

# 心肌组织特异性微小 RNA-1 在 ST 段抬高型急性心肌梗死患者尿中含量的变化研究

段晓霞 周贤 王晓斌 范忠才 张春祥 陈庄

**【摘要】** 目的 观察心肌组织特异性表达的微小 RNA-1 (microRNA-1, miR-1) 在 ST 段抬高型急性心肌梗死 (STEMI) 患者尿中的变化, 探讨尿 miR-1 在 STEMI 诊断中的潜在作用。方法 20 例 STEMI 患者在发病 12 h 内取尿, 用实时荧光定量逆转录-聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测 miR-1 含量, 同时检测血清心肌肌钙蛋白 I (cTnI) 和肌酸激酶同工酶 (CK-MB) 水平; 以 20 例健康自愿者作为对照。结果 STEMI 患者血 cTnI ( $\mu\text{g/L}$ )、CK-MB ( $\mu\text{g/L}$ ) 和尿 miR-1 的含量 [ 阈值循环 (Ct) 值, Ct 值越低, 表示含量越高 ] 均明显高于健康对照组 (血 cTnI:  $19.27 \pm 7.53$  比  $0.02 \pm 0.01$ , 血 CK-MB:  $93.82 \pm 12.30$  比  $0.86 \pm 0.63$ , 尿 miR-1:  $45.50 \pm 4.21$  比  $52.63 \pm 4.41$ ,  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。当 STEMI 患者血 CK-MB  $< 300 \mu\text{g/L}$  及 cTnI  $< 50 \mu\text{g/L}$  时, 尿 miR-1 含量与 CK-MB、cTnI 值呈直线相关 (尿 miR-1 的 Ct 值与血 CK-MB:  $r = -0.81$ ,  $P < 0.01$ ; 尿 miR-1 的 Ct 值与血 cTnI:  $r = -0.63$ ,  $P < 0.05$ )。结论 尿 miR-1 可作为 STEMI 早期诊断的新型敏感生物学标志物。

**【关键词】** ST 段抬高型急性心肌梗死; 微小 RNA-1; 心肌肌钙蛋白 I; 肌酸激酶同工酶

## Urine cardiac specific microRNA-1 level in patients with ST segment elevation acute myocardial infarction

DUAN Xiao-xia\*, ZHOU Xian, WANG Xiao-bin, FAN Zhong-cai, ZHANG Chun-xiang, CHEN Zhuang.

\*Department of Anesthesiology and Critical Care Medicine, Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan, China

Corresponding author: WANG Xiao-bin, Email: wangxiaobin67@163.com

**【Abstract】 Objective** To observe the change of urine level of cardiac specific microRNA-1 (miR-1) in patients with ST segment elevation acute myocardial infarction (STEMI) and investigate its potential applications. **Methods** Urine samples were collected from 20 STEMI patients within 12 hours after STEMI and from 20 healthy volunteers as control. Urine miR-1 concentrations were measured with real-time quantity reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR), at the same time serum cardiac troponin I (cTnI) and MB isoenzyme of creatine kinase (CK-MB) concentrations were measured. **Results** Serum level of cTnI ( $\mu\text{g/L}$ ), CK-MB ( $\mu\text{g/L}$ ) and urine level of miR-1 in STEMI patients were obviously higher than those in healthy control group [cTnI in blood:  $19.27 \pm 7.53$  vs.  $0.02 \pm 0.01$ , CK-MB in blood:  $93.82 \pm 12.30$  vs.  $0.86 \pm 0.63$ , miR-1 in urine (Ct value):  $45.50 \pm 4.21$  vs.  $52.63 \pm 4.41$ ,  $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ]. The urine miR-1 level in patients with STEMI had a strong correlation with serum CK-MB or cTnI when CK-MB  $< 300 \mu\text{g/L}$  and cTnI  $< 50 \mu\text{g/L}$  (Ct value of urine miR-1 with blood CK-MB:  $r = -0.81$ ,  $P < 0.01$ ; Ct value of urine miR-1 with blood cTnI:  $r = -0.63$ ,  $P < 0.05$ ). **Conclusion** The results suggest that urine miR-1 could be a novel sensitive biomarker the early diagnosis of SETAMI.

