

血清 miR-146a 与 miR-34a 表达水平对 ACS 冠脉病变及预后评估价值*

牛君义¹ 陈凤英¹ 狄祥龙¹ 陈敬严¹ 谢秀峰¹

[摘要] 目的:探讨急性冠状动脉综合征(ACS)患者血清 miR-146a、miR-34a 表达水平及临床价值。方法:选取 2018 年 2 月—2019 年 7 月在内蒙古医科大学附属医院行冠状动脉(冠脉)造影术的 100 例 ACS 患者为研究对象,同期选取 100 例体检人群为对照组。造影结果行 Gensini 评分,将 ACS 患者分为轻度组(47 例)、中度组(34 例)、重度组(19 例)。采用实时荧光定量 PCR 法检测各组 miR-146a、miR-34a 表达水平。随访患者 1 年内主要不良心血管事件(MACE)发生情况。**结果:**ACS 3 组患者血清 miR-146a、miR-34a 表达均高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);重度组 miR-146a、miR-34a 表达水平高于中度组与轻度组,并且中度组 miR-146a、miR-34a 表达水平高于轻度组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。随访 1 年,MACE 亚组血清 miR-146a、miR-34a 表达水平高于非 MACE 亚组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论:**ACS 患者血清 miR-146a、miR-34a 呈高表达,并与冠脉病变程度密切相关。

[关键词] 急性冠状动脉综合征;miR-146a;miR-34a;冠状动脉病变;主要不良心血管事件

doi:10.13201/j.issn.1001-1439.2020.09.008

[中图分类号] R541.4 **[文献标志码]** A

Clinical value of serum levels of miR-146a and miR-34a to the severity and prognosis in patients with acute coronary syndrome

NIU Junyi CHEN Fengying DI Xianglong CHEN Jingyan XIE Xiufeng

(Department of Emergency, Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Huhhot, 010050, China)

Corresponding author: XIE Xiufeng, E-mail: bbgqiyang1001@163.com

Abstract Objective: To explore the serum levels and clinical value of miR-146a and miR-34a in patients with acute coronary syndrome (ACS). **Method:** The 100 patients with ACS who underwent coronary angiography from February 2018 to July 2019 were collected to ACS group. And the 100 healthy volunteers during the same period were enrolled to control group. The ACS patients were divided into mild group (47 cases), moderate group (34 cases) and severe group (19 cases), according to the Gensini score. The serum levels of miR-146a and miR-34a in each group were detected by quantitative real-time polymerase chain reaction. Follow-up one year, the occurrence of major adverse cardiovascular events (MACE) were compared between two groups. **Result:** Compared with the control group, the serum levels of miR-146a and miR-34a in ACS group were significantly higher ($P < 0.05$). The serum levels of miR-146a and miR-34a in the severe group were higher than moderate group or mild group ($P < 0.05$), and the serum levels of miR-146a and miR-34a in the moderate group were higher than mild group ($P < 0.05$). Follow-up one year, the serum levels of miR-146a and miR-34a in the MACE sub-group were higher than non-MACE sub-group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Serum levels of miR-146a and miR-34a are high in patients with ACS, and are closely related to the severity of coronary artery disease.

*基金项目:内蒙古医科大学科技百万工程(No:YKD2016KJBW007)

¹内蒙古医科大学附属医院急诊科(呼和浩特,010050)

通信作者:谢秀峰, E-mail: bbgqiyang1001@163.com

[19] Houten SM, Wanders R, Ranea-Robles P. Metabolic interactions between peroxisomes and mitochondria with a special focus on acylcarnitine metabolism[J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2020, 1866(5): 165720.

[20] Ruiz M, Labarthe F, Fortier A, et al. Circulating acylcarnitine profile in human heart failure: a surrogate of fatty acid metabolic dysregulation in mitochondria and beyond[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2017, 313(4): H768-H781.

[21] 余航,陈慧,曹丽菲,等.急性心肌梗死患者血清脂蛋白相关磷脂酶 A2 的表达及其与冠状动脉病变程度和预后的相关性[J].临床心血管病杂志, 2020, 36(5): 433-437.

