

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.23.011

循环 microRNA-21 水平在预测冠状动脉侧支循环形成中的作用*

廖清池¹, 胡艳丽¹, 周胜华²

(1. 扬州大学附属苏北人民医院心内科, 江苏扬州 225001; 2. 中南大学湘雅二医院心内科, 湖南长沙 410000)

[摘要] **目的** 探讨 microRNA-21(miR-21)在预测冠心病慢性闭塞病变(CTO)患者侧支循环是否良好中的作用。**方法** 选取 95 例冠脉造影提示 CTO 的冠心病患者,根据患者冠脉侧支循环情况将其分为侧支循环良好组(53 例)及侧支循环不良组(42 例),选择冠脉造影正常的 30 例患者作为对照组,采用实时荧光定量 PCR 法检测 miR-21 水平,ELISA 法检测缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)水平。Logistic 回归分析法分析冠脉侧支循环形成的影响因素,应用接受者操作特征曲线(ROC 曲线)评价 miR-21 对 CTO 病变患者冠脉侧支循环是否良好的预测效能。**结果** 与冠脉侧支循环不良组相比,冠脉侧支循环良好组血浆 miR-21 及 HIF-1 α 水平明显升高($P<0.05$);CTO 病变组较正常冠脉组 miR-21 及 HIF-1 α 水平明显降低($P<0.05$);miR-21 水平与 HIF-1 α 表达呈正相关($r=0.804, P<0.05$);miR-21($OR=4.762, 95\%CI$ 为 $2.395\sim6.164, P<0.05$)及 HIF-1 α ($OR=12.906, 95\%CI$ 为 $11.774\sim15.048, P<0.05$)水平均为 CTO 冠脉侧支循环形成良好的预测因子;miR-21 可有效区分 CTO 病变侧支循环是否良好(AUC 为 $0.93, P<0.05$)。**结论** 循环 miR-21 水平在 CTO 侧支循环良好组明显升高,可作为区分冠心病 CTO 病变患者侧支循环是否良好的生物标志物。

[关键词] microRNA-21;慢性闭塞病变;冠脉侧支循环

[中图分类号] R541.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2018)23-3043-04

Function of circulating microRNA-21 in predicting the coronary collateral circulation*
LIAO Qingchi¹, HU Yanli¹, ZHOU Shenghua²
(1. Department of Cardiology, Northern Jiangsu People's Hospital Affiliated to Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225001, China; 2. Department of Cardiology, the Second Xiangya Hospital Affiliated to Central South University, Changsha, Hunan 410000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the role of microRNA-21 (miR-21) in predicting the collateral circulation in patients with coronary chronic total occlusions (CTO). **Methods** Ninety-five patients with coronary heart disease who were prompted by coronary angiography for CTO were divided into the well group (53 cases) and the poorly group (42 cases) according to the coronary collateral circulation, another 30 patients with normal coronary angiography were selected as the control group. The level of miR-21 was determined by real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) was detected by ELISA. Logistic regression analysis was used to analyze the influencing factors of the coronary collateral circulation formation. The receiver operating characteristic curve (ROC curve) was applied to evaluate the predictive efficacy of miR-21 on the coronary collateral circulation in patients with CTO. **Results** The levels of miR-21 and HIF-1 α significantly increased in the well group compared with the poorly group ($P<0.05$); the levels of miR-21 and HIF-1 α significantly decreased in the CTO group compared with the control group ($P<0.05$); the level of miR-21 was positively correlated to the HIF-1 α expression ($r=0.804, P<0.05$). Both miR-21 ($OR=4.762, 95\%CI$ $2.395-6.164, P<0.05$) and HIF-1 α ($OR=12.906, 95\%CI$ $11.774-15.048, P<0.05$) were the predictors indicating well developed coronary collateral circulation formation in the CTO patients; miR-21 could effectively distinguish whether the coronary collateral circulation formation was good or not (AUC was $0.93, P<0.05$). **Conclusion** The level of circulating miR-21 significantly increases in the well group, and it can be used as a biomarkers to distinguish whether the collateral circulation of patients with coronary heart disease CTO lesions is good or not.

