

血清长链非编码 RNA n342721 在急性心肌梗死患者中的表达及意义

刘丹, 颜福欣, 郭中州, 郎吉萍, 戴秋月, 林立龙, 曹世平

(南方医科大学南方医院心内科, 广东省广州市 510515)

[关键词] 长链非编码 RNA n342721; 急性心肌梗死; 动脉粥样硬化; 炎症因子; T 细胞; 胆固醇逆向转运

[摘要] **目的** 探索一种新的长链非编码 RNA n342721 (lncRNA n342721) 在急性心肌梗死 (AMI) 患者血清中的表达及临床意义。**方法** 采用人类全转录组芯片 2.0 技术在 5 例 AMI 患者和 5 例非冠心病 (non-CHD) 者血清检测 lncRNA 的表达, 筛选出表达水平差异明显的 6 个上调 lncRNA; 并在 20 例 AMI 患者和 20 例 non-CHD 者血清、体外 Jurkat T 细胞中进一步验证和筛选, 从中选择差异最大的 lncRNA n342721 进行研究。为了探索 lncRNA n342721 的临床价值, 对 60 例 AMI 和 60 例 non-CHD 血清 lncRNA n342721 表达及临床资料进行分析。进一步在 T 细胞水平过表达和沉默 lncRNA n342721, 检测细胞炎症因子白细胞介素 6 (IL-6)、IL-10、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 及胆固醇转运相关指标肝 X 受体 β (LXR- β)、ATP 结合盒转运体 A1 (ABCA1) 和 G1 (ABCG1) 的变化。**结果** 与 non-CHD 相比, AMI 患者血清中差异表达的 lncRNA 有 296 个上调, 74 个下调。在筛选的 6 个 lncRNA 中, 选择在血清和 T 细胞水平表达差异最大的 lncRNA n342721 作为主要研究对象。实时荧光定量 PCR 检测发现, AMI 组 ($n=60$) 血清 lncRNA n342721 表达较 non-CHD 组 ($n=60$) 明显升高 ($P<0.05$), 进一步 Logistic 回归分析表明, 血清 lncRNA n342721 与 AMI 发生密切相关。通过构建 lncRNA n342721 过表达慢病毒和小干扰 RNA 转染 T 细胞后发现, 与对照组相比, 过表达组 TNF- α 、IL-6 表达增加 ($P<0.05$), IL-10、LXR- β 、ABCA1、ABCG1 表达降低 ($P<0.05$), 沉默组 TNF- α 、IL-6 表达降低 ($P<0.05$), IL-10、LXR- β 、ABCA1、ABCG1 表达增加 ($P<0.05$)。**结论** 血清 lncRNA n342721 作为新的生物标志物, 可能通过促进免疫炎症反应和抑制胆固醇逆向转运促进 AMI 的发生发展。

[中图分类号] R543.1

[文献标识码] A

Expression and significance of serum long noncoding RNA n342721 in patients with acute myocardial infarction

LIU Dan, YAN Fuxin, GUO Zhongzhou, LANG Jiping, DAI Qiuyue, LIN Lilong, CAO Shiping

(Department of Cardiology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510515, China)

[KEY WORDS] long noncoding RNA n342721; acute myocardial infarction; atherosclerosis; inflammatory factor; T cell; reverse cholesterol transport

[ABSTRACT] **Aim** To explore the expression and clinical significance of a novel long noncoding RNA n342721 (lncRNA n342721) in the serum of patients with acute myocardial infarction (AMI). **Methods** The expression of lncRNA in serum of 5 patients with AMI and 5 cases without coronary heart disease (non-CHD) was detected by using Human Transcriptome Array 2.0, and 6 up-regulated lncRNAs with different expression levels were screened out. Further verification and screening were carried out in serum of 20 patients with AMI and 20 cases with non-CHD and Jurkat T cells in vitro, and the most different lncRNA n342721 was selected for the study. In order to explore the clinical value of lncRNA n342721, the serum lncRNA n342721 expression and clinical data of 60 patients with AMI and 60 cases with non-CHD were analyzed. Furthermore, lncRNA n342721 was overexpressed and silenced at T cell level, then the changes of

[收稿日期] 2020-11-19

[修回日期] 2020-12-25

[基金项目] 国家自然科学基金青年项目 (81900398, 81700388); 广东省自然科学基金面上项目 (2019A1515010666); 广东省教育厅高水平大学建设经费南方医科大学临床研究启动计划 (LC2016PY002); 南方医科大学南方医院临床研究专项 (2018CR051)

[作者简介] 刘丹, 硕士研究生, 研究方向为冠心病与炎症反应, E-mail 为 991807910@qq.com。通信作者曹世平, 博士, 主任医师, 博士研究生导师, 研究方向为冠心病发病机制与介入治疗, E-mail 为 csp2012@126.com。

inflammatory cytokines such as interleukin-6 (IL-6), IL-10 and tumor necrosis factor α (TNF- α), and cholesterol transport related indexes such as liver X receptor β (LXR- β), ATP binding cassette transporter A1 (ABCA1) and ABCG1 were detected.

Results Compared with non-CHD, 296 up-regulation and 74 down-regulation lncRNAs were detected among differentially expressed lncRNAs in the serum of AMI patients. Among the 6 selected lncRNAs, lncRNA n342721 was selected as the main research object, which had the greatest expression difference in serum and T cell levels. The results of quantitative real-time PCR showed that the expression of serum lncRNA n342721 in AMI group ($n=60$) was significantly higher than that in non-CHD group ($n=60$) ($P<0.05$). Further logistic regression analysis showed that serum lncRNA n342721 was closely related to the occurrence of AMI. After construction of lncRNA n342721 overexpression lentivirus and transfection of T cells with small interfering RNA, it was found that, compared with the control group, the expressions of TNF- α and IL-6 increased in overexpression group ($P<0.05$), the expressions of IL-10, LXR- β , ABCA1 and ABCG1 decreased ($P<0.05$), the expressions of TNF- α and IL-6 decreased in silence group ($P<0.05$), and the expressions of IL-10, LXR- β , ABCA1 and ABCG1 increased ($P<0.05$).

Conclusion As a new biomarker, serum lncRNA n342721 may promote the occurrence and development of AMI by promoting immune inflammatory response and inhibiting reverse cholesterol transport.

