

文章编号 1006-8147(2019)01-0054-05

论 著

冠心病患者外周血中 lncRNA-ANRIL 的表达水平及其临床意义

王 娜^{1,2}, 张学军¹

(1.天津医科大学免疫学系, 天津 300070; 2.天津市滨海新区大港医院检验科, 天津 300100)

摘要 目的:研究冠心病患者外周血中 lncRNA-ANRIL 的表达水平及其临床意义。方法:选取 2016 年 2 月-2018 年 2 月于本院心内科住院的冠心病病人 231 人作为冠心病组,此外纳入 447 名健康自愿者作为对照组,取两组病人外周血,RT-PCR 法测定外周血中 lncRNA-ANRIL 的表达及 9p21 基因区域 3 种单核苷酸:rs1333049、rs564398、rs2811712 以及 CDKN2A、CDKN2B 的相对表达量,分析各变量的相关性,分析 ANRIL 的表达于冠心病诊断中的敏感性与特异性。结果:ROC 曲线示:ANRIL(外显子 1-2)、ANRIL(外显子 17-18)在诊断冠心病方面均具有统计学意义(均 $P<0.01$);lnc RNA-ANRIL(外显子 1-2)与 CDKN2A、CDKN2B 表达均呈正相关(均 $P<0.05$),lncRNA-ANRIL(外显子 17-18)与 CDKN2A 的表达呈正相关($P<0.0001$)。冠心病组单核苷酸 rs1333049 等位基因 G 显著低于对照组($P<0.05$);冠心病组 rs133049 等位基因 G 与 ANRIL(外显子 1-2)、ANRIL(外显子 17-18)的表达均呈正相关($r=0.3402/0.3124$,均 $P<0.05$);冠心病组 ANRIL(外显子 1-2)与 ANRIL(外显子 17-18)的相对表达量均明显小于对照组(均 $P<0.01$)。结论:ANRIL 可能通过调控 CDKN2A/B 的表达影响冠心病的发生发展,ANRIL 的表达可能受染色体 9p21 区域单核苷酸 rs1333049 表达的影响,外周血 ANRIL 的表达可以作为早期诊断冠心病的特异性指标。

关键词 冠心病;lncRNA-ANRIL;9p21;CDKN2A/B

中图分类号 R541.4

文献标志码 A

Expression of lncRNA-ANRIL in peripheral blood of patients with coronary heart disease and its clinical significance

WANG Na^{1,2}, ZHANG Xue-jun¹

(1. Department of Immunology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Tianjin Binhai New Area Dagang Hospital, Tianjin 300100, China)

Abstract Objective: To explore the expression level of lncRNA-ANRIL in peripheral blood of patients with coronary heart disease and its clinical significance. **Methods:** Two hundred and thirty-two coronary heart disease patients were selected as coronary heart disease group from February, 2016 to February, 2018 in our hospital department of cardiology. In addition, 447 healthy volunteers were included as the control group. The peripheral blood of two groups of patients was extracted. The relative expression of lncRNA-ANRIL and 3 single nucleotides in the region of 9p21 gene: rs1333049, rs564398, rs2811712, and CDKN2A, CDKN2B were measured by RT-PCR method. The correlations between variables were analyzed, and the sensitivity and specificity of the expression of ANRIL in the diagnosis of coronary heart disease were determined. **Results:** The ROC curve showed that ANRIL (exon 1-2) and ANRIL (exon 17-18) were statistically significant in the diagnosis of coronary heart disease ($P<0.01$); The expression of LNC RNA-ANRIL (exon 1-2) was positively correlated with the expression of CDKN2A and CDKN2B ($P<0.05$). LncRNA-ANRIL (exon 17-18) was positively correlated with the expression of CDKN2A ($P<0.0001$). The SNPs rs1333049 allele G of the coronary heart disease group was significantly lower than that of the control group ($P<0.05$), and the rs133049 allele G was positively correlated with the expression of ANRIL (exon 1-2) and ANRIL (exon 17-18) ($r=0.3402/0.3124$, all $P<0.05$), and the expression of the relative value of ANRIL (exon 1-2) and ANRIL (exon 17-18) in coronary heart disease group was significantly lower than that of the control group ($P<0.01$). **Conclusion:** ANRIL may affect the development of coronary heart disease by regulating the expression of CDKN2A/B. The expression of ANRIL may be influenced by the expression of SNPs rs1333049 of the chromosome 9p21 region. The expression of ANRIL in peripheral blood can be used as a specific marker for early diagnosis of coronary heart disease.

