

MicroRNA-21 在扩张型心肌病患者血清中表达下调

许桂芬¹,翁智远¹,杨巍^{2*}

1. 福建医科大学附属第一医院内科,福州 350005
2. 哈尔滨医科大学附属第一医院内科,哈尔滨 150001

[摘要] **目的** 本文主要探讨血清 microRNA(miR)-21/155/181a/18b 在具有失代偿性心力衰竭症状的扩张型心肌病(扩心病)患者中的表达水平。**方法** 收集 40 例扩心病患者和 30 名健康对照者,通过实时免疫荧光定量 PCR 反应检测血清 miRNA。分析 miR-21 等 miRNA 和其他临床指标如 N 末端脑钠肽前体(NT-proBNP)、超敏 C-反应蛋白(hsCRP)、左室射血分数(LVEF%)、左室舒张末期内径(LVEDD)之间的相关性。**结果** 血清 miR-21 在扩心病患者中的相对表达量低于健康对照组($P<0.01$)。在所有的试验者中,血清 miR-21 与 LVEF%呈正相关,与 LVEDD 呈负相关($P<0.001$)。**结论** 与健康对照组相比,血清心肌重构相关的 miR-21 在失代偿性心力衰竭的扩心病患者中表达下调,并与疾病的严重程度相关。

[关键词] 微 RNAs;扩张型心肌病;血清;诊断

[中图分类号] R 542.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2016)03-0379-04

Serum microRNA-21 expression is significantly down-regulated in patients with dilated cardiomyopathy

XU Gui-fen¹, WENG Zhi-yuan¹, YANG Wei^{2*}

1. Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350005, Fujian, China
2. Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang, China

[Abstract] **Objective** To address the levels of serum miR-21/155/181a/18b in dilated cardiomyopathy (DCM) patients at a progressive heart failure stage. **Methods** The serum miRNAs were measured by real-time reverse-transcription PCR in 40 DCM patients and in 30 healthy controls. Pearson's correlation coefficient was used to calculate the potential correlation between miRNAs and other indicators, such as human N-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-proBNP), high-sensitivity C-reactive protein (hsCRP), left ventricular ejection fraction (LVEF%), and left ventricular end-diastolic diameter (LVEDD). **Results** Our findings revealed that serum miR-21 were significantly reduced in DCM patients compared with the healthy controls($P<0.01$). We also found that serum miR-21 was positively correlated with LVEF% and negatively correlated with LVEDD ($P<0.001$). **Conclusion** The serum level of cardiac remodeling-associated miR-21 is decreased in DCM patients at a progressive heart failure stage compared to the healthy controls, which may be also related to the disease severity.

[Key words] microRNAs; dilated cardiomyopathy; serum; diagnosis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2016, 37(3): 379-382]

MicroRNA(miRNA)能够游离于细胞之外,稳定存在于血浆或血清中,具有疾病和组织特异性等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^[1-2]。但是血清 miRNA 是否能用于心力衰竭(心衰)的诊断尚不清楚。心肌重构和炎症反应是心衰的两个重要的病理生理过程。miR-21/155/18b/181a 与炎症反应和心肌重构相关,在心血管系统组织中大量表达,且发挥着重要的功能^[3-9];但是它们在心衰患者血清中的表达水平仍然未知。扩张型心肌病(扩心病)是心衰和心脏移植的最常见原因之一,约占充血性心衰的 1/3,其病因不明,且在 20~60 岁男性中较多发。所以本研究选择扩心病患者进行特异 miRNA 的检测,并对其在扩心病诊断中的效价进行评价。

1 材料和方法

1.1 研究对象 (1)扩心病组:40 例,男 26 例,女 14 例,平均年龄(49.25±9.09)岁,均为 2011 年符合扩级心病诊断标准^[3]且于哈尔滨医科大学附属第一医院心内科住院的患者;扩心病组按纽约心功能分级(NYHA 分级)分为 NYHAⅢ级亚组 21 例, NYHAⅣ级亚组 19 例。(2)对照组:30 例,男 14 例,女 16 例,平均年龄(50.03±7.22)岁。对照组既往无心脏病病史,左室射血分数(LVEF%)>50%,且无自身免疫性病等疾病,超敏 C-反应蛋白(hsCRP)、肝肾功能、心肌酶、心脏彩超等各项指标均正常。两组均排除有瓣膜病、肥厚型或者酒精性心肌病、感染、恶性肿瘤、糖尿病、肺动脉高压或者肝脏纤维化等疾病者。

