

采用基因芯片技术研究丹红注射液对急性心肌梗死模型大鼠基因表达谱的影响[△]

施洋^{1,2,3*}, 樊官伟^{3,4#}, 侯宝林^{1,2}, 樊登峰^{1,2}, 张伟¹, 鲁西亮¹, 陈晓黎¹, 何敏²(1.克拉玛依市人民医院药剂科, 新疆克拉玛依 834000; 2.克拉玛依市中医医院药剂科, 新疆克拉玛依 834000; 3.天津市现代中药重点实验室/省部共建国家重点实验室培育基地, 天津 300193; 4.天津中医药大学第一附属医院医学实验中心, 天津 300193)

中图分类号 R285.5; R966 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)22-3042-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.22.04

摘要 目的:探讨丹红注射液(DHI)对急性心肌梗死(AMI)模型大鼠基因表达谱的影响。方法:将雄性SD大鼠随机分为假手术组、模型组和DHI组(0.76 mL/kg),每组10只。模型组和DHI组采用冠状动脉左前降支结扎法复制AMI模型。造模后,假手术组和模型组大鼠均肌内注射等容生理盐水,DHI组大鼠肌内注射相应药物,每日1次,连续14 d。末次给药后,分离大鼠梗死边缘区心肌组织,采用基因芯片技术检测基因表达谱的变化情况,以相对表达量差异倍数为指标,筛选差异表达微RNA(miRNA)。在检索其对应基因的基础上,利用DAVID生物信息学资源数据库和KEGG通路数据库分别进行基因本体(GO)和KEGG通路富集分析;借助TargetScan数据库预测差异表达miRNA对应的靶基因信使RNA(mRNA),采用Cytoscape 3.6.1软件构建miRNA-mRNA网络并进行分析,采用Agilent GeneSpring GX v11.5软件筛选上述网络中与炎症相关的靶基因和miRNA。结果:与假手术组比较,模型组差异表达miRNA共22个,其中上调5个、下调17个;与模型组比较,DHI组差异表达miRNA共26个,均为上调;与DHI治疗AMI有关的差异表达miRNA包括rno-let-7a-5p、rno-let-7d-5p、rno-let-7f-5p、rno-miR-26b-5p、rno-miR-29b-3p、cel-miR-39-3p、cel-miR-39-5p、rno-miR-142-5p、rno-miR-191a-5p、rno-miR-409a-3p。GO和KEGG通路富集分析结果显示,差异表达miRNA对应基因主要集中在膜结合细胞器、细胞质、内膜系统等细胞组分中,通过解剖结构发育、多细胞组织发育、发育过程等生物过程来发挥蛋白结合、离子结合等分子功能;其主要富集于钙信号通路,过氧化物酶体增殖物激活受体(PPAR)信号通路,血管内皮生长因子(VEGF)信号通路,细胞凋亡,糖基磷脂酰肌醇锚定生物合成,缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解等信号通路上。miRNA-mRNA网络分析结果显示,与差异表达miRNA对应的靶基因mRNA共25个,与之关联的miRNA共24个;该网络中与炎症相关的靶基因共6个(*IL6*、*IL1b*、*TNF*、*TLR4*、*CRP*、*CXCL12*),涉及差异表达miRNA共19个。结论:DHI对AMI的治疗作用可能与调节相关miRNA的表达,影响钙离子、PPAR、VEGF等通路的信号转导,调控白细胞介素、趋化因子、C反应蛋白等炎症标志物的分泌有关。

关键词 基因芯片技术;丹红注射液;急性心肌梗死;差异表达;微RNA;信使RNA;信号通路;炎症;大鼠

Study on the Effects of Danhong Injection on Gene Expression Profile of Acute Myocardial Infarction Model Rats by Gene Chip Technique

SHI Yang^{1,2,3}, FAN Guanwei^{3,4}, HOU Baolin^{1,2}, FAN Dengfeng^{1,2}, ZHANG Wei¹, LU Xiliang¹, CHEN Xiaoli¹, HE Min²(1. Dept. of Pharmacy, Karamay Municipal People's Hospital, Xinjiang Karamay 834000, China; 2. Dept. of Pharmacy, Karamay Hospital of TCM, Xinjiang Karamay 834000, China; 3. Tianjin Key Laboratory of Modern Chinese Medicine/State Key Lab Breeding Base, Tianjin 300193, China; 4. Medical Experiment Center, the First Affiliated Hospital of Tianjin University of TCM, Tianjin 300193, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the effects of Danhong injection (DHI) on gene expression profile of acute myocardial infarction (AMI) model rats. METHODS: Male SD rats were randomly divided into sham operation group, model group and DHI group (0.76 mL/kg), with 10 rats in each group. AMI model was established by ligation of left anterior descending coronary artery in model group and DHI group. After modeling, sham operation group and model group were given constant volume of normal saline intramuscularly, and DHI group was given relevant medicine intramuscularly, once a day, for consecutive 14 days. After last administration,

[△] 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81774050);天津市杰出青年科学基金资助项目(No.17JCJQC46200);克拉玛依市人民医院院级科研项目(No.Ry2018014)

