

急性心肌梗死患者循环血清 microRNAs 表达的研究

季倩¹ 田玉龙² 李小波¹ 张瑶俊¹ 孟培娜¹ 邵明学¹ 陈立文¹ 朱灏¹ 田乃亮¹

[摘要] **目的:**探讨循环血清 microRNAs 与急性心肌梗死(AMI)的相关性,分析其在早期诊断 AMI 中的价值。**方法:**选取 2013-10-2014-08 于我院心内科住院诊治的 AMI 患者,其中 ST 段抬高型心肌梗死(STEMI)患者 77 例(STEMI 组),非 ST 段抬高型心肌梗死(NSTEMI)患者 21 例(NSTEMI 组),以及同期体检的 23 名健康人群做对照(对照组),通过实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测血清中 miR-133a、miR-133b、miR-499-5p 的含量,同时采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测血清 cTnI 的含量并分析其与 AMI 的相关性。**结果:**STEMI 组和 NSTEMI 组患者血清 miR-133a、miR-133b、miR-499-5p 水平较对照组明显升高(均 $P < 0.05$)。1~4 h 组血清 miR-133a、miR-133b、miR-499-5p 表达量较 5~12 h 组和 13~24 h 组明显升高(均 $P < 0.05$)。此外,受试者工作特征曲线(ROC 曲线)分析显示,miR-133a、miR-133b、miR-499-5p 在诊断 AMI 方面具有明确的特异性和敏感性,但并不优于 cTnI。**结论:**血清 miR-133a、miR-133b、miR-499-5p 可作为新型的早期诊断 AMI 的标记物,但并不优于 cTnI。

[关键词] 循环 microRNAs;急性心肌梗死

doi:10.13201/j.issn.1001-1439.2015.08.013

[中图分类号] R542.2 **[文献标志码]** A

Expression of circulating microRNAs in patients with acute myocardial infarction

Ji Qian¹ Tian Yulong² Li Xiaobo¹ Zhang Yaojun¹ Meng Peina¹
Shao Mingxue¹ Chen Liwen¹ Zhu Hao¹ Tian Nailiang¹

(¹Department of Cardiology, Nanjing First Hospital Nanjing University, Nanjing, 210000, China; ²Department of Cardiology, Xuyi People's Hospital)

Corresponding author: TIAN Nailiang, E-mail: tiannailiang@163.com

Abstract Objective: To investigate MicroRNA expression in ST segment elevation myocardial infarction (STEMI) and non-ST segment elevation myocardial infarction (NSTEMI), and to compare their diagnostic values. **Method:** We assessed 77 STEMI and 21 NSTEMI patients admitted to the Department of Cardiology in Nanjing First Hospital from October 2013 to August 2014. And 23 healthy volunteers were selected at the same time. Serum miR-133a, miR-133b and miR-499-5p were quantified by using quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (qRT-PCR), and the concentration of serum cTnI was measured using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) methods. **Result:** The level of miR-133a, miR-133b and miR-499-5p were significantly higher in both STEMI and NSTEMI patients compared to healthy volunteers ($P < 0.05$), and were significantly increased in the early phase (the first 4 hours) ($P < 0.05$). Furthermore, receiver operating characteristic (ROC) curve analyses showed that miR-133a, miR-133b and miR-499-5p were specific and sensitive for the diagnosis of AMI, but not superior to cTnI. **Conclusion:** Serum miR-133a, miR-133b and miR-499-5p might be used as a biomarker but is not superior to cTnI for early diagnosis of AMI.

Key words circulating microRNA; acute myocardial infarction

急性心肌梗死(AMI)是冠心病(CHD)最严重的类型,是发达国家人口非肿瘤死亡的主要原因之一,近十年来在我国的发病率也迅速增加,发病凶险,致死率和病死率较高。已有许多研究表明,心肌损伤标志物包括磷酸肌酸激酶同工酶(CK-MB)、肌钙蛋白 I(cTnI)等是早期诊断 AMI 最有力的证据之一。

microRNA 是一种长约 17-25 个核苷酸的单链非编码小分子 RNA,它可以通过与特定信使 RNA(mRNA)的 3'非翻译区(3'UTR)相结合,抑制 mRNA 编码蛋白质的翻译过程来调控基因表达。特异性的 miRNAs 失调已经被证实与心血管疾病的发生发展相关,其可能成为潜在的心血管疾病诊断生物标记物和治疗靶点。本研究通过检测 AMI 患者梗后 24 h 内的循环血 miR-133a、miR-133b、miR-499-5p 3 种 microRNA 的表达情况,来分析循环 microRNA 在早期 AMI 中的应用价值。

