

缺血性心肌病患者外周血 MicroRNA-182、CITED2 及 HIF-1 的表达及相关性研究*

曾晓聪¹ 李醒三¹ 文宏¹

[摘要] **目的:**探讨 microRNA-182(miR-182)、cAMP 应答元件结合蛋白反式作用因子(CITED2)及低氧诱导因子-1(HIF-1)在缺血性心肌病(ICM)患者外周血中的表达及相关性。**方法:**收集本院 46 例 ICM 患者设为 ICM 组,同期选择 32 例健康者为对照组。分析 2 组一般资料及心脏功能指标[氨基末端 B 型脑钠肽前体(NT-proBNP)、左室射血分数(LVEF)、6min 步行实验(6MWT)距离];用实时荧光定量聚合酶链式反应法(qRT-PCR)检测血浆 miR-182 的含量,采用 ELISA 法测定血清 CITED2 和 HIF-1 水平,并观察 ICM 组治疗前及治疗 3 个月后上述指标的变化;分析 ICM 患者血浆 miR-182 水平与有关因素的相关性。**结果:**ICM 组治疗前 CITED2、LVEF 及 6MWT 距离明显低于对照组,NT-proBNP、HIF-1 及 miR-182 表达明显高于对照组,差异均有统计学意义($P<0.01$)。与 ICM 组治疗前比较,ICM 组治疗后 CITED2、LVEF 及 6MWT 距离明显升高,NT-proBNP、HIF-1 及 miR-182 显著降低,差异均有统计学意义($P<0.01$)。ICM 组治疗前血浆 miR-182 的水平与 CITED2、LVEF 及 6MWT 距离成负相关($r=-0.427$ 、 -0.351 、 -0.298 , $P<0.05$);ICM 组治疗前血浆 miR-182 水平与 HIF-1 成正相关($r=0.337$, $P<0.05$)。**结论:**外周血 miR-182 水平可作为 ICM 诊断及进行风险评估的生物标志物。miR-182 可能通过其靶蛋白 CITED2 上调 HIF-1,参与调控 ICM 的发生及发展。

[关键词] 缺血性心肌病; microRNA-182;cAMP 应答元件结合蛋白反式作用因子;低氧诱导因子-1

doi:10.13201/j.issn.1001-1439.2017.02.005

[中图分类号] R541.1 **[文献标志码]** A

Expression of circulating microRNA-182, CITED2 and HIF-1 in ischemic cardiomyopathy and their correlation

ZENG Xiaocong LI Xingsan WEN Hong

(Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning, 530021, China)

Corresponding author: ZENG Xiaocong, E-mail:aban829@163.com

Abstract Objective: To explore the expression of circulating microRNA-182 (miR-182), CBP/p300 interacting transactivators with ED-rich termini 2 (CITED2), hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) in ischemic cardiomyopathy (ICM), and to study their correlation. **Method:** Thirty two healthy volunteers and 46 ICM patients were enrolled, and their general clinical data and cardiac functional parameters, including N-terminal pro-B-type natriuretic peptide (NT-proBNP), left ventricular ejection fraction (LVEF) and the 6-minute walk test (6MWT) distance, were analyzed. The levels of blood plasma miR-182 in all subjects were detected by real time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR). Serum levels of CITED2 and HIF-1 were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), and their correlation with miR-182 was analyzed. Treatment lasted for 3 months. Level of NT-proBNP, CITED2, HIF-1, miR-182, 6MWT and LVEF in ICM group were observed before and after treatment. **Result:** Before treatment, the 6MWT distance, LVEF and CITED2 levels in ICM group were significantly lower than those in the control group ($P<0.01$). The NT-proBNP, HIF-1 and miR-182 levels in ICM group were significantly higher than those in the control group ($P<0.01$). After 3 months treatment, level of CITED2, 6 min walk distance and LVEF of patients in ICM group were significantly increased ($P<0.01$), and level of plasma NT-proBNP HIF-1 and miR-182 in ICM group were significantly decreased ($P<0.01$). Plasma miR-182 was negatively correlated with CITED2, LVEF and the 6MWT distance in group ICM ($r=-0.427$, -0.351 , -0.298 , $P<0.05$). Plasma miR-182 was positively correlated with HIF-1 in group ICM ($r=0.337$, $P<0.05$). **Conclusion:** Circulating miR-182 can be used as a new biomarker for ICM diagnosis and its risk evaluation. MiR-182 may upregulate the expression of HIF-1 by depressing CITED2, which might play an important role in the pathogenesis of ICM.

