

高通量测序分析冠心病患者外周血 LncRNA 表达差异

李平¹, 徐桂冬², 庞智¹, 翁嘉懿², 尹娟¹, 孙康云^{2*}¹南京医科大学附属苏州医院中心实验室, ²心血管内科, 江苏 苏州 215008

[摘要] **目的:**发现外周血中与冠状动脉粥样硬化性心脏病(冠心病)相关的未知长链非编码RNA(LncRNA)。**方法:**选取临床冠心病组及对照组各3例外周血血浆样本进行LncRNA高通量测序表达谱分析,使用cuffdiff软件获得LncRNA表达谱,计算两组样本间的倍数变化和P-value值,筛选差异表达LncRNA。Q-PCR法验证36对冠心病和正常组外周血浆及外周血单核细胞中的基因表达水平。**结果:**测序结果分析发现差异表达明显的45个上调表达及29个下调表达的LncRNA。Q-PCR法筛选出3个在冠心病患者外周血单核细胞中上调表达明显的LncRNA:uc003pxg.1, ENST00000565257, ENST00000568324。ROC曲线下面积分别为0.812 5, 0.742 4, 0.742 4。以上基因在冠心病患者中上调表达均差异显著,与测序结果一致。**结论:**初步从冠心病患者外周血样本中筛选出上调表达的LncRNA,这为后续深入研究奠定基础,为LncRNA用于冠心病临床早期筛查提供理论依据。

[关键词] 冠心病;长链非编码RNA;高通量测序;外周血单核细胞**[中图分类号]** R541.4**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2018)12-1696-05**doi:** 10.7655/NYDXBNS20181207

Analysis of the expression differences of peripheral blood LncRNA in patients with coronary artery disease by high-throughput sequencing

Li Ping¹, Xu Guidong², Pang Zhi¹, Weng Jiayi², Yin Juan¹, Sun Kangyun^{2*}¹Central Lab, ²Department of Cardiology, Affiliated Suzhou Hospital, NMU, Suzhou 215008, China

[Abstract] **Objective:** To discover unknown LncRNAs associated with Coronary Artery Disease (CAD) in peripheral blood. **Methods:** Three pairs of clinical CAD group and control blood plasma samples were tested in this experiment by high-throughput sequencing methods. Cuffdiff software was used to get the expression profiles of LncRNAs, differentially expressed LncRNAs were identified based on fold change and p-value. Differently expressed genes in peripheral plasma and blood monocytes were verified by Q-PCR in 36 pairs of clinical CAD group and controls. **Results:** The optimal 45 up-regulated and 29 down-regulated LncRNAs were detected. Three LncRNAs uc003pxg.1, ENST00000565257, ENST00000568324 were up-regulated obviously in peripheral blood mononuclear cells of CAD patients. Area under the ROC curve results of uc003pxg.1, ENST00000565257, ENST00000568324 were 0.812 5, 0.742 4, 0.742 4 respectively. These genes were all up-regulated in CAD patients obviously and these outcomes were consistent with the sequencing results. **Conclusion:** The ideal LncRNAs were detected preliminarily. This founding lays the foundation for further research, and provides theoretical basis of LncRNA using for CAD early clinical screening.

[Key words] coronary artery disease; LncRNAs; high-throughput sequencing; peripheral blood mononuclear cells

[Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(12): 1696-1700]

冠状动脉粥样硬化性心脏病简称冠心病(coronary artery disease, CAD)是全世界范围主要死亡原因之一^[1],有很多危险因素被证实与冠心病的发生相关,包括男性、肥胖、吸烟、糖尿病、高血压、高血

[基金项目] 苏州市卫生和计划生育委员会临床重点病种诊疗技术专项(LCZX201610)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: skywj66@163.com

脂以及相关遗传因素^[2]。在中国,冠心病致死率占总死亡率超过40%^[3]。

长链非编码RNA(LncRNA)在冠心病等心脏疾病诊断及判断预后方面也已经有很多相关研究。利用基因芯片、测序以及Q-PCR验证已鉴定出某些与冠心病相关的LncRNA,例如与细胞凋亡、炎症以及相关免疫反应的CoroMarker^[4]、lincRNA-p21^[5]、

