

外周血单个核细胞中 circTCF25 表达水平在肺源性心脏病患者诊断及预后中的应用

王敏 袁博 张一凡 庞咪 潘金

(西安交大医学院附属市九院(西安市第九医院)心血管内科,陕西 西安 710054)

【摘要】目的 探讨外周血单个核细胞(PBMCs)中环状 RNA circTCF25 在肺源性心脏病(CP)患者诊断及预后评估中的应用价值。**方法** 选取 2016 年 11 月—2018 年 11 月西安市第九医院收治的 CP 患者 52 例(CP 组),另选取同期性别、年龄匹配的健康体检者 30 例(对照组)作为研究对象,采用实时荧光定量聚合酶链反应检测两组 PBMCs 中 circTCF25 表达水平;采用 Pearson 相关法对 CP 组 circTCF25 水平与动脉血氧分压(PaO_2)、脑钠肽(BNP)进行相关性分析;应用受试者操作特征(ROC)曲线评价 circTCF25 在 CP 诊断和预后评估中的应用价值。**结果** CP 组 PaO_2 水平显著低于对照组($P<0.05$),BNP 水平显著高于对照组($P<0.05$);CP 组 PBMCs 中 circTCF25 水平显著高于对照组($P<0.05$);Pearson 相关分析结果显示 circTCF25 表达水平与 PaO_2 呈显著负相关($r=0.633, P<0.05$),与 BNP 水平呈显著正相关($r=0.528, P<0.05$);ROC 曲线分析结果显示, circTCF25 诊断 CP 的最佳截值为 1.37, ROC 曲线下面积(AUC)为 0.834(95%CI 0.734~0.908);circTCF25 预测 CP 患者预后不良的最佳截值为 1.74, 预测的 AUC 为 0.722(95%CI 0.636~0.798)。**结论** PBMCs 中 circTCF25 表达水平在 CP 患者明显上调,其对 CP 诊断和预后评估具有较好的应用价值。

【关键词】 肺源性心脏病;环状 RNA;circTCF25;诊断;预后

【DOI】10.16806/j.cnki.issn.1004-3934.2021.10.022

Application of circTCF25 in Peripheral Blood Mononuclear Cells on Diagnosis and Prognosis Evaluation of Cor Pulmonale

WANG Min, YUAN Bo, ZHANG Yifan, PANG Mi, PAN Jin

(Department of Cardiology, Ninth Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University Medical College, Xi'an 710054, Shaanxi, China)

【Abstract】 Objective To explore the application value of circular RNA TCF25 (circTCF25) in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) on diagnosis and prognosis evaluation of cor pulmonale (CP). **Methods** 52 patients with CP (CP group) and 30 healthy controls (control group) with matched gender and age admitted to our hospital from November, 2016 to November, 2018 were enrolled as research objects. The expression level of circTCF25 in PBMCs was detected by RT-PCR. Correlations of circTCF25 with arterial oxygen partial pressure (PaO_2) and brain natriuretic peptide (BNP) in CP group were analyzed with Pearson correlation analysis. The application value of circTCF25 on diagnosis and prognosis evaluation of CP was determined by receiver operating characteristic (ROC) curve. **Results** Compared with control group, PaO_2 and BNP level in CP group were both decreased ($P<0.05$), and circTCF25 level in PBMCs was increased ($P<0.05$). Pearson correlation analysis showed circTCF25 level was negatively correlated with PaO_2 ($r=0.633, P<0.05$), and positively correlated with BNP level ($r=0.528, P<0.05$). ROC curves analysis showed the best cut-off value of circTCF25 for diagnosis with CP was 1.37, with the area under ROC curve (AUC) of 0.834 (95%CI 0.734~0.908). The best cut-off value and AUC of circTCF25 for predicting poor prognosis of CP were 1.74 and 0.722 (95%CI 0.636~0.798), respectively. **Conclusion** The expression level of circTCF25 in PBMCs is distinctly up-regulated in CP patients, which may be of good application value on diagnosis and prognosis evaluation for CP.

