



DOI:10.11714/j.issn.2095-6959.2014.01.004

http://www.gjbl.net/gjblkx/fileup/PDF/20140129.pdf

心房颤动患者心房组织中差异表达miRNA的初步研究

李闰琴¹, 张磊善², 杨晓燕³, 唐惠芳⁴, 雷小勇³

(1. 南华大学附属南华医院临床药理学室, 湖南 衡阳 421001; 2. 石门县人民医院临床药理学室, 湖南 石门 415300;
3. 南华大学药学与生物科学学院, 湖南 衡阳 421001; 4. 南华大学附属第一医院医务部, 湖南 衡阳 421001)

[摘要] 目的: 应用基因芯片技术研究心房颤动(房颤)患者心房组织中miRNA的表达谱, 分析差异表达的miRNA, 为进一步研究miRNA在房颤发生、发展中的作用奠定基础。方法: 采用miRNA基因芯片技术检测房颤患者和非房颤患者心房组织样本中miRNA的表达水平; 采用实时定量PCR(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)对部分差异表达的miRNA进行验证。结果: MiRNA基因芯片分析结果显示, 与非房颤组织相比, 房颤组织中差异表达的miRNA共有26个, 其中16个miRNA表达上调, 10个miRNA表达下调。qRT-PCR验证结果与芯片结果相一致。结论: MiRNA在房颤患者心房组织中存在差异性表达。

[关键词] 基因芯片; 心房颤动; miRNA; 差异表达

Preliminary study on differentially expressed microRNA in atrial tissues from patients with atrial fibrillation

LI Guiqin¹, ZHANG Leishan², YANG Xiaoyan³, TANG Huifang⁴, LEI Xiaoyong³

(1. Department of Clinical Pharmacy, Affiliated Nanhua Hospital, University of South China, Hengyang Hunan 421001;
2. Department of Clinical Pharmacy, People's Hospital of Shimen County, Shimen Hunan 415300; 3. Institute of Pharmaceutical
and Biological Sciences, University of South China, Hengyang Hunan 421001; 4. Medical Administration
Department, First Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang Hunan 421001, China)

Abstract **Objective:** To analyze the differentially expressed microRNAs (miRNA) in atrial tissues from patients with atrial fibrillation by gene chip technology and to lay a foundation for studying its role in the development of atrial fibrillation. **Methods:** The miRNA gene chip was used to detect the miRNA expression level in patients with atrial fibrillation and without atrial fibrillation. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was used to verify

收稿日期 (Date of reception): 2013-06-23

并列作者: 李闰琴和张磊善为并列第一作者。

通信作者 (Corresponding author): 雷小勇, Email: Leixiaoyong@aliyun.com.

基金项目 (Foundation item): 国家自然科学基金 (30900625/H0205); 衡阳市科技厅科研项目 (2012KS13)。This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (30900625/H0205) and Science Research Project of Department of Science and Technology of Hengyang, Hunan Province (2012KS13), P. R. China.

the differential expression of microRNAs. **Results:** The results of miRNA gene chip showed that there were 26 differentially expressed miRNAs in the atrial fibrillation group compared with the non-atrial fibrillation group. Among them, the expression levels of 16 miRNAs were up-regulated while 10 of them were down-regulated. The result of miRNA gene chip was in consistent with the result of qRT-PCR. **Conclusion:** The differential expression of miRNAs exists in the atrial tissues of patients with atrial fibrillation.

Key words gene chip; atrial fibrillation; miRNA; differential expression

心房颤动(房颤)是临床最常见的慢性持续性心律失常,我国成人患病率为0.89%,65岁以上人群可高于5%^[1]。房颤可产生严重的临床后果,如导致致命的室性心律失常,引发血栓栓塞使卒中危险性升高,加快心力衰竭的进展,使住院率、致残率和病死率增加等。进行性、自我延续性的特点使得房颤的治疗一直以来都是临床研究的难点和热点,至今人们对房颤发病机制的认识仍然有限,针对这些机制所采取的治疗尚不能安全有效治愈房颤。微小RNA(microRNA, miRNA)是近年来发现的一类重要的内源性小RNA分子。它通过抑制靶基因的翻译或促进其mRNA降解来调节基因的表达。由于这种对基因的核心调控作用,它不仅参与细胞的生理过程,如细胞的增殖、分化、代谢、凋亡等^[2],而且也证实与许多疾病有关,包括肿瘤^[3]、心脑血管疾病(心肌肥大、心肌梗死、心律失常、心力衰竭^[4])、糖尿病^[5]等。MiRNA对房颤的参与作用也是最近才受到关注。目前研究认为^[6-7],miRNA可通过调控离子通道蛋白的表达而表现出促房颤或抗房颤的作用。本课题旨在应用 miRNA 基因芯片技术研究房颤患者心房组织中的miRNA 表达谱,以期对今后研究miRNA 在房颤发生、发展中的作用有所帮助。

