

miR-221-3p 在下肢缺血性疾病中的表达变化

王芳¹, 何雪梅², 姚佐懿³, 周翔宇¹

(西南医科大学附属医院 1.血管甲状腺外科,2.中心实验室,四川省泸州市 646000;

3.成都市第五人民医院,四川省成都市 610000)

[关键词] miR-221-3p; 动脉硬化闭塞症; 下肢缺血性疾病

[摘要] **目的** 探讨 miR-221-3p 在下肢缺血性疾病中的表达变化。**方法** 临床试验:收集西南医科大学附属医院血管甲状腺外科 2014 年至 2015 年间 55 例动脉硬化闭塞症(ASO)患者和 54 例健康对照人群血浆,24 例 ASO 截肢患者的正常血管及病变血管。选取 3 对年龄、性别相近的 ASO 患者和正常健康人血浆用 Microarray 筛选出 ASO 患者血浆中差异性表达在 2 倍以上的 24 种 microRNA,其中 miR-221-3p 的表达量明显降低。用实时荧光定量 PCR 检测临床 55 例 ASO 患者和 54 例健康对照人群血浆及 24 例 ASO 截肢患者正常血管和病变血管中 miR-221-3p 的表达量。**动物实验**:选取 SD 大鼠,结扎组分离结扎大鼠股动脉制备下肢缺血模型,假手术组仅暴露分离股动脉不做结扎。分别于术前、术后即刻、术后 7 天、49 天行激光多普勒扫描监测下肢皮肤血流变化。于术后 7 天、49 天行激光多普勒扫描后处死各组大鼠,收集大鼠术侧腓肠肌及下腔静脉血,采用实时荧光定量 PCR 检测各组血浆和腓肠肌内 miR-221-3p 的表达量。**结果** 临床试验显示:与健康对照组相比,ASO 患者血浆中 miR-22-3p 的含量明显降低(1.078±0.119 比 0.617±0.121);与正常血管相比,病变血管中 miR-221-3p 的表达量也明显降低(1.017±0.113 比 0.625±0.136)。**动物实验显示**:与假手术组相比,结扎组 7 天时血浆和腓肠肌内 miR-221-3p 的含量明显降低(血浆 1.04±0.07 比 0.31±0.07、腓肠肌 1.01±0.07 比 0.64±0.09),49 天时 miR-221-3p 的含量有所上升但仍低于对照组。**结论** miR-221-3p 在下肢缺血性疾病中明显降低,有望成为下肢缺血性疾病一个新的诊断方式及治疗靶点。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The expression of miR-221-3P in hindlimbs ischemia diseases

WANG Fang¹, HE Xue-Mei², YAO Zuo-Yi³, ZHOU Xiang-Yu¹

(1.Department of Vascular and Thyroid Surgery, 2.Experimental Medicine Center, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China; 3.The Fifth People's Hospital of Chengdu, Chengdu, Sichuan 610000, China)

[KEY WORDS] MiR-221-3p; Arteriosclerosis obliterans; Ischemic disease of lower extremity

[ABSTRACT] **Aim** To observe the expression of miR-221-3p in ischemic disease of lower extremity. **Methods** Using microarray to screen the different expression of miR-221-3p in arteriosclerosis obliterans(ASO) patients, then real time-PCR was further used to confirm the changes in 55 ASO patients and 54 healthy volunteers. Male SD rats were divided into hind-limb ischemia groups, sham operation group respectively. The laser Doppler imager was performed to evaluate the blood flow at different time points after operation. Then, the rats were sacrificed and the gastrocnemius and plasma were achieved to be further examined after angiography. **Results** Real-time PCR verified that the level of miR-221-3p was significantly decreased in the plasma, sclerotic samples or gastrocnemius compared with the controls no matter in the ASO patients or SD rat model. **Conclusion** MiR-221-3p could be a useful biomarker for ASO patients and may contribute to clinical decision making in treatments.

