

循环 miRNAs 与心血管疾病的诊断

马丽娟 高雅卿 刘巍

摘要 MicroRNAs 在血浆中以一种稳定的形式循环。由于经常在疾病中异常表达,即表现出敏感度和特异性,目前成为一种新兴诊断标志物。本文提出循环的 miRNAs 在心血管疾病中作为一种广泛的诊断标志物,如冠状动脉疾病、心肌梗死、心力衰竭、病毒性心肌炎和 2 型糖尿病的生物学标志物。此外,本文将讨论如何同时测量多种 miRNAs 以提高诊断测试的准确性。

关键词 循环 miRNAs 生物学标志物 心血管疾病

中图分类号 R2 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.09.049

心血管疾病的主要挑战之一是识别可靠的生物学标志物。MicroRNAs(miRNAs)是短链非编码 RNA 序列,通过 3'非编码区的 mRNA 序列转录后表达。基因表达研究表明,miRNA 基因调控途径可与多种疾病相关联^[1]。尤其是多种 miRNA 对心脏控制起关键性作用。心血管疾病中理想的生物学标志物标准:①可使用非侵入性方法;②对疾病敏感度和特异性高;③可早期检测;④在疾病中的相关变化敏感;⑤样品半衰期长;⑥具有快速、准确检测的能力。循环 miRNA 符合上述所有标准,在循环中稳定存在,可以用序列特异性扩增检测敏感度和特异性高。miRNA 标志物比蛋白质生物学标志物更有效,由于蛋白质组成复杂,且通常有抗体生成,翻译后修饰和血清中许多蛋白质浓度降低等离子体^[2]。迄今为止,在心血管疾病中,发现 miRNA 对冠状动脉疾病、心肌梗死、心力衰竭、病毒性心肌病和 2 型糖尿病具有独特模式^[3~7]。

一、冠状动脉疾病(CAD)

Wang 等^[8]研究 miRNA 在血清及血浆中的标记,研究证实 miRNA 可导致细胞死亡和斑块不稳定,并推测 miRNA 可作为早期预测冠状动脉粥样硬化的标志物。研究也证实了这一点,冠状动脉粥样硬化患者 miR - 221、miR - 155 和 miR - 100 降低,而 miR - 1273 显著升高。究其原因,Lif 等^[9]进一步研究证实,miR - 30b 参与冠状动脉内皮细胞同型半胱氨酸转化,导致细胞死亡。以往对 5 例冠心病和 5 例急性冠脉综合征患者的血浆研究,得出急性冠脉综合征患

者 miR - 19、miR - 21、miR - 146、miR - 155 和 miR - 223 升高。

1. CAD 全血中的 miRNAs: 目前为止,两项调查研究证实,已有潜在的循环 miRNAs 可作为 CAD 全血中的生物学标志物。Taurino 等^[10]对 12 例冠心病患者和 12 例健康对照的研究中发现 CAD 患者全血中有大量 mir - 140 - 3p 和 miR - 182。此外,对 10 例患者进行了术前和术后以运动为基础的康复计划,术后冠状动脉血运重建术后,显示 miR - 92 水平增加。早在几年前的研究中已证实,miRNA 中 11 个 miRNA (miR - 19a、miR - 484、miR - 155、miR - 222、miR - 145、miR - 29a、miR - 378、miR - 342、miR - 181d、miR - 150 和 miR - 30e - 5p) 可以降低冠心病发生率。进一步的研究结果证实,患者组服用 ACE 抑制剂导致 7 个 miRNAs (miR - 19a、miR - 155、miR - 145、miR - 222、miR - 342、miR - 30e - 149 5p 和 miR - 378) 减少。研究发现,CAD 患者全血中 miR - 155 和 miR - 145 的损失、降低与血浆中的一致。

2. 心肌梗死(MI): 研究证实心肌梗死后心肌细胞坏死导致 miRNA 泄漏到循环,miRNA 在心脏中特异性表达,可用于诊断急性冠状动脉事件。研究心肌梗死后释放 miRNA 的时间过程。最近,Bialsk 等^[11]发现 miR - 208 在心肌细胞中特异性表达,miR - 208 可快速诱导心肌梗死,30min 开始升高,3h 达到高峰,24h 血浆再次消失。大鼠肌肉富含的 miRNA,如 miR - 1、miR - 133a、miR - 499 在心肌梗死后 1h 内快速增加,3~12h 达到高峰,24h 减少,3 天恢复到基础水平。人类也在相似的时间进程中检测到 miRNA 释放;心肌梗死患者发病后 miR - 1 和 miR - 133a 在 2.5h 达高峰,而 cTnI 和 miR - 499 显示时间进程慢,6h 和 12h 分别达到顶峰。miR - 499 在心肌梗死后

