

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2020.02.031

◇临床医学◇

急性心肌梗死病人血浆中微小RNA-21定量检测及其临床意义

董松武^a,张静^b作者单位:亳州市人民医院,^a心血管内科,^b检验科,安徽 亳州 236800

摘要:目的 探讨微小RNA(miRNA)-21表达在急性心肌梗死(AMI)病人血浆中的表达及其临床意义。方法 选取2016年8月至2017年8月亳州市人民医院住院AMI病人40例为心肌梗死组,同期该院体检健康者作为健康对照40例为健康对照组,采用特异的茎环引物逆转录及荧光定量PCR法检测miR-21达到设定荧光阈值时的Ct值,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 相对定量法分析AMI组血浆中miR-21相对于健康对照组血浆中的表达量;采用受试者工作特征曲线(ROC)评价miRNA-21、肌钙蛋白在AMI病人中的诊断效率;采用Pearson相关性分析AMI病人血浆中miR-21表达和肌钙蛋白的相关性。结果 AMI病人血浆中miR-21相对表达量($2^{-\Delta\Delta Ct}$)为2.51(0.68~5.00),心肌梗死组血浆中miR-21表达明显高于健康对照组,与健康对照组血浆miR-21的表达水平差异有统计学意义($P<0.05$);在AMI病人miR-21的AUC为0.88,肌钙蛋白的AUC为0.98;在AMI病人血浆中miR-21水平和肌钙蛋白浓度成正相关,相关系数为0.48($P<0.05$)。结论 AMI病人血浆中miR-21高表达,可能与心肌梗死发生有关,有望成为心肌梗死诊断的新靶点,为临床诊疗提供新的思路。

关键词:心肌梗死; 肌钙蛋白; 荧光免疫测定; 实时聚合酶链反应; 微小RNA-21; 实时荧光定量PCR

The quantitative detection and its clinical significance of miR-21 in patients that with acute myocardial infarction

DONG Songwu^a,ZHANG Jing^b

Author Affiliation: ^aDepartment of Cardiovascular Medicine, ^bDepartment of Laboratory, Bozhou People's Hospital, Bozhou, Anhui 236800, China

Abstract: Objective to explore the clinical significance of miR-21 expression in acute myocardial infarction (AMI). **Methods** using specific stem-loop primers reverse transcription and fluorescence quantitative PCR method to detect the Ct value of miR-21 that was reached the threshold setted by fluorescent.using $2^{-\Delta\Delta Ct}$ relative quantitative method in analysis of 40 cases of AMI patients plasma's miR-21 expression relatively to the expression in 40 cases of healthy controls.The diagnostic efficiency of miRNA-21 and troponin in AMI patients was evaluated by receiver operating characteristic curve (ROC curve),and the correlation of miR-21 expression and troponin in the plasma of AMI patients was analyzed by Pearson correlation.**Results** the expression level of miR-21was higher in patients with AMI than in healthy control group, the expression multiple ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) is 1.713 (0.68~5.00), and there was statistically significant difference in the two groups ($t=10.20, P<0.05$).In patients with AMI, the AUC of miR-21 was 0.88, and the AUC of troponin was 0.98;In the plasma of AMI patients, the level of miR-21 was positively correlated with the concentration of troponin, and the correlation coefficient was 0.48 ($P<0.05$).**Conclusion** The high expression of miR-21 in patients with AMI may be associated with myocardial infarction occurred, miR-21 plays a role in myocardial infarction process, provides a new clue of clinical diagnosis and treatment.

Key words: Myocardial infarction; Troponin; Fluoroimmunoassay; Real-time polymerase chain reaction; microRNA-21; Real-time fluorescent quantitative PCR

心血管疾病的发病率和病死率逐年上升,严重危害人类的生命健康。急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)是由于血栓或冠状动脉粥样硬化斑块的急性改变引发冠状血流供应严重受损,导致心肌的缺血损伤。微小RNA(microRNA, miRNA)是一类新发现的长度约为22个核苷酸的以序列特

异性方式转录后调控基因表达的非编码单链RNA分子^[1],在生物体的生长、发育、分化

和凋亡等方面起着重要调控作用。近年来研究表明miRNA在心脏重塑、血管细胞收缩、心肌收缩以及脂质代谢等心血管疾病中发挥重要的调控作用^[2-3]。miR-21是一种位于17q23.2染色体FRA17B

