

circRNA-miRNA-mRNA 网络解析 AVF 血管重塑机制

赵明¹, 陈水玲², 李万军¹, 年瑞¹, 陈伟¹, 路宏朝^{2*}

1. 陕西汉中三二〇一医院, 陕西 汉中 723001

2. 陕西理工大学生物科学与工程学院, 陕西 汉中 723001

DOI:10.61369/MRP.2026090042

摘要 : 自体动静脉内瘘 (Arteriovenous Fistula, AVF) 狭窄与转录后调控驱动的血管重构密切相关。测序共筛得 211 个差异 miRNA 和 866 个差异 circRNA。ceRNA 分析提示, miR-665/miR-296 轴可能通过调控 CREB3L1 和 RXFP1, 促进平滑肌细胞增殖及炎症、纤维化反应, 参与内瘘失功进程。该轴有望作为 AVF 狭窄的潜在预警与干预靶点。

关键词 : 自体动静脉内瘘; 血管生成; 全转录组学

circRNA-miRNA-mRNA Network in AVF Remodeling

Zhao Ming¹, Chen Shuiling², Li Wanjun¹, Nian Rui¹, Chen Wei¹, Lu Hongchao^{2*}

1. Shaanxi Hanzhong 3201 Hospital, Hanzhong, Shaanxi 723001

2. School of Biological Science and Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong, Shaanxi 723001

Abstract : AVF stenosis is closely associated with vascular remodeling driven by post-transcriptional regulation. High-throughput sequencing identified 211 differentially expressed miRNAs and 866 differentially expressed circRNAs. ceRNA network analysis suggests that the miR-665/miR-296 axis may regulate CREB3L1 and RXFP1, thereby promoting vascular smooth muscle cell proliferation, inflammation, and fibrosis, and contributing to AVF failure. This regulatory axis may serve as a potential biomarker and therapeutic target for AVF stenosis.

Keywords : Arteriovenous Fistula; angiogenesis; whole transcriptomics

概述

近年来,慢性肾脏病患病率持续攀升,终末期肾病患者主要依赖血液透析等肾脏替代治疗^[1]。AVF 因感染风险低、长期通畅率高及血流动力学稳定被公认为首选血管通路,然而血栓形成、内膜增生及血管狭窄导致的 AVF 失功机制尚未完全阐明,传统血流动力学理论难以充分解释其发生发展过程^[2]。近年来研究发现,miRNA 和 circRNA 介导的表观遗传调控在血管重塑中发挥重要作用。其中,miR-21 可激活 TGF- β 信号通路,miR-221/222 通过靶向抑制 p27/p57 促进血管平滑肌细胞增殖;而 circRNA 凭借稳定的环状结构,可作为竞争性内源 RNA (ceRNA) 或结合 RNA 结合蛋白参与基因表达调控,共同影响血管平滑肌细胞增殖与凋亡平衡,促进内膜增生和血管狭窄的发生^[3,4]。基于此,本研究拟评价局部 miRNA/circRNA 作为 AVF 失功分子标志物的临床价值,并构建风险预测模型,为 AVF 失功的早期预警及精准干预提供依据。

一、实验方法

(一) 临床样本收集与组织学检测

收集 AVF 失功重建术患者的狭窄静脉组织为 AVF 组,初次内瘘成形术患者的正常静脉组织为 Control 组,每组 6 个生物学重复,组织经液氮速冻后于 -80℃ 保存。静脉标本经中性福尔马林固定后,梯度乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋,切 5 μ m 切片,脱蜡至水。HE 染色依次行苏木精染色 5 分钟、1% 乙醇 - 冰醋酸

分化 3 秒、伊红复染 3 分钟;Masson 染色依次行天青石蓝 5-10 分钟、Mayer 苏木素 10 分钟、丽春红酸性品红 5-10 分钟、磷钼酸 5 分钟、苯胺蓝 3-5 分钟,1% 冰醋酸冲洗后封片。

(二) 全转录组测序与生物信息学分析

TRIzol 法提取组织总 RNA,质检合格后分别构建 miRNA 及 circRNA 文库,于 Illumina HiSeq 平台测序。以 $|\log_2FC| > 1$ 且 $P < 0.05$ 筛选差异表达分子,利用 miRanda、TargetScan 预测 miRNA 靶基因及 circRNA-miRNA 互作关系,结合 GO 与 KEGG 富集分析构建 ceRNA

