doi:10.11659/jjssx.09E018022

·基础研究·

血浆 hsa-miR-19a-3p 与急性冠脉综合征相关性研究及其生物信息学分析

黄 浩[1],陈文江[2],陈国柱[2],秦 芳[2],刘长召[1],王 玲[1],华晓芳[1] (1.恩施土家族苗族自治州中心医院心血管病中心,湖北 恩施 445000;2.重庆医科大学附属第二医院心血管内科,重庆 400010)

[摘 要] **目的** 分析 hsa-miR-19a-3p 与急性冠状动脉综合征(ACS)的相关性,并探讨其可能机制。**方法** 选择 2014 年 3 月至 2015 年 9 月湖北省恩施土家族苗族自治州中心医院心血管病中心收治的 118 例冠心病患者作为研究对象,并按照冠心病分类分为 STEMI 组(34 例)、NSTEMI 组(25 例)、UAP 组(22 例)和 SCAD 组(37 例),采用实时荧光定量 PCR 检测血浆 hsa-miR-19a-3p 的表达,采用生物信息学分析其可能靶基因、生物信息学功能和可能结合非编码 RNA(如 miRNA、lncRNA、circRNA 等);采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测低密度脂蛋白受体相关蛋白 2(LRP2)的表达。**结果** STEMI 组和 NSTEMI 组血浆 hsa-miR-19a-3p 水平较 UAP 组和 SCAD 组明显升高,差异具有统计学意义($P<0.05$);hsa-miR-19a-3p 的靶基因可能为 LRP2,其生物信息功能主要与脂蛋白生物合成过程、脂肪因子信号通路、白介素信号通路、血小板源生长因子信号通路、缺氧诱导因子激活缺氧反应、血管生成、丝/苏氨酸激酶信号通路、丝裂素活化蛋白激酶信号通路、转化生长因子 β 信号通路和趋化因子信号通路等有关;hsa-miR-557、hsa-miR-507、RP11-70C1.1、CTD-2147F2.2、C9orf106、C1orf198_hsa-circRNA8985、FGFR3_hsa-circRNA5885、CAMK2N1_hsa-circRNA8340、TGFBR3_hsa-circRNA859 和 BCL3_hsa-circRNA4124 等可能为其"海绵";血浆 LRP2 水平,STEMI 组(1 511 ± 212.9)ng/mL、NSTEMI 组(1 436 ± 400.0)ng/mL 和 UAP 组(587.5 ± 176.0)ng/mL 较 SCAD 组(367.4 ± 47.69)ng/mL 明显升高,差异具有统计学意义($P<0.05$);血浆 hsa-miR-19a-3p 与 LRP2 Pearson相关系数为 0.488 1(95% *CI*:0.312 5 ~ 0.631 4,$P=0.000\ 4$)。**结论** hsa-miR-19a-3p 与 ACS 密切相关,通过调控 hsa-miR-19a-3p 的靶基因 LRP2 而导致 ACS 的发生,可能与脂质代谢密切相关。

[关键词] hsa-miR-19a-3p;急性冠状动脉综合征;低密度脂蛋白受体相关蛋白 2;脂质代谢;生物信息学

[中图分类号] R541.4 [文献标识码] A [收稿日期] 2018-09-09

Correlation between plasma hsa-miR-19a-3p and acute coronary syndrome and its bioinformatics analysis

HUANG Hao[1], CHEN Wen-jiang[2], CHEN Guo-zhu[2], QIN Fang[2], LIU Chang-zhao[1], WANG Ling[1], HUA Xiao-fang[1] (1. Cardiovascular Department, Central Hospital of Enshi Autonomous Prefecture, Enshi Hubei 445000, China; 2. Cardiovascular Department, Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

Abstract: Objective To investigate the relationship of hsa-miR-19a-3p and acute coronary syndrome (ACS), and to explore its possible mechanism. **Methods** A total of 118 patients who were admitted into hospital central hospital of Enshi autonomous prefecture were selected as the objects, and they were divided into the STEMI group ($n=34$), the NSTEMI group ($n=25$), the UAP group ($n=22$) and SCAD group ($n=37$) according to the classification of coronary heart disease. The expression of hsa-miR-19a-3p was detected by the real-time fluorescence quantitative PCR. The target genes, bioinformatics function and the non-coding RNAs (miRNA, lncRNA, circRNA, etc) of hsa-miR-19a-3p′s were analyzed by the bioinformatics techniques. The expression of low density lipoprotein receptor-associated protein 2 (LRP2) was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** Plasma hsa-miR-19a-3p in STEMI group and NSTEMI group were significantly higher than the UAP group and SCAD group ($P<0.05$). LRP2 may be a target gene of hsa-miR-19a-3p. And its main function of biological information may be connected with the biosynthesis of lipoprotein, fat factor signaling pathways, interleukin signaling pathways, platelet-derived growth factor signaling pathway, oxygen reaction activated by hypoxia inducing factor, angiogenesis, serine/threonine kinase signaling pathways, mitogen-activated protein kinase signaling pathways, transforming growth factor β signaling pathways and chemokine signaling pathway and so on. Hsa-miR-557, hsa-miR-507, RP11-70C1.1, CTD-2147F2.2, C9orf106, C1orf198_hsa-circRNA8985, FGFR3_hsa-circRNA5885, CAMK2N1_hsa-circRNA8340, TGFBR3_hsa-circRNA859 and BCL3_hsa-circRNA4124 may severed as its "sponge". The plasma LRP2 levels in STEMI group (1 511 ± 212.9) ng/mL, NSTEMI group (1 436 ± 400.0) ng/mL, UAP group (587.5 ± 176.0) ng/mL were significantly higher than SCAD group (367.4 ± 47.69) ng/mL, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). The Pearson correlation coefficient between plasma hsa-miR-19a-3p and LRP2 was 0.4881 (95% *CI*:0.312 5 ~ 0.631 4, $P=0.000\ 4$). **Conclusion** Hsa-miR-19a-3p may be closely associated with ACS by regulating LRP2 through lipid metabolism process.