脆性区域具有自主转录单位的 miRNA^[4],其在新生内膜细胞中表达上调,是血管平滑肌细胞(VSMC)增殖和凋亡的重要调节者^[5],miR-21在多种肿瘤细胞中表达也出现显著异常。本研究采用特异的茎环引物逆转录和 real-time PCR 检测 AMI 病人和健康对照者外周血血浆中 miR-21 的表达量,分析和探讨其在 AMI 发生发展过程中的作用和诊疗中的临床应用价值,采用 ROC 曲线评价 miRNA-21、肌钙蛋白在 AMI 病人中的诊断效率,采用 Pearson 相关性分析 AMI 病人血浆中 miR-21 表达和肌钙蛋白的相关性,为临床提供新的诊断视角和指标。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2016 年 8 月至 2017 年 8 月亳州市人民医院住院 AMI 病人 40 例,其中男 22 例,女 18 例,年龄范围为 36~61 岁,年龄(45.1±11.2)岁,同期本院体检健康者作为健康对照 40 例,其中男 20 例,女 20 例,年龄范围为 28~58 岁,年龄(42.8±10.5)岁,两组研究对象年龄、性别比例相匹配。病人或其近亲属知情同意。本研究符合《世界医学协会赫尔辛基宣言》相关要求。

AMI 的入选标准:参照 2012 年^[6]欧洲颁布全球心肌梗死定义:心脏标志物水平超过正常参考值上限,同时伴有下述心肌缺血证据之一:心肌缺血症状;ECG 提示新发缺血性改变(新发 ST-T 改变或新发左束支传导阻滞);ECG 提示新发病理性 Q 波形成;影像学证据提示新发局部室壁运动异常或存活心肌丢失;冠脉造影或尸检发现冠脉内存在新鲜血栓。排除标准:合并有瓣膜性心脏病、急慢性感染性疾病、血液系统疾病、肿瘤、周围血管性疾病、严重肝肾功能不全、糖尿病、全身免疫性疾病、慢性阻塞性肺疾病、心律失常等疾病。

1.2 主要试剂和仪器 miRCute miRNA 提取分离试剂盒(天根,离心柱型,生产批号 O4208),RealMasterMix Probe 试剂盒(天根,生产批号 O4215),5×Reverse Transcriptase M-MLV buffer(大连宝生物,生产批号 AHG0090A),dNTP Mixture(10 mmol/L)(大连宝生

物,生产批号 AI21491A),Reverse Transcriptase M-MLV (200 U/μL,大连宝生物,生产批号 BL1501D),20×RNAsafe(天根,生产批号 n3205),Rnase Free ddH₂O(天根,生产批号 O4214),Gene Amp PCR System 9700 扩增仪(ABI),Light Cycler real time PCR 扩增仪(Roche)。

1.3 引物和探针 由上海闪晶生物工程有限公司设计合成,见表 1。

1.4 血浆总 RNA 提取 采集研究对象外周血浆 1 mL,用天根 miRCute miRNA 提取分离试剂盒按试剂说明书提取 miRNA,用紫外分光光度仪检测总 RNA 溶液吸光度(A)值,A260/A280 比值在 1.9~2.1 者于 -80℃ 保存备用用于后续实验。

1.5 试验方法

1.5.1 逆转录反应 反应体系及循环条件:5×Reverse Transcriptase M-MLV buffer 8 μL,dNTP Mixture (10 mmol/L) 各 2 μL,RT 引物(5 pmol/μL)2 μL,Reverse Transcriptase M-MLV (200 u/μL) 1 μL,20×RNAsafe 2 μL,Total RNA 4 μL,Rnase Free ddH₂O 15 μL,混匀后于 PCR 仪上 16℃ 30 min,42℃ 40 min,85℃ 5 min,扩增产物 -20℃ 冰箱保存备用。

1.5.2 荧光定量 PCR 反应体系及循环条件:2.5×realMasterMix 8 μL,正、反向引物(5 pmol/μL)各 1 μL,20×Probe Enhancer solution 1 μL,探针(5 pmol/μL)1 μL,模板 1 μL,ddH₂O 7 μL,混匀后于 PCR 仪上 94℃ 预变性 2 min,94℃ 20 s,60℃ 30 s,68℃ 1 min,共 43 个循环。

