

· 论著 ·

Hsa_circ_0008957靶MiRNA预测及其表达载体构建

李仙仙¹ 鲁艳芹^{1,2,*} 韩金祥^{1,2,*}

1.山东第一医科大学(山东省医学科学院)生物医学科学学院(山东 济南 250014)

2.山东第一医科大学第一附属医院内分泌科(山东 济南 250062)

【摘要】目的 构建 I 型胶原蛋白结构基因COL1A2的靶向circRNA hsa_circ_0008957其靶向miRNA的功能。**方法** 采用circbase软件, 获取hsa_circ_0008957序列, 采用PCR进行circRNA克隆, 通过同源重组接入circRNA表达载体pCD2.1。重组载体pCD2.1-hCOL1A2_circ_0008957通过PCR、双酶切、Sanger测序进行验证。利用circBANK, circinteractome网站进行hsa_circ_0008957靶miRNA及其功能预测。**结果** pCD2.1-hCOL1A2-circ-0008957重组载体构建成功。Hsa_circ_0008957预测出该circRNA不具有蛋白编码功能, 其靶miRNA hsa_miR_1305, hsa_miR_140-3p, hsa_miR_421, hsa_miR_548c-3p和hsa_miR_628-3p与成骨相关, 预测hsa_circ_0008957可能通过这些miRNA参与成骨分化。**结论** Hsa_circ_0008957通过miR-1305、miR-140-3p、miR_421、miR_548c-3p和miR_628-3p参与成骨分化, 且预测COL1A2靶向miRNA与17种miRNA取交集, 得出hsa_miR_618, 该miRNA与肿瘤疾病相关, 为后续在细胞水平上进一步验证hsa_circ_0008957的调节功能奠定了基础。

【关键词】 COL1A2; hsa_circ_0008957; 快速克隆; 生物信息学预测**【中图分类号】** R34**【文献标识码】** A**DOI:**10.3969/j.issn.1009-3257.2022.01.033

Prediction of Hsa_circ_0008957 Target MiRNA and Construction of Its Expression Vector

LI Xian-xian¹, LU Yan-qin^{1,2,*}, HAN Jin-xiang^{1,2,*}

1.School of Biomedical Sciences, Shandong First Medical University (Shandong Academy of Medical Sciences), Jinan 250014, Shandong Province, China

2.Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital of Shandong First Medical University, Jinan 250062, Shandong Province, China

Abstract: Objective Building type I COL1A2 collagen structure gene targeting circRNA hCOL1A2_circ_0008957, the target function of micrnas. **Methods** The circbase software was used to obtain the hsa-COL1A2-circ-0008957 sequence, and the circRNA was cloned by RT-PCR. The circRNA was recombinant into the circRNA expression vector pCD2.1 by homologous recombination method. The recombinant vector pCD2.1-hCOL1A2-circ-0008957 was verified by PCR, double digestion and Sanger sequencing. Hsa-COL1A2-CIRC-0008957 targeting miRNA prediction and its function prediction were performed using circBANK and circinteractome website. **Results** The recombinant vector pCD2.1-hCOL1A2-circ-0008957 was successfully constructed. The prediction of hsa-COL1A2-circ-0008957 showed that this circRNA did not have protein coding function, and its targeted miRNA hsa_miR_1305, hsa_miR_140-3p, hsa_miR_421, hsa_miR_548c-3p, and hsa_miR_628-3p were correlated with osteogenic differentiation, and it was predicted that hsa_circ_0008957 might participate in osteogenic differentiation through these miRNAs. **Conclusion** Hsa_circ_0008957 participates in osteogenic differentiation through mir-1305, mir-140-3p, mir-421, mir-548c-3p and mir-628-3p, and predicts the intersection of COL1A2 targeted miRNA and 17 miRNAs, resulting in hsa_miR_618. This miRNA is related to tumor diseases, which lays a foundation for further verification of the regulatory function of hsa_circ_0008957 at the cellular level.

