

- 合心脑血管病杂志,2017,15(20):2583-2586.
- [4] MORISE A P. Assessment of estrogen status as a marker of prognosis in women with symptoms of suspected coronary artery disease presenting for stress testing [J]. *American Journal of Cardiology*, 2006, 97(3): 367-371.
- [5] IORGA A, CUNNINGHAM C M, MOAZENI S, et al. The protective role of estrogen and estrogen receptors in cardiovascular disease and the controversial use of estrogen therapy [J]. *Biology of Sex Differences*, 2017, 8(1): 33.
- [6] 李立健, 饶绍奇, 田镭钢, 等. BNP 或 NT-proBNP 对冠心病的临床意义 [J]. *海南医学*, 2017, 28(5): 784-787.
- [7] SARZANI R, SPANNELLA F, GIULIETTI F, et al. Cardiac natriuretic peptides, hypertension and cardiovascular risk [J]. *High Blood Pressure & Cardiovascular Prevention*, 2017, 24(2): 115-126.
- [8] CLERICO A, GIANNONI A, VITTORINI S, et al. Thirty years of the heart as an endocrine organ: physiological role and clinical utility of cardiac natriuretic hormones [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011, 301(1): H12-H20.
- [9] 吴凌凌, 陈艺莉, 黄艺仪, 等. 雌激素对小鼠心肌细胞脑钠肽表达的影响及机制 [J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2014, 35(4): 488-493.
- [10] LIN D Y, TSAI F J, TSAI C H, et al. Mechanisms governing the protective effect of 17 β -estradiol and estrogen receptors against cardiomyocyte injury [J]. *Bio Medicine*, 2011, 1(1): 21-28.

(收稿日期: 2018-07-30)

(本文编辑: 王雅洁)

miR-221 在病毒性心肌炎患儿外周血中的表达及其临床意义



孙健俊

摘要:目的 探究 miR-221 在病毒性心肌炎(viral myocarditis, VMC)患儿外周血中的表达及其临床意义。方法 收集 2015 年 7 月—2017 年 12 月我院收治的 VMC 患儿 67 例,将患儿分为轻型 VMC 组(37 例)与重型 VMC 组(30 例),收集同期 30 名于我院体检的健康儿童作为健康对照组。分别于 VMC 患儿的急性期和恢复期抽取患儿的静脉血,而健康对照组则一次性抽取静脉血。采用 Real-time PCR 检测研究对象血清中的 miR-221、电化学发光法测定血清肌钙蛋白 I(cardiac troponin I, cTnI)的水平,ELISA 法检测外周血肌酸激酶同工酶(creatinine kinase isoenzymes, CK-MB)的含量,并对 VMC 患儿血清 miR-221 水平与血清 cTnI、CK-MB 浓度的相关性进行分析。结果 VMC 患儿急性期与恢复期时外周血中的 miR-221 水平明显高于健康对照组($P < 0.05$),且重型 VMC 组患儿明显高于轻型 VMC 组患儿($P < 0.05$);在重型 VMC 患儿急性期与恢复期时外周血中的 cTnI 水平明显高于轻型 VMC 组患儿和健康对照组($P < 0.05$),而轻型 VMC 组患儿则与健康对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$);在重型 VMC 患儿急性期与恢复期时外周血中的 CK-MB 水平明显高于轻型 VMC 组患儿和健康对照组($P < 0.05$),而轻型 VMC 组患儿急性期时明显高于健康对照组($P < 0.05$),恢复期时则与健康对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。VMC 患儿外周血 miR-221 表达量与 cTnI、CK-MB 含量的相关性分析显示,VMC 患儿外周血 miR-221 表达量与 cTnI 和 CK-MB 均具有显著的相关性, r^2 分别为 -0.794 与 -0.871($P < 0.05$),而健康对照组则无明显相关性, r^2 分别为 0.022 与 0.027。结论 VMC 患儿外周血中的 miR-221 表达水平增高,且与患儿的心肌损伤程度有关,提示其在 VMC 患儿的疾病进程中发挥重要作用。

