

# 高通量测序筛选冠心病血瘀证相关 lncRNA-miRNA-mRNA 调控网络

廖江铨<sup>1,2</sup>, 王阶<sup>1\*</sup>, 刘咏梅<sup>1</sup>, 段练<sup>1,2</sup>, 陈光<sup>1,2</sup>

(1. 中国中医科学院广安门医院, 北京 100053; 2. 北京中医药大学, 北京 100029)

**[摘要]** **目的:**筛选冠心病血瘀证相关差异表达非编码 RNA (lncRNA), 微小 RNA (microRNA, miRNA), 信使 RNA (mRNA), 构建基因间调控网络, 从转录组层面研究冠心病血瘀证物质基础和病理机制。**方法:**使用高通量测序技术, 分别检测冠心病血瘀证、冠心病非血瘀证和正常 (各 5 例) lncRNA, miRNA 和 mRNA 表达情况, 通过交联分析筛选冠心病血瘀证相关的差异基因表达谱。对获得的差异基因进行功能通路分析, 根据基因间 Pearson 相关分析和 starBase 靶基因预测平台, 构建基因间调控网络, 通过网络拓扑分析, 筛选其中的关键基因。在另一匹配队列中 (每组各 15 例) 对基因调控网络中的关键节点进行实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 验证。**结果:**39 个 lncRNA, 229 个 miRNA 和 221 个 mRNA 与冠心病血瘀证密切相关。功能与通路分析结果显示, 冠心病血瘀证差异表达基因主要与免疫和炎症相关。共有 9 个 lncRNA (均为下调), 31 个 mRNA (11 个上调, 20 个下调) 和 24 个 miRNA (14 个上调, 10 个下调) 构成共调控网络, 包括 76 个基因间调控关系。CTA-384D8.35, CTB-114C7.4, RP11-567M16.6 和 hsa-miR-3158-3p 是冠心病血瘀证基因调控网络中的关键节点。Real-time PCR 结果验证了上述结果。**结论:**冠心病血瘀证存在 lncRNA-miRNA-mRNA 差异表达基因谱, 其与免疫和炎症密切相关; 差异表达基因间存在相互调控关系, 并可依此构建冠心病血瘀证相关 lncRNA-miRNA-mRNA 调控网络。对冠心病血瘀证的物质基础进行深度挖掘, 可为从转录组层面开展中医证型相关研究提供了一定的科学基础。

**[关键词]** 冠心病血瘀证; lncRNA; miRNA; 高通量测序; 转录组学

**[中图分类号]** R287; R259 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903 (2017) 19-0028-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2017190028

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170711.1400.044.html>

**[网络出版时间]** 2017-07-11 14:00

## Screen Coronary Heart Disease Blood Stasis Syndrome-related lncRNA-miRNA-mRNA Interaction Network Via High-throughput Sequencing technology

LIAO Jiang-quan<sup>1,2</sup>, WANG Jie<sup>1\*</sup>, LIU Yong-mei<sup>1</sup>, DUAN Lian<sup>1,2</sup>, CHEN Guang<sup>1,2</sup>

(1. Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China;

2. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To identify the differentially expressed lncRNA, miRNA and mRNA levels related to coronary heart disease (CHD) blood stasis syndrome, construct the interaction network, and explore the material foundation and mechanism of blood stasis syndrome from the perspective of transcriptomics. **Method:** The expression levels of lncRNA, miRNA and mRNA in CHD blood stasis syndrome group, non-blood stasis syndrome group and healthy group were detected via high-throughput sequencing technology, and the differentially expressed genes related to CHD blood stasis syndrome were identified by using crosslinking analysis. Functional and pathway enrichment was performed for the obtained differentially expressed genes, and then the interaction network was