【Key words】 Cor pulmonale; Circular RNA; CircTCF25; Diagnosis; Prognosis

肺源性心脏病(cor pulmonale, CP)是由于慢性肺组织、肺血管病变引起肺血流受限、肺动脉压力增加,从而引起右心室肥厚、扩张,甚至右心功能衰竭^[1-2]。

近年来研究发现环状 RNA(circular RNA, circRNA)在心血管疾病的发生和发展中发挥重要作用^[3-4]。circRNA 可通过多种机制调控基因表达,其中最重要

基金项目:西安市科技计划项目(2019114813YX003SF036)

通信作者:潘金, E-mail: pj15829097088@163.com

机制之一是与微小 RNA (microRNA, miRNA) 竞争性结合, 充当“miRNA 海绵”, 从而调控 miRNA 的靶基因^[5-6]。既往研究^[7]指出 miRNA-103/107 在肺动脉高压血管重塑中发挥重要调控作用, 而肺动脉高压作为 CP 病理生理的中心环节, 笔者推测与 miRNA-103/107 保守结合的 circTCF25 可能与 CP 病程密切相关, 可能是 CP 的潜在分子标志物。基于此, 本研究通过检测 CP 患者和健康人外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) 中 circTCF25 的表达差异, 探讨其对 CP 诊断和预后预测的价值, 旨在为 CP 诊断和预后预测寻找可靠的分子标志物, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取 2016 年 11 月—2018 年 11 月西安市第九医院收治的 52 例慢性 CP 患者 (CP 组)。纳入标准: (1) 符合 1977 年中国肺源性心脏病专业会议制定的诊断标准; (2) 年龄 > 18 岁; (3) 本研究取得患者知情同意, 经医院伦理委员会审批通过。排除标准: (1) 合并肿瘤、严重的肝肾疾病或全身代谢性疾病患者; (2) 有心肌梗死、肺梗死或脑梗死史者; (3) 合并神经系统疾病者; (4) 糖尿病、先天性心脏病及其他心血管疾病等。52 例 CP 患者中, 女性 20 例, 男性 32 例; 年龄 41~74 (65.63±6.40) 岁; 原发疾病: 慢性阻塞性肺病 41 例, 特发性肺动脉高压 11 例。另选取同期性别、年龄与 CP 组患者相匹配的健康体检者 30 例作为正常对照组, 均排除糖尿病和各种心血管疾病等。两组入院后均完成动脉血氧分压 (PaO₂)、脑钠肽 (BNP)、平均肺动脉压 (mPAP) 及心脏超声检查; 对 CP 患者随访观察 1 年, 随访以电话及门诊方式进行, 记录患者随访期内预后情况。

1.2 方法

1.2.1 外周血分离 PBMCs

所有研究对象入院后抽取清晨空腹静脉血 5 mL, 离心后分离血浆, 加入淋巴细胞分离液 (达科为生物技术股份有限公司) 后, 使用梯度离心法提取 PBMCs, 加入 TRIzol 试剂 (美国 Invitrogen) 充分裂解后于 -80 °C 条件下保存。

1.2.2 circRNA 的提取及实时荧光定量聚合酶链反应检测

根据 TRIzol 试剂盒说明书步骤提取 PBMCs 总 RNA。提取的总 RNA 以逆转录试剂盒 (罗氏) 合成 cDNA, 以 GAPDH 为内参, 采用全自动荧光定量 PCR 分析仪 (罗氏 cobas z480) 进行实时荧光定量聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测 circTCF25 相对表达水平。扩增条件: 以 95 °C 30 s、95 °C 5 s、60 °C 30 s 顺序进行扩

增反应; 以 95 °C 15 s、60 °C 1 min、95 °C 15 s 顺序进行溶解反应。circTCF25 相对表达水平采用 $\Delta\Delta C_t$ 法由 GAPDH 标准化后得到。引物序列由广州吉赛生物有限公司合成, GAPDH-F: 5'GGGAACTGTGGCGTGAT; GAPDH-R: 5'GAGTGGGTGTCGCTGTTGA; circTCF25-F: 5'GATACAGCAGGCGCTCACCAT; circTCF25-R: 5'TCGGGTCTGCGGTAATCCA。

1.3 统计学处理

使用 SPSS 20.0 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 t 检验; 计数资料采用率表示, 采取 χ^2 检验; 采用 Pearson 相关分析法进行相关性分析; 应用受试者操作特征 (ROC) 曲线评价 circTCF25 对 CP 的诊断价值和 CP 患者预后的预测价值, ROC 曲线下面积 (AUC) 比较使用 Z 检验。所有检验均采取双侧检验, 检验水平 $\alpha = 0.05$, 以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组一般资料比较

