

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.10.011

· 临床研究 ·

血浆 miR-29b 与急性冠脉综合征患者胞外基质蛋白含量的关系 及其诊断价值分析 *

齐德林 李洪利[△] 李 杨 刘燕晖 尚学斌

(首都医科大学宣武医院心外科 北京 100053)

摘要 目的:探究血浆微小 RNA-29b(miR-29b)与急性冠脉综合征患者细胞外基质(ECM)蛋白含量的关系及其诊断价值。方法:选择 2019 年 2 月至 2019 年 7 月我院诊治的 80 例急性冠脉综合征患者作为观察组,另选择同期我院体检的 80 例健康志愿者作为对照组。检测两组受试者血浆 miR-29b、透明质酸(HA)、层黏连蛋白(LN)和 I 型前胶原蛋白(PC I)水平,采用 Pearson 相关性分析血浆 miR-29b 与 HA、LN 和 PC I 水平的相关性,采用受试者工作特征(ROC)曲线分析血浆 miR-29b、HA、LN 和 PC I 对急性冠脉综合征的诊断价值。结果:与对照组相比,观察组的血浆 miR-29b 水平明显下降($P<0.05$),而血浆 HA、LN 和 PC I 水平明显升高($P<0.05$)。血浆 miR-29b 水平与血浆 HA、LN 和 PC I 水平均呈负相关关系($P<0.05$),ROC 曲线分析结果显示,血浆 miR-29b 单独检测的敏感性和特异性分别为 79.10%、71.60%,优于 ECM 三个指标的单独检测,且四项指标联合检测的敏感性和特异性高于单项检测。结论:急性冠脉综合征患者血浆 miR-29b 水平下调,且与 ECM 蛋白水平呈负相关,在急性冠脉综合征临床诊断中具有一定的价值。

关键词:微小 RNA-29b;急性冠脉综合征;胞外基质蛋白;诊断价值;相关性

中图分类号:R541.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2020)10-1850-04

Relationship between Plasma miR-29b and Extracellular Matrix Protein Content in Patients with Acute Coronary Syndrome and Its Diagnostic Value*

QI De-lin, LI Hong-li[△], LI Yang, LIU Yan-hui, SHANG Xue-bin

(Department of Cardiac Surgery, Xuanwu Hospital of Capital Medical University, Beijing, 100053, China)

ABSTRACT Objective: To explore the relationship between plasma microRNA-29b (miR-29b) and ECM content in patients with acute coronary syndrome and its diagnostic value. **Methods:** 80 patients with acute coronary syndrome who were diagnosed and treated in our hospital from February 2019 to July 2019 were selected as the observation group, another 80 healthy patients who underwent physical examination in our hospital during the same period were selected as the control group. The levels of miR-29b, hyaluronic acid (HA), laminin (LN) and procollagen I (PC I) were measured in two groups, the correlation between plasma miR-29b and the levels of HA, LN, PC I was analysed by Pearson correlation analysis. The diagnosis value of plasma miR-29b, HA, LN, PC I with the acute coronary syndrome was analysed by receiver operating curve (ROC). **Results:** Compared with control group, the level of plasma miR-29b in observation group was obviously decreased ($P<0.05$), while the levels of plasma HA, LN, PC I increased significantly ($P<0.05$). The level of plasma miR-29b and the level of plasma HA, LN, and PC I showed a negative correlation ($P<0.05$). ROC curve analysis showed that the sensitivity and specificity of plasma miR-29b were 79.10% and 71.60% respectively, which were superior to those of ECM, and the sensitivity and specificity of combined detection of four indicators were higher than that of single detection. **Conclusions:** The level of miR-29b in patients with acute coronary syndrome is down-regulated, and it is negatively correlated with the level of ECM protein. It has a certain value in the clinical diagnosis of acute coronary syndrome.

