

· 临床医学 ·

## 氯吡格雷低反应冠心病患者血小板 miRNA 表达谱差异

李济民<sup>1,2</sup>, 朱 辉<sup>1,3</sup>, 徐 可<sup>1</sup>, 王 飞<sup>1</sup>, 杨 璐<sup>1</sup>, 叶泽康<sup>1</sup>, 谈楚楚<sup>1</sup>, 顾 倩<sup>1</sup>, 王 静<sup>1</sup>, 李春坚<sup>1\*</sup><sup>1</sup>南京医科大学第一附属医院心脏科, 江苏 南京 210029; <sup>2</sup>阜阳市第五人民医院心血管内科二病区, 安徽 阜阳 236000;<sup>3</sup>南京医科大学附属常州第二人民医院老年病科, 江苏 常州 213000

**[摘要]** 目的:探讨氯吡格雷低反应(clopidogrel low response, CLR)与正常反应的冠心病(coronary artery disease, CAD)患者血小板 miRNA 表达谱的差异。方法:连续入选 78 例接受氯吡格雷治疗(负荷剂量 300 mg, 维持剂量 75 mg/d)至少 5 d 的冠心病患者,通过光学血小板聚集仪检测所有患者二磷酸腺苷诱导的血小板聚集率(platelet aggregation induced by adenosine diphosphate, PL<sub>ADP</sub>), PL<sub>ADP</sub> 大于上四分位数的 19 例患者为 CLR 组, 小于下四分位数的 19 例患者为对照组。提取所有入选患者纯化血小板中的总 RNA, 将上述两组患者的总 RNA 分别混为 2 个总 RNA 池, 通过 RNA 变性电泳质检后, 采用高通量测序筛选两组患者血小板 miRNA 的差异表达谱。通过靶基因预测软件 TargetScan、miRanda、PITA 和 miRWalk 对差异 miRNA 的功能进行预测。结果:两组患者临床基线资料无统计学意义。CLR 组 PLADP 显著高于对照组( $P < 0.000 1$ )。通过 RNA 变性电泳检测两组总 RNA 未见明显降解。高通量测序发现 95 种血小板 miRNA 表达上存在显著差异, 其中显著性下调且差异倍数 > 2 的拷贝数前 20 位 miRNA 依次是 hsa-miR-300、hsa-miR-151b、hsa-miR-1299 等。通过至少 2 个靶基因预测软件印证 8 个 miRNA (hsa-miR-188-5p、hsa-miR-6874-3p、hsa-miR-218-5p、hsa-miR-3150b-3p、hsa-miR-1288-3p、hsa-miR-1299、hsa-miR-6862-5p、hsa-miR-4421) 对血小板聚集关键蛋白有调控作用。结论:CLR 患者中存在血小板 miRNA 的显著下调, 本研究筛选出 8 个对血小板聚集关键蛋白可能有调控作用的 miRNA, 可能成为个体化抗血小板治疗提供新的干预手段。

**[关键词]** 冠心病; 氯吡格雷低反应性; 血小板; 微小 RNA; 表达谱**[中图分类号]** R541.4**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2021)08-1178-07**doi:** 10.7655/NYDXBNS20210811

### Differential expression profile of platelet miRNA in patients with coronary artery disease and clopidogrel low response

LI Jimin<sup>1,2</sup>, ZHU Hui<sup>1,3</sup>, XU Ke<sup>1</sup>, WANG Fei<sup>1</sup>, YANG Lu<sup>1</sup>, YE Zekang<sup>1</sup>, TAN Chuchu<sup>1</sup>, GU Qian<sup>1</sup>, WANG Jing<sup>1</sup>, LI Chunjian<sup>1\*</sup><sup>1</sup>Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029;<sup>2</sup>Cardiovascular Second Area, Fuyang Fifth People's hospital, Fuyang 236000; <sup>3</sup>Department of Geriatrics, the

Affiliated Changzhou No.2 People's Hospital of Nanjing Medical University, Changzhou 213000, China

**[Abstract]** **Objective:** This study aims to detect the differential expression profile of platelet miRNAs (miRNA) in patients with coronary artery disease (CAD) and clopidogrel low response (CLR). **Methods:** A total of 78 CAD patients with clopidogrel treatment (loading dose 300 mg and maintenance dose 75 mg/d) at least 5 days were consecutively enrolled. Adenosine diphosphate (ADP) induced platelet aggregation (PL<sub>ADP</sub>) was tested by light transmittance aggregation (LTA). Nineteen patients whose PLADP were at upper quartile were defined as CLR group, while another nineteen patients at lower quartile were selected as control. The total RNA of leukocyte depleted platelet (LDP) were extracted from each of the selected patients, and the extracted total RNA from the two groups were mixed into two RNA pools respectively. After two RNA pools were qualified by RNA denaturation electrophoresis, the differential expression profiles of platelet miRNAs were screened by high-throughput sequencing. The target gene predicting software including TargetScan, miRanda, PITA and miRWalk were adopted to explore the miRNAs that modulate the key protein in the process of platelet aggregation. **Results:** Baseline clinical characteristics of the two groups showed no significant difference. The PLADP level of the CLR

