

急性肺栓塞患者血清 miRNAs 标志物检测及 miR-134 的临床价值

朱邦 陈如昌 朱晓丹

[摘要] **目的** 探讨急性肺栓塞患者血清 miRNAs 标志物检测及 miR-134 的临床价值。**方法** 收集 50 例急性肺栓塞患者及 25 例对照者的血清,应用 miRNA 表达谱芯片进行筛选,并采用实时荧光定量聚合酶链反应进行验证,检测急性肺栓塞患者血清 miRNAs 的表达,分析 miR-134 标志物与 Wells 评分之间的关系及其诊断价值。**结果** 血清 miRNA 表达谱分析发现,在 6 例急性肺栓塞和 6 例健康对照者中筛选出 10 个 miRNA (miR-134、miR-197、miR-126、miR-191、miR-122、miR-370、miR-155、miR-133a、miR-375、miR-208b) 存在表达差异 (t 分别=14.17、12.26、11.13、10.02、9.34、17.26、15.22、7.57、3.62、7.24, P 均 <0.05)。进一步在 50 例急性肺栓塞患者中做血清 miRNAs 验证,结果显示:miR-134、miR-197 和 miR-126 在急性肺栓塞患者血清中表达水平较对照组高,而 miR-208b 表达水平较对照组低 (t 分别=7.65、6.23、4.36、-5.24, P 均 <0.05)。血清 miR-134 相对表达量与 Wells 评分呈明显正相关 ($r=0.32, P<0.05$)。当 miR-134 相对表达量取 5.6 时,miR-134 对急性肺栓塞的诊断灵敏度为 72.00% (36/50),特异度为 82.00% (41/50),曲线下面积为 0.86。**结论** miR-134、miR-197、miR-126 和 miR-208b 均可作为急性肺栓塞患者的血清 miRNAs 标志物,且 miR-134 在诊断和预测急性肺栓塞风险中具有较高的临床价值。

[关键词] 血清 miR-134; 急性肺栓塞; Wells 评分; 标志物

Detection of serum miRNAs markers and clinical value of miR-134 in patients with acute pulmonary embolism

ZHU Bang, CHEN Ruchang, ZHU Xiaodan. Department of Clinical Laboratory, Yiwu Central Hospital, Yiwu 322000, China

[Abstract] **Objective** To detect the serum miRNAs markers and explore the clinical value of miR-134 in patients with acute pulmonary embolism. **Methods** The serum samples of fifty cases of acute pulmonary embolism and 25 healthy controls were collected. The serum miRNAs markers were screened by miRNA expression profile chip, and the real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction was performed to verify the miRNAs markers. The relationship between miR-134 markers and Wells score and its diagnostic value were analyzed. **Results** The expression profiles of serum microRNAs in 6 patients with acute pulmonary embolism and 6 healthy controls showed that 10 kinds of microRNAs (miR-134, miR-197, miR-126, miR-191, miR-122, miR-370, miR-155, miR-133a, miR-375 and miR-208b) were screened-out and differentially expressed ($t=14.17, 12.26, 11.13, 10.02, 9.34, 17.26, 15.22, 7.57, 3.62, 7.24, P<0.05$). The expression levels of miR-134, miR-197 and miR-126 in the serum of patients with acute pulmonary embolism were higher than those of the healthy controls, while the expression level of miR-208b was lower ($t=7.65, 6.23, 4.36, -5.24, P<0.05$). The serum miR-134 was positively related to the Wells score ($r=0.32, P<0.05$). When the cut-off value of miR-134 is 5.6, the diagnostic sensitivity of miR-134 for acute pulmonary embolism was 72.00% (36/50), the specificity was 82.00% (41/50), and the area under the curve was 0.86. **Conclusion** All of miR-134, miR-197, miR-126 and miR-208b can be used as markers of serum microRNAs on patients with acute pulmonary embolism, and miR-134 has high clinical value in the diagnosis and prediction of the risk of acute pulmonary embolism.