Key words: MicroRNA-29b; Acute coronary syndrome; Extracellular matrix protein; Diagnostic value; Correlation

Chinese Library Classification(CLC): R541.4 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2020)10-1850-04

前言

心脑血管疾病是目前我国死亡率最高的疾病,据统计我国心脑血管疾病患者约为 2.9 亿,其中冠心病患者 1100 万,并且

* 基金项目:北京市科学技术委员会资助项目(Z162200002116007)

作者简介:齐德林(1987-),男,硕士,住院医师,研究方向:急性冠脉综合征,E-mail: widedeyu@163.com

△ 通讯作者:李洪利(1976-),男,硕士,副主任医师,研究方向:急性冠脉综合征,E-mail: Lihongli3021@sohu.com

(收稿日期:2019-11-23 接受日期:2019-12-18)

发病率和死亡率呈逐年上升趋势^[1]。急性冠脉综合征是导致冠心病患者死亡的主要原因,几乎一半的冠心病死亡发生在急性冠脉综合征之后^[2]。急性冠脉综合征的诊断首先要对患者的临床表现、心电图、心肌肌钙蛋白水平进行全面的评估,并回顾既往病史,在诊断准确性上有所欠缺,容易出现误诊和漏诊的情况^[3]。微小RNA(microRNA, miR)是一种小分子RNA,长度在18-24nt之间,能够结合到基因信使RNA上调节基因表达^[4]。研究报道显示在急性冠脉综合征发生过程中 miR-941、miR-499和 miR-210等 miR表达异常,可以作为急性冠脉综合征的诊断标志物^[5,6]。miR-29b是一种与心血管疾病发生密切相关的miR,在急性心肌梗死以及心肌纤维化等心血管疾病发生过程中均起到一定调节作用^[7,8],但是当前的研究对于 miR-29b在急性冠脉综合征中的作用仍然缺乏了解。细胞外基质(Extracellular matrix, ECM)主要分布于细胞膜上,参与细胞间黏附过程^[9],主要包括透明质酸(Hyaluronic acid, HA)、层黏连蛋白(Laminin, LN)和I型前胶原蛋白(Procollagen I, PC I)等ECM蛋白^[10,11],与急性冠脉综合征发病密切相关^[12]。鉴于此,本研究探讨了血浆 miR-29b与急性冠脉综合征患者ECM蛋白含量的关系及其诊断价值,报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选择2019年2月至2019年7月我院诊治的80例急性冠脉综合征患者作为研究对象,并将其纳入观察组。纳入标准:(1)患者均符合2016年中国医师协会修订的急性冠脉综合征诊断标准^[13];(2)首次发病;(3)年龄在18岁以上;(4)无既往代谢异常疾病和内分泌紊乱疾病。排除标准:(1)存在全身性感染者;(2)入院前接受过冠脉支架植入术;(3)先天性心脏病患者;(4)合并存在肿瘤者。选择同期在我院进行体检的80名健康志愿者作为对照组。对照组年龄20-75岁,平均年龄(48.69±12.16)岁,男性45名,女性35名。观察组年龄20-76岁,平均年龄(49.08±13.19)岁,男性46名,女性34名,其中不稳定型心绞痛(Unstable angina pectoris, UAP)26例,急性心肌梗死(Acute myocardial infarction, AMI)54例。美国纽约心脏病学会(New York Heart Association, NYHA)^[14]心功能分级I级8例,II级15例,III级38例,IV级19例。两组受试者在年龄和性别比例的比较无差异($P>0.05$),具有可比性。研究开展前均与患者签署知情同意书。

1.2 血浆 miR-29b 表达水平检测

抽取所有受试者外周静脉血5 mL于抗凝管中,5000 rpm离心20 min,半径8 cm,将上清液转移至干净离心试管中用于后续检测。采用血液RNA分离试剂盒(美国赛默飞世尔科技有

限公司,货号:K156001,规格:50T)提取血浆总RNA,吸取100ng总RNA进行1%琼脂糖凝胶电泳以确保提取的RNA完整性,并在紫外分光光度计(美国赛默飞科技有限公司,型号:Multiskan Sky)下检测260 nm及280 nm处的吸光值,260 nm吸光值/280 nm吸光值在1.8~2.0则表示提取的RNA纯度合格,随后进行总RNA逆转录反应,采用RNA逆转录试剂盒(美国Takara科技有限公司,货号:RR037A,规格:100T)对提取得到的总RNA进行逆转录。采用SYBR-Green荧光定量PCR检测试剂盒(美国赛默飞世尔科技有限公司,货号:A25741,规格:192T)对miR-29b进行荧光定量PCR检测,选择U6作为内参基因。反应体系为SYBR mix 12.5 μ L,正向引物0.5 μ L,反向引物0.5 μ L, DNA模板2 μ L,双蒸水9.5 μ L,总体积25 μ L。PCR扩增条件如下:95℃,40 s;96℃,10 s,59℃,50 s,进行36个循环。miR-29b正向引物:5'-GGCCTTAAGTCAAATGTCG-GCT-3', miR-29b反向引物:5'-AAAGGATCACTGGAACCT-GCC-3'。U6的正向引物:5'-GTGCTCGCTTCGGCAGCA-CATATAC-3'。反向引物:5'-CTTTGGTATCGTGAAG-GACTC-3'。根据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算miR-29b的相对表达量,并以相对表达量来表示miR-29b的表达水平。