1 资料与方法

1.1 研究对象

心脏外科手术患者共6名,房颤组患者年龄中位数为51岁,其中男性2例,女性1例。非房颤组患者年龄中位数为46岁,其中男性1例,女性2例。两组病例均系南华大学附属第一医院住院患者。本研究均获得南华大学附属第一医院伦理委员会的批准及患者的知情同意。

1.2 主要试剂与仪器

TRIzol为美国Invitrogen公司产品,miRNeasy mini试剂盒为德国QIAGEN公司产品,miRCURY™HY3™/HYS™ Power标记试剂盒和miRCURY™ LNA 芯片16.0版为丹麦Exiqon公司生产。该miRNA芯片包含1 891个特异性探针、66

个Exiqon特有的miRPlus探针(miRBase数据库不包含的新miRNA信息),可以检测miRBase 16.0数据库中人、小鼠、大鼠及这些物种相关病毒的全部miRNA。CFX96实时定量PCR仪为美国BioRad公司生产。MiRNA 芯片表达谱的检测由上海康成生物有限公司提供支持。

1.3 方法

1.3.1 临床组织样本的收集

手术过程中收集组织样本,立即用液氮冻存,2 h后转入-80℃冰箱保存,直至做miRNA的基因芯片分析。

1.3.2 MiRNA 表达谱芯片检测

首先对冷冻的组织样本进行低温粉碎,加入TRIzol和组织粉末进行匀浆,收集匀浆液,根据操作说明书使用miRNeasy mini试剂盒进行总RNA的纯化。然后用分光光度计检测RNA的浓度和纯度,1%琼脂糖凝胶电泳检测RNA的完整性。上述所有步骤均在无RNA酶污染状态下进行。分离得到的RNA采用miRCURY™HY3™/HYS™ Power标记试剂盒按照操作说明书对miRNA进行标记。标记好的样本与miRCURY™ LNA 芯片(v.16.0)进行杂交。同一样本在每张芯片上重复检测4次。样本杂交后采集图像,图像采用扫描分析软件进行数据分析,通过原始值减去背景值作为修正值,计算修正值≥50的非control探针的中值,以此作为标准化因子对整张芯片的点做标准化处理,再计算出两种样本中miRNA的标准值及比值。房颤组标准值与非房颤组标准值相比高于1.5倍或低于1.5倍即认为存在显著性上调或下调趋势。

1.3.3 差异表达miRNA的实时定量PCR验证

样本总RNA提取及质量检测与芯片分析的总RNA提取及质量检测步骤相同。使用从样本中提取的RNA,反转录合成cDNA,再以cDNA为模板进行扩增。合成的cDNA用于实时定量PCR(quantitative real time PCR, qRT-PCR),设计各目的miRNA引物(引物序列见表1),然后配置qRT-PCR反应体系:dNTP(2.5 mmol/L)2.5 μL,10×PCR缓冲液2.5 μL, Taq聚合酶1 U,终浓度0.25×的水SybergreenI, 10 μmol/L的PCR特异引

物F 1 μL, 10 μmol/L 的PCR特异引物R 1 μL, cDNA 1 μL, 加水至总体积为25 μL。将配置的PCR反应溶液置于RT-PCR仪上进行PCR反应。内参(U6)及各目的miRNA均按以下程序进行PCR: 95 °C, 5 min; 35个PCR循环[95 °C, 10s, 60 °C, 20s, 72 °C, 20 s, 78 °C, 20s(收集荧光)]。为了建立PCR产物的熔解曲线, 扩增反应结束后继续从72 °C缓慢加热到99 °C (每5秒升高1 °C)。得到的数据采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行计算分析。

表 1 PCR 引物

Tbale 1 PCR primers

基因名	双向引物序列
U6	F:5'-GCTTCGGCAGCAGCATATACTAAAAT-3' R:5'-CGCTTCACGAATTGCGTGTCAT-3'
hsa-miR-19b	GSP:5'-ACCTGTGCAAATCCATG-3' R:5'-TGCGTGTCGTGGAGTC-3'
hsa-miR-208a	GSP:5'-GGGATAAGACGAGCAAAA-3' R:5'-CAGTGCCTGTCGTGGAGT-3'
hsa-miR-155	GSP:5'-GGGGTAATGCTAATCGTGA-3' R:5'-CAGTGCCTGTCGTGGAGT-3'