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81170181);江苏省医学重点人才(ZDRCA2016013)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: lijay@njmu.edu.cn

group was significantly higher than that of the control group ( $P < 0.000 1$ ). The total RNA pools of the two groups were detected by RNA denaturation electrophoresis and no significant degradation was found. 95 platelet miRNAs were differently expressed by high-throughput sequencing between the two groups, among which 20 miRNAs (hsa-miR-300, hsa-miR-151b, hsa-miR-1299, et al) were 2-fold down-regulated in CLR patients, and 8 miRNAs (hsa-miR-188-5p, hsa-miR-6874-3p, hsa-miR-218-5p, hsa-miR-3150b-3p, hsa-miR-1288-3p, hsa-miR-1299, hsa-miR-6862-5p, hsa-miR-4421) were identified by at least two target gene predicting software as having regulatory effects on key proteins associated with platelet aggregation. **Conclusion:** There is a significant downregulation of platelet miRNAs in CLR patients. We successfully screen 8 miRNAs that could modulate the key protein in the process of platelet aggregation, which is warrant to be investigated in future study.

[Key words] coronary artery disease; clopidogrel low response; platelet; miRNA; expression profile

[J Nanjing Med Univ, 2021, 41(08):1178-1184]

抗血小板治疗是冠心病(coronary artery disease, CAD)药物治疗的基石。作为二磷酸腺苷(adenosine diphosphate, ADP)受体拮抗剂,氯吡格雷被广泛应用于急性冠脉综合征(acute coronary syndrome, ACS)或冠状动脉支架植入后的CAD患者<sup>[1-2]</sup>。但研究发现,氯吡格雷的抗血小板疗效存在显著的个体差异,20%以上的患者在服用常规剂量的氯吡格雷时血小板聚集功能未被有效抑制<sup>[3]</sup>,称为氯吡格雷低反应性(clopidogrel low response, CLR)或氯吡格雷抵抗(clopidogrel resistance, CR)<sup>[4]</sup>。研究显示,CLR患者的支架内血栓、心肌梗死和全因死亡的风险显著增加<sup>[5]</sup>。

microRNA(miRNA)是一类长18~22 nt的非编码RNA,其可通过与靶信使核糖核酸(messenger RNA, mRNA)特异性结合,在转录后水平调控靶基因的表达。Nagalla等<sup>[6]</sup>发现健康志愿者中血小板高反应组与正常反应组间血小板miRNA存在表达差异,miRNA可以通过与mRNA结合来调控血小板蛋白的表达,从而影响血小板活性。本研究旨在通过筛查CLR患者血小板miRNA表达的差异,探寻对血小板聚集关键蛋白(P2Y<sub>12</sub>受体、Gi2 $\alpha$ 蛋白、血小板糖蛋白II b/III a受体)可能有调控作用的miRNA,为个体化抗血小板治疗提供新的靶标。

## 1 对象和方法

### 1.1 对象

连续入选2015年4月—8月在南京医科大学第一附属医院心血管内科经常规氯吡格雷治疗(负荷剂量300 mg,维持剂量75 mg/d)至少5 d的CAD患者78例。入选标准:①年龄18~80岁;②入院诊断为急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)、

不稳定型心绞痛(unstable angina pectoris, UA)或稳定型心绞痛(stable angina pectoris, SA);③签署知情同意书。排除标准:①氯吡格雷过敏或不耐受者;②高出血风险患者(如血小板计数 $<80 \times 10^9/L$ 、活动性消化性溃疡、近期脑外伤史等);③计划服用华法林或可能干扰氯吡格雷[如细胞色素P450 3A(cytochrome P450 3A, CYP3A)抑制剂或CYP3A诱导剂等]抗血小板疗效的药物。本研究已在clinicaltrials.gov网站注册, ID号: NCT02447809。