H19^[6]。敲除与男性Y染色体相关的lnc-KDM5D-4,会增加男性冠状动脉粥样硬化的发生^[7]。本研究采用高通量测序的方法从临床冠心病患者外周血中筛选出与正常组差异表达的LncRNA,寻找冠心病生物标志物,并进一步深入研究基因的作用机制,以期为临床实现对冠心病的早发现、早治疗提供新的靶标,也为深入研究冠心病发生的分子机制提供理论基础。

1 对象和方法

1.1 对象

选取2017年1月—2018年5月就诊于苏州市立医院北区心内科经介入冠脉造影确诊为冠心病的患者36例,冠心病组选取标准为冠状动脉造影显示左主干(left main artery, LM)、左前降支(left anterior descending artery, LAD)、左回旋支(left circumflex artery, LCX)、右冠状动脉(right coronary artery, RCA)中至少有1支血管狭窄 $\geq 50\%$ 的住院患者^[8]。正常组收集体检样本36例,经病史调查、血常规、心电图、肝肾功能等检查,排除心脑血管疾病,癌症及其他重大疾病。排除标准:合并肝、肾、造血系统等严重原发性疾病,并发急性感染、外伤或其他手术,心肌梗死、脑梗死、癌症及其他重大疾病。

RNAiso PLUS试剂、反转录试剂盒PrimeScript™ RT Master Mix、实时荧光定量PCR试剂盒SYBR Premix Ex TaqII (Tli RNaseH Plus) (TaKaRa公司,日本)。TRIzol™ LS Reagent (Thermo Fisher公司,美国),Ficoll-Paque™ Plus (GE Healthcare公司,美国),实时荧光定量PCR仪Light Cycler480II (Roche公司,瑞士),微量核酸分析仪(杭州奥盛仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 标本采集

患者于入院24 h内清晨、正常组志愿者当日清晨EDTA真空抗凝采血管采血4 mL,置于4℃冰箱静置30 min,1 500 r/min离心10 min吸取血浆,血浆进一步于4℃、12 000 r/min离心10 min,去掉细胞碎片,利用TRIzol™ LS Reagent提取血浆RNA, TaKaRa反转录试剂将RNA反转录为cDNA备用。血细胞用Ficoll-Plus分离有核细胞,加入RNAiso PLUS提取RNA,反转录试剂将RNA反转录为cDNA备用。

1.2.2 高通量测序方法筛选差异表达的LncRNA

选取冠心病组和正常对照组各3例外周血血浆样本进行LncRNA-Seq高通量基因检测,样本RNA提取及质检,基因检测及数据分析由上海云序生物科技有限公司完成。经过Illumina HiSeq测序仪测

序,获得原始数据。使用cuffdiff软件计算并检测两组样品间的差异表达LncRNA。

1.2.3 Q-PCR法验证LncRNA差异表达

依据cuffdiff软件获得的数据,根据 P 值 ≤ 0.05 越小,Fold Change(倍数变化)值越大的标准选取差异表达的LncRNA,使用Primer3进行引物设计,由于外周血游离LncRNA主要来自于外周血单核细胞,实验选取正常组、冠心病组外周血血浆以及外周血单核细胞各36例进行验证。同时对之前研究发现的在冠心病患者血浆及单核细胞中上调表达的LncRNA coroMarker^[9]做对比验证。使用SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa)实时荧光定量试剂盒进行荧光定量PCR检测,内参为: β -actin (ACTB)。总反应体系为20 μ L, SYBR Premix Ex Taq II (2 \times) 10 μ L, PCR正向引物0.8 μ L, PCR反向引物0.8 μ L,以反转录的cDNA为模板2 μ L,双蒸水6.4 μ L,每组设3个平行,于罗氏Light Cycler480II仪器进行扩增反应。扩增条件为95℃预变性30 s;95℃反应5 s和60℃反应30 s,循环40次;95℃反应5 s和60℃反应1 min,95℃分析溶解曲线。根据溶解曲线分析引物的特异性,以 β -actin做内参,根据 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算基因相对定量的表达。

1.3 统计学方法

利用GraphPad Prism7对Real Time PCR数据结果进行表达量差异分析以及对数据进行ROC曲线分析,两组间数据比较采用 t 检验方法, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 样本选取与信息统计

