

· 论著 ·

(文章编号) 1007-0893(2021)04-0001-04

DOI: 10.16458/j.cnki.1007-0893.2021.04.001

高通量测序分析钙化性肌腱炎患者 microRNA 表达谱的差异

赵 喆 刘建全* 邓志钦 李文翠

(深圳市第二人民医院 深圳大学第一附属医院, 广东 深圳 518035)

[摘要] **目的:** 探讨 microRNA 在钙化性肌腱炎 (CT) 患者中的表达差异。**方法:** 选取 2019 年 10 月至 2020 年 5 月在深圳市第二人民医院骨科确诊为 CT 并接受手术治疗的患者 4 例, 每例患者均取其炎症肌腱组织 (CT 组) 及炎旁正常组织 (Ctr 组), 提取总 RNA 并进行转录组测序, 采用 Illumina HiSeq 2500 高通量测序技术进行深度测序, 筛选在两组组织中差异表达的 microRNA, 并进行功能分析。**结果:** 与正常肌腱组织比较, 在 $P < 0.05$ 、 \log_2 差异倍数 (FC) 绝对值 ≥ 2 条件下, CT 组共有 760 个 microRNA 表达有显著差异。其中 104 个 microRNA 的 $|\log_2(FC)| > 2$, 其中 24 个显著上调, 80 个显著下调。上调表达最明显的是 miR-3529-5p, 为 5.9136 倍。在下调表达最明显的是 miR-486-5p, 为 10.0018 倍。该类 microRNA 调控的 COL1A1、GOLGA2、S100A16、SOX9、FOXO1 等靶基因与离子结合和转运、钙通道活性、蛋白激酶活性和代谢功能密切相关。**结论:** CT 组织与正常肌腱组织 microRNA 表达谱存在明显差异, 差异表达的 microRNA 可能在 CT 的形成中具有重要作用, 为继续研究这些 microRNA 在 CT 中的作用机制打下基础。

[关键词] 钙化性肌腱炎; microRNA; 高通量测序; 生物信息学

[中图分类号] R 686.1 **[文献标识码]** A

Analysis of Differential MicroRNA Expression in Patient with Calcifying Tendinitis through High-throughput Sequencing Technologies

ZHAO Zhe, LIU Jian-quan*, DENG Zhi-qin, LI Wen-cui

(Shenzhen Second People's Hospital, The First Affiliated Hospital of Shenzhen University, Guangdong Shenzhen 518035)

[Abstract] **Objective** To investigate the expression difference of microRNA in patients with calcified tendonitis. **Methods** From October 2019 to May 2020, four patients who were diagnosed with CT and received surgical treatment in the Department of orthopedics of Shenzhen Second People's Hospital were selected. Inflammatory tendon tissue (CT group) and para-inflammatory normal tissue (CTR group) were collected from each patient. Total RNA was extracted and sequenced by transcriptome sequencing. The microRNA differentially expressed in the two groups was screened by Illumina HiSeq 2500 high-throughput sequencing technology. **Results** Compared with normal tendon tissue, there were 760 microRNA significantly changed in calcified tendon tissue. There were 104 differentially expressed genes with \log_2FC more than 4 times, among which 24 were up-regulated and 80 were down-regulated. The most obvious up-regulated expression was miR-3529 -- 5p, which was 5.9136 times and the most obvious down-regulated expression was miR-486-5p, which was 10.0018 times. The target genes such as COL1A1、GOLGA2、S100A16、SOX9 and FoxO1 regulated by microRNA are closely related to ion binding and transport, calcium channel activity, protein kinase activity and metabolic function. **Conclusion** There are significant differences in microRNA expression profiles between calcified tendonitis and normal tendon tissues. The differentially expressed microRNA may play an important role in the formation of calcified tendonitis, which will lay a foundation for further study on the mechanism of microRNA in calcifying tendonitis.

[Key Words] Calcifying tendinitis; MicroRNA; High-through sequencing; Bioinformation

钙化性肌腱炎 (calcifying tendonitis, CT) 是临床常见 在跟腱腱性止点中^[1]。多见于 30 ~ 50 岁的运动人群, 重复的慢性肌腱病变, 常发生于跟腱止点中, 其特征是钙盐沉积 性劳损引起的轻度伤害被认为是该病的主要诱因, 但其机理

[收稿日期] 2021 - 01 - 12

[基金项目] 广东省医学科研项目资助课题 (A2018262); 深圳市卫生健康委学科建设能力提升项目资助课题 (SZXJ2018065); 深圳市医疗卫生三名工程项目资助课题 (SZSM201612086); 深圳市医学重点学科建设经费资助课题 (SZXK025)

