

· 论 著 ·

冠心病患者血清同型半胱氨酸、miR-1、miR-126 和 miR-208 的相关性分析

金 洁¹, 王 俊², 王 磊², 蔡晓敏², 王立军², 宫剑滨²

[摘要] 目的 结合冠状动脉狭窄程度,探讨冠心病患者血清同型半胱氨酸(Hcy)与微小 RNA(miR-1、miR-126 及 miR-208)之间的相互关系。方法 选取行冠脉造影术的患者共 102 名,根据造影结果分为对照组和观察组,检测 Hcy、miR-1、miR-126 及 miR-208 水平,同时对冠脉造影结果进行评价并计算 Gensini 积分,应用相关及线性回归分析 Hcy、miRNA(miR-1、miR-126、miR-208)以及 Gensini 积分的相互关系。结果 观察组血清 Hcy、miRNA(miR-1、miR-126、miR-208)水平均高于对照组,血清 Hcy、miR-1 和 miR-126 水平分别与 Gensini 积分呈正相关[相关系数(r)分别为 0.575、0.649、0.499, P 均 < 0.01],偏相关分析校正后它们之间仍然呈正相关(r' 分别为 0.693、0.621、0.532, P 均 < 0.05);而血清 Hcy 与 miR-1、miR-126 水平亦呈正相关(r 分别为 0.513、0.56, P 均 < 0.01),偏相关分析校正后排除年龄、体重指数、高血压和高脂血症病史的影响,其间仍然呈正相关(r' 分别为 0.599、0.614, P 均 < 0.05),而与 miR-208 无显著相关性。结论 血清 Hcy、miRNA(miR-1、miR-126、miR-208)均是评价冠心病的独立危险因素,其水平均随着冠脉病变严重程度的加重而增加。

[关键词] 冠心病;同型半胱氨酸;微小核糖核酸-1;微小核糖核酸-126;微小核糖核酸-208

[中图分类号] R541.4 **[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1672-271X.2014.04.009

Correlation analysis of Hcy, miR-1, miR-126 and miR-208 in coronary heart disease patients

JIN Jie¹, WANG Jun², WANG Lei², CAI Xiao-min², WANG Li-jun², GONG Jian-bin². 1. Department of Internal, Hangzhou Air Force Medical Appraisal Center, Zhejiang 310007, China; 2. Department of Cardiology, Medical School of Nanjing University, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, Nanjing, Jiangsu 210002, China

[Abstract] **Objective** To study the correlation between miRNA (miR-1, miR-126, miR-208) and homocysteine (Hcy) combining on the severity of stenosis of coronary artery. **Methods** One hundred and two patients undergoing quantitative coronary angiography were involved in this study. Patients were categorized into control group and coronary artery disease (CAD) group. The concentration of Hcy and miRNA (miR-1, miR-126, miR-208) were measured. The severity scale of coronary artery stenosis was quantitatively assessed according to coronary angiography by Gensini score. The correlation analysis and linear regression were used to show the association of Hcy, miRNA (miR-1, miR-126 and miR-208) and Gensini score. **Results** The concentration of Hcy and miRNA (miR-1, miR-126 and miR-208) were higher in CAD group than those in control group. In the correlation analysis, Gensini score was positively associated with Hcy, miR-1 and miR-126 ($r = 0.575, 0.649$, and $0.499, P < 0.01$) and the positive correlation between them remained significant after revising partial correlation analysis ($r' = 0.693, 0.621$, and $0.532, P < 0.05$). Hcy was influenced by miR-1 and miR-126 both in the Spearson correlation analysis ($r = 0.513, 0.56, P < 0.01$) and partial correlation analysis ($r' = 0.599, 0.614, P < 0.05$), but not by miR-208. **Conclusion** Hcy, miRNA (miR-1, miR-126 and miR-208) are independent risk factor for coronary heart disease and are increased along with stenosis of coronary arteries.

