

# 糖尿病合并冠心病患者血清标志物 miR-24 的变化及临床意义

方丹<sup>1,2,3</sup>, 邓鑫<sup>1,3</sup>, 贺朝晖<sup>2,3</sup>, 吴剑波<sup>1,3</sup>, 罗茂<sup>1,3</sup>

(西南医科大学 1. 药物研究中心, 2. 临床医学, 3. 心血管药理系, 四川省泸州市 646000)

[关键词] 糖尿病合并冠心病; 血清 miR-24; YKL-40

[摘要] **目的** 深入调查糖尿病合并冠心病患者血清 miR-24 及其靶标 YKL-40 的变化及作用机制, 探讨血清 miR-24 作为糖尿病合并冠心病潜在分子标志物的临床意义。**方法** 收集行冠状动脉造影术确诊的患者 61 例, 并根据冠状动脉造影结果及糖尿病诊断标准分为单纯冠心病组(CHD)、糖尿病合并冠心病组(DM+CHD), 并且同期选取 32 例冠状动脉造影阴性的人群作为对照组。Gensini 积分方法评价冠状动脉病变程度; qRT-PCR 检测血清 miR-24 及靶标 YKL-40 mRNA 变化; ELISA 检测血清 YKL-40 蛋白水平; 受试者工作特征(ROC)曲线评估血清 miR-24 对糖尿病合并冠心病的诊断效率。**结果** miR-24 在 DM+CHD 组患者血清中水平显著低于对照组和单纯 CHD 组, 并且单纯 CHD 组血清 miR-24 水平也显著低于对照组。相对的, DM+CHD 组患者血清 YKL-40 mRNA 和蛋白水平则显著高于对照组和单纯 CHD 组, 同时单纯 CHD 组也显著高于对照组。ROC 曲线分析结果显示, 血清 miR-24 水平对区分 DM+CHD 和非 DM+CHD 以及 DM+CHD 和 CHD 患者均具备较高诊断价值, ROC 曲线下面积(AUC)及其 95%CI 分别为 0.919(95% CI: 0.856~0.983)和 0.901(95% CI: 0.814~0.988)。**结论** 糖尿病合并冠心病患者血清 miR-24 呈下调变化趋势并且具有较高 DM+CHD 诊断价值, 提示血清 miR-24 是潜在的糖尿病合并冠心病患者临床早期诊断标志物。

[中图分类号] R541.4

[文献标识码] A

## Altered levels and clinical significance of serum miR-24 as a potential biomarker in diabetes mellitus with coronary heart disease

FANG Dan<sup>1,2,3</sup>, DENG Xin<sup>1,3</sup>, HE Zhao-Hui<sup>2,3</sup>, WU Jian-bo<sup>1,3</sup>, LUO Mao<sup>1,3</sup>

(1. Drug Discovery Research Center, 2. Department of Clinical Medicine, 3. Department of Cardiovascular Pharmacology, Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China)

[KEY WORDS] Diabetes mellitus with coronary heart disease; Serum miR-24; YKL-40

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the changes of serum miR-24 and its target gene YKL-40 in diabetes mellitus (DM) with coronary heart disease (CHD) and explore its clinical significance as a predictive potential biomarker.

**Methods** According to the coronary arteries angiography and diabetes diagnostic criteria, the study included 61 subjects with CHD subjects ( $n=34$ ), DM+CHD subjects ( $n=27$ ), and 32 negative predictive value of coronary angiography (control) in our affiliated hospital from October 2013 to June 2016. Gensini score was used to evaluate the severity of coronary artery lesions. Bioinformatic analysis and identification of serum miR-24 and its target YKL-40 were assessed using quantitative real-time PCR, ELISA after a bicinchoninic acid (BCA) assay, and receiver-operating characteristic (ROC) assays. **Results** miR-24 was especially gradually decreased in serum of CHD and DM+CHD patients compared with controls and reached to minimum in DM+CHD groups, and conversely, its target YKL-40 mRNA and protein levels were significantly increased in serum of CHD and DM+CHD patients and reached to maximum in DM+CHD groups. Furthermore, the area under the curve (AUC) and 95% confidence interval (CI) for the receiver-operating characteristic (ROC) analysis was 0.919 (95% CI: 0.856~0.983) and 0.901 (95% CI: 0.814~0.988), suggesting that the levels of miR-24 have high diagnostic values in distinguishing between DM+CHD and non-DM+CHD, or DM+CHD and CHD. **Conclu-**