[作者简介] 赵喆, 男, 副主任医师, 主要从事足踝及手腕部疾患诊治工作, 研究方向为肌腱腱病的发病机制。

[*通信作者] 刘建全 (E-mail: szljq@126.com; Tel: 13714011160)

尚不清楚^[2]。微小 RNAs (microRNAs、miRNAs) 是一类长度约为 22 nt 的非编码 RNA, 其在生物体的调控中具有非常重要的作用, 在人体中大约 1/3 的基因受到 microRNA 的调控, 在多种疾病的发生发展中起到了重要的调节作用^[3]。多项研究证明了使用 microRNA 标记作为诊断工具的可行性^[4]。microRNA 是多功能分子, 广泛参与许多生理过程, 包括增殖、分化、凋亡和发育^[3-4]。近年来, 多个 microRNA 已被证明与肌腱疾病有关, 具有广泛炎症和纤维化疾病的关键调节功能。但均没有研究 microRNA 在肌腱病异位软骨化过程中的作用, 钙化肌腱病的机制尚不清楚。基于此, 本研究利用高通量测序技术对钙化性肌腱炎组织与正常肌腱组织中差异表达的 microRNA 进行分析, 为增强肌腱的修复和愈合提供了新的目标和策略。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2019 年 10 月至 2020 年 5 月在本院骨科确诊为 CT 并接受手术治疗的患者 4 例, 每例患者均取其炎症肌腱组织 (CT 组) 及炎旁正常组织 (Ctr 组), 在离体 15 min 内放入准备好的液氮罐中, 然后在 0.5 h 内移至 -80°C 冰箱中保存至核酸提取。患者中男 2 例, 女 2 例, 年龄 33 ~ 57 岁, 平均年龄为 (49 ± 5) 岁。

1.2 主要试剂与仪器

Trizol 试剂 (Invitrogen, 美国); Agilent 2100 生物分析仪、Illumina HiSeq 2500 测序系统 (Agilent Technologies 公司, 美国); ND-2000 分光光度计 (NanoDrop Technologies 公司, 美国)。

1.3 样本总 RNA 提取

Trizol 法提取标本总 RNA, DnaseI 处理 RNA 以消除 DNA 污染, 所有步骤严格按照说明书进行操作。然后分别采用 2100 生物分析仪、ND-2000 分光光度计检测 RNA 样品的质量, 合格的样品进行转录组测序。

1.4 测序文库的构建及测序

每例样本取 10 μg 总 RNA, 通过 Oligo dT 从总 RNA 中富集 mRNA, 加入 fragmentation buffer, 将 mRNA 随机断裂成 300 bp 左右的小片段, 利用随机引物在逆转录酶的作用下反转合成 cDNA, 并连接 adaptor。产物进行纯化和片段分选, 用分选产物进行聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 扩增建立小 RNA 文库。利用 Illumina HiSeq 2500 测序平台对该文库进行高通量测序。

1.5 miRNA 数据处理和信息分析

测序所得 miRNA 序列通过去接头、去除低质量和污染序列, 最终获得 18 ~ 32 nt 的高质量 miRNA 序列。统计 miRNA 的种类、数序列长度 (nt) 量及长度分布, 初步判断 miRNA 质量。基因表达量分析获得基因 Read Counts 数后, 采用差异分析软件 DEGseq, BH 多重检验校正方

法, 设置显著性水平 $P < 0.001$, $|\log_2(\text{FC})| > 2$, 对两组间 microRNA 差异表达整体分析。

1.6 microRNA 差异表达分析

将样本中的 microRNA 表达量标准化为 TPM (Tags per million), 应用 EdgeR 软件对两组样本已知 microRNA 表达差异分析统计。将 $|\log_2(\text{FC})| > 2$, $P < 0.05$ 的 microRNA 定义差异表达的 microRNA (钙化肌腱炎组 microRNA 标准化的表达量 / 正常组 microRNA 标准化的表达量)。

1.7 功能富集分析

为了进一步了解差异 miRNA 及其靶标的功能, 对每组注释的差异 miRNA 及其靶标进行 GO 富集和 KEGG 途径分析。使用 BioConductor 中的 “clusterProfiler” 包鉴定 DEGs。以 $P < 0.05$ 和 $|\log_2(\text{FC})| > 2$ 为筛选条件。

1.8 统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件进行数据处理, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 t 检验, 计数资料用百分比表示, 采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 样本序列分析及组成分布测定结果