1.3 血浆 ECM 蛋白 HA、LN 和 PC I 水平检测

HA、LN和PC I检测均采用酶联免疫法,分别采用HA酶联免疫检测试剂盒(上海歌凡生物科技有限公司,货号:HH030,规格:96T)、LN酶联免疫检测试剂盒(上海钦诚生物技术有限公司,货号:QC-LAMA4-Hu,规格:96T)和PC I酶联免疫检测试剂盒(上海冠导生物工程有限公司,货号:GD-E002265774,规格:96T)进行检测,实验操作严格按照试剂盒说明书进行。

1.4 统计学分析

数据分析采用SPSS20.0统计学软件,平均年龄、血浆miR-29b、HA、LN和PC I水平等计量资料采用平均值±标准差的方式来表示,采用t检验。性别比例等计数资料以百分比的方式来表示,采用 χ^2 检验,采用Pearson相关性分析分析血浆miR-29b与HA、LN和PC I蛋白水平的相关性,绘制受试者工作特征(Receiver operating curve, ROC)曲线分析各指标对急性冠脉综合征的诊断价值, $P<0.05$ 则表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 两组血浆 miR-29b、HA、LN 和 PC I 水平比较

观察组血浆HA、LN和PC I水平明显高于对照组,而血浆miR-29b水平明显低于对照组,组间差异具有统计学意义($P<0.05$),见表1。

表1 两组血浆 miR-29b、HA、LN 和 PC I 水平比较

Table 1 Comparison of the levels of plasma miR-29b, HA, LN, PC I between the two groups

Groups	n	HA(μ g/L)	LN(ng/mL)	PC I (μ g/L)	miR-29b
Control group	80	61.28± 19.77	84.69± 27.32	46.71± 15.07	1.43± 0.46
Observation group	80	127.97± 35.55	116.73± 32.43	69.57± 19.33	0.43± 0.12
t		14.665	6.759	8.344	18.771
P		0.000	0.000	0.000	0.000

2.2 血浆 miR-29b 表达水平与 ECM 蛋白 HA、LN 和 PC I 水平的相关性分析

Pearson 相关性分析结果显示, 血浆 miR-29b 表达水平与 ECM 蛋白 HA、LN 和 PC I 水平均呈负相关($r=-0.737, -0.838, -0.764; P=0.013, 0.007, 0.019$)。

2.3 血浆 miR-29b 与 ECM 蛋白 HA、LN 和 PC I 对急性冠脉综合症的诊断价值分析

血浆 miR-29b 联合 HA、LN 和 PC I 诊断的曲线下面积

表 2 血浆 miR-29b 与 ECM 蛋白 HA、LN 和 PC I 对急性冠脉综合症的诊断价值分析

Table 2 Analysis of diagnosis value of plasma miR-29b and ECM protein HA, LN, PC I in acute coronary syndrome

Index	AUC	P	95%CI	Sensitivity (%)	Specificity (%)
HA	0.724	0.000	0.647~0.802	61.20	59.80
LN	0.752	0.000	0.678~0.825	63.50	64.40
PC I	0.798	0.000	0.732~0.865	68.20	67.10
miR-29b	0.831	0.000	0.770~0.893	79.10	71.60
miR-29b+HA+LN+PC I	0.943	0.000	0.910~0.976	86.90	75.40