随着人们生活水平的日益提高、饮食结构及人口老龄化等因素的改变,以动脉硬化闭塞症(arterio-

sclerosis obliterans,ASO)为主的下肢缺血性疾病发病率逐年上升,因其早期无明显自觉症状,发现时

[收稿日期] 2016-05-16

[修回日期] 2016-09-17

[基金项目] 四川省卫生计生委 2014 年科研基金项目(140035)

[作者简介] 王芳,硕士研究生,E-mail 为 fangwangsx@126.com。通讯作者周翔宇,博士,E-mail 为 xiangyuzhou971@126.vip.com。

病情往往已发展到晚期,目前手术仍是治疗 ASO 的最佳方法,但是很多患者在术后一年就发生了再狭窄^[1-2],寻找一个 ASO 早期诊断方式就显得尤为迫切。microRNA(miRNA)是一类非编码小 RNA,可通过各种途径调控基因的表达,从而影响细胞的增殖、凋亡、分化、迁移等各种生理过程^[3-5]。研究者在 ASO 患者中发现了 617 种 miRNA,多种具有差异性表达,本课题组在前期研究中采用 microRNA 微阵列发现了一些在 ASO 患者中差异性表达的微小 RNA,包括 miR-4284、miR-221-3p、miR-4463 等,其中 miR-4284 的表达明显上升,而 miR-221-3p 和 miR-4463 的表达明显降低^[6],其中大鼠基因库中目前没有 miR-4284 和 miR-4463 的引物,本课题组将在后续的研究中对其进行引物设计及进一步研究。本研究选择 miR-221-3p 探讨其在下肢动脉硬化闭塞症中的表达变化。

1 材料和方法

1.1 实验动物、主要试剂和仪器

SD 大鼠,雄性,40 只,体重 190~240 g,平均 225 g,购于西南医科大学实验动物中心,随机分为假手术组(20 只)和结扎组(20 只)。moorLDI2-HIR 激光多普勒血流仪购自英国 Moor Instruments 公司;手术显微镜及显微手术器械购自重庆奥特光学仪器有限公司;miRNeasy Serum/Plasma Kit、miRNeasy Mini Kit、miScript II RT Kit 购自 QIAGEN 公司。

1.2 临床标本的获取

ASO 患者的纳入标准为患者有间接性跛行、静息痛,检测指标有彩色多普勒、踝肱指数等。对照组为年龄、性别、体重和 ASO 患者相似的门诊体检健康者。获取的血液 2 h 内于 4℃、12000 r/min 离心 15 min,吸取上层血浆置于 1.5 mL 无 RNA 酶的 EP 管中,-80℃ 保存。实验组为截肢的 ASO 患者病变血管,对照组为病变部位外缘的正常血管,置于 RNA 保护液中,-80℃ 保存。以上标本全部来自西南医科大学附属医院,并且通过医院伦理委员会同意及患者知情同意。

1.3 动物模型的制作

用 1%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,行术前激光多普勒扫描后仰卧固定,左后肢常规消毒铺巾,在左侧腹股沟部作纵形切口,分离暴露股动脉,范围从腹股沟韧带至隐动脉、腘动脉分叉处。于腹股沟韧带处双重结扎股动脉主干,远端结扎隐动脉、腘

动脉等分支,手术后缝合切口。假手术组麻醉方法、切口位置及股动脉分离同上,分离后的股动脉不做任何处理,随后缝合切口。术后 7 天、49 天行激光多普勒扫描后处死各组大鼠,收集大鼠术侧腓肠肌置于 RNA 保护液中,-80℃ 保存;采取下腔静脉血 2 mL,12000 r/min 离心 15 min,吸取上层血浆置于 1.5 mL 无 RNA 酶的 EP 管中,-80℃ 保存。

1.4 观察指标

1.4.1 后肢血流量的测定 于各对应时间点分别对两组大鼠常规麻醉后,于相对恒定的 26℃ 室温下,行多普勒激光扫描记录双侧血流灌注值(perfusion unite, PU)。比较两组手术侧(左侧)与非手术侧(右侧)肢体基础 PU 比值。

1.4.2 提取组织和血浆 RNA 用 miRNeasy Serum/Plasma Kit 提取血浆总 RNA,加入 Spike-In(miR-39)作为参照。用 miRNeasy Mini Kit 提取腓肠肌/血管组织的总 RNA,并测定 RNA 浓度,逆转录成 cDNA,以 U6 作为参照,再按说明书进行实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)。最后通过解链曲线分析扩增产物的特异性。微小 RNA 的相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示,其中 $\Delta Ct = Ct_{\text{目标微小RNA}} - Ct_{U6/miR-39}$, $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{处理}} - \Delta Ct_{\text{对照}}$ 。

1.5 统计学分析

各组数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用两独立样本 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-221-3p 在 ASO 患者血浆和血管中的表达