2 结果

2.1 心房组织样本提取的总RNA质量情况

心房组织样本提取总RNA的OD_{260/280}值在1.8~2.0之间。变性琼脂糖凝胶电泳结果可清晰显示18S, 28S和较为模糊的5S三个rRNA条带, 且28S的亮度约为18S的2倍, 说明总RNA无明显降解, 纯度基本达到实验要求(图1)。

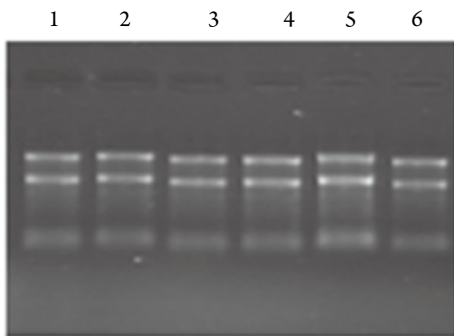


图1 房颤患者与非房颤患者心房组织样本中总RNA凝胶电泳图

Figure 1 Total RNA gel electrophoresis in atrial tissue samples from patients with atrial fibrillation and patients with non-atrial fibrillation

1-3: Three samples from patients with atrial fibrillation; 4-6: Three samples from patients with non-atrial fibrillation

2.2 心房组织样本中差异表达的miRNA

采集各样本的芯片图像(图2), 并对芯片图像数据进行聚类分析(图3), 结果显示: 房颤组比非房颤组上调1.5倍以上的miRNA有 miR-1275, miR-718, miR-664, miR-155等; 房颤组比非房颤组下调1.5倍以上的miRNA有miR-19b, miR-223, miR-100, miR-33a, miR-365等。两组间表达差异的miRNA共26个(图4)。

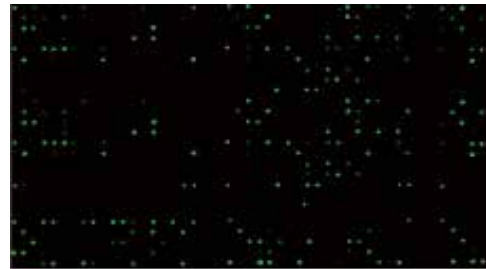


图2 荧光标记的miRNA芯片扫描图(局部)

Figure 2 Fluorescently labeled miRNA chip scan(Partial area)

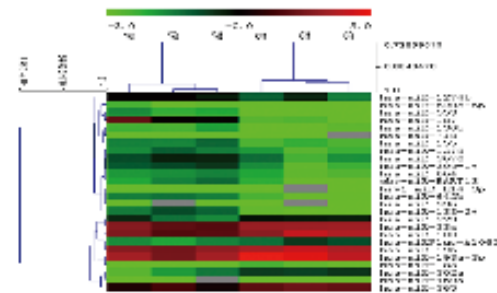


图3 房颤患者与非房颤患者组织中差异表达miRNA的聚类分析

Figure 3 Hierarchical clustering of differentially expressed miRNAs in atrial fibrillation and non-atrial fibrillation

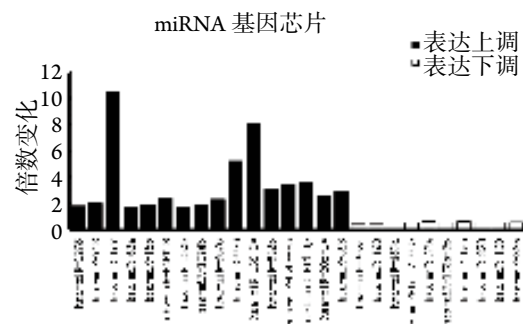


图4 房颤和非房颤组织样本中差异表达的miRNA

Figure 4 Differentially expressed miRNAs in atrial fibrillation and non-atrial fibrillation

Black bars represent upregulated miRNAs and white bars represent downregulated miRNAs

2.3 心房组织差异表达miRNA的验证情况

qRT-PCR的扩增曲线反映了每个样本的Ct值, 溶解曲线反映PCR完成后PCR产物的特异性(图5)。qRT-PCR结果显示: 与非房颤组相比, 房颤组心房组织中miR-19b表达显著下调, miR-155表达显著上调; 而miR-208a略有下调, 但不具有统计学意义, 这个结果与芯片结果相一致(图6)。

