

高血压左心室肥厚患者血浆 miR-30a 表达的变化

潘伟, 赵娟, 杨泽福, 罗韶金, 黄景文

基金项目: 广东省医学科研基金立项课题(编号:A2014712)

作者单位: 528200 广东, 南方医科大学附属南海医院 佛山市南海区人民医院心内科(潘伟, 杨泽福, 罗韶金, 黄景文), 超声科(赵娟)

作者简介: 潘伟(1977-), 男, 医学博士, 副教授, 副主任医师, 研究方向: 心血管疾病基础与临床研究。E-mail: weipan1977@163.com

[摘要] **目的** 观察高血压左心室肥厚(LVH)人群中血浆 miR-30a 与 LVH 的关系, 研究血浆 miR-30a 是否能作为高血压 LVH 患者临床诊断的标志物。**方法** 随机入选住院高血压患者中 73 例 LVH 患者和 77 例非 LVH 患者。行 real-time PCR 法检测血浆 hsa-miR-30a 的含量。用 ROC 曲线和 Pearson 相关性分析评价血浆 hsa-miR-30a 诊断高血压 LVH 的价值。**结果** LVH 组患者血浆 hsa-miR-30a 水平升高, 患者血浆 hsa-miR-30a 水平的曲线下面积(AUC)为 0.932, 血浆 hsa-miR-30a 水平用于诊断高血压 LVH 有意义。确定 hsa-miR-30a 判断高血压 LVH 的最佳临界点为 $7.267(2^{-\Delta ct} \times 10^4)$, 敏感度和特异度分别为 94.5%、89.6%。Pearson 相关性分析表明, 患者血浆 hsa-miR-30a 水平与室间隔厚度(IVSd)和左室后壁厚度(LVPWd)均呈正相关(R 值分别为 0.636 和 0.637, P 值均为 0.000)。**结论** 高血压 LVH 患者血浆 hsa-miR-30a 升高。血浆 hsa-miR-30a 水平与 IVSd 和 LVPWd 呈正相关, 血浆 hsa-miR-30a 水平用于诊断高血压 LVH 有意义。

[关键词] 左心室肥厚; 高血压; miR-30a

[中图分类号] R 541.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2016)07-0568-03

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2016.07.03

Plasma hsa-miR-30a expression on hypertension patients with left ventricular hypertrophy PAN Wei, ZHAO Juan, YANG Ze-fu, et al. Department of Cardiovascular Disease, Nanhai Hospital Affiliated to Southern Medical University, Guangdong 528200, China

[Abstract] **Objective** To observe the correlation between plasma hsa-miR-30a and left ventricular hypertrophy(LVH) in hypertension patients and to study whether plasma hsa-miR-30a can be a diagnostic marker for patients with LVH or not. **Methods** Seventy-three cases with LVH were collected from the hypertensive patients as LVH group and 77 cases without LVH as the control group. The mRNA expression of hsa-miR-30a in the derived plasma was analyzed by real-time PCR. Evaluation of the sensitivity and specificity of hsa-miR-30a on the diagnosis of LVH was performed by analyzing the ROC curve. The association between plasma hsa-miR-30a level and ventricular wall thickness was assessed by Pearson correlation analysis. **Results** Compared with that in the control group, the level of hsa-miR-30a expression in LVH group was significantly higher [$(5.16 \pm 0.31)(2^{-\Delta ct} \times 10^4)$ vs $(14.28 \pm 0.92)(2^{-\Delta ct} \times 10^4)$, $P=0.000$]. A receiver operating characteristic(ROC) curve showed that the areas under the curve(AUC) for the plasma level of hsa-miR-30a were 0.932. The optimal hsa-miR-30a cut-off value on receiver operating characteristic curve was $7.267(2^{-\Delta ct} \times 10^4)$. The corresponding cut-off points with sensitivity and specificity were 94.5% and 89.6%, respectively. Pearson correlation analysis indicated that the level of hsa-miR-30a expression in plasma was positively associated with IVSd and LVPWd ($R=0.636$ and 0.637 , $P=0.000$ and 0.000 , respectively). **Conclusion** Plasma hsa-miR-30a is elevated in hypertension patients with LVH and positively associated with left ventricular wall thickness. Elevated plasma hsa-miR-30a level is significant for the diagnosis of LVH in hypertension patients.

