

颈动脉粥样硬化性狭窄患者外周血 miRNA-210-5P 表达及其靶基因生物信息学分析

黄攀 徐敏 何晓英

【摘要】 目的 通过检测颈动脉粥样硬化性狭窄患者外周血 miRNA-210-5P 相对表达量,分析 miRNA-210-5P 及其靶基因功能。**方法** 选择 2015 年 7 月至 2018 年 9 月诊断明确的颈动脉粥样硬化性狭窄患者(CAS 组,146 例)作为观察对象,采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测不同处理组受试者外周血 miRNA-210-5P 相对表达量,并以 TargetScan 和 CoMeTa 数据库进行靶基因预测、DAVID 数据库进行靶基因功能富集分析(GO 分析)和 KEGG 信号通路分析。**结果** 与无颈动脉粥样硬化性狭窄患者或正常受试者(对照组,60 例)相比,CAS 组患者血清 miRNA-210-5P 相对表达量升高($t = 14.759, P = 0.000$)。其中,重度狭窄组(31 例; $q = 23.028, P = 0.000$)、中度狭窄组(53 例; $q = 6.657, P = 0.000$)、轻度狭窄组(62 例; $q = 42.612, P = 0.000$)患者外周血 miRNA-210-5P 相对表达量均高于对照组;而中度狭窄组($q = 34.538, P = 0.000$)和重度狭窄组($q = 11.914, P = 0.000$)miRNA-210-5P 相对表达量高于轻度狭窄组;重度狭窄组亦高于中度狭窄组($q = 16.983, P = 0.000$)。ROC 曲线显示,miRNA-210-5P 预测颈动脉粥样硬化中至重度狭窄的曲线下面积为 0.943,当最佳临界值为 1.495 时,其预测灵敏度 90.33%、特异度 92.54%;生物信息学分析提示,miRNA-210-5P 潜在靶基因包括 *VEGFA*、*KCMF1*、*HMGCS1*、*KLF12*、*EFNA3*、*GIT2* 等 54 个基因;GO 分析显示,miRNA-210-5P 靶基因功能主要富集于血管生成、神经元发育、DNA 转录因子活性的正性调控、内皮细胞趋化性、细胞迁移与分化黏附等;对 KEGG 信号通路的检测显示,miRNA-210-5P 靶基因主要富集于突触导向信号转导通路。**结论** 颈动脉粥样硬化性狭窄患者血清 miRNA-210-5P 表达上调,且可能通过调控多种靶基因而作用于突触导向信号转导通路中,参与颈动脉粥样硬化性狭窄的发生与发展。

【关键词】 颈动脉狭窄; 动脉粥样硬化; 微 RNAs; 基因; 计算生物学

The expression of miRNA-210-5P and bioinformatics analysis of its predicted target genes in peripheral blood of patients with carotid atherosclerotic stenosis

HUANG Pan¹, XU Min², HE Xiao-ying³

¹Department of Neurology, People's Hospital of Deyang City, Deyang 618000, Sichuan, China

²Department of Neurology, the Second People's Hospital of Deyang City, Deyang 618000, Sichuan, China

³Department of Neurology, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan, China

Corresponding author: HE Xiao-ying (Email: 102050228@qq.com)

【Abstract】 Objective To investigate the relative expression of miRNA-210-5P in serum of patients with carotid atherosclerotic stenosis (CAS) and to explore the function of miRNA-210-5P and its target genes using bioinformatics methods. **Methods** We selected 146 patients with CAS from July 2015 to September 2018 in our hospital. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect the relative expression of miRNA-210-5P in peripheral blood of all enrolled patients. The target genes were predicted by using TargetScan and CoMeTa databases. The target genes of miRNA-210-5P were enriched by Gene Ontology (GO) using DAVID data and were performed with KEGG Pathway analysis.

doi:10.3969/j.issn.1672-6731.2019.07.010

基金项目:四川省应用基础研究计划项目(项目编号:14JC0166);四川省卫生厅资助项目(项目编号:110368)

作者单位:618000 四川省德阳市人民医院神经内科(黄攀);618000 四川省德阳市第二人民医院神经内科(徐敏);646000 泸州,西南医科大学附属医院神经内科(何晓英)

