

[6] 蔡一非,钟旗,伊日盖,等. 两奶牛场布氏杆菌分离鉴定及四种血清学检测方法比较[J]. 中国人兽共患病学报, 2009, 25(5): 456-459.

[7] Minas A, Stournara A, Christodouloupoulos G, et al. Validation of a competitive ELISA for diagnosis of Brucella melitensis infection in sheep and goats[J]. Vet J, 2008,

177(3): 411-417.

[8] 刘晓民,杨华,高明春,等. 3 种奶牛布鲁氏菌病血清学检测方法的贝叶斯评估[J]. 畜牧兽医学报, 2010, 41(4): 449-453.

(收稿日期:2017-02-08 修回日期:2017-04-12)

• 临床研究 •

血清 miRNA-21、miRNA-126 异常表达对慢性心力衰竭患者的临床意义

谭顺林

(资阳市第一人民医院内科,四川资阳 641300)

摘要:目的 探讨循环血清 miRNA-21、miRNA-126 检测对慢性心力衰竭患者的临床意义。方法 选取该院收治的慢性心力衰竭患者 128 例(CHF 组)为研究对象(NYHA 心功能 II 级 40 例, NYHA 心功能 III 级 46 例, NYHA 心功能 IV 级 42 例),另选择同期 100 例体检中心健康患者为对照组,采用实时荧光定量 PCR(qPCR)检测血清 miRNA-21 和 miRNA-126 水平,同时测定 CHF 患者 B 型脑钠肽(BNP)、左室舒张末内径(LVEDD)和左室射血分数(LVEF),并进行统计学分析。结果 CHF 组患者血清 miRNA-21 和 miRNA-126 水平显著高于健康对照组($P < 0.05$);心功能 IV 级患者 miRNA-21 水平显著高于心功能 II 级、III 级患者($P < 0.05$),心功能 III 级患者 miRNA-21 显著高于心功能 II 级患者($P < 0.05$);心功能 IV 级患者 miRNA-126 水平显著高于心功能 II 级、III 级患者($P < 0.05$),但是心功能 II 级、III 级患者间比较差异无统计学意义($P > 0.05$);CHF 患者血清 miRNA-21 水平与 BNP($r = 0.792, P = 0.001$)、LVEDD($r = 0.618, P = 0.003$)呈正相关,与 LVEF 呈负相关($r = -0.521, P = 0.010$),血清 miRNA-126 水平与 BNP 呈正相关($r = 0.753, P = 0.001$),与 LVEDD($r = 0.207, P = 0.096$)、LVEF($r = -0.159, P = 0.176$)无明显相关性;血清 miRNA-21(RR: 2.158, 95% CI: 1.681~3.539, $P = 0.005$)和 miRNA-126(RR: 1.852, 95% CI: 1.105~2.996, $P = 0.012$)均是 CHF 的独立危险因素。结论 慢性心力衰竭患者血清 miRNA-21、miRNA-126 水平异常升高,二者可能参与了慢性心力衰竭的发生与进展,是其独立危险因素。

关键词:慢性心力衰竭; 血清; miRNA-21; miRNA-126

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2017.13.048

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2017)13-1844-03

慢性心力衰竭(CHF)为常见心血管系统疾病,多由于冠心病、高血压、肺心病等引起,是多种心血管系统疾病的终末期表现^[1]。心肌重构是 CHF 进展过程中的主要病理生理学改变,衰竭心肌的“重构”理论得到众多学者认可,近年来的研究显示在此过程中微小 RNA(miRNA)的表达变化可能扮演重要作用^[2]。miRNA 参与细胞分化、增殖、凋亡,免疫应答,肿瘤发生等一系列病理生理过程,目前在恶性肿瘤疾病得到广泛研究^[3]。最初的研究认为 miRNA 异常表达只存在于组织中,但随着研究的深入,发现 miRNA 失衡表达在循环血液中也具有表现。miRNA-21 和 miRNA-126 可能与心血管疾病有一定关系,Stephan 等^[4]的研究发现外周循环血 miRNA-21 和 miRNA-126 在冠状动脉心脏病呈异常高表达。但是二者是否参与到 CHF 的发病,目前还不十分明确。本研究选择 CHF 患者为研究对象,分析 miRNA-21、miRNA-126 在血清的表达情况,以期明确 miRNA-21、miRNA-126 对 CHF 的临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取本院 2015 年 6 月至 2016 年 6 月收治的 CHF 患者 128 例为研究对象(CHF 组),男 71 例,女 57 例,年龄 45~70 岁,平均(61.9±10.5)岁,病程 1~8 年,平均(6.2±5.1)年。诊断标准:参照中华医学会心血管病分会于 2007 年制定的《慢性心力衰竭诊断治疗指南》^[5],并结合患者临床体征和病史进行诊断, NYHA 心功能 II 级 40 例, NYHA 心功能 III 级 46 例, NYHA 心功能 IV 级 42 例。纳入标准: (1)所有患者 CHF 诊断明确; (2)患者心功能 NYHA 分级在 II~IV 级,左室射血分数(LVEF) < 50%, 病程 ≥ 1 年; (3)排除心肌梗死所致急性心力衰竭,甲状腺功能亢进、频发室性期前收缩至心功能