1.6 统计学方法 每个反应均设 3 个复孔,反应管中荧光信号达到设定阈值时的循环数为 Ct 值,以小核 RNA U6 作内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 相对定量法分析 AMI 病人血浆中 miR-21 基因表达相对于健康对照血浆中基因表达的变化倍数 $F(2^{-\Delta\Delta Ct})$, $\Delta\Delta Ct = \text{AMI}(Ct_{\text{miR21}} - Ct_{\text{U6}}) - \text{NC}(Ct_{\text{miR21}} - Ct_{\text{U6}})$ 。 $F(\text{NC}) = 1 (\Delta\Delta Ct = 0)$ 。

采用 SPSS 17.0 软件。KS 检验作数据正态分布分析,数据符合正态分布,采用两独立样本 *t* 检验;

表 1 miR-21 qRT-PCR 引物及探针序列

名称	碱基序列(5'→3')
miR-21 RT引物	GCGCGTGAGCAGGCTGGAGAAATTAACCACGCGCTCAACA
U6 RT引物	GCGCGTGAGCAGGCTGGAGAAATTAACCACGCGCGGAACG
miR-21 F引物	CGCTAGCTTATCAGACTG
U6 F引物	CGCAAGGATGACACG
通用 R引物	GAGCAGGCTGGAGAA
miR-21 探针序列	FAM-ACCACGCGCTCAACA-MGB
U6 探针序列	FAM-ATTCGTGAAGCGTCCGC-MGB

评价诊断效率采用ROC曲线分析, Pearson相关性分析 miR-21 和肌钙蛋白浓度的相关性, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 扩增产物的聚丙烯酰胺凝胶电泳 扩增片段经 20% 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 可见清晰、明亮的电泳条带, 与理论大小一致(56 bp), 见图 1。



图1 miR-21和U6扩增产物聚丙烯酰胺凝胶电泳图

2.2 建立标准曲线 将U6反转录产物和miR-21反转录产物倍比稀释后, 行PCR扩增建立标准曲线。扩增效率分别为 94.98%, 92.71%, 两组扩增效率接近, 故可以使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 相对定量法进行分析, 见图 2 和图 3。

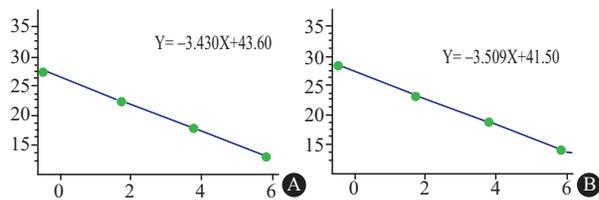


图2 miR-21和U6的标准曲线: A为miR-21; B为U6

2.3 miR-21 的荧光定量PCR扩增曲线 见图 3。

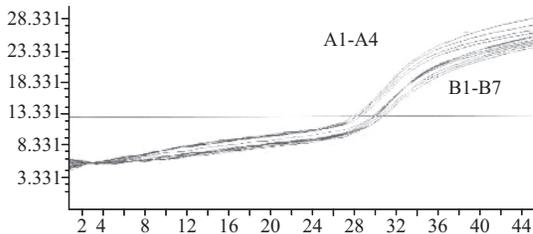


图3 心肌梗死组和健康对照组miR-21的扩增曲线: A1-A4 为心肌梗死组, B1-B7为健康对照组

2.4 miR-21 在心肌梗死和健康对照血浆中的表达 以U6为内参, 用 real-time PCR 分析 miR-21 的表达。结果显示 miR-21 在心肌梗死组中的相对表达量均值($2^{-\Delta\Delta Ct}$)为 2.51, 与健康对照组的表达量比较, 差异有统计学意义($t = 10.20, P < 0.05$), 见图 4。

2.5 miRNA-21、肌钙蛋白对AMI病人的诊断效能分析(ROC分析) 在急性心肌梗死病人 miR-21 的 AUC 为 0.88, 肌钙蛋白的 AUC 为 0.98, 与肌钙蛋白的诊断效率接近, 相关性分析表明, miR-21 水平和肌钙蛋白浓度成正相关, 相关系数为 0.48 ($P < 0.05$), miR-21 和肌钙蛋白在心肌梗死及健康对照组血浆中的 ROC 曲线分析见图 5 和图 6。

