

血清 microRNA126 和 microRNA1 检测 对心衰诊断价值的研究*

浩日瓦,娜日罕,周红,董莉 (内蒙古医科大学附属医院检验科,呼和浩特 010050)

摘要:目的 探讨血液中 microRNA-126(miR-126)和 microRNA-1(miR-1)在心衰患者中的诊断及预后评估价值。方法 选择2015年9月~2017年1月心内科住院病人心梗后心衰患者(AMI组)45例,扩心病心衰患者(DCM组)30例,健康体检者(健康对照组)20例,采用定量反转录聚合酶链反应(qRT-PCR)检测其血清中 miR-126 和 miR-1 的相对含量,进行统计学分析。结果 ①患者组与对照组的 miR-126 和 miR-1 分别为 0.76 ± 0.012 vs 1.01 ± 0.145 和 0.54 ± 0.09 vs 1.27 ± 0.649 ,与对照组比较,患者组显著低于对照组,差异具有统计学意义($t=72.14, 38.05$, 均 $P<0.001$);AMI组与DCM组相比较,差异无统计学意义(均 $P>0.005$)。②患者组中 miR-126, miR-1 与 NTproBNP, cTnT, 心胸比均呈负相关,与 LVEF 呈正相关,相关系数分别为: $-0.427, -0.578; -0.716, -0.534; -0.311, -0.631; 0.557$ 和 0.435 , 均 $P<0.005$; ③miR-126 和 miR-1 诊断心衰的 ROC 曲线下面积为 0.52 和 0.51 , 最佳 cutoff 值分别为 0.549 和 0.53 , 灵敏度为 55% 和 65.3% , 特异度为 85% 和 78.2% , 准确度为 87.1% 和 90.2% , 联合检测 NTproBNP 和 cTnT 诊断心衰的灵敏度、特异度分别为 69.3% 和 92.6% 。④血清 miR-1, miR-126 水平与患者1年主要不良心脏事件(MACE)及死亡率无关,相对危险度为 $(2.35, 0.53, P>0.005)$ 。结论 用 ROC 曲线分析的结果表明, miR-126 和 miR-1 对于心衰具有诊断价值, 联合 NTproBNP 和 cTnT 对心衰诊断和治疗更有意义, 但不能用于心衰病因的区分, 且对患者1年的预后及不良事件预测无意义。

关键词: microRNA126, microRNA1; 心肌梗死; 扩心病; 心衰

中图分类号: R541.6; R392.11 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-7414(2018)03-018-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2018.03.006

Study on the Diagnostic Value of Detecting Serum MicroRNA126 and MicroRNA1 in Heart Failure

HAO Ri-wa, NA Ri-han, ZHOU Hong, DONG Li (Department of Clinical Laboratory,
the Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010050, China)

Abstract: **Objective** To evaluate the values of plasma microRNA-126, microRNA-1 on diagnosis and prognosis for heart failure after myocardial infarction and dilated cardiomyopathy patients. **Methods** Chose 45 cases of patients with heart failure after myocardial infarction (AMI) and 30 cases of enlarged heart disease in patients with heart failure (DCM) from hospitalized patients in department of cardiology from September 2015 to January 2017 as observation group, and 20 health check-ups as the control group. Used the quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) to detect the relative content of serum miR-126 and miR-1, doing statistical analysis. **Results** ①miR-126 and miR-1 of patients group and control group were 0.76 ± 0.012 vs 1.01 ± 0.145 and 0.54 ± 0.09 vs 1.27 ± 0.649 , respectively, compared with control group, the patient group was significantly lower than the control group ($t=72.14, 38.05, P<0.001$), having significantly statistical difference, and compared with the DCM group, the AMI group had no statistical significance ($P>0.005$). ②In the patients group, miR-126, miR-1 and NTproBNP, cTnT, and cardiothoracic ratio were negatively correlated, positively correlated with LVEF, and the correlation coefficients were -0.427 and $0.578, -0.716$ and $0.534, -0.311$ and $0.631, 0.557$ and 0.435 (all $P<0.005$). ③The area under the ROC curve of miR-126 and miR-1 was 0.52 and 0.51 . The optimal cutoff values were 0.549 and 0.53 respectively. Sensitivity was 55% and 65.3% , specificity was 85% and 78.2% , accuracy was 87.1% and 90.2% , and the sensitivity and specificity of NTproBNP and cTnT diagnosis heart failure were 69.3% and 92.6% respectively. ④Serum miR-1 and miR-126 levels were not related to the patients' major adverse cardiac events (MACE) and mortality in 1 year. The relative risk was 2.35 and 0.53 ($P>0.005$). **Conclusion** Circulating miR-126 and miR-1 can be used as a supplement biomarker for HF diagnosis, and cannot be as a biomarker of antidiastole.

