

引用本文:郭伟崇,马金霞,姚方方.血清微小RNA-33、微小RNA-122水平与冠心病病人Gensini积分的相关性分析[J].安徽医药,2021,25(3):564-567.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2021.03.032.



◇临床医学◇

血清微小RNA-33、微小RNA-122水平与冠心病病人Gensini积分的相关性分析

郭伟崇¹,马金霞¹,姚方方²

作者单位:¹南阳市第一人民医院心血管内二科,河南 南阳 473000;

²南阳市眼科医院特检室,河南 南阳 473000

摘要: **目的** 探究血清微小RNA(miR)-33、miR-122水平与冠心病病人Gensini积分的相关性。**方法** 以随机抽签法选取2014年1月至2015年12月在南阳市第一人民医院行冠脉造影术的200例冠心病病人为冠心病组,并根据病变涉及冠脉支数将其分成单支、2支、3支病变组,Gensini评分计算冠脉病变严重程度;另外对照组120例。采用实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)检测冠心病组和对照组血清中miR-33和miR-122表达水平,采用Pearson分析法分析血清miR-33和miR-122水平与Gensini积分的相关性,采用logistic多重回归分析冠心病发生的危险因素。**结果** 与对照组相比,冠心病组病人在年龄、性别、腰臀比、血清肌酐异常和冠心病家族史方面无差异($P>0.05$),冠心病组病人吸烟情况、高血压病史、糖尿病病史比例均显著高于对照组($P<0.05$),血清三酰甘油、低密度脂蛋白胆固醇(LDL)水平、血清中miR-33、miR-122水平显著上调($P<0.05$);冠心病组中,2支组、3支组miR-33水平分别为(0.48±0.07)、(0.62±0.13),miR-122水平分别为(5.19±0.32)、(5.63±0.24),Gensini积分分别为(22.49±7.03)分、(65.57±15.32)分,均较单支组(0.37±0.04)、(4.89±0.56)、(9.43±3.68)分显著升高($P<0.001$),且均随病变支数增加而增加,两两比较差异有统计学意义($P<0.001$);Pearson结果显示,miR-33、miR-122水平与冠心病病人Gensini积分均呈正相关($r=0.706、0.458, P<0.05$);logistic回归结果显示,血清LDL含量、miR-33、miR-122水平及年龄是冠心病的独立危险因素($OR=1.862, 95\%CI: 1.359\sim 2.57; OR=4.157, 95\%CI: 2.597\sim 6.654; OR=4.196, 95\%CI: 2.362\sim 7.453, OR=1.824, 95\%CI: 1.213\sim 2.454$)。**结论** 血清miR-33、miR-122水平是评价冠心病的独立危险因素,miR-33、miR-122水平均随着Gensini积分增加而增加,可能与冠心病严重程度有关。

关键词: 冠心病; 微RNAs; 甘油三酯类; 脂蛋白类,LDL; miR-33; miR-122; Gensini积分; 相关性

Analysis of the correlations between levels of serum miR-33, miR-122 and Gensini scores in patients with coronary heart disease

GUO Weichong¹, MA Jinxia¹, YAO Fangfang²

*Author Affiliations:*¹Department of Cardiovascular Medicine, Nanyang First People's Hospital, Nanyang, Henan 473000, China;²Special Examination Room of Nanyang Ophthalmological Hospital, Nanyang, Henan 473000, China