[收稿日期] 2017-09-01

[修回日期] 2017-10-10

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81172050, 81570263); 国家级大学生创新创业训练计划项目(201710632043); 四川省教育厅重点项目(16ZA0178); 泸州市科技局项目(2017LZXNYD-T05, 2016LZXNYD-J24, 2016-R-70(11/24, 8/24))资助

[作者简介] 方丹, 硕士研究生, 讲师, 研究方向为糖尿病周围血管病变, E-mail 为 fangdan198301@163.com。通讯作者罗茂, 博士, 副研究员, 硕士研究生导师, 研究方向为糖尿病血管病变, E-mail 为 wujlab@163.com。

**sions** Serum circulating miR-24 was significantly decreased in patients with DM+CHD that had high clinical diagnostic value, indicating that miR-24 could be a potential biomarker for predicting diabetes mellitus with coronary heart disease.

糖尿病合并血管性疾病是糖尿病主要并发症,已严重威胁人类生命和健康。研究表明,糖尿病患者冠心病的发生率是非糖尿病患者的2~4倍<sup>[1-2]</sup>。与单纯冠心病(coronary heart disease, CHD)患者相比,糖尿病合并冠心病(type2 diabetes combined with coronary heart disease, DM+CHD)患者冠状动脉病变更加弥漫和严重。几丁质酶3样蛋白1(chitinase-3-like-1 protein, YKL-40)是一个新近发现的炎症标志物,其化学本质即人软骨糖蛋白39(HC-gp39)甲壳酶3样蛋白质1。目前,已有多项研究发现循环YKL-40可能是重要的炎症反应标志物<sup>[3-5]</sup>。微小RNA(microRNA, miRNA)是一类内源性的、18~25个碱基长度的小分子非编码RNA,在人体生命活动中具有广泛的调控作用<sup>[6-7]</sup>。近年来,部分研究显示循环miRNA(如血清、血浆等)异常表达与人体疾病的发生、发展密切相关,提示部分循环miRNA可作为部分疾病临床早期诊断及预后评估分子标志物<sup>[6-10]</sup>。自2001年首次发现miR-24以来,大量研究表明miR-24参与多种细胞生长及凋亡的调控作用,在心血管类疾病及肿瘤发生发展中扮演着重要调控角色。最近研究显示,病理生理条件下循环血液中存在异常表达miR-24,与血管炎症反应密切相关<sup>[8-10]</sup>。研究表明,糖尿病血清中存在大量miR-24<sup>[11-12]</sup>,血清miR-24是否能够通过靶向YKL-40 mRNA和蛋白表达,从而在CHD特别是DM+CHD患者临床诊断中发挥重要作用,仍有待深入研究。综合提示,研究血清miR-24和YKL-40在CHD特别是DM+CHD患者中的表达及临床意义,将有助于为DM+CHD患者筛查特异临床诊断标志物。

## 1 资料和方法

### 1.1 研究对象

研究对象选取因胸闷、胸痛等原因于我校附属医院行冠状动脉造影术的患者72例,其中确诊的61例患者根据冠状动脉造影结果、患者病史及糖尿病诊断标准分为:(1)单纯冠心病组(CHD组,34例),冠状动脉造影结果显示至少1支冠状动脉管腔直径狭窄>50%,其中男性18例,女性16例,平均年龄(60.9±5.3)岁;(2)糖尿病合并冠心病组(DM+CHD组,27例),冠状动脉造影结果显示至少1支冠

状动脉管腔直径狭窄>50%,且根据2010年新版《中国2型糖尿病防治指南》诊断为2型糖尿病[葡萄糖耐量试验(oral glucose tolerance test, OGTT):空腹血糖≥7 mmol/L(126 mg/dL),2 h口服葡萄糖耐量测试血糖≥11.1 mmol/L(200 mg/dL)],其中男性17例,女性10例,平均年龄(64.5±6.5)岁;(3)同期选取因不明原因胸闷、经常规检查无异常且冠状动脉造影阴性的人群作为对照组(32例),其中男性17例,女性15例,平均年龄(58.6±8.1)岁。排除标准:血液系统疾病、急慢性感染性疾病、甲状腺疾病、急慢性肝肾功能不全、自身免疫性疾病、恶性肿瘤及心功能不全等能影响YKL-40水平的情况。本研究所有入组者均遵循自愿参加原则,签署知情同意书,并经过我校及附属医院伦理委员会批准。