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81270310)

作者单位:150001 哈尔滨医科大学第一临床学院

通讯作者:刘巍,电子信箱:doctor_liuwei@126.com

48 h 可以检测到,3 天后所有的 miRNAs 恢复到正常水平。Yang 等^[12]研究得出急性心肌梗死患者 miR - 21 明显升高,且进一步证实 miR - 21 在心肌缺血或再灌注损伤中发挥重要作用。

3. 循环 miRNAs 对心肌梗死的诊断及预测:研究 miR - 208 特异性和肌肉富集的 miRNAs, miR - 133 和 miR - 499 - 5p 具有诊断心肌梗死患者的能力。最近,Ji 等^[13]研究证实,心肌梗死患者 miR - 133a、miR - 133b 和 mir - 499 - 5p 显著升高。此外发现 9 例受试心肌梗死患者中 3 例出现 miR - 208。可能是因为验证在症状发生平均 9 h 后进行,样本采集时间较晚的结果。有关研究证实健康组和冠心病患者血浆中检测不到 miR - 208,而在 91% 心肌梗死患者中可检测到 miR - 208。引人关注的是,20 例心肌梗死患者 4 h 后出现症状的血液标本中,均可检测到 miR - 208,而检测到 cTnI 的患者仅 85%,证明时间上 miR - 208 的敏感度优于 cTnI。实验结果表明 miR - 208 在鉴别其他心血管疾病和心肌梗死方面优于 miR - 1、miR - 133a 和 miR - 499。Liu 等^[14]研究,miR - 146a 和 miR - 21 可预测心肌梗死后心室重塑。

二、心力衰竭(HF)

心力衰竭是一个复杂的临床综合征,可导致结构或功能的改变,损害心室能力,以及充血和射血。研究证实 HF 时循环 miRNAs 分布异常,可作为本病的生物学标志物^[15]。同时研究发现,心力衰竭患者血浆中 7 个 miRNAs,miR - 423 - 5p 最支持心力衰竭的临床诊断。循环 miR - 423 - 5p 与疾病的严重程度呈正相关。miR - 423 - 5p 与目前临床使用的生物学标志物 N - 末端脑钠肽(NT - proBNP)水平具有相关性。Goren 等^[16]研究证实心力衰竭患者 26 个 miRNAs 显著不同,其中 miR - 423 - 5p 增加。在这项研究中 miR - 423 - 5p 能够区分心力衰竭患者与健康对照组 AUC 为 0.88。研究中检测到循环 miR - 423 - 5p 水平与 BNP 之间的直接相关性。然而,并没有发现与疾病严重程度的关系,表明 miR - 423 - 5p 和射血分数或 NYHA 心功能分级缺乏相关性。然而,最近研究表明,miR - 126 与左心室射血分数呈正相关,而与血浆 NT - proBNP 对数、心胸比率及 NYHA 呈负相关^[17]。与左心力衰竭的研究结果相反,在右心力衰竭时 miR - 423 - 5p 没有升高。研究 41 例患有先天性主动脉和肺动脉移位的患者,全身循环由右心室支持,发现 miR - 423 - 5p 没有任何差异。对

于这些不同的假设可能有两种解释:①系统性右心力衰竭与左心力衰竭相比存在病理生理性差异;②受患者严重程度差异的影响。故研究证实 miR - 423 - 5p 对左心力衰竭具有高度特异性;但是没有其他 miRNAs 可以检测右心力衰竭,这可能会使这种特殊的疾病有预测性的生物学标志物。

对于 miR - 423 - 5p 仍有几个重要的问题,miRNA 如何释放进入血液循环和通过哪种细胞类型。研究发现健康组血液循环中 miR - 423 - 5p 特异性的结合到 Argonaute2 复合物。另一方面,Goren 等^[16]在心力衰竭组胞体外发现了大量 miR - 423 - 5p,表明 miR - 423 - 5p 在心力衰竭组和健康对照组相比释放机制可能不同。猪体内心脏、肝脏和脑广泛表达 miR - 423 - 5p。同时结合在心力衰竭人体检测到 miR - 423 - 5p 上调的研究,这表明 miR - 423 - 5p 来自心力衰竭心肌细胞。研究也发现非小细胞型肺癌和胃癌的患者体内 miR - 423 - 5p 升高。事实上,无心力衰竭呼吸困难患者 miR - 423 - 5p 没有升高,反驳了心力衰竭期间肺释放 miR - 423 - 5p 可能性这一观点。心力衰竭诊断联系到了其他 3 个 miRNAs,与左心室射血分数呈正相关,而与血浆 NT - proBNP 对数、心胸比率及 NYHA 呈负相关^[17]。对 33 例急性心力衰竭相比 34 例健康对照组研究发现,血浆中 miR - 499 和 miR - 122 都很丰富。其中 miR - 499 可能来源于心肌,miR - 122 可能反映肝静脉淤血,因为肝脏富含 miR - 122。

