

# 冠心病 EAT 中 miR-455b-3p 调控脂肪细胞分化及炎症因子

杜雅彦<sup>1</sup> 刘洋<sup>2</sup> 卢沐<sup>3</sup> 怀施涛<sup>1</sup> 吕作利<sup>1</sup> 魏育涛<sup>4,5</sup>

**摘要** 目的 筛选在冠状动脉粥样硬化性心脏病(CAD)患者和非冠心病(non-CAD)患者心外膜脂肪组织(EAT)中差异性表达的 microRNAs(DE-miRNAs),探讨其中 miR-455b-3p 对脂肪细胞因子 APN、Kruppel 样因子 4(KLF4)、白细胞介素 6(IL-6)和单核细胞因子趋化蛋白 1(MCP-1)分泌及对脂肪细胞分化的影响。方法 收集冠心病(CAD)34 例和非冠心病(non-CAD)16 例 EAT 和血液标本,分别为实验组(CAD 组)和对照组(Non-CAD 组)采用 miRNA 芯片技术筛选出 EAT 中 DE-miRNAs,采用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测标本中 miR-455b-3p 的表达水平。分别将 miR-455b-3p 的 mimics、miR-455b-3p 的 inhibitors 和 NC 转染入前体 3T3-L1 细胞及已诱导成熟的 3T3-L1 细胞,分为上调组、下调组和 NC 组。采用 qRT-PCR 法检测转染 24 h 后细胞中 APN、KLF4、IL-6、MCP-1 mRNA 及脂肪细胞分化标志物过氧化物酶体增殖物激活受体-γ(PPARγ)、CCAAT/增强子结合蛋白 α(C/EBPα)、脂肪酸结合蛋白 4(FABP4) mRNA 的相对表达水平。结果 与实验组比较,对照组 EAT 标本中共筛选出 29 个 DE-miRNAs ( $P < 0.05$ ; 差异倍数  $> 2$ , 差异有统计学意义),其中下调 10 个,上调 19 个。miR-455b-3p 是与 ADIPOQ 3'-UTR 有互补结合位点或密切相关的 1 条 DE-miRNA。qRT-PCR 验证结果显示,与对照组比较,miR-455b-3p 在实验组中的表达均升高。与 NC 组比较,转染 miR-455b-3p 的 mimics 后,上调组成熟 3T3-L1 脂肪细胞中 APN、KLF4 mRNA 表达减少,IL-6、MCP-1 mRNA 表达增多;脂肪细胞分化标志物 PPARγ、C/EBPα、FABP4 mRNA 表达升高;转染 miR-455b-3p inhibitor 后,下调组 APN、KLF4 mRNA 表达水平升高,IL-6、MCP-1 mRNA 表达减少。结论 在 CAD 组患者 EAT 中存在差异性表达的 miRNAs,其中 miR-455b-3p

高表达 miR-455b-3p 影响脂肪细胞因子 APN、KLF4、IL-6 以及 MCP-1 的表达,并且促进脂肪细胞分化成熟,从而影响冠心病的发生发展。

**关键词** 冠心病;心外膜脂肪组织;微小 RNA;脂联素;脂肪细胞分化

中图分类号 R 34

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)10-1594-07

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.10.020

冠状动脉粥样硬化性心脏病(coronary artery disease, CAD)是欧洲发达国家导致死亡的主要因素<sup>[1]</sup>。随着经济增长,发展中国家的心血管疾病数量也在增加。心外膜脂肪组织(epicardial adipose tissue, EAT)是一种沉积在心肌表面独特的内脏脂肪组织<sup>[2]</sup>,能分泌脂联素(adiponectin, APN, ADIPOQ)等脂肪细胞因子,可能会对心脏功能产生影响,但 EAT 启动炎症发生的机制并不十分明确。微小 RNA(microRNA, miRNA)是一类大小约 22 个核苷酸的单链非编码 RNA<sup>[3]</sup>,通过与靶基因互补位点结合的方式来调控基因表达,调控多种疾病发生和发展。miRNAs 在 CAD 发病机制的各个环节中都有作用,但其对 CAD 发生发展的具体机制尚不明确。该实验通过芯片筛选结果显示,在 CAD 患者 EAT 中,miR-455b-3p 高表达。生物信息学预测,miR-455b-3p 与 APN 靶向结合。该研究以 miR-455b-3p 为切入点,探讨 miR-455b-3p 对脂肪细胞分化及脂肪细胞因子表达的影响。

## 1 材料与方法

**1.1 病例资料** 收集 2016 年 3 月~2017 年 6 月在石河子大学医学院附属第一医院心胸外二科行冠状动脉旁路移植术的 CAD 患者 34 例作为实验组,对照组为行瓣膜置换术的非冠心病(non-CAD)患者 16 例。手术前收集所有研究对象的一般资料和化验检查资料。实验组符合 CAD 的诊断标准及纳入标准。对照组冠状动脉造影阴性,需行瓣膜置换手术(瓣膜为退行性变)且符合纳入标准。本研究通过新疆石河子大学医学院附属第一医院伦理委员会

2019-05-28 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81460059)