[Key words] coronary heart disease; homocysteine; miR-1; miR-126; miR-208

同型半胱氨酸(Hcy)是甲硫氨酸代谢过程中产生的一种含硫氨基酸;微小核糖核酸(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^[1]。近些年的研究表明,Hcy 和 miRNA 可能是引起冠心病的又一危险因子^[2],而不仅仅是生物

学标记物。目前国内外关于 Hcy 与 miRNA 的相互作用关系研究较少。本研究通过对冠心病心绞痛患者血清 Hcy 和血管-炎症特异性 miRNA(miR-1, miR-126, miR-208)水平的观察,结合冠状动脉狭窄程度,比较三者之间的关联性。

1 对象与方法

1.1 研究对象 选择 2012 年 8-10 月南京军区南京总医院心脏内科收治的冠心病心绞痛 65 例为观察组,其中男 42 例,女 23 例,年龄为 (59.6 ± 8.6)

作者单位: 1. 310007 浙江杭州,空军杭州航空医学鉴定训练中心内科; 2. 210002 江苏南京,南京大学医学院(南京军区南京总医院)心脏内科

通讯作者: 宫剑滨, E-mail: piaopiao5556@126.com

岁,病例类型包括不稳定型心绞痛 21 例,稳定性心绞痛 44 例;均经冠状动脉造影证实并符合 2007 年美国心脏病学会/美国心脏协会(ACC/AHA)的诊断标准^[3];冠状动脉造影明确至少有 1 支血管狭窄 $\geq 50\%$ 。另选择 37 例疑似心绞痛患者作为对照组,经冠状动脉造影证实均非冠心病,男 19 例,女 18 例,年龄(55.1 ± 5.2)岁。两组均排除既往有心肌梗死病史、心肌病、心脏瓣膜病、严重肝肾功能异常、恶性疾病及妊娠、哺乳期女性。

1.2 研究方法

1.2.1 选择性冠脉造影与 Gensini 积分 由心内科专业医师完成,路径为经桡或股动脉,采用 Judkins^[4]方法进行。左冠状动脉的左主干、前降支、回旋支和右冠状动脉为冠状动脉系统主要的 4 支动脉,至少 2 个正交投射体位造影发现冠状动脉狭窄 $\geq 50\%$ 诊断为冠心病。采用 Gensini 积分^[5]评定冠状动脉病变严重程度:狭窄 $\leq 25\%$ 记为 1 分,26%~50%记为 2 分,51%~75%记为 4 分,76%~90%记为 8 分,91%~99%记为 16 分,100%记为 32 分。不同节段冠状动脉评分系数按 Gensini 标准,计算每例患者冠状动脉病变程度的 Gensini 积分之和。

1.2.2 血清 Hcy 测定 于行血管造影术当日清晨取两管静脉血各 3ml 并分离血清,分别用于 Hcy 和血清 miRNA 的检测。Hcy 检测应用 OP-162 微量荧光检测仪检测,Hcy 荧光定量试剂盒由济南杏恩生物科技有限公司提供。

1.2.3 血清 miRNA 绝对含量的测定 利用苯酚法提取血清中的总 RNA,经逆转录-聚合酶链反应(使用 ABI 公司的 miRNA Taqman 试剂和 PCR 仪)和 7500 型序列检测系统(ABI 公司产品),以 miR-let7 作为内参,miR-16 建立标准曲线,参照 Chen 等^[6]描述绝对表达量计算方法,计算血清 miRNA 的绝对含量。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 19.0 统计学软件进行统计分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,经正态性检验及方差齐性检验,两组间比较用 *t* 检验,多组间比较用 *F* 检验;对各变量采用 Pearson 检验进行相关性分析,再通过偏相关分析,排除年龄,体重指数,高血压和高脂血症病史的影响;对各变量

采用多元线性回归分析;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况比较 见表 1。观察组与对照组在人数、性别、年龄、吸烟、糖尿病发病率等方面比较差异无统计学意义($P > 0.05$),观察组体重指数明显高于对照组($P < 0.05$),高血压和高脂血症发病率也明显高于对照组($P < 0.05$)。

2.2 不同 Gensini 积分患者血清 Hcy 及 miRNA 水平比较 见表 2。Gensini 积分 ≤ 25 组和 Gensini 积分 > 25 组的血清 Hcy 和血管-炎症性 miRNA(miR-1、miR-126)明显高于对照组($P < 0.01$)。Gensini 积分 > 25 组的血清 Hcy、miR-1、miR-126 和 miR-208 水平也较 Gensini 积分 ≤ 25 组显著升高($P < 0.01$)。在轻度狭窄(Gensini 积分 ≤ 25 分)的患者血清中 miR-208 表达下降,且与对照组比较差异具有统计学意义($P < 0.01$),但与中重度狭窄患者比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.3 相关性分析 经 Pearson 直线相关分析显示,血清 Hcy、miR-1 和 miR-126 水平与 Gensini 积分呈正相关关系[相关系数(*r*)分别为 0.575、0.649、0.499, P 均 < 0.01];经偏相关分析,排除年龄,体重指数,高血压和高脂血症病史的影响,上述正相关关系依旧存在(*r'*分别为 0.693、0.621、0.532, P 均 < 0.05)。血清 Hcy 水平与 miR-1 和 miR-126 水平亦呈正相关(*r*分别为 0.513、0.56, P 均 < 0.01);经偏相关分析排除年龄,体重指数,高血压和高脂血症病史的干扰后相关性略增高(*r'*分别为 0.599、0.614, P 均 < 0.05),而 Hcy 与 miR-208 无显著相关性($r = 0.005, P > 0.05$)。

