

## 高氧诱导支气管肺发育不良新生小鼠肺组织中 lncRNA 表达谱的变化

包天平,赵 赛,杨丽娟,程怀平,张 媛,田兆方\*

(南京医科大学附属淮安第一医院新生儿科,江苏 淮安 223300)

**[摘要]** **目的:** 分析长链非编码 RNA(long non-coding RNA, lncRNA) 在高氧诱导支气管肺发育不良(bronchopulmonary dysplasia, BPD)小鼠模型肺中表达谱的变化。**方法:** 构建高氧诱导支气管肺发育不良新生小鼠模型,利用 lncRNA 芯片技术检测正常小鼠肺及 BPD 小鼠肺组织中 lncRNA 表达谱的变化,经过对原始数据进行预处理,筛选出差异常表达的 lncRNA。**结果:** 与对照组相比,模型组差异表达的 lncRNA(差异倍数 $\geq 2$  倍且  $P < 0.05$ )共 1 769 条,其中 882 条上调,887 条下调;5 倍以上上调的共 140 条,下调的共 71 条;10 倍以上上调的共 28 条,下调的有 2 条。**结论:** 高氧诱导 BPD 发生时,肺组织中 lncRNA 的表达谱发生了显著变化;这些差异表达的 lncRNA,可能参与了 BPD 发生、发展过程。

**[关键词]** 高氧;支气管肺发育不良;lncRNA 芯片

**[中图分类号]** R725.6

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2016)03-318-05

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20160313

## Study on expression profile of long non-coding RNA in lung tissues of newborn mice with hyperoxia-induced bronchopulmonary dysplasia

Bao Tianping, Zhao Sai, Yang Lijuan, Cheng Huaping, Zhang Yuan, Tian Zhaofang\*

(Department of Neonatology, Huai'an First Hospital Affiliated to NJMU, Huai'an 223300, China)

**[Abstract]** **Objective:** To analyze the expression profile variation of long non-coding RNA (lncRNA) in lung tissues of newborn mice with hyperoxia-induced bronchopulmonary dysplasia (BPD). **Methods:** We first successfully established a newborn mouse model of hyperoxia-induced BPD. We used lncRNA microarray technology to inspect differences of lncRNA expression profile between normal control lung and BPD lung, which helped us screen out the lncRNAs with differential expression after pretreatment of raw data. **Results:** Compared with the control group, there were 1 769 lncRNAs with differential expression which had more than 2-fold changes and significant differences ( $P < 0.05$ ), of which 882 increased more than 2 times and 887 reduced more than 2 times; 140 increased more than 5 times; 71 reduced more than 5 times; 28 increased more than 10 times and 2 reduced more than 10 times. **Conclusion:** lncRNA expression profile of hyperoxia-induced BPD was significantly changed in comparison with normal lung tissues. These lncRNAs with differential expression may be involved in the occurrence and development of BPD.

**[Key words]** hyperoxia; bronchopulmonary dysplasia; lncRNA microarray

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(03):318-322, 357]

支气管肺发育不良(bronchopulmonary dysplasia, BPD)是早产儿、尤其是小早产儿常见的慢性肺部疾病。随着产前糖皮质激素应用,生后肺表面活性物质替代治疗,更优化的通气策略引入,越来越多的胎龄 22~28 周和(或)出生体重 501~1 500 g 的极早早产儿得以存活,而 BPD 的发生率却呈逐年上升趋势<sup>[1]</sup>。目前,经典型 BPD 已很少见,更多的是“新型 BPD”<sup>[2]</sup>,以肺泡发育障碍和微血管形成异常为主要病理改变<sup>[3]</sup>。lncRNA 是指转录本长度大于 200 nt、不具备编码蛋白质功能的一类 RNA 分子<sup>[4]</sup>,能够在转录及转录后水平调控蛋白编码基因的表达<sup>[5-6]</sup>,广泛参与细胞分化、个体发育等重要生命过程,其异常表达与多种人类疾病的发生发展密切相关。研究显示,lncRNA 可在空间上与转录因子相关联并调控肺发育<sup>[7]</sup>,但到目前,尚无研究报道 lncRNA 与 BPD 之间的关系。本研究首次采用 lncRNA 芯片技术筛

