

血浆 miR-324-5p 对单纯性先天性心脏病预后风险分级的评估

万楠, 王璐, 孟冬娅, 郑伟, 胡晓芳[△] (沈阳军区总医院检验科, 沈阳 110016)

【摘要】 目的 研究单纯性先天性心脏病(CHD)患者血浆 miR-324-5p 表达变化, 评价其在 CHD 预后和风险分级等方面的临床应用价值。**方法** 选取 2012 年 1 月至 2013 年 1 月沈阳军区总医院先天性心脏病内科收治的 CHD 患儿 76 例为 CHD 组, 另选取 13 例健康者血清标本为对照组, 应用实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)检测血浆中 miR-324-5p 的表达变化, 通过 Kalpan-Meier 生存分析、Cox 比例风险模型等综合评价血浆 miR-324-5p 在 CHD 预后和风险分级等方面的临床应用价值。**结果** 与对照组相比, 单纯性 CHD 患者外周血浆 miR-324-5p 表达升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$); Kaplan-Meier 生存分析表明, miR-324-5p 表达水平较高组患者复发风险及死亡概率更高($P < 0.05$); Cox 比例风险模型分析表明, 在单因素分析中, miR-324-5p 表达水平和体质量指数(BMI)是 CHD 的发病危险因子($P < 0.05$), 风险比(HR)分别为 1.79 和 2.17; 在多因素分析中, 只有 BMI 是 CHD 的发病危险因子($P < 0.05$), HR 为 1.38, HR 95% 置信区间(CI)为(1.12, 1.79)。**结论** 血浆 miR-324-5p 作为 CHD 诊断的生物标志物具有一定的临床应用价值, 但还需要与其他指标联合应用。

【关键词】 先天性心脏病; miR-324-5p; 预后

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2015.05.010 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)05-0603-03

Plasma miR-324-5p for evaluation of prognostic risk classification in patients with simple congenital heart disease

WAN Nan, WANG Lu, MENG Dong-ya, ZHENG Wei, HU Xiao-fang[△] (Department of Clinical Laboratory, General Hospital of Shenyang Military Region, Shenyang, Liaoning 110016, China)

【Abstract】 Objective To investigate the change of plasma miR-324-5p expression in the patients with simple congenital heart disease(CHD) and to evaluate its clinical application value in the prognosis and the risk classification of CHD. **Methods** 76 children patients with CHD and 13 healthy controls were detected the plasma expression levels of miR-324-5p by the real-time PCR. The clinical application value of plasma miR-324-5p in the prognosis and the risk classification of CHD was comprehensively evaluated by adopting the Kalpan-Meier survival analysis, Cox proportional hazard model. **Results** The peripheral plasma miR-324-5p expression level in the simple CHD group was increased compared with the control group, the difference had statistical significance ($P < 0.05$); the Kalpan-Meier survival analysis indicated that the higher miR-324-5p expression group had much higher recurrent risk and much higher death probability($P < 0.05$); the Cox proportional hazard model indicated that in the univariate analysis, miR-324-5p and BMI were the risk factors of CHD($P < 0.05$). The hazard ratio (HR) was 1.79 and 2.17 respectively. The multivariate analysis demonstrated that only BMI was the risk factor of CHD($P < 0.05$), HR was 1.38, 95% CI(1.12, 1.79). **Conclusion** Plasma miR-324-5p as a biomarker of CHD diagnosis could have certain clinical application value, but should be combined application with other indicators.