作者单位:<sup>1</sup>石河子大学医学院、新疆民族与地方病教育部重点实验室,石河子 832000

<sup>2</sup>广东省第二人民医院心胸外科,广州 510000

<sup>3</sup>首都医科大学附属朝阳医院京西院区急诊科,北京 100020

<sup>4</sup>石河子大学医学院附属第一医院心胸外二科,石河子 832000

<sup>5</sup>济宁市第一人民医院,济宁 272000

作者简介:杜雅彦,女,硕士研究生;

魏育涛,男,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: wytfwb@126.com

批准(编号:2014-072-01),所有研究对象签署知情同意书。

**1.2 主要试剂** 3T3-L1 前体脂肪细胞(中科院上海细胞库);引物及内参(上海生工公司);miRNA 模拟物及抑制物(上海吉玛制药公司);RNA 提取试剂和 qRT-PCR 反应试剂盒(日本 TaKaRa 公司);胎牛血清(美国 Gibco 公司);DMEM 培养基及胰蛋白酶(美国 Hyclone 公司);TRIzol、Lipofectamine™ 2000 转染试剂(美国 Invitrogen 公司);miRNeasy miRNA 提取试剂盒(德国 Qiagen 公司);Thermo Scientific miRNA cDNA 第一链合成试剂盒、miRNA 荧光定量检测试剂盒(北京天根生化科技有限公司)。

### 1.3 方法

**1.3.1 诊断标准** 参照我国卫生部发布的《冠状动脉粥样硬化性心脏病的诊断标准》(2010 年版)以及 2011 年美国心脏联合会(American Heart Association, AHA) 冠心病诊疗指南。

**1.3.2 纳入标准** 实验组:① 年龄 40~75(63.8±4.2)岁;② 符合 CAD 的诊断标准需行冠状动脉旁路移植术患者;③ 民族为汉族。对照组:① 年龄 40~75(66.5±7.3)岁;② 冠状动脉造影阴性且需行瓣膜置换手术(瓣膜为退行性变)患者;③ 民族为汉族。

**1.3.3 排除标准** ① 合并有糖尿病或糖耐量异常者;② 其他类型心脏病,如风湿性心脏病患者;③ 患有恶性肿瘤者;④ 近期有创伤、外科手术者;⑤ 急、慢性感染者;⑥ 长期肝、肾等脏器疾病及其他内分泌疾病。

**1.3.4 收集临床资料** 包括患者年龄、性别、身高、体质量、病程、大生化、心肌酶、超敏 C 反应蛋白、心脏彩超及颈动脉彩超等。

**1.3.5 标本采集** 留取手术当天空腹卧位肘静脉血 5 ml,留取血清 -80 °C 冰箱保存。开胸后获取右室表面 EAT 约 1 g 0.9% 氯化钠溶液清洗并去除结缔组织后置于液氮中保存。在所有收集实验组及对照组标本中各挑选 5 例患者的 EAT 用于 miRNA 芯片检测,由上海伯豪生物芯片技术有限公司技术人员完成 Agilent miRNA 芯片检测。[Agilent human miRNA (8\* 60 K) V18.0 Design ID: 70156]同步取患者循环血约 5 ml 3 000 r/min 离心 10 min,取上层血浆至无酶 EP 管中,并置于 -80 °C 冰箱中暂时冻存。

**1.3.6 EAT 标本基因芯片检测** ① RNA 抽提和纯化:采用 mirVana™ PARISTM 标准操作流程进行

样品总 RNA 抽提,抽提所得 total RNA 经电泳质检合格后备用;② RNA 的标记:标本 RNA 按照 miRNA Complete Labeling and Hyb Kit 标准操作流程对 miRNA 分子进行荧光标记;③ 芯片杂交:按照 miRNA Complete Labeling and Hyb Kit 进行标本杂交实验。在滚动杂交炉中 55 °C 20 r/min 滚动杂交 20 h 之后在洗缸中洗片;④ 芯片扫描:芯片结果采用 Agilent Microarray Scanner 进行扫描,软件设置 Scan resolution = 5 μm, PMT 100%, 5% 最后采用 Gene Spring Software 11.0 进行归一化处理,所用的算法为 Quantile;⑤ 差异表达:CAD 组和 non-CAD 组间差异表达的 miRNAs 采用 SAS 系统进行筛选[设定筛选阈值  $P < 0.05$ , 差异倍数(fold change) > 2 且 Flag 值/Call 值为至少一组内不出现 A(Absent: 表示差异无统计学意义)]。

**1.3.7 细胞培养与诱导分化** 在 6 孔板中将 3T3-L1 前脂肪细胞接种于含有 10% FBS 的高糖 DMEM 培养液,于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,待细胞生长至 80%~90% 并接触抑制 2 d 退出对数增长长期后,更换为终浓度为 0.5 mmol/L 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(IBMx)、5 μg/ml 胰岛素(INS)和 1 μmol/L 地塞米松(DEX)的细胞分化诱导液诱导 2 d 后,再更换含有 55 μg/ml INS 的维持培养基继续培养 2 d,隔 2 d 更换含 10% FBS 的 DMEM 培养液。分化 8 d 后使用油红 O 染色鉴定诱导效率。

