

分析[J]. 现代口腔医学杂志, 2010, 24(4): 295 - 297.

8 Mc Crory PV. Oral and systemic health; Deficits in our knowledge[J]. Br Dent J, 2016, 220(4): 153 - 154.

9 王 兴. 第四次全国口腔健康流行病学调查报告[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2018: 12 - 78.

10 于 雪, 杨溪波, 董 青, 等. 唐山市 6 ~ 9 岁儿童第一磨牙萌出及患龋情况调查[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2015, 25(12): 739 - 742.

11 韦 艺, 周 嫣, 陈 燕, 等. 护牙素对龈下刮治后牙本质敏感患者牙周指数的影响[J]. 中国临床新医学, 2017, 10(12): 1146 - 1148.

12 罗 佳, 杨 艳, 赵 聪, 等. 遂宁市 10 ~ 12 岁儿童口腔健康状况及健康知识、行为情况调查分析[J]. 全科口腔医学电子杂志, 2016, 3(10): 1 - 4.

13 张 颖, 刘 璐, 程睿波, 等. 儿童乳牙患龋状况及其家庭口腔健康行为的差异[J]. 华西口腔医学杂志, 2008, 26(1): 67 - 69.

[收稿日期 2018 - 12 - 20][本文编辑 余 军 吕文娟]

课题研究 · 论著

# 长链非编码 RNA-ROR 在慢性心力衰竭患者血清中的表达及临床意义

张立臻, 刘淑珍, 马 军, 万大国

基金项目: 河南省科技攻关项目(编号: 162102310143)

作者单位: 450014 河南, 郑州大学第二附属医院心内科(张立臻, 万大国), 急诊科(刘淑珍); 450003 河南, 郑州大学消化疾病研究所(马 军)

作者简介: 张立臻(1992 -), 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 心血管内科介入治疗。E-mail: zlz427@163.com

通讯作者: 万大国(1965 -), 男, 医学博士, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向: 心血管内科介入治疗。E-mail: wandaguo@hotmail.com

**[摘要]** **目的** 探讨长链非编码 RNA-ROR(lncRNA-ROR)在慢性心力衰竭(CHF)患者血清中的表达水平及临床意义。**方法** 收集 25 名正常人(对照组)及 109 例 CHF 患者, 采用实时荧光定量 PCR(real-time PCR)检测两组血清中 lncRNA-ROR 的表达, 分析 lncRNA-ROR 的表达与 N-末端脑钠肽前体(NT-proBNP)、左室舒张末期内径及左心室射血分数的相关性。**结果** 对照组中 lncRNA-ROR 的表达水平相对较低, CHF 患者中 lncRNA-ROR 的表达水平明显升高, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。相关分析发现 lncRNA-ROR 的表达水平与 CHF 心功能分级、左室舒张末期内径及 NT-proBNP 呈正相关, 与左心室射血分数呈负相关( $P < 0.05$ )。**结论** lncRNA-ROR 的表达水平与心力衰竭严重程度相关, 有望成为早期诊断 CHF 的生物学标志物。

**[关键词]** 心功能分级; 慢性心力衰竭; 长链非编码 RNA-ROR

**[中图分类号]** R 541.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674 - 3806(2019)04 - 0388 - 04

doi: 10.3969/j.issn.1674 - 3806.2019.04.09

**Expression of long chain noncoding RNA-ROR in serum of patients with chronic heart failure and its clinical significance** ZHANG Li-zhen, LIU Shu-zhen, MA Jun, et al. Department of Cardiology, the Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Henan 450014, China

**[Abstract]** **Objective** To explore the expression of long chain noncoding RNA-ROR(lncRNA-ROR) in the serum of the patients with chronic heart failure(CHF) and its clinical significance. **Methods** The expressions of lncRNA-ROR in the serum of 25 healthy subjects(control group) and in 109 patients with CHF were detected by Real-time PCR. The correlation between the expressions of lncRNA-ROR and NT-proBNP, left ventricular end-diastolic diameter and left ventricular ejection fraction was analyzed. **Results** The expression of lncRNA-ROR in the CHF patients was significantly higher than that in the control group( $P < 0.05$ ). The expression of lncRNA-ROR was positively correlated with cardiac functional grading of CHF, left ventricular end-diastolic diameter and NT-proBNP, and

was negatively correlated with left ventricular ejection fraction ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The expression of lncRNA-ROR is related to the severity of heart failure. lncRNA-ROR is expected to be a biomarker for early diagnosis of CHF.