[22] Stegemann C, Pechlaner R, Willeit P, et al. Lipidomics profiling and risk of cardiovascular disease in the prospective population-based Bruneck study[J]. Circulation, 2014, 129(18): 1821-1831.

(收稿日期:2020-06-29)

Key words acute coronary syndrome; miR-146a; miR-34a; coronary artery disease; major adverse cardiovascular events

急性冠脉综合征(ACS)是最常见的急危重症之一^[1]。近年来 ACS 诊疗进展较大,但预后未见显著改善,原因在于主要不良心血管事件(MACE)发生率未有效降低^[2]。临床尚无较好评估 ACS 患者预后的指标^[3]。近年来微小 RNA(miRNAs)引起关注,其与多种疾病发生发展及预后相关,故有学者认为 miRNAs 可能与 ACS 病变存在相关性^[4]。本研究探讨 miRNAs 表达水平与冠状动脉(冠脉)严重程度及预后关系,分析其在 ACS 患者早期监测和预后评估中的价值。

1 对象与方法

1.1 对象

选取 2018 年 2 月—2019 年 7 月内蒙古医科大学附属医院收治行冠脉造影术 ACS 患者 100 例,其中男 73 例,女 27 例。纳入标准:① ACS 诊断胸痛持续时间 > 30 min;② 心电图两个以上导联提示心肌缺血;③ 血清心肌酶 cTnI 和 CK-MB 超过正常值两倍以上,但不稳定型心绞痛可正常;④ 冠脉造影提示血管病变。

选取同期健康体检人群 100 例纳为对照组。纳入标准:① 既往无冠心病及心肌梗死、心肌炎、心肌病、心力衰竭(心衰)史;② 年龄 < 75 岁。

本研究经医院伦理委员会同意并签署知情同意书。两组研究对象排除标准:急性心衰及严重心律失常者;严重感染或恶性肿瘤病史患者;血液系统疾病及自身免疫性疾病者。

1.2 标本采集

两组次日清晨空腹采集肘静脉血 4 ml,室温下静置 30 min,400 × g 离心 10 min 后取上清液,置入 -80℃ 冰箱保存。

1.3 血清 miRNAs 检测

① 取 500 μl 血清与 1 ml TRIzol 混匀室温静置 15 min 后,依次加异丙醇、75%乙醇重复上述操作,提取总 RNA, -20℃ 保存。

② 用 cDNA 反转录试剂盒对总 RNA 行反转录,合成 cDNA 产物,目标引物序列: miR-146a: (F) 5'-GGTTTCATCCAGGATCGAGCAGG-3', (R) 5'-ACAGGCCTTATGGTCACGAAGGC-3'; miRNA-34a: (F) 5'-GCCCTGGCAGTGTCTTAG-3', (R) 5'-CAGTGCCTGTCGTGGAGT-3'; 内参 GAPDH: (F) 5'-CGTTAAGGCCGCTAGAC-CCGGGA-3', (R) 5'-GCGGCCTTAAAGTACG-TACA-3'。在冰上构建反转录 RNA 为 cDNA 混合反应体系:100 mmol/L dNTP 0.15 μl, 50 U/μl 多链反转录酶 1 μl, 10 × 反转录缓冲液 1.5 μl, 20 U/μl RNA 酶抑制剂 0.19 μl, 无核酸酶水 4.16 μl, 总

体积 7 μl。分别加 1.6 ng/μl RNA 液 5 μl, 5 × 逆转录引物 3 μl, 混匀, 5000 g 离心 1 min。循环反应: 16℃ 30 min; 42℃ 30 min; 85℃ 5 min, 再立即插入冰浴至少 1 min, 置 -20℃ 保存。

③ 实时荧光定量 PCR 仪行 qRT-PCR 反应。按试剂盒提示准备 PCR 扩增体系: cDNA 2 μl, 上下引物各 3 μl, Taq 聚合酶 0.5 μl, 总体积 25 μl。反应条件: 95℃ 变性 15 s; 60℃ 退火 1 min, 共扩增 30 循环后, 终止扩增反应。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算 miR-146a、miR-34a 表达水平相对定量值。