急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI) 是一种由于冠状动脉斑块破裂、形成血栓阻塞血管、最后引起急性心肌缺血性损伤的疾病, 现已成为严重威胁人类健康的主要原因之一^[1]。目前针对 AMI 的治疗主要包括经皮冠状动脉介入术联合抗血小板和(或)抗凝治疗完成血运重建及调脂稳定斑块, 但是 AMI 患者的发病率和死亡率仍然居高不下。因此, 进一步研究 AMI 的发病机制, 寻找新的诊疗分子靶点具有重要的意义。长链非编码 RNA (long noncoding RNA, lncRNA) 是一类长度超过 200 个核苷酸的非编码 RNA, 最初人们因为 lncRNA 不具编码蛋白质的功能被认为是“生物垃圾”^[2]。近年来随着人们对 lncRNA 研究的不断深入, 循环血浆或血清 lncRNA 作为新型生物标记物在疾病诊断、预后或治疗中发挥重要作用。因此, 本研究拟通过基因芯片分析 AMI 患者血清 lncRNA 的表达, 探索 lncRNA 能否作为一种新型生物标记物参与 AMI 的发生发展, 为临床 AMI 治疗寻找新靶点。

1 资料和方法

1.1 研究对象

本研究连续入组 2018 年 12 月至 2020 年 6 月在南方医科大学南方医院心血管内科就诊并首次行冠状动脉造影者 130 例, 包括非冠心病 (non-coronary heart disease, non-CHD) 组 65 例, AMI 组 65 例, 其中外送 lncRNA 基因芯片分析 non-CHD 组和 AMI 组各 5 例, 我们自己后续 lncRNA 检测分析 non-CHD 组和 AMI 组各 60 例。AMI 组中包括急性 ST 段抬高型心肌梗死 (ST-segment elevation myocardial

infarction, STEMI) 40 例和急性非 ST 段抬高型心肌梗死 (non-ST-segment elevation myocardial infarction, NSTEMI) 25 例。排除标准: 严重的肝肾功能损害、重症感染性疾病、心力衰竭、严重的心脏瓣膜疾病、严重心律失常、恶性肿瘤、血液系统性疾病和自身免疫系统疾病。本研究经过患者同意并签署知情同意书, 经南方医科大学南方医院临床研究伦理委员会批准。

诊断标准: 根据卫生部 2010 年 11 月发布的冠心病诊断标准, 结合临床表现、病史、心电图及冠状动脉造影结果证实至少 1 支心外膜冠状动脉或其主要分支内径狭窄 $\geq 50\%$ 的患者诊断为冠心病; 冠状动脉造影证实冠状动脉主支狭窄 $< 50\%$ 者诊断为 non-CHD; AMI 根据 2018 年欧洲心脏病学会 (European Society of Cardiology, ESC) 发布的诊断标准诊断。

1.2 一般资料和临床生物化学指标收集

对所有纳入的研究对象收集一般资料包括年龄、性别、临床表现 (主要症状和体征)、吸烟史、高血压史及糖尿病史。临床生物化学指标包括入院后血常规、N 末端 B 型脑钠肽原 (N-terminal pro-B-type natriuretic peptide, NT-proBNP)、C 反应蛋白 (C-reactive protein, CRP)、心肌肌钙蛋白 I (cardiac troponin I, cTnI)、肌酸激酶同工酶 (creatinine kinase isoenzyme-MB, CK-MB)、天门冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST)、血肌酐 (serum creatinine, SCr)、尿酸 (uric acid, UA)、D-二聚体、低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDLC)、高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDLC)、糖化血红蛋白 (hemoglobin A1c, HbA1c)。

所有患者行冠状动脉造影后,用含肝素钠的促凝管收集次日清晨空腹静脉血 5 mL,室温静置 30 ~ 60 min 后 3 000 r/min 离心 15 min,收集血清置于 -80 ℃ 备用。

1.3 冠状动脉造影

冠状动脉造影术由南方医院心内科导管专业医师在标准导管室完成,采用 Judkins 法行左、右冠状动脉造影,由至少 2 名有经验的医师评估冠状动脉狭窄程度。主要的冠状动脉包括:左主干、左前降支、左回旋支及右冠状动脉、第 1 对角支、第 2 对角支、钝缘支、左心室后支、后降支。

1.4 lncRNA 基因芯片分析

本研究的 RNA 提取及检测,部分委托上海其明信息技术有限公司进行,采用人类全转录组芯片 2.0 (human transcriptome array 2.0, HTA 2.0) 技术分析 5 例 STEMI 和 5 例 non-CHD 外周血清中

lncRNA 差异表达谱,用 limma 包进行差异基因分析,计算转录本间的显著性水平 (P 值) 及倍数变化 (fold change)。

1.5 RNA 提取和实时荧光定量 PCR

血清 RNA、细胞 RNA 提取分别用 Trizol LS 法、Trizol 法。分光光度计测量 RNA 浓度,当 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 在 1.8 ~ 2.2 之间时视为合格样本。逆转录试剂盒 (Takara 公司, RR036A) 对 RNA 进行逆转录得到 cDNA。用实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 试剂盒 (Takara 公司, RR420) 配制 PCR 的反应体系,按试剂盒说明书设置反应程序,用罗氏 LightCycler480 荧光定量 PCR 仪检测 RNA 的表达情况。以 GAPDH 作为内参,根据 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算相对表达量。实验 qRT-PCR 所需引物序列由上海生工生物工程公司完成,见表 1。

表 1. qRT-PCR 所需的引物序列
Table 1. Primer sequence required for qRT-PCR

引物名称	5'-3'上游引物	5'-3'下游引物
lncRNA n342721	TAGACATGGAGCAGATCCCTCA	AGAACTTTGAGCTTGTGGCAGT
lncRNA n340998	CCGTCAGACCAAAGGAACCAAG	TGTTTGTCTATGCTAGTAATGTCCTG
lncRNA n335659	CTCTGTGATTCTCTGCCAGC	CAAGCCTCCTTGCTCTGTACG
lncRNA TCONS011118	GACACCCATATCCACGGACAAACC	CCCAGTGTAACCTCAGAACCGCATC
lncRNA TCONS013851	CTCCAACCACGCCACACTTC	AGGGCTGGTGAAGACATGAGAGAG
lncRNA TCONS000001	GGCTGACTCCATGTATGCTGCAG	GTTGGACTTTGATGGCTTCCTTGC
IL-6	CACTGGTCTTTTGGAGTTTGAG	GGACTTTTGTACTCATCTGCAC
TNF- α	TGGCGTGGAGCTGAGAGATAACC	CGATGCGGCTGATGCTGTGG
IL-10	GTTGTTAAAGGAGTCCTTGCTG	TTCACAGGGAAGAAATCGATGA
ABCA1	TTTTTGCTCAGATTGTCTTGCC	TGTACTGTTCTGTTGATACATCCA
ABCG1	CTCCTATGTCAGGTATGGGTTT	AAAATCCCAGTACGATGAAGT
LXR- β	GTCACAGTCACAGTCGCAGTCAC	AGCTGGACACCCTCGCCTTC
GAPDH	CAGGAGGCATTGCTGATGAT	GAAGGCTGGGGCTCATTT

