

microRNA-155 在病毒性心肌炎患者血清中的表达及临床意义*

刘佩勇, 谢梅, 纪玉强, 赵朝, 程曼丽 (西安市第一医院心内科, 西安 710002)

摘要:目的 探讨病毒性心肌炎患者(viral myocarditis)血清中 microRNA-155(miR-155)的表达水平及其临床意义。方法 采用定量逆转录聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)检测 38 例病毒性心肌炎患者和 38 例健康体检者血清中 miR-155 的水平,采用电化学发光检测血清中肌钙蛋白 T(cardiac troponin T, cTnT)的水平,统计分析 miR-155 与 cTnT 水平的相关性。**结果** 病毒性心肌炎患者血清中 miR-155 水平为 1.72 ± 0.59 ,明显高于对照组血清中 miR-155 水平(1.27 ± 0.34),二者差异具有统计学意义($t=4.074, P<0.01$);病毒性心肌炎患者血清中 miR-155 水平与 cTnT 呈明显正相关($r=0.624, P<0.05$)。**结论** 病毒性心肌炎患者血清中 miR-155 水平增高,且与心肌损伤程度相关,提示 miR-155 参与病毒性心肌炎的发生发展过程。

关键词:病毒性心肌炎;microRNA-155;临床意义;肌钙蛋白 T

中图分类号:R542.21;Q503 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2015)05-046-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2015.05.014

Changes of Serum Levels of MicroRNA-155 in the Patients with Viral Myocarditis and Their Clinical Significances

LIU Pei-yong, XIE Mei, JI Yu-qiang, ZHAO Zhao, CHENG Man-li

(Department of Cardiovascular Medicine, the First Hospital of Xi'an City, Xi'an 710002, China)

Abstract: Objective To explore the serum levels microRNA-155 (miR-155) and their clinical significances in the patients with viral myocarditis. **Methods** The serum levels of miR-155 were detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) in the 38 patients with viral myocarditis and 38 healthy controls. The serum levels of cardiac troponin T (cTnT) were detected by electrochemical luminescence method. The relationship between miR-155 and cTnT was analyzed by statistic analysis. **Results** Compared with healthy controls (1.27 ± 0.34), the serum levels of miR-155 in the patients with viral myocarditis (1.72 ± 0.59) were statistically higher ($t=4.074, P<0.01$). The serum levels of miR-155 were positive correlation with cTnT in the patients with viral myocarditis ($r=0.624, P<0.05$). **Conclusion** The serum levels of miR-155 in the patients with viral myocarditis were increased and related with the severity of myocardial injury. miR-155 may be involved in the occurrence and development of viral myocarditis.

Keywords: viral myocarditis; microRNA-155; clinical significance; cardiac troponin T

病毒性心肌炎(viral myocarditis, VCM)是由病毒感染引起的心肌炎症性病变,是常见的心血管疾病。多种病毒均可引起病毒性心肌炎,其中以肠道和上呼吸道病毒最多见,虽然引起病毒性心肌炎的病原体非常明确,但心肌损伤的具体机制尚未明确^[1,2]。微小 RNA(microRNA, miRNA, miR)是一类高度保守、长度大约 18~25 个碱基的非编码 RNA,1993 年发现第一个 miRNA-lin-4 以来,研究证实 miRNA 在细胞增殖、凋亡、分化等过程中发挥重要作用。miR-155 是一种具有多种功能的 miRNA,可以调控造血细胞及免疫细胞的发育分化,在肿瘤、炎症性疾病及自身免疫性疾病中发挥重要作用^[3~8]。近年来有研究证实 miR-155 在动脉粥样硬化、高血压、心肌肥厚、扩张性心肌病等心

血管疾病中发挥一定作用^[9~14],有研究报道 miR-155 在病毒性心肌炎动物模型及患者的心肌组织中高表达^[15,16]。本研究检测病毒性心肌炎患者血清中 miR-155 的表达水平,初步探讨 miR-155 在病毒性心肌炎中的作用。

