

## 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\*

程涛<sup>1</sup>, 黄刚<sup>2</sup> (1. 泾阳县医院检验科, 陕西泾阳 713700;  
2. 陕西中医药大学附属医院检验科, 陕西咸阳 712000)

**摘要:**目的 研究血清 miRNA-21, miRNA-126 检测在诊断经皮冠状动脉介入术(PCI)术后冠状动脉再狭窄(ISR)的临床应用。方法 收集82例在泾阳县医院和陕西中医药大学附属医院接受PCI治疗的急性冠脉综合征(ACS)患者(狭窄组30例, 未狭窄组52例)及33例健康体检者(对照组)的血清及临床资料, 采用 real-time qPCR 技术检测血清中 miRNA-21 和 miRNA-126 的相对表达量, 比较分析其在各组中的变化。应用血管内超声(intravascular ultrasound, IVUS)来评价 PCI 术后再狭窄的发生。结果 血清 miRNA-21 和 miRNA-126 在对照组、未狭窄组和狭窄组中的表达量分别为(0.22±0.03, 0.43±0.08, 0.92±0.17)和(0.87±0.15, 0.49±0.10, 0.23±0.04)。与对照组比较, 血清 miRNA-21 在狭窄组与未狭窄组的表达量明显增高, 而 miRNA-126 表达水平则显著降低, 差异均有统计学意义( $P=0.000$ )。狭窄组与未狭窄组比较 miRNA-21 表达水平明显增高, 而 miRNA-126 表达水平则显著降低, 差异均有统计学意义( $P=0.000$ )。IVUS 结果显示, 狭窄组的斑块面积(PLA)与未狭窄组比较显著增高, 而最小管腔面积(MLA)显著降低, 其差异均有统计学意义( $P=0.000$ )。两标志物在狭窄组的表达量具有负相关性( $r=-0.919, P<0.01$ )。狭窄组中 miRNA-126 和 miRNA-21 水平分别与 PLA 和 MLA 具有相关性( $r=-0.945, 0.926, P<0.01$ )和( $r=0.933, -0.917, P<0.01$ )。结论 血清 miRNA-21 和 miRNA-126 水平检测可用于急性冠脉综合征疾病 PCI 术后冠状动脉再狭窄的诊断以及预测, 可能作为该疾病时的基因检测指标之一。

**关键词:**急性冠脉综合征; 冠状动脉介入术; 冠状动脉再狭窄; 血管内超声; miRNA-21; miRNA-126

中图分类号: R531.3; R381 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2018)01-059-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2018.01.015

### Clinical Value of Serum miRNA-21 and miRNA-126 Expression in Diagnosis of the Coronary Artery Restenosis after PCI

CHENG Tao<sup>1</sup>, HUANG Gang<sup>2</sup> (1. Department of Clinical Laboratory, the Hospital of Jingyang Country, Shaanxi Jingyang 713700, China; 2. Department of Clinical Laboratory, the Affiliated Hospital of Shaanxi University of Chinese Traditional Medicine, Shaanxi Xianyang 712000, China)

**Abstract: Objective** To study the clinical application of serum miRNA-21 and miRNA-126 in diagnosis of the coronary artery restenosis after percutaneous coronary intervention (PCI). **Methods** The serum and clinical data of 82 cases of acute coronary syndrome (ACS) patients treated with PCI from the Hospital of Jingyang Country and the Affiliated Hospital of Shaanxi University of Chinese Traditional Medicine (stenosis group consisted of 30 cases, non-stenosis group consisted of 52 cases), and healthy persons (control group consisted of 33 cases) were collected. The relative expression levels of serum miRNA-21 and miRNA-126 were detected using real-time qPCR technology in the comparative analysis for their changes in the groups. Intravascular ultrasound (IVUS) was used to evaluate the occurrence of restenosis after PCI. **Results** Serum miRNA-21 and miRNA-126 levels in the control group, the non-stenosis group and the stenosis group were, (0.22±0.03, 0.43±0.08, 0.92±0.17) and (0.87±0.15, 0.49±0.10, 0.23±0.04), respectively. Compared with the control group, the expression level of serum miRNA-21 in the stenosis group and the non stenosis group were significantly increased, while the miRNA-126 levels was significantly decreased ( $P=0.000$ ), the differences were statistically significant. Compared with the non stenosis group, the level of miRNA-21 in the stenosis group was significantly increased, while the level of miRNA-126 was significantly decreased ( $P=0.000$ ), the differences were statistically significant. The results of IVUS showed that the plaque area (PLA) of the patients in the stenosis group was significantly higher than that in the non stenosis group, while the minimal luman area (MLA) was significantly decreased, and the differences were statistically significant ( $P=0.000$ ). There was a negative correlation between the expression of two markers in the stenosis group ( $r=-0.919, P<0.01$ ). The levels of miRNA-126 and miRNA-21 in the stenosis group were correlated with PLA and MLA ( $r=-0.945, 0.926, P<0.01$ ) and ( $r=0.933, -0.917, P<0.01$ ). **Conclusion** The detection of serum miRNA-21 and miRNA-126 levels can be used in diagnosis and prediction for the coronary artery restenosis of ACS after PCI, as the gene detection index of the dis-