1.6 细胞培养和干预

Jurkat T 细胞用含 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 的 RPMI-1640 培养基在 37 ℃、5% CO₂ 的培养箱中进行培养,隔 2 天换液。对数生长期 T 细胞用无血清培养基培养 6 ~ 8 h,按细胞密度 $1 \times 10^9/L$ 接种,再加入 1 mg/L 抗 CD3/CD28 单克隆抗体培养 24 h 活化 T 细胞。对照组均用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered solution, PBS) 干预。

1.7 病毒转染

实验用的 lncRNA n342721 过表达病毒购于上

海吉凯基因科技有限公司,实验方法按照生产商说明书进行。用完全培养基制备 $5 \times 10^7/L$ 的对数生长期细胞悬液,再根据细胞转染复数 (multiplicity of infection, MOI) (20, 30, 50, 70, 100) 及病毒滴度加入相应的病毒量,继续培养 12 h 后更换完全培养基。转染约 72 ~ 96 h 用显微镜观察转染效率,根据转染情况矫正 MOI 并选择最佳 MOI 进行后续实验。计算公式:病毒体积 = MOI \times 细胞密度 / 病毒滴度。

1.8 小干扰 RNA 转染

实验用 lncRNA n342721 小干扰 RNA (small in-

terfering RNA, siRNA) 购于广州锐博生物科技有限公司, 包括小干扰 RNA 对照 (siNC), lncRNA n342721 小干扰 1 (siRNA1, GAAATTGGCATA-CATTTTG)、小干扰 2 (siRNA2, TGTCGTAAAGTGCT-GAAGT) 和小干扰 3 (siRNA3, TGACAGAGATTTGC-TACAT)。用培养基 Opti-MEM (Gibco 公司, 31985-070) 制备 $5 \times 10^8/L$ 的对数生长期细胞悬液, Lipo2000 (Invitrogen 公司, 11668-019) 转染 siRNA 于 6 孔板, 转染终浓度为 100 nmol/L, 实验方法按照生产商说明书进行。转染 6~8 h 后更换为含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基, 继续培养 48 h, 用 qRT-PCR 检测 siRNA 沉默效果。

1.9 统计学方法

采用 SPSS 25.0 软件对数据进行统计分析, 用 GraphPad Prism 8.0 软件对数据进行绘图。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 所有数据进行正态性检验, 服从正态分布的两组数据间比较采用独立样本 *t* 检验; 不服

从正态分布的两组数据间比较采用非参数 Mann-Whitney 检验。计数资料采用 χ^2 检验。单因素或多因素采用二分类 Logistic 回归分析。所有 *P* 值采用双侧检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AMI 患者血清存在差异表达 lncRNA

对 5 例 STEMI 和 5 例 non-CHD 血清 lncRNA 采用 HTA 2.0 技术检测, 在检测的 20 474 个 lncRNA 中, 采用 limma 包筛选出 625 个差异有统计学意义的 lncRNA ($P < 0.05$)。根据倍数变化 > 1.2 或 < 0.833 , 发现与 non-CHD 相比, STEMI 患者血清差异表达 lncRNA 中有 296 个上调, 74 个下调, 结果如图 1A (分层聚类) 和图 1B (火山图) 所示。患者一般资料见表 2。

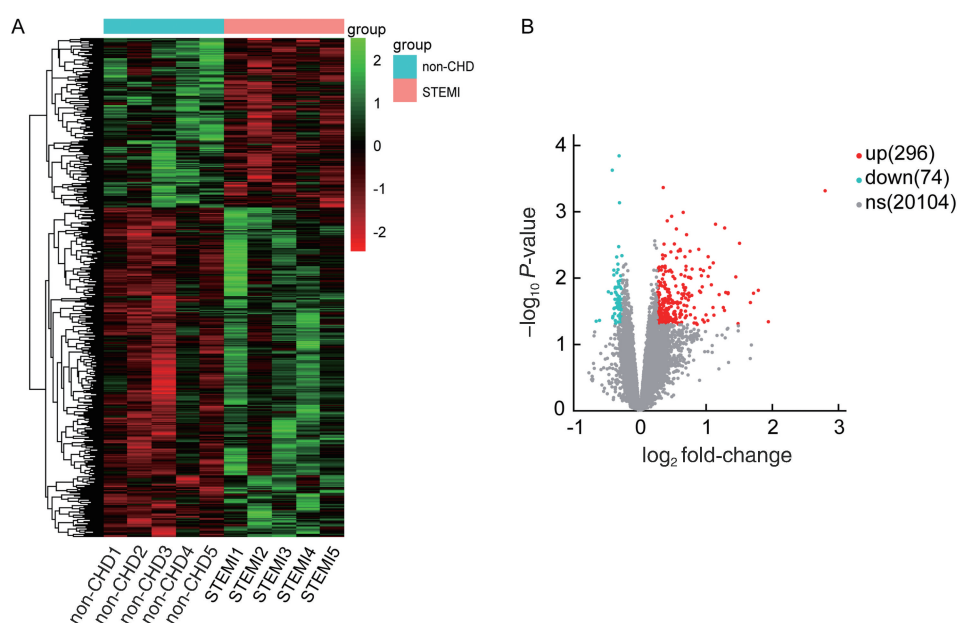


图 1. HTA 2.0 分析分层聚类图 (A) 和火山图 (B)

Figure 1. Hierarchical cluster map (A) and volcano map (B) of HTA 2.0 analysis

2.2 AMI 患者血清 lncRNA n342721 表达明显升高

在上述 AMI 患者明显上调的 lncRNA 中, 我们根据表达倍数筛选出上调明显的 6 个 lncRNA 进一步研究, 分别为 lncRNA n342721、n340998、n335659、TCONS_12_00021878-XLOC_12_011118、TCONS_00029192-XLOC_013851、TCONS_00000119-XLOC_000001 (以下依次简称为 n342721、n340998、n335659、TCONS011118、TCONS013851、TCONS000001)。我们通

过 qRT-PCR 在 20 例 non-CHD 和 20 例 AMI 患者外周血血清进一步验证了筛选的 lncRNA 表达。与 non-CHD 组相比, AMI 组除 lncRNA n335659 的表达无明显统计学差异外 ($P = 0.085$; 图 2C), 其他 5 个 lncRNA: n342721、n340998、TCONS011118、TCONS013851、TCONS000001 的表达分别增加 2.42、1.56、1.60、1.95、1.94 倍 (图 2A、B、D、E、F), 差异均有统计学意义, 且与芯片结果一致。患者一般资料如表 3 所示。

