**分类号：R541.4 密级：一般**

**U D C：616.1** **编号：2010310147**



广 州 医 学 院

**博 士 学 位 论 文**

**miR-497 对 ST 段抬高型心肌梗死患者急诊**

**PCI 术后无复流的影响及机制研究**

**Study on the effect and mechanism of miR-497 on no-reflow phenomenon in patients with ST-segment elevation acute myocardial infarction after primary percutaneous coronary intervention**

|  |  |
| --- | --- |
| **研究Th：** | **黎镇赐** |
| **导** **师：** | **陈敏生 教授** |

|  |  |
| --- | --- |
| **申请学位级别：医** 学 博 士 | **年** 级**：二 零 一零 级** |
| **学** 位 **专 业：心血管内科学** | **研** 究 **方 向：冠心病的防治** |
| **论文提交日期：二零一四年四月** | **论文答辩日期：二零一四年五月** |
| **学** 位 类 **型：医学科学** **学位** | **学位授予单位：广 州医科大学** |
| **答辩委员会主席：** | **评议人：** |

**2014 年 5 月**

广 州 医 学 院

**博 士 学 位 论 文**



**miR-497 对 ST 段抬高型心肌梗死患者急诊**

**PCI 术后无复流的影响及机制研究**

**Study on the effect and mechanism of miR-497 on no-reflow phenomenon in patients with ST-segment elevation acute myocardial infarction after primary percutaneous coronary intervention**

|  |  |
| --- | --- |
| **专 业 名 称：** | **心血管内科学** |
| **博士 研究Th：** | **黎镇赐** |
| **导** **师：** | **陈敏生 教授** |

**广州医科大学·广州**

**2014 年 05 月**

[**中文摘要 1**](#_bookmark0)

[**英文摘要 5**](#_bookmark1)

[**英文缩写词表 9**](#_bookmark2)

[**前 言 10**](#_bookmark3)

[**第一部分血清miR-497对STEMI患者急诊PCI术后无复流的影响** **13**](#_bookmark4)

1研究目的........................................................................................ **错误！未定义书签。**

2材料................................................................................................ **错误！未定义书签。**

3方法................................................................................................ **错误！未定义书签。**

4结果................................................................................................ **错误！未定义书签。**

5讨论................................................................................................ **错误！未定义书签。**

6 结论................................................................................................ **错误!未定义书签。**

目 录

**[Abstract](#_Toc686680190)** 6

[前 言](#_Toc686680191) 10

[第一部分 血清](#_Toc686680192)**[miR-497](#_Toc686680192)**[对](#_Toc686680192)**[STEMI](#_Toc686680192)**[患者急诊](#_Toc686680192)**[PCI](#_Toc686680192)**[术后无复流的影响](#_Toc686680192) 11

**[1](#_Toc686680193)** [材料](#_Toc686680193) 11

**[2](#_Toc686680194)** [方法](#_Toc686680194) 15

**[3](#_Toc686680195)** [结果](#_Toc686680195) 17

**[4](#_Toc686680196)** [讨论](#_Toc686680196) 22

[第二部分](#_Toc686680197) **[miR-497](#_Toc686680197)**[对大鼠心肌缺氧](#_Toc686680197)**[/](#_Toc686680197)**[复氧后细胞凋亡的影响](#_Toc686680197) 24

**[1](#_Toc686680198)** [研究目的](#_Toc686680198) 24

**[2](#_Toc686680199)** [材料](#_Toc686680199) 24

**[3](#_Toc686680200)** [方法](#_Toc686680200) 28

**[4](#_Toc686680201)** [结果](#_Toc686680201) 31

**[5](#_Toc686680202)** [讨论](#_Toc686680202) 34

[全文结论](#_Toc686680203) 35

[参考文献](#_Toc686680204) 36

[参考文献](#_Toc686680205)**[:](#_Toc686680205)** 41

[学位论文原创性声明](#_Toc686680206) 44

[学位论文知识产权权属声明](#_Toc686680207) 44

[关于学位论文使用授权的说明](#_Toc686680208) 45

**miR-497对ST段抬高型心肌梗死患者急诊**

**PCI术后无复流的影响及机制研究**

博士研究生：黎镇赐导师：陈敏生教授

**中文摘要**

【背景】

无复流（no-reflow）概念早期临床应用在急性心肌梗死溶栓治疗的血流评价，目前是指在冠状动脉病变行再通治疗以后，排除病变部位急性闭塞、高度狭窄、血栓、严重夹层、心外膜血管痉挛等因素后冠脉前向血流急性减少，TIMI血流分级≤

Ⅰ级者为无复流，TIMIⅡ级者为慢血流（slow-flow）。冠脉无复流目前机制仍然不明确，目前认为与多种因素导致的微血管功能障碍有关，它使恶性心律失常率、再次心肌梗死率及死亡率增加10倍左右，而且心功能障碍多见，是急性心肌梗死（AMI）远期心血管事件的独立预测指标。早期诊断和防治冠脉无复流有重要的临床价值，可大大改善AMI患者心功能及远期预后。尽早使梗死相关血管（IRA）再通，给予冠脉血管重建，恢复心肌灌注，是AMI患者治疗的关键所在。临床上，ST段抬高型心肌梗死（STEMI）患者起病12小时内首选急诊介入治疗，经治疗后虽然可使梗死相关血管再通，但仍有相当一部分病人因发生无复流或慢血流而引起冠脉微血管损伤和功能异常，最终导致预后不良。因此，心肌微循环的充分再灌注是血管重建后改善预后的关键。而STEMI患者PCI术后的微循环灌注评估以及预后的相关危险因素目前仍然不明确，需要进一步探讨研究。

MicroRNAs（miRNAs）在真核生物的基因调控中起着重要作用，广泛参与了细胞增殖、分化、发育、凋亡等多种生理病理活动。新近研究发现：miRNAs在组织或血清中的异常表达与多种人类疾病密切相关，对其诊断及预后分析起着重要的作用。血液中miRNAs能够在细胞之外游离存在，并在循环血液中保持稳定，它们有望成为血液中新兴的分子标志物，对提高疾病诊断和预后判断的能力起着巨大的促进作

1

用。在疾病的发生过程中，与组织细胞中一样，血液中miRNAs的表达谱也会产生特征性的变化，这些特定的miRNAs表达谱可构成疾病的“指纹”以用于疾病的预测、诊断和预后判断，从而成为一种新的无创伤性诊断标志物。目前，血清miRNAs作为心血管疾病生物标志物的研究取得了一定的成绩。

研究发现脑缺血再灌注的小鼠脑组织miR-497表达水平明显升高；缺氧复氧损伤的神经细胞miR-497表达水平同样增加，其机制可能与调节相关的细胞凋亡信号通路有关，提示了miR-497可以调节细胞凋亡。大量研究表明缺血再灌注损伤是冠脉无复流发生的主要机制之一，目前miR-497对急性心肌梗死PCI术后无复流的影响并没有相关的研究。在心肌缺血再灌注时miR-497的表达水平是否同样升高？急诊PCI术后miR-497的表达水平是否会发生变化？它和无复流是否相关？它是否可以通过调控线粒体凋亡途径和线粒体的损伤促进心肌细胞的凋亡，从而参与缺血再灌注损伤及无复流，值得进一步研究。

本研究的意义在于通过明确血清miR-497表达水平与STEMI患者急诊PCI术后无复流的关系及相关机制，为今后将miR-497作为早期诊断无复流、评估STEMI患者PCI术后的微循环灌注和预后指标提供理论依据；也有利于提高我们对PCI术后无复流现象的病理生理机制的认识；为今后将miR-497作为冠脉无复流的治疗靶点提供理论依据。

【研究目的】

本研究拟探讨血清miR-497水平与STEMI患者急诊PCI术后无复流的相关性以及血清miR-497水平与STEMI患者急诊PCI术后心血管事件发生的关系，并在缺氧

/复氧(A/R)损伤的心肌细胞模型通过采用激动剂和拮抗剂研究miR-497对线粒体凋亡途径和细胞凋亡的影响。

【研究方法】

（1）为研究miR-497表达水平与STEMI患者急诊PCI术后无复流的关系，收集患者不同时刻的（术前、PCI术后6h、24h、36h和48h）血清样本，提取miR-497，观察miR-497表达水平。

（2）把STEMI患者分成无复流组和复流组，观察miR-497表达水平与PCI术后无复流现象的相关性，随访患者主要不良心脏事件（MACE）发生率。

（3）为研究miR-497的基因调控功能，构建其激动剂agomir和拮抗剂antagomir

2

转染心肌细胞使其过表达或低表达miR-497，研究miR-497表达变化对A/R诱导的心肌细胞损伤的影响。

（4）为研究miR-497调节心肌细胞凋亡的下游信号转导通路，使用激动剂agomir和拮抗剂antagomir转染心肌细胞，而后对其进行A/R处理，测定线粒体膜电位、Caspase-3活性，以及Bcl-2、Bax、cleaved Caspase-3蛋白表达量。

【结果】

（1）与对照组相比，STEMI组miR-497表达水平增加，且随着时间的变化（术前、PCI术后6h、24h、36h和48h），miR-497表达水平逐渐降低：miR-497（0.25±0.10 vs 4.11±0.54 vs 3.36±0.32 vs 2.98±0.22 vs 1.65±0.11 vs 1.01±0.12 ，P=0.012），提示

STEMI患者体内miR-497水平明显升高，随着心肌缺血缺氧的改善，miR-497水平逐渐降低。

（2）急诊PCI术后出现无复流现象患者在不同时段miR-497相对表达量高于复流患者：术前（5.36±0.25 vs 3.88±0.45，P<0.001），术后6h（4.10±0.15 vs 3.12±0.21，P=0.048），术后24h (3.88±0.16 vs 2.46±0.25，P=0.004)，术后36h（1.90±0.12 vs

1.24±0.18，P=0.022），术后48h（1.84±0.16 vs 0.80±0.12, P<0.001）；多因素logistic回归分析提示miR-497高表达是无复流发生的危险因子（OR=2.733）；随访患者主要不良心脏事件（MACE）发生率，高表达miR-497组MACE发生率明显高于低表达miR-497组，有统计学差异（P＜0.05）；主要不良心脏事件的Cox风险比例回归模型分析结果也表明miR-497高表达是MACE独立预测性较强的因子（OR= 1.872）。

（3）构建miR-497激动剂agomir和拮抗剂antagomir转染心肌细胞可以过表达或低表达miR-497，过表达可使心肌细胞miR-497表达上调大于3.5倍，低表达可使心肌细胞miR-497表达下调60%，经TUNEL、Hoechst33258染色以及应用PI 和

AnnexinV染色流式细胞术分析，miR-497过表达可增加A/R诱导的心肌细胞凋亡，而miR-497低表达可减轻A/R诱导的心肌细胞凋亡。

（4）过表达miR-497可加重A/R诱导的线粒体膜电位降低，增加Caspase-3活性，从而使Bcl-2表达减少，Bax、cleaved Caspase-3表达增加，反之，低表达可导致相反结果。

【结论】

（1）STEMI患者miR-497表达水平升高，在急诊PCI的术前和术后，血清miR-497

3

可能存在动态性变化，并与急诊PCI术后的无复流现象有关。

（2）miR-497参与心肌缺血再灌注损伤过程，其机制可能与其激活线粒体凋亡途径促进心肌细胞凋亡有关。

【关键词】miR-497； STEMI；无复流；心肌细胞；缺血 /再灌注；凋亡

4

**Study on the effect and mechanism of miR-497 on no-reflow phenomenon in patients with ST-segment elevation acute myocardial**

**Infarction after primary percutaneous coronary intervention**

**Abstract**

**Background**

Some myocardial did not receive adequate perfusion after coronary artery lesion recanalization treatment, myocardial ischemia persists, this phenomenon has been described as a no-reflow phenomenon. Coronary no-reflow is an independent predictor of future cardiovascular events of acute myocardial infarction (AMI), and was prone to malignant arrhythmia, heart failure, left ventricular remodeling, pericardial effusion and cardiac tamponade, heart failure, shock, etc. So early diagnosis, prevention and treatment of coronary no-reflow for improving the cardiac function and long-term prognosis of patients with AMI has important clinical value. AMI patients is the key to giving coronary vascular remodeling as soon as possible, make the infarct-related artery recanalization, restore myocardial perfusion. Patients with st-elevation myocardial infarction (STEMI) undergoing primary PCI after treatment of coronary blood flow returned to normal, but there is a large number of patients due to coronary microvascular injury and dysfunction resulting in poor prognosis. Therefore, the sufficient reperfusion of myocardial microcirculation is the key to improve prognosis after vascular remodeling. However, the microcirculation perfusion evaluation and prognosis of patients with STEMI PCI postoperative related risk factors are still unclear, needs further research.

MiRNAs play an important role in cell growth, differentiation, apoptosis, proliferation and other important physiological and pathological process. Recent study found that the miRNAs can be separated from the cells and can be stable in the blood circulation. The abnormal expression of miRNAs in the serum or organization is closely related to the variety of human diseasesand shows unique valuein diagnosis and prognosis judgement. miRNAs is expected to be emerging molecular markers for disease diagnosis and

5

Prognosis judgementin the blood. Characteristic change of the miRNAs expression spectrum will happenin the blood and tissue cells. The specific miRNAs expression can constitute a disease" fingerprint", become a new kind of traumatic diagnostic markersto help the prediction, diagnosis and prognosis of disease. Serum miRNAs as biomarkers for cardiovascular disease research has made some achievements.

The study found that the miR-497 expression level increased significantly in the cerebral ischemia reperfusion mice brain, and also increased in the nerve cells of hypoxia reoxygenation injury. It showed that miR-497 can regulate cell apoptosis, the mechanism may be related to regulate apoptosis signaling pathways. There is no related research about miR-497 in myocardial infarction PCI postoperative microcirculation reperfusion so far. Does miR-497 expression level also rise in myocardial ischemia reperfusionIfitcancontrolthemitochondrialapoptosispathwayandmitochondrialdamagetopromotetheapoptosisofmyocardialcells, whichparticipateinischemia-reperfusioninjurydeservesfurtherresearch.

The significance of this study is through a clear relationshipand relevant mechanisms between serum miR-497 expression levels and STEMI PCI postoperative myocardial microcirculation reperfusion, it can provide a theoretical basisfor miR-497 as an early diagnosis of no-reflow, assessment of the microcirculation perfusion and prognosis of patients with STEMI PCI postoperative. It also helps to improve ourunderstanding of PCI postoperative no-reflow phenomenon of the pathophysiological mechanisms and provide a theoretical basis for the future promotion of the miR-497 as coronary microcirculation reperfusion therapeutic targets.

**Objective**

This project intends to investigate the relationship between the serum levels of miR-497 patients with STEMI PCI postoperative myocardial microcirculation reperfusion and the correlation of the serum levels of miR-497 patients with STEMI PCI postoperative and cardiovascular events. By using agonists and antagonists of miR-497in hypoxia reoxygenation injury of myocardial cell model, we intend to find how miR-497 affect mitochondrial apoptotic pathways and cell apoptosis.

**Methods**

(1) To investigate the miR-497 expression level of patients with STEMI PCI postoperative and myocardial microcirculation reperfusion, we collected patients with different time (immediate admission to hospital, PCI postoperative 6h,24h,36h and 48h) serum

6

Samples, extracted miR-497.

(2) Observed the correlation between miR-497 and PCI postoperativeno-reflow phenomenon in patients followed up for adverse cardiovascular events (MACE) rate.

(3) To investigate the gene regulation of miR-497 function, we constructed the agonist agomir and antagonist antagomir to transfectmyocardial cell and made it over express or low express miR-497, observed how the change of miR-497 affect myocardial cell injury induced by the A/R.

(4) To investigate how miR-497 regulate the downstream signal transduction

Pathway of myocardial cell apoptosis, we over expressedand low expressed miR-497 by constructing agomir and antagomir to transfectmyocardial cells, and then made hypoxia/reoxygenation treatment, measured the mitochondrial membrane potential, Caspase 3 activity, as well as the Bcl-2, Bax, cleaved Caspase-3 protein expression.

**Results**

(1) STEMI group expression level of miR-497 increased, and with the change of time, miR-497 expression level decreased gradually. miR-497（0.25±0.10 vs 4.11±0.54 vs 3.36±0.32 vs 2.98±0.22 vs 1.65±0.11 vs 1.01±0.12，P=0.012）.

(2) miR-497 expressed higher in patients with no-reflow than that of patients with reflow. immediate admission to hospital ( 5.36±0.25 vs 3.88±0.45，P<0.001)，PCI postoperative 6h(4.10±0.15 vs 3.12±0.21，P=0.048)，24h (3.88±0.16 vs 2.46±0.25，P=0.004), 36h(1.90±0.12 vs 1.24±0.18，P=0.022)，48h(1.84±0.16 vs 0.80±0.12，P<0.001)；Logistic regression analysis showed that high expression of miR-497 was risk factor of no-reflow(OR=2.733). Follow-up of patients with major adverse cardiovascular events (MACE) rates, high expression of miR-497 group survival rate was significantly lower than the low expression of miR-497 group(P<0.05). Cox proportional hazards regression analysis of cardiac events also showed high expression of miR-497 is a strong independent predictor of cardiac events factor(OR= 1.872 ).

(3) Results showed that overexpression could make the miR-497 levels of myocardial cells upregulat 3.5 times while lowexpression could make the miR-497 levels downregulat 60%. By TUNEL, Hoechst 33258 staining and applying PI and AnnexinV staining flow cytometry analysis, miR-497 overexpression increased the

7

A/R -induced myocardial apoptosis, and low expression of miR-497 reduced A/ R

-induced myocardial apoptosis.

(4) Overexpression of miR-497 might aggravate A/R-induced mitochondrial membrane potential, increase Caspase-3 activity, decrease expression of Bcl-2, and increase expression of Bax and cleaved Caspase-3, whereas low expression could lead to the contrary result.

**Conclusion**

1. STEMI group expression level of miR-497 increased, In patients with STEMI PCI preoperative and postoperative, serum miR-497 changed dramatically, and associated with PCI postoperative no-reflow phenomenon.

2. MiR-497 involved in myocardial ischemia and reperfusion, and its mechanism related to its activation of mitochondrial apoptosis pathway to promote myocardial cell apoptosis.