实验选取冠心病组及对照组各36例进行样本检测,信息统计见表1,利用SPSS卡方检验和 t 检验进行 P 值计算。数据统计发现冠心病患者中75%患有高血压,38.9%患有糖尿病,50%有吸烟史,与对照组相比有显著性差异。另外,冠心病患者中男性较女性多,血脂相关指标在冠心病患者中没有明显增高的趋势,高密度脂蛋白(HDL)和载脂蛋白B(ApoB)在冠心病患者中明显降低。

2.2 高通量数据分析结果

根据 P 值 ≤ 0.05 , FPKM ≥ 0.1 的标准筛选出了45个上调表达及29个下调差异表达明显的LncRNA,并根据LncRNA与邻近基因的关系,确定预测LncRNA靶基因,使用差异表达LncRNA临近靶基因进行KEGG通路分析(图1),以注释并推测这

些 LncRNA 参与的通路。以 $P \leq 0.05$ 作为显著富集的阈值。在冠心病外周血中上调表达的 LncRNA 主要参与尼古丁、可卡因依赖性,长时增强效应,神经

突触,老年痴呆以及免疫等通路方面的反应。下调表达的 LncRNA 主要参与糖类、脂类、氨基酸、促性腺激素、胆碱代谢以及 HIF-1 信号通路等。

表1 CAD患者与对照组临床信息统计

Table 1 The clinical characteristics of CAD patients and controls

临床指标	高通量测序样本		临床验证样本		P值
	冠心病组(n=3)	对照组(n=3)	冠心病组(n=36)	对照组(n=36)	
年龄(岁)	60.33	57.78	67.28	63.97	0.156
男性[n(%)]	2	2	23(63.9)	26(72.2)	0.448
体质指数(kg/m ²)	24.32	23.99	25.08	25.62	0.268
糖尿病[n(%)]	0	0	14(38.9)	4(11.1)	0.006
高血压[n(%)]	1	0	27(75.0)	9(25.0)	0.000
胆固醇(mmol/L)	3.56	3.69	4.22	4.55	0.067
甘油三酯(mmol/L)	1.57	1.77	1.92	1.69	0.592
高密度脂蛋白(mmol/L)	0.98	1.08	1.09	1.23	0.032
低密度脂蛋白(mmol/L)	2.13	2.21	2.59	2.63	0.324
极低密度脂蛋白(mmol/L)	0.34	0.5	0.55	0.59	0.746
载脂蛋白A1(g/L)	1.32	1.11	1.28	1.35	0.299
载脂蛋白B(g/L)	0.71	0.69	0.79	0.97	0.001
脂蛋白a(mg/L)	200.67	162.09	268.79	202.92	0.302
胆碱酯酶(KU/L)	8.41	8.74	7.91	8.47	0.164
总胆汁酸(μmol/L)	5.23	5.15	6.49	4.76	0.119
吸烟[n(%)]	0	0	18(50.0)	11(30.6)	0.001
饮酒[n(%)]	0	0	6(16.7)	5(13.9)	0.116

2.3 Real time-PCR 验证基因表达

对 45 个上调表达及 29 个下调表达的每个 LncRNA 各设计 3 对引物,验证发现其中 3 个在外周血单核细胞中明显上调的 LncRNA: uc003pxg.1, ENST00000565257 和 ENST00000568324, 参考文献 [4] 中报道的上调表达的 LncRNA CoroMarker 做对比验证。利用 Q-PCR 法进行表达量验证, GraphPad Prism7 数据分析结果见图 2。发现 CoroMarker、uc003pxg.1、ENST00000565257 和 ENST00000568324

在冠心病患者中都较正常对照组上调表达。CoroMarker 与文献 [4] 报道一致, uc003pxg.1、ENST 00000565257 和 ENST00000568324 也与测序结果一致。

2.4 ROC 曲线分析

为了进一步分析差异表达的 LncRNA 是否具有临床早期筛查诊断冠心病潜力,进行了 ROC 曲线分析(图 3)。ROC 曲线下面积(AUC): CoroMarker、uc003pxg.1、ENST00000565257、ENST00000568324 分别为 0.860 5、0.812 5、0.742 4、0.742 4,这 4 种 LncRNA