### 1.2 试剂与仪器

YKL-40 ELISA试剂盒(R&D公司); PrimeScript™ RT reagent kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)试剂盒(TaKaRa); Mir-X™ miRNA first-strand synthesis和SYBR® RT-qPCR试剂盒(Clontech); Trizol、DL2000、1 kb DNA Ladder Marker和2×Taq PCR Master Mix等(TaKaRa);其它试剂均为进口产品或国产分析纯产品。吸头、离心管等经0.1% DEPC-H<sub>2</sub>O浸泡24 h后高温灭菌、50℃烘干备用。CFX96荧光定量PCR仪(Bio-Rad);多功能酶标仪(SpectraMax M3);高速冷冻离心机(Eppendorf Centrifuge 5804R);自动凝胶成像系统 Gel DocXR+、ND-1000微量紫外可见分光光度计(美国NanoDrop公司);超净工作台(SW-CJ);-80℃超低温冰箱(Thermo)。PCR引物由Invitrogen公司合成。

### 1.3 资料收集及生化指标测定

收集入选患者的临床资料,包括年龄、性别、吸烟史、家族史、高血压病史等。测量研究对象身高、体重、收缩压(systolic blood pressure, SBP)及舒张压(diastolic blood pressure, DBP),计算体重指数(body mass index, BMI)。清晨采集空腹静脉血,3000 r/min离心15 min分离血清,1.5 mL EP分装保存于-80℃冰箱备用。并且,所有病例均测定空腹血糖(fasting plasma glucose, FPG)、糖化血红蛋白(hemoglobin A1c, HbA1c)、甘油三酯(triglyceride, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol,

LDLC)、高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDLC) 等生化指标。并进行口服葡萄糖耐量试验。

#### 1.4 冠状动脉造影及病变程度判断

根据冠状动脉造影结果,采用 Gensini 评分标准评价冠状动脉病变程度。冠状动脉狭窄程度  $\leq 25\%$  定义为 1 分,  $25\% \sim 49\%$  定义为 2 分,  $50\% \sim 74\%$  定义为 4 分,  $75\% \sim 89\%$  定义为 8 分,  $90\% \sim 99\%$  定义为 16 分,  $100\%$  定义为 32 分。不同节段冠状动脉评分系数严格按照 Gensini 标准执行,每例患者冠状动脉病变狭窄程度的最终积分为各主要分支的积分之和。

#### 1.5 miR-24 靶基因的预测

应用在线软件 miRBase<sup>[13]</sup> (<http://www.mirbase.org/>) 获得 miR-24 的基本信息,结合 miWalk<sup>[14]</sup> (<http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/>)、TargetScan 6.2<sup>[15]</sup> (<http://www.targetscan.org/>) 和 PicTar<sup>[16]</sup> (<http://www.pictar.org/>) 靶基因预测结果,分析其中交集结果并提交 miTarbas<sup>[17]</sup> (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/>) 与已证实靶基因比对,结合已有文献报道<sup>[8-10]</sup>,查明 miR-24 与 YKL-40 mRNA 存在靶向结合位点。本研究组前期已通过双荧光素酶报告基因报告系统证实 miR-24 可直接与 YKL-40 mRNA 3'-UTR 区结合,从而靶向调控 YKL-40 的表达<sup>[9]</sup>。

#### 1.6 荧光定量 PCR 检测血清 miR-24 和 YKL-40 mRNA 的表达水平

将冻存储备用的血清样本每份取 400  $\mu\text{L}$ ,严格按照 Trizol 试剂盒 (Invitrogen) 说明书提取总 RNA,利用 NANODrop 1000 测定总 RNA 浓度和纯度, DNA 变性凝胶电泳检测 RNA 完整性。结合茎环 (Stem-loop) RT 引物和 Mir-X<sup>TM</sup> miRNA first-strand synthesis and SYBR<sup>®</sup> qRT-PCR 试剂盒制备 miR-24 cDNA 模板, PrimeScript<sup>TM</sup> RT reagent kit with gDNA eraser (Perfect Real Time) 试剂盒制备靶标 cDNA 模板。分别以 U6 和 18S rRNA 为内参,应用 Stem-loop qRT-PCR 检测血清 miR-24 表达, qRT-PCR 检测血清靶标 YKL-40 mRNA 表达。应用 SYBR Premix Ex Taq II (TaKaRa) 进行 qPCR 检测。扩展条件为 95 $^{\circ}\text{C}$  预变性 10 min; 95 $^{\circ}\text{C}$  变性 5 s, 50~60 $^{\circ}\text{C}$  复性 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 s, 共进行 40 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 2 min 后, 60~95 $^{\circ}\text{C}$  绘制融解曲线。应用  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  法计算 miR-24 和靶标 YKL-40 mRNA 水平, 设置 6 个复孔, 引物序列如表 1 所示。