**Key words:** MiR-497; STEMI; No-reflow; Myocardial cells; Ischemia/reperfusion; Apoptosis

8

**英文缩写词表**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **英文缩写** | **英文全称** | **中文全称** |
| PCI | Percutaneous coronary interventions | 经皮冠状动脉介入治疗 |
| AMI | Acute myocardial infarction | 急性心肌梗死 |
| IRA | Infarction Relative Artery | 梗死相关动脉 |
| STEMI  TIMI | ST-elevation myocardial infarction  Thrombolysis in myocardial infarction | ST 段抬高型心肌梗死  心肌梗死后血栓溶解 |
| miR-497 | Micro RNA 497 | 微小 RNA 497 |
| MMP | Mitochondrial membrane potential | 线粒体膜电位 |
| EDTA | Ethylene diamine tetracetic acid | 乙二胺四乙酸 |
| FBS | Fetal bovine serum | 胎牛血清 |
| PBS | Phosphate buffer saine | 磷酸缓冲液 |
| DMSO | Dimethyl sulfoxide | 二甲基亚砜 |
| ERK | Extracellular regulated protein kinases | 细胞外调节蛋白激酶 |
| PEG | Polyethyleneglycol | 聚乙二醇 |
| PI | Propidium Iodide | 碘化丙啶 |
| PMFS | Phenylmethanesulfonyl fluoride | 苯甲基磺酰氟 |
| TEA | Tetraethylammonium | 四乙胺 |
| SDS | Sodium dodecyl sulfate | 十二烷基硫酸钠 |
| TEMED | N,N,N,N,-tetramethylethylene diamine | N,N,N,N,-四甲基乙二酸 |
| Tris | Tris(hydroxymethyl) aminomethane | 三强甲基氨基甲烷 |

9

前 言

尽早使梗死相关血管再通，给予冠脉血管重建，恢复心肌灌注，是AMI患者治疗的关键所在[1]。大量的临床试验表明，在再灌注治疗早期，如果患者心肌组织没有完全有效地恢复血流灌注，即使心外膜血管血流已达TIMIⅢ级，仍然会出现左心室功能障碍，死亡率明显增加[2]。冠脉无复流容易导致恶性心律失常、左室重构、心力衰竭等，严重者易发生死亡，它是AMI远期心血管事件的独立预测指标[1]。临床上，STEMI患者首选急诊PCI治疗，尽管PCI术后梗死相关血管血流恢复灌注，但仍有相当一部分病人预后不良，其主要原因是冠脉微血管损伤和功能异常[3]。因此，血管重建后改善预后的关键是充分恢复心肌微循环的再灌注。目前有关无复流的病理生理机制主要包括：PCI时从粥样硬化斑块脱落活化组织因子、微血栓形成和PCI术脱落碎片栓塞、微血管痉挛、氧自由基介导的内皮细胞缺血损伤和心肌细胞内和间质水肿、白细胞聚集等。随着对无复流病理生理机制的深入探讨，早期诊断无复流、术前或术后辅以药物干预以及在PCI术中置入远端保护装置等使无复流的防治取得了一定的成果，但是，STEMI患者PCI术后的微循环灌注评估以及预后的相关危险因素目前仍然不明确，需要进一步探讨研究。

microRNA（miRNA）是一类长度为19~24个核苷酸的非编码单链RNA，广泛参与了细胞增殖、分化、发育、凋亡等多种生理病理活动，其机制是通过与靶mRNA

3'端完全或部分互补结合，导致mRNA降解或翻译抑制从而调控靶基因的表达[4, 5]。血液中miRNA能够游离于细胞之外，稳定存在于循环血液中，具有创伤小、方法简便、准确可靠的特点，在多种疾病诊断、预后评估、疗效及复发预测中显示了独特价值[6]。血液中microRNA表达谱的检测技术现在已经较为成熟，其敏感度和特异度已经可使临床需求满足，所以miRNA有希望成为新兴的一种用于疾病预后和诊断的血液学分子标志物。循环系统中miRNA作为诊断心血管疾病方面的研究取得了一定的成绩。例如学者们[7, 8]筛选了血浆中缺乏或含量微弱而在心脏中有特异性高表达的miRNA作为候选标志物，包括miR-133a、miR-499、miR-1和miR-208a；他们利用了手术结扎心脏血管前降支的方法制备急性心梗动物模型，发现上面所提到的

miRNAs在冠状动脉结扎1h后其表达水平明显上升，在结扎6-12h的时候表达水平达到高峰，而在24h时则下降明显；根据miRNA表达谱，单纯开胸手术不结扎冠状

10

动脉的假手术组血浆中miR-499、miR-1和miR-133a的表达水平也不同程度的上升。随后在小样本[9]的人群中发现，AMI人群血浆中上述4种miRNA 的平均水平要显著高于非AMI人群，这种差异可以有效地区分急性冠脉综合征人群；尤其是miR-208a，在非AMI人群中检测不到，而在AMI人群中，却有90.9%患者（30/33）血浆中miR-208a的表达水平增加明显。进一步对不同胸痛持续时间的AMI患者亚组分析显示，AMI胸痛持续4h内的患者中，miR-208a的检出率比肌钙蛋白检出率高，进一步揭示了miR-208a可作为AMI诊断的新标记物[10]。另外研究发现[11, 12]心衰患者血浆miRNA表达谱的定量PCR检测结果显示，胸闷患者中对HF和非HF的区分可以通过miR-18b和miR-423-5p进行。更深入的研究显示血清中脑钠肽与miR-423-5p存在正相关，而和左心室射血分数（LVEF%）呈负相关关系，该研究显示血浆miR-423-5p很有可能作为心力衰竭筛查的分子标记物[13]；miR-499能作用于心肌细胞缺血再灌注损伤导致的凋亡，这主要通过P53通路实现[14]。miR-24 能通过减少心肌细胞在缺血缺氧条件下的凋亡水平来改善心肌梗死后心脏重塑。miR-24是一种在心肌组织中高表达的miRNA，在肿瘤细胞中，研究表明miR-24 能够作用于

DND1蛋白，进而减少肿瘤细胞凋亡水平[15]，同时miR-24在心肌梗死组织中表达量降低，通过在心梗组织中转染过表达miR-24的途径能够减少心梗面积，从而使心功能得到改善，并且过表达miR-24同样能在心肌细胞缺血缺氧模型中抑制心肌细胞的凋亡水平[16]。

研究发现脑缺血再灌注的小鼠脑组织miR-497表达水平明显升高；缺氧/复氧损伤的神经细胞miR-497表达水平同样增加。此外，miR-497的表达水平与脑梗死的体积和神经功能缺损相关，抑制miR-497能有效减少缺血再灌注小鼠的脑梗死体积，其机制主要与抑制神经元细胞的凋亡有关[17]。上述研究提示了miR-497可以调节细胞凋亡，其机制可能与调节相关的细胞凋亡信号通路有关。目前普遍认为冠脉无复流的主要机制包括：冠状动脉微血管的痉挛、栓塞、完整性破坏和缺血再灌注损伤。再灌注损伤过程，心肌细胞的死亡大部分经由Bcl-2家族蛋白调控的线粒体途径凋亡

[18]. 经典的线粒体凋亡途径激活过程大致如下：病理情况下线粒体膜的通透性增高、

线粒体肿大、线粒体通透性转换孔开放、线粒体DNA（mtDNA）受损，从而导致线粒体电子传递链功能障碍、三羧酸循环障碍、ATP合成障碍、跨膜电位下降、细胞色素C的释放，激活Caspase-9介导的细胞凋亡途径[19]。目前miR-497在心肌缺血

11

再灌注中的具体机制如何并未明确，miR-497是否同样与心肌缺血再灌注有关，它对急性心肌梗死PCI术后无复流有无影响，目前并没有相关的研究。

因此本项目拟探讨血清miR-497水平对STEMI患者急诊PCI术后无复流的影响以及血清miR-497水平与STEMI患者PCI术后心血管事件发生的关系，并在缺氧/复氧损伤的心肌细胞模型通过采用激动剂和拮抗剂研究miR-497对线粒体凋亡途径和细胞凋亡的影响，为今后将miR-497作为早期诊断无复流，评估STEMI患者PCI术后的微循环灌注和预后指标提供理论依据，也有利于提高我们对PCI术后无复流现象的病理生理机制的认识，为今后将miR-497作为冠脉无复流的治疗靶点提供理论依据。

12

# 第一部分 血清**miR-497**对**STEMI**患者急诊**PCI**术后无复流的影响

## **1** 材料

### **1.1** 研究对象

#### **1.1.1** 病例来源

该研究获得了广州市第一人民医院临床医学伦理委员会的批准，所有入选患者均知情同意。所入选的患者均为中国汉族人。选择2012年6 月～2013 年12月入住广州市第一人民医院心内科CCU的100例行急诊PCI的STEMI患者为研究对象。另设心内科专科门诊对照组志愿者50例。

#### **1.1.2** 病例选择

入选标准：根据以下入选标准拟选取100例STEMI患者。

①所有研究对象符合我国中华医学会制定的《急性心肌梗死诊断和治疗指南》【48】的ST段抬高性心肌梗死的诊断标准（持续的典型胸痛30 min以上，典型的心电图变化，心肌酶（CK/CK-MB）或肌钙蛋白动态变化，a持续胸痛≥30 min，硝酸酯类药物不能缓解；b 至少两个相邻的胸导联ST 段上抬≥0.2mV 或肢导联ST 段上抬

≥0.1mV；c胸痛发作≤12 h；若> 12 h，胸痛仍持续或ST段持续上抬者仍入选。）

②首次AMI发作；

③首次接受急诊PCI术（24h内）或补救性PCI术（2周内）；

④所有入选的研究对象均签署知情同意书。排除标准：

①既往陈旧性心肌梗死病史；既往接受PCI术治疗；

②心肌病、心包疾病等；

③入院时合并急性心力衰竭；

④存在感染性疾病、恶性肿瘤、严重肝肾疾病等；

⑤合并心源性休克。

#### **1.1.3** 主要实验试剂

13

|  |  |
| --- | --- |
| **名称** | **来源** |
| 无水乙醇 | 国产分析纯 |
| 异丙醇 | 国产分析纯 |
| 嗅化乙锭(EB) | 国产分析纯 |
| 0.2mlPCR 荧光管 | Axgen 公司 |
| RNAlater | AMBION 公司 |
| 2000bpDNALadder | 广州锐博生物科技有限公司 |
| 焦碳酸二乙醋(DEPC)一 treated  water | Takara 公司 |
| Trizol | Invitrogen 公司 |
| RNA 反转录试剂盒 | Takara 公司 |
| SyBrI 荧光定量试剂盒 | Gene copoeia 公司 |
| 琼脂糖 | Sigma 公司 |
| 引物设计、合成 | 英骏（上海）生物技术有限公司 |

#### **1.1.4** 主要溶液的配制

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **试剂名称** | **所需化学试剂** | **化学试剂用量** | **补充** |
| l×TBE 电泳  缓冲液 | Tris | 0.8g |  |
| 硼酸 | 5.5g | 加双蒸水至 1,000ml |
| 低熔点琼脂  糖封胶液 | 低熔点琼脂糖 | 0.5g | 定容至 100ml，加热溶解  至澄清，室温保存 |
| 电泳缓冲液 |  |
| DEPC 水 | DEPC | 1ml | 配成 I％oDEPC 水，静  置 4 小时备用 |
|  | 双蒸水 | 1000ml |
| 1.0％琼脂糖凝胶的配制 | 0.4g 琼脂糖 40ml 电泳缓冲液，微波炉中火 30s 至沸腾，当熔化的琼脂物冷却到 60℃时加入 10mg/ml 溴化乙锭 3μl，充分混匀， 将温热的凝胶倒入己置好梳子的胶膜中，在室温下放置30--45min  后现进行电泳 | | |
| 1×PBS | NaCl | 8g | PH7.2-7.4,双蒸水定容 |
|  | KCl | 0.2g |  |

14

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Na2HP04 | 1.44g | 至 1,000ml,1.034×10 5Pa  高压灭菌 30min，4℃贮存 |
| KH2P04 | 0.24 g |

#### **1.1.5** 主要实验仪器

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **仪器名称** | **型号** | **厂家** |
| 台式低温高速离心机 | MICROMAX | Thermo Jouan |
| 恒温振荡器 | CR703 | CIRRUS |
| 精密天平 | PL303 | 上海 |
| PH 计 | 6219 型 | 上海 |
| 磁力搅拌器 | PH baiskT/C | IKA |
| 旋涡振荡器 | MS3 | IKA |
| 台式低速离心机 | L-420 | 湖南湘仪离心机仪器有限公司 |
| 荧光 PCR | MX3005P | 美国 stratagche |
| 凝胶成像系统 | GENEGENIUS |  |
| 超低温冰箱 | Thermo | 美国 |
| 多用途紫外仪 | WD-9403F | 北京六一 |
| TiThermocyclerReal-timepCR 仪 |  | Biometra 公司 |
| 垂直层流洁净工作台 | Thermo | 美国 |
| 稳压稳流电泳仪 | DYY6B 型 | 美国 Bio-Rad 公司 |
| 超速冷冻离心机 | Sigma3K30 | 美国 Sigma 公司 |
| 荧光定量 PCR 仪及分析软件  MXPro4.01 | MX3005P | Stratagene 公司 |

## **2** 方法

### **2.1** **PCI**手术

经皮冠状动脉腔内成形术(PTCA)和支架置入术具体方法：参照标准PCI方法，以Judkins法行左右冠状动脉造影，确定梗死相关血管(IRA)，并以标准方法行PTCA或PCI术。原则上要求只对梗死相关动脉行直接PTCA以及支架植入术。手术成功

15

标准定义：TIMI血流3级，残余狭窄<20％，无严重并发症（死亡、再次心肌梗死和靶血管血运重建）。

### **2.2** **mRNA**的提取和荧光定量**PCR**检测表达水平

#### **2.2.1** **mRNA**提取

(1)在入院即刻、PCI术后6h、24h、36h和48h，收集患者血清样本，加入Trizol裂解液试剂，将其放置在水平位置片刻，使裂解液等密度地分布在拟实验的细胞表面并使细胞裂解，遂采用移液枪反复吹打细胞并使其脱落；将里面含有细胞的裂解液转移至1.5mlEP管中剧烈振荡10秒，采用移液枪吹打裂解液，直至无明显沉淀；静置于室温5分钟；

(2)向上述匀浆裂解液中按照0.2ml氯仿/裂解液lml的比例加入氯仿进行抽提，盖紧EP管盖，用力振荡10分钟。待充分乳化溶液无分相现象即呈乳白状后，再静置于室温5分钟。

(3) 12000rpm速度4℃下离心15分钟；小心的从离心机中取出EP管，用其吸取上清液转移到另一支新的EP管中；

(4)向上清中加入等容量的异丙醇沉淀RNA，将其轻轻混匀充分后，静置于室温

10分钟；12000rpm速度4℃离心z1k5q分钟2; 01小60心3弃23去上清液，缓慢地沿EP管壁加入无水酒精及双蒸水l ml用于洗涤，轻轻混匀。

(5) 12000rpm速度4℃下离心10分钟后小心弃去酒精；在干燥室温下沉淀2分钟到5分钟，加入大约15μl的焦碳酸二乙酯（DEPC）处理水溶解RNA。取lμl RNA在1%的琼脂糖凝胶中电泳20分钟，然后在紫外灯下进行拍照分析。用分光光度计检测A280nm和A260nm的OD值，计算A260/A280的比值和RNA的含量，并于负

80℃环境中保存备用。

#### **2.2.2** 逆转录反应生成**cDNA**

按照Takara公司提供的逆转录试剂盒操作程序说明书进行本阶段的逆转录反应

（1）准备容量为0.2ml的EP 管

（2）加入上下游引物各0.5ul，以及5.0μl的焦碳酸二乙酯（DEPC）水，1μl模板RNA

（3）稍离心，100℃沸水浴1分钟

（4）加入0.5μl脱氧核苷三磷酸dNTP，1μl AMV逆转录酶和2μl 5×Buffer

（5）稍将其离心，在42℃的水浴中进行30分钟的RT反应

16

（6）100℃沸水浴3min灭活AMV

|  |  |
| --- | --- |
| 5×Buffer | 2μl |
| AMV逆转录酶 | 0.5μl |
| dNTP mixture | 1μl |
| 上游引物 | 1μl |
| 下游引物 | 1μl |
| DEPC水 | 3.5μl |
| RNA | 1μl |

（7）立即PCR或-20℃保存。冰上加入下列试剂10μl（体系）：

PCR反应条件：16℃30min，42℃30 min，85℃5 min之后，立即将其放入冰中进行冷却，之后加入2ul的大肠埃希菌RNA酶在37℃反应30min，最后将其放置在负20℃环境中保存备用。

#### **2.2.3** **Real-time PCR**

本实验采用ABI 7300 Real-time PCR系统对miR-497基因的表达水平进行相对定

zkq 20160323

量分析，内参分别为U6。使用的Real-time PCR的上游引物/下游引物均由上海英骏

生物技术有限公司提供在每20nl的PCR反应体系中包含有4μl cDNA，10μl SYBR Master mix荧光染料混合物，0.4μl ROX, DEPC水4.8μl，上、下游引物各0.2μl。

PCR反应条件：95℃5 min; 95℃15 s，60℃1 min，共40个循环，4℃保存。

##### 2.2.3.1 标准曲线制作

以经过焦碳酸二乙酯（DEPC）处理后的不含RNA模板的蒸馏水作为阴性对照。每个样本设置3个复孔用于检测。以相同体积作为标准进行血清miR-497含量的测定比较，即是以血清miR-497的含量归一化为血清体积作为内参照，并对于含量采用绝对定量法进行检测，将以1 mol/L的浓度进行人工合成的miRNA成熟体依次稀释成102、103、104、105和106 fmol/L的浓度梯度作为标准品，以浓度的对数值，即

log10为X轴，而Y轴设置为每个浓度对应的Ct值。每个浓度梯度重复检测3次，设3个孔。将标准品与待测样本同时进行PCR扩增，根据扩增曲线，扩增结束后设定统一阈值并对其进行标准曲线的制作，并计算出该样本miR-497的绝对含量，其依据是根据标准曲线及待测样本的Ct 值进行。

17

##### 2.2.3.2 熔解曲线绘制

在做定量PCR实验（SYBR GreenI染料法）时为确定实验产物中有无非特异性的引发或者引物二聚体，我们常规需要在反应完全结束过后，进行一个熔解曲线的绘制。熔解曲线绘制是依据双链DNA和SYBR GreenI染料结合的特性，设计一个过程实现从55℃~95℃逐渐升高温度。伴随着温度的逐渐升高，SYBR GreenI染料结合数量不断的减少，双链DNA也在进行不断的解链，发出的荧光也越来越少，当产物

Tm值达到时，荧光信号骤降之后处于平缓状态，此时的双链完全被解开而不再有荧光发出。在软件的反应设置面板增加熔链温度检测模块，就可以在反应结束后，点击熔解曲线按钮，获得该样品反应的熔解曲线，单一的熔解峰对于获得高质量实验结果非常重要。

### **2.3** 无复流现象的评价

左前降支取右头位，回旋支以右脚位，右冠状动脉以左头位作为投照体位读片。造影剂自心外膜冠状动脉清除后显像时间至少持续3个心动周期。TIMI血流分级评定由两位有经验的医师读片确定。

冠心病冠脉造影TIMI[13]分级：①0级，无血流灌注，闭塞血管远端无血流。②

zkq 20160323

Ⅰ级，[部分造影剂](http://zhidao.baidu.com/search?word=%E9%96%AB%E7%8A%B2%E5%A5%96%E9%8D%93%3Ffr%3Dqb_search_exp&amp;ie=gbk)可以通过，但冠状动脉狭窄的远端并不能完全充盈。③Ⅱ级，虽然冠状动脉狭窄的远端可以完全充盈，但显影慢，[造影剂](http://zhidao.baidu.com/search?word=%E9%96%AB%E7%8A%B2%E5%A5%96%E9%8D%93%3Ffr%3Dqb_search_exp&amp;ie=gbk)消除也慢。④Ⅲ级，冠状动脉远端不但完全而且可以迅速充盈与消除，与正常冠状动脉相同。

根据TIMI分级，无复流定义为PCI术后TIMI分级≤Ⅰ级，并排除冠状动脉夹层，急性血栓形成，高度残余狭窄或冠状动脉痉挛【14】。

### **2.4** 检测冠脉血流储备（**CFR**）和冠脉微循环阻力指数（**IMR**）

FFR测定所需要的冠状动脉生理测量系统及压力导丝由Radi St. Jude Medical公司提供【15】。操作主要步骤为：首先将压力导丝在体外校正归零，在指引导管到位后，压力导丝送至冠脉口进行压力校正，然后将压力导丝头端经狭窄病变推送至距狭窄病变3-4cm的远段冠脉，接着在外周肘正中静脉用高压注射泵快速泵注三磷酸腺苷

**（**ATP）配置液，ATP滴速为140ug/（kg·min），当达到稳定的最大充血状态时（通常在静脉给药30-60 秒后起效），连续记录冠脉血流储备分数（FFR）数值曲线及其数值。

CFR：先用硝酸甘油0.2mg往冠脉内注射，在3~4 min后通过冠脉造影测定血

18

流速度，冠脉内弹丸式注射腺苷（右冠脉40ug、左冠脉60ug），重复进行血管造影，再采集图像。血流速度测量方法：通过使用数字跟踪技术软件，选择当前帧（n）图像中造影剂前端位置为参照点，图方法像进到下一帧( n+ 1)或第( n+ m)帧，然后测量第n帧或n+ m帧中从造影剂前端至参照点之间的距离( L, cm)，计算血流速度( CFV), CFV( cm/ s) = L/ t ( t= m \* 0.04)，t为m帧间历时时间（秒），其中0.04为每帧历时40毫秒，计算注射前后血流速度比值为CFR，即CFR= 药后CFV/药前

CFV【16】。

IMR: IMR 为远端冠状动脉压力( Pd)除以最大充血状态下平均传导时间( hTmn)

的倒数。换言之，即Pd与hTmn的乘积( mmHg1s或U)。冠脉内压力导丝测定IMR

【17】。

### **2.5** 心电图、肌钙蛋白和心肌酶谱的检测

全部病例均于入院当天采用日本光电公司9020K心电图描记仪进行标准12导联的心电图检查，对部分病例作动态心电图检测，分别记录入院时初始心电图和PCI术后2h心电图ST段抬高最明显导联ST段抬高最大幅度。心肌酶谱测定采用日立

7170A 全自动生化分析仪检测，包括肌酸磷酸激酶(CK)的同工酶(CK-MB)、天冬氨

zkq 20160323

酸转氨酶(AST)、乳酸脱氢酶(LDH)；肌钙蛋白-I采用罗氏诊断（香港）有限公司生产的

Cardiac reader(序列号20025600)检测，试剂是德国罗氏公司提供的试剂盒。

### **2.6** 心脏事件随访

通过门诊或电话随访AMI患者，收集直接PCI术后所发生的心血管事件包括不稳定性心绞痛、非致命性心力衰竭、再发心肌梗死、缺血性靶血管血运重建、心脏性死亡的发生率，主要不良心脏事件(MACE)包括再发心肌梗死、靶血管血运重建和心脏性死亡。随访时间为18个月。

### **2.7** 统计学方法

所有实验数据均采用统计学软件包SPSS13.0进行统计分析处理，计量资料采用

一

用均数±标准差（*X*±SD）表示，各组间差异性比较采用重复测量的方差分析；多组

间差异的比较采用单因素方差分析，组间两两差异的比较采用LSD法进一步分析。若遇方差不齐时，则采用Tamhane'sT2法；两组间比较服从正态分布用两独立样本t检验，非正态分布采用非参数检验，即Mann-Whitney's U检验；相关性分析根据若数据符合正态分布，则用spearman相关分析，若不符合就使用非参数检验；与心脏

