

文章编号 1006-8147(2021)06-0561-03

论著

急性心肌梗死后心力衰竭的特异性靶点基因研究

李树杰^{1,2}, 宋昱²

(1.天津医科大学研究生院,天津 300070;2.天津泰达国际心血管病医院 ICU,天津 300457)

摘要 目的:生物信息库系统性比较急性心肌梗死后心力衰竭患者相对于非心力衰竭患者的差异性基因(mRNA 和 miRNAs),临床进行重点差异基因验证。方法:基础研究中,基于 GEO 数据库(编号 GSE59867)中 17 例急性心肌梗死患者在发病后 6 个月随访期间内心力衰竭发展的详细情况,分析心力衰竭患者相对于非心力衰竭患者基因表达的差异,构建心力衰竭患者基因表达网络。临床研究中,回顾性收集天津泰达国际心血管病医院 2018 年 1 月—2020 年 12 月经病理确诊的急性心肌梗死患者 61 例,根据心力衰竭与否,分为心力衰竭组和非心力衰竭组。利用 ELISA 方法比较验证特征基因的表达差异。结果:基础研究发现,与急性心肌梗死后非心力衰竭患者比较,心力衰竭患者共显示 703 个差异表达基因(mRNAs),包括 567 个上调基因和 136 个下调基因。其中 SPI1、MCUR1、ZBTB7A、IRF8 和 PPARG 表现出最显著上调。与此同时,心力衰竭患者表现出 12 个差异 miRNAs,其中上调的 miRNAs 5 个,下调的 miRNAs 7 个。miR-133、miR-124-3 和 miR-9-1 显著下调,差异均具有统计学意义($P<0.05$)。临床研究发现,SPI1、MCUR1、ZBTB7A、IRF8 和 PPARG 蛋白表达浓度在急性心肌梗死后心力衰竭组中有了显著的升高($SPI1:t=4.36, P<0.01$; $MCUR1:t=4.98, P<0.01$; $ZBTB7A:t=3.77, P<0.01$; $IRF8:t=3.12, P<0.01$; $PPARG:t=5.13, P<0.01$)。结论:相对于心肌梗死后非心力衰竭患者,心力衰竭患者表现出若干差异基因(SPI1、MCUR1、ZBTB7A、IRF8 和 PPARG),可以作为潜在临床标志物进行研究。

关键词 急性心肌梗死;心力衰竭;差异性基因比较

中图分类号 R543.3

文献标志码 A

Study on specific target genes of heart failure after acute myocardial infarction

LI Shu-jie^{1,2}, SONG Yu²

(1. Graduate School, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2. ICU of Tianjin TEDA International Cardiovascular Hospital, Tianjin, 300457, China)

Abstract Objective: To systematically compare the differential genes(mRNA and miRNAs) between patients with heart failure after acute myocardial infarction and non-heart failure patients in the bioinformation database, and to verify the key differential genes in the clinic. **Methods:** In the basic study, based on the GEO database(GSE59867), 17 patients with acute myocardial infarction were followed up for 6 months after the onset of heart failure. The difference of gene expression between heart failure patients and non-heart failure patients were analyzed, and the gene expression network of heart failure patients was constructed. In the clinical study, 61 patients with acute myocardial infarction diagnosed by pathology from January 2018 to December 2020 at TEDA international cardiovascular hospital were retrospectively divided into heart failure group and non-heart failure group according to heart failure. The difference of characteristic gene expression was verified by ELISA method. **Results:** The basic research showed that 703 differentially expressed genes(mRNAs), including 567 up-regulated genes and 136 down-regulated genes, were displayed in patients with heart failure, compared with patients without heart failure after acute myocardial infarction. SPI1, MCUR1, ZBTB7A, IRF8 and PPARG demonstrated the most significant increase. Meanwhile, patients with heart failure showed 12 different miRNAs, including 5 up-regulated miRNAs and 7 down-regulated miRNAs. MiR-133, miR-124-3 and miR-9-1 decreased significantly, the differences were statistically significant($P<0.05$). Clinical studies showed that the expression levels of SPI1, MCUR1, ZBTB7A, IRF8 and PPARG were significantly increased in patients with heart failure ($SPI1:t=4.36, P<0.01$; $MCUR1:t=4.98, P<0.01$; $ZBTB7A:t=3.77, P<0.01$; $IRF8:t=3.12, P<0.01$; $PPARG:t=5.13, P<0.01$). **Conclusion:** Some differentially expressed genes (SPI1, MCUR1, ZBTB7A, IRF8 and PPARG) may be used as potential clinical markers in patients with heart failure, compared with patients without heart failure after myocardial infarction.

