

# 丹参多酚酸盐干预非 ST 段抬高心肌梗死患者 microRNA 与靶基因

张振鹏, 滕菲, 刘咏梅, 李军, 王阶\*  
(中国中医科学院广安门医院, 北京 100053)

**[摘要]** **目的:**高通量检测非 ST 段抬高性心肌梗死(NSTEMI)患者药物干预前后的微小 RNA(microRNA)表达谱,对比中西药物治疗前后 microRNA 表达变化,分析活血化瘀药物干预靶标与机制。**方法:**选取符合西医疾病诊断标准和中医证候诊断标准的患者,分为 2 组,包括 NSTEMI 中药治疗组,NSTEMI 西药组,每组纳入 35 例,抽取外周血,分离外周血单核细胞(PBMC),提取总 RNA。根据各组差异表达的 microRNA 和基因的通路和网络分析结果,确定各组中起关键调控作用的 microRNA 及其靶基因。**结果:**在 microRNA 表达谱中,中药治疗组治疗前后、中药治疗组与西药组两组治疗后比较均存在差异;中药治疗组治疗后 hsa-miR-92a, hsa-miR-363, hsa-miR-499, hsa-miR-30b, hsa-miR-454-3p, hsa-miR-933 表达下调, hsa-miR-144, hsa-miR-451, hsa-miR-494, hsa-miR-320 表达上调。表明这 10 个 microRNA 是丹参多酚酸盐干预 NSTEMI 的靶标。实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)验证,与西药组比较,中药治疗组治疗后 hsa-miR-92a, hsa-miR-30b, hsa-miR-499, hsa-miR-454 表达下调;中药治疗组治疗后 hsa-miR-494 的表达上调( $P < 0.05$ )。**结论:**NSTEMI 患者治疗前后,中药治疗组与西药组 microRNA 的表达谱均存在差异,筛选的 miRNA 可能是活血化瘀药物干预的靶标。

**[关键词]** 非 ST 段抬高性心肌梗死; 微小 RNA; 丹参多酚酸盐; 治疗靶标; 生物信息学

**[中图分类号]** R287;R259 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)19-0017-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfx.2017190017

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170711.1401.046.html>

**[网络出版时间]** 2017-07-11 14:01

## Intervention Effect of Salvianolate on microRNA and Target Genes in Patients with Non-ST-segment Elevation Myocardial Infarction

ZHANG Zhen-peng, TENG Fei, LIU Yong-mei, LI Jun, WANG Jie\*

(Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China)

**[Abstract]** **Objective:** To conduct high throughput detection of microRNA expression in patients with non-ST segment elevation myocardial infarction (NSTEMI) before and after drug intervention, compare the expression changes of microRNA before and after treatment with Chinese and western medicines, and analyze the intervention targets and mechanism of Chinese medicines for promoting blood flow and eliminating blood stasis. **Method:** Patients who met the diagnostic criteria of Western medicine diseases and the diagnostic criteria of traditional Chinese medicine (TCM) syndromes were divided into NSTEMI Chinese medicine treatment group and NSTEMI western medicine control group, 35 cases in each group. Their peripheral blood was extracted, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated and total RNA was extracted. The active microRNA and its target genes in each group were identified according to differentially expressed microRNAs, gene pathways and network analysis results. **Result:** In the microRNA expression profile, there were differences between Chinese medicine