\* 作者简介: 程涛(1982-), 男, 大学本科, 主管检验师, 研究方向: 心血管疾病的基因诊断, E-mail: 3248089878@qq.com.

通讯作者: 黄刚(1979-), 男, 大学本科, 主管检验师, 研究方向: 心血管疾病的基因诊断, E-mail: 3436309161@qq.com.

ease.

**Keywords:** ACS; PCI; ISR; IVUS; miRNA-21; miRNA-126

动脉粥样硬化(AS)导致的冠脉管腔狭窄或闭塞是引起冠心病患者心肌缺血缺氧或坏死的主要原因,冠状动脉介入术(PCI)已成为冠心病治疗的重要手段之一,但 PCI 术后仍有 20% 的患者出现支架内再狭窄(ISR)或血栓形成等不良缺血性事件<sup>[1]</sup>。微小 RNA (MicroRNAs, miRNAs) 通过调控基因表达,来参与机体各种疾病的发生发展过程。有报道认为,miRNAs 能够调控多种心脏疾病的病理过程,其在缺血性心脏病的病理过程中呈现差异性表达<sup>[2]</sup>。研究发现 miRNAs 可稳定存在与血液循环中,并且可能作为诊断疾病的生物学标志物<sup>[3]</sup>。笔者通过检测 100 例接受 PCI 术的急性冠脉综合征(ACS)患者的血清 miRNA-21, miRNA-126 的表达水平,旨在探讨其对于缺血缺氧条件下心肌细胞凋亡水平的调节,及对心肌梗死后心功能及心肌细胞凋亡水平的影响,并为 PCI 术后 ISR 的早期发现提供依据。

## 1 材料与方法

**1.1 研究对象** 选取 2015 年 7 月~2017 年 7 月我们医院心血管内科住院接受 PCI 治疗的 ACS 患者 82 例为研究对象,按术后是否出现 ISR 分为两组:狭窄组 30 例,未狭窄组 52 例,其中男性 51 例,女性 31 例,平均年龄  $52.3 \pm 12.2$  岁。ACS 的诊断依据世界卫生组织关于 ACS 及急性心肌梗死(AMI)、不稳定型心绞痛的诊断标准,同时补充 2007 年全球心肌梗死工作组关于 ACS 及 AMI 的修定义<sup>[4]</sup>。ACS 患者中 AMI 43 例,UA 39 例。对照组选取冠状动脉造影阴性的患者,男 27 例,女 22 例,平均年龄  $55.3 \pm 13.7$  岁。所有患者病变位于前降支者 53 例,病变位于右冠脉者 23 例;位于回旋支者 6 例。PCI 术后 ISR 诊断标准:经冠脉造影显示患者原病变部位支架内和节段内血管管腔直径狭窄  $\geq 50\%$ 。选取同期在本院体检中心体检健康者 33 例作为对照组,其中男性 20 例,女性 13 例,平均年龄  $51.9 \pm 12.9$  岁。两病例组患者均于支架置入术后服用阿司匹林 100 mg/d 及波力维 75 mg/d。所有试验对象排除瓣膜性心脏病、扩张型心肌病、肥厚型心肌病、心肌炎、肿瘤、肌肉疾病、肝肾功能不全及感染性疾病。各组患者性别、年龄比较差异均无统计学意义(均  $P > 0.05$ )。本研究经本院伦理委员会批准,所有研究对象签署知情同意书。