2.4 多元线性回归分析 以 Gensini 积分为因变量,年龄、性别、吸烟、体重指数、miR-1、miR-126、miR-208 和 Hcy 水平为自变量进行逐步多元线性回归分析,结果显示年龄、性别、吸烟、体重指数以及 miR-208 等因变量均未达到引入标准。最终只有 miR-1 和 Hcy 显示与冠状动脉狭窄程度的积分独立相关(表 3)。

表 1 观察组和对照组一般情况比较

组别	<i>n</i>	性别 (男/女)	年龄 (岁, $\bar{x} \pm s$)	体重指数 ($\bar{x} \pm s$)	吸烟 [<i>n</i> (%)]	高血压 [<i>n</i> (%)]	高脂血症 [<i>n</i> (%)]	糖尿病 [<i>n</i> (%)]
观察组	65	42/23	59.6 \pm 8.6	23.5 \pm 3.0 *	29(44.6)	20(30.8) *	21(32.3) *	15(23.1)
对照组	37	19/18	55.1 \pm 5.2	21.1 \pm 3.0	16(44.3)	4(10.8)	4(10.8)	7(18.9)

注:与对照组比较,* $P < 0.05$

表 2 不同 Gensini 积分患者血清 Hcy 及血清 miRNA 水平比较($\bar{x} \pm s$)

Gensini 积分	<i>n</i>	Gensini 积分	Hcy(umol/L)	miR-1 (fmol/L)	miR-126 (fmol/L)	miR-208 (fmol/L)
对照组	37	0	6.9 ± 2.5	10.1 ± 6.1	82.6 ± 69.4	34832.7 ± 25215.9
≤25 组	35	10.9 ± 7.2	12.6 ± 4.8 *	69.3 ± 25.8 *	332.7 ± 221.2 *	15777.2 ± 42762.8 *
>25 组	30	37.7 ± 12.7	18.6 ± 7.0 * [△]	113.5 ± 46.9 * [△]	942.6 ± 779.1 * [△]	27559.3 ± 20184.2 [△]

注:与对照组比较,**P* < 0.01;与 Gensini 积分≤25 分组比较,[△]*P* < 0.01

表 3 Gensini 积分与各参数的多元线性回归分析(*n* = 65)

变量	未标准化系数		标准化系数	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
	回归系数	标准误			
常数	-4.469	3.564	-	-1.254	0.213
miR-1	0.161	0.039	0.486	3.550	0.001
miR-126	-0.002	0.004	-0.054	-0.459	0.647
Hcy	0.838	0.236	0.340	3.126	0.002

3 讨论

Hcy 是一种含硫氨基酸,作为甲硫氨酸和半胱氨酸的重要中间产物,是一种多功能损害因子。Hcy 可使大鼠大动脉平滑肌细胞内 mRNA 和 fos 癌基因表达增加,诱导静止细胞进入分裂期,促进平滑肌细胞迅速增值,血管内膜增厚^[7]。Hcy 在代谢过程产生的多种强氧化剂能导致内皮细胞结构和功能的损伤,诱导内皮细胞的凋亡^[8]。Hcy 的自身氧化产物能作为抗原刺激、激活体内多种免疫细胞,刺激 B 细胞增殖和分泌,放大已激活的 T 细胞,从而放大单核巨噬细胞引起的免疫炎症反应^[9]。Hcy 通过抑制凝血酶调节蛋白在内皮细胞表面的表达及活性,进一步抑制蛋白 C 的激活,从而影响对凝血因子 Va、凝血因子Ⅷa 和凝血酶的灭活。上述因素可分别或以不同形式组合,共同促进动脉粥样硬化的形成。本研究显示,冠心病患者血清 Hcy 水平较对照组明显升高,且升高程度与代表冠脉病变程度的 Gensini 积分正相关,与 Zhu 等^[10]研究结果相符。