Key words ischemic cardiomyopathy; microRNA-182; CITED2 gene; hypoxia-inducible factor-1

* 基金项目:广西壮族自治区卫生厅自筹经费科研课题(No:Z2011318);

广西医科大学青年科学基金(No:GXMUYSF2014028)

¹ 广西医科大学第一附属医院心血管内科(南宁,530021)

通信作者:曾晓聪, E-mail:aban829@163.com

近年来,随着冠状动脉(冠脉)粥样硬化性心脏病发病率的提高,由于冠脉狭窄或闭塞后慢性心肌缺血所导致的缺血性心肌病(ischemic cardiomyopathy, ICM)的发病率也在逐年增加,并已经逐渐上升为心力衰竭(心衰)的主要病因^[1],深入研究 ICM 的病理生理机制,寻找干预的切入点,是有效防治 ICM 的关键。

低氧诱导因子-1(hypoxia-inducible factor-1, HIF-1)是参与缺氧应答的全局性调控因子,可以与下游的靶基因结合,并促进其转录,使机体产生一系列耐受缺氧的反应。目前研究表明,HIF-1 途径的慢性激活参与了心功能不全的发生及发展^[2]。新近研究发现 1 种与 HIF-1 竞争结合 cAMP 应答元件结合蛋白(cAMP-responsive element-binding protein, CBP/p300)的转录调节因子——CBP/P300 反式作用因子(CBP/p300 interacting trans-activators with ED-rich termini 2, CITED2)^[3]。

微小 RNA(microRNA, miRNA)是一类长 21~25 个核苷酸的小分子非编码 RNA。目前研究发现,心衰患者的循环血中的 microRNA-182(miR-182)表达出现明显改变^[4-5]。生物信息学网站 TargetScan、miRanda 预测结果发现,miR-182 与转录共激活因子 CITED2 基因的 3'端非翻译(3' UTR)区有特异性结合位点。

因此,笔者通过检测 ICM 患者治疗前后外周血中 miR-182、CITED2 及 HIF-1 的表达,并对其相关性分析,旨在研究 miR-182、CITED2 及 HIF-1 在 ICM 病理生理机制中的意义,为揭示 miRNAs 在 ICM 临床诊疗中的价值提供依据。

1 对象与方法

1.1 对象

选择 2015-03—2016-03 在广西医科大学第一附属医院确诊为 ICM 的 46 例患者为 ICM 组,另选择健康志愿者 32 例为对照组。ICM 入选标准:①冠脉造影至少 1 支主要冠脉及其分支存在 $\geq 50\%$ 狭窄性病变;②纽约心功能分级Ⅲ级或Ⅳ级;③心脏明显扩大及左室射血分数(LVEF) $\leq 40\%$ 。排除标准:冠心病机械并发症(室间隔穿孔、乳头肌功能不全)和其他心脏病(原发性心肌病、风湿性心脏病、高血压病、长期贫血、甲亢等)引起的心脏扩大和心衰,恶性肿瘤、急慢性感染、脑血管疾病、自身免疫性疾病、血液系统疾病以及肝肾功能不全。所有 ICM 患者入院后均给予传统抗 ICM 治疗,包括卧床休息、吸氧、限盐等;药物包括硝酸酯类、血管紧张素转换酶抑制剂(ACEI)或血管紧张素Ⅱ受体拮抗剂(ARB)、洋地黄类、利尿剂、 β 受体阻滞剂、抗凝或抗血小板制剂及他汀类药物等。ICM 组 3 个月为 1 个疗程,治疗前及治疗结束时检测氨基末端 B 型脑钠肽前体(NT-proBNP)、CITED2、HIF-

1、miR-182、心脏彩色超声、6 min 步行实验(6-min walk test, 6-MWT)。

1.2 NT-proBNP 水平测定

从每个研究对象抽取 10 ml 的全血到肝素化试管。此血液样品在室温下立刻送化学实验室,测定在采血后 1 h 内进行。NT-proBNP 水平测定采用罗氏(Roche)cobasE601 电化学发光免疫分析仪。此法的测量范围为 5~35 000 pg/ml,实验的变异系数为 1.2%~1.9%。