Keywords: microRNA126; microRNA1; AMI; DCM; heart failure

心力衰竭(heart failure, HF)是由各种心脏结构或功能性疾病所导致的心室功能受损,以器官、组织血液灌注不足为临床表现的一组临床症状。急性心肌梗死(acute myocardial infarction AMI)是我国心力衰竭的主要病因^[1];扩张性心肌病(dilated cardiomyopathy, DCM)是一类以左心室或双

* 基金项目:内蒙古自治区自然科学基金(2017MS0826),内蒙古自治区科技厅科技计划基金(2016)。

作者简介:浩日瓦(1992—),男,在读硕士研究生,研究方向:心血管疾病检验诊断学。

通讯作者:董莉(1964—),女,主任检验师,硕士研究生导师。

心室扩大伴收缩功能障碍为特征的心肌病,其终末期结果也为心力衰竭。因此对心衰的早期诊断尤为重要,而目前实验室常用的N端脑钠肽(NT-proBNP)、肌钙蛋白(cTnT),因其受到诸多因素影响,诊断意义有限。有报道认为,microRNA能够调节多种心脏疾病的病理过程,并呈异常表达^[2],而microRNA126(血管内皮细胞及血管功能密切相关)和microRNA1(心肌肥大相关)是否可以作为新的诊断标志物,现报告如下:

1 材料与方法

1.1 研究对象 选取2015年9月~2017年1月在我院心内科住院确诊的AMI后心衰患者45例,(诊断依据2015年心梗后心衰诊断指南),男性23例,女性22例,年龄45~82岁。扩心病后心衰患者30例(诊断依据2015年扩心病心衰诊断指南),其中男性17例,女性13例,年龄47~77岁。选取同期在我院进行健康体检的健康者20例为对照组,其中男性10例,女性10例,年龄40~83岁。

1.2 仪器与试剂 采用赛默飞世尔科技公司Series 4' A2型实时荧光定量PCR扩增仪,美国伯乐公司的CFX96 REAL-TIME system; miRcute miRNA提取分离、合成、荧光定量检测试剂盒(天根生化科技有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 标本采集:两组患者入院即刻使用抗凝分离胶管采集全血5 ml,于湘仪TDZ5-W5离心机3000 r/min离心5 min分离血清,使用无RNA酶的离心管于-80℃冰箱,健康对照组标本采集及处理与上两组标本相同。

1.3.2 miR-1, miR-126表达量检测:采用qRT-PCR技术。

表1

DCM组及AMI组心衰患者miR-126及miR-1相对表达量($\bar{x} \pm s$)

项 目	对照组(n=20)	心衰患者		t值	P值
		AMI组(n=45)	DCM组(n=30)		
miR-126	1.01±0.145	0.76±0.012	0.75±0.01	72.14	0.001
miR-1	1.27±0.649	0.54±0.09	0.40±0.02	38.05	0.001

2.2 miR-126, miR-1与NTproBNP, cTnT, 心胸比, 射血分数相关性分析 见表2。

表2 心衰患者miR-126, miR-1与cTnT, NTproBNP, LVEF相关性

项 目	miR-126		miR-1	
	r	P	r	P
cTnT	-0.716	0.016	-0.78	0.004
NTpro-BNP	-0.427	0.004	-0.399	0.03
心胸比	-0.357	0.006	-0.591	0.02
LVEF	0.557	0.007	0.345	0.03