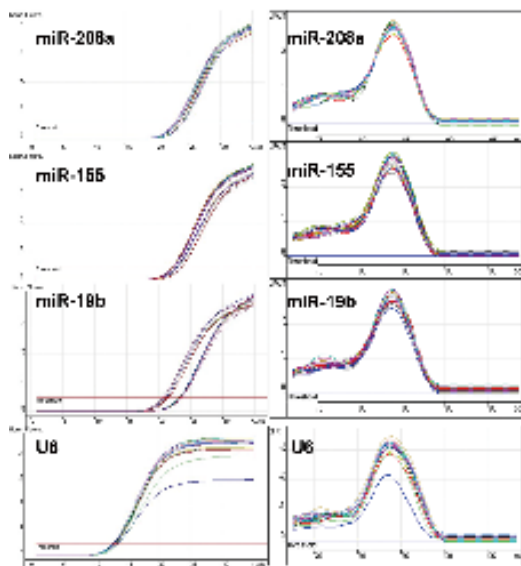


图5 MiRNA与内参U6的扩增曲线(左侧)和溶解曲线(右侧)

Figure 5 Amplification curves (left) and melting curves (right) of miRNA and internal reference U6

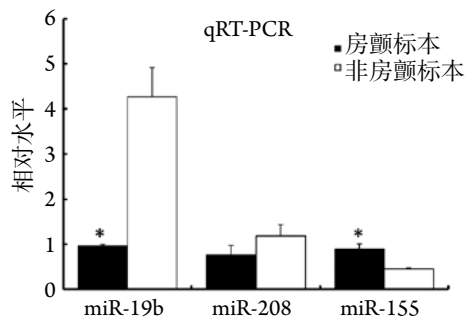


图6 MiR-19b, miR-208a及miR-155在房颤患者和非房颤患者心房组织中的表达

Figure 6 Expression of miR-19b, miR-208a, and miR-155 in atrial tissue from atrial fibrillation patients and non-atrial fibrillation patients

* $P < 0.05$ ($\bar{x} \pm s$, $n=3$) vs atrial tissue from non-atrial fibrillation patients

3 讨论

从miRNA的发现至今, miRBASE(<http://www.mirbase.org>)中已收录miRNA超过16 000条, 其中人类miRNA 1 700多个, miRNA相关领域的研究已成为生命科学领域的重点之一。MiRNA基因的表达具有显著的组织特异性和时序性, 并且在病理状态下miRNA的表达可能有其特殊标记。这些表达标记有助于疾病的诊断和预后。本研究发现房颤患者心房组织较之非房颤患者心房组织, 有26个miRNA的表达发生了显著变化, 其中16个上调, 10个下调。表达上调的miR-644与Lu等^[6]的狗房颤模型心房组织的芯片分析结果相符, 后者发现miR-328的表达也显著上调; 但本研究的芯片结果显示miRNA-328的表达没有显著变化, miR-223的表达却与他们的结果相反。这种差异可能是由于芯片样本组织来源于不同的种属。生物芯片(microarray)技术广泛应用于功能miRNA的初步筛选, 其特点是高通量, 但又存在信息质量稳定性较差、重复性较低的不足, 故对芯片的结果通常需要进行进一步的验证。为了提高芯片结果的可信度, 本研究选取芯片分析结果中表达上调的miR-155和表达下调的miR-19b以及在心脏特异性表达的miR-208a进行了实时定量PCR验证。结果显示miR-155和miR-19b的表达在两种分析方法中是一致的, 并且与Jun等^[8]研究的结论一致。实时定量PCR验证结果同时显示: 房颤组与非房颤组相比, miR-208a的表达略有下调, 但不具有统计学意义。这个结果与芯片分析结果一致。

房颤是临床常见的心律失常之一, 随着社会人口老龄化, 其发病率持续增加, 已严重威胁人类健康和生存。目前有关房颤发病机制的学说众多, 针对这些发病机制采取的治疗措施也各有弊端。基因表达失调作为房颤发病的分子机制, 近期也引起研究者的极大关注。目前研究的目标转向miRNA——一类新发现的基因表达调控因子, 它在转录后水平对基因的表达进行调控。已证实与房颤有关的miRNA有miR-1, miR-26, miR-33及miR-590, 它们被证实表达下调^[7,9-12]; 而miR-208, miR-21, miR-29及miR-30等则被认为它们的靶基因与房颤有潜在关系^[6,13-16]。然而miRNA对基因的调控作用并非单纯的一对一的关系, 而是通过相互协同发挥网络调控作用, 故在多种病理条件下通常有多个miRNA共同发生改变。本研究不足之处在于收集的临床标本有限, 芯片分