¹南京医科大学附属南京医院心内科 南京市第一医院(南京,210000)

²江苏省盱眙县人民医院心内科

通信作者:田乃亮, E-mail: tiannailiang@163.com

1 对象与方法

1.1 对象

选取 2013-10—2014-08 南京医科大学附属南京医院心内科收治的 AMI 患者,其中 ST 段抬高型心肌梗死患者 77 例(STEMI 组),非 ST 段抬高型心肌梗死患者 21 例(NSTEMI 组),同期健康体检的健康人群 23 例(对照组)。AMI 的临床诊断根据最新指南:①缺血性胸痛>30 min;②胸痛 6 h 内心电图检查至少有 2 个导联出现 ST 段抬高 0.1 mV;③血清心肌酶 cTnI 和 CK-MB 至少超过正常值 2 倍。排除标准:严重心律失常、心力衰竭、心肌病等心脏疾病者,合并感染、恶性肿瘤者。本研究经南京医科大学附属南京医院伦理委员会同意,所有患者签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 标本收集 AMI 患者入院即刻采集肘静脉血 4 ml,室温静置 30 min,2 000×g 离心 10 min 取上清液等量分装于 RNase-free EP 管中,-80℃ 保存、备用。

1.2.2 总 RNA 的提取 取 500 μl 血清与 2 倍体积的 TRIzol (Invitrogen, USA) 混合,涡旋混匀,室温 15 min;12 000×g 4℃ 离心 15 min,取上清 500 μl,加入等体积的异丙醇,颠倒,静置 10 min;16 000×g 4℃ 离心 10 min,弃上清;加 1 ml 预冷 75% 乙醇(750 μl 无水乙醇+250 μl DEPC 水),12 000×g 4℃ 离心 5 min,吸去乙醇,加 20 μl DEPC 水稍吹打。用 Nanodrop 2000 微量分光光度计(Thermo, USA)检测浓度。-20℃ 保存。

1.2.3 逆转录及定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)检测 3 种 microRNA 从每份血清样本提取的总 RNA 中取 2 μg,加入 miRNA 特异性引物及 M-MLV 逆转录酶(Promega, USA)构建反应体系,按产品说明书进行逆转录,Bulge-Loop™ miRNA qRT-PCR 专用引物由瑞博公司提供。miR-16 作为标准内参。反应参数设定:①42℃ 60 min;②70℃ 10 min。所得 cDNA 产物储存于-20℃ 备用。运用 ABI7500 实时荧光定量 PCR 仪(Applied Biosystems, USA)进行 qRT-PCR 反应,检测 miR-133a、miR-133b、miR-499-5p 的表达,20 μl 反应体系中含 2 μl cDNA,0.8 μl 上游引物,0.8 μl 下游引物(上、下游引物均由锐博公司提供),9 μl SYBR Premix Ex Taq II (Takara, Japan),7.4 μl RNase-free 水。每个样本均设 3 个副孔,反应体系 95℃ 预变性 20 s 后开始循环,95℃ 20 s,60℃ 31 s 共 40 个循环。

1.2.4 荧光定量 qRT-PCR 结果分析 实验数据用 7500 SDS 软件(Sequence Detection Software, version 1.4)进行采集。将所采集的 Ct 值作为样

本表达量标准,用 2^{-ddCt} 方法计算 microRNA 的相对表达量。

1.2.5 cTnI 检测 用 ELISA 法(Abnova, Taiwan)检测血 cTnI 表达水平。

1.3 统计学处理

采用 SPSS20.0(IBM, USA)进行分析和处理,实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。3 组临床特征数据的比较采用单因素方差分析、t 检验和 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 基本资料分析

实验组男性比例明显高于对照组,2 组在年龄、高血压、糖尿病、吸烟史等基本资料无统计学差异。STEMI 组和 NSTEMI 组的低密度脂蛋白(LDL)水平明显高于对照组($P < 0.05$),3 组肌酐、左心室射血分数(LVEF)指标无明显差异($P > 0.05$)。见表 1。

