[文章编号]　1007-3949(2019)27-05-0421-05　·临床研究·

血浆 miRNA-21 作为急性主动脉夹层分子标记物的初步探索

刘银河[1,2]，杨建安[3]，杨　璐[3]，邓阳欢[3]，张　锐[3]

(1. 深圳市孙逸仙心血管医院检验科；2. 深圳大学医学部；3. 深圳市孙逸仙心血管医院外科，广东省深圳市 518057)

[关键词]　主动脉夹层；　miR-21；　分子标记物；　血浆

[摘　要]　**目的**　通过急性主动脉夹层(AAD)病例对照研究分析血浆 miR-21 的相对表达水平，结合受试者工作曲线(ROC)及相关临床资料评估 miR-21 对 AAD 的诊断价值。**方法**　收集华南地区汉族人群 AAD 30 例、心绞痛 30 例、急性心肌梗死(AMI) 29 例及对照组 29 例样本，同时对各组样本的相关临床资料进行收集。通过实时荧光定量反转录聚合酶联反应分别检测各组血浆 miR-21 及内参基因 miR-16 表达水平，计算 miR-21 的相对表达量。**结果**　与对照组比较，AAD 组患者血浆 miR-21 的相对表达水平显著升高($P<0.05$)。心绞痛组、AMI 组与 AAD 组比较，血浆 miR-21 的表达水平差异无统计学意义($P>0.05$)。ROC 曲线分析显示曲线下面积(AUC)为 0.664，95% 置信区间为 0.520～0.809，血浆 miR-21 对 AAD 诊断的敏感度为 40%，特异度为 96.6%。当 miR-21 相对表达量为 0.034 时，血浆 miR-21 对 AAD 诊断的敏感度为 80%，特异度为 20.7%。**结论**　血浆 miR-21 检测对 AAD 的诊断具有一定的临床价值，但尚不足以支持其独立作为 AAD 理想的分子诊断标志物。

[中图分类号]　R446；R54　　[文献标识码]　A

Exploration of plasma miRNA-21 as a molecular marker for acute aortic dissection

LIU Yinhe[1,2], YANG Jian'an[3], YANG Lu[3], DENG Yanghuan[3], ZHANG Rui[3]

(1. *Department of Laboratory Medicine, Sun Yat-sen Cardiovascular Hospital*; 2. *Shenzhen University Health Science Center*; 3. *Department of Cardiac Surgery, Sun Yat-sen Cardiovascular Hospital, Shenzhen, Guangdong* 518057, *China*)

[**KEY WORDS**]　aortic dissection;　miR-21;　molecular marker;　plasma

[**ABSTRACT**]　**Aim**　Detection of relative expression levels of plasma miR-21 by a case-control study of acute aortic dissection (AAD), combined with receiver operating curve (ROC) and related clinical data to evaluate the diagnostic value of miR-21 for AAD.　**Methods**　30 samples of AAD patients, 30 samples of angina patients, 29 patients with acute myocardial infarction (AMI) and 29 patients in the control group, clinical data of each group were also collected. The plasma levels of miR-21 and housekeeping gene miR-16 in each group were identified by quantitative reverse transcriptase polymerase amplification reaction, and the relative expression of miR-21 was calculated.　**Results**　Compared with the control group, the relative expression level of miR-21 in plasma of AAD group were significantly increased ($P<0.05$). There was no significant difference in plasma miR-21 expression between angina pectoralis group vs AAD group and AMI group vs AAD group ($P>0.05$). ROC curve analysis showed that the area under the curve (AUC) was 0.664. The 95% confidence interval was 0.520～0.809, and the sensitivity of plasma miR-21 to AAD diagnosis was 40%, and the specificity was 96.6%. When the comparative expression of miR-21 was 0.034, the sensitivity of plasma miR-21 to AAD diagnosis was 80%, and the specificity was 20.7%.　**Conclusion**　The detection of plasma miR-21 has definite clinical value for the diagnosis of AAD, but it is not enough to support miR-21 as an ideal molecular diagnostic marker for AAD.

