

外周血 microRNA-199a 水平与特发性肺动脉高压预后的相关性

宋玮 齐咏 陈卓昌

(河南省人民医院呼吸与危重症医学科, 河南 郑州 450000)

【摘要】目的 探讨外周血微小核糖核酸-199a(miRNA-199a)与特发性肺动脉高压(IPAH)预后的相关性。**方法** 选取2015年11月—2017年11月河南省人民医院收治的IPAH患者42例(IPAH组),另选取同期性别、年龄匹配的健康人40例(对照组)作为研究对象,采用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测两组外周血miRNA-199a表达水平;采用Pearson相关分析法对IPAH组miRNA-199a与心导管检查指标(肺动脉平均压、肺血管阻力和肺血管阻力指数)进行相关性分析;应用ROC曲线评价血浆miRNA-199a表达水平对IPAH患者预后的预测价值。**结果** IPAH组外周血miRNA-199a水平显著低于对照组($P<0.05$),差异有统计学意义;Pearson相关分析结果显示miRNA-199a表达水平与肺动脉平均压、肺血管阻力和肺血管阻力指数均呈显著负相关($r=-0.509, P<0.05$; $r=-0.637, P<0.05$; $r=-0.591, P<0.05$);ROC曲线分析结果显示,外周血miRNA-199a预测IPAH患者预后不良的最佳截断值为1.36,预测的AUC为0.834(95%CI 0.734~0.908),与AUC=0.5比较,差异有统计学意义($Z=6.430, P<0.001$)。**结论** IPAH患者外周血miRNA-199a表达水平明显下调,其对IPAH患者预后具有较好的预测价值。

【关键词】 特发性肺动脉高压;微小核糖核酸-199a;肺动脉血管阻力;预后

【DOI】 10.16806/j.cnki.issn.1004-3934.2021.08.021

Correlation of microRNA-199a Level in Peripheral Blood with Prognosis of Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension

SONG Wei, QI Yong, CHEN Zhuochang

(Department of Respiratory and Critical Diseases Medicine, Henan People's Hospital, Zhengzhou 450000, Henan, China)

【Abstract】 Objective To explore the correlation of serum microRNA-199a(miRNA-199a) with prognosis of idiopathic pulmonary arterial hypertension(IPAH). **Methods** 42 patients with IPAH(IPAH group) admitted to our hospital from November 2015 to November 2017 and contemporary 40 healthy people(control group) with matched gender and age were enrolled as research objects. The expression level of miRNA-199a in peripheral blood was detected by RT-PCR. Pearson correlation analysis was used to analyze the relationship between miRNA-199a and cardiac catheter examination indexes [mean pulmonary artery pressure (mPAP), pulmonary vascular resistance (PVR), pulmonary vascular resistance index (PVRi)] in IPAH group. The predictive value of plasma miRNA-199a in prognosis of IPAH patients was evaluated by ROC curves. **Results** miRNA-199a level in peripheral blood was obviously lower in IPAH group than control ($P<0.05$). Results of Pearson correlation analysis showed miRNA-199a level was negatively correlated with mPAP, PVR and PVRi ($r=-0.509, P<0.05$; $r=-0.637, P<0.05$; $r=-0.591, P<0.05$). ROC curve analysis showed the best cut-off value and AUC of miRNA-199a in peripheral blood for predicting poor prognosis of IPAH patients were 1.36 and 0.834 (95% CI 0.734~0.908) respectively. Differences were statistically significant compared with AUC = 0.5 ($Z = 6.430, P<0.001$). **Conclusion** The expression level of miRNA-199a in peripheral blood is significantly down-regulated in IPAH patients, which could be of good predictive value in prognosis of IPAH.

【Key words】 Idiopathic pulmonary arterial hypertension; microRNA-199a; Pulmonary artery vascular resistance; Prognosis

特发性肺动脉高压(idiopathic pulmonary arterial hypertension, IPAH)是肺动脉高压中的一种特殊类型,是以不明原因的肺小动脉管壁增殖性改变为主要病理特征,进而引起肺动脉血管阻力增加、血流受限并最终导致右心功能不全的临床综合征^[1-2]。一组基于

中国人的调查显示,IPAH患者经常规治疗后5年生存率为20.8%^[3]。目前临床上仍缺乏预测IPAH疾病严重程度和预后的特异性强的分子标志物。报道显示,微小核糖核酸(miRNA, miRNA)参与调节IPAH发展进程,可能成为IPAH防治的新的潜在标志物^[4]。