**1.2 试剂和仪器** RNA 提取采用 mirVANA PARIS 试剂盒。PCR 试剂盒采用上海起福生物科技有限公司产品。lightCycler 荧光 PCR 仪采用德

国 Roche 公司产品。血管内超声检查采用 Boston Scientific Clearview 血管内超声仪。介入系统为德国 SIEMENSCOROSKOP TOP 心血管造影系统。

## 1.3 方法

**1.3.1 IVUS 检查:**采用血管内超声(intravascular ultrasound, IVUS)来评价 PCI 术后再狭窄的发生。血管内超声检查采用频率为 40 Mhz 的超声探头,通过狭窄病变处远段后以 0.5 mm/s 的速度回撤探头导管,对支架内病变及病变远段各 10 mm 处测量 3 次。测量及计算最小管腔面积(minimal lumen area, MLA)和斑块面积(plaque area, PLA)。通过机器自带的软件计算狭窄程度(restenosis rate, RS%)。测量参数参考美国心脏病学院的 IVUS 检测指南。PCI 患者于术后 6 个月行 IVUS 检查。

**1.3.2 标本采集:**PCI 患者于术后 6 个月行 IVUS 检查的当天采集静脉血 5 ml,对照组研究对象于体检时采集静脉血 5 ml。所有研究对象采集的血液于 2 h 内分离血清,4℃, 3 000 r/min 离心 10 min,取上清液 4℃, 3 000 r/min 离心 10 min,将所得的血清标本分装于无 RNA 酶的冻存管中, -80℃ 保存备用。

**1.3.3 miRNAs 表达量检测:**采用实时逆转录-聚合酶链反应技术研究甲亢患者血清 miRNA-21, miRNA-126 表达水平。

**1.3.4 RNA 的提取及保存:**首先吸取 200  $\mu$ l 血液样品、750  $\mu$ l 的 RNA 提取试剂和 20  $\mu$ l 冰醋酸,常温下孵育 5 min。再加入 0.2 ml 氯仿,常温下孵育 3 min。然后离心取上清倒在无 RNA 酶的 Eppendorf 管中,加入等量异丙醇,常温放置 10 min。再离心,弃上清,室温干燥。再通过 RNA 溶解步骤,获得 RNA 溶液 -20℃ 保存。

**1.3.5 PCR 扩增:**用 pfimer5 软件设计引物。miRNA-21 的引物序列为:正义链 5'-GATGATGCGCGAGAAGGAGGAGT-3', 反义链 5'-GGGGCGGGGTGCTGTCAT-3';产物长度 590 bp。miRNA-126 的引物序列为:正义链 5'-GGGGTCGTACCGTGAGT-3', 反义链 5'-CAGT GCGTGTCGTGGAGT-3',产物长度 620 bp。U6 作为内参照,引物序列为:正义链 5'-GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT-3', 反义链 5'-CGCTTCACGAATTTGCGTGTCAT-3',产物长度 320 bp,反应条件:94℃ 3min  $\rightarrow$  94℃ 60 s, 58℃ 60 s, 72℃ 1.5 min, 40 个循环  $\rightarrow$  72℃

15min→4℃保存。

1.3.6 标志物相对表达量计算:对扩增的目的片段进行凝胶电泳,通过紫外光凝胶成像系统进行扫描并记录,测定各组的 cDNA 的特异性,miRNA 表达量用 Ct 值变化表示。 $\Delta Ct = Ct_{(目的基因)} - Ct_{(内参基因)}$ 。由  $2^{-\Delta Ct}$  得出相应的 miRNA 相对表达量。

1.4 统计学分析 应用 21.0 统计软件进行统计分析,计量资料采用单样本检验 Kolmogorov-smirnov 对计量资料作正态性检验,正态分布的统计指标以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。组间 IVUS 资料的比较采用  $t$  检验,miRNAs 水平比较采用单因素方差分析。相关性分析用 Pearson 法。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

表 2

PCI 患者术后血清 miRNA-21,miRNA-126 水平比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	对照组( $n=33$ )	未狭窄组( $n=52$ )	狭窄组( $n=30$ )	F	P
miRNA-21	0.22±0.03	0.43±0.08*	0.92±0.17*#	89.73	0.000
miRNA-126	0.87±0.15	0.49±0.10*	0.23±0.04*#	93.62	0.000

注:miRNA-21:微小 RNA-21;miRNA-126:微小 RNA-126; \* 与对照组比较  $P=0.000$ ; # 与未狭窄组比较  $P=0.000$ 。