关键词:病毒性心肌炎;miR-221;肌钙蛋白 I;肌酸激酶同工酶;心肌损伤程度;急性期;恢复期

中图分类号: R542.2 R256.2 **文献标识码:** B **doi:** 10.12102/j.issn.1672-1349.2019.23.037

病毒性心肌炎(viral myocarditis, VMC)是一类心肌病毒感染所导致的常见心血管疾病,常见的可导致心肌感染的病毒主要有腺病毒(adenovirus, ADV)和柯萨奇 B 组病毒(coxsackievirus B, CVB)^[1-2]。近年来,急性 VMC 发病率逐年上升,VMC 也是儿科的常见疾病,已成为青少年猝死的主要原因之一,此外还可导

致扩张型心脏病的发生,导致心脏结构与功能出现异常,严重威胁着儿童的生命健康^[3]。迄今为止尚无有效的 VMC 治疗方法,其具体的发病机制尚不清楚,通常仅进行对症治疗,因此探究阐明 VMC 的发病机制具有重要的临床意义^[4]。微小 RNA(microRNAs, miRNAs)是一类内源性非编码 RNA,可以通过与靶 RNA 的非编码区结合而直接抑制蛋白翻译或降解靶 RNA^[5]。研究发现,miRNAs 在病毒性感染性疾病的进程中起着重要作用,miRNAs 可以调控宿主与病原体双方的基因表达调控^[6]。此外,miRNAs 在小鼠心血

作者单位 中国人民解放军第四五五医院(上海 200052),E-mail: vxjij9@163.com

引用信息 孙健俊.miR-221 在病毒性心肌炎患儿外周血中的表达及其临床意义[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2019, 17(23): 3787-3790.

管疾病模型以及临床病人的心脏中均有特异性表达,提示其表达可能与先天性心脏病的发生有关^[7]。miR-221在多种肿瘤中高表达而发挥癌基因的作用,是miR-221/222家族的成员,也有研究发现miR-221在心力衰竭病人血清中高表达,且miR-221的循环表达量在心肌梗死组织中异常高,提示它可作为心肌梗死早期诊断的标志物之一^[8-10]。因此,本研究对我院收治的67例VMC患儿进行研究,旨在探究miR-221在VMC患儿外周血中的表达及其临床意义。

1 资料与方法

1.1 临床资料 纳入标准:患儿符合2000年由中华医学会儿科学分会心血管学组制定的VMC临床诊断标准^[11];年龄4~12岁;无精神疾病,可以配合研究进行;研究对象与家属均了解本研究内容,自愿签署知情同意书。排除标准:患儿无心肌病、先天性心脏病等其他心脏疾病;近期无感染史;近期无腹泻史。根据纳入标准和排除标准收集2015年7月—2017年12月我院收治的VMC患儿67例,均符合2000年中华医学会儿科学分会心血管学组制定的VMC临床诊断标准^[11],根据超声心动图左心室射血分数(left ventricular ejection fractions, LVEF)及血清肌钙蛋白I(cTnI)结果,将心肌炎患儿分为轻型VMC组(37例)与重型VMC组(30例)两组,其中轻型VMC组LVEF>50%,cTnI<0.1 μg/L或正常;重型VMC组LVEF<50%,cTnI>0.2 μg/L或超出正常值。其中轻型VMC组男21例,女16例;年龄4~12(8.25±3.67)岁。重型VMC组患儿男19例,女11例,年龄4~11(8.61±4.11)岁。收集同期于我院体检的健康儿童30名作为健康对照组,男17例,女13例,年龄4~12(8.47±3.20)岁。3组间临床资料(性别、年龄)经比较差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。

1.2 治疗方法 所有患儿均需进行对症治疗、营养心肌、保护重要脏器、抗病毒等综合治疗方案,重型VMC组患儿需同时给予静脉输注大剂量丙种球蛋白(IVIG),总量2 g/kg,分2~5 d进行,以及连用3 d的甲基强松龙(MP),剂量为15 mg/kg。

1.3 研究方法

1.3.1 血液样本的采集 分别于患儿急性期和恢复期抽取静脉血,而健康对照组则进行一次抽取静脉血,收集静脉血3 mL置于EDTA防凝管内,于4℃采用离心机离心,3 000 r/min离心10 min,留取上清液(血清)分为3管,用于进一步检测。