* 药师,硕士。研究方向:临床药学、心血管药理学。电话:0990-6865417。E-mail:shiyangjutc@126.com

通信作者:研究员,博士。研究方向:心血管药理学。电话:022-59596163。E-mail:fgw1005@hotmail.com

group (0.76 mL/kg), with 10 rats in each group. AMI model was established by ligation of left anterior descending coronary artery in model group and DHI group. After modeling, sham operation group and model group were given constant volume of normal saline intramuscularly, and DHI group was given relevant medicine intramuscularly, once a day, for consecutive 14 days. After last administration,

myocardial tissue in the marginal zone of infarction was separated. The change of gene expression profile was detected by gene chip technique. Using fold-change of relative expression as index, differentially expressed microRNA (miRNA) were screened. On the basis of retrieving their corresponding genes, gene ontology (GO) and KEGG pathway enrichment analysis were carried out by using DAVID bioinformatics resource database and KEGG pathway database, respectively. TargetScan database was used to predict the target gene messenger RNA (mRNA) corresponding to differentially expressed miRNA. Cytoscape 3.6.1 software was used to construct and analyze the miRNA-mRNA network. Agilent GeneSpring GX v11.5 software was used to screen target genes and miRNA related to inflammation in the above networks. RESULTS: Compared with sham operation group, there were 22 differentially expressed miRNAs in model group, 5 up-regulated and 17 down-regulated. Compared with model group, there were 26 differentially expressed miRNAs in DHI group, and all of them were up-regulated. The differentially expressed miRNAs related to DHI therapy for AMI included rno-let-7a-5p, rno-let-7d-5p, rno-let-7f-5p, rno-miR-26b-5p, rno-miR-29b-3p, cel-miR-39-3p, cel-miR-39-5p, rno-miR-142-5p, rno-miR-191a-5p, rno-miR-409a-3p. Results of GO analysis and KEGG pathway enrichment analysis showed that differentially expressed miRNAs were mainly concentrated in membrane-bound organelles, cytoplasm, endometrial system and other cell components. The molecular functions such as protein binding and ion binding were exerted through biological processes such as anatomical structure development, multicellular tissue development and development process, which were mainly enriched in calcium signaling pathway, PPAR signaling pathway, VEGF signaling pathway, cell apoptosis, glycosylphosphatidylinositol anchored biosynthesis, valine, leucine and isoleucine degradation, etc. miRNA-mRNA network analysis showed that there were 25 target gene mRNAs corresponding to differentially expressed miRNA and 24 miRNAs related to it. There were 6 inflammation-related target genes (*IL6*, *IL1b*, *TNF*, *TLR4*, *CRP*, *CXCL12*) in this network, involving 19 differentially expressed miRNAs. CONCLUSIONS: The therapeutic effect of DHI on AMI may be related to regulating the expression of related miRNA, affecting signal transduction of calcium ion, PPAR and VEGF pathways, and regulating the secretion of inflammatory markers such as interleukin, chemokine and C-reactive protein.

KEYWORDS Gene chip technique; Danhong injection; Acute myocardial infarction; Differential expression; MicroRNA; Messenger RNA; Signaling pathway; Inflammation; Rat

急性心肌梗死(AMI)是临床上常见的急危重症,属急性冠脉综合征(ACS)的严重类型,是心血管疾病中最主要的致死因素之一^[1]。该病既往常见于欧美发达国家,据一项为期26年的随访研究显示,美国35~84岁中老年人群中AMI的男性发病率为71%,女性为22%;每年约有150万人新发AMI,45万人发生再次心肌梗死^[2]。受社会经济发展、人口老龄化加剧、饮食习惯改变、心理状态变化等因素的影响,我国AMI的发病率呈逐年上升的趋势^[3]。该病发病机制主要是冠状动脉粥样硬化形成不稳定的粥样斑块溃破,继而引发出血和管腔内血栓形成,从而使管腔闭塞,且通常是由一支或多支血管发生阻塞而侧支循环尚未充分建立所造成的心肌缺血缺氧,最终导致患者心肌大面积坏死,这一过程与机体炎症反应密切相关^[4]。为防止梗死范围扩大,缩小缺血面积以挽救濒死心肌是AMI治疗的重要环节;此外,消除炎症反应等各种不利因素的影响以避免心功能的持续恶化,也日益成为临床关注的焦点之一^[5-6]。

丹红注射液(DHI)是在传统中医理论指导下结合现代制药技术制成的中药注射剂,由丹参和红花两味中药组成,具有活血化瘀、通脉舒络之功效,可用于临床治疗瘀血闭阻所致的胸痹、中风以及冠心病、心绞痛、心肌梗死、脑血栓等症^[7-9]。AMI发生后,机体内多种基因[如基质金属蛋白酶(MMP)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素1 β (IL-1 β)等的编码基因]的表达均发生改变,其中

微RNA(miRNA)的变化备受学者关注^[9]。miRNA可通过调节靶信使RNA(mRNA)的翻译过程来调控基因的表达,进而影响炎症反应、氧化应激、细胞凋亡等一系列生物学效应^[10]。有研究指出,AMI发生后,机体内多种miRNA表达水平发生变化,并参与AMI的进展,从而影响患者的治疗结局^[11-12]。目前,对于AMI发生后miRNA的作用类型及具体机制尚处于初始研究阶段,且中药干预AMI的作用机制及靶点亦未完全明确。鉴于此,本研究通过建立AMI大鼠模型,利用基因芯片技术分析DHI对其心肌梗死边缘区基因表达谱的影响;在筛选差异表达miRNA的基础上,从基因功能、信号通路等方面挖掘DHI对AMI的潜在调控机制,并初步探讨该药对炎症反应的可能影响,以期对DHI作用机制阐释及其临床应用提供參考。