Keywords: hsa-miR-19a-3p; acute coronary syndrome; low density lipoprotein receptor-associated protein 2; lipid metabolism; bioinformatics

[基金项目] 国家自然科学基金(81270262)

[通信作者] 华晓芳,E-mail:yezi62002413@163.com

急性冠状动脉综合征(acute coronary syndrome,ACS)是在冠状动脉粥样硬化基础上发生的斑块破裂或侵袭、继发完全或不完全闭塞性血栓形成为病理基础的一组临床综合征,临床上主要包括急性ST段抬高性心肌梗死(STEMI)、急性非ST段抬高性心肌梗死(NSTEMI)和不稳定型心绞痛(UAP)。ACS常见危险因素有老年、男性及绝经后女性、吸烟、高血压、糖尿病、高脂血症、腹型肥胖及早发冠心病家族史;也有一些新型危险因素,如性情急躁、好胜心和竞争性强、不善于劳逸结合的A型性格者和高同型半胱氨酸患者等[1-2]。近年来研究发现非编码RNA(non-code RNA,ncRNA),包括微小RNA(microRNA,miRNA)、长链非编码RNA(long non-code RNA,lncRNA)和环状RNA(circular RNA,circRNA),尤其是miRNA与ACS发病密切相关[3]。随着循环miRNA的发现,越来越多的证据表明循环miR-1、miR-133a/b、miR-208a和miR-499等miRNA可能与ACS发病机制有关,并可以作为ACS的疾病诊断新型生物标志物[4-7]。有研究发现血浆循环miR-19a可能与急性心肌梗死有关,然而并未对miR-19a与ACS的关系以及miR-19a的生物信息学功能进行探讨[8-9]。因此,本研究拟对血浆循环hsa-miR-19a-3p是否在ACS患者中差异性表达及其生物信息学功能进行分析。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选择2014年3月至2015年9月于湖北省恩施土家族苗族自治州中心医院心血管病中心入院的冠心病患者118例作为研究对象,按照冠心病分类分为ST段抬高型心肌梗死组(STEMI组,$n=34$)、非ST段抬高型心肌梗死组(NSTEMI组,$n=25$)、不稳定性心绞痛组(UAP组,$n=22$)和稳定性冠心病组(SCAD组,$n=37$)。所有患者于入院6 h内以EDTA抗凝管抽取2 mL静脉血,并对行PCI术的急性心肌梗死(acute myocardial infarction,AMI)患者在术后1 d和术后3 d各收集2 mL静脉血,并于4 h内进行离心(3 000 r/min,4 ℃,10 min),分离血浆,保存于-80 ℃冰箱以备后续实验使用。同时,收集患者入院时基本病史和生化检测指标等。按照《中国经皮冠状动脉介入治疗指南(2016)》对冠心病进行诊断和分类[10]。

纳入标准[11]:①经冠状动脉造影证实3支主要冠状动脉中至少1支冠脉管腔狭窄大于50%;②行急诊PCI的AMI患者;③心电图和传统心肌标志物符合AMI诊断。慢性稳定性心绞痛包括以下3类患者:①慢性稳定性劳累型心绞痛;②既往已明确诊断有冠心病,或最近发生休息时心绞痛但经治疗后疼痛消失、需定期随访的稳定患者(这其中又包括变异型心绞痛、低危不稳定性心绞痛、微血管性心绞痛);③无症状或者有"缺血相当"症状(包括气急、左心室功能不全等)的缺血性心脏病患者。排除标准:恶性肿瘤、脑卒中、外周血管疾病、肝肾功能不全、急性感染及其他慢性器质性疾病患者。

1.2 主要试剂与仪器

miRcute miRNA提取分离试剂盒、miRNAcute miRNA cDNA第一链合成试剂盒、miRNAcute miRNA SYBR Green荧光定量检测试剂盒、hsa-miR-19a-3p(MIMAT0000073,UGUGCAAAUCUAUGCAAAACUGA)的上游引物和内参U6引物均由广州真知生物有限公司提供,下游引物为试剂盒通用引物;ELISA试剂盒(DLDEVELOP,DL-LRP2-Hu,检测范围0.625~40 ng/mL)由上海康朗生物科技有限公司提供;主要仪器包括ROCHE LightCycler480 Ⅱ荧光定量PCR仪(ROCHE)、小型高速离心机(美国ThermoMicroMax CL17)、日立超高速冷冻离心机(美国ThermoMicroMax CL17)和全自动酶标仪(芬兰雷勃MK3)等。

1.3 样本血浆hsa-miR-19a-3p的qRT-PCR检测

采用miRNAcute miRNA提取分离试剂盒柱式分离提取并纯化其miRNA,然后按照其配套的miRNAcute miRNA cDNA第一链合成试剂盒将miRNA逆转录合成cDNA,最后按照miRNAcute miRNA SYBR Green荧光定量检测试剂盒及试剂盒中的下游引物进行荧光定量检测。所有操作步骤均按照试剂盒说明书进行,荧光定量过程:94 ℃变性2 min;PCR循环中模板94 ℃变性20 s;60 ℃退火、延伸34 s;共30个循环。采用$2^{-\Delta Ct}$相对定量方法进行数据分析:ΔCt(实验组)=Ct(实验组目标基因)-Ct(实验组内参基因);ΔCt(对照组)=Ct(对照组目标基因)-Ct(对照组内参)。

1.4 LRP2测定

采用酶联免疫吸附法(enzyme linked-immuno-sorbent assay,ELISA)测定低密度脂蛋白受体相关蛋白2(low density lipoprotein receptor related protein 2,LRP2)表达,按照试剂盒说明书操作。

1.5 hsa-miR-19a-3p生物信息分析

采用miRWalk、miRanda、PITA、RNAhybrid、Targetscan、starBase、CircNet和circBase等软件对hsa-miR-19a-3p进行生物信息学分析[12-15];主要分析其靶基因、基因本体功能(gene ontology,GO)、京都基因和基因组百科全书(kyoto encyclopedia of genes and genomes,KEGG)信号通路、蛋白质关系的进化分析(protein analysis through evolutionary relationships,PANTHER)信号通路和相互作用的miRNA、lncRNA、circRNA等。