Key words coronary heart disease (CHD); lncRNA-ANRIL; 9p21; CDKN2A/B

冠心病引起的心肌梗死等卒中性疾病目前依然是全球人口死亡和残疾的主要原因^[1-2]。尽管目前

作者简介 王娜(1979-),女,主管技师,硕士在读,研究方向:医学检验;通信作者:张学军, E-mail: xjzh@tmu.edu.cn。

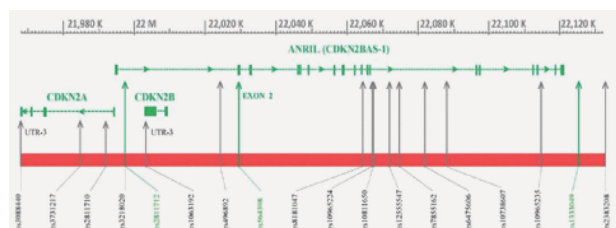
心血管介入治疗技术发展迅速,但仍有相当大比例的冠心病患者在早期未能准确诊断,并且在心梗发作时不能得到有效的救治,急性冠脉综合征等冠心病严重阶段将会对心肌细胞造成严重损害,最终导

致心肌细胞坏死、凋亡、肥大或纤维化。目前研究发现冠心病所致心肌损伤的一部分机制是通过基因表达的下调而诱导的,非编码 RNAs 被任意分为短非编码 RNAs (microRNA, 20~22 个核苷酸长)和长非编码 RNAs (lncRNAs, 200 个核苷酸)。miRNAs 主要通过调节靶信使 RNA 的功能来下调基因表达^[3],但 lncRNAs 对基因表达的调控更为复杂,包括激活或抑制基因表达、调节染色质结构等^[4]。目前多项研究报道 lncRNA 已经成为肿瘤学领域中进行诊断的新的生物标志物以及肿瘤治疗的新靶点^[4-5],然而,笔者对 lncRNAs 在心血管疾病中的作用认识还处于初步阶段,本研究主要探索了 lncRNA-ANRIL 于冠心病病人外周血清中的表达及其诊断意义,现报道如下。

1 对象与方法

1.1 研究对象 选取 2016 年 2 月~2018 年 2 月来自天津市大港医院行冠状动脉 CT 造影或冠脉 CT 的患者 231 例,定义为冠心病组,男性 189 例,女性 42 例,平均年龄(63.42 ± 10.75)岁;同时选取健康志愿者 447 例,定义为对照组,男性 359 例,女性 88 例,平均年龄(61.17 ± 9.84)岁。冠心病组纳入标准:冠脉 CT 造影检查:右冠状动脉、左回旋支、左前降支、左主干的主要血管,根据 Judkins 标准:每个血管进行至少 3 个多体位头测定,结果示 ≥ 1 支血管直径出现超过 50%的狭窄确诊为冠状动脉粥样硬化性心脏病。排除标准:伴有严重肝肾功能不全、周围血管性疾病、肿瘤、血液系统疾病、急慢性感染性疾病、慢性阻塞性肺疾病、心律失常、瓣膜性心脏病等。

1.2 主要实验试剂 Trizol 试剂购自 invitrogen 公司,根据图 1 9p21 区域基因转录图谱,选择 lncRNA-ANRIL、CDKN2A、CDKN2B、GAPDH 基因作为引物合成对象,上下游引物由武汉金凯瑞公司合成。SYBR GREEN Master Mix 与逆转录试剂盒均购自赛默飞世尔公司。



分析, $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 lnc RNA-ANRIL 表达与冠心病相关性比较分析 冠心病组 ANRIL(外显子 1-2)与 ANRIL(外显子 17-18)的相对表达量均明显小于对照组(均 $P < 0.01$),见表 1。通过 ROC 曲线可知 ANRIL(外显子 1-2)对于诊断冠心病具有显著统计学意义($P < 0.001$),曲线下面积为 0.894(95%CI 0.835~0.953),最佳临界值(cut off 值)为:0.945 0,敏感性为:50.88%,特异度为 98.25%。ANRIL(外显子 17-18)对于诊断冠心病也具有显著统计学意义($P < 0.001$),曲线下面积为 0.793(95%CI 0.711~0.875),最佳临界值(cut off 值)为 1.10,敏感性为 45.61%,特异度为 94.74%,见图 2。