**[Key words]** Cardiac functional grading; Chronic heart failure; Long chain noncoding RNA-ROR (lncRNA-ROR)

慢性心力衰竭 (CHF) 是大多数心血管疾病的终末期阶段, 是 21 世纪心血管领域最大挑战之一, 尽管 CHF 的治疗已经取得很大进展, 但 CHF 患者死亡率仍在增加, 且医疗费用负担沉重<sup>[1,2]</sup>。因此, 早期正确的诊断和有效治疗对提高 CHF 患者生存率和改善远期预后极为重要。目前临床诊断 CHF 的标准主要是依靠心力衰竭症状、体征、N-末端脑钠肽前体 (NT-proBNP)、超声心动图结果等, NT-proBNP 是目前国际公认的用于 CHF 诊断的标志物, 但由于高龄、肾功能不全、肺栓塞等因素会引起 NT-proBNP 假性升高, 因此其特异度不高<sup>[3]</sup>。因此寻找特异度和敏感度较高的生物学标志物对早期诊断及改善 CHF 患者长期预后具有重要的临床意义。长链非编码 RNA (lncRNA) 是一类位于细胞核内或胞浆内长度超过 200 nt 的功能性 RNA 分子, 其在真核细胞内被普遍转录, 但不具有蛋白编码功能, 过去被认为是 RNA 聚合酶 II 转录的副产物, 无具体的生物学功能<sup>[4]</sup>。然而越来越多的研究表明 lncRNA 参与 X 染色体沉默、基因组印记、染色质修饰、转录激活、转录干扰及核内运输等多种重要的调控过程, 具有表观遗传调控、转录调控以及转录后调控等作用<sup>[5]</sup>。近年来研究发现, lncRNA 与多种心血管疾病 (如冠状动脉粥样硬化性心脏病、CHF) 的发病密切相关<sup>[6]</sup>。lncRNA-ROR 位于人类染色体 18q21.31, 全长 2.6 kb, 由 4 个外显子构成, 又称 lincRNA-ST8SIA3, 是对细胞重编程过程具有重要调控作用的 lncRNA, 在诱导多能干细胞形成过程中发挥重要的作用<sup>[7]</sup>。Jiang 等<sup>[8]</sup>发现 lncRNA-ROR 在体外培养的肥大心肌细胞中表达明显上调, 具有促进心肌肥厚的作用, 但 lncRNA-ROR 在 CHF 方面的研究鲜有报道。本研究通过检测正常对照组和 CHF 患者组血清中 lncRNA-ROR 的表达水平, 进一步分析 CHF 患者中 lncRNA-ROR 的表达水平与心功能指标的关系。

## 1 对象与方法

**1.1 研究对象** 选取 2017-01 ~ 2018-05 在郑州大学第二附属医院心内科住院的 CHF 患者 109 例, 男 64 例, 女 45 例, 年龄 50 ~ 72 (59.76 ± 6.67) 岁, 按照《中国心力衰竭诊断和治疗指南 2014》<sup>[9]</sup> 确诊为 CHF; 按照 NYHA 心功能分级, 其中 I 级 28 例, II 级 30 例, III 级 27 例, IV 级 24 例。选取同期健康体检者 25 名

为对照组, 其中男 13 名, 女 12 名, 年龄 51 ~ 73 (61.05 ± 4.35) 岁。入选标准: 心电图、心脏彩超、NT-proBNP、肝肾功能检查均无异常。排除标准: 感染性心脏病、严重先天性心脏病、心脏瓣膜病及心肌病、恶性心律失常、肿瘤、肝肾功能不全、急性心肌梗死。两组间年龄、性别、是否患有高血压、是否有高血糖、是否吸烟, 差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见表 1。所有受试者均签署知情同意书, 本研究经我院伦理委员会批准。

表 1 两组基线资料比较 [ $n(\%)$ , ( $\bar{x} \pm s$ ) ]

组别	例数	性别		年龄 (岁)	高血压	高血糖	吸烟
		男	女				
CHF 组	109	64	45	59.76 ± 6.67	72(66.10)	68(62.39)	67(61.47)
对照组	25	13	12	61.05 ± 4.35	11(44.00)	12(48.00)	13(52.00)
$t/\chi^2$	-	0.375	1.194	3.313	1.749	0.758	
$P$	-	0.540	0.234	0.069	0.186	0.384	