**【Key words】** ST segment elevation acute myocardial infarction; MicroRNA-1; Cardiac troponin I; MB isoenzyme of creatine kinase

微小 RNAs (microRNAs, miRNAs) 是近年发现的一类细胞中内源性、小的、非编码的 RNAs, 它通过对 mRNA 进行切割或抑制其翻译达到对靶目标 mRNA 的负反馈调控作用<sup>[1-2]</sup>。有研究揭示, miRNAs 在许多疾病组织中有特异性异常表达<sup>[3]</sup>。但与肿瘤组织不一样, 某些疾病组织如心脏和脑组织临床上

不易获得, 克服临床基因诊断心血管疾病障碍一个好的方法是选择外周血或尿。本课题组前期的研究发现, 血浆心肌特异性的 miRNA-1 (miR-1) 可作为急性心肌梗死 (AMI) 新的敏感生物学标志<sup>[4-5]</sup>。本研究进一步检测 STEMI 患者尿 miR-1 表达情况, 并探讨其在早期诊断 STEMI 中的作用。

## 1 资料与方法

**1.1 病例纳入标准及排除标准:** ①纳入标准: 心肌缺血导致特征性胸痛至少持续 30 min; 胸痛 6 h 内心电图至少 2 个导联出现 ST 段抬高 0.1 mV; 血清心肌肌钙蛋白 I (cTnI) 和肌酸激酶同工酶 (CK-MB) 升高超过正常参考值至少 2 倍。②排除标准: 糖尿

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2012.12.003

基金项目: 四川省科技厅国际合作项目 (2011HH0031); 美国 NIH 项目 (HL080133, HL095707)

作者单位: 646000 四川, 泸州医学院附属医院麻醉与危重病教研室 (段晓霞、王晓斌), 内科教研室 (周贤、范忠才), 分子中心实验室 (史小玲、陈庄); 60612 芝加哥, 美国拉什大学药理系 (张春祥)

通信作者: 王晓斌, Email: wangxiaobin67@163.com

病患者。本研究得到医院伦理委员会同意,患者签署知情同意书。

**1.2 一般资料:**采用前瞻性研究方法,选择 2010 年 9 月至 2011 年 12 月的 STEAMI 患者,本研究共纳入 20 例 STEAMI 患者,其中男性 14 例,女性 6 例;年龄 55~78 岁,平均(67±11)岁;11 例患者冠状动脉(冠脉)造影结果显示至少 1 支血管病变;6 例患者有高血压并一直使用抗高血压药物治疗[血管紧张素 II 受体抑制剂和(或)β 受体阻滞剂];7 例患者有高脂血症。以同期年龄和性别匹配的健康自愿者 20 例作为对照。

**1.3 检测指标及方法**

**1.3.1 标本收集和处理:**在 STEAMI 患者出现典型胸痛 12 h 内留取外周血和尿标本,健康对照组体检时留取标本;于 -80℃ 下保存待测。

**1.3.2 血清 cTnI 和 CK-MB 含量测定:**用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清 cTnI 和 CK-MB 含量。操作按照试剂盒(美国 Life Diagnostics 公司提供)说明书进行。

**1.3.3 RNA 分离和实时荧光定量逆转录-聚合酶链反应(qRT-PCR)检测 miR-1 表达:**尿标本与 TRIzol(美国 Invitrogen 公司)按 1:3 比例混合,并振荡 30 s。使用 miRNA 抽提试剂盒(德国 Qiagen 公司),按生产厂家说明分离 RNA。使用 miR-1 特异引物 5'-GTCGTATCCAGTGCCTGTCGTGGAGTCGGCAATTGCACTGGATACGACTACATAC-3'(美国 ABI 公司提供),用 Bio-Rad 生物分析仪(美国 Bio-Rad 公司)检测 miR-1 表达情况。

**1.3.4 qRT-PCR 数据分析:**阈值循环(Ct)被定义为荧光达到给定阈值的分数 PCR 循环数,指 PCR 扩增过程中,目的基因 cDNA 扩增产物荧光信号超过基线值(进入指数增长期)时的循环数,目的基因起始拷贝数越多,达到指数扩增所需循环数越少,即 Ct 值越小。PCR 循环数越少,表明其中含量相对较高;与健康对照组比较,得出相差的 PCR 循环数后,可知道与健康者含量的相差倍数(2<sup>ΔCt</sup>)。

