

LncRNA TUG1 和 miR-138-5p 在慢性心力衰竭患者中的表达及意义

李奎¹, 冯健², 余丹¹, 罗立¹

(1. 宜宾市第二人民医院心内科, 四川省宜宾市 644000; 2. 西南医科大学附属医院心内科, 四川省泸州市 646000)

[关键词] 长链非编码 RNA TUG1; miR-138-5p; 慢性心力衰竭

[摘要] 目的 探讨长链非编码 RNA TUG1 (LncRNA TUG1) 及微小 RNA 138-5p (miR-138-5p) 在慢性心力衰竭患者血浆中的表达及临床意义。方法 采用实时荧光定量 PCR 检测 148 例冠心病合并慢性心力衰竭患者 (CHF 组) 及 40 例健康体检者 (对照组) 血浆 LncRNA TUG1 及 miR-138-5p 的表达, 分析 TUG1 及 miR-138-5p 的表达与患者临床参数之间的相关性。受试者工作特征 (ROC) 曲线分析 TUG1 及 miR-138-5p 对 CHF 早期诊断的潜能。Kaplan Meier 生存分析 TUG1 及 miR-138-5p 对 CHF 2 年生存率的影响。结果 与对照组比较, CHF 组血浆 TUG1 及脑钠肽 (BNP) 的表达明显升高 ($P < 0.001$); 而 miR-138-5p 表达明显降低 ($P < 0.05$)。TUG1 的表达与 CHF 患者血清 BNP 的表达呈正相关 ($r = 0.682, P < 0.001$); 而与 miR-138-5p 的表达及左心室射血分数 (LVEF) 呈负相关关系 ($P < 0.05$)。LncRNA TUG1 作为诊断慢性心力衰竭患者生物标志物的曲线下面积 (AUC) 为 0.868 (95% CI 0.590 ~ 0.960, $P < 0.001$)。miR-138-5p 作为诊断慢性心力衰竭患者生物标志物的曲线下面积 (AUC) 为 0.607 (95% CI 0.620 ~ 0.940, $P < 0.001$)。Kaplan-Meier 法分析发现, 高表达 LncRNA TUG1 患者 2 年中位生存时间短于低表达者 ($\chi^2 = 19.77, P < 0.001$)。高表达 miR-138-5p 患者 2 年中位生存时间长于低表达者 ($\chi^2 = 11.97, P < 0.001$)。结论 慢性心力衰竭患者血浆 LncRNA TUG1 高表达, 与 miR-138-5p 的表达呈负相关, 可作为 CHF 患者早期诊断及预后评估的生物标志物。

[中图分类号] R541.4

[文献标识码] A

Expression and significance of lncRNA TUG1 and miR-138-5p in patients with chronic heart failure

LI Kui¹, FENG Jian², YU Dan¹, LUO Li¹

(1. Department of Cardiology, Yibin Second People's Hospital, Yibin, Sichuan 644000, China; 2. Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China)

[KEY WORDS] long chain non coding RNA TUG1; miR-138-5p; chronic heart failure

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the expression and clinical significance of Long chain non coding RNA TUG1 (LncRNA TUG1) and microRNA 138-5p (miR-138-5p) in plasma of patients with chronic heart failure (CHF).

Methods The expression of LncRNA TUG1 and miR-138-5p in plasma of 148 patients with coronary heart disease complicated with chronic heart failure (CHF group) and 40 healthy persons (control group) were detected by real-time quantitative PCR. The correlation between the expression of TUG1 and miR-138-5p and clinical parameters was analyzed. ROC curves were used to analyze the potential of TUG1 and microRNA-138-5p for early diagnosis of CHF. Kaplan Meier survival analysis was used to analyze the effects of TUG1 and miR-138-5p on the 2-year survival rate of CHF. **Results**

Compared with the control group, the expression of TUG1 and BNP in the plasma of patients with chronic heart failure was significantly higher ($P < 0.001$), while the expression of microRNA-138-5p in the plasma of patients with chronic heart failure was significantly lower ($P < 0.05$). The expression of TUG1 was positively correlated with the expression of BNP in serum of CHF patients ($r = 0.682, P < 0.001$), but negatively correlated with the expression of microRNA-138-5p and left

[收稿日期] 2019-06-02

[修回日期] 2019-08-31

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (31300946)

