

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.21.004

文章编号: 1005-8982 (2019) 21-0020-09

临床研究·论著

MicroRNA 标志物在早期诊断 室间隔缺损中的价值*

纪龙, 王小卉, 刘雪贞, 刘华民, 张倩倩, 杨伟丽, 韩东洋, 李栋

[山东第一医科大学(山东省医学科学院), 山东 泰安 271000]

摘要:目的 评价血浆 microRNA (miRNA) 在室间隔缺损 (VSD) 早期诊断中的临床应用价值以及作为 VSD 分子诊断标志物的可行性, 并建立临床早期诊断模型。**方法** 采用以济南市儿童医院、泰安市妇幼保健院为基础的病例-对照研究方法开展本次研究。研究分为 VSD 组 85 例和对照组 80 例, 分 3 个阶段进行检测: 首先选取 VSD 组及其匹配对照组各 3 例, 应用 miRNA 全基因组表达谱芯片进行初筛; 然后扩大样本量 (20 例 VSD 组 VS 15 例对照组), 对选定的 8 个有差异的 miRNA 采用实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 进行芯片结果的验证; 最后进一步扩大样本 (62 例 VSD 组 VS 62 例对照组) 进行 qRT-PCR 检测, 筛选先天性心脏病早期诊断的生物标志物, 建立多指标的 Logistic 回归模型, 并应用 MedCalc 软件进行受试者工作特征 (ROC) 曲线分析评价诊断模型的价值。**结果** 芯片杂交初筛结果显示, 与对照组比较, 有 36 个表达有差异的 miRNA ($P < 0.05$), 两阶段大样本 qRT-PCR 验证, 检测到 5 种血浆 miRNA (let-7e-5p、miR-155-5p、miR-222-3p、miR-433-3p 和 miR-487b-5p) 在 VSD 中的表达差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 可以选择作为具有 VSD 早期诊断意义的生物标志物。5 种血浆 miRNA 的 ROC 曲线下面积 (AUC) 分别在 0.678 ~ 0.832, 其中 miR-222-3p 的 ROC 曲线下面积最大为 0.832。建立多指标 Logistic 回归分析模型, 5 种血浆 miRNAs 联合模型可提高 VSD 的诊断效率, ROC 曲线下面积达到 0.955, 敏感性和特异性分别为 83.87% 和 95.16%; 3 种血浆 miRNA (let-7e-5p、miR-155-5p、miR-222-3p) 联合诊断模型, ROC 曲线下面积达到 0.910, 敏感性和特异性分别为 82.30% 和 90.30%, 接近 5 个 miRNA 的诊断效率。**结论** 5 种血浆 miRNA 作为 VSD 早期诊断标志物, 具有一定的可信性。将其整合后可建立起多指标的联合诊断模型。联合 3 种血浆 miRNA 构建诊断模型可提高 VSD 的诊断效率, 临床应用价值更大。

关键词: 心血管疾病; 室间隔缺损; 微 RNAs; ROC 曲线

中图分类号: R654.2

文献标识码: A

Value of microRNA markers in early diagnosis of VSD*

Long Ji, Xiao-hui Wang, Xue-zhen Liu, Hua-min Liu, Qian-qian Zhang,

Wei-li Yang, Dong-yang Han, Dong Li

[Shandong First Medical University (Shandong Academy of Medical Sciences),

Taian, Shandong 271000, China]

Abstract: Objective To evaluate the clinical value of plasma microRNA in the early diagnosis of ventricular septal defect (VSD) and its feasibility as a molecular diagnostic marker for VSD, and to establish a clinical early diagnosis model. **Methods** This study was conducted using a Jinan Children's Hospital and Taian Maternal and

收稿日期: 2019-05-05

* 基金项目: 山东省自然科学基金 (No: ZR2017MH007); 山东省高等学校科技计划 (No: J16LL09); 泰安市科技发展计划 (No: 2016NS1209)

[通信作者] 李栋, E-mail: tsmcdongli@163.com

Child Health Hospital-based case-control study. A total of 85 cases were collected for the VSD group and 80 cases for the control group. The test was performed in three stages. At first, 3 cases of ventricular septal defect (VSD) and 3 matched controls were selected, and the microRNA whole genome expression profile chip was used for primary screening. Then, the sample size was expanded (20 VSD cases VS 15 controls). The selected 8 differential microRNAs were verified by real-time quantitative PCR (qRT-PCR). Finally, further expanding samples (62 VSD cases VS 62 controls) were selected for qRT-PCR to screen biomarkers for early diagnosis of congenital heart disease and to establish a multi-index logistic regression model, and using MedCalc software for ROC (Receiver-Operator Characteristic curve) curve to analyze the value of the diagnostic model. **Results** Compared with control group, the results of microarray screening showed that there were 36 differential-expressed microRNAs ($P < 0.05$), two-stage large samples detected by qRT-PCR ($P < 0.05$) and significantly different expression among five plasma microRNAs (let-7e-5p, miR-155-5p, miR-222-3p, miR-433-3p and miR-487b-5p) in VSD ($P < 0.05$), which proved plasma microRNAs can be biomarkers for early diagnostic significance of VSD. The area under the ROC curve of five plasma microRNAs ranged from 0.678 to 0.832, and the largest area under the ROC curve was 0.832 in miR-222-3p. A multi-index logistic regression analysis model was established. Five plasma microRNAs combined models could improve the diagnostic efficiency of VSD. The area under the ROC curve reached 0.955, and the sensitivity and specificity were 83.87% and 95.16%, respectively. In the combined diagnostic model of three plasma microRNAs (let-7e-5p, miR-155-5p, miR-222-3p), the area under the ROC curve reached 0.910, sensitivity and specificity were 82.30% and 90.30%, respectively, which was closed to the diagnosis effectiveness of five miRNAs. **Conclusions** Five kinds of plasma microRNAs have certain credibility as early diagnostic markers of VSD. After integration, a joint diagnostic model with multiple indicators can be established. Combining three kinds of plasma microRNA to construct a diagnostic model can significantly improve the diagnostic efficiency of VSD, and has more clinical application value.

