

急性心肌炎患者血浆 miR-133 和 miR-1291 的表达及临床意义

董 虹, 刘天春[△] (湖北省荆州市第一人民医院检验科 434000)

【摘要】 目的 探讨急性心肌炎患者血浆 miR-133 和 miR-1291 的表达及临床意义。**方法** 2010~2014 年该院收治的 38 例急性心肌炎患者作为观察组, 选取同期进行体检的 49 例健康者作为对照组, 采用实时定量 PCR (qRT-PCR) 检测 2 组研究对象血浆 miR-133 和 miR-1291 的表达情况。**结果** 高胆固醇是急性心肌炎发病的危险因素, 2 组研究对象差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 而在高血压、糖尿病、吸烟、饮酒等方面, 2 组研究对象差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。miR-133 和 miR-1291 在观察组患者血浆中的表达水平平均高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 同时 miR-133 和 miR-1291 在急性心肌炎患者急性期的表达水平高于恢复期, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** miR-133 和 miR-1291 在急性心肌炎患者血浆中高表达, 其急性期表达水平高于恢复期, miR-133 和 miR-1291 可能参与急性心肌炎的发生发展。

【关键词】 miR-133; miR-1291; 急性心肌炎; 血浆

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2016.04.016 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2016)04-0477-03

The expression and clinical significance of miR-133 and miR-1291 in plasma of acute myocarditis patients DONG Hong, LIU Tian-chun[△] (Department of Clinical Laboratory, the First People's Hospital of Jingzhou City, Jingzhou, Hubei 434000, China)

【Abstract】 Objective To analyze the expression and clinical significance of miR-133 and miR-1291 in plasma of acute myocarditis patients. **Methods** 38 patients with acute myocarditis were chosen as the observation group during the time from 2010 to 2014 in our hospital, and 49 cases which carried out healthy physical examination in the same period were chosen as the control group, the 2 groups matched in sex and age. The correlation between the characteristic and acute myocarditis were compared by statistical methods. The expression of miR-133 and miR-1291 were detected by qRT-PCR. **Results** Hypercholesterolemia is the risk factor of acute myocarditis, there are significant differences between two group ($P < 0.05$), and there are no significant differences between the two group in the aspects of hypersension, diabetes, smoking and alcohol drinking ($P > 0.05$). The expression level of miR-133 and miR-1291 in acute myocarditis patients were significantly higher than the control group ($P < 0.05$), and the expression level of miR-133 and miR-1291 in acute stage were higher than the convalescent stage ($P < 0.05$). **Conclusion** The level of miR-133 and miR-1291 were high expression in plasma of acute myocarditis patients, the express level in acute stage is higher than convalescent stage, suggesting the 2 miRNAs may participate in the occurrence and development of acute myocarditis.

【Key words】 miR-133; miR-1291; acute myocarditis; plasma

急性心肌炎是一种严重的心肌损害性疾病, 也是导致 40 岁以下青壮年猝死的主要原因之一。由于急性心肌炎在早期临床无明显症状, 但其病情变化快, 病程短, 病死率高^[1-2]。因此, 寻找急性心肌炎的分子标志物, 对预防其发生有着重要的临床意义。miRNAs 是真核生物中发现的一类内源性的、具有调控功能的非编码 RNA, 长度约为 20~25 个核苷酸。成熟的 miRNAs 可通过碱基互补配对的方式识别靶 mRNA, 并根据互补程度的不同指导沉默复合体降解靶 mRNA 或者阻遏靶 mRNA 的翻译^[3]。目前研究已发现数千种 miRNAs, 这些 miRNAs 调节人类约 1/3 的基因表达, 参与包括个体生长、分化、发育、凋亡、脂类代谢、激素分泌、肿瘤发生等多种生理和病理过程^[4]。现探讨急性心肌炎患者血浆中 miR-133 和 miR-1291 的表达及临床意义, 为其预防和治疗提供理论依据。报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2010~2014 年该院收住的 38 例急性心

肌炎患者作为观察组, 其中急性期 23 例, 恢复期 15 例; 男 20 例, 女 18 例, 年龄 30~67 岁, 平均年龄 (47.7 ± 3.2) 岁。选取同期健康体检者 49 例作为对照组, 男 25 例, 女 24 例, 年龄 29~69 岁, 平均年龄 (49.4 ± 3.0) 岁。2 组研究对象的年龄、性别等一般资料比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 具有可比性。

