

# 冠状动脉支架内再狭窄相关 miRNA 的表达谱分析和意义

魏广和<sup>1,3</sup>, 蔺跃栋<sup>1,3</sup>, 苏强<sup>2</sup>, 刘立新<sup>1,3</sup>, 张韶辉<sup>1,3</sup>, 杨国良<sup>1</sup>, 郭莹<sup>1</sup>, 张淑芳<sup>1</sup>

(济宁医学院附属医院 1. 心内科, 2. 健康管理中心, 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; 生物信息学

[摘要] **目的** 筛选出支架内再狭窄(ISR)患者中特异性表达的 miRNA,并用生物信息学方法分析其意义。**方法** 通过 miRNA 基因芯片筛选 ISR 患者血浆 miRNA 的表达谱差异,以筛选出与 ISR 相关的 miRNA;通过实时荧光定量聚合酶链反应(Real-time PCR)对 miRNA 的相对表达量进行验证;通过生物信息学技术对 miRNA 靶基因进行预测,并对 miRNA 的下游靶基因网络进行数据挖掘,构建 ISR 相关 miRNA-Gene-Network 网络,探讨其在 ISR 中可能的作用机制。**结果** 经过高通量 miRNA 芯片检测,筛选获得了一批在 ISR 患者中差异表达的 miRNA,其中 43 个基因表达下调,10 个基因表达上调。通过生物信息学方法及 Real-time PCR 对基因芯片结果进行了验证,获得了一批与 ISR 相关的 miRNA 及靶基因,并构建了 miRNA 与靶基因的调控网络 miRNA-Gene-Network。Real-time PCR 定量检测发现,与 non-ISR 组比较,ISR 组 miR-126 明显下降( $0.507 \pm 0.131$  比  $1.427 \pm 0.337$ ,  $P < 0.05$ )。**结论** miRNA 在 ISR 患者中存在差异性表达,这些 miRNA 及靶基因可能与 ISR 的发生有关,miR-126 水平下降倾向于发生 ISR。

[中图分类号] R542.2

[文献标识码] A

## MicroRNA profiling and significance in coronary in-stent restenosis

WEI Guang-He<sup>1,3</sup>, LIN Yue-Dong<sup>1,3</sup>, SU Qiang<sup>2</sup>, LIU Li-Xin<sup>1,3</sup>, ZHANG Shao-Hui<sup>1,3</sup>, YANG Guo-Liang<sup>1</sup>, GUO Ying<sup>1</sup>, ZHANG Shu-Fang<sup>1</sup>

(1. Department of Cardiology, 2. Health Management Center, 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; Bioinformatics

[ABSTRACT] **Aim** To screen out the specific expression of miRNA in ISR, and its significance was analyzed by bioinformatics method. **Methods** The expression profiles of miRNA in ISR patients were screened by miRNA gene chip to screen out ISR related miRNA. The relative expression of miRNA and ISR was verified by Real-time PCR. miRNA target genes were predicted by bioinformatics, and data mining of the downstream target genes of miRNA was carried out, and the ISR related miRNA-Gene-Network was constructed, the possible mechanism of ISR was discussed. **Results** The difference expression of miRNA in ISR patients was detected by high throughput miRNA microarray, 43 genes were down regulated and 10 genes were up-regulated. Bioinformatics and Real-time PCR were used to verify the result of microarray. A number of miRNA and target genes related to ISR were obtained, and the regulatory networks of miRNA and target genes were constructed miRNA-Gene-Network. Quantitative detection of Real-time PCR quantitative detection showed that miR-126 in group ISR was significantly lower than that in group non-ISR ( $0.507 \pm 0.131$  vs.  $1.427 \pm 0.337$ ,  $P < 0.05$ ). **Conclusion** The expression of miRNA in ISR patients is different from no-ISR, these miRNA and target genes may be related to the occurrence of ISR, the decrease of miR-126 level tended to occur in ISR.