#### 1.7 YKL-40 蛋白水平检测

采用酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测血清 YKL-40 蛋白水平, 试剂盒购自 R&D 公司, 操作步骤参照说明书进行。每个样品均设置 6 个复孔, 最后记录 450 nm 的 OD 值, 用于绘制标准曲线和计算待测样品水平。

表 1. 引物列表

Table 1. The sequences of primers used in the study

引物名称	引物序列
miR-24 茎环 RT 引物	5'-CTCAACTGGTGTCTGGAGTTCG-GCAATTCAGTTGCTGCTGA-3'
miR-24 上游引物	5'-ACACTCCAGCTGGGTGGCTCAGT-TCAGCAGG-3'
miR-24 下游引物	5'-CTCAACTGGTGTCTGGGA -3'
U6 上游引物	5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3'
U6 下游引物	5'-AACGCTTCACGAATTTGCCGT-3'
YKL-40 上游引物	5'-TGCCCTTGACCCTCCTCTGTACC-3'
YKL-40 下游引物	5'-GAGCGTCACATCATTCCACTC -3'
18S rRNA 上游引物	5'-CCTGGATACCGCAGCTAGGA-3'
18S rRNA 下游引物	5'-GCGGCGCAATACGAATGCCCC-3'

#### 1.8 统计学分析

采用 SPSS 16.0 统计软件进行数据统计, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组间数据的对比使用独立样本 *t* 检验。多组间比较采用单因素方差分析, 以  $P < 0.05$  为差异有显著性。miR-24 在 DM+CHD 中的诊断价值采用 ROC 曲线来描述。

## 2 结果

### 2.1 研究对象临床资料比较

各组间年龄、性别、高血压病史、BMI、SBP、血脂指标 (TC、LDLC、HDLC) 的差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。与对照组和单纯 CHD 组比较, DM+CHD 组患者的吸烟比例、DBP、FPG、2 hPG、TG 和 HbA1c 水平均显著升高 ( $P < 0.05$ ); 单纯 CHD 组与对照组比较, 吸烟比例、DBP 和 HbA1c 水平明显增高, FPG、2hPG 水平无显著性差异。DM + CHD 组 Gensini 评分显著高于单纯 CHD 组 ( $P < 0.05$ ), 提示 DM+CHD 组冠状动脉病变程度比单纯 CHD 组更严重 (表 2)。

### 2.2 靶基因预测与血清 miR-24 水平的变化

应用在线软件 miRBase<sup>[13]</sup> 获得 miR-24 基本信息, 结合 miWalk<sup>[14]</sup>、TargetScan6.2<sup>[15]</sup> 和 PicTar<sup>[16]</sup> 进

行在线靶基因预测,预测结果提交 miTarbas<sup>[17]</sup>与已证实靶基因比对,并结合已有文献报道,结果显示存在 miR-24 与 YKL-40 mRNA 3'-UTR 区的靶向结合位点,本研究组前期发表成果<sup>[9]</sup>已通过双荧光素酶报告基因报告系统证实 miR-24 可直接与 YKL-40 mRNA 3'-UTR 区结合,从而靶向调控 YKL-40 的表达<sup>[9]</sup>。

表 2. 各组一般临床资料比较

Table 2. Comparison of general clinical data among three groups ( $\bar{x}\pm s$ )

