

· 论 著 ·

循环微小 RNA-16 在急性心肌梗死早期诊断中的价值

朱静, 罗旺胜, 汪俊军, 杨锴

武汉市中心医院新洲院区(武汉市新洲区人民医院)心内科, 湖北 武汉 430400

摘要: **目的** 检测急性心肌梗死(AMI)患者血浆中微小核糖核酸-16(microRNA-16, miR-16)的表达水平,并分析其对AMI早期诊断的价值。**方法** 收集2014年1月至2016年12月在武汉市新洲人民医院心内科确诊的200例AMI患者作为AMI组,以同期本院200例健康体检者作为对照组。对AMI组患者发病0、6、12及24h及对照组,采用荧光定量聚合酶链式反应(FQ-PCR)检测其血浆miR-16表达水平,采用酶联免疫吸附法(ELISA)测定其血浆心肌肌钙蛋白I(cTnI)及肌红蛋白(Mb)含量。分析AMI组患者血浆miR-16表达水平与cTnI及Mb水平的相关性,受试者工作特征曲线(ROC)分析AMI组患者血浆miR-16表达水平对AMI的诊断价值。**结果** 对照组血浆miR-16的表达量为 1.00 ± 0.17 ,AMI组患者发病0、6、12及24h血浆miR-16的表达量分别为 1.73 ± 0.32 、 2.75 ± 0.44 、 2.63 ± 0.47 及 2.36 ± 0.28 ,较对照组显著增高(P 均 <0.05)。对照组血浆cTnI含量为 (33.24 ± 7.32) pg/ml,AMI组患者发病0、6、12及24h血浆cTnI含量分别为 (417.73 ± 36.54) pg/ml、 (779.28 ± 88.25) pg/ml、 (1329.45 ± 221.06) pg/ml及 (1154.22 ± 156.39) pg/ml,较对照组显著增高(P 均 <0.05)。对照组血浆Mb含量为 (21.55 ± 4.67) U/L,AMI组患者发病0、6、12及24h时血浆Mb含量分别为 (26.89 ± 7.22) U/L、 (71.43 ± 16.52) U/L、 (152.18 ± 26.34) U/L及 (94.17 ± 18.16) U/L,除0h外,均较对照组显著增高(P 均 <0.05)。AMI组患者血浆miR-16表达水平与cTnI($r=0.41, P<0.05$)和Mb($r=0.27, P<0.05$)含量分别呈正相关。ROC曲线分析显示,miR-16对AMI诊断的ROC曲线下面积为 $0.86(95\% CI:0.81 \sim 0.90)$,当miR-16的临界值(截点)为2.17时,其敏感度和特异度分别为84.74%和74.57%。**结论** miR-16在AMI患者血浆中的表达明显高于健康人群;高表达的miR-16在AMI诊断中具有较高的敏感度和特异度,拟可作为早期诊断AMI的生物学指标。

关键词: 微小核糖核酸-16; 肌钙蛋白I; 急性心肌梗死; 诊断效能

中图分类号: R 543.3⁺1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2018)10-1323-04

Diagnostic value of cyclic miR-16 in early acute myocardial infarction

ZHU Jing, LUO Wang-sheng, WANG Jun-jun, YANG Kai

Department of Cardiology, Wuhan Xinzhou District People's Hospital, Hubei, Wuhan 430400, China