Abstract: **Objective** To explore the correlations between levels of serum miR-33, miR-122 and Gensini score in patients with coronary heart disease.**Methods** A total of 200 patients with coronary heart disease who underwent coronary angiography in the First People's Hospital of Nanyang City from January 2014 to December 2015 were selected as coronary artery disease group, and divided into single, two and three lesion groups according to the number of coronary artery branches involved. Gensini score was used to calculate the severity of coronary artery lesions; at the same times, the other 120 patients were selected as the control group. The expression levels of miR-33 and miR-122 in serum of CHD group and control group were detected by qRT-PCR. Pearson analysis was used to analyze the correlations between levels of serum miR-33 and miR-122 and Gensini scores. Logistic multiple regression analysis was used to analyze the risk factors of coronary heart disease.**Results** Compared with the control group, there were no significant differences in age, sex, waist-hip ratio, serum creatinine abnormality and family history of coronary heart disease in the CHD group ($P>0.05$). The proportions of smoking, hypertension history, diabetes history were significantly higher in the CHD group than those in control group ($P<0.05$), and the levels of serum TG, LDL, miR-33 and miR-122 in patients with coronary heart disease were significantly increased ($P<0.05$). In CHD group, the levels of miR-33 in the 2 and 3 groups were (0.48±0.07) and (0.62±0.13), respectively, the levels of miR-122 were (5.19±0.32) and (5.63±0.24), and the Gensini points were (22.49±7.03) points and (65.57±15.32) points, which are significantly higher than those in the single-branch group (0.37±0.04), (4.89±0.56), (9.43±3.68) points ($P<0.001$), and increased with the increase of the number of lesion branches. There was a significant difference between the two groups ($P<0.001$). Pearson results showed that the levels of miR-33 and miR-122 were positively correlated with Gensini scores in patients with coronary heart disease ($r=0.706, r=$

0.458, $P < 0.05$). Logistic regression analysis showed that serum LDL content, miR-33 and miR-122 levels and age were independent risk factors for coronary heart disease ($OR = 1.862$, 95%CI: 1.359-2.57; $OR = 4.157$, 95%CI: 2.597-6.654; $OR = 4.196$, 95%CI: 2.362-7.453, $OR = 1.824$, 95%CI: 1.213-2.454). **Conclusion** Levels of serum miR-33 and miR-122 are independent risk factors for evaluating coronary heart disease, the levels of miR-33 and miR-122 increase with the increase of Gensini score, which may be related to the severity of coronary heart disease.

Key words: Coronary disease; MicroRNAs; Triglycerides; Lipoproteins, LDL; MiR-33; MiR-122; Gensini score; Correlation

冠状动脉粥样硬化性心脏病(简称冠心病)是一种常见心血管疾病,好发于中老年人群,随着现代生活方式的改变,该病发病率呈逐年上升趋势,已成为人类致死率最高的疾病之一^[1-2]。微小RNA(microRNA, miRNA)是非编码内源性小分子RNA,长度约为22~25个核苷酸,参与诸多肿瘤疾病的发生发展及细胞增殖凋亡等生物进程^[3]。据报道,miRNAs表达水平变化与心血管疾病的发生发展密切相关^[4]。近期研究发现,miRNA不仅仅是一种生物标志物,还可能是引起冠心病的又一危险分子^[5]。Gensini积分是目前公认的可全面反映冠心病血管病变严重程度的量化指标。目前,国内外关于miR-33、miR-122水平与冠心病病人Gensini积分的相关性分析研究较少。本研究通过观察冠心病病人血清miR-33、miR-122水平及Gensini积分,并分析其相关性。现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 随机抽签法选取2014年1月至2015年12月在南阳市第一人民医院做冠脉造影术的冠心病病人200例为冠心病组,男性96例,女性104例,年龄45~75岁,平均年龄(54.69±7.61)岁;对照组120例,男性63例,女性57例,年龄46~77岁,平均年龄(54.32±7.85)岁。本研究中样品的采集获得病人、近亲属的知情同意,符合《世界医学协会赫尔辛基宣言》。

1.2 选取标准 纳入标准:①冠脉造影术显示至少一支冠脉血管狭窄≥50%者;②所有调查研究均自愿且经病人及其近亲属同意,并签字确认;③年龄均≥40岁。排除标准:①患有恶性肿瘤、严重肝脏、肾脏等脏器功能不全、自身免疫性疾病者;②精神状态异常、生活不能自理者;③伴有心肌梗死、心脏瓣膜病、慢性心肌炎、急性心肌炎、心包炎、先天性心脏病等病人;④患有肺动脉栓塞、结缔组织病者。