[Key words] Left ventricular hypertrophy; Hypertension; MicroRNA-30a

我们的前期研究^[1]表明, miR-30a 在心肌肥厚中起作用, 但 miR-30a 是否可作为高血压左心室肥

厚(left ventricular hypertrophy, LVH)临床诊断的标志物, 我们在人群中观察血浆 hsa-miR-30a 与 LVH

的关系,研究血浆 hsa-miR-30a 是否能作为高血压 LVH 患者临床诊断的标志物。

1 对象与方法

1.1 研究对象 选 2014-01 ~ 2014-12 的 150 例高血压住院患者,按心脏超声分为 LVH 组 73 例和非 LVH 对照组 77 例。LVH 患者入选标准:超声心动

图 IVSd 或/且 LVPWd ≥ 1.2 cm,EF > 40%。剔除:收缩性心力衰竭、肿瘤、急性期感染、BNP > 400 ng/L、帕金森氏病、特发性肺纤维化、休克、肝硬化等及近期应用过干扰素、苯巴比妥者。对照组与 LVH 组两组一般资料比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 两组一般资料比较[$(\bar{x} \pm s)$, n]

组 别	例数	性别		年龄 (岁)	SBP (mmHg)	DBP (mmHg)	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDL-C (mmol/L)	LDL-C (mmol/L)	Cr (μmol/L)	GLU (mmol/L)	UA (mmol/L)
		男	女										
对照组	77	28	49	71.12 ± 11.24	155.27 ± 26.32	87.45 ± 15.17	5.03 ± 1.21	1.41 ± 0.58	1.11 ± 0.26	2.95 ± 0.92	118.64 ± 19.45	6.01 ± 0.98	348.34 ± 49.13
LVH 组	73	33	40	72.91 ± 11.41	157.86 ± 26.12	85.99 ± 16.39	5.01 ± 1.17	1.39 ± 0.49	1.19 ± 0.30	2.89 ± 0.76	115.34 ± 12.99	5.94 ± 1.23	333.27 ± 39.98
χ^2	-	1.214		1.027	1.727	1.579	0.327	0.531	0.943	0.661	0.467	1.423	1.860
P	-	0.271		0.373	0.083	0.134	0.953	0.637	0.376	0.589	0.873	0.165	0.058

注:SBP,收缩压;DBP,舒张压;TC,总胆固醇;TG,总甘油三酯;HDL,高密度脂蛋白;LDL,低密度脂蛋白;Cr,肌酐;GLU,葡萄糖;UA,尿酸

1.2 方法 所有入选患者完善一般临床资料,次日空腹采血,空腹时 EDTA 抗凝管收集全血,获取血浆,检测 hsa-miR-30a。尿酸(UA)、甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL)、血糖(GLU)等采用检验科全自动生化分析仪检测,由专人质控。心脏超声检查由富有经验的超声医师完成,并测定 IVSd、LVPWd。用 EDTA 抗凝管收集 3 ml 全血,室温放置 1 ~ 2 h。1 600 g,4 ℃,离心 15 min,获取上层的血浆;12 000 g,4 ℃,离心 15 min,获取上清放在 - 80 ℃ 保存。取 300 μl 血浆加入 1.2 ml TRIzol® LS Reagent 溶液及 2 μl 人工合成的 cel-miR-39(1 nM)作为内参,迅速震荡摇匀 30 s,再加入 200 μl 氯仿,强烈震荡 20 s 后静置 3 min,室温 14 000 g 离心 10 min,获取上层水层;加入 10 μl SiO₂ 吸附液,混匀,14 000 g 离心 5 min。弃上清,加入 75% 乙醇 400 μl,14 000 g 离心 5 min。弃上清,风干 5 min,加入 25 μl DEPC 水溶解。10 mM dNTP、RNase inhibitor、miR-30a 逆转录引物、cel-miR-39 逆转录引物、5x buffer、M-MLV 加入到上溶液中,混匀后 42 ℃ 孵育 60 min → 85 ℃ 孵育 10 min。采用 SYBR Green PCR Master Mix 进行 qRT-PCR,反应参数:95 ℃ 5 min → 95 ℃ 15 s → 65 ℃ 15 s → 72 ℃ 32 s,40 cycles。引物序列:hsa-miR-30a FP 为 5'ACACTCCAGCTGGGTGTAAACAT-CCTCGACTG;cel-miR-39 为 5'ACACTCCAGCTGGG-TCACCGGGTGTAAATCAGCT;miRNARP 为 5'CT-CAACTGGTGTCTGTGGA。