基金项目:2019年河南省医学科技攻关计划省部共建项目(YXKC2020005)

通信作者:齐咏, E-mail: rose20000@126.com

相关研究^[5]表明,miRNA-199a 在肺动脉平滑肌细胞(pulmonary arterial smooth muscle cells, PAMSCs)增殖调控中具有明确的作用。因此,本研究通过分析外周血 miRNA-199a 在 IPAH 患者中的表达水平,探讨其与 IPAH 预后的相关性,旨在为 IPAH 的预后预测寻找可靠的分子标志物。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取 2015 年 11 月—2017 年 11 月河南省人民医院收治的 42 例 IPAH 患者(IPAH 组)。纳入标准:(1)符合 IPAH 诊断标准,静息状态肺动脉平均压(mean pulmonary artery pressure, mPAP) ≥ 25 mm Hg (1 mm Hg=0.133 3 kPa),并排除其他病因;(2)年龄 ≥ 18 岁;(3)本研究取得患者知情同意并经医院伦理委员会通过。排除标准:(1)合并肿瘤、严重的肝肾疾病或全身代谢性疾病者;(2)有心肌梗死、脑梗死或脑梗死史者;(3)合并其他系统疾病导致无法配合完成心导管检查者。42 例 IPAH 患者中,女性 27 例,男性 15 例;年龄 21~64 岁[(36.64 \pm 6.20)岁]。另选取同期性别、年龄与 IPAH 组患者相匹配的健康体检者 40 例作为正常对照组。所有患者入院后采集空腹静脉血 5 mL,离心后分离血浆,并于 -80 °C 条件下保存。对 IPAH 患者随访观察 2 年,随访以电话及门诊方式进行,记录患者随访期内生存情况。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂和仪器

实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)于罗氏 cobas z480 全自动荧光定量 PCR 分析仪进行,miRNA 提取试剂盒由德国 Qiagen 生产。

1.2.2 miRNA 的提取

冷冻血浆标本融化后,将 1 mL 总提取液加入到 300 μ L 血清样本中,根据 miRNeasy 血浆提取试剂盒操作说明从血浆样本中提取总 RNA。

1.2.3 miRNA 逆转录及 RT-PCR 检测

以 U6 作为实验内参,逆转录反应体系:5 μ L RNA 模板,3 μ L U6 及 miRNA-199a 引物,0.15 μ L 100 mmol/L dNTPs,1.00 μ L 逆转录酶,1.5 μ L 10 \times 反转录缓冲液,0.19 μ L RNase 抑制剂,4.16 μ L 无菌三蒸水;逆转录反应条件:16 °C 30 min,42 °C 30 min,85 °C 5 min,4 °C 保存。扩增反应体系为 20 μ L:1.00 μ L TaqMan Small RNA Assay (20 \times) 溶液,10.00 μ L TaqMan[®] Universal PCR Master Mix II(2 \times)溶液,1.33 μ L cDNA,7.67 μ L 焦碳酸二乙酯(DEPC)处理水。扩增条件:95 °C 10 min 为一个循环,95 °C 15 s、60 °C 1 min 进行 40 个循环,重复 3 次。以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 miRNA-199a 的相对表达水平。

1.3 统计学处理

使用 SPSS 20.0 统计软件进行数据统计分析,以 $\bar{x}\pm s$ 表示计量资料,两组间比较使用独立样本 t 检验;计数资料采用率表示,行 χ^2 检验。应用 ROC 曲线评价外周血 miRNA-199a 预测 IPAH 患者预后的预测效能,曲线下面积(AUC)比较使用 Z 检验。所有检验均采用双侧检验,检验水平 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 两组一般资料及 IPAH 组心导管检查结果

两组性别、年龄和身体质量指数比较无显著差异($P>0.05$)。IPAH 组心导管检查结果详见表 1。

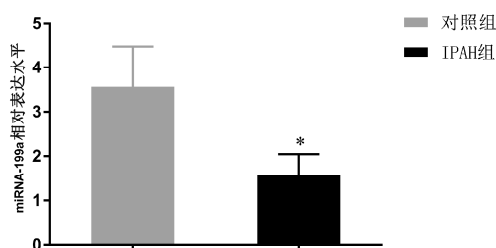
表 1 两组患者一般资料及 IPAH 组心导管检查结果

项目	IPAH 组 (n=42)	对照组 (n=40)	χ^2/t 值	P 值
性别(男/女)/例	15/27	16/24	0.160	0.689
年龄/岁	36.64 \pm 6.20	38.10 \pm 7.33	0.975	0.332
BMI/(kg \cdot m ²)	21.31 \pm 2.19	21.68 \pm 2.47	0.719	0.474
6MWD/m	357.24 \pm 33.15	—	—	—
mPAP/mm Hg	49.37 \pm 5.28	—	—	—
PVR/Wood	5.16 \pm 0.93	—	—	—
PVRi/(Wood \cdot m ²)	7.97 \pm 1.91	—	—	—