Keywords: cardiovascular diseases ; heart septal defects, ventricular; microRNAs; ROC curve

先天性心血管病 (congenital heart diseases, CHDs) 是人类发病率最高的出生缺陷, 研究表明活产儿先天性心血管病平均发病率为 9.1%, 其中亚洲国家最高, 为 9.3%^[1]。中国出生缺陷监测数据显示, 2000 ~ 2011 年 CHDs 是我国高发的畸形之一, 并呈逐年上升趋势。如何提高 CHDs 的早期诊断准确率, 已成为临床诊断和防治的重点和难点问题。目前包括 CHDs 在内的出生缺陷的早期诊断, 临床上主要依靠妊娠期的影像学检查, 该诊断方法特异性较差。正是由于缺乏针对 CHDs 特异性较高并且较为简易的早期检测手段, CHDs 患儿较难被早期发现, 因此, 需寻找一种新的高敏感性和高特异性的分子标志物, 用于 CHDs 的早期诊断和病情监测, 进而指导疾病预防, 这对降低 CHDs 的发病风险具有重要意义。

MicroRNA (miRNA) 是一类长约 22 个核苷酸的非编码小分子 RNA。CHEN 等^[2]发现人类血浆中存在大量 miRNA, 并进一步证明在 RNA 酶、酸碱性和高低温度等条件改变和长时间的储存均不会对血浆中 miRNA 的含量造成影响, 并且易于在外周血中检测, 可以便利地运用于临床疾病的诊断, 具有临床诊断标志物的重要特质。目前血浆 miRNA 作为多种疾病尤

其是肿瘤分子诊断标志物的研究已经广泛开展^[3-4]。虽然 miRNA 在 CHDs 发病过程中的作用尚不十分明确, 但近年来已有研究提示 miRNA 与心脏的形成、发育有关, 可能在 CHDs 的发生、发展中起重要作用^[5]。有关 CHDs 患者外周血 miRNA 的研究甚少, 最近的一项关于室间隔缺损 (ventricular septal defect, VSD) 合并重度肺动脉高压的小样本研究发现, 通过检测对比 VSD 合并 PAH 患者血浆的 86 种 miRNA, 得出 miR-98、miR-19a-3p、let-7f-5p、miR-198 等的表达水平升高, 而 miR-4312、miR-3943、miR-4284 的表达水平降低^[6]。然而 miRNA 在 CHDs 发生、发展过程中究竟扮演何种角色, 究竟有多少 miRNA 在发病过程中发生改变, 目前仍不清楚。

因此, 本研究首先通过 miRNA 表达谱芯片技术对 VSD 中特定表达的 miRNA 进行筛选、鉴定和验证, 寻找 VSD 分子诊断标志物, 为进一步探讨 miRNA 的异常表达与 CHDs 的关系提供依据, 进而评估血浆 miRNA 作为新的分子标志物用于临床 VSD 筛查诊断的价值和应用前景, 建立 VSD 早期临床诊断模型, 对现有 CHDs 早期诊断方法进行有效补充, 进一步提高 CHDs 的诊断效率, 改善患者预后, 减轻疾病负担。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取 2012 年 6 月—2015 年 11 月分别在济南市儿童医院、泰安市妇幼保健院心血管外科就诊和治疗的 4 个月~6 岁单纯性 VSD 患者作为 VSD 组(85 例);选取同期于上述医院体检中心健康体检儿童作为对照组(80 例),无 CHD 家族遗传史并且与 VSD 组来自相同地区。

本研究选取的对象通过 3 个阶段的对照性实验筛选、鉴定血浆有差异的 miRNA,并建立 VSD 血浆 miRNA 早期诊断模型。初始筛选阶段,按照 1:1 匹配收集 VSD 组和对照组研究对象各 3 例,采用 miR CURY™ LNA Array (v.18.0) (Exiqon, Vedbaek, Denmark) 全基因组表达谱芯片技术进行差异 miRNA 表达谱检测,初步筛查 VSD 血浆差异 miRNA;验证阶段扩大样本量,选取表达量差异(上调或下调)1.5 倍以上的 8 种重要的 miRNA,在 20 例 VSD 组和 15 例对照组血浆中采用实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)进行检测,验证芯片的检测结果;在 VSD 诊断模型的建立阶段,选取新的独立组(62 例 VSD 组 VS 62 例对照组)样本再次对上述已验证的差异血清 miRNA 进行 qRT-PCR 检测,分析其表达水平与 VSD 的相关性,建立 VSD 早期诊断模型,进一步探讨血浆 miRNA 在 VSD 临床诊断中的价值。