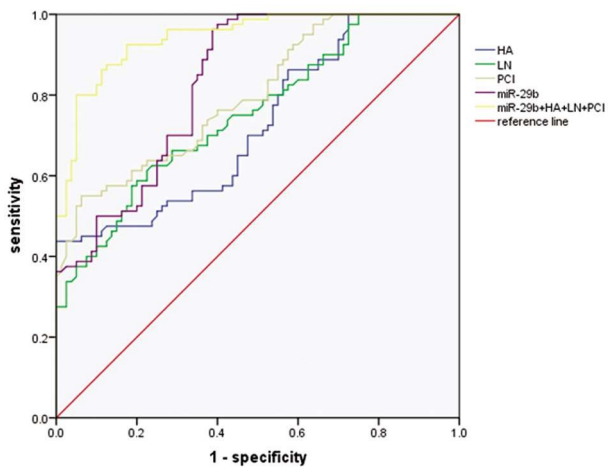


图 1 血浆 imR-29b 与 ECM 蛋白 HA、LN 和 PC I 诊断急性冠脉综合症的 ROC 曲线

Fig.1 ROC curve of plasma miR-29b and ECM protein HA, LN, PC I in acute coronary syndrome

3 讨论

急性冠脉综合征具有高发病率和死亡率的特点,对社会造成了严重的经济负担^[15]。目前急性冠脉综合征的临床诊断存在诊断准确性低和敏感性较差的问题,导致患者的过度治疗和治疗不及时的情况时有发生,继而患者病情快速恶化^[16],因此寻求与急性冠脉综合征发病密切相关的生物标志物并将其应用于急性冠脉综合征的诊断和治疗中具有重要的临床意义。

miR-29b 表达异常与 T 淋巴细胞瘤、动脉粥样硬化和心肌纤维化等多种疾病的发生密切相关,可以作为多种疾病的诊断标志物分子^[17-19]。本研究发现在急性冠脉综合征患者中血浆 miR-29b 水平明显下降,提示 miR-29b 可能与急性冠脉综合征的发生发展有关,Yuan 等人^[20]发现在血管内皮细胞中 miR-29b 能够抑制核因子 κ B(Nuclear factor κ B, NF- κ B)信号通路的活化,进而抑制炎症反应对细胞造成的损伤,使得血管内皮细胞在细菌脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)刺激下仍然能够存活。

(Area Under The Curve,AUC)值为 0.943、敏感性为 86.90%、特异性为 75.40%, 高于 miR-29b (AUC 为 0.831, 敏感性为 79.10%, 特异性为 71.60%)、PC I (AUC 为 0.798, 敏感性为 68.20%, 特异性为 67.10%)、LN (AUC 为 0.752, 敏感性为 63.50%, 特异性为 64.40%)和 HA (AUC 为 0.724, 敏感性为 61.20%, 特异性为 59.80%), 同时血浆 miR-29b 诊断的 AUC 值、敏感性和特异性高于 HA、LN 和 PC I 单一检测,见表 2 和图 1。

miR-29b 主要作用机制与其余 miR 的大致相同,即结合到基因 mRNA 上促进 mRNA 降解,进而下调相应基因表达^[21]。Nijhuis 等人^[22]发现在肠成纤维细胞中 miR-29b 能够结合到骨髓细胞白血病蛋白 1(Myeloid cell leukemia 1, MCL-1)基因 mRNA 的 3'-UTR 上并下调 MCL-1 基因表达,而炎症因子如白细胞介素 6(Interleukin-6, IL-6)能够诱导 MCL-1 基因表达并促进肠道纤维化,miR-29b 与 IL-6 等炎症因子相互拮抗,从而抑制肠道纤维化的发生。有研究报道显示炎症反应是急性冠脉综合征的主要触发因素之一,炎症反应的发生会导致急性冠脉综合征患者的病情加剧,并且与急性冠脉综合征患者的死亡存在一定相关性^[23],因此推测 miR-29b 表达水平下调导致 NF- κ B 信号通路的活化以及 IL-6 等炎症因子水平升高,导致炎症反应的发生,心肌细胞发生纤维化,导致急性冠脉综合征的发生。