**[收稿日期]** 20170423(007)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81473561)

**[第一作者]** 张振鹏, 博士, 副主任医师, 从事中西医结合心血管病研究, Tel:010-88001341, E-mail: zpzshou@163.com

**[通讯作者]** \* 王阶, 博士, 主任医师, 教授, 从事中西医结合心血管病研究, Tel:010-88001018, E-mail: wangjie0103@126.com

treatment group before and after treatment as well as between TCM treatment group and western medicine control group after treatment, hsa-miR-92a, hsa-miR-363, hsa-miR-499, hsa-miR-30b, hsa-miR-454-3p, and hsa-miR-933 expression levels were down-regulated, while hsa-miR-144, hsa-miR-451, hsa-miR-494, and hsa-miR-320 expression levels were up-regulated in TCM treatment group after treatment. These 10 microRNAs were considered as the intervention targets of salvianolate for NSTEMI. Real-time PCR, results verified that as compared with the western medicine control group, hsa-miR-92a, hsa-miR-30b, hsa-miR-499 and hsa-miR-454 expression levels were down-regulated while the expression of hsa-miR-494 was up-regulated after treatment in Chinese medicine treatment group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** There are differences in the expression profiles of microRNAs between the Chinese medicine treatment group and the western medicine control group before and after the treatment of NSTEMI, and the screened miRNAs may be the intervention targets for Chinese medicines of promoting blood flow and eliminating blood stasis.

[ **Key words** ] Non-ST segment elevation myocardial infarction; microRNA; salvianolate; therapeutic targets; bioinformatics

非 ST 段抬高性心肌梗死 (NSTEMI) 是一组可危及生命的重要临床综合征,常因冠状动脉粥样硬化斑块不稳定、斑块破裂导致冠状动脉内血栓形成、冠脉血流减少引起<sup>[1]</sup>。非 ST 段抬高急性冠脉综合征与 ST 段抬高的急性心梗不同在病理学上的不同决定了治疗上的特殊性。多年来对非 ST 段抬高 ACS 患者采用直接介入治疗,还是药物保守治疗无统一论。最新证据表明,微小 RNA (microRNA, miRNA) 是心血管疾病最重要和最活跃的调控因子之一,microRNA 及靶基因的动态变化与急性心肌梗死的发生、发展和预后具有密切的关系。目前收集的很多证据表明,急性心肌梗死患者血浆中 miR-1, miR-133, miR-499, miR-208a 水平比未患病人群的血浆 microRNA 水平要高<sup>[2]</sup>。因此 microRNA 可能成为急性心肌梗死的早期诊断工具、生物标记物和治疗的靶标。

长期以来,活血化瘀方药在冠心病、急性心肌梗死的治疗中占有重要地位,具体的作用机制可能是通过调整相关 microRNA 与靶基因之间的消长平衡,调节机体阴阳失衡,维持机体内环境动态平衡来干预急性心肌梗死。本研究通过在体选择临床确诊的 NSTEMI 的病例,使用活血化瘀经典药物丹参

多酚酸盐进行干预,探讨 NSTEMI 相关 microRNA 及其调控网络,以其阐述病证结合、方证相应理论在防治心肌梗死(瘀血阻络证)医学实践中的科学内涵。同时揭示 microRNA 及其靶基因所调控的细胞通路的作用,为其治疗急性心肌梗死提供潜在的靶标。在分子生物学层面探索了活血化瘀中药治疗急性心肌梗死的基因靶点和机制。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 所有 NSTEMI (瘀血阻络证) 患者 81 例来自 2012 年 1 月至 2013 年 12 月中国中医科学院广安门医院心血管科住院患者,临床诊断以出院诊断为最终标准入选,脱落 11 例,最终入组 70 例。70 例 NSTEMI 患者随机分为对照组 (按照国际指南推荐进行标准化治疗) 和治疗组,各 35 例,告知所参加试验的目的、方法、内容和可能存在的潜在风险,并签署知情同意书。该研究符合赫尔辛基宣言,不违背医学伦理道德经中国中医科学院广安门医院伦理委员会批准,批号 2013EC071。

对 NSTEMI 西药组, NSTEMI 中药治疗组和健康对照组的一般临床资料进行了统计分析,发现 3 组患者的年龄,性别,吸烟史, 2 型糖尿病方面比较均无显著性差异;基线齐同,资料具有可比性。见表 1。