1 材料

1.1 仪器

MP-150型多导生理记录仪(美国BioPac公司);ALC-V8型小动物呼吸机(上海精密科学仪器有限公司);STEMI2000-C型体视显微镜(德国Zeiss公司);Microfuge22R型冷冻离心机(美国Beckman公司);CFX96型实时逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)仪(美国Bio-Rad公司);E-spect型吸光-荧光光度计(日本Malcom公司);G2939A 2100型生物分析仪(美国Agilent公司);NanoDrop2000型分光光度计(美国Thermo Fisher Scien-

tific公司)。

1.2 药品与试剂

DHI(菏泽步长制药有限公司,批号:17121030,规格:每支装10 mL);注射用青霉素钠[石家庄制药集团有限公司,批号:017140617,规格:0.96 g(160万单位)];QIAzol Lysis组织样本裂解试剂(批号:79306)、miRNA纯化试剂盒miRNeasy Mini Kit(批号:217004)、miRNA定量检测试剂盒miScript II RT Kit(批号:218161)、设置和优化的miRNA定量检测试剂盒miScript PCR Starter Kit(批号:218193)、miRNA定量检测试剂盒miScript SYBR® Green PCR Kit(批号:218073)、miRNA表达谱分析试剂盒miScript miRNA PCR Arrays(批号:331231)均购自德国Qiagen公司;其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

1.3 动物

SPF级SD大鼠30只,雄性,体质量220~250 g,购自北京华阜康生物科技股份有限公司,生产许可证号:SCXK(京)2014-0008。所有大鼠均饲养于天津中医药大学医学动物实验中心清洁级动物房内,温度为20~25℃,相对湿度为40%~60%,每12 h交替明暗环境,每2 d更换1次垫料。

2 方法

2.1 分组、造模与给药

将30只SD大鼠按随机数字表法分为假手术组、模型组和DHI组,每组10只。模型组和DHI组大鼠采用冠状动脉左前降支结扎法复制AMI模型:大鼠麻醉后,将胸前及颈部皮肤备皮并消毒,沿颈部正中切开,牵拉周围肌肉暴露气管。将静脉鞘管针带芯插入气管内,拔出针芯,连接小动物呼吸机进行辅助呼吸(呼吸频率:80次/min,潮气量:4 mL,呼吸比:1:1)并记录心电图。于3、4肋间隙作一斜行长约1.5 cm的切口,逐层钝性分离肌肉,撑开胸腔,暴露心脏。在体视显微镜下剥离心包膜并寻找肺动脉圆锥和左心耳,于两者交界且距冠状动脉起始点下方1~2 mm处进针,深度1.0~1.5 mm,以6/0号缝合线结扎。若大鼠心电图呈S-T段弓背上抬、T波高耸、QRS波电压增高伴波幅增宽则判定造模成功^[13]。术后腹腔注射青霉素钠(40万单位,每日1次,连续3 d)以预防感染。假手术组大鼠只穿线不结扎,其余操作同上。造模成功后,DHI组大鼠肌内注射DHI(0.76 mL/kg,剂量根据临床用量并结合本课题组前期研究结果^[14]换算而得),假手术组和模型组大鼠均肌内注射生理盐水(0.76 mL/kg),每日1次,连续14 d。

2.2 组织取材

末次给药2 h后,以颈椎脱臼法处死大鼠。取出心脏,剪开右心耳,经腹主动脉用磷酸盐缓冲液(PBS,pH为7.2~7.4)清洗2次,每次50 mL。保留左心室游离壁

部分,剪去发白梗死区,取梗死边缘区心肌组织约50 mg,用锡箔纸包裹后,放入冻存管中,于液氮中速冻30 min后,转入-80℃超低温冰箱保存,待检。

2.3 总RNA提取和纯化

使用QIAzol Lysis组织样本裂解试剂裂解大鼠心肌梗死边缘区组织,以异丙醇沉淀法^[15]提取其总RNA;使用miRNeasy Mini Kit试剂盒按其说明书方法进行纯化。

2.4 miRNA基因芯片检测

采用分光光度计分别于260、280 nm波长处检测总RNA的吸光度(*A*),若其 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 值为1.8~2.0则表明RNA纯度较高^[16]。采用生物分析仪对总RNA进行凝胶电泳分析,通过对比电泳条带灰度值来计算总RNA的分子完整数(RIN)及28S/18S,若其 $RIN \geq 7$ 且 $28S/18S \geq 0.7$ 即为合格RNA^[17],可进行后续试验。应用miScript II RT Kit对包含miRNA的总RNA进行逆转录,参照miScript PCR Starter Kit试剂盒说明书设置和优化miRNA的定量分析,采用miScript SYBR® Green PCR Kit对miRNA进行检测,采用miScript miRNA PCR Arrays对miRNA表达谱进行分析。上述试验平行操作3次,芯片数据汇总、分析由上海欧易生物医学科技有限公司完成。

2.5 差异表达miRNA筛选及分析

将假手术组、模型组、DHI组进行两两匹配,即假手术组与模型组、模型组与DHI组。采用RT-PCR法以实时RT-PCR仪分析上述各组样品miRNA的表达情况,引物、反应体系及反应条件均参照miScript SYBR® Green PCR Kit试剂盒说明书,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算并定量分析其相对表达量(Ct值为每个样品的荧光信号到达设定阈值时所经历的循环数)。同时,将所得Ct值导入MiRNA在线分析软件(<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/mirna>)中进行分析,将相对表达量差异倍数(Fold-change) ≥ 1.5 且 $P < 0.05$ 的miRNA定义为差异表达miRNA^[18]。对上调、下调的miRNA进行汇总、分析,并在分组比较的基础上,筛选与DHI治疗AMI有关的差异表达miRNA。

