

# MiR-301a-5p 调节继发性甲状旁腺功能亢进症中甲状旁腺激素的分泌 基于调控钙敏感受体的表达

柳丽丹<sup>1</sup>, 钱立元<sup>1</sup>, 李珮婷<sup>1</sup>, 李俊<sup>1</sup>, 黄珊<sup>1</sup>, 易文君<sup>2</sup>, 柳双喜<sup>1</sup>, 吴唯<sup>1</sup>

<sup>1</sup>中南大学湘雅三医院乳甲外科, 湖南 长沙 410013; <sup>2</sup>中南大学湘雅二医院乳甲外科, 湖南 长沙 410013

**摘要:**目的 探索继发性甲状旁腺功能亢进症(SHPT)中引起钙敏感受体(CaSR)低表达的miRNA及其对甲状旁腺激素(PTH)分泌的影响。方法 对6例正常甲状旁腺组织标本和11例SHPT的甲状旁腺组织标本进行了全转录组测序,结合网站的预测,初步筛选了7个有可能调控CaSR的miRNAs,通过双荧光素酶实验,选定出一个最可能调控CaSR的miRNA。采用qRT-PCR检测正常甲状旁腺组织与SHPT甲状旁腺组织中miR-301a-5p和CaSR信使RNA表达的差异,并分析其表达量与患者血清PTH水平的相关性。采用Western blot检测SHPT甲状旁腺原代细胞转染miR-301a-5p mimics、inhibitors及各自对照之后CaSR蛋白表达的情况,同时取其上清液测定PTH的分泌情况。结果 初步选定了7个有可能调控CaSR的miRNAs,分别是:miR-15a-5p、miR-15b-5p、miR-16-5p、miR-221-3p、miR-222-3p、miR-301a-5p和miR-503-5p。与正常甲状旁腺组织相比,miR-301a-5p在SHPT中表达上调( $P<0.05$ ),其表达量与患者PTH水平呈正相关关系,但结果无统计学意义( $P>0.05$ );而CaSR信使RNA表达下调( $P<0.05$ ),其表达量与患者PTH水平呈负相关关系,但结果无统计学意义( $P>0.05$ )。在细胞实验中,当miR-301a-5p过表达时,SHPT甲状旁腺原代细胞中CaSR蛋白的表达较对照组减少( $P<0.05$ );反之,当miR-301a-5p的表达被抑制时,CaSR蛋白的表达较对照组增加( $P<0.05$ )。过表达miR-301a-5p后,PTH的分泌与对照组的差异无统计学意义( $P>0.05$ ),而拮抗miR-301a-5p的表达后,PTH的分泌较对照组增加( $P<0.05$ )。结论 miR-301a-5p可能通过调控SHPT中CaSR的表达而影响PTH的分泌。

**关键词:**继发性甲状旁腺功能亢进症;钙敏感受体;甲状旁腺激素;miR-301a-5p

## MiR-301a-5p modulates parathyroid hormone secretion in secondary hyperparathyroidism possibly by regulating calcium-sensing receptor

LIU Lidan<sup>1</sup>, QIAN Liyuan<sup>1</sup>, LI Peiting<sup>1</sup>, LI Jun<sup>1</sup>, HUANG Shan<sup>1</sup>, YI Wenjun<sup>2</sup>, LIU Shuangxi<sup>1</sup>, WU Wei<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Breast and Thyroid Surgery, Third Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410013, China; <sup>2</sup>Department of Breast and Thyroid Surgery, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410013, China

**Abstract: Objective** To explore the miRNAs that down-regulate calcium-sensing receptor (CaSR) in secondary hyperparathyroidism (SHPT) and their effects on parathyroid hormone (PTH) secretion. **Methods** Whole transcriptome sequencing was performed for 6 normal parathyroid tissue samples and 11 SHPT parathyroid tissue samples. Based on bioinformatic prediction, we screened out 7 candidate miRNAs that regulate CaSR, among which the most likely miRNA for CaSR regulation was identified by double luciferase test. We detected the differential expression of miR-301a-5p and CaSR mRNA in SHPT and normal parathyroid tissue using qRT-PCR, and analyzed the correlation between their expressions and serum PTH levels of the patients. Western blotting was used to detect the expression of CaSR protein in primary SHPT parathyroid cells transfected with miR-301a-5p mimics or inhibitors, and the level of PTH in the supernatant of the cell culture was determined. **Results** Among the preliminarily selected 7 miRNAs that potentially regulate CaSR (miR-15a-5p, miR-15b-5p, miR-16-5p, miR-221-3p, miR-222-3p, miR-301a-5p and miR-503-5p), miR-301a-5p was significantly upregulated in SHPT compared with normal parathyroid tissue ( $P<0.05$ ), and its expression appeared to be positively correlated with PTH level, but this correlation was not statistically significant ( $P>0.05$ ); The expression of CaSR mRNA was significantly downregulated in SHPT ( $P<0.05$ ), and its expression tended to inversely correlate with the patient's PTH level, but the correlation was not statistically significant ( $P>0.05$ ). In primary culture of SHPT parathyroid cells, miR-301a-5p overexpression caused a significant decrease of CaSR protein expression ( $P<0.05$ ), and conversely, inhibition of miR-301a-5p expression increased the expression of CaSR protein ( $P<0.05$ ). Although miR-301a-5p overexpression did not significantly affect PTH secretion of the cells ( $P>0.05$ ), inhibition of miR-301a-5p expression strongly increased the secretion of PTH ( $P<0.05$ ). **Conclusion** MiR-301a-5p affects PTH secretion in SHPT possibly by regulating the expression of CaSR.