2.3 相关性分析 见图 1~5。狭窄组中 miRNA-126 与 miRNA-21 水平呈负相关性( $r=-0.919$ ,  $P < 0.01$ )。该组中 miRNA-126 和 miRNA-21 水平

2.1 各组 IVUS 结果比较 见表 1。狭窄组的 PLA 与未狭窄组比较显著增高,而 MLA 显著降低,其差异均有统计学意义( $P=0.000$ )。

表 1 PCI 患者术后 IVUS 结果比较( $\bar{x} \pm s$ , mm<sup>2</sup>)

项目	未狭窄组( $n=52$ )	狭窄组( $n=30$ )	t	P
PLA	6.26±1.83	10.97±2.36	11.39	0.000
MLA	5.96±2.10	3.56±1.92	5.93	0.000

注:PLA:斑块面积;MLA:最小管腔面积。

2.2 各组血清 miRNA-21,miRNA-126 水平比较

见表 2。与对照组比较,血清 miRNA-21 在狭窄组与未狭窄组的表达量明显增高,而 miRNA-126 水平则显著降低,差异均有统计学意义( $P < 0.01$ )。狭窄组与未狭窄组比较 miRNA-21 水平明显增高,而 miRNA-126 水平则显著降低,差异均有统计学意义( $P < 0.01$ )。

分别与 PLA 和 MLA 具有相关性( $r=-0.945$ ,  $0.926$ ,  $P < 0.01$ ), ( $r=0.933$ ,  $-0.917$ ,  $P < 0.01$ )。

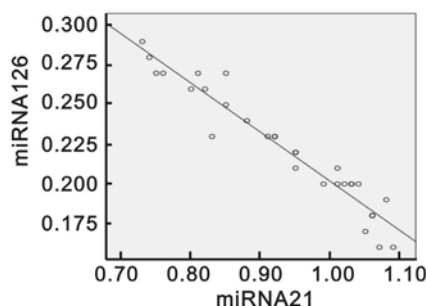


图 1 miRNA-126 与 miRNA-21 相关性散点图

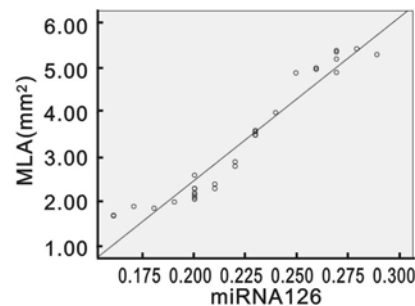


图 2 miRNA-126 与 MLA 相关性散点图

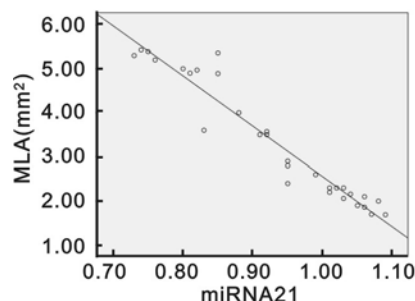


图 3 miRNA-21 与 MLA 相关性散点图

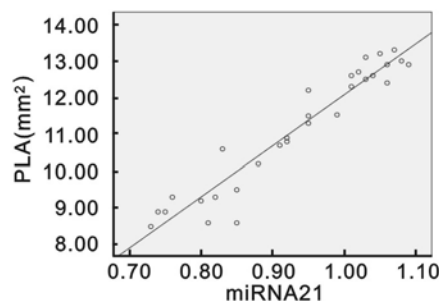


图 4 miRNA-21 与 PLA 相关性散点图

3 讨论 研究表明支架介入术容易引起血管内皮细胞的损伤。这种损伤引起机体的自我修复,而修复过度则可能引起血管再狭窄。PCI 治疗过程中导致动脉血管壁的直接损伤,可能引起炎症反应的发生、血栓形成以及血管内膜过度增殖等。血管壁的这些变化最终引起血管新生内膜形成及血管重

塑,导致 PCI 术后再狭窄的发生<sup>[5]</sup>。miRNA 在癌症等疾病中已得到广泛应用,在冠心病领域也一直成为人们关注的焦点。miRNA-21 被证实通过影响心肌细胞的凋亡来参与心脏疾病的进展,其表达水平在心肌梗死患者的心脏组织中呈现显著上调<sup>[6]</sup>。miRNA-21 的表达在正常心肌组织中表达