miRNA 在进化过程中高度保守,广泛地在转录或转录后修饰负调控基因的表达,并且可以稳定地存在于血清和血浆等多种体液中,这类 miRNA 被称为循环 miRNA。本研究发现冠心病患者血清中血管-炎症源性 miR-1、miR-208 以及 miR-126 明显高于对照组,且在 Gensini 积分≤25 和 Gensini 积分>25 两组间差异有统计学意义,与 Gensini 积分水平呈正相关,偏相关分析校正后这种正相关依旧存在,这可能与多支病变导致缺血心肌范围较大、心肌缺血程度较重,影响心肌细胞内 miRNA 的代谢有关。粥样斑块的形成是一种慢性炎症反应的过程,巨噬细胞吞噬氧化型低密度脂蛋白后引发炎症反应是动脉粥

样硬化发生发展的病理基础^[11]。miR-126 能够抑制肿瘤坏死因子 α(TNF-α)刺激的血管黏附细胞因子 1(VCAM-1)的表达,并限制白细胞在血管内皮的黏附。VCAM-1 是 miR-126 的靶基因,敲除 miR-126 反义寡核苷酸可导致 TNF-α 诱导的 VCAM-1 表达上调,从而促进白细胞向内皮细胞的黏附^[12]。所以 miR-126 具有调控黏附分子表达及血管炎症反应的功能,并能通过抑制 VCAM-1 的表达在动脉粥样硬化的发展过程中起保护作用。研究表明 miR-1 和 miR-208 是急性心肌梗死潜在的诊断学标记物^[13],而对于机制方面的研究较少。

虽然 Hcy 与 miRNA 已证实是冠心病的危险因素,但对于两者之间是否存在相互影响尚未见相关报道。Mishra 等^[14]构建 Hcy 相关心力衰竭模型,发现包括 miR-188 在内的 11 种 miRNA 表达水平有显著差异,说明 miRNA 参与到 Hcy 诱导心力衰竭的病理机制当中。本研究中,全体入选人群(包括冠心病患者和对照组)血清 Hcy 水平与 miR-1 和 miR-126 水平呈正相关,偏相关分析校正后相关系数略增加,而 Hcy 与 miR-208 无明显相关性。采用多元线性回归分析后,发现 miR-1、miR-126、Hcy 和冠心病的病变程度有着独立的相关性,它们可能共同参与冠心病动脉粥样硬化的病理过程,且存在相互促进的关系,但其具体机制有待进一步研究。

综上所述,冠心病患者血清 Hcy 和 miRNA(miR-1、miR-126 及 miR-208)均与冠状动脉病变严重程度相关,随着严重程度增加而逐渐升高。与此同时,血清 Hcy 水平受 miR-1、miR-126 的影响,亦随着后者的升高而升高。临床上对冠心病心绞痛患者检测血清 Hcy 和 miRNA(miR-1、miR-126 及 miR-208)水平可以预测患者冠脉病变程度,早期发现

高危人群。血清 Hcy 与 miR-1、miR-126 之间的相互机制,以及它们在冠心病动脉粥样硬化中的发生机制有可能是今后研究的热点问题。

【参考文献】

[1] Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay[J]. Nat Rev Genet, 2010, 11(9):597-610.

[2] Saposnik G, Ray JG, Sheridan P, et al. Homocysteine-Lowering therapy and stroke risk, severity, and disability additional findings from the HOPE 2 trial[J]. Stroke, 2009, 40(4):1365-1372.

[3] Anderson JL, Adams CD, Antman EM, et al. ACC/AHA 2007 guidelines for the management of patients with unstable angina/non-ST-Elevation myocardial infarction; a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the 2002 Guidelines for the Management of Patients With Unstable Angina/Non-ST-Elevation Myocardial Infarction) developed in collaboration with the American College of Emergency Physicians, the Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, and the Society of Thoracic Surgeons endorsed by the American Association of Cardiovascular and Pulmonary Rehabilitation and the Society for Academic Emergency Medicine[J]. J Am Coll Cardiol, 2007, 50(7):e1-e157.

[4] Judkins MP. Selective coronary arteriography I. A percutaneous transfemoral technic[J]. Radiology, 1967, 89(5):815-824.

[5] Gensini GG. A more meaningful scoring system for determining the severity of coronary heart disease[J]. Am J Cardiol, 1983, 51(3):606.

[6] Chen X, Ba Y, Ma L, et al. Characterization of microRNAs in serum; a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases[J]. Cell Res, 2008, 18(10):997-1006.

