

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2023.17.014
文章编号: 1005-8982 (2023) 17-0084-05

临床研究·论著

MicroRNA-29a与冠心病心绞痛患者血管内皮损伤及斑块不稳定性的相关性*

林红丽, 张雪菲, 彭慧, 黄倩倩, 张月辉

[青岛市中医医院(青岛市海慈医院) 干部保健科, 山东 青岛 266033]

摘要: **目的** 探讨microRNA-29a(miR-29a)与冠心病心绞痛患者血管内皮损伤及斑块不稳定性的相关性。**方法** 连续纳入2020年4月—2022年6月于青岛市中医医院住院的冠心病患者120例, 入院后均完善冠状动脉CT血管成像检查, 测定冠状动脉斑块CT值, 实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测外周静脉血循环miR-29a表达, 通过酶联免疫吸附试验检测血管内皮细胞特异性分子-1(ESM-1)、内皮素-1(ET-1)、一氧化氮(NO)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)及细胞间黏附分子-1(ICAM-1)水平, 根据miR-29a中位数(miR-29a=1.13)将患者分为高miR-29a组及低miR-29a组, 分析两组患者冠状动脉斑块稳定性、外周静脉血中血管内皮活性物质表达及炎症指标变化。**结果** 两组患者临床基本资料无差异, 具有可比性; 高miR-29a组的ESM-1、ET-1、NO、TNF- α 均高于低miR-29a组($P<0.05$); 斑块不稳定患者miR-29a水平高于斑块稳定患者($P<0.05$), 不稳定型心绞痛患者miR-29a水平高于稳定型心绞痛患者($P<0.05$); 软斑块患者miR-29a mRNA相对表达量高于纤维斑块和钙化斑块患者($P<0.05$); Pearson相关性分析结果显示, miR-29a与ET-1、TNF- α 及ESM-1呈正相关($r=0.471, 0.605$ 和 $0.328, P=0.000, 0.041$ 和 0.000), 与NO呈负相关($r=-0.291, P=0.034$)。**结论** miR-29a与冠心病心绞痛患者冠状动脉血管内皮损伤及斑块不稳定性具有相关性, miR-29a表达越高, 血管内皮损伤可能越严重, 斑块不稳定性风险越大。

关键词: 冠心病; microRNA-29a; 血管内皮损伤; 不稳定斑块

中图分类号: R541.4

文献标识码: A

Correlation between microRNA-29a and vascular endothelial damage and plaque instability in patients with coronary heart disease and angina pectoris*

Lin Hong-li, Zhang Xue-fei, Peng Hui, Huang Qian-qian, Zhang Yue-hui

[Department of Cadre Health, Qingdao Traditional Chinese Medicine Hospital (Qingdao Haici Hospital), Qingdao, Shandong 266033, China]

Abstract: Objective To investigate the correlation of microRNA-29a (miR-29a) with endothelial vascular injury and plaque properties in patients with coronary heart disease and angina pectoris. **Methods** A total of 120 patients with coronary heart disease who were admitted to the Department of Cardiovascular Medicine in our hospital from April 2020 to June 2022 were consecutively enrolled. After admission, coronary artery imaging examinations were completed, the CT values of coronary plaques were measured, and peripheral venous blood was drawn from the patients. Circulating miR-29a levels were detected by real-time fluorescent quantitative PCR, and endothelial cell-specific molecule-1 (ESM-1), endothelin-1 (ET-1), nitric oxide (NO), the levels of tumor necrosis

收稿日期: 2023-03-10

* 基金项目: 山东省自然科学基金青年项目(No:ZR2020QH237); 青岛市民生科技计划项目(No:14-2-3-23-nsh)