[Key words] microRNA-21; chronic total occlusion; coronary collateral circulation

* 基金项目:扬州市自然科学基金资助项目(YZ2014045)。 作者简介:廖清池(1977—),副主任医师,博士,主要从事冠心病的基础与临床研究。

冠脉侧支循环形成过程即为动脉血管新生的过程,可为冠脉闭塞患者提供替代的冠脉灌注途径,冠脉侧支循环发展良好的冠心病患者保留有更好的心脏功能,更少受不良心血管事件的影响,病死率亦更低,因此冠脉侧支循环在冠心病慢性闭塞(CTO)患者中具有重要的临床意义。microRNA 是一类非编码单链小分子 RNA,通过 mRNA 转录后抑制或诱导其降解调节基因表达。资料表明 microRNA 可作为区分患者是否患有心血管疾病的生物标志物,这类疾病主要包括心力衰竭,稳定性心绞痛及急性心肌梗死,然而至今有关 microRNA 与冠心病侧支循环的关系研究仍鲜有报道^[1]。microRNA-21(miR-21)已被证实为多种肿瘤的生物标志物,近来研究表明其在促进血管新生中亦起重要作用^[2]。缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)是缺氧条件下诱导产生的一种转录因子,参与机体对缺氧的反应,研究表明亦有促进血管新生的作用。研究表明 miR-21 可调控 HIF-1 α 的表达^[3-4]。本研究主要探讨不同侧支循环的 CTO 冠心病患者中循环 miR-21 表达的差异,并进一步明确 miR-21 是否可作为预测冠脉侧支循环是否良好的生物标志物。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2012 年 8 月至 2017 年 8 月在本院住院治疗的冠心病患者 95 例,男 60 例,女 35 例,年龄 40~79 岁(55.7 $\pm$ 17.2)岁,均行冠脉造影证实前降支、回旋支或右冠状动脉至少有一支为 CTO 病变,根据冠脉侧支循环是否良好分为侧支良好组 53 例,侧支不良组 42 例,所有患者均有超过 4 周的心绞痛症状,符合冠心病诊断标准。排除标准包括:既往心肌梗死、心脏外科手术、左心功能不全、糖尿病、慢性炎症、冠状动脉心肌桥、瓣膜性心脏病、周围血管疾病、血液系统疾病、脑血管疾病、肿瘤及重要脏器严重功能障碍等。排除糖尿病主要因其对冠脉侧支循环及 microRNA 表达有潜在影响^[5-6],因此排除此类患者有利于明确 microRNA 表达水平与冠脉侧支循环的关系。选取同期行冠脉造影正常的住院患者 30 例作为对照组,男 19 例,女 11 例,年龄 39~79 (56.3 $\pm$ 18.1)岁。各组患者性别、年龄差异无统计学意义($P>0.05$)。同时收集其他一般临床资料,主要包括高血压、高脂血症病史、吸烟史及相关用药史[如拜阿司匹林、氯吡格雷、他汀类药物、血管紧张素转换酶抑制剂/血管紧张素 II 受体阻断剂(ACEI/ARB)、钙通道阻滞剂(CCB)、硝酸酯类药物、倍他乐克、低分子肝素等],上述指标在 CTO 两组患者中比较差异无统计学意义($P>0.05$)。本研究通过本单位伦理委员会批准,所有研究对象均书面知情同意。

1.2 方法

1.2.1 冠状动脉侧支循环情况评估 根据冠脉侧支循环 Rentrop 分级标准^[7]评估冠状动脉侧支循环:0 级为未见侧支循环;1 级为分支冠脉充盈,但主要的心

外膜冠脉未见显影;2 级为主要心外膜冠脉部分充盈;3 级为主要心外膜冠脉完全显影。0、1 级者为冠脉侧支循环功能不良组(42 例),而 2、3 级者为冠脉侧支循环功能良好组(53 例)。