19

事件发生的关系采用kaplan-meie 分析和COX 风险回归模型分析，显著性标准为

α=0.05, P<0.05有统计学意义。

## **3** 结果

### **3.1** **STEMI**组和正常健康对照组一般情况比较

纳入的100例STEMI患者，与对照组比较，两组患者在年龄、性别、平均病程、以及并发症高脂血症、糖尿病和高血压患病率等方面差别无统计学意义（P> 0.05），具有可比性。见表1, 2。

表1 两组年龄、性别、病程比较（X±S ）

|  |  |  | 性别 | |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 组别 | n | 平均年龄 |  |  | 平均病程 |
|  |  |  | 男 | 女 |  |
| STEMI 组 | 100 | 62.1±5.4 | 55 | 45 | 6.1±3.1 |
| 对照组 | 50 | 59.1±5.9 | 28 | 22 | 5.5±3.4 |

表 2 两组合并症比较

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 组别 | 例数 | 高血压【例（%）】 | 高脂血症【例  （%）】 | 糖尿病【例  （%）】 |
| STEMI 组 | 100 | 42（42.00） | 51（51.00） | 20（20.00） |
| 对照组 | 50 | 23（45.71） | 24（48.57） | 11（22.86） |

zkq 20160323

### **3.2** **STEMI**组患者**miR-497**表达及影响因素分析

琼脂糖凝胶电泳结果显示，PCI术前以及术后6h、24h、36h和48h，与对照组，六组血清样品总RNA均可见清晰的18S和28S条带，说明总RNA纯度基本达到实验要求，且样品保存质量较好无明显降解；对提取的miRNA用紫外分光光度计测量A260/A280值为1.8-2.0，说明miRNA总量及质量满足实时定量荧光RT-PCR的要求（见表3）。RT-PCR结果显示STEMI组miR-497表达水平高于对照组(P<0.05)，且随着术后时间的变化，miR-497表达水平逐渐下降，差异有统计学意义（P<0.05），见图1。在PCI术后人群中，性别和年龄对miR-497表达水平均无影响，差异无统计学意义（P＞0.05），见图2。

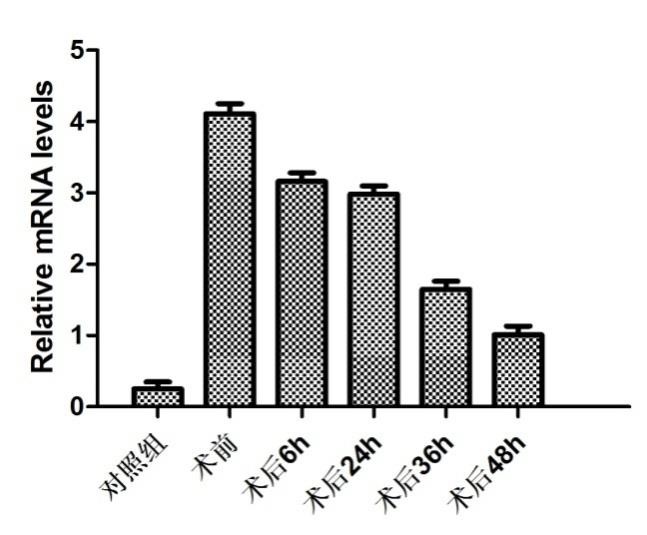
表 3 各组miRNA的A260/A280值、浓度和总量

| 组织 | A260 | A280 | A260/A280 | miRNA 浓度 | miRNA 总量 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |

20

|  |  |
| --- | --- |
|  |  |
| **检测时间点** | **miR-497 相对表达量** |
| 对照组 | 0.25±0.10 |
| 术前 | 4.11±0.14 |
| 术后 6h | 3.36±0.12 |
| 术后 24h | 2.98±0.12 |
| 术后 36h | 1.65±0.11 |
| 术后 48h | 1.01±0.12 |

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  | （μg/μl） |  |
| 对照组 | 0.418 | 0.223 | 1.87 | 0.181 | 8.21 |
| 术前 | 0.982 | 0.507 | 1.94 | 0.536 | 20.26 |
| 术后 6h | 1.589 | 0.804 | 1.98 | 0.742 | 28.61 |
| 术后 24h | 0.569 | 0.309 | 1.84 | 0.625 | 14.44 |
| 术后 36h | 0.782 | 0.420 | 1.86 | 0.643 | 16.27 |
| 术后 48h | 1.875 | 0.993 | 1.89 | 0.691 | 28.99 |



zkq 20160323

图 1 STEMI患者血清miR-497的动态变化



21

图 2 STEMI患者性别和年龄对血清miR-497表达的影响

### **3.3** 无复流现象与血清**miR-497**表达的关系分析

根据冠心病冠脉造影TIMI分级，无复流定义为PCI术后TIMI分级≤Ⅰ级，并排除冠状动脉夹层，急性血栓形成，高度残余狭窄或冠状动脉痉挛，STEMI组患者术后无复流现象有12例，复流组88例。无复流现象患者术后6小时miR-497相对

表达量高于复流患者，且差异有统计学意义（P＜0.01）。见表4，图3。

表4 无复流现象与血清miR-497表达的关系



|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 组别 | n | miR-497 |
| 无复流组 | 12 | 4.10±0.15 |
| 有复流组 | 88 | 3.12±0.2 1 |
| *P* 值 |  | ＜0.00001 |

图3

### 3.4 血清**miR-497**表达与冠脉血流储备分数和冠脉微循环阻力指数的相关性分析在PCI术后人群中，血清miR-497相对表达水平与冠脉血流储备分数水平的相关

性分析显示：r=-0.688，P<0.01，二者呈负相关，有统计学意义，见图4；血清miR-497相对表达水平与冠脉微循环阻力指数的相关性分析显示：r=0.500，P=0.001，二者呈正相关，有统计学意义，见图5；



图 4 血清miR-497表达与冠脉血流储备分数的相关性分析

22



图 5 血清 miR-497表达与冠脉微循环阻力指数的相关性分析

### **3.5** 血清**miR-497**表达与肌钙蛋白的相关性分析

在PCI术前STEMI人群中，血清肌钙蛋白平均水平为4.31±3.58ug/L，血清miR-497相对表达水平与肌钙蛋白水平的相关性分析显示：r=0.557，P=0.001，二者呈正相关，有统计学意义，见图6。



图 6 血清 miR-497表达与肌钙蛋白的相关性分析

### **3.6** 血清**miR-497**水平与心脏事件发生的关系（**kaplan-meie**分析和**COX**风险回归模型分析）

对100例STEMI患者PCI术前血清miR-497进行检测，其平均相对表达量为4.11

±0.14，以平均值4.11为界将100例STEMI患者分miR-497高表达组和miR-497低表达组，结果显示高表达miR-497者64例，低表达miR-497者36例。所有患者发病10周后，低表达miR-497组发生不良心血管事件2 例（5.56%），其中严重心力衰竭1 例（2.78%），恶性心律失常1 例（2.78%），无心源性死亡、再发心肌梗死、

23

靶病变血管重建发生；高表达miR-497组不良心血管事件出现14 例（21.9%），严重心力衰竭发生8例（12.5%），恶性心律失常4例（6.25%）、心源性死亡2例（3.1%），无再发心肌梗死、靶病变血管重建发生。

发病50周后，低表达miR-497组发生不良心血管事件6 例（16.7%），其中严重心力衰竭3例（8.33%），恶性心律失常2 例（5.56%），再发心肌梗死1例（2.78%），无心源性死亡和靶病变血管重建发生；高表达miR-497组不良心血管事件出现21 例

（32.8%），严重心力衰竭发生10 例（15.6%），恶性心律失常5 例（7.81%）、心源性死亡3例（4.69%），再发心肌梗死3例（4.7%），无靶病变血管重建发生。见表5。

表5 随访患者主要心血管不良事件（MACE）发Th率

|  | 10 周 |  | 50 周 | |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| MACE | 高表达组  （N =64） n(%) | 低表达组  （N =36） n(%) | 高表达组（N  =64） n(%) | 低表达组  （N =36） n(%) |
| 严重心力衰竭 | 8（12.5）\* | 1(2.78) | 10（15.6）\* | 3(8.33) |
| 恶性心律失常 | 4（6.25）\* | 1(2.78) | 5（7.81）\* | 2(5.56) |
| 心源性死亡 | 2（3.1）\* | 0(0) | 3（4.69）\* | 0(0) |
| 再发心肌梗死 | 0(0) | 0(0) | 3(4.7) | 1(2.78) |
| 靶病变血管重建 | 0(0) | 0(0) | 0(0) | 0(0) |
| 合计 | 14（21.9）\* | 2(5.56) | 21（32.8）\* | 6(16.7) |

**注：经t检验，两组比较：\*P<0.05。**

Kaplan-Meier生存分析曲线分析提示高表达miR-497组生存率明显低于低表达miR-497组(P<0.05, 图7)。心脏事件的Cox风险比例回归模型分析结果也表明miR-497高表达是心脏事件独立预测性较强的因子（P<0.001），差异有统计学意义（表6）。（A 低表达miR-497 B 高表达miR-497）



24

图 7 累积Th存率的Kaplan-Meier分析图表6心脏事件Cox风险比例回归模型分析结果

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 心脏事件 | 年龄 | miR-497 | 高血压 | 糖尿病 |
| RR(95%CI) | 1.011(0.994-1.029) | 1.840(1.399-2.421) | 1.435(1.081-1.906) | 1.273(0.916-1.769) |
| *P* 值 | 0.220 | ＜0.0001 | 0.012 | 0.035 |

## **4** 讨论

最近研究发现AMI是受到复杂的多基因调控的过程。研究发现miRNAs可能和动脉壁内皮功能稳定的维持有一定关系，与动脉粥样硬化有关[43]。因此有理由认为心肌梗死中有miRNAs的参与[44]。实验显示心肌缺血再灌注中miR-133和miR-1起到的作用极其重要，它们可以相反地作用于细胞的凋亡。miR-1还通过抑制胰岛素样生长因子（insulin-like growth factor, IGF）的转运与细胞死亡联系在一起[45, 46]。miRNA-142-5p在小鼠不稳定斑块中表达量上调，推测其可能与斑块稳定性有关[45]。最近的研究报道在患者的外周循环血中也可检测出miRNAs，可以认为外周血中

miRNAs反映了组织的损害[47]。循环miRNA在进化上高度保守，性能稳定，具有病理或者组织的特异性，多方面因素都显示其可以成为生物标志物的特点。其中尤为重要的是可以通过实时荧光定量PCR检测，可测量到含量很低的miRNA[48]。正是由于该种原因，miRNAs完全可以作为AMI的血清生物标记物。miR-92a可控制新的血管生成，高度表达于人的内皮细胞中。在体外和体内的研究发现可通过内皮细胞中的过度表达miR-92a以损害血管生成。体外研究证实miR-92a表达在缺血诱导后的组织中上调明显。急性心梗模型中心脏功能的恢复可通过抑制miR-92a的表达进行实现。实验研究证实miR-92a在心肌细胞中和心脏成纤维细胞中也有表达，而不仅在内皮细胞中表达，拮抗miR-92a不会对细胞的生存造成明显影响，但能使细胞凋亡明显降低。另外研究还显示miR-92a可控制血管张力，该种作用是通过调节一氧化氮合酶来实现的。研究表明冠状动脉粥样硬化性心脏病患者中miR-92a的表达往往在较高的水平，miR-92a 的低表达可以使他汀类药物实现血脂下降的作用[49,

50]. 对miR-92a进行抑制，可能会改善心肌梗死后新生血管的生成和重塑，以及其心肌梗死的面积可能会减少。一项关于心肌缺血-再灌注的研究显示[51]，miR-92a对于心脏保护蛋白的合成可起到促进作用。我们本课题中STEMI组miR-497表达水平

25

增加，且随着时间的变化，miR-497表达水平逐渐增加。血清miR-497水平与STEMI

患者PCI术后心肌微循环再灌注呈时间相关性。

目前，通过在急性心肌梗死发生后早期行介入治疗，可以尽快开通梗死相关血管，改善梗死相关血管的前向血流，从而挽救濒临坏死的心肌，提高生活质量及生存率，改善预后。但是在临床中可以发现，有将近30~40%的STEMI患者虽然通过PCI术开通了梗死相关血管，却出现了慢血流或者无复流现象，造成了心肌微循环的灌注不足，这导致了心肌梗死面积并不因及时地开通血管而获得减少[52, 53]。近年来国内外大量研究[54, 55]通过一些先进的评估心肌微循环的方法，例如心肌核磁共振、心肌对比超声等，可以发现在直接PCI术后，患者心肌微循环障碍的范围、程度是发生心肌梗死后心室重塑的独立预测因子。而众所周知，心功能不全发生、发展的基本机制就是心室重塑，它对患者的生活质量及病死率产生直接影响。Ndrepepa等在研究中发现[56]，直接PCI术后如果出现心肌微循环障碍，可以导致诸如心室重塑、心力衰竭、恶性心律失常、梗死后延展等一些严重并发症，这预示着患者近期和远期生存率的下降。因此，直接PCI术后心肌微循环灌注的状态可以预示心肌梗死患者的预后。目前通过冠脉造影评价心肌微循环有许多方法，包括CTFC分级、心肌呈色分级（MBG）、TMPG 分级、TIMI 心肌灌注帧数（TMPFC）等。冠脉造影TIMI血流分级以及检测冠脉血流储备（CFR）和冠脉微循环阻力指数（IMR），是一种经济、客观、简单的评价心肌微循环的方法，根据TIMI分级，无复流定义为PCI术后TIMI分级≤Ⅰ级，并排除冠状动脉夹层，急性血栓形成，高度残余狭窄或冠状动脉痉挛[57]。Mousavi[58]等发现其在心脏的射血分数、心电图ST段回落程度、梗死面积的大小等方面的关联性更好，更能体现出心肌组织的灌注水平。STEMI患者首选急诊介入治疗，经治疗后虽然可使梗死相关血管再通，但仍有相当一部分病人因发生无复流或慢血流而引起冠脉微血管损伤和功能异常，最终导致预后不良。因此，心肌微循环的充分再灌注是血管重建后改善预后的关键。目前关于无复流的病理生理机制主要包括内皮细胞缺血损伤和心肌细胞水肿、白细胞聚集、微血栓形成等[60]。本研究根据冠心病冠脉造影TIMI分级，确定PCI术后无复流现象有12例，复流组

88例，无复流现象患者miR-497相对表达量高于复流患者。通过检测冠脉血流储备

（CFR）和冠脉微循环阻力指数（IMR），发现血清miR-497相对表达水平与冠脉血流储备分数水平呈负相关，与冠脉微循环阻力指数呈正相关。

26

目前cTnI的测定是诊断AMI特异和灵敏的标志物之一，但对胸痛发作6小时内的患者其诊断灵敏度不高[61]。筛选新的心肌标志物用于ACS早期诊断具有重要意义。目前的研究主要集中在肌肉特异和心脏特异的miRNA，其中miR-208a和miR-208b是心脏特异表达的miRNA，调控肌球蛋白重链基因（MHC）亚基表达，与心肌胚胎干细胞分化关系密切，并通过调节MHC的α亚基与β亚基转换参与心肌纤维化、心肌肥厚、心力衰竭及心肌缺血的发生[62, 63]。研究表明与健康及无冠脉病变胸痛者相比，ST段抬高性心肌梗死（STEMI）患者miR-208a和miR-208b水平均显著升高[64, 65]；而Apple等[64]研究表明，与UA患者相比，非ST段／ST段抬高性心肌梗死（NST

／STEMI）患者循环miR-208b水平升高，而miR-208a水平却无升高。Wang等[23]发现，miR-208a在非AMI患者中检测不到，而在90.9％的AMI患者和100％症状出现4h 内的AMI患者中很容易检测到。PCR 法检测ACS 患者出现胸痛症状后

（5.0±1.4）h时血浆中miR-208b的表达，结果显示血浆miR-208b水平仅在AMI患者中升高，且miR-208b水平与cTnI水平成正相关，提示cTnI有助于AMI的早期诊断。ACS患者miR-145在血管平滑肌中高表达，且参与平滑肌细胞收缩表型的维持与正常增殖，缺乏miR-145的小鼠血管平滑肌缺乏收缩能力，因而表现为血压下降[66, 67]，但与cTnI无相关性。本研究提示在PCI术后人群中，血清miR-497相对表达水平与肌钙蛋白水平呈正相关。

研究表明在接受冠脉介入治疗（[PCI](http://www.cmt.com.cn/Index/search?msg_key=PCI)）的患者中，围手术期心梗相对常见并且与死亡风险升高具有相关性。此项研究对来自于11项PCI研究的个体患者资料进行了汇总。纳入研究常规测定了围手术期肌酸激酶同工酶（CK-MB），并前瞻性采集了死亡率数据。共有23, 604例患者被纳入研究[71]。结果显示，在11项PCI研究（23 604例）中有7.1%（1677例）的患者发生围手术期心梗。围手术期心梗的最常见机制为侧枝闭塞。老年、女性、糖尿病、高血压、肾功能不全、多血管病变、左前降支病变、左主干病变、分叉部位病变、长病变、药物洗脱支架和支架数量为围手术期心梗的独立预测因素。随访时间介于1至5年之间。与无围手术期心梗患者相比，初步分析显示出现围手术期心梗的患者死亡风险显著升高（危险比[HR] 1.47）。对基线变量进行校正之后，围手术期心梗与死亡风险升高具有相关性（HR 1.20）[72]。目前全世界每年约有2千万人死于急性心血管事件[41]。我国数据显示，2007年约280万人死于心血管事件，相当每11秒就有1人死于心血管事件[73]，由于STEMI患者PCI

27

术后的微循环灌注评估和预后的相关危险因素仍不清楚，因此通过检测血液中

miRNA表达谱的技术，提高疾病诊断、预后评估、疗效及复发预测的精度。目前诊断心血管疾病的生物学标志物主要是某些特定的蛋白质，例如肌钙蛋白、BNP。发展蛋白质作为新的生物学标志物可能比较复杂，因为蛋白质在血清中往往以复合体的形式存在，不易提纯分离，并且有些蛋白质在外周血含量甚微，缺乏敏感性高的检测方法。另外蛋白质的检验基本都是基于抗体技术，可能会出现交叉反应[45]。而

miRNAs不存在上述问题，并且miRNAs稳定、序列保守、在病理状态下特异性表达、实时荧光定量PCR精确检测等特点，使得miRNAs在生物学标志物的研究中备受瞩目。miRNAs作为诊断心血管疾病包括CAD、AMI、高血压等的生物学标志物已经被证明。并且联合多种miRNAs诊断一种疾病较单一miRNA的诊断价值高。有人通过基因芯片技术证明miRNAs阵列或者一种miRNA信号可能对诊断疾病有更高的敏感性和特异性。然而，也存在着许多挑战。miRNAs在外周血中一般表达较低，这对提取血清总RNA及检测浓度都有很严格的要求。正确而细致的操作可能能提高实验的准确性，而且从血浆分离出的总RNA容易被RNAase降解，整个操作过程应保证严格无RNAase操作，避免RNA降解影响结果[46-47]。所以我们仍然需要寻找简便快捷的检测血清miRNAs的方法，早日将miRNAs的检测由实验室应用于临床。目前研究者们正在在循环miRNAs中致力于寻找一种“看家基因”，目前比较常用的是U6，还有一些其他的例如miRNA-16作为看家基因，然而在一些病理状态下，这些

miRNAs可能会有改变，有人[38]报道了用人工合成的miRNA作为看家基因，虽然技术上可行，然而人工合成的miRNA缺少相应的保护，加入血清后易降解，所以寻找最合适的看家基因仍然很重要。今后的研究重点包括miRNAs的具体作用机制，释放至血清中的原理及如何快速简便、高效的检测外周血miRNAs的浓度，miRNAs有望成为血液中新兴的用于疾病诊断和预后判断的分子标志物[82]。

本研究中随访患者心血管不良事件（MACE）发生率，高表达miR-497组生存率明显高于低表达miR-497组，Kaplan-Meier生存分析曲线分析提示高表达miR-497组生存率明显低于低表达miR-497组。心脏事件的Cox风险比例回归模型分析结果也表明miR-497高表达是心脏事件独立预测性较强的因子。

综上所述，miR-497在STEMI患者缺血再灌注损伤中特异性表达，对其诊断有一定的价值。其表达升高的机制可能与缺血再灌注损伤后缺血和坏死的组织释放有

28

关。MiR-497参与了急性心肌梗死的发生、发展及转归的过程，抑制miR-497的表达可能是未来治疗冠状动脉粥样硬化性心脏病缺血再灌注损伤的靶点。

29

# 第二部分 **miR-497**对大鼠心肌缺氧**/**复氧后细胞凋亡的影响

## **1** 研究目的

### 1.1 本研究拟探讨miR-497的基因调控功能，通过构建其激动剂agomir和拮抗剂antagomir转染心肌细胞使其过表达或低表达miR-497，研究miR-497表达变化对A/R诱导的心肌细胞损伤的影响。

### 1.2 为研究miR-497 调节心肌细胞凋亡的下游信号转导通路，使用激动剂

agomir和拮抗剂antagomir转染心肌细胞，而后对其进行A/R处理，测定线粒体膜电位、Caspase-3活性，以及Bcl-2、Bax、cleaved Caspase-3蛋白表达量。

