

## 急性心肌梗死患者血浆外泌体 mRNA 表达谱分析

袁雯<sup>1</sup>, 郑美丽<sup>2</sup>, 韩瑞娟<sup>3</sup>, 孙凯<sup>3</sup>, 钟久昌<sup>2</sup>, 李鹰<sup>1</sup>

(1. 首都医科大学附属北京朝阳医院医学研究中心, 北京市 100020; 2. 首都医科大学附属北京朝阳医院心脏中心 高血压研究北京市重点实验室, 北京市 100020; 3. 中国医学科学院阜外医院, 北京市 100037)

[关键词] 心肌梗死; 外泌体; mRNA; 高通量分析

[摘要] **目的** 比较分析急性心肌梗死(AMI)患者和非心源性胸痛(NCCP)患者血浆外泌体中 mRNA 的表达差异,并探讨差异表达 mRNA 对 AMI 发生发展可能的影响。**方法** 入选北京朝阳医院和内蒙古包头市中心医院 NCCP 患者和 AMI 患者各 15 例。提取入选者血浆外泌体及外泌体总 RNA,高通量测序技术检测 AMI 患者和 NCCP 患者血浆中外泌体信使 RNA(mRNA)的表达谱,筛选出 AMI 患者中差异表达的 mRNA。对差异表达 mRNA 进行基因本体(GO)分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)信号通路分析。**结果** 提取的外泌体为粒径在 30~200 nm 之间的双层膜小囊泡,表达外泌体标志分子分化簇 63(CD63)和热休克蛋白 70(HSP70),而不表达甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH),符合外泌体的特征。对入选 AMI 患者和 NCCP 患者血浆外泌体中的 mRNA 表达量进行检测,AMI 患者血浆中外泌体转录本数量为 64 258 条,NCCP 患者血浆中外泌体转录本数量为 64 374 条。其中差异表达的 mRNA 共 1 800 条(上调 951 条,下调 849 条)。GO 和 KEGG 分析表明上述差异表达的 mRNA 参与了 AMI 的生物学调节功能和通路。**结论** AMI 患者血浆外泌体中 mRNA 的表达水平与 NCCP 组比较存在明显的差异,这些差异表达的外泌体 mRNA 可能在 AMI 的发生发展过程中发挥重要的作用。

[中图分类号] R541.4

[文献标识码] A

## Analysis of the expression profile of plasma exosome mRNAs in patients with acute myocardial infarction

YUAN Wen<sup>1</sup>, ZHENG Meili<sup>2</sup>, HAN Ruijuan<sup>3</sup>, SUN Kai<sup>3</sup>, ZHONG Jiuchang<sup>2</sup>, LI Ying<sup>1</sup>

(1. Medical Research Center, Beijing Chao-Yang Hospital, Capital Medical University, Beijing, 100020, China; 2. Heart Center & Beijing Key Laboratory of Hypertension Research, Beijing Chao-Yang Hospital, Capital Medical University, Beijing, 100020, China; 3. Fuwai Hospital, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing, 100037, China)

[KEY WORDS] acute myocardial infarction; exosome; mRNA; high-throughput analysis

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the expression pattern of plasma exosome mRNA in AMI (acute myocardial infarction) patients using NCCP (noncardiac chest pain) patients as control group, and determine the possible effects of differentially expressed mRNAs in AMI patients. **Methods** Fifteen NCCP and AMI patients were enrolled from Beijing Chao-yang Hospital and Baotou Central Hospital. Exosomes and exosome RNA were extracted from the plasma of selected patients. High-throughput sequencing technology was used to detect the expression of mRNA (message RNA) profile in exosomes in the plasma of patients with AMI and NCCP. GO (gene ontology) and KEGG (kyoto encyclopedia of genes and genomes) were used to analyze differentially expressed mRNAs. **Results** The size of exosomes was between 30-200 nm. These exosomes express CD63 (cluster of differentiation 63) and HSP70 (heat shock proteins 70), but not GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), conforming with the characteristics of exosomes. 64258 mRNAs were detected in the plasma exosomes of AMI patients and 64374 mRNAs were detected in the plasma exosomes of NCCP patients. Among these detected mRNAs, 1800 mRNAs were differentially expressed in AMI group (951 mRNAs were upregulated, and 849 mRNAs were down regulated). GO and KEGG analysis showed that these differentially expressed mRNA partici-

[收稿日期] 2019-12-25

[修回日期] 2020-03-05

[基金项目] 国家自然科学基金(81800304, 81770253); 国家重大研究计划资助项目(91849111)

[作者简介] 袁雯, 硕士研究生, 技师, 研究方向为冠心病发病机制及生物标志物, E-mail 为 happy\_yuan\_2008@sina.com。通信作者李鹰, 博士, 研究员, 研究方向为再生医学与组织工程, E-mail 为 leeying2013@hotmail.com。

pated in the biological regulatory functions and pathways of AMI. **Conclusion** The mRNA expression pattern of plasma exosomes in patients with AMI was significantly different from that in the NCCP group. These differentially expressed exosome mRNAs may play important roles in the occurrence and development of AMI.