**[收稿日期]** 20170421 (001)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目 (81673847)

**[第一作者]** 廖江铨, 博士, 从事中西医结合防治心血管疾病研究, E-mail: liaojianguan@163.com

**[通讯作者]** \* 王阶, 教授, 主任医师, 博士生导师, 从事中西医结合防治心血管临床、科研研究, E-mail: wangjie0103@126.com

constructed by Pearson correlation analysis and starBase prediction. Key nodes of interaction network were screened out by tropical analysis. Another cohort was enrolled to verify the key nodes in interaction network with Real-time PCR. **Result:** The 39 lncRNAs, 229 miRNAs and 221 mRNAs were closely related to CHD blood stasis syndrome. Functional and pathway analysis results showed that the differentially expressed genes were majorly correlated to immune and inflammation. A total of 9 lncRNAs (all down-regulated), 31 mRNAs (11 up-regulated and 20 down-regulated) and 24 miRNAs (14 up-regulated and 10 down-regulated) constituted the regulation network, including 76 intergenic relationships. CTA-384D8.35, CTB-114C7.4, RP11-567M16.6 and hsa-miR-3158-3p were the key nodes in CHD blood stasis syndrome interaction network, which was verified by Real-time PCR. **Conclusion:** CHD blood stasis syndrome has specific lncRNA, miRNA and mRNA expression profiles, closed related to immunity and inflammation; gene-gene interactions exist among differentially expressed genes, and CHD blood stasis syndrome related lncRNA-miRNA-mRNA interaction network can be constructed on this basis.

[**Key words**] coronary heart disease (CHD) blood stasis syndrome; lncRNA; miRNA; high-throughput sequencing; transcriptomics

随着人类基因组测序工作的完成,相关组学技术发展日新月异,利用基因组学、转录组学对疾病发生发展机制进行研究已经成为学术界热点。在众多 RNA 中,非编码 RNA 可在转录或转录后水平对 mRNA 产生调控作用,从而影响下游蛋白的翻译,发挥其生理病理功能。非编码 RNA(lncRNA)和微小 RNA(miRNA)是其中研究较热门、研究方法较成熟的两种重要 RNA,均具有直接或间接调控 mRNA 的作用,最新研究表明 lncRNA 和 miRNA 之间亦存在互相调控关系,lncRNA,miRNA 和 mRNA 可组成调控网络,共同发挥生理病理功能<sup>[1-2]</sup>。非编码 RNA 同样已成为中医证型相关研究的切入点。已有研究证实,包括冠心病、糖尿病、乙型肝炎等多个疾病在内,存在血瘀证、肾阳虚等证候相关差异表达的基因谱<sup>[3-5]</sup>,如沈自尹等<sup>[6-7]</sup>对肾虚、肾阳虚在不同组织中特异基因表达谱的筛选总结,HUANG 等<sup>[8]</sup>从 947 名 2 型糖尿病患者中鉴定出 22 个与血瘀证密切相关的 SNP 位点。本课题组在前期研究中发现,冠心病血瘀证存在 miRNA 和 mRNA 差异表达谱,差异表达 miRNA 和 mRNA 可构成血瘀证相关基因调控网络<sup>[5,9]</sup>。基于以上研究背景,本研究利用高通量测序技术,对冠心病血瘀证、冠心病非血瘀证、正常进行交联分析,筛选冠心病血瘀证差异表达 lncRNA,miRNA,mRNA,并通过基因间的互作关系,构建其调控网络,试图从转录组学层面对冠心病血瘀证的证候本质进行探讨。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 所有不稳定心绞痛(UA)组为 2015 年 5 月至 2016 年 1 月期间招募于中国中医科学院广安门医院心血管科门诊及住院病房患者。

健康对照组为中国中医科学院广安门医院体检中心健康查体者。UA 患者根据辨证分为血瘀证组(A 组)和非血瘀证组(B 组),各 20 例;健康对照组(N 组)20 例,无病例脱落。3 组患者年龄、性别比例、吸烟史、早发心血管家族史均无统计学差异。本研究经中国中医科学院广安门医院委员会审查通过,批号 2015EC093-01。

**1.2 诊断标准** 冠心病 UA 诊断标准参照 2011 年美国心脏病学会基金会(ACC)/美国心脏学会(AHA)制定的《不稳定型心绞痛/非 ST 段抬高型心肌梗死诊疗指南更新》<sup>[10]</sup>,经冠脉造影确诊至少 1 支血管狭窄 > 50%,同时在招募前 48 h 内发生心绞痛。