[Key words] serum miR-134; acute pulmonary embolism; Wells score; marker

DOI: 10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2018.06.005

作者单位: 322000 浙江义乌, 义乌市中心医院检验科

通讯作者: 朱邦, Email: pippobang@163.com

急性肺栓塞是以各种栓子阻塞肺动脉或其分支为其发病原因的一组疾病或临床综合症的总称^①, 发病率为 0.06% ~ 0.11%, 在心血管疾病中仅

次于冠心病和高血压,位居第三位^[2],病死率约占住院患者的10%。急性肺栓塞患者30 d内的病死率超过15%,未经治疗的肺栓塞病死率甚至高达25%~30%^[3]。有研究报道, MicroRNAs (miRNAs) 在心脑血管发病机制^[4]、炎症反应^[5]、疾病转归^[6]等方面发挥着重要作用。MicroRNA-134 (miR-134) 是一种短RNA分子^[7],通过多种机制调节其他基因的表达水平^[8],它能促进粒细胞分化,同时也与红细胞分化抑制有关,在心脑血管疾病中起着至关重要的作用^[9]。目前,有关急性肺栓塞的血清miRNA标志物还在探索阶段。因此,本次研究旨在探讨急性肺栓塞患者血清miRNAs标志物检测及miR-134的临床价值,以期为肺栓塞提供更多的诊断依据。

表1 急性肺栓塞组与对照组基线资料比较

组别	n	性别(男/女)	年龄/岁	体重指数/kg/m ²	高血压/例(%)	糖尿病/例(%)
急性肺栓塞组	50	26/24	35.10 ± 9.34	28.00 ± 3.10	30(60.00)	32(64.00)
对照组	25	13/12	35.26 ± 6.22	27.60 ± 3.00	10(40.00)	11(44.00)

1.2 方法

1.2.1 样本收集 所有患者均于清晨采集空腹血液标本4 ml。血液标本先在4℃, 3 000 r/min离心机上离心10 min,然后以12 000 r/min离心15 min,将上层血清转移到EP管中,储存在-80℃冰箱备用。

1.2.2 miRNA表达谱芯片检测标志物 因本次研究经费有限,在能够符合芯片检测的最低限度例数(每组5例)要求下,选取急性肺栓塞患者及对照组患者各6例,使用miRNA提取试剂盒(由美国ABI公司生产)抽提其血液中的miRNA,抽提后的RNA样品用带有茎环的特异引物进行反转录,反转录采用Taqman miRNA逆转录试剂盒(由美国ABI公司生产),具体操作参照试剂盒说明书进行,然后进行miRNA表达谱芯片检测。通过分析12例样本的血清miRNA表达谱筛选急性肺栓塞血清miRNA标志物。

1.2.3 肺栓塞miRNA标志物的验证 选取50例急性肺栓塞患者和25例健康对照者的血液进行验证。因本次研究经费有限,因此只对两组平均Ct值倍数相差较大的4种miRNA标志物(miR-134、miR-197、miR-126和miR-208b)进行了验证。miRNA抽提及反转录方法同1.2.2。将样本加样于96孔板,置于ABI PRISM 7900 system(由美国ABI公司生产)上进行荧光定量PCR。反应条件:51℃ 100 s, 94℃ 10 min; 95℃ 10 s, 60℃ 1 min, 42个循环。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集义乌市中心医院2016年7月至2017年12月收治的急性肺栓塞患者50例为急性肺栓塞组,均经肺动脉CT血管造影结果确定为肺栓塞。肺动脉CT血管造影的适应证:Wells评分≥7分;或Wells评分<7分但D-二聚体阳性(>500 ng/ml)。排除标准:慢性肝病、乙型肝炎、急性慢性胆道系统疾病、活动性感染、慢性炎症性疾病、失代偿性心力衰竭、慢性肾功能疾病以及癌症史等患者。患者临床信息资料从医疗病历中收集,所有样本留存者皆签署知情同意书。同时,选择同期在体检中心进行健康体检的对照者25例纳入对照组。两组基线资料见表1,两组性别、年龄、体重指数、合并症等基线资料比较,差异均无统计学意义(P 均>0.05)。