目前中国心血管疾病人数高达 2.9 亿,心血管疾病死亡率居首位,高于肿瘤及其他疾病,占居民疾病死亡构成的 40% 以上<sup>[1]</sup>。急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)是最常见的心血管疾病之一,严重威胁着人类的健康。传统的循环生物标志物如心肌肌钙蛋白 T(cardiac troponin T, cTnT)在 AMI 的诊断和预后评估中起着重要的作用, cTnT 有着高灵敏性,但是由于在非 AMI 患者(如心力衰竭或肺栓塞患者)中也容易检测到 cTnT, 所以其特异性相对较低<sup>[2]</sup>。因此探究 AMI 的发病机制,并寻找更特异的生物标志物是改善 AMI 患者治疗和预后的关键<sup>[3]</sup>。

外泌体是由大多数细胞产生的直径约 30 ~ 150 nm 的脂质双层囊泡<sup>[4]</sup>。这些囊泡含有多种生物活性物质,如蛋白质、脂质、微小 RNA(micro-RNA, miRNA)和信使 RNA(message RNA, mRNA)等。外泌体通过将这些分子转移到靶细胞来介导细胞间的通信,其中转移的分子可能影响多种生物过程<sup>[5-6]</sup>。外泌体存在于几乎所有体液中,如血液、唾液、乳汁等,很容易被检测到<sup>[7-9]</sup>。探究外泌体在心血管疾病发生发展过程的作用具有重要的意义。本研究拟采用高通量测序技术对 AMI 患者和非心源性胸痛(noncardiac chest pain, NCCP)患者血浆外泌体中 mRNA 进行测序<sup>[10]</sup>,并比较 AMI 患者血浆外泌体中差异表达的 mRNAs,进而分析差异表达 mRNAs 的功能。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料和设备

主要试剂:分化簇 63(cluster of differentiation 63, CD63)抗体、热休克蛋白 70(heat shock proteins 70, HSP70)抗体、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体、羊抗兔二抗、羊抗鼠二抗(Abcam)、含蛋白酶抑制剂的裂解液(碧云天生物技术)、5%牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)、磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)、Tris-HCl 缓冲液(Tris-HCl, NaCl, Tween20, TBST)、外泌体提取(exoEasy Maxi Kit)试剂盒、外泌体 RNA 提取(miRNeasy Serum/Plasma Kit)试剂盒(Qiagen)、低密度脂蛋白测定试剂盒、高密度脂蛋白

测定试剂盒、胆固醇测定试剂盒、甘油三酯测定试剂盒、肌酸激酶-MB 型(creatine phosphokinase-MB, CK-MB)测定试剂盒、N 端 B 型脑钠肽(N-terminal pro B-type natriuretic peptide, NT-proBNP)测定试剂盒(Siemens)。

主要设备:离心机(Thermo, 美国), 纳米颗粒跟踪分析仪 Zeta View(Particle Metrix, 德国), 透射电镜(日立公司, 日本), 全自动化学发光免疫分析仪(Siemens, 德国)。

### 1.2 分组和标本收集

选取 2016 年 8 月—2017 年 1 月首都医科大学附属北京朝阳医院和内蒙古包头市中心医院住院的患者 30 例,其中 AMI 患者 15 例、NCCP 患者 15 例。记录入选者性别、年龄、吸烟史、饮酒史、收缩压、舒张压、体质量指数、总胆固醇、甘油三酯、高密度脂蛋白、低密度脂蛋白、CK-MB、NT-proBNP 等临床资料。

非心源性胸痛入选标准:胸痛入院,冠状动脉造影阴性,最终诊断为心脏神经症(5 例)、动脉硬化(4 例)、反流性食管炎(1 例)、高脂血症(5 例)。

急性心肌梗死入选标准(诊断标准基于 2015ESC/AHA/ACC 指南):缺血症状, cTnT 和 CK-MB 表达量升高、心电图病理 Q 波。所有 AMI 患者均为首次确诊。AMI 排除标准:AMI 合并其他疾病如糖尿病、甲状腺功能减退、支气管哮喘、慢性肾病、肿瘤等。

用采血针和抗凝管含乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)采集病人入院次日早晨的空腹静脉血 10 mL,混匀后 4 ℃ 下静置 3 ~ 4 h。3 000 r/min, 4 ℃ 离心 10 min, 上清即为血浆, 1 mL/管分装后 -80 ℃ 保存。

### 1.3 生化指标的检测

总胆固醇、甘油三酯、高密度脂蛋白、低密度脂蛋白、cTnT、CK-MB、NT-proBNP 的检测按照试剂盒说明书进行操作。

### 1.4 血浆外泌体的提取

使用血浆外泌体提取试剂盒(Qiagen 公司, 货号 76064)从血浆中分离外泌体。从 -80 ℃ 冰箱中取出冻存血浆, 37 ℃ 金属浴融化, 10 000 g 离心 15 min 取上清, 使用 0.2 μm 滤器过滤出 4 mL 血浆到新的 15 mL 离心管中。加入 1 倍体积的缓冲液轻

轻颠倒管子5次,室温孵育;再将混合液放进柱子里500 g离心1 min,倒掉废液将柱子重新放回离心管中。加入10 mL缓冲液3 000 g离心5 min,将柱子重新转移到一个新的离心管中。最后加1 mL洗脱液到柱子里,孵育1 min,500 g离心5 min后收集滤液,重新加到柱子上,再次孵育1 min,3 000 g离心5 min,收集滤液到一个新的无RNA酶EP管中,于-80℃保存。