【Key words】 congenital heart disease; miR-324-5p; prognosis

先天性心脏病(CHD)是一种常见的先天畸形, 据相关文献报道其在新生儿中的发病率为 1.25%^[1]。尽管目前相关检测和治疗手段已经提高, 但是 CHD 引起的死亡仍占新生儿死亡的 3%, 占先天畸形死亡的 46%^[2]。目前对 CHD 的治疗以手术为主, 这不仅给患儿及其家庭带来沉重的经济负担, 且近 50% 的患儿面临着再次手术、心律失常及心力衰竭等问题^[3-6]。因此, 对 CHD 患者的预后判断和风险分级尤为重要, 尽早地对高风险患者进行相关治疗, 对提高患者的生存率和生活质量有着重要意义。miR-324-5p 位于 17 染色体短臂 1 区 3 带 1 亚带(17p13.1), 编码于酰基辅酶 A 脱氢酶第 35 个内含子并与其共转录。以往关于 miR-324-5p 的研究多集中于肿瘤, 近期的研究指出循环系统 miR-324-5p 可用于诊断心力衰竭, 提示 miR-324-5p 与心血管系统密切相关。因此, 本研究通过检测外周血清 miR-324-5p 来阐明 CHD 的疾病发生、发展机制, 并为治疗及预后提供有价值的信息。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2012 年 1 月至 2013 年 1 月本院先天性心脏病内科收治的 76 例单纯性 CHD 患者为 CHD 组; 另选取本科健康者 13 例为对照组, 所有单纯性 CHD 患者均具有典型的临床表现, 且经心脏超声和手术确诊。

1.2 方法 所有患者于入院前抽取静脉血 2 mL, 乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K₂)抗凝, 3 000 r/min 离心 15 min, 分离血浆于 -20 ℃ 冻存备用。

1.2.1 血浆微 RNA(miRNA)的提取 采用天根生化(北京)科技有限公司 RNApure pure Tissue Kit 试剂盒(批号 DP121221)进行血浆 miRNAs 提取, 提取的 miRNAs 于 -70 ℃ 保存以防止降解。

1.2.2 miR-324-5p 反转录 采用茎环反转录方法进行 miR-324-5p 反转录。茎环实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)引物: 5'-CTC AAC TGG TGT CGT GGA GTC GGC AAT TCA

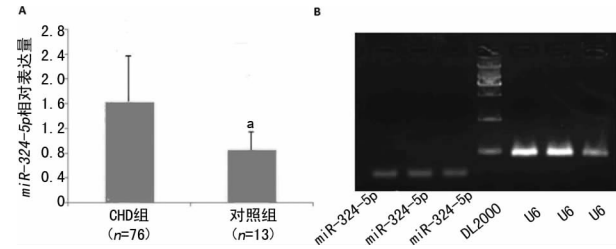
GTT GAG ACA CCA AT-3';反应条件:16 ℃ 30 min,42 ℃ 30 min,85 ℃ 5 min。应用 TaKaRa Real-Time PCR 试剂盒,以 U6 为内参照基因进行实时荧光定量 PCR 分析,正向引物:5'-ACA CTC CAG CTG GGC GCA TCC CCT AGG GC-3';反向引物:5'-TGG TGT CGT GGA GTC G-3';内参基因 U6-sense:5'-AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT-3';U6-antisense:5'-CTC GCT TCG GCA GCA CA-3'。实时荧光定量 PCR 反应在 ABI Prism 7500 型高通量荧光定量仪(美国 ABI 公司)上进行,反应条件:95 ℃ 30 s,95 ℃ 5 s,60 ℃ 34 s,95 ℃ 15 s,60 ℃ 60 s,循环 40 次,95 ℃ 5 s。反应结果采用标准曲线法进行分析,每个样品重复 3 次,取平均值。

1.3 统计学处理 生存分析采用 Kaplan-Meier 法,对 CHD 患者以 miR-324-5p 表达水平 $2^{-\Delta Ct}$ 的中位数为标准,分为高表达和低表达两组。终点事件定义为心源性死亡及与心血管相关疾病的复发,随访时间 1 年。对两组的生存曲线采用对数秩检验分析是否存在差异,进而判断不同 miR-324-5p 表达水平的 CHD 患者生存过程是否存在差异。CHD 发病风险分析采用 SPSS18.0 统计学软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计数资料以百分率表示;首先使用非参数 Mann-Whitney、*t* 检验或 χ^2 检验进行组间比较;以 $\alpha=0.05$ 为检验水准, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。将组间比较差异有统计学意义的因素($P<0.05$)代入 Cox 比例风险模型进行分析,再采用逐步回归法对单因素分析中 $P<0.1$ 的因子进行 Cox 回归多因素模型分析,最终判断 CHD 发病风险的因素。