1.6 统计学分析

应用 SPSS 19.0 和 GraphPad Prism 5 软件对数据进行统计学处理和数据作图,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,2 组间均数检验采用单因素方差分析,进一步的两两比较采用 SNK 法;计数资料采用例数描述,组间比较采用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法;相关性检验用 Pearson 相关进行分析。$P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 入选研究人群基本特征

本研究共纳入 118 例研究对象,按照冠心病分类分组后各组患者在年龄、性别、吸烟史、基本病史方面和基本心血管相关药物服用方面(除阿司匹林和氯吡格雷以外)比较差异无统计学意义($P>0.05$);入院时基本生化检测如血清肌酐、血糖、三酰甘油等方面比较差异也无统计学意义($P>0.05$);STEMI 组、NSTEMI 组和 UAP 组脂蛋白 a、总胆固醇、高密度脂蛋白和低密度脂蛋白与 SCAD 组比较,差异有统计学意义($P<0.05$),NSTEMI 组和 UAP 组的载脂蛋白 A1 水平较 STEMI 组和 SCAD 组低,差异具有统计学意义($P<0.05$),见表 1。

2.2 血浆中 hsa-miR-19a-3p 表达

对 4 组患者血浆 hsa-miR-19a-3p 检测发现,STEMI 组(0.252 6 ± 0.035 1)和 NSTEMI 组(0.174 0 ± 0.022 1)高于 UAP 组(0.065 4 ± 0.008 1)和 SCAD 组(0.052 4 ± 0.009 1),差异具有统计学意义($P<0.05$),而 UAP 组和 SCAD 组血浆 hsa-miR-19a-3p 水平比较,差异无统计学意义($P>0.05$);STEMI 组和 NSTEMI 组血浆 hsa-miR-19a-3p 与 UAP 组比较,差异具有统计学意义($P<0.05$);而 STEMI 组和 NSTEMI 组比较差异无统计学意义($P>0.05$),见图 1。

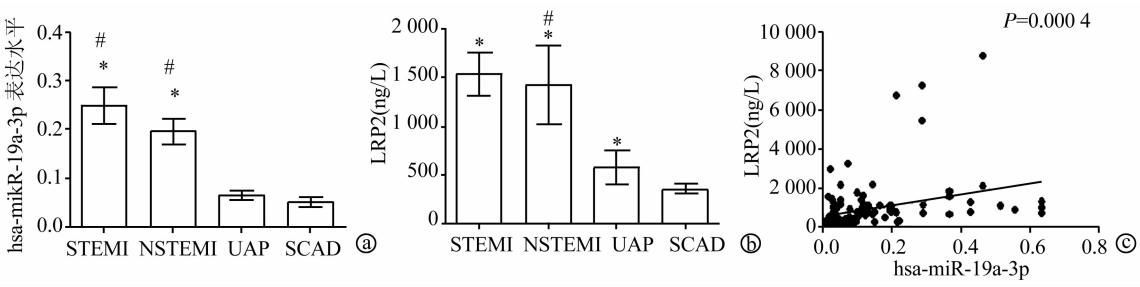
2.3 AMI 患者 LRP2 表达及与 hsa-miR-19a-3p 相关分析

本研究对 hsa-miR-19a-3p 可能的靶基因 LRP2 在 ACS 和 SCAD 患者中的表达水平进了初步检测,发现 STEMI 组[(1 511 ± 212.9)ng/mL]、NSTEMI 组[(1 436 ± 400.0)ng/mL]和 UAP 组[(587.5 ± 176.0)ng/mL]血浆 LRP2 水平较 SCAD 组[(367.4 ± 47.69)ng/mL]明显升高,差异具有统计学意义($P<0.05$);STEMI 组和 NSTEMI 组血浆 LRP2 较 UAP 组差异也有统计学意义($P<0.05$);而 STEMI 组和 NSTEMI 组比较差异无统计学意义($P>0.05$),见图 1b;通过相关性分析发现血浆 hsa-miR-19a-3p 与 LRP2 呈正相关,Pearson 相关系数为 0.488 1,95% CI(0.312 5,0.631 4),$P=0.000\,4$,见图 1c。

表 1 4 组患者基本病史和生化检查情况

项目	STEMI 组($n=34$)	NSTEMI 组($n=25$)	UAP 组($n=22$)	SCAD 组($n=37$)
年龄(岁)	67.88 ± 2.09	67.36 ± 2.34	70.18 ± 2.12	65.16 ± 1.72
男/女(例)	19/15	14/11	13/9	19/18
BMI(kg/m^2)	24.77 ± 1.25	24.58 ± 1.19	24.65 ± 1.05	24.53 ± 1.28
吸烟史(例)	25	21	20	24
高血压(例)	22	16	17	25
糖尿病(例)	15	17	15	17
心房颤动(例)	5	4	4	3
β 受体阻滞剂(例)	16	14	13	21
CCB(例)	17	15	14	22
ACEI(例)	15	16	16	14
阿司匹林(例)	21	17	15	30
氯吡格雷(例)	15	13	13	26
ARB(例)	13	12	15	17
血清肌酐(μmol/L)	83.76 ± 6.83	85.16 ± 7.99	87.66 ± 13.54	84.11 ± 7.07
血糖(mmol/L)	5.69 ± 0.188 6	6.47 ± 0.67	6.52 ± 0.47	5.53 ± 0.29
脂蛋白 a(mg/L)	262.42 ± 34.51 *	304.93 ± 52.45 *	272.42 ± 42.58 *	92.93 ± 7.31
总胆固醇(mmol/L)	5.73 ± 0.35 *	4.80 ± 0.16 *	4.44 ± 0.15 *	3.89 ± 0.17
三酰甘油(mmol/L)	1.67 ± 0.14	1.44 ± 0.47	1.24 ± 0.18	1.72 ± 0.29
高密度脂蛋白(mmol/L)	1.23 ± 0.06 *	1.17 ± 0.06 *	1.28 ± 0.07 *	1.59 ± 0.06
低密度脂蛋白(mmol/L)	3.34 ± 0.21 *#	2.92 ± 0.43 *	2.57 ± 0.18	2.11 ± 0.14
载脂蛋白 A1(g/L)	1.35 ± 0.03 △	1.28 ± 0.03 *	1.36 ± 0.05 *	1.54 ± 0.03 △
载脂蛋白 B(g/L)	1.03 ± 0.05 *#△	0.87 ± 0.02	0.77 ± 0.02	0.78 ± 0.02

