

· 临床研究 ·

[文章编号] 1007-3949(2017)25-06-0582-08

靶向 PPAR γ 的 miRNA 在冠脉支架内再狭窄中的表达及意义

张韶辉^{1,3}, 赵永亮², 魏广和¹, 刘立新^{1,3}, 杨国良¹, 高振才¹, 蔺跃栋^{1,3}, 郭莹^{1,3}

(济宁医学院附属医院 1. 心内科, 2. 心外科, 3. 山东省心脏疾病诊疗重点实验室, 山东省济宁市 272029)

[关键词] 冠心病; 支架内再狭窄; miRNA; 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ ; 生物信息学

[摘要] 目的 探索靶向于过氧化物酶体增殖物激活型受体 γ (PPAR γ) 的 miRNA, 在这些 miRNA 中寻找与支架内再狭窄 (ISR) 密切相关的 miRNA, 并初步探索其临床意义。方法 利用 Cytoscape 及其插件构建 miRNA 与 PPAR γ 的作用网络, 筛选出靶向 PPAR γ 的关键 miRNA。利用实时荧光定量聚合酶链反应 (Real-time PCR) 检测这部分 miRNA 在 ISR 人群中的表达差异, 再通过 ROC 曲线评估 miRNA 对 ISR 患者的临床识别能力。结果 通过生物信息学分析发现, miR-27a/b 对 PPAR γ 的调控作用较强; 而 miR-130a/b 则能调控该网络中更多的基因。Real-time PCR 发现 miR-27a/b 和 miR-130a 在 ISR 组较 non-ISR 组存在差异性表达 ($P < 0.05$)。ROC 曲线分析发现, miR-27a 对 ISR 具有一定的临床识别能力 ($AUC = 0.884$, 95% CI 0.768~1.00, $P < 0.001$)。结论 miR-27a/b 和 miR-130a/b 是靶向于 PPAR γ 的主要 miRNA, miR-27a/b 和 miR-130a 在 ISR 中差异性表达, miR-27a 可能对识别 ISR 患者具有一定的临床意义。

[中图分类号] R542.2

[文献标识码] A

Expression and significance of the miRNAs target to PPAR γ in coronary artery in-stent restenosis

ZHANG Shao-Hui^{1,3}, ZHAO Yong-Liang², WEI Guang-He¹, LIU Li-Xin^{1,3}, YANG Guo-Liang¹, GAO Zhen-Cai¹, LIN Yue-Dong^{1,3}, GUO Ying^{1,3}

(1. Department of Cardiology, 2. Department of Cardiac Surgery, 3. Shandong Provincial Key Laboratory of Cardiac Disease Diagnosis and Treatment, Affiliated Hospital of Jining Medical University, Jining, Shandong 272029, China)

[KEY WORDS] Coronary artery disease; In-stent restenosis; miRNA; PPAR γ ; Bioinformatics

[ABSTRACT] **Aim** To explore the key members of the miRNAs target to peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ), and reveal the clinical significance of which are closely related to in-stent restenosis (ISR). **Methods** Cytoscape and its plug-in was used to build the miRNAs-PPAR regulatory network to screen out which are the key miRNAs target to PPAR γ . The expression of miRNAs in ISR group were detected by Real-time PCR and the clinical recognition ability of miRNAs on ISR patients were evaluated by ROC curve. **Results** By bioinformatics analysis, miR-27a/b has a strong regulatory effect on PPAR γ , while miR-130a/b is able to regulate more genes in the network. Real-time PCR found that miR-27a/b and miR-130a were differentially expressed in the ISR group and no-ISR group ($P < 0.05$). ROC curve analysis showed that miR-27a has a certain clinical recognition ability to ISR ($AUC = 0.884$, 95% CI 0.768~1.00, $P < 0.001$). **Conclusion** MiR-27a/b and miR-130a/b are key members of the miRNAs target to PPAR γ , miR-27a/b and miR-130a were differentially expressed in ISR, miR-27a might have certain clinical diagnostic value in patients with ISR.

随着技术的进步, 冠状动脉内支架置入治疗已经成为冠心病的常规治疗手段, 但支架内再狭窄 (in-stent restenosis, ISR) 是影响这类患者预后的主

要因素。过氧化物酶体增殖物激活型受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ , PPAR γ) 是人体糖脂代谢、炎症反应、细胞增殖分化和血栓

[收稿日期] 2016-10-11

[修回日期] 2017-01-19

[基金项目] 山东省医药卫生科技发展项目 (2014WS0515); 济宁医学院重点项目 (JY2013KJ005)

[作者简介] 张韶辉, 博士, 主治医师, 研究方向为 miRNA 与冠心病, E-mail 为 zhangshaohui9@sina.com。通讯作者魏广和, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为冠心病介入治疗, E-mail 为 weiguanghe@medmail.com.cn。

