

• 心律失常/离子通道病专栏 •

新疆维吾尔族、汉族新发心房颤动患者 microRNA-328 的表达水平

方志敏¹ 吴庆¹ 陆云¹ 刘顺民¹ 赵海燕¹
钟小兰¹ 宋宏雁¹ 班努·库肯¹ 刘超群¹

[摘要] 目的:比较 microRNA-328 在新疆维吾尔族及汉族新发心房颤动(AF)患者和窦性心律者中的表达水平。方法:收集 2014-01—2015-06 在新疆医科大学第二附属医院新发 AF 患者 37 例的病历资料,采用实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测 microRNA-328,比较血浆中的 microRNA-328 表达水平。结果:窦性心律组和新发 AF 组 microRNA-328 表达水平差异有统计学意义($P<0.01$)。将维吾尔族和汉族作为协变量分层,比较窦性心律组和新发 AF 组 microRNA-328 表达水平的差异,结果显示维吾尔族、汉族 microRNA-328 表达在窦性心律组和新发 AF 组中均差异有统计学意义($P<0.01$),不同民族表达具有一致性。结论:新发 AF 患者血浆 microRNA-328 表达水平增高,无论在维吾尔族或汉族患者中均具有一致性,提示 microRNA-328 可作为新发 AF 的生物标志物。

[关键词] 心房颤动;microRNA-328;聚合酶链反应

doi:10.13201/j.issn.1001-1439.2016.03.004

[中图分类号] R541.7 **[文献标志码]** A

Expression of microRNA-328 in patients with new onset atrial fibrillation of Uygur and Han nationality in Xinjiang

FANG Zhimin WU Qing LU Yun LIU Shunmin ZHAO Haiyan
ZHONG Xiaolan SONG Hongyan BANLU·Kuken LIU Chaoqun

(Department of Cardiology, The Second Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, 830063, China)

Corresponding author: FANG Zhimin, E-mail: fangzhimin15@sina.com

Abstract Objective: To compare the expression level of microRNA-328 in Xinjiang Uygur and Han patients with new onset atrial fibrillation (AF) and sinus rhythm. **Method:** A total of 37 cases with new AF in the Second Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University from January 2014 to June 2015 were included. Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (QRT-PCR) was used to detect microRNA-328 plasma expression level. **Result:** There was significant difference in microRNA-328 expression between sinus rhythm group and AF group ($P<0.05$). The expressions of microRNA-328 in sinus rhythm group and AF group were statistically significant both in Uygur and Han patients ($P<0.05$). **Conclusion:** The plasma expression level of microRNA-328 is increased in new AF both in Uygur and Han patients, suggesting that microRNA-328 can be used as a biological marker of new onset AF.

Key words atrial fibrillation; microRNA-328; polymerase chain reaction

心房颤动(AF)是临床上常见的心律失常之一,在总体人群中的患病率为 0.4%~1.0%^[1]。AF 的患病率随年龄增长而增多,80 岁以上人群发病率在 7%以上^[2]。周自强等^[3]首次对中国 AF 现状进行了大规模流行病学研究,对 14 个省份和直辖市自然人群中 29 079 例 30~85 岁人群调查提示:我国 AF 总患病率为 0.77%。由于其可以给患者带来严重心血管系统并发症,如心力衰竭、脑卒中及其他动脉系统血栓,因此 AF 一直是人们关注和研究的热点。关于

AF 相关的多种重构,早在 1994 年的 Framingham 研究中就已发现心房增大导致 AF 的发生,左心房大小是发生 AF 的独立危险因素^[4]。在 Lu 等^[5]的研究中,风湿性心脏病 AF 患者 microRNA-328 升高 3.5 倍,并认为 microRNA-328 通过作用于 L-Ca²⁺ 通道基因促进 AF 的心房电重构。循环血液中存在稳定的 microRNA-328,且具有较高的组织特性和细胞特异性^[6-9]。本实验通过采集新疆维吾尔族及汉族新发 AF 患者血浆标本,研究 microRNA-328 表达水平在新发 AF 患者和窦性心律人群中的差异,同时进行不同民族分层,观察 microRNA-328 在维吾尔族及汉族

¹新疆医科大学第二附属医院心内科(乌鲁木齐,830063)
通信作者:方志敏,,E-mail:fangzhimin15@sina.com

新发 AF 患者中是否具有表达一致性,探讨 microRNA-328 表达水平与不同民族新发 AF 之间的关系。

1 对象与方法

1.1 对象

2014-01—2015-06 在新疆医科大学第二附属医院的新发 AF 患者 37 例为新发 AF 组,体检健康志愿者为窦性心律组 35 例。新发 AF 由病史、常规心电图、24 h 动态心电图检查证实。所有患者均无肝肾功能损害、电解质紊乱及感染,无高血压病、甲状腺功能亢进、糖尿病,心功能均在Ⅱ~Ⅲ级(NYHA 分级)。登记患者的临床基线资料。

