



[DOI] 10.3969/j.issn.1001-9057.2020.05.007

http://www.lcnkzz.com/CN/10.3969/j.issn.1001-9057.2020.05.007

· 论著 ·

血清微小 RNA-433 和转化生长因子- β_1 在扩张型心肌病合并慢性心力衰竭患者中的变化及临床意义

杜春书 王军 黄佩花 吴多省 陈梦飞

[摘要] 目的 探讨血清微小 RNA(miR)-433 和转化生长因子(TGF)- β_1 在扩张型心肌病(DCM)合并慢性心力衰竭(CHF)患者中的变化及临床意义。方法 纳入 DCM 合并 CHF 患者 106 例(DCM 合并 CHF 组),另选取 100 例健康体检者作为对照组,检测并比较两组受试者血清 miR-433 和 TGF- β_1 水平,分析其与纽约心脏病学会(NYHA)心功能分级、N 末端脑利钠前体(NT-proBNP)、左心室舒张末期内径(LVEDd)、左心室射血分数(LVEF)的相关性。采用多因素 logistic 回归分析评估血清 miR-433 和 TGF- β_1 对 DCM 合并 CHF 患者心功能损伤的影响。结果 DCM 合并 CHF 组患者血清 miR-433 和 TGF- β_1 水平均高于对照组($P < 0.05$)。Spearman 等级相关分析结果显示,DCM 合并 CHF 患者血清 miR-433 和 TGF- β_1 水平均与 NYHA 心功能分级呈正相关($P < 0.001$)。Pearson 相关分析结果显示,DCM 合并 CHF 患者血清 miR-433 和 TGF- β_1 水平均与 NT-proBNP、LVEDd 呈正相关,与 LVEF 呈负相关($P < 0.001$)。多因素 logistic 回归分析结果显示,血清 miR-433 和 TGF- β_1 均是 DCM 合并 CHF 患者心功能损伤加重的独立危险因素($P < 0.05$)。结论 DCM 合并 CHF 患者血清 miR-433 和 TGF- β_1 水平均升高,且均与 NYHA 心功能分级呈正相关,对于危险分层有一定的临床指导意义。

[关键词] 微小 RNA-433; 转化生长因子- β_1 ; 扩张型心肌病; 慢性心力衰竭

Changes and clinical value of serum microRNA-433 and transforming growth factor- β_1 in dilated cardiomyopathy patients with chronic heart failure Du Chunshu*, Wang Jun, Huang Peihua, Wu Duosheng, Chen Mengfei. * Department of Cardiology, Dongfang Hospital of Dongfang City, Dongfang 572600, China

[Abstract] **Objective** To explore the changes and clinical value of microRNA(miR)-433 and transforming growth factor(TGF)- β_1 in dilated cardiomyopathy(DCM) patients with chronic heart failure(CHF). **Methods** A total of 106 DCM patients with CHF(DCM with CHF group) were included and 100 healthy examiners were selected as control group. Serum miR-433 and TGF- β_1 levels were detected and compared. Relationship among serum miR-433, TGF- β_1 levels and New York Heart Disease Association(NYHA) cardiac function classification, N terminal pro-B type natriuretic peptide(NT-proBNP), left ventricular end-diastolic dimension(LVEDd) and left ventricular ejection fraction(LVEF) were analyzed. Multivariate logistic regression analysis was conducted to evaluate effect of serum miR-433 and TGF- β_1 on cardiac function injury in DCM patients with CHF. **Results** Serum miR-433 and TGF- β_1 levels in patients of DCM and CHF group were higher than those in control group($P < 0.05$). Results of Spearman rank correlation analysis showed that serum miR-433 and TGF- β_1 levels in DCM patients with CHF were both positively correlated with NYHA cardiac function classification($P < 0.001$). Results of Pearson correlation analysis showed that serum miR-433 and TGF- β_1 levels were both positively correlated with NT-proBNP, LVEDd, while they were both negatively correlated with LVEF($P < 0.001$). Results of multivariate logistic regression analysis showed that serum miR-433 and TGF- β_1 were independent risk factors for the aggravation of cardiac function in DCM patients with CHF($P < 0.05$). **Conclusion** Serum miR-433 and TGF- β_1 levels increase in DCM patients with CHF, and they are both positively correlated with NYHA cardiac function classification, which has certain clinical instructional significance for risk stratification.