1.2.2 miR-21、HIF-1 α 表达水平检测及白细胞计数

各组患者在行冠状动脉造影术前,于主动脉根部抽取血样本 10 mL,注入事先准备好的无菌柠檬酸盐试管中,然后置入冰中,并以 1 500 $\times$ g 离心 20 min,血浆储存于-80 $^{\circ}$ C 无 RNA 酶的小瓶中待用。实时荧光定量 PCR 法测定血浆 miR-21 相对表达水平,ELISA 法测定血浆 HIF-1 α 水平,计算白细胞、单核细胞及淋巴细胞总数。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,对于符合正态分布的资料,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析(若方差不齐予 Welch's 法校正),对于非正态分布资料,组间比较应用 Mann-Whitney U 检验;计数资料以率表示,组间比较进行 χ^2 检验;采用 Pearson 法分析 miR-21 与 HIF-1 α 的相关性;以侧支循环建立是否良好作为因变量,以 miR-21 与 HIF-1 α 及临床一般资料为自变量,行多元 Logistic 回归分析;回归分析中的预测概率用来制作 ROC 曲线,ROC 曲线用来分析评估 miR-21 在区分冠脉侧支循环是否良好时的特异度及敏感度。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组白细胞、淋巴细胞及单核细胞计数比较 侧支循环良好组单核细胞计数较侧支不良组明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1。

表 1 两组白细胞、淋巴细胞及单核细胞计数的比较($\bar{x}\pm s$, $\times 10^9/L$)

组别	<i>n</i>	白细胞	淋巴细胞	单核细胞
侧支良好组	53	6.3 $\pm$ 1.7	1.9 $\pm$ 0.7	0.59 $\pm$ 0.16 ^a
侧支不良组	42	6.7 $\pm$ 1.8	1.8 $\pm$ 0.6	0.35 $\pm$ 0.13

^a: $P<0.05$,与侧支不良组比较

2.2 两组血 miR-21、HIF-1 α 表达水平比较 侧支良好组较侧支不良组血浆 miR-21、HIF-1 α 表达水平明显升高;CTO 组 miR-21、HIF-1 α 表达水平较正常对照组减少,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 2。

表 2 各组血 miR-21、HIF-1 α 水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	miR-21	HIF-1 α (ng/L)
CTO 组	95	0.46 $\pm$ 0.12 ^a	26.55 $\pm$ 5.19 ^a
侧支良好组	53	0.56 $\pm$ 0.13 ^b	29.97 $\pm$ 5.70 ^b
侧支不良组	42	0.35 $\pm$ 0.09	22.98 $\pm$ 4.61
正常对照组	30	0.68 $\pm$ 0.17	34.26 $\pm$ 7.43

^a: $P<0.05$,与对照组比较;^b: $P<0.05$,与侧支不良组比较

2.3 冠心病患者侧支循环形成的影响因素 相关分析显示血浆 miR-21 表达水平与 HIF-1 α 表达水平及

单核细胞计数呈正相关 ($r = 0.804, P < 0.05; r = 0.784, P < 0.05$)。多因素 Logistic 回归分析显示 miR-21 ($OR = 4.762, 95\% CI$ 为 $2.395 \sim 6.164, P < 0.05$) 及 HIF-1 α 水平 ($OR = 12.906, 95\% CI$ 为 $11.774 \sim 15.048, P < 0.05$) 是 CTO 患者侧支循环形成良好的预测因子。

2.4 血浆 miR-21 预测效能 根据 Logistic 回归分析的概率值绘制 ROC 曲线, AUC 为 $0.93 (95\% CI$ $0.79 \sim 0.95, P < 0.05)$, 应用血浆 miR-21 表达水平预测 CTO 患者侧支循环形成的灵敏性及特异性分别为 $87.5\%、94.1\%$ 。