本研究经相关医院医学伦理委员会批准,所有研究对象由监护人签署知情同意书,血液标本仅用于本研究实验。

1.2 血浆标本采集和保存

采集病例组和对照组研究对象空腹静脉血标本 4 ml,2 ml 全血静置 10 min,4 000 r/min 离心 10 min,上层透明淡黄色液体即为血浆,收集后分装入无 RNase 的 EP 管中,置入 -80℃ 冰箱冷冻备用。另外 2 ml 用乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝,于 -20℃ 冰箱冷冻保存,用于基因组 DNA 提取。

1.3 血浆 RNA 提取

应用 Trizol and miRNeasy mini kit (美国 Qiagen 公司)试剂盒提取血浆总 RNA,具体操作参见试剂盒说明书。琼脂糖凝胶电泳法检测 RNA 质量,紫外分光光度计测定总 RNA 在 260 nm 和 280 nm 处的光密度(OD)值(A260/A280)衡量 RNA 的纯度,OD 值在 1.8~2.1,认为质量合格。

1.4 血浆 miRNA 芯片检测

将提取的血浆总 RNA 送上海康程生物技术服务公司进行 miRNA 芯片检测。

1.5 qRT-PCR 检测 miRNA

Rever Tra Ace qPCR-RT Kit 逆转录试剂盒和 miscrip SYBR Green PCR Kit 定量试剂盒购自上海 Toyobo 公司。U6 内参引物,let-7e-5p、miR-155-5p、miR-222-3p、miR-379-5p、miR-409-3p、miR-433、miR-487b 和 miR-498 引物购自上海 Gene Pharma 公司。10 μl 逆转录反应体系包括 Nuclease free water 2 μl,5 × RT Buffer 2 μl,miRNA & U6 RT Primer mix 0.5 μl,RT Enzyme Mix 0.5 μl,总 RNA 5 μl。反应进行条件:25℃ 30 min,42℃ 30 min,85℃ 5 min,4℃ 保存。qRT-PCR 采用 20 μl 体系,包括 SYBR 10 μl,miRNA/U6 specific Primer set 1 μl,灭菌水 7 μl,cDNA 2 μl。qRT-PCR 反应条件:95℃ 预变性 3 min,1 个循环;95℃ 变性 12 s,40 个循环;62℃ 退火 40 s,荧光信号采集。miRNA 的表达水平采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值表示, $\Delta\Delta Ct = \text{VSD 组}(Ct \text{ 样本} - Ct \text{ 对照}) - \text{对照组}(Ct \text{ 样本} - Ct \text{ 对照})$ 。

1.6 统计学方法

数据分析采用 SPSS 24.0 统计软件,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,比较采用 *t* 检验,计数资料以例(%)表示,比较采用 χ^2 检验和 Fisher 精确概率法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。对单个 miRNA 和多指标联合诊断模型进行诊断价值评价,首先建立 ROC 曲线,通过曲线下面积(AUC)、敏感性、特异性、约登指数、阳性预测值等来判断诊断 VSD 的效果;利用逐步 Logistic 回归模型建立多指标的诊断模型,用以区分 CHDs 患者和对照人群。

2 结果

2.1 研究对象一般特征

上述 3 阶段研究对象,在年龄、性别等方面均具有可比性,所选研究对象均为汉族,具体临床资料见表 1~3。

2.2 血浆 miRNA 表达谱芯片检测结果

利用 miRNA 芯片技术检测 3 例 VSD 组和 3 例对照组血浆中的 miRNA 表达特征,初步确定 VSD 差异 miRNA 表达谱。微阵列芯片杂交结果显示:与对照组比较,有 36 个表达有差异的 miRNA(差异倍数 > 1.5 或差异倍数 < 0.67, $P < 0.05$),其中 21 个 miRNA 在 VSD 组表达下调,表达上调的 miRNA 有 15 个。见表 4。

表 1 初筛阶段 VSD 组与对照组临床资料比较 (n=3)

组别	性别	年龄 / 岁	出生方式	避孕药服用史	叶酸服用史	CHDs 家族史
VSD 组						
D28	男	1.2	自然分娩	无	有	无
D55	男	2.1	自然分娩	有	有	无
D61	女	1.4	自然分娩	无	无	无
对照组						
C58	男	1.2	自然分娩	无	有	无
C56	男	2.1	自然分娩	有	有	无
C92	女	1.4	自然分娩	无	无	无

