

## ST 段抬高型急性心肌梗死患者外周血心肌特异性微小 RNA-208a 水平的变化

姚怡 周贤 王晓斌 段晓霞 张春祥 史小玲 陈庄 范忠才

**【摘要】 目的** 观察心肌特异性微小 RNA-208a(microRNA-208a, miR-208a)在 ST 段抬高型急性心肌梗死(STEAMI)患者血中的含量变化,探讨血 miR-208a 在 STEAMI 诊断中的作用。**方法** 采集 30 例 STEAMI 患者发病 12 h 内的外周血,用实时荧光定量逆转录-聚合酶链反应(qRT-PCR)检测血中 miR-208a 相对含量,同时用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清心肌肌钙蛋白 I(cTnI)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)含量。以 30 例健康者血标本作为对照。**结果** STEAMI 患者血 cTnI( $\mu\text{g/L}$ )、CK-MB( $\mu\text{g/L}$ )含量明显高于健康对照者(cTnI:  $17.72 \pm 8.43$  比  $0.05 \pm 0.01$ , CK-MB:  $250.83 \pm 177.26$  比  $71.20 \pm 20.50$ , 均  $P < 0.01$ )。在 PCR 60 个循环内,健康对照者血均未能检出 miR-208a, STEAMI 患者血中可检出 miR-208a(0~6 h 为  $44.95 \pm 4.77$ , 6~12 h 为  $43.98 \pm 4.68$ );以健康对照者血 miR-208a 阈值循环(Ct)值 60 为基础进行统计,AMI 患者血 miR-208a 相对含量至少高于健康对照者  $2^{15}$  倍以上,两组比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。**结论** 血 miR-208a 可作为 STEAMI 患者早期诊断的新型敏感生物学标志。

**【关键词】** ST 段抬高型急性心肌梗死; 微小 RNA-208a; 心肌肌钙蛋白 I; 肌酸激酶同工酶

**Changes in cardiac specific microRNA-208a level in peripheral blood in ST segment elevation acute myocardial infarction patients** YAO Yi \*, ZHOU Xian, WANG Xiao-bin, DUAN Xiao-xia, ZHANG Chun-xiang, SHI Xiao-ling, CHEN Zhuang, FAN Zhong-cai. \*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 serum cardiac specific microRNA-208a (miR-208a) levels in ST segment elevation acute myocardial infarction (STEAMI) patients, and to explore the role of serum miR-208a levels in the diagnosis of STEAMI. **Methods** The serum miR-208a concentrations were assessed within 12 hours after STEAMI, while 30 healthy individuals as control. Serum miR-208a concentrations were measured with real-time quantity reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR), and serum cardiac troponin I (cTnI) or MB isoenzyme of creatine kinase (CK-MB) concentrations were measured with enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** The contents of serum cTnI ( $\mu\text{g/L}$ ) or CK-MB ( $\mu\text{g/L}$ ) in STEAMI patients were significantly higher than those in healthy individuals (cTnI:  $17.72 \pm 8.43$  vs.  $0.05 \pm 0.01$ , CK-MB:  $250.83 \pm 177.26$  vs.  $71.20 \pm 20.50$ , both  $P < 0.01$ ). Serum miR-208a concentrations were detected in all individuals with STEAMI within 60 PCR cycle (0-6 hours:  $44.95 \pm 4.77$ , 6-12 hours:  $43.98 \pm 4.68$ ), but were beyond detection for all individuals in the healthy control group. The serum miR-208a relative levels in STEAMI patients were at least more than  $2^{15}$  fold than that in healthy persons, compared with qRT-PCR (Ct=60) of miR-208a in healthy control persons ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** Serum miR-208a may be a new biomarker the early diagnosis of STEAMI patients.