表 2. 用于 HTA 2.0 的一般临床资料
Table 2. General clinical data for HTA 2.0

项目	non-CHD 组 (n=5)	STEMI 组 (n=5)	P 值
男性/女性/例	5/0	5/0	
年龄/岁	58.80±6.83	60.80±4.49	0.599
高血压史/[例(%)]	0(0)	2(40)	0.444
糖尿病史/[例(%)]	0(0)	2(40)	0.444
吸烟史/[例(%)]	1(20)	1(20)	1.000
白细胞/(×10 ⁹ /L)	7.13±2.26	9.07±2.12	0.201
中性粒细胞/(×10 ⁹ /L)	4.68±1.99	6.91±2.28	0.138
单核细胞/(×10 ⁹ /L)	0.44±0.08	0.63±0.25	0.135
淋巴细胞/(×10 ⁹ /L)	1.88±0.45	1.42±0.32	0.098
NT-proBNP/(ng/L)	94.87±63.94	89.24±70.97	0.898
CRP/(mg/L)	2.21±1.84	3.08±0.79	0.362
cTnI/(μg/L)	0.04±0.09	47.00±6.70	<0.001
CK-MB/(μg/L)	1.30±0.77	132.06±93.81	0.014
AST/(U/L)	21.60±13.22	160.60±147.39	0.069
SCr/(μmol/L)	72.00±15.60	69.80±7.66	0.784
UA/(μmol/L)	346.20±72.10	307.20±43.58	0.331
D-二聚体/(mg/L)	0.27±0.20	0.51±0.29	0.176
LDLC/(mmol/L)	2.45±0.40	2.80±0.80	0.413
HDLc/(mmol/L)	0.94±0.14	1.16±0.52	0.408
HbA1c/%	6.12±0.72	7.00±1.07	0.165

注:表中空白表示不适用。

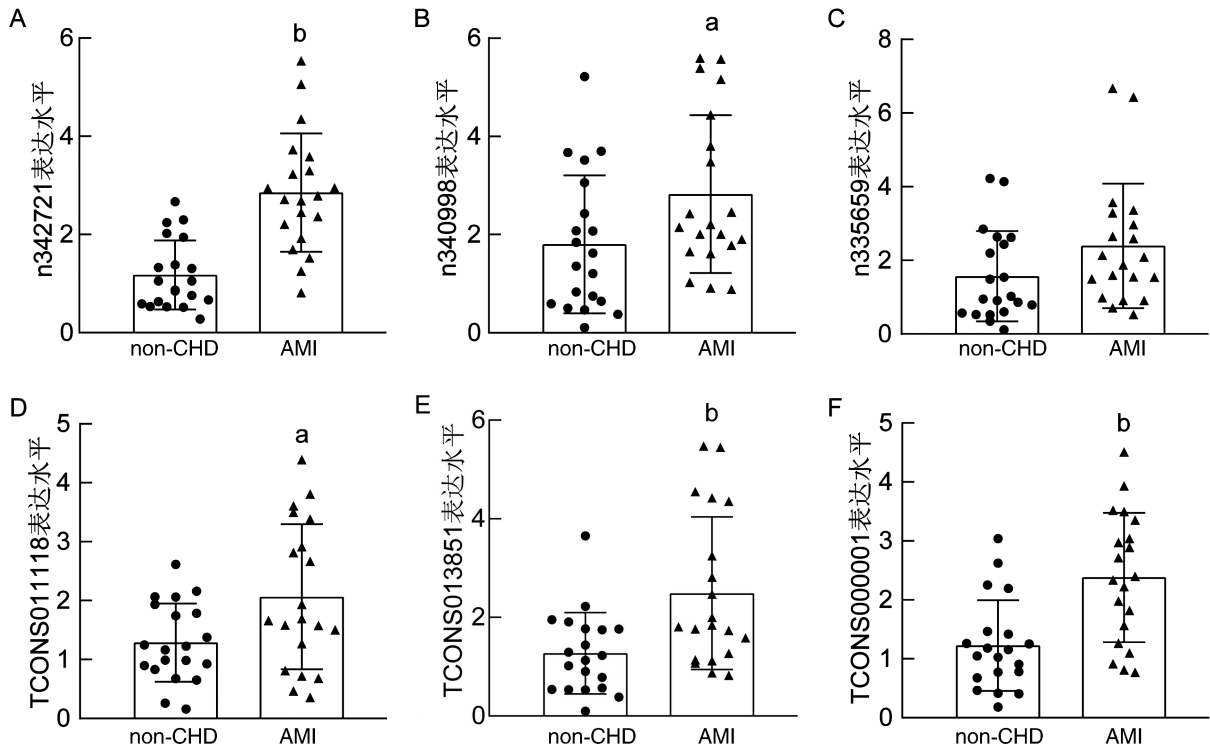


图 2. lncRNA 在 AMI 组、non-CHD 组血清中的表达 (n=20)

a 为 $P<0.05$, b 为 $P<0.01$, 与 non-CHD 组比较。

Figure 2. Expression of lncRNA in the serum of AMI group and non-CHD group (n=20)

表 3. 小样本验证的一般临床资料
Table 3. General clinical data for small sample verification

项目	non-CHD 组 (n=20)	AMI 组 (n=20)	P 值
男性/女性/例	13/7	17/3	0.144
年龄/岁	59.80±12.12	56.95±9.12	0.406
高血压史/[例(%)]	10(50)	12(60)	0.525
糖尿病史/[例(%)]	4(20)	6(30)	0.465
吸烟史/[例(%)]	4(20)	12(60)	0.010
白细胞/($\times 10^9$ /L)	7.47±2.12	10.10±2.58	0.001
中性粒细胞/($\times 10^9$ /L)	4.92±1.85	7.58±2.93	0.001
单核细胞/($\times 10^9$ /L)	0.50±0.17	0.58±0.21	0.206
淋巴细胞/($\times 10^9$ /L)	1.88±0.52	1.82±0.89	0.787
NT-proBNP/(ng/L)	124.10±259.39	649.06±653.63	0.003
CRP/(mg/L)	1.73±2.11	8.04±7.89	0.002
cTnI/(μ g/L)	0.005±0.006	16.370±16.660	<0.001
CK-MB/(μ g/L)	0.95±0.45	42.36±81.54	0.035
AST/(U/L)	20.25±10.42	52.40±31.84	<0.001
SCr/(μ mol/L)	81.40±21.22	79.75±14.71	0.777
UA/(μ mol/L)	357.70±97.86	363.30±80.19	0.872
D-二聚体/(mg/L)	0.35±0.26	0.48±0.47	0.281
LDLC/(mmol/L)	2.64±0.89	3.12±1.01	0.121
HDLc/(mmol/L)	1.03±0.19	1.20±0.36	0.079
HbA1c/%	6.25±1.28	6.36±1.03	0.757