2.2 血清 miR-133a、miR-133b、miR-499-5p 在患者中表达升高

STEMI 组和 NSTEMI 组的血清 miR-133a、miR-133b、miR-499-5p 表达水平较对照组明显升高且差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 1。

2.3 不同时间段 microRNA 的表达水平有差异

将 98 名 AMI 患者按采血距发病的时间分成 3 组,1~4 h 为第 1 组,5~12 h 为第 2 组,13~24 h 为第 3 组,比较这 3 组患者血清 miR-133a、miR-133b、miR-499-5p 的表达水平。结果发现随着时间的延长,患者血清 microRNA 水平呈递减趋势,第 1 组最高,明显高于第 2、3 组且差别有统计学意义;第 2 组稍高于第 3 组,差别无统计学意义,见表 2。提示 AMI 患者血清中 miR-133a、miR-133b、miR-499-5p 在发病 1~4 h 内达高峰,4 h 后逐渐下降。

2.4 ROC 曲线分析

利用 ROC 曲线分析 microRNAs 是否具备早期诊断 AMI 的潜力,miR-133a、miR-133b、miR-499-5p 的 ROC 曲线下面积(AUC, areas under ROC curve)分别为 0.787(95% 可信区间 0.703~0.871),0.823(95% 可信区间 0.749~0.896),0.791(95% 可信区间 0.706~0.875),而 cTnI 的 AUC 为 0.977(95% 可信区间 0.956~0.999)。上述结果显示,miR-133a、miR-133b、miR-499-5p 具有早期诊断 AMI 的价值,但并不优于 cTnI(图 2)。

3 讨论

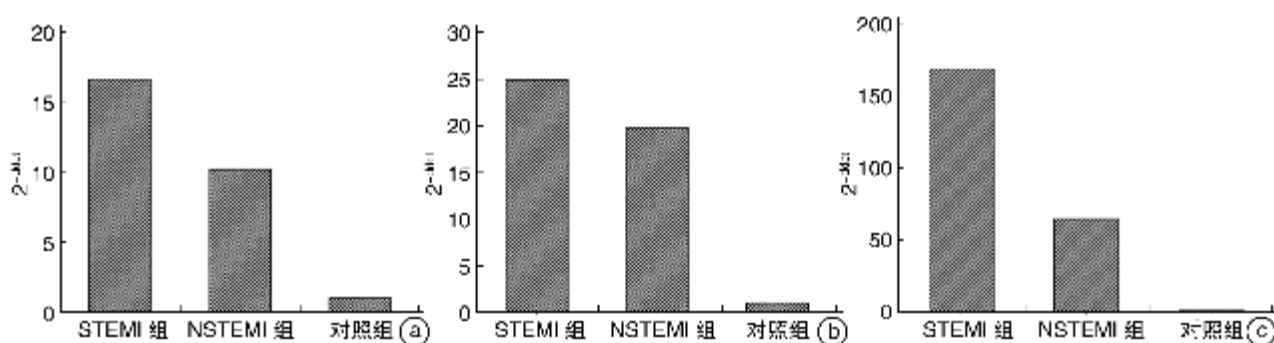
有研究证明,microRNA 调控几乎所有的细胞功能,包括:细胞分化、细胞增殖、血管形成、细胞凋亡以及细胞坏死等^[1]。组织中 microRNA 水平的显著变化与多种心血管疾病相关,如心肌肥厚、心肌纤维化、心衰、心律失常以及其他一些急慢性的心脏疾

表 1 3 组基本资料分析

Table 1 General data

指标	STEMI 组(77 例)	NSTEMI 组(21 例)	对照组(23 例)
年龄/岁	61.00±13.7	67.00±13.9	63.60±12.2
男性/%	88.30 ¹⁾	66.70	65.20
高血压/%	66.20	57.10	47.80
糖尿病/%	23.40	23.80	30.40
吸烟史/%	19.50	23.80	30.40
平均取样时间/h	8.00±6.5	6.00±5.6	—
LDL/(mmol·L ⁻¹)	2.92±0.86 ²⁾	2.44±0.89 ¹⁾	2.06±0.69
血肌酐/(μmol·L ⁻¹)	83.36±25.69	87.71±30.43	73.14±16.97
LVEF/%	51.70±10.5	51.30±12.5	59.20±10.7