2.6 基因本体(GO)分析

借助miRBase数据库(<https://www.mirbase.org>)检索“2.5”项下所得差异表达miRNA的对应基因,并以此为对象,利用DAVID生物信息学资源数据库(<https://david.ncifcrf.gov>)进行GO分析,获知其潜在作用靶点的功能分布及富集程度。其中,功能分布包括分子功能、生物过程和细胞组分等3个方面;富集程度以富集度(即归类聚集程度,以转录域覆盖率表示)为指标,以正负值分别表示对应上调或下调靶点,其绝对值越大表明富集度越高^[19]。分析结果采用WEGO 2.0软件处理,并以富集条形图展示。

2.7 KEGG通路富集分析

以“2.6”项下所得差异表达miRNA的对应基因为对象,利用KEGG数据库(<https://www.kegg.jp>)进行KEGG通路富集分析,富集程度以P值表示,其值越小表明其生物学富集途径越显著^[20]。分析结果采用TBtools 0.6656软件处理,并以富集条形图展示。

2.8 miRNA-mRNA网络分析

借助TargetScan数据库(<http://www.targetscan.org/>)预测差异表达miRNA(包括与AMI发生以及DHI治疗有关的全部miRNA)的靶基因mRNA,并运用Cytoscape 3.6.1软件构建miRNA-mRNA网络,对差异表达miRNA与目标基因之间的相互关系进行可视化展示;同时,应用Agilent GeneSpring GX v11.5软件筛选上述网络中与炎症相关的靶基因,以此挖掘与AMI发生后炎症反应调控有关的miRNA。上述分析由上海欧易生物科技有限公司完成。

2.9 数据处理

利用Excel 2010对芯片数据进行归一化处理后,导入RT2 Profiler qPCR Array System在线分析软件(<http://www.SABiosciences.com/pcrarraydataanalysis.php>)进行分析。采用SPSS 17.0软件对数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用t检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 差异表达miRNA筛选分析结果

与假手术组比较,模型组差异表达miRNA共22个,其中表达上调5个、下调17个,详见表1(表中,“mo”表示大鼠,“cel”表示细胞,下同)。与模型组比较,DHI组差异表达miRNA共26条,均为表达上调,详见表2。由表1、表2可见,与DHI治疗AMI有关的差异表达miRNA包括 rno-let-7a-5p、rno-let-7d-5p、rno-let-7f-5p、rno-miR-26b-5p、rno-miR-29b-3p、cel-miR-39-3p、cel-miR-39-5p、rno-miR-142-5p、rno-miR-191a-5p、rno-miR-409a-3p。

表1 模型组与假手术组的差异表达miRNA

Tab 1 Differentially expressed miRNA in model group and sham operation group

miRNA名称	差异倍数	P	miRNA名称	差异倍数	P
rno-let-7a-5p	-3.532	0.032 4	mo-miR-30c-5p	-2.330	0.033 6
mo-let-7d-5p	-2.017	0.041 2	mo-miR-30e-5p	-2.243	0.026 6
mo-let-7f-5p	-3.788	0.025 4	mo-miR-26a-5p	-2.277	0.020 9
mo-miR-126a-3p	-2.924	0.012 3	mo-miR-409a-3p	-2.596	0.010 5
mo-miR-128-3p	-2.014	0.015 4	cel-miR-39-3p	-4.187	0.004 1
mo-miR-150-5p	-3.816	0.028 7	cel-miR-39-5p	-3.502	0.013 9
mo-miR-191a-5p	-2.191	0.036 5	mo-miR-146b-5p	4.147	0.003 4
mo-miR-142-5p	-2.438	0.017 8	mo-miR-21-5p	2.681	0.031 8
mo-miR-26b-5p	-3.940	0.001 2	mo-miR-214-3p	5.177	0.017 8
mo-miR-29b-3p	-2.730	0.010 1	mo-miR-383-5p	2.150	0.027 3
mo-miR-30b-5p	-2.373	0.045 9	mo-miR-31a-5p	4.491	0.005 9

表2 DHI组与模型组的差异表达miRNA

Tab 2 Differentially expressed miRNA in DHI group and model group

miRNA名称	差异倍数	P	miRNA名称	差异倍数	P
rno-let-7a-5p	4.876	0.007 3	rno-miR-186-5p	3.162	0.023 9
mo-let-7c-5p	2.240	0.019 8	rno-miR-191a-5p	2.198	0.014 8
mo-let-7d-5p	2.414	0.039 8	mo-miR-205	2.899	0.031 6
mo-let-7e-5p	2.287	0.030 8	mo-miR-207	2.339	0.019 0
mo-let-7f-5p	2.811	0.014 5	mo-miR-210-3p	2.343	0.025 1
mo-miR-103-3p	2.008	0.024 9	mo-miR-26b-5p	2.039	0.021 5
mo-miR-129-5p	2.113	0.010 3	mo-miR-296-3p	2.271	0.016 9
mo-miR-130a-3p	2.247	0.015 6	mo-miR-299a-5p	2.043	0.033 7
mo-miR-142-5p	3.191	0.022 4	mo-miR-29b-3p	3.920	0.009 3
mo-miR-143-3p	2.356	0.031 2	mo-miR-325-5p	2.334	0.012 4
mo-miR-15b-5p	2.221	0.018 8	mo-miR-409a-3p	3.367	0.011 4
mo-miR-16-5p	2.014	0.035 3	cel-miR-39-3p	4.365	0.007 4
mo-miR-185-5p	2.589	0.043 6	cel-miR-39-5p	3.651	0.016 8