很低,但在各种心衰、心肌肥厚、缺血缺氧等条件下表达

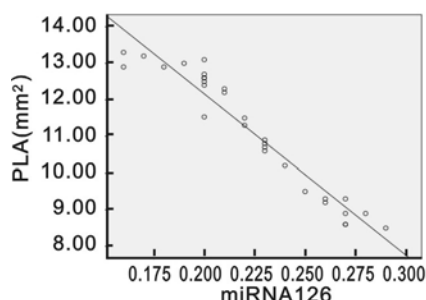


图5 miRNA-126与PLA相关性散点图

水平明显增高。研究认为心绞痛患者外周循环 miRNA-21 表达较对照组上调 1.9 倍,而 AMI 患者则上调 3.2 倍<sup>[7]</sup>。Zhang 等<sup>[8]</sup>对 412 例下肢动脉闭塞性疾病患者的研究显示在介入治疗后再狭窄组外周循环 miRNA-21 水平显著增高,在术后无狭窄组则明显降低。研究分析 70 例 PCI 术后的冠心病患者的结果显示冠脉支架术后狭窄组患者血清 miRNA-21 水平明显增高<sup>[5]</sup>。以上研究提示 miRNA-21 水平在血管出现狭窄或闭塞时呈现过量表达。本研究结果显示冠脉支架术后狭窄组 miRNA-21 水平高于未狭窄组 ( $P < 0.01$ ),推测 PCI 术后的冠状动脉损伤引起血管内膜过度增殖可能与 PCI 术后冠脉狭窄的发生有密切的关系。进一步的研究显示未狭窄组患者血清 miRNA-21 水平显著高于对照组 ( $P < 0.01$ ),提示 PCI 术后患者可能存在再狭窄的风险。miRNA-21 在缺血性心脏病的研究尚处于起步阶段,随着对 miRNA-21 研究的不断深入,相信 miRNA-21 对于缺血性心脏病及 ISR 发生的防治值得期待。

既往的研究表明动脉粥样硬化可能导致冠脉管腔的狭窄或闭塞,其可能与 PCI 术后再狭窄的病理过程有关<sup>[1]</sup>。miRNA-126 在血管内皮细胞中的特异性表达已被证实,其表达的下调可提高细胞黏附分子-1 活性,促进新生血管的形成,维持血管壁的完整性<sup>[9]</sup>。另外,miRNA-126 调控血管黏附细胞因子-1 的表达,影响着动脉粥样硬化斑块形成的过程。研究显示静脉注射 miRNA-126 可以抑制小鼠主动脉粥样硬化病变,其结果使主动脉粥样硬化斑块的面积减小,表明 miRNA-126 与动脉粥样硬化斑块的形成有密切关系<sup>[10]</sup>。推测 miRNA-126 在血管炎症及动脉粥样硬化的发展中起着重要的保护作用。Wang 等<sup>[11]</sup>采用 RT-PCR 技术研究 miRNA-126,瑞舒伐他汀以及血管内皮生长因子三者间的关系。他们的实验结果显示心肌梗死小鼠模型中 miRNA-126 的表达显著减少,但血管内皮生长因子表达水平增加。miRNA-126

在 PCI 术患者外周血液的表达也有报道。PCI 术后心肌梗死患者通过增强型体外反搏疗法后循环 miRNA-126 水平较未采用该疗法的患者显著增高<sup>[12]</sup>,证明增强型体外反搏疗法治疗心肌梗死患者的有效性,另一方面也印证了 miRNA-126 在心肌缺血缺氧中的保护性作用。本实验结果显示狭窄组患者血清 miRNA-126 表达显著低于未狭窄组和对照组患者 ( $P < 0.01$ ),未狭窄组与对照组比较,血清 miRNA-126 表达明显降低 ( $P < 0.01$ )。提示冠脉造影阳性患者经过 PCI 术后冠状动脉的缺血得到缓解,发生心肌梗死的风险明显降低。因此认为检测血清 miRNA-126 表达可用于 ACS 疾病的早期诊断,并可能成为预测 AMI 疾病发生的分子标记物。

本研究相关性分析的结果显示,狭窄组中 miRNA-21 和 miRNA-126 表达呈负相关性。该组中 miRNA-126 和 miRNA-21 水平分别与 PLA 和 MLA 具有相关性。提示两个标志物与 PCI 术后的 ISR 发生密切相关。其变化可以反映 PCI 术后患者症状的改善状况。