1.3.2 Real-time PCR检测血清中miRNA-221表达水平 ①总RNA提取:取800 μL血清样本,采用RNA抽提试剂盒进行血清总RNA的提取,试剂盒购自美国Ambion公司,完全按照试剂盒说明书操作,最后溶于RNase-Free的水中,采用紫外分光光度计测定每个样本的总RNA的浓度和吸光度比值,当A260/A280在1.8~2.0为符合实验要求的RNA。②逆转录反应:将提取的2 μg总RNA进行逆转录反应,逆转录试剂盒购自美国Promega公司,按照说明书操作进行逆转录反应合成cDNA,反应体系20 μL:包括Random primer 0.5 μL,Random primer 0.5 μL,oligo(dT)0.5 μL、10 mmol/L dNTP 2 μL、RNase inhibitor 0.5 μL、5×buffer 4 μL M-MLV 0.5 μL,total RNA 1 μg,剩余用H₂O(RNase free)补齐,反应条件:16℃ 30 min合成杂合双链,42℃ 30 min水解RNA链,85℃ 5 min合成DNA双链。③Real-time PCR:采用ABI 7500定量PCR仪(购自美国ABI公司)进行Real-time PCR,试剂盒为购自上海吉玛公司的Hairpin-it miRNAs荧光定量PCR试剂盒,反应体系:cDNA产物2 μL、miR-221正、反向引物(5 μmol)各1 μL、Taq DNA聚合酶0.2 μL、dNTP(2.5 mmol)1 μL、2×Real-time PCR缓冲液10 μL,用H₂O(RNase free)补齐至20 μL。miR-221的上下游引物分别为5'-CCG CAG CTA CAT CTG GCT ACT G-3'和5'-GTG CAG GGT CCG AGG T-3'^[12]。反应条件:95℃ 10 min预变性,95℃ 15 s变性,60℃ 1 min退火,共40个循环。经3次重复试验后,采用2^{-ΔΔCt}法计算miR-221的相对表达量。

1.3.3 cTnI与肌酸激同工酶(CK-MB)的检测 ①cTnI的检测:采用电化学发光法进行检测,仪器为Roche-2010分析仪,检测仪器与试剂盒均购自罗氏公司,检测步骤完全按照说明书进行,正常参考值为:0~0.09 μg/L。②CK-MB的检测:采用ELISA法进行检测,仪器为AU5800全自动生化分析仪,检测仪器购自美国贝克曼库尔特公司,试剂盒购自美国R&D公司,检测完全按照说明书进行,正常参考值为:0~24 U/L。

1.4 统计学处理 数据均经SPSS 18.0软件分析处理。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两样本间的均数比较采用t检验,血清中miR-221分别与cTnI和CK-MB水平间的关系采用Pearson相关分析法。设 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 时差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 VMC患儿外周血miR-221、cTnI、CK-MB的表达

变化 在 VMC 患儿急性期与恢复期时外周血中的 miR-221 水平明显高于健康对照组 ($P < 0.05$), 且重型 VMC 组患儿急性期与恢复期时外周血中的 miR-221 水平明显高于轻型 VMC 组患儿 ($P < 0.05$)。在重型 VMC 患儿急性期与恢复期时外周血中的 cTnI 水平明显高于轻型 VMC 组患儿和健康对照组 ($P < 0.05$), 而轻型 VMC 组患儿急性期与恢复期时外周血

中的 cTnI 水平与健康对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。在重型 VMC 患儿急性期与恢复期时外周血中的 CK-MB 水平明显高于轻型 VMC 组患儿和健康对照组 ($P < 0.05$), 而轻型 VMC 组患儿急性期时外周血中的 CK-MB 水平明显高于健康对照组 ($P < 0.05$), 恢复期时外周血中的 CK-MB 水平与健康对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。详见表 1。

表 1 VMC 患儿外周血 miR-221、cTnI、CK-MB 的表达变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	时期	miR-221	cTnI($\mu\text{g/L}$)	CK-MB(U/L)
轻型 VMC 组	37	急性期	1.29±0.09 ¹⁾	0.05±0.03	49.51±11.72 ¹⁾
		恢复期	1.07±0.08 ¹⁾	0.04±0.02	22.08±10.05
		t 值	11.113	1.687	10.807
		P	0.000	0.096	0.000
重型 VMC 组	30	急性期	1.67±0.11 ¹⁾	0.58±0.23 ¹⁾	78.52±19.42 ¹⁾
		恢复期	1.28±0.09 ¹⁾	0.19±0.14 ¹⁾	30.21±10.34 ¹⁾
		t 值	15.030	7.933	12.067
		P	0.000	0.000	0.000
健康对照组	30		0.94±0.07	0.04±0.03	21.31±9.23
		t ₁ 值	15.557	13.896	7.554
		P ₁	0.000	0.000	0.000
		t ₂ 值	10.103	6.448	11.247
		P ₂	0.000	0.000	0.000