光学血小板聚集仪(light transmittance aggregometry, LTA; 540VS, Chronolog公司, 美国),全自动血液分析仪(XS-500i, Sysmex公司, 日本),高速离心机(Centrifuge 5810 R)、移液枪(Eppendorf公司, 德国),反应杯、搅拌磁棒(Chronolog公司, 美国),漩涡震荡仪(上海青浦沪西仪器厂), pH计(上海仪电科学仪器股份有限公司),去离子水制水设备(Merck Millipore公司, 德国),电泳仪(Bio-Rad公司, 美国),凝胶成像系统(上海天能科技有限公司), Agilent 2200TapeStation (Agilent Technologies公司, 美国), Qubit 2.0(Life Technologies公司, 美国), Hiseq 2500(Illumina公司, 美国),台式低温高速离心机、分光光度计、水浴锅(Thermo Fisher Scientific公司, 美国),磁珠分选磁铁架(Miltenyi Biotec公司, 德国),电子天平(Mettler Toledo公司, 瑞士),净化工作台(苏州安泰空气技术有限公司),制冰机(SANYO公司, 日本), Illumina Hiseq 2500测序仪(Illumina公司, 美国)。

TRIzol (Invitrogen公司, 美国), mirVana™ miRNA Isolation Kit (Life Technologies公司, 美国), CD45 MicroBeads, human (Miltenyi Biotec公司, 德国), Small RNA Sample Prep Kit (Illumina公司, 美

国),终浓度为5  $\mu\text{mol/L}$ 的ADP(Chronolog公司,美国),氢氧化钠、盐酸、冰醋酸(上海凌峰化学试剂有限公司),乙二胺四乙酸、琼脂糖、MOPS、PBS粉剂(合肥Biosharp公司),枸橼酸钠(西陇化工股份有限公司),无水乙醇、甲醛(上海国药集团化学试剂有限公司),DEPC水(Invitrogen公司,美国),甲酰胺(上海麦克林生化科技有限公司),5 mL枸橼酸钠1:9抗凝的采血管(BD公司,美国),CD45抗体、LD磁珠分选柱(Miltenyi Biotec公司,德国),0.22  $\mu\text{m}$ 无茵过滤器(Merck Millipore公司,德国)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 血小板聚集率测定

在患者服用氯吡格雷后2.5 h,用含3.2%枸橼酸钠抗凝管采集肘静脉血样8 mL,并于标本采集后2 h内完成LTA法血小板聚集功能检测,具体方法如下:在常温下将采集的血标本以200 g离心8 min,用移液枪缓慢抽取离心后血标本的上清液以获取富血小板血浆(platelet rich plasma, PRP);用全自动血液分析仪检测PRP中的血小板计数;将吸取PRP后剩余的的血样常温下以2 460 g离心10 min,用移液枪缓慢抽取血标本的上清液以获取贫血小板血浆(platelet poor plasma, PPP);用PPP作为稀释液将PRP中的血小板浓度稀释至 $250 \times 10^9/\text{L}$ (如PRP中的血小板浓度在 $250 \times 10^9/\text{L}$ 以下,则无需稀释);向PRP中加入2.5  $\mu\text{L}$ 终浓度为5  $\mu\text{mol/L}$ 的ADP,测定8 min最大血小板聚集率。

参照CREST研究,将ADP诱导的血小板聚集率(platelet aggregation induced by adenosine diphosphate,  $\text{PL}_{\text{ADP}}$ )大于上四分位数定义为氯吡格雷低反应性<sup>[7]</sup>,小于下四分位数者设为对照组。

### 1.2.2 血小板纯化与RNA提取及变性电泳

在患者进行冠状动脉造影时,经鞘管采集15 mL动脉血于枸橼酸钠抗凝管,以200 g离心10 min,移取上层PRP,用免疫磁珠法分选白细胞与血小板比例低于1:5 000 000的纯化血小板(具体操作参考CD45 MicroBeads LD磁珠分选柱的说明书)。用TRIzol裂解上述纯化血小板,再用mirVana™ miRNA Isolation Kit提取裂解后血小板中的总RNA(具体操作参考TRIzol及mirVana™ miRNA Isolation Kit说明书),最终将每份样本的总RNA溶解于20  $\mu\text{L}$ 无RNase的DEPC水中置-80  $^{\circ}\text{C}$ 冰箱储存。通过Nanodrop分光光度计检测每个样本总RNA的浓度及260 nm/280 nm的吸光度(OD)比值,确认每个总RNA样本的OD比值均在1.8~2.0之间。按上述分

组结果,将氯吡格雷低反应组和对照组患者的总RNA分别混为2个RNA池。分别从2组RNA池中取RNA样本1.5  $\mu\text{g}$ ,按照相应配比加入10 $\times$ MOPS、甲醛、甲酰胺并混匀,用1%琼脂糖凝胶进行变性电泳。