[通信作者] 张月辉, E-mail: 710000399@qq.com; Tel: 18563920866

factor- α (TNF- α) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1). According to the median of miR-29a (miR-29a = 1.13), patients were divided into high miR-29a group. In the low miR-29a group, the stability of coronary plaques, the expression of vascular endothelial active substances in peripheral blood and the changes of inflammatory indexes were analyzed. **Results** There was no significant difference in basic clinical data between the two groups, and they were comparable; ET-1, TNF- α , ESM-1 in the high miR-29a group were significantly higher than those in the low miR-29a group; comparison shows that the level of miR-29a in patients with unstable plaque is significantly higher than that in patients with stable plaque ($P < 0.05$), and the level of miR-29a in patients with unstable angina is significantly higher than that in stable plaque patients with angina pectoris ($P < 0.05$); patients with soft plaques had significantly higher levels of miR-29a than those with fibrous plaques and calcified plaques ($P < 0.05$); Pearson correlation analysis indicated that miR-29a was associated with ET-1 ($r = 0.471, P = 0.000$), TNF- α ($r = 0.605, P = 0.041$) and ESM-1 ($r = 0.328, P = 0.000$) were positively correlated, but negatively correlated with NO ($r = -0.291, P = 0.034$). **Conclusion** miR-29a was associated with coronary artery disease in patients with coronary heart disease vascular endothelial injury and plaque stability are correlated. The higher the level, the more severe the vascular endothelial injury and the greater the risk of plaque instability.

Keywords: coronary disease; microRNA-29a; vascular endothelial injury; unstable plaque

既往多项研究证实, microRNA-29a (miR-29a) 参与机体多系统疾病如肾小球病变^[1]、脓毒症^[2]、神经细胞凋亡^[3]等; 动物实验证实, 敲除 miR-29a 小鼠出现蛋白尿, 且肾小球损伤及肾脏纤维化程度加剧^[4]。临床数据表明, 早期脓毒症患者外周血中检出 miR-29a 表达明显上调, 是潜在的诊断脓毒血症的生物标志物, 可能也具有预测脓毒症患者临床预后的价值^[2]。随着研究的深入, 发现 miR-29a 参与冠心病发生、发展, 是临床诊断冠心病的有益生物学标志物, 与健康对照组相比, miR-29a 在冠心病患者中表达增加, 且参与冠心病病情进展, 影响患者心功能, 分析机制可能与 miR-29a 影响机体炎症反应有关^[4]。笔者回顾文献发现, miR-29a 对冠心病的影响可能与其参与冠状动脉粥样斑块的发生、发展有关。查晴等^[5]发现, 冠状动脉粥样斑块中 miR-16 的表达显著上调, 进一步的病理学机制研究发现, miR-16 促进血管内皮炎症反应, 加剧泡沫细胞凋亡。目前针对 miR-29a 与斑块稳定性及冠脉血管内皮损伤的相关性研究尚属空白, 阐明 miR-29a 参与上述病理过程的机制能够为临床治疗冠心病提供新的分子靶点。

1 资料与方法

1.1 研究对象

连续纳入 2020 年 4 月—2022 年 6 月于青岛市中医医院心血管内科门诊住院的冠心病患者 120 例。其中, 男性 68 例, 女性 52 例; 年龄 46~81 岁, 平均 (59.03 \pm 8.27) 岁。纳入标准: ①患者符合冠心病诊

断^[6]; ②首次诊断冠心病且自愿入组; ③稳定型心绞痛定义为特定劳力状态下导致胸闷和(或)胸痛等症; ④不稳定型心绞痛。排除标准: ①合并急性心肌梗死(包括急性 ST 段抬高型心肌梗死和非 ST 段抬高型心肌梗死); ②存在抗血小板、调脂等药物治疗禁忌证; ③合并其他系统恶性肿瘤、严重肝肾功能不全等不适宜入组疾病; ④既往接受过冠状动脉介入治疗; ⑤临床资料不完整; ⑥存在先天性心脏病、反复且难以控制的心力衰竭及其他累及心血管系统的疾病; ⑦虽有冠状动脉血管病变, 但平素无心绞痛等临床症状; ⑧妊娠或哺乳期妇女。所有患者自愿入组, 入组前获得充分知情同意, 并签署知情同意书。本研究经医院医学伦理委员会审查批准 (No: 20221014002)。

1.2 检测方法

1.2.1 样本收集 抽取受试者禁食 12 h 后外周静脉血, 3 000 r/min 离心 5 min, 收集上层血清用于实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 和酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), 同时抽取禁食 12 h 后静脉血用于检测血脂水平。

1.2.2 qRT-PCR 检测 miR-29a 表达 取冻存血清室温完全解冻后加入 TRIzol 试剂提取总 RNA, 通过紫外分光光度仪在波长 260 nm 处检测总 RNA 浓度和纯度合格^[4], 备用实验。应用 miScript Reverse Transcription Kit 逆转录试剂盒 (美国赛默飞世尔科技公司) 构建 cDNA 文库, 应用 TaqMan[®] Fast Advanced Master Mix 试剂盒 (美国赛默飞世尔科技公