Correspondence author: LUO Wang-sheng, E-mail: luows17@163.com

Abstract: Objective To detect the expression level of plasma microRNA-16 (miR-16) in the patients with acute myocardial infarction (AMI) and explore the value of miR-16 on early diagnosis of AMI. **Methods** A total of 200 AMI patients (AMI group) and 200 healthy controls (control group) were recruited between January 2014 and December 2016. The expression levels of miR-16 in plasma were detected by FQ-PCR at 0-, 6-, 12- and 24- hour after onset of AMI, and plasma concentrations of cardiac troponin I (cTnI) and myoglobin (Mb) were measured by ELISA. Associations of the expression level of miR-16 in plasma with cTnI and Mb levels in AMI patients were analyzed, and the diagnostic value of plasma miR-16 expression level was analyzed by ROC curve. **Results** The miR-16 expression levels in plasma were 1.73 ± 0.32 , 2.75 ± 0.44 , 2.63 ± 0.47 and 2.36 ± 0.28 at 0-, 6-, 12- and 24- h, respectively in AMI group and significantly increased compared with that (1.00 ± 0.17) in control group (all $P < 0.05$). The plasma concentrations of cTnI were (417.73 ± 36.54) pg/ml, (779.28 ± 88.25) pg/ml, (1329.45 ± 221.06) pg/ml and (1154.22 ± 156.39) pg/mL at 0-, 6-, 12- and 24- h, respectively in AMI group and were obviously higher than that (33.24 ± 7.32) pg/ml in control group (all $P < 0.05$). Mb levels in plasma were (26.89 ± 7.22) U/L, (71.43 ± 16.52) U/L, (152.18 ± 26.34) U/L and (94.17 ± 18.16) U/L at 0-, 6-, 12- and 24- h, respectively in AMI group and were significantly higher than that (21.55 ± 4.67) U/L in control group (all $P < 0.05$). Expression level of miR-16 in plasma was positively correlated with contents of cTnI ($r = 0.41, P < 0.05$) and Mb ($r = 0.27, P < 0.05$) respectively in AMI group. ROC curve analysis showed that the area under

the ROC curve of miR-16 for AMI diagnosis was 0.86 (95% CI:0.81-0.90). When the critical value (cut-off point) of miR-16 was 2.17, the sensitivity and specificity were 84.74% and 74.57%, respectively. **Conclusions** The expression of miR-16 in plasma of AMI patients is significantly higher than that of healthy population, and its high expression has higher sensitivity and specificity in the diagnosis of AMI, which might be used as a biological indicator for early diagnosis of AMI.

Key words: MicroRNA-16; Cardiac troponin I; Acute myocardial infarction; Diagnostic efficacy

急性心肌梗死(AMI)是指冠状动脉急性闭塞,血流中断,所引起的局部心肌的缺血性坏死^[1-2]。AMI患者急性发作后,若延缓救治1h,则病死率提高1.6%,因此及早确诊治疗是改善预后的关键^[3-4]。大量研究证实,血清心肌肌钙蛋白I(cTnI)和肌红蛋白(Mb)是目前临床诊断心肌损伤最敏感和最特异的生化标志物^[5]。微小核糖核酸分子(microRNAs, miRNAs)是一类长度约为19~25核苷酸的小型非编码RNA分子,其通过碱基互补配对方式与靶基因的3'非翻译区结合,进而抑制基因的翻译过程^[6]。

近年来循环miRNAs研究越来越受到重视。研究发现,血浆中miR-21、miR-126、miR-124及miR-99a等在AMI发生发展过程中异常表达,提示可能作为AMI的潜在生物标志物^[7-9]。miR-16在多种疾病中异常表达并发挥重要作用。例如,miR-16在骨肉瘤中高表达,而敲低其表达可明显抑制肿瘤细胞的增殖和转移^[10];高表达miR-16可作为乳腺癌诊断和预后判断新的分子标志物^[11];miR-16在结肠癌中表达上调,并与其复发密切相关^[12];非小细胞肺癌患者血浆中miR-16较正常人显著上调,高表达miR-16可作为肺癌诊断标志物^[13]。目前关于循环miR-16在AMI中的表达尚少见报道。本文对循环miR-16在AMI患者和健康人血浆中的含量进行比较,探讨miR-16是否具有作为AMI早期诊断标志物的可能性。

1 资料与方法

1.1 临床资料 选取2014年1月至2016年12月于我院心内科就诊的200例AMI患者为AMI组,其中男123例,女77例;年龄38~79(52.21±5.73)岁。纳入标准:符合WHOAMI诊断标准;年龄>18周岁;无合并内分泌和/或代谢性疾病;近期无感染史;无职业性致癌因素接触史。排除标准:AMI诊断不明确者;既往行冠脉支架植入术或冠脉旁路手术者;先天性心脏病患者;合并内分泌和/或代谢性疾病。选取同期我院体检中心200例健康体检者为对照组,其中男116例,女84例;年龄32~76(49.87±4.29)岁。本研究经本院医学伦理委员会批准,并获得全部患者知情同意。