形成的重要调节基因,目前研究发现,PPAR γ 表达下调可能导致 ISR^[1];而本课题组前期研究则发现 PPAR γ 激动剂吡格列酮能够减少 ISR 的发生^[2]。但目前 PPAR γ 和 ISR 的相关研究仍较少,其具体机制尚不明确。microRNA(miRNA, miR)是一类转录后调控基因表达的非编码短链 RNA,已有大量证据表明其在心血管系统有特异的表达谱并且广泛参与了心血管疾病的发病过程^[3]。因此,本研究主要致力于在 miRNA 水平探讨 PPAR γ 参与 ISR 的可能机制。将利用生物信息学分析工具反向预测靶向 PPAR γ 的 miRNA,在这些 miRNA 中寻找与 ISR 密切相关的 miRNA,为 PPAR γ 在 ISR 中的研究奠定基础,为进一步研究以 miRNA 为靶点的药物提供理论依据。

1 资料和方法

1.1 生物信息学分析靶向 PPAR γ 的 miRNA

Cytoscape (<http://www.cytoscape.org/>) 是一个开源的系统生物学网络分析软件^[4],它在生物学层面主要是利用强大的数据库(DNA、蛋白质等)整合分子间和高通量基因间相互作用的网络,并将整合结果以图形化展示。为了适应快速发展的附加的计算分析和其他功能,它可以通过插件进行扩展(<http://apps.cytoscape.org/>)。本研究利用 Cytoscape 及其插件构建 miRNA 与靶基因的调控网络,可以将靶向 PPAR γ 的 miRNA 及其关系以图形化展示,这大大缩小了研究的搜索范围,为下一步的生物实验进行了初步筛选,减少了生物实验的盲目性。在此基础上,再通过实时荧光定量聚合酶链反应(real-time polymerase chain reaction, Real-time PCR)检测筛选出来的 miRNA,以观察其在 ISR 人群中的表达差异。

1.2 研究对象

2014 年 1 月至 2015 年 12 月在济宁医学院附属医院心内科住院的冠脉支架置入后患者 36 例,根据术后 6~12 月复查冠状动脉造影术(coronary arteriography, CAG)结果分为支架内再狭窄组(ISR 组, $n=16$)和非支架内再狭窄组(non-ISR 组, $n=20$)。纳入标准:首次接受冠状动脉介入治疗;置入雷帕霉素洗脱支架(爱立, Tivoli)。排除标准:排除植入其它支架的患者、再狭窄部位发生支架断裂的患者、既往有急性心肌梗死史、冠脉支架治疗史或冠状动脉搭桥术(coronary artery bypass grafting,

CABG)手术史以及失随访的患者;排除合并恶性肿瘤、免疫疾病、创伤、感染、肝肾衰竭、服用免疫抑制剂、细胞毒性药物、激素替代治疗的患者。收集年龄和性别与 ISR 组相匹配的本院同期健康体检者 20 例作为对照组(control 组, $n=20$)。所有受试者均签署知情同意书,并经过本院医学伦理委员会批准。

1.3 治疗及随访

1.3.1 围手术期治疗 所有入选患者术中均使用静脉肝素和雷帕霉素洗脱支架(爱立, Tivoli)置入治疗,于术前 24 h 内给予肠溶阿司匹林 300 mg 和氯吡格雷 300 mg 口服,术后给予肠溶阿司匹林 100 mg 和氯吡格雷 75 mg 维持治疗 1 年。所有入选患者于住院后采集空腹肘静脉化验检测一般生化指标。

1.3.2 冠脉支架置入方法 经桡动脉(或股动脉)行冠状动脉造影术(CAG),通过定量计算机分析法(QCA)测量冠脉血管的内径,根据病变情况及冠脉开口情况选择指引导管,标准技术置入雷帕霉素药物洗脱支架(爱立, Tivoli)。ISR 判定标准:冠脉支架置入术后的第 12 个月行 CAG,以冠脉支架内或支架两端 5 mm 内狭窄 $\geq 50\%$ 为 ISR 的判定标准,定义 ISR 的参照血管为 ISR 远端正常血管,再血管化事件及冠脉造影资料保存做进一步分析。

1.4 实时荧光定量聚合酶链反应

1.4.1 血浆标本采集及处理 所有研究对象于入院当天即刻采集肘静脉血 3 mL 于 EDTA 管中,血标本均于 3 h 内处理,3000 r/min, 10 min,分离血浆置于 -80°C 下冷冻保存,留待后续检测。

1.4.2 Real-time PCR 定量检测 miRNA 用 Tiangen(北京天根生化科技有限公司)试剂盒。用 miRcute miRNA 提取分离试剂盒分离血浆总 miRNA,根据 A_{260}/A_{280} 比值确定样品总 RNA 纯度和浓度。用 miRcute miRNA cDNA 第一链合成试剂盒采用加尾法对成熟 miRNA 进行逆转录,最终生成 miRNA 对应的 cDNA 第一链。用 miRcute miRNA 荧光定量检测试剂盒(SYBR Green) Real-time PCR 荧光定量检测 miRNA 的表达差异。以 U6 为内参基因进行结果的归一化;以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示目的 miRNA 的相对表达量。用扩增曲线、溶解曲线分析来检测 PCR 产物的特异性。通过 Primer 5.0 软件,根据 miRNA 引物设计原则,设计引物见表 1。ABI 7500 PCR 仪的程序设置: $1 \times (94^{\circ}\text{C} \ 2 \ \text{min})$; $40 \times (94^{\circ}\text{C} \ 20 \ \text{s}, 60^{\circ}\text{C} \ 34 \ \text{s})$ 。所有步骤均按照试剂盒操作说明进行。