注: BMI: 身体质量指数; 6MWD: 6 分钟步行试验距离; PVR: 肺血管阻力; PVRi: 肺血管阻力指数; “—”表示无相关数据。

2.2 外周血 miRNA-199a 在 IPAH 组和对照组表达水平比较

IPAH 组外周血 miRNA-199a 水平显著低于对照组,差异有统计学意义($t=12.359, P<0.05$),见图 1。



注:与对照组比较,*表示 $P<0.05$ 。

图 1 外周血 miRNA-199a 在 IPAH 组和对照组表达比较

2.3 IPAH 患者外周血 miRNA-199a 表达水平与 mPAP、肺血管阻力和肺血管阻力指数相关性分析

采用 Pearson 相关分析 IPAH 患者外周血 miRNA-199a 表达水平与 mPAP、肺血管阻力(total pulmonary vascular resistance, PVR)和肺血管阻力指数(pulmonary vascular resistance index, PVRi)的相关性,结果显示外周血 miRNA-199a 表达水平与 mPAP、PVR 和 PVRi 均呈显著负相关($r=-0.509, P<0.05$; $r=-0.637, P<0.05$; $r=-0.591, P<0.05$)。见图 2。

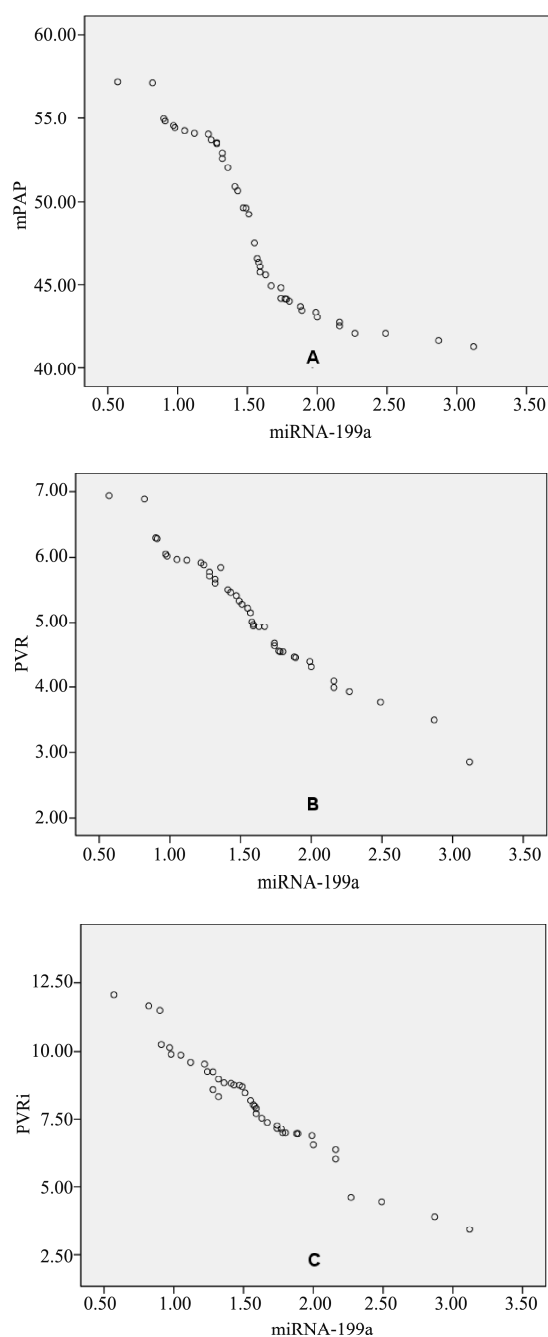


图2 IPAH患者外周血 miRNA-199a 表达水平与 mPAP、PVR 和 PVRi 的关系

2.4 外周血 miRNA-199a 表达水平与 IPAH 患者预后的关系

2.4.1 不同预后 IPAH 患者外周血 miRNA-199a 表达水平比较

截止随访时间,42 例 IPAH 患者均获得完整随访,其中 12 例 (28.57%) 因心功能不全死亡。据随访结局,将 IPAH 患者分为生存组与死亡组,死亡组外周血 miRNA-199a 表达水平显著低于生存组 ($P < 0.05$),见表 2。