1.2 试剂与仪器 (1)试剂:总RNA提取试剂盒

(Trizol),反转录试剂盒TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit(Ambion),QuantiTect SYBR Green PCR Kit(Qiagen),PCR扩增引物由Invitrogen广州分公司合成。肌钙蛋白I(cTnI)和肌红蛋白(Mb)酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒购自美国Sigma公司。(2)仪器:普通PCR仪(BIO-RAD),电泳仪及凝胶成像系统公司(BIO-RAD),NanoDrop 2000c紫外分光光度计(ThermoScientific),普通离心机及电热恒温水浴箱(BIO-RAD),荧光定量PCR仪(Roche)。

1.3 静脉血标本采集 于AMI组患者发病0、6、12及24h4个时间点抽取患者静脉血4ml;对照组为早晨空腹采血。使用乙二胺四乙酸钠盐抗凝,颠倒摇匀,随后放置-80℃超低温冰箱保存备用。

1.4 总RNA提取及反转录 按照Trizol试剂盒说明书抽提各组标本总RNA。用NanoDrop 2000c紫外分光光度计对提取的总RNA进行定量后,取1μg总RNA按照TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit试剂盒说明书进行逆转录反应合成cDNA,随后将cDNA放置-80℃超低温冰箱保存备用。

1.5 荧光定量聚合酶链式反应(PCR)反应 荧光定量PCR反应参照QuantiTect SYBR Green PCR Kit试剂盒说明书,以合成的cDNA作为模版在罗氏Light-Cycler 480 II荧光定量PCR仪上进行试验。反应总体积20μl:包括模版cDNA 1μl,miR-16上游引物和下游引物各1μl,2×SYBR premix Ex Taq™ II PCR 7μl和RNase-free water 10μl。反应条件为:95℃ 10min,随后95℃ 10s,65℃ 30s,72℃ 30s,共40个循环。miR-16上游引物序列为:5'-CCA GUA UUA ACU GUG CUG CUG A-3',下游引物序列为通用引物;U6上游引物序列为:5'-CCA UGC UCU UCU ACU CCU-3',下游引物序列为:5'-CAC UGA UGU CGG UUA GUU-3'。以U6作为内参对照,采用比较CT值法分析各组miR-16的相对表达量^[14]。

1.6 酶联免疫吸附法(ELISA) 采用双抗体夹心法测定各组血浆cTnI和Mb含量的变化:用纯化的一抗包被微孔板,制成固相抗体,往微孔中加入血清,再加入与酶标记过的二抗结合,形成抗体-抗原-酶标抗体复合物,经过彻底洗涤后加显色剂显色。

1.7 统计学分析 统计分析采用SPSS 19.0软件。

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 Student's *t* 检验;计数资料采用例(%)表示,采用 χ^2 检验;相关性采用 Pearson 相关分析;miR-16 对的诊断效能采用受试者工作特征曲线分析。 $\alpha = 0.05$ 为检验水准。

2 结果

2.1 一般资料比较 两组对象的年龄、性别、心率、血压及吸烟情况相当(P 均 > 0.05);AMI 组 LDL-C 水平高于对照组, HDL-C 低于对照组(P 均 < 0.01),提示上述两指标可能与 AMI 相关。见表 1。

2.2 两组血浆中 miR-16 的表达 对照组血浆 miR-16 的相对表达量为 1.00 ± 0.17 , AMI 组患者发病 0、6、12 及 24 h 血浆 miR-16 的相对表达量分别为 1.73 ± 0.32 、 2.75 ± 0.44 、 2.63 ± 0.47 及 2.36 ± 0.28 , 较对照组明显增高(P 均 < 0.05)。见图 1。