## 1.2 研究方法

**1.2.1 样本收集** 采集两组受试者清晨空腹肘静脉血 5 ml, 即刻用真空采血管采集, 于 4 °C 冷藏 30 min, 室温下 3 000 rpm 离心 15 min, 留取上层血清, 置于 -80 °C 冰箱备用。

**1.2.2 血清总 RNA 提取** 将分离所得血清, 置于冰上融化; 取 250 μl 血清样品, 加入 750 μl Trizol (美国 Invitrogen 公司), 振荡器混匀, 静置 5 min, 加入 200 μl 氯仿, 振荡器混匀, 静置 10 min, 室温下离心 (12 000 rpm, 10 min), 留取上清液并量取其体积, 转移至另一个无核糖核酸酶的 EP 管中; 分别加入与上清液等体积的异丙醇, 振荡器振荡混匀, 室温下静置 3 min, 室温下离心 (12 000 rpm, 10 min); 倒出管内液体, 加用 1 ml 75% 乙醇, 室温 12 000 rpm 离心 2 min, 倒出乙醇, 并用 Tip 枪头将剩余液体吸干净, 晾干。每管中加入 10 μl 无 Rnase 的去离子水 (dd H<sub>2</sub>O), 以充分溶解 RNA; 用分光光度计测定总 RNA 浓度及纯度, 以 A260/A280 为准。

**1.2.3 实时荧光定量 PCR (real-time PCR)** 参照 Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒说明书对提得的 RNA 进行逆转录, 以 20 μl 体系进行 cDNA 的合成。real-time PCR 采用 2x SYBR Green PCR Master Mix 试剂盒 (美国 Invitrogen 公司),

1 μl cDNA 作为模板, lnc RNA ROR 引物正义链: 5'-CGAACGAGAGGACCGAAG-3', 反义链: 5'-GC-CAAGTTCTAGATAAGC-3', 引物浓度为 0.4 μmol/L, 以 15 μl 体系进行扩增, 每个待测样本设置 2 个平行样, 根据目标基因设计合成相应上下游引物进行 PCR 扩增。PCR 反应条件: 50 °C 2 min, 95 °C 2 min, 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 进行 40 个循环, 以 GAPDH 作为内参照。PCR 反应在定量 PCR 反应仪上进行。2 次独立实验后得到的数据运用公式  $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$  的方法进行分析。

1.2.4 彩色多普勒超声心动图检查 本组所选患者均于就诊当日或次日行超声心动图(惠普 500 型)检查, 主要包括左心室射血分数(LVEF)、左心室舒张末期内径(LVEDD)。

1.2.5 NT-proBNP 检测 研究对象入院第 2 天清晨空腹血, 采用南京市基蛋公司生产的免疫定量分

析仪测量 NT-proBNP。

1.3 统计学方法 应用 SPSS21.0 统计软件进行数据分析, 计量资料以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 两组比较采用成组 *t* 检验, 多组比较采用单因素方差分析。计数资料以百分率 (%) 表示, 两组间比较采用  $\chi^2$  检验。相关性分析采用 Pearson 相关分析。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组血清中 lncRNA-ROR 表达及心功能指标比较 不同心功能分级的 CHF 患者与对照组的 lncRNA-ROR 表达水平、LVEF、NT-proBNP 和 LVEDD 比较, 差异均有统计学意义(P < 0.05)。其中 CHF 组中不同心功能分级患者 lncRNA-ROR 表达水平、LVEF、NT-proBNP 和 LVEDD 的组间差异均有统计学意义(P < 0.05)。见表 2。

表 2 两组血清中 lncRNA-ROR 表达及心功能指标比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	lncRNA-ROR	LVEF (%)	NT-proBNP (pg/ml)	LVEDD (mm)
CHF 组	109	-	-	-	-
心功能 I 级	28	1.60 ± 0.35**	57.71 ± 3.26**	312.65 ± 56.71**	48.64 ± 4.68**
心功能 II 级	30	2.55 ± 0.76**#	53.17 ± 2.37**#	565.42 ± 47.86**#	54.43 ± 3.68**#
心功能 III 级	27	4.72 ± 1.66**#△	45.59 ± 3.02**#△	1091.25 ± 344.83**#△	58.19 ± 3.75**#△
心功能 IV 级	24	6.96 ± 2.13**#△☆	35.54 ± 3.15**#△☆	2238.73 ± 767.94**#△☆	63.75 ± 3.78**#△☆
对照组	25	0.58 ± 0.29	63.32 ± 3.09	51.04 ± 10.99	40.92 ± 3.83
F	-	108.709	330.106	142.390	118.957
P	-	0.000	0.0001	0.000	0.000