随着经皮冠状动脉介入治疗(percutaneous coronary intervention, PCI)手术的推广,目前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)仍是影响这类手术预后的重要因素。microRNA(miRNA, miR)是一类转录后调控基因表达的非编码短链

[收稿日期] 2017-02-27

[修回日期] 2017-04-15

[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] 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。通讯作者张韶辉,博士,主治医师,研究方向为 miRNA 与冠心病,E-mail为 zhangshaohui9@sina.com。

RNA,已有大量证据表明 miRNA 在心血管系统存在特异性的表达并广泛参与了冠心病的发病过程<sup>[1-2]</sup>,但 miRNA 与 ISR 相关的研究尚少,因此,本研究主要致力于探讨 miRNA 参与 ISR 的可能机制。本研究将利用基因芯片和实时荧光定量聚合酶链反应(Real-time PCR)方法筛选在 ISR 中差异性表达的 miRNA,寻找与 ISR 密切相关的 miRNA,为 ISR 的防治提供新思路。

## 1 资料和方法

### 1.1 研究对象

连续入选在济宁医学院附属医院心内科自 2014 年 1 月至 2015 年 1 月住院并行药物洗脱支架(drug eluting stent,DES)置入的冠心病患者,根据 6~12 个月时复查冠状动脉造影(coronary angiography,CAG)结果,分为支架内再狭窄组(ISR 组, $n=18$ )、非支架内再狭窄组(non-ISR 组, $n=20$ )。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,并经过医院医学伦理委员会批准。纳入标准:(1)首次接受冠状动脉介入治疗;(2)置入雷帕霉素洗脱支架(爱立,Tivoli)。排除标准:植入其它支架的患者、再狭窄部位发生支架断裂、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(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。

### 1.2 治疗及随访

1.2.1 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血化验检测一般生化指标。

1.2.2 冠脉支架置入方法 经桡动脉(或股动脉)行冠状动脉造影术,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)。

1.2.3 ISR 定义 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。

### 1.3 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  $-80^{\circ}\text{C}$  下冷冻保存,留待后续检测。在 3 个研究组中分别随机选取 5 例血浆分别取 100  $\mu\text{L}$  至同一 EP 管,颠倒混合成 3 个血清池,用于进行 5 次生物学重复。

### 1.4 miRNA 基因芯片检测

利用美国 Affymetrix 公司的 Affymetrix GeneChip miRNA 4.0 芯片(北京博奥晶典生物技术有限公司代理)对 miRNA 进行高通量检测,并使用配套软件进行表达差异分析和分层聚类分析。

### 1.5 Real-time PCR 验证和定量测定

使用 TIANGEN(天根)miRNA 分离试剂盒分离血浆 miRNA,RNA 质检评估。用 TIANGEN 试剂盒,首先采用加尾法对成熟 miRNA 进行逆转录,最终生成 miRNA 对应的 cDNA 第一链。随后用进行 miRNA 荧光定量检测。以 U6 为内参基因进行结果的归一化;以  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  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(表 1)。ABI 7500 PCR 仪的程序设置:94 $^{\circ}\text{C}$  2 min;94 $^{\circ}\text{C}$  20 s,60 $^{\circ}\text{C}$  34 s,40 个循环。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-19b-3p	FP AATCCCTACCGCGCAATAAACT	60 $^{\circ}\text{C}$
	RP CCGCTGTGCAAATCCATGC	
hsa-miR-20a-5p	FP CGATTCATTTGTTAGCGAGCGG	60 $^{\circ}\text{C}$
	RP CGCCATGTAAAGTGCTTATAGTGC	
hsa-miR-126-3p	FP CTGCTCGACCTCGGAAACTATG	60 $^{\circ}\text{C}$
	RP AGCATGAATCGTACCGTGAGT	
U6	FP GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT	60 $^{\circ}\text{C}$
	RP CGCTTCACGAATTTGCGTGTTCAT	