[7] Tsai JC, Perrella MA, Yoshizumi M, et al. Promotion of vascular smooth muscle cell growth by homocysteine; a link to atherosclerosis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(14):6369-6373.

[8] Perna AF, Ingrosso D, Lombardi C, et al. Possible mechanisms of homocysteine toxicity[J]. Kidney Int Suppl, 2003(84):S137-40.

[9] Wang G, Dai J, Mao J, et al. Folic acid reverses hyper-responsiveness of LPS-induced chemokine secretion from monocytes in patients with hyperhomocysteinemia[J]. Atherosclerosis, 2005, 179(2):395-402.

[10] Zhu GF, Yang LX, Guo RW, et al. microRNA-155 is inversely associated with severity of coronary stenotic lesions calculated by the Gensini score[J]. Coron Artery Dis, 2014, 25(4):304-310.

[11] 杨继玉, 宫剑滨, 王立军, 等. 急性冠状动脉综合征患者血清中炎症因子变化的临床研究[J]. 医学研究生学报, 2012, 25(4):382-386.

[12] Cavarretta E, Chiariello GA, Condorelli G. Platelets, endothelium, and circulating microRNA-126 as a prognostic biomarker in cardiovascular diseases: per aspirin ad astra[J]. Eur Heart J, 2013, 34(44):3400-3402.

[13] D' Alessandria Y, Pompilio G, Capogrossi MC. MicroRNAs and myocardial infarction[J]. Curr Opin Cardiol, 2012, 27(3):228-235.

[14] Mishra PK, Tyagi N, Kundu S, et al. MicroRNAs are involved in homocysteine-induced cardiac remodeling[J]. Cell Biochem Biophys, 2009, 55(3):153-162.

(收稿日期:2014-02-24;修回日期:2014-06-21)

(本文编辑:张仲书; 英文编辑:王建东)

(上接第 362 页)

该联合方案的剂量确定尚有待于大样本、前瞻性、随机双盲实验加以证实。

【参考文献】

[1] 应 瑛, 刘惠芝, 庄云强. 人工全膝关节置换术多模式镇痛疗效分析[J]. 浙江医学, 2012, 34(1):48-49.

[2] 杨 瑾, 于 峰, 葛卫红, 等. 羟考酮与曲马多用于人工关节置换围手术期多模式镇痛的疗效观察[J]. 药学与临床研究, 2013, 21(3):268-270.

[3] 林 燕, 余雪梅, 任瑞芳, 等. 塞来昔布联合曲马多对膝关节置换患者早期康复的影响[J]. 实用药物与临床, 2013, 16(7):575-578.

[4] 黄 伟. 塞来昔布在骨科围手术期超前镇痛中的作用[J]. 国际骨科学杂志, 2010, 31(6):374-375.

[5] Dahl JB, Miniche S. Preemptive analgesia[J]. Br Med Bull, 2004, 71(1):13-27.

[6] 蒋宗明, 陈忠华, 郑羨河, 等. 帕瑞昔布钠超前镇痛对骨科患者术后血 IL-10、IL-6 和 IL-8 水平的影响[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(13):1485-1486.

[7] Reuben SS, Ekman EF, Raghunathan K, et al. The effect of cyclooxygenase-2 inhibition on acute and chronic donor-site pain after spinal-fusion surgery[J]. Reg Anesth Pain Med, 2006, 31(1):6-13.

[8] 彭 宇, 蒋宗滨. 围术期口服药物治疗术后急性疼痛的临床研究[J]. 微创医学, 2010, 5(1):65-67.

[9] 王桂龙, 王志萍. 超前应用曲马多联合小剂量芬太尼防治全麻苏醒期躁动的临床观察[J]. 实用药物与临床, 2012, 15(4):213-214.

[10] Radbruch L, Grond S, Lehmann KA. A risk-benefit assessment of tramadol in the management of pain[J]. Drug Saf, 1996, 15(1):8-29.

[11] Jack NT, Liem EB, Vonhogen LH. Use of a stimulating catheter for total knee replacement surgery: preliminary results[J]. Br J Anaesth, 2005, 95(2):250-254.

[12] 董丰琴, 熊秀萍, 陈 丹, 等. 骨科患者术后疼痛管理的新进展[J]. 东南国防医药, 2013, 15(6):615-617.

(收稿日期:2014-05-16;修回日期:2014-06-27)

(本文编辑:黄攸生; 英文编辑:王建东)