1 材料与方法

1.1 研究对象 本研究入选 2014 年 3 月~2015 年 2 月在我院住院治疗诊断符合 2001 年成人急性病毒性心肌炎诊断参考标准^[17]的病毒性心肌炎患者 38 例,其中男性 18 例,女性 20 例,年龄 18~44 岁,平均年龄 28.94 ± 8.75 岁。选择同期在我院健康体检中心进行体检的 38 例健康者为对照组,其中男性 19 例,女性 19 例,年龄 17~45 岁,平均年龄 29.58 ± 9.26 岁,本研究得到医院伦理委员会批

* 基金项目:西安市科技计划项目[编号:SF1319(5)]。

作者简介:刘佩勇(1966—),男,本科,主治医师,主要从事心血管内科工作, Tel:13891862038, E-mail: xadyyy@163.com。

通讯作者:纪玉强(1977—),男,博士研究生,助理研究员,主要从事心血管疾病基础研究工作, Tel:13571992248, E-mail: jiyuqiang112299@126.com。

准并获得所有研究对象的知情同意。

1.2 试剂和仪器 Trizol 液购自美国 Invitrogen 公司, miScript Reverse Transcription 试剂盒购自德国 QIAGEN 公司, miScript SYBR[®] Green PCR 试剂购自德国 QIAGEN 公司。冷冻高速离心机为德国 Eppendorf 公司产品, 紫外分光光度仪为德国贝克曼公司产品, 定量 PCR 仪为美国 Bio-Rad 公司产品, 电化学发光分析仪为美国 Roche 公司产品。

1.3 研究方法

1.3.1 血液样本采集: 所有患者在治疗前采集空腹静脉血 4.0 ml, 对照组采集空腹静脉血 4.0 ml, 室温下 3 000 r/min 离心 5 min, 分离上清至无 RNA 酶的 EP 管中, 然后 4℃ 12 000 r/min 再次离心 10 min, 收集上清至无 RNA 酶的 EP 管中, -80℃ 保存备用。

1.3.2 血清中 miR-155 表达水平的检测: 取 800 μ l 血清, 加入 1.0 ml RNA 提取试剂 Trizol 液进行 RNA 提取, 提取的 RNA 溶于 DEPC 处理过的水中, 利用紫外分光光度仪测定 RNA 提取液的 $A_{260\text{ nm}}$, $A_{280\text{ nm}}$ 吸光度值, 计算 RNA 浓度和纯度, $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 的比值在 1.8~2.1 范围的 RNA 样品用于逆转录反应。根据文献[18]合成 miR-155 及内参照 U6 的逆转录引物及 PCR 扩增引物, 取 2.0 μ l RNA 采用 miScript Reverse Transcription 试剂盒进行逆转录反应, 反应体系如下: 4.0 μ l 反应缓冲液, 1.0 μ l 逆转录酶, 2.0 μ l RNA, 1.0 μ l 逆转录引物及 12.0 μ l 无 RNA 酶水。反应条件: 37℃ 60 min, 95℃ 5 min 后冰上冷却后 -20℃ 保存备用。采用 miScript SYBR[®] Green PCR 试剂进行定量 PCR 扩增, 20 μ l 反应体系包括 10 μ l 缓冲液、上下游引物各 2.0 μ l, cDNA 模板 2.0 μ l 及 4.0 μ l 无 RNA 酶水。反应条件为: 95℃ 预变性 15 min, 94℃ 15s, 55℃ 30s, 70℃ 30s 共 35 个循环, 每个样本设置三个复孔。PCR 扩增结束后自动获得循环阈值即 Ct 值, miR-155 表达水平采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 进行分析, $\Delta\Delta\text{Ct} = \text{实验组 } \Delta\text{Ct}(\text{目的基因 Ct} - \text{内参基因 Ct}) - \text{对照组 } \Delta\text{Ct}(\text{目的基因 Ct} - \text{内参基因 Ct})$ 。