通讯作者:何晓英,Email:102050228@qq.com

Results Compared with non-CAS patients or normal subjects (control group, $N = 60$), the relative expression of miRNA-210-5P in the serum of CAS group was significantly increased ($t = 14.759$, $P = 0.000$). The relative expressions of serum miRNA-210-5P in severe stenosis group ($N = 31$; $q = 23.028$, $P = 0.000$), moderate stenosis group ($N = 53$; $q = 6.657$, $P = 0.000$) and mild stenosis group ($N = 62$; $q = 42.612$, $P = 0.000$) were higher than that in control group. The relative expressions of serum miRNA-210-5P in moderate stenosis group ($q = 34.538$, $P = 0.000$) and severe stenosis group ($q = 11.914$, $P = 0.000$) were significantly higher than that in mild stenosis group. The relative expressions of serum miRNA-210-5P in severe stenosis group was significantly higher than that in moderate stenosis group ($q = 16.983$, $P = 0.000$). Receiver operating characteristic (ROC) curve showed that the miRNA-210-5P predicted the area under the curve (AUC) of moderate to severe stenosis in CAS to be 0.943, the sensitivity was 90.33% and the specificity was 92.54% at the best cutoff value of 1.495. Bioinformatics analysis showed there were 54 potential target genes of miRNA-210-5P, such as *VEGFA*, *KCMF1*, *HMGCS1*, *KLF12*, *EFNA3*, *GIT2*, etc. GO analysis showed that the target genes of miRNA-210-5P were involved in angiogenesis, neuronal development, positive regulation of DNA transcription factor activity, endothelial cell chemotaxis, cell migration and differentiation and adhesion processes. KEGG Pathway analysis displayed miRNA-210-5P target genes were mainly enriched in synaptic-directed factor signal transduction pathways. **Conclusions** The expression of miRNA-210-5P in peripheral blood of CAS patients is upregulated, and it may participate in the process of CAS occurrence and development by regulating multiple target genes and acting on synaptic-directed signaling pathways.

【Key words】 Carotid stenosis; Atherosclerosis; MicroRNAs; Genes; Computational biology

This study was supported by Sichuan Applied Basic Research Project (No. 14JC0166) and Sichuan Provincial Health Department Funded Project (No. 110368).

Conflicts of interest: none declared

颈动脉粥样硬化性狭窄(CAS)是指颈动脉发生进行性脂质沉积、纤维组织增生和炎性细胞浸润等病理改变,导致颈动脉管径变细、管腔狭窄的慢性疾病。有研究显示,40岁以上人群颈动脉粥样硬化性狭窄发生率为45%,而70岁以上人群则高达84%^[1-2]。关于颈动脉粥样硬化性狭窄的发病机制目前尚不清楚,炎症反应、脂质浸润等假说均不能独立解释其病理生理过程。近年,随着基因诊断学技术的发展,微小RNA(miRNA)在多种疾病中的作用颇受关注,研究表明,颈动脉粥样硬化性狭窄患者存在miRNA的差异表达谱,提示miRNA在颈动脉粥样硬化性狭窄性疾病中发挥重要作用^[3]。MiRNA是一类长度为17~22个核苷酸的非编码小分子物质^[4],其过表达或低表达与多种疾病的发生发展有关,通过完全或不完全碱基互补配对原则与特定靶基因的miRNA互补结合,进而降解或抑制特定靶基因miRNA转录后翻译水平^[5-6]。因miRNA可在外周血中稳定表达,近年来已成为多种疾病的生物学标志物^[7-8],该家族中的miRNA-210-5P是一种缺氧条件下的关键调控因子^[9-10],对经手术切除的颈动脉粥样硬化组织进行的基因芯片分析显示,粥样硬化组织中存在miRNA-210-5P的差异表达^[11]。为了探究颈动脉粥样硬化性狭窄患者外周循环是

否也存在miRNA-210-5P的差异表达,以及探讨miRNA-210-5P与颈动脉粥样硬化性狭窄发生发展相关的靶分子调控网络之间的关系,本研究采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)结合生物信息学分析方法,探讨颈动脉粥样硬化性狭窄患者外周血miRNA-210-5P表达变化及其可能的生物学过程,为进一步构建颈动脉粥样硬化性狭窄miRNA分子调控网络奠定基础。

对象与方法

一、研究对象

1. 诊断标准 根据北美症状性颈动脉内膜切除术试验(NASCET)提出的诊断标准^[12],颈动脉超声检查显示颈动脉狭窄程度0~50%、收缩期峰值流速<125 cm/s、舒张末期流速<40 cm/s、频窗存在,为轻度狭窄;颈动脉狭窄程度51%~70%、收缩期峰值流速为126~230 cm/s、舒张末期流速40~100 cm/s、频窗消失,为中度狭窄;颈动脉狭窄程度>71%、收缩期峰值流速>231 cm/s、舒张末期流速>100 cm/s、频窗消失,为重度狭窄。

2. 纳入标准 (1)经颈动脉超声检查诊断明确的颈动脉粥样硬化性狭窄病例^[13]。(2)意识清楚,检查过程中能够很好配合并完成检查者。(3)本研究

经四川省德阳市人民医院道德伦理委员会审核批准,所有纳入研究的患者均知情同意并签署知情同意书。

3. 排除标准 (1)合并缺血性或出血性卒中。(2)合并恶性肿瘤。(3)合并免疫系统疾病。(4)既往有精神疾病,不能配合检查。(5)伴有心、肝、肾功能障碍。(6)存在家族遗传性疾病病史。