司)进行qRT-PCR,配制总体积为20 μL 的反应体系:包括5 μL cDNA,10 μL Master Mix,正向引物和反应引物各1 μL (上海生工生物工程股份有限公司),3 μL RNA-free水。反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性10 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火1 min,共40个循环。以U6为内参基因。miR-29a正向引物:5'-CGCGGATCATGTTAAAGAGCC-3';反向引物:5'-CCCAAGCTTTCAGTATAACCATTC-3',引物长度23 bp;U6正向引物:5'-GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT-3';反向引物:5'-CGCTTCACGAATTTGCGTGTTCAT-3',引物长度25 bp。miR-29a mRNA相对表达量的计算方式为 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$,每个样本均重复检测3次,取平均值。

1.2.3 ELISA法检测内皮细胞特异性分子-1 (endothelial cell specific molecule-1, ESM-1)、内皮素-1 (endothelin-1, ET-1)、一氧化氮(nitric oxide, NO)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、细胞间黏附分子-1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) 取1.2.1中血清,采用ELISA法检测内皮细胞ESM-1、ET-1、NO、TNF- α 、ICAM-1^[7],检测试剂盒均购自上海西唐生物科技有限公司。

1.2.4 实验室检查 抽取受试者空腹静脉血约5 mL送检至本院中心实验室,检测低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(Triglycerides, TG)及血肌酐(serum creatinine, Scr)。

1.2.5 冠状动脉CT血管成像检查评估冠状动脉粥样硬化斑块性质 根据冠状动脉CT血管成像评价冠状动脉粥样硬化斑块的稳定性^[7],计算斑块CT值,其中CT值<60 HU为软斑块,60 HU \leq CT值<130 HU为纤维斑块,CT值 \geq 130 HU为钙化斑块。应用宝石能谱CT进行冠状动脉成像检查(德国西门子公司),扫描范围设定为主动脉弓肺动脉起始段至膈肌下1 cm。参数设置:管电压为120 kV,管电流为800 mA,螺距为0.5 mm,层厚0.625 mm,经肘正中静脉推注对比剂,注射速度3.5 mL/s;依据冠状动脉CT血管成像检查将冠状动脉粥样斑块分为稳定斑块(钙化斑块和硬斑块)及不稳定斑块(软斑块和混合斑块)^[8]。

1.3 分组

根据miR-29a mRNA中位数(miR-29a mRNA=

1.13)对患者进行分组,外周血miR-29a mRNA $>$ 1.13的患者归为高miR-29a组(59例),外周血miR-29a mRNA \leq 1.13的患者归为低miR-29a组(61例)。根据患者斑块性质,将患者分为软斑块(51例)、纤维斑块(37例)及钙化斑块(32例)。根据斑块稳定性,将患者分为斑块稳定组(82例)与斑块不稳定组(38例)。根据患者临床表现将患者分为稳定型心绞痛组(74例)与不稳定型心绞痛组(46例)。

1.4 统计学方法

数据分析均采用SPSS 25.0统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,比较用 t 检验或方差分析;计数资料以构成比或率(%)表示,比较用 χ^2 检验;相关性分析用Pearson法。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者临床资料及实验室指标比较

高miR-29a组与低miR-29a组的年龄、性别、高血压、糖尿病、高脂血症、LDL-C、HDL-C、TG、TC、Scr比较,经 t 检验或 χ^2 检验,差异均无统计学意义($P>0.05$)。高miR-29a组与低miR-29a组的NO、ET-1、ESM-1、TNF- α 及ICAM-1水平比较,经 t 检验或 χ^2 检验,差异均有统计学意义($P<0.05$),高miR-29a组的NO、ET-1、ESM-1、TNF- α 及ICAM-1水平高于低miR-29a组($P<0.05$)。见表1。

2.2 miR-29a与斑块稳定性、不稳定型心绞痛及斑块性质的关系

qRT-PCR结果显示,稳定斑块组与不稳定斑块组miR-29a mRNA相对表达量分别为(1.42 \pm 0.51)、(2.09 \pm 0.33),经 t 检验,差异有统计学意义($t=4.933, P=0.000$);不斑块稳定组外周血miR-29a mRNA相对表达量高于斑块稳定组。

qRT-PCR结果显示,不稳定型心绞痛组与稳定型心绞痛组miR-29a mRNA相对表达量分别为(2.27 \pm 0.41)、(1.58 \pm 0.36),经 t 检验,差异有统计学意义($t=5.656, P=0.000$);不稳定型心绞痛组外周血miR-29a mRNA相对表达量高于稳定型心绞痛组。

qRT-PCR结果显示,软斑块组、纤维斑块组、钙化斑块组的miR-29a mRNA相对表达量分别为(2.41 \pm 0.43)、(1.94 \pm 0.29)、(1.25 \pm 0.27),经方差分析,差异有统计学意义($F=4.053, P=0.000$)。软斑