**Keywords:** secondary hyperparathyroidism; calcium-sensing receptors; parathyroid hormone; miR-301a-5p

收稿日期:2023-02-17

基金项目:国家自然科学基金(8227033850)

Supported by the Natural Science Foundation of China (8227033850).

作者简介:柳丽丹,住院医师,E-mail:1140246679@qq.com

通信作者:吴唯,主任医师,副教授,硕士生导师,E-mail:1103108245

@qq.com

继发性甲状旁腺功能亢进症(SHPT)是由于各种原因所致的低钙血症刺激甲状旁腺,使之代偿性分泌过多的甲状旁腺激素(PTH),常继发于慢性肾脏疾病<sup>[1]</sup>。慢性肾脏疾病引起的SHPT与肾性骨营养不良、骨外钙化、骨矿化受损和心血管疾病有关,SHPT逐渐进展引起

的矿物质代谢紊乱和心脑血管系统紊乱均是慢性肾脏疾病患者死亡的主要原因<sup>[2]</sup>。SHPT的特征是PTH分泌增加和甲状旁腺增生,导致骨和矿物质代谢紊乱,且甲状旁腺增生导致维生素D受体和钙感受体(CaSR)的表达减少,PTH分泌增加<sup>[3,4]</sup>。SHPT发病机制复杂,既往研究认为其与高磷血症、CaSR、维生素D受体、成纤维细胞生长因子-23、PTH受体表达下调、靶器官对PTH反应性降低、PTH代谢紊乱、碎片化微小RNA(miRNA)的改变等相关<sup>[5]</sup>,但尚不完全明确。CaSR的低表达在其中起着重要作用,据此机制而使用的拟钙剂药物也广泛用于临床;但对于晚期的SHPT患者,药物的治疗效果甚微,此时大部分患者仍需手术治疗。由于手术本身存在风险及部分患者不能耐受手术等因素,导致SHPT患者的生存与生活质量严重受损,研究SHPT中CaSR低表达的相关机制以探寻进一步的治疗手段刻不容缓。

CaSR是一种位于甲状旁腺主细胞膜上的G蛋白偶联受体,在生理状况下与调节机体血清钙浓度及PTH的分泌有关<sup>[6]</sup>;在SHPT中,CaSR也与PTH的异常分泌有关<sup>[7]</sup>。既往认为其低表达与高磷状态、Klotho蛋白和甲状旁腺增生有关<sup>[8]</sup>,但目前尚无针对调控SHPT中CaSR的miRNA相关研究。MiRNAs具有调节激素合成、激素释放和内分泌细胞增殖等的功能,与许多疾病的发生发展有密切关系<sup>[9-11]</sup>。本研究旨在探索miRNA对CaSR的相对调控作用及其对PTH的分泌是否存在影响,以期为进一步研究SHPT的发病机制和诊治等提供新的参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

RIPA裂解液(Abiowell),蛋白酶抑制剂(北京金泰宏达),蛋白磷酸酶抑制剂(Abiowell),显影液(上海佳信),定影液(上海佳信),1640培养基(Sigma),胎牛血清(GIBICO),青-链霉素(碧云天),I型胶原酶(索莱宝),Lipo3000(thermofisher),trizol试剂(invitrogen);化学发光成像系统(中国勤翔),超净工作台(北京亚泰),低速离心机(知信仪器),直热式二氧化碳培养箱(上海三藤仪器),倒置显微镜(北京中显恒业);mRNA及miRNA引物,miRNA mimics及miRNA inhibitor,mRNA及miRNA qRT-PCR Starter Kit试剂盒(广州锐博生物有限公司);双荧光素酶报告质粒(Abiowell),293T细胞(上海中乔新舟生物科技公司);SHPT的组织标本来源于接受外科手术的尿毒症继发SHPT患者的术后标本,正常的甲状旁腺标本来源于甲状腺癌患者行甲状腺癌根治手术时,术者不慎将甲状旁腺切除的标本,标本均来源于中南大学湘雅三医院乳甲外科,实

验所需用到甲状旁腺标本的收集已通过中南大学湘雅三医院伦理委员会的批准。

### 1.2 目标miRNA的初步筛选

本课题组已对6个正常甲状旁腺组织标本和11个SHPT甲状旁腺组织标本进行了全转录组高通量测序,得到52个在SHPT中高表达的miRNAs<sup>[12]</sup>。同时通过targetscan网站([https://www.targetscan.org/vert\\_80/](https://www.targetscan.org/vert_80/))和miRDB网站(mirdb.org)对可能调控CaSR基因的miRNA进行预测,将上述3种方法得到的结果作韦恩图取交集可得到三者共有的7个miRNAs,对初步筛选出的7个miRNAs进行下一步的双荧光素酶实验。

