

microRNA-499 在急性心肌梗死患者外周血中含量变化的研究

陈曦¹, 杨承健^{1*}, 韩志君², 章丽珠¹, 叶新和¹

(¹南京医科大学附属无锡市第二人民医院心血管内科, ²检验科, 江苏 无锡 214002)

[摘要] 目的:通过观察 microRNA-499(miR-499)在急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)患者血中含量的变化,探讨 miRNA-499 在 AMI 病情监测中的作用。方法:连续收集 2013 年于本院就诊的急性冠脉综合征(acute coronary syndrome, ACS)患者 73 例,包括 AMI 患者 53 例,不稳定心绞痛(unstable angina, UA)患者 20 例,同期选择本院健康体检志愿者 30 例为对照。AMI 组于症状发作后 12 h 内、24 h 取血,UA 组于入院即刻采血。采用 TaqMan real-time PCR 方法测定 miR-499 的含量。通过电化学发光法检测血浆肌钙蛋白 I(cTnI)及肌酸激酶同工酶(CK-MB)的水平。将 AMI 组患者根据是否接受急诊经皮冠状动脉介入(PCI)治疗及不同冠脉病变进行分组,分析对比各组间 microRNA-499 水平的差异。结果:53 例 AMI 患者外周血 miR-499 的相对表达水平(4.57 ± 2.3),显著高于 UA 组(2.75 ± 1.39)和健康对照组(0.5 ± 0.39),差异具有统计学意义($P < 0.01$)。53 例 AMI 患者血浆 miR-499 的相对表达水平与血清 CK-MB、cTnI 含量均呈正相关($r = 0.361, 0.428, P$ 均 < 0.01)。32 例行冠状动脉造影术的 AMI 组患者中,miR-499 的表达在 2 支及 3 支病变中高于单支病变($P < 0.01$);24 例成功接受急诊 PCI 治疗的 AMI 患者,其症状发作后的 24 h 血浆 miR-499 水平较入院即刻时明显降低($P < 0.01$)。结论:心脏特异表达的 miRNA-499 在健康人血浆中含量很低,但在心肌梗死后含量明显升高并于早期即可被检测到,具有用于早期诊断以及评估心肌梗死严重程度的价值,可以作为诊断 AMI 的一个新的敏感的生物标志物。

[关键词] microRNA;急性心肌梗死;生物学标记

[中图分类号] R541.4

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)01-046-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20150110

Changes of microRNA-499 level in peripheral blood of acute myocardial infarction patient

Chen Xi¹, Yang Chengjian^{1*}, Han Zhijun², Zhang Lizhu¹, Ye Xinhe¹

(¹Department of Cardiology, ²Department of Central Laboratory, Affiliated Wuxi No.2 Hospital, NJMU, Wuxi 214002, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the level of cardio-specific microRNA-499 levels (miR-499) in acute myocardial infarction (AMI) patients and to explore the effect of plasma miR-499 levels on the diagnosis of AMI. **Methods:** The subjects enrolled in this study, included 30 healthy subjects and 73 patients with suspected acute coronary syndrome(ACS), who went on our hospital in 2013 and were divided into the AMI group and the unstable angina(UA) group with 53 and 20 patients, respectively. MiR-499 concentrations were measured with a real-time reverse-transcription PCR (qRT-PCR). Blood samples of the AMI group were collected 12 h and 24 h after the onset of symptom, and those of the UA group were collected after admission. Serum cardiac troponin I(cTnI) and creatine kinase-MB (CK-MB) concentrations were measured by the electrochemiluminescence method. The 53 AMI patients were further divided into various subgroups according to coronary arteries involved and primary PCI or not, plasma miR-499 concentrations were measured by TaqMan real-time PCR and analyzed between the two groups. **Results:** The relative level of miR-499 was significantly increased in patients with AMI (4.57 ± 2.3) than that of UA subjects (2.75 ± 1.39) and normal subjects (0.5 ± 0.39) (both $P < 0.01$). The serum miR-499 relative level in the patients with AMI had a positive correlation with serum cTnI or CK-MB ($r = 0.361, 0.428$, respectively, both $P < 0.01$). It was significantly higher in 32 AMI patients with double or triple coronary arteries stenosis than those with single stenosis ($P < 0.01$). MiR-499 was significantly decreased in 24 patients after received primary PCI ($P < 0.01$). **Conclusion:** The plasma concentration of miRNA-499 with cardiac specific expression is low in healthy person, but

[基金项目] 江苏省临床科技专项-新型临床诊疗技术攻关(BL2012042)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: doctory2071@sina.com

significantly increase after myocardial infarction and can be detected in the early stage. This can be used for early diagnosis and AMI severity evaluation. The plasma concentration of miR-499 may be a useful biomarker of AMI in humans.