主动脉夹层 (aortic dissection，AD) 是一种在疾病早期及远期都具有高死亡率的危重疾病，多在春季和冬季发病。欧美国家 AD 的年发病率约为(2.6～6.0)/100 000，中国大陆地区尚无相关流行病学

[收稿日期]　2018-10-17　　[修回日期]　2019-01-29

[基金项目]　广东省医学科学技术研究基金项目(B2015001)；深圳市心脏大血管外科医学工程技术研究开发中心项目(GCZX2015060416090402)

[作者简介]　刘银河，硕士，主管技师，研究方向为主动脉夹层相关分子机制，E-mail 为 lanselehe@163.com。通信作者杨建安，硕士，主任医师，硕士研究生导师，研究方向为主动脉夹层分子机制及临床应用，E-mail 为 yangjianan@hotmail.com。

调查结果,但有研究表明,近年来中国 AD 的发病率呈上升趋势[1]。AD 患者未得到及时治疗,在第 1 个 24 h 内死亡率可达到 24%,48 h 内达到 50%[2],因此,AD 的早期诊断和及时治疗对于患者至关重要。

MicroRNA(miRNA)是一类内源性、非编码小分子 RNA(18 ~ 25 nt),主要作用为抑制靶 mRNA 翻译或诱导靶 mRNA 降解,负性调控靶基因表达[3],从而调控相应蛋白或转录子表达水平。研究发现 miRNA 可以通过外核体、凋亡小体、微泡及 RNA-蛋白结合等形式稳定存在于循环血中[4-7]。循环 miRNA 在病理状态下可显示不同程度的水平,包括心血管疾病,参与疾病过程的调控[8]。既往研究表明,miR-21 不仅对机械生物力敏感,还参与血管平滑肌细胞表型调控[9-12]。本研究通过急性主动脉夹层 (acute aortic dissection, AAD)病例对照研究,分析血浆 miR-21 的相对表达水平,结合受试者工作曲线(ROC)及相关临床资料,评估 miR-21 对 AAD 的诊断价值。

1 资料和方法

1.1 研究对象与分组

收集深圳孙逸仙心血管医院 2015 ~ 2016 年华南汉族人群住院患者样本,分析患者相关的临床资料。本实验已通过伦理委员会批准,实验前依据知情同意原则,告知受试者实验目的及意义,经患者同意后采集标本。收集患者相关临床资料,整理分析。分组情况如下:

AAD 组:经主动脉 CT 血管造影,临床确诊的 Stanford A 型 AAD 患者 30 例,年龄 40 ~ 70 岁,除外其他心血管疾病。入院后采集静脉全血 4 mL。

心绞痛组:经冠状动脉造影或 64 排螺旋 CT 检查冠状动脉分支有狭窄,狭窄程度大于 50%,经运动试验及临床症状确诊者 30 例,入院后采集静脉全血 4 mL。

急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)组:实验室肌钙蛋白检测阳性,心电图显示有急性心肌梗死特征性表现,经超声心动图结合临床典型症状确诊为 AMI 者 29 例,入院后采集静脉全血 4 mL。

对照组:无心血管疾病家族史,既往无胸痛表现,经心血管专科相关检查除外 AD、心绞痛、心肌梗死及肿瘤相关病史的体检志愿者 29 例,采集静脉全血 4 mL。

1.2 样本处理和保存

入院后采集静脉全血 4 mL, EDTA-K2 抗凝,3 000 r/min 离心 5 min,将上清液分别移至 2 mL 离心管并标记。使用低温离心机分段离心,将上清液行 820 g、4℃、15 min 离心后再行 16 000 g、4℃、10 min 离心,取上清液 1.0 mL 分装至无 RNA 酶的冻存管并标记,-80℃冰箱保存。

1.3 RNA 的提取和质检

用 Trizol 法提取血浆样本中的总 RNA,经过 total RNA 的沉淀、洗涤与重悬,以分光光度计检测 total RNA 的浓度,用 RNA 在 250 nm 和 280 nm 处的吸收值作为测定浓度,A260/280>1.8 为合格样品,检测完毕将 total RNA 至于-80℃中备用。