2.3 lncRNA n342721 与 T 细胞功能密切相关

AMI 由动脉斑块破裂和缺血性损伤引起,动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是其根本原因^[3]。免疫细胞参与慢性炎症反应、异常胆固醇逆向转运(reverse cholesterol transport, RCT)进而促发形成血管壁动脉斑块是 As 发病的主要机制^[4-5]。T 细胞作为主要的免疫细胞参与 As 的形成^[6-7],与 AMI 发生发展密切相关。

我们在细胞水平活化 T 细胞后通过 qRT-PCR 检测 lncRNA 的表达。如图 3A 所示,与对照组相比,T 细胞活化后 lncRNA n342721 差异最大,趋势与血清一致。因此,我们推测血清 lncRNA n342721 可能来源于 T 细胞。

为了继续探讨 lncRNA n342721 在 T 细胞中发挥的生物学功能,我们体外构建 lncRNA n342721 过表达慢病毒和 siRNA,用 qRT-PCR 确认转染效率。当 MOI=50 时病毒转染 T 细胞效率可以达到 90% 以上(图 3B)。转染慢病毒后,过表达组(LV-OE) lncRNA n342721 的表达比空白对照组(PBS)和慢病毒空载体组(LV-NC)增加约 31 倍[(31.710±2.610)比(1.000±0.006)],(31.710±2.610)比

(1.140±0.011), $P<0.001$;图 3C]。我们用抗 CD3/CD28 单克隆抗体活化 T 淋巴细胞后通过 qRT-PCR 检测细胞炎症指标白细胞介素 6(interleukin-6, IL-6)、IL-10、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)和 RCT 指标肝 X 受体 β (liver X receptor β , LXR- β)、ATP 结合盒转运体 A1(ATP binding cassette transporter A1, ABCA1)、ABCG1 的 mRNA 水平变化(图 3D),与对照组(PBS 和 LV-NC)相比, LV-OE 组促炎因子 TNF- α 、IL-6 mRNA 水平明显升高(分别对应图 3E、F),抑炎因子 IL-10(图 3G)和 RCT 指标 LXR- β 、ABCA1、ABCG1 mRNA 明显降低(分别对应图 3H、I、J)。

转染 siRNA 沉默 lncRNA n342721 后发现,与 siNC 相比, siRNA1、siRNA2、siRNA3 均可抑制 lncRNA n342721 的表达,其中 siRNA2 抑制效果最好(图 4A),我们选择 siRNA2 进行后续研究。与对照组(PBS 和 siNC)相比, siRNA2 组促炎因子 TNF- α 、IL-6 mRNA 水平明显降低(分别对应图 4B、C),抑炎因子 IL-10(图 4D)和 RCT 指标 LXR- β 、ABCA1、ABCG1 mRNA 明显升高(分别对应图 4E、F、G)。

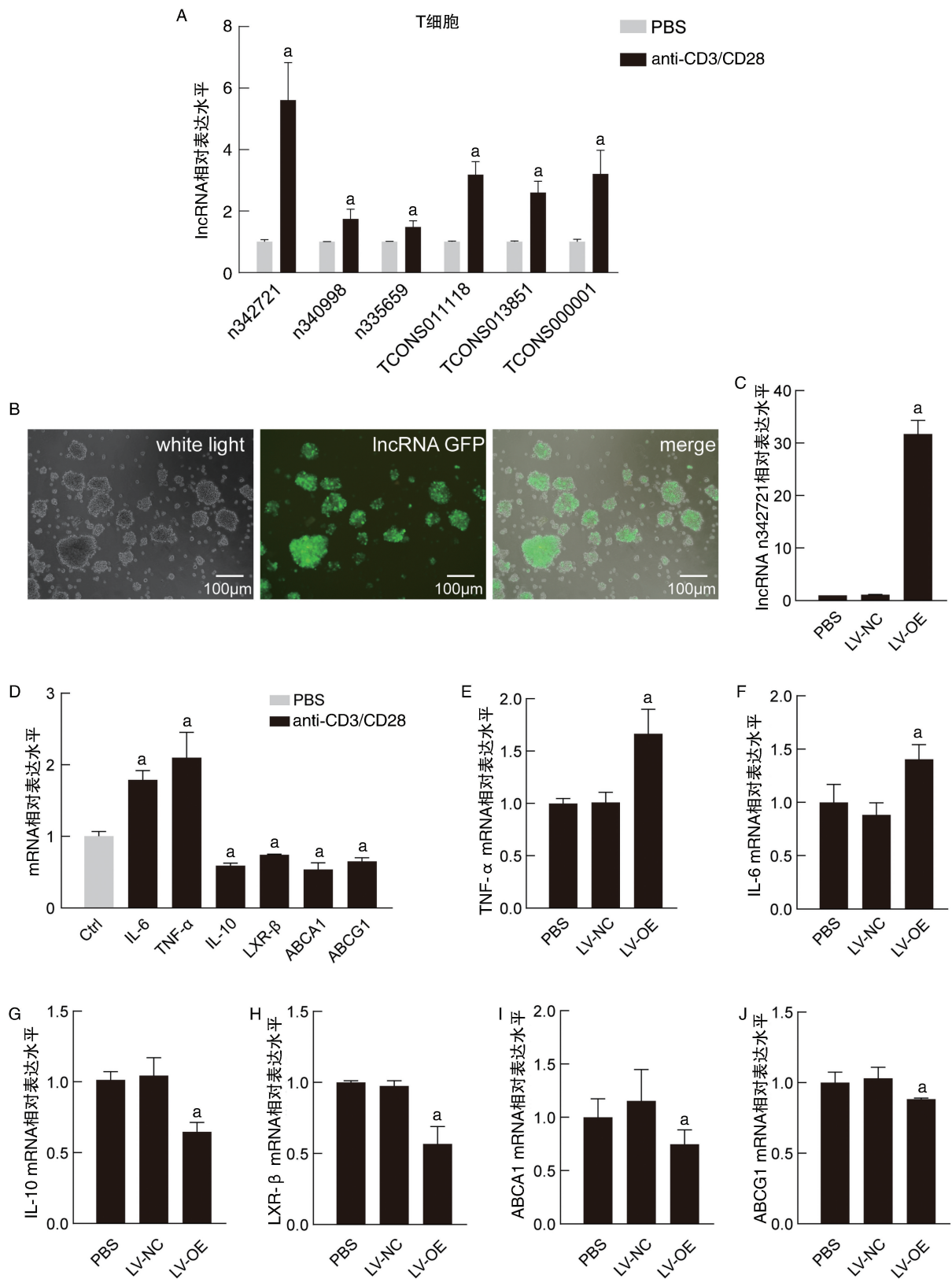


图 3. 过表达 lncRNA n342721 后炎症因子和胆固醇转运因子表达

图 A: a 为 $P < 0.05$, 与 PBS 组比较; 图 C: a 为 $P < 0.001$, 与 PBS 组、LV-NC 组比较; 图 D: a 为 $P < 0.05$, 与 Ctrl 组比较; 图 E、F、G、H、I、J: a 为 $P < 0.05$, 与 LV-NC 组比较。

