

基于 m6A 相关长链非编码 RNA 鉴定克罗恩病的 潜在诊断生物标志物

黄晓东¹, 黄 銜¹, 梁靖华¹, 李 昂¹, 刘琦凯¹, 钟秀清¹, 肖剑伟²

(1. 深圳市中医肛肠医院<福田>外三科, 广东 深圳 518031;

2. 深圳市福田区风湿病专科医院风湿免疫科, 广东 深圳 518000)

摘要:目的 探索克罗恩病(CD)m6A 相关的长链非编码 RNA(LncRNA)及其与患者临床性状的相关性。方法 通过 GEO 数据库获取 CD 芯片数据, 获取 m6A 相关的甲基化酶的表达量, 通过差异分析筛选 LncRNA。分析与 m6A 甲基化酶共表达的 LncRNA, 探索 LncRNA 与 CD 患者病情活动的相关性并绘制 ROC 曲线, 对 LncRNA 共表达的 mRNA 进行 GO 富集分析及 KEGG 信号通路分析。结果 共筛选出 CD 中 m6A 相关的 LncRNA 7 个, 3 个 LncRNA 与 8 个 m6A 甲基化酶存在相关性。其中, LncRNAGSEC 与病情活动指标 CDEIS 呈正相关。m6A 甲基化位点预测提示 GSEC 存在多个高甲基化位点; ROC 曲线下面积为 0.805。GO 富集分析显示其富集于蛋白丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸激酶活性、Toll 样受体结合等功能。KEGG 信号通路分析显示其富集于 NF- κ B 信号通路、炎症性肠病等通路。结论 GSEC 可能是 CD 潜在的诊断及治疗靶点。

关键词: 克罗恩病; m6A; LncRNA; GSEC

中图分类号: R574.62

文献标识码: A

DOI: 10.3969/j.issn.1006-1959.2024.01.002

文章编号: 1006-1959(2024)01-0010-06

Identification of Potential Diagnostic Biomarkers for Crohn's Disease Based on m6A-related Long Non-coding RNAs

HUANG Xiao-dong¹, HUANG Xian¹, LIANG Jing-hua¹, LI Ang¹, LIU Qi-kai¹, ZHONG Xiu-qing¹, XIAO Jian-wei²

(1. The Third Department of Surgery, Shenzhen TCM Anorectal Hospital <Futian>, Shenzhen 518031, Guangdong, China;

2. Department of Rheumatology, Shenzhen Futian District Hospital for Rheumatic Diseases, Shenzhen 518000, Guangdong, China)

Abstract: **Objective** To explore the long non-coding RNA (LncRNA) associated with m6A in Crohn's disease (CD) and its correlation with clinical characteristics of patients. **Methods** The CD chip data was obtained through the GEO database to obtain the expression of m6A-related methylase, and the LncRNA was screened by differential analysis. The LncRNA co-expressed with m6A methylase was analyzed to explore the correlation between LncRNA and the disease activity of CD patients and draw the ROC curve. GO enrichment analysis and KEGG signaling pathway analysis were performed on the mRNA co-expressed with LncRNA. **Results** A total of 7 LncRNAs related to m6A in CD were screened, and 3 LncRNAs were correlated with 8 m6A methylases. Among them, LncRNAGSEC was positively correlated with disease activity index CDEIS. The prediction of m6A methylation site suggested that there were multiple hypermethylation sites in GSEC. The area under the ROC curve was 0.805. GO enrichment analysis showed that it was enriched in protein serine/threonine/tyrosine kinase activity, Toll-like receptor binding and other functions. KEGG signaling pathway analysis showed that it was enriched in NF- κ B signaling pathway, inflammatory bowel disease and other pathways. **Conclusion** GSEC may be a potential diagnostic and therapeutic target for CD.