血瘀证诊断标准参照《血瘀证诊断标准的研究》<sup>[11]</sup>,根据量表中的条目进行逐项评分,≥ 19 分为血瘀证,< 19 分为非血瘀证。由 2 名副高级中医师进行证型诊断,诊断一致者即可纳入分组。

**1.3 纳入、排除标准** 纳入标准,符合诊断标准,年龄 35 ~ 85 岁,签署知情同意书。冠心病组受试符合上述冠心病不稳定心绞痛诊断标准。正常组经病史调查、血常规、肝肾功能、心电图等检查,排除心脑血管疾病、内分泌疾病、精神及其他重大疾病。

排除标准,稳定型心绞痛者;急性心肌梗死者;合并肝、肾、造血系统等严重原发性疾病者;最近 2 周内急性感染、外伤或手术史者;合并其他较严重而必须治疗疾病者;精神、神经异常或智力障碍不能完成问卷调查者;妊娠或哺乳期妇女。

**1.4 标本采集与处理** 住院患者于入院 24 h 内清晨、门诊患者及健康对照于招募第 2 天清晨空腹抽取静脉血 4 mL,置于抗凝剂分离胶真空采集管

(EDTA)中,将血液先保存于 4 ℃,6 h 内使用红细胞裂解液分离外周血有核细胞。加入 trizol 提取总 RNA,经质量检测合格后进行高通量测序。

**1.5 高通量测序筛选差异基因** 每组随机选取 5 例样本,根据 RNA 种类分别进行文库构建,使用 HiSeq 2500 进行高通量测序,使用 FastQC 对原始序列进行检测,保留高质量的整洁序列(clean reads)。使用 Cufflinks 2.0 对所有转录组结果进行汇总整合,并使用 Ensemble 转录本数据库对获得结果进行注释。

使用 Cufflinks 软件筛选冠心病血瘀证与健康对照、冠心病血瘀证与冠心病非血瘀证之间的差异基因,差异基因的筛选标准为同时满足以下条件,①在两个样本中测序读数之和  $\geq 10$  的基因;②满足  $|\log_2(FC)| > 1$  (上调或下调 2 倍);③同时满足  $P < 0.05$  和  $FDR(\text{false discovery rate}) < 0.05$ 。

**1.6 基因间调控关系网络构建及功能分析** 获取各组间差异表达 lncRNA, miRNA, mRNA 后,根据基因间调控关系,构建基因调控网络。为提高所构建基因间调控关系的可靠性,使用 Pearson 相关分析和 starBase v2.0 靶基因数据库<sup>[12]</sup>交叉印证,筛选组合成基因调控网络,并使用 cytoscape 3.3 进行可视化。使用基因本体论(GO)<sup>[13]</sup>和京都基因与基因组百科全书(KEGG)<sup>[14]</sup>在线工具进行功能富集和信号通路富集分析。使用实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)方法对每组剩余 15 例样本进行差异基因网络

中关键基因表达验证。

**1.7 统计学分析** 采用 SPSS 17.0 统计软件进行其余统计分析。计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示。两组计量资料比较时,不符合正态分布的采用秩和检验;符合正态分布的,采用独立样本  $t$  检验。使用 Pearson 相关分析计算两组间相关系数。 $P < 0.05$  认为具有统计学差异。

## 2 结果

**2.1 差异表达基因筛选** 冠心病血瘀证和正常之间的差异基因包含①与冠心病相关的差异基因;②与血瘀证相关的差异基因;③冠心病血瘀证和非血瘀证之间的差异基因包含血瘀证相关的差异基因。将两组差异基因取交集,则获得冠心病血瘀证相关的差异基因。经筛选后,冠心病血瘀证相关差异基因包括 39 个 lncRNA(3 个上调,36 个下调),229 个 miRNA(138 个上调,91 个下调)和 221 个 mRNA(105 个上调,116 个下调)。