*:与 SCAD 组比较,$P<0.05$;#:与 UAP 比较,$P<0.05$;△:与 NSTEMI 组比较,$P<0.05$; BMI:身体质量指数;CCB:钙通道阻滞剂;ACEI:血管紧张素转换酶抑制剂;ARB:血管紧张素转换酶受体拮抗剂



a:血浆中 hsa-miR-19a-3p 的表达;b:血浆中 LRP2 的表达;c:血浆中 hsa-miR-19a-3p 和 LRP2 的相关性 *:与 SCAD 组比较,$P<0.05$;#:与 UAP 组比较,$P<0.05$

图 1 血浆中 hsa-miR-19a-3p 和 LRP2 的表达及二者相关性

2.4 hsa-miR-19a-3p 生物信息学分析

hsa-miR-19a-3p (MIMAT0000073, UGUGCAAAUCUAUGCAAAACUGA)的家族 miRNA(family)包括 hsa-miR-19a-3p、hsa-miR-19a-5p、hsa-miR-19b-1-5p、hsa-miR-19b-2-5p 和 hsa-miR-19b-3p,其 miRNA 簇(cluster)包括 hsa-mir-17、hsa-mir-18a、hsa-mir-19a、hsa-mir-20a、hsa-mir-19b-1 和 hsa-mir-92a-1,其中 hsa-miR-19a-3p 在各个物种间有较好保守性,各物种间序列较为一致(图 2)。

通过靶基因预测和分析,发现 miRWalk 预测的 hsa-miR-19a-3p 靶基因有 3 953 种,miRanda 有 2 406 种,PITA 有 5 009 种,Targetscan 有 3 398 种,进行维恩汇总分析(图 3a),发现 LRP2、IGF2R、INHBB、IREB2、ITPKB、KCNA4、KPNA3、KRAS、MXD1、MATN3、MDM4、MEF2D、MAP3K1、MAP3K9、NR3C2、TRIM37、MYBL1、MYCN、MYO5A、NEUROD1、NEUROG1、NOTCH2、NPTX1、NPY2R、PAFAH1B2、SERPINE1 和 SLC26A4 等都可能为其靶基因,进行富集分析和文献分析发现 LRP2 可能为其靶基因,通过软件分析发现 hsa-miR-19a-3p 与 LRP2 有多个 3′UTR 结合区域(表 2)。

通过对 hsa-miR-19a-3p 序列分析,用软件分析其可能相互作用 miRNA,miRWalk 分析有 122 种可能 miRNA,miRanda 有 13 种,RNAhybrid 有 376 种,Targetscan 有 67 种,进行维恩汇总分析(图 3b),发现 ptr-miR-557、hsa-miR-557、ppy-miR-507、mml-miR-507、hsa-miR-507 和 ptr-miR-507 可能为其可能相互作用 miRNA,从我们研究目的来看,hsa-miR-557 和 hsa-miR-507 可能与 hsa-miR-19b-3p 有相互作用,可能为“海绵”miRNA。

同时,我们对 hsa-miR-19a-3p 可能相互作用 lncRNA 进行了分析,miRWalk 预测 hsa-miR-19b-3p 有可能相互作用的 lncRNA 共 1 895 种,miRanda 有 11 047种,RNAhybrid 有 10 552 种,Targetscan 有 1 895 种,进行维恩汇总分析(图 3c),发现 RP11-70C1.1、CTD-2147F2.2、RP11-483I13.6、RP11-795J1.1、LINC00517、RP3-326L13.2、RP11-734K23.9、RP11-184E9.2、RP11-81K13.1、CTD-2554C21.2、RP11-141M3.6、MIR137HG、HAGLR、EC24B-AS1、CTC-479C5.10、RP1-118J21.25、RP11-115H13.1、GMDS-AS1、BFSP2-AS1、RP11-542A14.1、RP11-689P11.2、LINC00908、LINC01140、AL109763.1、LINC00896、C9orf106 和 AC007796.1 等可能与 hsa-miR-19a-3p 有相互作用。

通过对 hsa-miR-19a-3p 可能相互作用 circRNA 进行分析,发现了 709 种可能相互作用的 circRNA,主要包括 CMPK1_hsa-circRNA286、C1orf198_hsa-circRNA8985、FGFR3_hsa-circRNA5885、NUP35_hsa-circRNA4717、QKI_hsa-circRNA6957、TESK2_hsa-circRNA8485、RAP1A_hsa-circRNA451、LAMB1_hsa-circRNA15274、CCNB1IP1_hsa-circRNA10364、CAMK2N1_hsa-circRNA8340、TGFBR3_hsa-circRNA8598、NPEPPS_hsa-circRNA3411、CCDC126_hsa-circRNA7010、AP3M2_hsa-circRNA7434、EIF1AX_hsa-circRNA16071、SLC16A10_hsa-circRNA6864、EIF3E_hsa-circRNA15578、NIPA1_hsa-circRNA10619、GINS1_hsa-circRNA4960 和 BCL3_hsa-circRNA4124 等。

对 hsa-miR-19a-3p 的 GO、KEGG 和 PANTHER 信号通路进行分析,发现 hsa-miR-19a-3p 的 GO 生物学功能可能主要参与脂蛋白生物合成过程(lipid biosynthetic process)、胰岛素样生长因子受体信号通路、转化生长因子 β 受体信号通路和内膜系统等;其可能调控 KEGG 信号通路有:丝/苏氨酸激酶信号通路、丝裂素活化蛋白激酶信号通路、转化生长因子 β 信号通路、脂肪因子信号通路和趋化因子信号通路等;其可能参与调控 PANTHER 信号通路主要包括胰岛素/胰岛素样生长因子通路丝裂原活化蛋白激酶级联反应、白介素信号通路、血小板源生长因子信号通路、缺氧诱导因子激活缺氧反应和血管生成等(表 3)。