表 1. 设计的 miRNA 引物序列

Table 1. Design of miRNA primer sequences

基因名称	双向引物序列		Tm
hsa-miR-27a-3p	FP	CGAAGCTTGGATGGGATTTGCTTCCTGT	60℃
	RP	CTGCTGCAGGTGTTTCAGCTCAGTAGGCA	
hsa-miR-27b-3p	FP	CGCAAGCTTCAGGTGCATCTCGTAGCTCT	60℃
	RP	CATGGATCCGGTCAAGTGGTCTCTCATCC	
hsa-miR-130a-3p	FP	GGGGCAGTGCAATGTTAAAA	60℃
	RP	GTGCGTGTCTGGAGTCG	
hsa-miR-130b-3p	FP	TCCAGGTCCATCCATTTGCCTA	60℃
	RP	CCCTCAACAGAGGAATGGATAC	
U6	FP	GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT	60℃
	RP	CGCTTCACGAATTTGCGTGTCTAT	

1.5 统计学处理

使用 SPSS 17.0 进行统计分析。Real-time PCR 结果相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法表示 (CT 值比较法)。连续变量均进行正态分布检验,并以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用独立样本 t 检验;对于等级资料、非正态分布的资料,采用秩和检验。不连续变量用计数和相关百分数表示,用 Pearson Chisquare 检验或 Fisher P 检验。通过计算 ROC 曲线下面积 (area under curve, AUC) 评估预测方法的优劣。 $P<0.05$ 为有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组患者的基线特征的比较

ISR 组和 no-ISR 组随访复查冠脉造影的时间比较无显著性差异 (9.13 ± 1.49 月 比 9.40 ± 1.56 月, $P>0.05$)。患者临床特点上,ISR 组不稳定型心绞痛比率低于 non-ISR 组 ($P<0.001$);但 ISR 组非 ST 抬高型心肌梗死比率高于 non-ISR 组 ($P<0.05$)。冠脉病变特点上 ISR 组与 non-ISR 组无显著性差异 ($P>0.05$)。两组的介入手术成功率均为 100% (表 2)。典型 ISR 患者的冠脉造影图像见图 1。

表 2. 患者的基线资料

Table 2. Baseline characteristics of the patients

基线变量	ISR 组	non-ISR 组	P 值
n	16	20	
年龄 (岁)	62.0 ± 6.83	61.0 ± 6.34	0.876
男性 [例 (%)]	10 (62.50)	13 (65.00)	0.723
不稳定型心绞痛 [例 (%)]	10 (62.50)	14 (85.00)	<0.001
急性非 ST 抬高型心肌梗死 [例 (%)]	4 (25.00)	4 (20.00)	0.006
急性 ST 抬高型心肌梗死 [例 (%)]	2 (12.50)	2 (10.00)	0.532
高血压病 [例 (%)]	11 (68.75)	13 (65.00)	0.128
2 型糖尿病 [例 (%)]	11 (68.75)	14 (70.00)	0.657
高脂血症 [例 (%)]	6 (37.50)	8 (40.00)	0.392
体质指数 (kg/m^2)	28.3 ± 2.3	27.7 ± 4.1	0.784
冠脉病变位置 [例 (%)]			
单支病变	9 (56.25)	11 (55.00)	0.658
双支病变	4 (25.00)	6 (30.00)	0.094
三支病变	2 (12.50)	2 (10.00)	0.735
支架直径 (mm)	3.11 ± 0.34	3.25 ± 0.63	0.822
支架长度 (mm)	22.23 ± 6.45	19.16 ± 5.66	0.287
支架释放最大压力 (atm)	15.70 ± 3.18	14.06 ± 2.73	0.625
后扩张 [例 (%)]	3 (18.75)	3 (15.00)	0.165
介入手术成功 [例 (%)]	16 (100.00)	20 (100.00)	1