[Key words] miR-499; acute myocardial infarction; biomarker

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(01):046-050]

微小 RNA (microRNA, miRNA) 是一类长 21~25 个核苷酸的小分子非编码 RNA。它主要通过影响 mRNA 的稳定性或抑制 mRNA 的翻译来影响基因表达^[1]。目前证实微小 RNA 与很多疾病相关如白血病、进行性肝脏疾病、神经退行性疾病等^[2-4]。在 Lawrie 等^[5]首次于人类血清中发现 miRNA 之后,大量的实验证明循环 miRNAs 可以广泛存在于人类细胞外液中,包括血清、血浆和组织。2010 年 Gupta 等^[6]提出循环 miRNA 是非常稳定的,有作为心血管疾病生物标记物的潜力。已有研究推荐 miRNA-1、miRNA-133、miRNA-208、miRNA-499 为急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI) 有价值的标记物^[7-8]。miRNA-499 除了在骨骼肌中有少量的释放外,几乎完全存在于心肌中,心肌损伤时,可见 miR-499 显著升高^[9]。本研究观察了 AMI 患者冠状动脉造影和经皮冠状动脉介入 (PCI) 治疗过程中血浆 miR-499 水平的变化,探讨 miRNA-499 是否具有成为 AMI 早期诊断和治疗评估检测标志物的潜力。

1 对象和方法

1.1 对象

连续招募 2013 年 1~12 月于本院心血管内科和急诊科住院急性冠脉综合征 (ACS) 患者 73 例,其中 AMI 患者 53 例,不稳定性心绞痛 (UA) 患者 20 例。入选标准:AMI 的诊断标准均符合 WHO 诊断 (典型的胸痛持续时间超过 30 min;ST 段上抬 >0.2 mm;血清心肌酶学升高超过正常两倍以上)。UA 诊断标准按中华医学会心血管病分会制定的关于 UA 的诊断标准^[10]。所有患者排除肝肾等慢性疾病。同时选择于本院体检中心体检的健康者 30 例 (均无心脏及肝肾疾病) 作为正常对照组 (HC)。过程获得南京医科大学附属无锡市第二人民医院伦理委员会认可,并获得所有纳入的研究对象的同意。

AMI 组于症状发作后 12 h 内、24 h 取血。53 例 AMI 组患者从胸痛至入院时间最早 30 min 最晚 12 h,平均时间为 (5.24 ± 3.65) h。UA 组于入院即刻采血,健康组于清晨空腹采血。所有标本均用 EDTA 抗凝管收集,4℃ 3 000 g 离心 10 min 分离血浆。取上清液置于

无 RNA 酶的 EP 管中,存储于 -80℃ 冰箱备用。

1.2 方法

1.2.1 资料的采集

建立调查表收集患者住院期间的临床资料。包括患者的年龄、性别、身高、体重、吸烟史、是否合并糖尿病、高血压病;次日抽取静脉血检测血脂、肌酐;收集 AMI 组患者入院后是否接受急诊 PCI 治疗以及冠脉造影记录。

1.2.2 miR-499 的检测

采用美国 Qiagen 公司的 miRNeasy RNA isolation 试剂盒提取血浆总 RNA,美国 Applied BioSystems 公司的 Taq-Man miRNA Reverse Transcription 试剂盒进行逆转录,最后以美国 Applied BioSystems 公司的 miR-499 和 U6 检测试剂盒检测血浆 miR-499 和 U6。每个样本均进行 3 次检测,应用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法计算 miR-499 的相对表达水平并对其进行 $\lg_2^{-\Delta\Delta C_T}$ 转换^[11-12], $\Delta\Delta C_T = \text{实验组}(C_{\text{miR-499}} - C_{\text{U6}}) - \text{对照组}(C_{\text{miR-499}} - C_{\text{U6}})$,我们采用 $-\Delta\Delta C_T$ 表示 miR-499 的相对水平。