**1.4 统计学分析:**所有结果以均数±标准误( $\bar{x} \pm s_x$ )表示,采用非成对 t 检验对资料进行统计分析;使用线性相关分析血清 cTnI、CK-MB 含量与尿 miR-1 的关系,P<0.05 为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 STEAMI 患者一般资料(表 1):**STEAMI 组患者既往史明显多于健康对照组(P<0.05),而性别、年龄与健康对照组无明显差异。STEAMI 组患者冠脉

造影有 11 例提示冠脉狭窄,心电图检查有 16 例提示心肌梗死;健康对照组心电图无异常,均未检查冠脉造影。

表 1 STEAMI 患者和健康对照者一般资料比较

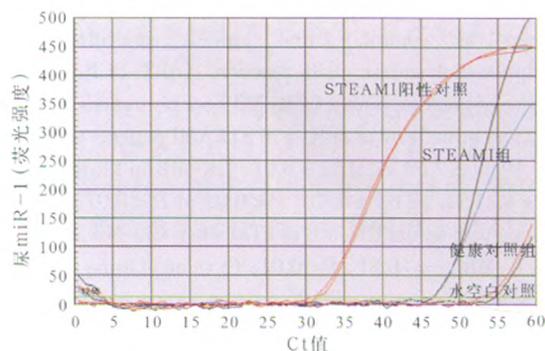
组别	例数	性别(例)		年龄(例)		
		男性	女性	<55 岁	55~70 岁	>70 岁
健康对照组	20	13	7	3	10	7
STEAMI 组	20	14	6	3	9	8

组别	例数	既往史(例) <sup>a</sup>						
		冠心病	高血压	糖尿病	肺部疾病	肾脏疾病	颅脑疾病	手术史
健康对照组	20	1	3	0	2	0	0	1
STEAMI 组	20	8	9	0	4	3	1	4

注:STEAMI:ST 段抬高型急性心肌梗死;两组比较,<sup>a</sup>P<0.05

**2.2 尿中 miR-1 含量(图 1):**qRT-PCR 结果显示,STEAMI 尿 miR-24 阳性对照在 30 个 Ct 值出现扩增;水空白对照在 60 个 Ct 值内未见扩增;健康对照组尿 miR-1 平均 Ct 值为 52.63±4.41;STEAMI 组尿 miR-1 平均 Ct 值为 45.50±4.21,较健康对照组 Ct 值低 7 个循环,因此 STEAMI 组尿 miR-1 含量相对健康对照组高 2<sup>7</sup> 倍(128 倍),差异有统计学意义(P<0.01)。



注:STEAMI:ST 段抬高型急性心肌梗死,miR-1:微小 RNA-1, qRT-PCR:实时荧光定量逆转录-聚合酶链反应,Ct 值:阈值循环

图 1 STEAMI 患者尿中 miR-1 qRT-PCR 的 Ct 值

**2.3 STEAMI 患者血清 cTnI 和 CK-MB 含量与尿 miR-1 相对含量的关系(表 2):**STEAMI 患者血清 CK-MB(μg/L)、cTnI(μg/L)明显高于健康对照者(93.82±12.30 比 0.86±0.63,19.27±7.53 比 0.02±0.01,均 P<0.01)。当 CK-MB<300 μg/L 及 cTnI<50 μg/L 时,STEAMI 患者尿 miR-1 的相对含量随 CK-MB 和 cTnI 值的升高而增加。

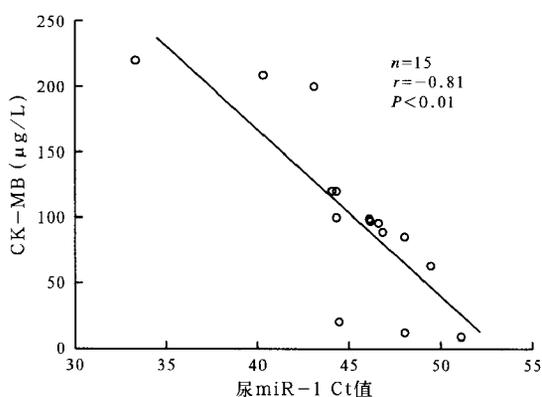
**2.4 STEAMI 患者血清 CK-MB 含量与尿 miR-1 Ct 值的相关性分析(图 2):**<300 μg/L 的 CK-MB 与 STEAMI 12 h 内尿 miR-1 的 Ct 值呈显著负相关