## 1.6 miRNA 及靶基因的生物信息学分析

Cytoscape (<http://www.cytoscape.org/>) 是一个开源的系统生物学网络分析软件<sup>[3]</sup>,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/>)。Cytoscape 目前最新的版本是 version 3.4.0。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 ISR 相关 miRNA 的作用及与靶基因的关系以图形化展示,为将来的生物实验进行了初步筛选,减少下一步生物实验的盲目性。

## 1.7 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。 $P<0.05$  为有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 患者的基线特征

本研究入选患者的基线特征见表 2。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( $P<0.001$ )。ISR 组与 non-ISR 组病变特点上无显著性差异( $P>0.05$ )。两组的介入手术成功率均为 100%( $P>0.05$ )。正常对照组未列入。

表 2. 冠心病患者基线资料的比较

Table 2. Comparison of baseline data in patients with coronary heart disease

基线变量	ISR 组 ( $n=18$ )	non-ISR 组 ( $n=20$ )	<i>P</i> 值
年龄(岁)	58.95±9.97	56.23±11.34	0.661
男性[例(%)]	14(77.78)	14(70.00)	0.192
不稳定型心绞痛[例(%)]	11(61.11)	15(75.00)	<0.001
非 ST 抬高型心肌梗死[例(%)]	5(27.78)	3(15.00)	<0.001
ST 抬高型心肌梗死[例(%)]	2(11.11)	2(10.00)	0.932
高血压病[例(%)]	11(61.11)	13(65.00)	0.348
糖尿病[例(%)]	13(72.22)	14(70.00)	0.571
高脂血症[例(%)]	7(38.88)	8(40.00)	0.692
吸烟[例(%)]	6(33.33)	7(35.00)	0.701
BMI( $\text{kg}/\text{m}^2$ )	28.6±3.2	27.4±3.8	0.872
规律服用药物[例(%)]			
阿司匹林/氯吡格雷	18(100.00)	19(95.00)	0.124
他汀类降脂药	16(88.89)	16(80.00)	0.437
$\beta$ 受体阻断药	14(77.78)	15(75.00)	0.657
冠脉病变位置[例(%)]			
单支病变	10(55.56)	12(60.00)	0.158
2支病变	5(27.78)	6(30.00)	0.902
3支病变	3(16.67)	2(10.00)	0.083
支架直径(mm)	3.19±0.79	3.22±0.42	0.722
支架长度(mm)	20.74±7.51	21.67±5.36	0.098
支架释放最大压力(atm)	15.12±3.2	14.68±2.81	0.125
后扩张[例(%)]	3(16.67)	4(20.00)	0.492
介入手术成功[例(%)]	18(100.00)	20(100.00)	1.000

### 2.2 miRNA 基因芯片筛选结果

Affymetrix GeneChip miRNA 4.0 芯片不仅完全覆盖 203 个物种所有 miRNA 成熟体的 30424 个探针组;还包括人 miRNA 前体 2025 个。差异基因的筛选标准为  $q\text{-value}\leq 5\%$  且  $\text{Fold Change}\geq 2$  或  $\leq 0.5$ 。通过 3 张基因芯片的筛选,按照分组进行两两比较:ISR 组与 non-ISR 组比较,88 个基因差异表达;ISR 组与 control

组比较,98 个基因差异表达。因为本研究主要方向是 ISR,主要目的是获得即患冠心病又同时发生 ISR 的差异基因,因此为了滤除与冠心病相关的 miRNA,研究选取 ISR 组比 non-ISR 组和 ISR 组比 control 组的合集,发现 ISR 患者有 53 个基因差异表达(图 1),其中 43 个基因表达下调,10 个基因表达上调。这其中 46 个 miRNAs 差异表达,7 个 snoRNAs 差异表达。