Figure 3. Expression of inflammatory factors and cholesterol transport factors after overexpression of lncRNA n342721

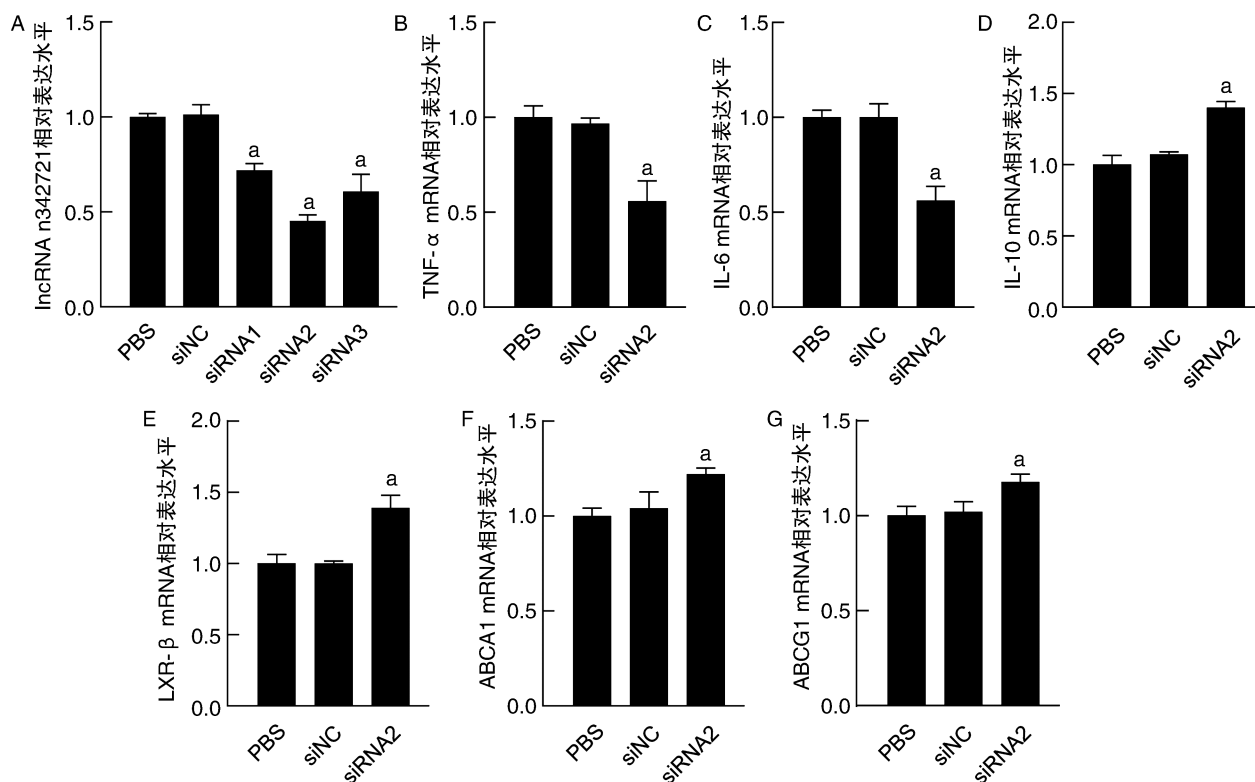


图 4. 沉默 lncRNA n342721 后炎症因子和胆固醇转运因子表达

a 为 $P < 0.05$, 与 PBS 组、siNC 组比较。

Figure 4. Expression of inflammatory factors and cholesterol transport factors after silence of lncRNA n342721

2.4 lncRNA n342721 作为生物标志物的临床潜能

为了进一步探讨 lncRNA n342721 在 AMI 患者中作为生物标志物的临床潜能,我们对收集的 60 例 non-CHD 和 60 例 AMI 患者血清通过 qRT-PCR 检测 lncRNA n342721 的表达(两组一般资料见表 4)。如图 5 所示,AMI 患者血清 lncRNA n342721 水平明显高于 non-CHD 组[(2.37 ± 1.97)比(1.56 ± 1.58)], $P = 0.014$]。我们随后对临床指标及 lncRNA n342721 进行单因素和多因素 Logistic 回归分析以探讨其临床价值,结果表明循环 lncRNA n342721 与 AMI 的发生密切相关(表 5)。

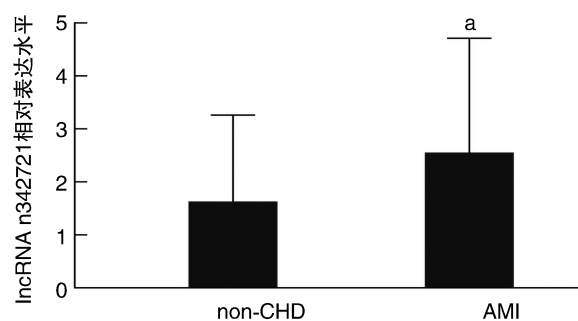
图 5. lncRNA n342721 在 AMI 组、non-CHD 组血清中的表达($n=60$)a 为 $P < 0.05$, 与 non-CHD 组比较。Figure 5. Expression of lncRNA n342721 in the serum of AMI group and non-CHD group ($n=60$)

表 4. 两组一般资料比较

Table 4. Comparison of general data between two groups

项目	non-CHD 组($n=60$)	AMI 组($n=60$)	P 值
男性/女性/例	30/30	49/11	<0.001
年龄/岁	60.05 ± 9.86	59.75 ± 11.11	0.876
高血压史/[例(%)]	34(56.6)	36(60.0)	0.711
糖尿病史/[例(%)]	12(20.0)	22(36.6)	0.043
吸烟史/[例(%)]	11(18.3)	31(51.6)	<0.001