2.5 LRP2 生物信息学分析

LRP2 为低密度脂蛋白受体相关蛋白 2,其 GO 生物

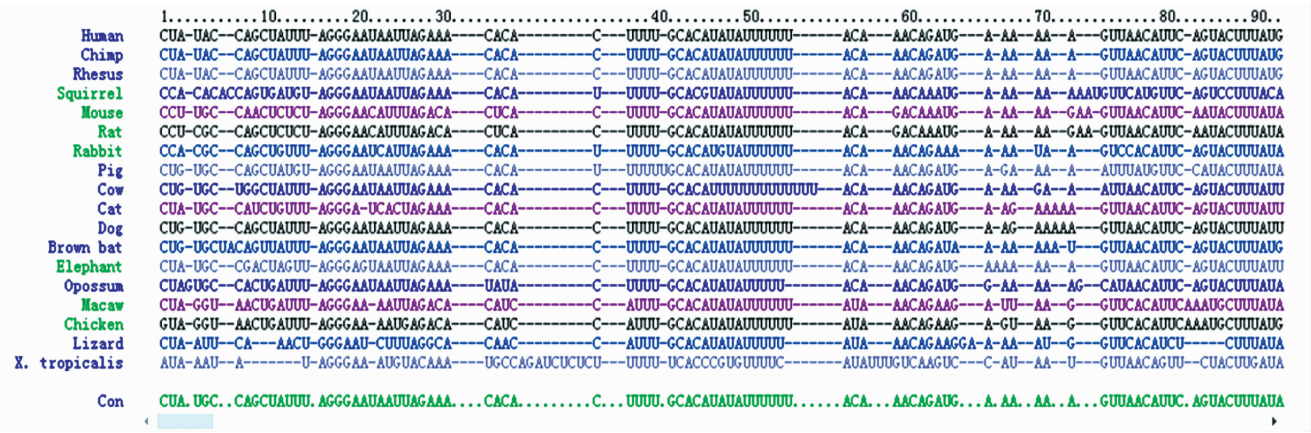
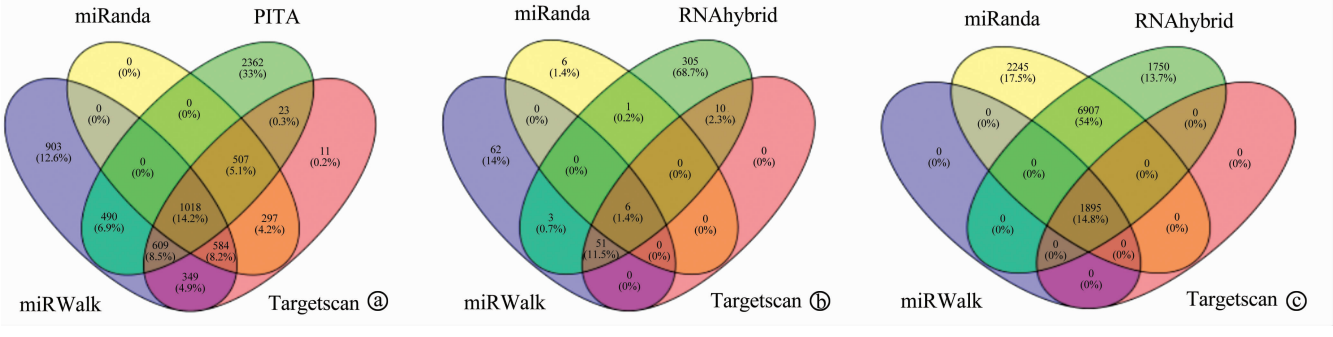


图 2 hsa-miR-19a-3p 在各物种间保守性序列

表 2 hsa-miR-19a-3p 与 LRP2 的 3′UTR 结合区域

项目	miRNAs 和位点	靶点区域	位点类型	P_{CT}
保守位点	Position 38-45 of LRP2 3′UTR	5′... AAUUAGAAACACACUUUUGCACA...		
		|||||||	8mer	0.80
	hsa-miR-19a-3p	3′ AGUCAAAACGUACCUAAACGUGU		
	Position 38-45 of LRP2 3′UTR	5′... AAUUAGAAACACACUUUUGCACA...		
		|||||||	8mer	0.80
	hsa-miR-19a-3p	3′ AGUCAAAACGUAUCUAAACGUGU		
	Position 209-215 of LRP2 3′UTR	5′... UACUAUAUGUAUAUCUUUGCACU...		
		|||||||	7mer-m8	0.81
	hsa-miR-19a-3p	3′ AGUCAAAACGUAUCUAAACGUGU		
	Position 209-215 of LRP2 3′UTR	5′... UACUAUAUGUAUAUCUUUGCACU...		
		|||||||	7mer-m8	0.81
	hsa-miR-19a-3p	3′ AGUCAAAACGUACCUAAACGUGU		
弱保守位点	Position 1352-1358 of LRP2 3′UTR	5′... CUCUCUGUGCUAAUA- UUGCACAU...		
		||| ||||||	7mer-A1	< 0.1
	hsa-miR-19a-3p	3′ AGUCAAAACGUAUCUAAACGUGU		
	Position 1352-1358 of LRP2 3′UTR	5′... CUCUCUGUGCUAAUA-UUGCACAU...		
		||| ||||||	7mer-A1	< 0.1
	hsa-miR-19a-3p	3′ AGUCAAAACGUACCUAAACGUGU		



a:hsa-miR-19a-3p 靶基因;b:hsa-miR-19a-3p 可能结合 miRNA;c:hsa-miR-19a-3p 可能结合 lncRNA

图 3 hsa-miR-19a-3p 的靶基因及可能结合 miRNA 和 lncRNA 汇总维恩图

信息学功能:分子功能主要是参与脂蛋白转运体活性、低密度脂蛋白受体活性、SH3 结构域结合、钙离子结合和蛋白结合;生物过程主要参与脂质代谢过程、脂蛋白转运、冠状动脉血管发育、主动脉发育、细胞增殖、室间隔发育和维生素 D 代谢过程等;细胞组成功能主要参与高尔基体、顶端质膜、刷状缘膜、包被小窝、包被小泡膜、内吞小泡、内质网、细胞外渗体、溶酶体膜和溶酶体等。通过对 LRP2 可能结合 circRNA 进行分析发现,其可能有关 circRNA 主要包括 hsa_circ_0117986、hsa_circ_0056948、hsa_circ_0056949、lme_circ_0000387、mmu_circ_0010127 和 mmu_circ_0010128 等。