不全; (4)患者均排除恶性肿瘤,严重肝、肾、肺及代谢性疾病。另选择同期本院健康体检中心健康体检者 100 例为对照组,男: 60 例,女 40 例,年龄: 42~65 岁,平均(58.3±9.2)岁。所有患者均知晓本研究目的、过程和意义,签署知情同意书,本研究得到医院伦理委员会支持。CHF 组与对照组在性别、年龄等一般资料比较差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。

1.2 方法

1.2.1 采集 CHF 患者入院后次日清晨空腹静脉血 5 mL, 促凝管促凝, 室温静置 15~20 min, 4 °C、3 500 r/min 离心 5 min, 取血清置于洁净 1.5 mL 离心管, 保存于 -80 °C 冰箱待测。

1.2.2 cDNA 合成 严格按照血清 RNA 提取试剂盒说明书(美国 Applied Biosyste 公司)提取血清总 RNA, 以分光光度仪检测 A260/280 吸光度, 吸光度值在 1.8~2.2 之间为合格标本。逆转录: 逆转录反应体系: 1.0 μgRNA, 10.0 mmol/L dNTP 0.70 μL, 5×RT 缓冲液 5.0 μL, 逆转录酶 0.25 μL、RNA 酶抑制剂 0.25 μL, 其余以去离子水补足至 20 μL。PCR 仪设置逆转录条件: 16 °C 30 min, 42 °C 30 min, 75 °C 15 min, 待转录结束后置于 -20 °C 冰箱备用。

1.2.3 实时荧光定量 PCR(qPCR) 以 ABI-7300 荧光定量 PCR 仪(ABI 公司, 美国)使用 miRNA Real-time PCR 实时荧光定量反应试剂盒(北京艾德莱生物)进行扩增反应, 以 U6 为内参基因, U6、miRNA-21、miRNA-126 引物序列见表 1(上海生工, 中国)。反应体系: cDNA 产物 1.0 μL, 2×miRNA qPCR Mix 10 μL, 正、反向引物各 0.5 μL, 引物序列见表 1, 去离子水 18 μL。扩增条件: 94 °C 预变性 3 min, 94 °C 35 s, 60 °C 35 s, 72 °C 60 s, 共 40 个循环, 设立 3 个复孔。根据 qPCR 曲线得到

循环数 Ct 值, miRNA-21、miRNA-126 水平采用相对表达量 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 描述。

1.2.4 其他检测 于本院检验科采用 E170 电化学发光仪(罗氏公司, 瑞士)检测患者血清 B 型脑钠肽(BNP)水平; 超声科采用超声多普勒(飞利浦公司, 荷兰)进行心脏超声检测左室舒张末内径(LVEDD)和左室射血分数(LVEF)。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件统计包进行统计学分析。正态性分布检测显示血清 miRNA-21、miRNA-126 相对表达量 $2^{-\Delta Ct}$ 呈非正态分布, 故以 $M(P_{25} \sim P_{75})$ 描述, 采用 Wilcoxon 符号秩和检验; 相关性采用 Spearman 秩相关性分析; COX 比例风险回归模型进行多因素分析 CHF 危险因素。所有结果均以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 引物序列