Key words: Crohn's disease; m6A; LncRNA; GSEC

克罗恩病(Crohn's disease, CD)是一种慢性、节段性、不对称分布的肉芽肿性炎症,可累及胃肠道的任何部位,主要病变常见于回肠末端和邻近的结肠^[1]。研究显示^[2],我国 CD 发病率有明显上升趋势。然而,目前缺乏用于诊断 CD 的有效标志物。同

时,在治疗上,使用美沙拉嗪和柳氮磺吡啶等药物可以在一定程度上缓解 CD 的症状,但治疗效果较差。因而,更好地了解 CD 发病机制可能有助于开发新的诊断及治疗方式。研究表明,长链非编码 RNA (LncRNA)在 CD 发病中发挥着重要作用。有研究报道^[3],血浆 LncRNALUCAT1 与 CD 患者的疾病活动度呈正相关。Haberman Y 等^[4]的研究表明,CD 患者肠道组织样本中有 15 个 LncRNA 存在差异表达,提示 LncRNA 在 CD 发病中发挥着重要的作用。m6A 是 RNA 中的一种核苷酸修饰方式,这是迄今为止在各类 RNA 修饰中最普遍的一种,包括 mRNA、microRNA 及 LncRNA^[5]。调节 m6A 修饰的蛋白质,

基金项目:1.广东省中医药管理局中医药科研项目(编号:20221342);

2.深圳市福田区卫生公益性科研项目(编号:FTWS2020046)

作者简介:黄晓东(1982.8-),男,广东揭阳人,本科,副主任医师,主要从事肛肠疾病及炎症性肠病研究

通讯作者:肖剑伟(1983.8-),男,广东汕头人,硕士,副主任医师,主要从事免疫学疾病研究

与肠道微生物群的改变和胃肠道癌症的发展有关^[6,7]。m6A 对 LncRNA 的修饰在 CD 发病中的意义仍不清楚。基于此,本研究通过生物信息学分析确认 m6A 相关基因调节的 LncRNA,分析其与临床性状的相关性,以期开发 CD 新的诊断及治疗靶点提供帮助。

1 资料与方法

1.1 数据检索 在 GEO(www.ncbi.nlm.nih.gov/geo)中以“Crohn's disease”作为关键词,检索得到 GSE94648(22 个健康对照、50 个 CD 患者)数据集,该数据集包含了患者临床数据。

1.2 数据合并及重注释 使用 Perl 软件(版本 5.30.2)对数据集进行基因注释以区分 mRNA 及 LncRNA。

1.3 提取 m6A 甲基化基因及 LncRNA 根据当前的研究确定了 21 个 m6A 相关基因,包括 readers (YTHDC1、YTHDC2、YTHDF1、YTHDF2、YTHDF3、IGF2BP1、IGF2BP2、IGF2BP3、RBMX、HNRNPA2B1、HNRNPC、LRPPRC)、writers (METTL3、METTL14、METTL16、RBM15、RBM15B、WTAP、VIRMA、KIA1499、ZC3H13)和 erasers(FTO 和 ALKBH5)。使用 R 软件的 Limma 包获数据集 m6A 基因及 LncRNA 的表达量。

1.4 差异 LncRNA 分析 使用 R 软件 4.04,通过 limma 包对 1.3 步骤得到 LncRNA 进行差异分析,取 LogFC 绝对值大于 0.5,adjust $P < 0.05$ 。

1.5 计算 m6A 甲基化基因与 LncRNA 表达量的相关性 使用 R 软件的 Limma 包,设置相关性大于 0.5, $P < 0.05$, 获取 1.4 步骤得到的与 LncRNA 相关的 m6A 甲基化基因。

1.6 临床相关性分析 对 1.4 步骤得到的 LncRNA 及 m6A 甲基化基因,分析其与内镜下严重指数(Crohn's Disease Endoscopic Index of Severity,CDEIS)的相关性,采用斯皮尔曼相关性分析计算关键基因表达量与 CDEIS 的相关性。以相关系数绝对值大于 0.5, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义,获取与临床性状相关的 LncRNA 进一步分析。并通过在线网站(<http://www.cuilab.cn/sramp>)预测 LncRNAm6A 甲基化位点。

1.7 m6A 相关 LncRNA 的诊断分析及获取共表达 mRNA 对 1.6 步骤得到的 LncRNA,使用 R 软件 survROC 包绘制 ROC 曲线,以 $P < 0.01$ 表示统计学意义显著,验证 m6A 相关 LncRNA 诊断价值。使用 R 软件的 Limma 包,设置相关性绝对值大于 0.5, $P <$

0.05,获取与 LncRNA 共表达的 mRNA。

1.8 GO 富集分析及 KEGG 信号通路分析 通过 R 包“clusterProfiler”“org.Hs.eg.db”,对 1.7 步骤获得共表达 mRNA 进行 GO 富集分析及 KEGG 信号通路分析,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 差异 LncRNA 分析结果 共获得 7 个 LncRNA 存在差异表达,其中 4 个 LncRNA 表达上调,3 个表达下调(图 1)。