1.2 标本的采集与处理 入院 24 h 内抽取空腹静脉血后送至检验科行血肝肾功能、hsCRP、N 末端脑

钠肽前体(NT-proBNP)等项目检测。入院 3 d 内由心脏彩超室专业医师行心脏超声检查,测定 LVEF% 及左室舒张末期内径(LVEDD)。保留 8 mL 静脉血于抽血后 2 h 内离心,提取血清 RNA (Invitrogen 公司 TRIzol LS reagent,货号 10296-010)后,应用紫外分光光度计测定总 RNA 的光密度 D_{260} (核酸最大吸收波长)、 D_{280} (蛋白、酚类物质最大吸收波长)和 D_{260}/D_{280} 值检测其纯度, D_{260}/D_{280} 值范围在 1.8~2.1 可认为合格。在反转录酶的作用下将 miRNA 反转录成 cDNA(Promega 公司 Reverse Transcription System,货号 A3500),以管家基因 U6^[2] 为内参,进行实时荧光定量 PCR (Applied Biosystems 公司 SYBR Green PCR Master Mix,货号 4309155)。

1.3 引物设计 通过生物信息学方法获知 miR-21/155/18b/181a 的基因组序列,用 Primer 5 软件设计 PCR 引物^[2]。引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物序列

引物	引物序列 (5'-3')
U6 反转录引物	CGCTTCACGAATTTGCGTGTGCAT
上游引物	GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT
下游引物	CGCTTCACGAATTTGCGTGTGCAT
miR-21 反转录引物	GTCGTATCCAGTGCCTGTCTGTTGGAGTCGGCAATTGCACTGGATACGACTCAACAT
上游引物	GGGAGCTTATCAGACTGATG
下游引物	TGCGTGTCTGTTGGAGTC
miR-155 反转录引物	GTCGTATCCAGTGCCTGTCTGTTGGAGTCGGCAATTGCACTGGATACGACACCCCTA
上游引物	GGTGCTAATCGTGATAGGG
下游引物	AGTGCGTGTCTGTTGGAGTCG
miR-18b 反转录引物	GTCGTATCCAGTGCCTGTCTGTTGGAGTCGGCAATTGCACTGGATACGACCTAACTG
上游引物	GAGGTGCATCTAGTGCAG
下游引物	AGTGCGTGTCTGTTGGAGTC
miR-181a 反转录引物	GTCGTATCCAGTGCCTGTCTGTTGGAGTCGGCAATTGCACTGGATACGACACTCACC
上游引物	CATTCAACGCTGTCTGGTG
下游引物	AGTGCGTGTCTGTTGGAGTC

1.4 统计学处理 用 SPSS 15.0 统计软件进行数据处理。连续变量以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组之间对比用 χ^2 检验和 t 检验。各样品的 miR-21/155/18b/181a 和 U6 分别进行 real-time PCR 反应,相对定量即采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法,其中 $\Delta\Delta CT = \Delta CT(\text{心衰}) - \Delta CT(\text{对照})$, 而 $\Delta CT = CT(\text{miRNA}) - CT(U6)$,通过扩心病组与对照组的比值来分析 miRNA 表达量的变化。采用

Spearman 相关分析检测两组数据之间的相关性。检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 入选患者临床资料 收集 40 例扩心病患者和 30 例健康志愿者的临床资料,抽血之前对扩心病患者进行强心、利尿、减轻心脏负荷、控制心率等相关

药物治疗。两组在年龄、性别、吸烟及饮酒等方面差异均无统计学意义($P>0.05$),而临床指标 hsCRP、NT-proBNP、LVEF%、LVEDD 间差异有统计学意义($P<0.01$,表 2)。

表 2 扩心病组和对照组的一般临床资料

临床特征	对照组 N= 30	扩心病组 N= 40	P
年龄 (岁), $\bar{x}\pm s$	50.03 $\pm$ 7.22	49.25 $\pm$ 9.09	>0.05
性别 n(%)			
男	14(46.7)	26(65.0)	>0.05
女	16(53.3)	14(35.0)	
吸烟者 n(%)	7(23.3)	14(35.0)	>0.05
饮酒者 n(%)	4(13.3)	13(32.5)	>0.05
临床相关指标			
hsCRP ρ_B /(mg $\cdot$ L ⁻¹), $\bar{x}\pm s$	2.23 $\pm$ 2.69	6.33 $\pm$ 7.15	<0.05
NT-proBNP ρ_B /(pg $\cdot$ mL ⁻¹), $\bar{x}\pm s$	60.91 $\pm$ 39.65	3 722.62 $\pm$ 6 030.79	<0.01
LVEF%, $\bar{x}\pm s$	64.64 $\pm$ 5.74	31.30 $\pm$ 8.27	<0.01
LVEDD d/mm, $\bar{x}\pm s$	47.39 $\pm$ 4.09	68.14 $\pm$ 7.62	<0.01
药物干预 n(%)			
β -受体阻断剂		9 (22.5)	
ACEI/ARBs		24(60.0)	
利尿剂		33(82.5)	
地高辛		25(62.5)	