**【Key words】** ST segment elevation acute myocardial infarction; MicroRNA-208a; Cardiac troponin I; MB isoenzyme of creatine kinase

微小 RNAs (microRNAs, miRNAs) 是近年发现的一类细胞内小的非编码 RNAs, 它通过对 mRNA 切割来抑制其翻译达到对靶目标 mRNA 的负反馈

调控作用<sup>[1]</sup>, 可直接调节大约 30% 的细胞内基因, 是机体正常发育、生理和疾病状态包括肿瘤、心血管疾病方面重要的调节因子<sup>[2]</sup>。许多疾病组织中 miRNAs 存在异常表达, 且部分 miRNAs 是该疾病特有的<sup>[3]</sup>。研究发现疾病状态下检测组织中某些特异性的 miRNAs 可用于疾病的诊断<sup>[4-5]</sup>。然而一些疾病组织如心肌和大脑不如肿瘤组织容易获取, 依靠检测组织中 miRNAs 的含量辅助诊断心血管和神经系统疾病存在很大困难。目前研究发现, 来自这些疾病组织的 miRNAs 能进入外周血液循环系统, 通过检测

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2012.12.005

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(姚怡、王晓斌、段晓霞), 内科教研室(周贤、范忠才), 分子中心实验室(史小玲、陈庄); 美国新泽西医学院麻醉与危重病教研室(张春祥)

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

血中某些 miRNAs 含量也可辅助诊断该类疾病<sup>[6-8]</sup>。相关动物实验研究证实,miR-208a 仅存在于大鼠心肌组织中,且血中 miR-208a 含量可作为心肌损伤的生物学标志<sup>[9-10]</sup>。最近有研究者对人体各组织和细胞中 671 种 miRNAs 含量进行了分析,发现 miR-208a、miR-208b 仅存在于心肌组织中<sup>[6,11]</sup>。因此本研究希望通过检测 ST 段抬高型急性心肌梗死 (STEMI) 患者心肌梗死(心梗)后 12 h 内外周血中 miR-208a 的表达情况,来探讨血 miR-208a 能否作为临床 STEAMI 的生物学标志物。

1 资料与方法

1.1 患者纳入标准:①心肌缺血致特征性胸痛至少持续 30 min; ②胸痛 6 h 内心电图至少 2 个导联出现 ST 段抬高 0.1 mV; ③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; ④本研究得到泸州医学院附属医院伦理委员会同意,患者签署知情同意书。

1.2 患者排除标准:①严重肝肾功能不全; ②恶性肿瘤; ③急慢性感染性疾病; ④糖尿病及其他自身免疫性疾病。

1.3 标本收集和处理:在出现典型胸痛 12 h 内采集患者外周血,离心取血清 -80 °C 保存。留取年龄和性别匹配的 30 例健康自愿者血标本进行对照。

1.4 血清心肌酶 cTnI、CK-MB 检测:采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清 cTnI 和 CK-MB 含量,按照试剂盒(美国 Life Diagnostics 公司)说明操作。

1.5 RNA 分离和实时荧光定量逆转录-聚合酶链反应(qRT-PCR)检测 miR-208a 表达:血标本与 TRIzol 总 RNA 提取试剂(美国 Invitrogen 公司)按 1:3 比例混合,振荡 30 s。然后按照 miRNAs 分离试剂盒(美国 RNA 生物科技公司)说明分离 RNA。miR-208a 特异引物 AUAAGACGAGCAAAAAGCUU GU, Bio-Rad iQ5 生物分析仪(美国 Bio-Rad 公司)检测 miR-208a 表达。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,

则 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,可知道与健康对照含量的相差倍数(2<sup>ΔCt</sup>)。

1.6 统计学处理:所有正态分布数据以均数 ± 标准误( $\bar{x} \pm s_x$ )表示,偏态分布数据以中位数(四分位间距)表示,以非成对 t 检验对资料行统计评价;使用线性相关分析来决定血清心肌酶学指标与血 miR-208a 的关系, P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 患者一般情况:最终纳入 30 例 STEAMI 患者,其中男性 20 例,女性 10 例;年龄 49 ~ 86 岁,平均(56 ± 20)岁;并发症:冠心病 8 例,高血压 5 例,心脏疾病 3 例;4 例有手术史。21 例患者冠状动脉(冠脉)造影显示至少有 1 支血管病变提示冠脉狭窄;5 例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〕;另有 4 例患者有高脂血症并一直使用他汀类药物治疗。心电图检查有 22 例提示心梗。Killip 泵功能 II 级及以下 19 例;22 例表现为心律失常,其中 16 例为室性期前收缩,多数伴房室传导阻滞或束支传导阻滞,3 例心室纤颤;5 例心源性休克;死亡 2 例。