### 1.3 双荧光素酶实验

采用24孔板培养8组293T细胞,分别转染质粒(含有人CASR基因3'UTR端部分序列,命名为psiCHECK-2-CASR-3U)及各个miRNA mimic或对照(NC),具体分组如下:(1)psiCHECK-2-CASR-3U+miRNA NC组;(2)psiCHECK-2-CASR-3U+miR-15a-5p mimics组;(3)psiCHECK-2-CASR-3U+miR-15b-5p mimics组;(4)psiCHECK-2-CASR-3U+miR-16-5p mimics组;(5)psiCHECK-2-CASR-3U+miR-221-3p mimics组;(6)psiCHECK-2-CASR-3U+miR-222-3p mimics组;(7)psiCHECK-2-CASR-3U+miR-301a-5p mimics组;(8)psiCHECK-2-CASR-3U+miR-503-5p mimics组。每组做3个复孔,共24孔。转染72 h后,使用试剂盒(Vazyme Biotech Co., Ltd.)对各组细胞进行裂解,并检测相应的荧光强度。通过上述实验选定了miR-301a-5p为进一步的研究对象,并构建了人CASR基因3'UTR双荧光素酶报告质粒(突变型),命名为psiCHECK-2-CASR-3U-Mut(以下简称Mut)。Mut针对预测的miR-301a-5p结合位点进行了定点突变。再次使用24孔板培养两组293T细胞,分别转染Mut及miR-301a-5p mimics或miRNA NC,具体分组如下:(1)Mut+NC组:共转染psiCHECK-2-CASR-3U-Mut大提质粒、miRNA NC的293T细胞(2)Mut+miR-301a-5p mimics组:共转染psiCHECK-2-CASR-3U-Mut大提质粒、miR-301a-5p mimics的293T细胞。再次用上述方法检测荧光强度。

### 1.4 qRT-PCR

采用trizol提取甲状旁腺组织RNA之后,检测CaSR mRNA及miR-301a-5p在SHPT和正常甲状旁腺组织中的表达水平,采用染料法(SYBR Green I)通过LightCycler-4800II PCR仪进行实时定量PCR分析,mRNA的内参选用GAPDH,miRNA的内参选用U6,实验所用引物由广州锐博生物公司所设计并且合成。

### 1.5 SHPT甲状旁腺原代细胞的提取、培养及转染

手术切除的SHPT甲状旁腺标本浸泡于约4℃含

有链霉素及青霉素(以下简称双抗)的1640培养液中,在PBS中清洗组织块,去掉血块、脂肪和包膜,只留下腺体组织;在PBS中剪碎组织至1 mm<sup>3</sup>大小,将组织转移至50 mL离心管中,加入胶原酶消化液;37 °C摇床80 r/min消化1 h;过200目细胞滤网,收集滤液;1000 r/min离心5 min,弃上清,加10 mL PBS洗涤,1000 r/min离心5 min,弃上清;加入2 mL红细胞裂解液,室温裂解5 min,再加8 mL PBS,混匀,1000 r/min离心5 min,弃上清,加10 mL PBS洗涤,1000 r/min离心5 min,弃上清;加1 mL完全培养基重悬,混匀,取10 μL计数,每孔接种5×10<sup>5</sup>/孔细胞,接种体积2 mL;细胞于含10%FBS+1%双抗的1640培养基中,37 °C、5% CO<sub>2</sub>饱和湿度的培养箱中培养。培养2 d后首次换液,以后每2~3 d换液1次。细胞培养至5 d时,细胞体积变大,细胞未见明显增多。此时取细胞进行分组转染,共分为4组,分别为:

1.6 Western blotting

收集转染后的细胞,用蛋白裂解液在冰上裂解细胞。加入样本进行SDS-PAGE电泳,转膜,封闭,再加入一抗过夜。第2天TBST洗涤3次后,加入二抗常温孵育1.5 h。TBST清洗后,加入显影液拍照。

1.7 细胞上清液PTH浓度的检测

取转染后的细胞上清液在中南大学湘雅三医院核医学科进行PTH分泌情况检测。

1.8 统计学分析

采用Graphpad Prism 8软件对数据进行统计学分析,计量资料以均数±标准差表示,组间比较采用t检验,以P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-15a-5p、miR-15b-5p、miR-16-5p、miR-221-3p、miR-222-3p、miR-301a-5p和miR-503-5p与CaSR基因均有靶向作用关系

因miRNA通常与靶基因呈负调控关系,当靶基因表达下调时,其miRNA多为上调,CaSR基因在SHPT中表达下调,故选择测序结果中上调的52个miRNAs作为下一步的研究对象。同时,结合生物信息学网站预测的可能靶向CaSR的miRNAs,三者作韦恩图取交集(图1),初步筛选出了可能靶向调控CaSR基因的7个miRNAs,分别是miR-15a-5p、miR-15b-5p、miR-16-5p、miR-221-3p、miR-222-3p、miR-301a-5p和miR-503-5p。

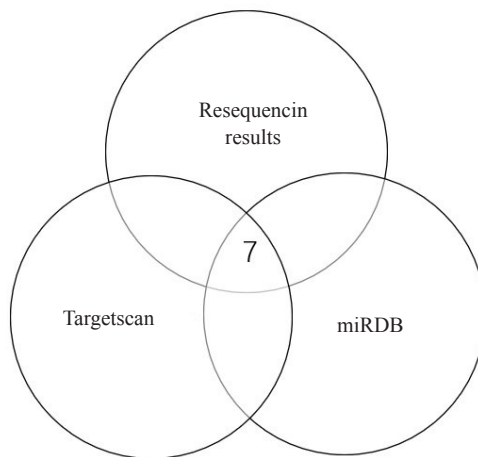


图1 韦恩图结果  
Fig.1 Result of Venn diagram.

