

本文引用: 高洁, 张莹, 官宝怡, 等. 基于 microRNA 的冠心病氯吡格雷低反应生物标志物研究[J]. 中国动脉硬化杂志, 2022, 30(2): 135-140.

[文章编号] 1007-3949(2022)30-02-0135-06

· 临床研究 ·

基于 microRNA 的冠心病氯吡格雷低反应生物标志物研究

高洁, 张莹, 官宝怡, 史大卓, 马晓娟

(中国中医科学院西苑医院心血管病中心, 北京市 100091)

[关键词] 冠心病; 氯吡格雷低反应; 生物标志物; miR-34a-5p; miR-495-3p

[摘要] 目的 探讨相关 microRNA(miRNA)与冠心病氯吡格雷低反应的相关性及其作为生物标志物的诊断价值。方法 筛选 158 例稳定型冠心病患者作为研究对象,采用光比浊法检测二磷酸腺苷(ADP)诱导的最大血小板聚集率(MPAR),将其中 MPAR \geq 65% 的 35 例患者纳入氯吡格雷低反应组(低反应组),并按年龄、性别配对将 35 例 MPAR $<$ 65% 的患者纳入氯吡格雷正常反应组(正常反应组)。采集患者外周血单核细胞并提取总 RNA,利用实时荧光定量 PCR 技术检测 miR-34a-5p、miR-370-3p、miR-432-5p 和 miR-495-3p 在两组患者中的表达差异,并通过相关性分析和受试者工作特征(ROC)曲线分析评估差异 miRNA 对氯吡格雷低反应的诊断价值。结果 与正常反应组相比,低反应组患者的 miR-34a-5p 和 miR-495-3p 表达显著升高,且差异倍数大于 2($P<0.05$);而 miR-370-3p 和 miR-432-5p 的表达差异不显著($P>0.05$)。miR-34a-5p 和 miR-495-3p 的表达与冠心病患者 MPAR 均呈显著正相关($r=0.709, P<0.01$; $r=0.597, P<0.01$)。ROC 曲线分析显示,miR-34a-5p 诊断冠心病氯吡格雷低反应性的 ROC 曲线下面积为 0.789,miR-495-3p 的 ROC 曲线下面积为 0.787,miR-34a-5p 与 miR-495-3p 联合诊断的 ROC 曲线下面积为 0.873,显著高于 miR-34a-5p 及 miR-495-3p 单一诊断($P<0.05$)。结论 miR-34a-5p 和 miR-495-3p 的高表达均与冠心病氯吡格雷低反应性相关,有望成为诊断冠心病氯吡格雷低反应性的新型生物标志物。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Role of microRNA as the biomarkers of low-response to clopidogrel in patients with coronary heart disease

GAO Jie, ZHANG Ying, GUAN Baoyi, SHI Dazhuo, MA Xiaojuan

(Cardiovascular Disease Center, Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China)

[KEY WORDS] coronary heart disease; low-response to clopidogrel; biomarkers; miR-34a-5p; miR-495-3p

[ABSTRACT] **Aim** To identify the correlation between microRNA (miRNA) and low-response to clopidogrel in patients with coronary heart disease (CHD), and explore their diagnostic value as biomarkers of low-response to clopidogrel. **Methods** 158 patients with stable CHD were recruited as the research population. The maximum platelet aggregation rate (MPAR) induced by adenosine diphosphate (ADP) was measured using light transmission aggregometry for all these patients. Eventually, 35 patients of them whose MPAR \geq 65% were allocated to low-response group. For comparison, 35 age-and gender-matched patients with MPAR $<$ 65% were allocated to normal-response group. The peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from the blood samples of each patient to extract total RNA. The expression differences of miR-34a-5p, miR-370-3p, miR-432-5p and miR-495-3p in the two groups were detected by real-time quantitative PCR. The diagnostic value of differently expressed miRNA for low-response to clopidogrel were evaluated by correlation analysis and receiver-operating characteristic (ROC) curve analysis. **Results** Compared with normal-response group, the expressions of miR-34a-5p and miR-495-3p were significantly elevated in low-response group, and their fold changes were greater than 2 ($P<0.05$). There was no significant difference in miR-370-3p and miR-432-5p expressions between two groups ($P>0.05$). The expressions of miR-34a-5p and miR-495-3p were positively correlated with MPAR in

