

血清 microRNA 对心肌桥的诊断价值

钟勇, 裴颖皓, 王俊, 宫剑滨, 江时森

(南京大学医学院临床学院 南京军区南京总医院心脏内科, 江苏省南京市 210002)

[关键词] 心肌桥; microRNA; 表达差异; 生物学标记物

[摘要] **目的** 在心肌桥患者血清中筛选出表达差异的 microRNA(miRNA), 寻找早期诊断心肌桥的血清生物标记物。**方法** 采集 100 例心肌桥患者及 50 例对照者的血清样本, 提取血清中的 miRNA, 用 Microarray 基因芯片方法在病例组 20 例及对照组 10 例混合样本中筛选差异的血清 miRNA, 分析结果并采用实时荧光定量 PCR 对差异性显著的 miRNA 进行验证。**结果** Microarray 检测结果显示部分 miRNA 在心肌桥患者血清中表达异常, 心肌桥患者 Hsa-miR-92a、Hsa-miR-487a 和 Hsa-miR-126 表达量上升, Hsa-miR-29b 表达量下降, 与对照组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。Hsa-miR-92a、Hsa-miR-487a、Hsa-miR-126 和 Hsa-miR-29b 的 ROC 曲线下面积分别为 0.998、0.956、0.719 和 0.986, 通过最佳切点分析, 其诊断心肌桥的灵敏度和特异度分别为: 97% 和 100%、97% 和 100%、45.5% 和 100%、87.9% 和 100%。**结论** 心肌桥患者血清中存在 miRNA 表达差异, Hsa-miR-92a、Hsa-miR-487a、Hsa-miR-126 和 Hsa-miR-29b 是潜在诊断心肌桥的血清标记物。

[中图分类号] R44

[文献标识码] A

The Value of Serum MicroRNA in Diagnosing Myocardial Bridging

ZHONG Yong, PEI Ying-Hao, WANG Jun, GONG Jian-Bin, and JIANG Shi-Sen

(Department of Cardiology, School of Medicine, Nanjing University, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, Nanjing, Jiangsu 210002, China)

[KEY WORDS] Myocardial Bridging; MicroRNA; Differential Expression; Biomarker

[ABSTRACT] **Aim** To identify a serum microRNA(miRNA) expression profile that can serve as a novel diagnostic biomarker for myocardial bridging (MB) detection. **Methods** Serum samples were taken from 100 MB patients and 50 controls. An initial screening of miRNA expression by microarray was performed using serum samples pooled from 20 MB patients and 10 controls, respectively. Differential expression was validated using hydrolysis probe-based stem-loop quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR) in individual samples. **Results** The microarray results demonstrated that 21 serum miRNAs were markedly different in the MB patients compared with the controls. The RT-qPCR analysis further identified a profile of four serum miRNAs (miR-92a, miR-487a, miR-29b and miR-126) as a biomarker for MB detection. The areas under the receiver operating characteristic (ROC) curve of this four-serum miRNAs were 0.998, 0.956, 0.719 and 0.986 respectively, and using the optimal cutoff value, we obtained the following sensitivity and specificity values to detect MB: 97% and 100%, 97% and 100%, 45.5% and 100%, 87.9% and 100% respectively. **Conclusions** We identified four serum miRNAs signature for MB diagnosis by genome-wide serum miRNA expression profiling. Expression levels of this serum miRNA may be a novel biomarker for early detection of MB in human.