构建一个插入了人CaSR基因(NM\_001178065)3'UTR端部分序列的报告质粒,命名为psiCHECK-2-CASR-3U,该段序列包含了上述7个miRNAs可能与之结合的位点(图2)。将各个miRNA mimic或mimic NC分别和质粒一同转染至293T细胞中,进行双荧光素酶实验,实验结果显示,各个mimics与靶基因均有不同程度的结合,7个miRNAs都与CaSR基因有靶向关系,但miR-301a-5p与CaSR基因之间的靶向关系最强(图3)。因此,选择miR-301a-5p进行下一步的验证实验。

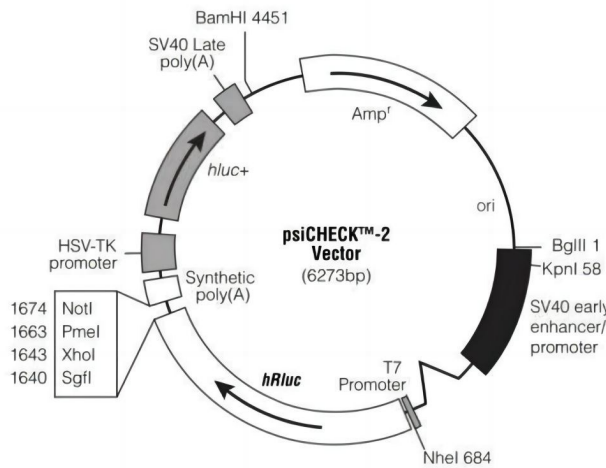


图2 双荧光素酶报告质粒psiCHECK-2-CASR-3U  
Fig.2 Structure of the dual-luciferase plasmid psiCHECK-2-CASR-3U.

2.2 将CaSR基因3'UTR区中预测的miR-301a-5p结合位点进行定点突变后miR-301a-5p mimics与CaSR基因的靶向关系

在之前构建的质粒基础上,又构建了一个人CaSR基因3'UTR双荧光素酶报告质粒(突变型),命名为



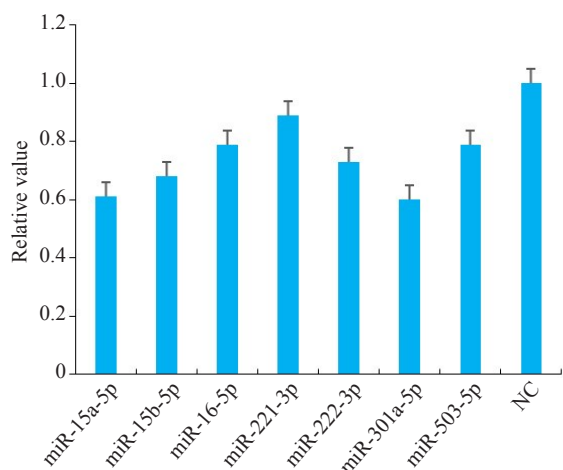


图3 双荧光素酶实验结果  
Fig.3 Dual-luciferase experiment results.

psiCHECK-2-CASR-3U-Mut(简称Mut), Mut针对预测的miR-301a-5p结合位点进行了定点突变。将该突变质粒分别和miR-301a-5p mimic、mimic NC转染至293T细胞中再次进行双荧光素酶实验,结果显示,将CaSR基因3'UTR区中预测的miR-301a-5p结合位点进行定点突变后,miR-301a-5p mimics与CaSR基因没有了靶向关系。反之,也进一步验证了miR-301a-5p与CaSR基因有靶向关系(图4)。

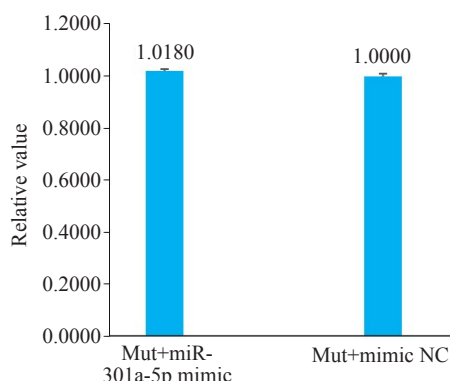


图4 转染突变型质粒后的双荧光素酶结果  
Fig.4 Dual-luciferase results after transfection with the mutant plasmids.

### 2.3 MiR-301a-5p与CaSR mRNA在SHPT中的表达情况

选取11例手术切除的SHPT标本与3例正常甲状旁腺标本分别进行RNA提取,然后进行qRT-PCR实验,结果与测序的结果一致,同正常甲状旁腺组织相比,miR-301a-5p在SHPT中的表达量更高,差异有统计学意义( $t=2.747, P=0.018$ ,图5)。另外,还选取了10例手术切除的SHPT标本与6例正常甲状旁腺组织标本再次提取RNA进行qRT-PCR实验,验证CaSR mRNA的表

达情况,结果显示CaSR基因的表达下调,差异有统计学意义( $t=3.148, P=0.007$ ,图6)。另外,miR-301a-5p和CaSR mRNA与血清PTH水平分别呈正相关和负相关关系,但结果无统计学意义( $P>0.05$ ,图7、8)。

### 2.4 SHPT原代细胞中miR-301a-5p对CaSR基因表达的调控作用

培养SHPT甲状旁腺原代细胞,按如下分组进行转

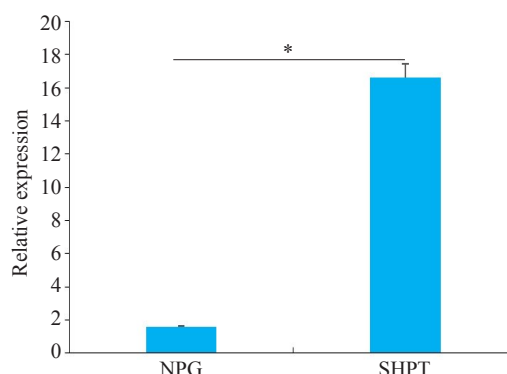


图5 MiR-301a-5p在正常甲状旁腺与SHPT中的相对表达量比较

Fig.5 Comparison of the relative expression of miR-301a-5p in normal parathyroid gland and SHPT. \* $P<0.05$ .