基因	引物序列(5'~3')
U6	
正向	GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT
反向	CGCTTCACGAATTTGCGTGTTCAT
miRNA-21	
正向	TTTCTTGCCGTTCTGTAA GTG
反向	TGGATATGGATGGTCAGATGAA
miRNA-126	
正向	GCAGGGTCCGAGGTATTCCG
反向	ATGGTTCGTGGGTCGTACCGTGAGTAAT

2 结 果

2.1 CHF 组与对照组血清 miRNA-21、miRNA-126 的比较 CHF 组 miRNA-21 水平为 1.791(1.206~2.083), 显著高于对照组的 1.107(0.872~1.696), 差异有统计学意义 ($P = 0.005$); CHF 组 miRNA-126 水平为 2.518(1.435~3.226), 显著高于对照组的 1.627(1.231~2.384), 差异有统计学意义 ($P = 0.012$)。见图 1。

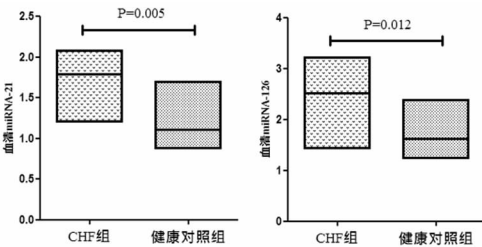


图 1 CHF 组与对照组血清 miRNA-21、miRNA-126 比较

2.2 不同心功能 CHF 患者血清 miRNA-21、miRNA-126 比较 NYHA 心功能 IV 级患者 miRNA-21 水平为 1.985(1.572~2.217), 显著高于心功能 III 级患者的 1.653(1.297~2.151), 及 II 级患者的 1.411(1.082~1.958) ($P = 0.015$ 、 0.008), 心功能 III 级患者 miRNA-21 水平显著高于 II 级患者, 差异有统计学意义 ($P = 0.027$)。NYHA 心功能 IV 级患者 miRNA-126 水平为 2.893(2.271~3.385), 显著高于心功能 III 级患者的 2.173(1.529~3.192), 及 II 级患者的 2.025(1.316~3.037), $P = 0.001$ 、 0.001 , 差异有统计学意义, 但是心功能 III 级与 II 级患者 miRNA-126 水平比较差异无统计学意义 ($P = 0.107$)。见图 2。

2.3 miRNA-21、miRNA-126 与 BNP、LVEDD、LVEF 相关性

miRNA-21 与 BNP、LVEDD 呈正相关 ($P < 0.05$), 与 LVEF 呈负相关 ($P < 0.05$); miRNA-126 与 BNP 呈正相关, ($P < 0.05$), 但是与 LVEDD、LVEF 相关性不具有统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2。

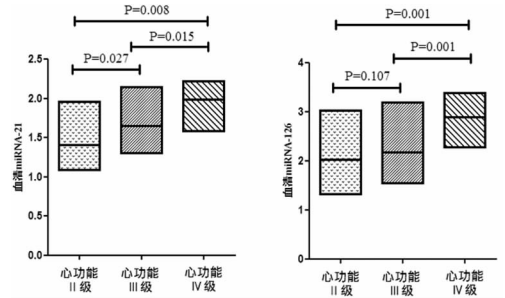


图 2 不同心功能 CHF 患者血清 miRNA-21、miRNA-126 比较

表 2 miRNA-21、miRNA-126 与 BNP、LVEDD、LVEF 相关性

项目	BNP		LVEDD		LVEF	
	r	P	r	P	r	P
miRNA-21	0.792	0.001	0.618	0.003	-0.521	0.010
miRNA-126	0.753	0.001	0.207	0.096	-0.159	0.176

2.4 CHF 危险因素分析 COX 比例风险模型分析显示, miRNA-21、miRNA-126 是 CHF 的独立危险因素, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 3。

表 3 CHF 危险因素分析

因素	β	SE	Wald	P	RR	95%CI
性别	0.432	0.415	1.135	0.259	1.117	0.382~1.512
年龄	0.723	0.557	1.628	0.037	1.511	0.712~1.972
家族遗传史	0.482	0.317	1.203	0.109	1.231	0.688~1.581
miRNA-21	0.619	0.610	1.723	0.005	2.158	1.681~3.539
miRNA-126	0.602	0.583	1.658	0.012	1.852	1.105~2.996