1.3 方法

1.3.1 主要试剂及仪器 Trizol试剂(DP424)购于

天根生化科技有限公司;AceQ qPCR SYBR® Green Mix(货号Q111-02)购于南京vazyme公司;miR-33、miR-122及内参U6引物由上海生工生物公司合成。紫外分光光度计(型号ND-2000C)购于美国Thermo公司、实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)仪(型号T100)购于美国Bio-Rad公司。

1.3.2 qRT-PCR检测血清miR-33、miR-122水平 采集受试者晨起空腹静脉血约5 mL,常温离心10 min(3 500 r/min),收集血清-80 °C超低温冰箱中保存备用。采用Trizol试剂提取受试者血清中的总RNA并通过紫外分光光度计测定其中RNA的浓度和纯度。经过反转录得到互补DNA(cDNA),采用qRT-PCR检测受试者血清中miR-33、miR-122的相对表达量。反应体系:10 μL miScript SYBR® Green Mix, 1 μL cDNA(50 mg/L), 0.5 μL正向、反向引物(10 μM), 8.0 μL双蒸水(ddH₂O)。反应条件(40个循环):95 °C(90 s);95 °C(30 s);63 °C(30 s);72 °C(15 s)。miR-33、miR-122、内参U6的引物序列见表1。采用2^{-ΔΔCT}法分析受试者血清中miR-33、miR-122的相对表达水平。

1.3.3 Gensini积分计算标准 冠脉造影检查及Gensini积分由该院资深心内科医师完成,Gensini积分标准参考美国心脏协会规定的冠脉血管图像分段评价标准Gensini积分系统^[6]:根据冠状动脉狭窄程度进行评分:正常,0分;≤25%,1分;26%~50%,2分;51%~75%,4分;76%~90%,8分;91%~99%,16分;100%,32分。系数根据不同狭窄部位确定:左主干,系数为5;左前降支近段,系数为2.5,中段,系数为1.5,远段,系数为1.0;第一对角支,系数为1.0,第二对角支,系数为0.5;回旋支近段,系数为2.5,中段,系数为1.5,远段,系数为1.0;后降支,系数为1.0;后侧支,系数为0.5;右冠近、中、远后降支,系数为1.0。根据冠心病的病变支数分组:单支组(回旋支、前降支、右冠任1支发生病变,血管狭窄≥50%);2支组(回旋支、前降支、右冠任2支有病变,左主干

表1 实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)引物序列

基因	正向引物序列(5'→3')	反向引物序列(5'→3')
miR-122	CCAAGCTTCCGATCCCATTTCTCACAC	CCGCTCGAGATGCCAGGGTGTGCTTTTC
miR-33	CCAGCACAGAATTAATACGACTCACTA	GCGAGCACAGAATTAATACGACTCACTATAGC
U6	ATTGGAACGATACAGAGAAGATT	GGAACGCTTCACGAATTTG

病变属2支组,至少1支血管狭窄≥70%);3支组(回旋支、前降支、右冠均发生病变,至少1支血管狭窄≥90%)^[7]。按照公式计算 Gensini 积分=(单处病变狭窄程度积分×相应系数)×总支数。

1.4 统计学方法 采用SPSS 22.0数据分析系统进行统计学分析,采用“例(%)”对计数资料进行描述,并进行 χ^2 检验;用 $\bar{x} \pm s$ 对计量资料进行表示,并进行t检验;多组比较进行单因素方差分析;采用Pearson相关性分析冠心病病人血清中 miR-33、miR-122 水平与 Gensini 积分的相关性;采用 logistic 回归分析发生冠心病的危险因素。 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对照组、冠心病组病人一般资料比较 与对照组相比,冠心病组病人年龄、性别、腰臀比、血清肌酐异常比例和冠心病家族史比例均差异无统计学意义($P > 0.05$),吸烟比例、高血压病史比例、糖尿病病史比例、三酰甘油及低密度脂蛋白胆固醇(LDL)水平显著较高($P < 0.05$)。见表2。