表 2 qRT-PCR 验证阶段 VSD 组与对照组临床资料比较

组别	n	男 / 女 / 例	年龄 / (岁, $\bar{x} \pm s$)	孕周数 / (周, $\bar{x} \pm s$)	出生体重 / (kg, $\bar{x} \pm s$)	流产史 例 (%)	避孕药服用 史 例 (%)	CHDs 家族史 例 (%)	生育年龄 / (岁, $\bar{x} \pm s$)	叶酸服用史 例 (%)
VSD 组	20	11/9	1.23 ± 0.51	38.35 ± 2.76	3.19 ± 0.50	9 (45.00)	2 (10.00)	0 (0.00)	25.3 ± 4.86	17 (85.00)
对照组	15	9/6	1.28 ± 0.37	39.27 ± 0.88	3.12 ± 0.50	1 (6.67)	1 (6.67)	0 (0.00)	27.13 ± 4.61	14 (93.33)
χ^2/t 值	-	-	-0.321	-1.241	0.410	-	-	-	-1.127	-
P 值	0.573 [†]		0.354	0.121	0.804	0.000 [†]	0.497 [†]	-	0.580	0.125 [†]

注: †Fisher 精确概率法。

表 3 诊断价值评价阶段 VSD 组与对照组临床资料 (n=62)

组别	男 / 女 / 例	年龄 / (岁, $\bar{x} \pm s$)	孕周数 / (周, $\bar{x} \pm s$)	出生体重 / (kg, $\bar{x} \pm s$)	流产史 例 (%)	避孕药服用史 例 (%)	生育年龄 / (岁, $\bar{x} \pm s$)	叶酸服用史 例 (%)
VSD 组	32/30	2.34 ± 1.96	38.77 ± 1.59	2.91 ± 0.4	15 (24.19)	9 (14.52)	29.67 ± 4.57	58 (93.55)
对照组	41/21	2.68 ± 1.31	39.1 ± 1.38	3.06 ± 0.47	8 (12.90)	5 (8.06)	28.64 ± 4.24	57 (91.94)
χ^2/t 值	2.698	-1.136	-1.234	-1.914	2.616	1.288	1.301	0.120
P 值	0.100	0.270	0.211	0.055	0.106	0.256	0.196	0.729

2.3 差异表达的 miRNA 的检测结果

通过查阅文献, 结合微阵列芯片表达情况, 选择 8 个差异表达的 let-7e-5p、miR-155-5p、miR-222-3p、miR-379-5p、miR-409-3p、miR-433-3p、miR-487b-5p 和 miR-498 运用 qRT-PCR 技术进行随后的两阶段大样本 qRT-PCR 验证, 检测到 5 种血浆 miRNA (let-7e-5p、miR-155-5p、miR-222-3p、miR-433-3p 和 miR-487b-5p) 在 VSD 中的表达差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 可以选择作为具有 VSD 早期诊断意义的生物标志物。见表 5。

2.4 单个 VSD 血浆 miRNA 的诊断价值

采用 ROC 曲线分析 5 种血浆 miRNA 对 VSD 的诊断价值, 5 种血浆 miRNA (let-7e-5p、miR-155-5p、

miR-222-3p、miR-433-3p 和 miR-487b-5p) 的 ROC 曲线下面积 (AUC) 分别为 0.767 (95% CI: 0.683, 0.838, $P = 0.000$)、0.709 (95% CI: 0.620, 0.787, $P = 0.000$)、0.832 (95% CI: 0.754, 0.893, $P = 0.000$)、0.678 (95% CI: 0.588, 0.759, $P = 0.001$) 和 0.698 (95% CI: 0.609, 0.777, $P = 0.000$); 当 5 种血浆 miRNA 表达量 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) 的截断值分别取 1.05、0.79、0.62、1.10 和 1.11 时, 敏感性分别为 91.9%、71.0%、74.2%、95.2% 和 82.3%, 特异性分别为 53.2%、72.6%、88.7%、33.9% 和 51.6%, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 6 和图 1。

2.5 miRNA 诊断模型的建立

利用逐步 Logistic 回归分析模型, 以是否患 VSD 为因变量, 5 种 miRNA 相对表达量为自变量, 分析

表 4 VSD 患者表达有差异的 miRNA

下调 miRNA	差异倍数	P 值	上调 miRNA	差异倍数	P 值
miR-4288	0.45	0.027	hsv2-miR-H23	57.67	0.004
miR-892a	0.45	0.035	miR-4268	6.74	0.020
let-7e-5p	0.44	0.024	miR-4778-3p	4.17	0.029
miR-4483	0.42	0.038	miR-3591-3p	3.90	0.039
miR-3138	0.41	0.029	ebv-miR-BART	3.39	0.041
miR-371b-5p	0.40	0.035	miR-498	3.05	0.006
ebv-miR-BAR	0.39	0.044	miR-585	2.70	0.045
miR-222-3p	0.38	0.042	miR-3667-5p	2.56	0.010
miR-2115-3p	0.38	0.042	miR-3924	2.56	0.001
miR-769-5p	0.37	0.030	miR-4742-3p	2.27	0.010
miR-146a-5p	0.36	0.036	miR-4732-3p	2.26	0.016
miR-155-5p	0.34	0.038	miR-5681b	2.25	0.014
miR-30b-3p	0.33	0.033	miR-5100	2.18	0.031
miR-191-5p	0.28	0.043	miR-1537	2.05	0.022
miR-654-3p	0.27	0.010	miR-4472	1.74	0.009
miR-379-5p	0.27	0.040			
miR-877-5p	0.26	0.030			
miR-493-5p	0.25	0.018			
miR-433-3p	0.15	0.036			
miR-487b-5p	0.14	0.003			
miR-409-3p	0.13	0.028			