冠状动脉及其分支通常走行于心脏表面的心外膜结缔组织中, 当一段冠状动脉被心肌所包绕时, 则该段心肌被称为心肌桥 (myocardial bridging, MB)。心肌桥是一种最常见的冠状动脉血管变异,

解剖检出率约 33%。1960 年, Portmann 等^[1]首次报道了在冠状动脉造影时心肌桥的动态影像学改变。目前, 心肌桥的诊断只能依靠冠状动脉造影或是冠状动脉 CT 血管造影, 这两种方法都存在着价格昂

[收稿日期] 2013-02-26

[基金项目] 江苏省自然科学基金资助项目 (BK2011661) 和南京军区南京总医院面上课题 (2011014)

[作者简介] 钟勇, 博士研究生, 主治医师, 研究方向为动脉粥样硬化性心血管病的分子机制, E-mail 为 zhongyongnj@163.com。王俊, 博士研究生, 主治医师, 研究方向为动脉粥样硬化性心血管病的分子机制。通讯作者江时森, 主任医师, 博士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化性心血管病的分子机制, E-mail 为 jiangshisen@sina.com。

贵、有创和碘剂过敏的检查禁忌等缺陷。因此,迫切需要探索一种价格低廉、简单可行的早期诊断心肌桥方法。microRNA(miRNA)是一类长度为20~25个核苷酸的内源性小分子非编码单链RNA,主要参与基因转录后表达调控^[2]。一些研究均已证实,miRNA在心肌发育、心肌纤维化等方面扮演着重要的角色^[3,4]。目前国内外关于心肌桥的循环miRNA研究尚未见相关报道,本文结合Microarray与实时荧光定量PCR(RT-qPCR)技术,在心肌桥患者中筛选出表达差异显著的miRNA,可能成为心肌桥临床新型诊断学生物标记物。

1 对象和方法

1.1 研究对象

选择2011年11月至2012年6月在南京军区南京总医院心血管内科住院的100例心肌桥患者为研究对象(病例组),其中男64例,女36例。另外,选择50例非心肌桥且无冠心病的患者设为对照组。两组患者均通过冠状动脉造影验证,并排除心力衰竭、心律失常、肿瘤病史和脑、肝、肾以及内分泌代谢疾病。

1.2 Microarray 芯片

分别将病例组20例和对照组10例样本混合,提取总RNA,通过Microarray芯片进行miRNA表达检测,利用U6 snRNA进行校正比较两组miRNA的表达差异谱,筛选出差异表达 ≥ 2 倍的miRNA,准备进一步验证。

1.3 循环 miRNA 提取方法

(1)用于Microarray样本处理:每个样本取100 μL 混匀,按照3倍体积比例加入Trizol充分混匀。按照产品说明书提取总RNA。(2)用于RT-qPCR验证样本处理:取100 μL 低温冷藏的血清样本,加入300 μL DEPC水和200 μL 苯酚,剧烈震荡,加入200 μL 氯仿,再次剧烈震荡,室温16000 g离心20 min,吸取上清后加入800 μL 异丙醇,静置1 h,在4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下16000 g离心20 min,充分弃上清,加入1 mL 75%乙醇混匀,再次在4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下16000 g离心20 min,充分弃上清,加入20 μL DEPC水溶解提取出的RNA。

1.4 cDNA 的合成

RT-PCR使用miRNA Taqman试剂(ABI公司产品)。每10 μL 逆转录反应为一个反应体系,包括7 μL 反应体系混合物、1 μL Taqman引物和2 μL RNA样本。在PCR仪(ABI公司产品)上设定温度

程序为16 $^{\circ}\text{C}$ 30 min,42 $^{\circ}\text{C}$ 30 min,85 $^{\circ}\text{C}$ 5 min,短期内待检样本保存在4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱,长期需保持在-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中,同时注意避免反复冻融。

1.5 实时荧光定量 PCR 检测

使用7300型序列检测系统(ABI公司产品),每个反应孔为20 μL 反应体系,包括1 μL 逆转录产物、0.33 μL miRNA Taqman引物、18.67 μL 体系混合物II。反应体系在PCR仪上温度设定为:95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,进行40个循环。

1.6 数据分析

以miR-let7作为内参,miR-16建立标准曲线,参照Chen等^[5]描述绝对表达量计算方法,计算差异表达miRNA的绝对含量。Ct值为反应过程中实时荧光强度到达设定的阈值时所经过的扩增循环数,此时扩增呈对数增长,Ct值与标本起始拷贝数成反比。