[收稿日期] 2021-06-24

[修回日期] 2021-08-10

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81774141, 81904046, 82074418)

[作者简介] 高洁, 博士, 主治医师, 研究方向为中西医结合防治心血管病, E-mail 为 gaojie_enjoylife@163.com。通信作者马晓娟, 博士, 副主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向为中西医结合防治心血管病, E-mail 为 abc_mxj@aliyun.com。通信作者史大卓, 博士, 主任医师, 博士研究生导师, 研究方向为中西医结合防治心血管病, E-mail 为 shidztc@163.com。

CHD patients ($r=0.709, P<0.01; r=0.597, P<0.01$). ROC curve analysis showed that the area under the curve (AUC) of miR-34a-5p was 0.789, and the AUC of miR-495-3p was 0.787; while the AUC of miR-34a-5p+miR-495-3p was 0.873, which was significantly higher than that of miR-34a-5p ($P<0.05$) or miR-495-3p ($P<0.05$).

Conclusion Both the high expression of miR-34a-5p and miR-495-3p were associated with low-response to clopidogrel in CHD patients, and may serve as novel biomarkers for low-response to clopidogrel in CHD.

血小板在受损血管内膜和破溃斑块表面的黏附和聚集,是冠状动脉粥样硬化易损斑块破裂和急性血栓形成的一个关键环节^[1]。研究证实,血小板的活化程度与冠心病患者的远期预后及血栓发生率明显相关^[2]。因此,抗血小板治疗不仅是治疗心血管疾病的基础,更是预防冠心病血栓事件发生的有效防御手段。氯吡格雷联合阿司匹林即双联抗血小板是冠心病患者特别是支架术后患者的首选治疗方案。然而,尽管接受规范的双联抗血小板治疗,部分患者仍会出现反复的缺血事件,抗血小板药物低反应导致的治疗后血小板高反应性是其中的一个重要原因。CREST 研究指出氯吡格雷低反应发生率高达 41%,阿司匹林低反应发生率仅为 3%^[3]。研究表明,氯吡格雷低反应导致的治疗后血小板高反应性是介入术后患者支架内早期血栓形成的独立预测因子^[4]。长期以来血小板反应性的检测是临床的难点,其方法多种多样,标准各不相同,采用不同实验方法各有利弊,且尚缺乏公认的氯吡格雷低反应的诊断标准。已有研究证实,miRNA(miRNA)的表达差异与血小板活性密切相关,因此可以作为血小板活化甚至心血管事件的预测因子^[5-6]。那么 miRNA 是否与冠心病患者氯吡格雷低反应性有关,其是否可作为冠心病氯吡格雷低反应性的生物标志物,目前尚无相关的明确研究。课题组前期研究发现外周血单核细胞源性的 miR-34a-5p、miR-370-3p、miR-432-5p 和 miR-495-3p 与冠心病患者的血小板高反应性和血栓形成密切相关^[7],因此本研究通过临床筛查探讨这 4 个 miRNA 与冠心病患者氯吡格雷低反应性的相关性,并进一步评价其诊断价值。

1 资料和方法

1.1 研究对象和分组

参照 2013 年欧洲心脏病学会(European society of cardiology, ESC)发布的《稳定性冠状动脉粥样硬化性心脏病指南》^[8],选取 2016 年 10 月—2019 年 5 月中国中医科学院西苑医院心血管科收治的稳定型冠心病患者 158 例作为研究对象,其中男性 122