表 1 两组 lnc-ANRIL 相对表达量比较

Tab 1 Comparison of relative expression of lnc-ANRIL between the two groups

组别	n	ANRIL(外显子 1-2) 相对表达量	ANRIL(外显子 17-18) 相对表达量
冠心病组	231	0.73±0.12	0.84±0.16
对照组	447	0.98±0.15	1.04±0.18
t		21.96	14.23
P		<0.000 1	<0.000 1

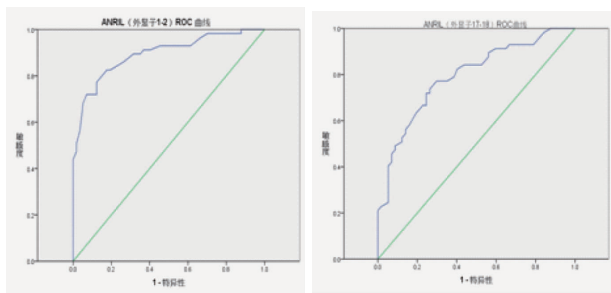


图 2 ANRIL 诊断冠心病 ROC 曲线分析

Fig 2 ROC curve analysis of the diagnosis of coronary heart disease by ANRIL

2.2 9p21 区域单核苷酸多态性与冠心病相关性比较分析 对冠心病组及对照组测定了 9p21 基因区域 3 种单核苷酸:rs1333049、rs564398、rs2811712 的多态性分布情况。结果显示:rs1333049 等位基因频率在两组受试者中具有显著差异($P < 0.05$),其中冠心病组等位基因 G 显著低于对照组 ($P < 0.05$),而 rs564398 与 rs2811712 等位基因频率在两组间的比较并无统计学意义($P > 0.05$),见表 2,图 3。

2.3 rs1333049 等位基因频率 G 与 lnc-ANRIL 表达的相关性分析 分别测定了冠心病组 rs133049 等位基因 G 的分布与 ANRIL(外显子 1-2)、ANRIL

(外显子 17-18)的相关性,发现两者均呈正相关($r = 0.340 2/0.312 4$,均 $P < 0.05$),见图 4。

表 2 两组单核苷酸等位基因频率比较

Tab 2 Comparison of rs1333049 single nucleotide allele frequencies between the two groups

单核苷酸	基因型	对照组/人(%)	冠心病组/人(%)	χ^2	P
Rs1333049	CC	101(22.6)	72(31.2)	9.101	0.010 6
	CG	224(50.1)	116(50.2)		
	GG	122(27.3)	43(18.6)		
Rs564398	CC	9(2.0)	4(1.7)	0.543	50.762 0
	CG	109(24.4)	51(22.1)		
	GG	329(73.6)	176(76.2)		
Rs2811712	CC	279(62.4)	140(60.6)	0.609	70.737 2
	CG	147(32.9)	82(35.5)		
	GG	21(4.7)	9(3.9)		