2.3 两组血浆中 cTnI 含量比较 对照组血浆 cTnI 含量为 (33.24 ± 7.32) pg/ml, AMI 组患者发病 0、6、12 及 24 h 时血浆 cTnI 含量分别为 (417.73 ± 36.54) pg/ml、 (779.28 ± 88.25) pg/ml、 $(1\ 329.45 \pm 221.06)$ pg/ml 及 $(1\ 154.22 \pm 156.39)$ pg/ml, 较对照组显著增高(P 均 < 0.05)。见图 2。

2.4 两组血浆中 Mb 含量比较 对照组血浆 Mb 含量为 (21.55 ± 4.67) U/L, AMI 组患者发病 0、6、12 及 24 h 血浆 Mb 的含量分别为 (26.89 ± 7.22) U/L、 (71.43 ± 16.52) U/L、 (152.18 ± 26.34) U/L 及 (94.17 ± 18.16) U/L, 除 0 h 外, 均较对照组显著增高(P 均 < 0.05)。见图 3。

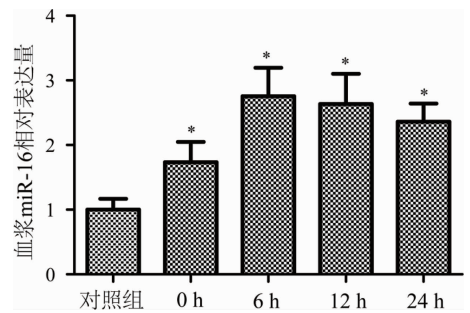
2.5 AMI 组患者血浆 miR-16 表达与 cTnI 及 Mb 的相关性 Pearson 相关分析表明, AMI 组患者血浆 miR-16 表达水平与 cTnI 和 Mb 分别呈正相关($r = 0.41$, $P < 0.05$; $r = 0.27$, $P < 0.05$)。

2.6 miR-16 对 AMI 诊断的 ROC 分析 miR-16 对 AMI 诊断的 ROC 曲线下面积为 0.86 (95% CI: 0.81 ~ 0.90), 当 miR-16 的临界值(截点)为 2.17 时, 敏感度和特异度分别为 84.74% 和 74.57%。见图 4。

表 1 AMI 组与对照组临床资料比较 ($\bar{x} \pm s$)

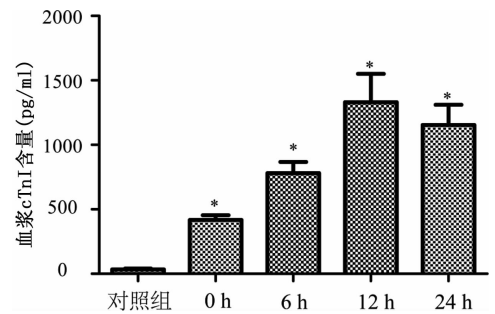
组别	AMI 组 (n=200)	对照组 (n=200)	P 值
年龄(岁)	52.21 ± 5.73	49.87 ± 4.29	0.46
男/女(例)	123/77	116/84	0.77
吸烟[例(%)]	45(22.5)	39(19.5)	0.09
心率(次/min)	81.12 ± 11.55	78.64 ± 12.31	0.32
收缩压(mm Hg)	132.22 ± 19.42	129.88 ± 16.67	0.57
舒张压(mm Hg)	78.21 ± 6.49	77.53 ± 8.97	0.84
LDL-C (mmol/L)	3.75 ± 0.88	2.78 ± 0.63	0.00
HDL-C (mmol/L)	1.75 ± 0.66	2.27 ± 0.79	0.00