表 3 hsa-miR-19a-3p 的 GO 分子功能、KEGG 和 PANTHER 信号通路预测

项目	ID 号	名称	靶基因	*P*	Bonferroni P
GO 生物过程	GO:0048009	胰岛素样生长因子受体信号通路	GIGYF1,GRB10,IGF1,IGF2R,PLCB1	0.348 8	0.013 4
	GO:0007179	转化生长因子 β 受体信号通路	BAMBI, CCNT2, CGN, HIPK2, KLF10, MAP3K1, MTMR4, NLK, PARD3, PMEPA1, PPM1A, RNF111, SMAD4, SMAD5, SMURF1, TGFBR2,TGIF1,TRIM33,ZFYVE9	0.004 4	0.000 7
	GO:0008610	脂质生物合成过程	ACSL1,ACSL4,PRKAA1,PRKAA2	0.000 8	0.026 3
GO 分子功能	GO:0001948	糖蛋白结合	CSNK1G1,IGF2R,LDLR,RASA1,SDC1,THBS1	0.006 9	0.049 9
	GO:0004709	丝裂素活化蛋白激酶活性	MAP3K1,MAP3K12,MAP3K14,RAF1,ZAK	0.000 7	0.014 4
	GO:0005085	鸟苷酸核苷酸交换因子活性	ARFGEF1, BCAR3, DOCK3, DOCK4, DOCK5, ITSN1,RALGPS1,RAPGEF4,RAPGEFL1,SOS2	0.003 7	0.034 5
GO 细胞组成	GO:0016942	胰岛素样生长因子结合蛋白复合物	IGF1,IGFBP3	0.006 7	0.045 7
	GO:0010008	内体膜	APPL1,CD164,CLCN6,GGA1,KIF13A,LDLR, NDFIP1,PARM1,PIKFYVE,RHOB,SLC48A1, SNX3, STEAP2, STX12, TBK1, TOM1L1, VPS37A,VPS37B,VPS4B,WDR44	0.011 3	0.001 4
	GO:0012505	内膜系统	ATP6V1B2, BCL2L11, DOCK4, FRS2, NBEA, NRBP1,PARD3,PITPNM2,RNF167,SLC11A2	0.003 4	0.032 4
KEGG 信号通路	hsa04150	丝/苏氨酸激酶信号通路	CAB39, HIF1A, IGF1, MAPK1, PIK3CA, PIK3R3,PRKAA1,PRKAA2,PTEN,RICTOR, RPS6KA2,RRAGD,TNF,TSC1	0.000 1	0.001 0
	hsa04010	丝裂素活化蛋白激酶信号通路	DUSP7, HSPA2, IL1R1, KRAS, MAP2K3, MAP3K1, MAP3K12, MAP3K14, MAP4K3, MAPK1,MAPK14,MECOM,NF1,NLK,PPM1A, PRKACB, PRKX, RAF1, RAP1A, RAP1B, RAPGEF2,RASA1,RPS6KA2,RPS6KA5,SOS2, TAOK1,TGFBR2,TNF,ZAK	0.000 1	0.001 0
	hsa04350	转化生长因子 β 信号通路	BAMBI, BMP6, BMPR2, ID2, ID4, MAPK1, SMAD4, SMAD5, SMURF1, TGFBR2, THBS1, TNF,ZFYVE9	0.000 1	0.004 1
	hsa04920	脂肪因子信号通路	ACSL1, ACSL4, ADIPOR2, PPARA, PRKAA1, PRKAA2,SLC2A1,SOCS3,TNF,TNFRSF1B	0.001 6	0.018 2
	hsa04062	趋化因子信号通路	ADCY9,GRK6,KRAS,MAPK1,PARD3,PIK3CA, PIK3R3,PLCB1,PRKACB,PRKX,RAF1,RAP1A, RAP1B,SOS2,STAT2,VAV2,WASL	0.008 6	0.043 4
PANTHER 信号通路	P00032	胰岛素/胰岛素样生长因子通路丝裂原活化蛋白激酶级联反应	IGF1,IGF2R,MAP2K3,MAPK1,RAF1,RASA1, RPS6KA2,RPS6KA5,SOS2	0.000 1	0.000 2
	P00036	白介素信号通路	ELK3,IL6ST,MAPK1,MAPK6,PIK3CA,RAF1, RASA1,RPS6KA2,SOS2,STAT2	0.011 3	0.048 0
	P00047	血小板源生长因子信号通路	ARHGAP1, ARHGAP12, ITPR1, MAPK1, MAPK6, PIK3CA, PIK3R3, RAF1, RASA1, RPS6KA2,RPS6KA5,SOS2,SRGAP2,SRGAP3, STAT2,VAV2	0.000 3	0.006 9
	P00030	缺氧诱导因子激活缺氧反应	HIF1A,PIK3C2A,PIK3CA,PIK3R3,PTEN	0.006 1	0.037 8
	P00005	血管生成	ARHGAP1,EFNB2,F3,FRS2,HIF1A,MAPK1, MAPK14,PDGFD,PIK3C2A,PIK3CA,PIK3R3, RAF1,RASA1,RHOB,SOS2,SPHK2,WNT10A	0.000 8	0.009 7