例,女性 36 例;平均年龄为(58.03±8.49)岁。纳入标准:①年龄 18~70 岁;②近 7 天内规律服用氯吡格雷(75 mg/d);③知情同意,自愿签署知情同意书。排除标准:①近 1 个月内参加过其他临床试验、有感染、发热、创伤、烧伤、手术史者;②近 6 个月内合并急性期脑卒中者;③合并有精神、免疫、肝肾、造血系统功能异常或恶性肿瘤者;④处于妊娠、哺乳期及月经期的妇女。入组后应用光比浊法检测二磷酸腺苷(adenosine diphosphate, ADP)诱导的血小板聚集率,参照权威文献^[9],ADP 诱导的最大血小板聚集率(maximum platelet aggregation rate, MPAR)≥65%的患者进入氯吡格雷低反应组(低反应组),MPAR<65%的患者进入氯吡格雷正常反应组(正常反应组)。本研究获得中国中医科学院西苑医院伦理委员会审批(2016XLA129-2)。

1.2 临床资料采集

研究人员采集受试者的一般临床资料,包括年龄、性别、身高、体质量、心血管危险因素(包括吸烟史、饮酒史、相关慢性病史)、心肌梗死病史、血运重建病史、心绞痛 CCS 分级和近期用药情况。

1.3 血小板聚集率检测

采用光比浊法检测 ADP 诱导的血小板聚集率:使用含 3.8% 柠檬酸钠的真空采血管采集受试者静脉血 2 mL,室温下将抗凝血样以 40 g/min 离心 10 min,吸取 300 μL 上清即富血小板血浆(platelet-rich plasma, PRP)装入有金属转子的比色杯;剩余血样以 120 g/min 继续离心 10 min,吸取 300 μL 上清即贫血小板血浆(platelet-poor plasma, PPP)放入另一只空比色杯中;根据血小板聚集仪(北京普利生公司,型号 LBY-NJ4)说明书操作,以贫血小板血浆作为对照,在富血小板血浆中加入 3 μL ADP(终浓度为 20 μmol/L)后 300 s 内读取 MPAR。

1.4 外周血单核细胞 RNA 提取

使用 EDTA 抗凝管采集受试者静脉血 2 mL,利用密度梯度离心法分离外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC)。血液按 1:1 比例加入磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)稀释后,加至 3 mL 淋巴细胞分离液的上层,避免混合,20 °C、400 g 离心 20 min,吸取单核细胞层后与 PBS

按 1 : 3 体积混合,再以 20 °C、500 g 离心 10 min,得到 PBMC 沉淀,加入 1 mL Trizol 试剂混匀,-80 °C 冰箱保存。选用 mirVana 试剂盒(美国 Ambion 公司)提取 PBMC 中的总 RNA,依据试剂盒说明书进行操作。

1.5 实时荧光定量 PCR 检测

应用实时荧光定量 PCR (real-time quantitative polymerase chain reaction, qRT-PCR) 技术检测 4 个 miRNA (miR-34a-5p、miR-370-3p、miR-432-5p、miR-495-3p) 在两组患者 PBMC 中的表达差异。选择 U6 作为内参,合成 miRNA 引物,引物序列为:miR-34a-5p 正向 5'-ATGGTTCGTGCGTGCCAGTGTCTTAGCTGG-3',反向 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACACAACCAG-3'; miR-370-3p 正向 5'-ATGGTTCGTGCGGCCTGCTGGGGTGGAAAC-3',反向 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACACCAGGTT-3'; miR-432-5p 正向 5'-ATGGTTCGTGCGTCTTGGAGTAGGTCAT-TGG-3',反向 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACCCACCCAA-3'; miR-495-3p 正向 5'-ATGGTTCGTGCGAAACAAACATGGTGCACCT-3',反向 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAAGAAGTG-3'; 内参 U6 正向 5'-GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT-3',反向 5'-CGCTTCACGAATTTGCGTGTCTAT-3'。应用 miRNA 反转录试剂盒(美国 ABI 公司)制备 cDNA。依据 qRT-PCR 试剂盒(美国 ABI 公司)说明书制备 qRT-PCR 反应体系并放入 PCR 仪(美国 ABI 公司,型号 7500)进行扩增,将反应条件依次设定为:94 °C 预变性 10 min;94 °C 15 s、60 °C 60 s、72 °C 10 min 进行 45 个循环。miRNA 的表达定量以 Ct 值表示,确保将 3 次重复检测的 Ct 值误差控制在 ± 0.2 以内。利用 DataAssist 软件,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 miRNA 在氯吡格雷低反应患者中的相对表达量,相对表达量 ≥ 2 的 miRNA 为差异 miRNA。