续表

项目	non-CHD 组 ($n=60$)	AMI 组 ($n=60$)	P 值
白细胞/ $(\times 10^9/L)$	6.99 \pm 2.00	9.26 \pm 2.95	<0.001
中性粒细胞/ $(\times 10^9/L)$	4.50 \pm 1.70	6.61 \pm 3.00	<0.001
单核细胞/ $(\times 10^9/L)$	0.45 \pm 0.16	0.60 \pm 0.23	<0.001
淋巴细胞/ $(\times 10^9/L)$	1.86 \pm 0.63	1.82 \pm 0.82	0.786
NT-proBNP/ (ng/L)	234.97 \pm 506.33	832.00 \pm 1 483.26	<0.001
CRP/ (mg/L)	3.35 \pm 6.59	7.13 \pm 7.65	<0.001
cTnI/ $(\mu g/L)$	0.03 \pm 0.15	14.88 \pm 18.17	<0.001
CK-MB/ $(\mu g/L)$	1.16 \pm 0.71	35.09 \pm 76.40	<0.001
AST/ (U/L)	20.36 \pm 7.30	44.48 \pm 34.79	<0.001
SCr/ $(\mu mol/L)$	78.45 \pm 20.32	84.13 \pm 16.50	0.095
UA/ $(\mu mol/L)$	355.98 \pm 88.91	393.58 \pm 97.85	0.030
D-二聚体/ (mg/L)	0.39 \pm 0.40	0.53 \pm 0.45	0.015
LDLC/ $(mmol/L)$	2.72 \pm 0.81	2.90 \pm 0.94	0.282
HDLc/ $(mmol/L)$	1.12 \pm 0.27	1.03 \pm 0.30	0.085
HbA1c/%	6.19 \pm 0.94	6.59 \pm 1.25	0.056

表 5. 二分类 Logistic 回归分析

Table 5. Binary Logistic regression analysis

风险因素	单因素分析			多因素分析		
	OR	95% CI	P 值	OR	95% CI	P 值
lncRNA n342721	1.30	1.05 ~ 1.62	0.018	2.21	1.10 ~ 4.42	0.025
性别	4.45	1.95 ~ 10.18	<0.001	0.63	0.08 ~ 5.01	0.663
年龄	1.00	0.96 ~ 1.03	0.875	1.01	0.89 ~ 1.14	0.921
高血压史	0.87	0.42 ~ 1.80	0.711	2.48	0.23 ~ 26.35	0.453
糖尿病史	0.43	0.19 ~ 0.98	0.045	14.30	1.29 ~ 158.07	0.030
吸烟史	0.21	0.09 ~ 0.48	<0.001	13.00	1.18 ~ 142.70	0.036
白细胞	1.48	1.23 ~ 1.79	<0.001	2.10	0.00 ~ 12 724.16	0.868
中性粒细胞	1.49	1.22 ~ 1.83	<0.001	0.45	0.00 ~ 2 768.87	0.859
单核细胞	57.14	6.50 ~ 502.68	<0.001	2 855.14	0.00 ~ 7 322 261	0.291
淋巴细胞	0.93	0.57 ~ 1.52	0.784	0.13	0.00 ~ 751.53	0.648
NT-proBNP	1.002	1.001 ~ 1.003	0.001	1.00	1.00 ~ 1.00	0.081
CRP	1.11	1.02 ~ 1.19	0.010	0.99	0.88 ~ 1.11	0.857
cTnI	58.79	2.65 ~ 1 305.48	0.010	819.36	1.83 ~ 365 984.82	0.031
CK-MB	2.76	1.60 ~ 4.73	<0.001	5.68	1.26 ~ 25.57	0.024
AST	1.09	1.04 ~ 1.13	<0.001	1.04	0.97 ~ 1.11	0.326
CR	1.02	0.99 ~ 1.04	0.098			
UA	1.004	1.000 ~ 1.008	0.033			
D-二聚体	2.15	0.87 ~ 5.26	0.095			
LDLC	1.25	0.83 ~ 1.89	0.280	1.34	0.35 ~ 5.16	0.669
HDLc	0.32	0.08 ~ 1.19	0.090	0.01	0.00 ~ 0.64	0.030
HbA1c	1.42	0.98 ~ 2.05	0.062			

注:表中空白表示不适用。

3 讨 论

尽管在过去的 30 年人类死亡率呈下降趋势,AMI 仍然是最严重的心脏事件,目前的治疗策略包括冠状动脉血管再通、抗血小板、抗凝、降低 LDLC 水平,但 AMI 发病率和死亡率依旧居高不下。人类基因组研究发现超过 95% 的基因缺乏编码蛋白质的潜力^[8],lncRNA 为其中一类,同样缺乏编码潜力。然而,最近越来越多的证据表明 lncRNA 可通过表观遗传学、转录前或转录后调控机制参与疾病发生过程,甚至一些 lncRNA 已被用作生物标志物,如前列腺癌患者尿液中 lncRNA PCA3^[9]和血浆中 MALAT-1^[10],大肠癌患者组织中 lncRNA HOTAIR^[11]。不仅如此,lncRNA 也参与心血管疾病的病理生理改变,在心肌病或心力衰竭患者的心脏或血液循环中 lncRNA 表达也会发生变化,甚至可以预测患者预后^[12-13]。综上,lncRNA 有可能作为诊疗 AMI 的分子靶点,为临床工作提供新思路。

我们采用 HTA 2.0 分析 AMI 和 non-CHD 两组循环 lncRNA 的表达,发现存在 lncRNA 差异表达谱。与 non-CHD 相比,AMI 患者血清中差异表达的 lncRNA 有 296 个上调,74 个下调。寻找差异表达 lncRNA 来源,探索可能的分子机制,有望为 AMI 诊疗提供新的有效方法。

为了探索 lncRNA n342721 的临床价值,我们检测血清 lncRNA n342721 的表达,发现在 AMI 和 non-CHD 中存在差异,通过单因素和多因素 Logistic 回归分析发现血清 lncRNA n342721 与 AMI 的发生密切相关。

动脉粥样硬化是 AMI 发病的根本原因,免疫细胞始终伴随和参与 As 的发生发展。免疫细胞炎症反应、异常脂质代谢和胆固醇沉积与血管壁斑块形成密切相关,在 As 的发病机制中起重要作用^[5,14-15]。此外,研究表明免疫细胞可直接影响 AMI 梗死面积大小和心室重塑^[16]。Fernandez 等^[17]对 46 例 As 患者进行单细胞测序,发现血液及斑块中 T 细胞是启动免疫反应的主要细胞群,表明 T 细胞与 AMI 发生密切相关。

我们在细胞水平活化 T 细胞后检测细胞 lncRNA 的表达,发现筛选的 6 个上调 lncRNA 在血清的水平与在 T 细胞中的表达水平呈正相关。我们筛选差异最大的 lncRNA n342721 作为主要研究对象,结合上述研究我们推测 AMI 患者血清 lncRNA 可能来源 T 细胞。

T 细胞通过不断产生 TNF- α 、IL-6 等炎症因子

放大炎症反应,此外 T 细胞不仅是启动免疫炎症反应的主要细胞群,而且与脂质代谢密切相关^[18]。我们团队之前研究证实,T 细胞的炎症反应伴随着胆固醇积累,活化的 T 细胞会促进炎症因子的表达、降低胆固醇外排能力和增加细胞内胆固醇含量^[19-20]。因此,靶向涉及细胞内炎症和脂质代谢作用的干预将可能为 AMI 提供新的治疗方法。