1.3 统计学方法 应用 PASW Statistics 18.0 统计学软件进行数据处理,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)

表示,是否正态分布用 Shapiro-Wilk 检验,两组正态分布计量资料组间比较使用 Student's t 检验;计数资料统计使用 χ^2 检验;Pearson 相关分析用于分析 miR-30 与心脏大小的相关性, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LVH 患者血浆 hsa-miR-30a 表达的变化 对照组与 LVH 组 IVSd、LVPWd、hsa-miR-30a 经 Shapiro-Wilk 检验,两组资料均为正态资料。与对照组比较,LVH 组患者 LA、LVDd、hsa-miR-30a 升高, $P < 0.05$ 。见表 2。

表 2 两组患者室壁厚度与 hsa-miR-30a 测定值比较($\bar{x} \pm s$)

组 别	例数	IVSd (cm)	LVPWd (cm)	hsa-miR-30a ($2^{-\Delta ct} \times 10^4$)
对照组	77	0.96 ± 0.08	0.94 ± 0.07	5.16 ± 0.31
LVH 组	73	1.26 ± 0.09	1.26 ± 0.09	14.28 ± 0.92
t	-	3.479	3.463	5.321
P	-	0.000	0.000	0.000

注:IVSd 为室间隔厚度;LVPWd 为左室后壁厚度。 $\Delta ct = ct \text{ hsa-miR-30-ctcel-39}$

2.2 血浆 hsa-miR-30a 在 LVH 诊断中的敏感度和特异度 ROC 曲线下面积分析显示,患者血浆 hsa-miR-30a 水平的曲线下面积(AUC)为 0.932(95% CI 0.879 ~ 0.967)。见图 1。PASW Statistics 18.0 统计软件分析特异性与敏感性,根据 ROC 曲线,计算 Youden 指数,以 Youden 指数最大的切点(0.841)为最佳临界点,确定 hsa-miR-30a 判断心脏肥厚的最佳临界点为 7.267($2^{-\Delta ct} \times 10^4$),此时,敏感度和特异度分别为 94.5%、89.6%。

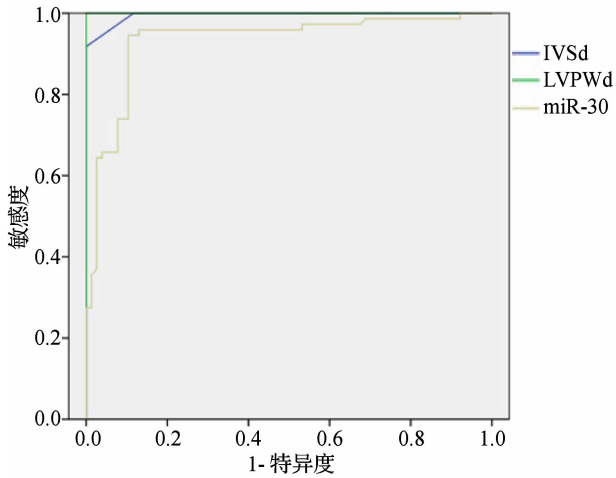


图1 ROC 曲线下面积图

2.3 血浆 hsa-miR-30a 与室壁厚度的相关性 将血浆 hsa-miR-30 与 IVSd 和 LVPWd 行 Pearson 相关性分析,hsa-miR-30 水平与 IVSd 和 LVPWd 均呈正相关,相关系数 R 分别为 0.636 和 0.637, P 值均为 0.000。

3 讨论

3.1 microRNA (miRNA) 是一类在生物进化过程中高度保守的非编码微小 RNA,通过降解目的 mRNA 或抑制其翻译,调节目的基因表达,进而影响细胞或生物个体的生理病理状态^[2]。目前报道的人类和褐家鼠 miR-30 家族有 miR-30a、miR-30b、miR-30c-1、miR-30c-2、miR-30d 和 miR-30e 六个亚型。2008 年 Mitchell 等^[3]首次报道 miRNAs 在人的血浆中非常稳定。这是因为血浆中的 miRNA 被包在 exosomes 中。exosomes 是 50 ~ 90 nm 的小微粒,在血浆中非常丰富。临床上,活体心脏标本获得困难,通过研究患者外周血浆 miRNA 水平可以获取心脏疾病病理生理过程的信息。所以,对循环血 miRNA 用于诊断心血管疾病的研究亦有相继报道^[4~6]。