3.2 差异表达miRNA对应基因GO分析结果

差异表达miRNA对应基因主要集中在膜结合细胞器、细胞质、内膜系统等细胞组分中,通过解剖结构发育、多细胞组织发育、发育过程等生物过程来发挥蛋白结合、离子结合等分子功能,详见图1。

3.3 差异表达miRNA对应基因KEGG通路富集分析结果

差异表达miRNA对应基因主要富集于钙信号通路,细胞凋亡,糖基磷脂酰肌醇锚定生物合成,缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解,过氧化物酶体增殖物激活受体(PPAR)信号通路,血管内皮生长因子(VEGF)信号通路,自然杀伤细胞介导的细胞毒性等相关信号通路上,详见图2。

3.4 差异表达miRNA-mRNA网络分析结果

在该网络中,与差异表达miRNA对应的靶基因mRNA共25个,包括CXCL10、IL7、Nox4、VEGF、TNF、CCL3等;与之有关联的miRNA有24个,详见图3(图中,方形表示差异表达miRNA,圆形表示对应靶基因mRNA,连线表示两者关联)。其中,与炎症反应相关的靶基因有6个,分别为IL10、IL1b、TNF、TLR4、CRP、CXCL12,涉及差异表达miRNA共19个,包括rno-let-7a-5p、rno-let-7c-5p、rno-miR-205、rno-miR-26b-5p等,详见表3。

4 讨论

miRNA被认为是20世纪最伟大的十大发现之一,其参与了生物体内包括生长发育、组织器官形成、细胞增殖与凋亡等在内的多种重要生物过程,且与诸多重大疾病(如心脑血管疾病、恶性肿瘤等)的发生密切相关^[21-23]。目前,人类已经发现了两千多个miRNA,其数量还在不断增加,已成为医学界研究的热点之一^[21]。

基因芯片技术起始于上世纪80年代中期,其原理为杂交测序,即将已知序列的寡核苷酸片段有序地固定在玻璃、硅等固体支持物上,然后与标记的样品分子进行杂交,通过检测每个探针的杂交信号强度进而获取样品

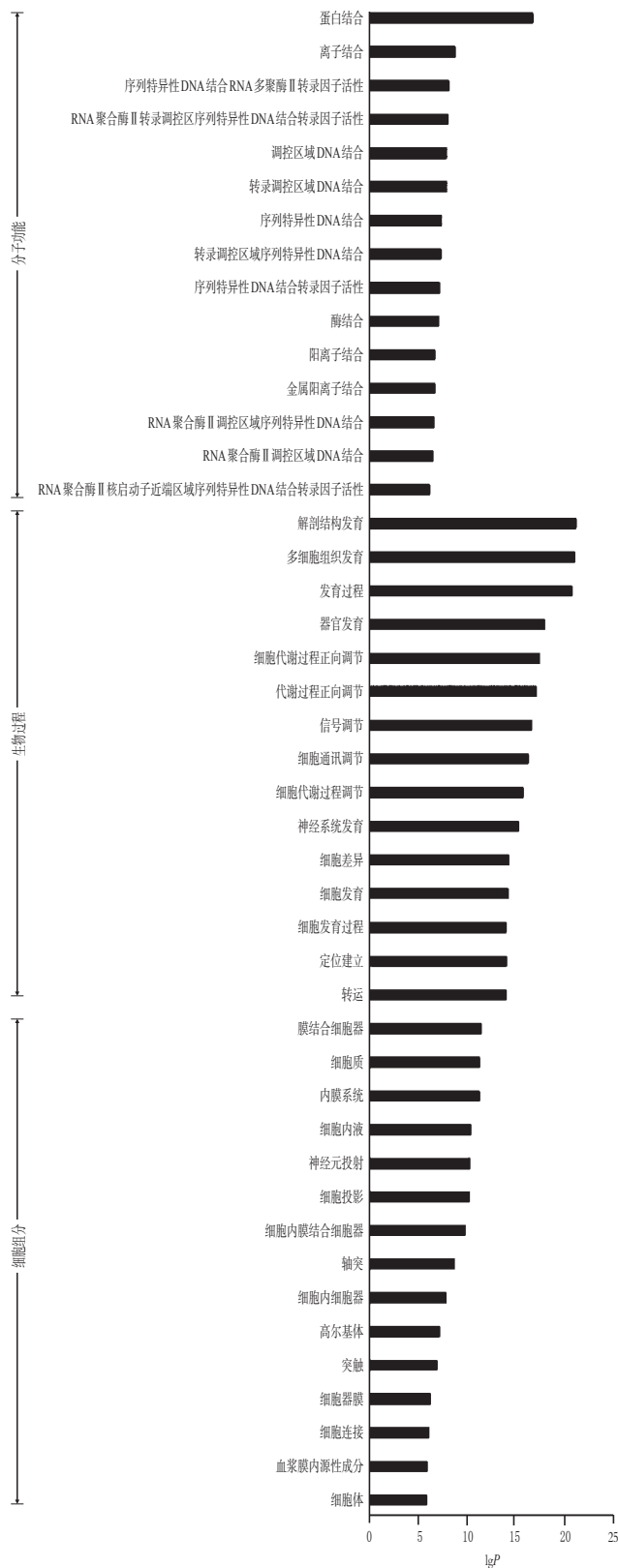


图1 差异表达miRNA对应基因GO分析结果
Fig 1 GO analysis results of genes corresponding to differentially expressed miRNA