表 1 两组患者一般资料比较

Table 1 Comparison of general data between two groups

组别	性别(男/女)/例	年龄( $\bar{x} \pm s$ )/岁	高血压史/例	糖尿病史/例	高脂血症史/例	吸烟史/例
对照	14/21	72 ± 4.71	28	22	20	11
治疗	17/18	69 ± 3.51	30	23	21	10

**1.2 诊断标准** NSTEMI 的诊断标准依据 2011 年美国心脏病学会 (ACC)/美国心脏协会 (AHA) 制定

的《不稳定性心绞痛和非 ST 段抬高心肌梗死诊断与治疗指南》<sup>[3]</sup>。

**1.3 纳入标准** 符合西医诊断标准,年龄 35 ~ 75 岁;不建议行或患者拒绝经皮冠状动脉介入术(PCI),药物溶栓,冠状动脉旁路移植术(CABG)等血运重建术者;自愿接受临床试验并签署知情同意书者。

**1.4 排除标准** 经证实为心肌病、心肌炎、瓣膜性心脏病、重度神经官能症、更年期证候群、甲状腺功能亢进症、胆心综合征、胃及食管返流、食道裂孔疝、主动脉夹层动脉瘤等者;重度心肺功能不全者;严重心律失常(快速心房颤动、心房扑动、室性心动过速,Ⅱ型及以上房室传导阻滞,完全性房室传导阻滞)者;严重肝肾功能损害者;血液系统疾病者;妊娠或哺乳期妇女;合并有神经、精神疾患而无法合作或者不愿合作者;恶性肿瘤等及其他影响试验研究的因素;过敏体质或对药物成分过敏者;结缔组织病者;参加其他临床试验的患者;其他干扰试验的完成或影响结果解释的主要疾病或因素者。

**1.5 脱落标准** 对已被选入试验组或对照组,属于以下情况之一者,作为脱落病例。由于受试者本身或医疗方面等原因造成完全、部分或不稳定依从者(包括观察记录不全);出现不良事件不宜继续进行本临床研究;受试者自行退出(包括因药物无效自行退出者);研究过程中并发其他疾病,不适宜继续接受研究。

**1.6 中止标准** 临床研究中止是指临床研究尚未按方案结束,中途停止全部试验。试验中发生严重安全性问题(如出现严重不良反应者或出现严重并发症或病情迅速恶化者),应及时中止。

**1.7 给药方案** 对照组,常规西药药物治疗 7 d(按照 ACC/AHA2011 年 UA/STEMI 诊疗指南的更新推荐规范用药,包括抗凝,抗血小板聚集,硝酸酯类, $\beta$ 受体阻滞剂,血管紧张素转换酶抑制剂 ACEI,血管紧张素受体 II 拮抗剂 ARB,钙离子拮抗剂等药物)。治疗组,在常规西药治疗的基础上,0.9%氯化钠 250 mL + 注射用丹参多酚酸盐(上海绿谷制药有限公司,国药准字 Z20050249, 200 mg/支) 200 mg,静脉滴注,1 次/d,连续使用 7 d。所有病例在试验期间不得合并使用治疗冠心病的其他中药汤剂和中成药制剂。

**1.8 标本采集与检测** 非 ST 段抬高型心肌梗死患者发病后 24 h 内清晨空腹抽取静脉血 10 mL,置于乙二胺四乙酸抗凝剂(EDTA)分离胶真空采集管中,6 h 之内分离外周血单核细胞(PBMC)。治疗组及西药组用药 7 d 后再次抽取静脉血,分离外周血