**1.3.8 细胞的转染** 诱导成功的细胞待细胞密度达 70%~80% 时进行转染。用 Opti-MEM 稀释模拟物、抑制剂以及阴性对照组,并分别与转染试剂脂质体 Lipofectamine 2000 按 2:1 混合均匀,室温放置 20 min,使其形成稳定的复合物。再将复合物加入 6 孔板中,混匀,将 6 孔板置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中继续培养,24 h 后收取细胞,空白处理作阴性对照。实验分为 3 组:上调组、下调组和 NC 组。脂肪细胞因子脂联素(adiponectin, APN, ADIPOQ)、Krüppel 样因子 4(Krüppel-like factors, KLF4)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、单核细胞趋化因子 1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)、CCAAT/增强子结合蛋白 α(C/EBPα)和过氧化物酶体增殖物激活受体-γ(PPARγ)总 RNA 提取后使用核酸定量分析仪分析 RNA 纯度。合格的 RNA 反转录为 cDNA。使用 Step One 荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)进行 PCR 反应。

**1.3.9 RNA 提取及实时荧光 PCR 检测** 提取总 RNA、反转录按照 TaKaRa MiniBEST Universal RNA

Extraction Kit 细胞及组织 RNA 提取试剂盒及 Prime-Script™ RT reagent Kit with Gdna Eraser 试剂盒说明书进行操作。Real-time PCR 按照 TB Green™ Premix Ex Taq™ II 说明书操作。以 U6 为内参基因,用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  的方法表示 miR-455b-3p 相对于内参基因的定量。引物序列见表 1。

表 1 实验相关引物序列

目的基因	引物序列(5'-3')
miR-455-3p	F: CGCAGTCCATGGGCATATACAC R: GAATCGAGCACCACTTACCG
APN	F: AGTTGGATGGCAGGC R: GTCTCACCTTAGGACCAAGAA
FABP4	F: AAATCACCGCAGACGACA R: CACATTCCACCACAGCT
PPAR $\gamma$	F: GTGCTGACCCCAAGAAGGA R: GAGGTGGTTGTGAAAAGG
C/EBP $\alpha$	F: GTGAAAGCAGCAAAGAGGCA R: TTGGGTCAGGGGTGTTATT
U6	F: GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT R: CGCTTCACGAAATTTGCGTGCAT

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS 17.0 软件进行数据分析。进行方差齐性检验、正态性检验。计量资料实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。单变量两组资料之间的比较采用  $t$  检验;多组资料之间的比较采用单因素方差分析;方差不齐采用非参数检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

**2.1 患者的基本信息** 34 例患者的基本临床信息见表 2。其中,与对照组比较,实验组患者低密度脂蛋白和超敏 C 反应蛋白升高,高密度脂蛋白和 APN 降低,差异有统计学意义。

表 2 患者的基本信息( $\bar{x} \pm s$ )

项目	对照组 (n=16)	实验组 (n=34)	t 值	P 值
年龄(岁)	61.9 $\pm$ 5.5	66.5 $\pm$ 7.3	4.426	0.132
体质指数(kg/m <sup>2</sup> )	22.37 $\pm$ 2.83	23.61 $\pm$ 2.67	13.420	0.178
腰围(cm)	98.15 $\pm$ 9.55	100.43 $\pm$ 9.78	17.170	0.861
空腹血糖(mmol/L)	6.28 $\pm$ 0.25	6.45 $\pm$ 0.29	1.790	0.083
总胆固醇(mmol/L)	4.78 $\pm$ 1.20	5.08 $\pm$ 1.03	1.812	0.081
三酰甘油(mmol/L)	2.60 $\pm$ 1.43	2.64 $\pm$ 1.28	3.105	0.327
低密度脂蛋白(mmol/L)	1.23 $\pm$ 0.30	3.12 $\pm$ 0.09	8.123	<0.01
高密度脂蛋白(mmol/L)	2.64 $\pm$ 0.80	3.02 $\pm$ 0.77	24.240	<0.01
超敏 C 反应蛋白(mg/ml)	1.48 $\pm$ 0.22	2.94 $\pm$ 0.37	16.860	<0.01
APN( $\mu$ g/ml)	11.78 $\pm$ 2.65	9.59 $\pm$ 2.73	47.420	<0.05

**2.2 实验组与对照组配对比较** 图 1 为使用散点

图显示两组之间倍数变化和显著性之间的关系。Y 轴是  $-\log_{10}(P \text{ 值})$  (较高的值表示较大的显著性),并且 X 轴是倍数变化,即  $\log_2(\text{miRNAs 的表达量})$ 。确定为显著的探针在 plot 上标记(FDR  $t$  检验  $< 0.05$ )。图中的红点表示差异有统计学意义的 miRNA。