[作者简介] 李奎, 硕士, 主治医师, 研究方向为心力衰竭的病因及机制, E-mail 为 85291516@qq.com。通信作者冯健, 博士, 副主任医师, 研究方向为冠心病的基础与临床, E-mail 为 jerryfeng@swmu.edu.cn。

ventricular ejection fraction (LVEF) ($P < 0.05$). The area under curve (AUC) of LncRNA TUG1 as a biomarker for the diagnosis of chronic heart failure was 0.868 (95% CI 0.590 ~ 0.960, $P < 0.001$). The area under curve (AUC) of microRNA-138-5p as a biomarker for the diagnosis of chronic heart failure was 0.607 (95% CI 0.620 ~ 0.940, $P < 0.001$). Kaplan-Meier analysis showed that the 2-year median survival time of patients with high expression of LncRNA TUG1 was shorter than that of patients with low expression, and the difference was statistically significant ($\chi^2 = 19.77$, $P < 0.001$). The median 2-year survival time of patients with high expression of microRNA-138-5p was longer than that of patients with low expression, with significant difference ($\chi^2 = 11.97$, $P < 0.001$). The high expression of TUG1 in plasma of patients with chronic heart failure is related to the diagnosis and prognosis of CHF. **Conclusion** The high expression of TUG1 in patients with chronic heart failure is negatively correlated with the expression of miR-138-5p, which can be used as a biomarker for early diagnosis and prognosis evaluation of CHF.

慢性心力衰竭(chronic heart failure, CHF)是各种原因导致的心脏结构和功能的变化,最后导致心室泵血功能低下,是多种心脏疾病的终末阶段,其治疗效果欠佳且死亡率高^[1]。目前临床上缺乏有效的早期诊断及预后评估生物标志物^[2]。长链非编码核糖核酸(long non-coding ribonucleic acid, LncRNA)是一类长度超过 200 nt 的功能性 RNA 分子,不具有蛋白编码功能,早期被认为是 RNA 转录过程中的“噪音”^[3]。但近年来的研究发现,长链非编码 RNA(LncRNA)参与人类多种疾病的发生、发展^[4]。关于 LncRNA 在心力衰竭中作用的研究报道较少^[5], LncRNA 在心血管系统疾病中的具体作用机制目前尚未完全阐明。本课题组前期预实验通过基因芯片发现长链非编码 RNA TUG1 (long non-coding TUG1, LncRNA TUG1)在慢性心力衰竭患者血浆中明显高于对照组,通过基因信息学分析发现 LncRNA TUG1 与 miR-138-5p 之间有相互结合位点(待发表),但其具体机制尚不清楚。本研究旨在研究 LncRNA TUG1 与 miR-138-5p 在慢性心力衰竭中的作用及意义。

1 资料和方法

1.1 研究对象

收集 2015 年 1 月至 2016 年 12 月在本院心血管内科就诊确诊的冠心病合并慢性心力衰竭患者 148 例(CHF 组),所有患者符合慢性心力衰竭的诊断标准^[6]。患者平均年龄(62.27 ± 10.44)岁,其中男 78 例,女 70 例,心功能 I 级 36 例,II 级 38 例,III 级 42 例,IV 级 32 例。常规检测入院时患者血浆 BNP 水平。同时选取 40 例于本院体检的健康者作为对照组,平均年龄(61.95 ± 7.65)岁,其中男 22 例,女 18 例,对照组心电图无异常,超声心动图排除心脏结构和心功能异常。采集慢性心力衰竭患者

及对照组清晨空腹肘静脉血 5 mL,置于抗凝管中室温静置 30 min 后,室温下 3 000 r/min 离心 15 min,留取上层血浆,置于 -80°C 冰箱备用。经本院伦理委员会批准,本研究所有研究者均签署知情同意书。

1.2 Real-time PCR 检测 LncRNA TUG1 的表达水平

采用 TRIZOL (Invitrogen, Grand Island, NY) 方法提取总 RNA。将提取的总 RNA,参照 AMV 反转录试剂盒说明书提供的方法将其反转录成 cDNA。采用 2 \times SYBRTM Green PCR 主混合物,以 cDNA 为模板,进行实时荧光定量 PCR。PCR 反应在 PCR 反应仪上进行。PCR 反应条件:先 95°C 10 min;然后 95°C 15 s, 60°C 30 s, 72°C 30 s 40 个循环。三次独立实验后得到的数据运用公式 $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ 的方法进行分析。