分子的数量和序列信息,具有高效、高通量的特点,现已广泛应用于药物研发、疾病诊断、环境保护、司法鉴定等领域^[24]。

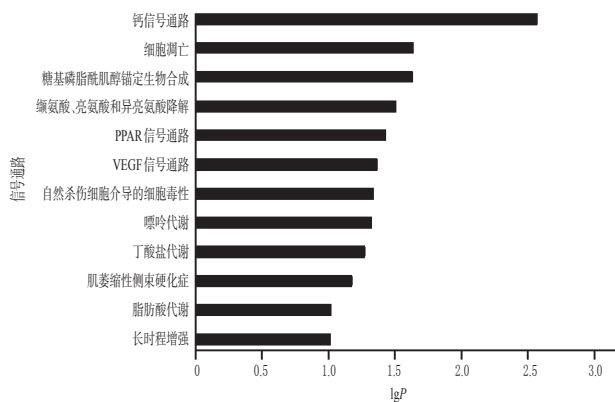


图2 差异表达miRNA对应基因KEGG富集分析结果
Fig 2 KEGG enrichment analysis results of genes corresponding to differentially expressed miRNA

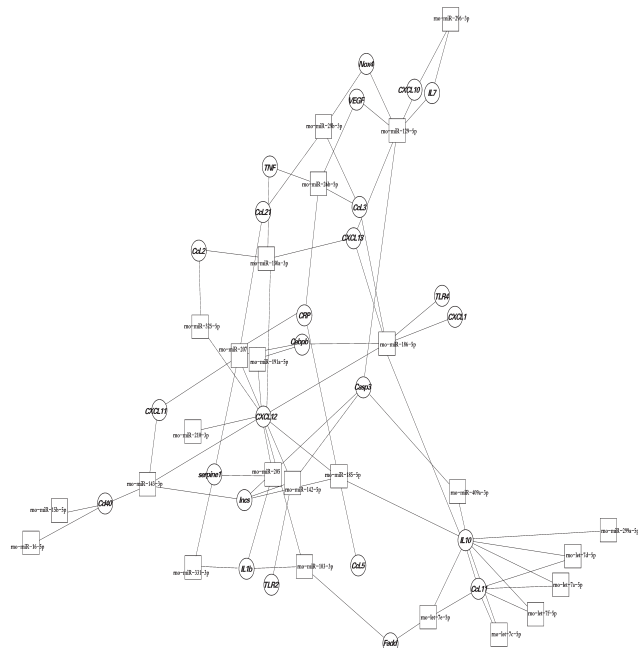


图3 miRNA-mRNA网络
Fig 3 miRNA-mRNA network

表3 网络预测炎症相关靶基因mRNA及其miRNA
Tab 3 mRNA and miRNA of predicted inflammation-related target genes

预测靶基因	涉及炎症反应相关差异表达miRNA的数量	涉及炎症反应相关差异表达miRNA
<i>IL10</i>	9	mo-let-7a-5p, mo-let-7c-5p, mo-let-7d-5p, mo-let-7e-5p, mo-let-7f-5p, mo-miR-409a-3p, mo-miR-299a-5p, mo-miR-186-5p, mo-miR-185-5p
<i>IL1b</i>	2	mo-miR-205, mo-miR-103-3p
<i>TNF</i>	2	mo-miR-26b-5p, mo-miR-130a-3p
<i>TLR4</i>	1	mo-miR-186-5p
<i>CRP</i>	3	mo-miR-207, mo-miR-26b-5p, mo-miR-185-5p, mo-miR-325-5p, mo-miR-130a-3p, mo-miR-207, mo-miR-191a-5p, mo-miR-210-3p, mo-miR-205, mo-miR-142-5p, mo-miR-185-5p, mo-miR-103-3p, mo-miR-186-5p, mo-miR-143-3p
<i>CXCL12</i>	11	

DHI为临床常用中药注射剂,可用于临床治疗瘀血闭阻所致的冠心病、心绞痛、心肌梗死、脑血栓等症,疗效较好^[7-8]。为进一步阐释其作用机制,本研究在复制

AMI大鼠模型的基础上,以基因芯片技术为手段,探讨了DHI对模型大鼠心肌梗死边缘区基因表达谱的影响。根据药品说明书,DHI肌内注射给药的剂量为单次2~4 mL,每日1~2次,故本研究参考上述最高剂量和本课题组前期研究结果^[14]将DHI的给药剂量设定为0.76 mL/kg,以确保药效的充分发挥。

基因表达谱分析结果显示,与假手术组比较,模型组差异表达miRNA共22个,其中上调5个、下调17个;与模型组比较,DHI组差异表达miRNA共26条,均为上调。与DHI治疗AMI有关的差异表达miRNA为mo-let-7a-5p、mo-let-7d-5p、mo-let-7f-5p、mo-miR-26b-5p、mo-miR-29b-3p、cel-miR-39-3p、cel-miR-39-5p、mo-miR-142-5p、mo-miR191a-5p、mo-miR-409a-3p。这提示上述miRNA可能是DHI治疗AMI的潜在作用靶点。

AMI发生后,心肌细胞形态、结构以及各细胞器功能均发生明显改变,进而影响细胞生物学功能的发挥;随着AMI病情的不断进展,心肌细胞各组分、功能及生物过程也随之改变,逐渐由正常的生理过程转变为病理过程^[25]。本研究以上述差异表达miRNA为对象,对其对应基因进行GO分析。结果显示,差异表达miRNA对应基因主要集中在膜结合细胞器、细胞质、内膜系统等细胞组分中,通过解剖结构发育、多细胞组织发育、发育过程等生物过程来发挥蛋白结合、离子结合等分子功能。这提示DHI对AMI的治疗作用可能与调节细胞内细胞器,影响蛋白或离子结合,调控多种细胞、组织发育过程等途径有关。