表2 冠心病组和对照组病人一般临床资料比较

一般情况	对照组 (n=120)	冠心病组 (n=200)	t(χ^2)值	P值
年龄/(岁, $\bar{x} \pm s$)	54.32±7.85	54.69±7.61	0.416	0.678
性别(男/女)/例(%)	63/57	96/104	(0.441)	0.507
吸烟/例(%)	46(38.33)	107(53.5)	(6.302)	0.012
腰臀比/ $\bar{x} \pm s$	0.98±0.14	0.96±0.13	1.294	0.197
高血压病史/例(%)	40(33.33)	128(64.00)	(52.258)	<0.001
糖尿病病史/例(%)	27(22.50)	95(47.50)	(18.825)	<0.001
血清肌酐异常/例(%)	6(5.00)	13(6.50)	(0.093)	0.760
三酰甘油/(mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	1.45±0.41	1.72±0.35	6.259	<0.001
LDL/(mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	2.09±0.57	2.53±0.62	6.332	<0.001
冠心病家族史/例(%)	20(16.67)	41(20.50)	(0.487)	0.485

注:LDL为低密度脂蛋白胆固醇。

2.2 对照组、冠心病组病人血清中 miR-33、miR-122 水平比较 与对照组相比,冠心病组病人血清中 miR-33、miR-122 水平显著升高($P < 0.05$)。见表3。

表3 冠心病组和对照组血清 miR-33、miR-122 水平比较/ $\bar{x} \pm s$

组别	miR-33	miR-122
对照组	0.68±0.10	1.13±0.08
冠心病组	1.34±0.42	5.49±1.15
t值	21.262	41.446
P值	<0.001	<0.001

2.3 冠心病组各亚组血清中 miR-33、miR-122 水平及 Gensini 积分比较 2支组、3支组 miR-33、miR-122 水平及 Gensini 积分均较单支组显著升高($P < 0.001$);与2支组相比,3支组 miR-33、miR-122 水平及 Gensini 积分显著升高($P < 0.001$)。详见表4。

表4 冠心病组中各亚组血清中 miR-33、miR-122 水平及 Gensini 积分比较/ $\bar{x} \pm s$

组别	例数	miR-33	miR-122	Gensini 积分/分
单支组	110	0.37±0.04	4.89±0.56	9.43±3.68
2支组	66	0.48±0.07 ^①	5.19±0.32 ^①	22.49±7.03 ^①
3支组	24	0.62±0.13 ^{①②}	5.63±0.24 ^{①②}	65.57±15.32 ^{①②}
F值		73.170	28.101	610.264
P值		<0.001	<0.001	<0.001

注:①与单支组相比, $P < 0.001$ 。②与2支组相比, $P < 0.001$ 。

2.4 冠心病各亚组病人血清中 miR-33、miR-122 水平与 Gensini 积分的相关性分析 Pearson 分析结果显示,miR-33 水平和 Gensini 积分呈正相关($r = 0.706, P < 0.001$);miR-122 水平和 Gensini 积分呈正相关($r = 0.458, P < 0.001$)。

2.5 logistic 回归分析冠心病的危险因素 为了确定冠心病的危险因素,以冠心病年龄、性别、腰臀比、血清肌酐异常和冠心病家族史、吸烟、高血压病史、糖尿病病史、三酰甘油、LDL 含量、血清 miR-33、miR-122 水平为自变量进行多因素 logistic 回归分析,结果显示 LDL 含量、miR-33、miR-122 水平及年龄是冠心病的独立危险因素($OR = 1.862, 95\%CI: 1.359 \sim 2.57; OR = 4.157, 95\%CI: 2.597 \sim 6.654; OR = 4.196, 95\%CI: 2.362 \sim 7.453, OR = 1.824, 95\%CI: 1.213 \sim 2.454$)。详见图1。