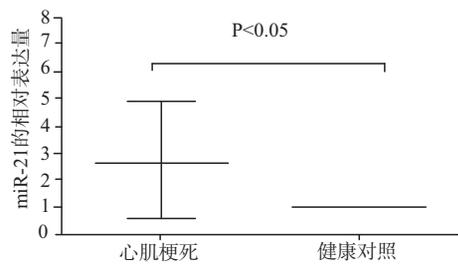


图4 miR-21在心肌梗死及健康对照组血浆中的表达

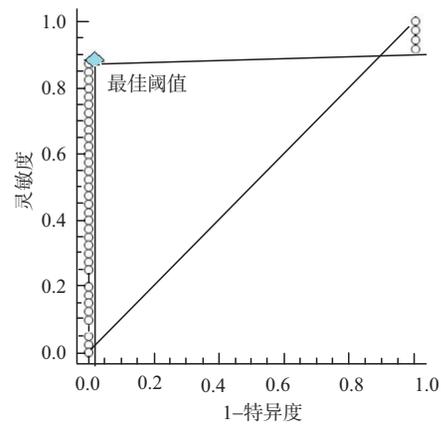


图5 miR-21在心肌梗死及健康对照组血浆中的ROC曲线分析

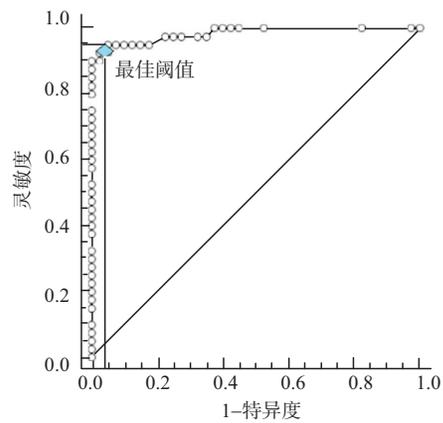


图6 肌钙蛋白在心肌梗死及健康对照组血浆中的ROC曲线分析

3 讨论

近年来, 随着冠心病的发病率和死亡率的日趋升高, miRNA 介导心脏发育、心肌肥厚、心率失常及心衰等多种心血管疾病病理生理调控机制的研究已成为当前研究的热点, 多项研究表明, 可在人体多种体液包括血清、血浆、尿液、唾液中检测到异常表达的循环 miRNA, 有研究人员提出特定的 miRNA 有望成为心肌梗死及其他疾病的标志物^[7-8]。Van Rooij 等^[9]研究发现在大鼠和人类心肌梗死后可检测到 miR-21、miR-214、miR-223 表达上调, 同时 miR-149 及 miR-29 家族表达下调。Dong^[10]通过结扎大鼠左冠状动脉建立心肌梗死模型, 6 h 后检测心肌细胞 miRNA 表达情况, 发现 miR-21 在梗死区表达降低, 而在临界区表达明显升高。

Dong 进一步通过腺病毒载体于急性心肌梗死 3 天前转染 miR-21 到大鼠心肌细胞,发现相对于单纯急性心肌梗死组 24 h 的心肌梗死面积减少 29%。表明 miR-21 在急性心肌梗死早期保护缺血心肌细胞损伤方面起到关键作用,其机制可能与调控程序性细胞死亡分子(PDCD)-4 及激活蛋白(AP-1)有关,体内试验研究证实 miR-21 过表达可明显减低心肌细胞凋亡率。

本研究采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 相对定量法分析 40 例 AMI 病人血浆中 miR-21 相对于 40 例健康对照血浆中表达量,结果表明实验组血浆 miR-21 表达水平明显增高,与健康对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),AMI 病人血浆中 miR-21 与肌钙蛋白成正相关($r = 0.48, P < 0.05$),其 AUC 为 0.88,与杨寿娟等^[11]研究结果一致,认为 miR-21 是潜在的诊断学标志物,对缺血灌注损伤的心肌具有保护作用。心肌梗死病人 miR-21 表达增高可能是机体的保护机制,同时为 miR-21 成为药物治疗靶点对缺血心肌进行临床治疗提供了一个新的思路。Roy 等^[12]在心肌缺血/再灌注的模型中,发现 miR-21 作用于 PTEN,引起基质金属蛋白酶 2 的增加,参与心肌梗死后心肌肥厚、心肌纤维化进程;miR-21 与 miR-26 能用过 PTEN/AKT 信号通路从而抑制缺氧诱导的细胞凋亡,有望成为改善 AMI 后心肌重构的潜在靶点^[13-14];马超^[15]等通过观察低能激光照射(LLLI)对大鼠心肌梗死模型梗死区及其边缘组织中 miR-21 表达的影响,发现 LLLI 处理梗死心肌能有效上调梗死及边缘区域 miR-21 的表达,miR-21 有较好的心肌保护作用。多项实验证实了 miR-21 参与了心肌梗死后的心脏重塑过程。目前所有的探索 miRNAs 对 AMI 模型都是通过动物实现的,尚未有人体试验的研究报道,有待研究人员深入探讨。同时 miR-21 不是一个高度特异性的检测指标,有研究表明 miRNA 对食管癌^[16]的诊断有一定价值,在 HCC 病人^[17]、乳腺癌^[18]病人、慢性心力衰竭^[19]、胃癌^[20]病人血清中表达水平平均增高。不同的 miRNA 分子也可在心肌梗死病人血清中同时表达异常,肖蕾等人^[21]通过 meta 分析表明 miRNA-499 在早期急性心肌梗死病人血清中升高,可作为早期诊断的分子生物学标志。