( $r = -0.81, P < 0.01$ )。说明在 STEAMI 患者, 当 CK-MB  $< 300 \mu\text{g/L}$  时, CK-MB 水平与尿 miR-1 含量呈正相关。

表 2 20 例 STEAMI 患者血清 CK-MB、cTnI 与尿 miR-1 相对含量的关系

CK-MB ( $\mu\text{g/L}$ )	miR-1 [升高倍数(例)]	cTnI ( $\mu\text{g/L}$ )	miR-1 [升高倍数(例)]
$< 50$	27( 3)	$< 20$	126(9)
50 ~ 300	302(12)	20 ~ 50	338(6)
$> 300$	58( 5)	$> 50$	58(5)

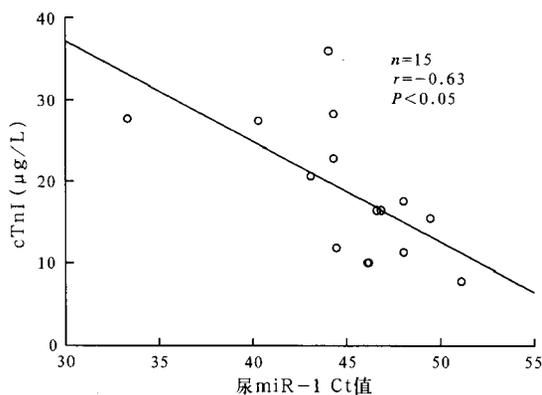
注: STEAMI: ST 段抬高型急性心肌梗死, CK-MB: 肌酸激酶同工酶, cTnI: 心肌肌钙蛋白 I, miR-1: 微小 RNA-1



注: STEAMI: ST 段抬高型急性心肌梗死, CK-MB: 肌酸激酶同工酶, miR-1: 微小 RNA-1, Ct 值: 阈值循环

图 2 STEAMI 患者 12 h 内血清 CK-MB 含量与尿 miR-1 Ct 值的相关性

2.5 STEAMI 患者血清 cTnI 含量与尿 miR-1 Ct 值的相关性分析 (图 3):  $< 50 \mu\text{g/L}$  的 cTnI 与 STEAMI 12 h 内尿 miR-1 的 Ct 值呈显著负相关 ( $r = -0.63, P < 0.05$ )。说明在 STEAMI 患者, 当 cTnI  $< 50 \mu\text{g/L}$ , cTnI 水平与尿 miR-1 含量呈正相关。



注: STEAMI: ST 段抬高型急性心肌梗死, cTnI: 心肌肌钙蛋白 I, miR-1: 微小 RNA-1, Ct 值: 阈值循环

图 3 STEAMI 患者 12 h 内血清 cTnI 含量与尿 miR-1 Ct 值的相关性

### 3 讨论

AMI 是临床常见的心血管急症, 也是造成急性死亡的重要原因<sup>[6]</sup>。但目前包括血清心肌酶学检查在内的各种检测手段仅可用于评估病情严重程度, 仍不能满意地对 AMI 作出早期确诊<sup>[7]</sup>。此外, 检测方法的标准化、假阳性等问题都会影响 AMI 的诊断, 因此, 寻找心血管疾病新的诊断标志物十分重要<sup>[8-10]</sup>。

miRNAs 是正常发育、生理以及疾病状态等方面重要的调节因子。近年研究揭示, miRNAs 在许多疾病组织中存在异常表达, 且部分 miRNAs 是该疾病特有的, 可作为新的疾病诊断指标<sup>[11-12]</sup>。有研究发现, AMI 时疾病心肌组织能释放特异性的 miRNAs 进入循环血液, 大鼠心肌组织中 miR-1 表达最为丰富, 且是心肌和骨骼肌中所特有的 miRNAs, 大鼠心肌细胞释放的 miR-1 在培养液中可持续稳定 24 h 以上; AMI 患者血清 miR-1 含量迅速升高, 6 h 达到峰值, 证实血清中 miR-1 含量可作为 AMI 的一个新的敏感生物学指标<sup>[4-5]</sup>。本课题组前期动物实验发现, 血中 miR-1 能排泄到尿中并能在尿中检测到, 且在 AMI 12 h 内达到峰值, 因此, 本研究中采集 STEAMI 患者发病后 12 h 内的尿液进行观察, 发现 20 例 STEAMI 患者 12 h 内尿液中均能检出 miR-1, 平均含量高于健康对照组 128 倍。当 CK-MB  $< 300 \mu\text{g/L}$  及 cTnI  $< 50 \mu\text{g/L}$  时, STEAMI 患者 12 h 内尿 miR-1 含量与血清 CK-MB、cTnI 浓度呈直线正相关; CK-MB 在 50 ~ 300  $\mu\text{g/L}$  时 STEAMI 12 h 内尿 miR-1 的含量平均较健康对照组升高 302 倍, 而 cTnI 在 20 ~ 50  $\mu\text{g/L}$  时较健康对照组升高 338 倍。