### 1.5 外泌体粒径分析

外泌体原液加入1 mL PBS,混匀。使用纳米颗粒跟踪分析仪 Zeta View-Particle Metrix 对外泌体颗粒的直径进行检测。

### 1.6 外泌体投射电镜分析

向提取的外泌体中加入50~100 μL 2%多聚甲醛溶液。取5~10 μL外泌体溶液滴于Formvar-carbon载样铜网上,室温下放置10 min,然后使用PBS缓冲液清洗。先在铜网上使用50 μL 1%戊二醛液处理5 min,再用100 μL重蒸水洗8次,2 min/次。然后用50 μL草酸双氧铈液(pH7.0)处理5 min。最后在冰上用50 μL甲基纤维素液处理10 min。空气干燥5~10 min。将铜网放在样品盒里,80 kV下调节合适的焦距及亮度并拍照。

### 1.7 Western blot 鉴定外泌体特异性分子标志

向分离得到的100 μL外泌体中加入等体积分含RIPA,冰上裂解5 min,13 000 r/min 4℃离心5 min,弃沉淀。向上清液中加入50 μL 5×上样缓冲液,95℃煮5 min;取20 μL,加入10%SDS聚丙烯酰胺凝胶中进行电泳,结束后将蛋白转印至聚偏二氟乙烯膜(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上,5%BSA封闭1 h。加入CD63抗体(Abcam公司,1:1 000),HSP70抗体(Abcam公司,1:3 000)或GAPDH抗体(Abcam公司,1:5 000),4℃孵育过夜。TBST洗涤3次,每次10 min,之后加入羊抗兔二抗(北京力高泰科技公司,1:15 000)或羊抗鼠二抗(北京力高泰科技公司,1:15 000),温室孵育1 h, TBST洗涤3次,每次10 min,曝光<sup>[11]</sup>。

### 1.8 外泌体RNA的提取

使用RNA提取试剂盒(Qiagen公司,货号217184)提取外泌体RNA。先向提取出的外泌体原液中加入600 μL裂解液,室温孵育2 min,3 000 g 5 min离心,取上清。加入氯仿,分层,取上层水相,再加入1.5倍体积100%乙醇,用移液器上下混匀。然后分批加到试剂盒提供的柱子里,8 000 g 15 s离心,倒掉废液,回收柱子。然后加入试剂盒的缓冲液到柱子上离心洗涤柱子。再加80%乙醇到柱子

上8 000 g 2 min离心,离心后把柱子转移到一个新的无RNA酶EP管中,晾干柱子上的过滤膜,加入14 μL洗脱液,8 000 g 1 min离心后,扔掉柱子,收集滤液,储存至-80℃冰箱。

### 1.9 外泌体RNA高通量测序

首先对提取的外泌体RNA进行完整度、纯度、质量等的鉴定。合格后反转录合成cDNA第一条链,随后用RNA酶H降解RNA链,并在DNA聚合酶的作用下,以dNTP为原料合成cDNA第二条链。纯化后的双链cDNA经过末端修复、PCR扩增、纯化等步骤得到测序文库,利用Illumina HiSeq平台进行测序。去除测序原始数据中的接头、包含poly-N的读长和低质量的读长得到干净数据。采用DESeq2 R包(1.16.1)对mRNA进行差异表达分析,通过Cluster Profiler R包对差异表达的转录本进行基因本体(gene ontology, GO)分析和京都基因与基因组百科全书(kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)信号通路富集分析<sup>[12]</sup>。

### 1.10 差异表达mRNA分析

用Audics软件对差异表达mRNA进行分析,并且使用Kobas 2.0软件对差异表达mRNA进行GO和KEGG信号通路分析。

### 1.11 统计学方法

应用SPSS软件进行统计分析,正态分布数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,非正态分布数据用中位数及( $P_{25}, P_{75}$ )表示。正态分布数据两组间比较采用 $t$ 检验,非正态分布数据两组间比较采用非参数检验,两组数据率的比较采用卡方检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 两组基本临床资料的比较

AMI患者的年龄和性别与NCCP组比较差异无统计学意义,而吸烟率、cTNT、CKMB、NT-proBNP等较NCCP组高( $P < 0.05$ ;表1),符合心肌梗死患者的临床特征。

### 2.2 不同粒径外泌体分布情况

提取到的外泌体颗粒粒径大小不同,主要集中在30~200 nm,在所有外泌体颗粒中占比97.5%。直径100 nm左右的外泌体含量最高,约为 $3.9 \times 10^6$ 个/mL(图1)。10~30 nm、30~200 nm、大于200 nm的外泌体颗粒累计百分比分别为1.0%、97.5%、0.4%。

表 1. 两组基本临床资料的比较 ( $n=15$ )Table 1. Comparison of basic clinical data between the two groups ( $n=15$ )

指标	AMI 组	NCCP 组	<i>P</i>
男/[例(%)]	12(80.0)	8(66.7)	0.054
年龄/岁	62.1±2.32	55.4±2.55	0.080
吸烟史/[例(%)]	14(93.3)	5(33.3)	0.005
饮酒史/[例(%)]	8(53.5)	4(26.7)	0.234
收缩压/mmHg	135.5±6.64	123.2±3.14	0.084
舒张压/mmHg	81.9±3.01	74.77±2.26	0.067
体质量指数/(kg/m <sup>2</sup> )	25.76±0.56	26.28±1.32	0.751
总胆固醇/(kg/m <sup>2</sup> )	4.6±0.37	4.41±0.29	0.694
甘油三酯/(kg/m <sup>2</sup> )	1.68±0.40	1.30±0.15	0.313
HDL/(mmol/L)	1.03±0.07	1.21±0.07	0.090
LDL/(mmol/L)	2.92±0.29	2.73±0.30	0.676
cTNT/(μg/L)	7.72 (0.815,10.2)	0 (0,0.02)	0.0004
CK-MB/(μg/L)	7.52 (1.1,59.59)	0.2 (0,0.6)	0.0002
NT-proBNP/(ng/L)	312.8 (703.5,2728)	41.83 (26.66,99.25)	0.0009