两组性别、年龄、体质指数 (BMI) 比较无显著差异 ($P > 0.05$); CP 组 PaO₂ 显著低于对照组 ($P < 0.05$), BNP 水平显著高于对照组 ($P < 0.05$), 右室内径显著大于对照组 ($P < 0.05$), 详见表 1。

表 1 两组患者一般资料比较

项目	CP 组 (<i>n</i> = 52)	对照组 (<i>n</i> = 30)	χ^2/t 值	<i>P</i> 值
性别 (男/女)/例	32/20	19/11	0.026	0.872
年龄/岁	65.63±6.40	63.90±7.83	1.085	0.281
BMI/(kg·m ⁻²)	21.61±2.18	21.98±2.47	0.719	0.474
PaO ₂ /mm Hg	60.58±12.70	85.37±14.28	8.133	0.000
BNP/(pg·mL ⁻¹)	254.70±53.61	4.26±1.53	25.514	0.000
mPAP/mm Hg	47.61±3.50	—	—	—
右室内径/cm	26.72±3.54	20.41±4.17	7.280	<0.001

注: 1 mm Hg = 0.133 3 kPa; “—”表示无法获得。

2.2 circTCF25 在 CP 组和对照组 PMBCs 中的表达水平比较

CP 组 PMBCs 中 circTCF25 水平显著高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 2。

表 2 CP 组和对照组 circTCF25 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	circTCF25
CP 组	52	1.58±0.47
对照组	30	1.06±0.32
<i>t</i>		5.377
<i>P</i>		<0.001

2.3 CP 患者 PMBCs 中 circTCF25 水平与 PaO₂、BNP 的相关性分析

采用 Pearson 相关分析 CP 患者 circTCF25 表达水平与 PaO₂、BNP 的相关性,结果显示 circTCF25 表达水平与 PaO₂呈显著负相关($r=0.633, P<0.05$),与 BNP 水平呈显著正相关($r=0.528, P<0.05$)。

2.4 PMBCs 中 circTCF25 表达水平对 CP 的诊断价值

应用 ROC 曲线确定 circTCF25 诊断 CP 的最佳临界值,取约登指数最大时对应的 circTCF25 水平作为临界值,结果显示 circTCF25 诊断 CP 的最佳截值为 1.37,诊断的 AUC 为 0.834(95%CI 0.734~0.908),与 AUC=0.5 比较,差异有统计学意义($Z=9.219, P<0.001$)。见表 3、图 1。

表 3 PMBCs 中 circTCF25 诊断 CP 的诊断效能

指标	最佳截值	AUC	SE	95%CI
circTCF25	1.37	0.834	0.036	0.734~0.908

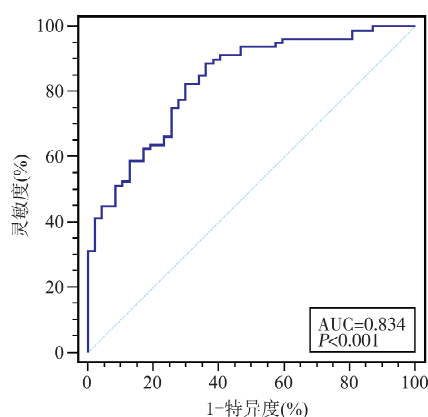


图 1 PMBCs 中 circTCF25 诊断 CP 的 ROC 曲线

2.5 PMBCs 中 circTCF25 表达水平与 CP 患者预后的关系

截止随访时间,52 例 CP 患者均获得完整随访,其中全因性死亡 8 例,占 15.38%。根据随访临床结局,将 CP 患者分为生存组与死亡组,死亡组 circTCF25 表达水平显著高于生存组($P<0.05$),见表 4。应用 ROC 曲线确定 circTCF25 预测 CP 患者预后不良的最佳临界值,取约登指数最大时对应的 circTCF25 水平作为临界值,结果显示外周血 circTCF25 预测 CP 患者预后不良的最佳截值为 1.74,预测的 AUC 为 0.722(95%CI 0.636~0.798),与 AUC=0.5 比较,差异有统计学意义($Z=4.708, P<0.001$)。见表 5、图 2。