## **2** 材料

### **2.1** 实验动物

来源：广州医科大学动物实验中心

种属与品系：SPF级健康新生（出生24 h以内）Wistar大鼠乳鼠

### **2.2** 药品及试剂

|  |  |
| --- | --- |
| 低糖 DMEM 培养基 | GIBCO 公司 |
| 高糖 DMEM 培养基 | GIBCO 公司 |
| 胎牛血清（FBS） | GIBCO 公司 |
| 30%过氧化氢（H2O2） | 广州奕源生物科技有限公司 |
| 胰蛋白酶 | Sigma 公司 |
| 苯甲基磺酰氟（PMSF） | 上海碧云天生物技术有限公司 |
| Hoechst 33258 试剂盒 | 上海碧云天生物技术有限公司 |
| Capase 3 活性测试试剂盒 | 上海碧云天生物技术有限公司 |
| Annexin V-FITC/PI 试剂盒 | 上海碧云天生物技术有限公司 |
| EDTA | 上海碧云天生物技术有限公司 |
| MTT | 上海碧云天生物技术有限公司 |
| DMSO | 上海碧云天生物技术有限公司 |
| β-actin 多克隆抗体 | 武汉博士德生物工程有限公司 |
| Caspase3 多克隆抗体 | 武汉博士德生物工程有限公司 |

30

|  |  |
| --- | --- |
| Bax 多克隆抗体 | 武汉博士德生物工程有限公司 |
| Bcl-2 多克隆抗体 | 武汉博士德生物工程有限公司 |
| 细胞色素 C 多克隆抗体 | 武汉博士德生物工程有限公司 |
| 羊抗小鼠 IgG HRP(BA1050) | 武汉博士德生物工程有限公司 |
| 羊抗兔 IgG HRP(BA1050) | 武汉博士德生物工程有限公司 |
| 脱脂奶粉（1326131） | MBchem 公司 |
| PVDF 膜 0.45u 30×100cm (M-4) | 广州威佳科技有限公司 |
| SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液  5×（P0015） | 上海碧云天生物技术有限公司 |
| TEMED(ST-728) | 广州威佳科技有限公司 |
| Tween-20 (0777-1) | Amresco 公司 |
| 甘氨酸（Glycine, 071673601） | MD 公司 |
| Beyo ECL Plus (P0018) | 上海碧云天生物技术有限公司 |
| Triton X-100 (2026752) | Amresco 公司 |
| 脱脂奶粉 | 广州威佳有限公司 |
| 氯化钠（AR500G） | 广州东巨实验仪器有限公司 |
| 甲醇（AR500ML） | 广州东巨实验仪器有限公司 |
| Tris 碱 | 广州威佳科技有限公司 |
| 丙烯酰胺（Acrylamide） | 广州威佳科技有限公司 |
| 甲叉二丙烯酰胺(Bis- Acrylamide) | 广州威佳科技有限公司 |
| ELC 化学发光液 | 广州威佳科技有限公司 |
| 十二烷基硫酸钠(SDS) | 广州威佳科技有限公司 |
| 过硫酸胺(APS) | 广州威佳科技有限公司 |

### **2.3** 实验仪器

|  |  |
| --- | --- |
| 小号匀浆器×2 个，中号匀浆器×2 个 | 南方医科大学教保商场 |
| KODAK Image Station 4000MM Digital  Imaging System | 美国 kodar 公司 |
| BioTrace PVDF Transfer Membrane | Pall Life Science 公司 |
| L420 台式低速自动平衡离心机 | 湘仪离心机仪器有限公司 |

31

|  |  |
| --- | --- |
| SYC-2101 水平摇床 | 其林贝尔仪器制造有限公司 |
| 1000μl 微量加样枪×1 支 | 法国吉而森公司 |
| 20-100μl 微量加样枪×1 支 | 法国吉而森公司 |
| 1-20μl 微量加样枪×1 支 | 法国吉而森公司 |
| PL3O3 型电子天平 | 梅特勒一托利多仪器有限公司 |
| JY-SP-C 型水平电泳仪 | 北京君意东方电泳设备公司 |
| 33K30 高速低温离心机 | Sigma 公司 |
| Hofer MiniVE 型western 电泳印记系统 | 美国 Amersham 公司 |
| SYC-2101 水平摇床 | 南京畅翔仪器设备有限责任公司 |

### **2.4** 药液配制

（1）1.5mol/L Tris 8.8配制：Tris碱9.09g加入蒸馏水40mL，用浓HCl调节pH

值至8.8，最后定容至50mL，4℃保存。

（2）0.5mol/L Tris 6.8配制：Tris碱3.03g加入蒸馏水40mL，用浓HCl调节pH

值至6.8，最后定容至50mL，4℃保存。

（3）10％SDS配制：10g SDS溶于蒸馏水中，定容至100mL，室温保存。

（4）10％APS配制：1g APS溶于蒸馏水中，定容至10mL，分装后-20℃冻存。

（5）30%丙烯酰胺：丙烯酰胺29g甲叉二丙烯酰胺1g→纯水定容至1L

（6）电泳缓冲液配制：Tris碱3.0g，甘氨酸18.8g，加蒸馏水定容至2L。使用时每1L加入10％SDS 10mL。

（7）转印缓冲液配制：Tris碱5.9g，甘氨酸2.9g, SDS 0.37g，甲醇200mL，加蒸馏水定容至1L。

（8）TBST缓冲液配制：NaCl 8.8g, 1M Tris-HCl(pH8.0) 20mL，充分溶解后加去离子水到800mL，再加入0.5mL Tween 20后充分混匀，最后定容到1L。

（9）5％封闭液配制：0.5g脱脂奶粉，加入10ml TBST溶解。

（10）5％抗体稀释液配制：0.5gBSA，加入10mLTBST 溶解。

## **3** 方法

### **3.1** 原代培养大鼠乳鼠心肌细胞

#### 3.1.1 双酶消化分离培养法

在超净台内无菌操作，将乳鼠浸泡于75%乙醇中10 s。消毒胸、腹部皮肤2-3次。

32

于剑突处正中线稍偏左向上开胸，压住胸骨右缘，使心脏自然跳出，自心尖根部取出心脏，置于装有预冷PBS缓冲液培养皿中。将鼠心脏全部取出后，剔除心房和心脏上结缔组织、脂肪及血管，用PBS（含双抗）清洗3次，去除血污，剪成约1 mm3的组织块备用。将组织碎块加入心肌组织的10～15倍的Ⅱ型胶原酶和胰蛋白酶( 1: 1)联合消化液，置37℃水浴摇床消化20 min，轻轻吹打组织块，使细胞分散，加入10% FBS的HG/DMEM终止消化，收获细胞，未完全消化的组织块中加入1 /2体积前次联合消化液，重复消化4次，经200 目铜网过滤。

#### 3.1.2 细胞培养

取适量细胞悬液，1000r·min -1离心5min，弃上清，加入10% FBS的HG/DMEM 7 mL，吹打均匀后，置于10cm培养皿，5% CO2、37℃培养箱中培养，90 min后差速贴壁，最先贴壁为心肌成纤维细胞，将未贴壁的细胞悬液（ 心肌细胞）1000 r·min

- 1离心5 min，弃上清，加入0% FBS 的HG/DMEM 7 mL重悬细胞，细胞计数调

整细胞浓度为1.4×10 8L-1后接种于6孔板中，置5% CO2、37 ℃培养箱中继续培养。

### **3.2** 化学合成**miRNA**激动剂和拮抗剂的转染

上海吉玛制药技术有限公司通过化学合成的方法合成，使用前用灭菌的RNase-free H2O配制成20μM的工作浓度，避免反复冻融。转染前一天，每孔接种4.5×10 5数量的心肌细胞至96孔板或6孔板，加入不含抗生素的、含10%FBS的DMEM新鲜培养液培养，使转染时的细胞密度达到40%左右。

转染步骤方法和试剂用量按照Lipofectamine 2000说明书中有关RNA转染方法和吉玛miRNA产品使用说明进行。按照实验设计，实验分转染eGFP mRNA agomir

|  |  |
| --- | --- |
| 激动剂 | 5’-p-fsAGfCAGfCAfCAfCGfAAAfUAfUfUGGsfCsG-3’  5’-p-fUsfUfCfUfCfCGAAfCGfUGfUfCAfCGfUsUsU-3’ |
| 抑制剂 | 5’-GsAsAACCCAGCAGACAAUGUsAsGsCsU-Chol3’  5’-GsAsAACCCAGCAGACAAUGUsAsGsCsU-Chol 3’ |

100nM（激动剂阴性对照组）、转染miR-497 agomir100nM（激动剂组）、转染eGFP mRNA antagomir 100nM（拮抗剂阴性对照组）和转染miR-497 antagomir 100nM（拮抗剂组）4组。

#### **3.2.1** 过表达**miRNA-497**稳定细胞株的建立

常规实验室转染技术可分为瞬时转染和稳定转染两大类。瞬时转染含义是宿主染

33

色体中不整合进外源性的DNA/RNA，因此某一宿主细胞中虽然可以有多个拷贝数，并对于进行高表达，但维持时间不长，一般只有几天。该类技术多用于诸多调控元件和启动子的分析。一般来说，超螺旋质粒DNA转染效率较高，在转染后24-72小时内（依赖于各种不同的构建）分析结果，常常用到一些报告系统如荧光蛋白，β半乳糖苷酶等来帮助检测。稳定转染是外源DNA可以整合到宿主染色体中，也可能作为一种游离体存在。尽管线性DNA比超螺旋DNA转入量低但整合率高。外源DNA整合到染色体中概率很小，大约1/104转染细胞能整合，通常需要通过一些选择性标记，如来氨丙基转移酶（APH；新霉素抗性基因），潮霉素B 磷酸转移酶（HPH），胸苷激酶（TK）等反复筛选，得到稳定转染的同源细胞系。本章节中我们选用慢病毒转染方法构建稳定过表达miRNA-497的细胞株。

#### **3.2.2** 细胞准备

慢病毒转染前18-24小时采用胰酶对实验细胞进行消化和计数，之后对细胞进行铺板，在铺板过程中避免细胞的堆积，使其混匀充分，应能在24小时内使细胞混合，混匀完成后，[将贴壁细胞](http://www.bio1000.com/zhuanti/product/201308/444232.html)以1×10 5/孔铺到24孔板中。使细胞在慢病毒转染时的数量为2×10 5/孔左右。

#### **3.2.3** 慢病毒包装

（1）将前一天准备好的细胞，用含有6μg/ml polybrene的2ml[新鲜培养基](http://www.bio1000.com/zhuanti/product/201307/440739.html)替换原培养基，加入适量病毒悬液。37℃孵育。

（2[）继续培养](http://www.bio1000.com/zhuanti/product/201307/440793.html)24小时，用新鲜培养基替换含有病毒的培养基。

（3）继续培养。待转染的细胞PBS清洗后加入50uL/1500uL Opti-MEMI稀释miRNA Agomir/ antagomir/NC：用不含血清培养基Opti-MEMI 25μL/250μL稀释miRNA Agomir，轻柔混匀，室温孵育5min；稀释lipo2000：用不含血清培养基Opti-MEMI稀释lipo2000 25uL/250uL，轻柔混匀并室温孵育5min；将两者轻柔混匀，室温孵育20nim，勿剧烈吹打或振荡，过度用力会破坏脂质体的结构以及混合物的合成。将转染混合液加入细胞培养孔中，轻轻晃动。将培养板置于5% CO2、37℃培养箱中继续培养。转染6h后，将孔中的培养基弃去，更换含10%FBS的DMEM新鲜培养液继续培养。

### **3.3** 缺氧**/**复氧细胞模型的建立

配制缺氧液(mM: NaCl 98.5, KCl 10, MgSO4 1.2, CaCl2 1.0, HEPES 20, sodium

34

lactate 40，pH 6.8, 37℃）和复氧液（mM: NaH2PO4 0.9, NaHCO3 20.0, CaCl2 1.0, MgSO4 1.2, HEPES 20.0, NaCl 129.5, KCl 5.0，glucose。按1×10 5 cells/well心肌细胞接种于96孔板，转染24h后，用缺氧液置换正常的培养基，置于含5%CO2气体的培养箱，通入99.9%的N2气体，监测仪测得O2体积分数＜1%，认为缺氧并开始计时，缺氧3 h。复氧前复氧液置换缺氧液后，放置常氧培养箱孵育2 h。将细胞按1×10 5个/ml的密度接种于96孔板，用10%FBS的高糖DMEM培养基于5%CO2、37℃培养箱培养24h，改用无FBS 的低糖DMEM 培养基，用50μmol/L，100μmol/L，

200μmol/L，400μmol/L的H2O2刺激细胞24小时。每个浓度设置6个复孔。

### **3.4** **RT-qPCR**检测转染后心肌细胞**miR-497**的表达

转染48h后，实验分组空白对照组（control），miR-497激动剂阴性对照（eGFP agomir+A/R），miR-497激动剂（497 agomir+A/R），miR-497拮抗剂阴性对照组（eGFP antagomir+A/R），miR-497拮抗剂组（497 antagomir+A/R），提RNA进行，提取各组心肌细胞miRNA，随后进行逆转录和PCR扩增，RT-qPCR检测转染后各组细胞

|  |  |
| --- | --- |
| 反转录引物 | GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTACAAA |
| 上游引物 | CGCCAGCAGCACACTGTGG |
| 下游引物 | GTGCAGGGTCCGAGGT |

miR-497表达水平（A/R：缺氧/复氧）。RT-qPCR引物序列如下：

### **3.5** **Hoechst 33258**染色检测细胞凋亡

Hoechst 33258是一种[可以穿透细胞膜的蓝色荧光染料](http://wenwen.soso.com/z/Search.e?sp=S%E8%8D%A7%E5%85%89%E6%9F%93%E6%96%99&amp;ch=w.search.yjjlink&amp;cid=w.search.yjjlink)，实验中常用于检测细胞

凋亡情况，细胞凋亡后膜通透性增高，Hoechst 33258进入凋亡比正常细胞的多，其荧光强度高，参照HU Sheng-quan方法，各实验组按要求给予不同的处理因素后，加入新鲜配制的4％多聚甲醛（pH为7.4）于37℃固定细胞30 min, D-Hanks液洗两次，加5 mg/L Hochest 33258染色液1ml，于摇床上染色30 min, D-Hanks液洗2次，每次于摇床上摇动10 min，后用封片液（20 mM柠檬酸，50 mM磷酸氢二钠，50％甘油，pH 5.5）封片后荧光显微镜观察、摄片。

### **3.6** 流式细胞技术分析转染**miR-497**激动剂**/**拮抗剂对**A/R**诱导的心肌细胞凋亡的影响

细胞凋亡早期的改变主要体现在细胞膜的表面，这些改变之一是磷脂酰丝氨酸

（phosphatidylserine, PS）从细胞膜内转移到细胞膜外，使PS暴露在细胞膜外表面。

PS正常主要在细胞膜的内面存在，是一种磷脂，带有负电荷，细胞膜上的PS分布

35

呈不对称性，在细胞发生凋亡时该特性被破坏而使PS暴露在细胞膜外。Annexin V

膜联蛋白是一种Ca2+依赖的磷脂结合蛋白，具有易于结合到磷脂类如PS的特性。

FITC标记的Annexin V（Annexin V-FITC）对PS有高度的亲和性，用流式细胞仪检测。PS转移到细胞膜外也可发生在细胞坏死中，而不是凋亡所独有的。碘化丙啶染色液，碘化丙啶可以染色坏死细胞，可使细胞着色。对于坏死细胞，由于细胞膜的完整性已经丧失，Annexin V-FITC可以进入到细胞浆内，与位于细胞膜内侧的磷酯酰丝氨酸结合，从而也使坏死细胞呈现绿色荧光。故细胞在Annexin V/PI双染下，在荧光显微镜下观察，凋亡细胞发出绿色荧光，坏死细胞发出红色荧光。把细胞培养液吸至离心管内，PBS洗涤贴壁细胞3次，收集洗涤液至离心管内，用不含EDTA胰酶细胞消化液消化1 min~2min，加入完全培养液，吹打，细胞消化下来后，转移到离心管内，离心350g，5分钟，去上清，PBS重悬，离心350 g，5分钟，重复两次，加入100μl结合1x缓冲液，重悬细胞。加入5μl Annexin V-FICT，轻轻混匀，室温避光孵育10分钟，然后加1μl PI(100 ug/ul)染色液轻轻混匀，室温避光孵育5分钟，再加400μl结合缓冲液，30分钟内上机检测，每份样品检测1万个细胞。在双变量流式细胞仪的散点图上，左下象限显示活细胞为（FICT-/PI-）；右上象限是坏死细胞为（FICT+/PI+）；而右下象限为凋亡细胞显现（FICT+/PI-）。

### **3.7** **TUNEL**染色观察心肌细胞凋亡

将约5×10 7个/ml细胞于4％中性甲醛室温中固定10min。在载玻片上滴加

50～100μl细胞悬液并使之干燥。用PBS洗两次，每次5min，用Proteinase K工作液处理组织15-30 min在21–37°C（温度、时间、浓度均需摸索）或者加细胞通透液8min；PBS漂洗2次；制备TUNEL反应混合液，处理组用50μl TdT+450μl荧光素标记的dUTP液混匀；而阴性对照组仅加50μl荧光素标记的dUTP液，阳性对照组先加入100μl DNase 1，反应在15~25℃×10min，后面步骤同处理组。玻片干后，加50μl TUNEL反应混合液（阴性对照组仅加50μl荧光素标记的dUTP液）于标本上，加盖玻片或封口膜在暗湿盒中反应37℃×1h. PBS漂洗3次；可以加1滴PBS在荧光显微镜下计数凋亡细胞（激发光波长为450~500nm，检测波长为515~565nm）；玻片干后加50μl converter-POD于标本上，加盖玻片或封口膜在暗湿盒中反应37℃

×30min. PBS漂洗3次。在组织处加50~100μl DAB底物，反应15~25℃×10min ；

PBS漂洗3次；加一滴PBS或甘油在视野下，用光学显微镜观察凋亡细胞（共计

36

200~500个细胞）并拍照。可结合凋亡细胞形态特征来综合判断（未染色细胞变小，胞膜完整但出现发泡现象，晚期出现凋亡小体，贴壁细胞出现邹缩、变圆、脱落；而染色细胞呈现染色质浓缩、边缘化，核膜裂解，染色质分割成块状/凋亡小体）

### **3.8** 流式细胞技术检测**miR-497**激动剂**/**拮抗剂对**A/R**诱导的心肌细胞线粒体膜电位的变化

线粒体膜电位的产生是由于其内膜对各种离子不通透而在内膜两侧建立起的一个离子势能。当内膜由于某种原因完整性遭到破坏，其对离子的这种不通透性就会发生改变，内膜两侧阴阳离子可以自由交换，原来建立的离子电势就会下降甚至消失，因此线粒体膜电位的改变可以间接反映线粒体内膜的完整性，是细胞发生坏死的一个重要特征。JC-1也称CBIC2（3）或5, 5′，6，6′-Tetrachloro-1, 1′，3，3′-tetraethyl-imidacarbocyanine iodide，分子式为C25H27Cl4IN4，分子量为652.23，是一种能渗透到细胞器内，并且特异性与细胞中线粒体结合的荧光物质。JC-1是一种广泛用于检测线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential)ΔΨm 的理想荧光探针。可以检测细胞、组织或纯化的线粒体膜电位。

把细胞培养液吸至离心管内，PBS洗涤贴壁细胞3次，收集洗涤液至离心管内，用胰酶细胞消化液消化1 min~2min，加入RIPM 1640完全培养液，吹打，细胞消化下来后，转移到离心管内，350 g离心5分钟，去上清，加0.5 ml培养基重悬细胞，加入0.5 ml JC-1工作液（1.6ml超纯水溶解JC-1(200X)，再加0.4 ml(5X JC-1)洗涤缓冲液），置37℃，5％CO2培养箱内孵育30分钟，然后600 g离心4 min，去上清，用1X缓冲液（8 ml超纯水+2 ml(5X JC-1)洗涤缓冲液）洗涤两次，600 g离心4 min，清洗干净JC-1工作液，去上清，加入250μl 1X缓冲液，经FACS Calibur流式细胞仪检测，用Cel1Quest软件分析荧光相对强度，观察细胞线粒体膜电位的变化。

### **3.9** **Capsase 3** 活性检测

A. 准备工作：首先将裂解液溶解后混匀并置于冰浴上备用，并将检测缓冲液溶解后混匀并置于冰浴上备用。

B. 测定pNA标准曲线：标准品稀释液的配制：按照每0.9ml检测缓冲液加入0.1ml裂解液的比例配制适量的标准品稀释液。将试剂盒提供的pNA(10mM)用标准品稀释液稀释为0、10、20、50、100和200μM，作为标准品。每个浓度取100μl用酶标仪进行检测，或取适当量用容量不超过100μl的分光光度检测杯进行检测，测定A405。