1.4 冠脉造影

由本院心内科医生操作, DSA 图像处理系统定量分析冠脉狭窄病变程度, 对造影结果行 Gensini 评分^[5], 根据分值差异将 ACS 组患者分为: 轻度组, 47 例, 评分 < 50 分; 中度组, 34 例, 评分 50~90 分; 重度组, 19 例, 评分 > 90 分。

1.5 随访

所有患者术后均采用门诊复查或电话方式随访, 时间点分别为术后 1 个月、3 个月、6 个月、1 年, 记录随访期间发生的 MACE 事件, 终点事件主要包括: 心源性死亡、再发性 ACS、卒中及恶性室性心律失常。根据 MACE 发生情况将 ACS 组分为两个亚组: MACE 亚组(18 例)和非 MACE 亚组(82 例)。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 20.0 行统计学分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 符合齐性检验组间比较用成组 *t* 检验, 冠脉病变组间比较用 ANOVA 检验, 亚组间比较用 LSD-*t* 检验; 计数资料采取百分数表示, 比较用 χ^2 检验。统计分析以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准。

2 结果

2.1 一般资料比较

两组性别、年龄、高血压、糖尿病、吸烟史等差异无统计学意义($P > 0.05$), 见表 1。

2.2 生化资料比较

ACS 组 CK-MB、cTnI、WBC、AST、LDL-C 高于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 两组间血肌酐、空腹血糖水平比较差异无统计学意义($P > 0.05$), 见表 2。

2.3 血清 miR-146a 及 miR-34a 表达水平比较

ACS 组血清 miR-146a 及 miR-34a 表达水平高于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.001$), 见表 3。

2.4 不同冠脉病变 miR-146a、miR-34a 表达

重度组血清 miR-146a、miR-34a 表达水平高于

中度组与轻度组,差异有统计学意义($P < 0.001$),而中度组的两种指标水平高于轻度组,差异有统计学意义($P < 0.001$),见表 4。

2.5 MACE 与 miR-146a、miR-34a 表达关系

随访 1 年,ACS 患者 MACE 发生率 18.00%,其中心源性死亡 2 例、再发性 ACS 3 例、卒中 10 例及恶性室性心律失常 3 例;MACE 亚组患者造影后接受支架植入术 6 例(33.33%),接受急诊静脉

溶栓治疗 12 例(66.67%);非 MACE 亚组患者造影后接受支架植入术 76 例(92.68%),接受急诊静脉溶栓治疗 6 例(6.52%),两亚组患者造影后治疗方式存在显著差异($\chi^2 = 35.224, P < 0.001$)。发生 MACE 患者血清 miR-146a、miR-34a 表达水平高于未发生 MACE 患者,差异有统计学意义($P < 0.001$),见表 5。

表 1 两组一般临床资料分析

组别	例数	年龄/岁	男/例(%)	高血压病史/例(%)	糖尿病史/例(%)	吸烟史/例(%)
ACS 组	100	64.15 ± 11.72	63(63.0)	50(50.0)	19(19.0)	46(46.0)
对照组	100	64.87 ± 10.54	60(60.0)	40(40.0)	15(15.0)	38(38.0)
t/χ^2		0.458	0.190	2.020	0.567	1.314
P		0.648	0.663	0.155	0.451	0.252

表 2 两组生化资料比较

组别	例数	CK-MB /(U · ml ⁻¹)	cTnI /(U · ml ⁻¹)	WBC /(×10 ⁹ · L ⁻¹)	AST /(U · ml ⁻¹)	肌酐 /(μmol · L ⁻¹)	空腹血糖 /(mmol · L ⁻¹)	LDL-C /(mmol · L ⁻¹)
ACS 组	100	80.02 ± 12.39	28.08 ± 7.68	12.03 ± 4.12	142.57 ± 71.22	83.17 ± 21.35	8.49 ± 3.16	2.79 ± 0.81
对照组	100	14.06 ± 5.07	0.04 ± 0.01	7.15 ± 1.54	39.03 ± 10.49	80.26 ± 17.49	7.85 ± 2.94	2.51 ± 0.62
t		49.271	36.558	11.095	14.383	1.054	1.483	2.745
P		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.293	0.140	0.007