势<sup>[1]</sup>。目前,经典型 BPD 已很少见,更多的是“新型 BPD”<sup>[2]</sup>,以肺泡发育障碍和微血管形成异常为主要病理改变<sup>[3]</sup>。lncRNA 是指转录本长度大于 200 nt、不具备编码蛋白质功能的一类 RNA 分子<sup>[4]</sup>,能够在转录及转录后水平调控蛋白编码基因的表达<sup>[5-6]</sup>,广泛参与细胞分化、个体发育等重要生命过程,其异常表达与多种人类疾病的发生发展密切相关。研究显示,lncRNA 可在空间上与转录因子相关联并调控肺发育<sup>[7]</sup>,但到目前,尚无研究报道 lncRNA 与 BPD 之间的关系。本研究首次采用 lncRNA 芯片技术筛

**[基金项目]** 江苏省临床医学专项(BL2014063);淮安市科技攻关项目(HAS2014010)

\*通信作者(Corresponding author),E-mail:tianzhaofan@163.com

选 BPD 形成过程中差异表达的 lncRNA 并进行初步分析,筛选出可能与 BPD 相关的 lncRNA,以期进一步阐明 BPD 发病的分子机制,并有可能使得 lncRNA 成为 BPD 的分子标志物或治疗靶点,为 BPD 的诊治提供新思路。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

自南京医科大学动物房购得孕 18 d 的 C57BL/6J 小鼠 10 只。lncRNA 芯片由美国 Arraystar 公司中国唯一代理商上海康成生物工程有限公司提供。数字式测氧仪 xp-3118 购自日本新宇宙公司,氧气由南京医科大学附属淮安第一医院提供。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 模型制备

依据本实验组之前的模型构建方法<sup>[8]</sup>,将出生时间相差 30 min 以内的 20 只新生小鼠,随机分配至高氧模型组( $FiO_2 > 95\%$ )与对照组( $FiO_2 = 21\%$ ),每组 10 只。模型组小鼠置于 60 cm×50 cm×40 cm 自制氧箱,氧浓度由数字式测氧仪监测,维持 7 d。期间,每 24 h 开箱补充饲料和水,更换垫料,并互换母鼠防止氧中毒,同时消除不同氧浓度下母鼠对仔鼠哺乳的影响。交换母鼠过程轻拿轻放,防止母鼠激惹发生食子。

#### 1.2.2 标本采集

两组同时于实验第 7 天处死新生小鼠并采集肺组织。眼科剪、2 mL EP 管均经 DEPC 浸泡、灭菌处理。4%水合氯醛 0.1 mL/g 腹腔注射麻醉后,剪开胸腔,取右下肺置于 4%多聚甲醛中固定,石蜡包埋,制备 5  $\mu$ m HE 染色病理切片,其余肺组织经液氮速冻后冻存于-80℃冰箱。

#### 1.2.3 肺发育评价

肺泡发育程度用辐射状肺泡计数(radial alveolar counts, RAC)来评估,即呼吸性细支气管中心至最近纤维隔或胸膜垂直线上的肺泡数目<sup>[9]</sup>。100 倍光镜视野下,每张切片计数 5 次,取平均值。

#### 1.2.4 芯片信息

Arraystar 小鼠 lncRNA 芯片 v3.0 是为研究小鼠 lncRNAs 和蛋白质编码转录本而设计的,能够检测 35 923 个 lncRNAs 和 24 881 个蛋白质编码转录本。lncRNAs 是从权威数据库(包括 Refseq、UCSC Knowngenes、Ensembl、RNAdb、NRED、lncRNAdb 等)和高影响因子论文中仔细收集的。

#### 1.2.5 探针设计

Arraystar 小鼠 lncRNA 芯片 v3.0 设计的探针为

60 mer 的长寡核苷酸,在高严格杂交条件下可得到灵敏度、特异性均很高的实验结果。每个转录本由一个特定外显子或者剪接点探针代表,它们能够被探针准确地检测。芯片上也包括了阳性探针(看家基因)和阴性探针,以进行杂交质控监测。