Key words acute myocardial infarction; heart failure; differentially gene expression

急性心肌梗死是我国 50~75 岁人群中多发疾病,

而且死亡率居高不下^[1]。急性心肌梗死主要是由持续性缺血缺氧、冠状动脉急性缺血缺氧所导致的心肌梗死。目前临床主要采取保守治疗和经皮冠状动脉介入治疗(percutaneous coronary intervention, PCI)^[2]。心力

基金项目 天津市卫生局科技基金重点项目(2013KZ006)

作者简介 李树杰(1989-),男,医师,硕士在读,研究方向:心血管相关疾病;通信作者:宋昱, E-mail: 773842817@qq.com。

衰竭是急性心肌梗死后常见的并发症,并且与多种严重的不良预后密切相关^[3-4]。然而,目前针对急性心肌梗死后心力衰竭的发病机制尚不明。其特异性预测生物标志物和候选治疗靶点尚未完全建立。针对于此,本研究利用 GEO 数据库进行急性心肌梗死后心力衰竭靶点基因的筛选,并开展临床初步验证。

1 资料与方法

1.1 生物信息方法筛选差异基因

1.1.1 数据源 本研究分析数据来源于 GEO 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>), 编号 GSE59867。芯片中包含 65 个样本, 记录了 17 例急性心肌梗死患者在发病后 6 个月随访期间内心力衰竭发展的详细情况。本研究生物信息部分针对芯片中 17 例急性心肌梗死患者入院、出院(4~6 d)、1 个月和 6 个月后外周血单个核细胞的转录谱进行分析。芯片中急性心肌梗死发生后心力衰竭患者($n=9$)与非心力衰竭患者($n=8$)在临床基本特征上无显著差异($P>0.05$)。芯片数据是利用 GPL6244 平台进行分析。

1.1.2 差异基因分析 本研究以 R 语言中 limma 软件包来分析不同组之间差异表达的 mRNA 和 miRNA, 以对数转换的差异表达倍数(Log2FC)的绝对值 >1 和 $P<0.05$ 为标准^[5]。

1.1.3 miRNA 靶点基因的预测 miRNA 的靶点基因通过 miRNA 数据库(miRDB, 版本 6.0)进行预测^[6]。Cytoscape 软件(3.7.2 版)用于 miRNA-mRNA 相关性可视化调控网络建立。

1.2 针对重点基因的临床验证

1.2.1 研究对象 回顾性分析天津泰达国际心血管

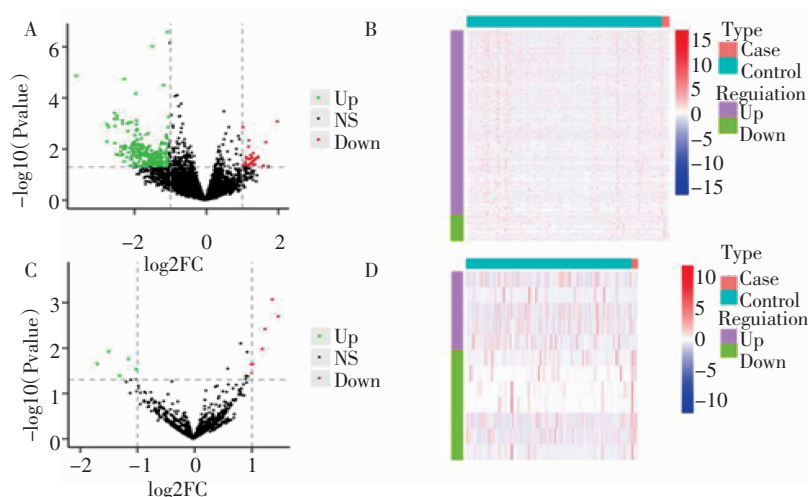
病医院 2018 年 1 月—2020 年 12 月经病理确诊的急性心肌梗死患者。纳入标准: 所有病例均经病理证实; 有完整的影像学检查资料。排除标准: 存在其他心血管疾病; 存在重大疾病; 未得到患者或者家属同意。患者出院后跟踪记录观察 6 个月, 研究对象共 61 例, 根据心力衰竭与否分为: 心力衰竭组[共 32 例, 男性 20 例, 女性 12 例, 年龄(51.2 ± 8.3)岁]与非心力衰竭组[共 29 例, 男性 18 例, 女性 11 例, 年龄(47.3 ± 7.2)岁]。组间患者临床基本特征上无显著差异($P>0.05$)。