4. 一般资料 (1)颈动脉粥样硬化性狭窄组(CAS组):根据纳入与排除标准,选择2015年7月至2018年9月在我院神经内科住院或门诊治疗且诊断明确的颈动脉粥样硬化性狭窄患者共146例,男性87例,女性59例;年龄43~81岁、平均为(69.75±8.67)岁。其中,轻度狭窄组62例,男性37例、女性25例,年龄43~78岁、平均为(69.32±8.62)岁;中度狭窄组53例,男性32例、女性21例,年龄为42~80岁、平均(69.53±8.51)岁;重度狭窄组31例,男性18例、女性13例,年龄46~81岁、平均(70.72±8.71)岁。(2)对照组:选择同期于我院进行体检的正常者或住院病例中的非颈动脉粥样硬化病变者共60例,男性41例,女性19例;年龄41~79岁,平均(69.12±8.50)岁。CAS组与对照组受试者性别($\chi^2=1.382, P=0.240$)、年龄($t=1.981, P=0.362$)差异无统计学意义,具有可比性。

二、研究方法

1. 逆转录-聚合酶链反应 两组患者于药物治疗前、对照组中正常受试者于入组后空腹采集外周静脉血5 ml,室温自然凝固10~20 min,采用H1750R型冷冻离心机以离心半径10 cm、3000 r/min离心30 min,获得血清,-80℃超低温保存备用,提取总RNA。(1)试剂:Trizol Reagent(批号:15596-026,剂量:1 ml)、M-MLV(批号:C-28025,剂量:1 μl)逆转录酶试剂盒和dNTP Mix(批号:C-18427-013,剂量:1 μl)均购自美国Invitrogen公司,三氯甲烷(批号:10006818,剂量:250 μl)、异丙醇(批号:80109218,剂量:500 μl)、无水乙醇(批号:10009218,剂量:1 ml)、Template(批号:814803YZ,剂量:1 μl)和Rox(批号:BMD00036,剂量:0.20 μl)由国药集团化学试剂有限公司提供。(2)仪器与设备:TGL-16c型台式离心机为上海安亭科学仪器厂产品,H1750R型冷冻离心机购自湖南省仪器仪表工业公司湘仪电子仪器厂,TC-XP型PCR仪(规格:96×0.20 ml,精密度:≤5%,误差:±0.3℃)购自杭州博日科技有限公司,StepOne™荧光定量PCR仪

(规格:48×0.10 ml,精密度:3.82%,误差:±0.25℃)购自美国Life Technologies公司,超净工作台(规格:500 cm×500 cm×700 cm,精密度:沉降菌浓度≤0.5 cfu/皿·0.5 h,电压:220 V,功率:0.13 kW)购自苏净安泰空气技术有限公司。(3)RT-PCR法检测miRNA-210-5P相对表达水平:按照Trizol试剂盒所显示检测方法,提取受试者血清总RNA,经核酸蛋白检测获得RNA条带,选择光密度(OD)值OD₂₆₀/OD₂₈₀比值为1.80~2.00的RNA,用于下一步实验。首先,合成第一链cDNA,再将RT-PCR反应混合液置于96孔反应板中,滴入2×qPCR Mix 5 μl、引物工作液(2.50 μm)1 μl、Template 1 μl、重蒸水2.80 μl和Rox 0.20 μl,使总体积至10 μl,每个血清样本均做3个复孔,其扩增循环条件为95℃ 1 min,95℃ 15 s,58℃ 20 s,72℃ 45 s,共进行40个循环。MiRNA-210-5P正向引物序列为5'-TTGCCACCCGACACTG-3',反向引物序列为5'-CTCAACTGGTGTCTCGTGAGTC-3';内参基因U6正向引物序列为5'-CTCGCTTCGGCAGCACAT-3',反向引物序列为5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'。计算目的基因相对表达量。由于RT-PCR中的Ct值不能作为原始数据进行统计学分析,故采用2^{-ΔCt}代表miRNA相对表达量,经标准化处理后,ΔCt=目标miRNA Ct值-内参基因Ct值。(4)预实验:旨在能够于颈动脉粥样硬化性狭窄患者的外周循环中检测到表达稳定的miRNA-210-5P。分别从CAS组选择3例、对照组选择1例,每样本每个miRNA设置3个复孔,以RT-PCR法检测外周血miRNA-210-5P表达水平,miRNA-210-5P约在第14个循环开始扩增,至第28个循环扩增结束,所得Ct值具有实验意义,提示获得的miRNA-210-5P符合实验要求,在外周血中表达稳定,实验条件控制良好。

2. 生物信息学分析 对miRNA-210-5P靶基因的预测,采用TargetScan数据库(http://www.targetscan.org/vert_72/)和CoMeTa数据库(http://cometa.tigem.it/co_rank_search.php)中的数据进行分析,取二者的交集作为miRNA-210-5P的潜在靶基因;通过DAVID数据库(<https://david-d.ncifcrf.gov/>)分别对miRNA-210-5P潜在靶基因的功能富集分析(GO分析)和KEGG信号通路分析进行预测。