Voellenkle 等^[18]研究心力衰竭患者外周血单核细胞的 miRNA 标志物。19 例对照者、19 例非缺血性扩张型心肌病(NIDCM)和 15 例缺血性心肌病(ICM),两组心力衰竭中 miR - 107、miR - 142 - 5p 和 mir - 139 下调,miR - 125b 和 miR - 497 只存在于缺血性心肌病中,NIDCM 患者 miR - 142 和 miR - 29b 上调。在单核细胞内血浆/血清 miRNA 没有显著不同,表明这些细胞没有释放 miRNAs,在样品制备过程中不影响研究的结果。理想的生物学标志物特征之一是对治疗疾病严重程度改变做出鉴别。在心力衰竭过程中证实有两个 miRNAs,mir - 499 - 5p 和 miR - 423 - 5p。在 Dahl 盐敏感的心力衰竭鼠通过高盐饮食导致高血压,用 antimiR - 208a 治疗后因改善心脏功能而存活。这种 antimiR 治疗降低循环 miR - 499 - 5p 和 miR - 423 - 5p 水平。虽然这种治疗心力衰竭治疗方法,使 mir - 499 - 5p 和 miR - 423 - 5p 成为有前途的生物学标志物,但这些 miRNA 的诊断性

能只测试过较少患者,因此需要有更多的研究来证实他们的诊断能力。

三、病毒性心肌炎(VM)

心肌炎是一种急性或慢性心肌的炎症性疾病,是健康青年人心源性猝死和心力衰竭的重要原因。其发病机制是基因一种不良的免疫反应,究其原因是由于心肌被柯萨奇病毒B3感染引起的。Bao等^[7]的研究证实,病毒性心肌炎患者miR-155和miR-148a显著升高,进一步研究,miR-155和miR-148a通过抑制NF-κB通路来降低急性病毒性心肌炎的心肌损伤,同时得出miR-155和miR-148a是直接靶基因。miR-155作为免疫反应的负反馈因子,降低柯萨奇病毒B3对心肌细胞感染。因此miR-155是病毒性心肌炎的一个潜在的治疗靶点。

四、2型糖尿病(DM)

多项研究证实,12种miRNAs与糖尿病显著相关。miR-126作为2型糖尿病的预测指标出现。5个最显著改变的miRNAs(miR-15a、miR-126、miR-320、miR-223、miR-28-3p)可以鉴别DM患者的敏感度为70%,特异性为92%。然而miR-126、miR-454 15a、miR-29b、miR-223和miR-28-3p在疾病症状表现之前已经发生改变。Kong等对19例易感糖尿病人群,19例糖尿病前期患者和18例2型糖尿病患者进行研究,发现血清中7种miRNAs参与胰岛素的调节(miR-9、miR-29a、miR-30d、miR-34、460 miR-124、miR-146a和miR-375,但miR-126并未在其中)。引人关注的是,2型糖尿病患者和非糖尿病前期患者相比对照组7种miRNAs升高。研究证实空腹血糖受损和2型糖尿病患者循环miR-144,miR-192和miR-29a表达进一步增加,miR-146在疾病状态下降低。miR-150和miR-320空腹血糖受损时降低,而2型糖尿病患者明显升高,这与miR-182和miR-30d相反。miR-126与2型糖尿病密切相关,这可能是由不同的样本特征解释(血浆和全血)两者之间的研究。近年来不断发现新的miRNA作为2型糖尿病的诊断标志物,Paramasivam等^[19]对糖耐量正常(NGT)、糖耐量受损(IGT)、糖尿病(T2DM)患者研究证实,IGT和T2DM患者miRNAs(miR-128、miR-130b、miR-374a-5p、miR-423-5p)呈负相关。Fabiola等^[20]研究证实,循环MiR-21-5p和miR-126a-3p与2型糖尿病的并发症密切相关。最近几项研究表明,MiR-21表达水平与血管内皮细胞的生成有关,且

