

# 冠状动脉粥样硬化性心脏病血浆微小 RNA-126 的表达水平及其临床意义

吴雪纯 贾永平

**【摘要】** 目的:探讨微小 RNA(miRNA)-126 在冠状动脉粥样硬化性心脏病(冠心病)患者血浆中的表达情况及临床意义。 方法:收集 2015 年 2 月至 2015 年 6 月在山西医科大学第一医院心内科住院的 114 例冠心病患者(冠心病组)和 40 例健康者(对照组)的血浆,将冠心病组分为急性心肌梗死组(AMI 组,  $n=40$ )、不稳定型心绞痛组(UA 组,  $n=38$ )、稳定型心绞痛组(SA 组,  $n=36$ )3 个亚组,运用实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)检测各组血浆 miRNA-126 的表达水平,并分析各组间的表达差异。 结果:AMI 组 miR-126 的相对表达水平( $0.65 \pm 0.53$ )与对照组( $1.0$ )、UA 组( $0.93 \pm 0.68$ )、SA 组( $0.96 \pm 0.55$ )相比明显下降,差异有统计学意义( $P$  均  $<0.05$ );UA 组、SA 组与对照组相比有下降趋势,但差异无统计学意义( $P$  均  $>0.05$ )。 结论:血浆 miR-126 在冠心病患者中的表达存在差异,miR-126 在 AMI 患者中表达明显下降,可能成为诊断 AMI 的新型标志物。

**【关键词】** 冠状动脉粥样硬化性心脏病;微小 RNA-126;实时荧光定量聚合酶链式反应

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2017.06.012

**The expression level of plasma microRNA-126 in patients with coronary atherosclerotic disease and its clinical significance** WU Xuechun<sup>1</sup>, JIA Yongping<sup>2</sup>. 1. China Railway 17 Bureau Group Central Hospital 030021; 2. Department of Cardiology, First Hospital of Shanxi Medical University, Shanxi 030001, China

**【Abstract】 Objective:** To study the difference of microRNA (miR)-126 expression between coronary atherosclerotic heart disease (CAD) patients and healthy people, and discuss its clinical significance. **Methods:** Collect the plasma of 114 CAD patients (experimental group) hospitalized in department of cardiology, the First Hospital of Shanxi Medical University from February to June 2015 and 40 cases of healthy people (control group). The CAD group was divided into three subgroups: acute myocardial infarction group (AMI,  $n=40$ ), unstable angina group (UA,  $n=38$ ) and stable angina group (SA,  $n=36$ ). Real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to detect the miR-126 expression level in each group and the expression differences between the groups was analyzed. **Results:** The expression of miR-126 in AMI group was significantly lower than those in control group, UA group and SA group (all  $P<0.05$ ). The expression in UA group and SA group decreased slightly compared with the control group, but the differences were not statistically significant (both  $P>0.05$ ). **Conclusion:** The expression of plasma miR-126 in CAD patients is different, which is obviously decreased in AMI group, and may become a new hematological marker for the diagnosis of AMI.

**【Key words】** Coronary atherosclerotic disease; MiRNA-126; qRT-PCR

基金项目:山西省科技攻关项目(20140313015-14)

作者单位:030032 太原,中铁十七局集团中心医院(吴雪纯),030001 太原,山西医科大学第一医院心内科(贾永平)

通信作者:贾永平,Email:849782305@qq.com

微小 RNA(miRNA)属于内源性非编码 RNA,通过对靶基因转录后水平的负性调控作用降低靶基因的表达水平<sup>[1-2]</sup>。人类基因组中约 1/3 基因的表达都受到 miRNA 的调控<sup>[3]</sup>,且 miRNA 具有相对稳定、易检测、组织特异性等特点。其中 miR-126 在内皮细胞中高表达,是目前唯一已知的在内皮细胞系特异性表达的 miRNA,参与调节血管生长发育、血管炎性反应和血管再生等病理生理过程<sup>[4-11]</sup>。另外,miR-126 参与动脉粥样硬化以及脂质代谢等疾病过程。本研究采用荧光实时定量 PCR(qRT-PCR)的方法检测冠状动脉粥样硬化性心脏病(冠心病)不同分组中血浆 miR-126 的表达水平,旨在为冠心病的早期诊断、治疗提供新思路。