1.6 统计学处理

使用 SPSS 20.0 软件统计数据,GraphPad Prism 6 软件作图。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,正态分布数据采用独立样本 *t* 检验,非正态分布数据采用 Kruskal-Wallis 秩和检验。计数资料以百分比 (%) 表示,组间比较采用 χ^2 检验,等级资料采用 Kruskal-Wallis 秩和检验。相关性分析采用 Pearson 相关性检验。所有假设检验均为双侧检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。应用 MedCalc 15.2.2 软件进行受试者工作特征(receiver-operating characteristic, ROC) 曲线分析,分析差异 miRNA 的 ROC 曲线下面积(area

under the curve, AUC)、特异度、灵敏度和最大约登指数,依据约登指数计算最佳截断值。

2 结果

2.1 临床基线资料比较

研究筛选 158 例稳定型冠心病患者,最终入组 35 例氯吡格雷低反应患者,按年龄、性别配对入组氯吡格雷正常反应患者 35 例。两组患者在体质指数(body mass index, BMI) 水平、吸烟饮酒习惯、相关病史、相关药物服用情况和心绞痛轻重程度等方面的资料均无统计学差异($P > 0.05$),组间可比性较好(表 1)。低反应组患者的 MPAR 显著高于正常反应组患者($P < 0.01$)。

表 1. 受试者基线资料

Table 1. Clinical characteristics of study populations

项目	正常反应组 (<i>n</i> = 35)	低反应组 (<i>n</i> = 35)	<i>P</i> 值
年龄/岁	58.34 ± 5.64	59.31 ± 6.11	0.492
男性/%	27(77.1)	28(80.0)	0.771
BMI/(kg/m ²)	25.90 ± 3.04	26.57 ± 2.58	0.324
吸烟/[例(%)]	13(37.1)	10(28.6)	0.445
饮酒/[例(%)]	5(14.3)	6(17.1)	0.743
心肌梗死病史/[例(%)]	9(25.7)	15(42.9)	0.131
脑卒中病史/[例(%)]	5(14.3)	6(17.1)	0.743
血运重建史/[例(%)]			
PCI	24(68.6)	26(74.3)	0.597
CABG	3(8.6)	5(14.3)	0.452
高血压/[例(%)]	19(54.3)	19(54.3)	1.000
糖尿病/[例(%)]	10(28.6)	8(22.9)	0.584
高脂血症/[例(%)]	21(60.0)	21(60.0)	1.000
服用药物/[例(%)]			
ACEI 或 ARB 类药物	12(34.3)	14(40.0)	0.621
钙离子拮抗剂	9(25.7)	12(34.3)	0.434
β 受体阻滞剂	18(51.4)	19(54.3)	0.811
他汀类药物	30(85.7)	28(80.0)	0.526
阿司匹林	30(85.7)	30(85.7)	1.000
CCS 分级/[例(%)]			0.420
I 级	27(77.1)	24(68.6)	
II 级	8(22.9)	11(31.4)	
MPAR/%	39.16 ± 14.99	79.69 ± 11.02	<0.01

注:PCI:经皮冠状动脉介入治疗(percutaneous coronary intervention);CABG:冠状动脉旁路移植术(coronary artery bypass grafting);ACEI:血管紧张素转换酶抑制剂(angiotensin converting enzyme inhibitor);ARB:血管紧张素受体拮抗剂(angiotensin receptor inhibitor)。

2.2 冠心病氯吡格雷低反应相关的差异 miRNA

miR-34a-5p、miR-370-3p、miR-432-5p 和 miR-495-3p 在两组患者 PBMC 中的表达水平见图 1。与正常反应组相比,miR-34a-5p 和 miR-495-3p 在低反应组患者中的相对表达量显著升高,且差异倍数大于 2 ($P < 0.05$),而 miR-370-3p 和 miR-432-5p 在低反应组患者中的表达差异不显著 ($P > 0.05$; 图 1)。