与对照组比较,¹⁾P<0.05;²⁾P<0.01。



与对照组比较,¹⁾P<0.05。

a: miR-133a; b: miR-133b; c: miR-499-5p。

图 1 3 组血清 miR-133a, miR-133b, miR-499-5p 表达水平的对比

Figure 1 miR-133a, miR-133b, miR-499-5p in three groups

表 2 不同时间段 ddCt 值的比较

Table 2 ddCt in different time stage

指标	1~4 h	5~12 h	13~24 h
miR-133a	-5.143(5.598)	-3.115(5.842) ¹⁾	-2.364(5.443) ¹⁾
miR-133b	-6.193(5.242)	-3.421(5.766) ²⁾	-3.727(6.317) ¹⁾
miR-499-5p	-8.476(9.940)	-5.435(8.001) ¹⁾	-3.723(8.501) ²⁾

与 1~4 h 时间段比较,¹⁾P<0.05;²⁾P<0.01。

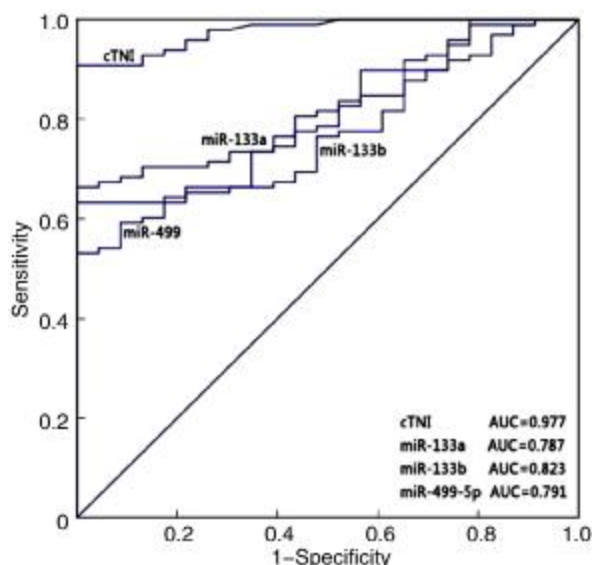


图 2 miR-133a, miR-133b, miR-499-5p 与 cTnI 诊断 AMI 特异性和敏感性的 ROC 曲线分析

Figure 2 ROC curve

病^[2-10]。已有不少动物及人的研究证明 microRNA 以非常稳定的形式大量存在于外周血中,并且能被检测到^[11-12]。本研究进一步证明了 miR-133a, miR-133b, miR-499-5p 可稳定、独立的存在于循环中,并可在 AMI 患者血清中检测到。因此,这 3 种 microRNA 具备了作为诊断 AMI 的可能性。

miR-133 由 miR-133a 和 miR-133b 组成,在平滑肌、骨骼肌、心肌中表达^[13]。miR-133 在血管平滑肌细胞表型转换中起重要作用,与粥样硬化的进程相关^[14]。miR-499-5p 是一种心脏特异性的 microRNA^[15]。有研究显示,虽然 miR-499-5p 正常情况下在心脏中高表达^[16-17],但在缺血的心肌中表达下降^[18],提示 miR-499-5p 是由损伤心肌所释放。另有研究提示,虽然组织损伤可能导致 miR-133、miR-499-5p 释放入血,但是急性下肢缺血情况下,循环 miR-133、miR-499-5p 表达水平并不升高^[4],从而进一步揭示 miR-133、miR-499-5p 具有诊断 AMI 的特异性。

本研究检测了 3 种 microRNA 在循环中的表达水平,结果显示,3 种 microRNA 在 AMI 患者循环中的水平明显高于对照组,且在症状发作 4 h 内的表达水平显著升高(升高倍数分别为:miR-133a 35.3 倍;miR-133b 73 倍;miR-499-5p 357.1 倍),差异有统计学意义,4 h 后逐渐下降,由此提示 3 种 microRNA 在 AMI 发病 4 h 内达高峰。目前临床上 cTnI 被认为是诊断 AMI 的金标准,cTnI 一般在发病后 4~8 h 升高,12~24 h 达峰值,释放过程一般为 7~10 d,并能维持 10~14 d。相比较可发现 miR-133a、miR-133b、miR-499-5p 相对于 cTnI 升高更早且更早达到峰值,提示了检测血清中这 3 种 microRNA 可能作为早期诊断 AMI 方法的可行性。