MiR-21高表达抑制血管内皮祖细胞增值,并有助于内皮细胞衰老^[21]。总之,报告显示DM患者体内几种循环miRNAs处于异常水平。此外,疾病症状表现之前miRNA已被调节,因此对风险的预测可能是有价值的。

五、展望

循环miRNAs作为心血管疾病血液中的生物学标志物,具有许多吸引人的特点,即循环中稳定存在,序列在进化中保守,表达往往是组织或病理特定的,这些特点有助于敏感度和特异性检测。本次审查讨论,miRNAs用于CAD、心肌梗死、高血压、心力衰竭、心肌炎和2型糖尿病生物学标志物。然而,循环miRNAs作为疾病的生物学标志物存在验证方面的挑战。首先,大多数研究在不到100例受试者的人群中进行。虽然有几种候选miRNAs在多个研究中被证实,但仍需要较大的患者群体进一步验证。研究不仅要关注这些miRNAs的诊断性能,而且需要探讨miRNAs预测预后的价值。例如,标识一组miRNAs可以预测冠心病患者发生心肌梗死的风险。其次,未来的研究还应阐明miRNAs对监测治疗反应是否有用。应用于临床时,能否用简便仪器测出。再者,医学技术方面没有绝对,miRNAs对所诊断疾病敏感度及特异性仍是在不断探索中。除此之外,其他的挑战包括血浆或血清中的总RNA含量低,测量循环miRNAs经常需要miRNA扩增。RNA在血浆和血清中含量低,致使测量浓度和分离RNA的质量很难。因此,基于原料和miRNA提取可能发生差异。因此,规范化是循环miRNAs的测量的一个重要方面,校正血浆容量是正常化的最佳方法,因为血浆容量是其他生物学标志物的临床标准。未来的研究需要比较这些不同的方法和识别规范化是最可靠的方法。

目前,大多是研究单个miRNA作为疾病的生物学标志物。但可预期的是,组合多个miRNAs可提供更大的准确性。例如,miR-208a、miR-133、miR-1和miR-499-5p结合可以更准确地确定心肌梗死的诊断。心肌梗死时3种miRNAs3h达到第1个高峰,miR-499在12h达高峰。诊断试验相结合的miRNA可能提供更好的诊断准确率。

总之,识别稳定的循环miRNA可推出新一代的潜在生物学标志物,优势是相对容易地开发,较低的费用、超高的敏感度和特异性。这些方法很容易地结合了大量的循环miRNAs,可能会彻底改变循环生物学标志物的使用。