心衰患者血清miR-126, miR-1相对含量与NTproBNP, cTnT, 心胸比呈负相关, 与LVEF呈

1.3.3 引物设计: miR-1, miR-126引物及内参引物U6, 外参均由天根生化科技(北京)有限公司提供。miR126引物序列: UCGUAC-CGUGAGUAAUAAUGCG, U6内参引物序列: ATGGACTATCATATGCTTACCGTA; miR1引物序列: CTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAG, 检测外参引物序列: TAATACGACTCACTAT-AGGG。miR-1, miR-126, 内参基因为U6 RNA, miR-1及miR-126表达相对量为 $2^{-[(C_{\text{miR-1-CtU6}}) - (C_{\text{miR-1-CtU6}}) \text{ 对照组}]}$,

$2^{-[(C_{\text{miR-1-CtU6}}) - (C_{\text{miR-1-CtU6}}) \text{ 对照组}]}$ 。

1.4 NTproBNP, cTnT, LVEF检测及诊疗记录

血清NTproBNP, cTnT检测使用罗氏全自动电化学发光仪, 按说明书进行, 所有检测均在室内质控在控下进行。

1.5 统计学分析 采用SPSS 20.0统计软件对数据进行处理。检测结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用t检验。组间比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。Spearman's相关法分析患者血清miR-126, miR-1与NTproBNP, cTnT, LVEF的相关性。采用ROC曲线评估miRNA-126和miRNA-1水平对心衰诊断效能, 将曲线下面积作为反应诊断标准性的指标, 得出诊断敏感度和特异度。使用COX回归及Kaplan-Meier生存曲线分析miR-126, miR-1与心衰患者预后的关系。

2 结果

2.1 血清miR-126, miR-1检测结果 见表1。两组患者血清miR-126, miR-1较对照组显著下降($t = 72.14, 38.05$, 均 $P < 0.001$)。AMI组与DCM组比较, 差异有统计学意义($P > 0.05$)。

正相关, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 血清miR-126, miR-1对心衰的诊断效能 见表3。

表3 心衰患者miR-126, miR-1的诊断效率比较(%)

项 目	miR-126	miR-1	cTnT	NTpro-BNP	χ^2	P
敏感度	55	65.3	97	89	38.6	0.002
特异度	85	78.2	98	85	11.3	0.055
阳性预测值	77.23	78.44	94	94	25.1	0.05
阴性预测值	36.7	35.2	47	44	12.35	0.06
准确度	87.1	90.2	94	91.3	3.6	0.13

miR-126, miR-1灵敏度仅为55%, 65.3%, 低

于 cTnTt pro-BNP, 差异无统计学意义 ($P < 0.05$); 但特异度为 85%, 78.2%, 与 cTnT, NTpro-BNP 比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 阳性预测值为 77.23%, 78.44% 低于 cTnT 和 NTpro-BNP, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。阴性预测值和准确度, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结果显示血清 miR-126 和 miR-1 对心衰有诊断意义。

2.4 心衰患者 12 个月预后 COX 回归分析 对两组病人 12 个月预后进行生存分析, 发现校正心肌梗死标志物后 miR-126 的 12 个月相对危险度为 0.53, (95% CI 0.451~1.452, $P = 0.052$), 0.73 (95% CI 0.516~1.529, $P = 0.062$), 差异无统计学意义。miR-1 的 12 个月生存分析其相对危险度分别为 1.35 (95% CI 0.542~1.893, $P = 0.073$), 2.35 (95% CI 0.432~1.939, $P = 0.053$), 差异无统计学意义。