KEGG是整合了基因组、化学和系统功能信息的数据库,可将已知序列的基因、基因组信息以及更高层次的功能信息相结合,是生物信息学研究的重要平台^[26]。本研究对差异表达miRNA对应基因进行了KEGG通路富集分析。结果显示,对应基因主要富集于钙信号通路,细胞凋亡,糖基磷脂酰肌醇锚定生物合成,缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解,PPAR信号通路,VEGF信号通路,自然杀伤细胞介导的细胞毒性等相关信号通路上,其中钙信号转导通路、PPAR信号通路、VEGF信号通路与AMI的发生发展密切相关^[27-30]。钙信号通路调节机制在心血管疾病中起着桥梁纽带的作用,与心律失常、心力衰竭、心肌肥大等心血管疾病密切相关,故维持细胞内钙动态平衡对于缺血再灌注损伤心肌细胞内环境的稳定至关重要^[27]。PPAR的 α 亚型广泛存在于心血管系统中,可抑制血管和心室重塑,并可改善血管舒张功能,减少心力衰竭患者心血管事件的发生^[28];其 γ 亚型是重要的细胞分化转录因子,可通过抗炎、抗氧化应激等途径发挥抗动脉粥样硬化的作用,同时还可改善内皮细胞功能、刺激内皮细胞分泌C型利钠肽从而达到降血压

的目的^[29]。VEGF是一种高度特异性的促血管内皮细胞生长因子,具有促进血管通透性增加,细胞外基质变性,血管内皮细胞迁移、增殖和血管形成等作用;同时,VEGF可促进梗死后血管新生以及侧支循环的形成,改善心肌的供血供氧,提高濒死心肌细胞的存活率^[30]。由此可见,上述通路可能是DHI抗AMI的作用靶点。

在上述研究的基础上,本课题组构建了miRNA-mRNA网络,以探讨差异表达miRNA与相应靶基因mRNA的相互关系,并筛选炎症相关基因和miRNA。结果,共获得与差异表达miRNA对应靶基因mRNA 25个,与之有关联的miRNA 24个;共筛选得与炎症反应相关的靶基因6个,分别为*IL10*、*IL1b*、*TNF*、*TLR4*、*CRP*、*CXCL12*,共涉及差异表达miRNA 19个。其中,白细胞介素6(IL-6)和IL-1 β (分别由*IL6*、*IL1b*基因编码)在AMI患者体内呈高表达^[31-32];肿瘤坏死因子 α (TNF- α ,由*TNF- α* 基因编码)作为一种自分泌的炎症因子,可参与AMI心肌损伤的发生发展过程^[33];Toll样受体(TLR,由*TLR*基因编码)可通过免疫应答而启动下游信号通路,通过刺激炎症因子的分泌来诱导炎症的发生,该基因的缺失是AMI患者心脏保护的有利因素^[34];C反应蛋白(CRP,由*CRP*基因编码)作为一种炎症标志物,可激活补体系统,诱导内皮功能障碍,进而影响AMI的发生发展^[35];趋化因子(CXCL,由*CXCL*基因编码)是一种能够吸引白细胞移行至感染部位的低分子量蛋白质,在炎症反应中具有重要作用,参与了AMI后患者的心肌损伤及心室重塑过程^[36]。由此可见,DHI有可能通过调控上述差异表达miRNA来调节炎症相关靶基因mRNA的表达,从而调节心肌梗死组织的炎症反应,以发挥抗AMI的作用。

综上所述,DHI对AMI的治疗作用可能是通过调节相关miRNA的表达,影响钙离子、PPAR、VEGF等通路的信号转导,调控IL、TNF、CXCL、TLR、CRP等炎症标志物的分泌等途径来实现的。但本结论尚有待更多基础研究予以进一步验证。

参考文献

- [1] 中华医学会心血管病学分会,中华心血管病杂志编辑委员会,中国循环杂志编辑委员会.急性心肌梗死诊断和治疗指南[J].中华心血管病杂志,2001,29(12):705-720.
- [2] 柯峰.“冠心V号”制剂(合剂与颗粒剂)干预AMI后模型大鼠VR及炎症反应的研究[D].南京:南京中医药大学,2015.
- [3] 苏懿,王磊,张敏州.急性心肌梗死的流行病学研究进展[J].中西医结合心脑血管病杂志,2012,10(4):467-469.
- [4] 陆再英,钟南山.内科学[M].7版.北京:人民卫生出版社,

2008;284-286.