2.2 健康对照组及 STEAMI 组患者血 cTnI、CK-MB 含量:健康对照组血 CK-MB、cTnI 值在正常参考值范围内〔CK-MB:(71.20 ± 20.50) μg/L、cTnI:(0.05 ± 0.01) μg/L〕;STEMI 组患者血 CK-MB [(250.83 ± 177.26) μg/L]、cTnI [(17.72 ± 8.43) μg/L] 含量明显高于健康对照组(均 P < 0.01)。STEMI 患者 0 ~ 6 h 与 6 ~ 12 h 时段 CK-MB、cTnI 含量无明显差异(均 P > 0.05;表 1)。结合 STEAMI 患者的临床表现发现,有 3 例患者病情严重,表现为心力衰竭(心衰)、低血压、严重心律失常、心电图 ST 段明显抬高,胸痛至采血仅间隔 0.5 h,但血清 cTnI 升高不明显,分别为 3.25、0.98、5.68 μg/L;5 例患者血清 cTnI 水平升高超过 20.00 μg/L,但临床症状轻,仅表现为胸痛、心电图 ST 段抬高。1 例终末期肾衰竭患者血清 cTnI 水平升高达 13.60 μg/L,但经检查确诊该患者未发生急性冠脉综合征(ACS)。3 例 CK-MB 值超过 100.00 μg/L 患者的症状疑似心梗,但经检查确诊为

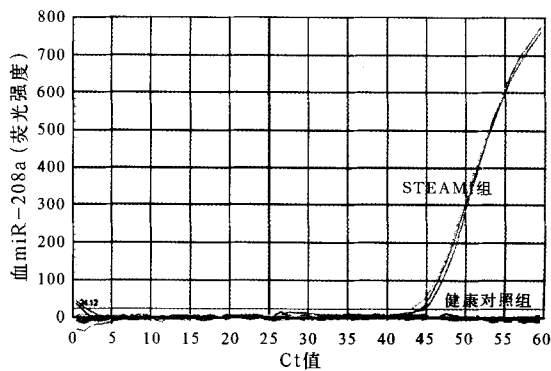
表 1 30 例 STEAMI 患者不同时段血 CK-MB 和 cTnI 含量分布

取血时间	例数	CK-MB 分布(例)			CK-MB ( $\bar{x} \pm s_x$ , μg/L)	cTnI 分布(例)			cTnI ( $\bar{x} \pm s_x$ , μg/L)
		10 ~ 50 μg/L	50 ~ 300 μg/L	>300 μg/L		1 ~ 20 μg/L	20 ~ 50 μg/L	>50 μg/L	
0 ~ 6 h	17	8	6	3	205.00 ± 163.60	7	7	3	15.10 ± 9.20
6 ~ 12 h	13	2	5	6	296.60 ± 190.40	3	5	5	20.30 ± 7.60

注:STEMI: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

消化系统疾病。

**2.3 血 miR-208a 相对含量 (图 1):**qRT-PCR 结果显示, STEAMI 发作 6 h 内 17 例患者血 miR-208a Ct 值为  $44.95 \pm 4.77$ , STEAMI 发作 6~12 h 13 例患者血 miR-208a Ct 值为  $43.98 \pm 4.68$ , 而健康对照组 PCR 60 个循环内未能检测到 miR-208a, STEAMI 患者血 miR-208a 含量明显高于健康对照组。如果以健康对照组血 miR-208a Ct 值 60 为基础进行统计, STEAMI 患者血中 miR-208a 含量是健康对照组的  $2^{15}$  倍以上, 两组 Ct 值比较差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 但 AMI 组两个时段 Ct 值比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。



注: qRT-PCR: 实时荧光定量逆转录-聚合酶链反应, STEAMI: ST 段抬高型急性心肌梗死, miR-208a: 微小 RNA-208a, Ct 值: 阈值循环

图 1 qRT-PCR 法检测 STEAMI 组和健康对照组血 miR-208a Ct 值

**2.4 血 cTnI、CK-MB 含量与 miR-208a Ct 值的相关性分析:** 将 30 例 STEAMI 患者血 CK-MB、cTnI 含量与相应患者的血 miR-208a Ct 值进行相关分析发现, 无论 CK-MB 还是 cTnI 含量与血 miR-208a Ct 值均不具有明显相关性 (均  $P > 0.05$ )。