AMI 后 CK-MB 释放到血液中, 发病后 3 ~ 4 h 开始升高, 但小肠、舌、膈肌、子宫、前列腺和肝脏疾病、心肌疾病、心肌炎、骨骼肌创伤、肺动脉栓塞、休克及糖尿病等疾病中也可存在少量 CK-MB, 因此检测 CK-MB 可导致假阳性。有报道用 cTnI 诊断 AMI 的特异性可高达 100%, 而 cTnI 在早期诊断 AMI 方面的价值不如 CK-MB<sup>[13-14]</sup>。但本研究发现尿 miR-1 与血 CK-MB、cTnI 均呈正相关, miR-1 是 AMI 发生后既灵敏又有特异性的指标, 这克服了 cTnI 特异性高但灵敏度低、CK-MB 灵敏度高而特异性差的矛盾。本研究还发现血 CK-MB  $> 300 \mu\text{g/L}$  及 cTnI  $> 50 \mu\text{g/L}$  的 STEAMI 患者心功能都很差, 12 h 内仅有少量尿液, 有的甚至在 24 h 内死亡, 其尿中 miR-1 的含量仍然高于健康对照组 20 倍以上, 但与心肌酶学指标无相关性, 可能是因为严重的 STEAMI 患

者,心功能差、每搏量减少、肾脏灌注压低导致少尿,测到的 miR-1 含量较低,不能适时反映患者的病情所致。

虽然尿中 miR-1 可能是 STEAMI 的早期重要生物学标志,由于检测手段复杂,操作要求精确度高,尤其检测耗时,容易贻误治疗时机,不如心肌酶学检测便捷省时,尚不适合用于临床诊断。随着 PCR 仪器敏感度提高,检测方法的改进,高特异性的尿 miR-1 必将简化检测过程、缩短检测时间,为 STEAMI 的早期诊断提供支持。

### 参考文献

- [1] Zhang C. MicroRNomics: a newly emerging approach for disease biology. *Physiol Genomics*, 2008, 33: 139-147.
- [2] Hayashita Y, Osada H, Tatematsu Y, et al. A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Res*, 2005, 65: 9628-9632.
- [3] Cheng Y, Liu X, Yang J, et al. MicroRNA-145, a novel smooth muscle cell phenotypic marker and modulator, controls vascular neointimal lesion formation. *Circ Res*, 2009, 105: 158-166.
- [4] Cheng Y, Tan N, Yang J, et al. A translational study of circulating cell-free microRNA-1 in acute myocardial infarction. *Clin Sci (Lond)*, 2010, 119: 87-95.
- [5] 周贤, 王晓斌, 姚怡, 等. 心肌组织特异性 microRNA-1 在 ST 段抬高急性心肌梗死患者血中含量变化的研究. *中国急救医学*, 2012, 32: 579-582.
- [6] 丁邦晗, 邹旭. 全面理解全球心肌梗死统一定义更新急性心肌梗死的诊治思维. *中国中西医结合急救杂志*, 2009, 16: 308-309.
- [7] 孙红. N-末端脑钠肽前体及心肌肌钙蛋白 I 与慢性心力衰竭的关系. *中国中西医结合急救杂志*, 2011, 18: 235-236.
- [8] Adachi T, Nakanishi M, Otsuka Y, et al. Plasma microRNA 499 as a biomarker of acute myocardial infarction. *Clin Chem*, 2010, 56: 1183-1185.
- [9] Ji X, Takahashi R, Hiura Y, et al. Plasma miR-208 as a biomarker of myocardial injury. *Clin Chem*, 2009, 55: 1944-1949.
- [10] 程文伟, 孟庆义, 杭荣华. 乳酸脱氢酶同工酶 LD1/LD2 比值在急性心肌梗死诊断中的意义. *中国危重病急救医学*, 2001, 13: 601-603.
- [11] Cheng CW, Wang HW, Chang CW, et al. MicroRNA-30a inhibits cell migration and invasion by downregulating vimentin expression and is a potential prognostic marker in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 2012, 134: 1081-1093.
- [12] Chen L, Jiang M, Yuan W, et al. miR-17-5p as a novel prognostic marker for hepatocellular carcinoma. *J Invest Surg*, 2012, 25: 156-161.
- [13] Abbas NA, John RI, Webb MC, et al. Cardiac troponins and renal function in nondialysis patients with chronic kidney disease. *Clin Chem*, 2005, 51: 2059-2066.
- [14] 王虹, 刘石, 邢艳琳, 等. 肌酸激酶同工酶质量判定肌病心肌损害的局限性. *中国危重病急救医学*, 2011, 23: 723-726.