### 1.2.3 测序文库的构建及测序

每例样本取1.5  $\mu\text{g}$ 总RNA行15%尿素聚丙烯酰胺凝胶电泳,电泳后对18~32 nt片段进行切割、洗脱、纯化回收。采用Small RNA Sample Prep Kit(Illumina,美国)构建小RNA文库。纯化后的小RNA序列采用T4 RNA连接酶将接头引物分别连接至2个文库的序列5'端和3'端,逆转录合成cDNA第一链,PCR建立小RNA文库。利用Illumina HiSeq 2500测序平台对该文库进行高通量测序。

### 1.2.4 小RNA数据处理和信息分析

测序所得长度为51 nt的小RNA序列通过去接头、去除低质量和污染序列,最终获得18~32 nt的高质量小RNA序列。统计小RNA的种类、数量及长度分布,初步判断小RNA质量。采用mirdeep2软件将所得小RNA序列与参考基因组进行比对分析,再将匹配序列分别与GenBank和Rfam 10.0数据库进行对比,筛选出miRNA序列并分类注释,分析其表达情况。

### 1.2.5 miRNA差异表达分析

将样本中的miRNA表达量标准化为TPM(tags per million),应用EdgeR软件对2对样本已知miRNA表达差异分析统计。将“差异倍数”绝对值 $\geq 2$ 且 $P < 0.05$ 的miRNA定义为差异表达的miRNA。差异倍数= $\text{Log}_2$ (氯吡格雷低反应组miRNA标准化的表达量/对照组miRNA标准化的表达量)。

## 1.3 统计学方法

计量资料经正态检验符合正态分布者采用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组计量资料的比较采用独立样本的 $t$ 检验;不符合正态性分布者用中位数与四分位数 $[M(P_{25}, P_{75})]$ 表示,组间比较采用非参数检验中的秩和检验;计数资料以百分率表示,计数资料比较采用 $\chi^2$ 检验或Fisher's精确检验。所有数据采用SPSS 20.0统计学处理, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 临床基线资料及患者分组

根据入选患者的 $\text{PL}_{\text{ADP}}$ 结果计算出四分位数 $P_{25}=19.5\%$ , $P_{75}=48.5\%$ 。选取 $\text{PL}_{\text{ADP}} > 48.5\%$ 的氯吡格雷低反应性患者19例为低反应组,为了更明显地筛

选出血小板 miRNA 表达谱的差异, 将  $PL_{ADP} < 19.5\%$  的 19 例患者设为对照组。两组患者的临床基线特征包括年龄、性别、体重指数、临床诊断、既往史及合并用药等均无统计学差异(表 1)。两组患者住院期间的生化指标包括红细胞计数、白细胞计数、尿素氮、丙氨酸氨基转移酶、射血分数等亦无显著的统计学差异(表 2)。

### 2.2 住院期间的血小板聚集率

氯吡格雷低反应组和对照组的  $PL_{ADP}$  分别为  $54.8\% \pm 5.3\%$  vs.  $13.3\% \pm 4.4\%$ , 组间存在统计学差异 ( $P < 0.0001$ , 图 1)。

### 2.3 血小板总 RNA 的变性电泳

经 Nanodrop 分光光度计检测, 氯吡格雷低反应组血小板总 RNA 池 OD 值为 2.0, 浓度为  $30.3 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 。对照组的血小板总 RNA 池 OD 比值为 1.9, 浓度为  $41.8 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 。从 RNA 变性电泳图可以看出血小板总 RNA 中 miRNA 分布区的条带清晰, 无明显降解(图 2)。

### 2.4 两组患者血小板 miRNA 表达谱差异

通过高通量测序发现两组患者有 95 种血小板 miRNA 表达上存在显著差异, 其中显著性下调的、差异倍数  $> 2$ 、拷贝数前 20 位的 miRNA 依次是 hsa-miR-300、hsa-miR-151b、hsa-miR-1299、hsa-miR-16-1-3p、hsa-miR-3150b-3p、hsa-miR-548am-3p、hsa-miR-1260a、hsa-let-7f-2-3p、hsa-miR-4755-3p、hsa-miR-3144-3p、hsa-miR-5004-3p、hsa-miR-6862-5p、hsa-miR-1288-3p、hsa-miR-4661-5p、hsa-miR-4479、