表 3 两组血清 miR-146a、miR-34a 相对表达量比较

组别	例数	miR-146a	miR-34a
ACS 组	100	19.95 ± 4.86	24.13 ± 6.95
对照组	100	10.05 ± 3.24	13.67 ± 3.44
t		16.949	13.489
P		<0.001	<0.001

表 4 不同冠脉病变 ACS 患者血清 miR-146a、miR-34a 表达水平比较

Gensini 评分	例数	miR-146a	miR-34a
轻度	47	16.98 ± 2.86	18.95 ± 1.97
中度	34	20.45 ± 3.26	22.06 ± 2.95
重度	19	27.12 ± 3.62	35.23 ± 5.72
F		9.133	12.741
P		<0.001	<0.001

表 5 ACS 的 MACE 发生与血清 miR-146a、miR-34a 表达水平的关系

组别	例数	miR-146a	miR-34a
MACE 亚组	18	24.83 ± 3.93	38.57 ± 5.39
非 MACE 亚组	82	19.39 ± 4.26	22.84 ± 5.75
t		4.971	10.622
P		<0.001	<0.001

3 讨论

miRNA 是一组单链非编码小分子 RNA,通过抑制 mRNA 编码蛋白质翻译过程,调控目标基因表达^[6]。研究表明,部分 miRNA 参与心肌细胞的生长及凋亡过程,进而参与心肌梗死、心力衰竭等心血管疾病发生发展^[4]。研究者认为 miRNA 对于 ACS 患者 PCI 术后冠脉再狭窄具有较好的预测价值^[7]。miR-146a 通过对靶基因的调控,参与肿瘤、心血管疾病等多种疾病病理过程。既往研究显示,miR-146a 在动脉粥样硬化斑块中表达水平较对照组升高 2.87 倍^[8]。miR-34a 在心脏、肾脏等组织中高表达^[9],研究表明 miR-34a 在动脉粥样硬化斑块中高表达^[10-11]。IL-1β、TNF-α 等促炎细胞因子可诱导内皮细胞中 miR-145 等 miRNA 分子表达水平快速上调,而 miRNA 又能通过抑制 RNA 结合蛋白表达及影响整合素连接激酶表达等多种途径,抑制内皮细胞活化^[12-14]。另据研究发现,给小鼠注射 anti-miR-34a 能使凋亡相关蛋白表达显著减少,抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达显著增多,从而降低内皮细胞凋亡数量^[15-16]。因此,miR-34a 表达水平降低可促使抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达上调,从而抑制内皮细胞凋亡^[17]。这些都提示 miR-146a、miR-34a 在冠心病发病中扮演重要角色。然而目前 ACS 患者血清中 miR-146a、miR-34a 表达水平及与冠脉病变程度相关性等问题至今未见临床报

道,因此本研究通过检测 ACS 患者血清 miR-146a、miR-34a 表达水平,分析其与冠脉病变程度及疾病预后关系,以探究其在 ACS 早期诊断及预后评估价值。

先前已有研究发现,血清 miR-146a、miR-34a 与多种心血管疾病发生发展有着密切关系,可作为心血管疾病风险预测和预后评估的新指标^[18]。本研究进一步分析这两种血清 miRNAs 在 ACS 患者表达水平及在不同冠脉病变程度患者中表达水平差异。结果显示,此 2 种 miRNAs 在 ACS 患者循环血清中表达水平均显著高于对照组,同时随着冠脉病变加重,在患者体内表达水平也呈现增高趋势,由此提示 ACS 患者冠脉病变程度越重,血清 miR-146a、miR-34a 表达水平越高。此外,本研究对入组 ACS 患者行 1 年随访,发现发生 MACE 患者 miR-146a、miR-34a 表达水平较未发生 MACE 患者显著升高,提示 miR-146a、miR-34a 不仅可作为 ACS 早期诊断标志物,还可作为 ACS 病情预测与预后评估潜在标志物。

综上所述,ACS 患者血清 miR-146a、miR-34a 表达水平升高,且随着冠脉病变程度加重而升高,与 MACE 发生相关;因此 miR-146a、miR-34a 可作为辅助 ACS 病情监测及预后评估的潜在标志物。但本实验属于小规模临床研究,仍需进一步扩大样本量来支持现有研究结果。

参考文献

[1] 秦小伟,项鹰羽,黄立娟.循环 miRNA 在急性冠脉综合征中的研究进展[J].国际免疫学杂志,2018,41(1):89-93.