[Key words] MicroRNA-433; Transforming growth factor- β_1 ; Dilated cardiomyopathy; Chronic heart failure

心力衰竭(简称心衰)是各种器质性心血管疾病的终末期阶段,血流负荷过重或由心肌梗死引起心脏重构是心衰的主要病理生理基础^[1]。既往研究证实,转化生长因子(TGF)- β_1 介导的信号通路自心肌代偿性肥大至心衰发生各阶段均发挥重要作用^[2]。近年来,随着分子生物学的研究进展,微小RNA(miRNA, miR)在心衰发生、发展过程中的作用越来越受到重视^[3]。Espinosa-Diez 等^[4]研究发现,miR-433 通过反馈性放大 TGF- β_1 /Smad3-Azin1 信号通路促进肾脏纤维化。我们通过分析扩张型心肌病(DCM)合并慢性心衰(CHF)患者血清 miR-433 和 TGF- β_1 水平变化及其与心功能的相关性,旨在为 miR-433 和 TGF- β_1 在心衰发生、发展中的作用机制研究提供理论依据。

对象与方法

1. 对象:2017 年 8 月~2019 年 2 月于海南省东方市东方医院和海南医学院第一附属医院心血管内科确诊并接受治疗的 DCM 合并 CHF 患者 106 例(DCM 合并 CHF 组),其中男 67 例,女 39 例,年龄 37~81 岁,平均年龄(62.1 ± 12.0)岁,纽约心脏病学会(NYHA)心功能 II 级 33 例,III 级 47 例,IV 级 26 例。同时选取 100 例健康体检者作为对照组,其中男 60 例,女 40 例,年龄 34~80 岁,平均年龄(60.3 ± 13.5)岁。纳入标准:(1)符合《中国心肌病诊断与治疗建议》^[5]关于 DCM 的诊断标准[心脏扩大:左心室舒张末期内径(LVEDd) $> 5.5\text{cm}$ (男性)或 $> 5.0\text{cm}$ (女性);左心室射血分数(LVEF) $< 45\%$];(2)符合欧洲心脏病学会关于 CHF 的诊断标准^[6];(3)NYHA 心功能分级 II~IV 级^[7];(4)有明确的基础心脏病史。排除缩窄性心肌炎、心包炎、家族性 DCM、自身免疫性疾病、慢性阻塞性肺疾病、严重肝肾功能不全、恶性肿瘤、急慢性感染、外伤及长期大量吸烟、饮酒、滥用药物者。本研究经海南省东方市东方医院和海南医学院第一附属医院医学伦理委员会审核批准,所有受试者均签署知情同意书。

2. 方法

(1)血清 miR-433 水平检测:采用实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测血清 miR-433 水平。抽取两组受试者空腹肘静脉血 2 ml,加入乙二胺四乙酸抗凝,离心取上清液,采用 Trizol and miRNeasy mini 试剂盒(德国 Qiagen 公司)提取总 RNA,并对其进行质检,若 $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ 为 1.8~2.1,则质检合格。采用 miScript II RT kit(50)(德国 Qiagen 公司)和 SYBR® Premix Ex TaqTM II(中国 TaKaRa 公司)进行逆转录反应。miR-433 茎环逆转录引物(上海生工生物工程

有限公司)序列为 5'-CGT GGT GAA CCT CCG TTT TAC CCG GTC TAA TGA GGA GGG CCC TAT GTC GAA TCC CCC GAT GGG -3';miR-433 扩增上游引物为 5'-GTA CGG GCA AAT AAC CCC CGA GTC GC-3',下游引物为 5'-CCT GCC GTA TGG GTA CGT GCC AT-3',以小分子 U6 作为内参,反应条件为:95℃ 10 min,95℃ 10 s,60℃ 15 s,72℃ 20 s 共 45 个循环。以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示 miR-433 相对表达水平。