3 讨论

心血管疾病已经成为我国居民死亡首因,尤其是冠心病给个体健康和社会带来了沉重负担,ACS 的危害尤甚。目前,由于医疗水平的提高,尤其是支架置入术和溶栓药物的应用,ACS 死亡率得到控制。关于 ACS 早发现、早诊断、早治疗和早预防的观点逐渐被重视,尤其对诊断水平提出了挑战。关于 ACS 的诊治主要依靠临床症状、心电图和心肌标志物等,目前临床上常用生物标志物主要以 CK-MB 和 cTnI 使用较为广泛[16-17]。近年来,发现了一些新型的 AMI 生物诊断标志物,如高敏感性 C 反应蛋白、脂蛋白相关磷脂酶 A2、血清卵泡抑素样蛋白 1 和 ncRNA 等[11-12,18-19],尤其是循环 miRNA(主要是指血清、血浆和尿液等中的 miRNA)与 ACS 的研究成为热点。现有研究发现循环 miR-1、miR-133a/b、miR-208a 和 miR-499 等都可能与 ACS 发病密切相关,并可作为 ACS 的诊断标志物[20-23]。本研究发现,STEMI 组、NSTEMI 组和 UAP 组血浆 hsa-miR-19a-3p 水平较 SCAD 组明显升高;STEMI 组和 NSTEMI 组血浆 hsa-miR-19a-3p 较 UAP 组也有明显差异;而 STEMI 组和 NSTEMI 组比较差异无统计学意义,提示血浆 hsa-miR-19a-3p 水平在 ACS 中确实呈现差异性表达,可能参与了 ACS 的发生,且可能对 STEMI 和 NSTEMI 更有研究意义。

关于 miRNA 的研究,基本都要借助生物信息学分析以研究其具体机制。本研究通过生物信息学分析发现 hsa-miR-19a-3p 的家族 miRNA 包括 hsa-miR-19a-3p、hsa-miR-19a-5p、hsa-miR-19b-1-5p、hsa-miR-19b-2-5p 和 hsa-miR-19b-3p;其靶基因主要可能包括 LRP2、IGF2R、KCNA4、MAP3K1、MAP3K9、MYCN、MYO5A、NEUROD1、NOTCH2 和 SLC26A4 等;进行富集分析、序列分析和文献分析发现 LRP2 可能为其靶基因,通过软件分析发现 hsa-miR-19b-3p 与 LRP2 有多个 3′UTR 结合区域。同时,本研究对 hsa-miR-19a-3p 可能的靶基因 LRP2 在 ACS 和 SCAD 患者中进了初步检测,发现 STEMI 组、NSTEMI 组和 UAP 组血浆 LRP2 水平较 SCAD 组明显升高,STEMI 组和 NSTEMI 组血浆 LRP2 较 UAP 组也有明显差异,而 STEMI 组和 NSTEMI 组比较差异无统计学意义;通过相关性分析发现血浆 hsa-miR-19a-3p 与 LRP2 呈正相关。该结果提示 hsa-miR-19a-3p 可能与 LRP2 有关,LRP2 可能为 hsa-miR-19a-3p 的靶基因。

近年的研究表明,circRNA 和 lncRNA 分子富含 miRNA 结合位点,在细胞中起到 miRNA“海绵”(sponge)的作用,进而解除 miRNA 对其靶基因的抑制作用,升高靶基因的表达水平[24-27]。通过软件分析其可能相互作用 miRNA 为 hsa-miR-557 和 hsa-miR-507,可能为“海绵”miRNA[28-29];其可能相结合 lncRNA 主要有 RP11-70C1.1、CTD-2147F2.2、CTC-479C5.10、GMDS-AS1、BFSP2-AS1、RP11-542A14.1、RP11-689P11.2、AL109763.1、LINC00896、C9orf106 和 AC007796.1 等;通过对 hsa-miR-19b-3p 可能相互作用 circRNA 进行分析,发现包括 CMPK1_hsa-circRNA286、C1orf198_hsa-circRNA8985、FGFR3_hsa-circRNA5885、RAP1A_hsa-circRNA451 和 CAMK2N1_hsa-circRNA8340 可能与 hsa-miR-19a-3p 相互作用,该结果提示 hsa-miR-19a-3p 可能并不是单一的调控 LRP2 导致了 ACS 的发生,还可能与相关的 lncRNA 和 circRNA 有关,后期实验如果从相关 miRNA、lncRNA 和 circRNA 等方面进行检测,可能会为 ACS 的防治提供更全面的理论支持。

对 hsa-miR-19a-3p 的 GO、KEGG 和 PANTHER 信号通路进行分析,发现 hsa-miR-19a-3p 的 GO 生物学功能可能主要参与脂质生物合成过程、脂细胞因子信号通路、白细胞介素信号通路、血小板源生长因子信号通路、缺氧诱导因子激活缺氧应答、血管生成、丝/苏氨酸激酶信号通路、丝裂素活化蛋白激酶信号通路、转化生长因子 β 信号通路、趋化因子信号通路等有关;而且对 LRP2 分析发现其主要是参与脂蛋白转运体活性、低密度脂蛋白受体活性、脂代谢过程、脂蛋白转运、冠状动脉发育、主动脉发育、细胞增殖、室间隔发育和溶酶体等生物过程,可能与脂质代谢密切相关,而脂蛋白与 ACS 发病机制密切相关。

综上所述,hsa-miR-19a-3p 与 ACS 密切相关,可能通过调控靶基因 LRP2 导致 ACS 的发生,主要与脂质代谢密切相关。然而,本研究只是一个初步的临床样本的筛选和生物信息学分析,未在细胞水平和动物实验水平进行机制研究,有待后续实验进行验证。后续实验如果从 miRNA、lncRNA 和 circRNA 等多方向进行研究,可能会更有利于阐明其发病机制,从而为 ACS 的防治提供有效方法。

[参考文献]

[1] Benjamin EJ,Virani SS,Callaway CW,et al. Heart Disease and stroke statistics-2018 update: a report from the american heart association[J]. Circulation,2018,137(12):e467 - e492. doi: 10.1161/CIR.0000000000000558.

[2] 陈伟伟,高润霖,刘力生,等.《中国心血管病报告 2017》概要[J].中国循环杂志,2018,33(1):1 - 8. doi:10.3969/j.issn.1000 - 3614.2018.01.001.

[3] 卜晓敏,王 锋,汪俊军. 心血管疾病相关的循环 miRNA 的来源与存在形式及其功能[J]. 医学研究生学报,2015,28(10):1091 -

1094. doi:10.16571/j.cnki.1008-8199.2015.10.019.

[4] Navickas R,Gal D,Laucevicius A,et al. Identifying circulating microRNAs as biomarkers of cardiovascular disease: a systematic review[J]. Cardiovasc Res,2016,111(4):322-337. doi: 10.1093/cvr/cvw174.