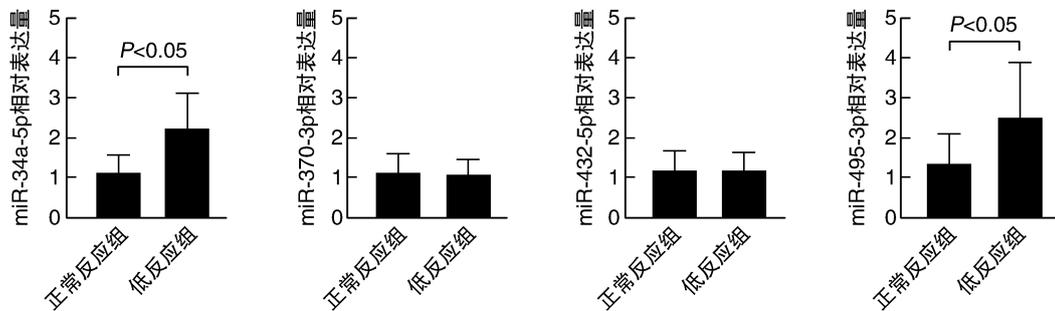


图 1. qRT-PCR 检测 miR-34a-5p、miR-370-3p、miR-432-5p 和 miR-495-3p 的相对表达量

Figure 1. The relative expression of miR-34a-5p, miR-370-3p, miR-432-5p, and miR-495-3p measured by qRT-PCR

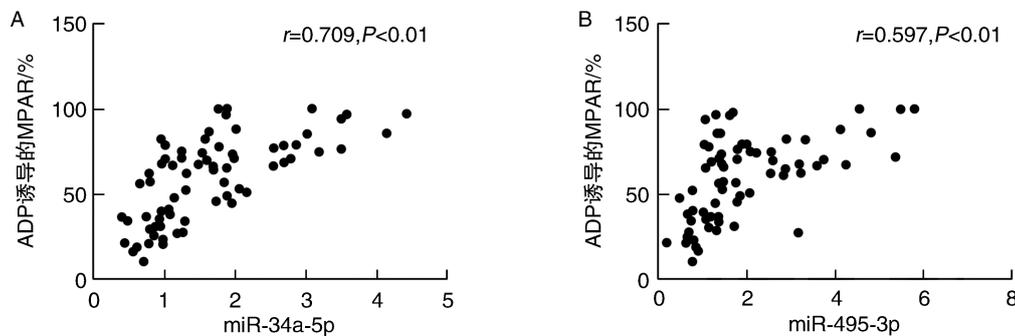


图 2. miR-34a-5p 和 miR-495-3p 与冠心病患者 MPAAR 的相关性

Figure 2. The correlations between miR-34a-5p, miR-495-3p and MPAAR in patients with coronary heart disease performed by pearson correlation test

2.4 miR-34a-5p 和 miR-495-3p 对冠心病氯吡格雷低反应的诊断价值

将有差异表达的 miR-34a-5p 和 miR-495-3p 纳入 ROC 曲线分析,结果显示,miR-34a-5p 单一诊断冠心病氯吡格雷低反应性的 ROC 曲线下面积 (AUC) 为 0.789 (95% CI: 0.674 ~ 0.877), 灵敏度为 74.29%, 特异度为 74.29%; miR-495-3p 单一诊断的 AUC 为 0.787 (95% CI: 0.673 ~ 0.876), 灵敏度为 80.00%, 特异度为 62.86%; miR-34a-5p 和 miR-495-3p 联合诊断的 AUC 为 0.873 (95% CI: 0.772 ~ 0.941), 灵敏度为 100.00%, 特异度为 65.71% (图 3 和表 2)。miR-34a-5p 和 miR-495-3p 联合诊断的 AUC 显著高于 miR-34a-5p ($P < 0.05$) 或 miR-495-3p

2.3 miR-34a-5p 和 miR-495-3p 与冠心病患者血小板聚集率的相关性

应用 Pearson 相关性检验分析 miR-34a-5p 和 miR-495-3p 与冠心病患者 MPAAR 的相关性,结果表明 miR-34a-5p 和 miR-495-3p 的相对表达量与冠心病患者的 MPAAR 均呈显著正相关 ($r = 0.709, P < 0.01$; $r = 0.597, P < 0.01$; 图 2)。