3. 统计分析方法 采用SPSS 17.0统计软件进行数据处理与分析。呈正态分布的计量资料采用均数±标准差($\bar{x}±s$)表示,两组比较行两独立样本

表 1 不同处理组受试者 miRNA-210-5P 相对表达量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1. Comparison of relative expression of miRNA-210-5P among different groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	miRNA-210-5P 相对表达量	F 值	P 值
对照组(1)	60	0.87 ± 0.24	363.723	0.000
轻度狭窄组(2)	62	1.21 ± 0.29		
中度狭窄组(3)	53	2.25 ± 0.51		
重度狭窄组(4)	31	2.96 ± 0.48		

表 2 不同处理组受试者 miRNA-210-5P 相对表达量的两两比较

Table 2. Paired comparison of relative expression of miRNA-210-5P among different groups

组间两两比	q 值	P 值	组间两两比	q 值	P 值
(1) vs (2)	42.612	0.000	(2) vs (3)	34.538	0.000
(1) vs (3)	6.657	0.000	(2) vs (4)	11.914	0.000
(1) vs (4)	23.028	0.000	(3) vs (4)	16.983	0.000

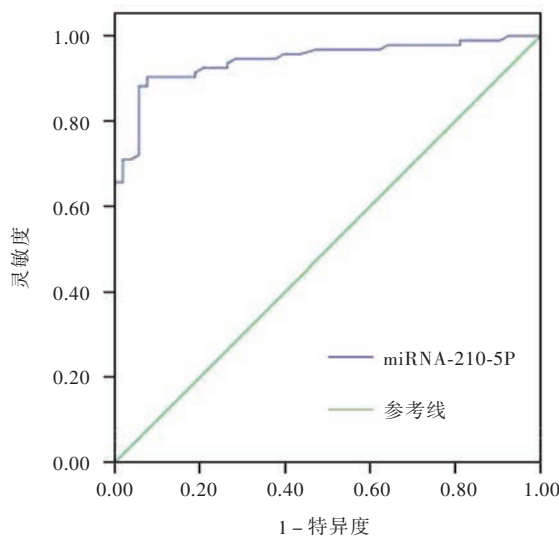


图 1 ROC 曲线显示, 曲线下面积为 0.943 (95% CI: 0.907 ~ 0.980, $P = 0.000$)

Figure 1 ROC curve showed the AUC was 0.943 (95% CI: 0.907-0.980, $P = 0.000$).

的 t 检验; 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较行 SNK- q 检验。通过绘制受试者工作特征曲线 (ROC 曲线) 评价 miRNA-210-5P 预测颈动脉粥样硬化性狭窄患者颈动脉狭窄程度的价值。以 $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

CAS 组患者外周血 miRNA-210-5P 相对表达量为 1.96 ± 0.81 , 高于对照组的 0.87 ± 0.24 , 两组比较差异有统计学意义 ($t = 14.759, P = 0.000$), 提示颈动脉粥样硬化性狭窄患者外周血 miRNA-210-5P 相对表达量较高。

不同处理组受试者外周血 miRNA-210-5P 相对表达量差异具有统计学意义 ($F = 363.723, P = 0.000$), 重度狭窄组、中度狭窄组和轻度狭窄组患者外周血 miRNA-210-5P 相对表达量高于对照组 (均 $P = 0.000$); 重度狭窄组与中度狭窄组患者外周血 miRNA-210-5P 相对表达量高于轻度狭窄组 (均 $P = 0.000$); 重度狭窄组外周血 miRNA-210-5P 相对表达量高于中度狭窄组 ($P = 0.000$; 表 1, 2), 提示颈动脉狭窄程度越严重、miRNA-210-5P 相对表达量越高。

按照颈动脉狭窄程度, 分为轻度狭窄组 (62 例) 和中至重度狭窄组 (84 例), 通过绘制 ROC 曲线评价 miRNA-210-5P 预测颈动脉狭窄程度的价值, 结果显示, ROC 曲线下面积 (AUC) 为 0.943 (95% CI: 0.907 ~

0.980, $P = 0.000$), 而当 miRNA-210-5P 取最佳临界值 1.495 时, 预测颈动脉中至重度狭窄的灵敏度为 90.33%、特异度为 92.54% (图 1)。

采用 CoMeTa 数据库对 miRNA-210-5P 靶基因进行预测, 发现共有 314 个可能靶基因, 而采用 TargetScan 数据库对 miRNA-210-5P 靶基因进行预测, 共发现 3467 个可能靶基因。对以上两个数据库检索所得的靶基因进行对比分析取其交集, 同时出现的潜在靶基因共有 54 个 (包括 *VEGFA*、*KCMF1*、*HMGCS1*、*KLF12*、*EFNA3*、*GIT2*、*INSIG1* 等)。