ASO 患者血浆 miR-221-3p 的表达水平明显低于健康对照者(0.617 ± 0.121 比 1.078 ± 0.119 , $P < 0.05$;图 1A),ASO 患者病变血管中 miR-221-3p 的表达水平也明显低于正常血管(0.625 ± 0.136 比 1.017 ± 0.113 , $P < 0.05$;图 1B)。

2.2 双下肢血流灌注情况

与术前相比,结扎组术后患侧血流立即减少,在术后达到最低值(0.3294 ± 0.0460 , $P < 0.05$)。随后逐渐升高,术后 3 天、7 天、49 天血流分别恢复到术前的 73.6%、91.1%和 98.3%。假手术组在整个过程中血流 PU 值(左侧/右侧)变化不明显(图 2)。

2.3 miR-221-3p 在大鼠血浆和腓肠肌中的表达

术后 7 天腓肠肌中 miR-221-3p 的表达明显低于假手术组(0.64 ± 0.09 比 1.01 ± 0.07 , $P < 0.05$),术

后 49 天仍低于假手术组,但差异无统计学意义(图 3A)。术后 7 天血浆 miR-221-3p 的表达明显低于术

前(0.31 ± 0.07 比 1.04 ± 0.07 , $P < 0.01$),术后 49 天仍低于术前,差异仍有统计学意义($P < 0.05$;图 3B)。

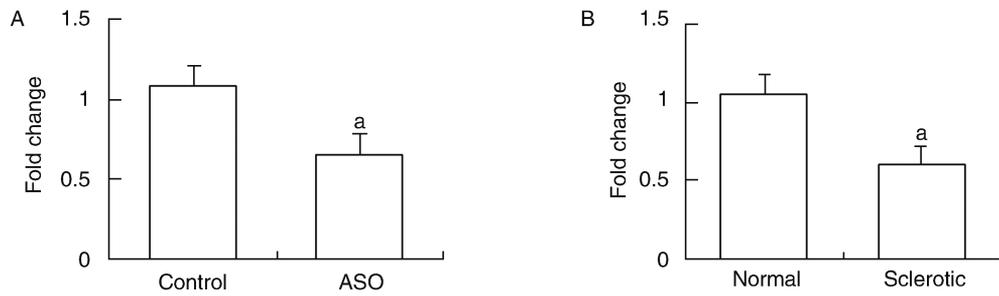


图 1. 实时荧光定量 PCR 检测 ASO 患者血浆和血管中 miR-221-3p 的表达 a 为 $P < 0.05$,与健康对照者或正常血管比较。
Figure 1. Expression of miR-221-3p in plasma and blood vessels of ASO patients detected by real-time PCR

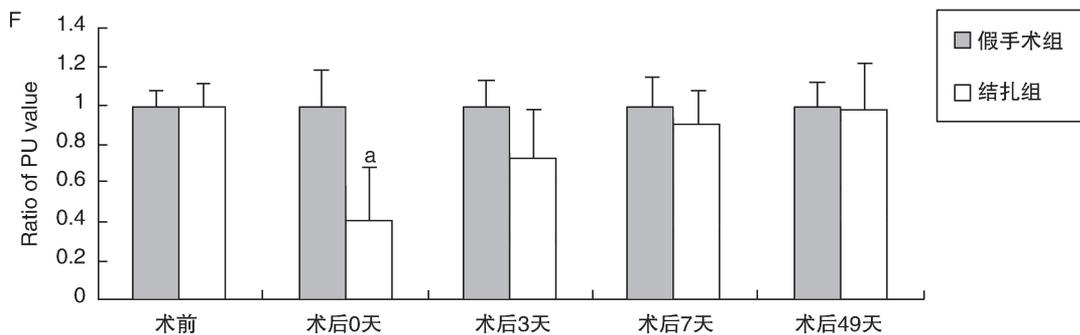
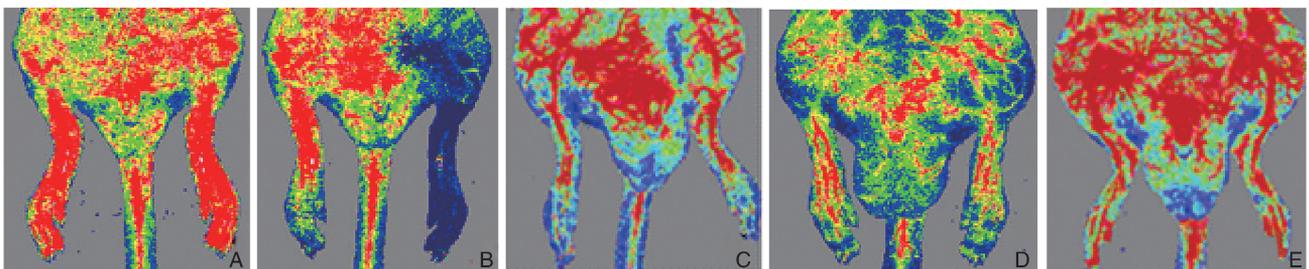