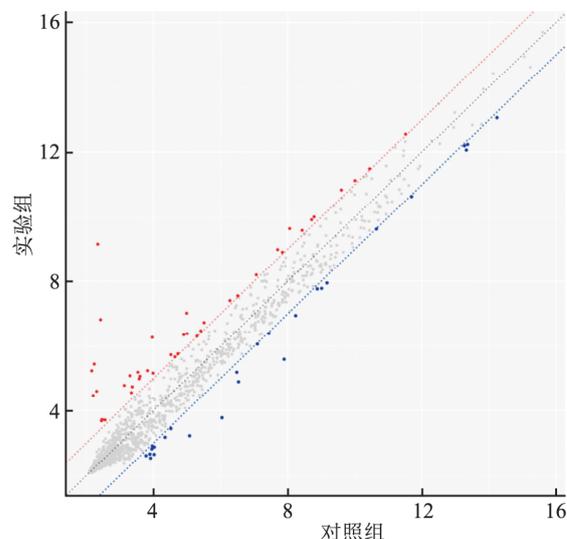


图 1 实验组与对照组配对比较的散点图

**2.3 miRNA 芯片筛选出的 DE-miRNAs 热图结果**

图 2 为 CAD(n=4) 与对照(n=3) 中差异表达的 miRNA 的分层聚类(差异有统计学意义,  $P < 0.05$  和差异倍数  $> 2$  倍)。Columns 显示 EAT 样品的聚类,行显示基因的聚类。每个样品中每种 miRNA 的表达强度从红色变为绿色,这分别表示相对高或低的表达。在图的侧面描绘了代表上调至下调的不同模式的表达簇。

**2.4 实验组和对照组 EAT 及血清中 miR-455b-3p 表达水平** qRT-PCR 验证结果显示,与对照组比较,miR-455b-3p 在实验组 EAT 组织和血清中表达均上调,差异有统计学意义,见图 3。

**2.5 miR-455b-3p 与 APN 和 FABP4 3'非翻译区(3'-UTR) 互补结合位点** 选取 PicTar(<http://pictar.org/>)、miRGen(<http://www.diana.pcbi.upenn.edu/miRGen.html>)、TargetScan([http://www.targetscan.org/vert\\_50/](http://www.targetscan.org/vert_50/))、miRWalk(<http://www.microrna.org/microrna/>) 和 miRDB(<http://mirdb.org/miRDB/>) 四个预测网站进行。为了减少软件预测的假阳性,取至少同时满足 2 个预测软件的基因才能作为靶基因。图 4 为预测出的结合位点。

**2.6 miR-455b-3p 表达谱** 3T3-L1 前脂肪细胞诱

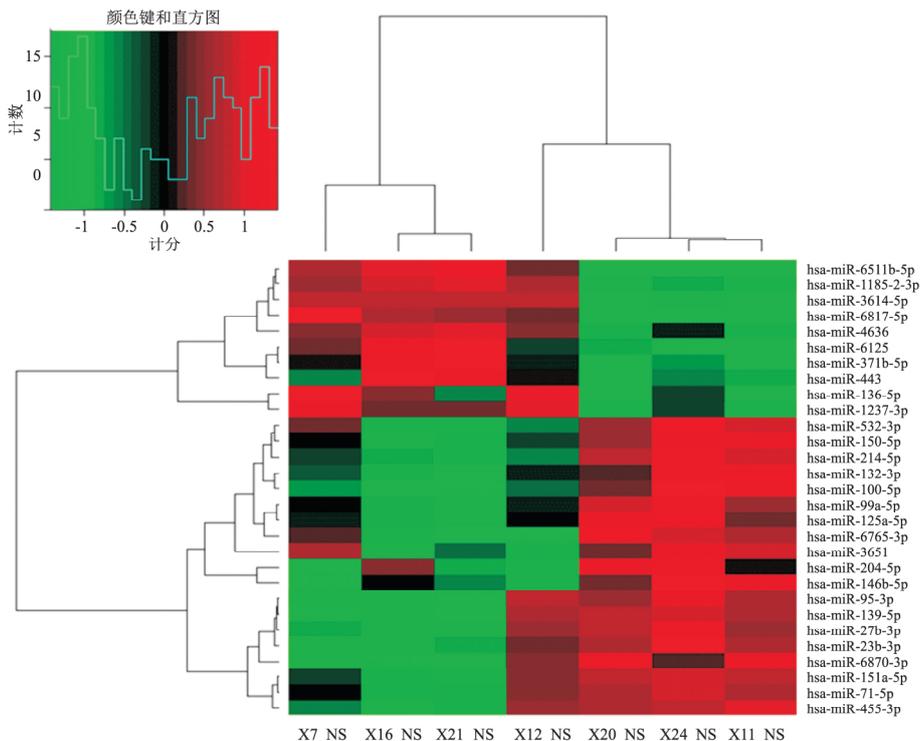


图2 差异 miRNA 分层聚类热图

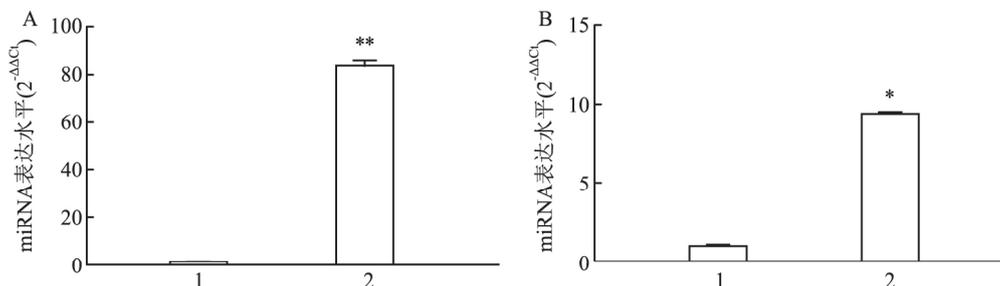


图3 实验组与对照组 EAT 和血清中 miR-455b-3p 表达水平

A: EAT 中 miR-455b-3p 表达水平; B: 血清中 miR-455b-3p 表达水平; 1: 实验组; 2: 对照组; 与对照组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

	Predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)	Site type	Context++ score	Context++ score percentile	Weighted context++ score	Conserved branch length	P <sub>CT</sub>
Position 1822-1828 of ADIPOQ 3' UTR	5' ... GCADGATDCGGGCUUACUGCAAC... 3' CACAUATAACGGGUAACCGACGUA	7mer-A1	-0.02	46	-0.01	0.163	< 0.1
hsa-miR-455-3p 2	3' CACAUATAACGGGUAACCGACGUA	7mer-m8	-0.22	96	-0.22	0.124	< 0.1
Position 3661-3667 of ADIPOQ 3' UTR	5' ... AADGUGUUCUACAGACUGCAU... 3' CACAUATAACGGGUAACCGACGUA	7mer-A1	-0.02	46	-0.01	0.163	< 0.1
hsa-miR-455-3p 2	3' CACAUATAACGGGUAACCGACGUA	7mer-m8	-0.22	96	-0.22	0.124	< 0.1
Position 18-25 of FABP4 3' UTR	5' ... CAAGGGAGUUGACUGGACUGA... 3' CACAUATAACGGGUAACCGACGUA	8mer	-0.61	99	-0.61	3.600	0.29
hsa-miR-455-3p 1	3' CACAUATAACGGGUAACCGACGUA	8mer	-0.61	99	-0.61	3.600	0.29

图4 miR-455b-3p 与 APN 3'-UTR 结合位点

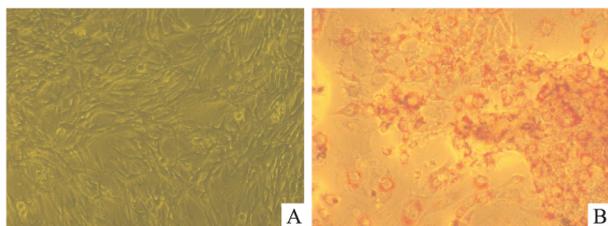


图5 诱导 8 d 后油红 O 染色 ×200  
A: 3T3-L1 前脂肪细胞; B: 油红 O 染色结果

导 8 d 后使用油红 O 染色鉴定诱导效率(图 5)。3T3-L1 前脂肪细胞经过鸡尾酒法诱导后分别于诱导 0、2、4、6、8 d 检测 miR-455b-3p 的表达(图 6A)。  
**2.7 miR-455b-3p 对 APN 及脂肪细胞因子表达影响** 分别在脂肪细胞诱导分化成熟 0、2、4、6、8 d 时检测 miR-455b-3p 在 3T3-L1 细胞中的表达 结果显示 miR-455b-3p 呈先增多后减少并在 8 d 时达到最高的趋势(图 6A); miR-455b-3p 转染的 3T3-L1 细胞

在转染后 2 d 通过 qRT-PCR 检测,结果显示,miR-455b-3p 表达为转染前约 15 倍(图 6B)。对已诱导成熟的 3T3-L1 脂肪细胞转染 miR-455b-3p 模拟物,与 NC 组比较,上调组 3T3-L1 脂肪细胞中 APN、KLF4 mRNA 表达减少,IL-6、MCP-1 mRNA 表达增多,差异有统计学意义(图 7A);下调组 3T3-L1 脂肪细胞中 APN、KLF4 mRNA 表达水平升高,IL-6、MCP-1 mRNA 表达减少,差异有统计学意义(图 7B)。

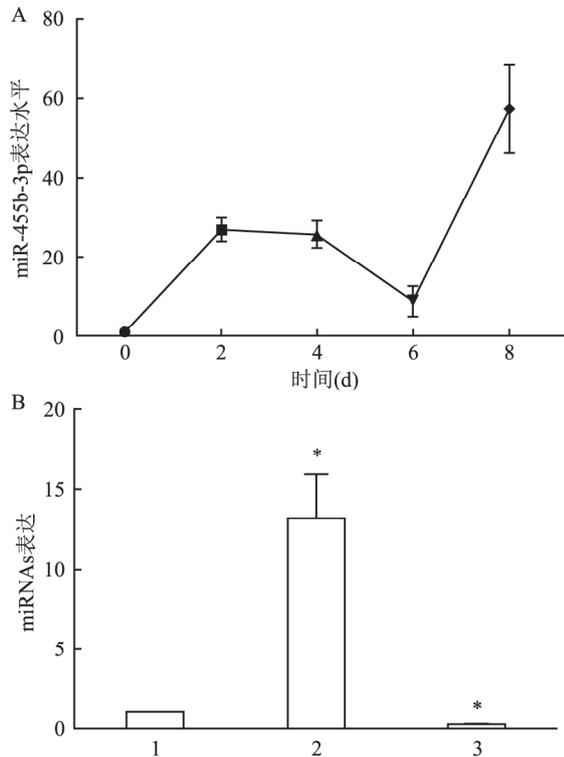


图 6 miR-455b-3p 表达谱及转染效率

A: miR-455b-3p 在脂肪细胞分化过程中表达谱; B: miR-455b-3p 转染效率; 1: NC 组; 2: 上调组; 3: 下调组

**2.8 miR-455b-3p 促进脂肪细胞分化成熟** 如油红 O 染色(图 8)所示,与 NC 组比较,上调组分化第 8 天时脂滴积累较对照组增多,脂肪形成标记基因 PPAR $\gamma$ 、C/EBP $\alpha$  的 mRNA 表达水平升高(图 9)。