表 5 8 种血浆 miRNA 的相对表达量 ($\bar{x} \pm s$)

miRNA	let-7e-5p	miR-155-5p	miR-222-3p	miR-379-5p	miR-409-3p	miR-433-3p	miR-487b-5p	miR-498
VSD 组 ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)	0.96 ± 0.56	0.89 ± 0.43	0.89 ± 0.21	0.98 ± 0.56	0.88 ± 0.27	0.93 ± 0.24	1.03 ± 0.33	1.03 ± 0.32
对照组 ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)	0.49 ± 0.35	0.64 ± 0.27	0.53 ± 0.39	0.89 ± 0.24	0.86 ± 0.31	0.79 ± 0.21	0.80 ± 0.30	1.13 ± 0.41
t 值	5.562	3.951	7.893	1.758	0.274	3.684	4.206	-1.320
P 值	0.000	0.000	0.000	0.081	0.785	0.000	0.000	0.190

血浆 miRNA 的差异表达是否与 VSD 有关, 结果显示 let-7e-5p、miR-155-5p、miR-222-3p、miR-433-3p 及 miR-487b-5p 的表达量与 VSD 的发生分别有独立的关联, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 6。

联合 5 种血浆 miRNA 指标建立多指标的诊断模型: $\text{Logit}(P = \text{VSD}) = 17.04 - [3.34 \times (\text{let-7e-5p}) - 2.810 \times (\text{miR-155-5p}) - 6.75 \times (\text{miR-222-3p}) - 5.56 \times (\text{miR-433-3p}) + 3.69 \times (\text{miR-487b-5p})]$ 。诊断模型 AUC 为 0.955 (95% CI: 0.902, 0.984, $P = 0.000$), 当截断值为 0.63 时,

敏感性和特异性分别为 83.87% 和 95.16%, 约登指数为 0.79, 5 种 miRNA 联合诊断的阳性预测值为 92.86%, 提示联合多个 miRNA 可大幅提高 VSD 的诊断效率。见表 7 和图 2A。

本室进一步取 AUC > 0.7 的 3 种血浆 miRNA (let-7e-5p、miR-155-5p 和 miR-222-3p) 进行 Logistic 回归分析 (见表 8 和图 2B), 得出诊断模型 (见表 9): $\text{Logistic}(P = \text{VSD}) = [7.26 - 2.68 \times (\text{let-7e-5p}) - 2.16 \times (\text{miR-155-5p}) - 5.28 \times (\text{miR-222-3p})]$ 。诊断模型

表 6 5 种血浆差异表达 miRNA 诊断价值评价相关指标

miRNA	S_0	截断值	敏感性 /%	特异性 /%	P 值	95% CI	
						下限	上限
let-7e-5p	0.04	1.05	91.9	53.2	0.000	0.683	0.838
miR-155-5p	0.05	0.79	71.0	72.6	0.000	0.620	0.787
miR-222-3p	0.04	0.62	74.2	88.7	0.000	0.754	0.893
miR-433-3p	0.05	1.10	95.2	33.9	0.001	0.588	0.759
miR-487b-5p	0.05	1.11	82.3	51.6	0.000	0.609	0.777

