

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.00109

急性冠脉综合征患者血浆 miR-208b 和 miR-145 的表达水平及临床意义

贺付成¹, 赵雪¹, 高峰², 王玺³, 孙莉¹, 朱庆华¹

1. 郑州大学第一附属医院检验科, 郑州 450052
2. 郑州大学河南省医药科学研究所, 郑州 450052
3. 郑州大学第一附属医院心血管内科, 郑州 450052

[关键词] 急性冠脉综合征; miR-208b; miR-145; 血浆

[中图分类号] R 541.4

[文献标志码] B

[文章编号] 0258-879X(2013)01-0109-03

Plasma expression of microRNA-208b and microRNA-145 in acute coronary syndrome patients and its clinical relevance

HE Fu-cheng¹, ZHAO Xue¹, GAO Feng², WANG Xi³, SUN Li¹, ZHU Qing-hua¹

1. Laboratory Department, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan, China
2. Henan Academy of Medical and Pharmaceutical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan, China
3. Department of Cardiovasology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan, China

[Key words] acute coronary syndrome; miR-208b; miR-145; plasma

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(1): 109-111]

miRNA 是一类长度为 18~25 nt 的小分子非编码单链 RNA, 广泛存在于真核细胞中, 能通过降解靶 mRNA 或者抑制其翻译, 调节细胞增殖、分化与凋亡, 参与个体发育、机体代谢以及肿瘤发生、发展等过程^[1]。最新研究表明, miRNA 可稳定存在于人类外周血中, 作为生物标志物用于肿瘤、肌肉损伤、炎症等多种疾病的研究^[2-4]。报道显示 miR-208b 与心肌纤维、心肌肥厚、心力衰竭及心肌缺血形成有关^[5-6]; miR-145 与血管平滑肌细胞表型分化有关^[7]。本研究采用特异的茎环引物反转录实时定量 PCR(qRT-PCR)方法检测急性冠脉综合征(acute coronary syndrome, ACS)患者血浆 miR-208b 和 miR-145 的表达水平, 探讨其在 ACS 诊断中的可能作用。

1 材料和方法

1.1 研究对象 经医院伦理委员会批准及患者知情同意, 收集 2010 年 7 月至 2011 年 5 月在郑州大学第一附属医院确诊为 ACS 的患者 50 例为 ACS 组, 其中包括不稳定心绞痛(unstable angina, UA)20 例和急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)30 例; 另选择

16 例健康体检者作为对照组。ACS 诊断参照 2010 年美国心脏病学会(ACC)和美国心脏协会(AHA)发布的心血管诊疗指南标准。

1.2 试剂 TRI Reagent BD 购自美国 MRC Gene 公司; RT 反转录试剂盒和荧光定量 PCR 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司; 引物由广州锐博生物有限公司合成。普通 PCR 仪为美国 Bio-Rad 公司产品, NanoDrop 2000c 紫外分光光度计为美国赛默飞世尔公司产品, Lightcycler 1.5 荧光定量 PCR 仪为瑞士罗氏公司产品。肌钙蛋白 I(cTnI)采用罗氏电化学发光试剂盒测定。

1.3 标本采集 ACS 患者于出现胸痛症状后(5.0±1.4)h 采集静脉血 2~4 mL, 对照组于健康体检前取静脉血 2~4 mL, 置于 EDTA-Na₂ 抗凝管中。

1.4 qRT-PCR 测定血浆中 miR-208b 和 miR-145 水平 将血液标本以 1 600×g 离心 15 min, 将血浆转移至 EP 管, 再 12 000×g 离心 15 min, 吸取上清, 采用 TRI Reagent BD 试剂从 200 μl 血清中提取总 RNA, 实验步骤严格按照说明书进行操作。用 NanoDrop2000c 紫外分光光度计检测 RNA 溶液 D₂₆₀/D₂₈₀ 比值, 计算 RNA 浓度和纯度, 取 D₂₆₀/D₂₈₀ 比值在 1.8~2.1 者用于

[收稿日期] 2012-06-16

[接受日期] 2012-11-16

[基金项目] 河南省科技厅重点攻关项目(122102310226). Supported by the Key Project of the Scientific and Technological Department of Henan (122102310226).

[作者简介] 贺付成, 博士, 主任技师. E-mail: hefucheng@126.com

反转录。按照反转录试剂盒说明书配 20 μ L 反应体系,反应条件为 42 $^{\circ}$ C 15 min,85 $^{\circ}$ C 5 s,转录得到 cDNA 用于 qRT-PCR 反应。以 cDNA 为模板,按照 qRT-PCR 试剂盒说明书进行操作,反应条件:95 $^{\circ}$ C 30 s;95 $^{\circ}$ C 5 s,60 $^{\circ}$ C 20 s,40 个循环。miR-208b 和 miR-145 的相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算^[8]。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行独立样本 *t* 检验和 Pearson 相关性分析,检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 一般资料 对入选本研究的研究对象的一般资料进行统计学分析,结果见表 1。