37

每一个标准品的A405减去不含pNA的空白对照的A405计算出实际的因pNA而导致的吸光度，并制作出pNA浓度相当于A405的标准曲线。

C. 加入100μl裂解液，在冰浴上用玻璃匀浆器匀浆。然后把匀浆液转移到1.5ml离心管中，冰浴再裂解5分钟。4℃16000-20000rpm离心10-15 min。把上清转移到冰浴预冷的离心管中。立即测定caspase 3的酶活性或-70℃保存样品。

### **3.10** **Western-Blot**法测定凋亡相关蛋白的含量

#### 3.10.1 心肌细胞总蛋白提取

（1）预冷匀浆器、蛋白激酶提取液、制冰，预冷高速低温离心机至4℃。

（2）大鼠心肌组织手动匀浆，匀浆前应用电子天平称取大鼠的心肌重量，按1g组织加入5ml蛋白激酶提取液、5µl 100mmol/LPMSF 。

（3）手动匀浆5-10min后，将匀浆物质进行高速低温离心(14000g, 4℃, 5min)，离心完毕取上清备用。

#### 3.10.2 蛋白定量（BCA法）

（1）配制BCA工作液：根据样品数量，将1体积BCA试剂B加入50体积的

BCA试剂A中，比例即50: 1，以配制适量BCA工作液。

（2）绘制蛋白含量标准曲线：取适量蛋白标准品（2.5mg/mL）用0.9％NaCl稀释至终浓度为0.5mg/mL，将稀释的标准品按0、1、2、4、8、12、16、20μL分别加到96孔板中，然后再加入0.9％NaCl补足至20μL。各孔再加入200μL BCA工作液。

（3）测定样品蛋白含量：每组样品取2μL，用0.9％NaCl稀释至20μL加入到

96孔板中，各孔再加入200μL BCA工作液，把酶标板放于振荡器上震荡30秒，室温放置30分钟。

（4）用多标记微孔检测仪在540nm波长下测定各孔吸光度值。根据所测得的吸光度值进行标准曲线的绘制，从而计算出样品中蛋白的含量。

#### 3.10.3 配胶和封胶

（1）配胶前应确保玻璃板洗净（多次清洗最后用双蒸水冲洗），倾斜晾干，用夹子安装固定玻璃板，加入双蒸水检测是否渗漏。

（2）10%分离胶配制：将2805μl蒸馏水、2340μl丙烯酰胺、2625μl Tris. HCl 8.8、70μL 10%SDS、3μL TEMED、50uL 10％APS在一小瓶中充分混合（表7），沿两板夹层滑动均匀注入。当液面距板上沿3cm左右时，滑动加入少许蒸馏水覆盖胶面，室温

38

放置30min，待分离胶聚合完全后，倒出蒸馏水，再用滤纸吸去残留液体。

（3）5%浓缩胶配制：将2055μL蒸馏水、500μL丙烯酰胺、380uL Tris. HCl 6.8、30μL 10%SDS、3μL TEMED、30μL 10％APS在一小瓶中充分混合（表7），加至分离胶的上面直至玻璃板顶端。将梳子插入凝胶内，室温聚合30min。

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 10%分离胶 | 7ml | 3.5ml | 5%浓缩胶 | 3ml | 1.5ml |
| 三蒸水 | 2805μl | 1400μl | 三蒸水 | 2055μl | 1030μl |
| 丙烯酰胺 | 2340μl | 1170μl | 丙烯酰胺 | 500μl | 250μl |
| 1.5M Tris-HCL | 2625μl | 875μl | 1.0M Tris-HCL | 380μl | 190μl |
| 10%SDS | 70ul | 35μl | 10%SDS | 30μl | 15μl |
| 10%AP | 50ul | 25μl | 10%AP | 30μl | 15μl |
| TEMED | 3μl | 1.5μl | TEMED | 3μl | 1.5μl |

**表 10 10%分离胶和5%浓缩胶的配制**

#### 3.10.4 样品处理

将冻存的细胞蛋白放至室温融化，根据蛋白定量各组取出等质量的细胞蛋白，加入5×上样Buffer（所取蛋白样品体积1/4），高速离心10000g，10s，充分混匀后于金属浴中，100℃，5min使蛋白质变性。

#### 3.10.5 电泳

（1）在电泳槽内加入1×SDS电泳缓冲液，轻轻拔出梳子，上样之前应先将胶板下及梳槽内气泡赶尽，用移液枪将处理好的蛋白样品加入到梳槽内，在最左侧泳道加入3μL protein ladder，同时在蛋白样品两侧槽内加入与蛋白样品等体积的样品缓冲液；

（2）接通电泳装置电源，将电压调至80V电泳浓缩胶，当溴酚蓝下降至浓缩胶与分离胶交界时，将电压改成120V电泳分离胶，直至溴酚蓝到达分离胶底部时停止电泳，取出凝胶，切取15~80KD范围的浓缩胶，放置于转膜缓冲液中。

#### 3.10.6 转膜

（1）电泳结束前20分钟左右戴上手套开始准备，按凝胶面积剪切同样大小的

PVDF膜1张、滤纸3张。将PVDF膜在甲醇中浸泡15s后转入转膜缓冲液中。将滤

39

纸也浸入转膜缓冲液中。

（2）按―滤纸－膜－胶－滤纸‖的顺序依次在转移槽中放好，注意用玻棒逐出气泡，剪去滤纸与膜的过多部分。注意膜接正极，胶接负极。在80mA电流下转印1h。

#### 3.10.7 封闭及抗体杂交

（1）封闭：将膜从电转槽中取出，浸没于抗体封闭缓冲液，放至摇床上缓慢摇晃1小时；

（2）洗涤：封闭结束后，用TBST浸洗3次，每次5min；

（3）结合一抗：含小鼠抗兔LOX-1、Bax、Bcl-2、P-P38、P38、P-ERK1/2、ERK1/2、

P65及兔抗鼠β-actin的一抗稀释缓冲液滴加于摇床的塑料膜上，将PVDF膜从封闭液中取出，4℃静置过夜；

（4）洗涤：一抗孵育结束后，用TBST浸洗3次，每次5min；

（4）结合二抗：将按比例稀释的二抗覆盖于PVDF 膜上，放至摇床室温轻摇

90min；

（5）洗涤：二抗孵育结束后，用TBST浸洗3次，每次5min。

#### 3.10.8 HRP-ECL发光鉴定

先用滤纸轻轻吸干PVDF膜上液体，将等体积的BeyoECL Plus A液和B液混匀后，迅速用移液滴加在PVDF膜上，确保液体覆盖PVDF膜，放入KODAK全光谱多功能活体成像系统中曝光。

#### 3.10.9 Image tool V3.0图像分析软件分析

分别计算目的蛋白及内参β-actin灰度值，目的蛋白与内参β-actin灰度值之比代表了其的活性。

### **3.11** 统计学处理

所有实验数据均采用统计学软件包SPSS13.0进行统计分析处理，计量资料采用

一

用均数±标准差（*X*±SD）表示；两组间比较用两独立样本t检验；多组间差异的比

较采用单因素方差分析，组间两两差异的比较采用LSD法进一步分析；计数资料以率表示，组间比较采用χ2检验；显著性标准为α=0.05, P<0.05有统计学意义。

40

## **4** 结果

### **4.1** 原代乳鼠心肌细胞培养特征

接种培养5小时，细胞开始贴壁生长，48小时后牢固贴壁。细胞从圆形逐渐转化成梭形、三角形或长方形，中央有卵圆形核，胞质向外伸出2-3个长短不同的突起，

细胞在生长时呈放射状、火焰状或漩涡状走行，约4天后细胞生长成单层，相互融合成片，呈现有节律的同步搏动，波动频率为80-100次/分（图3）。

**培养36h培养60h**



**图3** **原代乳鼠心肌细胞培养特征**

### **4.2** 转染激动剂和拮抗剂后**miR-497**在心肌细胞中表达升高**/**降低

Agomir和antagomir是经过甲基化特殊修饰，末端胆固醇标记的miRNA激动剂，稳定性更高。因此，为了探索miR-497对A/R诱导的心肌细胞凋亡的影响，我们通过改变miR-497在细胞内的表达水平，从而来观察心肌细胞凋亡的变化。通过转染miR-497激动剂和miR-497拮抗剂以及相应对照组，24h后进行总RNA提取和逆转录，用实时荧光定量PCR检测各组miR-497的表达，如图4是miR-497 agomir 和

antagomir扩增曲线及溶解曲线：说明实验反应良好、顺利。数据分析后结果（图5）显示转染后的心肌细胞，与激动剂阴性对照eGFP agomir组比较，心肌细胞miR-497表达在miR-497 agomir组转染的细胞中表达水平增加超过3.5倍（P＜0.01），而与拮抗剂阴性对照eGFP antagomir组比较，miR-497 antagomir组miR-497表达下调60%

（P＜0.01）。

41



图4 miR-497 agomir和antagomir扩增曲线(A)及溶解曲线(B), 其中a: miR-497 agomir; b: miR-497 antagomir; c: eGFP agomir/antagomir



图5 转染后心肌细胞miRNA-497的表达水平（#P＜0.01）

42

### **4.3** **TUNEL**和**Hoechst 33258**染色结果

经过TUNEL染色后，正常组中未见到明显的凋亡心肌细胞，凋亡的心肌细胞胞核显示出不同程度的黄绿色，miR-497 agomir+A/R 组绿色荧光程度最强，miR-497

antagomir+A/R组绿色荧光程度最弱；通过Hoechst 33258染色确定A/R诱导的心肌细胞凋亡的作用，荧光显微镜显示，正常组细胞的胞核界限清晰，圆形或椭圆形，呈均匀蓝色荧光，染色质分布均匀，而其他组细胞出现不同程度染色质分布不均匀，部分细胞细胞核固缩，呈新月形或球形，染色质凝集，miR-497 agomir+A/R组细胞凋亡情况较强，miR-497 antagomir+A/R组较弱，且差异具有统计学意义（P＜0.05）。说明过表达miR-497使A/R诱导的心肌细胞凋亡增加，干扰miR-497使A/R诱导的心肌细胞凋亡减少。见图6。



图 6 TUNEL和Hoechst 33258染色结果(merge: PI和Tunel）

A Control B miR-497 antagomir+A/R C eGFP antagomir+A/R D eGFP agomir+A/R E miR-497 agomir+A/R

### **4.4** 流式细胞技术检测转染**miR-497**激动剂**/**拮抗剂对**A/R**诱导的心肌细胞凋亡

**的影响**

应用PI和AnnexinV染色，进行流式细胞术分析，Annexin V和PI双染的流式细胞术显示，miR-497 agomir+A/R组细胞凋亡率高于其阴性对照组情况较强，miR-497 antagomir+A/R组细胞凋亡率低于其阴性对照组，且差异具有统计学意义（P

43

＜0.05）。也说明过表达miR-497 使A/R 诱导的心肌细胞凋亡增加，干扰miR-497

使A/R诱导的心肌细胞凋亡减少。见图7。

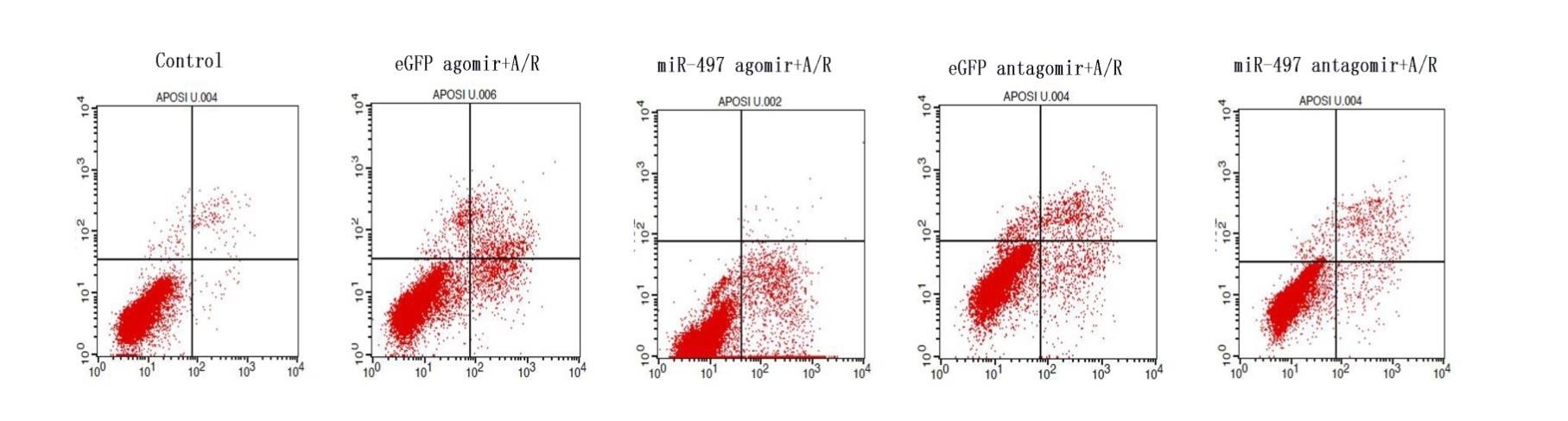


图7 流式细胞技术检测各组细胞凋亡结果图（\*P＜0.05，#P＜0.01）

### **4.5** **JC-1**法检测转染**miR-497**激动剂**/**拮抗剂对**A/R**诱导的心肌细胞后线粒体膜电位

应用JC-1法染色，进行流式细胞术分析结果显示，miR-497 agomir+A/R组细胞线粒体膜电位低于其阴性对照组情况，miR-497 antagomir+A/R组细胞细胞线粒体膜电位高于其阴性对照组，且差异具有统计学意义（P＜0.05）。见图8。

44



图8 检测各组细胞线粒体膜电位结果图（\*P＜0.05，#P＜0.01）

A Control B eGFP agomir+A/R C miR-497 agomir+A/R D eGFP antagomir+A/R E miR-497 antagomir+A/R

### **4.6** 转染**miR-497**激动剂**/**拮抗剂对**A/R**诱导的心肌细胞的**Capase 3**活性的影响

Capase 3参与了与细胞凋亡相关的调节。正常对照组中，Capase 3活性较其他组显著降低（P=0.000），miR-497 agomir+A/R 组Capase 3 活性高于阴性对照组及miR-497 antagomir+A/R组，且差异具有统计学意义（P＜0.05）。提示miR-497促A/R诱导心肌细胞凋亡作用可能与调节Capsase 3激活相关。见表11，图9。

表 11 miR-497对细胞Capsase 3活性的影响±S，n=10）



|  |  |
| --- | --- |
| 实验分组 | Capsase 3 活性 |
| Control | 0.17± 0.03 |
| eGFP agomir+A/R | 0.63±0.17 #▲ |
| miR-497 agomir+A/R | 0.70±0.07 # |
| eGFP antagomir+A/R | 0.54±0.07 #▲ |
| miR-497 antagomir+A/R | 0.33±0.13 \*▲ |
| *F* | 9.33 |
| *P* | 0.000 |

图 9 miR-497对细胞Capsase 3活性的影响

与对照组相比，\*P＜0.05，#P＜0.01；与miR-497 agomir+A/R组相比，▲P＜0.05

### **4.7** **Western-Blot**法测定凋亡相关蛋白表达

Western blot结果显示以β-actin为内参时，转染miR-497激动剂与对照组相比，可增加A/R诱导的心肌细胞中bax表达水平，降低bcl-2表达水平，同时转染miR-497拮抗剂可增加A/R 诱导的心肌细胞中bcl-2 表达水平，降低bax 表达水平；同时

45

miR-497过表达可增加cleaved caspase3的表达，干扰miR-497降低了cleaved caspase3

的表达。见图11。

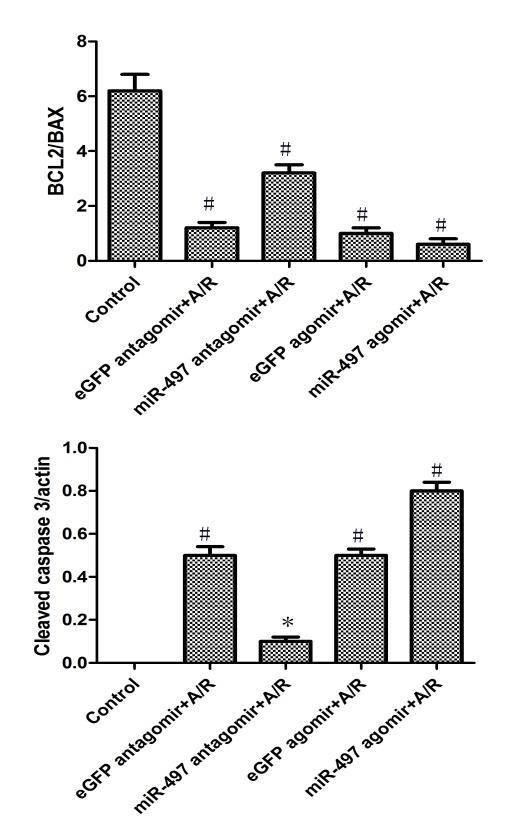


图11 Western-Blot法测定凋亡相关蛋白表达（\*P＜0.05，#P＜0.01）

A Control B eGFP antagomir+A/R C miR-497 antagomir+A/R D eGFP agomir+A/R E miR-497 agomir+A/R

## **5** 讨论

心肌梗死后心功能不全的关键作用因素是心肌细胞缺血缺氧造成的心肌细胞凋亡，目前心肌梗死研究的关键即是怎样降低心肌细胞在缺氧缺血条件下的凋亡。以乳鼠心肌细胞缺氧缺血模型为体外研究的对象，以小鼠的AMI模型为体内研究对象来研究miRNAs对心肌细胞缺氧缺血后调控凋亡水平的作用，并且分析和检测对其可能作用的靶位点。现今多种细胞被使用来进行心肌细胞凋亡水平的研究，包括小鼠心肌细胞、大鼠乳鼠原代细胞及大鼠心肌母细胞株H9c2，而大鼠乳鼠心肌细胞又以其收集培养技术的成熟稳定被广泛采用，而国内外相关心肌组织及细胞实验也大都采用小鼠心脏模型加大鼠乳鼠心肌细胞原代模型进行检测[47-49]。近年来的研究发现，miRNA作为一种转录后调控因子，能够同时靶向作用于多个不同通路中相关蛋白质的信使RNA，从转录水平或转录后水平调节基因表达[50-53]，进而从整体水平实现对细胞内多种因子的表达乃至多条信号通路的―网状‖调控[54]。在心脏中miRNA

46

也被发现能调节心肌各种病理生理过程，包括心脏发育、心脏重塑、心肌纤维化、血管新生以及心肌细胞凋亡[55, 56]。当前已经发现miR-21能通过抑制过氧化氢的途径来调控心肌细胞凋亡和死亡。

microRNA参与了心肌细胞凋亡过程。最近的研究[57-58]表明，miR-1 和miR-133

在氧化应激引起的细胞凋亡效应中的作用是不同的，miR-1 能够下调热休克蛋白

HSP60和HSP70，起到促凋亡的作用，而miR-133能够抑制CASPASE9的表达，抑制凋亡的发生。此外，在心肌氧化应激模型中[59]，miR-21表达上调，可以抑制促凋亡因子PDCD4的表达，保护心脏以应对氧化应激引起的损伤。最新研究表明，miR-499通过抑制钙调磷酸酶介导的DRP1(动力相关蛋白1)去磷酸化作用，减少线粒体中DRP1积聚，抑制DRP1介导的线粒体分裂程序激活，从而抑制凋亡的作用[60,61]。此外，Wang等人[62]发现，miR-494在小鼠心肌缺血再灌注损伤以及人类的心肌梗死组织中表达下调，miR-494通过抑制钙调磷酸酶催化亚基，抑制了心肌细胞凋亡，具有保护心脏功能的miR-30家族包括miR-30a，miR-30b，miR-30c以及miR-30d，该家族microRNA在心肌细胞中高表达，Li等人[63]对miR-30影响线粒体分裂的机制进行的研究发现，miR-30家族可以通过抑制P53表达阻止线粒体的分裂，进而抑制细胞凋亡。心脏组织中miR-30家族高表达而P53表达水平较低被认为是保护心肌细胞的一种生理机制。miR-378也是一种心肌和骨骼肌高表达的microRNA，

Knezevic等人[64]发现，过表达miR-378能够通过直接靶向IGF1R（胰岛素样生长因子1受体）增加凋亡发生率，并且能够降低AKT的信号通路的级联反应。然而将miR-378敲低后则可通过增加IGF1R表达以及促进AKT信号通路的级联反应来保护心肌细胞免受H2O2和缺氧-复氧引起的细胞死亡。