1.2.2 ELISA 检测 差异基因浓度测定采用 ELISA 双抗体夹心法, 具体操作严格按照商用试剂盒说明书进行(Abcam 公司)。待测样品源于两组患者的外周血。实验进行 3 次独立检测, 最终进行统计分析。

1.3 统计学处理 采用 Excel 2013 软件建立数据库, SAS 9.4 和 SPSS 19.0 统计软件进行数据分析。对连续性变量进行正态分布检验, 符合正态分布的变量以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 SAS 9.4 中的 t 检验方法用于数据比较。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 芯片中心力衰竭组差异基因筛选与非心力衰竭组比较 心力衰竭组共显示 703 个差异表达基因(mRNAs), 包括 567 个上调基因和 136 个下调基因(图 1A 和图 1B)。其中 SPI1、MCUR1、ZBTB7A、IRF8 和 PPARG 表现出最显著上调。与此同时, 心力衰竭组患者表现出 12 个差异 miRNAs, 其中上调的 miRNAs 5 个, 下调的 miRNAs 7 个(图 1C 和图 1D)。miR-133、miR-124-3 和 miR-9-1 显著下调, 差异均具有统计学意义($P<0.05$)。



注: A: 两组之间差异表达 mRNA 的火山图。绿点表示上调的基因, 红点表示下调的基因; B: 差异表达 mRNA 的热图。横轴表示样品, 纵轴表示不同的基因; C: 两组之间差异表达 miRNA 的火山图; D: 差异表达的 miRNA 的热图

图 1 急性心肌梗死患者心力衰竭组差异基因分析

Fig 1 Differential gene analysis of heart failure group in patients with acute myocardial infarction

2.2 芯片中心力衰竭组 miRNA-mRNA 调控网

络 本研究利用 Cytoscape 软件将 3 种选定的 miRNA(miR-133、miR-124-3 和 miR-9-1)和 5 个差异最为显著的 mRNA(SPI1、MCUR1、ZBTB7A、IRF8 和 PPARG)构建基因调控网络。从图 2 可以看出, miR-133 参与 SPI1 和 MCUR1 功能的调控,而 miR-124-3 和 miR-9-1 分别控制 ZBTB7A、PPARG 以及 IRF8。

2.3 差异基因临床检测 与非心力衰竭组比较, SPI1、MCUR1、ZBTB7A、IRF8 和 PPARG 蛋白表达浓度在心力衰竭组中显著升高。与差异基因筛选结果一

表 1 差异基因的水平检测($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Detection of differentially expressed genes($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	SPI1 (ng/mL)	MCUR1 (ng/mL)	ZBTB7A (ng/mL)	IRF8 (ng/mL)	PPARG (ng/mL)
非心力衰竭组	29	34.18±11.16	17.11±4.28	21.33±6.56	57.28±17.35	22.65±7.13
心力衰竭组	32	57.36±17.88	31.18±6.53	32.44±7.33	73.86±18.37	40.35±10.56
<i>t</i>		4.36	4.98	3.77	3.12	5.13
<i>P</i>		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

3 讨论

急性心肌梗死是临床常见危重症,起病急骤,病情变化迅速,死亡率高。心力衰竭是急性心肌梗死最常见的并发症。近年来,中国发布了心肌梗死和心力衰竭的诊疗指南^[7]。指南中明确指出:中国心肌梗死后心力衰竭仍然存在很高的发病率。虽然近些年随着治疗手段的发展,心肌梗死后心力衰竭患者的预后得到一定改善,但是其死亡率、心血管事件发生率仍然居高不下。这与该类患者治疗手段和发现的时间密切相关^[8]。目前临床上针对急性心肌梗死后心力衰竭的有效标记物研究较少。本研究利用生物信息学和临床验证的方式,提出了若干潜在心力衰竭标志物,并构建了基因调控网络。本研究确定 SPI1、MCUR1、ZBTB7A、IRF8 和 PPARG 可以作为急性心肌梗死后心力衰竭的主要特征性基因。最近一项研究表明,SPI1 在心肌重塑的发病机制中存在明显的过量表达^[9]。MCUR1 是线粒体钙单向转运蛋白调节因子 1,主要在心肌细胞内离子调控方面发挥重要作用^[10]。ZBTB7A 是一种含 POZ 结构域的蛋白质,直接结合到许多基因组调控位点,控制染色质结构和基因组启动子的招募。ZBTB7A 主要通过核因子- κ B 通路,调节心肌细胞的功能^[11]。IRF8 是来自干扰素调节因子(IRF)家族的一员。除了调节先天性免疫反应外,IRF8 还被证实涉及某些癌症的肿瘤抑制基因调节。IRF8 心肌特异性过表达的小鼠可以对主动脉缩窄引起的心肌肥大具有保护作用^[12]。