荧光定量PCR完成后,经电脑自动分析,查看每个miRNA的扩增情况,导出相应的域值循环数Ct值。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法,以U6为内参,计算每个miRNA的相对表达量。每个样本重复3次。

1.3 统计学方法 采用SPSS 16.0统计软件。正态分布计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两组间比较采用两独立样本 t 检验。miR-134与急性肺栓塞Wells评分的关系采用Pearson相关性分析;应用ROC工作曲线探讨miR-134的最佳临界值来诊断肺栓塞。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 急性肺栓塞血清miRNAs标志物的筛选 对6例急性肺栓塞和6例对照组的血清miRNA表达谱分析,筛选出10个miRNA,见表2。

表2 两组血清miRNAs标志物平均Ct值

血清miRNA表达谱	急性肺栓塞组	对照组
miR-134	8.86 ± 2.03*	1.21 ± 0.41
miR-197	7.68 ± 1.76*	1.23 ± 0.44
miR-126	6.97 ± 1.68*	1.26 ± 0.47
miR-191	5.74 ± 1.53*	1.16 ± 0.36
miR-122	4.85 ± 1.36*	1.11 ± 0.29
miR-370	4.55 ± 1.32*	0.98 ± 0.23
miR-155	3.26 ± 0.97*	0.95 ± 0.31

续表 表2 两组血清 miRNAs 标志物平均 Ct 值

血清 miRNA 表达谱	急性肺栓塞组	对照组
miR-133a	2.88 ± 0.86*	1.03 ± 0.32
miR-375	1.80 ± 0.53*	0.94 ± 0.27
miR-208b	0.31 ± 0.12*	1.02 ± 0.35

注: *: 与对照组比较, $P < 0.05$ 。

由表2可见, 筛选出的10个 miRNA 的 Ct 值均小于30, 且急性肺栓塞组 miR-134、miR-197、

miR-126、miR-191、miR-122、miR-370、miR-155、miR-133a、miR-375 平均 Ct 值均明显高于对照组, 而 miR-208b 平均 Ct 值明显低于对照组, 差异均有统计学意义 (t 分别 = 14.17、12.26、11.13、10.02、9.34、17.26、15.22、7.57、3.62、7.24, P 均 < 0.05)。

2.2 急性肺栓塞血清 miRNAs 标志物的验证 根据筛选出的血清 miRNAs 标志物, 选取 Ct 值相差倍数较大的 miR-134、miR-197、miR-126 和 miR-208b 进行了验证。两组 miRNAs 相对表达量结果见表3。

表3 急性肺栓塞和对照组血清中4种 miRNA 标志物相对表达量比较

组别	miR-134	miR-197	miR-126	miR-208b
急性肺栓塞组	6.25 ± 1.82*	5.56 ± 1.11*	3.86 ± 0.87*	0.27 ± 0.18*
对照组	1.15 ± 0.34	1.23 ± 0.38	1.55 ± 0.42	0.75 ± 0.22

注: *: 与对照组比较, $P < 0.05$ 。

由表3可见, miR-134、miR-197 和 miR-126 在急性肺栓塞患者血清中表达水平较对照组高, 而 miR-208b 表达水平较对照组低 (t 分别 = 7.65、6.23、4.36、-5.24, P 均 < 0.05)。

2.3 miR-134 与急性肺栓塞患者 Wells 评分的关系

50例急性肺栓塞患者中, Wells 评分平均为 (4.64 ± 1.57) 分, 血清 miR-134 相对表达量为 6.25 ± 1.82, 血清 miR-134 相对表达量与 Wells 评分呈明显正相关 ($r = 0.32$, $P < 0.05$)。