采用 DAVID 数据库软件对 miRNA-210-5P 潜在的 54 个靶基因进行功能 GO 分析, 以 $P < 0.05$ 为显著性检验标准, 结果得到 9 个具有统计学意义的 GO 功能 (均 $P < 0.05$), 主要是富集于血管生成、神经元发育、DNA 转录因子活性的正性调控、内皮细胞趋化性、细胞迁移与分化黏附等多个生物学过程中 (表 3); 同时对 miRNA-210-5P 潜在的 54 个靶基因进行 KEGG 信号通路分析, 结果显示具有统计学意义的 KEGG 信号通路仅有 1 条 ($P = 0.009$), 主要富集于突触导向信号转导通路中, 主要靶基因为 *EFNA3*、*RasGAP3*、*EPHB2*。

讨 论

颈动脉粥样硬化性狭窄是一种与血脂异常有关的动脉炎性疾病, 可引起颈动脉内膜灶性纤维增

表 3 MiRNA-210-5P 预测靶基因 GO 分析结果

Table 3. GO enrichment analysis of predicted target genes of miRNA-210-5P

编号	生物学过程	基因	P 值
0001525	血管生成调控	<i>HOXA3, VEGFA, MEIS1, EPHB2</i>	0.007
0048935	神经系统发育调控	<i>ONECUT2, ETV1</i>	0.018
0051091	DNA 转录因子活性调控	<i>HDAC4, NEUROD2, FZD4</i>	0.023
0035767	内皮细胞趋化调控	<i>EGR3, VEGFA</i>	0.025
0035924	细胞对内皮生长因子刺激的调控	<i>EGR3, VEGFA</i>	0.039
0002042	血管芽生	<i>EGR3, VEGFA, EPHB2</i>	0.039
0007274	神经肌肉接头突触传输	<i>EGR3, FCHSD2</i>	0.009
0030154	细胞分化	<i>ONECUT2, ETV1, SH2B3</i>	0.009
0007155	细胞黏附	<i>NCAM1, SORBS2, TOR1A</i>	0.009

厚、粥样硬化斑块形成,进而导致颈动脉管壁变硬、管腔狭窄。因颈动脉供应总脑血流量(CBF)的2/3,一旦发生颈动脉粥样硬化性狭窄则易诱发脑血管事件。据研究显示,颈动脉狭窄程度与年脑卒中风险呈正相关,即颈动脉狭窄程度越严重,发生脑卒中的风险越高,当狭窄率达到50%~69%、70%~89%、>90%时,所对应的年脑卒中发生率则分别为0.8%、1.4%、1.9%^[14]。因此,积极探寻一种可以早期预测颈动脉狭窄严重程度的指标至关重要。MiRNA是一类与疾病发生发展密切相关的小分子物质,而miRNA-210-5P是miRNA大家族成员之一,目前的研究大多集中于缺血缺氧性疾病,是一种公认的缺氧条件下的关键调控因子,而颈动脉粥样硬化性狭窄即是缺血缺氧性疾病的典型代表^[15],但迄今较少检索到有关miRNA-210-5P与颈动脉粥样硬化性狭窄关系的研究报道。在本研究中,我们采用RT-PCR技术对颈动脉粥样硬化性狭窄患者的外周血进行miRNA-210-5P检测,发现其呈高表达,提示miRNA-210-5P在颈动脉粥样硬化性狭窄的形成中发挥重要作用;ROC曲线亦表明miRNA-210-5P对颈动脉狭窄程度具有很好的预测作用(AUC=0.943),提示miRNA-210-5P除参与颈动脉粥样硬化性狭窄的发生外,可能还具有促进颈动脉狭窄程度进展的作用。

MiRNA发挥疾病调控作用的本质是通过对疾病相关信号转导通路中的靶基因进行调控,目前已经证实miRNA-210-5P可能参与颈动脉粥样硬化性狭窄的发生与发展^[3],但关于其具体调控的靶基因网络尚不十分清楚。生物信息学分析方法是预测

miRNA靶基因的重要手段,通过生物信息学分析方法可寻找出miRNA可能的潜在靶基因,为后续验证miRNA功能提供研究方向和思路。目前常用的miRNA靶基因预测网站以TargetScan和CoMeTa数据库为主,本研究通过以上两种数据库筛选出有关miRNA-210-5P潜在靶基因的交集,结果显示,miRNA-210-5P可能的潜在靶基因共有54个(包括*VEGFA*、*KCMF1*、*HMGCS1*、*KLF12*、*EFNA3*、*GIT2*、*INSIG1*等)。其中,*VEGFA*基因是编码血管内皮生长因子(VEGF)的上游基因之一,VEGF蛋白不仅具有促进血管内皮细胞增殖、分化的作用,还可刺激单核巨噬细胞的激活