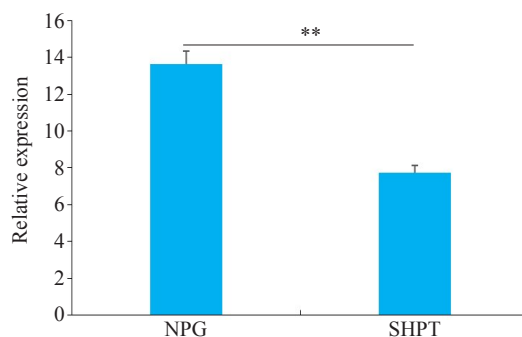


图6 CaSR mRNA在正常甲状旁腺与SHPT中的相对表达量比较

Fig.6 Comparison of relative expression of CaSR mRNA in normal parathyroid gland and SHPT. \*\* $P<0.01$ .

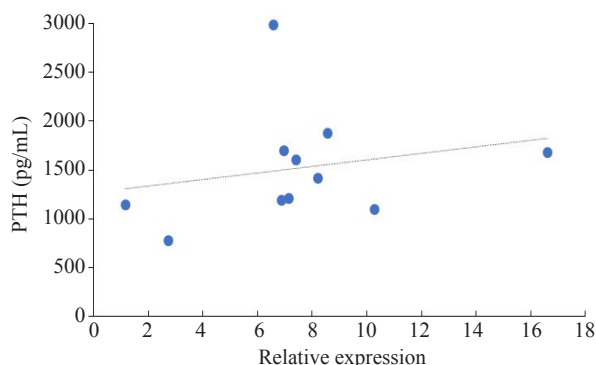


图7 MiR-301a-5p与PTH水平的相关性

Fig.7 Correlation between miR-301a-5p and PTH levels.

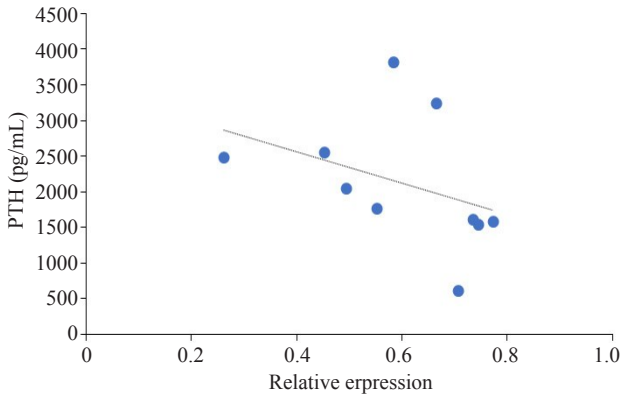


图8 CaSR mRNA与PTH水平的相关性  
Fig.8 Correlation between CaSR mRNA and PTH levels.

染:(1)组:细胞转染 miR-301a-5p mimics;(2)组:细胞转染 mimics NC;(3)组:细胞转染 miR-301a-5p inhibitor;(4)组:细胞转染 inhibitor NC。将4组的细胞继续置于 37 °C培养箱中培养 12 h后换新鲜完全培养液,转染 48 h后,留取细胞上清液测定 PTH 浓度,收集细胞样品进行 Western blotting 实验,重复 3 次,实验结果(图9~11)。用 Image J 软件测得其各组灰度值,其相对表达量差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,表 1,2)。

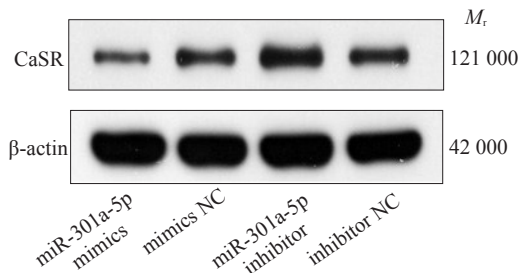


图9 第1次实验各组CaSR的表达量  
Fig.9 Expression of CaSR in each group in the first experiment.

### 2.5 拮抗 miR-301a-5p 促进 SHPT 甲状旁腺原代细胞 PTH 的分泌

取上述转染实验完成后的上清液,测其 PTH 的浓度进行对比,结果显示,当 miR-301a-5p 过表达时,其 PTH 的分泌未受明显影响( $P > 0.05$ ),而 miR-301a-5p 的表达被抑制时,其 PTH 的分泌升高( $P < 0.001$ ,表 3,4)。

## 3 讨论

### 3.1 MiR-301a-5p 与 CaSR 基因存在靶向作用关系

本研究测序和实验结果发现,miRNAs 在 SHPT 中表达异常,这提示了 miRNA 与此种疾病的相关性。在既往的实验性 SHPT 中,甲状旁腺特异性 dicer 酶被敲除后的小鼠在应对低钙血症和尿毒症时都不能增加血清

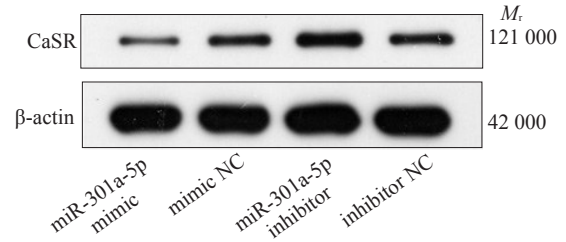


图10 第2次实验各组CaSR的表达量  
Fig.10 Expression of CaSR in each group in the second experiment.