表 1 两组患者临床资料及实验室指标的比较

组别	n	年龄/(岁, $\bar{x} \pm s$)	男/女/例	高血压 例(%)	糖尿病 例(%)	高脂血症 例(%)
高 miR-29a 组	59	57.42 ± 6.38	37/22	39(66.10)	18(30.51)	14(23.73)
低 miR-29a 组	61	58.05 ± 7.49	31/30	44(72.13)	23(37.70)	17(27.87)
t/χ ² 值		0.495	1.727	0.511	0.691	0.268
P 值		0.621	0.203	0.555	0.445	0.679

组别	NO/(mmol/mL, $\bar{x} \pm s$)	ET-1/(pg/mL, $\bar{x} \pm s$)	ESM-1/(ng/mL, $\bar{x} \pm s$)	TNF-α/(pg/mL, $\bar{x} \pm s$)	ICAM-1/(pg/mL, $\bar{x} \pm s$)
高 miR-29a 组	92.07 ± 10.26	69.26 ± 9.34	4.07 ± 1.53	3.96 ± 0.84	494.82 ± 94.55
低 miR-29a 组	75.46 ± 13.28	58.38 ± 7.91	2.45 ± 0.97	1.81 ± 0.59	325.71 ± 101.68
t/χ ² 值	7.649	6.894	6.951	16.269	9.429
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

组别	LDL-C/(mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	HDL-C/(mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	TG/(mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	TC/(mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	Scr/(μmol/L, $\bar{x} \pm s$)
高 miR-29a 组	2.98 ± 0.74	1.26 ± 0.49	1.84 ± 0.61	5.18 ± 1.37	81.54 ± 11.66
低 miR-29a 组	3.17 ± 0.93	1.31 ± 0.57	1.72 ± 0.59	4.95 ± 1.45	75.81 ± 14.25
t/χ ² 值	1.236	0.515	1.095	0.893	1.138
P 值	0.219	0.608	0.276	0.374	0.257

块组外周血 miR-29a mRNA 相对表达量高于纤维斑块组及钙化斑块组 ($P < 0.05$); 但纤维斑块组及钙化斑块组外周血 miR-29a mRNA 相对表达量比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.3 miR-29a 与冠状动脉血管内皮因子的相关性

Pearson 相关性分析结果提示, miR-29a 与 ET-1、TNF-α 及 ESM-1 呈正相关 ($r = 0.471$ 、 0.605 和 0.328 , $P = 0.000$ 、 0.041 和 0.000), 但与 NO 呈负相关 ($r = -0.291$, $P = 0.034$)。

3 讨论

血管内皮损伤是指内皮功能或正常形态受到损伤时出现功能障碍及变形, 导致机体炎症反应、血栓聚集、氧化应激及血管收缩等病理过程显著加强, 也是动脉粥样硬化的始动因素。持续的内皮细胞损伤最终导致动脉粥样硬化^[9-11], 因此探讨影响血管内皮损伤的机制有利于降低动脉粥样硬化类疾病的病程进展和恶性事件风险。孙定军等^[12]研究发现, miR-29a-3p 调控细胞凋亡等病理生理过程, 抑制 miR-29a-3p 降低了 ox-LDL 所致的血管内皮细胞氧化应激和凋亡, 以上结果提示临床通过靶向干预 miR-29a-3p 治疗动脉粥样硬化类疾病有理论基础支撑。本研究则从临床病例出发, 探讨了 miR-29a 在冠心病心绞痛患者中的表