(2)血清 TGF- β_1 水平检测:采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测两组受试者血清 TGF- β_1 水平,ELISA 试剂盒购于南京森贝伽生物科技有限公司。

(3)生化指标检测:采用 Cobas e411 全自动电化学发光免疫分析仪(瑞士罗氏)检测总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、糖化血红蛋白(HbA1c)、氨基末端 B 型钠尿肽前体(NT-proBNP)等。采用葡萄糖氧化酶法检测空腹血糖(FPG)和餐后 2 h 血糖(2 h PG)。

3. 统计学处理:应用 SPSS 19.0 软件进行统计分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 t 检验,多组间比较采用方差分析;不符合正态分布的计量资料以 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示,组间比较采用非参数检验;计数资料以例数和百分比表示,组间比较采用 χ^2 检验。相关性分析采用 Pearson 相关分析和 Spearman 等级相关分析。采用多因素 logistic 回归分析评估血清 miR-433 和 TGF- β_1 对 DCM 合并 CHF 患者心功能损伤的影响。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 两组受试者一般资料和临床资料比较:两组受试者性别、年龄、BMI、吸烟史、饮酒史及 FPG、2 h PG、HbA1c、TC、TG、HDL-C、LDL-C 水平比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$),而 DCM 合并 CHF 组患者血清 miR-433 和 TGF- β_1 水平均高于对照组($P < 0.05$)。见表 1。

2. DCM 合并 CHF 组患者血清 miR-433 与 TGF- β_1 水平的相关性分析:Pearson 相关分析结果显示,DCM 合并 CHF 组患者血清 miR-433 与 TGF- β_1 水平呈正相关($r = 0.302, P < 0.001$),见图 1。

3. 不同 NYHA 心功能分级的 DCM 合并 CHF 患者血清 miR-433、TGF- β_1 、NT-proBNP 水平及 LVEF、LVEDd 比较:NYHA 心功能 II 级、III 级、IV 级的 DCM 合并 CHF 患者血清 miR-433、TGF- β_1 、NT-proBNP 水平及 LVEF、LVEDd 比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$),且随着 NYHA 心功能分级的增加,其血清 miR-433、

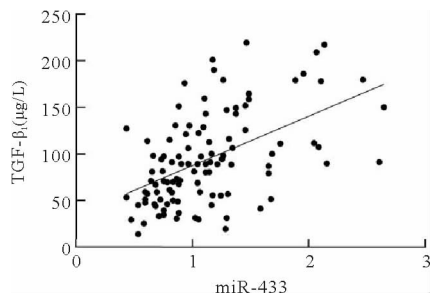


图1 DCM合并CHF组患者血清miR-433与TGF- β_1 水平的相关性分析

TGF- β_1 、NT-proBNP水平及LVEDd逐渐升高,LVEF逐渐降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表2。

4. DCM合并CHF患者血清miR-433和TGF- β_1 水平与心功能的相关性分析: Spearman等级相关分析结果显示,DCM合并CHF患者血清miR-433和TGF- β_1 水平均与NYHA心功能分级呈正相关($r_s = 0.576$ 、 0.473 , P 均 < 0.001)。Pearson相关分析结果显示,DCM合并CHF患者血清miR-433和TGF- β_1 水平均与NT-proBNP($r = 0.455$ 、 0.410 , P 均 < 0.001)、LVEDd($r = 0.388$ 、 0.372 , P 均 < 0.001)呈正相关;而血清

miR-433和TGF- β_1 水平与LVEF呈负相关($r = -0.420$ 、 -0.365 , P 均 < 0.001)。

5. DCM合并CHF患者血清miR-433和TGF- β_1 与心功能分级的关系:将NYHA心功能分级(Ⅲ~Ⅳ级)作为因变量,赋值为1,分别将血清miR-433和TGF- β_1 水平以连续变量纳入logistic回归方程,未校正混杂因素时,血清miR-433和TGF- β_1 均是DCM合并CHF患者NYHA心功能分级进展的影响因素($P < 0.05$);校正各项混杂因素后,血清miR-433和TGF- β_1 仍是DCM合并CHF患者心功能损伤加重的独立危险因素($P < 0.05$)。见表3。