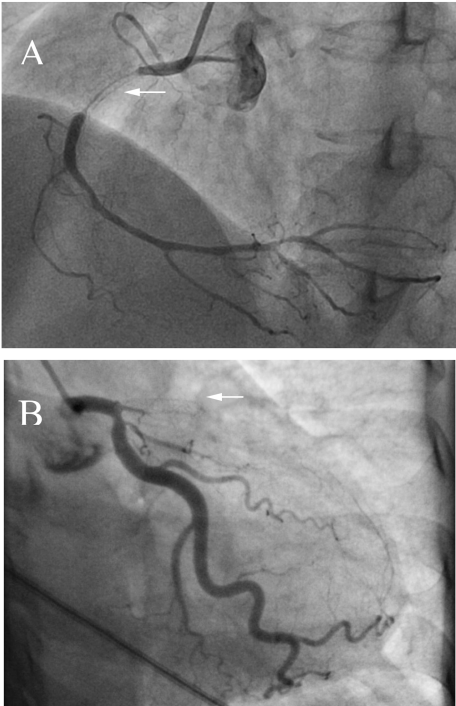


图 1. ISR 患者的冠脉造影图像 白色箭头为发生 ISR 的位置。A 为右冠近中段支架内再狭窄 90%, 前向血流 TIMI III 级(投照体位 LAO 43.96/ CAU 3.59)。B 为前降支近段可见支架影, 自开口闭塞, 前向血流 TIMI 0 级(投照体位 RAO 6.20/ CAU 39.00)。

Figure 1. Coronary angiography in patients with in-stent restenosis

2.2 生物信息学分析靶向 PPAR γ miRNA 的结果

利用 TargetScan6. 2、DIANA、microRNA. org、PicTar 和 miRTarBase 等 5 个靶基因数据库预测靶向 PPAR γ miRNA,取这 5 个靶基因预测软件结果的

交集作为靶向 PPAR γ 预测 miRNA(阳性预测 ≥ 2 的 8 个 miRNA;表 3)。其中 miRTarBase 数据库主要是通过人工收集的有实验支持的 miRNA 的靶标^[5],也就是说,表 3 中的 miR-27a/b、miR-130a/b 均是经过前人的生物学实验验证过的靶向 PPAR γ 的 miRNA,其它的 miRNA 是软件预测的结果,尚未经过实验验证。

为了进一步明确这 8 个 miRNA 及靶基因的作用关系,本研究利用系统生物学网络结构分析软件 Cytoscape 及其插件 CyTargetLinker^[6]构建 miRNA 与靶基因的调控网络,并以图形化展示。将这 8 个 miRNA 输入 Cytoscape,软件搜索 7 个靶基因数据库(targetscan、mirbase、mirtarbase、microcosm、encode-distal、encode-proximal、tfe-hsa),这 8 个 miRNA 共发现 780 个靶基因(Overlap threshold= 2)(图 2)。

利用图论的方法对 ISR 相关调控网络中的 miRNA 和 Gene 在该网络中的地位进行评价:用度(degree)来衡量 miRNA 所能调控 Gene 的数量,度越大表示 miRNA 所能调控的 Gene 数量越多。由于本研究目的是评价与 PPAR γ 调控关系较强的 miRNA,也就是说,在网络中寻找较粗的连接线,因此用边介数(edge betweenness)来评价 miRNA 对 Gene 的调控强度,边介数越大表示 miRNA 对 Gene 的调控强度越高。通过表 4 可以看出,在该 miRNA-Gene 网络中,miR-27a/b 对 PPAR γ 的调控作用较强;而 miR-130a/b 则能调控网络中更多数量的基因。在上述结果的基础上,结合文献检索,本研究最终选择 miR-27a/b 和 miR-130a/b 作为 ISR 的候选相关 miRNA,并进一步通过 Real-time PCR 检测明确其表达差异,以评估其临床意义。

表 3. 靶向 PPAR γ 的 miRNA 预测结果

Table 3. Prediction results of miRNA target to PPAR γ

miRNA	Target Scan Release 6.2	DIANA	microRNA.org	PicTar	miRTarBase	预测阳性的数据库(个)
hsa-miR-27a-3p	+	+	+	+	+	5
hsa-miR-27b-3p	+	+	+	+	+	5
hsa-miR-130a-3p	+	+	+	+	+	5
hsa-miR-130b-3p	+	+	+	+	+	5
hsa-miR-128	+		+	+		3
hsa-miR-301a	+		+	+		3
hsa-miR-301b	+		+	+		3
hsa-miR-454-3p	+		+			2

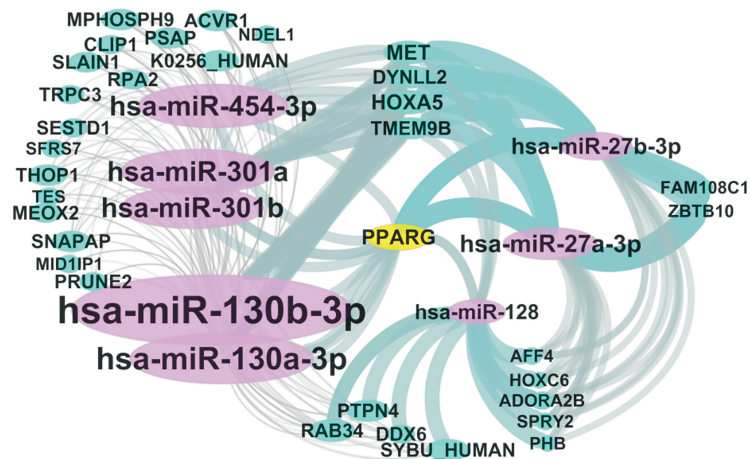


图 2. PPAR γ 相关 miRNA 及靶基因的网络关系图 椭圆为 miRNA (红色), 其余为 Gene, 连接线为 miRNA 与 Gene 的调控关系。较大椭圆为该 miRNA 能够调控更多个 Gene, 较大字体 Gene 名称为其被更多的 miRNA 调控; 较粗连接线为 miRNA 与 Gene 之间调控关系更强。