图 2. 激光多普勒血流成像监测双下肢血流灌注 A 为术前两侧下肢血流灌注,B 为术后 0 天血流灌注,C 为术后 3 天血流灌注,D 为术后 7 天血流灌注,E 为术后 49 天血流灌注,F 为结扎组和假手术组各时间点的 PU 比值(左/右)。a 为 $P < 0.05$,与术前比较。

Figure 2. Laser Doppler flow imaging monitoring lower limb perfusion

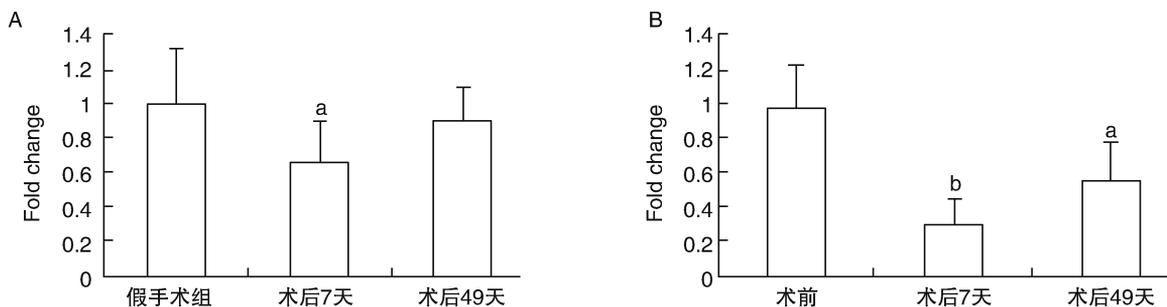


图 3. 实时荧光定量 PCR 检测大鼠 miR-221-3p 在血浆和腓肠肌中的表达 a 为 $P < 0.05$,b 为 $P < 0.01$,与假手术组或术前比较。

Figure 3. Expression of miR-221-3p in plasma and gastrocnemius of rats detected by real-time PCR

3 讨论

ASO 是动脉粥样硬化性疾病在下肢动脉的体现,目前认为血管平滑肌细胞迁移和增殖是引起新生内膜增厚、管腔狭窄的主要原因之一^[7], microRNA 可作为干预和治疗 ASO 及血管再狭窄的潜在分子靶点^[8]。

microRNA 是长度约 21~25 个核苷酸的非编码 RNA,它通过与靶基因 3'-UTR 完全或不完全匹配结合来负调控其表达抑制 mRNA 翻译或降解其 mRNA,而 miR-221 位于 X 染色体 p11.3 区域^[9],参与了血细胞生成、血管生成、肺癌、乳腺癌、胰腺癌、恶性胶质瘤等疾病的发生,其靶基因涉及 GHR、p27、p57、Bmf、HIF-1B 及 c-kit 等^[10-11]。

在心血管疾病中,miR-221 具有细胞特异性,其在血管平滑肌细胞和内皮细胞中起相反的作用,在内皮细胞中,miR-221 通过作用于细胞周期依赖性激酶阻滞基因 1B (cyclin-dependent kinase inhibitor 1B, CDKN1B) 和 PI3KR1 (p85-regulatory subunit of the phosphoinositide-3-kinase) 来抑制内皮细胞的增殖和迁移,引发凋亡^[12]。在人类主动脉内皮细胞中,miR-221-3p 的高表达可以抑制过氧化体增殖物激活型受体 γ 共激活因子 1 α 的生成,导致线粒体功能障碍,引起细胞内 ROS 累积,导致细胞凋亡^[13]。