3.2 我们的前期研究^[1]显示,miR-30a 在心脏肥厚中起作用。我们试图观察高血压合并 LVH 时,外周血浆 hsa-miR-30a 水平是否有改变。hsa-miR-30a 是否可作为高血压 LVH 患者临床诊断的标志物。本部分实验检测血浆 hsa-miR-30a 应用的是染料法,而国外文献大部分是用 TaqMan 法,后者更加准确,但费用较前者高。我们检测 LVH 患者血浆 hsa-miR-30a 水平,发现 LVH 患者较非 LVH 对照组患者相比,外周血浆 hsa-miR-30a 水平上调,为 $5.16 \pm 0.31 (2^{-\Delta\text{ct}} \times 10^4)$ vs $14.28 \pm 0.92 (2^{-\Delta\text{ct}} \times 10^4)$, $P <$

0.05。ROC 曲线显示,hsa-miR-30a 用于诊断 LVH 的 AUC 达到了 0.932 (95% CI 0.879 ~ 0.967)。血浆 hsa-miR-30a 水平用于诊断 LVH 有意义。hsa-miR-30a 判断心脏肥厚的最佳临界点为 $7.267 (2^{-\Delta\text{ct}} \times 10^4)$,此时,敏感度和特异度分别为 94.5%、89.6%。患者血浆 hsa-miR-30a 的含量与 IVSd 和 LVPWd 均呈正相关。相关系数 R 值分别为 0.636 和 0.637, $P < 0.05$ 。由于临床样本例数不足,未进行 logistic 回归分析。我们没有机会获得高血压 LVH 患者心脏组织,但是我们的前期研究中^[1],心脏肥厚大鼠血浆 miR-30a 水平与心脏组织 miR-30a 水平相背离。故我们认为,高血压 LVH 患者血浆 hsa-miR-30a 上调可能是因为 miR-30a 从心脏组织释放到外周循环血所致。关于这个假设的验证和 miR-30a 的转移途径值得进一步研究。而且,hsa-miR-30a 指标在临床中不难获取,费用不高,操作性强^[7]。

综上所述,hsa-miR-30a 有可能成为高血压 LVH 患者的诊断标志物。我们设想,补充外源性 miR-30a 有可能改善高血压 LVH 患者的心脏肥厚。倘若如此,这给我们提供了干预 LVH 或心脏重构的新思路。

参考文献

1 Pan W, Zhong Y, Cheng C, et al. miR-30-regulated autophagy mediates angiotensin II-induced myocardial hypertrophy[J]. PLoS ONE, 2013, 8(1): e53950.
2 Maxwell EK, Campbell JD, Spira A, et al. SubmiRine: assessing variants in microRNA targets using clinical genomic data sets[J]. Nucleic Acids Res, 2015, 43(8): 3886 - 3898.
3 Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(30): 10513 - 10518.
4 Martino F, Carlomosti F, Avitabile D, et al. Circulating miR-33a and miR-33b are up-regulated in familial hypercholesterolaemia in paediatric age[J]. Clin Sci (Lond), 2015, 129(11): 963 - 972.
5 Min PK, Chan SY. The biology of circulating microRNAs in cardiovascular disease[J]. Eur J Clin Invest, 2015, 45(8): 860 - 874.
6 Melman YF, Shah R, Danielson K, et al. Circulating microRNA-30d is associated with response to cardiac resynchronization therapy in heart failure and regulates cardiomyocyte apoptosis: a translational pilot study[J]. Circulation, 2015, 131(25): 2202 - 2216.
7 赵娟,张小勇,灯彩妹,等.超声检查肱动脉 FMD 和 sCD40L 对急性冠状动脉综合症的预测价值[J]. 中国临床新医学, 2014, 7(9): 803 - 805.

[收稿日期 2016-01-22][本文编辑 杨光和]