## 1 对象与方法

### 1.1 研究对象

入选 2015 年 2 月至 2015 年 6 月就诊于山西医科大学第一医院心内科的冠心病患者 114 例,其中男性 70 例,女性 44 例,年龄 43~69 岁,平均年龄( $53.10 \pm 6.88$ )岁。收集研究对象的一般临床资料,包括性别、年龄、血压、血生化指标、吸烟史、家族史、高血压史、高血脂史、糖尿病史等。所有患者均行冠脉造影术,根据患者的症状、体征、心电图、冠脉造影结果等将患者分为急性心肌梗死(AMI)组 40 例、不稳定型心绞痛(UA)组 38 例、稳定型心绞痛(SA)组 36 例,选择同期行冠脉造影未见异常者 40 例作为对照组。所有样本采集及使用均取得患者及家属同意,并签署知情同意书。

### 1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取 所有研究对象均于入院后 1 d 内收集新鲜血浆样本,1 900 × g 4℃离心 10 min,分离上层血浆和下层血细胞,上层血浆继续 16 000 × g 离心 10 min,EP 管分装,−80℃冰厢中保存备用。血浆样本总 RNA 的提取采用 miRNeasy Serum/Plasma 试剂盒,操作过程参照相应说明书。

1.2.2 qRT-PCR RNA 的反转录使用 miScript II RT、miScript SYBR Green PCR 试剂盒,操作过程参照相应的说明,每份标本在 RNA 的提取过程中均加入线虫 cel-miR-39 作为内参,使用 ABI7500FAST 型荧光定量 PCR 仪进行 qRT-PCR,反转录反应体系:5 × miScript Hispec Buffer 4 μL、10 × miScript Nucleus Mix 2 μL、RNase-free water 10 μL、miScript Reverse Transcriptase mix 2 μL、Template RNA 2 μL,共计 20 μL 混匀后稍离心,在

PCR 仪中进行反应。参数设置为 37℃ 60 min,95℃ 5 min,所获得产物即为 cDNA,稀释后备用。PCR 反应体系包括:Template cDNA 2.5 μL、2 × QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix 12.5 μL、10 × miScript Universal Primer 2.5 μL、10 × miScript Primer Assay 2.5 μL、RNase-free water 5 μL,共计 25 μL。每个样本对目的基因及内参基因 cel-miR-39 的定量均重复 3 次,循环参数设置为:95℃ 5 min 预变性,94℃ 15 s、55℃ 30 s、70℃ 30 s,共 40 个循环。做溶解曲线,统计各组 Ct 值。miR-126 的茎环引物序列为 GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACCGCATT,上游引物为 5'-GGCTCGTACCGTGAGTAAT-3',下游引物为 5'-GTGCCAGGGTCCGAGGT-3'; cel-miR-39 的茎环引物序列为 TCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGCCAAGCT,上游引物为 5'-AGTGCACGGTCCGAGGTATT-3',下游引物为 5'-CGGGTGTAATCAGCTTGGT-3'。miR-126 相对表达水平的计算采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法,其中  $\Delta CT$  为  $\Delta CT_{miR-126}$  与  $\Delta CT_{内参}$  的差值, $\Delta\Delta CT$  为  $\Delta CT_{冠心病组}$  与  $\Delta CT_{对照组}$  的差值。

### 1.3 统计学分析

采用 SPSS 20.0 进行统计学分析,计量资料采用均数 ± 标准差表示。经正态检验及方差齐性检验后,两组间比较采用  $t$  检验,多组间单因素比较采用方差分析,多组间两两比较采用  $q$  检验。采用受试者工作特征(ROC)曲线评价 miR-126 的相对表达水平对 AMI 诊断的意义。以  $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组临床资料的比较

各组年龄、性别、血压、吸烟史、家族史、高脂血症史、高血压史、糖尿病史、总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、体质指数(BMI)的差异均无统计学意义,见表 1。

### 2.2 血浆 miR-126 在冠心病各组中的相对表达水平

AMI 组 miR-126 的相对表达水平( $0.65 \pm 0.53$ )与对照组( $1.0$ )、UA 组( $0.93 \pm 0.68$ )、SA 组( $0.96 \pm 0.55$ )相比均明显下降,差异有统计学意义( $P$  均  $< 0.05$ );UA 组、SA 组与对照组相比有下降趋势,但差异无统计学意义。