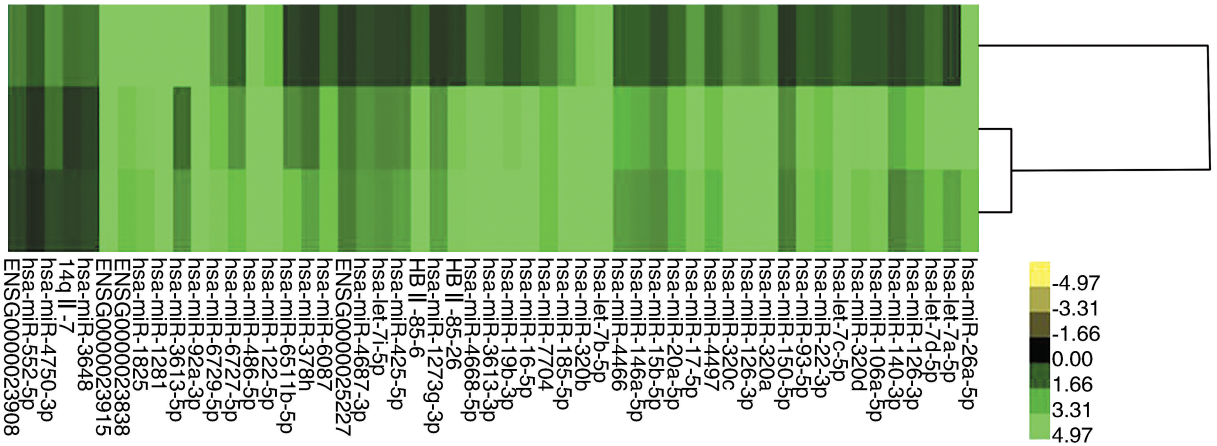


图 1. miRNA 芯片聚类分析图

Figure 1. Cluster analysis of miRNA microarray

2.3 miRNA 及其靶基因的生物信息学分析

利用系统生物学网络结构分析软件 Cytoscape 及其插件 CyTargetLinker<sup>[4]</sup> 构建 miRNA 与靶基因的调控网络 miRNA-Gene-Network, 将 ISR 相关 miRNA 及靶基因的作用关系以图形化展示, 这样有利于进一步分析, 为后续研究寻找了方向。将前面芯片筛

选出的 53 个差异表达 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 53 个 miRNA 共发现 132 个靶基因 (Overlap threshold = 3) (图 2)。

