

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.00696

ST段抬高型心肌梗死患者循环血 miR-1 的检测及意义

钟惠萍, 宗建平*

宁波市第一医院急诊内科, 宁波 315010

[关键词] 心肌梗死; 心电图记录术; ST段抬高; 微RNAs; 诊断

[中图分类号] R 542.22 [文献标志码] B [文章编号] 0258-879X(2012)06-0696-02

Detection of circulating miR-1 in patients with ST-segment elevation myocardial infarction and its clinical significance

ZHONG Hui-ping, ZONG Jian-ping*

Department of Emergency Medicine, First Hospital of Ningbo, Ningbo 315010, Zhejiang, China

[Key words] myocardial infarction; electrocardiography; ST-segment elevation; microRNAs; diagnosis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(6):696-Inside back cover]

ST段抬高型心肌梗死(ST-segment elevation myocardial infarction, STEMI)是目前临床上较为常见的一种心肌梗死类型,及时和正确的诊断对其治愈具有重要意义。心电图和心肌生化标志物(血清酶)检查是目前诊断心肌梗死的主要手段,尤其是后者具有重要的临床指导价值^[1]。

MicroRNA(miRNA)是真核细胞内一类大小约18~25个碱基的内源性非编码单链小分子RNA,通过抑制靶基因的表达,影响细胞的发育和疾病过程,参与了包括细胞增殖、分化、凋亡以及肿瘤发生和转移等各种生理病理过程^[2-3]。新近研究发现成熟的miRNA能够游离于细胞外,稳定存在于循环血中,具备疾病分子生物标志物的某些优点,已在多种疾病的诊断和预后中显示了独特的价值^[4-5]。心肌细胞具有特异的miRNA表达谱,其中miR-1在肌肉组织中特异表达且表达量最高^[6-7]。为此,本研究检测了STEMI患者血浆中miR-1的水平,并初步探讨其临床意义。

1 资料和方法

1.1 研究对象 经本院伦理委员会批准及患者的知情同意,收集2010年9月至2012年2月在本院经心电图、肌钙蛋白标志物等检测而临床确诊为STEMI、拟行经皮冠状动脉介入治疗(PCI)的患者45例,胸痛时间(4±1.2)h。另收集心绞痛(AP)25例和非冠心病样本(non-CHD)20例作为对照。

1.2 样本采集 抽取患者术前静脉血5ml,非冠心病对照组于体格检查前取血,收集于抗凝管中,1 000 r/min离心后取血浆,-80℃保存。相关参数由本院检验科检测。

1.3 核酸提取 采用mirVana™ miRNA Isolation Kit(美国

Ambion公司)提取每个样本血浆中的miRNA,具体操作参照试剂盒说明书进行。每200 μl的血浆提取miRNA后用20 μl去离子水溶解。

1.4 反转录合成cDNA 使用primeScript™反转录试剂盒(日本TaKaRa公司),利用茎环结构的反转录引物将miRNA反转录合成cDNA。10 μl的反应体系中含有primeScript™缓冲体系(1×),primeScript™反转录酶混合物(1×),miR-1的反转录引物(20 pmol),总RNA样品(4 μl),去离子水。反应条件为37℃,15 min;85℃,15s。所用miR-1反转录引物序列为:GGC TGC CGA CCG TGT CGT GGA GTC GGC AAT TGG TCG GCA GCC ATA CAT AC(5'-3')。

1.5 绝对定量PCR 运用OneStep SYBR PrimeScript™ PCR试剂盒(日本TaKaRa公司)进行miR-1的定量PCR检测。利用已知浓度的人工合成miR-1绘制绝对定量PCR的标准曲线,并通过检测的Ct值计算实际的miR-1拷贝数。反应条件为95℃ 30 s,95℃ 5 s,60℃ 15 s,共45个循环。所用miR-1的PCR引物序列为:正向GGT TAT GCC CTG CCA CAC(5'-3');反向ATG TCG CGC ACA ATC TCA C(5'-3')。

1.6 统计学处理 所有的实验重复3次,数据以 $\bar{x} \pm s_x$ 表示。采用SPSS 16.0统计学软件进行数据分析,计数资料组间比较采用 χ^2 检验,多组样本均数的比较采用One-Way ANOVA检验。检验水平(α)为0.05。

2 结果

2.1 临床一般资料 对入选本研究的患者和对照组的一般资料采用SPSS软件进行检验分析,结果见表1。3组在年

[收稿日期] 2012-04-17 [接受日期] 2012-05-31

[作者简介] 钟惠萍,主治医师. E-mail: zhppz1978@163.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 0574-87085122, E-mail: zongjianping@126.com