综合本研究的试验结果,虽然目前对 miRNA 的研究已经取得了一些成果,但仍有很多问题需要进一步深入探究和进行临床验证,miRNA 在不同疾病有特定的表达谱,我们应寻求针对不同疾病的特定的表达谱提高诊断的敏感性和特异性,miRNA 距离

临床应用还有很多未解决的问题,亟需广大研究人员深入探索。

参考文献

- [1] CANNELLG, KONG YW, BUSHELL M. How do microRNAs regulate gene expression? [J]. *Biochem SoRc Trans*, 2008, 36(Pt 6): 1224-1231.
- [2] MOSCHOS SA, WILLIAMS AE, PERRY MM, et al. Expression profiling in vivo demonstrates rapid changes in lung microRNA levels following lipopolysaccharide-induced in flammation but not in the anti-inflammatory action of glucocorticoids [J]. *BMC Genomics*, 2007, 8, 240.
- [3] ZHAO Y, SAMAL E, SRIVASTAVA D. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis [J]. *Nature*, 2005, 436(7048): 214-220.
- [4] FUJITA S, ITO T, MIZUTANI T, et al. miR-21 Gene expression triggered by AP-1 is sustained through a double-negative feedback mechanism [J]. *J Mol Biol*, 2008, 378(3): 492-504.
- [5] JI R, CHENG Y, YUE J, et al. MicroRNA expression signature and antisense-mediated depletion reveal an essential role of microRNA in vascular neointimal lesion formation [J]. *Circ Res*, 2007, 100(11): 1579-1588.
- [6] THYGESEN K, ALPERT JS, JAFFE AS, et al. Third universal definition of myocardial infarction [J]. *Glob Heart*, 2012, 7(4): 275-295.
- [7] BOERI M, VERRI C, CONTE D, et al. MicroRNA signatures in tissues and plasma predict development and prognosis of computed tomography detected lung cancer [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(9): 3713-3718.
- [8] D'ALESSANDRA Y, DEVANNA P, LIMANA F, et al. Circulating microRNAs are new and sensitive biomarkers of myocardial infarction [J]. *Eur Heart J*, 2010, 31(22): 2765-2773.
- [9] VAN ROOIJ E, SUTHERLAND LB, THATCHER JE, et al. Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(35): 13027-13032.
- [10] DONG S, CHENG Y, YANG J, et al. MicroRNA expression signature and the role of microRNA-21 in the early phase of acute myocardial infarction [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(43): 29514-29525.
- [11] 杨寿娟, 张颖, 刘寅. 冠心病患者外周血中 miR-21 的表达水平及其临床意义 [J]. *中国应用生理学杂志*, 2015, 31(2): 127-131.
- [12] ROY S, KHANNA S, HUSSAIN SR, et al. MicroRNA expression in response to murine myocardial infarction: MiR-21 regulates fibroblast metallopeptidase-2 via phosphatase and tensin homologue [J]. *Cardiovasc Res*, 2009, 82(1): 21-29.
- [13] YANG Q, YANG K, LI A, et al. MicroRNA-21 protects against ischemia-reperfusion and hypoxia-reperfusion-induced cardiocyte apoptosis via the phosphatase and tensin homolog/Akt-dependent mechanism [J]. *Mol Med Rep*, 2014, 9(6): 2213-2220.
- [14] KANG Y, JIA P, ZHAO H, et al. MicroRNA-26a overexpression