**2.2 差异基因功能分析** 使用 GO,KEGG,DAVID 等功能通路分析工具,分别分析上调和下调的冠心病血瘀证相关差异表达 mRNA,结果显示上调 mRNA 的 GO 项目富集包括 17 项生理过程(biological process),53 项分子功能(molecular function)和 1 项细胞成分(cellular component);下调 mRNA 的 GO 富集包括 17 项 biological process,3 项 molecular function 和 6 项 cellular component。每项显著性排名前 10 的富集项目见图 1,2。

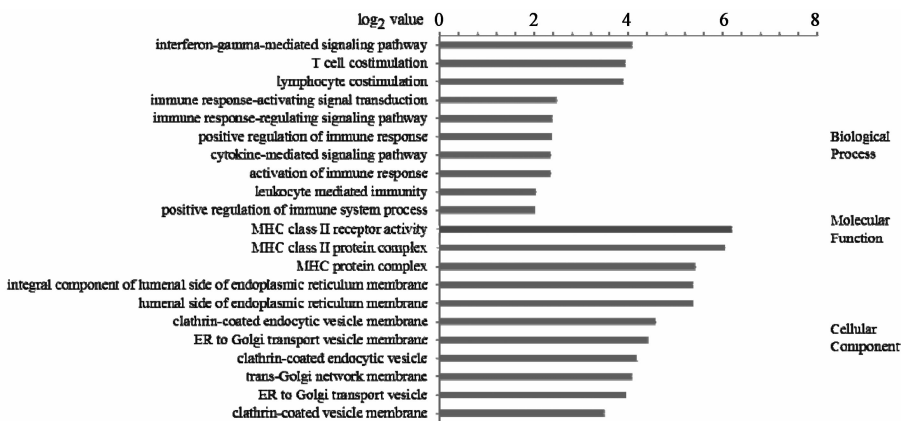


图 1 上调差异 mRNA 的 GO 富集项目(各项中 fold enrichment 排名前 10)

Fig.1 GO enrichment terms of upregulated mRNA(top 10 of fold enrichment)

**2.3 lncRNA-miRNA-mRNA 相互作用分析和调控网络构建** 通过联合 Pearson 相关分析和 starBase 数据库预测获得的基因间调控关系,构建 lncRNA, miRNA, mRNA 之间的共调控网络。符合共调控条

件的共有 9 个 lncRNA(均为下调),31 个 mRNA(11 个上调,20 个下调)和 24 个 miRNA(14 个上调,10 个下调)构成共调控网络,包括 76 个基因间调控关系。见图 3。

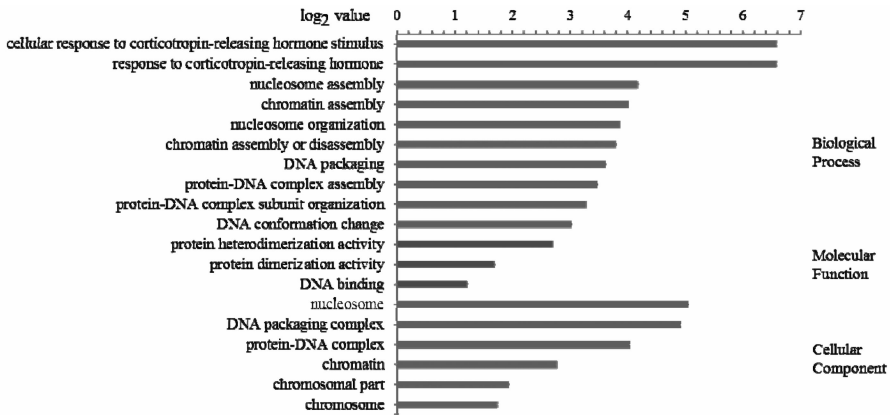


图 2 下调差异 mRNA 的 GO 富集项目(各项中 fold enrichment 排名前 10)

Fig. 2 GO enrichment terms of downregulated mRNA (top 10 of fold enrichment)