注: 与对照组比较, \*P < 0.05; 与心功能 I 级比较, #P < 0.05; 与心功能 II 级比较, △P < 0.05; 与心功能 III 级比较, ☆P < 0.05

2.2 CHF 组血清中 lncRNA-ROR 表达水平与心功能指标 Pearson 相关分析结果 Pearson 相关分析显示, CHF 患者血清中 lncRNA-ROR 表达水平与 LVEF

呈负相关(P < 0.05), 与心功能分级、NT-proBNP 和 LVEDD 呈正相关(P < 0.05)。见表 3。

表 3 CHF 组血清中 lncRNA-ROR 表达水平与心功能指标 Pearson 相关分析结果

分析项目	心功能分级		LVEF		NT-proBNP		LVEDD	
	r	P	r	P	r	P	r	P
lncRNA-ROR	0.822	0.000	-0.644	0.000	0.798	0.000	0.856	0.000

3 讨论

3.1 CHF 是多种心血管疾病的终末期表现及主要死亡原因, 目前我国成人 CHF 患病率为 0.9%, 总人数已超过 400 万, 随着年龄的增高, CHF 患病率明显上升, 然而我国人口呈现老龄化趋势, 这将显著增加 CHF 患者的人数<sup>[10]</sup>。且 CHF 致残率及致死率很高, CHF 患者 5 年生存率不超过 50%<sup>[11]</sup>。因此, 早期正确的诊断和早期干预对提高 CHF 患者生存率

和改善远期预后尤为重要。lncRNA 是一类位于细胞核内或胞浆内长度超过 200 nt 的功能性 RNA 分子, 在真核细胞内被普遍转录, 但不具有蛋白编码功能, 过去被认为没有生物学功能的转录噪音, 然而随着研究的深入, 人们发现 lncRNA 参与调节多种复杂疾病的发展过程, 然而目前 lncRNA 在心血管疾病方面的研究才刚刚起步。有研究表明 lncRNA 在心肌组织中的表达具有高度特异性, 这些特异性表

达的 lncRNA 对于心室重塑、心肌细胞凋亡、心功能等具有独特的功能特性<sup>[12]</sup>,提示 lncRNA 在心脏发育和心血管疾病的发生发展中扮演重要角色。

**3.2 LIPCAR** 是一种来源于线粒体的 lncRNA,与心肌梗死后心室重塑相关。研究表明 LIPCAR 表达水平在 CHF 末期明显增高,进一步探究发现较高的 LIPCAR 水平与 CHF 患者的死亡率密切相关,因此,LIPCAR 可以作为一个评估 CHF 患者预后的新型生物学标记物<sup>[13]</sup>。Greco 等<sup>[14]</sup>发现,在非终末期心力衰竭患者中,有 14 个 lncRNA 被显著调节,尤其是 CDKN2B-AS1/ANRIL(INK 4 位点反义非编码 RNA)、HOTAIR(HOX 转录反义 RNA)和 LOC 285194/TUSC 7(抑癌候选基因 7)在外周血单核细胞和心脏组织中表现出相似的调节作用,提示其可能成为诊断心力衰竭的潜在生物学标志物。lncRNA H19 是 miR-675 的前体,miR-675 在多个生物学过程中介导 lncRNA H19 的功能。研究表明 lncRNA H19 的过度表达上调了心肌细胞 miR-675 的表达水平,而 miR-675 的上调则通过靶性结合钙/钙调素依赖蛋白激酶 2D(CaMKII $\delta$ )而负性调节心肌细胞肥大,其有望成为治疗 CHF 的靶点<sup>[15]</sup>。这些 lncRNA 已被证实参与心肌肥大、心室重塑等心力衰竭发展过程。目前已有研究表明,lncRNA-ROR 在小鼠心力衰竭模型及培养的肥大心肌细胞中表达上调,同时检测到心钠肽(ANP)、脑钠肽(BNP)等心力衰竭指标明显升高,沉默 lncRNA-ROR 后 miR-133 表达上调,过表达的 miR-133 不仅降低了 lncRNA-ROR 的表达,而且降低了 ANP 和 BNP 的表达,进而抑制心肌肥厚,而过表达的 lncRNA-ROR 通过负性调控 miR-133 的表达,从而促进心肌肥厚<sup>[8]</sup>。病理性心肌肥厚是 CHF 发生发展过程中重要的一环,然而 lncRNA-ROR 在 CHF 患者外周血的表达及意义研究甚少。本研究通过 PCR 检测 109 例 CHF 患者及 25 名正常对照者血清中 lncRNA-ROR 的表达,分析 lncRNA-ROR 与 CHF 心功能分级、LVEDD、NT-proBNP 及 LVEF 的相关性。结果发现与对照组相比,CHF 组患者血清中 lncRNA-ROR 的表达水平明显升高,同时 lncRNA-ROR 的表达水平随着心功能的分级增高而升高。相关分析发现 lncRNA-ROR 与心功能分级、LVEDD 及 NT-proBNP 呈正相关,与 LVEF 呈负相关。因此,根据已有研究成果和 CHF 发生机制,我们推测 lncRNA-ROR 可能通过促进心肌肥厚而进一步参与 CHF 的发生发展过程,并且与 CHF 的严重程度密切相关。