1.4 RNA 纯化

使用 mirVana™ miRNA Isolation Kit(AM1561)对 total RNA 进行纯化并重新定量。

1.5 RNA 反转录反应

采用颈环结构的 Megaplex™RNA 反转录引物混合物进行,取 100 ng RNA 样本,加入 1 μL miRNA 特异性茎环反转录引物,添加 Nuclease-Free Water 至 12.3 μL,于 65℃下孵育 5 min,再于冰上放置 2 min,反转录反应使用普洛麦格生物技术有线公司的 RNA 酶抑制剂 N2515,于 PCR 仪上进行,条件分别为 16℃ 10 min;37℃ 30 min;65℃ 5 min,最后将 miRNA 反转录成 cDNA。

1.6 定量 PCR 反应

使用实时定量 PCR 试剂盒(Applied Biosystems, 4367659)进行实时荧光定量 PCR 反应,反应体系为:2×Green PCR Master Mix 10 μL、cDNA 样本 1 μL、无核酸酶水 8 μL、miRNA 特异性上游正义链引物(10 μmol/L)0.5 μL、下游反义链引物(10 μmol/L) 0.5 μL,在实时荧光定量 PCR 仪(Applied Biosystems)上进行扩增反应,反应条件:95℃ 10 min,95℃ 15 s、60℃ 1 min 进行 40 个循环,60℃ ~ 95℃ 温度浮动 2%。以 miR-16 作为内参,通过 $2^{-\Delta Ct}$ 计算每个样本 miR-21 的相对表达量。miR-16 及 miR-21 上下游引物序列见表 1。

1.7 统计学方法

使用 SPSS 25.0 统计软件对数据进行分析,计数资料比较采用 χ^2 检验;计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 t 检验或 Mann-Whitney U 检验。miR-21 的相对表达量以 $2^{-\Delta Ct}$ 值表示($\Delta Ct = Ct_{目的\ miRNA} - Ct_{内参\ miRNA}$),以中位数(四分位间距)表示,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。对检测数据进行 ROC 分析,并计算曲线下面积(AUC)。

表 1. miR-16 及 miR-21 上下游引物序列

Table 1. The upstream and downstream primer sequences of miR-16 and miR-21

Gene		Primer Sequence 5′→3′
hsa-miR-16	RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGG-TATTCGCACTGGATACGACCGCCAA
	AS	GCTTGTAGCAGCACGTAAATATTG
hsa-miR-21	RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGG-TATTCGCACTGGATACGACTCAACA
	AS	ATGAGCCGTTAGCTTATCAGACTG

2　结　果

2.1　一般资料分析

与对照组比较，AAD 组一般临床资料除年龄外，其他均差异无统计学意义（$P>0.05$）。心绞痛组、AMI 组与 AAD 组的年龄比较差异有统计学意义（$P<0.05$），提示 AAD 组发病年龄趋向年轻化，这与临床所见相符合。详见表 2。

表 2. 各组间一般临床资料比较

Table 2. Comparison of general clinical data among groups

临床资料	心绞痛组（$n=30$）	AMI 组（$n=29$）	AAD 组（$n=30$）	对照组（$n=29$）	Value[a]	P^a	Value[b]	P^b	Value[c]	P^c
性别（男/女）	22/8	25/4	25/5	24/5	0.88	0.35	0.09	0.76	0.00	0.95
年龄（岁）	54.50±5.39	53.8±5.7	49.2±9.63	50.79±6.84	2.98	0.00	2.68	0.01	−0.73	0.47
高血压（是/否）	22/8	19/10	23/7	21/8	0.09	0.77	0.89	0.34	0.14	0.71
糖尿病（是/否）	7/23	7/22	4/26	1/28	1.00	0.32	1.14	0.29	1.86	0.17
高血脂（是/否）	15/15	12/17	8/22	6/23	3.46	0.06	1.42	0.23	0.29	0.59
吸烟史（是/否）	16/14	18/11	12/18	12/17	1.07	0.30	2.87	0.09	0.01	0.91
饮酒史（是/否）	3/27	2/27	3/27	4/25	0.00	1.00	0.18	0.67	0.20	0.65