Keywords: COL1A2; Hsa_circ_0008957; One Step Cloning; Bioinformatic Prediction

CircRNA即环状RNA分子, 是通过共价键连接的环状构造的不具有5'末端磷酸基和3'末端poly(A)羟基的非编码RNA分子^[1]。根据形成方式不同, circRNAs可分为内含子circRNAs、外显子circRNAs和内含子-外显子circRNAs(ElciRNA), 大多数的circRNAs来自蛋白质编码基因的外显子^[2]。作为环状RNA, 可以有效地防止被RNA酶和核酸外切酶降解掉, 比线性RNA的稳定性要强。它会在血浆和外泌体中稳定并广泛存在, 所以circRNAs常作为疾病的生物标记物。CircRNA在不同物种间在进化上具有高度保守性^[3]; 在动物不同时期、不同组织的表达水平不同, 具有表达的时序性与特异性。

circRNA分子能与miRNA中的应答元件(miRNA response element, MRE)结合, 作为竞争性内源RNA(competing endogenousRNA, ceRNA)与miRNA结合, 中起到miRNA海绵的作用, 进而降除miRNA对其目标基因的抑制作用, 提高目标基因的表达水平^[4]。

CircRNAs可以调控基因的转录, ElciRNA可以与RNA聚合酶结合, 影响其转录活性^[5]。如果circRNAs序列中含有其母本基因的起始密码子, 可能会影响其转录本的翻译, 可编码蛋白^[6]。近年来, circRNAs在肿瘤疾病^[7]、心脑血管疾病^[8-9]、神经系统疾病^[10]以及骨相关疾病^[11]等诸多病理状态时表达异常, 并且其表达水平与疾病的发生阶段有

【第一作者】李仙仙, 女, 硕士研究生, 主要研究方向: 骨分子生物学。E-mail: 834955412@qq.com**【通讯作者】**韩金祥, 男, 研究员, 主要研究方向: 骨分子生物学。E-mail: jxhan@sdfmu.edu.cn

鲁艳芹, 女, 副研究员, 主要研究方向: 骨分子生物学。E-mail: yqlu@sdfmu.edu.cn

紧密联系^[12]，可作为评估病情的潜在指标。

COL1A2是I型胶原蛋白的结构基因之一，I型胶原蛋白是动物体内分布最广、含量最丰富的蛋白质，起到支撑、保护机体的功能，其主要分布在真皮、肌腱、骨和牙本质等^[13]。另外它还在肿瘤间质成纤维细胞^[14]及血管细胞^[15]中表达。COL1A2基因多个独立突变会引起骨骼和心血管缺陷，如成骨不全和Ehlers-Danlos综合征^[16]。但它的突变与肿瘤的发生机理仍不清楚，只是在某些肿瘤细胞中COL1A2表达上调或者下调，如结直肠癌，肝癌^[17]，且COL1A2被鉴定为与转移潜力高度相关的17个基因之一^[18]，COL1A2基因在某些转移性肿瘤中上调。

CircRNAs作为当下的研究热点，本研究通过对COL1A2基因circRNA进行预测，对hsa-col1a2-circ-0008957基因进行克隆，构建表达载体，该circRNA尚未报道，研究意义较大，可为后续细胞水平机制方面的研究奠定基础。

1 资料与方法

1.1 一般资料

Trizol试剂购自Invitrogen公司；琼脂糖凝

胶DNA回收试剂盒、质粒提取试剂盒均购自OMEGA_biotek有限公司；PCR试剂、反转录试剂盒、Taq酶、内切酶(KpnI和BamHI)购自宝日医生物技术(北京)有限公司；Clon Express II One Step Cloning Kit试剂购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司；Yeast Extract和TRYPTone均购自OXOID公司；氯化钠试剂购自国药集团化学试剂有限公司；Agar Powder购自索莱宝科技有限公司；大肠杆菌DH5α感受态细胞、pCD 2.1质粒均由山东省罕见病重点实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 Hsa_COL1A2_circ_0008957序列的获取及引物的设计及合成。采用circbase网站，查询以COL1A2为母本基因的circRNA，挑选出hsa_col1a2_circ_0008957，并获得其基因序列，利用载体的酶切位点通过软件CE Design V1.04设计基因特异性扩增引物，用于目的基因的PCR扩增，引物序列如下表1(黑体序列为同源臂，小写序列为酶切位点，下划线序列为正/反向环化介导序列)，引物均由华大基因有限公司合成。