1.7 统计学分析

采用SPSS 19.0软件进行处理。组间比较采用配对 t 检验,相关性分析用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miRNA 测序结果分析

Microarray芯片结果显示,在病例组及对照组中分别检测出391个和329个miRNA的表达,筛选出18个表达上调的miRNA(Hsa-miR-92a、Hsa-miR-487a、Hsa-miR-126、Hsa-miR-147、Hsa-miR-450b-3p、Hsa-miR-551b、Hsa-miR-208、Hsa-miR-208b、Hsa-miR-199a、Hsa-miR-21、Hsa-miR-210、Hsa-miR-215、Hsa-miR-449、Hsa-miR-151、Hsa-miR-502、Hsa-miR-1、Hsa-miR-582-3p和Hsa-miR-769)以及3个表达下调的miRNA(Hsa-miR-29b、Hsa-miR-211和Hsa-miR-219),共21个miRNA进行后续试验(表1)。

2.2 在个体之间验证 miRNA 的结果

在病例组100例患者和对照组50例非冠心病无心肌桥患者的血清样本中,利用RT-qPCR方法逐个验证上述21个miRNA,并计算绝对含量。结果发现,miR-92a、miR-487a、miR-126和miR-29b在两组之间有明显的表达差异,其中miR-29b在病例组表达量明显下降,其余3个miRNA则显示表达量升高(图1)。miR-211在内的9个miRNA虽然在两组间表达有明显差异,但是与Microarray结果不符,miR-147在内的8个miRNA则没有差异(表1)。

表 1. 两组血清 miRNA 的表达差异

Table 1. The discrepancy of miRNA in two groups

miRNAs	病例组 (n = 100)		对照组 (n = 50)		Fold change	P	-ΔΔCt
	Mean	SD	Mean	SD			
miR-92a	44.83	44.80	2.92	0.96	15.34	0.00	2.68
miR-487a	382.18	177.21	35.31	12.56	10.82	0.00	10.86
miR-29b	58.15	77.06	205.11	83.85	0.28	0.00	-2.35
miR-126	63.39	53.27	29.14	18.62	2.18	0.00	3.68
miR-210	67.84	88.30	26.05	25.75	2.60	0.01	4.69
miR-211	298.03	243.83	3.98	2.91	74.83	0.00	-12.48
miR-450-3p	10.60	7.47	24.34	17.87	0.44	0.00	2.74
miR-582-3p	18.09	19.35	183.10	87.94	0.10	0.00	19.84
miR-208	73.26	48.80	977.27	319.56	0.07	0.00	5.56
miR-769-3p	0.12	0.10	2.11	2.29	0.06	0.00	4.55
miR-551b	0.36	0.44	1.00	1.11	0.36	0.01	7.12
miR-1	2.79	4.22	8.28	6.58	0.34	0.01	2.75
miR-502	186.37	124.76	404.89	333.35	0.46	0.02	3.66
miR-147	343.15	398.00	46.46	10.15	7.39	0.05	2.24
miR-219	6.16	1.59	7.54	3.26	0.82	0.05	-7.24
miR-199a	151.32	181.00	84.55	65.66	1.79	0.06	15.94
miR-215	650.97	499.04	378.21	514.32	1.72	0.06	3.70
miR-151-3p	5.15	5.76	8.18	6.93	0.63	0.09	2.92
miR-449	18.83	12.52	24.83	18.92	0.76	0.13	4.12
miR-208b	9.08	14.85	4.94	2.17	1.84	0.26	22.97
miR-21	5.04	4.93	6.14	7.33	0.82	0.65	2.64