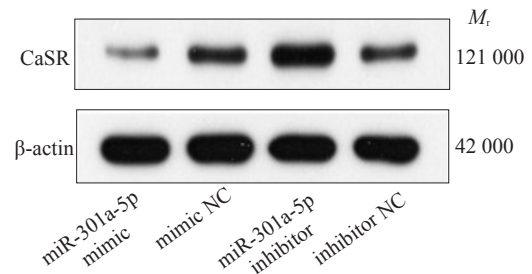


图11 第3次实验各组CaSR的表达量  
Fig.11 Expression of CaSR in each group in the third experiment.

PTH 的水平,这表明完整的 dicer 酶和 miRNAs 对于低钙血症和患尿毒症时 PTH 的分泌至关重要<sup>[13-14]</sup>,这与本研究结果一致,miRNAs 很可能参与了 SHPT 的发病机制。CaSR 是 G 蛋白偶联受体家族的成员,具有很多高度特异的钙结合位点,生理状态下当血清  $Ca^{2+}$  浓度升高时, $Ca^{2+}$  与 CaSR 的胞外特异结合位点相结合,刺激内质网释放  $Ca^{2+}$ <sup>[15]</sup>。随后细胞膜上的  $Ca^{2+}$  通道激活,细胞外的  $Ca^{2+}$  内流,胞质内  $Ca^{2+}$  浓度升高,抑制细胞释放 PTH,并促进其降解,从而使血浆 PTH 浓度下降<sup>[16]</sup>。反之,当细胞外  $Ca^{2+}$  浓度降低时,CaSR 表达减少,胞内  $Ca^{2+}$  流出,使得 PTH 的抑制作用减弱,引起血清 PTH 浓度升高<sup>[17]</sup>。在 SHPT 中,CaSR 蛋白的表达减少,导致甲状旁腺对  $Ca^{2+}$  的调节出现抵抗, $Ca^{2+}$  的浓度变化对 PTH 的产生和分泌几乎没有影响<sup>[18]</sup>,随着疾病进展,PTH 的分泌逐渐失调。本研究也发现 CaSR mRNA 在 SHPT 中的表达量较正常甲状旁腺组织减少,并且其在 SHPT 中的表达量与患者血清 PTH 水平呈现负相关关系,但无统计学意义,可能与样本量较少有关。CaSR 下调的机制可能与 SHPT 中 miR-15a-5p、miR-15b-5p、miR-16-5p、miR-221-3p、miR-222-3p、miR-301a-5p 和 miR-503-5p 的高表达有关,因其各个 miRNA mimics 与双荧光素酶报告质粒(含有人 CaSR 基因 3'UTR 端部分序列)共转染后,其荧光素酶的活性都受到了不同程度的抑制。这表明 7 个 miRNAs 均和 CaSR 基因具有靶向作用关系,但其中靶向作用关系最强的是 miR-301a-5p,提示 miR-301a-5p

表1 MiR-301a-5p-mimic组和mimic NC组3次 Western blot 实验的相对表达量

Tab.1 Relative expression of 3 Western blotting experiments in miR-301a-5p-mimic group and mimic NC group

CaSR's relative expression	MiR-301a-5p-mimic group	Mimic NC group	<i>t</i>	<i>P</i>
The first	0.10	0.24		
The second	0.11	0.25	12.030	<0.001
The third	0.11	0.28		

CaSR: Calcium-sensitive receptor.

表2 MiR-301a-5p inhibitor组和inhibitor NC组3次 Western blot 实验的相对表达量

Tab.2 Relative expression of CaSR in 3 Western blot experiments in the miR-301a-5p inhibitor group and inhibitor NC group

CaSR's relative expression	MiR-301a-5p inhibitor group	Inhibitor NC group	<i>t</i>	<i>P</i>
The first	0.36	0.24		
The second	0.35	0.23	4.344	0.012
The third	0.45	0.26		

表3 MiR-301a-5p-mimic组和mimic NC组3次实验细胞上清液的PTH浓度

Tab.3 PTH concentration in cell supernatants in miR-301a-5p-mimic and mimic NC in 3 experiments (pg/mL)

PTH's concentration	MiR-301a-5p-mimic group	Mimic NC group	<i>t</i>	<i>P</i>
The first	246.78	245.52		
The second	287.75	310.75	0.624	0.566
The third	224.43	254.36		

PTH: Parathyroid hormone.

表4 MiR-301a-5p inhibitor组和inhibitor NC组3次实验细胞上清液的PTH浓度

Tab.4 PTH concentration of supernatant of three experimental cells in the miR-301a-5p inhibitor group and inhibitor NC group (pg/mL)

PTH's concentration	MiR-301a-5p inhibitor group	Inhibitor NC group	<i>t</i>	<i>P</i>
The first	>4173	1346.38		
The second	>4173	1314.46	189.200	<0.001
The third	>4173	1294.59		

可能与CaSR mRNA的3'UTR中的部分序列发生了最密切的结合。MiR-301a-5p mimics与突变型质粒的共转染实验也再次对此进行了反向论证,当预测的miR-301a-5p结合位点发生突变后,荧光素酶的活性与对照组相比几乎无异,说明两者几乎没有结合,因此我们认为miR-301a-5p对CaSR基因存在靶向调控关系。本研究也发现与正常甲状旁腺组织相比,miR-301a-5p在SHPT甲状旁腺组织中表达量增加。但由于甲状旁腺组织标本较小,提取到的RNA也较少,未能对同一组标本同时进行CaSR mRNA和miR-301a-5p的qRT-PCR实验,故未对两者进行相关性的分析。但基于双荧光素酶的实验结果,我们猜想这两者之间可能存在某种潜在关系。MiR-301a-5p或可能与CaSR mRNA的3'UTR