基金项目: 通用技术集团医疗健康有限公司 2023 年度科研基金项目 (TYYLKYJJ-2023-013)。

通讯作者: 路宏朝。

调控网络。将靶基因导入 STRING 数据库 (v11.5, score ≥ 0.9) 获取 PPI 数据, Cytoscape (v3.10.0) 可视化后以 Network Analyzer 计算度中心性、介数中心性等拓扑参数, 识别核心调控蛋白。

二、结果

(一) 组织学特征与差异表达谱

与对照组相比, AVF 组内膜和中膜均增厚, 内膜表面不平且与中膜界限模糊, 增生内膜凸向管腔甚至致其闭塞; 细胞形态不规则、排列紊乱, 胶原纤维密集增生且分布紊乱 (图1)。差异基因表达分析显示, AVF 组鉴定出211个显著差异 miRNA, 113个上调, 98个下调 (图1N), 火山图与聚类热图分别展示其整体分布与表达模式 (图1O,P), 其中44个显著上调 (如 miR-382-5p、miR-1185-1-3p、miR-146b-3p), 26个显著下调 (如 miR-582-5p、miR-548b-3p、miR-628-5p); AVF 组共检出866个差异 circRNA, 256个上调, 610个下调 (图1Q), 火山图与聚类热图显示其整体分布 (图1R,S), 筛选出8个显著上调 circRNA (如 CREB3L1、ASAP1、RXFP1) 和34个显著下调 circRNA (如 LIFR、MYOCD、NOX4)。

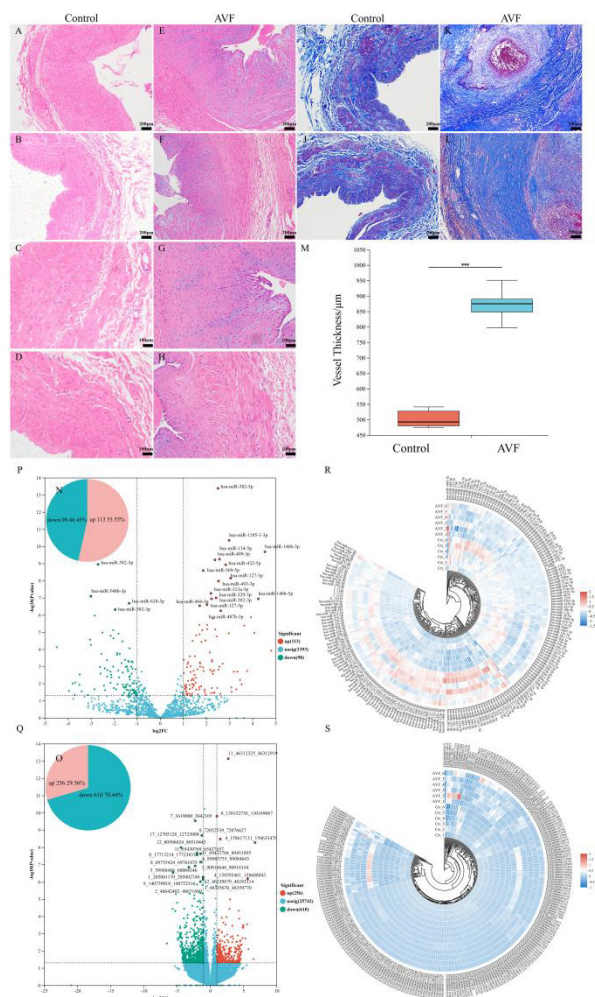


图1 AVF 狭窄组织学特征与差异表达谱 A-H. 对照组 (A-D) 与 AVF 组 (E-H) HE 染色; I-L. 对照组 (I-J) 与 AVF 组 (K-L) Masson 染色; M. 血管壁厚度定量比较; N-O. 差异表达 miRNA (N) 与 circRNA (O) 上下调比例; P-Q. 差异 miRNA (P) 与 circRNA (Q) 火山图; R-S. 差异 miRNA (R) 与 circRNA (S) 聚类热图。