1.2 miRNA 的提取 采集 2 组研究对象的静脉血 2 mL 置于 EDTA 抗凝管中, 3 000 r/min, 离心 5 min, 吸取上清液于 -80 ℃ 冰箱保存, 备用。miRNAs 的提取使用 miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen); 取血浆 200 μ L 加入 1 mL QIAzol Lysis Reagent, 混匀后室温孵育 5 min; 继续加入 3.5 μ L 氯仿, 涡旋 15 s 混匀后于室温放置 3 min; 12 000 r/min 4 ℃ 离心机中离心 15 min, 转移上层水相至新 EP 管中, 同时加入 1.5 倍体积的无水乙醇, 混匀。将混合液转移置入有滤膜的收集管中, 离心 30 s 直至混合液完全透过滤膜, 弃滤过液。将 700 μ L miRNA Wash Solution 1 加入至滤膜管中, 8 000 r/min 室温离心 15 s, 弃过滤液。将剩余液体按上述步骤过滤。加入 700 μ L

RWT 缓冲液至滤膜管中,8 000 r/min 离心 15 s 进行洗脱,弃过滤液;加入 500 μ L RPE 缓冲液至滤膜管中,8 000 r/min 离心 15 s 进行洗脱,弃过滤液;加入 500 μ L 80% 的乙醇至滤膜管中,8 000 r/min 离心 2 min 进行洗脱;将滤膜转移至新 EP 管中,离心 5 min 进行干燥。干燥后转移滤膜至新 EP 管中,加入 14 μ L 无 RNA 酶的水,离心 1 min 收集 RNA。紫外分光光度法测定 RNA 浓度后于-80 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

1.3 miRNA 的表达检测 miRNAs 的逆转录使用 Prime-Script[®] RT reagent kit with gDNA Eraser(TaKaRa)试剂盒;miRNAs 的表达检测使用 SYBR[®] Premix Ex TaqTM (Perfect Real Time)试剂盒 (TaKaRa)。miRNAs 的逆转录及扩增引物由广州锐博生物科技有限公司设计合成。PCR 反应参数为:95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s,然后进入扩增阶段,95 $^{\circ}$ C 变性 15 s,58 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,循环 40 次。PCR 反应在 ABI 7300 仪器上进行。以 miR-16 作为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 miR-133 和 miR-1291 的相对表达量。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行数据分析,计量资料使用 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用方差分析,计数资料组间比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 2 组研究对象一般资料结果比较 2 组研究对象的年龄、性别等一般资料比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。2 组高血压、糖尿病、吸烟、饮酒等比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),但高胆固醇则是急性心机炎发病的危险因素,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

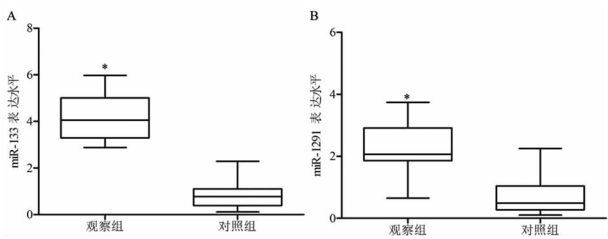
表 1 2 组研究对象一般资料结果比较

项目	<i>n</i>	观察组(<i>n</i>)	对照组(<i>n</i>)	χ^2	<i>P</i>
年龄(岁)	>40	43	17	0.593	0.441
	≤40	44	21		
性别	男性	45	20	0.022	0.881
	女性	42	18		
高血压	有	44	22	1.446	0.229
	无	43	16		
高胆固醇	有	49	28	8.268	0.004
	无	38	10		
糖尿病	有	33	14	0.034	0.854
	无	54	24		
吸烟	有	53	24	0.142	0.706
	无	34	14		
饮酒	有	37	18	0.647	0.421
	无	50	20		

注:与对照组比较,* $P < 0.05$ 。

2.2 2 组研究对象 miR-133 和 miR-1291 表达结果比较 miR-133 在观察组和对照组中的相对表达量分别为(4.25 $\pm$ 1.38)和(0.79 $\pm$ 0.15);miR-1291 在观察组和对照组中的相对表达量分别为(2.17 $\pm$ 0.93)和(0.69 $\pm$ 0.22)。miR-133 和 miR-1291 在观察组患者血浆中的表达水平均显著高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 1。

2.3 miR-133 和 miR-1291 在观察组患者不同时期的表达结果比较 miR-133 和 miR-1291 在观察组患者急性期的表达水平[(3.52 $\pm$ 1.17,1.98 $\pm$ 1.2)]明显高于恢复期[(1.35 $\pm$ 0.72,1.04 $\pm$ 0.81)],差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。



注:与对照组比较,* $P < 0.05$ 。

图 1 miR-133 和 miR-1291 在 2 组中的相对表达水平

表 2 观察组患者不同时期 miR-133 和 miR-1291 水平结果比较($\bar{x} \pm s$)

项目	<i>n</i>	miR-133	miR-1291
急性期	23	3.52 $\pm$ 1.17	1.98 $\pm$ 1.2
恢复期	15	1.35 $\pm$ 0.72*	1.04 $\pm$ 0.81*