达变化, 及其与血管内皮损伤程度、斑块稳定性、心绞痛发作情况的相关性, 为后续开展基因靶向治疗提供理论基础。

本研究结果显示, 高 miR-29a 组 ESM-1、ET-1、NO、TNF-α 均高于低 miR-29a 组; 且 miR-29a 与 ET-1、TNF-α 及 ESM-1 呈正相关, 与 NO 呈负相关。说明循环 miR-29a 水平可能是反应冠状动脉血管内皮损伤程度的指标, 提示 miR-29a 可能具备潜在的损伤冠脉血管内皮, 加剧病程进展的不利影响因素, 与既往研究结果一致^[13]。比较可知, 斑块不稳定患者 miR-29a 水平高于斑块稳定患者, 不稳定型心绞痛患者 miR-29a 水平高于稳定型心绞痛患者; 软斑块患者 miR-29a 水平高于纤维斑块及钙化斑块患者, 结果提示高水平 miR-29a 提示患者有更多的心血管事件风险, 能够帮助临床医师在诊治过程中识别高危患者, 积极给予综合干预措施, 降低不良心血管事件发生风险。

综上所述, miR-29a 与冠心病患者冠脉血管内皮损伤及斑块不稳定性具有相关性, miR-29a 表达越高, 血管内皮损伤可能越严重, 斑块不稳定性风险越大。后续笔者将开展相关研究探讨干预 miR-29a 对冠心病的影响, 为临床转化提供理论依据。

参 考 文 献 :

- [1] 李慧,王鑫,王向东,等. miR-29a 基因敲除对 C57BL/6 小鼠肾小球结构和功能的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2022, 38(5): 884-892.
- [2] 胡氏亮,贺婉晶,江锐,等. 外周血 miR-10a 和 miR-29a 水平对早期脓毒症急诊患者预后预测作用[J]. 内科急危重症杂志, 2022, 28(3): 211-214.
- [3] 吴琳,邱建维,黄灵芝. miR-29a 调控 Wnt/ β -catenin 信号改善癫痫大鼠学习记忆能力并减少神经细胞凋亡的机制[J]. 中国老年学杂志, 2022, 42(8): 1946-1950.
- [4] 孙玉敏,李绒. 冠心病患者血清 miR-21、miR-29a 表达水平与心电图 QRS 波时限相关性分析[J]. 陕西医学杂志, 2021, 50(6): 713-716.
- [5] 查晴,于晨溪,刘亚,等. miR-16 在冠状动脉粥样硬化斑块进展中的作用及初步机制研究[J]. 诊断学理论与实践, 2021, 20(1): 82-87.
- [6] 刘万车. 冠状动脉粥样硬化性心脏病的命名及诊断标准[J]. 中国社区医师, 1989(1): 11-13.
- [7] 李慧敏,苏振琪,谢伟,等. 血清 GGT 水平与冠心病患者斑块稳定性、血管内皮损伤及炎症应激反应的相关性分析[J]. 临床和实验医学杂志, 2021, 20(15): 1603-1607.
- [8] 高连辉,徐冰,宋微. 多层螺旋 CT 血管造影对冠状动脉粥样硬化斑块稳定性的诊断价值[J]. 河南医学研究, 2022, 31(16): 3028-3031.
- [9] 林艾雯,陈竹君. 动脉粥样硬化与内皮细胞损伤机制的研究进展[J]. 岭南心血管病杂志, 2015, 21(4): 580-582.
- [10] HERRERO-FERNANDEZ B, GOMEZ-BRIS R, SOMOVILLA-CRESPO B, et al. Immunobiology of atherosclerosis: a complex net of interactions[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(21): 5293.
- [11] 甄艳华,任海燕,郑加贺. 中性粒细胞/淋巴细胞比值在下肢动脉硬化闭塞症中的研究进展[J]. 中国现代医学杂志, 2021, 31(16): 48-52.
- [12] 孙定军,梁中书,邢波,等. LncRNA CRNDE 通过靶向 miR-29a-3p 对 ox-LDL 诱导的血管内皮细胞损伤的影响及其机制[J]. 中国老年学杂志, 2021, 41(20): 4477-4482.
- [13] LIU C Z, ZHONG Q, HUANG Y Q. Elevated plasma miR-29a levels are associated with increased carotid intima-media thickness in atherosclerosis patients[J]. Tohoku J Exp Med, 2017, 241(3): 183-188.

(张西倩 编辑)

本文引用格式: 林红丽,张雪菲,彭慧,等. MicroRNA-29a 与冠心病心绞痛患者血管内皮损伤及斑块不稳定性的相关性[J]. 中国现代医学杂志, 2023, 33(17): 84-88.

Cite this article as: LIN H L, ZHANG X F, PENG H, et al. Correlation between microRNA-29a and vascular endothelial damage and plaque instability in patients with coronary heart disease and angina pectoris[J]. China Journal of Modern Medicine, 2023, 33(17): 84-88.