讨 论

DCM以心室异常扩张、心室壁变薄、心肌纤维化等为主要病理表现。根据指南推荐,DCM的治疗原则为阻止或延缓心肌损伤进程^[8],因此,亟需针对心肌纤维化和心室重构的研究。Cho等^[9]的研究结果显示,TGF- β_1 可促进心肌成纤维细胞活化并向肌成纤维细胞分化,进而导致细胞外基质大量沉积。Chen等^[10]的研究结果显示,通过抑制大鼠TGF- β_1 基因表达后,

表1 两组受试者一般资料和临床资料比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	性别 (男/女)	年龄 (岁)	BMI (kg/m ²)	吸烟史 [例, (%)]	饮酒史 [例, (%)]	FPG (mmol/L)	2 h PG (mmol/L)
DCM合并CHF组	106	67/39	62.1 ± 12.0	23.54 ± 2.31	23(21.7)	29(27.36)	6.07 ± 1.34	8.12 ± 1.40
对照组	100	60/40	60.3 ± 13.5	23.12 ± 2.14	15(15.0)	34(34.0)	5.78 ± 0.95	7.85 ± 1.24
χ^2/t 值		0.190	0.997	1.334	1.625	0.842	1.766	1.444
P 值		0.663	0.320	0.184	0.202	0.359	0.079	0.150

组别	例数	HbA1c (%)	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDL-C (mmol/L)	LDL-C (mmol/L)	miR-433	TGF- β_1 (μg/L)
DCM合并CHF组	106	6.11 ± 0.98	4.81 ± 1.06	1.56 ± 0.67	1.47 ± 0.59	3.15 ± 0.76	1.32 ± 0.43	98.68 ± 50.03
对照组	100	5.89 ± 0.77	4.57 ± 0.84	1.43 ± 0.45	1.40 ± 0.46	2.99 ± 0.81	0.98 ± 0.27	65.72 ± 20.69
χ^2/t 值		1.765	1.775	1.611	0.936	1.441	6.750	6.113
P 值		0.079	0.078	0.109	0.351	0.151	<0.001	<0.001

表2 不同NYHA心功能分级的DCM合并CHF患者血清miR-433、TGF- β_1 、NT-proBNP水平及LVEF、LVEDd比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	miR-433	TGF- β_1 (μg/L)	NT-proBNP [pg/ml, $M(P_{25}, P_{75})$]	LVEF (%)	LVEDd (mm)
NYHA心功能Ⅱ级组	33	0.92 ± 0.33	75.89 ± 38.69	63.58(6.52, 685.74)	43.32 ± 3.29	54.91 ± 12.73
NYHA心功能Ⅲ级组	47	1.37 ± 0.48 ^a	103.19 ± 48.61 ^a	516.39(59.75, 1 981.26) ^a	39.67 ± 6.41 ^a	59.86 ± 10.78 ^a
NYHA心功能Ⅳ级组	26	1.74 ± 0.53 ^{ab}	121.36 ± 54.83 ^{ab}	1 345.62(177.84, 3 781.26) ^{ab}	34.87 ± 8.43 ^{ab}	67.83 ± 7.52 ^{ab}
F/u 值		22.720	6.528	129.46	9.781	10.053
P 值		<0.001	0.002	<0.001	<0.001	<0.001