#### 1.2.6 样品总 RNA 抽提和检测

取 50~100 mg 新鲜肺组织,加入 1 mL 的 RNA 抽提试剂 TRIzol(Invitrogen 公司,美国),匀浆裂解后按照试剂说明书步骤,抽提总 RNA。使用 Nandrop 测定 RNA 在分光光度计 260、280、230 nm 的吸收值,以计算浓度并评估纯度。此外,甲醛变性琼脂糖凝胶电泳用于检测 RNA 纯度及完整性。

#### 1.2.7 RNA 标记和芯片杂交

样品标记和芯片杂交根据 Agilent One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis 实验方案(Agilent Technology 公司,美国)执行:从总 RNA 中移除 rRNA 后,得到 mRNA(mRNA-ONLY™ Eukaryotic mRNA Isolation Kit, Epicentre 公司,美国),使用随机引物方法将每个样品放大并转录成带荧光的 cRNA,再使用 RNeasy Mini Kit(Qiagen 公司,美国)纯化标记的 cRNAs,并用 NanoDrop ND-1000 检测荧光标记效率,已保证后续芯片实验结果的可靠性,接着进行芯片杂交、固定。

#### 1.2.8 图像采集和数据分析

采用 Agilent Microarray Scanner(G2505B)扫描芯片,将 Agilent Feature Extraction 软件读出的荧光值导入 Agilent Genespring GX(Agilent 公司,美国)软件中进行数据分析。数据经过标准化后得出实验组与对照组标记的信号比值(fold change),即为该基因组在实验组与对照组中变化情况。最后经过 *t* 检验,筛选出 fold change  $\geq 2$  的基因为表达显著上调基因, fold change  $\leq 0.5$  为表达显著下调基因(所有差异性基因均满足  $P < 0.05$ )。lncRNA 芯片中也有 mRNA 探针,可同时筛选出差表达的 mRNA(筛选标准同 lncRNA),通过分析差异表达的 lncRNA 与 mRNA 所在基因组位置,以寻找 lncRNA 附近有功能的基因。

### 1.3 统计学方法

使用 SPSS19.0 软件进行统计学分析,数据用均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组间比较采用 *t* 检验,  $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 模型成功与否评价

模型组、对照组新生小鼠均无死亡。与对照组 [(3.312 ± 0.254)g] 相比,模型组小鼠反应差、自主活动少,体重 [(2.045 ± 0.151)g] 明显减轻 ( $P < 0.01$ );肺组织病理切片显示肺泡直径变大、数目减少、肺泡间隔增大,RAC 值差异具有统计学差异 ( $7.1 \pm 0.5$  vs.  $4.8 \pm 0.3$ ,  $P < 0.05$ )。这与新型 BPD 特点一致,提示我们成功构建了高氧诱导 BPD 小鼠模型。

### 2.2 芯片杂交结果

取 3 个正常肺组织及 3 个 BPD 肺组织,采用芯片杂交方法对差异表达的 lncRNA 进行筛选,筛选结果如下:差异表达的 lncRNA 共 1 769 条,其中 2 倍以上上调的有 882 条,下调的有 887 条;5 倍以上上调的共 140 条,下调的共 71 条;其中上调 10 倍以上共 28 条,下调的共 2 条(表 1)。

### 2.3 lncRNA 子类分析

#### 2.3.1 差异 antisense lncRNA 与相应 mRNA 联合分析

在 lncRNA 中,研究比较深入的是反义(anti-sense)lncRNA,有超过 30%的已注释人类转录本有相应的反义 lncRNA。这些反义 lncRNA 通过多种机制在转录水平或转录后水平调控相应的正义(sense)mRNA,从而发挥生物学功能。我们将差异 antisense lncRNA 及其差异 sense mRNA 进行整合,以推断 lncRNA 的功能(表 2)。

#### 2.3.2 差异基因间 lncRNA (lincRNA) 与临近基因 mRNA 联合分析

lincRNA 是目前研究的热点之一。我们将 lincRNA 挑选出来与邻近基因 mRNA(< 300 kb)进行联合分析,以推断 lincRNA 功能,同时列举了表达差异倍数前 20 的 lincRNA 及其邻近基因 mRNA(表 3)。