(二) 功能富集与互作网络分析

差异 miRNA 靶基因主要富集于细胞外基质 (ECM) 重塑、血管生成及细胞黏附等生物过程, 分子功能以胶原结合和 PDGF 活性为主, 提示生长因子信号与 ECM 代谢共同参与血管重构。AGE-RAGE 及补体 / 凝血级联通路同步激活, 提示炎症、氧化应激和血栓形成参与 AVF 病变 (图2A-B)。差异 circRNA 则主要富集于白细胞趋化、炎症反应及趋化因子、NF- κ B 信号通路, 呈现明显的免疫炎症特征 (图2C-D)。

基于差异表达谱构建 ceRNA 网络, 160个差异 mRNA 和382个 miRNA 靶基因分别与差异 miRNA、circRNA 形成82组和37组共表达关系 (图2E-F)。miRNA-circRNA 网络包含26组互作, 以 miR-665和 CAMK2G 为核心 (图2G); miRNA-mRNA 网络包含55组互作, hsa-miR-29b-5p、miR-27b-3p 及 miR-296-3p 连接度较高, MEGF8、COL5A2 和 MYOT 为主要靶基因 (图2H)。整合网络共纳入23个 circRNA、31个 miRNA 和71个 mRNA, 形成127组调控关系 (图2I), 其中 CAMK2G、UNC13C 可能参与钙信号和内皮功能调控, miR-766-3p、miR-301a-5p 等枢纽 miRNA 与纤维化及内膜增生密切相关。

PPI 分析显示, miRNA 靶基因网络 (157个节点、300条互作) 以 COL1A1、COL1A2、COL3A1 和 MMP9 为核心 (图2J); circRNA 网络 (119个节点、300条互作) 则以 IL1 β 为枢纽, MMP9、CXCL8 和 CCR7 连接度较高 (图2K)。两类网络功能各有侧重: 前者主要涉及 ECM 重塑、WNT 信号及染色质调控, 后者则集中于免疫炎症、细胞迁移和代谢重编程。MMP9 同时位于两类网络中心, 连接 ECM 降解与炎症放大过程, 可能是促进 AVF 狭窄进展的重要枢纽分子。

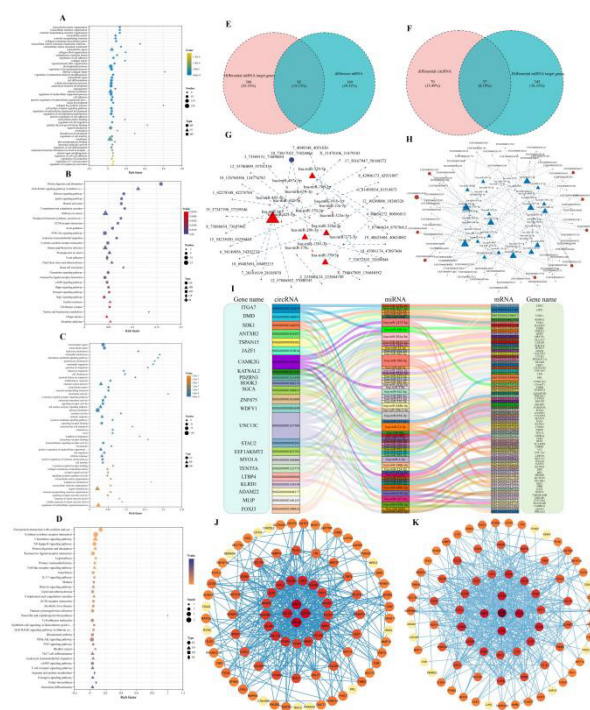


图2 功能富集与分子互作网络分析 A-D. miRNA 靶基因 (A-B) 与 circRNA (C-D) 的 GO 及 KEGG 富集分析; E-F. 差异 mRNA、miRNA 及 circRNA 间共表达关系的维恩图; G-H. miRNA-circRNA 与 miRNA-mRNA 互作网络; I. ceRNA 关联网络; J-K. miRNA 靶基因与 circRNA 的蛋白质互作 (PPI) 网络。

三、讨论

AVF 非血栓性狭窄以静脉内膜增生为主要病理特征,其发生是血流动力学刺激与炎症微环境共同作用下血管壁重构失衡的结果^[5]。TGFβ/Smad、PDGF 及 TLR4 等信号持续激活血管平滑肌细胞(VSMC)、促进炎症浸润及 ECM 沉积,最终导致管壁纤维化及顺应性下降^[6],这一过程受表观遗传调控网络广泛参与。