李培峰等[65]发现miRNA-499通过抑制心肌细胞凋亡抑制心肌梗死，具有心肌保护功能，并揭示了其相关的分子机制。在大鼠心肌梗死组织及缺氧诱导的心肌细胞凋亡过程中，miRNA-499的表达水平显著下调。进一步研究表明miRNA-499具有明显抑制心肌细胞凋亡的作用[65]；该研究首先构建心脏特异性miRNA-499[转基因](http://www.antpedia.com/news/99/n-379699.html)小鼠，然后缺血再灌注诱导小鼠心肌梗死，发现转基因小鼠的凋亡心肌细胞、心肌梗死面积较野生型小鼠明显减少，心功能的各项指标也得到明显改善。这提示miRNA-499可以通过抑制心肌细胞凋亡的途径发挥心肌保护的作用；同时该研究发现了miRNA-499调控心肌细胞凋亡的分子机制，它通过抑制其靶蛋白钙调磷酸酶催化亚

47

基CnAa和CnAb来抑制钙调磷酸酶所介导的Drp1[去磷酸化](http://www.antpedia.com/news/19/n-365319.html)，导致Drp1失去促进[线粒体](http://www.antpedia.com/news/83/n-379083.html)分裂的功能，从而抑制了细胞凋亡的发生[65]。在心肌缺血损伤及心肌细胞凋亡过程中p53表达水平升高，抑制miRNA-499的表达，从而促进心肌梗死后心肌细胞凋亡的发生。miRNA-133a在心肌组织中特异表达[66]，广泛参与了心肌细胞应激、增殖、分化和凋亡等多种生物效应，并在I/R损伤以及缺血预处理心肌保护机制中具有重要作用，在活体大鼠心肌I/R损伤模型，观察I/R的损伤机制，探讨miRNA-133a在缺血后处理（PostC）抗凋亡机制中对Bcl-xl/s表达的调控作用。使用rniRNA-133a特异性抑制剂antagomiR-133a后，PostC减少心肌梗死面积以及抗细胞凋亡作用消失，miRNA-133a，Bcl-xl mRNA表达水平显著下调，Bcl-xs mRNA表达水平显著上调，同时Bcl-xs蛋白表达水平显著上调，Bcl-xl蛋白表达水平显著下调，miRNA-133a参与了缺血后处理心肌保护作用，其机制可能是通过调控凋亡蛋白Bcl-xl及Bcl-xs表达水平减少再灌注后心肌细胞调亡[67,68]。Yin[69]等研究发现在心肌缺血预处理

（IPC）的时候miRNA-21、-1、-24（IPC-miRNAs）表达明显上调。通过注射IPC-miRNAs至缺血心肌区的途径可减少心肌缺血再灌注损伤。进一步研究表明IPC-miRNAs是通过上调表达热休克蛋白70（HSP70）[、内皮一氧](http://drugs.dxy.cn/drug/89555.htm)化氮合酶、热休克蛋白转录因子 1

（HSF-1）来对心肌进行保护[70]。活性氧（ROS）所导致的心肌细胞损伤对心血管疾病起着重要的作用。根据最新研究发现在ROS导致损害的心肌细胞中miRNA -21表达明显上调，miRNA-21可减少ROS对心肌细胞的损伤[71]，这主要通过抑制程序性

4死亡基因（PDCD4）的表达来实现。Yang[72]等研究发现miRNA-1可促进心肌细胞凋亡，其途径为抑制HSP60蛋白表达。miRNA-133通过抑制caspase基因表达的途径来抑制心肌细胞凋亡。这提示miRNA在心肌损伤及凋亡过程中起到非常重要的调控作用。miRNA-1、21可用于治疗某些缺血性心脏病，如心肌梗死、心肌缺血再灌注损伤。

本实验通过缺氧/复氧建立微循环再灌注损伤模型，再通过激动剂Agomir和拮抗剂antagomir使其过表达及低表达miR-497，观察其对A/R诱导的心肌细胞凋亡的影响，发现miR-497可促进心肌细胞凋亡。提示miR-497可能为心肌微循环再灌注损伤细胞凋亡重要调控因子，阻断miR-497表达可能保护心肌细胞，减轻再灌注损伤。miR-497参与心肌缺血再灌注损伤过程，其过程信号转导机制有待进一步研究。

Caspase信号通路可分为内源性和外源性凋亡信号通路，近年来多个关于caspase

48

成员活性调控的研究已经获得了一定的进展，包括有关的信号通路（JNK、ERK、

P13K-Akt 等）、凋亡调控的相关蛋白(Bcl-2、IAP 等)和一系列具有调控功能的微小

RNA[73]。在由心肌再灌注损伤所诱导的细胞凋亡过程主要经由线粒体途径调节，当线粒体外膜的通透性发生改变时可诱发心肌细胞凋亡，这过程主要由促凋亡的和抗凋亡的Bcl-2家族蛋白控制，其中Bcl-2和Bax是一对重要的平衡因子，Bcl-2能够抑制mPTP 开放，从而阻止线粒体膜间隙的前凋亡因子进入胞浆，而Bax 可促进

mPTP的开放，释放细胞色素C（Cyt-c）以及凋亡诱导因子（AIF）等，继而引起了下游的死亡激酶——半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶（Caspase）的级联激活，最后导致细胞凋亡[74]，Bcl-2/Bax 的轻微动态改变即可影响线粒体通透性来调控凋亡。心肌梗死、再灌注损伤、心力衰竭等心血管疾病均存在不同程度的细胞凋亡，由于心肌细胞再生分裂能力较低，功能性心肌细胞丢失可使心功能减低[75]。

本研究表明miR-497对A/R诱导的心肌细胞凋亡的调节机制可能为通过Bcl-2表达减少，Bax表达升高，增加线粒体通透性转换孔开放，释放促凋亡因子，引起caspase 3激活，提示阻断miR-497表达可能为一种降低缺血再灌注损伤导致的心肌细胞凋亡的重要方法，为临床应用提供理论基础。

49

# 全文结论

1. STEMI患者miR-497表达水平升高，在急诊PCI的术前和术后，血清miR-497

可能存在动态性变化，并与急诊PCI术后的无复流现象有关。

2. miR-497参与心肌缺血再灌注损伤过程，其机制可能与其激活线粒体凋亡途径促进心肌细胞凋亡有关。

50

参考文献

[1] 毛焕元, 曹林生, 心脏病学（第2版）, 北京: 人民卫生出版社, 2001: 1078.

[2] 陈军, 姚琳芳, 王珊珊, 等. 中青年急性心肌梗死发病特点的临床研究[J]. 宁夏医学杂志, 2012, 34 (6): 532-533.

[3] 卫生部信息统计中心. 2010年中国卫生统计年鉴[Z]. [http: //www. moh. gov. cn/publicfiles/business/htmlfiles/zwgkzt/ptjnj/year2010/index2010. html.](http://www.moh.gov.cn/publicfiles/business/htmlfiles/zwgkzt/ptjnj/year2010/index2010.html)

[4] Bujak M, Ren G, Kweon HJ, et al. Essential role of Smad3 in infarct healing and in thepathogenesis of cardiac remodeling [J]. Circulation, 2007, 116(19): 2127-38.

[5] 刘同奎, 修萍, 董玉珠, 等. 急性心肌梗塞溶栓治疗的现状[J]. 中国危重病急救医学, 1996(06): 56-58.

[6] Tsuda T, Gao E, Evangelisti L, et al. Post-ischemic myocardial fibrosis occurs independent of hemodynamic changes [J]. Cardiovasc Res, 2003, 59(4): 926-33.

[7] Ikeuchi M, Tsutsui H, Shiomi T, et al. Inhibition of TGF-beta signaling exacerbates early cardiac dysfunction but prevents late remodeling after infarction [J]. Cardiovasc Res, 2004, 64(3): 526-35.

[8] Bujak M, Frangogiannis NG. The role of TGF-beta signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling [J]. Cardiovasc Res, 2007, 74(2): 184-95.

[9] Gailhouste L, Gomez-Santos L, Ochiya T. Potential applications of miRNAs as diagnostic and prognostic markers in liver cancer [J]. Front Biosci (Landmark Ed), 2013, 18: 199-223.

[10] Lall S, Grun D, Krek A, et al. A genome-wide map of conserved microRNA targets in C. elegans [J]. Curr Biol, 2006, 16(5): 460-71.

[11] Olivetti G, Capasso JM, Meggs LG, et al. Cellular basis of chronic ventricular remodeling after myocardial infarction in rats [J]. Circ Res, 1991, 68(3): 856-69.

[12] 郝玉明, 朱文玲. 心肌梗死后的心室重构[J]. 中华心血管病杂志, 2005(02): 96-97.

[13] Nana-Sinkam SP, Croce CM. Clinical applications for microRNAs in cancer [J]. Clin Pharmacol Ther, 2013, 93(1): 98-104.

[14] Tijsen AJ, Creemers EE, Moerland PD, et al. MiR423-5p as a circulating biomarker for heart failure [J]. Circ Res, 2010, 106(6): 1035-9.

[15] Wang GK, Zhu JQ, Zhang JT, et al. Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans [J]. Eur Heart J, 2010, 31(6): 659-66.

[16] JOHNS TN, OLSON BJ. Experimental myocardial infarction. I. A method of coronary occlusion in small animals [J]. Ann Surg, 1954, 140(5): 675-82.51

[17] Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fishbein MC, et al. Myocardial infarct size and ventricular function in rats [J]. Circ Res, 1979, 44(4): 503-12.

[18] Chen M, Masaki T, Sawamura T. LOX-1, the receptor for oxidized low-density lipoprotein identified from endothelial cells: implications in endothelial dysfunction and atherosclerosis [J]. Pharmacol Ther, 2002, 95(1): 89-100.

[19] Groenning BA, Nilsson JC, Sondergaard L, et al. Antiremodeling effects on the left ventricle during beta-blockade with metoprolol in the treatment of chronic heart failure [J]. J Am Coll Cardiol, 2000, 36(7): 2072-80.

[20] 修萍, 董玉珠等. 急性心肌梗死治疗的现状[J]. 中国急救医学, 2009(06): 56-59.

[21] Movahed MR, Butman SM. The pathogenesis and treatment of no-reflow occurring during percutaneous coronary intervention [J]. Cardiovasc Revasc Med, 2008, 9(1): 56-61.

[22] Christenson RH. Preamble: National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines for utilization of biomarkers in acute coronary syndromes and heart failure [J]. Clin Biochem, 2008, 41(4-5): 208-9.

[23] Mehta JL, Sanada N, Hu CP, et al. Deletion of LOX-1 reduces atherogenesis in LDLR knockout mice fed high cholesterol diet [J]. Circ Res, 2007, 100(11): 1634-42.

[24] Wang R, Li N, Zhang Y, et al. Circulating microRNAs are promising novel biomarkers of acute myocardial infarction [J]. Intern Med, 2011, 50(17): 1789-95.

[25] Zile MR, Mehurg SM, Arroyo JE, et al. Relationship between the temporal profile of plasma microRNA and left ventricular remodeling in patients after myocardial infarction [J]. Circ Cardiovasc Genet, 2011, 4(6): 614-9.

[26] Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, et al. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (2) [J]. N Engl J Med, 1992, 326(5): 310-8.

[27] Long G, Wang F, Duan Q, et al. Circulating miR-30a, miR-195 and let-7b associated with acute myocardial infarction [J]. PLoS One, 2012, 7(12): e50926.

[28] Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, et al. Third universal definition of myocardial infarction [J]. Eur Heart J, 2012, 33(20): 2551-67.

[29] Schmidt M, Jacobsen JB, Lash TL, et al. 25 year trends in first time hospitalisation for acute myocardial infarction, subsequent short and long term mortality, and the prognostic impact of sex and comorbidity: a Danish nationwide cohort study [J]. BMJ, 2012, 344: e356.

[30] Vamos EP, Millett C, Parsons C, et al. Nationwide study on trends in hospital admissions for major cardiovascular events and procedures among people with and without diabetes in England, 2004-2009 [J]. Diabetes Care, 2012, 35(2): 265-72.

[31] Windhausen F, Hirsch A, Sanders GT, et al. N-terminal pro-brain natriuretic peptide for52

Additional risk stratification in patients with non-ST-elevation acute coronary syndrome and an elevated troponin T: an Invasive versus Conservative Treatment in Unstable coronary Syndromes (ICTUS) substudy [J]. Am Heart J, 2007, 153(4): 485-92.

[32] Rogers WJ, Frederick PD, Stoehr E, et al. Trends in presenting characteristics and hospital mortality among patients with ST elevation and non-ST elevation myocardial infarction in the National Registry of Myocardial Infarction from 1990 to 2006 [J]. Am Heart J, 2008, 156(6): 1026-34.

[33] Chan D, Ng LL. Biomarkers in acute myocardial infarction [J]. BMC Med, 2010, 8: 34.

[34] Jernberg T, Johanson P, Held C, et al. Association between adoption of evidence-based treatment and survival for patients with ST-elevation myocardial infarction [J]. JAMA, 2011, 305(16): 1677-84.

[35] Adams JR, Abendschein DR, Jaffe AS. Biochemical markers of myocardial injury. Is MB

Creatine kinase the choice for the 1990s[J]. Circulation, 1993, 88(2): 750-63.

[36] Scirica BM. Acute coronary syndrome: emerging tools for diagnosis and risk assessment [J]. J Am Coll Cardiol, 2010, 55(14): 1403-15.

[37] Ndrepepa G, Kastrati A. Bleeding complications in patients undergoing percutaneous coronary interventions: current status and perspective [J]. Coron Artery Dis, 2012.

[38] Apple FS, Collinson PO. Analytical characteristics of high-sensitivity cardiac troponin assays [J]. Clin Chem, 2012, 58(1): 54-61.

[39] Mousavi N, Czarnecki A, Kumar K, et al. Relation of biomarkers and cardiac magnetic resonance imaging after marathon running [J]. Am J Cardiol, 2009, 103(10): 1467-72.

[40] Wilson SR, Sabatine MS, Braunwald E, et al. Detection of myocardial injury in patients with unstable angina using a novel nanoparticle cardiac troponin I assay: observations from the PROTECT-TIMI 30 Trial [J]. Am Heart J, 2009, 158(3): 386-91.

[41] Venge P, Johnston N, Lindahl B, et al. Normal plasma levels of cardiac troponin I measured by the high-sensitivity cardiac troponin I access prototype assay and the impact on the diagnosis of myocardial ischemia [J]. J Am Coll Cardiol, 2009, 54(13): 1165-72.

[42] Eggers KM, Oldgren J, Nordenskjold A, et al. Diagnostic value of serial measurement of cardiac markers in patients with chest pain: limited value of adding myoglobin to troponin I for exclusion of myocardial infarction [J]. Am Heart J, 2004, 148(4): 574-81.

[43] Eggers KM, Venge P, Lindahl B. High-sensitive cardiac troponin T outperforms novel diagnostic biomarkers in patients with acute chest pain [J]. Clin Chim Acta, 2012, 413(13-14): 1135-40.

[44] Lin S, Yokoyama H, Rac VE, et al. Novel biomarkers in diagnosing cardiac ischemia in the53

Emergency department: a systematic review [J]. Resuscitation, 2012, 83(6): 684-91.

[45] Apple FS, Smith SW, Pearce LA, et al. Assessment of the multiple-biomarker approach for diagnosis of myocardial infarction in patients presenting with symptoms suggestive of acute coronary syndrome [J]. Clin Chem, 2009, 55(1): 93-100.

[46] McCann CJ, Glover BM, Menown IB, et al. Novel biomarkers in early diagnosis of acute myocardial infarction compared with cardiac troponin T [J]. Eur Heart J, 2008, 29(23): 2843-50.

[47] Heidenreich PA, Alloggiamento T, Melsop K, et al. The prognostic value of troponin inpatients with non-ST elevation acute coronary syndromes: a meta-analysis [J]. J Am Coll Cardiol, 2001, 38(2): 478-85.

[48] Lindahl B, Diderholm E, Lagerqvist B, et al. Mechanisms behind the prognostic value of troponin T in unstable coronary artery disease: a FRISC II substudy [J]. J Am Coll Cardiol, 2001, 38(4): 979-86.

[49] James SK, Oldgren J, Lindback J, et al. An acute inflammatory reaction induced by myocardial damage is superimposed on a chronic inflammation in unstable coronary artery disease [J]. Am Heart J, 2005, 149(4): 619-26.

[50] Lindahl B, Lindback J, Jernberg T, et al. Serial analyses of N-terminal pro-B-type natriuretic peptide in patients with non-ST-segment elevation acute coronary syndromes: a Fragmin and fast Revascularisation during In Stability in Coronary artery disease (FRISC) -II substudy [J]. J Am Coll Cardiol, 2005, 45(4): 533-41.

[51] Correia LC, Esteves JP. C-Reactive protein and outcomes in acute coronary syndromes: a systematic review and meta-analysis [J]. Arq Bras Cardiol, 2011, 97(1): 76-85.

[52] He LP, Tang XY, Ling WH, et al. Early C-reactive protein in the prediction of long-term outcomes after acute coronary syndromes: a meta-analysis of longitudinal studies [J]. Heart, 2010, 96(5): 339-46.

[53] James SK, Armstrong P, Barnathan E, et al. Troponin and C-reactive protein have different relations to subsequent mortality and myocardial infarction after acute coronary syndrome: a GUSTO-IV substudy [J]. J Am Coll Cardiol, 2003, 41(6): 916-24.

[54] Hall C. Essential biochemistry and physiology of (NT-pro) BNP [J]. Eur J Heart Fail, 2004, 6(3): 257-60.

[55] Baxter GF. Natriuretic peptides and myocardial ischaemia [J]. Basic Res Cardiol, 2004, 99(2): 90-3.

[56] James SK, Lindahl B, Siegbahn A, et al. N-terminal pro-brain natriuretic peptide and other risk markers for the separate prediction of mortality and subsequent myocardial infarction in patients54

With unstable coronary artery disease: a Global Utilization of Strategies To Open occluded arteries (GUSTO) -IV substudy [J]. Circulation, 2003, 108(3): 275-81.

[57] Wiviott SD, de Lemos JA, Morrow DA. Pathophysiology, prognostic significance and clinical utility of B-type natriuretic peptide in acute coronary syndromes [J]. Clin Chim Acta, 2004, 346(2): 119-28.

[58] Jernberg T, Stridsberg M, Venge P, et al. N-terminal pro brain natriuretic peptide on admission for early risk stratification of patients with chest pain and no ST-segment elevation [J]. J Am Coll Cardiol, 2002, 40(3): 437-45.

[59] Kilic T, Oner G, Ural E, et al. Comparison of the long-term prognostic value of cystatin C to other indicators of renal function, markers of inflammation and systolic dysfunction among patients with acute coronary syndrome [J]. Atherosclerosis, 2009, 207(2): 552-8.

[60] Garcia AJ, Gonzalez-Babarro E, Grigorian SL, et al. Cystatin C provides more information than other renal function parameters for stratifying risk in patients with acute coronary syndrome [J]. Rev Esp Cardiol, 2009, 62(5): 510-9.

[61] Wollert KC, Kempf T, Peter T, et al. Prognostic value of growth-differentiation factor-15 in patients with non-ST-elevation acute coronary syndrome [J]. Circulation, 2007, 115(8): 962-71.

[62] Eggers KM, Kempf T, Venge P, et al. Improving long-term risk prediction in patients with acute chest pain: the Global Registry of Acute Coronary Events (GRACE) risk score is enhanced by selected nonnecrosis biomarkers [J]. Am Heart J, 2010, 160(1): 88-94.

[63] Schaub N, Reichlin T, Twerenbold R, et al. Growth differentiation factor-15 in the early diagnosis and risk stratification of patients with acute chest pain [J]. Clin Chem, 2012, 58(2): 441-9.

[64] Adlbrecht C, Hulsmann M, Strunk G, et al. Prognostic value of plasma midregionalpro-adrenomedullin and C-terminal-pro-endothelin-1 in chronic heart failure outpatients [J]. Eur J Heart Fail, 2009, 11(4): 361-6.

[65] Li PF, Pan Q, Li DG, et al. Relationship between miRNA-499 and mortality in patients with unstable coronary artery disease: effects of an early invasive or noninvasive strategy [J]. JAMA, 2006, 286(17): 2107-13.

[66] Dhillon OS, Khan SQ, Narayan HK, et al. Prognostic value of mid-regional pro-adrenomedullin levels taken on admission and discharge in non-ST-elevation myocardial infarction: the LAMP (Leicester Acute Myocardial Infarction Peptide) II study [J]. J Am Coll Cardiol, 2010, 56(2): 125-33.

[67] Lindahl B, Venge P, Wallentin L. Troponin T identifies patients with unstable coronary artery disease who benefit from long-term antithrombotic protection. Fragmin in Unstable Coronary55

Artery Disease (FRISC) Study Group [J]. J Am Coll Cardiol, 1997, 29(1): 43-8.

[68] Heeschen C, Hamm CW, Goldmann B, et al. Troponin concentrations for stratification of patients with acute coronary syndromes in relation to therapeutic efficacy of tirofiban. PRISM Study Investigators. Platelet Receptor Inhibition in Ischemic Syndrome Management [J]. Lancet, 1999, 354(9192): 1757-62.

[69] Morrow DA, Cannon CP, Rifai N, et al. Ability of minor elevations of troponins I and T to predict benefit from an early invasive strategy in patients with unstable angina and non-ST elevation myocardial infarction: results from a randomized trial [J]. JAMA, 2001, 286(19): 2405-12.