通过 4 对样本抽提总 RNA 质量检测, 符合文库构建要求。两组样本所获得的可用于分析的 miRNA 序列数量分别为 13219644 和 14193113 条。所获得的序列长度主要集中于 18 ~ 32 nt, 说明测序获得的序列质量较高, 可以用于后续的生物信息学分析序列长度 (nt), 见表 1。

表 1 测序数据统计表 ($n = 4$)

组别	Raw Reads	Clean Reads	Error rate /%	Q20 /%	Q30 /%	GC content /%	Useful reads (18 ~ 32 nt)
CT 组	14158168	13854607	0.0229	98.90	96.27	44.91	13219644
Ctr 组	15633972	15216737	0.0229	98.89	96.37	44.44	14193113

注: (1) 可分别查看原始数据 (raw data) 测序质量和有效数据 (即, 长度在 18 ~ 32 nt 范围的质控后数据); (2) Raw reads: 原始测序数据的总条数; (3) Clean reads: 质控后测序数据的总条数; (4) Error rate: 质控数据对应的测序碱基平均错误率; (5) Q20, Q30 分别指测序质量在 99% 和 99.9% 以上的碱基占总碱基的百分比; (6) GC content (%): 有效序列碱基 GC 含量比; (7) Useful reads (18 ~ 32 nt): 用于后续分析的在 18 ~ 32 nt 的 reads 条数; CT — 钙化性肌腱炎

2.2 差异性表达 microRNA 的整体分析

两组共获得 760 个差异表达 microRNA 成熟体序列, 其中肌腱炎组独有的差异表达 microRNA 数量为 77 个, 非肌腱炎组独有的差异表达 microRNA 数量为 179 个, 两者共有的差异表达的 microRNA 数量为 504 个。对 $|\log_2(\text{FC})| > 2$ 且 $P < 0.05$ 的 microRNA 进行筛选后发现, 显著差异的 microRNA 共有 104 个, 其中 24 个上调, 80 个下调, 结果见图 1。

2.3 转录组测序筛选的差异表达的 microRNA 及其 mRNA 靶基因预测分析

以 $P < 0.05$ 为标准, 在差异性表达的 microRNA 中进一步筛选上调 / 下调各 5 个差异表达 microRNA。上调表达最明显的是 miR-3529-5p, 为 5.913622183 倍, miR-486-5p 下调最明显, 为 10.00176074 倍。筛选出在转录组测序数据中存在差异表达的相关 mRNA, COL1A1, GOLGA2, S100A16, SOX9, FOXO1 等多个基因与 microRNA 的存在相关性, 结果见表 2。

表 2 差异表达的 microRNA 及其 mRNA 靶基因列表

microRNA ID	Log2FC (CT组/Ctr组)	靶基因预测详情表
hsa-miR-3529-5p	5.913622183	MCC, SLC16A10, TGFBR1, MDM4
hsa-miR-412-3p	5.020537387	COL1A1, GOLGA2, PLCB4, DGKD, ATXN7L3, MYH14, TMOD1, EEF1A2, CYB561A3, PLEKHA6, GAPVD1, POU5F1, PLEKHA6, CALN1, ENAH, INTS3
hsa-miR-4510	5.020537387	S100A16, CHRDL1, NKIRAS2, SPRY4, SAMD14, HMGA1
hsa-miR-34b-5p	4.672614083	MET, ORC4, PEAK1, ULBP2
hsa-miR-138-5p	4.639447219	CCND3, IGLON5, MXD1, SOX9, PLEKHG4B, RELN, EIF4EBP1, VIM, DMKN, GNAI2
hsa-miR-486-5p	-10.00176074	FOXO1, LTBP2
hsa-miR-183-5p	-7.995458344	EIF4A3, KLHL23, TNRC6B, NOTCH2, EZR, STK40, GNL3, ZFAT, KLRD1, CNOT6, RDH11, AKAP12
hsa-miR-205-5p	-7.820240537	GNAS, RNF217, DMXL2, E2F1, UVRAG, XPR1
hsa-miR-96-5p	-7.702270144	PTPN9, PRKAR1A, DEK, PAQR4, NHLRC3, SMIM12, EDEM1, ANKRD36, SGK3
hsa-miR-618	-7.356673144	FAM136A