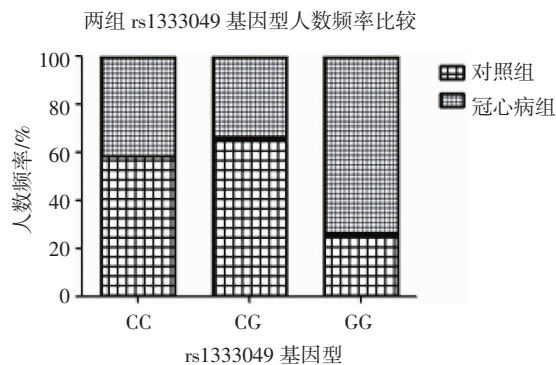


图 3 两组 rs1333049 基因型人数频率比较

Fig 3 Frequency comparison of rs1333049 genotypes in the groups

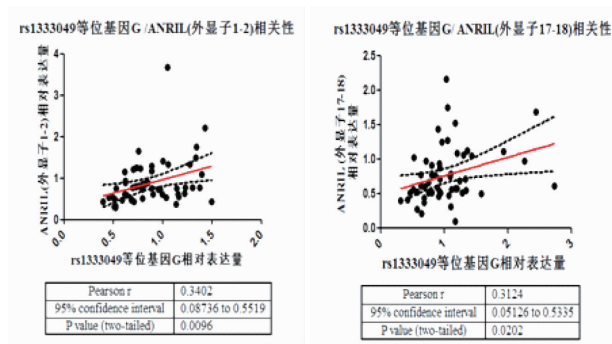


图 4 rs1333049 等位基因 G 与 ANRIL 相关性分析

Fig 4 Correlation analysis of rs1333049 allele G and ANRIL

2.4 lnc RNA-ANRIL 表达与 CDKN2A、CDKN2B 表达的相关性分析 分别测定了冠心病组 lnc-RNA 表达与 CDKN2A、CDKN2B 表达的相关性,结果显示:lnc RNA-ANRIL(外显子 1-2)与 CDKN2A、CDKN2B 表达均呈正相关(均 $P < 0.05$),lncRNA-ANRIL(外显子 17-18)与 CDKN2A 的表达呈正相关($P < 0.000 1$),而与 CDKN2B 的表达无相关性(图 5)。

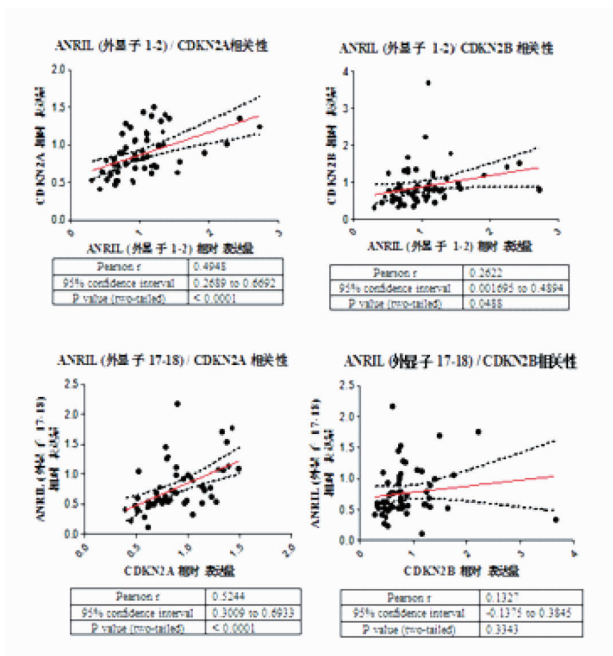


图 5 ANRIL 与 CDKN2A、CDKN2B 表达的相关性分析

Fig 5 The correlation analysis of the expressions of ANRIL, CDKN2A and CDKN2B

3 讨论

本研究主要探索了 lncRNA-ANRIL 于冠心病病人中的表达及其临床意义, lncRNA-ANRIL 属于长链非编码 RNA, 既往研究将 lncRNA-ANRIL 鉴定为与多种疾病相关的遗传易感性位点, 这些疾病包括 2 型糖尿病、颅内动脉瘤及多种癌症^[6]。lncRNA ANRIL 基因位于染色体 9p21 区域, 全长 3.8 kb, 在人体内多种正常组织中均有表达。ANRIL 基因序列的最后一个外显子与 9p21 心血管疾病相关基因位点相邻, 因此我们同时分析了 9p21 基因区域单核苷酸的表达与之相关性。本研究涉及的另外两个指标: CDKN2A 和 CDKN2B (编码 p15KIF4B, P16INK4A 和 p14ARF) 为两个细胞周期依赖性激酶抑制剂, 位于 lnc-RNA ANRIL 关联点附近, 该两种激酶抑制剂均在细胞增殖中发挥了关键作用, 并且在该过程中可有效吸附其它激酶。在细胞生长过程中, CDKN2A/B 被多梳蛋白所抑制, 于细胞生长过程中出现激活^[7]。