单核细胞。外周血单核细胞经过分离和纯化,总 RNA 提取,总 RNA 质量检测 PBMC 的 microRNA 芯片检测等步骤。

### 1.9 microRNA 和基因表达谱分析

**1.9.1 差异表达的 microRNA 和基因的筛选** 根据各组与正常组的比值的对数值( $\log_2$  ratio)和  $P$  进行差异表达的 microRNA 和基因筛选。

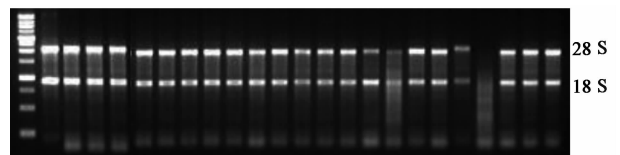
**1.9.2 层次聚类** 层次聚类(hierarchical clustering)和热图(heatmap)用于评估每组中 5 个样本之间的变异性(variation)以及西药组治疗前、西药组治疗后、中药治疗组治疗前,中药治疗组和正常组之间的差异性。运用聚类软件 Cluster 3.0 进行 average-linkage 层次聚类运算<sup>[4]</sup>。根据聚类结果,运用 Java Tree View-1.1.6r2 绘制热图<sup>[5]</sup>。在热图中,水平轴和垂直轴分别代表组别信息和 microRNA 或基因信息;图中红色表示 microRNA 或基因表达高于正常水平,绿色表示 microRNA 或基因表达低于正常水平。

**1.10 实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)验证** 根据各组差异表达的 microRNA 和基因的通路和网络分析结果,确定各组中起关键调控作用的 microRNA 及其靶基因。

**1.11 统计学方法** 采用 SPSS 16.0 统计软件分析数据,计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示。计数资料进行  $\chi^2$  检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 患者外周血单核细胞的总 RNA 的质量检测报告** 对提取的总 RNA 进行紫外吸收法检测及琼脂糖凝胶电泳检测。结果显示,所有样本总 RNA 的吸光度  $A_{260}/A_{280}$  介于 1.8 ~ 2.0,符合 RNA 质量标准。18 S 和 28 S 的条带分离清晰,无拖带和扩散现象,28 S 和 18 S 的条带亮度比接近 2:1,表明组织样本的总 RNA 均符合基因芯片的质量需要。见图 1。



治疗组和对照组中部分样本

图 1 外周血单核细胞总 RNA 凝胶电泳

Fig. 1 Total RNA gel electrophoresis map of peripheral blood mononuclear cells

**2.2 筛选差异表达的 microRNA 和基因** 差异表达的 microRNA 筛选方法,根据中药治疗组、西药组

与正常组的比值的对数值 ( $\log_2$  ratio) 和  $P$  进行差异表达的 microRNA 和基因筛选。并结合 Volcano plot 差异分布等方法进行对比。

**2.3 层次聚类** 各组差异表达的 microRNA 聚类分析产生的热图, 各组差异表达的基因聚类分析产生的热图, 结果显示, 每组的 5 个样本聚为一类, 显示各组组内的样本一致性较好。各组与健康对照组相比, microRNA 和基因的表达差异显著, 可以通过 microRNA 和基因的表达差异将各组与健康组区分开。见图 2。

#### 2.4 各组患者 microRNA 差异表达谱分析

**2.4.1 中药治疗组患者治疗前后比较分析** 通过上述差异基因表达筛选的方法, 在 microRNA 表达谱中, 中药治疗组治疗前与治疗自身对比发现, 43 个 microRNA 的表达存在差异, 其中 32 个 microRNA 下调 (74.4%), 11 个 microRNA 上调 (25.6%); 在中药治疗组中, NSTEMI 患者经过中医药联合治疗后, hsa-miR-191-5p, hsa-miR-130a-3p, hsa-miR-221-3p, hsa-miR-92a-3p, hsa-miR-584-5p, hsa-miR-363-3p, hsa-miR-140-3p, hsa-miR-15b-5p, hsa-miR-130b-3p, hsa-miR-320e, hsa-miR-423-3p, hsa-miR-320b, hsa-let-7b-5p, hsa-miR-199a-3p, hsa-miR-151a-5p, hsa-miR-339-5p, hsa-miR-30b-5p, hsa-miR-30d-5p, hsa-miR-1185-1-3p, hsa-let-7i-5p, hsa-miR-423-5p, hsa-miR-93-5p, hsa-miR-1185-2-3p, hsa-miR-29b-3p, hsa-miR-1233-3p, hsa-miR-222-3p, hsa-miR-625-5p, hsa-miR-139-5p, hsa-miR-376c-3p, hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-335-5p, hsa-miR-499 表达上调。hsa-miR-451a, hsa-miR-451, hsa-miR-513a-5p, hsa-miR-1225-5p, hsa-miR-1207-5p, hsa-miR-1292-5p, hsa-miR-320, hsa-miR-494, hsa-miR-30c-1-3p, hsa-miR-1247-3p, hsa-miR-1273 g-3p 表达下调。