ECM 是细胞外结构的主要成分,参与细胞信号转导以及细胞间黏附过程^[24],ECM 蛋白表达异常是导致器官纤维化疾病发生的主要因素^[25]。本研究发现在急性冠脉综合征患者中 ECM 蛋白的表达水平均明显上调,表明 ECM 蛋白水平升高与急性冠脉综合征的发生密切相关。Angelini 等人^[26]发现在急性冠脉综合征发病过程中,免疫功能的下降会导致急性冠脉综合征患者病情加重,是急性冠脉综合征的主要风险因素。同时,在急性冠脉综合征发病过程中也存在免疫相关信号通路异常的情况^[27]。Flego 等人^[28]发现在急性冠脉综合征患者中普遍存在免疫功能紊乱,T 细胞受体(T cell receptor, TCR)信号通路以及免疫细胞数量在急性冠脉综合征患者中均存在异常,而 TCR 信号通路的活化受到 ECM 蛋白的调节^[29]。Umair 等人^[30]发现 ECM 蛋白的分布存在动态平衡,并且 ECM 蛋白的分布与细胞免疫反应的发生具有紧密联系,因此笔者推测 ECM 蛋白水平异常升高导致了患者机体的免疫机能发生紊乱,从而促进急性冠脉综合征的发生。本研究进一步发现血浆中 miR-29b 表达与 HA、LN 和 PC I 水平呈负相关,血浆 miR-29b 检测对急性冠脉综合征诊断的特异性和敏感性高于 HA、LN 和 PC I, 血浆 miR-29b 联合 HA、LN 和 PC I 检测在急性冠脉综合征患者诊

断中具有较高的特异性和敏感性,表明血浆 miR-29b 检测在急性冠脉综合征患者诊断中具有一定的临床价值。

综上所述,急性冠脉综合征患者血浆 miR-29b 表达水平下调,与 HA、LN 和 PC I 蛋白水平呈负相关。血浆 miR-29b 检测对急性冠脉综合征具有一定的诊断价值,且 HA、LN、PC I 及血浆 miR-29b 联合检测可提高诊断的敏感性和特异性。

参考文献(References)