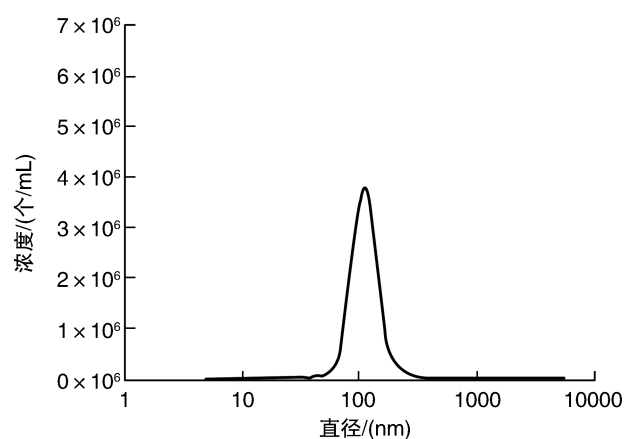


图 1. 外泌体粒径大小及浓度的分析

Figure 1. Size and concentration analysis of exosomes

### 2.3 外泌体透射电镜结果

透射电镜下观察到提取的囊泡大小不均,呈圆形或类圆形,具有脂质双层膜,直径在 30 ~ 200 nm 之间,符合外泌体的形态特征(图 2)。

### 2.4 外泌体特异性分子标志

免疫印迹实验结果显示,提取到的囊泡表达特异性标志蛋白 CD63 和 HSP70,而不表达 GAPDH(图 3),符合外泌体的特征。

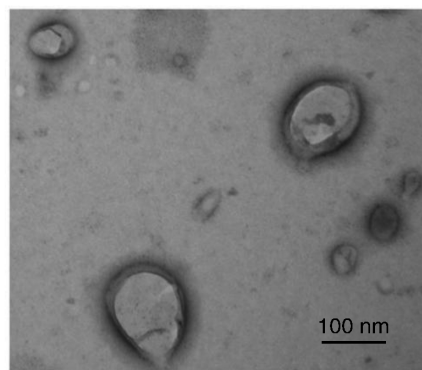


图 2. TEM 图像显示从血浆中提取的外泌体

Figure 2. TEM images show exosomes extracted from plasma

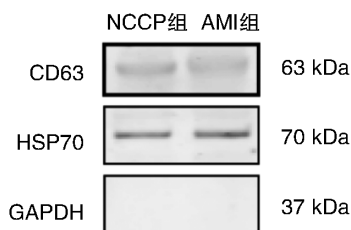


图 3. 外泌体标志蛋白 CD63 和 HSP70 的 Western blot 分析  
Figure 3. Western blot analysis of exosome marker molecules CD63 and HSP70

### 2.5 外泌体已知 mRNA 表达量

通过高通量测序检测到 AMI 患者血浆中外泌体转录本数量为 64 258 条,NCCP 患者血浆中外泌体转录本数量为 64 374 条。

### 2.6 外泌体已知 mRNA 表达差异分析

以差异倍数大于 2 或小于 0.5,以及  $q$ -value < 0.001 为筛选条件,挑选出了差异表达的 mRNA,差异表达的 mRNA 共 1 800 条(上调 951 条,下调 849 条,图 4),其中表达差异较为显著的转录本(差异倍数大于 8 或小于 0.125)如表 2 所示。

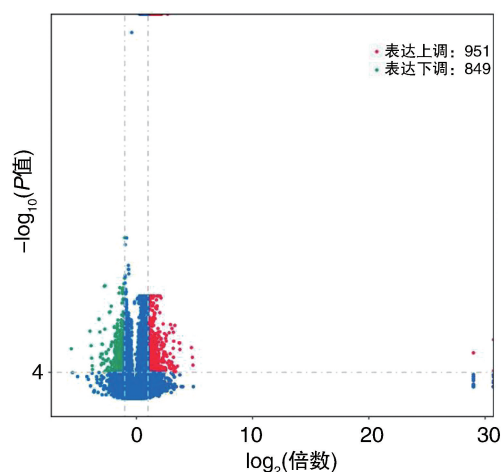


图 4. 差异表达 mRNAs 的火山图

Figure 4. Volcano map of differentially expressed mRNAs



表 2. 两组显著差异表达的 mRNAs ( $|\log_2 \text{Fold change}| > 3$ )Table 2. Significantly differentially expressed mRNAs between the two groups ( $|\log_2 \text{Fold change}| > 3$ )