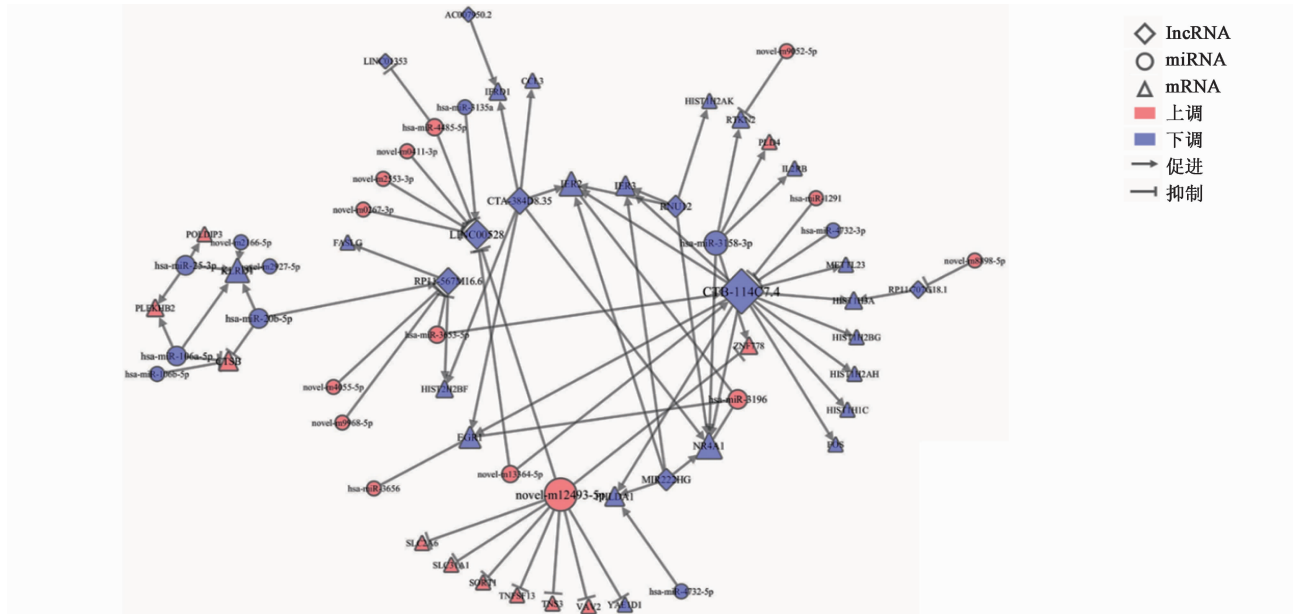


图 3 冠心病血瘀证相关 lncRNA-miRNA-mRNA 调控网络

Fig. 3 CHD blood stasis syndrome related lncRNA-miRNA-mRNA interaction network

对调控网络进行拓扑分析,获得网络中各节点的网络属性,通过韦恩图筛选网络中的关键基因,纳入节点度、中介中心度和亲近中心性作为 3 个分析项目。4 个基因被认为是其中关键基因(位于韦恩图中心区域),包括 3 个 lncRNA (CTA-384D8.35, CTB-114C7.4 和 RP11-567M16.6) 和 1 个 miRNA (hsa-miR-3158-3p)。

**2.4 Real-time PCR 验证网络中关键基因** 使用 Real-time PCR 检测冠心病血瘀证 lncRNA-miRNA-mRNA 调控网络中的关键节点以及其上下游基因在各组中表达情况。获得相对正常的每组表达量后与高通量测序相对结果进行比较。结果显示,CTA-384D8.35, CTB-114C7.4, miR-3158-3p 和 novel-

m12493-5p 等网络关键节点表达水平与高通量测序结果一致。见表 1。

### 3 讨论

目前已有大量研究证实, lncRNA, miRNA 和 mRNA 以不同方式参与冠心病的生理病理过程。关于中医证型的转录组学研究,亦有多项研究涉及到 lncRNA, miRNA 和 mRNA。本研究开创性地以 lncRNA, miRNA, mRNA 多层次为切入点,使用高通量测序技术,筛选冠心病血瘀证特征性基因表达谱。通过多组别交联分析,以较严格的差异判别标准,筛选出 39 个 lncRNA, 229 个 miRNA 和 221 个 mRNA 与冠心病血瘀证密切相关。

根据 GO 和 KEGG 富集分析结果可见,冠心病

表 1 基因网络中关键节点高通量测序与 Real-time PCR 结果比较

Table 1 Comparison of key nodes in interaction network between high throughput sequencing and Real-time PCR validation