龄、性别、是否吸烟、是否合并糖尿病、是否伴高血压等方面 差异均无统计学意义($P>0.05$)。

表 1 入选患者的临床一般情况

项目	STEMI ($n=45$)	对照		P1 (STEMI vs AP)	P2 (STEMI vs Non-CHD)
		AP($n=25$)	Non-CHD($n=20$)		
年龄(岁)	62.3±8.9	61.3±5.2	63.3±8.2	0.742	0.691
性别(男/女)	28/17	15/10	12/8	1.000	1.000
吸烟 $n(\%)$	14(31.1)	10(40.0)	6(30.0)	1.000	0.887
糖尿病 $n(\%)$	10(22.2)	6(24.0)	2(10.0)	1.000	0.853
高血压 $n(\%)$	26(57.8)	7(28.0)	5(25.0)	0.613	0.648
收缩压 p/mmHg	139.10±10.90	130.30±11.80	128.40±9.60	0.892	0.505
舒张压 p/mmHg	82.20±8.50	73.20±6.20	80.60±7.80	0.737	0.156
血糖 $c_B/\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	5.74±1.11	5.76±1.32	5.05±0.46	0.323	0.212
总胆固醇 $c_B/\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	5.13±1.83	4.14±0.84	4.43±1.05	0.073	0.165
低密度脂蛋白 $c_B/\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	3.14±1.53	2.57±0.57	2.58±0.73	0.145	0.318
肌酐 $c_B/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	70.20±13.5	76.30±18.4	68.80±12.5	0.473	0.573

STEMI: ST段抬高型心肌梗死; AP: 心绞痛; Non-CHD: 非冠心病. 1 mmHg=0.133 kPa

2.2 STEMI 患者血浆 miR-1 的水平变化 绝对定量 PCR 结果显示, PCI 术前(胸痛后 3~5 h) STEMI 组血浆 miR-1 的平均拷贝数为 $1\ 827 \pm 81$, 显著高于 AP 组 (242 ± 36) 和 non-CHD 组 (252 ± 44), 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$); 而 AP 组和 non-CHD 组之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$); PCI 术后当天, 24.4% (11/45) 的患者血浆 miR-1 含量上升; 但在术后 7 d, 所有患者血浆 miR-1 的含量明显降低, 与对照样本无明显差异。

3 讨论

利用血浆中游离于细胞之外的核酸作为疾病标志物的研究, 很早就已开展, 但因 miRNA 稳定性差、DNA 的特异性弱等原因, 两者作为血清标志物的应用前景并不乐观^[8-9]。关于 miRNA 表达谱的研究已经发现 miRNA 具有很强的细胞、组织或疾病特异性, 这些特异表达的 miRNA 既是其功能研究的基础, 又是很好的疾病标志物。同时 miRNA 在血浆中的稳定性强, 在反复冻融、常温放置, 以及在酸性、碱性、核酸酶等极端情况下, 其含量仍保持相对稳定, 显示了血浆 miRNA 作为理想的疾病标志物所需的某些特征^[4]。

研究表明 miR-1 是心肌细胞中表达丰度最高的一个 miRNA, 且 miR-1 在调控心肌前体细胞分化、维持心功能以及发生心肌梗死、心肌肥厚等病理生理变化方面具有重要作用^[7,10]。循环血 miRNA 的芯片结果显示, miR-1 在健康人血浆中含量很低^[11]。本研究通过绝对定量 PCR 的方法对 STEMI 患者 PCI 术前(胸痛后 3~5 h) 血浆 miR-1 水平进行了定量分析, 发现其高于非 STEMI 患者, 并且在 PCI 术后 7 d, 其水平又明显降低。研究结果初步提示血浆 miR-1 水平对 STEMI 的诊断可能具有指导意义。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Jaffe A S, Babuin L, Apple F S. Biomarkers in acute cardiac disease: the present and the future[J]. J Am Coll Cardiol, 2006, 48:1-11.
- [2] Bartel D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell, 2004, 116:281-297.
- [3] Ambros V. The functions of animal microRNAs[J]. Nature, 2004, 431:350-355.
- [4] Mitchell P S, Parkin R K, Kroh E M, Fritz B R, Wyman S K, Pogosova-Agadjanyan E L, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105:10513-10518.
- [5] Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases[J]. Cell Res, 2008, 18:997-1006.
- [6] Kloosterman W P, Plasterk R H. The diverse functions of microRNAs in animal development and disease[J]. Dev Cell, 2006, 11:441-450.
- [7] Zhao Y, Ransom J F, Li A, Vedantham V, von Drehle M, Muth A N, et al. Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2[J]. Cell, 2007, 129:303-317.
- [8] Melkonyan H S, Feaver W J, Meyer E, Scheinker V, Shekhtman E M, Xin Z, et al. Transrenal nucleic acids: from proof of principle to clinical tests[J]. Ann N Y Acad Sci, 2008, 1137:73-81.
- [9] Vlassov V V, Laktionov P P, Rykova E Y. Circulating nucleic acids as a potential source for cancer biomarkers[J]. Curr Mol Med, 2010, 10:142-165.
- [10] Li Q, Song X W, Zou J, Wang G K, Kremneva E, Li X Q, et al. Attenuation of microRNA-1 derepresses the cytoskeleton regulatory protein twinfilin-1 to provoke cardiac hypertrophy[J]. J Cell Sci, 2010, 123:2444-2452.
- [11] Wang G K, Zhu J Q, Zhang J T, Li Q, Li Y, He J, 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.

[本文编辑] 周燕娟, 邓晓群