3 讨论

近年来 miR-21 调节血管新生的作用已成为研究热点。研究发现在常氧条件下 miR-21 可抑制内皮细胞介导的血管新生^[8], 而其他研究人员在肿瘤细胞中研究发现 miR-21 通过激活 Akt 信号促进血管新生^[9], 因此 miR-21 在不同的细胞类型中发挥血管新生的调节作用不同。既往研究证实 miR-21 可显著缩小急性心肌梗死患者心肌梗死面积, 表明 miR-21 在缺血缺氧环境中可促进血管新生。其机制可能与 miR-21 作用于 10 号染色体 q23 有缺失且与张力蛋白同源的磷酸酯酶基因 (PTEN) 有关, 因后者可以抑制 Akt 的活化, 而 Akt 活化可促进血管新生。因此 miR-21 可通过 PTEN/Akt 信号途径促进缺血缺氧性血管新生。

尽管目前研究表明 miR-21 与血管新生的关系密切, 但鲜有临床报道 miR-21 与冠脉侧支循环功能程度有关。本研究表明 miR-21 水平在侧支循环良好的 CTO 患者血浆中表达明显增加, 并进一步证实 miR-21 可作为血浆循环标志物用来区分 CTO 患者侧支循环是否良好 (灵敏性及特异性分别为 $87.5\%、94.1\%$)。有趣的是与冠脉造影正常患者相比, CTO 患者血浆中 miR-21 表达明显减少, 提示 miR-21 可能是 CTO 冠心病患者的不利因素。

目前 microRNA 表达水平与冠心病冠脉侧支循环功能关系如何知之甚少, 本研究假定冠心病患者中侧支循环功能程度不同, 其血浆中 miR-21 表达水平亦不同, 结果证实 miR-21 表达水平与冠脉侧支循环程度呈正相关, miR-21 可用来区分冠心病患者冠脉侧支循环功能是否良好, 其水平升高提示冠脉侧支循环功能良好, 这一点在识别并发急性冠脉综合征高风险患者显得尤为重要。资料表明侧支循环丰富的冠心病患者有利于改善其生存率^[10], 令人遗憾的是目前尚缺乏循环标志物来区分这类高风险患者。由于 miR-21 在患者血浆中表达稳定, 有明显组织特异性, 而且随所处环境反应快速, 本研究证实在预测 CTO 患者冠脉侧支循环情况时其敏感度及特异度均较高, 因此 miR-21 作为简单易测的生物标志物可用来预测冠脉侧支循环是否良好, 有利于指导高危冠心病患者

的治疗及改善其预后。

循环中白细胞尤其是其中的单核细胞在冠脉侧支循环中起重要调节作用, 研究表明冠脉侧支循环功能良好与血液循环中低水平的白细胞总数及高水平的单核细胞有关^[11], 本研究结果表明冠脉侧支循环良好组单核细胞明显升高, 与前述研究一致, 进一步行相关分析发现 miR-21 与循环中单核细胞存在明确正相关, 推测其机制可能与单核细胞分泌 miR-21 有关^[12]。此外有研究发现淋巴细胞计数与冠脉侧支循环功能是否良好相关^[13], 本研究显示淋巴细胞计数及白细胞总数在冠脉侧支循环良好组及不良组间比较均无明显差别, 这可能与本研究选择 CTO 冠心病患者作为研究对象有关。HIF-1 α 在缺氧条件下有促进血管新生的作用。资料表明 HIF-1 α 可诱导血管内皮生长因子 (VEGF) 表达而缩小心肌梗死面积。研究显示 HIF-1 α 表达受 miR-21 调控^[3], 其机制可能与激活 Akt 信号途径有关, 而后者可促进 VEGF 的表达。有资料表明在缺氧环境下抑制 miR-21 可导致心肌细胞 HIF-1 α 表达减少^[4]。本研究结果显示 HIF-1 α 是冠脉侧支循环的影响因素, 而且 miR-21 与 HIF-1 α 呈正相关, 因此推测在 CTO 冠心病患者中 miR-21 通过上调 HIF-1 α 表达而促进冠脉侧支循环形成。此外, 研究表明 HIF-1 α 可通过上调 miR-19a 促进单核细胞水平上调及冠状动脉粥样硬化发生^[14], 本研究亦发现 HIF-1 α 与单核细胞计数呈正相关, 因此 HIF-1 α 发挥影响冠脉侧支循环的作用可能部分是通过增加血浆中单核细胞计数实现的。