1.3 统计学分析

采用 SPSS17.0 统计学软件进行数据分析。计量资料采用 t 检验或 One-way ANOVA 分析,用 $\bar{x} \pm s$ 表示;LncRNA TUG1 与 BNP 的相关性分析采用线性回归法, LncRNA TUG1 与各临床病理参数之间的关系使用 Chi-Square 检验。ROC 曲线分析 TUG1 和 BNP 预测 CHF 的潜能;采用 Kaplan-Meier 法分析患者的生存时间,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 两组一般资料的比较

两组间性别、年龄、BMI 均无统计学差异($P > 0.05$, 表 1)。

2.2 两组 TUG1、BNP 及 miR-138-5p 表达的比较

与对照组比较,CHF 组血浆 TUG1 及 BNP 的表达明显升高($P < 0.001$);而与对照组比较,CHF 组血浆 miR-138-5p 表达明显降低($P < 0.05$, 图 1)。

表 1. 两组研究对象一般资料的比较

Table 1. General data comparison of two groups of subjects

指标	对照组 (n=40)	CHF 组 (n=148)	P
年龄(岁)	61.95±7.65	62.27±10.44	0.790
男[例(%)]	22(55.00)	78(52.70)	0.796
BMI(kg/m ²)	23.19±4.62	24.33±7.45	0.860
吸烟史[例(%)]	19(47.50)	66(44.59)	0.743
高血压史[例(%)]	31(77.50)	102(68.92)	0.290
糖尿病史[例(%)]	27(67.50)	89(61.34)	0.395
饮酒史[例(%)]	24(60.00)	79(53.38)	0.455

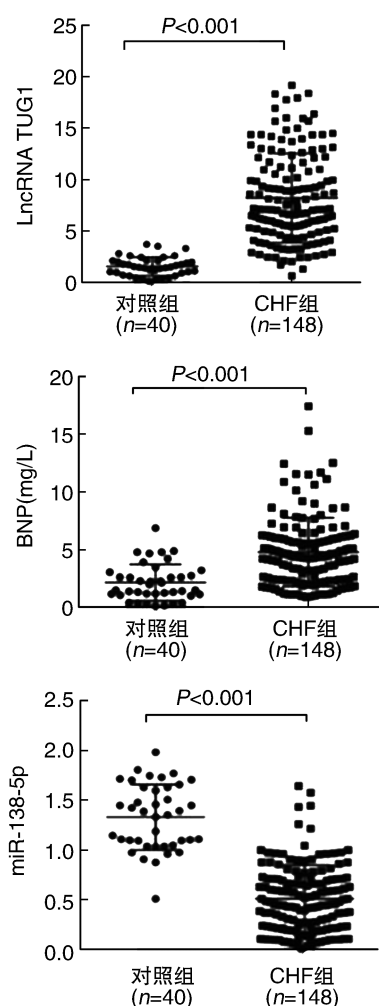


图 1. 两组血浆 TUG1、BNP 及 miR-138-5p 表达的比较

Figure 1. Comparison of the expression of TUG, BNP and miR-138-5p in control and CHF groups

2.3 TUG1 表达与慢性心力衰竭及 miR-138-5p 的相关性

线性相关分析发现,TUG1 的表达与患者血清 BNP 的表达呈正相关($r=0.682, P<0.001$);而与 miR-138-5p 的表达及左心室射血分数(LVEF)呈负