### 3 讨论

21 世纪以来,冠心病是欧洲、美国以及亚洲国家导致死亡的最主要原因,占世界死亡人数的近三分之一。CAD 的发生发展与脂代谢紊乱密切相关。EAT 是一种位于心肌和心包脏层之间独特的内脏脂肪组织,EAT 和心肌具有相同的微循环,这表明这两种结构之间有紧密的相互作用<sup>[4]</sup>。研究<sup>[5]</sup>表明 EAT 厚度是 CAD 独立危险因素,其厚度和代谢

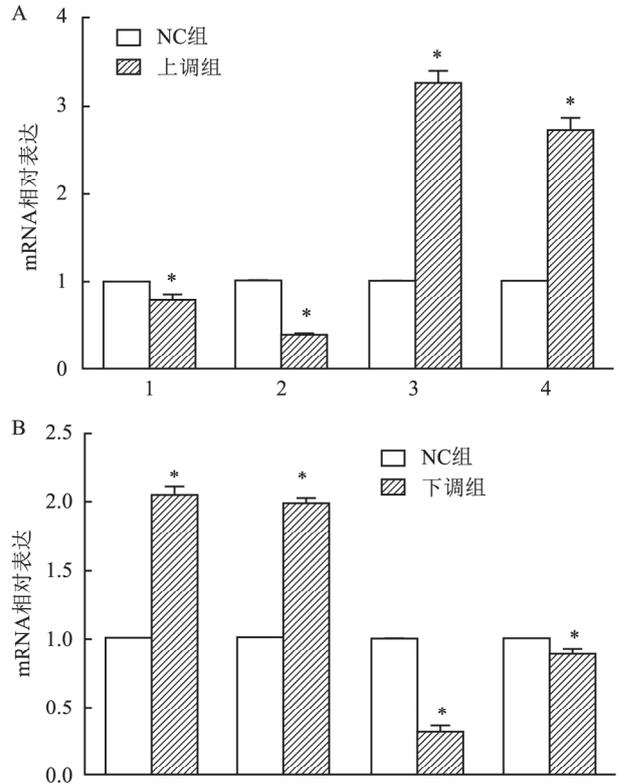


图 7 miR-455b-3p 对脂肪细胞因子表达影响

A: 上调组脂肪细胞因子的表达量; B: 下调组脂肪细胞因子的表达量; 1: APN; 2: KLF4; 3: IL-6; 4: MCP-1; 与 NC 组比较: \*  $P < 0.05$

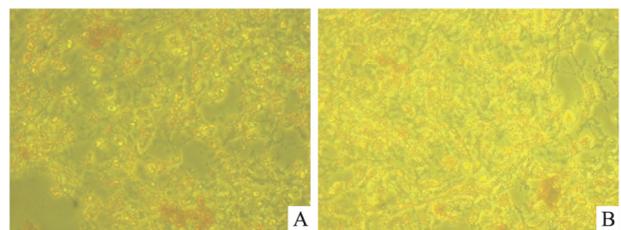


图 8 鸡尾酒法诱导 3T3-L1 前脂肪细胞

8 d 后油红 O 染色鉴定  $\times 100$

A: 3T3-L1 前脂肪细胞; B: 上调组油红 O 染色结果

活性与 CAD 的严重程度呈正相关性,在 CAD 患者中,增厚的 EAT 可能通过分泌促炎性细胞因子和其他机制促进斑块的发展。

APN 是一种脂肪细胞因子,对不同类型细胞具有提高胰岛素敏感性、抗脂毒性、抗凋亡和抗炎作用,被认为是具有保护作用的生物活性蛋白质<sup>[6]</sup>。APN 通过直接影响血管成分细胞(包括巨噬细胞、内皮细胞和平滑肌细胞)的行为来预防动脉粥样硬化进展。本研究显示,CAD 患者 EAT 中高表达的 miR-455b-3p 靶向调控 APN 表达。因此以 miR-455b-3p 为切入点,观察其对 APN 的调控、对脂肪细