表 1 各组一般临床资料的比较

项 目	AMI 组(n = 40)	UA 组(n = 38)	SA 组(n = 36)	对照组(n = 40)
例数(男/女)	40(24/16)	38(24/14)	36(22/14)	40(22/18)
年龄/岁	54.9 ± 6.0	53.2 ± 8.0	54.0 ± 7.3	50.4 ± 5.8
SBP/mmHg	133.3 ± 17.1	129.4 ± 15.4	128.9 ± 15.6	119.6 ± 16.1
DBP/mmHg	77.1 ± 6.8	75.5 ± 7.6	73.9 ± 6.8	70.8 ± 7.9
TC/mmol · L <sup>-1</sup>	4.17 ± 0.95	4.00 ± 0.91	3.98 ± 0.74	3.67 ± 0.82
TG/mmol · L <sup>-1</sup>	1.78 ± 0.68	1.63 ± 0.71	1.55 ± 0.69	1.37 ± 0.47
BMI/kg · m <sup>-2</sup>	25.77 ± 3.05	24.98 ± 2.86	24.03 ± 3.06	22.64 ± 3.39
吸烟史/例(%)	18(45)	14(38)	18(47)	16(40)
家族史/例(%)	14(35)	10(28)	14(36)	12(30)
高脂血症史/例(%)	18(45)	14(38)	16(42)	14(35)
高血压史/例(%)	12(30)	12(33)	10(26)	8(20)
糖尿病史/例(%)	8(20)	6(16)	6(15)	4(10)

2.3 AMI 组 miR-126 的 ROC 曲线

采用 ROC 曲线评价血浆 miR-126 的相对表达量对 AMI 的诊断是否有意义。血浆 miR-126 相对表达水平的 ROC 曲线下面积(AUC)为 0.755 (95%CI:0.658~0.852),提示血浆 miR-126 可能作为诊断 AMI 的指标,见图 1。

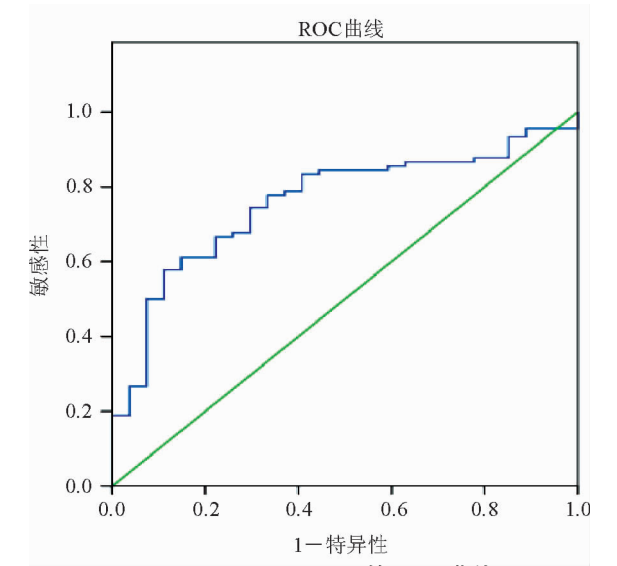


图 1 AMI 组 miR-126 的 ROC 曲线

3 讨论

研究表明,循环血 miRNA 与各种心血管疾病的发病机制有密切的关系,这为疾病的治疗及预防提供了新的思路<sup>[12]</sup>。多项研究表明,AMI 时外周血 miRNA 的表达水平出现显著变化,推测其可作为 AMI 的诊断学标志物。有学者认为 miRNA 可作为干细胞治疗 AMI 的新切入点。miR-126 是与血管内皮细胞及血管功能密切相关的 miRNA,

在心脏中高表达,敲除该基因的小鼠可出现血管芽生延迟,血管完整性受到破坏。Zemecke 等<sup>[13]</sup>发现 miR-126 可以通过诱导基质细胞源性因子 12 的表达延缓动脉粥样硬化的发展。本实验通过研究冠心病各组 miR-126 的表达水平,发现 AMI 时血浆 miR-126 水平显著降低,SA 及 UA 患者血浆 miR-126 水平与对照组相比有下降趋势,但差异均无统计学意义。Fichtlscherer 等<sup>[14]</sup>发现部分在健康人群中高表达的 miRNA 在冠心病患者中表达明显降低,在比较了 36 例冠心病患者与 17 例健康志愿者的血浆 miRNA 后发现,冠心病患者循环血中 miR-126、miR-17、miR-92a 以及 miR-155 的表达水平较健康志愿者组明显降低。Long 等<sup>[15]</sup>发现 AMI 患者不同时间段血浆 miR-126 的水平呈现逐渐下降的趋势,与本研究结果一致。

本实验不足之处为样本数量偏少,导致结果可能存在偏差,需要增加样本量,进一步研究 miR-126 的具体调控机制。

参 考 文 献

[ 1 ] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell, 2004, 116(2):281-297.

[ 2 ] Montgomery RL, van Rooij E. Therapeutic advances in MicroRNA targetin[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2011, 57 (1):1-7.

[ 3 ] Friedman RC, Farh KK, Burge CB, et al. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs[J]. Genome Res, 2009, 19(1):92-105.