($P < 0.05$) 单一诊断,表明两者联合的诊断价值优于单一 miRNA。依据约登指数计算得出,miR-34a-5p 的诊断阈值为相对表达量 > 1.32 ; miR-495-3p 的诊断阈值为相对表达量 > 1.36 ; miR-34a-5p 与 miR-495-3p 联合诊断的诊断阈值分别为相对表达量 > 1.69 和相对表达量 > 0.85 (同时满足)。

3 讨论

血小板在受损血管内膜处的黏附和聚集,是动脉粥样硬化易损斑块破裂和急性血栓形成的一个关键环节。氯吡格雷低反应导致的治疗后血小板高反应性是冠心病血栓事件发生的独立危险因素。

当前临床中,光比浊法检测的血小板聚集率是诊断治疗后血小板高反应性的金标准^[10]。然而,光比浊法检测需血液量大、操作繁琐、耗时、可重复性差、仪器之间可比性难以估量,并且检测结果易受血液浊度影响而出现系统误差,限制了其临床应用^[11]。其他一些替代方法包括血栓弹力图、流式细胞术等同样存在操作繁琐、费用昂贵等问题,并且其对稳

定型冠心病患者早期血栓形成的预测效应仍存在争议,也没能在临床中大规模应用。因此,对于鉴别冠心病患者氯吡格雷治疗后的血小板高反应性,寻找灵敏度和特异度更高的、更简便的新型生物标志物势在必得,对预防血栓形成、减少心血管事件发生有重大意义。

表 2. ROC 分析结果

Table 2. ROC curve analysis for miR-34a-5p, miR-495-3p, and their combination

miRNA	AUC	95% CI	P 值	灵敏度/%	特异度/%	约登指数	AUC 比较 P 值 (vs. miR-34a-5p+miR-495-3p)
miR-34a-5p	0.789	0.674 ~ 0.877	<0.001	74.29	74.29	0.485 7	0.043 3
miR-495-3p	0.787	0.673 ~ 0.876	<0.001	80.00	62.86	0.428 6	0.035 1
miR-34a-5p+miR-495-3p	0.873	0.772 ~ 0.941	<0.001	100.00	65.71	0.657 1	—

注:“—”表示无法获取。

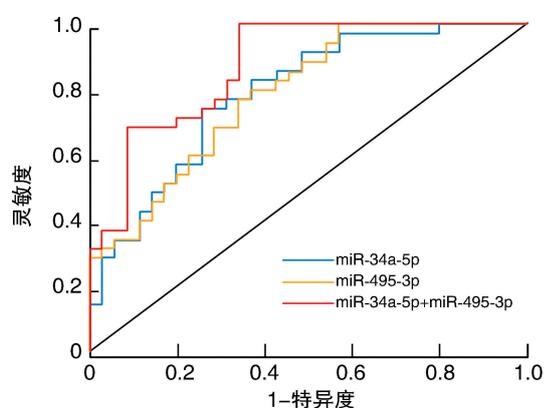


图 3. miR-34a-5p、miR-495-3p 和两者联合诊断的 ROC 分析曲线

Figure 3. ROC curves for miR-34a-5p, miR-495-3p and their combination

miRNA 是一类内源性的短链非编码 RNA,每个 miRNA 约由 22 个核苷酸构成,通过与靶标 mRNA 分子上的互补序列相结合以调控蛋白质的合成^[12]。miRNA 有着多靶点、微调的作用特点,其对于心血管疾病的调控作用在过去十年中逐渐引起人们的重视^[13-14]。以往文献指出,miRNA 在冠心病患者体内存在表达差异,有望成为冠心病的新型、无创性生物标志物和治疗靶点^[15]。PBMC 作为一种有核细胞,理论上涵盖了人体内所有的 miRNA 种类,是循环 miRNA 的重要来源。课题组前期利用基因芯片高通量测序和大样本的 qRT-PCR 验证,证实 PBMC 源性的 miR-34a-5p、miR-370-3p、miR-432-5p、miR-495-3p 与冠心病患者的血小板高反应性和微