1.2.3 肌钙蛋白 (cTnI) 和肌酸激酶同工酶 (CK-MB) 检测

采用电化学免疫荧光法检测 cTnI 和 CK-MB 的含量。

1.3 统计学方法

分类变量之间的比较采用卡方检验或者 Fisher 确切概率法。连续变量以均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 的形式表示,以单因素方差分析或 Kruskal-Wallis H 检验比较多组之间的差异,并采用 Pearson 相关分析 miR-499 与 CK-MB、cTnI 的相关性。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 研究对象的临床特征

本研究中共纳入 53 例 AMI 患者,20 例 UA 患者,30 例健康志愿者作为对照组。临床特征资料见表 1。3 组患者临床特征方面均无统计学差异 ($P > 0.05$)。

2.2 AMI 患者外周血 miR-499 的丰度分析

53 例 AMI 患者外周血 miR-499 的相对表达水平 (4.57 ± 2.30),显著高于 UA 组 (2.75 ± 1.39) 和健

表 1 研究对象的临床特征

Table 1 Clinical characteristics of the patients and healthy control

临床特征	AMI 组	UA 组	健康组	P 值
样本量(例)	53	20	30	-
年龄(岁)	68.8 ± 7.3	66.2 ± 5.1	70.3 ± 7.9	0.131
性别(男/女)	44/9	15/5	24/6	0.739
高血压病[n(%)]	37(69.8)	13(65.0)	15(50.0)	0.195
糖尿病史[n(%)]	12(22.6)	9(45.0)	7(23.0)	0.136
吸烟史[n(%)]	33(62.3)	12(60.0)	15(50.0)	0.544
总胆固醇(mmol/L)	4.16 ± 0.94	3.85 ± 1.13	3.78 ± 0.83	0.153
甘油三酯(mmol/L)	1.76 ± 0.92	1.63 ± 1.01	1.37 ± 0.67	0.149
高密度脂蛋白胆固醇(mmol/L)	1.12 ± 1.28	1.13 ± 0.37	1.23 ± 0.36	0.290
低密度脂蛋白胆固醇(mmol/L)	2.69 ± 0.91	2.35 ± 0.94	2.32 ± 0.71	0.119
肌酐(μmol/L)	70.7 ± 13.7	69.9 ± 12.2	68.1 ± 11.0	0.661