临床指标	对照组 (n=32)	单纯 CHD 组 (n=34)	DM+CHD 组 (n=27)
男性[例(%)]	17(53.1)	18(52.9)	17(62.9)
年龄(岁)	58.6±8.1	60.9±5.3	64.5±6.5
高血压史[例(%)]	17(53.1)	17(50.0)	16(59.2)
吸烟史[例(%)]	10(31.3)	15(44.1) <sup>a</sup>	13(48.1) <sup>ab</sup>
BMI/(kg/m <sup>2</sup> )	24.85±2.96	24.32±3.05	23.56±2.35
TG(mmol/L)	1.23±0.55	1.62±1.35	1.96±1.56 <sup>ab</sup>
TC(mmol/L)	4.12±0.75	4.16±0.80	4.26±1.12
LDLC(mmol/L)	2.35±0.86	2.46±1.05	2.55±1.10
HDLc(mmol/L)	1.10±0.28	1.05±0.25	1.01±0.30
FPG(mmol/L)	5.02±0.78	5.73±1.95	8.26±3.63 <sup>ab</sup>
2hPG(mmol/L)	7.86±1.55	8.95±3.20	13.35±5.45 <sup>ab</sup>
SBP(mmHg)	125.30±14.56	132.80±15.45	134.65±14.96
DBP(mmHg)	78.30±9.20	81.50±7.20 <sup>a</sup>	82.90±10.4 <sup>ab</sup>
HbA1c(%)	5.92±0.63	6.34±0.75 <sup>a</sup>	8.85±1.36 <sup>ab</sup>
Gensini 评分	0	47.80±9.66 <sup>a</sup>	65.30±9.82 <sup>ab</sup>

a 为  $P<0.05$ ,与对照组比较;b 为  $P<0.05$ ,与单纯 CHD 组比较。

进一步的 stem-loop qRT-PCR 检测结果表明,与对照组和单纯 CHD 组比较,DM+CHD 组血清 miR-24 水平呈明显下降趋势,差异有显著性 ( $P<0.05$ );单纯 CHD 组血清 miR-24 水平较对照组显著降低 ( $P<0.05$ ),提示 miR-24 下调与冠状动脉病变程度密切相关,其中 DM+CHD 组患者血清 miR-24 含量最低(图 1)。

### 2.3 血清 YKL-40 mRNA 和蛋白水平

应用 qRT-PCR 和 ELISA 方法分别检测血清 YKL-40 mRNA 和蛋白水平,结果表明,与对照组和单纯 CHD 组比较,DM+CHD 组血清 YKL-40 mRNA 和蛋白水平呈显著增加趋势,差异有显著性 ( $P<0.05$ )。另外,单纯 CHD 组血清 YKL-40 mRNA 和蛋白水平较对照组明显升高 ( $P<0.05$ ),提示 YKL-40 水平升高与冠状动脉病变程度密切相关,其中 DM+CHD 患者血清 YKL-40 水平最高(图 2)。