#### 2.4.2 中药治疗组与西药组患者治疗后比较分析

通过对比分析, 西药组与中药组患者的 microRNA 在治疗前后都出现了表达的变化, 同时中药组与西药组两组治疗后比较可以发现部分 microRNA 表达水平具有明显的变化, 共有 10 个 microRNA 表达变化存在差异。其中下调的 microRNA 6 个 (60%), 上调的 microRNA 4 个 (40%)。中药治疗组治疗后表达下调的 microRNA 是 hsa-miR-92a, hsa-miR-363, hsa-miR-499, hsa-miR-30b, hsa-miR-454-3p, hsa-miR-933, 中药治疗组治疗后表达上调的 microRNA 是 hsa-miR-144, hsa-miR-451, hsa-miR-494, hsa-miR-320。

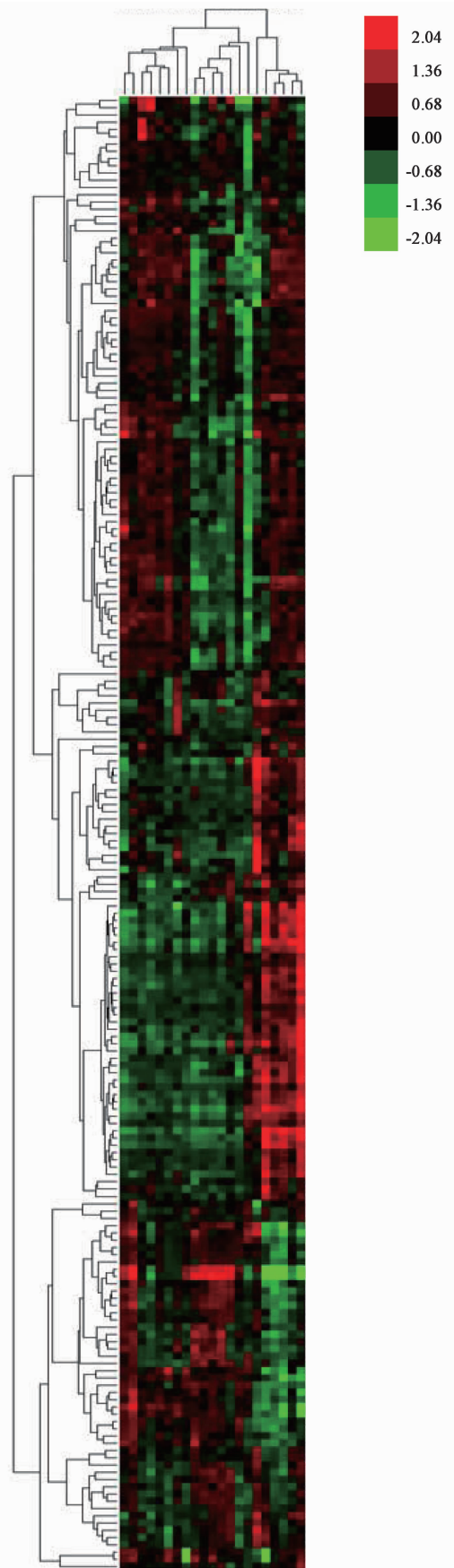


图 2 各组患者差异表达 microRNA 的基因的聚类分析产生的热图  
Fig. 2 Clustering analysis of differentially expressed microRNA genes