表2 不同结局 IPAH 患者外周血 miRNA-199a 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	miRNA-199a
生存组	30	1.82 ± 0.52
死亡组	12	0.97 ± 0.31
<i>t</i>		5.276
<i>P</i>		<0.001

2.4.2 外周血 miRNA-199a 预测 IPAH 患者预后的 ROC 曲线分析

绘制外周血 miRNA-199a 预测 IPAH 患者预后的 ROC 曲线,取约登指数最大时对应的 miRNA-199a 水平作为最佳临界值,结果显示外周血 miRNA-199a 预测 IPAH 预后不良的最佳截断值为 1.36,预测的 AUC 为 0.834 (95% CI 0.734 ~ 0.908),与 AUC = 0.5 比较,差异有统计学意义 ($Z = 6.430, P < 0.05$)。见表 3 和图 3。

表3 外周血 miRNA-199a 预测 IPAH 患者预后的预测效能

指标	最佳截断值	AUC	SE	95% CI
miRNA-199a	1.36	0.834	0.052	0.734 ~ 0.908

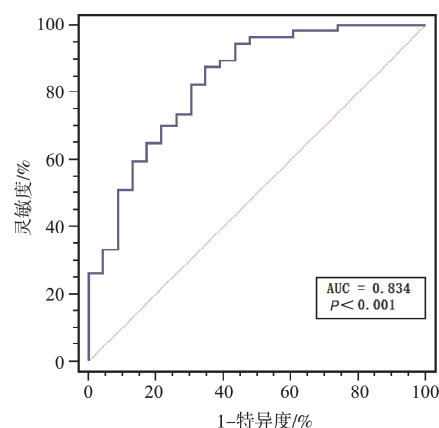


图3 外周血 miRNA-199a 预测 IPAH 患者预后的 ROC 曲线

3 讨论

近年来报道^[6]显示,循环血 miRNA 水平变化与众多疾病联系紧密,有潜力作为疾病早期诊断和预后评估的生物标志物。研究发现 miRNA 与肺动脉高压的疾病进程密切相关^[7-8]。此外,血液中的 miRNA 不易被降解,相关报道^[9]指出细胞中的 miRNA 能以微泡、外来体和凋亡小体等形式分泌入血,从而逃避血浆 RNA 消化酶对其进行消化降解,同时伴随着微量 miRNA 提取技术的快速进展,也使得血浆 miRNA 可能作为判断 IPAH 预后的潜在分子标志物。

报道指出,在肺动脉高压和癌症的致病机制中存在相似的细胞过度增殖和迁移的相关病理机制^[10-12]。研究^[13]显示,miRNA-199a 参与肿瘤疾病进程中的细胞增殖与迁移的调控,但目前 miRNA-199a 在 IPAH 中

的作用尚不完全清楚。本组病例中, IPAH 组 miRNA-199a 水平较正常对照组显著下调, 提示 miRNA-199a 可能与 IPAH 病程密切相关。右心导管检查是临床上 IPAH 诊断的“金标准”, 本研究中, IPAH 患者入院后右心导管检查均提示患者存在严重的血流动力学障碍, 表现为 mPAP、PVR 和 PVRi 等参数均异常升高。通过相关性分析, 笔者发现 miRNA-199a 水平与 mPAP、PVR 和 PVRi 呈显著负相关, 说明 miRNA-199a 与 IPAH 病情严重程度间存在着密切关联。Yang 等^[14]采用缺氧条件培养大鼠 PSMCs, 结果显示 miRNA-199a 表达水平在大鼠 PSMCs 中显著下调了约 85%, 通过过表达 miRNA-199a 可显著降低缺氧诱导的 PSMCs 增殖, 从而增加其凋亡; 而敲除 miRNA-199a 可增加 PSMCs 的增殖和减少其凋亡。结合 Yang 等^[14]研究, 笔者推测 IPAH 患者外周血 miRNA-199a 下调可能反映了 IPAH 患者 PSMCs 内 miRNA 的表达变化, 并通过相关信号通路调控 PSMCs 增殖和凋亡的形式参与 IPAH 疾病进程, 但具体的信号转导机制有待后续研究进一步明确。IPAH 好发于女性患者, 并且预后较差, 患者多因进行性的右心功能不全而致右心衰竭死亡。本研究中 IPAH 患者发病特征与以往报道^[15]的 IPAH 人口学特征相符, 另外通过分析外周血 miRNA-199a 表达水平与 IPAH 患者预后的关系发现, 低外周血 miRNA-199a 表达水平提示 IPAH 预后差。ROC 曲线分析显示, 外周血 miRNA-199a 预测 IPAH 预后不良的最佳截断值为 1.36, 预测的 AUC 为 0.834 (95% CI 0.734~0.908), 提示其对 IPAH 患者预后具有较好的预测价值。