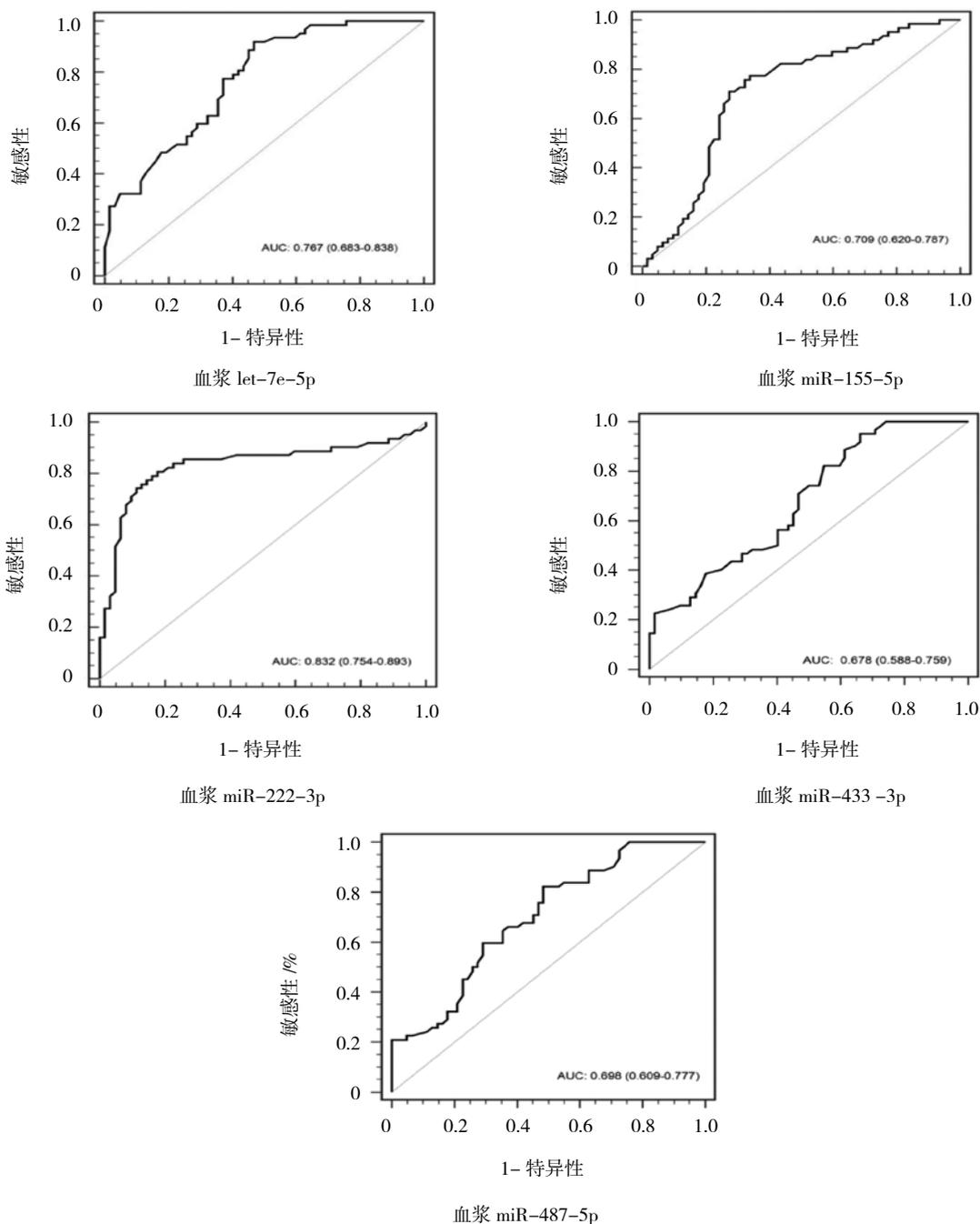


图 1 5 种血浆 miRNA 的 ROC 曲线

的 AUC 为 0.910 (95% CI : 0.845, 0.954, $P = 0.000$), 当截断值为 0.51 时, 敏感性和特异性分别为 82.30% 和 90.30%, 约登指数为 0.73, 3 种 miRNA 联合诊断

的阳性预测值为 89.47%。进一步分析表明: 3 个 miRNA 联合 (let-7e-5p、miR-155-5p 和 miR-222-3p) 即可接近于 5 个 miRNA 联合的诊断效率。

表 7 5 种血浆差异表达 miRNA 的 Logistic 回归分析参数

miRNA	b	S_b	Wald χ^2	\hat{OR}	P 值	95% CI	
						下限	上限
let-7e-5p	-3.34	0.90	13.71	0.036	0.000	0.006	0.209
miR-155-5p	-2.81	1.16	5.88	0.061	0.015	0.006	0.585
miR-222-3p	-6.75	1.44	22.01	0.001	0.000	0.000	0.020
miR-433-3p	-5.56	1.79	9.62	0.004	0.002	0.000	0.133
miR-487b-5p	-3.69	1.15	10.22	0.026	0.001	0.003	0.245
常数项	17.04	3.49	23.84		0.000		

表 8 3 种血浆差异表达 miRNA 的 Logistic 回归分析参数

miRNA	b	S_b	Wald χ^2	\hat{OR}	P 值	95% CI	
						下限	上限
let-7e-5p	-2.68	0.68	15.65	0.069	0.000	0.018	0.259
miR-155-5p	-2.16	0.84	6.64	0.116	0.010	0.022	0.597
miR-222-3p	-5.28	1.07	24.32	0.005	0.000	0.001	0.042
常数项	7.26	1.35	29.06		0.000		

表 9 血浆差异表达 miRNA 联合诊断模型的价值评价表

诊断模型	AUC	95% CI		S_b	敏感性 /%	特异性 /%	约登指数	阳性预测值 /%	P 值
		下限	上限						
5 种 miRNA 联合	0.955	0.902	0.984	0.02	83.87	95.16	0.79	92.86	0.000
3 种 miRNA 联合	0.910	0.845	0.954	0.03	82.30	90.30	0.73	89.47	0.000