Figure 2. Network image of miRNA and target genes related to PPAR γ

表 4. miRNA 在 PPAR γ 基因调控网络中的地位

Table 4. The role of miRNA in the regulation network of PPAR γ

MicroRNA	边介数	度	接近中心性
hsa-miR-27a-3p	41.66039312	26	0.4494382
hsa-miR-27b-3p	41.66039312	20	0.4494382
hsa-miR-130a-3p	27.92573249	50	0.6557377
hsa-miR-130b-3p	27.92573249	76	0.6557377
hsa-miR-301a-3p	27.92573249	42	0.6557377
hsa-miR-301b-3p	27.92573249	39	0.6557377
hsa-miR-454-3p	27.92573249	41	0.6557377
hsa-miR-128	27.21033356	16	0.45977011

2.3 各组 miRNA 相对表达量的比较

通过 Real-time PCR 分析 miR-27a/b 和 miR-130a/b 4 个成熟 miRNA 的表达差异。每个样本设定 3 个复孔, 取其平均值为检测结果, 为尽量减小逆转录反应及样品间差异, 以 U6 为内参基因来进行归一化处理, 以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示目的 miRNA 的相对表达量。与 non-ISR 组比较, miR-27a/b 和 miR-130a 在 ISR 组表达差异 (图 3、表 5; $P < 0.05$)。

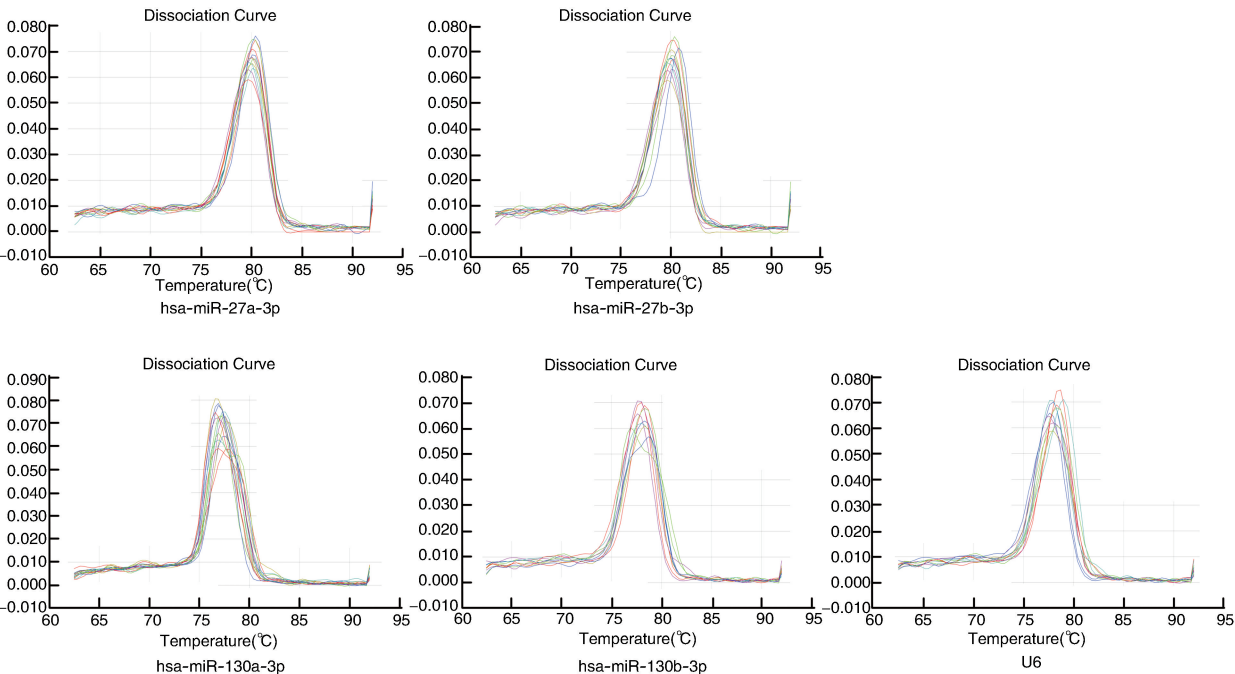


图 3. miRNA 和 U6 的 PCR 熔解曲线
Figure 3. The PCR melting curve of miRNA and U6

表 5. Real-time PCR 检测 miRNA 的相对表达量($2^{-\Delta\Delta Ct}$, $\bar{x}\pm s$)
Table 5. Relative expression of miRNA detected by Real-time PCR($2^{-\Delta\Delta Ct}$, $\bar{x}\pm s$)