1.2 RNA 提取及 cDNA 的合成

用 RNA 提取试剂盒提取各组织的总 RNA,紫外分光光度计测定所提取总 RNA 在 260 nm 和 280 nm 波长处的吸光度比值(OD260/OD280),计算 RNA 的纯度和浓度,确保 OD260/OD280 在 1.8~2.0。利用 Ferments 反转录试剂盒进行 cDNA 的合成。在逆转录管中加入总 RNA 0.1~5 μg,oligo(dT)18 引物 1 μl 并用双蒸水补充至 12 μl,混匀离心后在 65℃水浴锅中温育 5 min,立即放于冰上冷却。加入反应 Buffer 4 μl,RNase 抑制剂 1 μl,10 mmol/L dNTP Mix 2 μl,M-MuLV 反转录酶(200 U/μl)1 μl,混合离心,42℃水浴锅中温育 60 min,70℃灭活 5 min。合成好的 cDNA 置于一20℃备用。

1.3 荧光定量聚合酶链反应

采用染料法实时荧光定量 PCR 技术,根据 GenBank 中目的基因的 mRNA 序列,本研究中 miRNA-328 的序列为: UGGAGUGGGGGGCGAGGAGGGGCU CAGGGAGAAAGUGCAUACAGCC CCUGGCCUCUCUGCCCUUCCGUCCCCUG。用 premier 5.0 设计引物,荧光定量 PCR 反应体系为

SYBRPremix(2×)10 μl、10 μmol/L 的上下游引物各 0.6 μl,cDNA 样品 1 μl,然后用双蒸水补足至 20 μl,于 Bio-Rad 荧光定量 PCR 仪上进行反应。反应条件为 95℃预变性 15 min,95℃变性 10 s,60℃退火 10 s,72℃延伸 20 s,共 40 个循环的反应程序进行扩增,并于每个循环的延伸阶段采集荧光信号。反应结束后做 95~65℃的融解曲线分析。

1.4 统计学处理

采用 SPSS18.0 统计软件分析数据,数值变量以 $\bar{x}\pm s$ 表示,计量资料采用两独立样本 *t* 检验,计数资料采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 患者基线资料

窦性心律组和新发 AF 组民族、年龄、性别、左心室射血分数(LVEF)均差异无统计学意义;新发 AF 组左心房内径(LAD)较窦性心律组扩大($P<0.01$)。见表 1。

2.2 血浆 microRNA-328 表达水平

相比新发 AF 组,窦性心律组血浆 microRNA-328 表达水平升高($P<0.01$)。经民族分层后发现,在汉族和维吾尔族患者中,新发 AF 患者相比窦性心律者血浆 microRNA-328 表达水平均显著升高(均 $P<0.01$),不同民族表达具有一致性。见表 2。

3 讨论

心脏自主神经和 AF 之间互为因果,心脏自主神经的不均一分布对心房电生理特性产生影响,造成心房电重构,引起 AF 的发生和维持。而 AF 可因结构重构导致心房增大、供血不足和心肌损伤,使神经损伤。自主神经功能失衡可引起 AF,AF 又会导致自主神经重构,从而使 AF 易于维持。AF

表 1 窦性心律和新发 AF 患者的基线资料

Table 1 General data							$\bar{x}\pm s$
组别	民族/例(%)		性别/例(%)		年龄/岁	LVEF	LAD/mm
	维吾尔族	汉族	男	女			
窦性心律组(35 例)	16(46)	19(54)	20(57)	15(43)	54.91±9.16	0.61±0.09	42.95±5.41
新发 AF 组(37 例)	18(49)	19(51)	22(59)	15(41)	54.35±9.18	0.60±0.11	49.36±5.84
P 值	0.563		0.815		0.756	0.681	0.000

表 2 窦性心律和新发 AF 患者的血浆 microRNA-328 表达水平

Table 2 Expression levels of microRNA-328					$\bar{x}\pm s$
项目	窦性心律组		新发 AF 组		
	维吾尔族(16 例)	汉族(19 例)	维吾尔族(18 例)	汉族(19 例)	
男:女/例	11:5	19:10	10:8	12:7	
microRNA-328 Ct 值	35.08±0.81	35.14±0.76	30.94±1.28	31.06±1.31	
2 ^{-ΔΔCt}	1	1	8.27±8.93 ¹⁾	7.95±8.46 ¹⁾	

2^{-ΔΔCt}:microRNA-328 的相对表达量。与同族窦性心律组比较,¹⁾ $P<0.01$ 。

的电重构主要包括心房有效不应期和动作电位时程缩短、动作电位传导速度减慢、不应期离散度增加等电生理特征的改变,此有利于 AF 的发生和持续^[10]。电重构的基础是心房肌细胞跨膜离子流的改变,房颤时 L 型钙通道 Ca^{2+} 内流增多。

由于 microRNA 是在基因水平对疾病的发生进行调控,其表达量的改变往往较临床表现及实验室检查更早发现,并且具有高度敏感性与特异性,因此检测 microRNA 的表达量对疾病的诊断和病情评估起重要作用。Mitchell 等^[11]首次发现 microRNA 存在于外周血中,并证实 microRNA 可稳定存在于血清中,并可作为疾病诊断的潜在生物标志物。