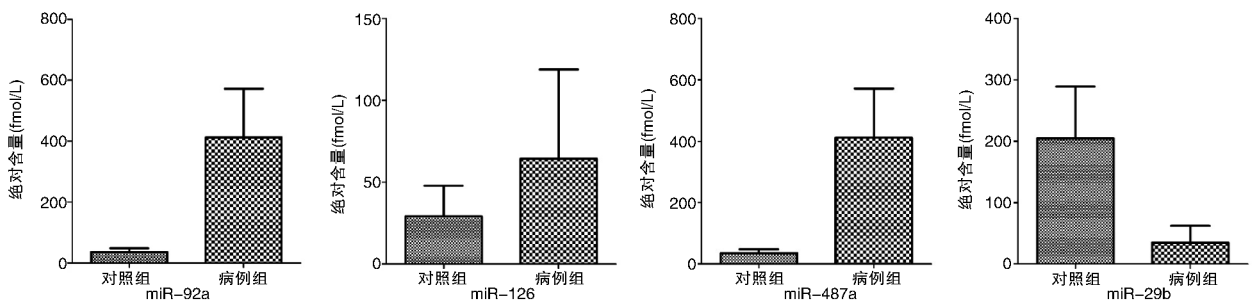


图 1. 两组血清 miRNA 绝对含量对比

Figure 1. Comparison of the absolute concentration of miRNA in two groups

2.3 血清差异 miRNA 浓度的 ROC 曲线分析

对血清 miR-92a、miR-487a、miR-126 和 miR-29b 浓度检测指标运用 SPSS 软件进行 ROC 曲线(图 2)分析, miR-92a、miR-487a、miR-126 和 miR-29b 的 ROC 曲线下面积 (area under the ROC curve, AUC) 分别为 0.998 (95% CI: 0.991 ~ 1.000)、0.956 (95%

CI: 0.892 ~ 1.000)、0.719 (95% CI: 0.577 ~ 0.862) 和 0.986 (95% CI: 0.961 ~ 1.000)。通过最佳切点分析, 得到这 4 个 miRNA 的最佳切点分别为: 8.01 fmol/L (97% 和 100%)、94.17 fmol/L (97% 和 100%)、27.54 fmol/L (45.5% 和 100%) 和 54.71 fmol/L (87.9% 和 100%)。

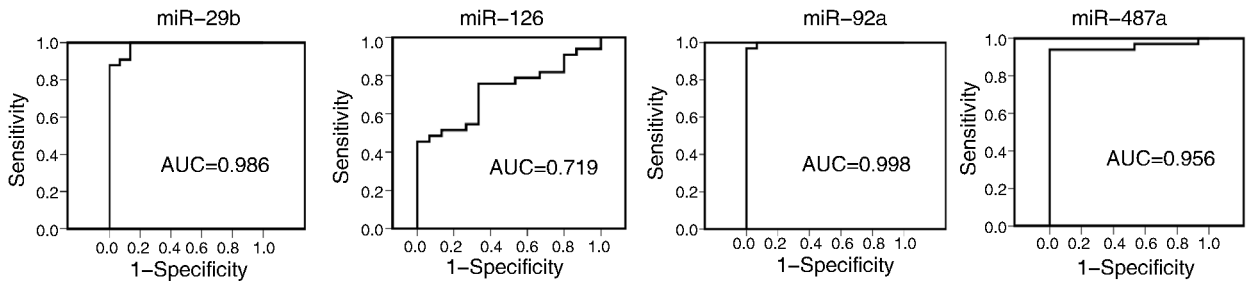


图 2. 4 种 miRNA 的 ROC 曲线

Figure 2. ROC curves of the 4 miRNAs

3 讨论

心肌桥是一种常见的冠状动脉血管变异,所有入选本次研究的心肌桥患者均通过冠状动脉血管造影证实。而冠状动脉血管造影也是目前诊断心肌桥的“金指标”,即至少在两个投影位发现冠状动脉典型的收缩期一过性狭窄征象,可成线状、串珠状或类似闭塞样改变,而舒张期病变段血管完全或部分恢复正常,称为“挤奶效应”。之前有报道通过冠状动脉血管造影术心肌桥的发现率约为 0.5%~40% 不等^[6],明显低于尸检结果,其原因可能与造影方法、角度、操作者专业程度以及人种相关。本研究中,冠状动脉血管造影术心肌桥的发现率为 14.2%,其中 63.7% 为男性,36.3% 为女性。Poláč ek 等^[7]报道心肌桥最常见于冠状动脉的左前降支,我们的数据中心肌桥全部位于左前降支,其中心肌桥位于左前降支中段有 69 例,远端有 15 例,近端有 8 例,长肌桥有 8 例。