而 miR-221 对 ASO 的影响主要表现在其对平滑肌细胞迁移增殖的调控。大量实验表明,血管损伤后由斑块组织释放血小板源性生长因子刺激血管平滑肌中 miR-221 的表达增高,从而介导 p27 (Kip1)、p57 (Kip2) 和 c-kit 的低表达来促进平滑肌细胞增殖迁移。而在实验中敲除 miR-221 导致 p27Kip1 mRNA 低表达,从而提高动脉硬化斑块的稳定性,延缓 ASO 的进程^[9,14-17]。

本研究利用 microRNA array 发现了在 ASO 患者中差异性表达的 miR-221-3p,用 ASO 患者的血浆和血管、大鼠的血浆和腓肠肌进行实时荧光定量 PCR 验证了 miR-221-3p 在实验组和对照组的表达确实有差异,预示着 miR-221-3p 有可能成为诊断 ASO 的生物标志物。

[参考文献]

[1] Wang M, Li W, Chang GQ, et al. MicroRNA-21 regulates vascular smooth muscle cell function via targeting tropomyosin 1 in arteriosclerosis obliterans of lower extremities [J]. *Arterioscler Thromb*

Vasc Biol, 2011, 31(9): 2 044-053.

- [2] Ji R, Cheng Y, Yue J, et al. MicroRNA expression signature and antisense-mediated depletion reveal an essential role of microRNA in vascular neointimal lesion formation [J]. *Circ Res*, 2007, 100(11): 1 579-588.
- [3] Fiore R, Khudayberdiev S, Saba R, et al. MicroRNA function in the nervous system [J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2011, 102: 47-100.
- [4] Van Wynsberghe PM, Chan SP, Slack FJ, et al. Analysis of microRNA expression and function [J]. *Methods Cell Biol*, 2011, 106: 219-252.
- [5] Zeng L, He X, Wang Y, et al. MicroRNA-210 overexpression induces angiogenesis and neurogenesis in the normal adult mouse brain [J]. *Gene Ther*, 2014, 21(1): 37-43.
- [6] He XM, Zheng YQ, Liu SZ, et al. Altered plasma micromas as novel biomarkers for arteriosclerosis obliterans [J]. *J Atheroscler Thromb*, 2016, 23(2): 196-206.
- [7] Orr AW, Hastings NE, Blackman BR, et al. Complex regulation and function of the inflammatory smooth muscle cell phenotype in atherosclerosis [J]. *J Vase Res*, 2010, 47(2): 168-180.
- [8] Ji R, Cheng Y, Yue J, et al. MicroRNA expression signature and antisense-mediated depletion reveal an essential role of MicroRNA in vascular neointimal lesion formation [J]. *Circ Res*, 2007, 100(11): 1 579-588.
- [9] Xiaojun Liu, Yunhui Cheng, Shuo Zhang, et al. A necessary role of miR-221 and miR-222 in vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal hyperplasia [J]. *Circ Res*, 2009, 104(4): 476-487.
- [10] Shimono Y, Mukohyama J, Nakamura S, et al. MicroRNA regulation of human breast cancer stem cells [J]. *J Clin Med*, 2015, 5(1): 42-62.
- [11] Zhong C, Ding S, Xu Y, et al. MicroRNA-222 promotes human non-small cell lung cancer H460 growth by targeting p27 [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(4): 5 534-540.
- [12] Chistiakov DA, Sobenin IA, Orekhov AN, et al. Human miR-221/222 in physiological and atherosclerotic vascular remodeling [J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 1-18.
- [13] Xue Y, Wei Z, Ding H, et al. MicroRNA-19b/221/222 induces endothelial cell dysfunction via suppression of PGC-1 α in the progression of atherosclerosis [J]. *Atherosclerosis*, 2015, 241(2): 671-681.
- [14] Liu X, Cheng Y, Yang J, et al. Cell-specific effects of miR-221/222 in vessels: molecular mechanism and therapeutic application [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2012, 52(1): 245-255.
- [15] Lim S, Park S. Role of vascular smooth muscle cell in the inflammation of atherosclerosis [J]. *BMB Rep*, 2014, 47(1): 1-7.
- [16] Bazan HA, Hatfield SA, O'Malley CB, et al. Acute loss of miR-221 and miR-222 in the atherosclerotic plaque shoulder accompanies plaque rupture [J]. *Stroke*, 2015, 46(11): 3 285-287.
- [17] Feinberg MW, Moore KJ. MicroRNA regulation of atherosclerosis [J]. *Circ Res*, 2016, 118(4): 703-720.

(此文编辑 文玉珊)