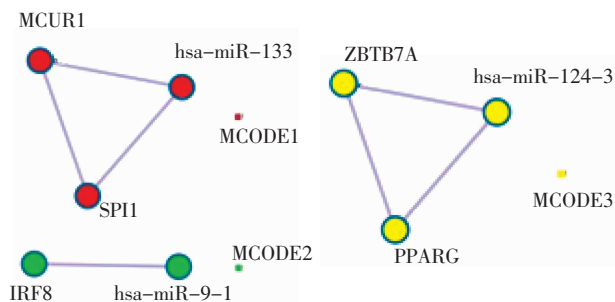


图2 急性心肌梗死患者心力衰竭组 mRNA-miRNA 基因网络图

Fig 2 Construction of mRNA-miRNA interaction network of heart failure group in patients with acute myocardial infarction

致,差异均具有统计学意义($P<0.05$),见表1。

PPARG 是核受体的过氧化物酶体的亚家族成员之一。目前,PPARG 已经证实与许多疾病的形成密切相关,例如肥胖、糖尿病、动脉粥样硬化和癌症。PPARG 还可以通过抑制炎症、氧化应激和凋亡发挥心脏保护作用^[13]。

本研究另一个重点是 miRNA 和急性心肌梗死后心力衰竭的密切联系。miR-133、miR-124-3 和 miR-9-1 是心力衰竭组的主要差异 miRNAs。miR-133 在之前的研究中已经被证明可以控制心肌纤维类型转换并诱导肌源性分化程序^[14]。miR-124-3 和 miR-9-1 也在一项生物信息报道中列为心力衰竭的主要参与 mRNAs^[15]。值得注意的是,本研究发现的 5 个主要差异基因在心力衰竭组中的表达均明显增加。这或许可以用 3 个主要 miRNAs 的下调来解释(图 2)。这些都值得进一步调查。总体而言,本研究全面比较了急性心肌梗死后心力衰竭组与非心力衰竭组主要的差异基因图谱,并建立了差异基因网络图,为今后了解急性心肌梗死患者后心力衰竭的发病机制提出了新的思路。本研究为单中心研究,样本量有限,尚存在一定的局限性。为了差异标志物更有效的进行临床推广,未来还需要进行多中心、大样本量研究。

参考文献:

- [1] 黄方成.急救治疗在急性心梗患者中的临床应用效果研究[J].临床医药文献电子杂志,2019,1(A1):40

参考文献:

- [1] 张启龙,王俊倪,王耀敏,等. 维持性腹膜透析患者血清尿酸水平对全因死亡及心血管事件死亡的影响[J]. 中华肾脏病杂志, 2018, 34(11):809
- [2] 孙东霞,丁岩. 尿酸与脑血管病及其高危因素相关性的研究进展[J]. 北京医学, 2018, 40(5):457
- [3] PASLAKIS G, MAAS S, GEBHARDT B, et al. Prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled phase II a clinical trial on the effects of an estrogen-progestin combination as add-on to inpatient psychotherapy in adult female patients suffering from anorexia nervosa[J]. *Bmc Psychiatry*, 2018, 18(1):93
- [4] OMER C, BANU AA, EBRU S, et al. The effect of nonsurgical periodontal treatment on gingival crevicular fluid stress hormone levels: a prospective study[J]. *Oral Diseases*, 2019, 25(1):250
- [5] 苗艳, 吴俊, 闫磊, 等. 非布司他治疗非终末期糖尿病肾病合并高尿酸血症的有效性及其对肾功能的影响[J]. 中国全科医学, 2019, 22(10):1192
- [6] 任广伟, 李明明, 杨洪娟, 等. 非布司他对维持性血液透析伴高尿酸血症患者血清炎症因子水平和肝功能的影响[J]. 河北医药, 2018, 40(14):2171
- [7] 汪洋畅, 李松兴, 汤桂丽. 非布司他治疗维持血液透析痛风伴高尿酸血症的临床效果[J]. 现代诊断与治疗, 2017, 28(11):1990
- [8] 中华医学会内分泌学分会. 高尿酸血症和痛风治疗的中国专家共识[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2013, 29(11):913
- [9] 任广伟, 李明明, 杨洪娟, 等. 非布司他对维持性血液透析伴高尿酸血症患者血管内皮功能、氧化应激反应的影响及安全性评价[J]. 河北医药, 2018, 40(15):2251
- [10] 秦林芳, 张瑞敏, 杨素霞, 等. 非布司他对慢性肾脏病合并高尿酸血症患者的临床效果及对炎症水平的影响[J]. 中医临床研究, 2019, 28(13):126
- [11] 刘丹, 吴红艳. 非布司他治疗 2 型糖尿病早期肾病合并无症状高尿酸血症的疗效试验[J]. 安徽医药, 2018, 22(10):1968
- [12] 魏晓岩, 李迎婕, 赵学慧, 等. 不同剂量非布司他治疗高尿酸血症伴痛风的效果试验及对机体炎症因子、血管内皮损伤因子的影响[J]. 临床误诊误治, 2019, 32(10):27
- [13] SCHROOTS A C, GERLAG P G, MULDER A W, et al. Liquid-chromatographic profiling of solutes in serum of uremic patients undergoing hemodialysis and chronic ambulatory peritoneal dialysis (CAPD); high concentrations of pseudouridine in CAPD patients[J]. *Clin Chem*, 1988, 34(1):91
- [14] TAWHEEL I, BEATTY N, DUARTE A, et al. Significance of bacteriuria in patients with end-stage renal disease on hemodialysis [J]. *Avic J Med*, 2018, 8(2):51
- [15] 张小筱, 车琳, 张慧, 等. 非布司他抑制慢性肾脏病 3~5 期伴高尿酸血症患者氧化应激反应[J]. 中华肾脏病杂志, 2019, 35(9):2129
- [16] YANG H, BAI W, GAO L, et al. Mangiferin alleviates hypertension induced by hyperuricemia via increasing nitric oxide releases[J]. *J Pharmacol Sci*, 2018, 137(2):154