目前有证据表明 ANRIL 可通过组蛋白修饰调节 CDKN2A/B 基因表达的作用。ANRIL 可通过调节 CDKN2A 从而发挥调节细胞衰老的作用, 并且表现出衰老依赖的增殖作用^[8]。ANRIL 转录后可与 Chromatin 7 (CBX7 亚基的多梳抑制复合物 1) 整合从而沉默 p16INK4A (CDKN2A), 并且可吸附多梳抑制复合物 2 (PRC2) 从而沉默 p15INKB (CDKN2B) 的表达^[9]。此外, ANRIL 是 CDKN2B 基因的反义物,

对于 CDKN2B 有义序列的表达具有抑制作用。因此, 在基因敲除 ANRIL 的情况下, CDKN2B 位点的抑制将被削弱, CDKN2B 将出现上调^[10]。笔者的研究发现 ANRIL 的减少与增多与 CDKN2A 表达呈正相关, PR 复合假说并不能解释该种机制, 这种减少似乎是由另一种机制所引起的。尽管目前的研究报道了 ANRIL 可通过多梳蛋白抑制 CDKN2A/B 基因座中的作用, 但是 ANRIL 的每个剪接变体的具体作用以及转录物的所有可能功能仍然缺乏相应的研究。因此本实验分别探讨了 ANRIL (外显子 1-2)、ANRIL (外显子 17-18) 对于 CDKN2A/B 表达的相关性。

染色体 9p21 区域中与疾病相关的单核苷酸表达极为丰富, 与该位点相关的一些基因表型与动脉粥样硬化性疾病、心肌梗死、颅内动脉瘤和 2 型糖尿病有关^[11-14]。此外, 与其它远缘病因的疾病, 如黑色素瘤、皮肤癌、白血病、牙周炎和阿尔茨海默病、子宫内膜异位症和青光眼均有关联^[15-19]。全基因组关联研究 (GWAS) 目前也已经确定了染色体 9p21 位点基因的遗传变异与心血管疾病的发生具有关联性^[20]。因此本研究测定了冠心病组及对照组 9p21 基因区域 3 种单核苷酸: rs1333049、rs564398、rs2811712 的表达情况, 该 3 种 SNPs 均在其它疾病中具有差异性的表达, 分析了其不同基因型在冠心病病人中的差异性表达。

通过本次研究笔者发现: SNP rs1333049 不同基因型的表达在冠心病人群与健康人群中存在显著差异, rs1333049 单核苷酸等位基因 G 的下降可能与动脉粥样硬化相关, 进一步研究等位基因 G 与 ANRIL 表达的相关性发现, 该两者表达存在正相关, 说明染色体 9p21 区域单核苷酸 rs1333049 等位基因可能参与调控了 ANRIL 的表达; 此外冠心病病人血清中 ANRIL 的表达均低于正常受试者, 通过 ROC 曲线可以发现 ANRIL (外显子 1-2)、ANRIL (外显子 17-18) 在诊断冠心病方面均具有统计学意义, ANRIL 可以作为诊断冠心病发病的高特异性指标; 最后本实验发现 ANRIL (外显子 1-2) 与 CDKN2A、CDKN2B 表达均呈正相关, ANRIL (外显子 17-18) 与 CDKN2A 的表达呈正相关。

综上所述, ANRIL 可能通过调控 CDKN2A/B 的表达影响冠心病的发生发展, ANRIL 的表达可能受染色体 9p21 区域单核苷酸 rs1333049 表达的影响, 外周血 ANRIL 的表达可以作为早期诊断冠心病的特异性指标。

参考文献:

- [1] Varavikova E, Bickford J D, Tulchinsky T H. The new public health

- [M]. Third edition, London: Academic Press, 2014: 213
- [2] Roger V L, Go A S, Lloyd-Jones D M, et al. Heart disease and stroke statistics –2012 update: a report from the American Heart Association[J]. *Circulation*, 2012, 125(1): e2
- [3] Guo H, Ingolia N T, Weissman J S, et al. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels[J]. *Nature*, 2010, 466(7308): 835
- [4] Wahlestedt C. Targeting long non-coding RNA to therapeutically upregulate gene expression[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2013, 12(6): 433
- [5] Carninci P, Kasukawa T, Katayama S, et al. The transcriptional landscape of the mammalian genome[J]. *Science*, 2005, 309(5740): 1559
- [6] Pasmant E, Sabbagh A, Vidaud M, et al. ANRIL, a long, noncoding RNA, is an unexpected major hotspot in GWAS[J]. *FASEB J*, 2011, 25(2): 444
- [7] Gill J, Peters G. Regulation of the INK4b-ARF-INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for all[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, 7(9): 667
- [8] Yap KL, Li S, Muñoz-Cabello AM, et al. Molecular Interplay of the noncoding RNA ANRIL and methylated histone H3 lysine 27 by Polycomb CBX7 intratranscriptional silencing of INK4a[J]. *Mol Cell*, 2010, 38(5): 662
- [9] Kotake Y, Nakagawa T, Kitagawa K, et al. Long non-coding RNA ANRIL is required for the PRC2 recruitment to and silencing of p15INK4B tumor suppressor gene[J]. *Oncogene*, 2011, 30(16): 1956
- [10] Yang X C, Zhang Q, Chen M L, et al. MTAP and CDKN2B genes are associated with myocardial infarction in Chinese Hans[J]. *Clin Biochem*, 2009, 42(10/11): 1071
- [11] Wellcome Trust Case Control Consortium. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3000 shared controls[J]. *Nature*, 2007, 447(7145): 661
- [12] Broadbent H M, Peden J F, Lorkowski S, et al. Susceptibility to coronary artery disease and diabetes is encoded by distinct, tightly linked, SNPs in the ANRIL locus on chromosome 9p[J]. *Hum Mol Genet*, 2008, 17(6): 806
- [13] Helgadóttir A, Thorleifsson G, Magnusson K P, et al. The same sequence variant on 9p21 associates with myocardial infarction, abdominal aortic aneurysm and intracranial aneurysm[J]. *Nat Genet*, 2008, 40(2): 217
- [14] Gschwendtner A, Bevan S, Cole J W, et al. International stroke genetics consortium, sequence variants on chromosome 9p21.3 confer risk for atherosclerotic stroke[J]. *Ann Neurol*, 2009, 65(5): 531
- [15] Yang X R, Liang X, Pfeiffer R M, et al. Associations of 9p21 variants with cutaneous malignant melanoma, nevi, and pigmentation phenotypes in melanoma-prone families with and without CDKN2A mutations[J]. *Familial Cancer*, 2010, 9(4): 625
- [16] Falchi M, Bataille V, Hayward N K, et al. Genome-wide association study identifies variants at 9p21 and 22q13 associated with development of cutaneous nevi[J]. *Nat Genet*, 2009, 41(8): 915
- [17] Sherborne A L, Hosking F J, Prasad R B, et al. Variation in CDKN2A at 9p21.3 influences childhood acute lymphoblastic leukemia risk[J]. *Nat Genet*, 2010, 42(6): 492
- [18] Schaefer A S, Richter G M, Groessner-Schreiber B, et al. Identification of a shared genetic susceptibility locus for coronary heart disease and periodontitis[J]. *PLoS Genet*, 2009, 5(2): e1000378
- [19] Ernst F D, Uhr K, Teumer A, et al. Replication of the association of chromosomal region 9p21.3 with generalized aggressive periodontitis (gAgP) using an independent case-control cohort[J]. *BMC Med Genet*, 2010, 11: 119
- [20] Visel A, Zhu Y, May D, et al. Targeted deletion of the 9p21 non-coding coronary artery disease risk interval in mice[J]. *Nature*, 2010, 464(7287): 409

(2018-05-04 收稿)

(上接第 50 页)

- Takayasu's arteritis: evaluation of the activity by ultrasonography[J]. *J Ultrasound Med*, 2001, 20(4): 371
- [14] Giordana P, Baquéjuston M C, Jeandel P Y, et al. Contrast-Enhanced Ultrasound of Carotid Artery Wall in Takayasu Disease First Evidence of Application in Diagnosis and Monitoring of Response to Treatment[J]. *Circulation*, 2011, 124(2): 245
- [15] Herlin B, Baud J M, Chadenat M L, et al. Contrast-enhanced ultrasonography in Takayasu arteritis: watching and monitoring the arterial inflammation[J]. *BMJ Case Rep*, 2015, 2015

(2018-03-29 收稿)