- [1] 胡盛寿,高润霖,刘力生,等.《中国心血管病报告 2018》概要[J]. 中国循环杂志,2019,34(3): 6-17
- [2] Yildirim A, Lübberts HT, Yildirim A. Acute Coronary Syndrome[J]. Swiss Dent J, 2017, 127(1): 38-39
- [3] Hironori T, Noriaki I, Jin K, et al. Glycemic variability determined with a continuous glucose monitoring system can predict prognosis after acute coronary syndrome [J]. Cardiovasc Diabetol, 2018, 17(1): 116
- [4] Schulte C, Karakas M, Zeller T. microRNAs in cardiovascular disease-clinical application [J]. Clin Chem Lab Med, 2017, 55 (5): 687-704
- [5] Bai R, Yang Q, Xi R, et al. miR-941 as a promising biomarker for acute coronary syndrome [J]. BMC Cardiovasc Disord, 2017, 17(1): 227
- [6] Shalaby SM, Amal S, Shoukry A, et al. Serum miRNA-499 and miRNA-210: A potential role in early diagnosis of acute coronary syndrome[J]. IUBMB Life, 2016, 68(8): 673-682
- [7] Grabmaier U, Clauss S, Gross L, et al. Diagnostic and prognostic value of miR-1 and miR-29b on adverse ventricular remodeling after acute myocardial infarction - The SITAGRAMI-miR analysis [J]. Int J Cardiol, 2017, 244(1): 30-36
- [8] Panizo S, Carrillo-López N, Naves-Díaz M, et al. Regulation of miR-29b and miR-30c by vitamin D receptor activators contributes to attenuate uraemia-induced cardiac fibrosis [J]. Nephrol Dial Transplant, 2017, 32(11): 1831-1840
- [9] 姜大庆,谷天祥,徐兆发,等. 心肌细胞外基质对心肌球源性心肌干细胞体外分化、增殖及凋亡影响的研究[J]. 中国胸心血管外科临床杂志, 2016, 23(9): 901-906
- [10] 熊钻,梅玉峰,王春阳,等. 透明质酸、III型前胶原、IV型胶原、层粘连蛋白对肝硬化的诊断价值分析 [J]. 中国处方药, 2018(1): 137-138
- [11] Nielsen SH, Mouton AJ, DeLeon-Pennell KY, et al. Understanding cardiac extracellular matrix remodeling to develop biomarkers of myocardial infarction outcomes[J]. Matrix Biol, 2019, 75(6): 43-57
- [12] Wight TN. A Role for Extracellular Matrix in Atherosclerotic Plaque Erosion[J]. J Am Coll Cardiol, 2018, 72(13): 1504-1505
- [13] 中国医师协会急诊医师分会,中华医学会心血管病学分会,中华医学会检验医学分会.急性冠脉综合征急诊快速诊疗指南 [J]. 中华急诊医学杂志, 2016, 36(4): 207-214
- [14] Bredy C, Ministeri M, Kempny A, et al. NYHA classification in adults with congenital heart disease: Relation to objective measures of exercise and outcome[J]. Eur Heart J Qual Care Clin Outcomes, 2017, 4(1): 51-58
- [15] 王胜强,赵爱荣,李吉刚,等. 急性冠脉综合征患者 GRACE 评分与心功能及冠脉病变的关系研究 [J]. 现代生物医学进展, 2017, 17 (31): 6175-6178, 6095
- [16] Barstow C, Rice M, Mcdivitt JD. Acute Coronary Syndrome: Diagnostic Evaluation[J]. Am Fam Physician, 2017, 95(3): 170-177
- [17] Kohnken R, Wen J, Mundy-Bosse B, et al. Diminished microRNA-29b level is associated with BRD4-mediated activation of oncogenes in cutaneous T-cell lymphoma [J]. Blood, 2018, 131 (7): 771-781
- [18] Huang YQ, Li J, Chen JY, et al. The Association of Circulating MiR-29b and Interleukin-6 with Subclinical Atherosclerosis [J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 44(4): 1537-1544
- [19] Liang JN, Zou X, Fang XH, et al. The Smad3-miR-29b/miR-29c axis mediates the protective effect of macrophage migration inhibitory factor against cardiac fibrosis [J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2019, 1865(9): 2441-2450
- [20] Yuan H, Ma J, Li T, et al. MiR-29b aggravates lipopolysaccharide-induced endothelial cells inflammatory damage by regulation of NF-κB and JNK signaling pathways[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 99(10): 451-461
- [21] Morales S, Monzo M, Navarro A. Epigenetic regulation mechanisms of microRNA expression[J]. Biomol Concepts, 2017, 8(5): 203-212
- [22] Nijhuis A, Curciarello R, Mehta S, et al. MCL-1 is modulated in Crohn's disease fibrosis by miR-29b via IL-6 and IL-8[J]. Cell Tissue Res, 2017, 368(2): 325-335
- [23] Sager HB, Nahrendorf M. Inflammation: A trigger for acute coronary syndrome[J]. Q J Nucl Med Mol Imaging, 2016, 60(3): 185-193
- [24] Frangogiannis NG. The extracellular matrix in myocardial injury, repair, and remodeling[J]. J Clin Invest, 2017, 127(5): 1600-1612
- [25] 姚小兵. 肾纤维化的发病机制及治疗研究进展 [J]. 国际泌尿系统杂志, 2019, 39(2): 371-374
- [26] Angelini G, Flego D, Vinci R, et al. Matrix metalloproteinase-9 might affect adaptive immunity in non-ST segment elevation acute coronary syndromes by increasing CD31 cleavage on CD4⁺T-cells[J]. Eur Heart J, 2018, 39(13): 1089-1097
- [27] 余天浩,李瑜辉,伍灏堃,等. Tim-3 在急性冠脉综合征患者 CD3⁺T 细胞中的表达及与炎症指标的相关性 [J]. 广东医学, 2017, 38(24): 3796-3799
- [28] Flego D, Liuzzo G, Weyand CM, et al. Adaptive Immunity Dysregulation in Acute Coronary Syndromes: From Cellular and Molecular Basis to Clinical Implications [J]. J Am Coll Cardiol, 2016, 68(19): 2107-2117
- [29] Hewitt SM. The Role of Extracellular Matrix in Innate Immunity, Fugues of Evolution[J]. J Histochem Cytochem, 2018, 66(4): 211-211
- [30] Umair MM, Athanasios P, Adam P, et al. Tumor matrix remodeling and novel immunotherapies: the promise of matrix-derived immune biomarkers[J]. J Immunother Cancer, 2018, 6(1): 65