目前明确冠脉侧支循环功能情况主要依靠冠脉造影等侵入性检查方法, 而冠脉造影亦仅提供一种半定量方法来评估冠脉侧支循环功能情况, 而且只能探测 $100 \mu g$ 以上的血管。因此利用循环标志物如本研究中证实的 miR-21 因其简单易操作且无创的方式来区分冠心病患者冠脉侧支循环情况就显得十分有价值。考虑到那些冠脉侧支循环功能不良的冠心病患者有更高并发急性冠脉事件的风险及更高的死亡率, 因此采用简单无创的方法有效识别这类患者非常重要。本研究表明 miR-21 可作为血浆循环标志物有效区分 CTO 冠心病患者冠脉侧支循环功能是否良好, 但其具体作用机制尚不明确, 因此将来的研究应纳入更多的患者群体以进一步明确 miR-21 在冠脉侧支循环中的作用并进行基础研究探讨其作用机制。

参考文献

- [1] HAKIMZADEH N, NOSSENT A Y, VAN DER LAAN A M, et al. Circulating microRNAs characterizing patients with insufficient coronary collateral artery function [J]. PLoS One, 2015, 10(9): e0137035.
- [2] ZHENG Z, XU P P, WANG L, et al. MiR21 sensitized B-lymphoma cells to ABT-199 via ICOS/ICOSL-mediated

- interaction of Treg cells with endothelial cells [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2017, 36(1):82.
- [3] HAN M, WANG Y, LIU M, et al. MiR-21 regulates epithelial-mesenchymal transition phenotype and hypoxia-inducible factor-1 α expression in third-sphere forming breast cancer stem cell-like cells [J]. *Cancer Sci*, 2012, 103(6):1058-1064.
 - [4] LIU Y, NIE H, ZHANG K, et al. A feedback regulatory loop between HIF-1 α and miR-21 in response to hypoxia in cardiomyocytes [J]. *FEBS Lett*, 2014, 588(17):3137-3146.
 - [5] VAN DER HOEVEN N W, TEUNISSEN P F, WERNER G S, et al. Clinical parameters associated with collateral development in patients with chronic total coronary occlusion [J]. *Heart*, 2013, 99(15):1100-1105.
 - [6] RAFFORT J, HINAULT C, DUMORTIER O, et al. Circulating microRNAs and diabetes: potential applications in medical practice [J]. *Diabetologia*, 2015, 58(9):1978-1992.
 - [7] AKIN F, AYCA B, CELIK O, et al. Predictors of poor coronary collateral development in patients with stable coronary artery disease: neutrophil-to-lymphocyte ratio and platelets [J]. *Anatol J Cardiol*, 2015, 15(3):218-223.
 - [8] SABATEL C, MALVAUX L, BOVY N, et al. MicroRNA-21 exhibits antiangiogenic function by targeting RhoB expression in endothelial cells [J]. *PLoS One*, 2011, 6(2):e16979.
 - [9] LIU L Z, LI C, CHEN Q, et al. MiR-21 induced angiogenesis through AKT and ERK activation and HIF-1 α expression [J]. *PLoS One*, 2011, 6(4):e19139.
 - [10] HAKIMZADEH N, PIEK J J. The coronary collateral circulation revisited [J]. *Neth Heart J*, 2013, 21(3):144-145.
 - [11] KURTUL A, DURAN M. The correlation between lymphocyte/monocyte ratio and coronary collateral circulation in stable coronary artery disease patients [J]. *Biomark Med*, 2017, 11(1):43-52.
 - [12] MAZLOOM H, ALIZADEH S, ESFAHANI E N, et al. Decreased expression of microRNA-21 is associated with increased cytokine production in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of obese type 2 diabetic and non-diabetic subjects [J]. *Mol Cell Biochem*, 2016, 419(1/2):11-17.
 - [13] ORNEK E, KURTUL A. Relationship of mean platelet volume to lymphocyte ratio and coronary collateral circulation in patients with stable angina pectoris [J]. *Coron Artery Dis*, 2017, 28(6):492-497.
 - [14] AKHTAR S, HARTMANN P, KARSHOVSKA E, et al. Endothelial hypoxia-inducible factor-1 α promotes atherosclerosis and monocyte recruitment by upregulating microRNA-19a [J]. *Hypertension*, 2015, 66(6):1220-1226.