中部分序列结合,使其转录本不稳定,促进其mRNA的降解,从而使得其表达量较少。

### 3.2 MiR-301a-5p下调CaSR基因的表达

SHPT原代细胞培养及转染实验表明miR-301a-5p对CaSR的表达具有负向调控作用。当miR-301a-5p过表达时,SHPT原代细胞的CaSR蛋白表达较对照组明显减少,反之当miR-301a-5p的表达被抑制时,CaSR蛋白的表达则明显增高。MiRNA是一种干预转录后调控的短的非编码RNA,和miRNA诱导的沉默复合物一起与靶mRNA的3'UTR中部分序列结合,使转录本不稳定,促进其降解或抑制其翻译<sup>[19-21]</sup>。因原代细胞的数量较少,本研究未能验证转染之后细胞中mRNA的变化,但基于上述机制,miR-301a-5p有可能直接靶向CaSR

mRNA 促进其降解, 使得其转录减少, 也有可能通过其他的 RNA 结合蛋白来调节亚细胞定位和抑制翻译, 从而降低目的蛋白的表达量<sup>[22]</sup>, 或者两种机制同时发生, 使得 CaSR 蛋白的表达减少。

### 3.3 MiR-301a-5p 影响 PTH 的分泌

尽管在 SHPT 组织中我们发现 miR-301a-5p 的表达量与患者血清 PTH 水平呈现出正相关关系, 但细胞实验结果却与此不一致。MiR-301a-5p 虽影响了 SHPT 甲状旁腺原代细胞 PTH 的分泌, 但未呈现出预计变化。有研究发现抑制丰富的 let-7 miRNAs 家族增加了正常和尿毒症大鼠以及小鼠甲状旁腺器官培养的 PTH 的分泌, 抑制 miR-148 家族可以阻止甲状旁腺器官培养中分泌的 PTH 水平的降低<sup>[18]</sup>。本研究也发现抑制 miR-301a-5p 的表达后, SHPT 原代细胞 PTH 水平升高, 表明 miR-301a-5p 在一定程度上调控了 PTH 的生成或分泌。MiR-301a-5p 曾被证明作为致癌基因, 在胃癌中表达上调, 并与其进展和不良预后相关<sup>[23]</sup>。有学者发现 miR-301a-5p 能够下调肌动蛋白的表达, 进而激活 STAT3 和 NF- $\kappa$ B 信号通路, 最终促进胃癌细胞的生长和运动<sup>[24]</sup>; 而 Mao 等<sup>[25]</sup>发现局部 NF- $\kappa$ B 激活能够促进尿毒症患者 PTH 的合成和分泌, 在 SHPT 中, miR-301a-5p 被抑制后是否通过影响 NF- $\kappa$ B 信号通路进而干扰 PTH 的分泌, 仍有待进一步考证。另外, 当 miR-301a-5p 过表达后, PTH 的分泌未受到明显影响, 这提示 CaSR 的表达和 PTH 的分泌可能还受到了其他因素的调控。有研究认为, CaSR 的表达减少可能与神经胶质细胞缺失因子 2 (GCM2) 在甲状旁腺细胞中的特异性表达有关<sup>[26]</sup>。GCM2 可以直接作用于 CaSR 基因的上游启动子, 促进 CaSR 的表达<sup>[27]</sup>。在成人体内, GCM2 还可与其他转录因子一起作用于 PTH 上游的顺式作用原件, 促进 PTH 基因的转录<sup>[28]</sup>。同时, miRNA 的调控作用也并非单一的调控, 一个 miRNA 可能调控多个靶基因, 一个基因也可以同时受到多个 miRNAs 的调控, miR-301a-5p 是否也可能影响了 GCM2 的表达, 从而影响了 PTH 的分泌。此外, 有研究表明维生素 D 受体也是 miR-301a-5p 的靶基因<sup>[29]</sup>, 在实验过程中, miR-301a-5p 是否也通过调控维生素 D 受体进而影响 PTH 的分泌, 值得深思。SHPT 的发病是一个多因素共同作用的过程, PTH 的分泌也受到多种因素的调节, 这些复杂的调控网络可能同时发生, 影响着最终的实验结果。虽然未能完全阐明 miR-301a-5p 与 CaSR 水平、PTH 分泌之间的关系, 但本研究的发现为进一步探究 miR-301a-5p 在 SHPT 中的作用机制提供了新的思路。

综上所述, 本研究发现 miRNA 与 SHPT 关系密切, 且首次探讨了 SHPT 中 miR-301a-5p 与 CaSR 之间的负向调控关系, 发现其可能与 PTH 的异常分泌有关。这