分 组	Control 组	non-ISR 组	ISR 组
miR-27a	1.052±0.088	1.630±0.173	2.986±0.200 ^a
miR-27b	1.069±0.123	1.638±0.147	2.234±0.245 ^a
miR-130a	1.043±0.091	1.172±0.110	1.582±0.197 ^a
miR-130b	0.979±0.091	1.277±0.105	1.238±0.124

a 为 $P<0.05$, 与 non-ISR 组比较。

2.4 4 个 miRNA 对 ISR 患者的识别能力评估
为了进一步比较 miR-27a/b 和 miR-130a/b 对 ISR 预测的能力,进行了 ROC 曲线分析,结果显示,

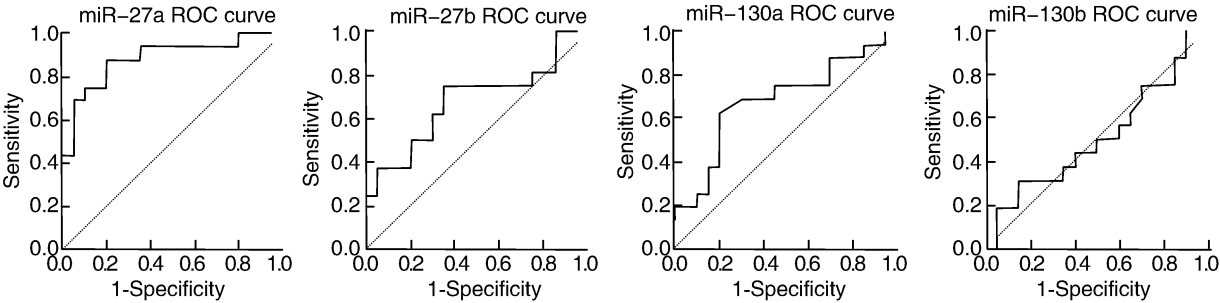


图 4. miR-27a/b 和 miR-130a/b 对 ISR 的预测能力评价
Figure 4. Evaluation of the predictive ability of miR-27a/b and miR-130a/b on ISR

3 讨 论

近年来核受体家族(PPAR 等)在代谢性疾病领域受到广泛的关注,核受体 PPAR 激动剂一直被认为是在临床上调脂降糖的希望。PPAR α 激动剂-苯氧芳酸类(非诺贝特等)降脂药和 PPAR γ 激动剂-噻唑烷二酮类(吡格列酮等)降糖药是较早用于临床的人工合成配体激动剂。噻唑烷二酮类(thiazolidinediones, TZDs)药物主要是直接作用于 PPAR γ 受体,增加胰岛细胞活性和促进糖代谢;而 miRNA 可以调控 PPAR γ 的表达。因此从理论上讲,miRNA 可能影响 TZDs 的临床疗效。但有研究发现 TZDs 也能调控 miRNA 的表达,如 Ye 等^[7]发现吡格列酮能够下调 miR-29a 和 miR-29c 水平,而 GW9662(选择性的 PPAR γ 阻滞剂)能够阻断吡格列酮的这种调控作用。可见 miR-29a 和 miR-29c 处于 TZDs 和 PPAR γ 的下游。考虑到 miRNA 在机体中作用的广泛性,猜测 miRNA 可能在 TZDs 激动 PPAR γ 受体过程的上、下游均有参与,只是上下游是由不同的 miRNA 参与罢了。显然核受体激动剂与 miRNA 之间的相互关系还需要更多研究来阐明^[8]。

miR-27a 的 AUC = 0.884, 95% CI(0.768, 1.000), $P<0.001$, 有统计学意义; miR-27b 和 miR-130a/b 的 AUC 无统计学意义($P>0.05$)(表 6, 图 4)。

表 6. 4 个 miRNA 对 ISR 预测能力的比较(ROC 曲线)
Table 6. The comparison of the predictive ability of these four miRNA to ISR (ROC curve)

miRNA	ROC 曲线 下面积(AUC)	标准误	95% CI	P 值
miR-27 ^a	0.884	0.06	0.768 1.000	<0.001
miR-27 ^b	0.681	0.094	0.497 0.865	0.065
miR-130 ^a	0.681	0.094	0.500 0.865	0.065
miR-130 ^b	0.511	0.099	0.315 0.710	0.911