基因号	NCCP 组	AMI 组	$\log_2$ 倍数	$P$	$Q$
XM_005275398.1	0.4223966	0.0087163	-5.598738559	$2.63 \times 10^{-8}$	$8.70 \times 10^{-7}$
XM_005255923.1	3.20523	0.202531	-3.984213232	$5.23 \times 10^{-11}$	$3.09 \times 10^{-9}$
XM_005272579.1	2.432003333	0.163785	-3.892270065	$8.89 \times 10^{-9}$	$3.35 \times 10^{-7}$
XM_005274827.1	1.257019	0.0874175	-3.845940526	$7.26 \times 10^{-7}$	$1.56 \times 10^{-5}$
NM_173494.1	0.735132	0.0528105	-3.799106617	$1.01 \times 10^{-5}$	$1.48 \times 10^{-4}$
NM_001270395.1	0.749085333	0.054595	-3.77828934	$3.71 \times 10^{-5}$	$4.37 \times 10^{-4}$
NM_001167890.1	1.930408333	0.208642	-3.209804539	$7.82 \times 10^{-13}$	$5.81 \times 10^{-11}$
NM_015507.3	1.932793	0.2089	-3.209802737	$7.82 \times 10^{-13}$	$5.81 \times 10^{-11}$
NM_005143.3	3.15408	0.359801	-3.131948152	$7.09 \times 10^{-11}$	$4.10 \times 10^{-9}$
NM_152436.2	1.332676667	0.155837	-3.096217082	$4.69 \times 10^{-7}$	$1.07 \times 10^{-5}$
NM_001271752.1	1.87951	0.2301075	-3.029976679	$1.62 \times 10^{-7}$	$4.29 \times 10^{-6}$
XM_005251141.1	3.070783333	0.3770215	-3.025888021	$7.40 \times 10^{-6}$	$1.15 \times 10^{-4}$
NM_198195.1	0.078952833	0.639212	3.017231547	$3.02 \times 10^{-5}$	$3.68 \times 10^{-4}$
XM_005251284.1	0.166261333	1.355425	3.027220695	$6.24 \times 10^{-6}$	$9.91 \times 10^{-5}$
XM_005263714.1	0.185814	1.5360745	3.047317079	$2.86 \times 10^{-6}$	$5.06 \times 10^{-5}$
NM_001243763.1	0.460554333	3.859125	3.066830503	$2.04 \times 10^{-11}$	$1.28 \times 10^{-9}$
XM_005267470.1	0.084933433	0.7648395	3.170752557	$2.23 \times 10^{-8}$	$7.52 \times 10^{-7}$
XM_005267228.1	0.0719098	0.652313	3.181304078	$1.15 \times 10^{-5}$	$1.66 \times 10^{-4}$
NM_001172654.1	0.221742667	2.02031	3.187618381	$7.83 \times 10^{-11}$	$4.49 \times 10^{-9}$
NM_004477.2	0.169351667	1.55137	3.195448718	$5.20 \times 10^{-7}$	$1.16 \times 10^{-5}$
NM_018460.3	0.148464333	1.37771	3.214083952	$1.80 \times 10^{-9}$	$7.91 \times 10^{-8}$
XM_005257191.1	0.125534	1.188435	3.242912933	$7.17 \times 10^{-5}$	$7.45 \times 10^{-4}$
XM_005257192.1	0.126022333	1.1930605	3.242915872	$7.17 \times 10^{-5}$	$7.45 \times 10^{-4}$
NM_001164238.1	0.110162333	1.068604	3.278024395	$2.28 \times 10^{-5}$	$2.93 \times 10^{-4}$
NM_006865.3	0.189117333	1.876925	3.3110175	$7.03 \times 10^{-12}$	$4.69 \times 10^{-10}$
XM_005257190.1	0.127210333	1.307107	3.361089474	$2.13 \times 10^{-5}$	$2.78 \times 10^{-4}$
XM_005257189.1	0.12094	1.2426805	3.36109203	$2.13 \times 10^{-5}$	$2.78 \times 10^{-4}$
NM_001005479.1	0.099349	1.046441	3.396841716	$8.21 \times 10^{-5}$	$8.34 \times 10^{-4}$
NM_014171.4	0.0462913	0.5368885	3.53580952	$1.20 \times 10^{-5}$	$1.71 \times 10^{-4}$
NM_152836.2	0.050448333	0.6545425	3.697608358	$3.30 \times 10^{-9}$	$1.38 \times 10^{-7}$
NM_152837.2	0.051853667	0.6727765	3.6976094	$3.30 \times 10^{-9}$	$1.38 \times 10^{-7}$
NM_022133.3	0.046857333	0.618416	3.722230889	$3.30 \times 10^{-9}$	$1.38 \times 10^{-7}$
XM_005251282.1	0.041232	0.553252	3.746100414	$3.37 \times 10^{-8}$	$1.08 \times 10^{-6}$
XM_005251283.1	0.019617033	0.524186	4.739900037	$1.75 \times 10^{-8}$	$6.10 \times 10^{-7}$
XM_005248452.1	0.0151274	0.426286	4.816585723	$5.24 \times 10^{-7}$	$1.17 \times 10^{-5}$
XM_005267229.1	0.016308033	0.4767365	4.86953737	$8.24 \times 10^{-6}$	$1.26 \times 10^{-4}$

## 2.7 差异表达 mRNA GO 分析

基因本体(GO)分析分别从分子功能(molecular functions, MF)、细胞组分(cellular component, CC)及生物学过程(biological process, BP)共3种独立方式对差异 mRNA 进行分类。在 MF 方面,差异最多的

是结合、蛋白结合、杂环化合物结合、有机环状化合物结合和催化活性相关。CC 方面,细胞组分、细胞、细胞内、细胞内组分和细胞器的变化比较显著。在 BP 方面,最显著差异的细胞过程、单有机体过程、单有机体细胞过程、生物调控和生物过程调控(图 5)。