1.3.3 血清中肌钙蛋白 T (cardiac troponin T, cTnT) 水平的检测: 取 100 μ l 血清, 采用电化学发光分析仪检测 cTnT 水平。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 16.0 软件进行数据处理, 计量资料采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两样本均数比较采用 *t* 检验, 血清中 miR-155 与 cTnT 水平间的关系采用 Pearson 相关法, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-155 在病毒性心肌炎患者与对照组血清中表达水平的比较 定量 PCR 结果显示病毒性心肌炎患者血清中 miR-155 水平 (1.72 ± 0.59) 明显高于对照组血清中 miR-155 水平 (1.27 ± 0.34), 二者差异具有统计学意义 ($t = 4.074, P < 0.01$)。

2.2 病毒性心肌炎患者血清中 miR-155 水平与 cTnT 水平的关系 统计分析显示病毒性心肌炎患者血清中 miR-155 水平与 cTnT 水平呈明显正相关 ($r = 0.624, P < 0.05$)。

3 讨论 病毒性心肌炎患者常有病毒感染病史, 其临床表现取决于心肌炎症的程度和部位, 大多轻症患者可无症状, 重者可以表现为心力衰竭甚至猝死, 极少数可进展为扩张型心肌病。目前研究认为心肌损伤主要由病毒直接作用及机体免疫反应所引起, 多种细胞因子及免疫细胞参与了这一炎症过程^[1,2]。自从 miRNA 被发现以来, miRNA 被证实参与了各种生理病理过程, 近年来研究发现 miRNA 也参与了病毒性心肌炎的发病过程。有学者^[19]利用柯萨奇病毒 coxsackievirus B3 (CVB3) 诱导的小鼠心肌炎模型采用 miRNA 芯片筛选出表达差异的 miRNAs, 其中 22 个 miRNA 下调, 4 个 miRNA 上调 (1.5 倍)。Zhang 等^[20]人也利用 miRNA 芯片检测心肌炎小鼠模型的心肌组织中 miRNAs 的表达情况, 结果发现 miR-21, miR-29a, miR-146a 和 miR-374 表达水平上调, 而 miR-23a 表达下调。国内学者^[21]采用茎环 RT-PCR 方法在 CVB3 感染小鼠的心肌组织中发现 miR-92a, 126-5p, 199a, 208b 和 210 表达上调, miR-21 和 320 下调。这些国内外研究结果提示 miRNA 在病毒性心肌炎中发挥了一定作用。

miR-155 是一种具有多种功能的 miRNA, 定位于人类 21q21, 位于 B 细胞非编码集合基因簇的第三个外显子中^[3]。miR-155 在乳腺癌、胃癌、肺癌、胰腺癌、宫颈癌等多种实体瘤及 B 细胞淋巴瘤、成人 T 细胞白血病等血液系统恶性肿瘤中高表达, 发挥致癌基因作用^[6]。随着对 miR-155 的研究不断深入, miR-155 在心血管疾病中也发挥了重要的作用。多项研究发现在动脉粥样硬化过程中 miR-155 可以发挥抑制炎症反应、防治动脉粥样硬化的功能^[22~24], 但 Nazari-Jahantigh 等^[25]研究却发现 miR-155 通过靶向一致 BCL6 的表达进而促进了动脉粥样硬化的发生。此外研究还发现在高血压、心肌肥厚、扩张性心肌病等心血管疾病中 miR-155 也发挥了一定作用^[9~14]。有关 miR-155 与病毒性心肌炎的研究报道较少, 且研究结果并不完全一致, Corsten 等^[15]人在建立的心肌炎小鼠模型中利用 miRNA 芯片技术发现 miR-155 在心肌

组织润性巨噬细胞和 T 淋巴细胞中高表达,抑制 miR-155 的表达可以减轻心肌炎症,同时在人的心肌炎组织中也验证了这一结果。有学者^[16]利用茎环 qRT-PCR 方法检测人的心肌炎右心室室间隔组织发现 miR-155 表达水平明显增高。但有研究检测 14 例病毒性心肌炎患者血浆中 miRNA 表达水平,发现 miR-155 水平虽然升高,但与对照组相比差异无统计学意义^[26]。为了进一步研究 miR-155 在病毒性心肌炎中的作用,本实验检测了 38 例病毒性心肌炎患者血清中 miR-155 的水平,结果发现病毒性心肌炎患者血清中 miR-155 水平明显高于对照组($P < 0.01$),这与 miR-155 在病毒性心肌炎组织中的表达水平一致^[15,16],与 Corsten 等^[26]人在病毒性心肌炎患者血浆中的检测结果不一致,这可能与病例选择、采样时间、检测方法等因素有关,需要进一步扩大样本量进一步研究。同时我们还分析了 miR-155 与 cTnT 水平的关系,统计分析显示病毒性心肌炎患者血清中 miR-155 水平与 cTnT 水平呈明显正相关($P < 0.05$),提示 miR-155 表达水平与心肌损伤严重程度也密切相关。

