VV, Tyan NV, Orlov NB, et al. Association of Serum Levels and Gene Polymorphism of Vascular Endothelium Growth Factor With Ischemic Heart Disease in Type 2 Diabetic Patients[J]. *Kardiologiia*, 2017, 57(5): 17-22.
- [8] Yadav BK, Yadav R, Chang H, et al. Genetic Polymorphisms rs699947, rs1570360, and rs3025039 on the VEGF Gene Are Correlated with Extracranial Internal Carotid Artery Stenosis and Ischemic Stroke[J]. *Ann Clin Lab Sci*, 2017, 47(2): 144-155.
- [9] Zhao J, Bai Y, Jin L, et al. A functional variant in the 3'-UTR of VEGF predicts the 90-day outcome of ischemic stroke in Chinese patients [J]. *PLoS One*, 2017, 12(2): e0172709.
- [10] Salmeron K, Aihara T, Redondo-castro E, et al. IL-1 alpha induces angiogenesis in brain endothelial cells in vitro: implications for brain angiogenesis after acute injury[J]. *J Neurochem*, 2016, 136(3): 573-580.
- [11] Wang P, He Q, Liu C, et al. Functional polymorphism rs3783553 in the 3'-untranslated region of IL-1A increased the risk of ischemic stroke: A case-control study[J]. *Medicine*, 2017, 96(46): e8522.
- [12] Yang B, Zhao H, Bin X, et al. Influence of interleukin-1 beta gene polymorphisms on the risk of myocardial infarction and ischemic stroke at young age in vivo and in vitro[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(11): 13806-13813.
- [13] 曹赠,李亚培,陈瑞芳,等. NLRP3 炎症体在血管疾病中的作用[J]. *中南大学学报(医学版)*, 2016, 41(11): 1232-1236.
- [14] Tong Y, Ding ZH, Zhan FX, et al. The NLRP3 inflammatory and stroke[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(4): 4787-4794.
- [15] Yang Z, Zhong L, Xian R, et al. MicroRNA-223 regulates inflammation and brain injury via feedback to NLRP3 inflammasome after intracerebral hemorrhage [J]. *Mol Immunol*, 2015, 65(2): 267-276.
- [16] Zhu Z, Yan J, Geng C, et al. A Polymorphism Within the 3'UTR of NLRP3 is Associated with Susceptibility for Ischemic Stroke in Chinese Population [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2016, 36(6): 981-988.
- [17] Kim JO, Park HS, Ryu CS, et al. Interplay between 3'-UTR polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene and the risk of ischemic stroke[J]. 2017, 7(1): 12464.
- [18] He W, Lu M, Li G, et al. Methylene Tetrahydrofolate Reductase (MTHFR) rs868014 Polymorphism Regulated by miR-1203 Associates with Risk and Short Term Outcome of Ischemic Stroke [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 41(2): 701-710.
- [19] Shi J, He W, Wang Y, et al. Tagging Functional Polymorphism in 3'Untranslated Region of Methylene Tetrahydrofolate Reductase and Risk of Ischemic Stroke[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 46(3): 1019-1026.
- [20] Wei LK, Au A, Menon S, et al. Polymorphisms of MTHFR, eNOS, ACE, AGT, ApoE, PON1, PDE4D, and Ischemic Stroke: Meta-Analysis [J]. *J Stroke Cerebrov Dis*, 2017, 26(11): 2482-2493.
- [21] Szpakowicz A, Pepinski W, Waszkiewicz E, et al. The influence of renal function on the association of rs854560 polymorphism of paraoxonase 1 gene with long-term prognosis in patients after myocardial infarction [J]. *Heart Vessels*,

2016, 31(1): 15-22.

- [22] Emami A, Tajadini M, Zeinalian M, et al. Paraoxonase 1 activities and its gene promoter single nucleotide polymorphisms (-108, -126, and -162) in diabetes mellitus [J]. Interv Med Appl Sci, 2018, 10(1): 27-32.
- [23] Liu ME, Liao YC, Lin RT, et al. A functional polymorphism of PON1 interferes with microRNA binding to increase the risk of ischemic stroke and carotid atherosclerosis [J]. Atherosclerosis, 2013, 228(1): 161-167.
- [24] Berretta A, Tzeng YC, Clarkson AN. Post-stroke recovery: the role of activity-dependent release of brain-derived neurotrophic factor [J]. Exp Rev Neurother, 2014, 14(11): 1335-1344.
- [25] Liu BH, He W, Liu DH. Functional BDNF rs7124442 Variant Regulated by miR-922 is Associated with Better Short-Term Recovery of Ischemic Stroke [J]. Ther Clin Risk Manag, 2019, 15: 1369-1375.
- [26] Ye Z, Zhang H, Sun L, et al. GWAS-Supported CRP Gene Polymorphisms and Functional Outcome of Large Artery Atherosclerotic Stroke in Han Chinese [J]. Neuromolecular Med, 2018, 20(2): 225-232.
- [27] Elena M, Jurek K, Caty C, et al. An Inflammatory Polymorphisms Risk Scoring System for the Differentiation of Ischemic Stroke Subtypes [J]. Med Inflamm, 2015, 2015: 1-7.
- [28] Wu Z, Huang Y, Huang J, et al. Impact of CRP gene and additional gene-smoking interaction on ischemic stroke in a Chinese Han population [J]. Neurol Res, 2017, 39(5): 442-447.
- [29] Zhang X, Wang A, Zhang J, et al. Association of plasma C-reactive protein with ischaemic stroke: a Mendelian randomization study [J]. Eur J Neurol, 2020, 27(3): 565-571.
- [30] Guo QG, Zhang Y, Xu JN, et al. Association Between the Gene Polymorphisms of HDAC9 and the Risk of Atherosclerosis and Ischemic Stroke [J]. Pathol Oncol Res, 2016, 22(1): 103-107.
- [31] Zhou X, Guan T, Li S, et al. The association between HDAC9 gene polymorphisms and stroke risk in the Chinese population: A meta-analysis [J]. Scientific reports, 2017, 7(1): 2095-2128.
- [32] Malik R, Dau T, Gonik M, et al. Common coding variant in SERPINA1 increases the risk for large artery stroke [J]. Proc Natl Acad, 2017, 114(14): 3613-3618.
- [33] Llinca A, Samuelsson S, Piccinelli, et al. A stroke gene panel for whole-exome sequencing [J]. Eur J Hum Genet, 2018, 27(2): 317-324.
- [34] Malik R, Chauhan G, Traylor M, et al. Multiancestry genome-wide association study of 520,000 subjects identifies 32 loci associated with stroke and stroke subtypes [J]. Nat Genet, 2018, 50(4): 524-537.
- [35] Swart M, Dandara C. Genetic variation in the 3'-UTR of CYP1A2, CYP2B6, CYP2D6, CYP3A4, NR1I2, and UGT2B7: potential effects on regulation by microRNA and pharmacogenomics relevance [J]. Front Genet, 2014, 4(5): 167.
- [36] Sennblad B, Basu S, Mazur J, et al. Genome-wide association study with additional genetic and post-transcriptional analyses reveals novel regulators of plasma factor XI levels [J]. Human Mol Genet, 2017, 26(3): 637-649.