相关(图 2)。

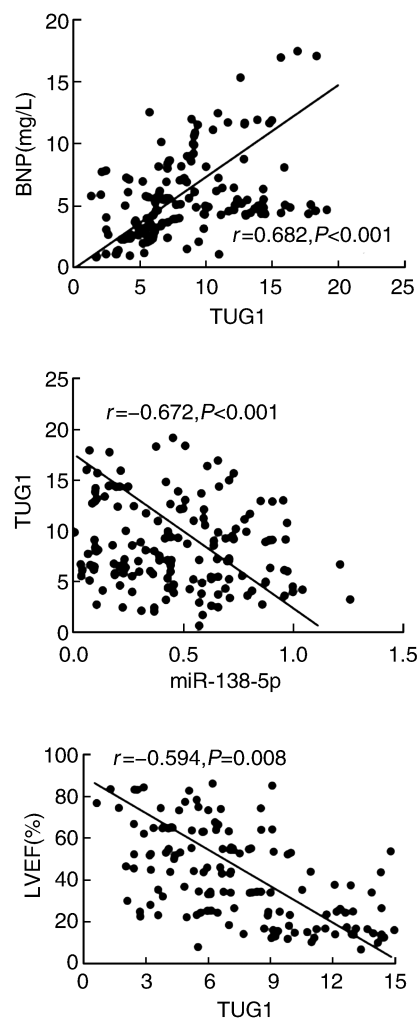


图 2. TUG1 表达与 BNP、miR-138-5p 表达及左心室射血分数的关系

Figure 2. Relationship between plasma TUG1 expression and BNP, miR-138-5p expression and left ventricular ejection fraction

2.4 LncRNA TUG1 及 miR-138-5p 作为 CHF 患者生物标志物的潜能

ROC 曲线分析结果发现,LncRNA TUG1 作为诊断慢性心力衰竭患者生物标志物的曲线下面积(AUC)为 0.868(95% CI 0.590~0.960),最佳 cutoff 值为 8.97,LncRNA TUG1 诊断慢性心力衰竭患者的灵敏度为 83.49%,特异度为 79.5% ($P<0.001$,图 3)。miR-138-5p 作为诊断慢性心力衰竭患者生物标志物的曲线下面积(AUC)为 0.607(95% CI 0.620~0.940),最佳 cutoff 值为 0.57,miR-138-5p 诊断慢性心力衰竭患者的灵敏度为 79.65%,特异度为 81.35% ($P<0.001$,图 3)。

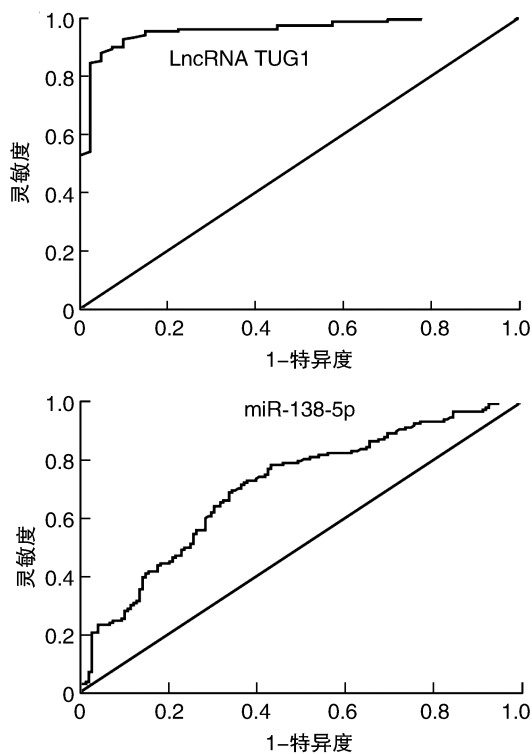


图3. LncRNA TUG1 及 miR-138-5p 作为诊断慢性心力衰竭的生物标志物的潜能

Figure 3. The potential of LncRNA TUG1 and miR-138-5p as biomarkers for the diagnosis of chronic heart failure

2.5 慢性心力衰竭患者生存分析

根据 LncRNA TUG1 平均表达水平(9.540)将 148 例慢性心力衰竭患者分为 LncRNA TUG1 高表达组(LncRNA TUG1 \geq 9.540)84 例及低表达组(LncRNA TUG1<9.540)64 例。Kaplan-Meier 法分析发现高表达 LncRNA TUG1 患者的 2 年中位生存时间[(11.68 \pm 1.47)月]短于低表达者[(16.75 \pm 2.98)月]($\chi^2=19.77, P<0.001$)。高表达 miR-138-5p 患者的 2 年中位生存时间[(15.52 \pm 1.03)月]长于低表达者[(10.32 \pm 1.55)月]($\chi^2=11.97, P<0.001$, 图4)。

3 讨论

慢性心力衰竭(CHF)是指持续存在的心力衰竭状态,是许多心血管疾病终末期的表现,随着年龄的增高,心力衰竭的发病率显著上升,近年来的调查发现中国心力衰竭者发病率为 0.9%^[7-8]。目前心力衰竭具体的发病机制及预后预测标志物尚未完全阐明。LncRNA 是一类位于细胞核内或胞质内长度超过 200 nt 的功能性 RNA 分子,最初被认为