参考文献

- 1 Dzikiewicz - Krawczyk A. MicroRNA polymorphisms as markers of risk, prognosis and treatment response in hematological malignancies [J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2015, 93(1): 1 - 17
- 2 WanggXW, Zhang WB. Cellular Synthesisof Protein Catenanes [J]. Angewandte Chemie, 2016, 55(10): 3442 - 3446
- 3 D'Alessandra Y, Pompilio G, Capoqrossi MC. Letter by D'Alessandra et al regarding article, " Circulating microRNA - 208b and micro RNA - 499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease" [J]. Circ Cardiovasc Genet, 2011, 4(1): e7
- 4 Widmer RJ, Lerman LO, Lerman A. MicroRNAs: small molecule, big potential for coronary artery disease [J]. Eur Heart J, 2015, 17(4): 405 - 415
- 5 Sardu C, Barbieri M, Rizzo MR, et al. Cardiac resynchronization therapy outcomes in type 2 diabetic patients: role of microRNA changes [J]. J Diabetes Res, 2016, 20167292564
- 6 Zampetaki A, Kiechl S, Drozdov I, et al. Plasma microRNA profiling reveals loss of endothelial miR - 126 and other microRNAs in type 2 diabetes [J]. Circ Res, 2011, 17: 810 - 817
- 7 Bao JL, Lin L. MiR - 155 and miR - 148a reduce cardiac injury by inhibiting NF - κB pathway during acute viral myocarditis [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2014, 18(16): 2349 - 2356
- 8 Wang R, Dong LD, Meng XB, et al. Unique MicroRNA signatures associated with early coronary atherosclerotic plaques [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 464(2): 574 - 579
- 9 Li F, Chen Q, Song X, et al. MiR - 30b is involved in the homocysteine - induced apoptosis in human coronary artery endothelial cells by regulating the expression of caspase 3 [J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(8): 17682 - 17695
- 10 Taurino C, Miller WH, McBride MW, et al. Gene expression profiling in whole blood of patients with coronary artery disease [J]. Clin Sci (Lond), 2012, 119(8): 335 - 343
- 11 Bialek S, Gorko D, Zaikowska A, et al. Release kinetics of circulating miRNA - 208a in the early phase of myocardial infarction [J]. Kardiol Pol, 2015, 73(8): 613 - 619
- 12 Yang SJ, Zhang Y, Liu Y. Research on expressionof miRNA - 21 in the peripheral blood of coronaryheart disease and its clinical significance [J]. Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi, 2015, 31(2): 127 - 131
- 13 Ji O, Jiang Q, Yan W, et al. Expression of circulating microRNAs in patients with ST segment elevation acute myocardialinfarction [J]. Minerva Cardioangiolog, 2015, 63(5): 397 - 402
- 14 Liu X, Dong Y, Chen S, et al. Circulating microRNA - 146a and microRNA - 21 predict left ventricular re - modeling after ST - elevation myocardial in - farction [J]. Cardiology, 2015, 132(4): 233 - 241
- 15 Pascual - Figal DA, Casas T, Ordonez - Llanos J, et al. Highly sensitive troponin Tfor risk stratification of acutely destabilized heart failure [J]. Am Heart J, 2012, 163(6): 1002 - 1010
- 16 Goren Y, Kushnir M, Zafraib R, et al. Serumlevels ofmicroRNAs in patients with heart failure [J]. Eur J Heart Fail, 2012, 14(2): 147 - 154
- 17 Katrina LE, Vicky AC, Richard WT, et al. Mark richards 1,2, circulating microRNAs as candidate markersto distinguish heart failure in breathless patients [J]. Eur J Heart Fail, 2013, 15(10): 1138 - 1147
- 18 Voellenkle C, van Rooij J, Cappuzzello C, et al. MicroRNA signatures in peripheral blood mononuclear cells of chronic heart failure patients [J]. Physiol Genomics, 2012, 42(3): 420 - 426
- 19 Paramasivam P, Sophie R, Chandrakumar S, et al. Circulating MiRNAs of 'Asian Indian phenotype' identified in subjects with impaired glucose tolerance and patients with type 2 diabetes [J]. PLoS One, 2015, (5): e0128372
- 20 Fabiola O, Liana S, Massimiliano B, et al. MiR - 21 - 5p and miR - 126a - 3p levels in plasma and circulating ngiogenic cells: relationship with type 2 diabetes complications [J]. Oncotarget, 2015, 6(34): 35372 - 35382
- 21 Zuo K, Li M, Zhang X, et al. MiR - 21 suppresses endothelial progenitor cell proliferation by activating the TGFβ signaling pathway via downregulation of WWIP1 [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015; 8 (1): 414 - 422

(收稿日期:2016-12-08)

(修回日期:2016-12-10)

(上接第 103 页)

- 8 Bolignano D, Lacquaniti A, Coppolino G, et al. Neutrophil gelatinase - associated lipocalin as an early biomarker of nephropathy in diabetic patients [J]. Kidney Blood Press Res, 2009, 32(2): 91 - 98
- 9 Bei Li, Jin Huang. Progress in research on the relationship between NGAL and metabolic syndrome [J]. Medical Sciences, 2015, 40(11): 1264 - 1269
- 10 Peng Y, Yuan Z, Li H. Removal of inflammatory cytokines and endotoxin by veno - venous continuous renal replacement therapy for burned patients with sepsis [J]. Burns, 2005, 31(5): 623 - 628
- 11 de Geus HR, Betjes MG, Bakker J. Neutrophil gelatinase - associated lipocalin clearance during veno - venous continuous renal replacement therapy in critically ill patients [J]. Intensive Care Med, 2010, 36(12): 2156 - 2157

- 12 Endre ZH, Pickering JW, Walker RJ, et al. Improved performance of urinary biomarkers of acute kidney injury in the critically ill by stratification for injury duration and baseline renal function [J]. Kidney Int, 2011, 79(10): 1119 - 1130
- 13 朱丽丽, 师东武. 中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白及白细胞介素 - 1 在脓毒症所致急性肾损伤中的早期诊断价值 [J]. 中华危重症急救医学, 2016, 28(8): 718 - 722
- 14 Hongqi R, Xuan Z, Deshu D, et al. Assessment of urinary kidney injury molecule - 1 and interleukin - 18 in the early post - burn period to predict acute kidney injury for various degrees of burn injury [J]. BMC Nephrol, 2015, 16: 142
- 15 叶智明, 史伟, 梁馨苓, 等. 不同透析方式及透析膜对清除血清胱抑素 C 的效果比较 [J]. 新医学, 2006, 37(6): 362 - 363, 381

(收稿日期:2016-12-06)

(修回日期:2016-12-19)