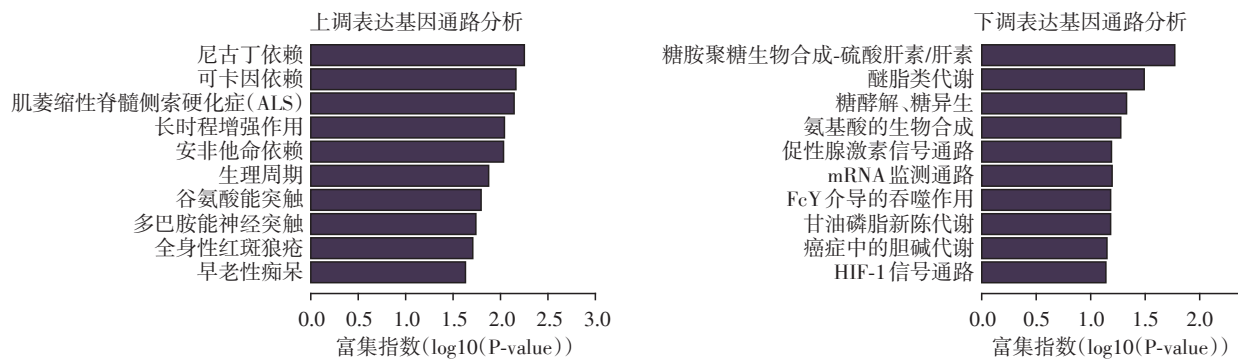
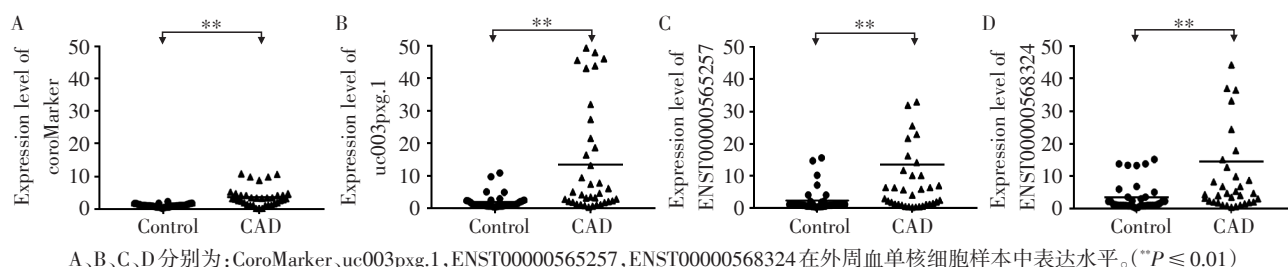


图1 差异表达LncRNA靶基因KEGG通路
Figure 1 KEGG pathway of LncRNAs target genes



A、B、C、D分别为:CoroMarker、uc003pxg.1、ENST00000565257、ENST00000568324在外周血单核细胞样本中表达水平。(** $P \leq 0.01$)

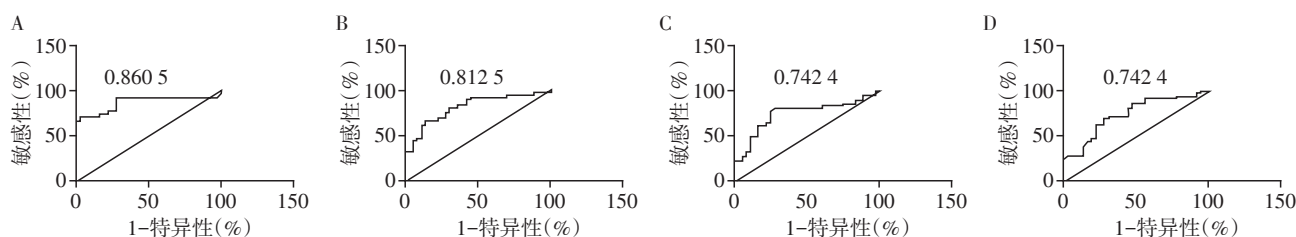
图2 LncRNA在外周血单核细胞样本中差异表达统计

Figure 2 Statistics of differential expression of LncRNAs in peripheral blood monocytes samples

cRNA的AUC均在0.7~0.9之间,具有一定的诊断意义。uc003pxg.1较ENST00000565257、ENST00000568324具有更高的诊断准确性。