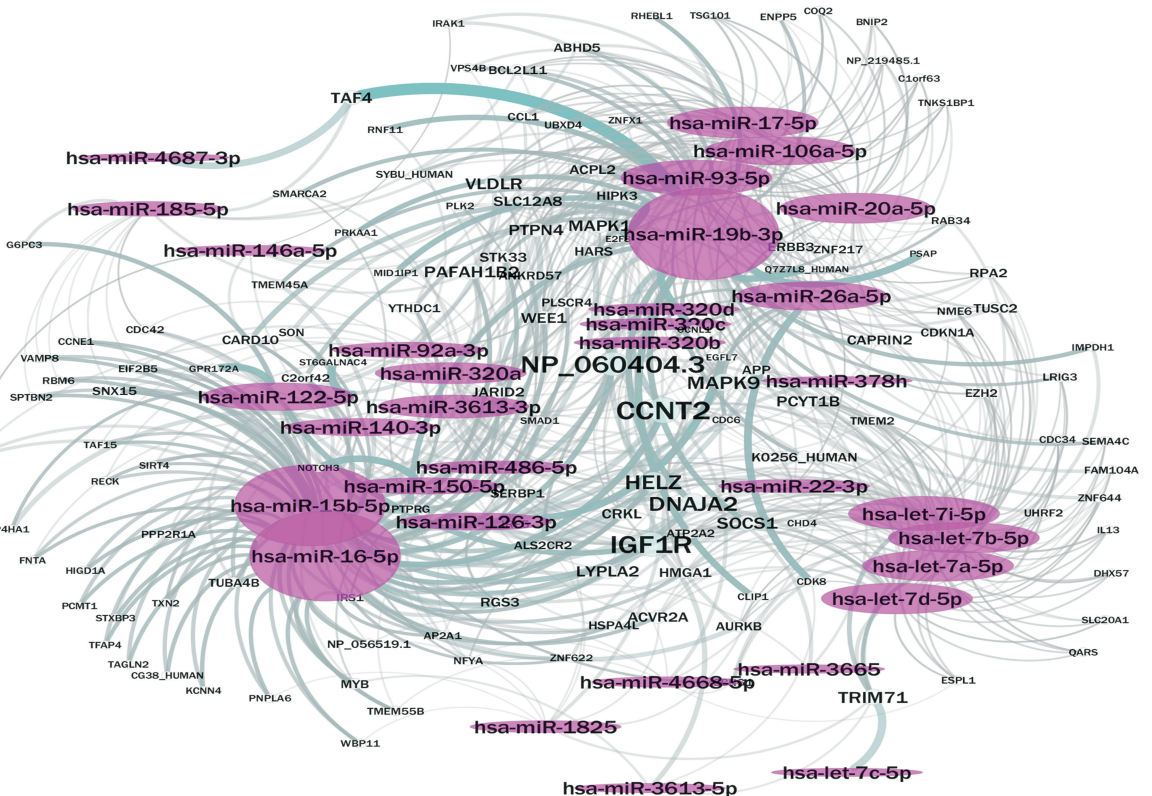


图 2. ISR 相关的 miRNA-Gene-Network 椭圆为 miRNA (红色), 余为 Gene, 连接线为 miRNA 与 Gene 的调控关系。较大椭圆为该 miRNA 能够调控更多个 Gene, 较大字体 Gene 名称为其被更多的 miRNA 调控, 较粗的连接线为 miRNA 与 Gene 之间更强的调控关系。

Figure 2. The miRNA-Gene-Network related to ISR

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,评价标准以 miRNA 和 Gene 在该调控网络中的度 (Degree) 来衡量,度表示在该网络中 miRNA 能够调控 Gene 的数量,度越大表示 miRNA 所能调控的 Gene 数量越多;同样, Gene 的度表示它被多少个 miRNA 所调控, Gene 的度越大表示被越多个 miRNA 所调控。通过这个调控网络图得到的 ISR 相关的关键 miRNA 和 Gene 见表 3、表 4。

表 3. 在 ISR 相关 miRNA-Gene-Network 中关键的 miRNA  
Table 3. The key miRNAs in the miRNA-Gene-Network related to ISR

MicroRNA	Degree	Closeness Centrality	Topological Coefficient
hsa-miR-16-5p	150	0.47126437	0.148276
hsa-miR-19b-3p	109	0.44808743	0.169388
hsa-miR-15b-5p	92	0.46327684	0.155758
hsa-miR-93-5p	73	0.42487047	0.226724
hsa-miR-20a-5p	63	0.42051282	0.239564
hsa-miR-17-5p	63	0.42051282	0.233212
hsa-let-7a-5p	62	0.41624365	0.233716
hsa-let-7b-5p	59	0.41414141	0.231527
hsa-let-7d-5p	58	0.41624365	0.226667
hsa-miR-106a-5p	56	0.41836735	0.242311
hsa-let-7i-5p	51	0.42051282	0.242287
hsa-miR-26a-5p	38	0.3923445	0.218571
hsa-miR-122-5p	26	0.36936937	0.174603
hsa-miR-320a	26	0.38862559	0.249216
hsa-miR-22-3p	21	0.37272727	0.249337
hsa-miR-3613-3p	21	0.38497653	0.232993
hsa-miR-126-3p	20	0.36123348	0.198718
hsa-miR-92a-3p	19	0.37442922	0.180952
hsa-miR-140-3p	18	0.37614679	0.241379

## 2.4 基因芯片结果的 Real-time PCR 验证和定量测定

挑选 miRNA 基因芯片结果中差异表达的 miRNA 进行 Real-time PCR 验证。通过 Real-time PCR 分析 hsa-miR-20a-5p 的表达差异,以 U6 为内参基因来进行归一化,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。将 Real-time PCR 结果与 miRNA 基因芯片结果进行比较显示二者结果相一致,证实基因芯片结果可信。