表 1 各组研究对象的一般情况

项目	对照组	ACS 组		
		合计	AMI 亚组	UA 亚组
N	16	50	30	20
年龄(岁)	60.4 \pm 6.6	62.4 \pm 5.8	63.6 \pm 5.9	61.2 \pm 5.5
性别(男/女)	9/7	30/20	17/13	13/7
吸烟 <i>n</i> (%)	4(25)	14(28)	7(23.3)	7(25)
糖尿病 <i>n</i> (%)	1(6.25)	6(12)	4(13.33)	2(10)
高血压 <i>n</i> (%)	2(12.5)	14(28)	6(20)	8(40)
行 PCI <i>n</i> (%)	0(0)	41(82)*	26(86.7)	15(75)
舒张压 <i>p</i> /mmHg	76.80 \pm 6.20	77.80 \pm 6.30	78.00 \pm 6.20	77.45 \pm 6.52
收缩压 <i>p</i> /mmHg	115.75 \pm 14.08	122.98 \pm 15.82	121.00 \pm 16.81	125.95 \pm 14.10
LDL-C <i>c_B</i> /(mmol \cdot L $^{-1}$)	2.39 \pm 0.4	3.03 \pm 0.57*	3.15 \pm 0.56	2.85 \pm 0.56
HDL-C <i>c_B</i> /(mmol \cdot L $^{-1}$)	0.96 \pm 0.37	1.04 \pm 0.27*	1.03 \pm 0.27	1.04 \pm 0.29
TG <i>c_B</i> /(mmol \cdot L $^{-1}$)	1.07 \pm 0.83	1.75 \pm 0.79*	1.81 \pm 0.85	1.67 \pm 0.71
TC <i>c_B</i> /(mmol \cdot L $^{-1}$)	1.19 \pm 0.69	4.85 \pm 1.20*	5.07 \pm 1.41	4.53 \pm 0.69
cTnI <i>ρ_B</i> /(ng \cdot mL $^{-1}$)	0.01 \pm 0.01	8.04 \pm 8.0*	13.40 \pm 6.0	0.01 \pm 0.01 Δ

ACS: 急性冠脉综合征; AMI: 急性心肌梗死; UA: 不稳定心绞痛; PCI: 经皮冠状动脉介入术; LDL-C: 低密度脂蛋白胆固醇; HDL-C: 高密度脂蛋白胆固醇; TG: 三酰甘油; TC: 总胆固醇; cTnI: 肌钙蛋白 I; * $P < 0.05$ 与对照组比较; $\Delta P < 0.05$ 与 AMI 亚组比较。1 mmHg=0.133 kPa

由表 1 可见,对照组和 ACS 组相比,在年龄、性别、是否吸烟、是否患有糖尿病、是否患有高血压、舒张压及收缩压等方面差异无统计学意义($P > 0.05$),而在是否行经皮冠状动脉介入术(PCI)及低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、三酰甘油(TG)、总胆固醇(TC)、cTnI 水平等方面差异有统计学意义($P < 0.05$);AMI 亚组与 UA 亚组比较,仅 cTnI 水平差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 ACS 患者血浆 miR-208b 和 miR-145 水平变化 由表 2 可见,对照组血浆 miR-208b 表达水平为 0; ACS 患者出现胸痛后(5.0 \pm 1.4) h,血浆 miR-208b 表达水平为 265.70 \pm 256.24,其中 UA 亚组血浆 miR-208b 表达水平为 0,AMI 亚组血浆 miR-208b 表达水平为 442.16 \pm 174.38;统计分析显示,ACS 患者血浆 miR-208b 水平高于对照组($P < 0.05$),AMI 亚组血浆 miR-208b 水平高于 UA 亚组($P < 0.05$)。对照组血浆 miR-145 表达水平为(1.00 \pm 0.00);ACS 患者出现胸痛后(5.0 \pm 1.4) h,血浆 miR-145 表达水平为 0.21 \pm 0.12,明显低于对照组($P < 0.05$);AMI 亚组患者血浆 miR-145

水平与 UA 亚组相比差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 2 各组研究对象血浆 miR-208b 及 miR-145 水平比较

组别	N	$2^{-\Delta\Delta Ct}$, $\bar{x} \pm s$	
		miR-208b	miR-145
对照组	16	0	1.00 \pm 0.00
ACS 组	50	265.70 \pm 256.24*	0.21 \pm 0.12*
AMI 亚组	30	442.16 \pm 174.38	0.19 \pm 0.10
UA 亚组	20	0 Δ	0.25 \pm 0.14

ACS: 急性冠脉综合征; AMI: 急性心肌梗死; UA: 不稳定心绞痛; * $P < 0.05$ 与对照组比较; $\Delta P < 0.05$ 与 AMI 亚组比较

2.3 AMI 患者血浆 miR-208b 和 miR-145 水平与 cTnI 水平相关性分析 Pearson 相关性分析结果显示,AMI 患者血浆 miR-208b 水平与 cTnI 成正相关($r = 0.833$, $P < 0.05$),而血浆 miR-145 水平与 cTnI 无相关性($r = 0.352$, $P > 0.05$)。