(2021-01-23 收稿)

(上接第 563 页)

- [2] REED G W, ROSSI J E, CANNON C P. Acute myocardial infarction[J]. *Lancet*, 2017, 389(10055):197
- [3] 戴宇翔, 葛均波. 2020 年心血管治疗领域研究进展[J]. 中华医学信息导报, 2021, 36(2):4
- [4] 史忠良, 甘建祥, 郑亚国, 等. 沙库巴曲缬沙坦钠对急性心肌梗死后心功能不全患者的疗效[J]. 中国临床研究, 2020, 33(6):792
- [5] RITCHIE M E, PHIPSON B, WU D, et al. Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies[J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(7):e47
- [6] YU G, WANG L G, HAN Y, et al. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters[J]. *OMICS*, 2012, 16(5):284
- [7] 徐长霞, 王保霞. 急性心肌梗死患者院前急救的护理价值——评《解读欧洲急性心肌梗死治疗指南 2018》[J]. 中国医学装备, 2020, 17(12):211
- [8] LI J, LI X, WANG Q, et al. ST-segment elevation myocardial infarction in China from 2001 to 2011 (the China PEACE-Retrospective Acute Myocardial Infarction Study): a retrospective analysis of hospital data[J]. *Lancet*, 2015, 385(9966):441
- [9] SONG H K, HONG S, KIM T, et al. Deep RNA sequencing reveals novel cardiac transcriptomic signatures for physiological and pathological hypertrophy[J]. *PLoS One*, 2012, 7(4):e35552
- [10] MALLILANKARAMAN K, CÁRDENAS C, DOONAN P J, et al. MCUR1 is an essential component of mitochondrial Ca²⁺ uptake that regulates cellular metabolism[J]. *Nat Cell Biol*, 2015, 17(7):953
- [11] RAMOS P J, ORUBA A, MITTLER G, et al. Zbtb7a is a transducer for the control of promoter accessibility by NF- κ B and multiple other transcription factors[J]. *PLoS Biol*, 2018, 16(5):e2004526
- [12] JIANG D S, WEI X, ZHANG X F, et al. IRF8 suppresses pathological cardiac remodelling by inhibiting calcineurin signalling [J]. *Nat Commun*, 2014, 5(1):3303
- [13] MISTRY N F, CRESCI S. PPAR transcriptional activator complex polymorphisms and the promise of individualized therapy for heart failure[J]. *Heart Fail Rev*, 2010, 15(3):197
- [14] VIENBERG S, GEIGER J, MADSEN S, et al. MicroRNAs in metabolism[J]. *Acta Physiol (Oxf)*, 2017, 219(2):346
- [15] LI Y, HE X N, LI C, et al. Identification of candidate genes and microRNAs for acute myocardial infarction by weighted gene coexpression network analysis[J]. *Biomed Res Int*, 2019(1):5742608

(2021-02-28 收稿)