a 为心绞痛组与 AAD 组比较；b 为 AMI 组与 AAD 组比较，c 为 AAD 组与对照组比较。

2.2　miR-21 在各组中的检测结果

miR-21 在 AAD 组、心绞痛组、AMI 组及对照组中的相对表达量分别为 0.05（0.03，0.12）、0.07（0.04，0.15）、0.07（0.04，0.11）及 0.04（0.04，0.05）。miR-21 相对表达量差异倍数各组间两两比较结果见表 3。各组间 miR-21 的相对表达量比较结果见图 1。结果提示，AAD 组与对照组比较差异有显著性（$P<0.05$），其差异倍数为 1.92。而心绞痛组、AMI 组与 AAD 组 3 组间比较差异无统计学意义（$P>0.05$）。

表 3. 各组间 miR-21 相对表达量差异倍数的比较

Table 3. Comparison of the fold change in the relative expression of miR-21 between groups

$2^{-\Delta Ct}$	差异倍数	P 值
AAD 组/对照组	1.92	0.03
心绞痛组/AAD 组	1.25	0.47
AMI 组/AAD 组	1.20	0.68

2.3　血浆 miR-21 浓度的 ROC 曲线分析

对各组血浆 miR-21 相对表达量进行 ROC 分析，miR-21 浓度 ROC 曲线下面积（AUC）为 0.664，95% 置信区间为 0.520～0.809，当 miR-21 相对表达量为 0.065 时，血浆 miR-21 对 AAD 诊断的敏感度为 40%，特异度为 96.6%，当 miR-21 相对表达量为 0.034 时，血浆 miR-21 对 AAD 诊断的敏感度为 80%，特异度为 20.7%（图 2）。