3 讨论

目前 cTnI 的测定是诊断 AMI 特异和灵敏的标志

物之一,但对胸痛发作 6 h 内的患者其诊断灵敏度不高^[9]。筛选新的心肌标志物用于 ACS 早期诊断具有重要意义。目前的研究主要集中在肌肉特异和心脏特异的 miRNA,其中 miR-208a 和 miR-208b 是心脏特异表达的 miRNA,调控肌球蛋白重链基因(MHC)亚基表达,与心肌胚胎干细胞分化关系密切,并通过调节 MHC 的 α 亚基与 β 亚基转换参与心肌纤维化、心肌肥厚、心力衰竭及心肌缺血的发生^[10-12]。研究表明与健康及无冠脉病变胸痛者相比,ST 段抬高性心肌梗死(STEMI)患者 miR-208a 及 miR-208b 水平均显著升高^[6];而 Widera 等^[13]研究表明,与 UA 患者相比,非 ST 段/ST 段抬高性心肌梗死(NST/STEMI)患者循环 miRNA-208b 水平升高,而 miRNA-208a 水平却无升高。Wang 等^[5]发现,miR-208a 在非 AMI 患者中检测不到,而在 90.9% 的 AMI 患者和 100% 症状出现 4 h 内的 AMI 患者中很容易检测到。本实验采用 qRT-PCR 法检测 ACS 患者出现胸痛症状后(5.0±1.4) h 时血浆中 miR-208b 的表达,结果显示血浆 miR-208b 水平仅在 AMI 患者中升高,且 miR-208b 水平与 cTnI 水平成正相关,提示 miR-208b 有助于 AMI 的早期诊断。

此外,本实验还检测了 ACS 患者血浆 miR-145 的表达。miR-145 在血管平滑肌中高表达,且参与平滑肌细胞收缩表型的维持与正常增殖,缺乏 miR-145 的小鼠血管平滑肌缺乏收缩能力,因而表现为血压下降^[14]。本实验发现血浆 miR-145 在 AMI 和 UA 患者血浆中均降低,但与 cTnI 无相关性,提示 miR-145 有助于 ACS 的诊断,但在区分 AMI 和 UA 上的价值却有限。

综上所述,本实验结果发现 ACS 患者早期血浆中 miR-145 降低,其机制尚需进一步研究;而 miR-208b 可能更适合作为 AMI 早期诊断的生物标志物。

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] He L, Hannon G J. MicroRNAs; small RNAs with a big role in gene regulation[J]. *Nat Rev Genet*, 2004, 5: 522-531.
- [2] 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.
- [3] Qi P, Cheng S Q, Wang H, Li N, Chen Y F, Gao C F. Serum microRNAs as biomarkers for hepatocellular carcinoma in Chinese patients with chronic hepatitis B virus infection[J]. *PLoS One*, 2011, 6: e28486.
- [4] Lawrie C H, Gal S, Dunlop H M, Pushkaran B, Liggins A P, Pulford K, et al. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma[J]. *Br J Haematol*, 2008, 141: 672-675.
- [5] 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.
- [6] Corsten M F, Dennert R, Jochems S, Kuznetsova T, Devaux Y, Hofstra L, et al. Circulating microRNA-208b and Mi-croRNA-499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease[J]. *Circ Cardiovasc Genet*, 2010, 3: 499-506.
- [7] Collison A, Mattes J, Plank M, Foster P S. Inhibition of house dust mite-induced allergic airways disease by antagonism of microRNA-145 is comparable to glucocorticoid treatment [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2011, 128: 160-167.
- [8] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method[J]. *Methods*, 2001, 25: 402-408.
- [9] 聂宇, 刘哲, 陈曦, 丛祥凤. 循环 microRNA 与心血管疾病临床诊断[J]. *中华心血管病杂志*, 2011, 39: 377-382.
- [10] van Rooij E, Quat D, Johnson B A, Sutherland L B, Qi X, Richardson J A, et al. A family of microRNAs encoded by myosin genes governs myosin expression and muscle performance[J]. *Dev Cell*, 2009, 17: 662-673.
- [11] Wilson K D, Hu S, Venkatasubrahmanyam S, Fu J D, Sun N, Abilez O J, et al. Dynamic microRNA expression programs during cardiac differentiation of human embryonic stem cells: role for miR-499[J]. *Circ Cardiovasc Genet*, 2010, 3: 426-435.
- [12] Nakao K, Minobe W, Roden R, Bristow M R, Leinwand L A. Myosin heavy chain gene expression in human heart failure[J]. *J Clin Invest*, 1997, 100: 2362-2370.
- [13] Widera C, Gupta S K, Lorenzen J M, Bang C, Bauersachs J, Bethmann K, et al. Diagnostic and prognostic impact of six circulating microRNAs in acute coronary syndrome[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2011, 51: 872-875.
- [14] Cordes K R, Sheehy N T, White M P, Berry E C, Morton S U, Muth A N, et al. miR-145 and miR-143 regulate smooth muscle cell fate and plasticity[J]. *Nature*, 2009, 460: 705-710.