及迁移,而血管内皮细胞、血管平滑肌细胞、单核巨噬细胞则是构成颈动脉粥样硬化性狭窄的关键三要素,有研究显示,VEGF蛋白与颈动脉粥样硬化性狭窄的关系密切^[16-17];高血压与颈动脉粥样硬化性狭窄虽为两种独立的疾病,但可相互促进并导致恶性循环^[18],钾离子通道调控因子1(KCMF1)可以影响子痫患者的收缩压与舒张压,而miRNA-210-5P通过调控*KCMF1*基因的表达,影响子痫的发生^[19]; *HMGCS1*基因是一种调控肝脏生成胆固醇的基因,具有促进胆固醇合成的作用,而经典的颈动脉粥样硬化性狭窄发病机制学说即脂质浸润学说认为,血脂是导致颈动脉粥样硬化性狭窄的重要因素^[20-21]; Krüppel样因子1(KLF12)可对脂肪代谢途径中的多种重要代谢酶如乙酰辅酶A羧化酶、脂肪合成酶等相关基因的mRNA表达水平产生影响^[22]; GIT2蛋白可调控核因子-κB(NF-κB)、Toll受体(TLR)等多种炎症反应信号转导通路^[23-24],而炎症反应则是导致颈动脉粥样硬化性狭窄的重要机制^[25]。因此,miRNA-210-5P可能通过调控以上潜在靶基因而参与颈动脉粥样硬化性狭窄的发生与发展。

为了进一步明确miRNA-210-5P潜在靶基因在颈动脉粥样硬化性狭窄信号转导通路网络中的作用,本研究对颈动脉粥样硬化性狭窄患者进行GO分析,结果显示,miRNA-210-5P相关靶基因可能参与颈动脉粥样硬化性狭窄过程中的血管生成、DNA转录因子活性的正性调控、内皮细胞趋化性、细胞迁移分化等多个生物学环节,而血管生成、内皮细胞迁移分化均是颈动脉粥样硬化性狭窄发病的重要过程。此外,对KEGG信号通路的分析结果提示,

miRNA-210-5P 信号通路主要富集于突触导向信号转导通路中,参与颈动脉粥样硬化性狭窄的多个病理生理学过程。

综上所述,颈动脉粥样硬化性狭窄患者外周血 miRNA-210-5P 表达上调,且对狭窄程度具有很好的诊断价值;同时,miRNA-210-5P 可能通过调控多种靶基因作用于突触导向信号转导通路,进而参与颈动脉粥样硬化性狭窄的发生与发展过程。本研究观察的样本量较小,且为单中心研究,更为确切的循证医学证据有待大样本多中心临床对照试验进行验证。