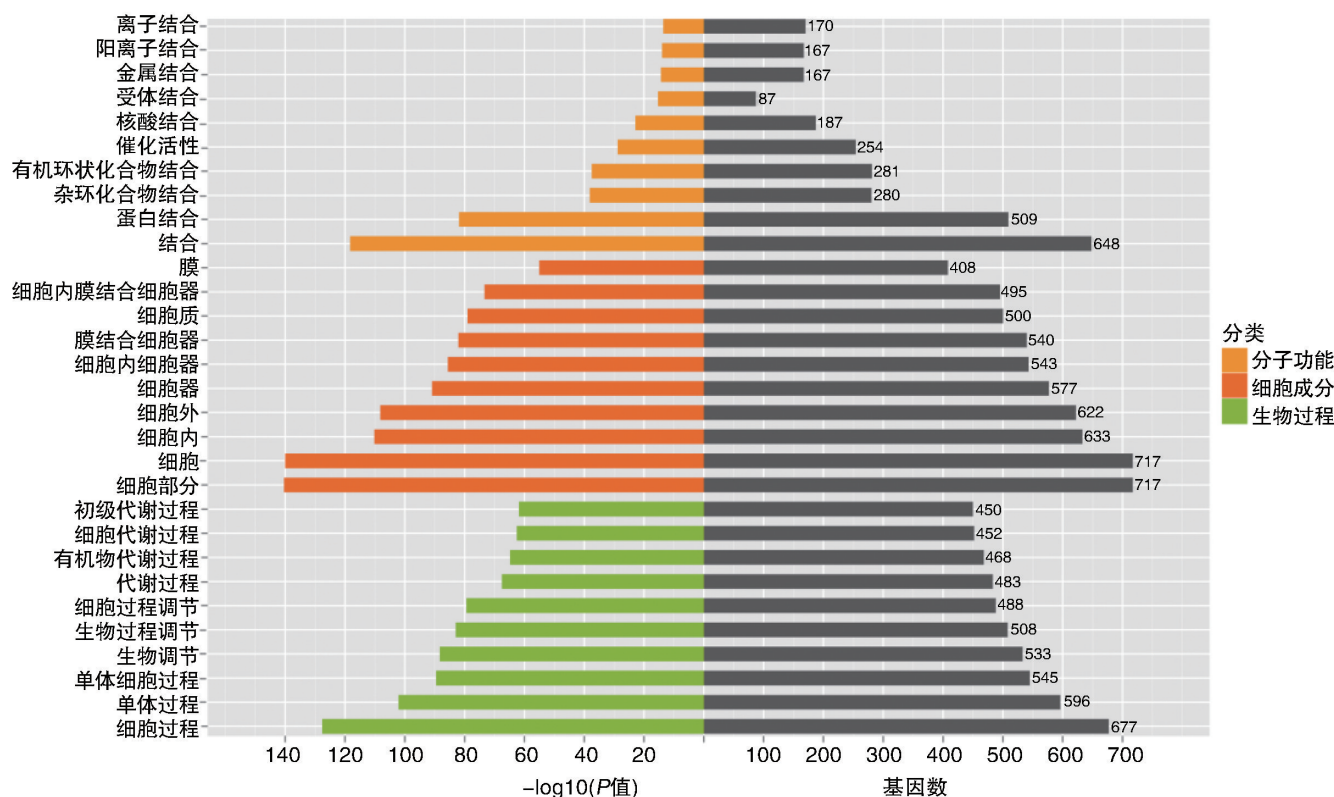


图 5. 差异表达 mRNA 的 GO 分析

Figure 5. Gene ontology analysis of differentially expressed mRNAs

## 2.8 差异表达 mRNA KEGG 分析

发现差异表达 mRNA 相关 KEGG 通路主要涉及组织系统(organismal systems)、新陈代谢(metabolism)、人类疾病(human diseases)、遗传信息处理(genetic information processing)、环境信息处理(environmental information processing)。其中组织系统主要涉及血小板活化、自然杀伤细胞介导的细胞毒性等。新陈代谢主要涉及代谢途径。人类疾病主要涉及病毒致癌、癌症途径。遗传信息处理主要涉及核糖体、泛素介导的蛋白质水解。环境信息处理主要涉及焦距黏合剂、细胞周期等(图 6)。

## 3 讨论

外泌体(exosome)是最小的细胞外囊泡,由胞内多囊泡小体与胞膜融合后分泌到细胞外环境中。

其直径为 30 ~ 150 nm,能通过与靶细胞的细胞膜融合、胞吞等作用等方式将携带的微小 RNA(miRNA)、mRNA、蛋白质等传递至受体细胞中,介导细胞间的信息交流并调控细胞的生理功能<sup>[13]</sup>,几乎所有的细胞都可以分泌外泌体,广泛分布于唾液、血浆、乳汁、脑脊液等体液等。根据细胞来源的不同,外泌体有着不同的生理功能:如免疫调节、凝血机制、细胞迁移、细胞分化、介导细胞间的交流等。

通过分析外泌体中的信息物质可以直接获得细胞的基本信息<sup>[14-15]</sup>。mRNA 作为外泌体中的重要信息物质之一,可受到外泌体的保护而不易被降解。已有研究表明,外泌体通过携带的 mRNA 参与了多种疾病的发生发展,并且外泌体 mRNA 可能会成为某些疾病诊断和预后判断的特殊标志物<sup>[16]</sup>。因此,可通过检测外泌体中的 mRNA 表达研究细胞间信息传递在疾病中的作用。