[5] Kondkar AA,Abu-Amero KK. Utility of circulating microRNAs as clinical biomarkers for cardiovascular diseases[J]. Biomed Res Int,2015,2015:821823. doi: 10.1155/2015/821823.

[6] Kim JM,Jung KH,Chu K,et al. Atherosclerosis-related circulating microRNAs as a predictor of stroke recurrence[J]. Transl Stroke Res,2015,6(3):191-197. doi: 10.1007/s12975-015-0390-1.

[7] Han H,Qu G,Han C,et al. MiR-34a,miR-21 and miR-23a as potential biomarkers for coronary artery disease:a pilot microarray study and confirmation in a 32 patient cohort[J]. Exp Mol Med,2015,47:e138. doi: 10.1038/emm.2014.81.

[8] Zhong J,He Y,Chen W,et al. Circulating microRNA-19a as a potential novel biomarker for diagnosis of acute myocardial infarction[J]. Int J Mol Sci,2014,15(11):20355-20364. doi: 10.3390/ijms151120355.

[9] 刘长召. 冠心病患者循环血 miR-19a 的表达变化和临床意义研究[D]. 东莞:广东医学院,2015.

[10] 中华医学会心血管病学分会介入心脏病学组,中国医师协会心血管内科医师分会血栓防治专业委员会,中华心血管病杂志编辑委员会. 中国经皮冠状动脉介入治疗指南(2016)[J]. 中华心血管病杂志,2016,44(5):382-400. doi:10.3760/cma.j.issn.0253-3758.2016.05.006.

[11] 刘长召,王 玲,陈文江. 血清卵泡抑素样蛋白 1 表达和冠心病的相关性研究[J]. 成都医学院学报,2016,11(2):224-228. doi:10.3969/j.issn.1674-2257.2016.02.021.

[12] 刘长召,王 玲,陈文江. 大鼠心肌梗死后与 FSTL1 和 miRNA-200 的表达及其机制[J]. 西部医学,2017,29(3):316-321. doi:10.3969/j.issn.1672-3511.2017.03.005.

[13] 成 力,李小庆,陈文江,等. miRNA-126-3p 与先天性心脏病肺动脉高压发病机制相关性的临床研究[J]. 重庆医学,2015,17(36):5103-5106. doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.36.018.

[14] Agarwal V,Bell GW,Nam JW,et al. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs[J]. Elife,2015,4. doi: 10.7554/eLife.05005.

[15] Li JH,Liu S,Zhou H,et al. starBase v2.0: decoding miRNA-ceRNA,miRNA-ncRNA and protein-RNA interaction networks from large-scale CLIP-Seq data[J]. Nucleic Acids Res,2014,42(Database issue):D92-D97. doi: 10.1093/nar/gkt1248.

[16] Mehta LS,Beckie TM,DeVon HA,et al. Acute myocardial infarction in women: a scientific statement from the American heart association[J]. Circulation, 2016, 133(9): 916-947. doi: 10.1161/CIR.0000000000000351.

[17] Puymirat E,Ducrocq G. Comparison between European Society of Cardiology (ESC) and American College of Cardiology/American Heart Association (ACC/AHA) guidelines for initial management of ST-elevation myocardial infarction (STEMI)[J]. Ann Cardiol Angeiol (Paris),2013,62(4):265-268. doi: 10.1016/j.ancard.2013.06.002.

[18] 刘长召,王 玲,陈文江. 大鼠心肌细胞缺氧后 miR-133a-3p 的表达及其下游靶基因预测[J]. 局解手术学杂志,2016,25(11):784-788. doi:10.11659/jjssx.05E016060.

[19] 刘长召,王 玲,陈文江. 血浆脂蛋白相关磷脂酶 A2 水平与急性心肌梗死相关性的临床研究[J]. 临床内科杂志,2016,33(11):744-746. doi:10.3969/j.issn.1001-9057.2016.11.006.

[20] 张高明,张国明,夏永杰. 循环 microRNA-499 诊断 AMI 的 Meta 分析[J]. 现代检验医学杂志,2016,17(1): 86-88. doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2016.01.025.

[21] Liu X,Fan Z,Zhao T,et al. Plasma miR-1,miR-208,miR-499 as potential predictive biomarkers for acute myocardial infarction: an independent study of Han population[J]. Exp Gerontol,2015,72:230-238. doi: 10.1016/j.exger.2015.10.011.

[22] 陈 曦,杨承健,韩志君,等. microRNA-499 在急性心肌梗死患者外周血中含量变化的研究[J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2015,35(1):46-50. doi:10.7655/NYDXBNS20150110.

[23] Wang J,Chen J,Sen S. MicroRNA as biomarkers and diagnostics[J]. J Cell Physiol,2016,231(1):25-30. doi: 10.1002/jcp.25056.

[24] Guo L,Zheng L,Zhao Y,et al. Profiling and bioinformatic analyses indicate differential circrna and miRNA/isomiR expression and interactions[J]. Biomed Res Int,2018,2018:8518563. doi: 10.1155/2018/8518563.

[25] Viereck J,Thum T. Circulating noncoding RNAs as biomarkers of cardiovascular disease and injury[J]. Circ Res,2017,120(2):381-399. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.308434.

[26] Viereck J,Thum T. Long noncoding RNAs in pathological cardiac remodeling[J]. Circ Res,2017,120(2):262-264. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.310174.

[27] Saddic LA,Sigurdsson MI,Chang TW,et al. The long noncoding RNA landscape of the ischemic human left ventricle[J]. Circ Cardiovasc Genet,2017,10(1):1534. doi: 10.1161/CIRCGENETICS.116.001534.

[28] Tang C,Zhang M,Huang L,et al. CircRNA_000203 enhances the expression of fibrosis-associated genes by derepressing targets of miR-26b-5p,Col1a2 and CTGF,in cardiac fibroblasts[J]. Sci Rep,2017,7:40342. doi: 10.1038/srep40342.

[29] Lai Y,He S,Ma L,et al. HOTAIR functions as a competing endogenous RNA to regulate PTEN expression by inhibiting miR-19 in cardiac hypertrophy[J]. Mol Cell Biochem,2017,432(1-2):179-187. doi: 10.1007/s11010-017-3008-y.

(编辑:魏 源)