## 3 讨论

基因芯片可以同时、快速、准确地分析数以万

表 1 芯片检测显示 10 倍以上差异表达的 lncRNA

Table 1 More than 10 times of differential expression of lncRNA by microarray technology

基因	来源	RNA 长度(bp)	染色体定位	Log <sub>2</sub> (BPD/Normal)
Mup-ps19	Ensembl	519	chr4	-13.293
Ahsg	RefSeq	1 439	chr16	-11.888
AK076311	GenBank	2 268	chr14	10.056
Gm10863	UCSC_kg	905	chr15	10.162
AK138478	GenBank	2 739	chr16	10.348
Olf990-ps1	Ensembl	896	chr2	10.468
Nupr1	Ensembl	2 449	chr7	10.556
Rmst	Ensembl	2 698	chr10	10.969
AK020757	GenBank	963	chr14	11.170
AK020832	GenBank	897	chr5	12.235
AK013470	GenBank	1 544	chr19	12.889
AK008754	GenBank	1 313	chr11	13.172
AK032235	GenBank	2 727	chr6	13.517
AK005616	UCSC_kg	759	chr4	14.074
AK089129	GenBank	2 233	chr6	14.884
Cryba1	Ensembl	1 377	chr11	15.845
AK030618	GenBank	1 611	chr3	15.849
AK005214	UCSC_kg	416	chr10	15.881
3110039M20Rik	RefSeq	870	chr12	15.892
D7Ert715e	UCSC_kg	6 765	chr7	16.117
Gm5859	UCSC_kg	1 147	chr4_GL456350_random	16.772
H2-BI	Ensembl	1 072	chr17	16.775
AK015642	GenBank	1 383	chr7	16.994
AK082001	GenBank	2 228	chr6	17.842
Xist	Ensembl	626	chrX	17.917
Eda2r	Ensembl	779	chrX	19.357
BC056457	UCSC_kg	757	chr12	24.251
A930011O12Rik	Ensembl	3 822	chr14	25.079
AK047207	GenBank	526	chr4_GL456350_random	25.255
C130071C03Rik	Ensembl	2 427	chr13	25.571

表 2 差异 antisense lncRNA 与临近基因 mRNA 表达变化情况  
Table 2 The differential expression of antisense lncRNA and its adjacent gene's mRNA

基因	lncRNA		临近基因	mRNA	
	差异倍数	调节		差异倍数	调节
AK012034	2.500 486 5	下调	Lmnb2	2.423 943 7	下调
AK031486	2.066 248 1	上调	Apobec2	3.556 955 5	下调
AK031656	2.599 275 8	下调	Adamts5	3.726 900 2	下调
AK034572	3.058 530 9	下调	Rrm2	2.379 519 6	下调
AK050905	6.291 498 2	上调	Pycard	2.071 897 7	下调
AK131677	3.491 088 7	下调	Gmnn	2.839 902 4	下调
AK134023	3.059 875 6	上调	Arg2	4.469 120 6	上调
AK141499	2.865 523	上调	Mastl	4.203 765 9	下调
AK146199	3.659 409 4	上调	Slc25a37	3.277 558 6	下调
Gm15807	2.416 478 2	下调	2900011008Rik	9.511 666 9	上调
Gm13644	2.050 729 8	下调	Tmem88b	2.389 927 7	上调
Gm15830	2.007 048 3	上调	Hopx	2.349 475 4	上调
Hist1h2aj	2.620 421 1	下调	Hist1h2bm	2.710 210 7	下调
A330040F15Rik	2.168 831 5	下调	Fam111a	3.911 793 8	下调
B130024G19Rik	2.170 924 2	下调	Nr2f2	2.633 935 5	下调
uc.255	4.595 267	上调	Elavl2	2.382 832 9	上调
AK153639	2.300 802 8	下调	Raet1b	5.169 407 9	下调
AK033210	2.962 376 4	下调	Tnc	2.087 066 9	上调

表 3 差异 lincRNA 与临近基因 mRNA 表达变化情况  
Table 3 The differential expression of lincRNA and its adjacent gene's mRNA