由于 miRNA 自身表达的调控以及对靶基因的调控网络是极其复杂的,单纯靠生物学实验的方

表 4. 在 ISR 相关 miRNA-Gene-Network 中部分关键的 Gene

Table 4. The key Genes in the miRNA-Gene-Network related to ISR

Gene	Degree	Closeness Centrality	Topological Coefficient
MAPK9	20	0.43967828	0.26148
CCNT2	19	0.47813411	0.25756
NP_060404.3	19	0.47813411	0.229335
IGF1R	18	0.43044619	0.228175
HELZ	18	0.46723647	0.242389
VLDLR	18	0.37357631	0.263211
WEE1	17	0.42597403	0.359375
CDKN1A	16	0.36043956	0.440058
DNAJA2	16	0.45429363	0.249022
PCYT1B	16	0.37188209	0.350168
CAPRN2	15	0.38954869	0.381319
APP	15	0.41943734	0.357798
TMEM2	14	0.34819533	0.361111
ERBB3	14	0.37528604	0.348837
MAPK1	14	0.38588235	0.266098
K0256_HUMAN	14	0.38407494	0.301136
TUSC2	13	0.38228438	0.425505
EZH2	13	0.36043956	0.388278
PTPN4	13	0.43967828	0.305085
SLC12A8	13	0.37357631	0.277381
ATP2A2	13	0.35421166	0.362934
STK33	13	0.4173028	0.40367

法代价高、周期长,很难对上述的 53 个差异基因全部进行鉴定和实验证实。因此,通过系统生物学网络结构分析软件 Cytoscape 对这 53 个差异表达基因构建网络,大大缩小了搜索范围,进一步结合文献检索,最终选取 hsa-miR-19b-3p、hsa-miR-20a-5p、hsa-miR-126-3p 这 3 个 miRNA,在扩大样本量的基础上采用 Real-time PCR 技术定量检测这 3 个候选 miRNA 在 ISR 患者血浆中的表达量,最终筛选出可能作为 ISR 生物标记物的 miRNA。Real-time PCR 检测结果与 miRNA 芯片结果相一致,两两比较发现,ISR 组 miR-19b、miR-20a、miR-126 与 controls 组比较均明显降低 ( $P < 0.05$ )。ISR 组 miR-126 与 non-ISR 组比较均明显降低 ( $P < 0.05$ );但 miR-19b、miR-20a 与 non-ISR 组比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。non-ISR 组 miR-19b、miR-20a、miR-126 与 controls 组比较差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ ;图 3)。

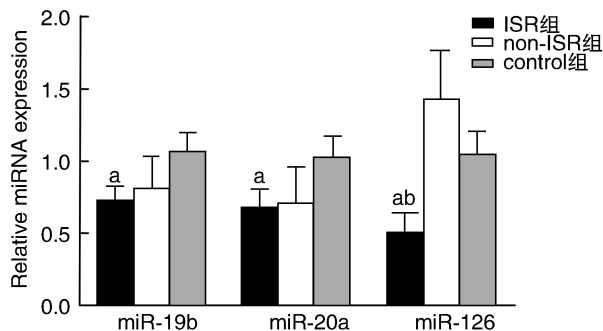


图 3. 3 种 miRNA 在各组的相对表达量比较 ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) a 为  $P < 0.05$ , 与 control 组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与 non-ISR 组比较。

Figure 3. Comparison of relative expression of three miRNAs in each group ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )

### 3 讨论

目前认为,血管内膜增生是动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)和 ISR 等心血管疾病共同的生理特征,其最终的结果是导致血管重塑。血管重塑性疾病指因血管内皮细胞(vascular endothelial cell, VEC)损伤、血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)的增殖和细胞外基质(extra cellular matrix, ECM)的沉积等因素导致的,以血管壁增厚以及血管腔狭窄为主要表现的心血管疾病。目前关于血管内膜增生机制的研究很多,如 VEC 损伤、VSMC 的迁移和增殖、脂质沉积、炎症和免疫复合物的形成等,但至今仍未能完全阐明。