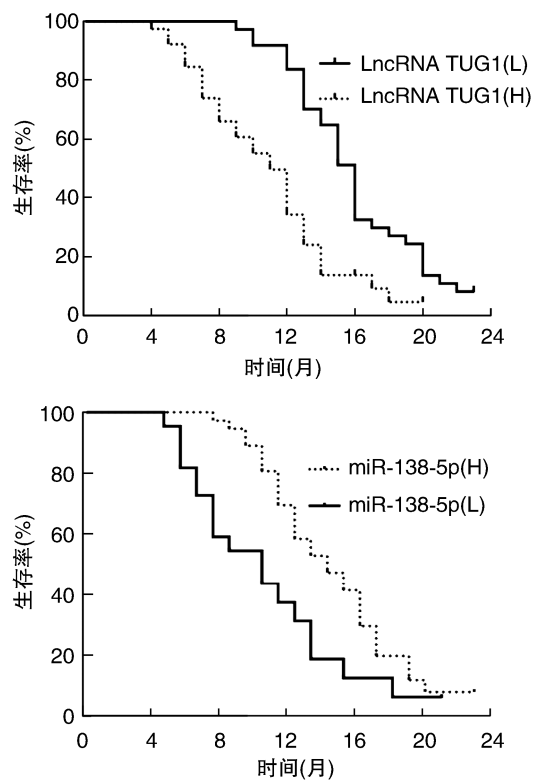


图4. LncRNA TUG1 及 miR-138-5p 表达与慢性心力衰竭患者 2 年生存时间的关系

Figure 4. The relationship between the expression of LncRNA TUG1 and miR-138-5p and the 2-year survival time of patients with chronic heart failure

是 RNA 聚合酶 II 转录的副产物,不具有生物学功能。

近年来的研究表明 LncRNA 参与调节多种疾病的发生、发展。同时 LncRNA 也在心血管疾病中存在差异表达,并且通过不同的作用机制在心血管疾病的调控网络中发挥作用,参与心血管疾病的发生发展。研究发现,反义长链非编码 RNA HOXA11 促进心脏成纤维细胞转化生长因子 β 1 诱导的纤维化^[9]。循环长链非编码 RNA 长基因间非编码 RNA 预测心脏重构 LIPCAR 与非慢性肾病患者的心力衰竭预后相关^[10]; Stat3 通过 miR-361-5p/hdac9 轴诱导 LncRNA 母系表达基因(maternally expressed 3, MEG3)上调促进心肌细胞肥大^[11]; LncRNA NR_045363 控制心肌细胞增殖和修复^[12]。LncRNA RMRP 作为 miR-206 的“内源性海绵”靶向作用于 ATG3 促进心肌缺血再灌注损伤^[13]。Wang 等^[14]发现 LncRNA 心肌肥厚相关因素(cardiac hypertrophy related factor, LncRNA CHRF)可作为 miR-489 的“内源性海绵”,下调 miR-489 的表达水平,从而对 miR-489 的靶基因 Myd88 进行调控,影响心肌细胞肥大。

Leung 等^[15]发现下调 LncRNA Ang362 后 miR-221 和 miR-222 表达下降,血管平滑肌细胞增殖降低。长非编码 RNA MEG3 在心肌梗死中调节心肌细胞凋亡^[16]。本课题组研究发现 LncRNA TUG1 与 miR-138-5p 之间有相互结合位点(待发表),然而关于 LncRNA TUG1 与 miR-138-5p 在慢性心力衰竭患者血浆中的表达及意义目前国内外尚未见相关报道。