1.3 CITED2、HIF-1 浓度检测

所有研究对象于清晨空腹采肘静脉血 3 ml,置于普通试管中,自然凝固 1 h,以 1 500 r/min 离心 10 min 后分离血清,低温(-80℃)冷冻保存,集中检测。采用双抗体夹心酶联免疫吸附法(ELISA 法)测定血清 CITED2、HIF-1 的浓度,试剂盒购自武汉华美生物工程有限公司,操作步骤按照试剂盒说明进行。

1.4 miR-182 水平测定

所有患者肘前静脉采集血样,取全血标本 3 000 \times g 离心 10 min,取血浆转移至 1.5 ml 离心管中,12 000 \times g 离心 10 min,取 200 μ l 血浆,采用 TRIzol[®] LS 试剂盒(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)提取总 RNA。取溶解好的 RNA,利用紫外分光光度计测其 OD₂₆₀与 OD₂₈₀的吸光值。对符合 OD_{260/280}比值在 1.8~2.1 之间的总 RNA 用于后续实验。RNA 逆转录为 cDNA,引物设计与合成由上海吉玛公司完成。实时荧光定量聚合酶链式反应法(qRT-PCR)总反应体系为 20 μ l,包括 SYBR Premix Ex Taq II (2 \times)10 μ l,10 μ mol/L 上、下游引物各 0.8 μ l,ROX Reference Dye II (50 \times)0.4 μ l,cDNA 模板 2.0 μ l,ddH₂O 6.0 μ l。循环参数:95℃ 30 s,95℃ 5 s,60℃ 34 s,共 40 个循环。以 U6 为内参基因。计算 Ct 值,血浆 miR-145 的相对表达量用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct}法计算,在 PCR 反应结束后采用溶解曲线方法验证反应的特异性。

1.5 心脏超声检测

采用彩色多普勒超声仪(Philips,美国),由本院心脏彩超室医师按改良 Simpson 法检测,探头频率 2.0~4.0 MHz,测量 LVEF。

1.6 6MWT 距离检测

参照美国胸科协会 2002 年 6MWT 指南^[6],嘱患者在标测好的 30 m(两端各放 1 把椅子以备休息)安静、通风、平直的走廊里尽力来回步行,测量其 6 min 内步行的总距离。若患者在步行中出现严重心绞痛、晕厥或血流动力学显著异常则终止实验。

1.7 统计学处理

采用 SPSS19.0 统计软件包进行统计分析,计

量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 2 组间数据比较用 t 检验; 计数资料以率或百分数表示, 采用 χ^2 检验; 相关性分析用 Pearson 直线相关分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 基线资料

ICM 组治疗前与对照组在性别、年龄、高血压史、糖尿病史、吸烟史、血脂异常、收缩压及舒张压等方面差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 1。

2.2 检测指标

ICM 组治疗前 CITED2、LVEF 及 6MWT 距离明显低于对照组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$); 而 NT-proBNP、HIF-1 及 miR-182 表达明显高于对照组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。与同组治疗前比较, ICM 组治疗后 CITED2、LVEF 及 6MWT 距离明显升高、NT-proBNP、HIF-1 及 miR-182 显著降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$), 见表 2。

表 1 2 组基线资料比较

临床特征	对照组 (32 例)	ICM 组治疗前 (46 例)	P 值
男:女/例	20:12	32:14	0.515
年龄/岁	59.7 \pm 5.9	61.9 \pm 6.6	0.146
高血压	14(43.80)	19(41.30)	0.830
糖尿病	3(9.38)	11(23.90)	0.100
吸烟	10(31.30)	19(41.30)	0.366
血脂异常	8(25.00)	20(43.50)	0.094
收缩压/mmHg [△]	129.6 \pm 12.7	133.0 \pm 13.3	0.270
舒张压/mmHg	78.3 \pm 8.5	80.0 \pm 8.2	0.377