(收稿日期: 2012-09-03)

(本文编辑: 李银平)

## · 科研新闻速递 ·

### α7 烟碱型乙酰胆碱受体介导动脉压力感受器对缺血性卒中的保护作用

压力感受器敏感性下降与多种心血管疾病包括卒中不良预后具有相关性,但两者相关性的具体分子机制不清。为此,第二军医大学研究人员进行了相关研究,旨在证明动脉压力感受器对缺血性卒中的保护作用是由 α7 烟碱型乙酰胆碱受体(α7nAChR)介导的。研究人员通过结扎大脑中动脉(MCAO)制备大鼠、小鼠卒中模型;通过主动脉窦去神经(SAD)的方法损伤动脉压力感受器的功能;应用抗胆碱酯酶剂激活胆碱能系统并增加内源性乙酰胆碱(ACh)的产生。结果发现:SAD 大鼠囊泡乙酰胆碱转运体和 α7nAChR 表达降低,而应用新斯的明能显著降低 MCAO 大鼠梗死面积,新斯的明的保护作用可被选择性 α7nAChR 拮抗剂维库溴铵拮抗,而不能被 nAChR 拮抗剂山莨菪碱拮抗。此外,在 α7nAChR 基因敲除小鼠中新斯的明无上述保护作用。在培养的神经元细胞中,ACh 可抑制双氧水诱导的细胞死亡。在培养的小神经胶质细胞中,ACh 可降低脂多糖引起的促炎细胞因子的释放,而 ACh 的上述作用可被 α7nAChR 拮抗剂所阻断。研究人员据此得出结论,动脉压力感受器对缺血性卒中的保护作用是由 α7nAChR 介导的。

杜明华, 编译自《CNS Neurosci Ther》, 2012, 18: 918-926; 胡森, 审校

### 主动脉僵硬度与冠状动脉血流速度储备之间的关系

有研究表明,主动脉僵硬度增加患者冠状动脉血流速度储备(CFR)会降低,而经食管超声心动图检查术(TEE)能同时评价 CFR 和主动脉僵硬度。为此,匈牙利研究人员进行了相关研究,旨在验证主动脉僵硬度[以血管压力-应变弹性模量( $E_p$ )表示]增加能否作为冠心病疑似患者 CFR 降低的预测指标。该研究共纳入 158 例冠心病疑似患者。与 CFR 正常患者相比,CFR 异常患者( $CFR < 2$ )的主动脉粥样硬化评分( $1.31 \pm 0.68$  比  $1.02 \pm 0.89$ ,  $P < 0.05$ )及  $E_p$  (mm Hg:  $892 \pm 594$  比  $723 \pm 495$ ,  $P < 0.05$ ,  $1 \text{ mm Hg} = 0.133 \text{ kPa}$ )明显增加。进一步分析发现, $E_p \geq 670 \text{ mm Hg}$  是预测 CFR 受损的临界值(敏感性 & 特异性均为 61%);回归分析发现主动脉粥样硬化评分增高(风险比为 2.01,  $P < 0.05$ )和  $E_p$  增高(风险比为 1.10,  $P < 0.05$ )是 CFR 降低的独立预测因子。因此,研究人员认为,主动脉僵硬度增加能作为冠心病疑似患者 CFR 受损的预测指标。

罗红敏, 编译自《Acta Physiol Hung》, 2012, 99: 271-278; 胡森, 审校