组别	CTB-114C7.4		CTA-384D8.35		novel-m12493-5p		miR-3158-3p	
	相对表达量	高通量测序	相对表达量	高通量测序	相对表达量	高通量测序	相对表达量	高通量测序
血瘀证	0.005 9	0.192 3	0.036 8	0.440 3	1.119 1	1.188 9	2.238 4	3.187 8
非血瘀证	0.010 1	0.119 5	0.042 1	0.503 2	2.538 5	1.260 8	2.136 7	3.136 8
健康对照	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0

血瘀证特异表达 mRNA 主要与免疫相关,如免疫反应的激活信号转导,  $\gamma$ -干扰素介导的信号通路, T 细胞共刺激, 白细胞介导的免疫反应, 白细胞的活化等。信号通路方面, Toll 样受体信号通路为代表性与冠心病或血瘀证明显相关的信号通路。Toll 样受体信号通路在免疫反应中具有重要意义, 该信号通路可以导致多种炎症基因表达上调, 激活和释放相关炎症因子, 对 Toll 样信号通路的抑制可以缓解炎症反应<sup>[15]</sup>。

lncRNA 和 miRNA 发挥其生理病理功能的其中一个重要途径是对 mRNA 进行调控<sup>[16-17]</sup>, lncRNA 和 miRNA 之间亦存在调控关系<sup>[18]</sup>, 因此 lncRNA, miRNA 和 mRNA 3 者可通过相互作用构成调控网络, 在网络中相互影响、相互制约, 以基因网络形式共同参与生理病理过程<sup>[19-20]</sup>。经过上述较严谨的调控关系筛选后, 最终获得 76 个基因间调控关系, 包含 9 个 lncRNA (均为下调), 31 个 mRNA (11 个上调, 20 个下调) 和 24 个 miRNA (14 个上调, 10 个下调)。64 个网络节点中, 9 个节点有  $\geq 5$  个交联基因, 最多交联基因的是 CTB-114C7.4 (15 个)。经过网络拓扑分析和韦恩分析, 3 个 lncRNA (CTA-384D8.35, CTB-114C7.4 和 RP11-567M16.6) 和 1 个 miRNA (hsa-miR-3158-3p) 被认为是网络中的关键节点。PCR 验证支持相关基因的表达趋势。

本研究通过使用高通量测序和生物信息学分析技术, 从 lncRNA, miRNA, mRNA 对冠心病血瘀证进行多层次研究, 获得了冠心病血瘀证临床患者的特异基因表达谱, 初步了解相关基因集所涉及的生理功能和信号通路, 并根据基因间调控关系和相关分析构建了冠心病血瘀证 lncRNA-miRNA-mRNA 调控网络, 对冠心病血瘀证的物质基础进行了深度挖掘, 为从转录组层面开展中医证型相关研究提供了一定的科学基础。

[参考文献]

[1] WANG K, LIU C Y, ZHOU L Y, et al. APF lncRNA regulates autophagy and myocardial infarction by

targeting miR-188-3p [J]. Nat Commun, 2015, doi: 10.1038/ncomms7779.

[2] WANG K, LONG B, ZHOU L Y, et al. CARL lncRNA inhibits anoxia-induced mitochondrial fission and apoptosis in cardiomyocytes by impairing miR-539-dependent PHB2 regulation [J]. Nat Commun, 2014, doi: 10.1038/ncomms4596.

[3] 严石林, 沈宏春, 王浩中, 等. 肾虚证的转录组特征研究 [J]. 华西医学, 2012, 27(4): 61-64.

[4] 杨婵娟, 刘宏伟, 王丽春, 等. 慢性乙型肝炎肝郁脾虚证和脾胃湿热证患者的差异表达基因研究初探 [J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 32(8): 1032-1037.

[5] WANG J, YU G. A systems biology approach to characterize biomarkers for blood stasis syndrome of unstable angina patients by integrating microRNA and messenger RNA expression profiling [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2013, doi: 10.1155/2013/510208.