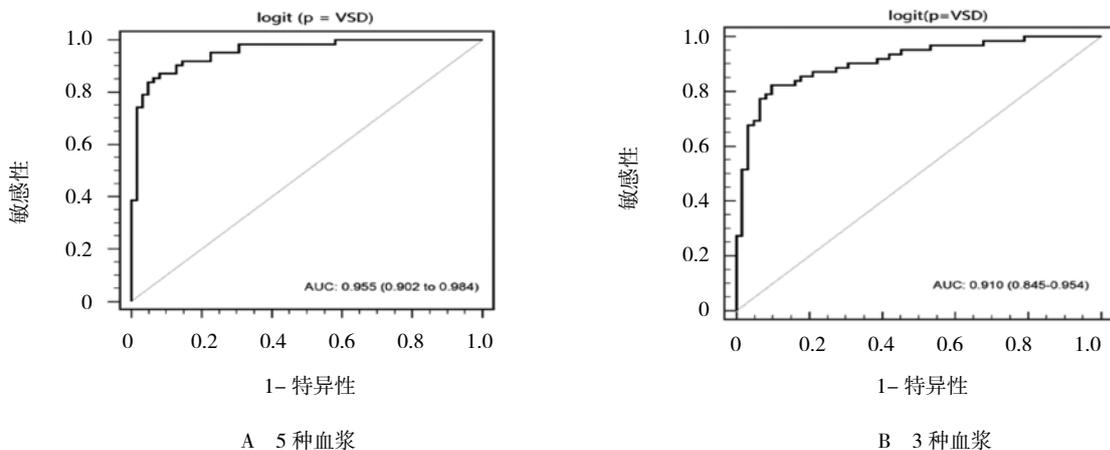


图 2 5 种和 3 种的血浆 miRNA 联合 ROC 曲线图

3 讨论

在前期研究中,通过 miRNA 表达谱芯片检测技术筛选出 VSD 血浆有差异表达的 36 种 miRNA。进一步扩大样本对重要差异 miRNA 进行两阶段的 qRT-PCR 检测,初步筛选出 5 种血浆差异表达 miRNA (miRNA-let-7e、miR-155-5p、miR-222-3p、miRNA-433-3p 和 miR-487b-5p) 作为 VSD 早期诊断标志物,将其整合后可建立起多指标的联合诊断模型。

利用 ROC 曲线下面积,判断上述 5 个 miRNA 的诊断效能。研究发现,let-7e-5p、miR-155-5p、miR-222-3p、miR-433-3p 和 miR-487b-5p 的 AUC 值分别为 0.767、0.709、0.832、0.678 和 0.698,其中 miR-222-3p 的诊断效能最高,其他 4 个 RNA 的 AUC 多集中在 0.6 ~ 0.8,也具有较好的诊断效能。研究发现,5 种 miRNA 的敏感性和特异性分别为 91.9%、53.2%; 71.0%、72.6%; 74.2%、88.7%; 95.2%、33.9%; 82.3%、51.6%。有些 miRNA 分子的敏感性或特异性相对较低,如 let-7e-5p 和 miR-487-5p 的特异性在 50% 左右,而 miR-433-3p 的特异性仅为 33.9%,即使是诊断效能最高的 miR-222-3p,其敏感性及特异性也只能达到 80% 左右,单个 miRNA 在临床上作为理想的分子诊断标志物仍有不小的差距。

鉴于此,本研究运用逐步 Logistic 回归分析,利用样品的 qRT-PCR 数据建立多指标的 Logistic 回归分析模型,优化组合该差异 miRNA,构建 VSD 联合诊断模型。通过联合 5 种 miRNA 诊断模型分析发现,AUC 达到 0.955,联合多个 miRNA 可大幅度提高诊断效能。当截断值为 0.63 时,5 种 miRNA 联合诊断的敏感性和特异性分别为 83.87% 和 95.16%,约登指数达到 0.79,结果提示通过构建 5 种 miRNA 诊断模型,可以使诊断的效果更好,真实性更高。

进一步以 AUC>0.7 的 3 种 miRNA (let-7e-5p、miR-155-5p 和 miR-222-3p) 构建诊断模型,该模型 AUC 面积为 0.910,截断值为 0.51 时,敏感性和特异性分别为 82.30%、90.30%,进一步提示多个 miRNA 组合可有效提高诊断效能。

let-7 作为一种可能的临床诊断标志物,通常作为一种抑癌物质,在肿瘤中表达下调,let-7 的正常表达是可以产生抑制癌症的作用和效果^[7-8]。最新研究发现,由于 let-7 在心血管系统的多种细胞中,如血管平滑肌细胞、内皮细胞、心肌细胞、冠脉平滑肌细胞等均有表达,所以 let-7 在心血管系统疾病和心脏发

育中的作用十分重要,有研究表明,血浆中 let-7b 可能作为急性心肌缺血的生物标志物^[9]。以上的研究报告提示 let-7 可能在心脏的发育和心血管疾病的发生中参与了调控,但是目前未见有关 let-7e-5p 与先天性心脏病的研究报道。本研究首次发现,let-7e-5p 在 VSD 组血浆中呈低表达,下调到对照组的 27%,ROC 曲线分析 let-7e-5p 的诊断效能达到 0.767,敏感性为 91.9%,提示 let-7e-5p 在 VSD 的早期诊断中具有一定的临床意义。