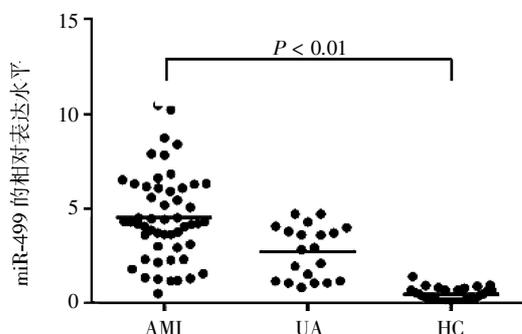


图 1 研究对象外周血 miR-499 丰度分析

Figure 1 The pattern of plasma miR-499 levels in acute myocardial infarction

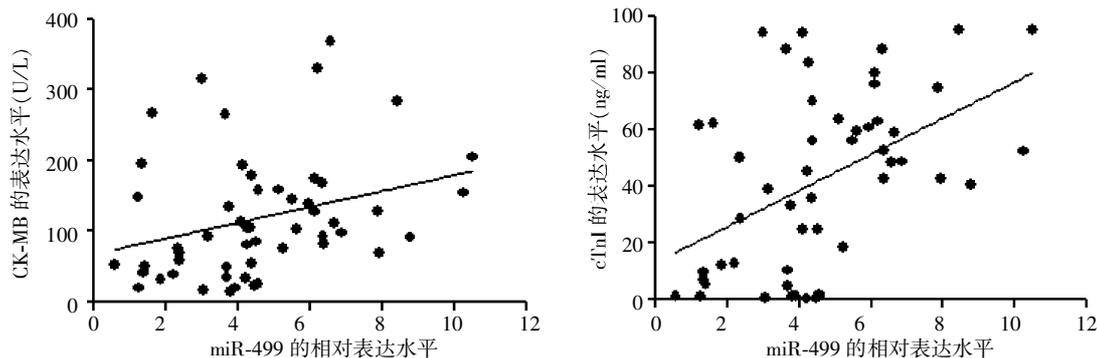


图 2 血浆 miR-499 的相对表达水平与血清 CK-MB、cTnI 的相关性

Figure 2 The correlations between miRNA-499 and concentrations of CK-MB and cTnI

3.3, 2 支、3 支病变的 AMI 患者血浆 miR-499 的水平高于单支病变($P < 0.01$, 图 3)。

2.5 PCI 治疗前后 microRNA-499 水平变化

53 例 AMI 患者中有 24 例成功接受急诊 PCI 治疗, 29 例未行急诊 PCI 治疗。如图 4 所示, 接受 PCI 治疗的患者 24 h 循环 miR-499 相对表达水平(3.63 ± 1.69)较入院即刻(5.60 ± 2.00)明显降低($P < 0.01$)。

康对照组(0.50 ± 0.39), 如图 1 所示, 差异具有统计学意义($P < 0.01$)。

2.3 miR-499 的相对表达水平与 AMI 患者心肌酶学值的相关性分析

我们分析了 53 例 AMI 患者与血浆 miR-499 的相对表达水平与血清 CK-MB、cTnI 的相关性, 结果发现血浆 miR-499 的相对表达水平与血清 CK-MB、cTnI 含量均呈正相关($r = 0.361, 0.428, P$ 均 < 0.01 , 图 2)。

2.4 AMI 患者不同冠状动脉病变对 miR-499 水平的影响

53 例 AMI 患者共有 32 例行冠状动脉造影术, 根据其血管病变支数($n=1, 2, 3$)分为 3 组, miR-499 的相对表达水平分别为 $2.6 \pm 1.6, 4.6 \pm 2.4, 6.3 \pm$

3 讨论

AMI 是由于部分心肌发生长期严重缺血而导致的急性坏死, 是临床上较严重的心血管急症, 在全世界有很高的发病率和病死率。目前诊断急性心肌梗死主要依靠临床症状、心电图的改变以及心肌损伤标志物的变化。至今最常用的心肌损伤标志物

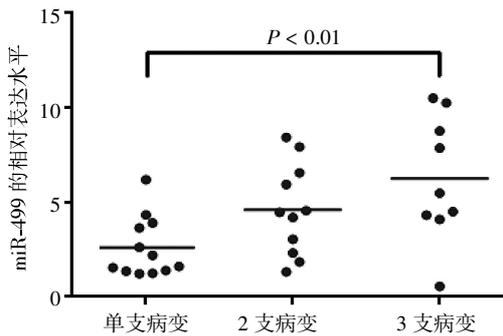


图 3 AMI 组冠脉病变与 miR-499 水平的比较

Figure 3 miRNA-499 and the severity of coronary atherosclerosis

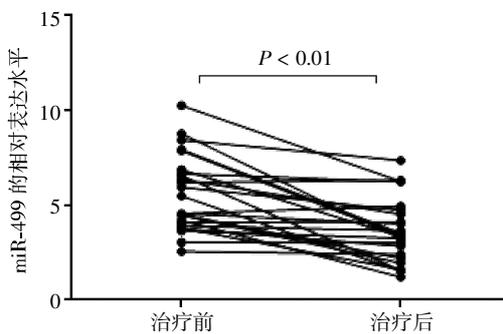


图 4 PCI 治疗前后 microRNA-499 水平变化

Figure 4 miRNA-499 expression in AMI patients after emergency PCI

为肌钙蛋白,其亚单位 cTnI 和 cTnT 是心肌细胞收缩的肌原纤维的一部分,在心肌细胞坏死之后被释放到循环中,对心肌梗死具有较高的敏感性。特别是高敏肌钙蛋白(hs-cTnT),它能在症状出现后的 3 h 内被检测出来。但是有研究指出其水平在老年心衰及慢性肾衰患者的血清中会升高,出现假阳性结果^[13];另一种较常用的心肌损伤标志物为 CK-MB,有研究提出其水平与心梗面积相关且与患者长期生存率呈反比,但是其组织特异性不如肌钙蛋白^[14]且其水平在心梗症状出现后 7 h 才能被检测^[15],因而敏感性欠佳。