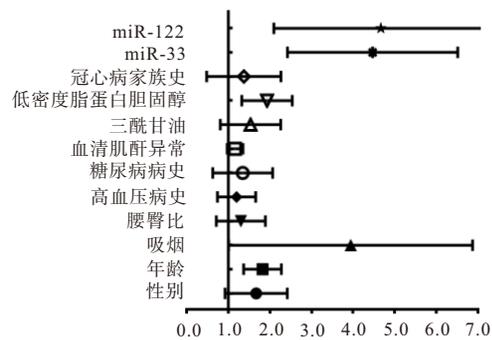


图1 影响冠心病发生的危险因素分析森林图

3 讨论

冠心病是一种常见的心血管疾病,是以动脉粥样硬化为病理基础导致冠状动脉狭窄的一种疾病,该病涉及血管内皮细胞损伤、平滑肌细胞增殖迁移及炎性介质释放等慢性病变过程^[8-9]。据不完全统计,我国每年因疾病死亡病人中冠心病病人约占50%,且发病率呈逐年上升趋势,目前已经成为危害我国居民健康的第2杀手^[10-11]。因此,加强冠心病预防、丰富早期诊断方法、提高治疗成功率为现阶段研究热点^[12]。miRNA 是一种内源性小 RNA,在进化过程中高度保守,且可稳定存在于血清或血浆等多种液体中,主要通过转录后调控基因表达参与机体的各种生理、病理过程,并与冠心病的发生、发展过

程密切相关^[13-14]。因此本实验拟探究 miR-33、miR-122 水平与冠心病 Gensini 积分的相关性,以期为冠心病的早期诊断提供一定有价值的理论参考。

本研究发现,冠心病组病人在吸烟比例、高血压病史比例、糖尿病病史比例、三酰甘油及 LDL 水平显著高于对照组,提示冠心病的发生可能与生活习惯有关,不良生活习惯可能增加冠心病发生风险。进一步研究结果显示,冠心病组病人血清中 miR-33、miR-122 水平均显著高于对照组,且随着冠心病血管病变支数增多,miR-33、miR-122 水平依次升高。miR-33 存在于大多数组织中,其基因序列和位置均高度保守,主要包含两个亚型,miR-33a 和 miR-33b。研究表明,miR-33 可以影响固醇合成和脂肪 β 氧化以及脂质代谢过程,上调 miR-33a 表达,血浆胆固醇含量会增加,抑制 miR-33 表达,血浆中胆固醇含量降低,HDL 含量显著增加,动脉粥样硬化程度会减弱^[15]。有研究发现,过表达 miR-33 可促进冠心病的发生发展,miR-33 可能成为冠心病发生发展的一个生物标志物^[16]。miR-122 是一种在成年人肝脏细胞中高度表达的 miRNA,研究表明,腺病毒高表达 miR-122 会增加肝脏中合成胆固醇基因如 Mmgcs1、Dhcr7 等表达,抑制 miR-122 表达后,会影响肝脏功能,使胆固醇合成效率降低^[17]。胆固醇的合成代谢与冠心病以及其他心血管疾病密切相关^[15]。综合以上研究及本研究结果,提示冠心病病人血清 miR-33、miR-122 高表达与病人病情发展有关。

研究发现,miR-181b 在冠心病病人血浆中低表达,与 Gensini 积分呈负相关,具有抗动脉粥样硬化作用;miR-130a 在冠心病病人血浆中高表达,与 Gensini 积分呈正相关关系,发挥促动脉粥样硬化作用^[8]。miR-21 可通过抵抗缺血引起的心肌死亡发挥心肌保护作用,在冠心病的发生发展过程中发挥重要作用^[1]。以上研究提示,多种 miRNA 表达可能参与冠心病发生发展。研究显示,miR-33 与 Gensini 积分呈正相关关系,可促进冠心病的发生发展进程^[8]。本研究结果显示,miR-33、miR-122 在冠心病病人血清中均高表达,且与病人 Gensini 积分呈正相关,提示血清 miR-33、miR-122 水平可能与冠心病病人严重程度有关。logistic 回归分析结果显示,miR-33、miR-122 水平升高、LDL 含量增多以及年龄均为冠心病发生的独立危险因素,提示 miR-33、miR-122 高表达与冠心病发生有关。