2.4 miR-134 诊断急性肺栓塞的价值 采用 ROC 曲线探讨 miR-134 的最佳临界值来区分急性肺栓塞。当 miR-134 相对表达量取 5.6 时, miR-134 对急性肺栓塞的诊断灵敏度为 72.00% (36/50), 特异度为 82.00% (41/50), 曲线下面积为 0.86。

3 讨论

急性肺栓塞是临床上最常见的疾病之一, 其发展过程主要涉及因素众多, 是一种多步骤、多阶段、多基因参与的疾病。近年来, miRNA 在急性肺栓塞发生发展中的作用成为人们研究的热点^[10]。目前研究表明, miRNA 具有上调基因和下调基因的作用^[11]。miRNA 微阵列芯片凭借其高通量、快速检测的优点, 成为了研究急性肺栓塞发病机制、早期诊断及预后判断的新方法。本次研究 miRNA 微阵列芯片筛选结果显示共有 10 种 miRNA 在急性肺栓塞患者血清和正常人血清标本中有差异表达, 其中上调表达有 8 个, 下调表达有 2 个。

通过查阅文献, 在芯片筛选出的 10 种差异表达 miRNA 中 miR-126、miR-197 与血管新生、血管载脂

蛋白稳定等相关^[9]。因此本次研究采用荧光定量 PCR 对这筛选出的 10 种 miRNA 进行验证。因本次研究经费有限, 因此只对两组平均 Ct 值倍数相差较大的 4 种 miRNA 标志物 (miR-134、miR-197、miR-126 和 miR-208b) 进行了验证, 结果发现其中 miR-134、miR-197 和 miR-126 这 3 个 miRNA 分子在急性肺栓塞患者中的表达水平明显较对照组高, 而 miR-208b 表达水平较对照组低 ($P < 0.05$)。表明急性肺栓塞患者血清 miR-134、miR-197 和 miR-126 等有作为潜在标志物的可能性。

miR-134 在血液中的作用已被广泛研究^[12]。近年来有报道, miR-134 与心血管疾病有着密切的关系^[13]。本次研究为了测量非组织特异性血清 miR-134, 在研究过程中排除了慢性肝病、乙型肝炎、急性慢性胆道系统疾病、活动性感染、慢性炎症性疾病、失代偿性心力衰竭、慢性肾功能疾病以及癌症等可能会干扰研究结果的基础疾病, 确保研究结果更可靠。结果显示血清 miR-134 相对表达量与 Wells 评分呈明显正相关 ($P < 0.05$), 表明急性肺栓塞患者血清 miR-134 具有预测急性肺栓塞风险可能。而且在本次研究的芯片筛查结果中亦发现 miR-134 在急性肺栓塞血清中表达倍数是正常人血清的 5.4 倍。后经过荧光定量 PCR 验证, 与芯片结果一致, 进一步确认了研究结果的可靠性。本次研究还发现, 当 miR-134 相对表达量取 5.6 时, miR-134 对急性肺栓塞的诊断灵敏度为 72.00%, 特异度为 82.00%, 曲线下面积为 0.86, 说明 miR-134 具有较高的诊断效能。

总之,急性肺栓塞患者血清 miRNAs 标志物检测及 miR-134 的具有潜在的临床诊断价值,可为肺栓塞提供更多的诊断依据。本次研究由于条件所限仅评估了例数不多的急性肺栓塞患者,后期仍需进一步前瞻性研究来论证。