我们之前初步研究了血浆 miR-499 对急性心肌梗死的早期诊断价值^[16],结果表明血浆 miR-499 是诊断 AMI 的有益标志物,可以提供 cTnI 以外的诊断信息,二者联合应用有助于提高 AMI 的诊断准确性。因此,本研究重点在于观察 miR-499 是否可以反映病情的变化并作为疾病“监测”的标志物。本次研究发现,AMI 组患者症状发作后 12 h 内血浆 miR-499 的水平明显高于对照组,且与 CK-MB 及 cTnI 的表达水平呈正相关,这和 Adachi 等^[9]研究提出 miR-499 水平在心肌梗死后 6 h 和 12 h 明显升高的研究结果相似。在近年一项研究中 Devaux 等^[12]发现,miR-499 的水平在胸痛<12 h 的 AMI 组患者中显著升高,且在胸痛

发作 3 h 内的 AMI 患者中,miR-499 的阳性率为 93%,显著高于 hs-cTnT。这表明 miR-499 可以作为反映急性心肌损伤的良好指标。本研究还发现 UA 患者的血浆 miR-499 水平较对照组也有一定的升高,这可能与缺血心肌组织释放增加有关。

我们还对冠脉的病变程度与 miR-499 的水平进行了研究,在 AMI 患者中,冠状动脉病变的支数越多,发生心肌缺血的风险也越高。本研究发现 2 支及 3 支病变患者的 miR-499 水平比单支病变明显升高。AMI 过程中的梗死损伤主要是因不稳定的粥样斑块破裂,引起冠状动脉出血和血管腔内血栓形成而使管腔闭塞,继而引起心肌细胞急性持续性缺血缺氧而导致坏死。如开头所述,miR-499 是几乎全部于心肌细胞中表达的,当心肌细胞损伤时才释放入外周血。结果提示 miR-499 对冠状动脉病变及心肌损伤程度有一定的预测作用。

另外,我们发现急诊 PCI 的患者 24 h 循环 miR-499 表达水平较入院即刻时明显降低,这提示 AMI 患者循环 miR-499 表达增高,早期成功的临床干预治疗可降低 AMI 患者 miR-499 表达。目前有研究报道 miR-499 与心肌细胞的增殖与分化有关^[17],且有研究提出 miR-499 可以增强梗死心脏质量和功能的恢复,并推荐其作为评估心肌再生疗法的指标^[18]。本研究提示 miR-499 对评估急性心肌梗死患者心肌缺血有效再灌注有重要价值,并对评估早期临床干预治疗有一定意义,因此凸现 miR-499 对临床病情监测的价值。

综上所述,miR-499 很可能成为诊断急性心肌梗死的新生物标记物,具有用于早期诊断以及评估心肌梗死严重程度,提高心肌梗死患者筛查的敏感性和特异性,以及评估心肌缺血有效再灌注的临床价值。

[参考文献]

- [1] Ambros V. The functions of animal microRNAs[J]. Nature, 2004, 431(7006): 350-355
- [2] Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(24): 15524-15529
- [3] Murakami Y, Toyoda H, Tanaka M, et al. The progression of liver fibrosis is related with overexpression of the miR-199 and 200 families[J]. PLoS One, 2011, 6(1): e16081
- [4] Cogswell JP, Ward J, Taylor IA, et al. Identification of miRNA changes in Alzheimer's disease brain and CSF yields putative biomarkers and insights into disease path-

ways[J]. *J Alzheimers Dis*, 2008, 14(1):27-41

[5] Lawrie CH, Gall S, Dunlop HM, 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(5):672-675

[6] Gupta SK, Bang C, Thum T. Circulating microRNAs as biomarkers and potential paracrine mediators of cardiovascular disease [J]. *Circ Cardiovasc Genet*, 2010, 3(5):484-488

[7] Wang F, Long G, Zhao C. et al. Plasma microRNA-133a is a new marker for both acute myocardial infarction and underlying coronary artery stenosis [J]. *J Transl Med*, 2013, 11(1):222

[8] Widera C, Gupta S, Lorenzen JM, et al. Diagnostic and prognostic impact of six circulating microRNAs in acute coronary syndrome [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2011, 51(5):872-887

[9] Adachi T, Nakanishi M, Otsuka Y, et al. Plasma microRNA 499 as a biomarker of acute myocardial infarction [J]. *Clin Chem*, 2010, 56(7):1183-1185

[10] 中华医学会心血管病学分会, 中华心血管病杂志编辑委员会. 不稳定型心绞痛和非 ST 段抬高心肌梗死诊断与治疗指南 [J]. *中华心血管病杂志*, 2007, 35(4):295-304