注: CT — 钙化性肌腱炎; FC — 差异倍数

3 讨论

在各种免疫耐受模型中, microRNA 被认为是免疫耐受的介质和标志物^[3]。miR-486 是炎症中枢的中心成分, 控制细胞存活和炎症的自我调节, 其异常表达可以导致各种人类炎症性疾病, 包括癌症和免疫功能障碍^[5]。Chai 等^[6]报道了 miR-486-5p 可调控其靶基因 FOXO1, 抑制细胞炎症反应、细胞外基质的降解和凋亡。Chinenov 等^[7]发现天然和合成的糖皮质激素通过抑制 miR-155 的表达, 可显著减轻急性炎症相关的疾病。在许多与炎症相关的疾病中, miR-223 的表达受到抑制, 研究表明, miR-223 在炎症中有调控多个靶基因的作用。近年来, 多个 microRNA 已被证明与肌腱疾病有关, 具有广泛炎症和纤维化疾病的关键调节功能。

Millar 等人^[8]研究证明 miR-29a 可通过靶向 IL-33 来调节肌腱重塑, miR-29b-3p 可能通过 TGF- β 1 信号传导负调控肌腱形成^[9], Usman 等人^[10]报道了 miR-210 可加速大鼠跟腱的愈合。这些结果凸显了 microRNA 在调节肌腱形成和肌腱疾病中的重要性, 但均没有研究 microRNA 在肌腱病异位软骨化过程中的作用, 钙化肌腱病的机制尚不清楚。本研究通过分析转录组测序结果, 发现了 760 个在钙化性肌腱炎中显著差异表达的 microRNA, 其中上调倍数最高的是 miR-3529-5p, 下调倍数最高的是 miR-486-5p。进一步分析, miR-412-3p、hsa-miR-4510、miR-138-5p、miR-183-5p、miR-96-5p 与筛选出在转录组测序数据中存在差异表达的相关 mRNA 相关基因较多, 这些 microRNA 的靶基因与众多细胞迁移侵袭、细胞增殖、钙离子转运密切相关。这些差异表达的 microRNA 可能引起机体出现严重的炎症反应, 从而导致 CT 的发生。然而本研究仅通过生物信息学手段对钙化性肌腱炎进行了初步的宏观分析, 其具体机制仍需进行后续的动物以及细胞实验进一步研究证实。笔者团队前期进行了一系列骨组织的研究, 李小林等^[11]研究发现 microRNA 可以通过参与靶基因的表达调控对骨性关节炎的病理进展发挥促进、抑制或双重作用。杨坤等^[12]发现 microRNA 在转录后水平调控与软骨分化相关转录因子及信号通路靶基因的表达, 以此调控间充质干细胞软骨分化。黄江鸿等^[13]证实了低氧诱导因子- α 诱导分化的骨髓间充质干细胞与复合纳米羟基磷灰石复合制成的复合人工骨具有良好的骨缺损修复能力, 可能成为一种理想的骨缺损修复材料。熊建义等^[14]研究表明透明质酸钠能有效地抑制膝关节骨关节炎患者的疼痛及肿胀等。

[参考文献]

- Gosens T, Hofstee DJ. Calcifying tendinitis of the shoulder: Advances in imaging and management (J). Current Rheumatology Reports, 2009, 11(2): 129-134.
- Darrieutort-Laffite C, Blanchard F, Goff BL. Calcific tendonitis of the rotator cuff: From formation to resorption. (J). Joint bone spine, 2018, 85(6): 687-692.
- Liang C, Liisa H, Wang C, et al. Trends in the development of miRNA bioinformatics tools (J). Briefings in bioinformatics, 2019, 20(5): 5.
- Sun Z, Shi K, Yang S, et al. Effect of exosomal miRNA on cancer biology and clinical applications (J). Mol Cancer, 2018, 17(1): 147.
- Elkhouly AM, Youness RA, Gad MZ. MicroRNA-486-5p and microRNA-486-3p: Multifaceted pleiotropic mediators in oncological and non-oncological conditions (J). Noncoding RNA Res, 2020, 5(1): 11-21.
- Chai X, Si H, Song J, et al. miR-486-5p inhibits inflammatory response, matrix degradation, and apoptosis of nucleus pulposus cells through directly targeting FOXO1 in