[6] 沈自尹, 黄建华, 陈伟华. 以药测证对肾虚和肾阳虚大鼠基因表达谱的比较研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2007, 27(2): 135-137.

[7] 沈自尹, 张新民, 林伟, 等. 基于基因表达谱数据建立肾虚证量化数学模型 [J]. 中国中西医结合杂志, 2008, 28(2): 131-134.

[8] HUANG K C, HUANG H J, CHEN C C, et al. Susceptible gene of stasis-stagnation constitution from genome-wide association study related to cardiovascular disturbance and possible regulated traditional Chinese medicine [J]. BMC Complement Altern Med, 2015, doi: 10.1186/s12906-015-0761-x.

[9] LIAO J, LIU Y, WANG J. Identification of more objective biomarkers for blood-stasis syndrome diagnosis [J]. BMC Complement Altern Med, 2016, doi: 10.1186/s12906-016-1349-9.

[10] Wright R S, Anderson J L, Adams C D, et al. 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): a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task

- Force on Practice Guidelines[J]. *Circulation*, 2011, 123 (18): 2022-2060.
- [11] 王阶, 陈可冀, 翁维良, 等. 血瘀证诊断标准的研究[J]. *中西医结合杂志*, 1988, 8 (10): 585-587, 589, 580.
- [12] Betel D, Wilson M, Gabow A, et al. The microRNA. org resource: targets and expression [J]. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36 (Database issue): 149-153.
- [13] Gene Ontology Consortium. Gene Ontology Consortium: going forward [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43 (Database issue): D1049-1056.
- [14] Ogata H, Goto S, Sato K, et al. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes [J]. *Nucleic Acids Res*, 1999, 27 (1): 29-34.
- [15] Kawai T, Akira S. TLR signaling [J]. *Semin Immunol*, 2007, 19 (1): 24-32.
- [16] LI Y, LUO M, SHI X, et al. Integrated bioinformatics analysis of chromatin regulator EZH2 in regulating mRNA and lncRNA expression by ChIP sequencing and RNA sequencing [J]. *Oncotarget*, 2016, 7 (49): 81715-81726.
- [17] SONG C, ZHANG J, LIU Y, et al. Construction and analysis of cardiac hypertrophy-associated lncRNA-mRNA network based on competitive endogenous RNA reveal functional lncRNAs in cardiac hypertrophy [J]. *Oncotarget*, 2016, 7 (10): 10827-10840.
- [18] Yoon J H, Abdelmohsen K, Gorospe M. Functional interactions among microRNAs and long noncoding RNAs [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2014, doi: 10.1016/j.semcdb.2014.05.015.
- [19] WANG W, ZHUANG Q, JI K, et al. Identification of miRNA, lncRNA and mRNA-associated ceRNA networks and potential biomarker for MELAS with mitochondrial DNA A3243G mutation [J]. *Sci Rep*, 2017, doi: 10.1038/srep41639.
- [20] 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]

## 欢迎订阅 2018 年《中国实验方剂学杂志》

《中国实验方剂学杂志》由国家中医药管理局主管, 中华中医药学会、中国中医科学院中药研究所主办的学术刊物。本刊创建于 1995 年 10 月, 主要设置栏目包括复方配伍专论、方剂学研究、药剂与炮制、资源与鉴定、化学分析、药物代谢、药理、毒理、临床、数据挖掘、中医传承及相关综述等。目前为 CSCD 来源期刊、中文核心期刊、中国科技核心期刊、RCCSE 中国学术期刊排行榜核心期刊、美国《化学文摘》统计源期刊; 并被评为中国中医药优秀期刊及中国学术期刊优秀期刊。

本刊为半月刊, 16 开本, 234 页, 标准刊号 ISSN1005-9903; CN11-3495/R。每期定价 48 元, 全年 1152 元。国内外公开发行, 国内由北京市报刊发行局办理总发行, 邮发代号 2-417; 国外由中国国际图书贸易集团有限公司办理发行, 代号 SM4655, 欢迎订阅。读者还可通过本刊编辑部办理邮购, Tel: (010)84076882, E-mail: syfjx\_2010@188.com, 网址: www.syfjzz.com。