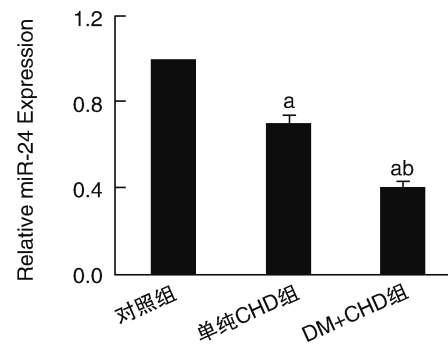


图 1. 各组血清中 miR-24 水平 a 为  $P<0.05$ ,与对照组比较;b 为  $P<0.05$ ,与单纯 CHD 组比较。

Figure 1. The levels of serum miR-24 among three groups

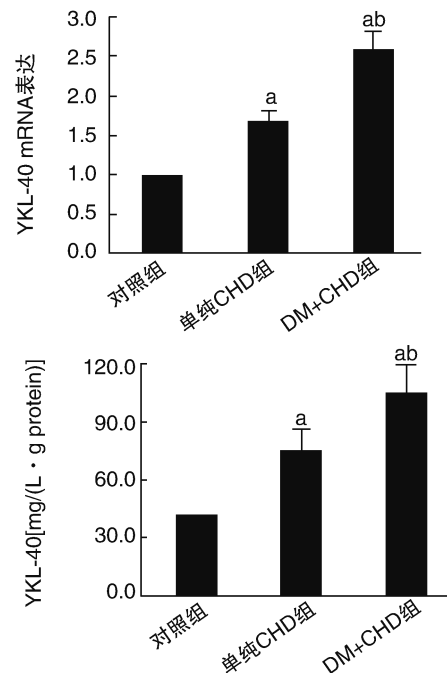


图 2. 各组血清中 YKL-40 水平 a 为  $P<0.05$ ,与对照组比较;b 为  $P<0.05$ ,与单纯 CHD 组比较。

Figure 2. The levels of serum YKL-40 among three groups

### 2.4 miR-24 对糖尿病合并冠心病的临床诊断价值

ROC 曲线发现,血清 miR-24 水平变化可以非常明显地将 DM+CHD 组与对照组和单纯 CHD 组区分,其 ROC 曲线下面积(AUC)及其 95%可信区间(CI)为 0.919 (95% CI: 0.856 ~ 0.983),临界值为 1.543(图 3A);另外,我们对入选的单纯 CHD 组和 DM+CHD 组患者单独进行 ROC 分析,结果显示 miR-24 变化同样可以明显区分 DM+CHD 组和单纯 CHD 组,其 ROC 曲线下面积(AUC)及其 95%CI 为 0.901 (95% CI: 0.814 ~ 0.988),临界值为 1.35(图 3B)。一般认为  $AUC \leq 0.7$  表示诊断价值较低; $0.7 <$

AUC $\leq$ 0.9 表示诊断价值中等。AUC $>$ 0.9 表示诊断价值较高。所以,我们的分析结果表明 miR-24 变化

对鉴别 DM+CHD 患者人群具有高度敏感性和特异性,诊断价值较高。

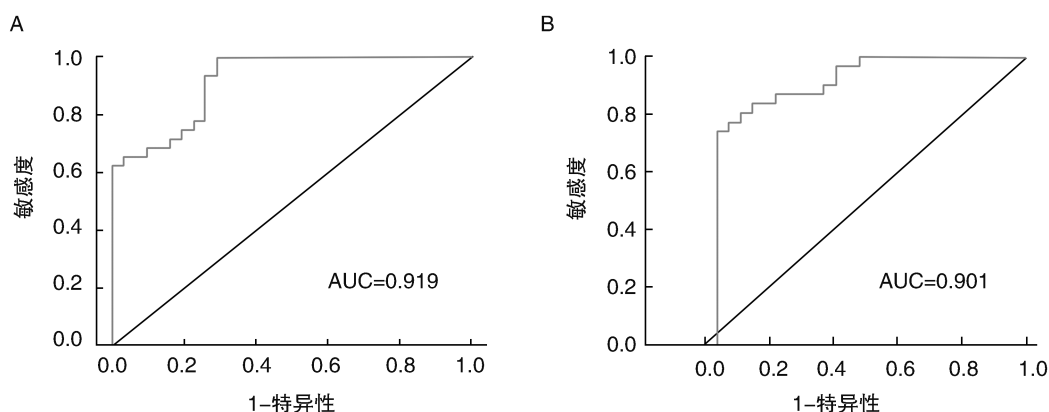


图 3. 血清 miR-24 诊断糖尿病合并冠心病的 ROC 曲线

A 为血清 miR-24 诊断糖尿病合并冠心病患者;B 为血清 miR-24 诊断冠心病中糖尿病患者。

Figure 3. ROC curves analysis for discrimination DM+CHD by serum miR-24

### 3 讨论

冠心病与糖尿病关系密切,其中临床性炎症反应是冠心病和糖尿病的共同病理基础。研究显示,冠心病患者易发生不同程度的糖调节受损,并且糖尿病患者糖脂代谢紊乱和血压异常,引发持续的低度炎症反应,进而导致并发冠心病机率较高<sup>[1-2]</sup>。研究显示,高糖环境导致的血管内皮细胞功能障碍、糖基化终末期产物增多、血小板功能异常、氧化应激反应加剧是促使糖尿病患者并发冠心病的主要诱因<sup>[18]</sup>。

近来研究揭示,YKL-40 作为新发现的重要急性或慢性炎症反应标志物,其表达升高与糖尿病患者心血管疾病死亡事件发生密切相关,提示 YKL-40 可作为糖尿病合并心血管疾病发生的独立预测因子<sup>[3-5]</sup>。目前,已有多项研究发现循环 YKL-40 是潜在的 CHD 临床诊断标志物,YKL-40 在动脉粥样硬化斑块的血管平滑肌和巨噬细胞中有较高的表达<sup>[19]</sup>,提示 YKL-40 与内皮细胞功能障碍有关,推测其可能与动脉粥样硬化进程密切相关,例如急性心肌梗死患者血清 YKL-40 水平较慢性稳定型心绞痛患者显著增加,提示不稳定的斑块形成与 YKL-40 水平变化密切相关<sup>[20]</sup>。另外,糖尿病患者血液中也存在高水平 YKL-40,同时 DM+CHD 患者动脉硬化斑块中 YKL-40 含量显著增高,推测循环 YKL-40 与糖尿病并发冠心病发生密切相关<sup>[21]</sup>。然而,YKL-40 参与炎症反应的研究尚少,临床发病机制仍不清楚。本研究发现 DM+CHD 患者血清 YKL-40 mRNA