表1 引物序列

名称	引物序列
上游引物5'-3'	ATCTGTTCAATTAACggtaccTGAAATATGCTATCTTACAGAACAGCTTTGCACATTTAATG
下游引物5'-3'	TCATCCCAAATTAGTggatccTCAAGAAAAATATATTCCTGTAAGAATCACCACAACCTTC

1.2.2 RNA提取及cDNA合成 采用Trizol法提取293T细胞总RNA，检测核酸浓度及纯度，选取合格的RNA用于cDNA合成。第一步去除基因组DNA；Random Primer(6mer)1μL，dNTP Mix(10nm)1μL，模板RNA 2μg，RNase-free ddH₂O补足10μL，65℃5min，4℃2min；第二步逆转录反应：在第一步反应产物中加入5xPrimer Script Buffer 4μL，RNase Inhibitor0.5μL，Primer Script Reverse Transcriptase 1μL，RNase-free ddH₂O 4.5μL，按下列反应程序合成第一条链cDNA：30℃10min；42℃60min；70℃15min^[19]。产物置于-80℃保存。

1.2.3 PCR扩增Hsa_COL1A2_circ_0008957 以cDNA为模板PCR扩增Hsa_COL1A2_circ_0008957，PCR反应体系20μL：2xGC Buffer 10μL，dNTP Mixture(2.5nm)1.6μL，TaKaRa Taq 0.1μL，模板cDNA(1000ng)，上下游引物各1μL，RNase-free ddH₂O补足20μL。PCR反应程序为：95℃预变性5min；95℃变性15s，50℃退火20s，72℃延伸30s，共35个循环。72℃延伸5min，4℃结束反应。

1.2.4 pCD2.1-hCOL1A2-circ-0008957重组载体构建及检测 PCR产物经0.8%琼脂糖凝胶电泳检测分离，将目的DNA片段进行切胶回收纯化。pCD2.1载体用限制性内

切酶Kpn I 和BamH I 进行双酶切，37℃酶切4h，电泳并回收酶切产物，与目的片段进行同源重组。将重组产物转化进入大肠杆菌DH5α感受态细胞，在含氨苄青霉素(Amp⁺)的LB固体培养基上涂布，置于37℃培养箱倒置培养12~16h。挑取单菌落克隆，在含氨苄青霉素(Amp⁺)的LB液体培养基中继续培养，并将菌液进行菌液PCR鉴定，挑取鉴定正确的的单克隆菌液利用质粒提取试剂盒提取质粒，并最终进一步酶切验证，将鉴定正确的质粒送去华大基因进行Sanger测序，将测序正确的质粒进行扩大培养，并用75%甘油保存在-80℃冰箱。

1.2.5 Hsa-COL1A2-circ-0008957生物信息学预测 应用circBANK(<http://www.circbank.cn/>)软件和Circular RNA Interactome 软件(<https://circinteractome.nia.nih.gov/>)对hsa-COL1A2-circ-0008957进行生物信息学分析。

2 结果

2.1 pCD2.1-hCOL1A2-circ0008957重组载体的验证 用限制性内切酶将pCD2.1原载体双酶切后，获得100bp左右的片段，与预期相符(图1A)；PCR扩增结果显示，扩增条带大小约372bp，与预期相符(图1B)；将纯化的目的基因与线性载体pCD2.1进行连接后，转化大肠杆菌感受态细胞，挑取单菌落进行菌落PCR鉴定，出现了与预期相符的目的条