本研究通过采用实时荧光定量 PCR 检测本院收治的 148 例 CHF 患者及 40 例健康体检者血浆 LncRNA TUG1 与 miR-138-5p 的表达,分析其临床意义。结果发现与对照组比较,慢性心力衰竭患者血浆中 TUG1 及 BNP 的表达明显升高;而 miR-138-5p 在慢性心力衰竭患者血浆中的表达明显降低。TUG1 的表达与 CHF 患者血清 BNP 的表达呈正相关;而与 miR-138-5p 的表达及左心室射血分数呈负相关。LncRNA TUG1 作为诊断慢性心力衰竭患者生物标志物的曲线下面积(AUC)为 0.868(95% CI 0.590~0.960, $P < 0.001$)。miR-138-5p 作为诊断慢性心力衰竭患者生物标志物的曲线下面积(AUC)为 0.607(95% CI 0.620~0.940, $P < 0.001$)。Kaplan-Meier 法分析发现高表达 LncRNA TUG1 患者的 2 年中位生存时间短于低表达者;高表达 miR-138-5p 患者的 2 年中位生存时间长于低表达者。以上研究提示慢性心力衰竭患者血浆 TUG1 与 miR-138-5p 高表达,与 CHF 患者的诊断及预后相关。然而影响 CHF 患者的预后的因素众多,关于 LncRNA TUG1 是通过怎样的机制影响慢性心力衰竭患者的预后,及其作为早期预测其预后生物标志物的潜能,尚需进一步扩大样本量,通过分子生物学实验进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] Bryce YC, Perez JR, Bryce EB, et al. Pathophysiology of right ventricular failure in acute pulmonary embolism and chronic thromboembolic pulmonary hypertension: a pictorial essay for the interventional radiologist[J]. *Insights Imaging*, 2019, 10(1): 18.
- [2] Korol S, White M, O'Meara E, et al. Is there a potential association between spironolactone and the risk of new-onset diabetes in a cohort of older patients with heart failure? [J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2019, 13(5): 277-282.
- [3] Li B, Hu Y, Li X, et al. Sirt1 antisense long noncoding rna promotes cardiomyocyte proliferation by enhancing the stability of sirt1[J]. *J Am Heart Assoc*, 2018, 7(21): e009700.
- [4] Lu YW, Wang DZ. Non-coding RNA in ischemic and non-ischemic cardiomyopathy[J]. *Curr Cardiol Rep*, 2018, 20(11): 115.
- [5] Zhang Y, Sun L, Xuan L, et al. Long non-coding RNA CCRR controls cardiac conduction via regulating intercellular coupling[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 4176.
- [6] 中华医学会心血管病学分会. 慢性心力衰竭诊断治疗指南[J]. *中华心血管病杂志*, 2007, 35(12): 1076-1095.
- [7] Ho JM. Pregabalin and heart failure: a population-based study[J]. *J Eval Clin Pract*, 2017, 21(15): 1121-1129.
- [8] Kaneko M, Narukawa M. Assessment of the risk of hospitalization for heart failure with dipeptidyl peptidase-4 inhibitors, saxagliptin, alogliptin, and sitagliptin in patients with type 2 diabetes, using an alternative measure to the hazard ratio[J]. *Ann Pharmacother*, 2017, 51(7): 570-576.
- [9] Wang J, Liu X, Zhuang Q, et al. Long noncoding RNA homeobox A11 antisense promotes transforming growth factor beta1 induced fibrogenesis in cardiac fibroblasts [J]. *Mol Med Rep*, 2019, 1(9): 129-138.
- [10] Santer L, Lopez B, Ravassa S, et al. Circulating long noncoding RNA LIPCAR predicts heart failure outcomes in patients without chronic kidney disease[J]. *Hypertension*, 2019, 11(8): 55-61.
- [11] Zhang J, Liang Y, Huang X, et al. STAT3-induced up-regulation of lncRNA MEG3 regulates the growth of cardiac hypertrophy through miR-361-5p/HDAC9 axis [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 460.
- [12] Wang J, Chen X, Shen D, et al. A long noncoding RNA NR_045363 controls cardiomyocyte proliferation and cardiac repair[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2019, 127: 105-114.
- [13] Kong F, Jin J, Lv X, et al. Long noncoding RNA RMRP upregulation aggravates myocardial ischemia-reperfusion injury by sponging miR-206 to target ATG3 expression [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109: 716-725.
- [14] Wang K, Liu F, Zhou L Y, et al. The long noncoding RNA CHRF regulates cardiac hypertrophy by targeting miR-489 [J]. *Circ Res*, 2014, 114(9): 1377-1388.
- [15] Leung A, Trac C, Jin W, et al. Novel long noncoding RNAs are regulated by angiotensin II in vascular smooth muscle cells[J]. *Circ Res*, 2013, 113(3): 266-278.
- [16] Wu H, Zhao ZA, Liu J, et al. Long noncoding RNA Meg3 regulates cardiomyocyte apoptosis in myocardial infarction [J]. *Gene Ther*, 2018, 25(8): 511-523.

(此文编辑 朱雯霞)