综上所述, 本研究结果表明外周血 miRNA-199a 表达水平在 IPAH 患者明显下调, 其能较好地预测 IPAH 患者预后, 可能是 IPAH 预后预测的潜在分子标志物。

参 考 文 献

[1] Han B, Bu P, Meng X, et al. Microarray profiling of long non-coding RNAs

associated with idiopathic pulmonary arterial hypertension [J]. *Exp Ther Med*, 2017, 13(6):2657-2666.

- [2] Bernhard M, Peter J, Shahrokh T, et al. Lung transplantation for idiopathic pulmonary arterial hypertension on intraoperative and postoperatively prolonged extracorporeal membrane oxygenation provides optimally controlled reperfusion and excellent outcome [J]. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2018, 53(1):178-185.
- [3] He JG, Zeng WJ, Sun YJ, et al. The impact of pulmonary arterial hypertension-targeted therapy on survival in Chinese patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension [J]. *Pulm Circ*, 2012, 2(3):373-378.
- [4] Wu D, Talbot CC, Liu Q, et al. Identifying microRNAs targeting Wnt/ β -catenin pathway in end-stage idiopathic pulmonary arterial hypertension [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2016, 94(8):875-885.
- [5] Zeng J, Chen L, Chen B, et al. MicroRNA-199a-5p regulates the proliferation of pulmonary microvascular endothelial cells in hepatopulmonary syndrome [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 37(4):1289-1300.
- [6] Roy S, Soh JH, Ying JY. A microarray platform for detecting disease-specific circulating miRNA in human serum [J]. *Biosens Bioelectron*, 2016, 75:238-246.
- [7] Deng L, Blanco FJ, Stevens H, et al. Correction to: miR-143 activation regulates smooth muscle and endothelial cell crosstalk in pulmonary arterial hypertension [J]. *Circ Res*, 2017, 120(4):e6.
- [8] Yuan C, Xu M, Rong R, et al. miR-200c regulates endothelin-1 induced PSMCs abnormal proliferation and apoptosis [J]. *IUBMB Life*, 2017, 69(11):877-886.
- [9] Li L, Li S, Wu M, et al. Early diagnostic value of circulating microRNAs in patients with suspected acute myocardial infarction [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(8):13649-13658.
- [10] Falzone L, Scola L, Zanghi A, et al. Integrated analysis of colorectal cancer microRNA datasets: identification of microRNAs associated with tumor development [J]. *Aging (Albany NY)*, 2018, 10(5):1000-1014.
- [11] Kian R, Moradi S, Ghorbian S. Role of components of microRNA machinery in cancerogenesis [J]. *Exp Oncol*, 2018, 40(1):2-9.
- [12] Koshizuka K, Hanazawa T, Kikkawa N, et al. Regulation of ITGA3 by the anti-tumor miR-199 family inhibits cancer cell migration and invasion in head and neck cancer [J]. *Cancer Sci*, 2017, 108(8):1681-1692.
- [13] Kuninty PR, Bojmar L, Tjomsland V, et al. MicroRNA-199a and 214 as potential therapeutic targets in pancreatic stellate cells in pancreatic tumor [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(13):16396-16408.
- [14] Yang J, Wu XW, Li YL, et al. MicroRNA-199a regulates hypoxia-mediated pulmonary artery smooth muscle cell proliferation and migration by targeting ROCK1 [J]. *Chest*, 2015, 148(4):945A.
- [15] Ramjug S, Hussain N, Hurdman J, et al. Idiopathic and systemic sclerosis associated pulmonary arterial hypertension: a comparison of demographic, haemodynamic and magnetic resonance imaging characteristics and outcomes [J]. *Chest*, 2017, 152(1):92-102.

收稿日期:2021-02-26