[△] 1 mmHg=0.133 kPa。

表 2 2 组各项检测指标比较

组别	NT-proBNP /(pg·ml ⁻¹)	CITED2 /(pg·ml ⁻¹)	HIF-1 /(pg·ml ⁻¹)	miR-182	LVEF/%	6MWT/m
对照组	245.53 \pm 64.87	195.72 \pm 61.02	32.16 \pm 11.10	2.19 \pm 0.75	63.25 \pm 5.45	558.22 \pm 48.17
ICM 组治疗前	2 544.26 \pm 729.15 ¹⁾	70.72 \pm 17.54 ¹⁾	202.13 \pm 49.74 ¹⁾	6.53 \pm 1.10 ¹⁾	34.57 \pm 3.73 ¹⁾	331.61 \pm 62.74 ¹⁾
ICM 组治疗后	748.30 \pm 247.23 ²⁾	135.67 \pm 34.89 ²⁾	109.26 \pm 37.02 ²⁾	4.15 \pm 1.20 ²⁾	43.28 \pm 4.14 ²⁾	396.98 \pm 60.80 ²⁾

与对照组比较,¹⁾ $P < 0.01$; 与同组治疗前比较,²⁾ $P < 0.01$ 。

2.3 miR-182、CITED2、HIF-1 的表达与心功能变化的相关性

Pearson 相关性分析结果表明, ICM 组治疗前血浆 miR-182 水平与 CITED2、LVEF 及 6MWT 距离呈负相关 ($r = -0.427$ 、 -0.351 、 -0.298 , $P < 0.05$); 与 HIF-1 呈正相关 ($r = 0.337$, $P < 0.05$); 而与 NT-proBNP 无相关性 ($r = 0.073$, $P > 0.05$)。

3 讨论

本次研究证实, ICM 患者治疗前的 CITED2、LVEF 及 6MWT 距离均较对照组明显降低, 而 miR-182、NT-proBNP 及 HIF-1 的水平则明显升高。ICM 患者经治疗后, 反映心功能的经典指标 NT-proBNP、LVEF 及 6MWT 距离均较治疗前有明显改善, ICM 患者心功能较前好转, 同时 miR-182 及 HIF-1 的水平也随着心功能好转而降低。进一步的相关性分析还发现, ICM 患者 miR-182 与 CITED2、LVEF、6MWT 距离呈负相关, 与 HIF-1 则呈正相关。

ICM 是由于冠脉狭窄闭塞, 长期慢性心肌缺血而导致的严重心肌功能障碍性疾病。长期心肌缺血可造成心肌细胞坏死、凋亡, 心肌顿抑或心肌冬眠, 继而引起心肌细胞数量减少、纤维组织增多以及病理性心室重构。研究表明, 导致 ICM 的病理生理机制包括微循环障碍、炎症反应、细胞内钙稳态失调及心肌凋亡等^[7-8]。进一步研究发现, 一些编码信号转导和能量代谢的基因在缺血心脏中明显下调; 正是由于缺血损伤或压力刺激导致的转录信号变化, 最终导致了心功能不全^[9-10]。miRNA 通过影响 mRNA 的稳定性或抑制 mRNA 的翻译来影响基因表达。大量的实验证明循环 miRNAs 可以广泛存在于人类细胞外液中, 包括血清、血浆和组织。Cakmak 等^[4]的研究显示, 慢性心衰患者血清中的 miR-182 表达明显增高; 而且 miR-182 在心衰的预后价值高于 NT-proBNP 和 hsCRP, 笔者的研究结果与之相似, 并证实 miR-182 与心功能的变化紧密相关, 可作为 ICM 诊断及进行风险评估的生物