3 讨论 MicroRNAs(miRNAs)是内源性非编码小 RNA, 长约 18~23 个核苷酸序列, 可通过结合 mRNA 的 3'非翻译区抑制转录和翻译过程^[3], 调节基因的表达。miRNAs 多数存在于组织细胞中, 并与心肌发育、细胞肥大、纤维化等有关^[4]; 其中部分 miRNAs 存在于外周循环, 可用于外周血的检测, 为我们实验的可行性提供了依据。

miR-1 是心脏和肌肉特异性的 miRNA, 也是心脏中含量最丰富的 miRNA, miR-1 通过 Ca/CaM(Ca 与 CaM 的比值为心肌肥大信号通路的重要介质)途径引起心肌肥大继而导致心衰^[5], 心衰时 miR-1 下调, 可引起心肌细胞肥大, 其原因在于: miR-1 下调后使靶基因钙调蛋白(calmodulin, CaM)和肌细胞增强因子-2(myocyte enhancer factor, Mef2)表达增加, Ca 与 CaM 比值下调活化钙神经素, 进一步引起转录因子激活 T 细胞核因子(nuclear factor of activated T cells, NFAT)的活化, CN-NFAT 通路激活导致心肌细胞肥大^[6]。

miR-126 能够通过调控 Spred-1, VCAM-1, HoxA9, v-Crk, EGFL-7 和 VEGF 等基因的表达, 参与调节血管发育、新生血管形成以及血管炎症反应等血管的生理和病理生理过程^[7,8]。其机理是: miR126 以 VCAM-1 为靶基因调节血管炎症反应^[9](此作用只能在翻译水平进行, 因 VCAM-1 的 3'UTR 区没有能与 miR126 精确配对区域, 无法在转录水平调节 VACM-1 的含量^[4]); VCAM-1 是由活化内皮细胞分泌的一种细胞因子, 可以使活化的血管内皮与炎症细胞黏附, 当 miR126 含量下降时, 其对 VCAM-1 的抑制作用减弱, 使白细胞和血管内皮细胞的黏附加强。因此, 检测循环 miR-126 可以推测血管炎症程度, 评估心衰及预

后^[6,10], 对临床有重要意义。此为内源性 microRNA126 的降低促进白细胞与血管内皮细胞的黏附的原因^[5]。

我们的研究发现: 两组心衰患者中 miR-1, miR-126 与对照相比显著下调; 而两组患者间差异均无统计学意义。这种差异表达使其有潜力用于心衰的诊断, 但不能作为区分心梗后心衰与扩心病心衰的依据。

我们的研究结果与 Gidlif 等^[5,11]的研究结果相同, 即: miR-126 显著下调。但 Gidlif 等^[5]的研究发现其上调和下调与时间相关, 同时其不同时间点的表达曲线与 cTnT 表达曲线一致, 但无相关性; 而我们的结果是 miR-126 相对含量与 cTnT 浓度呈负相关。存在出入可能原因是: miR-126 是血管特异性的 miRNA, 在 AMI 梗死处血管内浓度最高, 如直接取材与梗死处浓度必然高于外周血。外周循环中受循环血量、心率、相关生化指标等的影响; 也可能与我们标本收集只来源于我们医院(局限性), 对照组例数少有关。

Qian 等^[12]的研究发现, 在发生心衰的整个过程中, miR-1 非全程减少, 在心衰发生的初始阶段, miR-1 可轻微上调, 而我们的降低结果是否时间点掌握不够? 是否有必要进行连续观察? 有待于我们后期研究进行完善。

通过 miR-126 和 miR-1 检测效能的分析, 其灵敏度不够理想, 但特异度相当, 与 cTnT, NTpro-BNP 相比, 无显著性差异; 同时, cTnT, NTpro-BNP 检测受峰值、采样时间点、NTpro-BNP 半衰期、患者肾功能等因素影响就更加凸显出 miR-126 和 miR-1 检测的价值。而将其与 NTpro-BNP, cTnT 联合检测其灵敏度、特异度分别为 69.3% 和 92.6%。但 miR-126 和 miR-1 并非心衰患者 1 年内发生主要不良心脏事件的独立危险因素。