带,大小为372bp(图1C);提取质粒后对其进行双酶切验证,重组片段也出现了372bp的目的条带(图1D)。

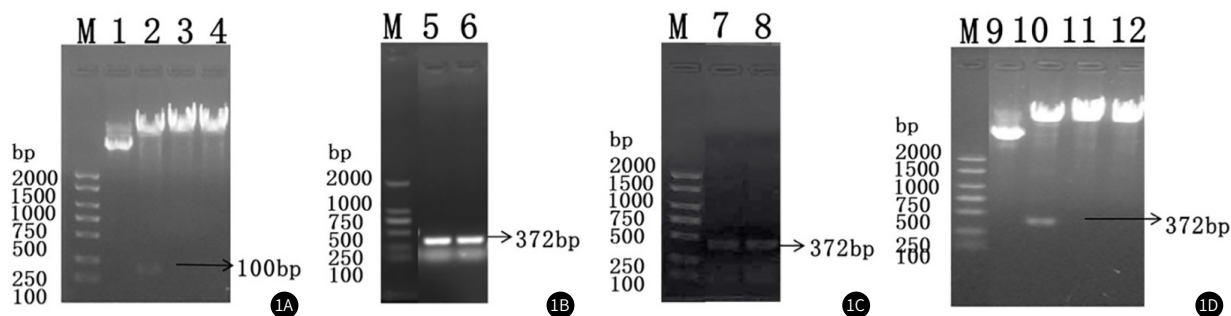
2.2 重组载体 pCD2.1-hCOL1A2-circ0008957 Sanger测序

将阳性重组质粒进行测序,测序结果在NCBI上进行BLAST比对分析,与预期结果完全一致,表明成功构建pCD2.1-hCOL1A2-circ0008957重组载体(图2)。

2.3 Hsa-COL1A2-circ0008957生物信息学预测

应用软件分析,其在circBANK中的ID为hsa_circCOL1A2_116,开放阅读框长度(ORF-SIZE)为171bp;存在IRES(internal ribosome entry site)序列,可通过此启动翻译行使编码

蛋白的功能,这与其他普通线性RNA是不同的;网站中提供的coding_prob却为0.0019(范围为0-1),分数较低,表明其编码潜力较低,其功能还待进一步研究,在网站中检索到该circRNA位于其母本基因COL1A2的mRNA的外显子中,且被发现存在于成骨细胞、皮下前脂肪细胞、膝关节软骨细胞、平滑肌细胞中。Circular RNA Interactome 软件预测到hCOL1A2-circ-0008957相互结合的miRNA有17种,其中与成骨分化和骨质疏松相关的miRNA有5种,该circRNA与5种miRNA的结合位点如图3。



注: 1: pCD2.1质粒; 2: pCD2.1质粒酶切产物(BamH I、Kpn I双酶切); 3: pCD2.1质粒 Kpn I单酶切; 4: pCD2.1质粒 BamH I单酶切; 5/6: 目的基因PCR扩增结果; 7/8: 菌液PCR结果; 9: pCD2.1质粒; 10: 重组质粒酶切产物(BamH I、Kpn I双酶切); 11: 重组质粒 Kpn I单酶切; 12: 重组质粒 BamH I单酶切。