3 讨论

越来越多的研究发现非编码RNA与冠心病的



A、B、C、D分别为:CoroMarker、uc003pxg.1、ENST00000565257、ENST00000568324。

图3 ROC曲线分析LncRNA差异表达

Figure 3 ROC curve analyses of differential LncRNAs expression

发生发展密切相关,在疾病的诊断和预测方面具有重要价值,并且成为近几年国内外研究的重点之一。本研究利用高通量测序的方法以及分析差异表达基因靶基因的通路,发现在冠心病外周血中差异表达的LncRNA主要参与药物依赖、神经突触、糖类、脂类、氨基酸代谢等信号通路。同时已有相关研究发现LncRNA参与这些类似代谢通路,例如LncRNA MEG3表达水平在冠心病患者中较对照组下调。过表达MEG3能够抑制miR-21的表达,从而抑制内皮细胞EC的增殖和减少I型胶原蛋白、V型胶原和蛋白聚糖的表达^[10]。下调LncPPAR δ 表达会导致过氧化物酶活化受体 δ (PPAR δ)、脂肪分化相关蛋白(ADRP)和血管生成素4(ANGPTL4)的表达降低^[11]。这些差异表达的LncRNA参与的通路可能与冠心病发生的主要原因例如吸烟、高血压、糖尿病等有一定的关联。

研究发现单核细胞在冠心病和动脉粥样硬化斑块的发病及进展中发挥着重要的作用,在CAD的早期阶段,大量的单核细胞会附着在动脉硬化区的内皮细胞上^[12]。本实验利用Q-PCR法从外周血单核细胞中筛选出3个在冠心病患者中上调表达明显的LncRNA: uc003pxg.1, ENST00000565257, ENST0

0000568324。接下来可以根据冠心病相关因素例如炎症、脂类以及细胞凋亡等方面做进一步的细胞实验,寻找与LncRNA相关的microRNA以及相关靶基因,深入分析基因作用机制。

研究初步筛选出了差异表达的LncRNA,但作为临床标志物具有很大的局限性,研究选取的是小范围地区内的患者,其他地区乃至其他种族是否具有同样差异还未可知。另外,对象接受造影检查,在其他类心脏性疾病中是否也具有诊断价值还需进行下一步更加深入的验证。本次研究的创新点在于利用高通量测序而不是芯片筛选差异表达LncRNA,能够发现更多未知的与冠心病相关的LncRNA。并且LncRNA作为目前热门的研究对象,还未能真正应用于临床,对于LncRNA与临床相结合的研究还具有非常大的科研价值。

[参考文献]

- [1] Hata J, Kiyohara Y. Epidemiology of stroke and coronary artery disease in Asia [J]. *Circ J*, 2013, 77 (8) : 1923-1932
- [2] Greenland P, Alpert JS, Beller GA, et al. 2010 ACCF/AHA guideline for assessment of cardiovascular risk in asymptomatic adults: a report of the American College of

- Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines [J]. *J Am Coll of Cardiol*, 2010, 56(25):e50-103
- [3] Gao R, Yang Y, Han Y, et al. Bioresorbable vascular scaffolds versus metallic stents in patients with coronary artery disease [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2015, 66(21):2298-2309
- [4] Cai Y, Yang Y, Chen X, et al. Circulating 'LncRNA OT-THUMT00000387022' from monocytes as a novel biomarker for coronary artery disease [J]. *Cardiovasc Res*, 2016, 112(3):714-724
- [5] Wu G, Cai J, Han Y, et al. LincRNA-p21 regulates neointima formation, vascular smooth muscle cell proliferation, apoptosis and atherosclerosis by enhancing p53 activity [J]. *Circulation*, 2014, 130(17):1452-1465
- [6] Han Y, Xu H, Cheng J, et al. Downregulation of long non-coding RNA H19 promotes P19CL6 cells proliferation and inhibits apoptosis during late-stage cardiac differentiation via miR-19b-modulated Sox6 [J]. *Cell Biosci*, 2016, 6(1):58
- [7] Molina E, Chew GS, Myers SA, et al. A novel Y-Specific long Non-Coding RNA associated with cellular lipid accumulation in HepG2 cells and Atherosclerosis - related genes [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):16710
- [8] Wenger NK. 2011 ACCF/AHA focused update of the guidelines for the management of patients with Unstable Angina/Non-ST-Elevation Myocardial Infarction (updating the 2007 Guideline): highlights for the clinician [J]. *Clin Cardiol*, 2012, 35(1):3-8
- [9] Yang Y, Cai Y, Wu G, et al. Plasma long non-coding RNA, CoroMarker, a novel biomarker for diagnosis of coronary artery disease [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2015, 129(8):675-685
- [10] Wu Z, He Y, Li D, et al. Long noncoding RNA MEG3 suppressed endothelial cell proliferation and migration through regulating miR-21 [J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(7):3326
- [11] Cai Y, Yang Y, Chen X, et al. Circulating "LncPPARδ" from monocytes as a novel biomarker for coronary artery diseases [J]. *Medicine*, 2016, 95(6):e2360
- [12] Knorr M, Münzel T, Wenzel P. Interplay of NK cells and monocytes in vascular inflammation and myocardial infarction [J]. *Front Physiol*, 2014, 5:295
- [收稿日期] 2018-08-10

(上接第 1673 页)

- hancing therapeutic efficacy for breast cancer [J]. *Biomaterials*, 2018, 173:58-70
- [8] Yan C, Yang M, Li Z, et al. Suppression of orthotopically implanted hepatocarcinoma in mice by umbilical cord-derived mesenchymal stem cells with sTRAIL gene expression driven by AFP promoter [J]. *Biomaterials*, 2014, 35(9):3035-3043
- [9] Yu B F, Wu J, Zhang Y, et al. Ultrasound-targeted HSVtk and Timp3 gene delivery for synergistically enhanced anti-tumor effects in hepatoma [J]. *Cancer Gene Ther*, 2013, 20(5):290-297
- [10] Yuan C, An Y, Zhang J, et al. Magnetic nanoparticles for targeted therapeutic gene delivery and magnetic-inducing heating on hepatoma [J]. *Nanotechnology*, 2014, 25(34):345101
- [11] Zhang H, Hou X, Lin M, et al. The study on the preparation and characterization of gene-loaded immunomagnetic albumin nanospheres and their anti-cell proliferative effect combined with magnetic fluid hyperthermia on GLC-82 cells [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2015, 9:6445-6460
- [12] Abdalkader R, Kawakami S, Unga J, et al. Evaluation of the potential of doxorubicin loaded microbubbles as a therapeutic modality using a murine tumormodel [J]. *Acta Biomater*, 2015, 19:112-118
- [13] Yang H, Zhou T, Cai W, et al. Novel dual-mode nanobubbles as potential targeted contrast agents for female tumors exploration [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(10):1-11
- [14] Tian Y, Liu Z, Zhang L, et al. Apatinib-loaded lipid nanobubbles combined with ultrasound-targeted nanobubble destruction for synergistic treatment of HepG2 cells in vitro [J]. *Onco Targets Ther*, 2018, 11:4785-4795
- [15] Tong HP, Wang LF, Guo YL, et al. Preparation of protamine cationic nanobubbles and experimental study of their physical properties and in vivo contrast enhancement [J]. *Ultrasound Med Biol*, 2013, 39(11):2147-2157
- [16] Yang H, Xue Shen, Yan J, et al. Charge-reversal functionalized PLGA nanobubbles as theranostic agents for ultrasonic imaging-guided combination therapy [J]. *Biomater Sci*, 2018, 6(9):2426-2439
- [17] Ling L, Qiang W, Li HB, et al. Evaluation of microbubbles as contrast agents for ultrasonography and magnetic resonance imaging [J]. *PloS One*, 2012, 7(4):e34644
- [18] Zhao F, Tian J, An L, et al. Prognostic utility of gene therapy with herpes simplex virus thymidine kinase for patients with high-grade malignant gliomas: a systematic review and meta analysis [J]. *J Neurooncol*, 2014, 118(2):239-246
- [收稿日期] 2018-07-27