本研究发现,AVF 狭窄涉及多层次 RNA 调控。circRNA 网络中,CAMK2G 作为钙信号关键节点,可调控钙稳态及 NFAT 核转位,影响血管收缩、炎症及细胞增殖^[7]。miRNA 网络中,miR-665、miR-301a-5p 及 miR-766-3p 分别关联 Hippo/自噬、VEGF/TGFβ-PI3K-AKT 及 Wnt/NFκB 通路,共同调节内皮功能、VSMC 表型及炎症反应^[8,9,10]。mRNA 层面,COL5A2

可能促进 EMT 及基质重塑,LIFR 则主要参与 JAK-STAT3 和 PI3K/AKT 介导的免疫调控^[11,12]。ceRNA 与 PPI 联合分析进一步表明,两类网络具有明显的功能分工:miRNA 靶基因主要富集于 WNT 信号、ECM 重塑及染色质调控,而 circRNA 网络更偏向炎症反应和代谢重编程。值得注意的是,MMP9 同时位于两类网络的核心,既参与 ELN 降解和 ECM 重塑,又连接 CCL2-MMP9 及 IL1B-CXCL8 等炎症轴,提示其可能是连接基质重构与炎症放大的关键分子^[13]。

这些结果表明,miRNA 与 circRNA 协同参与 AVF 狭窄的发生发展,为内瘘失功的早期识别及靶向干预提供了新的候选分子。后续仍需结合单细胞测序及功能实验,对关键调控轴进行进一步验证。

参考文献

- [1]Khajedaluee M,Ahmadi Ghezeldasht S,Mosavat A,et al.Prevalence and risk factors of chronic kidney disease in a populated area with highly moving populations[J/OL].medRxiv,2020.
- [2] 陈立洲,姚立正,李文会,等.自体动静脉内瘘阻塞介入治疗疗效和术后通畅率影响因素分析[J].医学影像学杂志,2022,32(3):500-504.
- [3] 沈凤,陶晓静,欧和生等.miRNA-145对血管平滑肌细胞功能调节与心血管疾病研究进展[J].生理科学进展,2017(05):357-361.
- [4]Greene J,Baird AM,Brady L,Lim M,et al.Circular RNAs:biogenesis, function and role in human diseases[J].Front Mol Biosci.2017;4:38.
- [5] 廖露,邹丽婷,付梦茹,等.血清代谢组学与维持性血液透析患者自体动静脉内瘘狭窄的关系[J].中国血液净化,2023,22(03):206-209.
- [6] 魏思琪,孔德阳.动静脉内瘘成熟障碍机制研究进展[J].肾脏病与透析肾移植杂志,2021,30(04):384-388.
- [7] 叶祖扬,邹迪莎,潘麟.自体动静脉内瘘手术前后血管组织病理改变的研究进展[J].临床肾脏病杂志,2019,19(08):633-636.
- [8] 叶才博,陈祥宇,杜杰勇,等.基于 miR-665/DRAM1 信号介导的自噬探讨补阳还五汤延缓血管衰老的作用[J].南京中医药大学学报,2024,40(04):369-378.
- [9]Yingying H,Xiaoxiao D,Xiangliu C,et al.MiR-301a-5p/SCIN promotes gastric cancer progression via regulating STAT3 and NF-κB signaling.[J].Journal of Cancer,2021,12(18):5394-5403.
- [10]Zhiqin L,Yang L,Jingya Y,et al.Circular RNA hsacirc0056836 functions an oncogenic gene in hepatocellular carcinoma through modulating miR-766-3p/FOSL2 axis.[J].Aging,2020,12(3):2485-2497.
- [11]Yanfeng J,Xinyan S,Xuankai S,et al.Up-regulation of collagen type V alpha 2(COL5A2) promotes malignant phenotypes in gastric cancer cell via inducing epithelial-mesenchymal transition (EMT)[J].Open Medicine,2023,18(1):20220593.
- [12]Giorgio D C,Morretta E,Lupia A,et al.Bile acids serve as endogenous antagonists of the Leukemia inhibitory factor(LIF)receptor in oncogenesis.[J].Biochemical pharmacology,2024,223:116134.
- [13]Katarzyna A,Anita H,Renata T,et al.MMP9:A Tough Target for Targeted Therapy for Cancer[J].Cancers,2022,14(7):1847-1847.