MicroRNA 是长约 22 个碱基的非编码 RNA,它通过与靶 mRNA 的 3'-非翻译区(untranslated regions, UTR)碱基相配对结合,而实现对靶 mRNA 的翻译抑制或切割降解。目前研究发现每个 miRNA 往往调控上百个靶基因,而每个靶基因往往受上百个 miRNA 的调控。如何从中鉴别出真正的靶基因并明确其机制是 miRNA 领域的核心问题。由于 miRNA 及靶基因的数量极为庞大,单纯生物学实验的方法难以实现,而依据已经证实的 miRNA 及靶基因序列之间的相互作用规律,可以通过计算机来实现对 miRNA 和靶基因的功能预测,可以大大减少生物学实验的次数,节省时间和成本。靶基因预测软件一般是依据不同的算法和参数来进行预测,因此会预测出不同的 miRNA 结合位点。显然,联合几个靶基因预测软件并取其交集,能够使预测的结果更加全面和准确^[9]。本研究利用 TargetScan、DIANA、microRNA.org、PicTar 和 miRTarBase 等 5 个靶基因数据库预测了靶向 PPAR γ 的 miRNA,取这 5 个数据库的交集作为靶向 PPAR γ 的 miRNA。进一步生物信息网络分析发现,在该调控网络中,miR-27a/b 对 PPAR γ 的调控作用较强;而 miR-130a/b

则能对该网络中多数的基因都有调控作用,其调控作用可能更加宽泛。因此,miR-27a/b 和 miR-130a/b 可能在 PPAR γ 的功能调控上占有主导地位。结合文献和本课题组之前的研究结论,PPAR γ 表达下调可能导致 ISR。因此推断,若某个 miRNA 能够调控 PPAR γ 的表达,则有可能其在 ISR 患者中也存在差异性表达。而通过进一步 Real-time PCR 检测证实了这个猜测:miR-27a/b 和 miR-130a 在 ISR 患者外周血较 non-ISR 组存在差异性表达,这说明它们可能参与了 ISR 的发病过程。

miR-27 家族包括 miR-27a 和 miR-27b 两个亚型,两者只相差一个核苷酸,但两个 miRNA 处于染色体的不同位置,且来源于不同的转录体,决定了 miR-27a 和 miR-27b 的功能具有相互独立性。目前研究发现 miR-27 家族在心血管疾病、能量代谢及肿瘤等方面有显著的调控作用^[10]。在心血管方面,PPAR γ 是 miR-27 的靶标,miR-27b 在脂肪细胞分化中下调,直接靶向 PPAR γ 调控脂肪分化,也可导致心肌肥大和功能障碍^[11-12]。Chen 等^[13] 研究发现,在巨噬细胞中 miR-27a/b 可与 ATP 结合盒转运体 A1(ATP-binding cassette transporter A1, ABCA1) 靶向结合,剂量和时间依赖性地抑制 ABCA1 的表达,进而增加细胞内脂滴和胆固醇蓄积,抑制细胞内胆固醇流出,从而促进动脉粥样硬化发生。miR-27a/b 除直接作用外,还可靶向沉默 ABCA1 上游的 PPAR γ 和肝 X 受体 α (liver X receptor α , LXR α) 基因,达到促进动脉粥样硬化的目的^[11],这是以 PPAR γ →LXR α →ABCA1 通路的形式来实现的^[14]。miR-27 在血管的生成中也起着重要的作用。miR-27 能够通过靶标 SPRY2 和 Sema6A 蛋白来诱导血管形成,而抑制 miR-27 将抑制体外血管形成和体内视网膜血管的发育。miR-27a 还可以通过调控内皮细胞间连接来控制血管的完整性^[15-16]。这些研究都表明 miR-27 参与了动脉硬化、血管新生、血管发育以及损伤修复的过程,而这些过程正是 ISR 的病理过程。与之相对应的是,在本研究确实发现 ISR 的患者外周血中 miR-27a/b 存在差异性表达。通过进一步 ROC 曲线分析发现,miR-27a 对 ISR 患者具有一定的临床识别能力[AUC = 0.884, 95% CI (0.768, 1.00), $P < 0.01$]。这表明 miR-27a 可能在 ISR 患者中具有一定的临床诊断价值。

miR-130 家族包括 miR-130a 和 miR-130b,近年来研究发现 miR-130 家族的异常表达与肿瘤密切相关^[17]。但也有研究报道 miR-130a 与脂质代谢密切

相关^[18],miR-130a 具有抑制胆固醇流出,促进巨噬细胞内脂质蓄积和泡沫细胞形成的作用^[19],miR-130a 在外周动脉性疾病的患者中表达明显升高^[20]。但 miR-130b 抑制其靶基因 PPAR γ 的作用可能与肿瘤有关^[21]。在本研究中,miR-130a/b 二者未显示出在 ISR 患者中的诊断价值,这与其他文献报道的结果也是相近的。

虽然本研究的结论与前人研究结果相似,但是仍存在诸多不足。本研究对靶向 PPAR γ 的 miRNA 功能分析主要是基于生物信息学的理论推测,其原因主要是 miRNA 调控网络十分复杂,难以单纯靠生物学实验的方法来验证;由于生物信息学方法本身的局限性,无论实验证实还是生物信息学预测的靶基因,假阳性/假阴性率都很高,这有可能造成后续研究的偏倚。另外,这是一个单中心研究,样本量少,可能存在病例的选择性偏倚而导致结论不准确,这需要通过大规模临床试验来进一步证实,因此 miRNA 在 ISR 中对靶基因的真实调控机制目前并不明确。但本研究仍然为进一步的研究提供了一定的基础和方向,相信随着更深入研究的开展,miRNA 在 ISR 中的作用机制会更加明确,从而使其在 ISR 的早期诊断和基因治疗中发挥应有的作用。