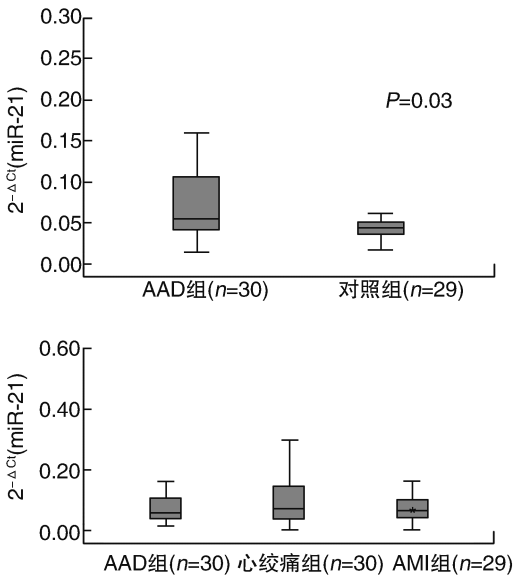

图 1. 各组 miR-21 相对表达量比较

Figure 1. Comparison of miR-21 among groups

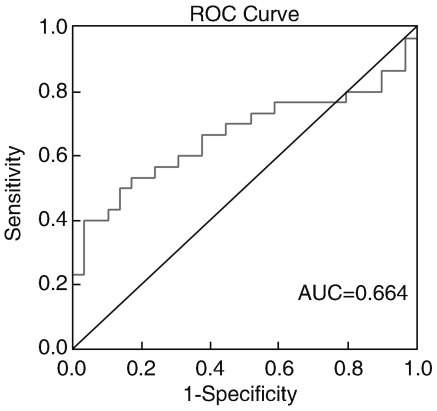

图 2. miR-21 相对表达量的 ROC 曲线分析

Figure 2. The ROC curve analysis of miR-21 relative expression

3 讨 论

主动脉夹层(AD)是一种起病急、进展快、致死率高的极危重疾病。因其临床症状与心肌梗死及其他心血管疾病类似,在早期大约有 25% ~50% 的 AD 患者容易被误诊。在第一个 48 h 内对 AD 作出早期有效诊断及治疗可以大大降低其死亡率[13]。课题组在前期预实验中对华南 AAD 人群使用 miRNA 芯片技术与对照组动脉组织对比发现,miRNA-21 在 AAD 患者中显著升高。miRNA-21 不仅是一种机械生物力敏感的 miRNA,还参与血管平滑肌细胞表型的调控,可调控血管平滑肌细胞和心肌细胞的凋亡。通过小鼠 miR-21 基因敲除研究发现, miR-21 的缺失可引起血管结构及功能方面的重构[14]。miR-21 负性调控靶基因 PTEN、SMAD7 的表达,从而通过 PI3K-Akt 信号通路介导抑制血管内皮细胞的增殖和迁移[15];miR-21 过表达通过调控靶基因 SMAD7 促进 TGF-β1 诱导的心肌成纤维细胞激活作用并促进心肌梗死后的心肌纤维化[16]。血管平滑肌细胞中 TGF-β 信号通路功能失调以及血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)水平升高与胸主动脉夹层的发生密切相关,miR-21 敲除加重了 AngⅡ诱导的小鼠胸主动脉夹层形成,这与 TGF-β 信号传导功能障碍有关, miR-21 可能通过 TGF-β 信号通路参与胸主动脉夹层的发生发展[17]。

本次研究通过对 AAD 组、心绞痛组、AMI 组及对照组 miR-21 血浆水平进行比较,结果显示与对照组比较,AAD 患者血浆 miR-21 的血浆水平显著升高。与 AAD 组比较,心绞痛组、AMI 组血浆 miR-21 血浆水平亦有升高,但差异不具有统计学意义。

MiR-21 在巨噬细胞中表达丰富,通过抑制靶基因 MKK3 的表达,可负性调控 p38-CHOP 和 JNK 信号通路的表达,从而减少巨噬细胞的凋亡,抑制三磷酸结合盒转运体 G1(ATP-binding cassette G1, ABCG1)翻译后降解[18];通过抑制靶基因 RECK 的表达以促进巨噬细胞中 MMP-9 的表达与分泌[19];通过调控炎症程序性细胞死亡蛋白 4(PDCD4),从而增加抗炎因子白细胞介素 10(IL-10)分泌[20]。miR-21 通过靶向过氧化物酶体增殖物激活型受体-α(PPAR-α)3′UTR 直接负向调节 PPARα 的表达增加激活蛋白 1(AP-1)活化,从而促进血管细胞黏附分子(VCAM-1)以及单核细胞趋化蛋白(MCP-1)的表达,诱导循环单核细胞与血管内皮细胞黏附导致血管炎症,进而发展为动脉粥样硬化[21]。AAD、心绞痛及 AMI 多合并动脉粥样硬化。这可能是 AAD、心绞痛及 AMI 患者 miR-21 血浆水平差异无显著性的原因之一,不过仍有待验证。

与对照组比较, AAD 患者血浆 miR-21 的表达量显著升高, miR-21 血浆水平 ROC 曲线下面积(AUC)为 0.664,95% 置信区间为 0.520 ~0.809。当 miR-21 相对表达量水平为 0.065($2^{-\Delta Ct}$ 值)时,血浆 miR-21 对 AAD 诊断的敏感度为 40%,特异度为 96.6%;当 miR-21 相对表达量为 0.034 时,血浆 miR-21 对 AAD 诊断的敏感度为 80%,特异度为 20.7%。分析认为,其一,miR-21 本身具有功能的多样性,其在体内调控多个靶基因,涉及多条信号通路,如细胞增殖、迁移、血管炎症、血管损伤再修复、动脉粥样硬化硬化等,而这些生物机制在主动脉夹层、心绞痛、心肌梗死等心血管疾病发病机制中均有体现。其二,血浆中成分复杂,其中的 miRNA 具体来源不明,可能是疾病的靶基因分泌的,也有可能是非疾病靶器官对疾病产生反应而分泌的,相对于组织样本,血浆样本中的 miRNA 特异性不显著。此次实验数据尚不足以支持 miR-21 独立作为 AAD 理想分子诊断标志物的假设。同时本实验的研究对象夹层组与其他几个心血管疾病组的研究样本量偏小,因此对于研究血浆样本中的 miRNA 的表达量以反应主动脉的诊断及鉴别诊断仍需要大样本的进一步研究。

[参考文献]

[1] 中国医师协会心血管外科分会大血管外科专业委员会. 主动脉夹层诊断与治疗规范中国专家共识[J]. 中华胸心血管外科杂志, 2017, 33(11): 641-654.