心肌桥可引起心肌缺血,当心肌收缩时,心肌桥机械压迫冠状动脉,影响冠状动脉收缩期血流灌注,继而舒张早期、中期心肌灌注减少,冠状动脉血流储备降低,从而发生心肌缺血,出现心绞痛等症状。目前,心肌桥的治疗策略仍存在争议。一般治疗方法包括药物、介入以及外科手术。其中首选药物治疗,主要使用 β 受体阻滞剂等。手术治疗创伤大,术后有诱发室壁瘤的危险。介入治疗可能有心肌桥穿孔的风险,远期有支架内再狭窄的可能,故少用。心肌桥通常被认为是一种良性病变,因此对于胸痛患者如能尽早明确心肌桥诊断可以更早离开监护病房及制定下一步治疗方案。通过冠状动脉血管造影诊断心肌桥比较浪费医疗资源,而且给患者增加痛苦。

miRNA 在进化过程中高度保守,广泛地负调控靶基因的表达^[8],并且可以稳定地存在于血清和血浆等多种体液当中,这类 miRNA 被称为循环 miR-

NA。目前研究发现循环 miRNA 是潜在的多种疾病的诊断学分子标记物。比如在肺癌^[5]、前列腺癌^[9]、胃癌^[10]、结直肠癌^[11]、乳腺癌^[12] 和卵巢癌^[13] 的患者血清中,发现了异常表达的 miRNA,每一种肿瘤都有相应特异性的 miRNA 表达水平,大多数低分化肿瘤也可以根据 miRNA 的表达水平确定其起源的组织或器官。目前发现,miRNA 对于神经干细胞的增殖和分化有调控作用,不同的 miRNA 通过影响其靶标 mRNA 在神经干细胞的表达及功能发挥,进而改变神经干细胞的增殖和分化状态,最终完成对神经系统发育的调控^[8]。在心脏发育方面,施翔翔等^[14]通过建立先天性室间隔缺损相关基因 Pax-8 敲除小鼠模型,发现 miRNA 为先天性心脏病室间隔缺损发生发展的病理机制之一。同时,近来的研究表明,miRNA 与心血管疾病的发生有着密切关系,Wang 等^[15]证实血清 miRNA-208a 在急性心肌梗死后迅速剧烈升高,有助于急性心肌梗死的早期诊断。Tijssen 等^[16]研究发现 6 个 miRNA 在心功能衰竭患者血清中表达增高,其中 miR-423-5p 优于 BNP 在内的多种临床心功能衰竭指标。也有学者通过动物模型发现,在心肌缺血再灌注早期,心肌缺血区域 miR-21 表达下降,细胞凋亡明显增加,过表达 miR-21 可改善细胞凋亡^[17]。

通过血清 miRNA 作为心肌桥的诊断学标记物,可以避免冠状动脉血管造影等在内的有创检查,也可以减少医疗成本和增加临床应用普及。我们通过对 100 例心肌桥患者和 50 例非心肌桥对照人群进行 Microarray 初筛和 RT-qPCR 进一步验证,确定了 Hsa-miR-92a、Hsa-miR-487a、Hsa-miR-126 和 Hsa-miR-29b 4 个 miRNA 在病例组的差异表达,通过 ROC 曲线分析,这 4 个 miRNA 的 AUC 分别是 0.998、0.956、0.719 和 0.986,通常认为 AUC 大于 0.7,该指标才具有诊断价值。得到这 4 个 miRNA 的最佳切点分别为 8.01 fmol/L (97% 和 100%)、94.17 fmol/L (97% 和 100%)、27.54 fmol/L (45.5%