[参考文献]

- [1] 郑波, 杨源润, 周振华, 等. 猪颈总动脉支架内再狭窄动物模型的建立及 PPAR- γ 与 PI3K/Akt 和 NF- κ B 的表达变化[J]. 中风与神经疾病杂志, 2015, 32(10): 898-901.
- [2] 魏广和, 刘立新, 王铁成, 等. 吡格列酮降低非糖尿病患者冠状动脉药物洗脱支架再狭窄的研究[J]. 临床心血管病杂志, 2012, 28(6): 445-448.
- [3] Sayed D, Abdellatif M. MicroRNAs in development and disease[J]. Physiol Rev, 2011, 91(3): 827-887.
- [4] Shannon P, Markiel A, Ozier O, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks [J]. Genome Research, 2003, 13(11): 2498-504.
- [5] Hsu SD, Tseng YT, Shrestha S, et al. miRTarBase update 2014: an information resource for experimentally validated miRNA-target interactions [J]. Nucleic Acids Res, 2014, 42(Database issue): D78-85.
- [6] Kutmon M, Kelder T, Mandaviya P, et al. CyTargetLinker: a cytoscape app to integrate regulatory interactions in network analysis[J]. PLoS One, 2013, 8(12): e82160.
- [7] Ye Y, Hu Z, Lin Y, et al. Downregulation of microRNA-29 by antisense inhibitors and a PPAR- γ agonist protects against myocardial ischaemia-reperfusion injury[J]. Cardio-

- vasc Res, 2010, 87(3): 535-544.
- [8] 唐 蕙, 刘益洲, 肖文超, 等. ABCA1 表达的 microRNA 转录后水平调控[J]. 中国动脉硬化杂志, 2016, 24(5): 517-523.
- [9] Van Rooij E. The art of microRNA research [J]. Circ Res, 2011, 108(2): 219-234.
- [10] 孙 琛, 梁廷明. miR-27 在肿瘤心血管疾病和能量代谢中的作用研究进展[J]. 生命科学, 2016, 28(1): 93-99.
- [11] Kim SY, Kim AY, Lee HW, et al. miR-27a is a negative regulator of adipocyte differentiation via suppressing PPAR γ expression[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 392(3): 323-328.
- [12] Wang J, Song Y, Zhang Y, et al. Cardiomyocyte overexpression of miR-27b induces cardiac hypertrophy and dysfunction in mice[J]. Cell Res, 2012, 22(3): 516-527.
- [13] Chen WJ, Yin K, Zhao GJ, et al. The magic and mystery of microRNA-27 in atherosclerosis [J]. Atherosclerosis, 2012, 222(2): 314-323.
- [14] Li S, Li J, Fei BY, et al. MiR-27a promotes hepatocellular carcinoma cell proliferation through suppression of its target gene peroxisome proliferator activated receptor[J]. Chin Med J (Engl), 2015, 128(7): 941-947.
- [15] Zhou Q, Gallagher R, Ufret-Vincenty R, et al. Regulation of angiogenesis and choroidal neovascularization by members of microRNA-23~27~24 clusters[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108(20): 8287-292.
- [16] Young JA, Ting KK, Li J, et al. Regulation of vascular leak and recovery from ischemic injury by general and VE-cadherin-restricted miRNA antagonists of miR-27 [J]. Blood, 2013, 122(16): 2911-919.
- [17] 吕 娟, 宋 鑫. miR-130a/b 与肿瘤关系的研究进展[J]. 重庆医科大学学报, 2014, 39(3): 273-277.
- [18] Li T, Cao H, Zhuang J, et al. Identification of miR-130a, miR-27b and miR-210 as serum biomarkers for atherosclerosis obliterans[J]. Clin Chim Acta, 2011, 412(1-2): 66-70.
- [19] 郑华峰, 陶 晶, 张 斌, 等. 微小 RNA-130a 调控人巨噬细胞三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 在动脉粥样硬化的作用[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2016, 18(2): 185-188.
- [20] Signorelli SS, Li Volsi G, Pitruzzella A, et al. Circulating miR-130a, miR-27b, and miR-210 in patients with peripheral artery disease and their potential relationship with oxidative stress: a pilot study [J]. Angiology, 2016, 67(10): 945-950.
- [21] Colangelo T, Fucci A, Votino C, et al. MicroRNA-130b promotes tumor development and is associated with poor prognosis in colorectal cancer[J]. Neoplasia (New York, NY), 2013, 15(9): 1086-099.
- (此文编辑 朱雯霞)