3 讨 论

miRNA 是一类广泛存在于真核细胞且进化高度保守的非编码小分子 RNA, 其长度约为 20~22 个核苷酸, miRNA 主要通过抑制 RNA 翻译或者诱导序列特异性靶 mRNA 降解来调控分化、增殖、凋亡等细胞生物学变化^[1-6]。miRNA 对人体内各类细胞、组织的生物学行为有非常重要的调控作用, 研究显示占比不到人类基因组 3% 的 miRNA 却在超过 30% 的基因调控中扮演关键角色^[7]。既往的观点认为 miRNA 只是在组织中差异性表达, 但事实上 miRNA 也可以在外周循环血中失衡表达。循环血中 miRNA 可能主要来自凋亡或死亡细胞裂解、细胞主动释放、组织损伤等, miRNA 外周循环血中的失衡表达可能在某些疾病具有特异性, 尤其是在恶性肿瘤方面研究较为深入, 部分学者甚至认为外周循环血 miRNA 检测可能会是肿瘤无创检测最可能实现的方法^[8]。miRNA 在心脏组织的失衡表达可能是心脏形态、功能改变的原因之一。CHF 作为多种心血管疾病的终末期表现, 其发病机制十分复杂, miRNA 可能参与到衰竭心肌的“重构”的调控^[9]。Wong 等^[10]对 CHF 患者血浆 miRNA 谱进行检测, 发现 miRNA-190a、miRNA-

1233, miRNA-193b 等较正常人群存在显著性差异表达,提示 miRNA 可能参与到 CHF 发病。

本研究对 CHF 患者血清 miRNA-21、miRNA-126 水平进行检测,结果显示 miRNA-21、miRNA-126 水平要显著高于健康体检人群。miRNA-21 在心脏负荷增加时表达量会明显上调以激活纤维化基因程序,导致心肌细胞纤维化变性,使其最终失去应有生理功能^[11]。Kumarswamy 等^[12]的研究证实,miRNA-21 可以调控 ERK/MAPK 信号通路,miRNA-21 在激活 ERK/MAPK 信号通路后可诱导心肌细胞纤维化改变,在抑制 miRNA-21/ERK/MAPK 通路后心肌纤维化得到明显改善。此外,miRNA-21 被认为参与心肌“重构”过程,是“重构”过程中表达增加最明显的 miRNA 之一。Bang 等^[13]发现,无论是体外实验细胞还是动物模型,miRNA-21 均可以刺激心肌肥厚,导致心功能进一步恶化,其机制可能涉及 miRNA-21 下调 Pdlim5、Sorbs2 等心脏组织关键蛋白。miRNA-126 可以使新生血管减少,导致血管壁形态和功能出现改变,还可以通过上调血管内皮生长因子(VEGF)表达来促进动脉粥样硬化的形成与进展^[14]。miRNA-126 与心肌梗死关系密切,Kukreja 等^[15]的报道显示,血清 miRNA-126 高表达与心肌梗死范围呈正相关性,并且提示患者预后往往不理想。但是 miRNA-126 是否参与到衰竭心肌“重构”目前还未见报道。冠状动脉疾病是 CHF 主要原因之一,在欧美发达国家左室收缩功能不全的病因中占比甚至超过 70%,所以 miRNA-126 可能通过冠状动脉心脏病导致 CHF 发生。

本研究分析了不同心功能 CHF 患者血清 miRNA-21、miRNA-126 水平差异,结果显示 miRNA-21 随着 NYHA 心功能分级的增加而表达升高,表明 miRNA-21 可能与 CHF 患者临床症状严重程度相关。而 miRNA-126 水平在 NYHA 心功能 IV 级最高,显著高于 NYHA 心功能 II 级、III 级患者,但是 II 级、III 级患者组间比较无差异。这可能与 miRNA-126 个体表达差异性较大有关,有报道 miRNA-126 在心肌梗死患者血清高表达^[15],但是也有研究显示 miRNA-126 低表达是心肌梗死的危险因素^[16]。本研究在相关性分析中发现,血清 miRNA-21、miRNA-126 水平与 BNP 呈显著正相关,而 BNP 被认为是 CHF 诊断的“金标准”,这表明 miRNA-21、miRNA-126 可能是 CHF 诊断的潜在生物标志物,有助于患者治疗效果判定。COX 比例风险模型分析显示,miRNA-21、miRNA-126 与年龄类似,均是 CHF 发病的独立危险因素,提示 miRNA-21、miRNA-126 可能参与到 CHF 的发病,但是具体机制还需要进一步深入研究。