[11] Wang GK, Zhu JQ, Zhang JT, et al. Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans [J]. *Eur Heart J*, 2010, 31(6):659-666

[12] Devaux Y, Vausort M, Goretti E, et al. Use of circulating microRNAs to diagnose acute myocardial infarction [J]. *Clin Chem*, 2012, 58(3):559-567

[13] de Lemos JA, Drazner MH, Omland T, et al. Association of troponin T detected with a highly sensitive assay and cardiac structure and mortality risk in the general population [J]. *JAMA*, 2010, 304(22):2503-2512

[14] Alpert JS, Thygesen K, Antman E, et al. Myocardial infarction redefined—a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2000, 36(3):959-969

[15] de Winter RJ, Koster RW, Sturk A, et al. Value of myoglobin, troponin T, and CK-MB mass in ruling out an acute myocardial infarction in the emergency room [J]. *Circulation*, 1995, 92(12):3401-3407

[16] 韩志君, 史万青, 沈红远, 等. 血浆 miR-499 对急性心肌梗死的诊断价值 [J]. *中华检验医学杂志*, 2013, 36(12):1009-9158

[17] Sluijter JP, van Mil A, van Vliet P, et al. MicroRNA-1 and 499 regulate differentiation and proliferation in human-derived cardiomyocyte progenitor cells [J]. *Arterioscler, Thromb Vasc Biol*, 2010, 30(4):859-868

[18] Hosoda T, Zheng H, Cabral-da-Silva M, et al. Human cardiac stem cell differentiation is regulated by a microRNA mechanism [J]. *Circulation*, 2011, 123(12):1287-1296

[收稿日期] 2014-04-25

(上接第 39 页)

[3] Zhou GS, Hu Z, Fang HT, et al. Biologic activity of triptolide in t(8;21) acute myeloid leukemia cells [J]. *Leuk Res*, 2011, 35(2):214-218

[4] Kim MJ, Lee TH, Kim SH, et al. Triptolide inactivates Akt and induces caspase-dependent death in cervical cancer cells via the mitochondrial pathway [J]. *Int J Oncol*, 2010, 37(5):1177-1185

[5] Mujumdar N, Mackenzie TN, Dudeja V, et al. Triptolide induces cell death in pancreatic cancer cells by apoptotic and autophagic pathways [J]. *Gastroenterology*, 2010, 139(2):598-608

[6] Antonoff MB, Chugh R, Skube SJ, et al. Role of Hsp-70 in triptolide-mediated cell death of neuroblastoma [J]. *J Surg Res*, 2010, 163(1):72-78

[7] Carter BZ, Mak DH, Schober WD, et al. Triptolide induces caspase-dependent cell death mediated via the mitochondrial pathway in leukemic cells [J]. *Blood*, 2006, 108(7):630-637

[8] Carter BZ, Mak DH, Schober WD, et al. Triptolide sensitizes AML cells to TRAIL-induced apoptosis via decrease of XIAP and p53-mediated increase of DR5 [J]. *Blood*, 2008, 111(4):3742-3750

[9] Meng HT, Zhu L, Ni WM, et al. Triptolide inhibits the proliferation of cells from lymphocytic leukemic cell lines in association with downregulation of NF-κB activity and miR-16-1 [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2011, 32(4):503-511

[10] Liu Q. Triptolide and its expanding multiple pharmacological functions [J]. *Int Immunopharmacol*, 2011, 11(3):377-383

[11] Salminen A, Lehtonen M, Paimela T, et al. Celastrol: molecular targets of Thunder God Vine [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 394(3):439-442

[12] 刘为萍, 刘素香, 唐慧珠, 等. 雷公藤研究新进展 [J]. *中草药*, 2010, 41(7):1215-1218

[13] 吴少辉, 刘光明. 雷公藤内酯的提取、分析和药理作用研究进展 [J]. *现代药物与临床*, 2011, 26(1):36-39

[14] 刘媛, 陈燕, 赵菲, 等. 雷公藤内酯醇对多发性骨髓瘤 RPMI 8226 细胞周期及 P21 wap1/cip1 和 P27kip1 表达的影响 [J]. *中草药*, 2010, 41(11):1819-1823

[收稿日期] 2014-07-21