MicroRNA 是长约 22 碱基的非编码 RNA,它通过与靶 mRNA 配对结合而实现其翻译抑制或降解作用。本研究经过 miRNA 芯片检测,筛选获得了一批在 ISR 患者中差异表达的 miRNA,其中 43 个基因表达下调,10 个基因表达上调。这表明 miRNA 在 ISR 患者中存在差异性表达,这些 miRNA 及靶基因可能与 ISR 的发生有关。但是每个 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,因此 miRNA 自身表达的调控以及对靶基因的调控网络是极其复杂的,单纯靠生物学实验的方法代价高、周期长,很难对基因芯片筛选出来的 53 个差异基因全部进行鉴定和实验证实。但依据已经证实的 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,可以大量减少生物学实验的次数,节省时间和成本。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准确<sup>[5]</sup>。因此,本研究利用系统生物学网络结构分析软件 Cytoscape

对这 53 个差异表达基因构建网络,可以更直观地发现 ISR 相关 miRNA 及其靶基因的关系网络,从而缩小搜索范围。

本研究通过 Real-time PCR 进一步验证了基因芯片的数据结果,Real-time PCR 结果与 miRNA 芯片结果相一致,miR-19b、miR-20a 和 miR-126 在 ISR 患者中较健康对照组均明显下降,miRNA 基因芯片结果是可靠的。通过将 ISR 组与 non-ISR 组进行比较,发现差异表达的 miRNA 只有 miR-126。miR-126 可能是 ISR 中的关键 miRNA,miR-126 降低倾向于发生 ISR。

既往众多研究结果与本研究结论相近。miRNA 参与了血管内皮细胞的损伤和修复<sup>[6-7]</sup>。miR-126 是一种与血管生成相关的 miRNA,它主要在心、肺、肾等血供丰富的脏器中表达,并特异性地在内皮细胞中高表达<sup>[8]</sup>,因此目前 miR-126 被认定为检测内皮细胞纯化程度的一种有效的标记<sup>[9]</sup>。Fish 等<sup>[10]</sup>报道,在内皮细胞中高表达的 miR-126 可通过抑制 CXC 类趋化因子 CXCL12 和磷脂酰肌醇-3-激酶调节亚基-2(phosphoinositol-3 kinase regulatory subunit, PIK3R2)和 Sprouty 家族相关蛋白 Spred 1(sprouty-related, EVH1 domain-containing protein-1, SPRED-1)解除它们对血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)信号通路的抑制,进而起到促进胚胎血管形成和维持血管完整性的作用。Chen 等<sup>[11]</sup>在心肌缺血性疾病研究中发现,miR-126 可通过调控丝氨酸-苏氨酸激酶(serine-threonine kinase, AKT)/细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)通路改变心肌梗死区域的血管生成和心脏功能。Jansen 等<sup>[12]</sup>发现内皮微粒通过将 miR-126 传递到受体细胞,进而减少 VSMC 的增殖、迁移和新生内膜形成。Izuhara 等<sup>[13]</sup>发现 miR-126 能够抑制 VSMC 的分化和迁移,并且他们开发了一个 miR-126 洗脱支架系统,发现 miR-126 洗脱支架能够显著抑制兔再狭窄模型中新生血管内膜的形成。这些研究结果与本研究 miR-126 下降倾向于发生 ISR 的结论是相一致的。miR-126 作为生理性血管生成的主要调控因素,在胚胎血管生成方面,miR-126 参与介导血管生成信号的通路,促进胚胎干细胞分化为内皮祖细胞和内皮细胞,促进内皮细胞的成熟。在成熟的内皮细胞和成人内皮祖细胞,血管损伤和/或缺氧情况下,miR-126 调控激活内皮祖细胞和内皮细胞和血管修复和新血管形成,从而表现出其血管保护和抗动脉粥样硬化的特