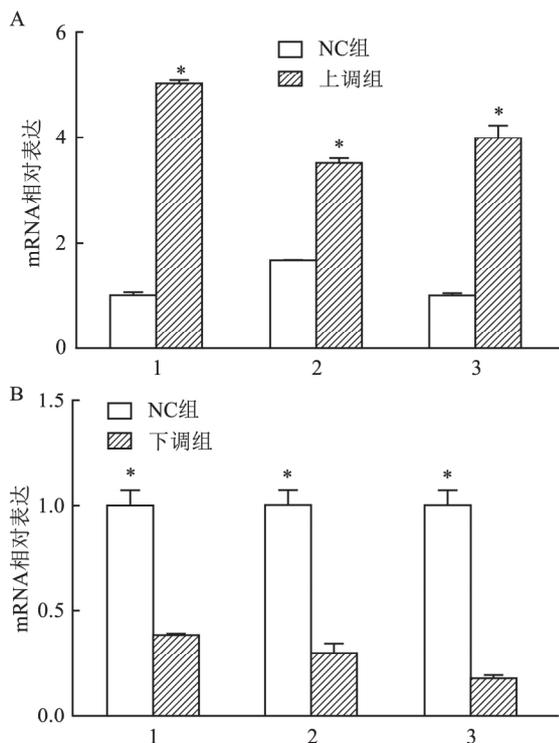


图9 miR-455b-3p对脂肪标志基因影响

A: 上调组脂肪分化标志物的表达量; B: 下调组脂肪分化标志物的表达量; 1: PPAR $\gamma$ ; 2: C/EBP $\alpha$ ; 3: FABP4; 与NC组比较: \*  $P < 0.05$

胞因子表达以及对脂肪细胞分化的影响。

miRNAs是一种具有调节功能的RNA,通过与对应的靶信使RNA(mRNA)特异性结合来直接降解靶mRNA,从而抑制靶mRNA的翻译,进行基因的转录后水平调控<sup>[7]</sup>。miRNAs在脂肪组织中表达有差异,因此被认为是代谢紊乱、CAD、2型糖尿病的诊断和治疗潜在生物学标志物<sup>[8]</sup>。近年来,人们对miRNA在脂肪细胞发育和肥胖的研究越来越深入<sup>[9]</sup>。研究<sup>[10]</sup>显示miR-183通过靶向Smad4级联调节PPAR $\gamma$ 、C/EBP $\alpha$ 、SREBP-1c和FAS,从而促进脂肪细胞分化。最近研究<sup>[11]</sup>表明,将miR-17-5p抑制剂尾静脉注入动脉粥样硬化小鼠体内后,动脉血管组织中的炎症反应和氧化应激水平有所降低。本研究显示,CAD患者的EAT和血清中miR-455b-3p高表达,高表达的miR-455b-3p可能通过调控APN和FABP4,从而引起脂代谢紊乱和炎症,并且促进脂肪细胞分化成熟。

肥胖既是心血管疾病的独立危险因素,也与其他几种危险因素密切相关。脂肪细胞分化与人体肥胖的发生密切相关。脂肪分化过程由几种转录因子组成的调控网络进行高度程序化调控,包括CCAAT/增强子结合蛋白(C/EBP)基因家族和过氧化物

酶体增殖物激活受体- $\gamma$ (PPAR $\gamma$ )<sup>[12]</sup>,在这些因子中,最主要的是PPAR $\gamma$ 和C/EBP $\alpha$ 。

动脉粥样硬化是动脉血流中内皮层紊乱、单核细胞迁移至血管壁并分化为巨噬细胞及泡沫细胞的炎症反应<sup>[13]</sup>。KLF4是一类具有锌指结构的转录因子,KLF4能够激活IL-10基因的表达,起到抗炎作用<sup>[14]</sup>。IL-6主要通过其介导的信号通路促进炎症反应,是一种目前已知的炎症因子<sup>[15]</sup>。MCP-1也称为趋化因子(CC基序)配体2(CCL2),参与炎症、伤口愈合、纤维化和血管形成过程。

综上,在冠心病心外膜脂肪组织中,脂代谢紊乱可能间接上调miR-455b-3p表达,而miR-455b-3p靶向调控APN表达,从而影响KLF4、IL-6和MCP-1等脂肪细胞因子分泌,导致其表达紊乱。同时miR-455b-3p能够促进脂肪细胞分化成熟,促进EAT在心外膜沉积及体积增多,从而引起CAD的发生发展,但其具体机制尚待进一步探究。

## 参考文献

- [1] Wang H, Abajobir A A, Abate K H. Global, regional, and national under-5 mortality, adult mortality, age-specific mortality, and life expectancy, 1970-2016: a systematic analysis for the global burden of disease study 2016 [J]. Lancet 2017, 390(10100): 1084-150.
- [2] Vinkhuyzen A, Wray N, Yang J, et al. Estimation and partition of heritability in human populations using whole-genome analysis methods [J]. Annu Rev Genet 2013, 4(7): 75-95.
- [3] Zhang L, Dong B, Ren P, et al. Circulating plasma microRNAs in the detection of esophageal squamous cell carcinoma [J]. Oncol Lett 2018, 16(3): 3303-18.
- [4] Iacobellis G. Epicardial and pericardial fat: close, but very different [J]. Obesity (Silver Spring) 2009, 17(4): 625-7.
- [5] Ahmadi R, Heidarian E, Fadaei R, et al. miR-342-5p expression levels in coronary artery disease patients and its association with inflammatory cytokines [J]. Clin Lab, 2018, 64(4): 603-9.
- [6] Liu Z, Gan L, Wu T, et al. Adiponectin reduces ER stress-induced apoptosis through PPAR $\alpha$  transcriptional regulation of ATF2 in mouse adipose [J]. Cell Death Dis, 2016, 7(11): e2487.
- [7] Bartel D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. Cell 2004, 116(2): 281-97.
- [8] Vacca M, Di Eusanio M, Cariello M, et al. Integrative miRNA and whole-genome analyses of epicardial adipose tissue in patients with coronary atherosclerosis [J]. Cardiovasc Res 2016, 109(2): 228-39.
- [9] Deuliis J A. MicroRNAs as regulators of metabolic disease: pathophysiologic significance and emerging role as biomarkers and therapeutics [J]. Int J Obes (Lond) 2016, 40(1): 88-101.
- [10] Zhao W, Yang H, Li J, et al. MiR-183 promotes preadipocyte dif-