[ 4 ] Takeuchi K, Yanail R, Kumase F, et al. Egf-like-domain-7 is required for vegf-induced akt/erk activation and vascular tube formation in an ex vivo angiogenesis assay[J]. PloS

- One, 2014, 9(3):e91849.
- [5] Ishizaki T, Tamiya T, Taniguchi K, et al. MiR-126 positively regulates mast cell proliferation and cytokine production through suppressing *spred1* [J]. Genes Cells, 2011, 16(7):803-814.
- [6] Wei YY, Nazari M, Neth P, et al. MicroRNA-126, -145, and -155: a therapeutic triad in atherosclerosis? [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2013, 33(3):449-454.
- [7] Giorgio A, Castellano L, Krell J, et al. Crosstalk-induced loss of miR-126 promotes angiogenesis [J]. Oncogene, 2014, 33(28):3634-3635.
- [8] Ye P, Liu J, He FY, et al. Hypoxia-induced deregulation of miR-126 and its regulative effect on VEGF and MMP-9 expression [J]. Int J Med, 2013, 11(1):17-23.
- [9] Sturgeon CM, Chicha L, Ditadi A, et al. Pitirivme erythropoiesis is regulated by miR-126 via nonhematopoietic Vcam-1<sup>+</sup> cells [J]. Developmental Cell, 2012, 23(1):45-57.
- [10] Zhang J, Zhang Z, Zhang DY, et al. microRNA-126 inhibits the transition of endothelial progenitor cells to mesenchymal cells via the PIK3R2-PI3K/Akt signalling pathway [J]. PLoS One, 2013, 8(12):1-9.
- [11] Jansen F, Yang X, Hoelscher M, et al. Endothelial microparticle-mediated transfer of microRNA-126 promotes vascular endothelial cell repair via SPRED1 and is abrogated in glucose-damaged endothelial microparticles [J]. Circulation, 2013, 128(18):2026-2038.
- [12] Small EM, Frast R J, Olson EN. MicroRNAs add a new dimension to cardiovascular disease [J]. Circulation, 2010, 12(8):1022-1032.
- [13] Zemecke A, Bidzhekov K, Noels H, et al. Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection [J]. Sci Signal, 2009, 2(100):ra81.
- [14] Fichtlscherer S, De Rosa S, Fox H, et al. Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease [J]. Circ Res, 2010, 107(5):677-684.
- [15] Long G, Wang F, Duan Q, et al. Human circulating microRNA-1 and microRNA-126 as potential novel indicators for acute myocardial infarction [J]. Int J Biol Sci, 2012, 8(6):811-818.

(收稿:2017-06-30 修回:2017-08-23)

(本文编辑:丁媛媛)

## 中国科协、教育部、科技部、卫生计生委、中科院、工程院、自然科学基金会 关于印发《发表学术论文“五不准”》的通知

科协发组字〔2015〕98 号

近年来,我国科技事业取得了长足的发展,在学术期刊发表论文数量大幅增长,质量显著提升。在取得成绩的同时,也暴露出一些问题。今年发生多起国内部分科技工作者在国际学术期刊发表论文被撤稿事件,对我国科技界的国际声誉带来极其恶劣的影响。为弘扬科学精神,加强科学道德和学风建设,抵制学术不端行为,端正学风,维护风清气正的良好学术生态环境,重申和明确科技工作者在发表学术论文过程中的科学道德行为规范,中国科协、教育部、科技部、卫生计生委、中科院、工程院、自然科学基金会共同研究制定了《发表学术论文“五不准”》。根据中央领导意见,现将《发表学术论文“五不准”》印发给你们,请遵照执行。

各有关单位要组织深入学习、广泛宣传,结合实际制定和完善相关规定,建立学术不端行为调查处理机制,进一步改革完善科技评价体系,为科技工作者创新创业提供良好的政策和环境保障;要采取切实有效的措施对被撤稿作者开展调查,对违反“五不准”的行为视情节作出严肃处理,并将处理结果报上级主管部门备案。广大科技工作者应加强道德自律,共同遵守“五不准”,认真开展自查,发现存在违反“五不准”的行为要主动申请撤稿,坚决抵制“第三方”学术不端行为。各全国学会(协会、研究会)要发挥科学共同体作用,做好教育引导,捍卫学术尊严,维护良好学风。

中国科协、教育部、科技部、卫生计生委、中科院、工程院、自然科学基金会要加强沟通协调和联合行动,落实“五不准”,督促有关单位对撤稿事件进行调查处理,逐步建立科研行为严重失信记录制度和黑名单信息共享机制,推动科技评价体系改革,规范科研诚信管理,维护科技工作者合法权益。

中国科协 教育部 科技部  
卫生计生委 中科院 工程院  
自然科学基金会  
2015 年 11 月 23 日