2 结 果

2.1 实时荧光定量 PCR 检测血清中 miR-324-5p 的表达水平 与对照组相比,CHD 患者外周血浆 miR-324-5p 表达水平升

高,差异具有统计学意义($P<0.05$)。见图 1。



注:A 为两组血浆 miR-324-5p 相对表达水平,与 CHD 组比较, $^aP<0.05$;B 为实时荧光定量 PCR 产物凝胶电泳图。

图 1 CHD 患儿与对照组血浆 miR-324-5p 表达情况

2.2 Kalpan-Meier 生存分析 以 miR-324-5p 表达水平的中位数 0.157 为标准将 CHD 患者分为高表达组与低表达组。在 1 年的随访中,由于各种原因造成失访的患者 11 例,其余 CHD 患者中发生死亡 3 例,肺动脉高压 4 例,心律失常 8 例,心力衰竭 4 例,肺炎 2 例。对数秩检验分析结果表明,miR-324-5p 表达水平较高的患者将承受更多的发病风险及较高的死亡概率($\chi^2=4.456,P=0.035$)。

2.3 CHD 发病风险分析 CHD 组与对照组的患儿年龄、体质质量指数(BMI)、血红蛋白与血小板水平及 miR-324-5p 表达水平比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。将以上因素代入 Cox 比例风险模型进行分析,单因素分析发现,miR-324-5p 表达水平和 BMI 都是 CHD 的发病危险因子,风险比(HR)分别为 1.79($P=0.046$)和 2.17($P<0.01$);但在多因素分析中,只有 BMI 是 CHD 的发病危险因子($P=0.021$),HR 为 1.38,HR 95%置信区间(CI)为(1.12,1.79)。见表 2。

表 1 两组基本资料比较[$\bar{x} \pm s$ 或 $n(\%)$]

组别	<i>n</i>	患儿年龄 (岁)	性别 (男)	BMI (kg/m ²)	CHD 家族史	母亲 吸烟史	出生时母亲 年龄(岁)	血红蛋白 (g/L)	血小板 ($\times 10^9/L$)	miR-324-5p 表达水平 ^a
CHD 组	76	3.5 $\pm$ 1.8	22(28.9)	11.3 $\pm$ 1.2	1(1.3)	11(14.5)	31 $\pm$ 7.3	118 $\pm$ 19	218 $\pm$ 35	0.14
对照组	13	9.5 $\pm$ 1.1	7(53.8)	16.1 $\pm$ 1.9	0(0)	2(15.4)	28 $\pm$ 5.3	131 $\pm$ 15	281 $\pm$ 44	0.08
<i>P</i>		<0.01	0.109	<0.01	0.854	0.605	0.16	0.022	<0.01	0.033

注:^a miR-324-5p 表达水平用 $2^{-\Delta Ct}$ 中位数表示, $2^{-\Delta Ct}=2^{-(Ct\text{ miR-324-5p}-CtU6)}$ 。

表 2 CHD 发病危险因素的 Cox 比例风险模型单因素分析

变量	HR	HR(95%CI)		<i>P</i>
		下限	上限	
患儿年龄	1.28	0.63	1.59	0.562
血红蛋白	1.53	0.85	2.02	0.137
血小板	1.39	0.73	1.88	0.263
miR-324-5p 表达水平 ^a	1.79	1.09	2.15	0.046
BMI	2.17	1.22	2.95	<0.001

注:^a miR-324-5p 表达水平用 $2^{-\Delta Ct}$ 中位数表示, $2^{-\Delta Ct}=2^{-(Ct\text{ miR-324-5p}-CtU6)}$ 。

3 讨 论

miRNAs 是一类内源性的、非编码的小分子(18~24 个核苷酸)RNA,通过与靶基因 3'-UTR 互补结合,在转录后水平负性调控靶基因表达。miRNAs 的表达具有组织特异性和发育阶段特异性,在心脏发育、骨骼肌增殖分化和肿瘤疾病中都起