参考文献

- 中华医学会心血管病学分会肺血管病学组. 急性肺栓塞诊断与治疗中国专家共识(2015)[S]. 中华心血管病杂志, 2016,44(3): 197-211.
- 何建国,程显声,高明哲,等. 全国21家医院急性肺栓塞诊治情况的调查分析[J]. 中华医学杂志, 2001, 81(24): 1490-1492.
- 陈央,周海霞,胡月红,等. 老年和非老年肺栓塞的危险因素及Caprini血栓风险评估量表的预测价值[J]. 中华医学杂志, 2017,97(10): 755-760.
- 朱丽华,孙瑞娟,董尔丹. 国家自然科学基金资助心血管领域微小RNA相关研究的概况与分析[J]. 中华心血管病杂志, 2013,41(5): 357-362.
- 张婷婷,谢谦,邵家骧,等. MicroRNAs与脑卒中的研究进展[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2012,4(1): 1-10.
- 高成芳,杨巍. 微小RNA与心血管病炎症[J]. 国际心血管病杂志,2014,41(1): 1-3,10.
- Zhang L, Lv Z, Xu J, et al. MicroRNA-134 inhibits osteosarcoma angiogenesis and proliferation by targeting the VEGFA/VEGFR1 pathway[J]. FEBS J, 2018, 285(7):1359-1371.
- Wang ZL, Zhang CB, Wang Z, et al. MiR-134, epigenetically silenced in gliomas, could mitigate the malignant phenotype by targeting KRAS[J]. Carcinogenesis, 2018, 39(3):389-396.
- Schulte C, Molz S, Appelbaum S, et al. miRNA-197 and miRNA-223 Predict Cardiovascular Death in a Cohort of Patients with Symptomatic Coronary Artery Disease[J]. PLoS One, 2015, 10(12):e0145930.
- Wang X, Luo Y, Liu S, et al. MicroRNA-134 plasma levels before and after treatment with valproic acid for epilepsy patients[J]. Oncotarget, 2017, 8(42):72748-72754.
- DU Y, Yang SH, Li S, et al. Circulating microRNAs as novel diagnostic biomarkers for very early-onset (≤ 40 years) coronary artery disease[J]. Biomed Environ Sci, 2016, 29(8):545-554.
- Liu Y, Sun Y, Zhao A. MicroRNA-134 suppresses cell proliferation in gastric cancer cells via targeting of GOLPH3[J]. Oncol Rep, 2017, 37(4):2441-2448.
- He F, Lv P, Zhao X, et al. Predictive value of circulating miR-328 and miR-134 for acute myocardial infarction [J]. Mol Cell Biochem, 2014, 394(1-2): 137-144.

(收稿日期 2018-07-20)

(本文编辑 蔡华波)

(上接第612页)

- Ghoshal UC, Srivastava D. Irritable bowel syndrome and small intestinal bacterial overgrowth: meaningful association or unnecessary hype[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(10):2482-2491.
- Zhao J, Zheng X, Chu H, et al. A study of the methodological and clinical validity of the combined lactulose hydrogen breath test with scintigraphic oro-cecal transit test for diagnosing small intestinal bacterial overgrowth in IBS patients[J]. Neurogastroenterol Motil, 2014, 26(6): 794-802.
- Zhang QE, Wang F, Qin G, et al. Depressive symptoms in patients with irritable bowel syndrome: a meta-analysis of comparative studies[J]. Int J Biol Sci, 2018, 14(11): 1504-1512.
- Rezaie A, Buresi M, Lembo A, et al. Hydrogen and methane-based breath testing in gastrointestinal disorders: the north American consensus[J]. Am J Gastroenterol, 2017, 112(5):775-784.
- Ning Y, Lou C, Huang Z, et al. Clinical value of radionuclide small intestine transit time measurement combined with lactulose hydrogen breath test for the diagnosis of bacterial overgrowth in irritable bowel syndrome[J]. Hell J Nucl Med, 2016, 19(2):124-129.
- Hirakawa M, Iida M, Kohrogi N, et al. Hydrogen breath test assessment of orocecal transit time: comparison with barium meal study[J]. Am J Gastroenterol, 1988, 83(12): 1361-1363.

(收稿日期 2018-06-01)

(本文编辑 蔡华波)