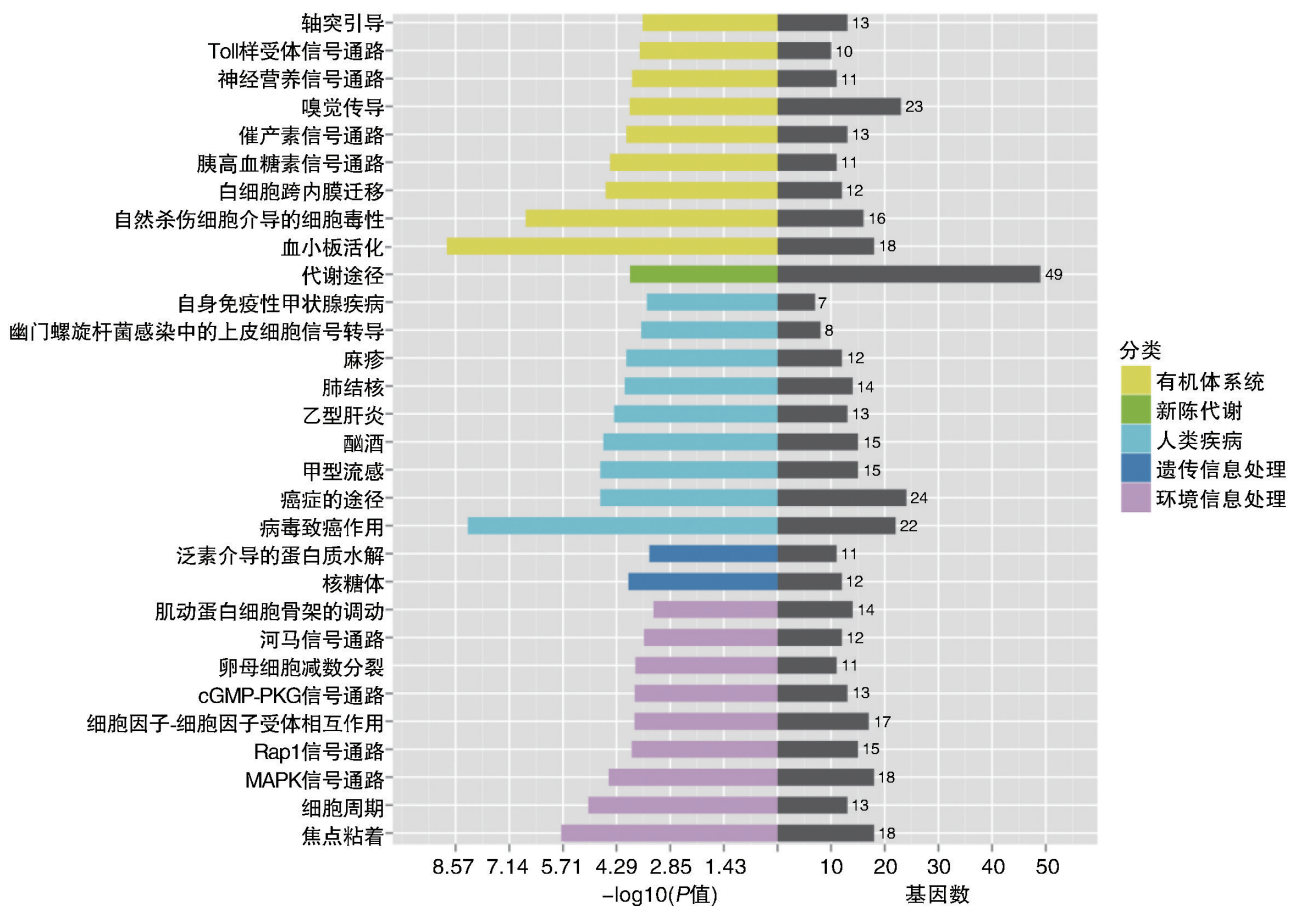


图 6. 差异表达 mRNAs 的 KEGG 途径

Figure 6. KEGG pathways of differentially expressed mRNAs

心肌梗死多发生于冠状动脉粥样硬化性狭窄,主要由斑块破裂或血栓形成及继发冠状动脉阻塞引起,导致心肌细胞凋亡和心肌坏死。研究表明,外泌体介导的细胞间信息沟通在心肌梗死中通过多种机制发挥作用<sup>[17-18]</sup>。已有的研究多集中在对外泌体中 miRNA 在 AMI 早期诊断、移植治疗,以及心肌梗死后的心肌纤维化和血管新生中的作用及机制。然而,外泌体 mRNA 在 AMI 患者中的表达变化及其在 AMI 病理过程中的作用及机制尚不明确。

本研究通过高通量测序技术,对 AMI 患者和 NCCP 患者血浆外泌体中的 mRNA 表达量进行检测,AMI 患者血浆中外泌体转录本数量为 64 258 条,NCCP 患者血浆中外泌体转录本数量为 64 374 条。比较两类患者血浆外泌体中 mRNA 的表达可知,AMI 患者血浆外泌体中差异表达的 mRNA 有 1 800 条,其中表达上调的有 951 条,下调的有 849 条;表达差异较为显著的转录本有 36 条,其中 23 条表达上调,13 条表达下调。人类白细胞免疫球蛋白样受体活化性受体成员 3 (NM\_001172654.1) 是

AMI 患者血浆外泌体中表达升高较为显著的转录本之一,其基因多态性与高密度脂蛋白胆固醇的水平相关以及冠心病密切相关<sup>[19]</sup>。此外,血浆外泌体中还有其他差异表达 mRNA 与心肌梗死的发生发展相关,所以外泌体 mRNA 的研究可为 AMI 的诊断及治疗提供靶点。