注: HDL-C: 高密度脂蛋白胆固醇; LDL-C: 低密度脂蛋白胆固醇。



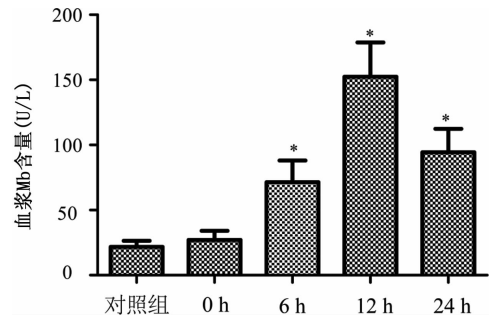
注:与对照组相比, * $P < 0.05$ 。

图 1 AMI 组和对对照组血浆中 miR-16 的表达比较



注:与对照组相比, * $P < 0.05$ 。

图 2 AMI 组和对对照组血浆 cTnI 含量比较



注:与对照组相比, * $P < 0.05$ 。

图 3 AMI 组与对对照组血浆 Mb 含量比较

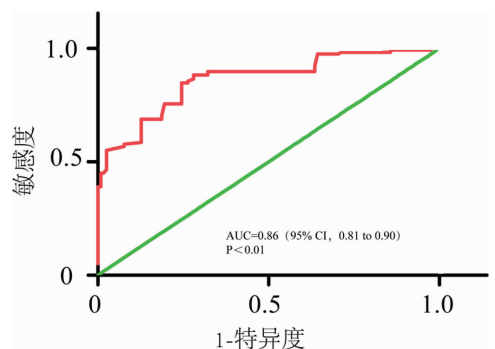


图 4 血浆 miR-16 对 AMI 诊断的 ROC 曲线

3 讨论

Mb 是第 1 个被用于诊断心肌损伤的非酶类蛋白, 在 AMI 发病早期快速释放, 症状发作 1 h 后血中即可升高, 5 ~ 10 h 达高峰, 约 30 h 后可恢复至正常, 是 AMI 早期诊断最敏感的指标。cTnI 是心肌的特有成分, 心肌受损时, cTnI 会大量释放到血液中, 心肌受损后 3 ~ 5 h, 血液中可检测到 cTnI, 并持续升高, 12

~24 h 达高峰,阳性结果持续5~7 d,是目前心肌损伤最具特异性的标志物。研究显示,miRNAs 在血浆中稳定存在,AMI 可引起患者循环中一些 miRNAs 表达异常。例如,Zhang 等^[14]发现 miR-21 在老年性 AMI 患者血浆中高表达,并与 Mb 和 cTnI 的表达成正相关。Coskunpinar 等^[15]报道循环 miR-221-3p 可作为早期预测 AMI 的新标志物。

miR-16 位于人基因组 13q14.2 区域,目前已有文献报道 miR-16 在多种肿瘤及心脑血管等多种疾病中起重要作用。胃癌和膀胱癌中上调 miR-16 的表达可明显抑制肿瘤细胞增殖、侵袭并促进细胞凋亡^[16-17]。miR-16 在高血压心脏病患者血浆明显高表达并发挥重要作用^[18]。阿尔茨海默病患者血浆 miR-16 可调控神经细胞凋亡^[19]。Devaux 等^[20]对 AMI 出院患者进行四种 miRNAs 的检测,显示其中 miR-16 升高是 AMI 左心室收缩力受损的预测因素。目前关于循环 miR-16 在 AMI 中的表达及作用尚少见报道。本研究发现,miR-16 在 AMI 患者血浆中的表达明显高于健康体检者,提示 miR-16 和 Mb 与 cTnI 一样,具有 AMI 早期诊断的参考价值。本研究选取发病后 4 个时点进行动态监测,结果显示,miR-16 具有一定的时间效应,0 h 左右检测到表达升高,6 h 左右达高峰,随后逐渐下降。与 Mb 和 cTnI 相比,miR-16 达峰较快。同时 AMI 组患者血浆 miR-16 表达水平与 cTnI 和 Mb 的含量呈正相关。ROC 曲线分析显示,当 miR-16 的临界值(截点)为 2.17 时,miR-16 对 AMI 诊断的敏感度和特异度分别为 84.74% 和 74.57%。提示高表达的 miR-16 在 AMI 诊断中具有较高的敏感度和特异度。

综上所述,本研究观察到 miR-16 在 AMI 患者血浆中的表达明显高于健康人群;与 Mb 和 cTnI 相比较,miR-16 升高较快,6 h 左右达到高峰。高表达的 miR-16 在 AMI 诊断中具有较高的敏感度和特异度,拟可作为早期诊断 AMI 的生物学指标。

参考文献

[1] Abuzaid A, Fabrizio C, Felpel K, et al. Oxygen Therapy in Patients with Acute Myocardial Infarction: A Systemic Review and Meta-Analysis[J]. *Am J Med*, 2018, 131(6): 693-701.