综上所述,血清 miRNA-21 和 miRNA-126 的检测可应用于 PCI 术后 ISR 的预测,并可能为其提供有效的基因学依据。

#### 参考文献:

- [1] 刘浙波,夏豪,杨洋,等. CYP2C19 正常代谢型冠心病患者 PCI 术后发生支架内再狭窄的危险因素分析[J]. 实用医学杂志, 2016, 32(7): 1088-1092.  
Liu ZB, Xia H, Yang Y, et al. Risk factors of in-stent restenosis in coronary artery disease patients with CYP2C19[J]. Journal of Practical Medicine, 2016, 32(6): 1088-1092.
- [2] 王菲, Saumya Das. 基于循环微小 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, Saumya Das. Circulating microRNA predict response to cardiac resynchronization therapy[J]. Journal of Shanghai University (Natural Science), 2016, 22(3): 265-269.
- [3] 万淑君,王成,王静,等. 2 型糖尿病微血管并发症患者血清 miR-16, miR-126 和 miR-221 水平检测及临床意义[J]. 现代检验医学杂志, 2016, 31(5): 9-13.  
Wan SJ, Wang C, Wang J, et al. Study on serum value of miRNA-16, miR-126 and miR-221 and their clinical significance in type 2 diabetes patients with or without microvascular complications[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2016, 31(5): 9-13.
- [4] 杨敏,刘奇峰,蓝新平,等. 他汀联合苯扎贝特对急性冠状动脉综合征患者的治疗优势分析[J]. 国际心血管病杂志, 2016, 43(2): 127-128.  
Yang M, Liu QF, Lan XP, et al. Therapeutic advantage of statins combined with bezafibrate in patients with acute coronary syndromes [J]. International Journal of Cardiovascular Disease, 2016, 43(2): 127-128.

(下转 66 页)

- [5] 刺梅,杨登魁,李江.血清 miRNA-1,miRNA-21 检测预测 PCI 术后患者再狭窄的临床价值[J].海南医学杂志,2017 28(6):923-927.  
La M, Yang DK, Li J. Value of the expression of miRNA-1, miRNA-21 in serum for predicting instant restenosis of expanded area after percutaneous coronary intervention[J]. Hainan Medical Journal, 2017 28 (6):923-927.
- [6] Sun T, Dong YH, Du W, et al. The role of microRNAs in myocardial infarction: from molecular mechanism to clinical application[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18 (4):745.
- [7] 杨寿娟,张颖,刘寅.冠心病患者外周血中 miRNA-21 的表达水平及其临床意义[J].中国应用生理学杂志,2015,31(2):127-131.  
Yang SJ, Zhang Y, Liu Y. Research on expression of miRNA-21 in the peripheral blood of coronary heart disease and its clinical significance[J]. Chinese Journal of Applied Physiology, 2015, 31(2):127-131.
- [8] Zhang B, Yao Y, Sun QF, et al. Circulating mircoRNA-21 as a predictor for vascular restenosis after interventional therapy in patients with lower extremity arterial occlusive disease[J]. Biosci Rep, 2017, 37(2): BSR20160502.
- [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

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] 王婷,潘旭东,马爱军,等. miR-126 在 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠颈动脉粥样硬化斑块中的表达[J]. 中风与神经疾病杂志, 2016, 33(4):296-298.

Wang T, Pan XD, Ma AJ, et al. The expression of miR-126 in carotid atherosclerotic plaques in ApoE<sup>-/-</sup> mice[J]. Journal of Apoplexy and Neuropathic Diseases, 2016, 33(4):296-298.

- [11] Fei L, Zhang J, Niu H, et al. Effects of rosuvastatin and miR-126 on myocardial injury induced by acute myocardial infarction in rats: role of vascular endothelial growth factor a (VEGF-A)[J]. Medical Science Monitor, 2016, 22:2324-2334.

- [12] 张建超,褚现明,徐昌,等.体外反搏对急性心肌梗死患者血浆微小 RNA-126 表达量的影响[J]. 岭南心血管病杂志, 2016, 22(2):123-126, 148.

Zhang JC, Chu XM, Xu C, et al. Effect of enhanced external counterpulsation on the expression of microRNA-126 in patients with acute myocardial infarction[J]. South China Journal of Cardiovascular Diseases, 2016, 22(2):123-126, 148.

收稿日期:2017-11-05

修回日期:2018-01-01