- [5] NAVINAN MR, MENDIS S, WICKRAMASINGHE S, et al. Inflammation in ST-elevation myocardial infarction: risk factors, patterns of presentation and association with clinical picture and outcome, an observational study conducted at the Institute of Cardiology-National Hospital of Sri Lanka[J]. *BMC Cardiovasc Disord*, 2019. DOI:10.1186/s12872-019-1104-5.
- [6] 赵英利, 邓兵. 心肌梗死后心室重构的机制及中医药防治进展[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2019, 17(2): 211-215.
- [7] 王赏, 卢宏. 丹红注射液的临床研究进展[J]. *中国实用神经疾病杂志*, 2018, 21(17): 1862-1866.
- [8] 刘金虹. 丹红注射液的临床应用进展[J]. *中国药房*, 2014, 25(23): 2189-2191.
- [9] 陈志松, 喻卓, 曾永利. 瑞舒伐他汀对急性心肌梗死大鼠心肌基质金属蛋白及炎症因子的影响[J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(2): 66-71.
- [10] LAGOS-QUINTANA M, RAUHUT R, LENDECKEL W, et al. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs[J]. *Science*, 2001, 294(5543): 853-858.
- [11] 高亚立, 田乃亮. MicroRNA 调节心肌梗死后心肌肥厚、心肌纤维化及心肌细胞凋亡的研究进展[J]. *医学综述*, 2018, 24(12): 2328-2333.
- [12] 郑重洲, 陈灿. miRNA 与心肌缺血再灌注的研究进展[J]. *现代医药卫生*, 2016, 32(3): 375-377.
- [13] 胡珍, 陈景瑞, 魏静, 等. 冠状动脉结扎制备大鼠心肌梗死模型及评价实验研究[J]. *天津中医药*, 2016, 33(2): 90-95.
- [14] 施洋, 候宝林, 樊登峰, 等. 丹红注射液对急性心肌梗死模型大鼠炎症和心肌形态学的影响[J]. *中国药房*, 2018, 29(19): 2603-2607.
- [15] 郑纺, 王宝利, 张镜宇, 等. 改良 TRIZOL 法从矿化骨组织中提取总 RNA[J]. *天津医药*, 2007, 35(10): 753-754.
- [16] 田汝芳. 二苯乙炔苷对 H₂O₂ 诱导血管内皮细胞粘附分子表达的影响[D]. 衡阳: 南华大学, 2010.
- [17] 吴泉明. 风湿性心脏病房颤患者 microRNA 表达水平的研究及 has-miR-145-5p 靶基因预测与功能探讨[D]. 福州: 福建医科大学, 2014.
- [18] 邹璐, 方泓, 吴银根. 基于基因芯片技术的哮喘六味合剂治疗寒哮型支气管哮喘的靶点发现和机制研究[J]. *天津中医药*, 2017, 34(2): 89-93.
- [19] SUN L, GUO Y, HE P, et al. Genome-wide profiling of long noncoding RNA expression patterns and CeRNA analysis in mouse cortical neurons infected with different strains of borna disease virus[J]. *Genes Dis*, 2019, 6(2): 147-158.
- [20] 叶远征, 周锐, 彭伊. 新疆地区维吾尔族人群高血压患者 microRNA 表达谱分析[J]. *基础医学与临床*, 2016, 36(10): 1374-1380.
- [21] FRIEDMAN RC, FARH KK, BURGE CB, et al. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs[J]. *Genome Res*, 2009, 19(1): 92-105.
- [22] 周斌, 赵芳. miRNA 与心血管疾病关系的研究进展[J]. *医学综述*, 2013, 19(18): 3268-3271.
- [23] 李淑英, 万福生. miRNA 与肿瘤转移的研究进展[J]. *南昌大学学报(医学版)*, 2018, 58(3): 77-81.
- [24] 桑平, 李高峰, 李雪鹏, 等. 应用基因芯片技术研究硫酸氨基葡萄糖对骨性关节炎相关炎症基因表达谱的影响[J]. *中国实验诊断学*, 2019, 23(6): 967-970.
- [25] 时召平, 周晓慧, 徐倩, 等. 丹皮酚对急性心肌梗死模型大鼠心肌病理改变及 TGF- β 、Collagen III 表达的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(24): 98-103.
- [26] 刘妍, 谢敏子, 张璐, 等. 采用网络药理学研究黄芪-葶苈子对治疗心力衰竭的作用机制[J]. *中国药房*, 2019, 30(11): 1513-1518.
- [27] 贺熙, 毕学苑, 王皓, 等. 心血管缺血再灌注损伤钙调控的研究进展[J]. *生理学报*, 2012, 64(3): 321-326.
- [28] 田颖, 祝善俊. PPAR α 与心血管系统重构[J]. *心血管病学进展*, 2007, 28(5): 756-759.
- [29] 林先和, 李隆贵. PPAR γ 在心血管疾病防治中的临床价值[J]. *临床心血管病杂志*, 2004, 20(5): 316-318.
- [30] 马跃东, 李德华. VEGF 在心血管疾病治疗中作用的研究进展[J]. *中国老年学杂志*, 2011, 31(9): 1703-1705.
- [31] 黄鑫, 丁华胜. 丹皮酚对大鼠心肌缺血再灌注损伤中高迁移率族蛋白 B1 和白细胞介素 1 β 及心肌凋亡的影响[J]. *中华老年心血管病杂志*, 2019, 21(5): 522-524.
- [32] 王旭敏, 章恒, 熊英, 等. IL-6、IL-27 与 ST 段抬高型心肌梗死患者冠状动脉介入治疗预后的关系[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2019, 27(3): 221-226.
- [33] 吕志敢, 郭政. 肿瘤坏死因子的研究进展[J]. *山西医科大学学报*, 2006, 37(3): 311-314.
- [34] 王媛媛, 曹建, 邓莉. Toll 样受体 3 在大鼠急性心肌梗死中的作用机制[J]. *中国现代医生*, 2018, 56(1): 36-38.
- [35] FORDJOUR PA, WANG Y, SHI Y, et al. Possible mechanisms of C-reactive protein mediated acute myocardial infarction[J]. *Eur J Pharmacol*, 2015. DOI: 10.1016/j.ejphar. 2015.04.010.
- [36] 葛洪霞, 郑亚安. 趋化因子与急性心肌梗死后炎症反应[J]. *临床荟萃*, 2008, 23(13): 978-980.

(收稿日期: 2019-03-01 修回日期: 2019-08-01)

(编辑: 张元媛)