标志物。另外,在本研究中 ICM 患者 miR-182 与其可能靶蛋白 CITED2 呈负相关,与 HIF-1 则呈正相关。这可能是由于 ICM 患者血液中的 miR-182 表达明显升高,并作用于其靶蛋白 CITED2,使之表达降低。Herrer 等^[11]研究发现,ICM 患者的心肌组织 CITED2 表达水平明显降低,且 CITED2 mRNA 表达水平与 LVEF 呈正相关^[11],笔者的观察与之相似。由于 CITED2 是 HIF-1 转录激活的辅阻遏物,CITED2 表达的降低可能引起 HIF-1 表达升高,因此 miR-182 的表达与 HIF-1 呈正相关。Lei 等^[2]的研究表明,在缺血性心脏中 HIF-1 途径的慢性激活导致了心脏的衰退以及心功能不全的进展。本研究中,miR-182 可能通过其靶蛋白 CITED2 致 HIF-1 水平明显升高,HIF-1 途径的慢性激活,使得 ICM 患者的心功能不全逐渐进展,LVEF 进一步降低,6MWT 距离也明显降低,因此 miR-182 的表达与 LVEF、6MWT 距离呈负相关。本研究显示 miR-182 的表达与 NT-proBNP 无明显相关性,考虑 NT-proBNP 受影响因素较多,如年龄、肥胖、急性冠脉综合征、肺部疾病等均有可能影响 NT-proBNP 的水平^[12],因此 miR-182 与 NT-proBNP 并未显示明显的相关性。

综上所述,ICM 患者血浆 miR-182 水平升高,可将其作为 ICM 诊断及风险评估的新型生物标志物。另外,miR-182 可能通过其靶蛋白 CITED2 上调 HIF-1,最终参与调控 ICM 的发生及发展。但本研究尚存在局限性,例如,NT-proBNP 的表达受影响因素较多,这些影响因素和 ICM 患者的基础疾病(如糖尿病、高血压等)是否会对 miR-182、CITED2、HIF-1 的表达水平产生影响尚不清楚,需要在将来的研究中增加样本量进行亚组分析以及行多因素分析进一步明确。而且,miR-182 与 CITED2 的靶向匹配关系是通过靶基因预测软件计算得出,应在今后的基础研究中通过双荧光素酶报告基因系统作进一步鉴定。

参考文献

- [1] 中华医学会心血管病分会,中华心血管病杂志编辑委员会. 中国心力衰竭诊断和治疗指南 2014[J]. 中华心血管病杂志,2014,42(2):98-122.
- [2] LEI L, MASON S, LIU D, et al. Hypoxia-inducible factor-dependent degeneration, failure, and malignant transformation of the heart in the absence of the von

Hippel-Lindau protein[J]. *Mol Cell Biol*, 2008, 28: 3790-3803.

- [3] YIN Z, HAYNIE J, YANG X, et al. The essential role of Cited2, a negative regulator for HIF-1alpha, in heart development and neurulation[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99:10488-10493.
- [4] CAKMAK HA, COSKUNPINAR E, IKITIMUR B, et al. The prognostic value of circulating microRNAs in heart failure: preliminary results from a genome-wide expression study[J]. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*, 2015, 16:431-437.
- [5] IKITIMUR B, CAKMAK H A, COSKUNPINAR E, et al. Relationship between circulating microRNAs and left ventricular mass in symptomatic heart failure patients with systolic dysfunction[J]. *Kardiol Pol*, 2015, 73:740-746.
- [6] ATS Committee on Proficiency Standards for Clinical Pulmonary Function Laboratories. ATS statement: guidelines for the six-minute walk test[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2002, 166:111-117.
- [7] HASENFUSS G, PIESKE B. Calcium cycling in congestive heart failure[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2002, 34:951-969.
- [8] ISHIKAWA K, LADAGE D, TAKEWA Y, et al. Development of a preclinical model of ischemic cardiomyopathy in swine[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011, 301:H530-537.
- [9] HOSHIJIMA M, CHIEN K R. Mixed signals in heart failure: cancer rules[J]. *J Clin Invest*, 2002, 109:849-855.
- [10] KITTLESON M M, MINHAS K M, IRIZARRY R A, et al. Gene expression analysis of ischemic and nonischemic cardiomyopathy: shared and distinct genes in the development of heart failure[J]. *Physiol Genomics*, 2005, 21:299-307.
- [11] HERRER I, ROSELLÓ-LLETÍ E, ORTEGA A, et al. Gene expression network analysis reveals new transcriptional regulators as novel factors in human ischemic cardiomyopathy [J]. *BMC Med Genomics*, 2015, 8:14.
- [12] ZENG X, LI L, SU Q. The prognostic value of N-terminal pro-brain natriuretic peptide in non-ST elevation acute coronary syndromes: a meta-analysis[J]. *Clin Chem Lab Med*, 2012, 50:731-739.

(收稿日期:2016-08-05)