## 2.5 Real-time PCR 验证 与西药组比较, 中药治疗组治疗后 hsa-miR-92a, hsa-miR-30b, hsa-miR-

499, hsa-miR-454 表达下调 ( $P < 0.05$ ); hsa-miR-494 表达上调 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

表 2 两组患者治疗前后 microRNA 表达比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 35$ )

Table 2 Comparison of microRNA expression between two groups before and after treatment ( $\bar{x} \pm s, n = 35$ )

组别	时间	hsa-miR-92a	hsa-miR-30b	hsa-miR-499	hsa-miR-454	hsa-miR-494
对照	治疗前	0.979 ± 0.25	1.181 ± 0.21	1.266 ± 0.16	1.079 ± 0.24	0.271 ± 0.08
	治疗后	1.213 ± 0.26	1.695 ± 0.26	1.501 ± 1.01	1.062 ± 0.25	0.176 ± 0.19
治疗	治疗前	0.968 ± 0.21	0.951 ± 0.07	1.053 ± 0.18	1.091 ± 0.27	2.921 ± 0.17
	治疗后	1.016 ± 0.23 <sup>1)</sup>	1.306 ± 0.24 <sup>1)</sup>	1.289 ± 0.18 <sup>1)</sup>	1.028 ± 0.28 <sup>1)</sup>	0.288 ± 0.15 <sup>1)</sup>

注:与对照组治疗后比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ 。

## 3 讨论

**3.1 microRNA 及其调控的网络是活血化瘀药物的治疗靶标** 丹参多酚酸盐具有降低氧化应激和氧自由基损伤, 抗血小板聚集, 保护内皮功能、扩血管、解痉、抗炎症等作用, 改善临床预后。丹参多酚酸盐及丹参乙酸镁能明显抑制血小板的最大聚集率和平均聚集率, 增加血小板的解聚率, 其作用较丹参素钾更强。此外还可以通过其他机制抗血栓形成。在临床研究中, 有试验显示丹参多酚酸盐可以改善稳定型心绞痛患者的症状和平板运动试验 ST-T 缺血性改变, 较丹参显著降低血小板聚集率和 P-选择素<sup>[6-9]</sup>。丹参多酚酸盐具有强大的抗氧化和清除自由基作用。在体外细胞培养的模型中, 丹参多酚酸盐能促进单核细胞合成和分泌血管内皮生长因子 (VEGF) 及成纤维细胞生长因子 (bFGF), 进而促进单核细胞诱导的内皮细胞迁移, 而内皮细胞的迁移是血管新生过程中的第 1 步, 因此可以预见丹参多酚酸盐可能具有促进缺血区心肌组织内血管再生的作用<sup>[10]</sup>。动物实验研究显示, 丹参多酚酸盐静脉给药可以减轻犬冠脉结扎后心外膜心电图 ST 抬高的程度, 缩小梗死范围。丹参多酚酸盐还可以降低慢性肾衰大鼠血浆内皮素含量, 减轻肾小球和肾小管损伤, 改善肾功能<sup>[11]</sup>。

**3.2 活血化瘀对 NSTEMI microRNA 的影响** 通过对比分析, 本研究发现中药组和西药组比较共有 10 个 microRNA 的表达变化存在差异。其中下调的 microRNA 6 个 (60%), 上调的 microRNA 4 个 (40%)。中药治疗组治疗后表达下调的 microRNA 是 hsa-miR-92a, hsa-miR-363, hsa-miR-499, hsa-miR-30b, hsa-miR-454-3p, hsa-miR-933, 中药治疗组组治疗后表达上调的 microRNA 是 hsa-miR-144, hsa-miR-451, hsa-miR-494, hsa-miR-320。并通过生物信息学的方法预测了上述 microRNA 的靶基因。这些