性<sup>[14]</sup>。因此,miR-126可能成为未来血管性疾病治疗的重要靶点。

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。首先,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,这是因为基因芯片只能用于定性而不能定量,并且芯片价格昂贵,一般用于miRNA的初筛,而芯片筛查的样本量一般均偏少,显然这还需要通过大规模临床试验来进一步证实;其次,本研究对miRNA基因芯片结果的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,难以单纯靠生物实验的方法来验证;由于其本身的局限性,生物信息学预测靶基因的假阳性率和假阴性率都很高,这有可能造成结果的偏倚。因此,要最终确定miRNA和靶基因作用关系,仍需要通过大规模生物实验及临床试验来证实。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,从而使其在不久将来ISR的早期诊断和靶基因治疗中发挥应有的作用。

综上所述,本研究通过基因芯片检测成功筛选出了ISR相关的miRNA表达谱,通过生物信息学和Real-time PCR对基因芯片的结果进行分析和验证发现,miR-126在ISR患者中存在差异性表达,miR-126水平下降倾向于发生ISR。这为今后ISR的研究奠定了可靠的分子基础,为未来ISR在临床上的诊断和治疗提供了新的生物学依据。

#### [参考文献]

- [1] Widmer RJ. MicroRNAs: small molecule, big potential for coronary artery disease[J]. *Eur Heart J*, 2016, 37(22): 1750-752.
- [2] Cavarretta E, Frati G. MicroRNAs in coronary heart disease: ready to enter the clinical arena [J]? *Biomed Res Int*, 2016, 2016: 2150763.
- [3] Shannon P, Markiel A, Ozier O, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks [J]. *Genome Res*, 2003, 13(11): 2498-504.

- [4] 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.
- [5] Van Rooij E. The art of microRNA research [J]. *Circ Res*, 2011, 108(2): 219-234.
- [6] Nazari-Jahantigh M, Egea V, Schober A. MicroRNA-specific regulatory mechanisms in atherosclerosis [J]. *Mol Cell Cardiol*, 2015, 89(Pt A): 35-41.
- [7] 李玉媚, 欧和生. miRNA对血管内皮细胞功能调节的研究进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2014, 22(10): 1072-076.
- [8] Santulli G, Wronska A, Uryu K, et al. A selective microRNA-based strategy inhibits restenosis while preserving endothelial function [J]. *J Clin Invest*, 2014, 124(9): 4102-114.
- [9] Miki K, Endo K, Takahashi S, et al. Efficient detection and purification of cell populations using synthetic microRNA switches[J]. *Cell Stem Cell*, 2015, 16(6): 699-711.
- [10] Fish JE, Santoro MM, Morton SU, et al. miR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity [J]. *Dev Cell*, 2008, 15(2): 272-284.
- [11] Chen JJ, Zhou SH. Mesenchymal stem cells overexpressing MiR-126 enhance ischemic angiogenesis via the AKT/ERK-related pathway [J]. *Cardiol J*, 2011, 18(6): 675-681.
- [12] Jansen F, Stumpf T, Proebsting S, et al. Intercellular transfer of miR-126-3p by endothelial microparticles reduces vascular smooth muscle cell proliferation and limits neointima formation by inhibiting LRP6[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2017, 104: 43-52.
- [13] Izuhara M, Kuwabara Y, Saito N, et al. Prevention of neointimal formation using miRNA-126-containing nanoparticle-conjugated stents in a rabbit model[J]. *PLoS One*, 2017, 12(3): e0172798.
- [14] Chistiakov DA, Orekhov AN, Bobryshev YV. The role of miR-126 in embryonic angiogenesis, adult vascular homeostasis, and vascular repair and its alterations in atherosclerotic disease [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2016, 97: 47-55.

(此文编辑 朱雯霞)