注: t₁ 值、P₁ 为重型 VMC 组与轻型 VMC 组的急性期相比; t₂ 值、P₂ 为重型 VMC 组与轻型 VMC 组的恢复期相比。与健康对照组相比, 1) $P < 0.01$

2.2 VMC 患儿外周血 miR-221 表达量与 cTnI、CK-MB 含量的相关性 对 VMC 患儿外周血 miR-221 表达量与 cTnI、CK-MB 含量进行 Spearman 相关性分析。结果显示, VMC 患儿外周血 miR-221 表达量与 cTnI 和 CK-MB 均具有显著的负相关性, r^2 分别为 -0.794、-0.871 ($P < 0.05$), 而健康对照组则无明显相关性, r^2 分别为 0.022、0.027。

3 讨论

VMC 患儿通常都存在病毒感染病史, 临床表现往往是由于其心肌炎症的部位及严重程度决定, 其中绝大多数的轻型患儿无明显临床症状, 而重型 VMC 则可表现为心力衰竭、扩张型心肌病, 甚至猝死等等^[3]。小儿 VMC 是小儿时期常见的心脏感染性疾病, 当病毒感染小儿心肌后会对心肌造成直接性损伤, 或通过激发自身免疫反应而引起心肌细胞的间质炎细胞纤维渗出

和浸润、心肌细胞坏死和变性等, 也可引起心包、心内膜和其他脏器的炎性病变^[12]。患儿的临床表现具有多变性、易变性和多样性等特点, 临床表现轻重不一^[1]。目前, 虽然引起 VMC 的病原体已非常明确, 但造成心肌损伤的具体机制仍不明确。

miRNA 自 1993 年被发现以来, 已逐渐被证实参与各种病理生理过程中, 成为研究的热点^[5]。近年来, 有研究报道显示 miRNA 也参与到了 VMC 的进程中, 并存在密切关系^[6]。研究发现, 在 CVB3 诱导的 VMC 小鼠心肌组织中进行 miRNA 微阵列技术检测, 筛选出 miR-126-5p、miR-199a、miR-29a、miR-146a 和 miR-210 等 22 个 miRNAs 的表达下调, 而 miR-320、miR-21、miR-23a 等 5 个 miRNAs 的表达上调^[13]。也有研究报道, miR-148a 与 miR-155 在急性 VMC 病人的心脏室间隔组织中表达明显增高, miR499 与 miR-208b

的水平也出现了明显升高,并且与心肌损伤存在正相关^[14-15]。这些结果均提示,miRNA在VMC的进程中发挥着重要的作用。miR-221作为一种癌基因在多种肿瘤组织中呈高表达,如甲状腺癌、乳腺癌、结直肠癌等,它位于X染色体的p11.3区,与miR-222组成一个集群^[8]。研究报道,miRNA-221/222在CVB3感染的VMC病人和C3H小鼠感染后7d,于心脏组织中出现高表达,而抑制miRNA-221/222可增加循环中的白细胞数量、病毒负荷,使心肌坏死程度加重^[16]。而也有研究报道,miR-221在心力衰竭心肌组织中呈高表达,并在心肌梗死组织中出现循环miR-221的高表达,提示循环miR-221是诊断早期心肌梗死的标志物^[9-10]。