microRNA 中的大多数均发现在 NSTEMI 患者中出现变化, 而药物的干预使这些 microRNA 出现了负向调控, 既在 NSTEMI 患者外周血单核细胞中表达上调的 microRNA 通过药物治疗其表达出现了下调, 在 NSTEMI 患者外周血单核细胞中表达下调的 microRNA 通过药物治疗其表达出现了上调。而 microRNA 已被证实是体内基因表达强有力的调节因子之一<sup>[12]</sup>, 据估计 microRNA 可能调控 30% 的人类 mRNA, 并通过抑制和降解来发挥负向调控作用。既是 microRNA 表达上调的其靶基因表达水平下调; microRNA 表达下调的其靶基因表达水平上调。

本研究观察到了活血化瘀药物对 microRNA 表达的影响, 并呈现出一定的变化规律, 这种变化规律是 microRNA 在疾病发生、发展、转归和预后过程中必然的变化规律还是药物干预的结果, 从目前的研究资料来看, 药物干预能够影响 microRNA 的表达, 进而影响下游的基因、蛋白、细胞因子及其网络, 从而发挥重要的药理作用。这些资料为心血管病的基因治疗增加了内容, 也为活血化瘀中药的分子生物学机制研究做了有益的探索。

### [参考文献]

[1] Anderson J L, Adams C D, Antman E M, et al. 2011 ACCF/AHA focused update incorporated into the ACC/AHA 2007 guidelines for the management of patients with unstable angina/non-ST-elevation myocardial infarction a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines [J]. Circulation, 2011, 123 (18): e426-e579.

[2] Widera C, Gupta S K, Lorenzen J M, et al. Diagnostic and prognostic impact of six circulating microRNAs in acute coronary syndrome [J]. J Mol Cell Cardiol, 2011, 51 (5): 872-875.

[3] 柯元南, 陈纪林. 不稳定性心绞痛和非 ST 段抬高心

- 肌梗死诊断与治疗指南[J]. 中华心血管病杂志, 2007,35(4):295-304.
- [ 4 ] de Hoon M J, Imoto S, Nolan J, et al. Open source clustering software [ J ]. Bioinformatics, 2004, 20 ( 9 ): 1453-1454.
- [ 5 ] Saldanha A J. Java Tree view-extensible visualization of microarray data [ J ]. Bioinformatics, 2004, 20 ( 17 ): 3246-3248.
- [ 6 ] 颜平,罗心平,施海明,等. 丹参多酚酸盐对血小板功能影响的临床研究[J]. 现代中西医结合杂志,2005, 14(16):2092-2094.
- [ 7 ] TAN K T, Tayebjee M H, Lynd C, et al. Platelet microparticles and soluble P selectin in peripheral artery disease: relationship to extent of disease and platelet activation markers[J]. Ann Med,2005,37(1):61-66.
- [ 8 ] MU X Y. Influence study of depside salt from *Salvia Miltiorrhiza* on blood platelet function and MMP-9 in patients with unstable angina [ J ]. China Medical Herald,2009,24:41.
- [ 9 ] Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases [ J ]. Circul Res, 2003, 92(8):827-839.
- [ 10 ] Kanehisa M, Goto S, Furumichi M, et al. KEGG for representation and analysis of molecular networks involving diseases and drugs [ J ]. Nucleic Acids Res, 2010,38(Suppl 1):355-360.
- [ 11 ] 徐曼,王逸平,孙伟康,等. 丹参多酚酸盐对大鼠慢性肾衰时肾功能及内源性内皮素释放的影响 [ J ]. 中国药理学与毒理学杂志,2001,15(1):39-42.
- [ 12 ] 王阶,姚魁武,刘咏梅,等. 冠心病血瘀证转录组学研究——病证结合生物标志物研究思路与方法 [ J ]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(19):1-5.

[责任编辑 张丰丰]