[2] Hagan PG, Nienaber CA, Isselbacher EM, et al. The in-

ternational registry of acute aortic dissection (irad): new insights into an old disease[J]. JAMA, 2000, 283(7): 897-903.

[3] Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias[J]. Cell, 2003, 115(2): 209-216.

[4] Eldh M, Ekstrom K, Valadi H, et al. Exosomes communicate protective messages during oxidative stress, possible role of exosomal shuttle RNA[J]. PLoS One, 2010, 5(12): e15353.

[5] Prokopi M, Pula G, Mayr U, et al. Proteomic analysis reveals presence of platelet micro-particles in endothelial progenitor cell cultures[J]. Blood, 2009, 114(3): 723-732.

[6] Zernecke 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.

[7] Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, et al. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins[J]. Nat Cell Biol, 2011, 13(4): 423-433.

[8] Yamakuchi M. MicroRNAs in vascular biology[J]. Int J Vasc Med, 2012: 794898

[9] Thum T, Gross C, Fiedler J, et al. MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts[J]. Nature, 2008, 456(7224): 980-984.

[10] Zhu SB, Zhu J, Zhou ZZ, et al. TGF-β1 induces human aortic vascular smooth muscle cell phenotype switch through PI3K/AKT/ID2 signaling[J]. Am J Transl Res, 2015, 7(12): 2764-2774.

[11] Cheng Y, Liu X, Zhang S, et al. MicroRNA-21 protects against the H_2O_2-induced injury on cardiac myocytes via its target gene PDCD4[J]. J Mol Cell Cardiol, 2009, 47(1): 5-14.

[12] Lin Y, Liu X, Cheng Y, et al. Involvement of MicroRNAs in hydrogen peroxide-mediated gene regulation and cellular injury response in vascular smooth muscle cells[J]. J Biol Chem, 2009, 284(12): 7903-7913.

[13] Xu Z, Wang Q, Pan J, et al. Characterization of serum miRNAs as molecular biomarkers for acute Stanford type A aortic dissection diagnosis[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 13659.

[14] Zhang XY, Shen BR, Zhang YC. et al. Induction of thoracic aortic remodeling by endothelial-specific deletion of microrna-21 in mice[J]. PLoS One, 2013, 8(3): e59002.

[15] Luo M, Tan X, Mu L, et al. MiRNA-21 mediates the antiangiogenic activity of metformin through targeting PTEN and SMAD7 expression and PI3K/AKT pathway[J]. Sci Rep, 2017, 7: 43427.

[16] Yuan J, Chen H, Ge D, et al. Mir-21 promotes cardiac fibrosis after myocardial infarction via targeting smad7[J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 42(6): 2207-2219.

[17] Huang X, Yue Z, Wu J, et al. MicroRNA-21 knockout exacerbates angiotensin ii-induced thoracic aortic aneurysm and dissection in mice with abnormal transforming growth factor-β-SMAD3 signaling[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2018, 38(5): 1086-1101.

[18] Canfrán-Duque A, Rotllan N, Zhang X, et al. Macrophage deficiency of miR-21 promotes apoptosis, plaque necrosis, and vascular inflammation during atherogenesis[J]. EMBO Mol Med, 2017, 9(9): 1244-1262.

[19] Fan X, Wang E, Wang X, et al. MicroRNA-21 is a unique signature associated with coronary plaque instability in humans by regulating matrix metalloproteinase-9 via reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs[J]. Exp Mol Pathol, 2014, 96(2): 242-249.

[20] Sheedy FJ, Palsson-McDermott E, Hennessy EJ, et al. Negative regulation of TLR4 via targeting of the proinflammatory tumor suppressor PDCD4 by the microRNA miR-21[J]. Nat Immunol, 2010, 11(2): 141-147.

[21] Zhou J, Wang KC, Wu W, et al. MicroRNA-21 targets peroxisome proliferators-activated receptor-α in an autoregulatory loop to modulate flow-induced endothelial inflammation[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108(25): 10355-10360.

(此文编辑 朱雯霞)