综上所述,研究证实 miRNA-21、miRNA-126 在 CHF 患者血清均呈高表达状态,并且与心功能、BNP 等有一定相关性,是 CHF 发病的独立危险因素。但是还需要通过多中心合作、相关基础研究来探讨 miRNA-21、miRNA-126 在 CHF 发病的具体机制,为该病诊断和治疗提供新思路。

参考文献

[1] Attanasio P, Bissinger R, Haverkamp W, et al. Enhanced suicidal erythrocyte death in acute cardiac failure[J]. Eur J Clin Invest, 2015, 45(12):1316-1324.

[2] Gupta SK, Foinquinos A, Thum S, et al. Preclinical Development of a MicroRNA-Based Therapy for Elderly Patients With Myocardial Infarction[J]. J Am Coll Cardiol,

2016, 68(14):1557-1571.

- [3] Toshiyuki N, Kimura T, Suzumura T, et al. The macroscopic appearance of computed tomography-guided needle biopsy specimens correlates with tumor metastasis in non-small cell lung cancer[J]. Osaka City Med J, 2015, 61(2):105-112.
- [4] Stephan F, Salvatore De R, Henrik F. Circulating MicroRNAs in Patients With Coronary Artery Disease[J]. Circ Res, 2010, 107(5):677-684.
- [5] 中华医学会心血管病学分会, 中华心血管病杂志编辑委员会. 慢性心力衰竭诊断治疗指南[J]. 中华心血管病杂志, 2007, 35(12):1076-1095.
- [6] Xu J, Li Y, Li X, et al. Dissection of the potential characteristic of miRNA-miRNA functional synergistic regulations[J]. Mol Biosyst, 2013, 9(2):217-224.
- [7] Khairy A, Hamza I, Shaker O, et al. Serum miRNA Panel in Egyptian Patients with Chronic Hepatitis C Related Hepatocellular Carcinoma[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2016, 17(5):2699-2703.
- [8] Hui B, Chen X, Hui L, et al. Serum miRNA expression in patients with esophageal squamous cell carcinoma[J]. Oncol Lett, 2015, 10(5):3008-3012.
- [9] Liu X, Meng H, Jiang C, et al. Differential microRNA Expression and Regulation in the Rat Model of Post-Infarction Heart Failure[J]. PLoS One, 2016, 11(8):e0160920.
- [10] Wong LL, Armugam A, Sepramaniam S, et al. Circulating microRNAs in heart failure with reduced and preserved left ventricular ejection fraction[J]. Eur J Heart Fail, 2015, 17(4):393-404.
- [11] Deng J, Zhong Q. Advanced research on the microRNA mechanism in heart failure[J]. Int J Cardiol, 2016, 220(1):61-64.
- [12] Kumarswamy R, Volkmann I, Thum T. Regulation and function of miRNA-21 in health and disease[J]. RNA Biol, 2011, 8(5):706-713.
- [13] Bang C, Batkai S, Dangwal S, et al. Cardiac fibroblast-derived microRNA passenger strand-enriched exosomes mediate cardiomyocyte hypertrophy[J]. J Clin Invest, 2014, 124(5):2136-2146.
- [14] Fernandes T, Baraúna VG, Negrao CE, et al. Aerobic exercise training promotes physiological cardiac remodeling involving a set of microRNAs[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2015, 309(4):543-552.
- [15] Kukreja RC, Yin C, Salloum FN. MicroRNAs: new players in cardiac injury and protection[J]. Mol Pharmacol, 2011, 80(4):558-564.
- [16] Chen JJ, Zhou SH. Mesenchymal stem cells overexpressing MiR-126 enhance ischemic angiogenesis via the AKT/ERK-related pathway[J]. Cardiol J, 2011, 18(6):675-681.