综上所述,病毒性心肌炎患者血清中 miR-155 水平增高,且与 cTnT 水平呈明显正相关,提示 miR-155 参与了病毒性心肌炎的发生发展过程,但 miR-155 在病毒性心肌炎中的具体作用机制尚有待于进一步研究,随着对 miR-155 与病毒性心肌炎的研究不断深入,miR-155 有望成为病毒性心肌炎诊断、判断预后及治疗的新靶点。

参考文献:

- [1] Yajima T. Viral myocarditis: potential defense mechanisms within the cardiomyocyte against virus infection [J]. *Future Microbiol*, 2011, 6(5): 551-566.
- [2] Pankuweit S, Klingel K. Viral myocarditis: from experimental models to molecular diagnosis in patients [J]. *Heart Fail Rev*, 2013, 18(6): 683-702.
- [3] Faraoni I, Antonetti FR, Cardone J, et al. MiR-155 gene: a typical multifunctional microRNA [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1792(6): 497-505.
- [4] Seddiki N, Brezar V, Ruffin N, et al. Role of miR-155 in the regulation of lymphocyte immune function and disease [J]. *Immunology*, 2014, 142(1): 32-38.
- [5] Vigorito E, Kohlhaas S, Lu D, et al. MiR-155: an ancient regulator of the immune system [J]. *Immunol Rev*, 2013, 253(1): 146-157.
- [6] Jurkovicova D, Magyerkova M, Kulcsar L, et al. miR-155 as a diagnostic and prognostic marker in hematological and solid malignancies [J]. *Neoplasma*, 2014, 61(3): 241-251.
- [7] Kanwal N, John P, Bhatti A. MicroRNA-155 as a therapeutic target for inflammatory diseases [J]. *Rheumatol Int*, 2013, 33(3): 557-560.
- [8] Leng RX, Pan HF, Qin WZ, et al. Role of microRNA-155 in autoimmunity [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2011, 22(3): 141-147.
- [9] Rayner KJ. MicroRNA-155 in the heart: the right time at the right place in the right cell [J]. *Circulation*, 2015, 131(18): 1533-1535.
- [10] Ma XC, Ma C, Zheng X. MicroRNA-155 in the pathogenesis of atherosclerosis: a conflicting role? [J]. *Heart Lung Circ*, 2013, 22(10): 811-818.
- [11] 李勤, 王玉明, 段勇. MiRNAs 与心血管疾病 [J]. *现代检验医学杂志*, 2014, 29(2): 22-25, 27.
- [11] Li Q, Wang YM, Duan Y. MiRNAs and cardiovascular diseases [J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2014, 29(2): 22-25, 27.
- [12] Heymans S, Corsten MF, Verheesen W, et al. Macrophage microRNA-155 promotes cardiac hypertrophy and failure [J]. *Circulation*, 2013, 128(13): 1420-1432.
- [13] Seok HY, Chen J, Kataoka M, et al. Loss of microRNA-155 protects the heart from pathological cardiac hypertrophy [J]. *Circ Res*, 2014, 114(10): 1585-1595.
- [14] Satoh M, Minami Y, Takahashi Y, et al. A cellular microRNA, let-7i, is a novel biomarker for clinical outcome in patients with dilated cardiomyopathy [J]. *J Card Fail*, 2011, 17(11): 923-929.
- [15] Corsten MF, Papageorgiou A, Verheesen W, et al. microRNA profiling identifies microRNA-155 as an adverse mediator of cardiac injury and dysfunction during acute viral myocarditis [J]. *Circ Res*, 2012, 111(4): 415-425.
- [16] Bao JL, Lin L. MiR-155 and miR-148a reduce cardiac injury by inhibiting NF- κ B pathway during acute viral myocarditis [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2014, 18(16): 2349-2356.
- [17] 中华心血管病杂志编辑委员会心肌炎心肌病对策专题组. 关于成人急性病毒性心肌炎诊断参考标准和采纳世界卫生组织及国际心脏病学会联合会工作组关于心肌病定义和分类的意见 [J]. *中国循环杂志*, 2001, 16(4): 307-308.
- [17] The Countermeasures groups of myocarditis and cardiomyopathy in the editorial committee of "Chinese Journal of cardiovascular disease", On acute viral myocarditis diagnostic criteria of adult and adopted the World Health Organization and international society of Cardiology Association Working Group on the definition and classification of cardiomyopathy [J]. *Chinese Journal of Circulation*, 2001, 16(4): 307-308.
- [18] 葛甜甜, 梁勇, 付蓉, 等. 淋巴瘤患者血浆中 miR-21, miR-155, miR-210 的表达及临床意义 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2012, 20(2): 305-309.
- [18] Ge TT, Liang Y, Fu R, et al. Expressions of miR-21, miR-155 and miR-210 in Plasma of Patients with Lymphoma and Its Clinical Significance [J]. *Journal of Experimental Hematology*, 2012, 20(2): 305-309.
- [19] Hemida MG, Ye X, Zhang HM, et al. MicroRNA-203 enhances coxsackievirus B3 replication through targeting zinc finger protein-148 [J]. *Cell Mol Life*