表 1 患者临床基线特征

Table 1 Baseline clinical characteristics of the patients

项目	低反应组 (n=19)	对照组 (n=19)	P 值
年龄(岁)	61.7 ± 13.4	59.4 ± 10.2	0.562
女[n(%)]	5(26.3)	3(15.8)	0.693
BMI(kg/m <sup>2</sup> )	25.7 ± 3.6	24.4 ± 2.2	0.182
临床诊断[n(%)]			
心肌梗死	5(26.3)	6(31.6)	1.000
不稳定型心绞痛	7(36.8)	8(42.1)	1.000
稳定型心绞痛	7(36.8)	5(26.3)	0.728
高血压	12(63.2)	13(68.4)	1.000
糖尿病	4(21.1)	8(42.1)	0.295
既往史[n(%)]			
吸烟	9(47.4)	5(26.3)	0.313
饮酒	6(31.6)	5(26.3)	1.000
冠状动脉支架植入术[n(%)]	13(68.4)	16(84.2)	0.447
合并用药[n(%)]			
质子泵抑制剂	7(36.8)	5(26.3)	0.728
他汀类	19(100.0)	19(100.0)	1.000
β受体阻滞剂	9(47.4)	7(36.8)	0.743
ACEI/ARB	7(36.8)	6(31.6)	1.000
硝酸酯类	12(63.2)	17(89.5)	0.124
钙离子拮抗剂	6(31.6)	9(47.4)	0.508
利尿剂	2(10.5)	1(5.3)	1.000

hsa-miR-4421、hsa-miR-6788-3p、hsa-miR-188-5p、hsa-miR-6874-3p、hsa-miR-218-5p(表 3)。

### 2.5 靶基因预测

通过靶基因预测软件 TargetScan、miRanda、PI-

表 2 患者住院期间的生化指标

Table 2 Biochemical indexes of the patients during hospitalization

项目	低反应组(n=19)	对照组(n=19)	P 值
射血分数(%)	61.5 ± 7.4	62.3 ± 6.1	0.734
左室舒张末期内径(mm)	48.3 ± 5.3	47.1 ± 3.8	0.522
红细胞( $10^{12}/L$ )	4.44 ± 0.43	4.58 ± 0.47	0.339
白细胞( $10^9/L$ )	6.8 ± 1.6	7.3 ± 1.9	0.368
血小板( $10^9/L$ )	193.2 ± 47.8	221.6 ± 90.1	0.234
血小板压积	0.20 ± 0.05	0.24 ± 0.09	0.168
血小板平均体积(fL)	10.8 ± 1.2	10.4 ± 1.2	0.331
血小板分布宽度(fL)	13.9 ± 2.3	12.7 ± 2.4	0.128
血红蛋白(g/L)	134.0 ± 13.5	139.4 ± 13.6	0.225
总胆固醇(mmol/L)[ $M(P_{25}, P_{75})$ ]	1.6(1.1, 2.2)	1.7(1.0, 2.4)	0.939
低密度脂蛋白(mmol/L)	2.47 ± 0.96	2.85 ± 0.90	0.224
肌酐(mmol/L)	69.3 ± 14.2	68.8 ± 18.1	0.931
尿素氮(mmol/L)	5.0 ± 1.2	5.9 ± 1.9	0.094
丙氨酸氨基转移酶(U/L)	49.4 ± 47.3	43.8 ± 42.2	0.700
天门冬氨酸氨基转移酶(U/L)[ $M(P_{25}, P_{75})$ ]	22.2(17.3, 36.4)	24.0(17.5, 30.0)	0.737

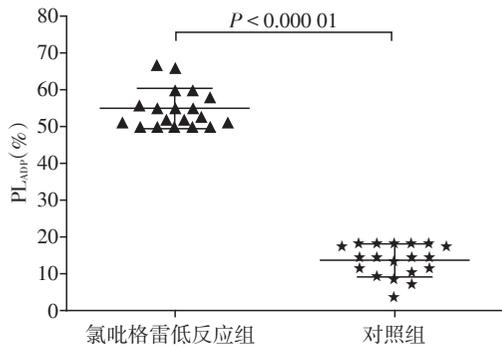
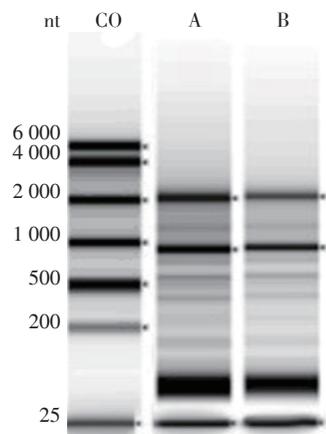