3 讨论

随着高通量测序技术的成熟及应用, circRNA 被发现与多种人类疾病的发生和发展密切相关,其生物

学功能也被越来越多的研究所揭示。众多研究^[8-10]发现, circRNA 可通过充当 miRNA 海绵、竞争性结合 miRNA 与蛋白质结合形成复合体等方式调控基因表达。近来发现,一些循环血的 circRNA 表达变化与疾病具有密切的关系,可用作疾病早期诊断和预后评估的生物标志物^[11]。 circRNA 的分子结构形似封闭的圆环,无 5' 端帽子结构和 3' 端多腺苷酸尾部,因此难以被核酸外切酶降解^[12],也让 circRNA 作为诊断或预后评估的生物分子标志物成为可能。 circRNA 的结构特点为较好的稳定性和序列保守性,其与 miRNA 的相互作用在不同疾病中发挥相似的作用。如果某种 miRNA 参与 CP 疾病进程,则与其结合的 circRNA 同样可能与 CP 进程有关^[13]。既往研究^[7]发现 miRNA-103/107 在肺动脉高压血管重塑中发挥重要调控作用,而肺动脉高压作为 CP 病理生理的中心环节,因此与 miRNA-103/107 保守结合的 circTCF25 可能与 CP 病程密切相关。

表 4 不同结局 CP 患者 PMBCs 中 circTCF25 表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	circTCF25
生存组	44	1.52±0.41
死亡组	8	1.90±0.54
<i>t</i>		2.296
<i>P</i>		0.026

表 5 PMBCs 中 circTCF25 预测 CP 患者预后的预测效能

指标	最佳截值	AUC	SE	95%CI
circTCF25	1.74	0.722	0.047	0.636~0.798

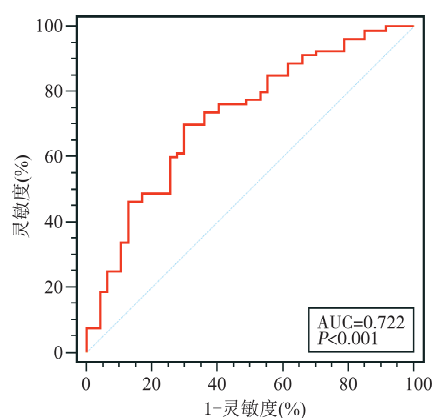


图 2 PMBCs 中 circTCF25 预测 CP 患者预后的 ROC 曲线

本研究检测了 circTCF25 在 CP 患者和健康人 PMBCs 中的表达水平,结果显示 circTCF25 表达水平在 CP 组较对照组明显上调,提示 circTCF25 可能与 CP 病程密切相关。 CP 患者晚期出现心肺功能衰竭时诊断相对容易,但早期诊断仍存在一定难度。肺动脉

高压是慢性 CP 的病理生理的中心环节,如能早期针对 CP 原发疾病进行干预,或有针对性的对肺动脉压进行控制,有可能逆转疾病进程或右心功能的进一步恶化。因此早诊断、早治疗对改善慢性 CP 患者预后,提升其生存质量临床意义重大。通过 ROC 曲线分析,笔者发现 circTCF25 对 CP 具有较好的诊断效能, AUC 为 0.834 (95% CI 0.734~0.908), 因此 circTCF25 可能是 CP 的潜在分子诊断物。

CP 患者右心功能受损,入院后行血气分析检查表现为 PaO₂ 值明显下降,而静脉血 BNP 水平显著升高,与既往报道^[14]相一致。通过 Pearson 相关性分析发现 circTCF25 表达水平与 PaO₂ 呈显著负相关,与 BNP 水平呈显著正相关,说明 circTCF25 与 CP 患者病情严重程度存在密切关联。Deng 等^[7]研究指出 miRNA-103/107 对肺动脉血管平滑肌增殖具有抑制性调节作用,在低氧诱导的肺动脉高压大鼠, mPAP 及右心室收缩压明显升高,右心室及肺血管重构,同时 miRNA-103/107 表达下调,这与本研究 circTCF25 表达上调的结果相一致,因此推测 circTCF25 可能通过“海绵机制”与 miRNA-103/107 结合,调控下游靶基因表达的形式参与 CP 病程,但这一机制及相关信号转导机制有待研究进一步明确。晚期 CP 患者多预后较差,患者多因右心衰竭致死^[15]。本研究通过比较不同临床结局患者 circTCF25 表达水平发现,死亡组 circTCF25 水平显著高于生存组,提示高 circTCF25 表达水平者预后差。通过 ROC 曲线进一步分析,确定 circTCF25 预测 CP 患者预后不良的 AUC 为 0.722 (95% CI 0.636~0.798),提示其对 CP 患者预后具有较好的预测价值。相信随着 circRNA 在 CP 发生、发展中的作用机制越来越明确,其作为 CP 分子标志物的应用价值也会越来越清晰。