- Sci, 2013, 70(2): 277-291.
- [20] Zhang QH, Xiao ZH, He F, et al. MicroRNAs regulate the pathogenesis of CVB3-induced viral myocarditis[J]. *Intervirology*, 2013, 56(2): 104-113.
- [21] 何进,董春升,岳艳,等. CVB3 诱导病毒性心肌炎小鼠模型中相关 miRNA 表达谱分析[J]. *现代免疫学*, 2013, 33(1): 12-17.
- He J, Dong CS, Yue Y, et al. Analysis of miRNA expression profiles in CVB3-induced myocarditis[J]. *Current Immunology*, 2013, 33(1): 12-17.
- [22] Zhu J, Chen T, Yang L, et al. Regulation of microRNA-155 in atherosclerotic inflammatory responses by targeting MAP3K10[J]. *PLoS One*, 2012, 7(11): e46551.
- [23] Wu XY, Fan WD, Fang R, et al. Regulation of microRNA-155 in endothelial inflammation by targeting nuclear factor (NF)- κ B P65[J]. *J Cell Biochem*, 2014, 115(11): 1928-1936.
- [24] Dorsett Y, McBride KM, Jankovic M, et al. MicroRNA-155 suppresses activation-induced cytidine deaminase-mediated Myc-Igh translocation[J]. *Immunity*, 2008, 28(5): 630-638.
- [25] Nazari-Jahantigh M, Wei Y, Noels H, et al. MicroRNA-155 promotes atherosclerosis by repressing Bcl6 in macrophages[J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(11): 4190-4202.
- [26] Corsten MF, Dennert R, Jochems S, et al. Circulating microRNA-208b and microRNA-499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease[J]. *Circ Cardiovasc Genet*, 2010, 3(6): 499-506.
- 收稿日期: 2015-06-12
修回日期: 2015-07-21

(上接 45 页)胆固醇酯转运蛋白(CETP)一起组成复合物。周围组织中的胆固醇在复合物的作用下变成胆固醇酯,并被运送到肝脏进一步代谢,这样可以清除周围组织中的胆固醇,预防动脉粥样硬化的形成。ApoA I 是 LCAT 的辅助因子,可以激活并调节该酶的活性。LCAT 可以促进新生的 HDL 转变为成熟的 HDL,还可以介导 VLDL, LDL 和 TG 中过剩的胆固醇转移至 HDL 颗粒^[6]。CETP 可将 LCAT 催化生成的胆固醇由 HDL 转移至 VLDL, IDL 和 LDL 中,在 HDL 和 ApoA I 代谢中发挥重要作用^[7]。Hcy 是否通过影响 ApoA I, LCAT 和 CETP 进而影响 HDL 的代谢,其具体机制将在后续研究中进一步探讨。