[2] Bagai A, Dangas GD, Stone GW, et al. Reperfusion strategies in acute coronary syndromes[J]. *Circ Res*, 2014, 114(12): 1918.

[3] Sim DS, Jeong MH. Development of Novel Drug-Eluting Stents for Acute Myocardial Infarction[J]. *Chonnam Med J*, 2017, 53(3): 187.

[4] Quinn T. Review: Real-world use of nonsteroidal antiinflammatory

drugs is associated with acute myocardial infarction[J]. *Ann Intern Med*, 2017, 167(6): JC30.

- [5] Hachey BJ, Kontos MC, Newby LK, et al. Trends in Use of Biomarker Protocols for the Evaluation of Possible Myocardial Infarction [J]. *J Am Heart Assoc*, 2017, 6(9): e005852.
- [6] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297.
- [7] Wang ZH, Sun XY, Li CL, et al. miRNA-21 Expression in the Serum of Elderly Patients with Acute Myocardial Infarction [J]. *Med Sci Monit*, 2017, 23: 5728-5734.
- [8] Guo ML, Guo LL, Weng YQ. Implication of peripheral blood miRNA-124 in predicting acute myocardial infarction [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21(5): 1054-1059.
- [9] Yang SY, Wang YQ, Gao HM, et al. The clinical value of circulating miR-99a in plasma of patients with acute myocardial infarction[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2016, 20(24): 5193-5197.
- [10] Dong J, Bi B, Zhang L, et al. GLIPRI inhibits the proliferation and induces the differentiation of cancer-initiating cells by regulating miR-16 in osteosarcoma[J]. *Oncol Rep*, 2016, 36(3): 1585.
- [11] Usmani A, Shoro AA, Shirazi B, et al. MiR-16: a novel hereditary marker in breast cancer and their offspring[J]. *J Pak Med Assoc*, 2017, 67(3): 446-450.
- [12] You C, Liang H, Sun W, et al. Deregulation of the miR-16-KRAS axis promotes colorectal cancer[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 37459.
- [13] Sromek M, Glogowski M, Chechlinska M, et al. Changes in plasma miR-9, miR-16, miR-205 and miR-486 levels after non-small cell lung cancer resection[J]. *Cell Oncol*, 2017, 40(5): 529-536.
- [14] Zhang Y, Liu YJ, Liu T, et al. Plasma microRNA-21 is a potential diagnostic biomarker of acute myocardial infarction[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2016, 20(2): 323-329.
- [15] Coskunpinar E, Cakmak HA, Kalkan AK, et al. Circulating miR-221-3p as a novel marker for early prediction of acute myocardial infarction[J]. *Gene*, 2016, 591(1): 90-96.
- [16] Jiang QQ, Liu B, Yuan T. MicroRNA-16 inhibits bladder cancer proliferation by targeting Cyclin D1 [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2013, 14(7): 4127-4130.
- [17] Zhu C, Huang Q, Zhu H. Melatonin Inhibits the Proliferation of Gastric Cancer Cells Through Regulating the miR-16-5p-Smad3 Pathway [J]. *DNA Cell Biol*, 2018, 37(3): 244-252.
- [18] He L, Huang C. MiR-19b and miR-16 cooperatively signaling target the regulator ADRA1A in Hypertensive heart disease [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 91: 1178-1183.
- [19] Zhang B, Chen CF, Wang AH, et al. MiR-16 regulates cell death in Alzheimer's disease by targeting amyloid precursor protein [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2015, 19(21): 4020-4027.
- [20] Devaux Y, Vausort M, Mccann GP, et al. Correction: a panel of 4 microRNAs facilitates the prediction of left ventricular contractility after acute myocardial infarction [J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): 773-779.

收稿日期:2018-05-21 修回日期:2018-06-12 编辑:周永彬