注:与NYHA心功能Ⅱ级组比较,^a $P < 0.05$;与NYHA心功能Ⅲ级组比较,^b $P < 0.05$

表3 DCM合并CHF患者血清miR-433和TGF- β_1 与心功能分级关系的多因素logistic回归分析

指标	未校正模型		模型1		模型2	
	OR值(95%CI)	P 值	OR值(95%CI)	P 值	OR值(95%CI)	P 值
miR-433	6.86(3.07 ~ 14.95)	<0.001	4.75(3.10 ~ 7.40)	<0.001	1.93(1.44 ~ 4.18)	0.012
TGF- β_1	5.65(2.67 ~ 15.96)	<0.001	4.39(2.62 ~ 8.94)	<0.001	1.24(1.05 ~ 3.23)	0.032

注:模型1:校正了年龄、性别、BMI、吸烟史、饮酒史、FPG、2 h PG、TC、TG、LDL-C、HDL-C;模型2:在模型1基础上进一步校正了NT-proBNP、LVEF、LVEDd

心脏 TGF- β_1 水平明显降低,进而抑制其心室重构,延缓心衰的发生,因此推测 TGF- β_1 及其调控通路有望成为抗心肌纤维化治疗的重要靶点之一。但 Heldin 等^[11]却发现抑制 TGF- β_1 表达虽能抑制心肌纤维化,改善心肌细胞功能,但却加剧了左心室扩张和炎症反应,因此,TGF- β_1 在心衰不同的发展阶段可能发挥着不同作用,针对 TGF- β_1 的抑制剂用于心衰的治疗尚存在争议。

心脏中的 TGF- β_1 主要是由心脏成纤维细胞和肌成纤维细胞分泌,TGF- β_1 反过来又可促进成纤维细胞向肌成纤维细胞分化。既往有研究证实,在心肌细胞中转染特定的 miRNA 可改善或损伤心肌功能,影响心力衰竭的进程。李军等^[12]的研究结果显示,敲除小鼠 miR-1252 基因表达后,其心肌纤维化程度明显加重,同时 TGF- β_1 表达水平升高。而史晓婧等^[13]的研究证实,转染 miR-808 后,大鼠成纤维细胞 TGF- β_1 水平明显降低,进而改善心肌梗死后心肌纤维化的程度。miR-433 定位于 12 号染色体,在肿瘤领域中的研究较为深入。陶丽婵等^[14]通过建立 DCM 小鼠模型,发现其 miR-433 表达水平明显升高。Li 等^[15]发现 miR-433 在纤维化肾脏组织中的表达水平明显上调,随后证实 miR-433 可能通过促进 TGF- β_1 /Smad3 信号通路激活进而促进肾脏纤维化进程。

本研究结果显示,DCM 合并 CHF 患者血清 miR-433 水平高于对照组,且与 TGF- β_1 水平呈正相关。目前对于 CHF 的诊断和分层主要依据心脏超声、脑钠肽、NT-proBNP、心肌损伤标志物等,除此以外,近几年陆续发现了一些炎症类(如白细胞介素-6、肿瘤坏死因子- α)或代谢类(如胰岛素样生长因子结合蛋白-7)心肌功能生物标志物,但提供的信息均有限,尚未发现可反映心衰进展和心肌纤维化程度的标志物,因此,从 miRNA 水平探索新的标志物对于临床精准治疗具有重要价值。本研究中,随着 NYHA 心功能分级的增加,DCM 合并 CHF 患者血清 miR-433、TGF- β_1 、NT-proBNP 水平及 LVEDd 逐渐升高,LVEF 逐渐降低,提示 miR-433 在 DCM 合并 CHF 的发生及病情进展过程中发挥重要作用,且血清 miR-433 与 TGF- β_1 水平呈正相关,表明二者之间可能存在某种调控关系;同时血清 miR-433、TGF- β_1 水平均与 NT-proBNP、LVEDd、LVEF 密切相关,表明在 DCM 合并 CHF 患者中,miR-433 也可能参与心肌纤维化和心室重构;多因素 logistic 回归分析结果显示,校正各项混杂因素后,血清 miR-433 和 TGF- β_1 均为 DCM 合并 CHF 患者心功能损伤加重的独立危险