miR-155 在已知的 miRNA 中,是与肿瘤关系最为密切的 miRNA^[10]。CALIN 等^[11]发现 miR-155 可作为一种 miRNA 标志物,同慢性淋巴细胞性白血病的预后和疾病进程相关。另外,KOENIG 等^[12]应用 miRNA 芯片检测稳定性冠心病患者血浆的 miRNA 表达谱,并进一步应用定量 PCR 检测患者血浆中 miRNA 的表达水平,结果显示炎症相关的 miRNA-155 在内皮细胞中明显降低,这为稳定性冠状动脉粥样硬化性心脏病的临床诊断提供了潜在的生物标志物。目前尚无关于先天性心血管病与 miR-155 表达的研究报道。在本研究中,首次发现 miR-155-5p 在 VSD 组血浆中表达下调。ROC 曲线下面积为 0.709,血浆 miR-155 诊断 VSD 具有较高的敏感性(71.0%)和特异性(72.6%)。血浆 miR-155-5p 可以作为 VSD 新的无创性诊断标志物。

miR-222 与 miR-221 具有高度的同源性,基因序列定位于 XPII3 大约在 1 kb 的区域内。miR-222 在血管生成、再构以及肿瘤转移过程中起着重要调控作用,是目前非常热门的一个 miRNA 分子。miR-222 与心血管系统的研究,大多集中在血管内皮细胞功能上,POLISENO 等^[13]通过芯片确认 27 个在人脐静脉内皮细胞高表达的 miRNA,发现其中 miR-222 能够抑制靶基因 c-kit 的表达从而抑制内皮细胞管腔形成和迁移。虽然未见有关 miR-222 与先天性心血管病的有关报道,但是本研究发现,miR-222 在 VSD 组血浆中表达降低。通过进一步绘制 ROC 曲线,结果显示,miR-222-3p 的曲线下面积最大,达到 0.832,表明这种 miRNA 对 VSD 的诊断具有较高的准确性,值得进一步探讨其临床诊断价值及其与 VSD 的致病机制。

另外,本研究首次报道 miR-433-3p 和 miR-487b-5p 在 VSD 组血浆中差异表达,这两个 miRNA 均未见国内外文献报道,其在 VSD 中的作用尚不清楚。miR-433-3p 和 miR-487b-5p 表达下调,与对照组比较均有差异,与 VSD 发病的机制不清,还有待进一步

研究。为了解以上所述 5 种血浆 miRNA 浓度变化是否为 VSD 直接导致,在接下来的研究中将选取已经手术治好的室间隔缺损患者,检测这 5 种血浆 miRNA 浓度,并计算 ROC 曲线下面积以及敏感性和特异性,进一步验证和明确 let-7e-5p、miR-155-5p、miR-222-3p、miR-433-3p 和 miR-487b-5p 作为辅助诊断 VSD 患者生物标志物的可行性及价值。

参 考 文 献:

- [1] 杨盼, 易岂建. 儿童先天性心脏病心肌损害机制研究进展 [J]. 儿科药学杂志, 2017, 23(9): 55-58.
- [2] CHEN X, BA Y, MA L, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases[J]. Cell research, 2008, 18(10): 997-1006.
- [3] SONG M Y, PAN K F, SU H J, et al. Identification of serum microRNAs as novel non-invasive biomarkers for early detection of gastric cancer[J]. PLoS One, 2012, 7(3): e33608.
- [4] KOMATSU S, ICHIKAWA D, TAKESHITA H, et al. Circulating microRNAs in plasma of patients with oesophageal squamous cell carcinoma[J]. British Journal of Cancer, 2011, 105(1): 104-111.
- [5] 余章斌, 韩树萍, 郭锡熔. 与心脏发育相关的 miRNA 研究 [J]. 医学分子生物学杂志, 2010, 7(1): 66-69.
- [6] 张程, 钟诗龙, 张智伟. 先天性心脏病继发性肺动脉高压患者血浆中 miRNA 的研究 [J]. 岭南心血管病杂志, 2014(4): 491-494.
- [7] BOYERINAS B, PARK S M, HAU A, et al. The role of let-7 in cell differentiation and cancer[J]. Endocr-Relat Cancer, 2010, 17(1): 19-36.
- [8] JOHNSON C D, ESQUELA-KERSCHER A, STEFANI G, et al. The let-7 microRNA represses cell proliferation pathways in human cells[J]. Cancer Research, 2007, 67(16): 7713-7722.
- [9] SHI G, CUI Q, ZHANG Y. MicroRNA set: a novel way to uncover the potential black box of chronic heart failure in MicroRNA microarray analysis[J]. Journal of Computer Science & Systems Biology, 2009, 2(4): 240.
- [10] TAM W, DAHLBERG J E. miR - 155/BIC as an oncogenic microRNA[J]. Genes, Chromosomes and Cancer, 2006, 45(2): 211-212.
- [11] CALIN G A, FERRACIN M, CIMMINO A, et al. A microRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia[J]. New England Journal of Medicine, 2005, 353(17): 1793-1801.
- [12] KOENIG W. High-sensitivity C-reactive protein and atherosclerotic disease: from improved risk prediction to risk-guided therapy[J]. International Journal of Cardiology, 2013, 168(6): 5126-5134.
- [13] POLISENO L, TUCCOLI A, MARIANI L, et al. MicroRNAs modulate the angiogenic properties of HUVECs[J]. Blood, 2006, 108(9): 3068-3071.

(张西倩 编辑)