研究发现,microRNA-328 通过作用于 L 型 Ca^{2+} 通道基因引起 AF 的不良电重构^[5]。McManus^[12]研究认为,microRNA-328 是心房电重构的关键调节因子,与 AF 的发生和维持有密切的相关性,microRNA-328 可作为进一步探索 AF 诊断或预后的重要生物标志物。研究显示,microRNA-328 调节的基因明显参与 AF 的发病机制^[13-16]。Lu 等^[17]研究发现,血浆 microRNA-328 在 AF 患者中的表达水平明显上调,也证实了血浆 microRNA-328 与 AF 的发生和维持有密切的相关性。王玺^[18]研究发现,AF 患者血浆中 miRNA-328 的变化,以血浆标本代替心房组织标本,更易于临床研究,发现 AF 的分类诊断及风险评估的新的生化指标。

本研究采用 qRT-PCR 和 Westernblot 技术,研究 microRNA-328 的表达情况。结果显示,相比窦性心律组,新发 AF 组血浆 microRNA-328 的表达水平均显著增高。对不同民族进行分层后比较,发现无论维吾尔族还是汉族,其血浆 microRNA-328 表达水平在新发 AF 患者中均显著高于窦性心律者,提示心房电重构无论在维吾尔族或汉族患者中均具有一致性,microRNA-328 可作为新发 AF 的生物标志物,这为未来新发 AF 的防治提供了新的思路。

参考文献

- [1] BENJAMIN E J, CHEN P S, BILD D E, et al. Prevention of atrial fibrillation: report from a national heart, lung, and blood institute workshop[J]. *Circulation*, 2009, 119: 606—618.
- [2] MIYASAKA Y, BARNES M E, GERSH B J, et al. Secular trends in incidence of atrial fibrillation in Olmsted County, Minnesota, 1980 to 2000, and implications on the projections for future prevalence[J]. *Circulation*, 2006, 114: 119—125.
- [3] 周自强,胡大一,陈捷,等. “中国心房颤动流行病学研究”结果解读[J]. *中华内科杂志*, 2010, 49(3): 198—199.
- [4] VAZIRI S M, LARSON M G, BENJAMIN E J, et al. Echocardiographic predictors of nonrheumatic atrial fibrillation. The Framingham Heart Study[J]. *Circulation*, 1994, 89: 724—730.
- [5] LU Y, ZHANG Y, WANG N, et al. MicroRNA-328 Contributes to Adverse Electrical Remodeling in Atrial Fibrillation[J]. *Circulation*, 2010, 122: 2378—2387.
- [6] GILAD S, MEIRI E, YOGEV Y, et al. Serum microRNAs are promising novel biomarkers[J]. *PLoS One*, 2008, 5, 3: e3148.
- [7] BARBEAU E J, TAYLOR M J, REGIS J, et al. Spatio temporal dynamics of face recognition [J]. *Cereb Cortex*, 2008, 18: 997—1009.
- [8] CHIM S S, SHING T K, HUNG E C, et al. Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma [J]. *Clin Chem*, 2008, 54: 482—490.
- [9] MITCHELL P S, PARKIN R K, KROH E M, et al. Circulating micro-RNAs as stable blood-based markers for cancer detection[J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2008, 105: 10513—10518.
- [10] WIJFFELS M C, KIRCHHOF C J, DORLAND R, et al. Atrial fibrillation begets atrial fibrillation: a study in awake chronically instrumented goats [J]. *Circulation*, 1995, 92: 1954—1968.
- [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 USA*, 2008, 105: 10513—10518.
- [12] MCMANUS D D, LIN H, TANRIVERDI K, et al. Relations between circulating microRNAs and atrial fibrillation: data from the Framingham Offspring Study[J]. *Heart Rhythm*, 2014, 11: 663—669.
- [13] ZHANG Q, KANDIC I, KUTRYK M J. Dysregulation of angiogenesis-related micrnas in endothelial progenitor cells from patients with coronary artery disease[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 405:42—46.
- [14] RONKAINEN J J, HANNINEN S L, KORHONEN T, et al. Ca^{2+} -calmodulin-dependent protein kinase II represses cardiac transcription of the l-type calcium channel $\alpha(1c)$ -subunit gene (*cacna1c*) by dream translocation[J]. *J Physiol*, 2011; 589:2669—2686.
- [15] HIGASHIKUNI Y, SAINZ J, NAKAMURA K, et al. The atp-binding cassette transporter *abcg2* protects against pressure overload-induced cardiac hypertrophy and heart failure by promoting angiogenesis and antioxidant response [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012; 32:654—661.
- [16] NOVIK K L, SPINELLI J J, MACARTHUR A C, et al. Genetic variation in *h2afx* contributes to risk of non-hodgkin lymphoma [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2007, 16:1098—1106.
- [17] LU Y, HOU S, HUANG D, et al. Expression profile analysis of circulating microRNAs and their effects on ion channels in Chinese atrial fibrillation patients [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8: 845—853.
- [18] 王玺,邱春光,黄振文,等. 血浆 miRNA-328 在心房颤动中的表达水平及其临床意义[J]. *中华心血管病杂志*, 2013, 41(2), 198—199.

(收稿日期:2015-08-27;修回日期:2015-10-13)