hsCRP: 超敏 C-反应蛋白; NT-proBNP: N 末端脑钠肽前体; LVEF%: 左室射血分数; LVEDD: 左室舒张末期内径; ACEI:血管紧张素转化酶抑制剂; ARBs: 血管紧张素Ⅱ受体拮抗剂

2.2 血清 miR-21 的表达水平 扩心病组患者血清中 miR-21 水平(以 2^{- $\Delta\Delta$ CT}表示)低于对照组(中位数:对照组为 33.92,扩心病组为 6.79; $P<0.01$)。

2.3 血清 miR-21 与患者临床特征之间的关系 血清 miR-21(以 2^{- $\Delta\Delta$ CT}表示)与 LVEF%呈正相关($r=0.471$, $P<0.001$),与 LVEDD 呈负相关($r=-0.440$, $P<0.001$);而 miR-21 和 NT-proBNP、hsCRP 之间无相关性($P>0.05$),NT-proBNP 与 LVEF%、LVEDD 之间的相关性较差($r=-0.362$; $r=0.297$)。hsCRP 与 LVEF%、LVEDD 之间的相关性亦较差($r=-0.352$; $r=0.361$)。NT-proBNP 与 hsCRP 之间亦没有相关性($P>0.05$),LVEF%与 LVEDD 具有较好的相关性 ($P<0.0001$, $r=-0.811$)。

2.4 血清 miR-155/18b/181a 的表达水平 结果表明,心肌重构相关的 miR-18b 以及炎症反应相关的 miR-155/181a 在血清中大量存在。在免疫细胞中大量表达的 miR-155 在扩心病组和对照组之间差异无统计学意义($P>0.05$)。miR-18b 在扩心病组和对照组之间差异无统计学意义($P>0.05$)。炎症相关的 miR-181a 在扩心病组的总体平均值较对照组稍有下降,但是差异仍然无统计意义($P>0.05$)。

3 讨论

本研究结果显示,与心肌重构及炎症反应相关的 miRNA 在血清中大量表达,但是并非所有的 miRNA 都异常表达(比如 miR-155/181a/18b)。循环中 miRNA 的来源尚无定论,现在普遍认为其来源于凋亡、坏死细胞的裂解或者组织细胞的主动分泌过程等。虽然 miRNA 的具体作用途径尚待进一步阐明,但通过对其疾病表达谱的研究已经发现 miRNA 具有器官组织及细胞特异性,而这些具有特异性的 miRNA 既是探索疾病发病机制的基础,又是良好的临床疾病诊断标志物^[10-11]。

miR-21 是目前在心血管疾病领域研究比较多的 miRNA 之一。研究表明,在心脏成纤维细胞中 miR-21 促进了心肌重构^[3]。但另一些研究表明,miR-21 在心肌细胞中具有抗凋亡作用;而且过表达 miR-21 可能改善心脏的射血功能,并减少心脏组织中胶原的沉积^[11-12]。虽然 miR-21 的具体作用仍然有争议,但是以往的研究结果都表明 miR-21 在病变的心肌组织中大量表达,并参与心肌重构过程。本实验的结果表明,血清 miR-21 的表达水平在扩心病患者中下调。有两个原因可以解释这一现象:首先,以往研究表明在心脏疾病中特异升高的 miR-21 具

有组织细胞保护作用,所以我们推断心衰时血清 miR-21 表达下调是因为心脏组织对血浆的摄取增多,miR-21 在心脏组织(特别是心肌纤维细胞)中积聚。第二,由于血液存在着大量的 RNA 酶,裸露游离的 miRNA 在加入血浆或血清中以后会很快降解。血液中内源 miRNA 分子常与脂质或者蛋白质等外来体结合而存在,而不以裸露游离的形式存在,通过这种保护机制来抵抗 RNA 酶的降解作用^[8,13-14]。所以,我们推测心衰时血清 miR-21 表达下调是因为脂质或者蛋白质等外来体在扩心病患者中的保护作用较正常者减弱,血清 miR-21 降解增多。