注:与急性期比较,* $P < 0.05$ 。

3 讨 论

心机炎是由多种致病因素所引起的复杂疾病,根据病程的发展情况可分为急性或慢性心机炎,急性心机炎易发生心脏电通路功能异常而使青壮年人群猝死^[5]。所以寻找急性心机炎分子诊断标志物至关重要。有研究报道,在心脑血管病变过程中,miR-150 可作为心力衰竭诊断的标志物,而 miR-26a 则与高血压密切相关^[6-7]。因此,本研究致力于寻找急性心机炎的分子标志物。

近年来发现 miRNAs 可在血液中循环并参与多种调控过程。目前心机相关标志物为肌钙蛋白和肌酸激酶,但存在一定的临床限制性。由于血浆中 miRNAs 含量丰富,性质稳定且易于检测,因此通过检测异常表达的 miRNAs 对急性心机炎的诊断和治疗有着重要的临床价值^[8]。Bao 等^[9]报道在急性病毒性心机炎中,miR-155 和 miR-148a 通过抑制转录因子- κ B (NF- κ B) 信号通路减少心脏损伤。Corsten 等^[10]研究报道,在急性心机炎患者和小鼠中,miR-155、miR-146b、miR-21 的表达水平显著上升,同时抑制 miR-155 的表达可减轻单核吞噬细胞引起的心脏侵袭。

miR-133 特异表达于心机和骨骼肌中的 miRNA,包括 miR-133a 和 miR-133b 2 个成员。在 C2C12 成肌细胞中,miR-133a 和 miR-133b 通过负向调控 FGFR1 和 PP2AC 表达,参与 ERK 信号通路,促进成肌细胞的分化并抑制细胞增殖,同时 miR-133 还参与调节心机细胞的肥厚、增生、凋亡、离子通道表达等^[11-13]。miR-1291 定位于第 12 号染色体 SNORA34 基因内,目前研究较少,主要研究其在肿瘤发生中的机制。Benjamin 等^[14]研究显示 miR-1291 在急性心机梗死中异常表达,因此推测 miR-1291 可能在急性心机炎的发生中发挥一定的作用。

本研究结果表明,高胆固醇是急性心机炎发病的危险因素($P < 0.05$),而在高血压、糖尿病、吸烟、饮酒等方面比较,2 组差异无统计学意义($P > 0.05$)。本组通过对 38 例急性心机炎患者和 49 例对照者血浆中 miR-133 和 miR-1291 的表达进行检测,结果提示 miR-133 和 miR-1291 在观察组患者血浆中的表达水平均显著高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),同时 miR-133 和 miR-1291 在观察组患者急性期的表达水平高于恢复期($P < 0.05$)。因此,本组认为 miR-133 和 miR-1291 在急性心机炎的发生、发展中发挥一定的作用,可能发挥正面

抵抗急性心机炎发生的作用。由于本研究样本量有限,后续研究需扩大标本量,深入研究 miR-133 和 miR-1291 作为急性心机炎临床诊断及治疗分子标志物的可行性。

综上所述,本研究结果显示,miR-133 和 miR-1291 在急性心机炎患者血浆中表达明显上升,且其急性期的表达水平高于恢复期,表明 miR-133 和 miR-1291 可能参与了急性心机炎的发生、发展过程。

参考文献

- [1] Breinholt JP, Moulik M, Dreyer WJ, et al. Viral epidemiologic shift in inflammatory heart disease: the increasing involvement of parvovirus B19 in the myocardium of pediatric cardiac transplant patient[J]. J Heart Lung Transplant, 2010, 29(7): 739-746.
- [2] 张辉, 卢新政. 心机炎的研究进展[J]. 国际心血管病杂志, 2013, 40(2): 103-107.
- [3] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell, 2004, 116(28): 281-297.
- [4] Widmer R, Woo-Young C, Joerg H, et al. The association between circulating microRNA levels and coronary endothelial function[J]. PLoS One, 2014, 9(10): e109650.
- [5] 彭健豪, 张连峰. 病毒性心机炎的发病机制[J]. 中国比较医学杂志, 2006, 16(1): 54-57.
- [6] Goren Y, Meiri E, Hogan C, et al. Relation of reduced expression of miR-150 in platelets to atrial fibrillation in patients with chronic systolic heart failure[J]. Am J Cardiol, 2014, 113(21): 976-981.
- [7] Schlosser K, White RJ, Stewart DJ. miR-26a linked to pulmonary hypertension by global assessment of circulating extracellular microRNAs[J]. Am J Respir Crit Care