综上所述,lncRNA-ROR 可以间接反映 CHF 患者的严重程度,有望成为 CHF 新型诊断生物学标志物,这对于早期诊断、有效治疗 CHF 具有重要的意义,有较好的临床发展前景,但其具体作用机制尚需进一步深入研究。

#### 参考文献

- 田倪妮,魏玲,李宏键,等.慢性心力衰竭患者心肌热休克蛋白 47 的表达及其与纤维化的相关性研究[J].中国动脉硬化杂志,2015,23(6):579-583.
- 张雪莲,原芳.微小 RNA 133 在慢性心力衰竭患者血清中表达及与心肌重构和心功能的相关性[J].安徽医药,2016,20(10):1879-1882.
- 贡时雨,范慧敏,张旭敏,等.lncRNA 在心力衰竭预后判断和治疗中的潜力研究进展[J].中国比较医学杂志,2018,28(2):102-105.
- Meng YB,He X,Huang YF,et al. Long non-coding RNA CRNDE promotes multiple myeloma cell growth by suppressing miR-451[J]. Oncol Res, 2017,25(7):1207-1214.
- Ponting CP, Oliver PL, Reik W. Evolution and functions of long noncoding RNAs[J]. Cell, 2009,136(4):629-641.
- 丘达,伍富贵.长链非编码核糖核酸在心血管疾病发生机制的研究进展[J].中国循环杂志,2017,32(3):310-312.
- 李冰,熊正方,郭亚民.长链非编码 RNA ROR 通过 notch1 蛋白调控腺癌细胞的增殖凋亡[J].实用医学杂志,2017,33(12):1922-1927.
- Jiang F, Zhou X, Huang J. Long non-coding RNA-ROR mediates the reprogramming in cardiac hypertrophy[J]. PLoS One, 2016, 11(4):e152767.
- 中华医学会心血管病学分会.中国心力衰竭诊断和治疗指南 2014[J].中华心血管病杂志,2014,42(2):3-10.
- 周京敏,崔晓通,葛均波.中国心力衰竭的流行病学概况[J].中华心血管病杂志,2015,43(12):1018-1021.
- Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B, et al. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines[J]. J Am Coll Cardiol, 2013, 62(16):e147-e239.
- 韩虎魁,何川,安闽生,等.循环长链非编码 RNA AK057321 在心肌梗死患者中的表达及意义初步研究[J].中国实用内科杂志,2017,37(7):648-651.
- Kumarswamy R, Bauters C, Volkmann I, et al. Circulating long noncoding RNA, LIPCAR, predicts survival in patients with heart failure[J]. Circ Res, 2014, 114(10):1569-1575.
- Greco S, Zaccagnini G, Perfetti A, et al. Long noncoding RNA dysregulation in ischemic heart failure[J]. J Transl Med, 2016, 14(10):183.
- Liu L, An X, Li Z, et al. The H19 long noncoding RNA is a novel negative regulator of cardiomyocyte hypertrophy[J]. Cardiovasc Res, 2016, 111(1):56-65.

[收稿日期 2018-08-31][本文编辑 余军 吕文娟]