图1 两组患者血小板聚集率

Figure 1 Platelet aggregation in the two groups



CO:质控;A:氯吡格雷低反应组血小板总RNA;B:对照组血小板总RNA。

图2 血小板总RNA的变性电泳图

Figure 2 Denaturation electrophoresis of platelet total RNA

TA和miRWalk对上述显著性下调的、差异倍数>2、拷贝数前20位miRNA的靶基因进行预测,并从中筛选出至少被2个靶基因预测软件预测对血小板聚集关键蛋白(P2Y<sub>12</sub>受体、Gi2α蛋白、血小板糖蛋白Ⅱb/Ⅲa受体)可能有调控作用的miRNA;结果发现血小板miRNAs中的hsa-miR-188-5p、hsa-miR-6874-3p对P2Y<sub>12</sub>受体基因的表达可能具有调控作用;hsa-miR-218-5p、hsa-miR-3150b-3p、hsa-miR-1288-3p、hsa-miR-1299、hsa-miR-6862-5p对Gi2α蛋白基因的表达可能具有调控作用;hsa-miR-6862-5p、hsa-miR-188-5p、hsa-miR-4421对血小板糖蛋白Ⅲa受体基因的表达可能具有调控作用;对于血小板糖蛋白Ⅱb受体,结果未发现同时被至少被2个靶基因预测软件预测到的交集miRNA(表4)。

### 3 讨论

目前,阿司匹林与氯吡格雷双联抗血小板治疗

被广泛应用于ACS患者<sup>[1,8-10]</sup>,较之新一代ADP受体拮抗剂替格瑞洛,氯吡格雷在年龄≥75岁的老年患者、肾功能不全、血小板计数偏低等特殊ACS患者中使用更为安全<sup>[11]</sup>。但研究发现在服用氯吡格雷常规剂量的患者中CLR发生率>20%<sup>[12]</sup>,且CLR患者血栓事件发生率显著增高<sup>[5]</sup>。研究发现CLR与细胞色素P450 2C19(cytochrome P450 2C19,CYP2C19)基因多态性、糖尿病、吸烟、肥胖、肾功能不全、血清碱性磷酸酶、尿酸等多种因素相关<sup>[13-18]</sup>,但基因变异等已知因素仅可解释约12%的个体反应差异,探讨

表3 大于2倍拷贝数下调的miRNA(前20位)

Table 3 2-fold down-regulated miRNAs(top 20)

拷贝数前20位的下调miRNA	log <sub>2</sub> (fold change)	P值
hsa-miR-300	1.39	<0.001
hsa-miR-151b	1.30	<0.001
hsa-miR-1299	1.82	<0.001
hsa-miR-16-1-3p	1.35	0.010
hsa-miR-3150b-3p	1.97	0.001
hsa-miR-548am-3p	2.18	0.002
hsa-miR-1260a	1.68	0.012
hsa-let-7f-2-3p	13.60	0.000
hsa-miR-4755-3p	1.16	0.046
hsa-miR-3144-3p	1.63	0.017
hsa-miR-5004-3p	1.32	0.017
hsa-miR-6862-5p	1.49	0.049
hsa-miR-1288-3p	13.40	<0.001
hsa-miR-4661-5p	13.32	<0.001
hsa-miR-4479	13.28	<0.001
hsa-miR-4421	13.11	<0.001
hsa-miR-6788-3p	12.98	<0.001
hsa-miR-188-5p	12.97	<0.001
hsa-miR-6874-3p	12.93	<0.001
hsa-miR-218-5p	1.33	0.001

表4 血小板miRNA靶基因预测

Table 4 Target gene prediction of platelet miRNA

ADP激活通路中的关键受体或蛋白	血小板miRNA	
P2Y <sub>12</sub> 受体	hsa-miR-188-5p	
	hsa-miR-6874-3p	
	Gi2α蛋白	hsa-miR-218-5p
		hsa-miR-3150b-3p
		hsa-miR-1288-3p
血小板糖蛋白Ⅲa受体	hsa-miR-1299	
	hsa-miR-6862-5p	
	hsa-miR-6862-5p	
	hsa-miR-188-5p	
	hsa-miR-4421	