和 100%) 和 54.71 fmol/L (87.9% 和 100%)。除 miR-126 外,其余三个 miRNA 对于心肌桥的诊断均有高度的特异性和高度的敏感性。

综上所述, Hsa-miR-92a、Hsa-miR-487a、Hsa-miR-126 和 Hsa-miR-29b 在心肌桥患者血清中差异表达,我们认为它们是预测心肌桥的血清学标记物,为心肌桥的早期诊断提供了一种廉价、简单方便的技术手段。

随着近年研究的深入,发现心肌桥与心肌梗死、猝死等不良心脏事件有着一定联系^[7,18],因此早期诊断心肌桥有助于早期干预、减少恶性心血管事件的发生率。至于 Hsa-miR-92a、Hsa-miR-487a、Hsa-miR-126 和 Hsa-miR-29b 在心肌桥相关心肌缺血、冠状动脉粥样硬化、冠状动脉痉挛和心肌梗死的心脏事件发生发展过程中的作用,有待进一步深入研究。

[参考文献]

[1] Portmann W, Iwig J. Die intramurale koronarie im angiogramm[J]. Fortschr Roentgenstr, 1960, 92: 129-132.

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

[3] Kloosterman WP, Plasterk RH. The diverse functions of microRNAs in animal development and disease[J]. Dev Cell, 2006, 11(4): 441-450.

[4] Ambros V. The functions of animal microRNAs[J]. Nature, 2004, 431(7006): 350-355.

[5] Chen X, Hu Z, Wang W, et al. Identification of ten serum microRNAs from a genome-wide serum microRNA expression profile as novel noninvasive biomarkers for non-small cell lung cancer diagnosis[J]. Int J Cancer, 2012, 130(7): 1 620-628.

[6] Möhlenkamp S, Hort W, Ge J, et al. Update on myocardial bridging[J]. Circulation, 2002, 106(20): 2 616-622.

[7] Poláček P. Relation of myocardial bridges and loops on the coronary arteries to coronary occlusions[J]. Am Heart J, 1961, 61(1): 44-52.

[8] 王丽,王媛媛,刘海莉,等. MicroRNA 与神经系统发育的研究进展[J]. 中南大学学报(医学版), 2012, 38(3): 323-328.

[9] Coppola V, De Maria R, Bonci D. MicroRNAs and prostate cancer[J]. Endocr Relat Cancer, 2010, 17(1): F1-F17.

[10] Liu R, Zhang C, Hu Z, et al. A five-microRNA signature identified from genome-wide serum microRNA expression profiling serves as a fingerprint for gastric cancer diagnosis[J]. Eur J Cancer, 2011, 47(5): 784-791.

[11] Yang L, Belaguli N, Berger DH. MicroRNA and colorectal cancer[J]. World J Surg, 2009, 33(4): 638-646.

[12] Blenkiron C, Goldstein LD, Thorne NP, et al. MicroRNA expression profiling of human breast cancer identifies new markers of tumor subtype[J]. Genome Biol, 2007, 8(10): R214.

[13] Dahiya N, Morin PJ. MicroRNAs in ovarian carcinomas[J]. Endocr Relat Cancer, 2010, 17(1): F77-F89.

[14] 施翔翔,来丹丹,章佳颖,等. 心脏发育相关的微小 RNA 差异表达分析[J]. 中华医学杂志, 2009, 89(20): 1 416-420.

[15] 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.

[16] Tijssen AJ, Creemers EE, Moerland PD, et al. MiR423-5p as a circulating biomarker for heart failure[J]. Circ Res, 2010, 106(6): 1 035-039.

[17] 杨琼. MicroRNA-21 在缺血再灌注损伤早期大鼠心肌的表达及抗细胞凋亡作用[J]. 中南大学学报(医学版), 2013, 38(5): 483-489.

[18] Ma ES, Ma GL, Yu HW, et al. Assessment of myocardial bridge and mural coronary artery using ECG-gated 256-slice CT angiography: a retrospective study[J]. Scientific World Journal, 2013, 947876.

(此文编辑 许雪梅)