- ferentiation by suppressing Smad4 in goats [J]. *Gene* ,2018 ,66 (6) : 158 – 64.
- [11] 谭力力,刘丽敏. miR-17-5p 在动脉粥样硬化小鼠中的作用机制研究[J]. *安徽医科大学学报* ,2018 ,53(6) : 889 – 93.
- [12] Kotsis V , Nilsson P , Grassi G , et al. New developments in the pathogenesis of obesity-induced hypertension [J]. *J Hypertens* , 2015 33(8) : 1499 – 508.
- [13] Tada H , Nohara A , Inazu A , et al. Sitosterolemia , hypercholesterolemia , and coronary artery disease [J]. *J Atheroscler Thromb* , 2018 25(9) : 783 – 9.
- [14] Pollak N M , Hoffman M , Goldberg I J , et al. Kruppel-like factors: crippling and un-crippling metabolic pathways [J]. *JACC Basic Transl Sci* 2018 3(1) : 132 – 56.
- [15] Ferrandi P J , Fico B G , Whitehurst M , et al. Acute high-intensity interval exercise induces comparable levels of circulating cell-free DNA and interleukin-6 in obese and normal-weight individuals [J]. *Life Sci* 2018 20(2) : 161 – 6.

## miR-455b-3p regulates adipocyte differentiation and inflammatory factors in coronary heart disease EAT

Du Yayan<sup>1</sup> , Liu Yang<sup>2</sup> , Lu Mu<sup>3</sup> , et al

(<sup>1</sup>*School of Medicine Shihezi University Key Laboratory of Xinjiang Ethnic and Endemic Diseases , Ministry of Education , Shihezi 832000;* <sup>2</sup>*Dept of Cardiothoracic Surgery , Guangdong Second Provincial General Hospital , Guangdong 510000;* <sup>3</sup>*Dept of Emergency , Beijing CHAO-YANG Hospital , Capital Medical University , Beijing 100020)*

**Abstract Objective** To investigate the differential expression of microRNAs ( DE-miRNAs) in patients with coronary atherosclerotic heart disease ( CAD) and non-CAD , in which miR-455b-3p chemotaxis of adipocytokines adiponectin( APN) , Kruppel-like factor 4 ( KLF4) , interleukin-6 ( IL-6) and monocyte cytokines protein 1 ( MCP-1) secretion and its effects on adipocyte differentiation. **Methods** Epicardial adipose tissue( EAT) and blood samples were collected from CAD ( 34 cases) and non-CAD ( 16 cases) patients. DE-miRNAs in EAT were screened by miRNA microarray technique. Real-time quantitative PCR ( qRT-PCR) was used to detect miR-455b-3p in specimens. The expression level of miR-455b-3p mimics , miR-455b-3p inhibitors and NC were transfected into precursor. The expression of APN , KLF4 , IL-6 , MCP-1 mRNA and adipocyte differentiation markers peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ( PPAR $\gamma$ ) and CCAAT/enhancer binding protein  $\alpha$  ( C/EBP $\alpha$ ) and fatty acid binding protein 4 ( FABP4) mRNA were detected by qRT-PCR after 24 h of transfection. **Results** Compared with the non-CAD group , 29 DE-miRNAs were screened out in the EAT specimens (  $P < 0.05$  , difference multiples  $> 2$ ) , of which 10 were down-regulated and 19 were up-regulated. miR-455b-3p was a DE-miRNA that had a complementary binding site or was closely related to the ADIPOQ 3'-UTR. The qRT-PCR results showed that the expression of miR-455b-3p was elevated in CAD patients compared with the non-CAD group. Compared with the miR-NC group , after transfection of miRs of miR-455b-3p , the expression of APN and KLF4 mRNA was decreased and the expression of IL-6 and MCP-1 mRNA was increased in mature 3T3-L1 adipocytes; After transfected miR-455b-3p inhibitor , APN and KLF4 mRNA expression levels increased , IL-6 and MCP-1 mRNA expression decreased; adipocyte differentiation markers PPAR $\gamma$  , C/EBP $\alpha$  , FABP4 mRNA expression increased. **Conclusion** There are differentially expressed miRNAs in EAT of CAD patients , in which miR-455b-3p is highly expressed. miR-455b-3p affects the expression of adipocytokines APN , KLF4 , IL-6 and MCP-1 , and promotes adipocyte differentiation and mature , thereby affecting the occurrence and development of coronary heart disease.

**Key words** coronary artery disease; epicardial adipose tissue; microRNAs; adiponectin; adipocyte differentiation