- intervertebral disc degeneration (J). Cellular Physiology and Biochemistry, 2019, 52(1): 109-118.
- (7) Chinenov Y, Coppo M, Gupte R, et al. Glucocorticoid receptor coordinates transcription factor-dominated regulatory network in macrophages (J). BMC Genomics, 2014, 15(1): 656.
- (8) Millar NL, Gilchrist DS, Akbar M, et al. MicroRNA29a regulates IL-33-mediated tissue remodelling in tendon disease (J). Nature Communications, 2015, 6(1): 6774.
- (9) Lu YF, Liu Y, Fu WM, et al. Long noncoding RNA H19 accelerates tenogenic differentiation and promotes tendon healing through targeting miR-29b-3p and activating TGF-β1 signaling (J). FASEB Journal, 2017, 31(3): 954-964.
- (10) Usman MA, Nakasa T, Shoji T, et al. The effect of administration of double stranded microRNA-210 on acceleration of Achilles tendon healing in a rat model (J). Journal Of Orthopaedic Science, 2015, 20(3): 538-546.
- (11) 李小林, 陈洁琳, 王大平. MicroRNA 在骨性关节炎中的最新研究进展 (J). 医学综述, 2017, 23(1): 12-15.
- (12) 杨坤, 解磊, 朱伟民, 等. 微 RNA 调控间充质干细胞软骨分化的机制研究进展 (J). 骨科, 2016, 7(3): 219-221.
- (13) 黄江鸿, 杨雷, 廖福朋, 等. 低氧诱导因子-1α 诱导分化的骨髓间充质干细胞复合纳米人工骨修复兔桡骨缺损 (J). 骨科, 2016, 53(3): 201-206.
- (14) 熊建义, 肖德明, 王大平, 等. 透明质酸钠关节腔注射治疗膝骨关节炎 (J). 浙江临床医学, 2009, 11(7): 709-710.

(文章编号) 1007-0893(2021)04-0004-05

DOI: 10.16458/j.cnki.1007-0893.2021.04.002

互动式头针治疗对脑卒中后认知功能及生活自理能力的影响

章春霞¹ 张绍华^{1*} 王玉龙² 章春平³ 肖鹏¹ 李浅峰¹ 潘小华¹ 梁伟容¹

(1. 深圳市大鹏新区南澳人民医院, 广东 深圳 518121; 2. 深圳市第二人民医院, 广东 深圳 518035; 3. 广州中医药大学深圳医院, 广东 深圳 518034)

【摘要】 **目的:** 观察互动式头针对脑卒中患者认知功能及生活自理能力的影响。**方法:** 选取2018年5月至2020年5月深圳市大鹏新区南澳人民医院康复医学科、深圳市第二人民医院康复医学科、广州中医药大学深圳医院(深圳市福田区中医院)住院部的脑卒中后认知障碍的住院患者666例。将666例脑卒中后认知功能障碍患者随机分为互动式头针组(223例)、单纯头针组(221例)和头针+认知训练组(222例)。三组患者均予常规药物及康复运动治疗、头针、计算机认知训练,互动式头针组将头针与认知训练同时进行,单纯头针组只做头针治疗,头针+认知训练组将头针和认知训练分不同时间进行,疗程8周。康复治疗前、治疗4周时及疗程结束时,以简易精神状态检查量表(MMSE)评定患者认知功能,Barthel指数量表评定患者生活自理能力。**结果:** 治疗前各组患者MMSE评分比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。各组患者治疗4周和疗程结束时MMSE评分均较治疗前提高,且互动式头针组及头针+认知训练组在疗程结束时MMSE评分较治疗4周时提高,差异均具有统计学意义($P < 0.01$)。治疗4周和疗程结束时互动式头针组MMSE评分均高于其余两组,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。治疗4周单纯头针组与头针+认知训练组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。疗程结束时头针+认知训练组MMSE评分高于单纯头针组,差异具有统计学意义($P < 0.01$);治疗前各组患者的Barthel指数评分比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。各组患者治疗4周时Barthel指数评分均较治疗前有所提高,且疗程结束时均较治疗4周时有所提高,差异均具有统计学意义($P < 0.01$)。治疗4周时,头针+认知训练组Barthel指数评分与单纯头针组比较无显著性差异($P > 0.05$),互动式头针组Barthel指数评分均高于其余两组($P < 0.01$)。疗程结束时,头针+认知训练组

〔收稿日期〕 2021-01-20

〔基金项目〕 广东省医学科研基金项目资助课题(A2020448); 深圳市大鹏新区产业发展专项资金扶持项目资助课题(YL20170202); 深圳市大鹏新区医疗健康集团医疗卫生科研基金项目资助课题(2019JTYM003); 深圳市大鹏新区医疗健康集团医疗卫生科研基金项目资助课题(2019JTYM004); 深圳医疗卫生三名工程资助课题(SZSM201610039)

〔作者简介〕 章春霞,女,主管技师,主要研究方向是针灸治疗脑血管疾病。

〔*通信作者〕 张绍华(E-mail: 365217558@qq.com; Tel: 15013592447)