- Med, 2013, 188(13): 1472-1475.
- [8] 石明, 仇雪梅, 樊红. 血浆 miRNA 检测在肿瘤临床应用的研究进展[J]. 东南大学学报: 医学版, 2012, 31(1): 122-125.
- [9] Bao JL, Lin L. MiR-155 and miR-148a reduce cardiac injury by inhibiting NF- κ B pathway during acute viral myocarditis[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2014, 18(16): 2349-2356.
- [10] Corsten MF, Papageorgiou A, Verhesen W, et al. MicroRNA profiling identifies microRNA-155 as an adverse mediator of cardiac injury and dysfunction during acute viral myocarditis[J]. Circ Res, 2012, 111(4): 415-425.
- [11] Feng Y, Niu LL, Wei W, et al. A feedback circuit between miR-133 and the ERK1/2 pathway involving an exquisite mechanism for regulating myoblast proliferation and differentiation[J]. Cell Death Dis, 2013, 4(6): e934.
- [12] Xu C, Lu Y, Pan Z, et al. The muscle-specific microRNAs miR-1 and miR-133 produce opposing effects on apoptosis by targeting HSP60, HSP70 and Caspase-9 in cardiomyocytes[J]. J Cell Sci, 2007, 120(17): 3045-3052.
- [13] Yin C, Wang X, Kukreja RC, et al. Endogenous micromas induced by heat-shock reduce myocardial infarction following ischemia-reperfusion in mice[J]. FEBS Lett, 2008, 582(56): 4137-4142.
- [14] Benjamin M, Andreas K, Britta V, et al. MicroRNA signatures in total peripheral blood as novel biomarkers for acute myocardial infarction[J]. Basic Res Cardiol, 2011, 106(19): 13-23.

(收稿日期: 2015-06-02 修回日期: 2015-09-20)

(上接第 476 页)

均持续升高, PIP 和 MAP 明显降低, 且应用第 2 剂 PS 12 h 后与应用第 1 剂 PS 12 h 后各数值比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 说明应用第 2 剂后患儿肺氧合功能及肺顺应性得到持续改善。据有关研究数据显示, MAS 肺泡内胎粪及化学性炎性物质对 PS 有抑制作用^[5]。其中多种蛋白质对 PS 的生物活性的抑制作用具有可逆性, 存在竞争机制^[6]。而重复、多次给予外源性 PS 可有效对抗多种蛋白质对 PS 的抑制作用。本研究结果也进一步证实。

另有研究报道, 部分患儿在应用 PS 时可出现肺出血、气胸、颅内出血等并发症, 肺出血可能与使用 PS 后增加肺血管血流, 引起肺组织的充血水肿有关。MAS 患儿呼吸阻力为正常者的 4~5 倍, 肺顺应性为正常者的 1/2~1/3, 因此所需吸气峰压会较正常者高, 应用 PS 后肺顺应性增高, 此时如不及时下调呼吸机参数, 则极易造成气胸甚至纵隔气肿。颅内出血则可能与应用 PS 后增加了肺血流量, 全身血液重新分配, 脑血流增加有关。本研究 50 例患儿未出现以上并发症, 可能与本组使用 PS 后暂缓下调 PEEP, 以维持较高的呼吸末正压, 及时下调 PIP 等有关, 另外, 在用药前应注意维持患儿内环境稳定(如纠正酸中毒、低血压等), 并限制液体质量、减轻肺水肿、扩张肺血管等, 防止发生持续肺动脉高压, 才能保证 PS 持续改善患儿肺顺应性及氧合功能, 提高治愈率。

综上所述, 使用 PS 治疗 MAS 疗效确切, 而重复使用 PS

能更持续、有效地改善 MAS 患儿的肺顺应性及氧合功能, 值得临床推广和应用。

参考文献

- [1] 潘家华. 新生儿胎粪吸入综合征的诊治进展[J]. 临床儿科杂志, 2008, 26(9): 823-826.
- [2] Stevens TP, Sinkin RA. Surfactant replacement therapy[J]. Chest, 2007, 131(25): 1577-1582.
- [3] Corne J, Chupp G, Lee CG, et al. IL-13 stimulate vascular cell growth factor and protects against hyperoxic acute lung injury[J]. J Clin Invest, 2000, 106(10): 783-791.
- [4] 夏耀方, 刘翠青. 外源性肺泡表面活性物质对胎粪吸入综合征患儿肺功能及血管内皮生长因子的影响[J]. 中国实用儿科杂志, 2013, 28(1): 31-33.
- [5] Dargaville PA, South M, McDougall PN. Surfactant and surfactant inhibitors in meconium aspiration syndrome[J]. J Pediatr, 2001, 138(1): 113-118.
- [6] Kobayashi T, Nitta, Ganzuka M, et al. Inactivation of exogenous surfactant by pulmonary edema fluid[J]. Pediatr Res, 1991, 29(5): 353-356.

(收稿日期: 2015-06-25 修回日期: 2015-09-15)