和蛋白水平较单纯 CHD 组和对照组均显著升高,同时单纯 CHD 患者血清 YKL-40 水平较对照组显著升高,提示 YKL-40 不仅是潜在的 CHD 临床诊断标志物,更可能是极佳的 DM+CHD 临床诊断标志物,并且 DM+CHD 患者冠状动脉病变与炎症水平更加严重,提示 YKL-40 也可作为 DM+CHD 患者病情及预后水平的监测指标。

循环 miRNA (如血清、血浆等)异常表达与糖尿病或心血管类疾病的发生、发展密切相关,部分循环 miRNA 可作为糖尿病或心血管类疾病早期诊断、治疗和预后标志物,心血管疾病临床循环 miRNA 诊疗标志物的筛查与挖掘已成为当前临床研究的前沿和热点<sup>[6-10,22-23]</sup>。miR-24 在多种疾病异常表达,参与对多种细胞的生长、凋亡、分化和增殖的调节作用,在肿瘤、炎症以及心血管类疾病的发生发展中扮演着重要调控角色。同时,已有报道证实循环 miR-24 参与了糖尿病病理进程,例如,Xiang 等<sup>[8]</sup>研究表明糖尿病患者血浆 miR-24 水平显著降低,研究指出高血糖是显著诱导 miR-24 变化的主要原因。Dai 等<sup>[12]</sup>和 Lirun 等<sup>[11]</sup>研究均发现 2 型糖尿病患者血清存在低水平 miR-24。Deng 等<sup>[9]</sup>研究发现糖尿病合并冠心病患者血浆 miR-24 呈下调变化趋势并且靶向调控 YKL-40。综合上述提示,糖尿病状态下循环(血清、血浆)miR-24 含量降低可能是糖尿病患者并发冠心病的危险因素之一。本研究发现与对照组和单纯 CHD 组比较,DM+CHD 组血清 miR-24 含量呈明显下降趋势;另外,单纯 CHD 组血清 miR-24 表达较对照组显著降低( $P<0.05$ ),提示 miR-24

含量下降与冠状动脉病变炎症水平密切关联,其中DM+CHD患者血清 miR-24 含量最低。

研究表明,不稳定性动脉粥样硬化斑块中存在高水平 YKL-40 和低水平 miR-24,部分研究证实 miR-24 能够靶向调控 YKL-40,推测 miR-24 和 YKL-40 可能与部分疾病病理生理状况具有一定相关性<sup>[8-10]</sup>。据此,本研究进一步评价血清 miR-24 的诊断意义。ROC 曲线显示,miR-24 在 DM+CHD 组与非 DM+CHD 组之间的鉴别诊断价值较高,其 ROC 曲线下面积(AUC)及其 95%CI 为 0.919(95%CI: 0.856~0.983),临界值为 1.543;同时,miR-24 在 DM+CHD 组与单纯 CHD 组之间的鉴别诊断价值也较高,其 ROC 曲线下面积(AUC)及其 95%CI 为 0.901(95%CI:0.814~0.988),临界值为 1.35。结果表明血清 miR-24 对 DM+CHD 具有较高的诊断价值。我们认为血清 miR-24 有潜力运用于 DM+CHD 疾病的早期筛查、诊断、预后评价等。

综上所述,血清 miR-24 含量降低有可能成为糖尿病合并冠心病发生发展过程中一个重要的生物预警,对糖尿病合并冠心病发作的早期诊断和预防有一定指示作用,其具体作用仍需扩大临床样本量,更进一步研究血清 miR-24 变化差异在疾病发生中的具体调控机制。