图1 pCD2.1-hCOL1A2-circ0008957重组载体的验证

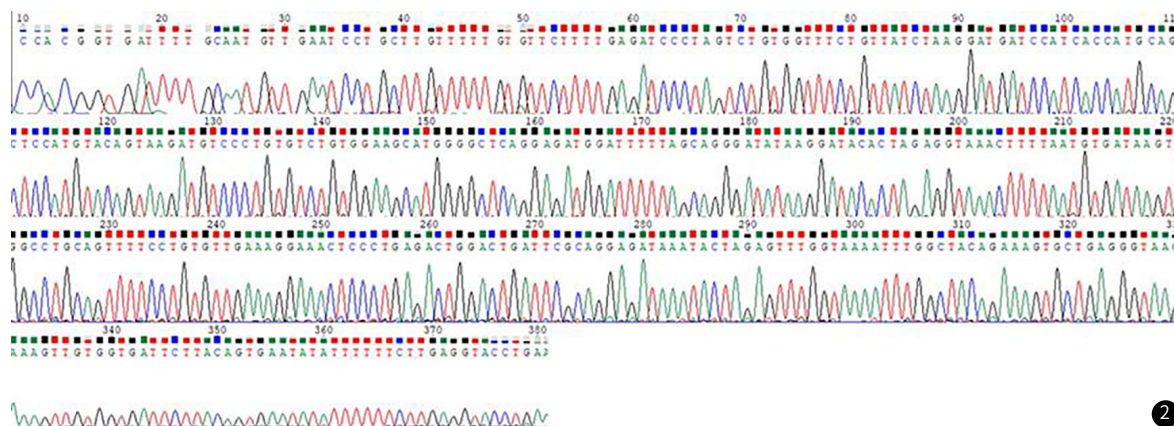


图2 pCD2.1-hCOL1A2-circ0008957 Sanger测序结果

CircRNA	CircRNA (Top) - miRNA (Bottom) pairing	
Mirbase ID		
hsa_circ_0008957 (5' ... 3')		CUGCAGUUUCCUGUGUUGAAAG
hsa-miR-1305 (3' ... 5')		
		AGAGAGGGUAAUCUCAACUUUU
hsa_circ_0008957 (5' ... 3')		UUUGAGAUCCCUAGUCUGUGGUU
hsa-miR-140-3p (3' ... 5')		
		GGCACCAAGAUGGGACACCAU
hsa_circ_0008957 (5' ... 3')		CCUGCAGUUUCCUGUGUUGAAA
hsa-miR-421 (3' ... 5')		
		CGCGGGUAAUUACAGACAACUA
hsa_circ_0008957 (5' ... 3')		GGGCUCAGGAGAUUGAUUUUU
hsa-miR-548c-3p (3' ... 5')		
		CGUUUUAUUAAUCUAAAAAC
hsa_circ_0008957 (5' ... 3')		UUCGACGAGAUAAAUAUAGAG
hsa-miR-628-3p (3' ... 5')		
		AGCUGACGGUGAGAAUGAUCU

图3 circRNA与靶向miRNA的结合位点

3 讨论

CircRNA较其他线性RNA研究开始较晚,随着circRNA研究的深入开展,越来越多的circRNA被发现。CircRNA多在肿瘤中报道,有少量关于骨相关疾病的报道。本研究中,hsa-COL1A2-circ-0008957在之前从未报道,该circRNA无编码蛋白的功能,猜测它靶向miRNA分子海绵进而调节成骨分化。通过circinteractome数据库得出17种靶向miRNA分析,其中hsa-miR-1305、hsa-miR-140-3p、hsa-miR-421、hsa-miR-548c-3p和hsa-miR-628-3p五种miRNA与骨质疏松,成骨分化相关;hsa-miR-618、hsa-miR-561、hsa-miR-1233、hsa-miR-1305、hsa-miR-558、hsa-miR-577、hsa-miR-518a-5p、hsa-miR-527、hsa-miR-1200和hsa-miR-1183与肿瘤疾病相关;hsa-miR-561可作为肿瘤的生物靶标,hsa-miR-1200也可作为妊娠糖尿病的靶标;hsa-miR-1225-3p、hsa-miR-1183和hsa-miR-197与自身免疫系统疾病相关。COL1A2作为该circRNA的母本基因,它与骨骼发育有关,为后续研究其在成骨分化中的作用奠定基础。

参考文献

[1]Chen L L,Yang L.Regulation of circRNA biogenesis[J].RNA Biol, 2015, 12 (4): 381-388.
[2]夏天,蒋孝明,陈晓敏,等.环状RNA:竞争性内源RNA新成员[J].中国细胞生物学学报,2013, 35 (11): 1695-1700.
[3]夏世金,高文,胡明冬,等.环状RNA的研究现状及展望[J].中华肺部疾病杂志(电子版),2014, 7 (6): 670-673.
[4]许妍,赵雪,堵晶晶,等.环状RNA研究进展[J].中国生物工程杂志,2017, 37 (10): 93-102.
[5]张春雷,杨琦,晔晓渊,等.环状RNA在肿瘤中作用的研究进展[J].癌变·畸变·突变,2020, 32 (6): 477-480, 484.
[6]Diallo L H,Tatin F,David F,et al.How are circRNAs translated by non-canonical initiation mechanisms[J].Biochimie,2019, 164: 45-52.