### 3 讨论

早期正确诊断急性心肌梗死 (AMI) 是保证其有效治疗、减少患者死亡的重要途径<sup>[12]</sup>。如最近马承泰等<sup>[13]</sup>研究发现血浆脑钠肽、超敏 C-反应蛋白可用于 AMI 的预后判断和危险分层; 程文伟等<sup>[14]</sup>报道乳酸脱氢酶同工酶 LD1/LD2 测定有助于 AMI 早期诊断; 也有研究发现 CK-MB 质量对判定肌病心肌损害也存在一定局限性<sup>[15]</sup>。目前临床可通过检查血中心肌酶学指标 cTnI 和 CK-MB 辅助诊断 AMI, 在这些指标中 cTnI 被认为是诊断 AMI 的金标准<sup>[16]</sup>, 但不足之处是大部分 AMI 患者血 cTnI 高峰出现在发病后 12~48 h, 时间偏晚, 且 AMI 患者临床病情程度常与 cTnI 高低不一致。如本组观察到 30 例 STEAMI 患者中有 3 例临床病情很严重, 表现为心

衰、低血压、严重心律失常, 但血清 cTnI 升高不明显; 另外 5 例血清 cTnI 升高超过  $20.00 \mu\text{g/L}$ , 但临床心梗病情轻, 仅表现为胸痛、心电图 ST 段抬高。有研究发现未发生 ACS 的终末期肾衰竭患者血 cTnI 也可升高, 这是因为肾脏可分泌 cTnI 入血<sup>[17]</sup>。而血中 CK-MB 的特异性较 cTnI 更低, 因为在小肠、舌、膈肌、子宫、前列腺, 以及肝脏疾病、骨骼肌创伤、肺动脉栓塞、休克和糖尿病等疾病中 CK-MB 也可明显升高, 导致假阳性。本组患者中有 3 例 CK-MB 值升高, 症状疑似心梗, 但经检查确诊为消化系统疾病。至今为止, 包括血清酶学检查在内的各种检测手段仍然不能满意地对发病 6 h 内的 AMI 作出早期确诊, 传统的心肌酶学指标已经不能准确、快速地诊断和指导治疗。因此, 人们一直在寻找新的高敏感性、高特异性的生物学标志物用于 AMI 的早期诊断。

有证据表明, 循环血中的某些 miRNAs 是许多恶性肿瘤的生物学标志<sup>[18]</sup>, 且有报道血中 miRNAs 相当稳定, 测定血中 miR-141 可作为诊断前列腺癌的指标<sup>[18]</sup>。最近的研究还显示, miR-208a 通过转录后基因表达的调控, 参与调控心脏发育、生理和病理过程, 并只在心脏特异性表达, 心梗后坏死心肌细胞释放 miR-208a 入血<sup>[10]</sup>。动物实验研究发现, 大鼠 AMI 后可检出血清 miR-208a, 持续检测发现 miR-208a 含量在血中较稳定, 且心梗面积越大, 血清 miR-208a 含量越高<sup>[10]</sup>。本研究参照动物实验结果, 按中华医学会检验学会“心肌损伤标志物的应用准则”, 以胸痛出现 6 h 和血中浓度确实增高的心脏标志物作为早期标志物, 将 STEAMI 后 0.3~12 h 采集的标本分为 6 h 内、6~12 h 进行比较。研究发现, 即使在 cTnI 和 CK-MB 升高不明显的情况下, qRT-PCR 也能检出 STEAMI 患者发病 6 h 内、6~12 h 血 miR-208a, 且两个时段血 miR-208a 含量差异不明显, 而 30 例健康对照者在 Ct 值 60 内未能检出。本研究中假定健康对照者血 miR-208a Ct 值为 60, STEAMI 患者血中 miR-208a 含量仍是健康对照者  $2^{15}$  倍以上, 远远高于健康对照者, 可见心肌细胞特异性的生物学标志 miR-208a 在心肌细胞坏死后即能在血液中检测出来。本研究中在 STEAMI 发生后最早检测到的 miR-208a 距发病仅 0.3 h, 这远比 AMI 后最早在血液中能检测到 cTnI 和 CK-MB 的时间要短, 说明 miR-208a 释放入血快, 因此血 miR-208a 可能比 cTnI 和 CK-MB 更适合作为 STEAMI 的生物学标志; AMI 后 6 h 内的高检出率证