CLR的未知相关因素一直是近年来的研究热点。

Chen等<sup>[19]</sup>发现与健康对照相比,支架植入术后接受抗血小板治疗(阿司匹林联合氯吡格雷或替格瑞洛或西洛他唑)的患者中 miR-365-3p 表达水平与抗血小板治疗的反应性相关;Chen S 等通过检测血管舒张刺激磷蛋白计算血小板反应指数来评价健康对照与介入治疗术后冠心病患者对氯吡格雷的反应性,发现 miRNA-26a 与氯吡格雷低反应性相关<sup>[20]</sup>;Nagalla等<sup>[6]</sup>发现在血小板高反应与正常反应的健康人中有74种血小板 miRNA 存在表达水平的差异,并发现 miR-200b、miR-495 和 miR-107 可通过特异性识别各自的靶 mRNA 来调控血小板相应蛋白的表达。因入选对象、血小板 miRNA 提取方法、血小板功能检测方法、miRNA 测序方法等存在差异,上述不同研究筛选出的与血小板反应性相关的小血小板 miRNA 不尽相同。

本研究通过如下方面在一定程度上避免了相关偏倚对实验结果造成的影响:①参考相关研究共入选38例CAD患者<sup>[6]</sup>,氯吡格雷低反应组与对照组患者的临床基线特征与生化指标均无显著的统计学差异。②采取了免疫磁珠法高效地纯化血小板后,提取的血小板 miRNA 又经 Nanodrop 分光光度计及变性电泳质控。③采用的光比浊法血小板功能检测可特异性地反映 ADP 通道被抑制的水平<sup>[21]</sup>,是目前血小板聚集功能检测的“金标准”<sup>[22]</sup>,也是国际相关共识推荐的检测方法之一<sup>[23]</sup>。POPULAR 研究比较了光比浊法、VerifyNow P2Y12、Plateletworks、IMPACT-R、PFA-100、改良 PFA P2Y 共6种血小板功能检测方法,结果提示,光比浊法是对临床终点有预测价值的3种血小板功能检测方法之一<sup>[24]</sup>。④选取的 Illumina HiSeq 2500 测序平台是一个功能强大的高通量测序系统,可获得高质量数据,是目前高通量测序领域主导的检测方法之一<sup>[25]</sup>。

与对照组相比,CLR患者中有95种血小板 miRNA 表达上存在显著差异;通过查询靶基因预测软件 TargetScan、miRanda、PITA 和 miRWalk,筛选出了至少被2个靶基因预测软件预测对血小板聚集关键蛋白(P2Y12受体、G<sub>i</sub>2 $\alpha$ 蛋白、血小板糖蛋白 IIb/IIIa 受体)可能有调控作用的 miRNA。在这些 miRNA 中,已有研究证实 miR-218-5p 与凝血功能相关,但具体机制还有待进一步研究<sup>[26]</sup>。这些差异表达的 miRNAs 有望成为血小板反应性特异性生物学标志物,也可能用于预测作用于相同位点的新型抗血小板药物的反应性。

综上所述,本研究通过高通量测序探讨了 CLR 的 CAD 患者血小板 miRNA 的表达差异,并筛选出了8个对血小板聚集关键蛋白可能有调控作用的 miRNA。随着血小板 miRNA 对血小板和其他细胞(包括血管内皮细胞、心肌细胞等)以及 lncRNA (long non-coding RNA)、circRNA、miRNA、mRNA 之间的调控网络的进一步完善,miRNA 在抗栓治疗中的调控作用可能会为个体化抗血小板治疗提供新的干预手段,值得进一步深入研究。

#### [参考文献]

- [1] 张新超,于学忠,陈凤英,等. 急性冠脉综合征急诊快速诊治指南(2019)[J]. 临床急诊杂志,2019,20(4):253-262
- [2] 中华医学会心血管病学分会介入心脏病学组,中国医师协会心血管内科医师分会血栓防治专业委员会,中华心血管病杂志编辑委员会. 中国经皮冠状动脉介入治疗指南(2016)[J]. 中华心血管病杂志,2016,44(5):382-400
- [3] 孔德玉,陈俊,李春坚,等. 冠心病患者阿司匹林与氯吡格雷抵抗发生情况的调查研究[J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2013,33(6):788-791
- [4] AL-HUSEIN B A, AL-AZZAM S I, ALZOUBI K H, et al. Investigating the effect of demographics, clinical characteristics, and polymorphism of MDR - 1, CYP1A2, CYP3A4, and CYP3A5 on clopidogrel resistance [J]. J Car Pharmacol,2018,72(6):396-302
- [5] STUCKEY T D, KIRTANE A J, BRODIE B R, et al. Impact of aspirin and clopidogrel hyporesponsiveness in patients treated with drug-eluting stents:2-year results of a prospective, multicenter registry study [J]. JACC Cardiovasc Interv,2017,10(16):1607-1617
- [6] NAGALLA S, SHAW C, KONG X, et al. Platelet microRNA-mRNA coexpression profiles correlate with platelet reactivity [J]. Blood,2011,117(19):5189-5197
- [7] GURBEL P A, BLIDEN K P, SAMARA W, et al. Clopidogrel effect on platelet reactivity in patients with stent thrombosis: results of the CREST Study [J]. J Am Coll Cardiol,2005,46(10):1827-1832
- [8] MARCO R, CARLO P, JEAN-PHILIPPE C, et al. 2015 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: Task Force for the Management of Acute Coronary Syndromes in Patients Presenting without persistent ST-segment elevation of the European Society of Cardiology(ESC)[J]. Eur Heart J,2016,37(3):267-315
- [9] 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. 急性ST段抬高型心肌梗死诊断和治疗指南