基因	lincRNA		临近基因	mRNA	
	差异倍数	调节		差异倍数	调节
AK082001	17.842 022 6	上调	Cadps2	2.113 188 7	下调
AK082001	17.842 022 6	上调	Fezf1	13.730 791 6	上调
AK015642	16.994 234 4	上调	Hif3a	4.078 975 0	上调
AK030618	15.849 325 8	上调	Tshb	6.306 907 6	上调
Mup-ps19	13.293 118 9	下调	Mup19	17.500 068 5	下调
Olf1990-ps1	10.468 439 8	上调	Aplnr	4.481 447 2	下调
Olf1990-ps1	10.468 439 8	上调	4833423E24Rik	5.100 094 9	下调
AK132645	9.584 010 6	上调	Serpina3n	5.786 927 9	上调
AK132645	9.584 010 6	上调	Gsc	3.168 046 3	上调
AK132645	9.584 010 6	上调	Serpina3i	8.480 380 7	上调
AK087397	9.505 072 7	上调	Chd3	2.012 733 9	下调
AK087397	9.505 072 7	上调	Slc35g3	2.950 924 8	下调
AK087397	9.505 072 7	上调	2810408A11Rik	2.962 071 4	下调
Nlrp5-ps	9.230 288 7	下调	Sult2a7	2.094 677 9	下调
C130080G10Rik	8.296 419 2	下调	Scg5	4.551 983 4	上调
C130080G10Rik	8.296 419 2	下调	Actc1	2.341 535 4	下调
C130080G10Rik	8.296 419 2	下调	Arhgap11a	3.148 914 7	下调
2610017I09Rik	7.896 775 3	上调	Pou3f3	6.337 136 5	上调
AK156967	7.653 433 8	下调	Lgals3	2.202 194 7	上调
AK156967	7.653 433 8	下调	Dlgap5	3.429 217 7	下调

计的基因组信息,成为研究基因功能的重要工具,为人类疾病的早期诊断、治疗和预后评估开辟了全新途径。正是由于其高通量、高效率、信息量丰富等优势,在肺部众多疾病中也得到广泛应用。学者

Wang 等<sup>[10]</sup>利用基因芯片对 3 对早期肺腺癌组织和癌旁正常组织进行检测筛选,标准设定为 fold-change $\geq 2.0$ , $P < 0.05$ ,共筛选出 1 170 个差异表达的 lncRNA,并选取了 5 个差异倍数显著的 lncRNA,

在 102 对早期肺腺癌和癌旁组织中进行了验证,这些差异的 lncRNA 有可能成为早期诊断肺腺癌的分子标志物。此外, Bi 等<sup>[11]</sup>为研究吸烟对慢性阻塞性肺病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 中 lncRNA 表达谱的影响, 选取了 3 例不吸烟也无 COPD 的肺组织、5 例吸烟而无 COPD 的肺组织和 5 例吸烟并患有 COPD 的肺组织进行基因芯片筛选, 所有肺组织均来自于病理证实为肺癌的患者, 且取自癌组织 5 cm 以外。筛选标准也设为 fold-change  $\geq 2.0$ ,  $P < 0.05$ , 前两组筛选出 87 个上调 lncRNA, 244 个下调 lncRNA; 后两组筛选出 120 个上调 lncRNA, 43 个下调 lncRNA; 3 组间均有差异表达的 lncRNA 有 4 个。本研究中共筛选出差异表达的 lncRNA 1 769 条, 882 个上调, 889 个下调。

lncRNA 起初被认为是基因组转录的“噪音”, 是 RNA 聚合酶 II 转录的副产物, 不具有生物学功能。然而, 近年来的研究表明, lncRNA 参与了 X 染色体沉默、基因组印记、染色质修饰、转录激活与干扰、核内运输等多种重要的调控过程<sup>[12-14]</sup>, lncRNA 的这些调控作用也开始引起人们的广泛关注。越来越多的研究也证实 lncRNAs 参与了氧化应激、炎症、凋亡、细胞生长和生存的调控过程<sup>[15-17]</sup>。但关于 lncRNA 在 BPD 中表达谱的变化尚未见报道, 因而深入探讨参与 BPD 发生发展过程中的 lncRNA 及其作用机制具有重要意义。