本实验表明,与 NT-proBNP、hsCRP 相比,miR-21 与 LVEF%、LVEDD 呈相关性,其中 miR-21 与 LVEDD 呈负相关,与 LVEF%呈正相关。LVEDD 和 LVEF% 是心衰患者 2 个重要的临床预后参考指标,与疾病的急性突发事件和死亡率相关。因此我们推测 miR-21 与疾病的严重性相关,血清 miR-21 下降越明显,患者的预后越差。NT-proBNP 等标记物的发现促进了心衰的诊断和治疗。但在本实验没有发现 NT-proBNP、hsCRP 和 miRNA-21 之间的相关性。当然这不能排除可能是患者例数太少所引起,我们推测 miR-21 可能是一个独立的指标。

众所周知,NT-proBNP、NYHA 分级、hsCRP 等在心衰的临床应用仍有一定的局限性,寻找新的客观可行的心衰标记物仍然需要。而血清 miRNA 的检测为我们提供一个思路,更多种类的 miRNA(不只是 miR-21)的研究在未来仍需进一步明确。评价血清 miRNA 在心衰疾病中的诊断价值在未来实验中仍需扩大样本量,以得到更加确切的结论。

[参考文献]

- [1] Ai J, Zhang R, Li Y, Pu J, Lu Y, Jiao J, et al. Circulating microRNA-1 as a potential novel biomarker for acute myocardial infarction[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 391: 73-77.
- [2] 雪若妍,史念珂. 骨质疏松、黄韧带骨化与正常人的血清 miRNA 的对比研究[J]. *第二军医大学学报*, 2014, 35(增刊): 44-45.
- XUE R Y, SHI N K. Serum miRNA in osteoporosis, ossification of the ligamentum flavum patients: a comparison with normal controls[J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2014, 35(Suppl): 44-45.
- [3] Thum T, Gross C, Fiedler J, Fischer T H, Kissler S, Bussen M, et al. MicroRNA-21 contributes to myocardial

disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts [J]. *Nature*, 2008, 456: 980-984.

- [4] Tili E, Michaille J J, Cimino A, Costinean S, Dumitru C D, Adair B, et al. Modulation of miR-155 and miR-125b levels following lipopolysaccharide/TNF- α stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock [J]. *J Immunol*, 2007, 179: 5082-5089.
- [5] Li D, Yang P, Xiong Q, Song X, Yang X, Liu L, et al. MicroRNA-125a/b-5p inhibits endothelin-1 expression in vascular endothelial cells [J]. *J Hypertens*, 2010, 28: 1646-1654.
- [6] Chen C Z, Li L, Lodish H F, Bartel D P. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation [J]. *Science*, 2004, 303: 83-86.
- [7] Tatsuguchi M, Seok H Y, Callis T E, Thomson J M, Chen J F, Newman M, et al. Expression of microRNAs is dynamically regulated during cardiomyocyte hypertrophy [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2007, 42: 1137-1141.
- [8] Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee J J, Lötvall J O. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells [J]. *Nat Cell Biol*, 2007, 9: 654-659.
- [9] Cheng Y, Ji R, Yue J, Yang J, Liu X, Chen H, et al. MicroRNAs are aberrantly expressed in hypertrophic heart: do they play a role in cardiac hypertrophy? [J]. *Am J Pathol*, 2007, 170: 1831-1840.
- [10] Quellet D L, Perron M P, Gobeil L A, Plante P, Provost P. MicroRNAs in gene regulation: when the smallest governs it all [J]. *J Biomed Biotechnol*, 2006, 2006: 69616.
- [11] 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: 10513-10538.
- [12] Sayed D, He M, Hong C, Gao S, Rane S, Yang Z, et al. MicroRNA-21 is a downstream effector of AKT that mediates its antiapoptotic effects via suppression of Fas ligand [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285: 20281-20290.
- [13] Dong S, Cheng Y, Yang J, Li J, Liu X, Wang X, et al. MicroRNA expression signature and the role of microRNA-21 in the early phase of acute myocardial infarction [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284: 29514-29525.
- [14] Dinger M E, Mercer T R, Mattick J S. RNAs as extracellular signaling molecules [J]. *J Mol Endocrinol*, 2008, 40: 151-159.