[7]Yu L,Gong X,Sun L,et al.The circular RNA Cdr1as act as an oncogene in hepatocellular carcinoma through targeting miR-7 expression[J].PLoS One.2016, 11 (7): e0158347.
[8]Sun J,Zhang Z,Yang S.Circ-RUSC2 upregulates the expression of miR-661 target gene SYK and regulates the function of vascular smooth muscle cells[J].Biochem Cell Biol,2019, 97 (6): 709-714.
[9]Cai L,Qi B,Wu X,et,al.Circular RNA Ttc3 regulates cardiac function after myocardial infarction by sponging miR-15b[J].J Mol Cell Cardiol,2019, 130: 10-22.
[10]周志威,雷炳喜,黄毓韬,等.Circ-0080229结合蛋白的筛选及其在胶质瘤调控中的意义[J].岭南现代临床外科,2019, 19 (2): 145-149.
[11]翟乃祥,任秀智,鲁艳芹,等.CircRNA与骨相关疾病[J].中国骨质疏松杂志,2018, 24 (6): 836-840.
[12]滕元伟,任秀智,王延宙,等.成骨不全14种长链非编码RNA差异表达分析[J].罕少疾病杂志,2016, 23 (2): 55-57.
[13]Heino J.The collagen family members as cell adhesion proteins[J].Bioessays,2007, 29 (10): 1001-1010.
[14]Ramirez F,Tanaka S,Bou-Gharios G.Transcriptional regulation of the human alpha2(I) collagen gene (COL1A2),an informative model system to study fibrotic diseases[J].Matrix Biol,2006, 25 (6): 365-372.
[15]Fouser L,Iruela-Arispe L,Bornstein P,et al.Transcriptional activity of the alpha 1(I)-collagen promoter is correlated with the formation of capillary-like structures by endothelial cells in vitro[J].J Biol Chem,1991, 266 (27): 18345-18351.
[16]Morlino S,Micale L,Ritelli M,et al.COL1-related overlap disorder: A novel connective tissue disorder incorporating the osteogenesis imperfecta/Ehlers-Danlos syndrome overlap[J].Clin Genet,2020, 97 (3): 396-406.
[17]Chiba T,Yokosuka O,Fukai K,et al.Identification and investigation of methylated genes in hepatoma[J].Eur J Cancer, 2005, 41 (8): 1185-1194.
[18]Que N,Hamai Y,Mitani Y,et al.Gene expression profile of gastric carcinoma: Identification of genes and tags potentially involved in invasion, metastasis, and carcinogenesis by serial analysis of gene expression[J].Cancer Res,2004, 64 (7): 2397-2405.
[19]韩峰,鲁艳芹,王延宙,等. IFITM5在不同癌细胞系中的差异表达[J].罕少疾病杂志,2015, 22 (2): 49-51.

(收稿日期: 2021-02-19)

关于书写作者单位名称和作者信息的要求

- 1.投稿时,首先应列出单位名称的全称,如已归属于综合大学的单位,应先列出大学名称,之后列出医学院名称或医院名称、科室名称。单位的英文名称应根据所在单位统一的英文名称书写;
- 2.作者在向本刊投稿时出具的版权转让协议上,签章单位名称须与文章中所书写的单位名称一致。若版权转让协议未盖章递交,本刊一律不接收其投稿;
- 3.由不同单位共同撰写的同一篇文稿,各个单位不同科室/部门/学院(系)的名称均须分别列出,由第一作者所在单位出具版权转让协议;
- 4.如第一作者在投稿后工作单位发生变动,必须第一时间通知到本刊,否则一经刊出,无法更改。
- 5.投稿时,须提供第一作者和通讯作者的姓名、性别、职称、主要研究方向和E-mail,文章出刊时会在脚注位置注明此类信息。
- 6.投稿时,须在填写基本资料时填写上收件地址、收件人和联系电话,否则本刊无法邮寄文章纸质刊书和发票文件。