析结果并不能代表所有病理条件下房颤患者的 miRNA 表达情况。

探索 miRNA 在房颤中作用的常用策略是先获得房颤动物模型或不同类型房颤患者中的 miRNA 表达标记^[17], 再在不同的房颤动物模型实验中利用已发表的结果或 miRNA 靶基因的理论进行验证, 最后获得 miRNA 在房颤的发生和维持中作用机制的整个图谱。本研究仅仅是对房颤病理状态下 miRNA 的表达情况作初步分析, 其是否参与房颤相关基因的调控还有待进一步的研究。

参考文献

1. 杨宝峰. 离子通道药理学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 244-245.
YANG Baofeng. Ion channel pharmacology [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2005: 244-245.
2. Callis TE, Deng Z, Chen JF, et al. Muscling through the microRNA world [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2008, 233(2): 131-138.
3. Kristen MN, Glen JW. MicroRNA and cancer: past, present, and potential future [J]. *Mol Cancer Ther*, 2008, 7(12): 3655-3660.
4. Divakaran V, Mann DL. The emerging role of in cardiac remodeling and heart failure [J]. *Circ Res*, 2008, 103(10): 1072-1083.
5. Walker MD. Role of microRNA in pancreatic β -cells: where more is less [J]. *Diabetes*, 2008, 57(10): 2567-2568.
6. Lu Y, Zhang Y, Wang N, et al. Control of experimental atrial fibrillation by microRNA-328 [J]. *Circulation*, 2010, 122(23): 2378-2387.
7. Shan H, Zhang Y, Lu Y, et al. Downregulation of miR-133 and miR-590 contributes to nicotine-induced atrial remodeling in canines [J]. *Cardiovasc Res*, 2009, 83(3): 465-472.
8. Xiao J, Liang D, Zhang Y, et al. MicroRNA expression signature in atrial fibrillation with mitral stenosis [J]. *Physiol Genomics*, 2011, 43(11): 655-664.
9. Zhao Y, Ransom JF, Li A, et al. Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2 [J]. *Cell*, 2007, 129(2): 303-317.
10. Voigt N, Trausch A, Knaut M, et al. Left-to-right atrial inward-rectifier potassium current gradients in patients with paroxysmal versus chronic atrial fibrillation [J]. *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 2010, 3(5): 472-480.
11. Dobrev D, Ravens U. Remodeling of cardiomyocyte ion channels in human atrial fibrillation [J]. *Basic Res Cardiol*, 2003, 98(3): 137-148.
12. Hoppe UC, Jansen E, Sudkamp M, et al. Hyperpolarization-activated inward current in ventricular myocytes from normal and failing human hearts [J]. *Circulation*, 1998, 97(1): 55-65.
13. Luo X, Lin H, Xiao J, et al. Downregulation of miRNA-1/miRNA-133 contributes to re-expression of pacemaker channel genes HCN2 and HCN4 in hypertrophic heart [J]. *Biol Chem*, 2008, 283(29): 20045-20052.
14. Lu Y, Xiao J, Lin H, et al. A single anti-microRNA antisense oligodeoxyribonucleotide (AMO) targeting multiple microRNAs offers an improved approach for microRNA interference [J]. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(3): e24.
15. Thum T, Gross C, Fiedler J, et al. MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts [J]. *Nature*, 2008, 456(7224): 980-984.
16. Roy S, Khanna S, Hussain SR, et al. MicroRNA expression in response to murine myocardial infarction: miR-21 regulates fibroblast metalloprotease-2 via phosphatase and tensin homologue [J]. *Cardiovasc Res*, 2009, 82(1): 21-29.
17. Wang Z, Lu Y, Yang B. MicroRNA and atrial fibrillation: new fundamentals [J]. *Cardiovasc Res*, 2011, 89(4): 710-721

(本文编辑 陈丽文)

本文引用: 李闰琴, 张磊善, 杨晓燕, 唐惠芳, 雷小勇. 心房颤动患者心房组织中差异表达 miRNA 的初步研究 [J]. *临床与病理杂志*, 2014, 34(1): 29-33. DOI:10.11714/j.issn.2095-6959.2014.01.004

Cite this article as: LI Guiqin, ZHANG Leishan, YANG Xiaoyan, TANG Huifang, LEI Xiaoyong. Preliminary study on differentially expressed microRNA in atrial tissues from patients with atrial fibrillation [J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2014, 34(1): 29-33. DOI:10.11714/j.issn.2095-6959.2014.01.004