明循环血中 miR-208a 可作为 STEAMI 患者新的敏感生物学标志。

将 30 例 STEAMI 患者血 CK-MB、cTnI 含量与血 miR-208a Ct 值进行相关分析发现,无论 CK-MB 还是 cTnI 含量与血 miR-208a Ct 值均无明显相关性,分析其原因可能有:①由于健康者血 miR-208a 含量很低,甚至无,所以 STEAMI 患者血 miR-208a 含量相对于健康对照者则很高,可高达 2<sup>15</sup> 倍,而本研究中未进行血 miR-208a 实际含量测定,因此,STEAMI 患者血 miR-208a Ct 值与血 cTnI、CK-MB 含量相关性分析结果可能不能反映 STEAMI 患者血 miR-208a 的实际含量与血 cTnI、CK-MB 含量的相关性。②STEAMI 患者血 cTnI 出现的高峰时间是 AMI 发作后 12~24 h,而 AMI 后 miR-208a 可以很快在血中检测出,这也可能是导致 STEAMI 患者血 CK-MB、cTnI 含量与血 miR-208a 相对含量不具有明显相关性的原因之一。

虽然外周血 miR-208a 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,不如血心肌酶学指标检测便捷省时,尚不适合用于临床诊断。但随着 PCR 仪器敏感度提高,检测方法的改进,必将简化检测过程、缩短检测时间,高特异性的血 miR-208a 必将为 STEAMI 的早期诊断提供支持。

参考文献

[1] Pushparaj PN, Aarathi JJ, Kumar SD, et al. RNAi and RNAa—the yin and yang of RNAome. *Bioinformation*, 2008, 2: 235–237.

[2] Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, 2005, 120: 15–20.

[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 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.

[5] 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.

[6] Adachi T, Nakanishi M, Otsuka Y, et al. Plasma microRNA 499 as a biomarker of acute myocardial infarction. *Clin Chem*, 2010, 56: 1183–1185.

[7] 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.

[8] Li X, Khanna A, Li N, et al. Circulatory miR34a as an RNA-based, noninvasive biomarker for brain aging. *Aging (Albany NY)*, 2011, 3: 985–1002.

[9] Bostjancic E, Zidar N, Stajer D, et al. MicroRNAs miR-1, miR-133a, miR-133b and miR-208 are dysregulated in human myocardial infarction. *Cardiology*, 2010, 115: 163–169.

[10] Ji X, Takahashi R, Hiura Y, et al. Plasma miR-208 as a biomarker of myocardial injury. *Clin Chem*, 2009, 55: 1944–1949.

[11] Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, et al. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell*, 2007, 129: 1401–1414.

[12] White HD, Chew DP. Acute myocardial infarction. *Lancet*, 2008, 372: 570–584.

[13] 马承泰, 蒋艳霞, 杜文杰, 等. 急性心肌梗死患者血浆脑钠肽、超敏 C-反应蛋白和左室射血分数的相关性分析. *中国危重病急救医学*, 2012, 24: 247–248.

[14] 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.

[15] 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.

[16] de Winter RJ, Koster RW, Sturk A, et al. Value of myoglobin, troponin T, and CK-MB mass in ruling out an acute myocardial infarction in the emergency room. *Circulation*, 1995, 92: 3401–3407.

[17] 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.

[18] 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. *Cell Res*, 2008, 18: 997–1006.

(收稿日期: 2012-05-22)

(本文编辑: 李银平)

欢迎订阅 2013 年《中国中西医结合急救杂志》

中国中西医结合学会主办 中文核心期刊 中国科技论文统计源期刊

全国各地邮局订阅, 邮发代号: 6-93; 本刊社邮购电话: 022-23197150

《中国危重病急救医学》杂志和《中国中西医结合急救杂志》

入编《中文核心期刊要目总览》2011 年版(第 6 版)核心期刊临床医学类