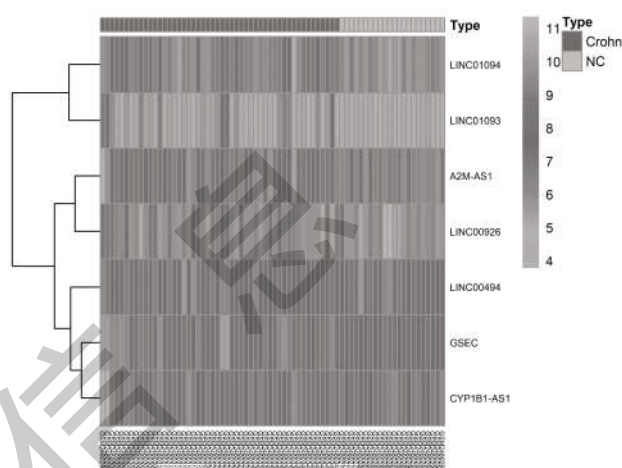


图 1 差异 LncRNA 表达热图

2.2 m6A 甲基化基因与 LncRNA 表达量的相关性 有 3 个 LncRNA (LINC01094、GSEC、LINC01093)和 8 个 m6A 甲基化酶(METTL16、RBM15B、YTHDC1、YTHDF1、YTHDF2、FTO、ALKBH5、LRPPRC)存在相关性,见表 1。

2.3 临床相关性分析 结果显示,LncRNAGSEC 表达与 CDEIS 呈正比,FTO、LRPPRC 表达与 CDEIS 呈反比(图 2)。其余 LncRNA 及 m6A 甲基化相关基因表达与 CDEIS 无明显相关性。m6A 甲基化位点预测提示 GSEC 存在多个高甲基化位点(图 3)。

2.4 ROC 诊断曲线结果 ROC 曲线显示,GSEC 的 AUC 为 0.805, $P < 0.001$ (图 4)。共有 1440 个 mRNA 与 GSEC 共表达。与 GSEC 共表达的蛋白 GO 富集分析显示其分子功能(MF)主要包括蛋白丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸激酶活性、Toll 样受体结合等功能,生物学过程(BP)包括 T 细胞分化、淋巴细胞分化等,细胞成分(CC)显示主要定位于分泌颗粒膜、胞质囊泡腔等(图 5)。KEGG 信号通路分析显示其富集于 Th1 和 Th2 细胞分化、Th17 细胞分化、NF- κ B 信号通路、炎症性肠病等通路(图 6)。

表 1 m6A 相关基因与 LncRNA 相关性

m6A 相关基因	LncRNA	相关系数	P	m6A 相关基因	LncRNA	相关系数	P
METTL16	LINC01094	-0.545 505 868	4.19E-05	METTL16	GSEC	-0.689 019 141	3.17E-08
RBM15B	LINC01094	-0.688 845 947	3.20E-08	RBM15B	GSEC	-0.584 150 7	8.45E-06
YTHDC1	LINC01094	-0.516 540 206	0.000 122 962	YTHDF1	GSEC	-0.625 093 664	1.22E-06
YTHDF1	LINC01094	-0.673 614 699	8.28E-08	LRPPRC	GSEC	-0.548 063 608	3.79E-05
YTHDF2	LINC01094	-0.541 802 307	4.83E-05	FTO	GSEC	-0.584 715 424	8.24E-06
FTO	LINC01094	-0.637 308 586	6.47E-07	RBM15B	LINC01093	-0.567 994 671	1.69E-05
ALKBH5	LINC01094	-0.620 543 176	1.53E-06	FTO	LINC01093	-0.543 328 702	4.56E-05