综上所述,本研究结果表明 PBMCs 中 circTCF25 表达水平在 CP 患者明显上调,其对 CP 诊断和预后评估具有较好的应用价值,可能是 CP 早期诊断和预后预测的潜在分子标志物。本研究不足之处在于样本

数量较小,结果有待进一步大样本研究验证。

参 考 文 献

- [1] Lala A, Pinney SP. Recognizing pulmonary hypertension and right ventricular dysfunction in heart failure[J]. *Prog Cardiovasc Dis*, 2016, 58(4): 416-424.
- [2] Canepa M, Temporelli PL, Rossi A, et al. Prevalence and prognostic impact of chronic obstructive pulmonary disease in patients with chronic heart failure: data from the GISSI-HF trial[J]. *Cardiology*, 2017, 136(2): 128-137.
- [3] Li M, Ding W, Sun T, et al. Biogenesis of circular RNAs and their roles in cardiovascular development and pathology[J]. *FEBS J*, 2018, 285(2): 220-232.
- [4] Bayoumi AS, Aonuma T, Teoh JP, et al. Circular noncoding RNAs as potential therapies and circulating biomarkers for cardiovascular diseases [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2018, 39(7): 1100-1109.
- [5] Zhou MY, Yang JM, Xiong XD. The emerging landscape of circular RNAs in cardiovascular diseases[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2018, 122(1): 134-139.
- [6] Cheng X, Joe B. Circular RNAs in rat models of cardiovascular and renal diseases[J]. *Physiol Genomics*, 2017, 49(9): 484-490.
- [7] Deng B, Du J, Hu R, et al. MicroRNA-103/107 is involved in hypoxia-induced proliferation of pulmonary arterial smooth muscle cells by targeting HIF-1 β [J]. *Life Sci*, 2016, 147: 117-124.
- [8] Xie H, Ren X, Xin S, et al. Emerging roles of circRNA_001569 targeting miR-145 in the proliferation and invasion of colorectal cancer[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(18): 26680-26691.
- [9] Chen F, Feng Z, Zhu J, et al. Emerging roles of circRNA_NEK6 targeting miR-370-3p in the proliferation and invasion of thyroid cancer via Wnt signaling pathway[J]. *Cancer Biol Ther*, 2018, 19(12): 1139-1152.
- [10] Tan WL, Lim BT, Anene-Nzulu CG, et al. A landscape of circular RNA expression in the human heart[J]. *Cardiovasc Res*, 2017, 113(3): 298-309.
- [11] Shang X, Li G, Liu H, et al. Comprehensive circular RNA profiling reveals that hsa_circ_0005075, a new circular RNA biomarker, is involved in hepatocellular carcinoma development[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2016, 95(22): e3811.
- [12] Chen LL, Yang L. Regulation of circRNA biogenesis[J]. *RNA Biol*, 2015, 12(4): 381-388.
- [13] Zhong Z, Lv M, Chen J. Screening differential circular RNA expression profiles reveals the regulatory role of circTCF25-miR-103a-3p/miR-107-CDK6 pathway in bladder carcinoma[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 30919.
- [14] Roth TS, Aboulhosn JA. Pulmonary hypertension and congenital heart disease [J]. *Cardiol Clin*, 2016, 34(3): 391-400.
- [15] Andrea R, López-Giraldo A, Falces C, et al. Pulmonary function predicts mortality and hospitalizations in outpatients with heart failure and preserved ejection fraction[J]. *Respir Med*, 2017, 134(1): 124-129.

收稿日期: 2021-04-07