着重要的作用^[7-9]。细胞内 miRNAs 水平异常表达已被证实与许多心血管疾病,如心力衰竭、心肌肥大及心血管重塑等密切相关。一些 miRNAs 在心血管组织中高表达,它们在调控心血管的发育和疾病方面具有重要意义,这给 CHD 的诊断和治疗带来了希望^[10-12]。早期的 miRNAs 研究主要集中于组织或细胞,在临床上无法用于 CHD 的诊断。近几年的研究表明,人外周血清中也存在丰富的 miRNAs,并且十分稳定,能抵抗 RNA 酶降解,并可以抵御酸、碱和高温等不良环境,室温放置一周仍稳定。这使得血清 miRNAs 具备了常规检测指标的基本条件。同时在疾病状态下,血液循环中的 miRNAs 主要来自患病的组织细胞的主动分泌,并通过外泌体、微小体等载体传送到微循环中的免疫细胞、成纤维细胞、内皮细胞或其他的受体细胞中,进而影响这些受体细胞的功能。

以往研究 miR-324-5p 多集中于肿瘤,而 Ellis 等^[13]提出循环系统 miR-324-5p 可用于诊断心力衰竭,提示其与心血管系统密切相关。本研究首先通过实时荧光定量 PCR 方法初步分析循环系统 miR-324-5p 在疾病人群中的表达分布状况,结果

表明 CHD 患者血清 miR-324-5p 表达水平较对照组明显增高。随后 Kaplan-Meier 生存分析表明,miR-324-5p 高表达患者的预后较低表达患者差,将承受更多的发病风险及较高的死亡概率。进一步采用 Cox 比例风险模型分析 CHD 的发病危险因素,在单因素分析中发现 miR-324-5p 表达水平和 BMI 都是 CHD 的发病危险因素,HR 分别为 1.79 和 2.17;但在多因素分析中,只有 BMI 是 CHD 的发病危险因素,HR 为 1.38。说明 miR-324-5p 在 CHD 的发病机制上并不是一个主要因素,可能处于一个旁路通道中,这也同时说明 CHD 的发病是多种因素综合作用的结果,miR-324-5p 并未起到决定性作用。另一方面,miR-324-5p 通过调控细胞多种生物学表现,导致下游基因和细胞生物学性状的一系列变化。作者认为在胚胎心脏发育过程中 miR-324-5p 通过直接或间接抑制某些基因表达来调节心肌细胞的凋亡和增殖,当 miR-324-5p 的表达失调,影响某个或某些靶基因表达水平并发生失控,继而引起心脏形态和功能的异常,导致 CHD 发生。

综上所述,在多因素分析中 miR-324-5p 虽然不是 CHD 的发病危险因素,但是 miR-324-5p 高表达的 CHD 患者却有较高的死亡概率和发病风险,提示可以将其作为临床预后判断的辅助指标,对提高 CHD 患者的生存质量有着一定的指导意义。

参考文献

[1] Sadowski SL. Congenital cardiac disease in the newborn infant: past, present, and future[J]. Crit Care Nurs Clin North Am, 2009, 21(1): 37-48.

[2] Donofrio MT, Moon-Grady AJ, Hornberger LK, et al. Diagnosis and treatment of fetal cardiac disease: a scientific statement from the American Heart Association[J]. Circulation, 2014, 129(21): 2183-2242.

[3] Muner-Hernando M, Gil-Mira M, Zapardiel I. Advances in prenatal diagnosis of congenital heart diseases[J]. Ginecol Obstet Mex, 2013, 81(6): 334-344.

[4] Ding X, Ding J, Ning J, et al. Circulating microRNA-122

as a potential biomarker for liver injury[J]. Mol Med Rep, 2012, 5(6): 1428-1432.

[5] Luo J, Chen M, Huang H, et al. Circulating microRNA-122a as a diagnostic marker for hepatocellular carcinoma[J]. Onco Targets Ther, 2013, 6(4): 577-583.