(收稿日期:2018-02-09 修回日期:2018-04-30)

(上接第 3042 页)

- Loss of stearoyl-coA desaturase-1 activity induced leptin resistance in neuronal cells [J]. *Biol Pharm Bull*, 2017, 40(8):1161-1164.
- [2] 张云良, 殷俏, 郭淑芹, 等. 2 型糖尿病患者视网膜病变与视黄醇结合蛋白 4 和胰岛素抵抗的相关性研究 [J]. *微循环杂志*, 2016, 26(2):56-59.
 - [3] 中华医学会内分泌学分会. 中国 2 型糖尿病合并肥胖综合管理专家共识 [J]. *中华糖尿病杂志*, 2016(11):662-666.
 - [4] LEITE F, LEITE Â, SANTOS A, et al. Predictors of sub-clinical inflammatory obesity: plasma levels of leptin, very low-density lipoprotein cholesterol and CD14 expression of CD16+ monocytes [J]. *Obes Facts*, 2017, 10(4):308-322.
 - [5] FRIAS J, BASTYR E, VIGNATI L, et al. The sustained effects of a dual GIP/GLP-1 receptor agonist, NNC0090-2746, in patients with type 2 diabetes [J]. *Cell Metab*, 2017, 26(2):343-352.
 - [6] LECOUTRE S, OGER F, POURPE C, et al. Maternal obesity programs increased leptin gene expression in rat male offspring via epigenetic modifications in a depot-specific manner [J]. *Mol Metab*, 2017, 6(8):922-930.
 - [7] 李宝新, 张云良, 王君, 等. 糖尿病合并高血压大鼠瘦素和神经肽 Y 水平变化 [J]. *中国循证心血管医学杂志*, 2016, 8(9):1040-1042.
 - [8] LOH K, ZHANG L, BRANDON A, et al. Insulin controls food intake and energy balance via NPY neurons [J]. *Mol Metab*, 2017, 6(6):574-584.
 - [9] DOUGLASS J D, DORFMAN M D, FASNACHT R, et al. Astrocyte IKK β /NF- κ B signaling is required for diet-induced obesity and hypothalamic inflammation [J]. *Mol Metab*, 2017, 6(4):366-373.
 - [10] AILANEN L, RUOHONEN S T, VÄHÄTALO L H, et al. The metabolic syndrome in mice overexpressing neuropeptide Y in noradrenergic neurons [J]. *J Endocrinol*, 2017, 234(1):57-72.
 - [11] NAKAMURA Y, YANAGAWA Y, MORRISON S F, et al. Medullary reticular neurons mediate neuropeptide Y-induced metabolic inhibition and mastication [J]. *Cell Metab*, 2017, 25(2):322-334.
 - [12] KIM Y, BI S. Knockdown of neuropeptide Y in the dorso-medial hypothalamus reverses high-fat diet-induced obesity and impaired glucose tolerance in rats [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2016, 310(2):134-142.
 - [13] LIN X, QI Q, ZHENG Y, et al. Neuropeptide Y genotype, central obesity, and abdominal fat distribution: the POUNDS LOST trial [J]. *Am J Clin Nutr*, 2015, 102(2):514-519.

(收稿日期:2018-02-07 修回日期:2018-04-14)