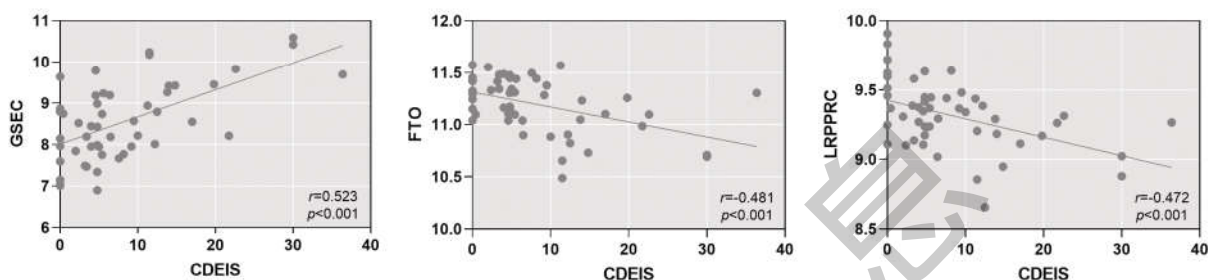


图 2 GSEC、FTO、LRPPRC 与 CDEIS 的相关性分析

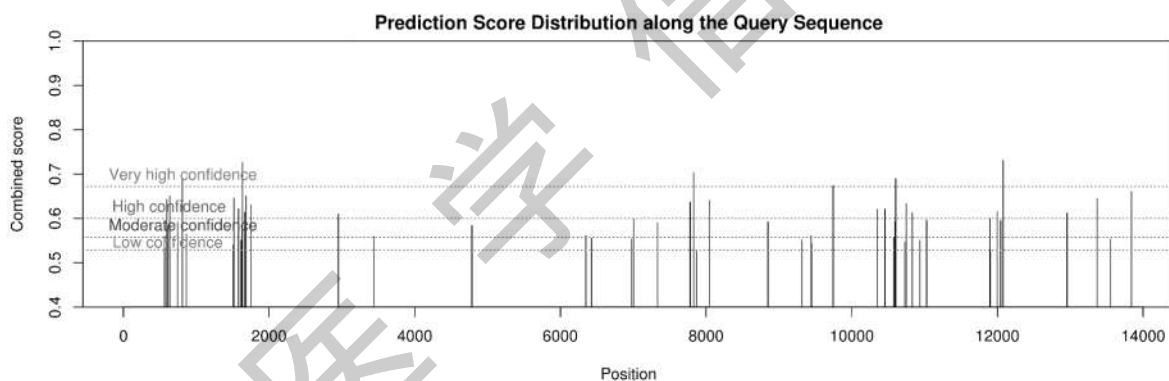


图 3 GSEC m6A 甲基化位点预测

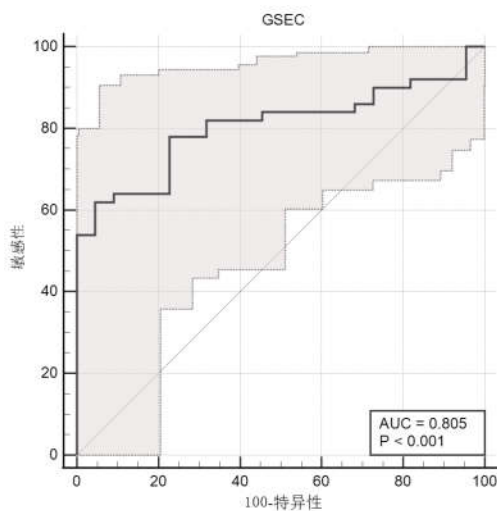


图 4 ROC 诊断曲线

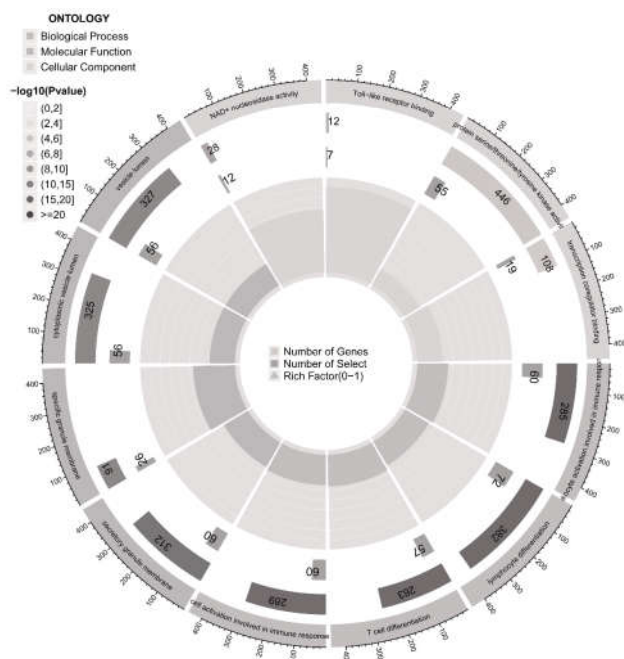


图 5 GO 富集分析

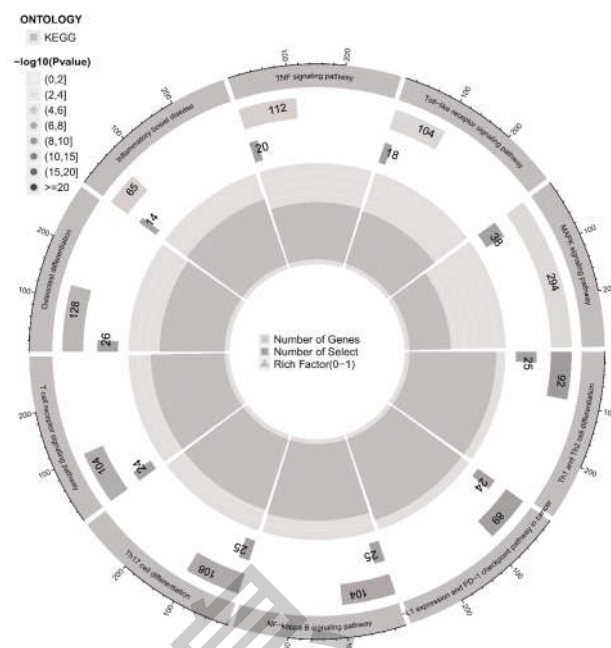


图 6 KEGG 信号通路分析

3 讨论

m6A 甲基化是最常见的 mRNA 修饰形式,在转录后水平调节基因表达中起着至关重要的作用^[8]。异常的 m6A 甲基化通过调节许多生物过程,包括细胞分化、免疫反应等。而在炎症性肠病中,m6A 甲基化在疾病进展中也发挥着重要的作用^[9,10]。越来越多的研究关注 LncRNA 在 CD 中诊断及治疗价值。研究显示^[11],血浆 LncRNA THRIL 在 CD 患者中表达升高,可以作为一种非侵入性的生物标志物来识别疾病活动度的程度。然而,m6A 相关 LncRNA 在 CD 中的研究仍较少。本研究对 CD 中 m6A 相关 LncRNA 的表达、相关功能及临床相关性影响进行了分析。研究结果显示,多个 m6A 相关的 LncRNA 在 CD 患者中存在表达异常。其中,GSEC 在 CD 患者中高表达,且与 CDEIS 评分呈正相关,提示其可作为评估患者病情活动的指标之一。GSEC 为位于 11 号染色体的 LncRNA。有研究显示^[12],GSEC 通过负调节 DHX36 的活性来增强结肠癌细胞迁移。然而,其在 CD 中的作用仍未有报道。为了进一步明确 GSEC 的潜在生物学功能,课题组通过分析 GSEC 共表达的蛋白来推测其潜在功能。