[70] Hamm CW, Bassand JP, Agewall S, et al. [ESC guidelines for the management of acute

Coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. The Task Force for the management of acute coronary syndromes (ACS) in patients presenting without persistent ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC)] [J]. G Ital Cardiol (Rome), 2012, 13(3): 171-228.

[71] Lindmark E, Diderholm E, Wallentin L, et al. Relationship between interleukin 6 and mortality in patients with unstable coronary artery disease: effects of an early invasive or noninvasive strategy [J]. JAMA, 2001, 286(17): 2107-13.

[72] James SK, Lindback J, Tilly J, et al. Troponin-T and N-terminal pro-B-type natriuretic peptide predict mortality benefit from coronary revascularization in acute coronary syndromes: a GUSTO-IV substudy [J]. J Am Coll Cardiol, 2006, 48(6): 1146-54.

[73] Heidenreich PA, Alloggiamento T, Melsop K, McDonald KM, Go AS, Hlatky MA. The prognostic value of troponin in patients with non-ST elevation acute coronary syndromes: a meta-analysis. J Am Coll Cardiol 2001;38:478–85.

[74] Lindahl B, Toss H, Siegbahn A, Venge P, Wallentin L. Markers of myocardial damage and

Inflammation in relation to long-term mortality in unstable coronary artery disease. FRISC Study Group. Fragmin during Instability in Coronary Artery Disease. N Engl J Med 2000;343:1139–47.

[75] Lindahl B, Diderholm E, Lagerqvist B, Venge P, Wallentin L. Mechanisms behind the prognostic

Value of troponin T in unstable coronary artery disease: a FRISC II substudy. J Am Coll Cardiol 2001;38:979–86.

56

**miRNAs与心血管疾病研究进展**

黎镇赐（综述）陈敏生（审校）

（广州医科大学，广东广州，510182）

**摘要：**微小RNA（microRNAs, miRNAs, miRs）在心血管生物学与疾病领域中的作用越来越受到重视。MicroRNAs是一类长度约为22个核糖核苷酸的非编码内源性小单链RNAs分子，通过与靶基因mRNA不完全或完全互补结合，改变靶基因mRNA的稳定性，进而调节蛋白的合成速率。miRNA已被证明在心血管系统发生及多种病理生理过程中发挥至关重要的作用。因此被研究用于疾病的诊断、预测和治疗。但是，在临床应用之前仍存在许多障碍，有待进一步研究。本文就miRNA在心血管疾病中的研究进展加以综述。

**关键词：**miRNA；心血管疾病； 一； miRNAs 的表达与起源

microRNA（miRNA）是一类长度约为19-25nt的内源性非编码RNA，广泛参与基因转录后调控活动，其中多数miRNA具有高度序列保守性、表达时序性和组织特异性[1, 2]。最近的研究表明[3]miRNA参与各种各样的调节途径，包括发育、病毒防御、造血过程、器官形成、细胞增殖和凋亡、脂肪代谢等，具有重要的基因表达调控作用[3]。在动物细胞中，miRNA首先在细胞核内转录出较长的初级miRNA（primary miRNA, pri-miRNA），然后在核内由Drosha加工成60~70个核苷酸的发夹状RNA，即前体miRNA（miRNA precusor, pre-miRNA），在Exprotin-5复合物的帮助下被转运出胞核，在胞浆中由Dicer剪切成为成熟miRNA，随即被整合进RNA沉默复合物

（RISC）中，基于与mRNA完全或不完全配对来调节基因表达[4, 5]。miRNA与靶

mRNA不完全互补，可导致miRNA在蛋白质翻译水平上抑制靶基因表达（哺乳动物中比较普遍）。miRNA也有可能影响mRNA的稳定性。如果miRNA与靶位点完全互补（或者几乎完全互补），那么这些miRNA的结合往往引起靶mRNA的降解（在植物中比较常见）。通过这种机制作用的miRNA的结合位点通常都在mRNA的编码区或开放阅读框中。每个miRNA可以有多个靶基因，而几个miRNAs也可以调节同一个基因[6, 7]。表观遗传是指在核酸序列水平上不涉及基因组改变的遗传变化。最近研究发现表明，miRNA影响基因启动子的CpG岛甲基化作用，在转录水平直接对靶基因进行调控作用。基于以上多种方式的调控作用构成了复杂的调控网络，既可

57

以通过一个miRNA来调控多个基因的表达，也可以通过几个miRNA的组合来精细调控某个基因的表达[8]。

**二miRNAs作为心脏疾病生物学标志物的研究**

microRNA与很多心脏疾病相关，但是，microRNA的功能远不止这些，另有一些新功能被陆续报道. miR-1, miR-133，miR-208b，miR-499是心肌和骨骼肌特异表达的microRNA，而miR-208a仅特异表达于心肌中[9]。这些microRNA在心脏发育过程中均起到重要的作用。心脏是哺乳动物在胚胎发育时期最早形成的器官，其发育过程受到精确的调控。microRNA作为一种新的调控因子，在心脏的发育过程中起到了至关重要的作用。

冠状动脉疾病（CAD）是在发达国家和发展中国家都面临的一个非常常见的健康问题。急性心肌梗死（AMI）是全世界死亡的主要原因之一。急性心肌梗死的迅速和正确的诊断对疾病的治疗和预后起着重要作用。在过去的二十年里，在早期诊断急性心肌梗死以及疾病的治疗和预后方面已经取得巨大的进步，尤其是在急性心肌梗死相关的生物标志物方面的进展引起了极大的关注[10]。目前，心肌肌钙蛋白在临床实践中是用于确诊急性心肌梗死最常见的生物标志物。然而，临床上仍然需要新颖的生物标志物，使患者入院后可以立即确诊或排除AMI。微小RNA（miRNA）似乎是急性心肌梗死早期诊断中最有希望的新的生物标志物[11]。在过去的几年中，

miRNA在组织中的表达水平失调已经被证明和心脏疾病相关联。除了在组织中的表达变化，最近的研究已表明，miRNA在血清、血浆、尿液和其他体液中可被检测[12]。在AMI、急性冠脉综合征（ACS），稳定型冠状动脉疾病，心力衰竭、冠状动脉粥样硬化、心律失常、心肌病和心肌肥大等病理状态下循环miRNA的浓度都会发生改变，循环miRNAs作为诊断急性心肌梗死潜在的新型生物标志物被寄予厚望。

miRNA是内源性的非编码小单链RNA（约22个核苷酸），是通过结合于3'非翻译区的靶mRNA（非编码区），调节转录后基因的表达[13]。当miRNA完全结合到其靶mRNA，靶mRNA的降解将被启动。miRNA参与多种生物过程，如增殖、迁移、分化、分泌、兴奋、传导、细胞周期、衰老和凋亡。

虽然最近研究表明在血清或血浆中循环的miRNA可被检测到，但循环miRNA的来源仍然未最终确定。许多研究报道，循环miRNA的一个可能的来源是不同类型细胞主动分泌miRNA。肥大细胞和鞘磷脂酶2（nSMase2），神经酰胺的生物合成的

58

限速酶，控制外来体分泌miRNA至胞外基质[14, 15]。除了微泡或外来体，微粒和脂蛋白复合物（例如高密度脂蛋白复合物）是循环miRNA的其他可能来源。

微粒比质膜来源的外来体较大，miRNA积极控制单元通信过程[16]。高密度脂蛋白（HDL）运输内源性的miRNA，并提供给受体细胞，具有除了其作为多余的细胞内胆固醇运载工具的基本角色功能的定位功能。有趣的是，正常人的人HDL-miRNA与家族性高胆固醇血症受试者显著不同。与正常人相关的HDL-miRNA是HSA-MIR-135A，HSA-MIR-188-5P，和HSA-MIR-877，而家族性高胆固醇血症高密度脂蛋白胆固醇的miRNA是HSA-MIR-223, hsa-miR-105和hsa-mir-106a[17, 18]。因此，人类的HDL不仅运输内源性的miRNA，而且还可以在不同的条件下显示不同的功能和充当基因调控和细胞间沟通的角色。血浆和血清中循环miRNA的检测表明，miRNA可能在细胞以外履行生物学功能，可作为疾病的潜在生物标志物[19]。

从血浆中分离的人类miRNA在沸水和具有非常高或低pH值的溶液中高度稳定。当它经受长时间的室温孵育或冻融多次，血浆miRNA水平仍保持稳定[20, 21]。外源

miRNA的等离子体是不稳定和容易受到迅速降解的，而原生循环miRNA是稳定的，耐RNase活性[22]。循环miRNA能够形成蛋白质-复合物（如核仁RNA结合蛋白，核磷蛋白1），以抵抗降解[23]。

**三外周血miRNAs与冠状动脉粥样硬化性心脏病（CAD）**

快速正确诊断对急性心肌梗死的治疗和预后非常重要。到目前为止，心肌肌钙蛋白和肌酸激酶-MB是最常用的AMI生物标志物，但其临床价值在许多情况下受到限制。miRNA由心肌细胞分泌并在血液中积累，是心血管危险因素和各种病理状况的

指标，以反映心脏损伤[24, 25]。因此，外周血miRNA（s

如miR-208, miR-499和miR-133），

是AMI诊断和治疗的独特生物标记物[26, 27]。研究发现脑缺血再灌注的小鼠脑组织miR-497表达水平明显升高；缺氧复氧损伤的神经细胞miR-497表达水平同样增加，提示了miR-497可以调节细胞凋亡，其机制可能与调节相关的细胞凋亡信号通路有关[28]。目前miR-497在心肌梗死PCI术后的微循环再灌注并没有相关的研究。

miR-497在染色体的位置属于17号短臂的13.1（17p13.1）位置上，属于miR-497/195/15/424/16簇中的一员[29]。AGCAGC序列在该家族所有成员中的miRNA的5’端具有体现，且在人的组织中均为中丰度或者高丰度的表达。该类miRNA是高度保守的miRNA[30]。据文献以及我们的生物信息学分析，p5 基因可使改家族所以

59

miRNA的表达上调，此外，对于myc和启动子的甲基化可使其发生低表达[31]。这些正是该家族在细胞的分裂、代谢，以及血管生成和应激反应上均起着一定的作用。目前较多研究证实miR-195和miR-497所在的染色体位置的拷贝数减少或删除，以及CpG岛核苷酸（启动子上游）的DNA甲基化和等位基因缺失等现象均可以导致上述两种miRNA表达减少[32-34]。文献报道miRNA 497与包括肺癌、肝癌、乳腺癌、黑色素瘤、原发性腹膜癌在内的多种肿瘤具有一定相关性[35-38]。另外，研究[28]还发现此miRNA与神经退行性疾病和缺血性疾病，如脑血管硬化或局部缺血等症状的发生密切相关。

microRNA在缺血性脑卒中生物学病原和病理两方面作为转录后基因沉默的关键调节子。在缺血性脑卒中的病因中，miRNA有明显调节致病过程表达的模式，包括在动脉高血脂(miR-125a-5p和miR-33)，斑块破裂(miR-210和miR-222)，粥样硬化(miR-126和miR-21)，高血压(miR-155)｡随着病灶脑缺血，miRNA转录组发生明显改变，在病理性的级联事件中独立于miRNA表达机制的包括血脑屏障破坏(miR-15a)和细胞凋亡蛋白酶介导的细胞死亡信号(miR-497)[39]，说明microRNA在缺血性脑卒中具有重要作用，也为其提供了潜在的基因治疗策略。

miR-208是心脏组织损伤时心脏富含的小分子RNA。它也参与应激，激素，电刺激心肌细胞[40, 41]。在心脏发育中，miR-208主要作用于肌球蛋白重链[42]。已经报道了异丙肾上腺素诱导的大鼠心肌损伤模型中血浆miR-208水平显著增加。但是这种现象在肾损伤后没有观察到，这表明血浆miR-208特异于心肌损伤[43]。

通过微阵列分析中，miR-208a是确定表达于人类心脏。miR-208a在健康人或非急性心肌梗死患者（如患者出现急性肾损伤，慢性肾功能衰竭，中风或创伤）的血浆检测不到，但它很容易在90.9％急性心肌梗死患者和100％的急性心肌梗死患者胸痛发作4小时检测到，同时cTnI水平仍未受影响，表明miRNA的可能表达于在心肌损伤的早期阶段（肌钙蛋白的生物学峰〜AMI后18 小时）[44-46]。



有趣的是，循环的miR-208a的急性心肌梗死的升高可能在成年小鼠持续性，但不会在人。一种可能的解释这种现象可能是由于人类和老鼠之间的不同的miRNA表达模式。miR-208a 是一个内含子编码的α -心肌肌球蛋白重链基因（MYH6），而miR-208b是miR-208的关系密切的家庭成员，是一个内含子编码β-心肌肌球蛋白重链基因（MYH7）[47]。高度存在于小鼠的miR-208a和miR-208b有同源性，但不能

60

在人。这很可能是AMI后的miR-208a的血浆水平持续升高，干扰miR-208b的表达

[48]。

急性ST段抬高心肌梗死（STEMI）患者，与12名健康对照相比，血浆的miR-208b的水平增加3, 000倍。miR-208b的峰值与肌钙蛋白I（cTnI水平）和射血分数有较好的相关性，说明循环的miR-208b可作为生物标志物在STEMI的诊断或在长期的并发症中应用[49]。在AMI患者，与健康受试者相比，等离子的miR-208b增加1600倍。miR-208b的血浆水平的变化与血浆肌钙蛋白-T的一致[50]。然而，它不是支持所有的miR-208作为生物标志物用于急性心肌梗塞的研究。Adachi等报道称，AMI患者循环的miR-208b的水平较低，但是一个非常有用的血浆生物标志物诊断AMI[51]。另一项研究最近表明，循环的miR-208b的可能被用来作为生物标志物用于急性心肌梗死，但它并没有显示过任何的cTnT优势，为急性心肌梗死的诊断[52]。

编码的miR-499基因嵌入一个心室特异性肌球蛋白重链基因，这是几乎完全体现在心脏以内[53, 54]。miR-499的血浆水平在所有急性心肌梗死患者明显增加。这些结果表明，循环的miR-499可能是AMI的标志[55, 56]。已经证实了miR-499的血浆水平与健康对照相比，在急性STEMI或AMI增加250倍或100倍。ROC曲线分析显示0.92的曲线，这是与循环cTnT相关的下一个区域。AMI患者胸痛<3小时有93％患者miR-499阳性，而HS-cTnT阳性率是88％，这表明了miR-499是一个敏感的和新颖的生物标志物的急性心肌梗死[57, 58]。然而，从Li等人的研究ROC曲线分析结果显示，miR-499与cTnT相比，对急性心肌梗死的诊断没有优势。

循环miR-499的家庭成员中miR-499-5p在急性非ST段抬高心肌梗死（NSTEMI）老年患者与健康人相比，增幅超过80倍。ROC曲线分析发现，miR-499-5p的诊断准确性明显高于TNT。因此，循环中的miR-499-5p的是一个潜在的生物标志物，在急性NSTEMI老年患者中，其精度优于传统的cTnT。最近一项研究证实了心肌梗死患者miR-499-5p高表达，并与左室射血分数值呈负相关，提示循环的miR-499-5p的可能被用于死亡风险[59-61]。

在大鼠急性心肌梗死模型中，miR-133a的血浆水平在1-3 小时升高，最高时3-12小时，并冠状动脉结扎后在12-24ħ降低。在急性心肌梗死患者中，miR-133的血浆水平高于健康对照。血浆的miR-133和cTNI水平之间有正相关。这些结果提供的证据表明了miR-133是一种强大的生物标志物用于急性心肌梗死的诊断[62]。然而，在







61

一份报告中的miR-133的血浆水平在AMI患者和健康人之间没有显著差异[63]。急性心肌梗死患者快速性心律失常和缓慢性心律失常相比，循环miR-133无显著变化。急性STEMI患者血浆中miR-133A和miR-133b上调。与此相反，急性后肢缺血患者循环的miR-133a的水平没有显著变化[64, 65]。

在冠状动脉结扎引起的急性心肌梗死大鼠模型中，AMI后的峰值6 h血清miR-1的水平增加了200倍，AMI 3天后miR-1水平恢复到基础水平，其显示与心肌梗死面积很强的正相关关系[66]。在临床研究中，AMI患者与健康人比较，循环的miR-1的水平增加了近100倍，显示出与血清肌酸激酶同工酶（CK-MB）水平呈正相关[67]。在另一项独立的临床研究中，AMI患者血浆中miR-1的水平显著高于非AMI，血浆miR-1增加的患者与年龄，性别，高血压，糖尿病，或其他既定的生物标志物，包括急性心肌梗死cTnI和CK-MB相关[68]。此外，在培养的心肌细胞的坏死模型中，miR-1被发现被释放到培养基中，并保持稳定至少24小时。总的来说，这些结果有力地支持了循环的miR-1可能是一个诊断AMI新的敏感生物标志物[69]。



**四急性心肌梗死后血清miRNAs改变**

急性心肌梗死后循环miRNA的变化是由于心脏损伤，释放的miRNA进入血液。在最近的研究中，急性心肌梗死患者外周血全血样本的全基因组miRNA表达进行了分析，其中miR-30C和miR-145水平梗死面积中高表达，20个miRNA的被证明可预测急性心肌梗塞，甚至有更高效率（特异性为96％，灵敏度90％，准确度93％）

[70, 71]。这些结果表明，从外周血细胞的miRNA的特征也可以作为一种新型的、灵敏的生物标记物对于急性心肌梗塞的诊断。

miR-126在人内皮细胞中特异性高表达。它在血管生成中有潜在作用，并在血管内皮稳态和血管完整性有调节作用[72, 73]。在AMI患者与健康受试者相比，循环血浆的miR-126显著下调，miR-126的血浆浓度与血清cTnI相关。到目前为止，越来越多的循环的miRNA（心源性或非心脏起源）是AMI的潜在生物标志物。至少有13个miRNA被报告为AMI的潜在生物标志物。其中，心肌特异性的miRNA（如miR-208, miR-499, miR-133和miR-1）引起了更多的关注[74, 75]。miR-208和miR-499仅在心脏检测到，而miR-133和miR-1在两种骨骼肌和心肌高表达。在王等人的研究中，他们研究了miR-208, miR-499, miR-133和miR-1在急性心肌梗死患者和AMI大鼠模型的血浆水平，结果显示miR-208是一种诊断AMI更可靠的生物标志物[76]。

62

然而，在DEVAUX等人的研究表明，检测心肌损伤的循环的miR-499明显优于的miR-208[77]。因此，需要进一步研究，以确定miR-208或miR-499是诊断急性心肌梗死最有潜力的生物标记物。

AMI患者发生HF常在起病1周内出现，目前认为其基本机理之一是心室重构

[78], miRNAs参与心脏的病理重构过程，它通过调节参与适应性和适应不良性的心室重塑的基因表达而调节心脏重构，进而导致HF的发生。Li等[79]发现胸主动脉缩窄诱导心肌肥大的小鼠及神经钙蛋白转基因小鼠中有21种miRNA表达上调，7 种

miRNA 下调。过表达上调或下调的miRNA，心肌细胞发生肥大或体积减小，揭示

miRNA在心肌肥厚中的重要角色。MI是病理性重构的重要病因，Van Rooij等[43]发现心梗后心衰患者在心梗边缘区和远离心梗区均有miRNA-29显著下调。miRNA-29在心肌成纤维细胞内优先表达，很多细胞外基质蛋白如原纤维蛋白-l、胶原蛋白是miRNA-29的靶标。如果能从基因水平阻断心肌重构的进程，有望减少心衰的发生。心梗后血运重建对心肌的修复也很重要，这需要多种促血管生成因子如血管内皮细胞生长因子(VEGF)、成纤维细胞生长因子(FGF)、血管平滑肌细胞(VSMC)等参与[80]。miRNA-126是内皮细胞特异性miRNA，在缺血刺激下，通过增强VEGF和FGF的下游信号细胞分裂素活化蛋白激酶的作用诱发血管生成[81]。心肌缺氧时miR-21表达降低，引起Fas配体和10号染色体上缺失的磷酸酶与张力蛋白同源物升高，进而诱导细胞凋亡，促发HF，这一过程可以因丝氨酸/苏氨酸激酶(AKT)的激活而被逆转：

AKT激活时上调miR-21，后者通过抑制caspase 8活性和线粒体损伤减少细胞凋亡

[82]. 另有研究表明，miR-21通过调控程序性细胞死亡4基因减少过氧化氢诱导的心肌细胞凋亡，因而可以减轻心衰时活性氧引起的细胞损伤，抑制凋亡的发生[83]。在应激状态下miR-208通过抑制靶基因甲状腺素受体相关蛋白1的表达，调控心肌肥厚、纤维化的表达。有研究显示，miR-1可以作用于胰岛素样生长因子1基因的3＇UTR，降低后者表达水平，引起线粒体功能下降、细胞色素C释放，促进细胞凋亡

[84]。

心肌细胞纤维化是MI 后HF 的一个重要病理生理过程，结缔组织生长因子

（CTGF）是纤维化过程中的一个重要分子。研究显示，miR-133和miR-30可以直接下调CTGF水平，调控心肌细胞外基质结构改变。敲除这两种miRNA可引起CTGF的水平升高，而高表达的miR-133、miR-30能够降低CTGF水平，减少胶原纤维生

63

成。该研究显示，CTGF基因的3＇UTR是miR-133和miR-30的直接作用靶点[85]。**五总结和展望**

综上所述，血清miRNAs具有抗内源性核糖核酸酶活性，并且可以非常稳定存在于人血浆或血清。到现在为止，约有20种miRNA被认为是急性心肌梗死的潜在生物标志物。然而，大多数的研究结果是基于相对较小的样本，从而导致不同的研究之间存在许多分歧。因此，有必要进行大型队列研究，以确定这些循miRNA与急性心肌梗死诊断之间的关系[86]。到目前为止，大多数研究侧重于miRNAs作为生物标志物对于诊断急性心肌梗死的作用。对于急性心肌梗死循环miRNA的预后影响的信息仍然在很大程度上的缺乏。实际上，作为理想的生物标志物，它对急性心肌梗死的预后也是应有重要作用。最近，我们发现miR-208B，miR-499, miR-149和miR-424的血浆水平在急性心肌梗死患者显著升高。其中，miR-208B，miR-499和miR-424在经皮冠状动脉介入治疗（PCI）后迅速下降，这表明了miR-208B，miR-499和miR-424可能是急性心肌梗死的预后潜在的生物标志物[87, 88]。寻求特定的miRNA在急性心肌梗死诊断以及预后中的潜在价值是一个可能的未来发展方向。

冠心病的发生发展与基因表达密切相关，miRNAs作为冠心病发生发展乃至预后的监测指标，是冠心病发生、发展基因调控网络中的关键一员。心力衰竭是各种心脏疾病的终末期表现，其发病率逐年增加，而MI后HF是临床心衰最常见的类型。同时，miRNAs与AMI后HF密切相关，可为MI后HF提供重要的诊断和预后信息，可望成为预测MI后HF早期的生化标志物。但是寻找miRNAs的靶基因，评价治疗因子稳定性及增强治疗因子效果仍是miRNAs研究领域面临的主要问题。相信随着对miRNAs了解的不断深入，以miRNAs为靶点设计药物，进行心脏疾病靶向治疗，将为人类征服MI后HF开辟一条光明的新途径。

参考文献**:**

[1] Ola MS, Nawaz M, Ahsan H. Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis [J]. Mol Cell Biochem, 2011, 351(1-2): 41-58.