我们采用 lncRNA 芯片技术在全基因组水平上成功筛选出了大量差异表达的 lncRNA, 有些可能在 BPD 形成过程中扮演重要角色。由于 lncRNA 常通过调控临近蛋白编码基因的表达来发挥生物学功能<sup>[4]</sup>, 因此我们对差异 lncRNA 与相应 mRNA 进行共表达联合分析, 预测 lncRNA 可能相关的调节机制。我们发现 lncRNA Gm15830 位于 mRNA Hopx 基因内, 且两者都上调。已有研究表明, Hopx 在肺发育过程中发挥重要作用, 其高表达会影响肺表面活性物质的合成并且阻碍肺泡形成<sup>[18]</sup>, 这提示 Gm15830 可能通过对 Hopx 的正向调控而在 BPD 的发生发展中发挥重要作用。本研究有望使 lncRNA 成为 BPD 早期诊断和治疗的靶点, 对 BPD 的诊治具有重要意义。

临床上我们很难得到 BPD 患儿肺组织标本, 且足月生小鼠肺的发育状态很好地模拟了人早产儿肺, 因此我们选择高氧诱导新生小鼠 BPD 模型作为研究 BPD 的一个手段。下步我们将挑选出部分 lncRNA 进行功能学验证、靶基因预测, 并在体内外进行验证, 以期深入挖掘 BPD 发生发展新机制、开

发 BPD 诊断治疗新靶点。

#### [参考文献]

- [1] Horbar JD, Carpenter JH, Badger GJ, et al. Mortality and neonatal morbidity among infants 501 to 1500 grams from 2000 to 2009[J]. *Pediatrics*, 2012, 129(6): 1019-1026
- [2] Mehler K, Grimme J, Abele J, et al. Outcome of extremely low gestational age newborns after introduction of a revised protocol to assist preterm infants in their transition to extrauterine life[J]. *Acta Paediatr*, 2012, 101(12): 1232-1239
- [3] Kiren V, Barbi E, Ventura A. Chronic lung disease after premature birth [J]. *N Engl J Med*, 2008, 358(7): 745-746
- [4] Ponting CP, Oliver PL, Reik W. Evolution and functions of long noncoding RNAs[J]. *Cell*, 2009, 136(4): 629-641
- [5] Nagano T, Fraser P. No-nonsense functions for long non-coding RNAs[J]. *Cell*, 2011, 145(2): 178-181
- [6] Beltran M, Puig I, Pena C, et al. A natural antisense transcript regulates Zeb2/Sip1 gene expression during Snail1-induced epithelial-mesenchymal transition[J]. *Genes Dev*, 2008, 22(6): 756-769
- [7] HERRIGES MJ, SWARR DT, MORLEY MP, et al. Long noncoding RNAs are spatially correlated with transcription factors and regulate lung development [J]. *Genes Dev*, 2014, 28(12): 1363-1379
- [8] 田兆方, 杜江, 付雪梅, 等. 人骨髓来源间充质干细胞对新生大鼠高氧肺损伤干预作用的研究[J]. *中华儿科杂志*, 2008, 46(1): 4-8
- [9] Balasubramaniam V, Tang JR, Maxey A, et al. Mild hypoxia impairs alveolarization in the endothelial nitric oxide synthase-deficient mouse [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2003, 284(6): L964-L971
- [10] Wang P, Lu SH, Mao HL, et al. Identification of biomarkers for the detection of early stage lung adenocarcinoma by microarray profiling of long noncoding RNAs[J]. *Lung Cancer*, 2015, 88(2): 147-153
- [11] Bi H, Zhou J, Wu D, et al. Microarray analysis of long non-coding RNAs in COPD lung tissue[J]. *Inflamm Res*, 2015, 64(2): 119-126
- [12] Mercer TR, Dinger ME, Mattick JS. Long non-coding RNAs: insights into functions [J]. *Nat Rev Genet*, 2009, 10(3): 155-159
- [13] Kogo R, Shimamura T, Mimori K, et al. Long noncoding RNA HOTAIR regulates polycomb-dependent chromatin modification and is associated with poor prognosis in colorectal cancers[J]. *Cancer Res*, 2011, 71(20): 6320-6326
- [14] Wang KC, Chang HY. Molecular mechanisms of long non-coding RNAs[J]. *Mol Cell*, 2011, 43(6): 904-914

(下转第 357 页)