- (2019)[J]. 中华心血管病杂志, 2019, 10(47): 766-783
- [10] 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. 非ST段抬高型急性冠状动脉综合征诊断和治疗指南(2016)[J]. 中华心血管病杂志, 2017, 45(5): 359-376
- [11] 中国医师协会心血管内科医师分会血栓防治专业委员会, 中华医学会心血管病学分会介入心脏病学组, 中华心血管病杂志编辑委员会. 急性冠状动脉综合征特殊人群抗血小板治疗中国专家建议[J]. 中华心血管病杂志, 2018, 46(4): 255-266
- [12] GURBEL P A, BLIDEN K P, HIATT B L, et al. Clopidogrel for coronary stenting: response variability, drug resistance, and the effect of pretreatment platelet reactivity [J]. *Circulation (Baltimore)*, 2003, 107(23): 2908-2913
- [13] ZHUO Z L, XIAN H P, LONG Y, et al. Association between CYP2C19 and ABCB1 polymorphisms and clopidogrel resistance in clopidogrel-treated Chinese patients [J]. *Anatol J Cardiol*, 2018, 19(2): 123-129
- [14] NAKAGAWA I, PARK H S, YOKOYAMA S, et al. Influence of diabetes mellitus and cigarette smoking on variability of the clopidogrel-induced antiplatelet effect and efficacy of active management of the target P2Y<sub>12</sub> reaction unit range in patients undergoing neurointerventional procedures [J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2016, 25(1): 163-71
- [15] DOGAN A, KAHRAMAN S, USTA E, et al. Effect of obesity and serum leptin level on clopidogrel resistance [J]. *Turk Kardiyoloji Dernegi arsivi: Turk Kardiyoloji Derneginin yayin organidir*, 2016, 44(7): 548-53
- [16] WU Y, SONG Y, PAN Y, et al. High on-clopidogrel platelet reactivity and chronic kidney disease: a meta-analysis of literature studies [J]. *Scand Cardiovasc J*, 2019, 53(2): 55-61
- [17] YE Y, ZHAO X, TU C, et al. Elevated serum levels of alkaline phosphatase and the risk of low responsiveness to clopidogrel [J]. *Int Heart J*, 2020, ;61(6): 1135-1141
- [18] WANG J, ABDUS S, TAN C, et al. Serum uric acid level negatively correlated with the prevalence of clopidogrel low response in patients undergoing antiplatelet treatment with aspirin and clopidogrel [J]. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2020, 30(12): 2215-2220
- [19] CHEN Y C, LIN F Y, LIN Y W, et al. Platelet microRNA 365-3p expression correlates with high on-treatment platelet reactivity in coronary artery disease patients [J]. *Cardiovasc Drug Ther*, 2019, 33(2): 129-137
- [20] XUE H, CHEN H, GU J, et al. Expression of miRNA-26a in platelets is associated with clopidogrel resistance following coronary stenting [J]. *Exp Ther Med*, 2016, 12(1): 518-524
- [21] DUNNE E, EGAN K, MCFADDEN S, et al. Platelet aggregation in response to ADP is highly variable in normal donors and patients on anti-platelet medication [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2016, 54(7): 1269-1273
- [22] HVAS A M, FAVALORO E J. Platelet function analyzed by light transmission aggregometry [J]. *Methods Mol Biology*, 2017, 1646: 321-331
- [23] BONELLO L, TANTRY U S, MARCUCCI R, et al. Consensus and future directions on the definition of high on-treatment platelet reactivity to adenosine diphosphate [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2010, 56(12): 919-933
- [24] 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
- [25] YOSHINAGA Y, DAUM C, HE G, et al. Genome sequencing [J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1775: 37-52
- [26] PERGOLI L, CANTONE L, FAVERO C, et al. Extracellular vesicle-packaged miRNA release after short-term exposure to particulate matter is associated with increased coagulation [J]. *Part Fibre Toxicol*, 2017, 14(1): 32

[收稿日期] 2021-03-23