为进一步探究VMC患儿外周血中miR-221的表达意义,本研究对我院收治的67例VMC患儿进行研究,结果显示,VMC患儿急性期与恢复期时外周血中的miR-221水平明显高于健康对照组($P < 0.05$),且重型VMC组患儿明显高于轻型VMC组患儿($P < 0.05$);在重型VMC患儿急性期与恢复期时外周血中的cTnl水平明显高于轻型VMC组患儿和健康对照组($P < 0.05$),而轻型VMC组患儿与健康对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$);在重型VMC患儿急性期与恢复期时外周血中的CK-MB水平明显高于轻型VMC组患儿和健康对照组($P < 0.05$),而轻型VMC组患儿急性期时明显高于健康对照组($P < 0.05$),恢复期时与健康对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。对VMC患儿外周血miR-221表达量与cTnl、CK-MB含量进行Spearman相关性分析,VMC患儿外周血miR-221表达量与cTnl和CK-MB均具有显著的负相关, r^2 分别为-0.794、-0.871($P < 0.01$),而健康对照组则无明显相关性, r^2 分别为0.022、0.027。

综上所述,VMC患儿外周血中的miR-221表达水平增高,且与患儿的心肌损伤程度有关,提示其在VMC患儿的疾病进程中发挥着重要作用。

参考文献:

- [1] WANG Y,WEI C X,SHAO L Q, *et al*. MiRNA signaling in viral myocarditis novel and unique pathological features[J].Acta Cardiol Sin,2018,34(1):77-86.
- [2] 彭宗生,孟宪文,王玥玲,等.小儿病毒性心肌炎肌钙蛋白T与肌钙蛋白I检测价值比较[J].河北医药,2010,32(8):956-957.
- [3] 马进爱.心肌损伤标志物联合检测对急性病毒性心肌炎的诊断价值探讨[J].临床医学研究与实践,2017,2(9):126-127.
- [4] 邵华.动态心电图与血清CK-MB诊断急性病毒性心肌炎的价值[J].中国妇幼保健,2017,32(13):3062-3064.
- [5] KUFFNER M,PAWLAK A,PRZYBYLSKI M.Viral infection of the heart:pathogenesis and diagnosis[J].Pol J Microbiol,2017,65 (4): 391-398.
- [6] CHEN Z G,LIU H,ZHANG J B, *et al* .Upregulated microRNA-214 enhances cardiac injury by targeting ITC during coxsackie virus infection[J].Mol Med Rep,2015,12(1):1258-1264.
- [7] 刘艳丽,伍伟锋.MiRNA-21和146b在病毒性心肌炎小鼠中的表达和意义[J].临床心血管病杂志,2014,30(2):114-116.
- [8] NOURAEI N,MOWLA S J.MiRNA therapeutics in cardiovascular diseases:promises and problems[J].Front Genet,2015,6:232.
- [9] COSKUNPINAR E,CAKMAK H A,KALKAN A K, *et al* .Circulating miR-221-3p as a novel marker for early prediction of acute myocardial infarction [J].Gene,2016,591(1):90-96.
- [10] SOUZA R W,FERNANDEZ G J,CUNHA J P, *et al* .Regulation of cardiac microRNAs induced by aerobic exercise training during heart failure [J].Am J Physiol Heart Circ Physiol,2015,309(10): H1629-H1641.
- [11] 中华医学会儿科学分会心血管学组.病毒性心肌炎诊断标准(修订草案)[J].中华儿科杂志,2000,38(2):75.
- [12] PU X X,HUANG G L,GUO H Q, *et al* .Circulating miR-221 directly amplified from plasma is a potential diagnostic and prognostic marker of colorectal cancer and is correlated with p53 expression[J].J Gastroenterol Hepatol,2010,25(10):1674-1680.
- [13] 何进,董春升,岳艳,等.CV B3诱导病毒性心肌炎小鼠模型中相关miRNA表达谱分析[J].现代免疫学,2013,33(1):12-17.
- [14] BAO J L,LIN L.MiR-155 and miR-148a reduce cardiac injury by inhibiting NF- κ B pathway during acute viral myocarditis[J].Eur Rev Med Pharmacol Sci,2014,18(16):2349-2356.
- [15] CORSTEN M F,DENNERT R,JOCHEMS S, *et al* .Circulating microRNA-208b and microRNA-499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease[J].Circ Cardiovasc Genet,2010,3(6):499-506.
- [16] MAARTEN C,WARD H,ANNA P P, *et al* .The microRNA-221/-222 cluster balances the antiviral and inflammatory response in viral myocarditis [J].Eur Heart J,2015,36(42):2909-2919.

(收稿日期:2018-04-04)

(本文编辑 王雅洁)