[2] Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium [J]. Circulation, 1986, 74(5): 1124-36.

[3] Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning [J]. Am J64

Physiol Heart Circ Physiol, 2003, 285(2): H579-88.

[4] 张国明, 苏绍萍, 王禹, 等. 大鼠心肌缺血后适应对p38丝裂原活化蛋白激酶及细胞凋亡的影响[J]. 中国医学科学院学报, 2010(05): 526-532+598.

[5] 张国明, 王禹, 李天德, 等. 应激活化蛋白激酶在大鼠缺血后适应中的变化及其对细胞凋亡影响的研究[J]. 浙江大学学报(医学版), 2009(06): 611-619.

[6] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. Cell, 2004, 116(2): 281-97.

[7] Pan ZW, Lu YJ, Yang BF. MicroRNAs: a novel class of potential therapeutic targets forcardiovascular diseases [J]. Acta Pharmacol Sin, 2010, 31(1): 1-9.

[8] van Rooij E. Introduction to the series on microRNAs in the cardiovascular system [J]. Circ Res, 2012, 110(3): 481-2.

[9] Mendell JT, Olson EN. MicroRNAs in stress signaling and human disease [J]. Cell, 2012, 148(6): 1172-87.

[10] Abdellatif M. Differential expression of microRNAs in different disease states [J]. Circ Res, 2012, 110(4): 638-50.

[11] Creemers EE, Tijsen AJ, Pinto YM. Circulating microRNAs: novel biomarkers and extracellular communicators in cardiovascular disease[J]. CircRes, 2012, 110(3): 483-95.

[12] Latronico MV, Catalucci D, Condorelli G. Emerging role of microRNAs in cardiovascular biology [J]. Circ Res, 2007, 101(12): 1225-36.

[13] Eltzschig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation [J]. Nat Med, 2011, 17(11): 1391-401.

[14] Buja LM. Myocardial ischemia and reperfusion injury [J]. Cardiovasc Pathol, 2005, 14(4): 170-5.

[15] van Rooij E, Purcell AL, Levin AA. Developing microRNA therapeutics [J]. Circ Res, 2012, 110(3): 496-507.

[16] Abbate A, Bussani R, Amin MS, et al. Acute myocardial infarction and heart failure: role of apoptosis [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2006, 38(11): 1834-40.

[17] Monassier JP. Reperfusion injury in acute myocardial infarction: from bench to cath lab. Part II: Clinical issues and therapeutic options [J]. Arch Cardiovasc Dis, 2008, 101(9): 565-75.

[18] Munoz-Pinedo C. Signaling pathways that regulate life and cell death: evolution of apoptosis in the context of self-defense [J]. Adv Exp Med Biol, 2012, 738: 124-43.

[19] Liu XH, Zhang ZY, Sun S, et al. Ischemic postconditioning protects myocardium from ischemia/reperfusion injury through attenuating endoplasmic reticulum stress [J]. Shock, 2008, 30(4): 422-7.65

[20] Halestrap AP, Pasdois P. The role of the mitochondrial permeability transition pore in heart disease [J]. Biochim Biophys Acta, 2009, 1787(11): 1402-15.

[21] Ulivieri C. Cell death: insights into the ultrastructure of mitochondria [J]. Tissue Cell, 2010, 42(6): 339-47.

[22] Castanier C, Arnoult D. [Mitochondrial dynamics during apoptosis] [J]. Med Sci (Paris), 2010, 26(10): 830-5.

[23] Caroppi P, Sinibaldi F, Fiorucci L, et al. Apoptosis and human diseases: mitochondrion damage and lethal role of released cytochrome C as proapoptotic protein [J]. Curr Med Chem, 2009, 16(31): 4058-65.

[24] Munoz-Pinedo C. Signaling pathways that regulate life and cell death: evolution of apoptosis in the context of self-defense [J]. Adv Exp Med Biol, 2012, 738: 124-43.

[25] Sevrioukova IF. Apoptosis-inducing factor: structure, function, and redox regulation [J]. Antioxid Redox Signal, 2011, 14(12): 2545-79.

[26] Guo CJ, Pan Q, Li DG, et al. miR-15b and miR-16 are implicated in activation of the rat hepatic stellate cell: An essential role for apoptosis [J]. J Hepatol, 2009, 50(4): 766-78.

[27] Martinou JC, Youle RJ. Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics [J]. Dev Cell, 2011, 21(1): 92-101.

[28] Yin KJ, Deng Z, Huang H, et al. miR-497 regulates neuronal death in mouse brain after transient focal cerebral ischemia [J]. Neurobiol Dis, 2010, 38(1): 17-26.

[29] Furuta M, Kozaki K, Tanimoto K, et al. The tumor-suppressive miR-497-195 cluster targets multiple cell-cycle regulatorsin hepatocellular carcinoma [J]. PLoS One, 2013, 8(3): e60155.

[30] Shen L, Li J, Xu L, et al. miR-497 induces apoptosis of breast cancer cells by targeting Bcl-w [J]. Exp Ther Med, 2012, 3(3): 475-480.

[31] Finnerty JR, Wang WX, Hebert SS, et al. The miR-15/107 group of microRNA genes: evolutionary biology, cellular functions, and roles in human diseases [J]. J Mol Biol, 2010, 402(3): 491-509.

[32] Li D, Zhao Y, Liu C, et al. Analysis of MiR-195 and MiR-497 expression, regulation and role in breast cancer [J]. Clin Cancer Res, 2011, 17(7): 1722-30.

[33] Guo ST, Jiang CC, Wang GP, et al. MicroRNA-497 targets insulin-like growth factor 1 receptor and has a tumour suppressive role in human colorectal cancer [J]. Oncogene, 2013, 32(15): 1910-20.

[34] Flavin RJ, Smyth PC, Laios A, et al. Potentially important microRNA cluster on chromosome 17p13.1 in primary peritoneal carcinoma [J]. Mod Pathol, 2009, 22(2): 197-205.

[35] Li D, Zhao Y, Liu C, et al. Analysis of MiR-195 and MiR-497 expression, regulation and66

Role in breast cancer [J]. Clin Cancer Res, 2011, 17(7): 1722-30.

[36] Yin KJ, Deng Z, Huang H, et al. miR-497 regulates neuronal death in mouse brain after transient focal cerebral ischemia [J]. Neurobiol Dis, 2010, 38(1): 17-26.

[37] Xie Y, Wei RR, Huang GL, et al. Checkpoint kinase 1 is negatively regulated by miR-497 in hepatocellular carcinoma [J]. Med Oncol, 2014, 31(3): 844.

[38] Zhao WY, Wang Y, An ZJ, et al. Downregulation of miR-497 promotes tumor growth and angiogenesis by targeting HDGF in non-small cell lung cancer [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 435(3): 466-71.

[39] Rink C, Khanna S. MicroRNA in ischemic stroke etiology and pathology [J]. Physiol Genomics, 2011, 43(10): 521-8.

[40] Liu L, Chen L, Xu Y, et al. microRNA-195 promotes apoptosis and suppresses tumorigenicity of human colorectal cancer cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 400(2): 236-40.

[41] Xu T, Zhu Y, Xiong Y, et al. MicroRNA-195 suppresses tumorigenicity and regulates G1/S transition of human hepatocellular carcinoma cells [J]. Hepatology, 2009, 50(1): 113-21.

[42] Busk PK, Cirera S. MicroRNA profiling in early hypertrophic growth of the left ventricle in rats [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 396(4): 989-93.

[43] van Rooij E, Sutherland LB, Liu N, et al. A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(48): 18255-60.

[44] Ghosh G, Subramanian IV, Adhikari N, et al. Hypoxia-induced microRNA-424 expression in human endothelial cells regulates HIF-alpha isoforms and promotes angiogenesis [J]. J Clin Invest, 2010, 120(11): 4141-54.

[45] Rosa A, Ballarino M, Sorrentino A, et al. The interplay between the master transcription factor PU.1 and miR-424 regulates human monocyte/macrophage differentiation [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(50): 19849-54.

[46] Yin KJ, Deng Z, Hamblin M, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor delta regulation of miR-15a in ischemia-induced cerebral vascular endothelial injury [J]. J Neurosci, 2010, 30(18): 6398-408.

[47] Pothof J, Verkaik NS, van IJcken W, et al. MicroRNA-mediated gene silencing modulates the UV-induced DNA-damage response [J]. EMBO J, 2009, 28(14): 2090-9.

[48] van Rooij E, Sutherland LB, Thatcher JE, et al. Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(35): 13027-32.

[49] Roy S, Khanna S, Hussain SR, et al. MicroRNA expression in response to murine myocardial67

Infarction: miR-21 regulates fibroblast metalloprotease-2 via phosphatase and tensin homologue [J]. Cardiovasc Res, 2009, 82(1): 21-9.

[50] White HD, Chew DP. Acute myocardial infarction [J]. Lancet, 2008, 372(9638): 570-84.

[51] Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, et al. Heart disease and stroke statistics--2011 update: a report from the American Heart Association [J]. Circulation, 2011, 123(4): e18-e209.

[52] Lindahl B. Acute coronary syndrome - the present and future role of biomarkers [J]. Clin Chem Lab Med, 2013, 51(9): 1699-706.

[53] Chim SS, Shing TK, Hung EC, et al. Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma [J]. Clin Chem, 2008, 54(3): 482-90.

[54] Wang GK, Zhu JQ, Zhang JT, et al. Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans [J]. Eur Heart J, 2010, 31(6): 659-66.

[55] Fichtlscherer S, De Rosa S, Fox H, et al. Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease [J]. Circ Res, 2010, 107(5): 677-84.

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

[57] Pan ZW, Lu YJ, Yang BF. MicroRNAs: a novel class of potential therapeutic targets for cardiovascular diseases [J]. Acta Pharmacol Sin, 2010, 31(1): 1-9.

[58] Tijsen AJ, Creemers EE, Moerland PD, et al. MiR423-5p as a circulating biomarker for heart failure [J]. Circ Res, 2010, 106(6): 1035-9.

[59] Baek D, Villen J, Shin C, et al. The impact of microRNAs on protein output [J]. Nature, 2008, 455(7209): 64-71.

[60] Skog J, Wurdinger T, van Rijn S, et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers [J]. Nat Cell Biol, 2008, 10(12): 1470-6.

[61] Small EM, Olson EN. Pervasive roles of microRNAs in cardiovascular biology [J]. Nature, 2011, 469(7330): 336-42.

[62] Camussi G, Deregibus MC, Bruno S, et al. Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication [J]. Kidney Int, 2010, 78(9): 838-48.

[63] Kosaka N, Iguchi H, Yoshioka Y, et al. Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells [J]. J Biol Chem, 2010, 285(23): 17442-52.

[64] Gilad S, Meiri E, Yogev Y, et al. Serum microRNAs are promising novel biomarkers [J]. PLoS One, 2008, 3(9): e3148.

[65] Hunter MP, Ismail N, Zhang X, et al. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles [J]. PLoS One, 2008, 3(11): e3694.68

[66] Chen X, Ba Y, Ma L, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases [J]. Cell Res, 2008, 18(10): 997-1006.

[67] Turchinovich A, Weiz L, Langheinz A, et al. Characterization of extracellular circulating microRNA [J]. Nucleic Acids Res, 2011, 39(16): 7223-33.

[68] Tsui NB, Ng EK, Lo YM. Stability of endogenous and added RNA in blood specimens, serum, and plasma [J]. Clin Chem, 2002, 48(10): 1647-53.

[69] Wang K, Zhang S, Weber J, et al. Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells [J]. Nucleic Acids Res, 2010, 38(20): 7248-59.

[70] Margulies KB. MicroRNAs as novel myocardial biomarkers [J]. Clin Chem, 2009, 55(11): 1897-9.

[71] Sayed AS, Xia K, Yang TL, et al. Circulating microRNAs: a potential role in diagnosis andprognosis of acute myocardial infarction [J]. Dis Markers, 2013, 35(5): 561-6.

[72] Callis TE, Pandya K, Seok HY, et al. MicroRNA-208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice [J]. J Clin Invest, 2009, 119(9): 2772-86.

[73] van Rooij E, Sutherland LB, Qi X, et al. Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA [J]. Science, 2007, 316(5824): 575-9.

[74] Ji X, Takahashi R, Hiura Y, et al. Plasma miR-208 as a biomarker of myocardial injury [J]. Clin Chem, 2009, 55(11): 1944-9.

[75] Malizia AP, Wang DZ. MicroRNAs in cardiomyocyte development [J]. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med, 2011, 3(2): 183-90.

[76] Gidlof O, Andersson P, van der Pals J, et al. Cardiospecific microRNA plasma levels correlate with troponin and cardiac function in patients with ST elevation myocardial infarction, are selectively dependent on renal elimination, and can be detected in urine samples [J]. Cardiology, 2011, 118(4): 217-26.

[77] Corsten MF, Dennert R, Jochems S, et al. Circulating MicroRNA-208b and MicroRNA-499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease [J]. Circ Cardiovasc Genet, 2010, 3(6): 499-506.

[78] Adachi T, Nakanishi M, Otsuka Y, et al. Plasma microRNA 499 as a biomarker of acute myocardial infarction [J]. Clin Chem, 2010, 56(7): 1183-5.

[79] Li YQ, Zhang MF, Wen HY, et al. Comparing the diagnostic values of circulating microRNAs and cardiac troponin T in patients with acute myocardial infarction [J]. Clinics (Sao Paulo), 2013, 68(1): 75-80.

[80] Cheng Y, Jiang S, Hu R, et al. Potential mechanism for endothelial progenitor cell therapy in acute myocardial infarction: Activation of VEGF- PI3K/Akte-NOS pathway [J]. Ann Clin Lab69

Sci, 2013, 43(4): 395-401.

[81] Devaux Y, Vausort M, Goretti E, et al. Use of circulating microRNAs to diagnose acute myocardial infarction [J]. Clin Chem, 2012, 58(3): 559-67.

[82] Olivieri F, Antonicelli R, Lorenzi M, et al. Diagnostic potential of circulating miR-499-5p in elderly patients with acute non ST-elevation myocardial infarction [J]. Int J Cardiol, 2013, 167(2): 531-6.

[83] Gidlof O, Smith JG, Miyazu K, et al. Circulating cardio-enriched microRNAs are associatedwith long-term prognosis following myocardial infarction [J]. BMC Cardiovasc Disord, 2013, 13: 12.

[84] Ai J, Zhang R, Li Y, et al. Circulating microRNA-1 as a potential novel biomarker for acutemyocardial infarction [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 391(1): 73-7.

[85] D'Alessandra Y, Devanna P, Limana F, et al. Circulating microRNAs are new and sensitive biomarkers of myocardial infarction [J]. Eur Heart J, 2010, 31(22): 2765-73.

[86] Mocharla P, Briand S, Giannotti G, et al. AngiomiR-126 expression and secretion from circulating CD34(+) and CD14(+) PBMCs: role for proangiogenic effects and alterations in type 2 diabetics [J]. Blood, 2013, 121(1): 226-36.

[87] De Rosa S, Fichtlscherer S, Lehmann R, et al. Transcoronary concentration gradients of circulating microRNAs [J]. Circulation, 2011, 124(18): 1936-44.

[88] Long G, Wang F, Duan Q, et al. Human circulating microRNA-1 and microRNA-126 as potential novel indicators for acute myocardial infarction [J]. Int J Biol Sci, 2012, 8(6): 811-8.

70

致**谢**

首先要衷心感谢我的导师陈敏生教授在这些年里给予我学业上的指导、生活上的关心！导师高尚的师德、严谨的科学态度、崇高的敬业精神、渊博的知识、忘我的工作精神、宽广的胸怀永远是我学习的榜样，也必将使我受益终生。从课题开始到完成，包括选题、实验设计、实验思路以及文章的撰写，都是我在导师的直接指导下克服困难，最终得以顺利完成。

衷心感谢广州市第一人民医院心内科罗义教授、曾冲主任、刘震主任、李韶南博士、黄建楷医师、吴天源医师、杨阳技师、检验科徐邦牢主任以及血液实验室杜庆华主任等在整个实验过程中给予的无私帮助！

衷心感谢广州医科大学研究生处黄钧裕、郭子强老师的帮助和支持！衷心感谢董颀老师、罗承锋博士、刘启才博士、周志衡老师、赵路

宁老师的指导和帮助，感谢陈爱兰、戴文君、区彩文、张建武、黄炯华、吴智业、邓菊等同门师兄弟的帮助和支持！谨向所有提及和未提及的关心和帮助我的老师、同学和朋友们致以最真挚的谢意和最美好的祝福。

最后，衷心感谢我的父母和妻子，是他们多年来无私的奉献、默默的支持才使我可以走到今天，梦想得以实现，有了他们的爱，有了他们的支持和鼓励，我才更加有信心，才能更加坚定地一直朝着自己的梦想前进！

博士生涯将成为我人生最宝贵的财富，感谢赐予我如此珍贵财富的每一个人！谢谢！

71

# 学位论文原创性声明

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。文中依法引用他人的成果、对本文的研究作出重要贡献的个人和集体，均已在文中做出明确标注或得到许可。论文内容未包含法律意义上已属于他人的任何形式的研究成果，也不包含本人已用于其他学位申请的论文或成果。

本人如违反上述声明，愿意承担以下责任和后果：1．交回学校授予的学位证书；

2．学校可在相关媒体上对作者本人的行为进行通报；

3．本人按照学校规定的方式，对因不当取得学位给学校造成的名誉损害，进行公开道歉。

4．本人负责因论文成果不实产生的法律纠纷。

论文作者签名：日期：年 月 日

# 学位论文知识产权权属声明

本人在导师指导下所完成的论文及相关的职务作品，知识产权归属广州医科大学及附属单位。广州医科大学及附属单位享有以任何方式发表、复制、公开阅览、借阅以及申请专利等权利。本人离校后发表或使用学位论文或与该论文直接相关的学术论文或成果时，署名单位仍然为广州医科大学及附属单位。任何其他收存和保管本论文的单位和个人，未经本论文作者、导师授权，不得将本论文转借他人、复制、抄录或以其他任何方式传播，否则，引起有碍作者的著作权益问题，将会追究相应的法律责任。

论文作者签名： 日期： 年 月 日

导师签名： 日期： 年 月 日

# 关于学位论文使用授权的说明

1、学校可以保留本学位论文的原件及复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或扫描等复印手段保存、汇编学位论文；

2、本人授权学校向国家有关部门或机构送交学位论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅。送交学位论文时间选择（请在下面相应栏内打“√”）：

①答辩后即可送：是否

②延迟一年后送：

③延迟二年后送：

④延迟三年后送：

论文作者签名： 日期： 年 月 日

导师签名： 日期： 年 月 日

72