本研究结果显示,STEMI 和 NSTEMI 患者血清 miR-133a、miR-133b、miR-499-5p 水平显著高于对照组,差异有统计学意义,提示这 3 种 microRNA 表达水平的变化与 AMI 的发展进程有密切的关联。因此笔者推测,正如许多国外相关文献所报道的,循环中 miR-133a、miR-133b、miR-499-5p 可能是由损伤的心肌释放出来,进入血液中的^[4,19-20]。

综上所述,血清 miR-133a、miR-133b、miR-499-5p 在 AMI 早期的表达水平明显升高,由此推测其有潜力成为新型的诊断 AMI 的标记物,但其诊断价值并不优于 cTnI。本实验属于小规模临床研究,若要验证 miR-133a、miR-133b、miR-499-5p 诊断 AMI 的可靠性,还需进一步进行大规模的临床研究。如果能将 microRNA 与已有的心肌损伤标记物结合起来联合应用,将会大大有益于 AMI 的临床诊断及治疗。

参考文献

- [1] BARTEL D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. *Cell*, 2004, 116: 281—297.
- [2] DE ROSA S, FICHTLSCHERER S, LEHMANN R, et al. Transcoronary concentration gradients of circulating microRNAs[J]. *Circulation*, 2011, 124: 1936—1944.
- [3] WANG R, LI N, ZHANG Y, et al. Circulating microRNAs are promising novel biomarkers of acute myocardial infarction[J]. *Intern Med*, 2011;50:1789—1795.
- [4] DALESSANDRA Y, DEVANNA P, LIMANA F, et al. Circulating microRNAs are new and sensitive biomarkers of myocardial infarction[J]. *Eur Heart J*, 2010, 31: 2765—2773.
- [5] WIDERA C, GUPTA S K, LORENZEN J M, et al. Diagnostic and prognostic impact of six circulating microRNAs in acute coronary syndrome[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2011, 51: 872—875.
- [6] GIDLÖF 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: 217—226.
- [7] KUWABARA Y, ONO K, HORIE T, et al. Increased microRNA-1 and microRNA-133a levels in serum of patients with cardiovascular disease indicate myocardial damage[J]. *Circ Cardiovasc Genet*, 2011, 4: 446—454.
- [8] 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*, 2012, 167: 531—536.
- [9] FICHTLSCHERER S, DE ROSA S, FOX H, et al. Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease[J]. *Circ Res*, 2010, 107: 677—684.
- [10] TIJSEN A J, CREEMERS E E, MOERLAND P D, et al. MiR423-5p as a circulating biomarker for heart failure[J]. *Circ Res*, 2010, 106: 1035—1039.
- [11] MITCHELL P S, PARKIN R K, KROH E M, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105: 10513—10518.
- [12] GILAD S, MEIRI E, YOGEV Y, et al. Serum microRNAs are promising novel biomarkers[J]. *PLoS One*, 2008, 3: e3148.
- [13] HAN M, TOLI J, ABDELLATIF M. MicroRNAs in the cardiovascular system[J]. *Curr Opin Cardiol*, 2011, 26: 181—189.
- [14] TORELLA D, IACONETTI C, CATALUCCI D, et al. MicroRNA-133 controls vascular smooth muscle cell phenotypic switch in vitro and vascular remodeling in vivo[J]. *Circ Res*, 2011, 109: 880—893.
- [15] SHIEH J T, HUANG Y, GILMORE J, et al. Elevated miR-499 levels blunt the cardiac stress response[J]. *PLoS One*, 2011, 6: e19481.
- [16] VAN ROOIJ E, QUIAT D, JOHNSON B A, et al. A family of microRNAs encoded by myosin genes governs myosin expression and muscle performance[J]. *Dev Cell*, 2009, 17: 662—673.
- [17] KIM H J, CUI X S, KIM E J, et al. New porcine microRNA genes found by homology search[J]. *Genome*, 2006, 49: 1283—1286.
- [18] WANG J X, JIAO J Q, LI Q, et al. miR-499 regulates mitochondrial dynamics by targeting calcineurin and dynamin-related protein-1[J]. *Nat Med*, 2011, 17: 71—78.
- [19] CORSTEN M F, DENNERT R, JOCHEMS S, et al. Circulating microRNA-208b and microRNA-499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease[J]. *Circ Cardiovasc Genet*, 2010, 3: 499—506.
- [20] WANG G K, ZHU J O, ZHANG J T, et al. Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans[J]. *Eur Heart J*, 2010, 31: 659—666.