[6] Zahm AM, Thayu M, Hand NJ, et al. Circulating microRNA is a biomarker of pediatric Crohn disease[J]. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2011, 53(1): 26-33.

[7] Zhao Z, Zhao Q, Warrick J, et al. Circulating microRNA miR-323-3p as a biomarker of ectopic pregnancy[J]. Clin Chem, 2012, 58(5): 896-905.

[8] Alvarez-Garcia I, Miska EA. MicroRNA functions in animal development and human disease[J]. Development, 2005, 132(21): 4653-4662.

[9] Gomase VS, Parundekar AN. microRNA: human disease and development[J]. Int J Bioinform Res Appl, 2009, 5(5): 479-500.

[10] Borik S, Simon AJ, Nevo-Caspi Y, et al. Increased RNA editing in children with cyanotic congenital heart disease[J]. Intensive Care Med, 2011, 37(10): 1664-1671.

[11] Chowdhury S, Erickson SW, MacLeod SL, et al. Maternal genome-wide DNA methylation patterns and congenital heart defects[J]. PLoS One, 2011, 6(1): e16506-e16509.

[12] Topkara VK, Mann DL. Role of microRNAs in cardiac remodeling and heart failure[J]. Cardiovasc Drugs Ther, 2011, 25(2): 171-182.

[13] Ellis KL, Cameron VA, Troughton RW, et al. Circulating microRNAs as candidate markers to distinguish heart failure in breathless patients[J]. Eur J Heart Fail, 2013, 15(10): 1138-1147.

(收稿日期: 2014-10-26 修回日期: 2014-12-10)

(上接第 602 页)

好,说明仪器的分类结果可信,这与类似报道结果相一致^[4-6]。

胸腔积液常规操作过程繁琐,不少学者使用不同仪器对其进行检测^[7-8]。但由于胸腔积液中细胞成分较多,细胞数量变化范围大,在本研究中,为使标本适合仪器的检测,尚需对红细胞数量低于 $10 \times 10^9/L$ 的标本进行浓缩,对白细胞过高的脓性胸腔积液则要进行稀释,这也需要消耗一定的时间与人工。并且,即便如此,Sysmex XT-2000i 全自动血细胞分析仪也只能对部分标本或检测项目适用,不能完全替代人工显微镜检测,在实际工作中,仍然应加强检验工作者对细胞形态学的学习与培训,并提高手工操作的能力。

参考文献

[1] 中华人民共和国卫生部医政司. 全国临床检验操作规程[M]. 3 版. 南京:东南大学出版社, 2006: 132-135.

[2] 熊立凡, 刘成玉. 临床检验基础[M]. 4 版. 北京:人民卫生出版社, 2010: 96-97.

[3] 朱丽丹, 陈小剑, 干素娥. 血液细胞分析仪检测浆膜腔积

液细胞数的初探[J]. 江西医学检验, 2004, 22(2): 131.

[4] 张勇, 伍淑娟, 余秀文, 等. 全自动五分类血液分析仪在胸腹水检测中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(10): 1175-1176.

[5] 何银华, 颜宇飞, 蔡峥, 等. Sysmex XE-2100 全自动血液分析仪计数胸腹水有核细胞的评价[J]. 检验医学, 2011, 26(4): 228-230.

[6] 罗耀凌, 池沛冬, 邝妙欢, 等. Sysmex XS-800i 血细胞分析仪在浆膜腔积液计数及分类中的应用[J]. 热带医学杂志, 2011, 11(6): 662-664.

[7] 鲁玲. UF-1000i 全自动尿沉渣分析仪对胸腹水中白细胞及红细胞的检测价值[J]. 现代实用医学, 2011, 23(4): 418-419.

[8] 莫筠, 陈俭荣, 谭洪扬, 等. 全自动尿沉渣分析仪对胸腔积液中红细胞和白细胞的检测价值[J]. 中国基层医药, 2014, 21(10): 1522-1524.

(收稿日期: 2014-11-10 修回日期: 2014-12-15)