结果显示其功能富集于 Th17 细胞分化、NF- κ B 信号通路、炎症性肠病等通路。两项独立研究表明^[13,14],CD 患者的外周血和肠道中存在 Th17 细胞。Th17 细胞主要分泌 IL-17A、IL-22 等细胞因子^[15]。活动期 IBD 患者血浆

和肠黏膜均高表达 IL-17,增加局部炎症反应^[16]。有研究指出,炎症性肠病中存在 T 细胞免疫持续激活的情况^[17]。在 CD 患者中,TH1 细胞和 TH17 细胞对抗原呈递细胞和巨噬细胞分泌的 IL-12、IL-18 和 IL-23 促炎症细胞因子产生过度反应。反之,TH1 和 TH17 细胞分泌促炎症细胞因子 IL-17、IFN γ 和 TNF,通过刺激其他细胞,如巨噬细胞、单核细胞产生 TNF、IL-1、IL-6、IL-12 和 IL-18 等多种炎症因子,导致炎症持续^[18]。以上研究均提示 Th17 在 CD 发病中发挥着重要的作用。NF- κ B 的异常激活导致促炎细胞因子的过度产生,从而导致肠道慢性炎症。研究显示^[19],与非 IBD 患者相比,炎症性肠病(IBD)患者的 NF- κ B 表达率显着升高。Han YM 等^[20]研究显示,在 CD 患者中,与 NF- κ B 活性低的患者相比,NF- κ B 活性高的患者回结肠受累频率更高。NF- κ B 活性高的患者的总组织学评分显著高于 NF- κ B 活性低的患者。Toll 样受体(Toll-like receptors, TLR)是表达于多种细胞上的跨膜蛋白,作为 NF- κ B 的上游信号,可激活多种细胞因子从而引起各种炎症反应。由 TLR 介导的免疫反应可诱发及加重 IBD 的发生与发展^[21]。这种多个通路之间的相互作用,提示 GSEC 可能通过影响多个基因来达到调控的目的。同时,本研究还发现,GSEC 具有良好的分类诊断功能,ROC 曲线下面积为 0.805,提示 GSEC 能作为 CD 患者的诊断标志物之一。