循环障碍相关,其中 miR-34a-5p 可作为血栓高风险状态的重要标志物^[7]。以往研究表明,miR-34a-5p 可促进巨核细胞分化生成血小板^[16]并影响肝脏凝血因子的表达^[17],同时 miR-34a-5p 高表达与内皮功能障碍^[18-19]和血管炎症^[20]均相关,对心血管事件具有一定预测价值^[21]。有报道指出,miR-495-3p 在活化的血小板中表达水平升高^[22],并参与调控血小板活化,其机制可能与 miR-495-3p 通过靶向调控 Kelchlike 蛋白 5 基因表达有关^[23]。而关于 miR-370-3p 和 miR-432-5p 对血小板功能的影响,目前尚没有相关报道。本次研究利用 qRT-PCR 检测发现,与冠心病氯吡格雷正常反应患者相比,miR-34a-5p 和 miR-495-3p 在冠心病氯吡格雷低反应患者中存在显著的高表达,反映了两者在血小板活化聚集过程中的调控作用,与以往研究相呼应^[7,17,22-23]。

本研究通过相关性分析发现 miR-34a-5p 和 miR-495-3p 在冠心病患者体内与 MPA 呈显著正相关,且 ROC 曲线分析显示,miR-34a-5p 和 miR-495-3p 单一诊断的 AUC 均>0.7,表明两者均可用于氯吡格雷低反应性的鉴别诊断;miR-34a-5p 与 miR-495-3p 联合后进一步提高了对氯吡格雷低反应性的诊断价值,优于单独使用,特别是诊断灵敏度达到 100.00%,可更灵敏地鉴别冠心病氯吡格雷低反应患者,但特异度偏低。同时,与传统检测方法相比,qRT-PCR 检测所需的血液量更少、成本较低,miR-34a-5p 和 miR-495-3p 联合检测仅需 500 μ L 外周血样本;且不易受样本纯度、浊度和环境光线的影响,使检测结果更稳定、可重复性好,更有利于临床应用

推广。

当然,本研究不可避免地存在一些局限性。本研究为单中心试验,纳入分析的样本量较小,在纳入受试者时难免存在一定程度的选择偏倚。因此,未来需要通过多中心、大样本、设计更严谨的临床研究对结果做进一步的论证。同时,本研究揭示了 miR-34a-5p 和 miR-495-3p 联合应用作为冠心病氯吡格雷低反应性生物标志物的良好诊断价值,但其诊断特异度仍需提高,且两者诊断阈值的精确范围尚需要通过临床研究和实践进行论证和完善。

综上所述,miR-34a-5p 和 miR-495-3p 的高表达与冠心病氯吡格雷低反应性显著相关,可作为冠心病氯吡格雷低反应性的新型生物标志物,两者联合应用可进一步提高诊断价值。

[参考文献]