综上所述,冠心病病人血清中 miR-33、miR-122 表达水平均显著上调,且与 Gensini 积分正相关,是影响冠心病发生的危险因素,推测检测血清 miR-33、miR-122 水平可能作为评估冠心病病人病情的指标,其具体机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] 张倩,宋林声,赵新湘. MicroRNA 21 与冠心病相关性的研究进展[J]. 心血管病学进展, 2018,39(4):598-601.
- [2] KASARGOD PRABHAKAR CR, STEWART R. Physical activity and mortality in patients with stable coronary heart disease[J]. *Curr Opin Cardiol*, 2018,33(6):653-659.
- [3] 陈芸,罗至,曾韡,等. 微小 RNA-143/145 基因多态性与冠心病危险因素及严重程度相关性[J]. 中国医学科学院学报, 2018,40(4):510-518.
- [4] YAO Y, SONG T, XIONG G, et al. Combination of peripheral blood mononuclear cell miR-19b-5p, miR-221, miR-25-5p, and hypertension correlates with an increased heart failure risk in coronary heart disease patients[J]. *Anatol J Cardiol*, 2018,20(2):100-109.
- [5] GUO J F, ZHANG Y, ZHENG Q X, et al. Association between elevated plasma microRNA-223 content and severity of coronary heart disease[J]. *Scand J Clin Lab Invest*, 2018,78(5):373-378.
- [6] ZHU CP, LI TP, WANG X, et al. The relationship between apnoea hypopnoea index and Gensini score in patients with acute myocardial infarction undergoing emergency primary percutaneous coronary intervention[J]. *J Thorac Dis*, 2017,9(8):2476-2483.
- [7] 曹雪明,李江,张静,等. 冠心病患者侧支循环程度与血浆补体 C1q 肿瘤坏死因子相关蛋白及胰岛素抵抗的相关性研究[J]. 心肺血管病杂志, 2018,37(4):307-310,324.
- [8] 谢岩,王月香,席燕,等. MicroRNA-181b 和 microRNA-130a 在冠状动脉粥样硬化性心脏病患者血浆中的表达及临床意义[J]. 中国现代医学杂志, 2017,27(22):42-46.
- [9] HUANG WQ, WEI P, LIN RQ, et al. Protective effects of MicroRNA-22 against endothelial cell injury by targeting NLRP3 through suppression of the inflammasome signaling pathway in a rat model of coronary heart disease[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017,43(4):1346-1358.
- [10] 许涵,翟春丽,李冰冰. 冠心病患者促炎因子 IL-1 β 和抑炎因子 IL-10 全身与病变局部水平的关系[J]. 心肺血管病杂志, 2018,37(11):968-971.
- [11] 王德征,张辉,徐忠良,等. 天津市居民 1999—2013 年冠心病死亡率变化趋势分析[J]. 中华预防医学杂志, 2017,51(2):176-179.
- [12] QIN WW, WANG L, JIAO Z, et al. Lower clearance of sodium tanshinone IIA sulfonate in coronary heart disease patients and the effect of total bilirubin: a population pharmacokinetics analysis[J]. *Chin J Nat Med*, 2019,17(3):218-226.
- [13] DENG X, LIU Y, LUO M, et al. Circulating miRNA-24 and its target YKL-40 as potential biomarkers in patients with coronary heart disease and type 2 diabetes mellitus[J]. *Oncotarget*, 2017,8(38):63038-63046.
- [14] 李艳华. microRNA 与冠心病相关性的研究进展及临床应用[J]. 心血管病学进展, 2017,38(3):261-264.
- [15] 朱磊,路瑛丽,冯连世,等. microRNA 调节脂代谢的研究进展[J]. 中国体育科技, 2016,52(3):61-68.
- [16] XIE Z, MA P. MiR-33 may be a biological marker for coronary heart disease[J]. *Clin Lab*, 2018,64(10):1755-1760.
- [17] WANG SS, WU L J, LI J J, et al. A meta-analysis of dysregulated miRNAs in coronary heart disease[J]. *Life Sci*, 2018,215(1):170-181.

(收稿日期:2019-08-17,修回日期:2019-09-16)