些结果为后续研究 SHPT 关于 miRNA 层面的发病机制奠定基础, 或为将来发现新的诊治方法提供思路。

### 参考文献:

- [1] 葛均波, 徐永健. 内科学[M]. 8版. 北京: 人民卫生出版社, 2013.
- [2] Xu M, Li H, Bai Y, et al. miR-129 blocks secondary hyperparathyroidism-inducing Fgf23/ $\alpha$ Klotho signaling in mice with chronic kidney disease[J]. *Am J Med Sci*, 2021, 361(5): 624-34.
- [3] Sadowski SM, Pusztaszeri M, Brulhart-Meynet MC, et al. Identification of differential transcriptional patterns in primary and secondary hyperparathyroidism[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2018, 103(6): 2189-98.
- [4] Brown AJ, Dusso A, Lopez-Hilker S, et al. 1, 25-(OH) $_2$ D receptors are decreased in parathyroid glands from chronically uremic dogs [J]. *Kidney Int*, 1989, 35(1): 19-23.
- [5] Lau WL, Obi Y, Kalantar-Zadeh K. Parathyroidectomy in the management of secondary hyperparathyroidism [J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2018, 13(6): 952-61.
- [6] Naveh-Many T, Silver J. Transcription factors that determine parathyroid development power PTH expression [J]. *Kidney Int*, 2018, 93(1): 7-9.
- [7] Centeno PP, Herberger A, Mun HC, et al. Phosphate acts directly on the calcium-sensing receptor to stimulate parathyroid hormone secretion[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 4693.
- [8] Fan Y, Liu WQ, Bi RY, et al. Interrelated role of Klotho and calcium-sensing receptor in parathyroid hormone synthesis and parathyroid hyperplasia[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115(16): E3749-58.
- [9] Rodríguez-Ortiz ME, Rodríguez M. Recent advances in understanding and managing secondary hyperparathyroidism in chronic kidney disease[J]. *F1000Research*, 2020, 9: 1077.
- [10] Bartel DP. microRNAs: target recognition and regulatory functions [J]. *Cell*, 2009, 136(2): 215-33.
- [11] Friedman RC, Farh KKH, Burge CB, et al. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs [J]. *Genome Res*, 2009, 19(1): 92-105.
- [12] 李珮婷, 李刚, 柳丽丹, 等. 继发性甲状旁腺功能亢进症来源的甲状旁腺原代细胞的培养及鉴定[J]. *南方医科大学学报*, 2022, 42(2): 238-43.
- [13] Shilo V, Ben-Dov IZ, Nechama M, et al. Parathyroid-specific deletion of dicer-dependent microRNAs abrogates the response of the parathyroid to acute and chronic hypocalcemia and uremia [J]. *FASEB J*, 2015, 29(9): 3964-76.
- [14] Kilav-Levin R, Hassan A, Nechama M, et al. Post-transcriptional mechanisms regulating parathyroid hormone gene expression in secondary hyperparathyroidism[J]. *FEBS J*, 2020, 287(14): 2903-13.
- [15] Ngamkam J, Vadcharavivad S, Areepium N, et al. The impact of CASR A990G polymorphism in response to cinacalcet treatment in hemodialysis patients with secondary hyperparathyroidism [J]. *Sci Rep*, 2021, 11: 18006.
- [16] Corbetta S, Lania A, Filopanti M, et al. Mitogen-activated protein kinase cascade in human normal and tumoral parathyroid cells[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, 87(5): 2201-5.
- [17] Naveh-Many T, Volovelsky O. Parathyroid cell proliferation in secondary hyperparathyroidism of chronic kidney disease [J]. *Int J*



- Mol Sci, 2020, 21(12): 4332.
- [18] Shilo V, Mor-Yosef Levi I, Abel R, et al. Let-7 and microRNA-148 regulate parathyroid hormone levels in secondary hyperparathyroidism[J]. J Am Soc Nephrol, 2017, 28(8): 2353-63.
- [19] Jeong S, Oh JM, Oh KH, et al. Differentially expressed miR-3680-5p is associated with parathyroid hormone regulation in peritoneal dialysis patients[J]. PLoS One, 2017, 12(2): e0170535.
- [20] Wu QX, Song R, Ortogero N, et al. The RNase III enzyme DROSHA is essential for microRNA production and spermatogenesis[J]. J Biol Chem, 2012, 287(30): 25173-90.
- [21] Gurtan AM, Sharp PA. The role of miRNAs in regulating gene expression networks[J]. J Mol Biol, 2013, 425(19): 3582-600.
- [22] Briata P. KSRP, many functions for a single protein[J]. Front Biosci, 2011, 16(1): 1787.
- [23] Xu XD, He XJ, Tao HQ, et al. Abnormal expression of miR-301a in gastric cancer associated with progression and poor prognosis[J]. J Surg Oncol, 2013, 108(3): 197-202.
- [24] Huang YY, Du XX, Chen XL, et al. miR-301a-5p/SCIN promotes gastric cancer progression via regulating STAT3 and NF- $\kappa$ B signaling [J]. J Cancer, 2021, 12(18): 5394-403.
- [25] Mao JP, Wang MJ, Ni L, et al. Local NF- $\kappa$ B activation promotes parathyroid hormone synthesis and secretion in uremic patients [J]. Endocrinology, 2021, 162(7): 84.
- [26] Yamada T, Tatsumi N, Anraku A, et al. Gcm2 regulates the maintenance of parathyroid cells in adult mice [J]. PLoS One, 2019, 14(1): e0210662.
- [27] Stremke E, Hill Gallant K. Intestinal phosphorus absorption in chronic kidney disease [J]. Nutrients, 2018, 10(10): 1364.
- [28] Portillo MR, Rodríguez-Ortiz ME. Secondary hyperparathyroidism: pathogenesis, diagnosis, preventive and therapeutic strategies [J]. Rev Endocr Metab Disord, 2017, 18(1): 79-95.
- [29] 蒋 韩, 李珮婷, 柳丽丹, 等. 靶向维生素D受体的miRNA的筛选及其对继发性甲状旁腺功能亢进患者甲状旁腺激素分泌的影响[J]. 南方医科大学学报, 2022, 42(4): 509-17.

(编辑:郎 朗)