参与 m6A 调控的蛋白质包括 m6A 甲基转移酶、m6A 去甲基转移酶和甲基化阅读蛋白。m6A 甲基化酶与炎症的发生和进展有关,如 T 细胞中 METTL14 的缺失可诱导小鼠出现自发性结肠炎^[22]。而本研究发现,FTO 与 LRPPRC 与 GSEC 表达呈负相关。其中 FTO 属于 m6A 去甲基转移酶,其能够识别含有 m6A 修饰的 mRNA,对该甲基化位点进去甲基化^[23]。而 LRPPRC 属于甲基化阅读蛋白,主要功能为参与 mRNA 的剪切、剪接^[24]。两者在 CD 中的功能尚未充分研究。FTO 作为“橡皮擦”基因,被认为是一种新的遗传标记。有研究显示^[25],FTO 变异 rs9939609 AA 基因型的携带者 CD 患者风险增加。另有研究显示^[26],FTO 可用于预测噻嗪类治疗克罗恩病患者的反应或毒性。炎症性肠病相关结直肠癌死亡率中约为 2%,但在炎症性患者中为 10%~15%^[27],LRPPRC 在结直肠癌组织中的表达比正常组织高 1.5 倍^[28]。然而,其调节 CD 和结直肠癌发展的潜在机制尚不清楚。本研究发现,FTO、LRPPRC 表达与 CDEIS 评分呈反比,提示其表达量与病情活动相关,同时 sramp 网站预测显示 GSEC 存在多个甲基化位点,提示 m6A 甲基化参与了 GSEC 的调控。m6A 甲基化酶调控 lncRNA 存在多种机制,一是改变 lncRNA 的结构并影响与蛋白质的相互作用;二是抑制基因转录;三是 m6A 修饰可能会改变 lncRNA 亚细胞定位分布;四是 m6A 修饰可以调节 lncRNA 的稳定性。基于 FTO 为去甲基化酶及 LRPPRC 为甲基化阅读蛋白,推测其可能通过影响 GSEC 的结构或稳定性,从而调控其功能,参与了 CD 的发病与发展。

综上所述,GSEC 可能是 CD 的潜在的诊断和治疗靶点。然而,对于其具体的作用机制及生物学功能仍需进一步的研究来验证。

参考文献:

- [1]Roda G,Chien NG,Kotze PG,et al.Crohn's disease[J].Nature reviews Disease Primers,2020,6(1):22.
- [2]郑家驹,史肖华,竺霞霜,等.我国克罗恩病不同年代发病率及患病率的比较[J].中华内科杂志,2011,50(7):597-600.
- [3]Kuai XY,Yu SY,Cui XF,et al.lncRNA LUCAT1 as a Plasma Biomarker for Assessing Disease Activity in Adult Patients with Crohn's Disease[J].Gastroenterol Res Pract,2021,2021:5557357.
- [4]Haberman Y,BenShoshan M,Di Segni A,et al.Long ncRNA Landscape in the Ileum of Treatment-Naive Early-Onset Crohn Disease[J].Inflamm Bowel Dis,2018,24(2):346-360.
- [5]Wei W,Ji X,Guo X,et al.Regulatory Role of N6-methyladenosine (m6A) Methylation in RNA Processing and Human Diseases[J].J Cell Biochem,2017,118(9):2534-2543.
- [6]Nishizawa Y,Konno M,Asai A,et al.Oncogene c-Myc promotes epitranscriptome m6A reader YTHDF1 expression in colorectal cancer[J].Oncotarget,2017,9(7):7476-7486.
- [7]Zhu S,Wang JZ,Chen D,et al.An oncopeptide regulates m6A recognition by the m6A reader IGF2BP1 and tumorigenesis[J].Nat Commun,2020,11(1):1685.
- [8]Oerum S,Meynier V,Catala M,et al.A comprehensive review of m6A/m6Am RNA methyltransferase structures[J].Nucleic Acids Res,2021,49(13):7239-7255.
- [9]Zhang T,Ding C,Chen H,et al.m6A mRNA modification maintains colonic epithelial cell homeostasis via NF- κ B-mediated antiapoptotic pathway[J].Sci Adv,2022,8(12):eabl5723.
- [10]Sebastian-de la Cruz M,Olazagoitia-Garmendia A,Gonzalez-Moro I,et al.Implication of m6A mRNA Methylation in Susceptibility to Inflammatory Bowel Disease[J].Epigenomes,2020,4(3):16.
- [11]Elamir A,Shaker O,Kamal M,et al.Expression profile of serum lncRNA THRIL and MiR-125b in inflammatory bowel disease[J].PLoS One,2022,17(10):e0275267.
- [12]Matsumura K,Kawasaki Y,Miyamoto M,et al.The novel G-quadruplex-containing long non-coding RNA GSEC antagonizes DHX36 and modulates colon cancer cell migration[J].Oncogene,2017,36(9):1191-1199.
- [13]Annunziato F,Cosmi L,Santarasci V,et al.Phenotypic and functional features of human Th17 cells[J].J Exp Med,2007,204(8):1849-1861.
- [14]Acosta-Rodriguez EV,Rivino L,Geginat J,et al.Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells[J].Nat Immunol,2007,8(6):639-646.
- [15]Korn T,Bettelli E,Oukka M,et al.IL-17 and Th17 cells[J].Annu Rev Immunol,2009,27:485-517.
- [16]裴中美,赵振亚,肖静波,等.白细胞介素-17 在活动期炎症性肠病患者血浆和肠黏膜中的表达及其意义[J].胃肠病学,2016,21(9):549-553.
- [17]de Souza HS,Fiocchi C.Immunopathogenesis of IBD: current state of the art[J].Nat Rev Gastroenterol Hepatol,2016,13(1):13-27.
- [18]Uhlir HH,Powrie F.Translating immunology into therapeutic concepts for inflammatory bowel disease[J].Annu Rev Immunol,2018,36:755-781.
- [19]Zhang C,Liu LW,Sun WJ,et al.Expressions of E-cadherin, p120ctn, β -catenin and NF- κ B in ulcerative colitis[J].J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci,2015,35(3):368-373.
- [20]Han YM,Koh J,Kim JW,et al.NF- κ B activation correlates with disease phenotype in Crohn's disease[J].PLoS One,

2017,12(7):e0182071.

[21]李旺林,刘梦鳌,曹杰,等.TLR4 在 LPS 诱导的结肠炎症恢复中的作用[J].中国病理生理杂志,2017,33(2):336-343.

[22]Lu TX,Zheng Z,Zhang L,et al.A new model of spontaneous colitis in mice induced by deletion of an RNA methyltransferase component METTL14 in T cells [J].Cell Mol Gastroenterol Hepatol,2020,10(4):747-761.

[23]Wei H,Li Z,Liu F,et al.The Role of FTO in Tumors and Its Research Progress[J].Curr Med Chem,2022,29(5):924-933.

[24]Cui J,Wang L,Ren X,et al.LRPPRC:A Multifunctional Protein Involved in Energy Metabolism and Human Disease [J].Front Physiol,2019,10:595.

[25]Dragasevic S,Stankovic B,Kotur N,et al.Metabolic syndrome in inflammatory bowel disease: association with genetic markers of obesity and inflammation [J].Metab Syndr Relat Disord,

2020,18(1):31-38.

[26]Chang JY,Cheon JH.Thiopurine Therapy in Patients With Inflammatory Bowel Disease:A Focus on Metabolism and Pharmacogenetics[J].Dig Dis Sci,2019,64(9):2395-2403.

[27]Keller DS,Windsor A,Cohen R,et al.Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: review of the evidence [J].Tech Coloproctol,2019,23(1):3-13.

[28]Nishio T,Kurabe N,Goto -Inoue N,et al.Immunohistochemical expression analysis of leucine-rich PPR-motif-containing protein (LRPPRC), a candidate colorectal cancer biomarker identified by shotgun proteomics using iTRAQ[J].Clin Chim Acta,2017,471:276-282.

收稿日期:2023-02-06;修回日期:2023-02-15

编辑/成森