本次实验并未对心衰等级做划分(NYHA III&IV 级), 今后我们的研究实验会在进一步增加健康对照的同时, 注意标本收集后心衰的等级划分, 充分利用循环 miR-126, miR-1 浓度的不同, 对疾病进行尽量准确的诊断, 指导临床治疗。

总之, miR-126, miR-1 可用于心衰的诊断, 但不能用于心衰病因的区分, 且对患者 1 年的预后及不良事件预测无意义。

参考文献:

- [1] 胡春松, 吴清华, 胡大一. 中国心血管现状: 挑战与对策[J]. 中华高血压杂志, 2015, 23(7): 625-626.
Hu CS, Wu QH, Hu DY. China's cardiovascular status: challenges and countermeasures[J]. Chinese Journal of Hypertension, 2015, 23(7): 625-626.
- [2] 王 菲, Saumya Das. 基于循环血微小 (下转 23 页)

- RNA 预测心脏再同步化治疗疗效[J]. 上海大学学报(自然科学版), 2016, 22(3): 265-269.
- Wang F, Das S. Circulating miRNA predict response to cardiac resynchronization therapy[J]. Journal of Shanghai University(Natural Science), 2016, 22(3): 265-269.
- [3] Xu C, Hu Y, Hou L, et al. B-Blocker carvedilol protects cardiomyocytes against oxidative stress-induced apoptosis by up-regulating miR-133 expression[J]. J Mol Cell Cardiol, 2014, 75: 111-121.
- [4] Enes Coskun M, Kervancoglu M, Öztuzcu S, et al. Plasma microRNA profiling of children with idiopathic dilated cardiomyopathy[J]. Biomarkers, 2016, 21(1): 56-61.
- [5] Gidlöf O, Smith JG, Miyazu K, et al. Circulating cardio-enriched microRNAs are associated with long-term prognosis following myocardial infarction[J]. BMC Cardiovasc Disord, 2013, 13(1): 12.
- [6] Devaux Y, Vausort M, McCann G, et al. MicroRNA-150: a novel marker of left ventricular remodeling after acute myocardial infarction[J]. Circ Cardiovasc Genet, 2013, 6(3): 290-298.
- [7] Long G, Wang F, Duan Q, et al. Human circulating microRNA-1 and microRNA-126, microRNA-150-1 as potential novel indicators for acute myocardial infarction and other disease[J]. Int J Biol Sci, 2012, 8(6): 813-818.
- [8] Dong H, Dong S, Zhang L, et al. MicroRNA-214 exerts a cardio-protective effect by inhibition of fibrosis[J]. Anat Rec (Hoboken), 2016, 299(10): 1348-1357.
- [9] 肖星, 潘旭东, 马爱军, 等. 微小 RNA 对内皮细胞炎症反应过程中血管内皮细胞黏附分子 1 表达的影响[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2016, 18(5): 522-526.
- Xiao X, Pan XD, Ma AJ, et al. Effect of microRNA on expression of VCAM-1 in inflammatory reaction of HUVEC[J]. Chinese Journal of Geriatric Heart Brain and Vessel Disease, 2016, 18(5): 522-526.
- [10] Gupta MK, Halley C, Duan ZH, et al. miRNA-548c: a specific signature in circulating PBMCs from dilated cardiomyopathy patients[J]. J Mol Cell Cardiol, 2013, 62: 131-141.
- [11] 程涛, 黄刚. 血清 miRNA-21, miRNA-126 表达在诊断 PCI 术后冠状动脉再狭窄的临床应用价值[J]. 现代检验医学杂志, 2018, 33(1): 59-62, 66.
- Cheng T, Huang G. Clinical value of serum miRNA-21 and miRNA-126 expression in diagnosis of the coronary artery restenosis after PCI[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2018, 33(1): 59-62, 66.
- [12] Qian L, van Laake LW, Huang Y, et al. MiR-24 inhibits apoptosis and represses bim in mouse cardiomyocytes[J]. J Exp Med, 2011, 208(3): 549-560.