在本次研究中,我们发现转染 lncRNA n342721 过表达慢病毒后可以明显促进 T 细胞炎症因子 TNF- α 和 IL-6 表达,减少抑炎因子 IL-10 和 RCT 指标 ABCA1、ABCG1、LXR- β 表达,当抑制 T 细胞内 lncRNA n342721 表达后,上述炎症因子表达降低,抑炎因子和 RCT 指标增加。研究证实炎症和胆固醇代谢可以双向调节,RCT 可以通过影响细胞内胆固醇水平干扰脂筏流动进而抑制炎症反应,LXR 可调控胆固醇代谢基因 ABCA1、ABCG1 的表达,在维持胆固醇稳态中发挥重要作用,同时 LXR 是连接炎症与胆固醇代谢之间的重要桥梁^[21]。在本研究中 lncRNA n342721 过表达后可以抑制 LXR- β 的表达,进而抑制 ABCA1、ABCG1 水平及促进炎症因子 TNF- α 和 IL-6 表达,二者共同促进 As 发生,提示沉默 lncRNA n342721 对减轻炎症反应和促进 RCT 具有潜在的临床益处。但是 lncRNA n342721 在炎症与胆固醇双向调节的具体机制如何,在原代初始 T 细胞水平是否具有影响 T 细胞向不同表型分化的作用,以及在动物水平的进一步验证还有待深入研究。

综上所述,本研究有如下发现:(1)AMI 患者血清中 lncRNA n342721 的表达明显升高;(2)体外活化 T 细胞可促进 lncRNA n342721 表达;(3)lncRNA n342721 过表达后可促进炎症因子和抑制 RCT 指标表达,沉默后可抑制炎症因子和促进 RCT 指标表达;(4)循环 lncRNA n342721 与 AMI 的发生密切相关,可作为新的生物标志物。

本研究发现在 AMI 患者血清中 lncRNA n342721 表达水平显著升高,与活化的 T 细胞表达呈正相关,推测 T 细胞可能是 AMI 患者血清 lncRNA n342721 的主要来源。我们验证了 lncRNA n342721 在 T 细胞中的功能,过表达 lncRNA n342721 明显促进炎症因子和抑制胆固醇转运因子的表达,沉默后可抑制炎症因子和促进 RCT 因子表达。我们得出结论:lncRNA n342721 可能来自血液中 T 细胞,可通过促进炎症反应、抑制胆固醇转运参与 AMI 发生发展;同时循环 lncRNA n342721 与 AMI 的发生密切相关,有望成为 AMI 治疗的潜在新

靶点。

[参考文献]

- [1] Sacks NC, Ash AS, Ghosh K, et al. Trends in acute myocardial infarction hospitalizations: are we seeing the whole picture? [J]. *Am Heart J*, 2015, 170(6): 1211-1219.
- [2] Ponting CP, Oliver PL, Reik W. Evolution and functions of long noncoding RNAs[J]. *Cell*, 2009, 136(4): 629-641.
- [3] Williams JW, Zaitsev K, Kim KW, et al. Limited proliferation capacity of aortic intima resident macrophages requires monocyte recruitment for atherosclerotic plaque progression [J]. *Nat Immunol*, 2020, 21(10): 1194-1204.
- [4] 尹凯, 唐朝克. 炎症调控胆固醇逆向转运的机制研究[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2018, 26(7): 655-657.
- [5] Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis [J]. *Nature*, 2011, 473(7347): 317-325.
- [6] Grivel JC, Ivanova O, Pinegina N, et al. Activation of T lymphocytes in atherosclerotic plaques [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011, 31(12): 2929.
- [7] 冯娟, 吕思霖, 王宪. T淋巴细胞代谢重塑与动脉粥样硬化发病[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2019, 27(1): 1-8.
- [8] Cech TR, Steitz JA. The noncoding RNA revolution-trashing old rules to forge new ones [J]. *Cell*, 2014, 157(1): 77-94.
- [9] Kok JBd, Verhaegh GW, Roelofs RW, et al. DD3(PCA3), a very sensitive and specific marker to detect prostate tumors [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(9): 2695.
- [10] Ren S, Wang F, Shen J, et al. Long non-coding RNA metastasis associated in lung adenocarcinoma transcript 1 derived miniRNA as a novel plasma-based biomarker for diagnosing prostate cancer[J]. *Eur J Cancer*, 2013, 49(13): 2949-2959.
- [11] Kogo R, Shimamura T, Mimori K, et al. Long noncoding RNA HOTAIR regulates polycomb-dependent chromatin modification and is associated with poor prognosis in colorectal cancers[J]. *Cancer Res*, 2011, 71(20): 6320-6326.
- [12] Kumarswamy R, Bauters C, Volkman I, et al. Circulating long noncoding RNA, LIPCAR, predicts survival in patients with heart failure[J]. *Circ Res*, 2014, 114(10): 1569-1575.
- [13] Xuan L, Sun L, Zhang Y, et al. Circulating long noncoding RNAs NRON and MHRT as novel predictive biomarkers of heart failure[J]. *J Cell Mol Med*, 2017, 21(9): 1803-1814.
- [14] Libby P. Inflammation in atherosclerosis[J]. *Nature*, 2002, 420(6917): 868.
- [15] Williams JW, Huang LH, Randolph GJ. Cytokine circuits in cardiovascular disease[J]. *Immunity*, 2019, 50(4): 941-954.
- [16] Andreadou I, Cabrera-Fuentes HA, Devaux Y, et al. Immune cells as targets for cardioprotection: new players and novel therapeutic opportunities [J]. *Cardiovasc Res*, 2019, 115(7): 1117-1130.
- [17] Fernandez DM, Rahman AH, Fernandez NF, et al. Single-cell immune landscape of human atherosclerotic plaques [J]. *Nat Med*, 2019, 25(10): 1576-1588.
- [18] Sun L, Zhang W, Zhao Y, et al. Dendritic cells and T cells, partners in atherogenesis and the translating road ahead[J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1456.
- [19] Luo T, Hu J, Xi D, et al. Lck inhibits heat shock protein 65-mediated reverse cholesterol transport in T cells[J]. *J Immunol*, 2016, 197(10): 3861-3870.
- [20] Zhang Y, Guo Z, Wu T, et al. SULT2B1b inhibits reverse cholesterol transport and promotes cholesterol accumulation and inflammation in lymphocytes from AMI patients with low LDL-C levels [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2020, 134(2): 273-287.
- [21] Bensinger SJ, Bradley MN, Joseph SB, et al. LXR signaling couples sterol metabolism to proliferation in the acquired immune response [J]. *Cell*, 2008, 134(1): 97-111.

(此文编辑 曾学清)