#### [参考文献]

- Zellweger MJ, Haaf P, Maraun M, et al. Predictors and prognostic impact of silent coronary artery disease in asymptomatic high-risk patients with diabetes mellitus [J]. *Int J Cardiol*, 2017, 244: 37-42.
- Pols AD, van Dijk SE, Bosmans JE, et al. Effectiveness of a stepped-care intervention to prevent major depression in patients with type 2 diabetes mellitus and/or coronary heart disease and sub-threshold depression: a pragmatic cluster randomized controlled trial [J]. *PLoS One*, 2017, 12(8): e0181023.
- Salomon J, Matusiak L, Nowicka-Suszko D, et al. Chitinase-3-like protein 1 (ykl-40) reflects the severity of symptoms in atopic dermatitis [J]. *J Immunol Res*, 2017, 2017: 5746031.
- Kucur M, Isman FK, Karadag B, et al. Serum YKL-40 levels in patients with coronary artery disease [J]. *Coron Artery Dis*, 2007, 18(5): 391-396.
- Lin CH, Li HY, Jiang YD, et al. Plasma YKL-40 predicts 10-year cardiovascular and all-cause mortality in individuals with type 2 diabetes [J]. *Clin Endocrinol*, 2013, 79(2): 185-191.
- Raffort J, Hinault C, Dumortier O, et al. Circulating microRNAs and diabetes: potential applications in medical practice [J]. *Diabetologia*, 2015, 58(9): 1 978-992.
- Ahlin F, Arfvidsson J, Vargas KG, et al. MicroRNAs as circulating biomarkers in acute coronary syndromes: a review [J]. *Vascul Pharmacol*, 2016, 81: 15-21.
- Xiang Y, Cheng J, Wang D, et al. Hyperglycemia repression of miR-24 coordinately upregulates endothelial cell expression and secretion of von Willebrand factor [J]. *Blood*, 2015, 125(22): 3 377-387.
- Deng X, Liu Y, Luo M, et al. Circulating miRNA-24 and its target YKL-40 as potential biomarkers in patients with coronary heart disease and type 2 diabetes mellitus [J]. *Oncotarget*, 2017, 1: 1-9.
- Maegdefessel L, Spin J M, Raaz U, et al. miR-24 limits aortic vascular inflammation and murine abdominal aneurysm development [J]. *Nat Commun*, 2014, 5: 5 214.
- Lirun K, Sewe M, Yong W. A pilot study: the effect of roux-en-y gastric bypass on the serum micrnas of the type 2 diabetes patient [J]. *Obes Surg*, 2015, 25(12): 2 386-392.
- Dai X, Pang W, Zhou Y, et al. Altered profile of serum microRNAs in pancreatic cancer-associated new-onset diabetes mellitus [J]. *J Diabetes*, 2016, 8(3): 422-433.
- Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, et al. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature [J]. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(suppl 1): D140-D144.
- Dweep H, Sticht C, Pandey P, et al. miRWalk--database: prediction of possible miRNA binding sites by "walking" the genes of three genomes [J]. *J Biomed Inform*, 2011, 44(5): 839-847.
- Lewis BP, Burge CB, Bartel DP, et al. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets [J]. *Cell*, 2005, 120(1): 15-20.
- Chen K, Rajewsky N. Natural selection on human microRNA binding sites inferred from SNP data [J]. *Nat Genet*, 2006, 38(12): 1 452-456.
- Chou CH, Chang NW, Shrestha S, et al. miRTarBase 2016: updates to the experimentally validated miRNA-target interactions database [J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(D1): D239-247.
- Vanessa Fiorentino T, Prioleta A, Zuo P, et al. Hyperglycemia-induced oxidative stress and its role in diabetes mellitus related cardiovascular diseases [J]. *Curr Pharm Des*, 2013, 19(32): 5 695-703.
- Rathcke CN, Vestergaard H. YKL-40, a new inflammatory marker with relation to insulin resistance and with a role in endothelial dysfunction and atherosclerosis [J]. *Inflamm Res*, 2006, 55(6): 221-227.
- Kastrup J, Johansen JS, Winkel P, et al. High serum YKL-40 concentration is associated with cardiovascular and all-cause mortality in patients with stable coronary artery disease [J]. *Eur Heart J*, 2009, 30(9): 1 066-072.
- Michelsen A E, Rathcke C N, Skjelland M, et al. Increased YKL-40 expression in patients with carotid atherosclerosis [J]. *Atherosclerosis*, 2010, 211(2): 589-595.
- 何雪梅, 王雪琴, 杜超, 等. miR-4463 在下肢动脉硬化闭塞症中的表达及意义 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2017, 25(8): 812-817.
- Orlicka-Plocka M, Gurda D, Fedoruk-Wyszomirska A, et al. Circulating microRNAs in Cardiovascular Diseases [J]. *Acta Biochim Pol*, 2016, 63(4): 725-729.

(此文编辑 许雪梅)