通过 GO 和 KEGG 信号通路分析将 AMI 患者血浆外泌体中差异表达的 mRNA 进行了功能注释和信号通路分析。本研究中所检出的差异表达 mRNA 涉及细胞周期相关蛋白 mRNA、代谢相关 mRNA 和人类疾病 mRNA 等。此外,这些差异表达 mRNA 影响众多信号通路,尤其很多涉及癌症通路和蛋白质的加工等途径。

综上所述,本研究通过高通量分析技术筛选出了 AMI 患者循环外泌体中差异表达的 mRNA,并对其进行了生物信息学分析,探讨了差异表达的 mRNA 及其参与的信号通路,深入研究这些特异性外泌体 mRNA 在 AMI 发生、发展过程中的作用有着重要的意义。

**致 谢** 本实验完成于首都医科大学附属北京朝阳医院医学研究中心,实验过程中得到研究中心和内蒙古包头市中心医院全体老师同学的帮助,在此深表谢意!

#### [参考文献]

- [1] 胡盛寿,高润霖,刘力生,等.《中国心血管病报告 2018》概要[J]. 中国循环杂志, 2019, 34(3): 209-220.
- [2] Van Hise CB, Greenslade JH, Parsonage W, et al. External validation of heart-type fatty acid binding protein, high-sensitivity cardiac troponin, and electrocardiography as rule-out for acute myocardial infarction[J]. Clin Biochem, 2018, 52: 161-163.
- [3] Gao L, Liu Y, Guo S, et al. Circulating long noncoding RNA HOTAIR is an essential mediator of acute myocardial infarction[J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 44(4): 1497-1508.
- [4] Qin W, Dallas SL. Exosomes and extracellular RNA in muscle and bone aging and crosstalk[J]. Curr Osteoporos Rep, 2019, 17(6): 548-559.
- [5] Altanerova U, Jakubecova J, Repiska V, et al. Exosomes of human mesenchymal stem/stromal/medicinal signaling cells[J]. Neoplasma, 2017, 64(6): 809-815.
- [6] Das T, Prodhan C, Patsa S, et al. Identification of over expressed proteins in oralsubmucous fibrosis by proteomica analysis[J]. J Celll Biochem, 2018, 119(6): 4361-4371.
- [7] Ma H, Zhang S, Xu Y, et al. Analysis of differentially expressed microRNA of TNF- $\alpha$ -stimulated mesenchymal stem cells and exosomes from their culture supernatant[J]. Arch Med Sci, 2018, 14(5): 1102-1111.
- [8] Clayton A, Buschmann D, Byrd JB, et al. Summary of the ISEVworkshop on extracellularvesicles as diseasebiomarkers, held in Birmingham, UK, during December 2017[J]. J Extracell Vesicles, 2018, 7(1): 1473707.
- [9] Cheng L, Zhang K, Wu S, et al. Focus on mesenchymal stem cell-derived exosomes: opportunities and challenges in cell-free therapy[J]. Stem Cells Int, 2017, 2017: 6305295.
- [10] Yokoi A, Yoshioka Y, Hirakawa A, et al. A combination of circulating miRNAs for the early detection of ovarian cancer[J]. Oncotarget, 2017, 8(52): 89811-89823.
- [11] 江梅,全晶,张恒,等. 动脉粥样硬化人群中血液分泌体的蛋白质谱分析[J]. 中国动脉硬化杂志, 2016, 24(9): 865-874.
- [12] 冯月,秦磊,田英杰,等. 肥大心肌细胞来源外泌体差异表达 microRNA 及其信号通路调节的初步研究[J]. 中国动脉硬化杂志, 2017, 25(12): 1196-1200.
- [13] Nakamura K, Sawada K, Kobayashi M, et al. Role of the exosome in ovarian cancer progression and its potential as a therapeutic target[J]. Cancers (Basel), 2019, 11(8): 1147.
- [14] Andrade GM, Meirelles FV, Perecin F, et al. Cellular and extracellular vesicular origins of miRNAs within the bovine ovarian follicle[J]. Reprod Domest Anim, 2017, 52(6): 1036-1045.
- [15] Jiao C, Jiao X, Zhu A, et al. Exosomal miR-34s panel as potential novel diagnostic and prognostic biomarker in patients with hepatoblastoma[J]. J Pediatr Surg, 2017, 52(4): 618-624.
- [16] Bhome R, Goh RW, Bullock MD, et al. Exosomal microRNAs derived from colorectal cancer-associated fibroblasts: role in driving cancer progression[J]. Aging (Albany NY), 2017, 9(12): 2666-2694.
- [17] Thankam FG, Agrawal DK. Infarct zone: a novel platform for exosome trade in cardiac tissue regeneration[J]. J Cardiovasc Transl Res, 2020. DOI: 10.1007/s12265-019-09952-8.
- [18] Duan P, Tan J, Miao Y, et al. Potential role of exosomes in the pathophysiology, diagnosis, and treatment of hypoxic diseases[J]. Am J Transl Res, 2019, 11(3): 1184-1201.
- [19] Stanley A, Ponde CK, Rajani RM, et al. Association between genetic loci linked to HDLC levels and Indian patients with CAD: a pilot study[J]. Heart Asia, 2017, 9(1): 9-13.

(此文编辑 朱雯霞)