利益冲突 无

参 考 文 献

- [1] Shi WL, Dai HP, Wang LL, Sun LT. Application of color Doppler ultrasound and arteriosclerosis detector in early diagnosis of arteriosclerotic diseases [J]. *Zhongguo Shi Yan Zhen Duan Xue*, 2016, 20:2077-2079. [石伟林, 戴海鹏, 王丽丽, 孙立涛. 彩超与动脉硬化检测仪在早期诊断动脉硬化疾病中的应用[J]. *中国实验诊断学*, 2016, 20:2077-2079.]
- [2] Gao ZY, Wang W, Chen M, Qin HN, Shi J, Gao XG. Relationship between carotid artery color ultrasonography indexes and brain white matter lesions in elderly patients [J]. *Zhonghua Lao Nian Xin Nao Xue Guan Bing Za Zhi*, 2019, 21: 270-273. [高智玉, 王雯, 陈敏, 秦海宁, 石净, 高旭光. 老年患者颈动脉彩色超声检查指标与脑白质病变相关性分析[J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2019, 21:270-273.]
- [3] Zhang XH. Expression profiles of six circulating micrornas critical atherosclerosis in patients with subclinical hypothyroidism: a clinical study [D]. Ji'nan: Shandong University, 2014. [张新焕. 动脉硬化关键信号分子相关的血清 microRNA 在亚临床甲减病人中表达谱初探[D]. 济南: 山东大学, 2014.]
- [4] Li JZ, Xia X, Huan SY, Ke XW, Jian Z, Ding HL, Yu LY. Identification of microRNA transcriptome reveals that miR-100 is involved in the renewal of porcine intestinal epithelial cells [J]. *Sci China Life Sci*, 2019, 62:816-828.
- [5] Pan YB, Sun ZL, Feng DF. The role of microRNA in traumatic brain injury [J]. *Neuroscience*, 2017, 367:189-199.
- [6] Chen YJ, Chang WA, Huang MS, Chen CH, Wang KY, Hsu YL, Kuo PL. Identification of novel genes in aging osteoblasts using next - generation sequencing and bioinformatics [J]. *Oncotarget*, 2017, 8:113598-113613.
- [7] Martinez SR, Ma Q, Dasgupta C, Meng X, Zhang L. MicroRNA-210 suppresses glucocorticoid receptor expression in response to hypoxia in fetal rat cardiomyocytes [J]. *Oncotarget*, 2017, 8: 80249-80264.
- [8] Kuang YQ, Liu L, Xu FF, Chen Y, Su YW. Analysis of microRNA - 122 as a biomarker for early evaluation of drug hepatotoxicity [J]. *Nanjing Yi Ke Da Xue Xue Bao (Zi Ran Ke Xue Ban)*, 2018, 38:322-327. [匡雨琼, 刘亮, 许飞, 陈芸, 苏钰文. MicroRNA-122 作为新药肝毒性早期评价标志物的相关分析[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2018, 38:322-327.]
- [9] Hu H, Ding Y, Wang Y, Geng S, Liu J, He J, Lu Y, Li X, Yuan M, Zhu S, Zhao S. MitoKATP channels promote the proliferation of hypoxic human pulmonary artery smooth muscle cells via the ROS/HIF/miR 210/ISCU signaling pathway [J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14:6105-6112.
- [10] Zhang WH, Song X. The role of hypoxia-related microRNA-210 in malignant process of tumor [J]. *Zhongguo Zhong Liu Sheng Wu Zhi Liao Za Zhi*, 2016, 23:733-738. [张文会, 宋鑫. 缺氧相关 microRNA-210 在肿瘤恶性进程中的作用[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2016, 23:733-738.]
- [11] Duan YY, Zhang J, Ye P. Recent advances in microRNA and atherosclerosis [J]. *Zhonghua Lao Nian Xin Nao Xue Guan Bing Za Zhi*, 2016, 18:1220-1223. [段媛媛, 张蛟, 叶平. 微小 RNA 与动脉粥样硬化最新研究进展[J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2016, 18:1220-1223.]
- [12] Karlsson L, Kangejård E, Hermansson S, Strömberg S, Österberg K, Nordanstig A, Ryndel M, Gellerman K, Fredén-Lindqvist J, Bergström GM. Risk of recurrent stroke in patients with symptomatic mild (20%-49% NASCET) carotid artery stenosis [J]. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2016, 52:287-294.
- [13] Xu XT, Ma N. Application of transcranial Doppler in interventional department [J]. *Zhongguo Zu Zhong Za Zhi*, 2018, 13:1237-1242. [徐晓彤, 马宁. 经颅多普勒超声在神经介入临床中的应用[J]. *中国卒中杂志*, 2018, 13:1237-1242.]
- [14] Shariat A, Niknam L, Izadi S, Salehi A. Prevalence of intracranial artery stenosis in Iranian patients with acute ischemic stroke using transcranial Doppler ultrasonography [J]. *Iran J Neurol*, 2016, 15:133-139.
- [15] Mei YY, Huang DS. Research progress of microRNA-210 [J]. *Yi Xue Zong Shu*, 2016, 22:2913-2917. [梅妍妍, 黄东生. 微 RNA-210 研究进展[J]. *医学综述*, 2016, 22:2913-2917.]
- [16] Fang H, Wu D, An Y, Li D. Recent advances in relationship between interstitial microenvironment of atherosclerosis plaque and formation of new angiogenesis [J]. *Xin Xue Guan Bing Xue Jin Zhan*, 2018, 39:75-79. [房昊, 吴丹, 安毅, 李丹. 动脉粥样硬化斑块内间质微环境与新生血管生成关系的最新研究进展[J]. *心血管病学进展*, 2018, 39:75-79.]
- [17] Jiang H, Toscano JF, Schiraldi M, Song SS, Schlick KH, Dumitrascu OM, Liou R, Lyden PD, Pan J, Zhan R, Saver JL, Gonzalez NR. Differential expression of vascular endothelial growth factor-A165 isoforms between intracranial atherosclerosis and moyamoya disease [J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2019, 28: 360-368.
- [18] Tian X, Xiong H, Wu D, Zhang R, Lu M, Zhang YT. Age and sex-specific relationships between blood pressure variability and carotid intima - media thickness [J]. *Australas Phys Eng Sci Med*, 2016, 39:967-976.
- [19] Vera Janavel G, Crottogini A, Cabeza Meckert P, Cuniberti L, Mele A, Papouchado M, Fernández N, Bercovich A, Criscuolo M, Melo C, Laguens R. Plasmid-mediated VEGF gene transfer induces cardiomyogenesis and reduces myocardial infarct size in sheep [J]. *Gene Ther*, 2006, 13:1133-1142.
- [20] Li JJ, Li S, Zhu CG, Wu CC, Zhang NQ, Guo Y, Gao LY, Li Y, Qing XL, Cui P, Xu CJ, Jiang RX, Sun ZW, Liu J, Dong G, Li Q. Familial hypercholesterolemia phenotype in Chinese patients under-going coronary angiography [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2017, 37:570-579.
- [21] Bulysheva AA, Burcus N, Lundberg CG, Francis MP, Heller R. VEGF - B electrotransfer mediated gene therapy induces cardiomyogenesis in a rat model of cardiac ischemia [J]. *Bioelectrochemistry*, 2018, 124:105-111.
- [22] Godin-Heymann N, Brabetz S, Murillo MM, Saponaro M, Santos CR, Loblely A, East P, Chakravarty P, Matthews N, Kelly G, Jordan S, Castellano E, Downward J. Tumour - suppression function of KLF12 through regulation of anoikis [J]. *Oncogene*,

2016, 35:3324-3334.