- [1] MCCARTHY C P, STEG G, BHATT D L. The management of antiplatelet therapy in acute coronary syndrome patients with thrombocytopenia: a clinical conundrum[J]. *Eur Heart J*, 2017, 38(47): 3488-3492.
- [2] STONE G W, GÉNÉREUX P, HARRINGTON R A, et al. Impact of lesion complexity on peri-procedural adverse events and the benefit of potent intravenous platelet adenosine diphosphate receptor inhibition after percutaneous coronary intervention: core laboratory analysis from 10 854 patients from the CHAMPION PHOENIX trial[J]. *Eur Heart J*, 2018, 39(46): 4112-4121.
- [3] SAMBU N, RADHAKRISHNAN A, DENT H, et al. Personalised antiplatelet therapy in stent thrombosis: observations from the Clopidogrel Resistance in Stent Thrombosis (CREST) registry [J]. *Heart*, 2012, 98(9): 706-711.
- [4] YOU S C, RHO Y, BIKDELI B, et al. Association of ticagrelor vs clopidogrel with net adverse clinical events in patients with acute coronary syndrome undergoing percutaneous coronary intervention [J]. *JAMA*, 2020, 324(16): 1640-1650.
- [5] EDELSTEIN L C, BRAY P F. MicroRNAs in platelet production and activation[J]. *Blood*, 2011, 117(20): 5289-5296.
- [6] KARAKAS M, SCHULTE C, APPELBAUM S, et al. Circulating microRNAs strongly predict cardiovascular death in patients with coronary artery disease-results from the large AtheroGene study[J]. *Eur Heart J*, 2017, 38(7): 516-523.
- [7] GAO J, LIU J, ZHANG Y, et al. PBMCs-derived microRNA signature as a prethrombotic status discriminator in stable coronary artery disease[J]. *Thromb Haemost*, 2020, 120(1): 121-131.
- [8] TASK FORCE MEMBERS, MONTALESCOT G, SECHTEM U, et al. 2013 ESC guidelines on the management of stable coronary artery disease: the task force on the management of stable coronary artery disease of the European Society of Cardiology [J]. *Eur Heart J*, 2013, 34(38): 2949-3003.
- [9] BREET N J, VAN WERKUM J W, BOUMAN H J, et al. Comparison of platelet function tests in predicting clinical outcome in patients undergoing coronary stent implantation [J]. *JAMA*, 2010, 303(8): 754-762.
- [10] LE BLANC J, MULLIER F, VAYNE C, et al. Advances in platelet function testing-light transmission aggregometry and beyond [J]. *J Clin Med*, 2020, 9(8): 2636.
- [11] 于泽洋, 何金婷, 徐忠信. 缺血性卒中患者血小板聚集率检测方法研究进展 [J]. *中国实验诊断学*, 2016, 20(1): 152-154.
- [12] MUSUNURU K, HICKEY K T, AL-KHATIB S M, et al. Basic concepts and potential applications of genetics and genomics for cardiovascular and stroke clinicians a scientific statement from the American heart association [J]. *Circ Cardiovasc Genet*, 2015, 8(1): 216-242.
- [13] SMALL E M, FROST R J, OLSON E N. MicroRNAs add a new dimension to cardiovascular disease [J]. *Circulation*, 2010, 121(8): 1022-1032.
- [14] 瞿媛, 顾宁. 微小 RNA 在动脉粥样硬化易损斑块中的研究进展 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2020, 28(6): 548-552.
- [15] DEVAUX Y, BADIMON L. CDR132L: another brick in the wall towards the use of miRNAs to treat cardiovascular disease [J]. *Eur Heart J*, 2021, 42(2): 202-204.
- [16] NAVARRO F, GUTMAN D, MEIRE E, et al. miR-34a contributes to megakaryocytic differentiation of K562 cells independently of p53 [J]. *Blood*, 2009, 114(10): 2181-2192.
- [17] SALLOUM-ASFAR S, ARROYO A B, TERUEL-MONTOYA R, et al. miRNA-based regulation of hemostatic factors through hepatic nuclear factor-4 alpha [J]. *PLoS One*, 2016, 11(5): e0154751.
- [18] SU G, SUN G L, LIU H, et al. Downregulation of miR-34a promotes endothelial cell growth and suppresses apoptosis in atherosclerosis by regulating Bcl-2 [J]. *Heart Vessels*, 2018, 33(10): 1185-1194.
- [19] 肖丽, 刘萍, 秦冰. miR-34a 通过调控 Sirt1/FoxO1 通路影响血管内皮细胞凋亡 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2021, 29(3): 193-200.
- [20] HART M, WALCH-RÜCKHEIM B, FRIEDMANN K S, et al. miR-34a: a new player in the regulation of T cell function by modulation of NF-κB signaling [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(2): 46.
- [21] 李晓伟, 奉淑君, 周凤华, 等. miR-34a 在心血管疾病中的作用及机制研究进展 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2019, 27(7): 624-628.
- [22] OSMAN A, FÄLKER K. Characterization of human platelet microRNA by quantitative PCR coupled with an annotation network for predicted target genes [J]. *Platelets*, 2011, 22(6): 433-441.
- [23] NAGALLA S, SHAW C, KONG X, et al. Platelet microRNA-mRNA coexpression profiles correlate with platelet reactivity [J]. *Blood*, 2011, 117(19): 5189-5197.

(此文编辑 许雪梅)