[2] Wang W, Li T, Gao L, et al. Diagnostic and prognostic impact of circulating microRNA-208b and microRNA-499 in patients with acute coronary syndrome[J]. Biomark Med, 2020, 14(2): 87-95.

[3] Qiu H, Chen Z, Lv L, et al. Associations between microRNA polymorphisms and development of coronary artery disease: a case-control study[J]. DNA Cell Biol, 2020, 39(1): 25-36.

[4] 许佳昕,吕伟.急性 ST 段抬高型心肌梗死患者血清 miR-1-3p、H-FABP 检测水平及与冠状动脉病变程度的关系[J].临床急诊杂志,2018,19(12):816-820.

[5] Gensini GG. A more meaningful scoring system for determining the severity of coronary heart disease[J]. Am J Cardiol, 1983, 51(3): 606.

[6] Ahlin F, Arfvidsson J, Vargas KG, et al. MicroRNAs as circulating biomarkers in acute coronary syndromes: A review[J]. Vascul Pharmacol, 2016, 81: 15-21.

[7] 马智会,朱永武.冠状动脉血管内超声钙化特征联合血清 miRNA-1、miRNA-208b 对 NSTEMI-ACS 患者 PCI 术后冠状动脉再狭窄的预测价值[J].临床心血管病杂志,2019,35(9):795-800.

[8] Bukauskas T, Mickus R, Cereskevicius D, et al. Value of Serum miR-23a, miR-30d, and miR-146a biomarkers in ST-elevation myocardial infarction[J]. Med Sci Monit, 2019, 25: 3925-3932.

[9] Arroyo AB, de Los Reyes-García AM, Rivera-Caravaca JM, et al. MiR-146a regulates neutrophil extracellular trap formation that predicts adverse cardiovascular events in patients with atrial fibrillation[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2018, 38(4): 892-902.

[10] 刘艳宾,杨树涵,陈红伟,等.老年冠心病患者血清 miRNA-34a 表达及其临床意义[J].实用医学杂志,2019,35(22):3482-3486.

[11] Kaur A, Mackin ST, Schlosser K, et al. Systematic review of microRNA biomarkers in acute coronary syndrome and stable coronary artery disease[J]. Cardiovasc Res, 2020, 116(6): 1113-1124.

[12] Wu S, Sun H, Sun B. MicroRNA-145 is involved in endothelial cell dysfunction and acts as a promising biomarker of acute coronary syndrome[J]. Eur J Med Res, 2020, 25(1): 2.

[13] 王木琼,孙向阳.美托诺尔对急性心肌梗死患者 miRNA-423-5p 与整合素连接激酶的影响[J].临床心血管病杂志,2019,35(10):899-902.

[14] Bagavad Gita J, George AV, Pavithra N, et al. Dysregulation of miR-146a by periodontal pathogens: A risk for acute coronary syndrome[J]. J Periodontol, 2019, 90(7): 756-765.

[15] Barraclough JY, Joan M, Joglekar MV, et al. MicroRNAs as prognostic markers in acute coronary syndrome patients-a systematic review[J]. Cells, 2019, 8(12): 1572.

[16] Tong KL, Mahmood Zuhdi AS, Wan Ahmad WA, et al. Circulating MicroRNAs in young patients with acute coronary syndrome[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(5): E1467.

[17] Rocic P. Can microRNAs be biomarkers or targets for therapy of ischemic coronary artery disease in metabolic syndrome? [J]. Curr Drug Targets, 2017, 18(15): 1722-1732.

[18] Moushi A, Michailidou K, Soteriou M, et al. MicroRNAs as possible biomarkers for screening of aortic aneurysms: a systematic review and validation study[J]. Biomarkers, 2018, 23(3): 253-264.

(收稿日期:2020-06-08)