因素。

综上所述,DCM 合并 CHF 患者血清 miR-433 和 TGF- β_1 水平均高于正常对照者,且均与 NYHA 心功能分级呈正相关,同时 miR-433 和 TGF- β_1 也存在一定联系,但其具体机制尚未明确,血清 miR-433 和 TGF- β_1 是否可用于心衰的危险分层、作为潜在心衰的治疗靶点仍需进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] Nägele MP, Barthelmes J, Ludovici V, et al. Retinal microvascular dysfunction in heart failure[J]. Eur Heart J, 2018, 39(1): 47-56.
- [2] 张忠锋, 刘鹏, 原建华, 等. Apocynin 通过 TGF- β_1 /Smad 信号通路对脂多糖心肌纤维化小鼠的作用及其对 Col I $\alpha 1$ 、Col III $\alpha 1$ 的影响[J]. 中国循证心血管医学杂志, 2019, 12(2): 234-238.
- [3] Wang R, Fu T, You K, et al. Identification of a TGF- β -miR-195 positive feedback loop in hepatocytes and its deregulation in hepatoma cells[J]. FASEB J, 2018, 32(7): 3936-3945.
- [4] Espinosa-Diez C, Fierro-Fernández M, Sánchez-Gómez F, et al. Targeting of Gamma-Glutamyl-Cysteine Ligase by miR-433 Reduces Glutathione Biosynthesis and Promotes TGF- β -Dependent Fibrogenesis[J]. Antioxid Redox Signal, 2015, 23(14): 1092-105.
- [5] 中华医学会心血管病学分会, 中国心肌炎心肌病协作组. 中国扩张型心肌病诊断和治疗指南[J]. 临床心血管病杂志, 2018, 34(5): 421-434.
- [6] Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, et al. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC). Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC[J]. Eur J Heart Fail, 2016, 18(8): 891-975.
- [7] Bredy C, Ministeri M, Kempny A, et al. New York Heart Association (NYHA) classification in adults with congenital heart disease: relation to objective measures of exercise and outcome[J]. Eur Heart J Qual Care Clin Outcomes, 2018, 4(1): 51-58.
- [8] 梁峰, 沈珠军, 方全, 等. 2015 年欧洲心脏病学会关于心脏结构正常和炎症性心脏病患者室性心律失常治疗和心脏性猝死预防指南的解读[J]. 中国循证心血管医学杂志, 2016, 9(8): 900-903.
- [9] Cho N, Razipour SE, McCain ML. Featured Article: TGF- β_1 dominates extracellular matrix rigidity for inducing differentiation of human cardiac fibroblasts to myofibroblast[J]. Exp Biol Med (Maywood), 2018, 243(7): 601-612.
- [10] Chen Y, Li T, Gao Q, et al. MiR-1908 improves cardiac fibrosis after myocardial infarction by targeting TGF- β_1 [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(7): 2061-2069.
- [11] Heldin CH, Moustakas A. Signaling receptors for TGF-beta family member[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2016, 8(8): pii: a022053.
- [12] 李军, 章玲, 芦爱霞, 等. miR-1252 通过靶向调控 TGF- β_1 -PI3K/Akt 通路对高糖诱导的心肌纤维化的保护作用的机制[J]. 基因组学与应用生物学, 2019, 24(9): 4218-4223.
- [13] 史晓婧, 王延稳, 曹慧, 等. miR-808 通过调控 TGF- β_1 改善心肌梗死后心肌纤维化的机制[J]. 贵州医科大学学报, 2019, 43(7): 821-826.
- [14] 陶丽婵. miR-433 参与调控由病理性重构诱导的纤维化及其分子机制[D]. 南京: 南京医科大学, 2016.
- [15] Li R, Chung AC, Dong Y, et al. The microRNA miR-433 promotes renal fibrosis by amplifying the TGF- β /Smad3-Azin1 pathway[J]. Kidney Int, 2013, 84(6): 1129-1144.

(收稿日期: 2020-01-21)

(本文编辑: 周三凤)