活性氧簇(ROS)是需氧细胞在代谢过程中产生的,它与动脉粥样硬化的形成有一定关系。机体在正常状态下,ROS 的产生和清除保持着动态平衡。但是在动脉粥样硬化状态下,ROS 浓度过高,产生氧化应激,导致血管损伤,进而加剧动脉粥样硬化的发展^[8]。Mn-SOD 是体内重要的抗氧化剂,它可以保护血管内皮细胞免受氧自由基和过氧化物的损伤。研究发现, Mn-SOD 的活性降低与冠心病的发生密切相关^[4]。本研究中,冠心病组血清 Hcy 水平与 Mn-SOD 活性呈负相关,提示高 Hcy 可能会抑制 Mn-SOD 的活性,使细胞抗氧化的能力降低。Hcy 可以自身氧化产生过量的 ROS,使清除氧自由基的酶活性降低,引起组织细胞发生炎症反应,加剧动脉粥样硬化的进展^[9]。有文献报道, Hcy 可以通过抑制 SOD 的活性减少氧自由基的清除,削弱机体抗氧化保护机制,引起脂质过氧化,导致血管内皮损伤^[10]。至于 Hcy 引起脂质氧化和炎症反应的具体机制还有待进一步的研究。

参考文献:

- [1] Wong BW, Meredith A, Lin D, et al. The biological
- 收稿日期: 2015-04-20
修回日期: 2015-05-26

- role of inflammation in atherosclerosis[J]. *Can J Cardiol*, 2012, 28(6): 631-641.
- [2] Hu YH, Ma YT. Advances in research in relationship between hyperhomocysteinemia and coronary heart disease [J]. *Advances in Cardiovascular Diseases*, 2009, 30(4): 682-685.
- [3] Kakko S, Paivansalo M, Koistinen P, et al. The signal sequence polymorphism of the MnSOD gene is associated with the degree of carotid atherosclerosis[J]. *Atherosclerosis*, 2003, 168(1): 147-152.
- [4] 姚创利,赵佳,黎阳,等. 锰超氧化物歧化酶 9 Ala/Val 基因多态性对冠心病的影响[J]. *现代检验医学杂志*, 2015, 30(2): 1-2, 6.
- Yao CL, Zhao J, Li Y, et al. Effects of manganese superoxide dismutase 9 Ala/Val genetic polymorphisms on coronary heart disease[J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2015, 30(2): 1-2, 6.
- [5] Guthikonda S, Haynes WG. Homocysteine: role and implications in atherosclerosis[J]. *Curr Atheroscler Rep*, 2006, 8(2): 100-106.
- [6] Weers PM, Patel AB, Wan LC, et al. Novel n-terminal mutation of human Apolipoprotein A-I reduces self-association and impairs LCAT activation[J]. *J Lipid Res*, 2011, 52(1): 35-44.
- [7] Charles MA, Kane JP. New molecular insights into CETP structure and function; a review[J]. *J Lipid Res*, 2012, 53(8): 1451-1458.
- [8] Mladenka P, Simunek T, Hubl M, et al. The role of reactive oxygen and nitrogen species in cellular iron metabolism[J]. *Free Radic Res*, 2006, 40(3): 263-272.
- [9] Antoniadis C, Shirodaria C, Stefanadis C, et al. Homocysteine lowering; any use in atherosclerosis[J]. *Hellenic J Cardiol*, 2007, 48(5): 249-251.
- [10] Caylak E, Aytakin M, Halifeoglu I. Antioxidant effects of methionine, alpha-lipoic acid, N-acetylcysteine and homocysteine on lead-induced oxidative stress to erythrocytes in rats[J]. *Exp Toxicol Pathol*, 2008, 60(4/5): 289-294.