[23] Li J, Zhou Y, Hao YE. Advances in the study of G protein-coupled receptor kinase interacting protein 2 (GIT2) involved in immune regulation[J]. Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi, 2016, 32:1416-1418.[李佳, 周艺, 郝玉娥. G 蛋白偶联受体激酶相互作用蛋白 2(GIT2)参与免疫调控的研究进展[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2016, 32:1416-1418.]

[24] Kang SG, Kim C, Cortez LM, Carmen Garza M, Yang J, Wille

H, Sim VL, Westaway D, McKenzie D, Aiken J. Toll-like receptor-mediated immune response inhibits prion propagation [J]. *Glia*, 2016, 64:937-951.

[25] Jones DP, True HD, Patel J. Leukocyte trafficking in cardiovascular disease: insights from experimental models [J]. *Mediators Inflamm*, 2017:ID9746169.

(收稿日期:2019-06-30)

· 临床医学图像 ·

零细胞腺瘤

doi: 10.3969/j.issn.1672-6731.2019.07.014

Null cell adenoma

YAN Xiao-ling

Department of Pathology, Tianjin Huanhu Hospital, Tianjin 300350, China (Email: ll934065@126.com)

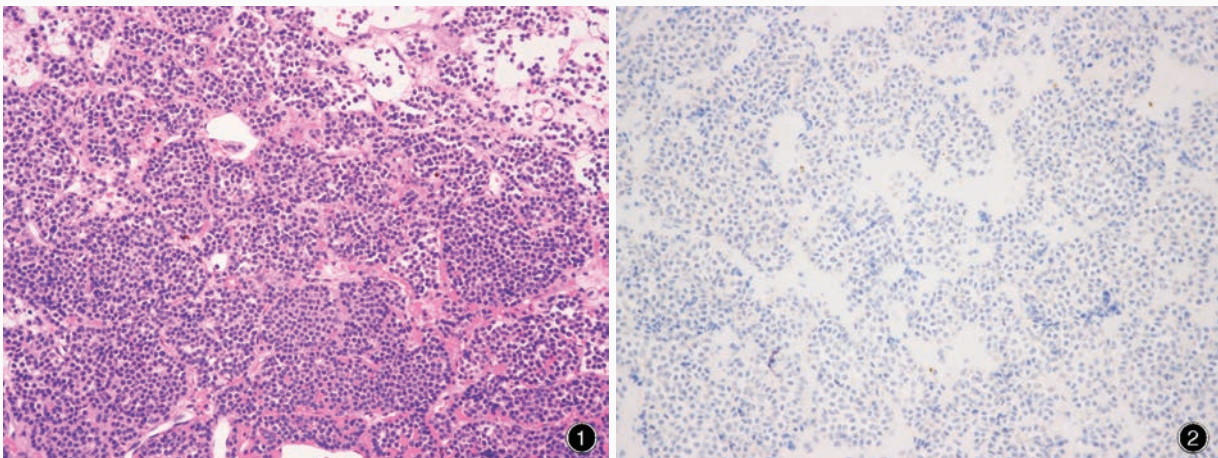


图1 光学显微镜观察显示,肿瘤细胞形态较一致,呈弥漫性排列 HE 染色 ×200 图2 光学显微镜观察显示,肿瘤细胞胞质 Syn 呈阳性 免疫组织化学染色(EnVision 二步法) ×200

Figure 1 Optical microscopy findings showed that the tumor cells were uniform in shape and were arranged in a diffuse pattern. HE staining ×200 Figure 2 Optical microscopy findings revealed that the cytoplasm of tumor cells were positive for Syn. Immunohistochemical staining (EnVision) ×200

2017 年世界卫生组织(WHO)内分泌系统肿瘤分类定义了零细胞腺瘤,源自腺垂体细胞,无免疫组织化学检测证实的细胞特异性激素和相关转化因子分化。该肿瘤好发于老年人,以占位效应为主。组织学形态,肿瘤呈嫌色性,亦可呈轻度嗜酸性;肿瘤组织由圆形或多角形细胞弥漫性片状排列构成(图1),乳头状和假“菊形团”样结构相对少见,细胞异型性不明显,核分裂象罕见。免疫组织化学染色,肿瘤细胞胞质突触素(Syn)和嗜铬素 A(CgA)呈阳性(图2);催乳素(PRL)、生长激素(GH)、促肾上腺皮质激素(ACTH)、促性腺激素、促甲状腺激素、 α 亚单位及相关转化因子(如 TPIT、PIT-1、SF1 等)呈阴性,细胞角蛋白(CK)可呈阴性。特殊染色高碘酸-雪夫(PAS)染色呈阴性。

(天津市环湖医院病理科阎晓玲供稿)