- protects RGC-5 cells against H₂O₂-induced apoptosis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 460(2): 164-169.
- [15] 马超, 法宪恩, 柳兵, 等. 低能激光照射对大鼠心肌梗死后 miRNA-21 表达的影响 [J]. *郑州大学学报*, 2016, 51(3): 333-336.
- [16] 支美苓, 晏世荣, 鲍依稀. miR-21 对食管癌诊断价值的 Meta 分析 [J]. *国际检验医学杂志*, 2015, 36(21): 3077-3080.
- [17] 郝清亚, 王以浪, 姚登福, 等. 肝癌患者血清 microRNA-21 水平变化 [J]. *实用肝脏病杂志*, 2014, 17(1): 68-70.
- [18] 石岩, 秦岩, 宋磊, 等. miRNA-21 和 miRNA-134 在乳腺癌患者血清中表达情况及其临床意义 [J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2016, 37(6): 875-880.
- [19] 谭顺林. 血清 miRNA-21、miRNA-126 异常表达对慢性心力衰竭患者的临床意义 [J]. *国际检验医学杂志*, 2017, 38(13): 1844-1846.
- [20] 许文, 费哲为, 高铭, 等. 血清 miRNA-21 在胃癌中的诊断价值 [J]. *现代肿瘤医学*, 2016, 24(22): 3592-3595.
- [21] 肖蕾, 沈飞燕, 洪斌, 等. 血液微小 RNA-499 对早期诊断急性心肌梗死价值的 Meta 分析 [J]. *安徽医药*, 2018, 22(1): 50-54.

(收稿日期: 2018-08-02, 修回日期: 2018-10-12)

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2020.02.032

◇ 临床医学 ◇

胃癌根治术后肠套叠 3 例临床治疗分析

张佳佳, 喻鑫, 陈晓雨, 曹先东

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院普外胃肠外科, 安徽 合肥 230022

通信作者: 曹先东, 男, 主任医师, 硕士生导师, 研究方向为消化道肿瘤, E-mail: caoxiandong002@126.com

摘要:目的 通过分析胃癌根治术后并发肠套叠 3 例病人的临床诊断与治疗方法, 为进一步对胃癌根治术后并发肠套叠的及时诊断与治疗提供帮助。**方法** 回顾性分析 2018 年 10 月至 2019 年 3 月安徽医科大学第一附属医院行胃癌根治术后并发肠套叠 3 例病人的临床资料。**结果** 3 例病人均为老年进展期胃癌病人, 分别于术后第 36、19、13 天发现肠套叠, 均行手术治疗切除套叠肠管, 均顺利出院。**结论** 胃癌根治术后并发肠套叠较其他胃癌术后并发症发生率低, 起病缓慢, 易误诊为术后肠梗阻而耽误治疗; 腹盆腔 CT、上消化道碘水造影检查能够帮助进一步确诊; 一旦诊断, 及时手术治疗效果较好。

关键词: 胃切除术/副作用; 肠套叠; 胃肿瘤; 肠梗阻; 老年人

Three cases clinical analysis of intussusception after radical gastrectomy

ZHANG Jiajia, YU Xin, CHEN Xiaoyu, CAO Xiandong

Author Affiliation: Department of Gastrointestinal Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei, Anhui 230022, China

Abstract: Objective By analyzing the clinical treatment of 3 patients with intussusception after radical gastrectomy, to provide some evidences for the therapy of these cases. **Methods** By analyzing the clinical datas of 3 patients with intussusception after radical gastrectomy, admitted in the First Affiliated Hospital Anhui Medical University from October 2018 to March 2019. **Results** they were elderly patients with advanced gastric cancer. Intussusception was found on the 36th, 19th and 13th postoperative day. All patients underwent surgical treatment of the incisional intestine and were discharged. **Conclusion** When encountering patients with intussusception after radical gastrectomy, surgical resection is the preferred therapy.

Key words: Gastrectomy/adverse effects; Intussusception; Stomach Neoplasms; Intestinal Obstruction; Aged

术后肠套叠是胃癌术后较为少见并发症, 临床术后起病缓慢、症状不典型, 容易误诊, 常因诊断治疗不及时而影响预后, 现收集了 2018 年 10 月—2019 年 3 月期间安徽医科大学第一附属医院胃癌病人(1 446 例)行胃癌根治术后并发肠套叠 3 例临床资料, 其发生率为 0.21%。

1 临床资料

例 1: 男, 67 岁。术前诊断为“贲门恶性肿瘤”, 2017 年 11 月 2 日行“根治性全胃切除+食管空肠 Roux-en-Y 吻合术”, 术中未见明显转移结节, 见贲门溃疡浸润病灶, 侵及浆膜, 胃周见肿大淋巴结, 胃管、空肠营养管分别置入食管空肠吻合口 15 cm 处、