

3. 癫痫组患者治疗情况:癫痫患者对有效药物的需求率最高(61/128,49.2%)。绝大多数(114/128,89.1%)患者在就诊过程中曾接受脑电图检查。在药物选择方面,大多数(120/128,93.8%)患者选择抗癫痫药物治疗。在用药依从性方面,多数(40/128,46.9%)患者用药无规律。在治疗效果方面,多数(76/128,59.3%)患者治疗效果一般,仅表现为发作次数减少。

讨 论

农村地区人口经济收入和医疗资源有限,受关注度较低。本研究基于农村人口调查发现,癫痫患者的 QOL 评分较正常人明显下降,且与性别、用药种类相关,与病程无明显相关性。癫痫相关指南认为,70%~80%的癫痫患者仅需要单药治疗即可控制病情,且其致畸性较联合用药少<sup>[3]</sup>,因而单药治疗较多药治疗可明显提高癫痫患者的 QOL。在性别方面,多项研究认为,成年男性患者的 QOL 高于女性<sup>[5-7]</sup>,与本研究结果一致。与男性癫痫患者比较,女性患者更易受药物影响、更倾向于采取退避、消极的应对方式是导致女性易出现焦虑及抑郁症状的原因;同时,女性对发病的担忧程度更高,以上因素均导致女性 QOL 降低。朱丹彤等<sup>[8]</sup>研究发现,病程 <1 年与 ≥1 年癫痫患者的 QOL 比较差异无统计学意义,与本研究结果一致。有研究结果显示,病程越长,癫痫患者 QOL 有升高趋势,可能是由于随着病程延长,患者在不断自我调节中,其心理素质得到提高<sup>[9]</sup>。

癫痫患者 QOL 的影响因素很多,包括疾病发作频率、药物有效率、检查项目、治疗方式、是否进行血药浓度监测及患者依从性测等。有研究证实,早期的药物治疗与社会心理学因素均可影响癫痫患者的预后和生活质量<sup>[10-11]</sup>。提示临床医生应在常见影响因素(包括年龄、心理因素、社会认知功能、治疗需求、过去治疗情况等)基础上对患者进行个体评估,再辅以合理药物治疗、血药浓度监测、手术等有效手段控制癫痫发作,后期从生理、

心理、社会 3 个方面进行规范化护理,进而提高癫痫患者 QOL。

本研究有一定的局限性,如未对儿童患者 QOL 状况以及其他社会心理因素与 QOL 的相关性进行探讨。河南省农村地区癫痫患者多为低收入人群,今后我们应该进一步给予其更多经济支持和人文关怀,提高癫痫患者的 QOL。

参 考 文 献

[1] 洪震. 癫痫病学研究热点[J]. 中华神经科杂志,2017,50(4):245-249.  
 [2] 丁晶,汪昕. 癫痫诊疗指南解读[J]. 临床内科杂志,2016,33(2):142-144.  
 [3] 临床诊疗指南-癫痫病学分册[M]. 北京:人民卫生出版社,2007.45-61.  
 [4] 王海燕,杜晓莉,文雯,等. 癫痫患者焦虑抑郁负性情绪对患者心境、社会交往及生活质量的影响[J]. 国际精神病学杂志,2015,42(5):128-131.  
 [5] 李晓裔,邵西仓,吴云,等. 女性癫痫患者焦虑、抑郁和失眠发病率及相关因素分析[J]. 临床神经病学杂志,2018,31(1):1-5.  
 [6] Elliott JO, Mares AS. Gender differences in quality of life among Canadian adults with epilepsy[J]. Epilepsy Res,2012,100(1-2):42-48.  
 [7] Grant AC, Prus N, Nakhutina L. Factors affecting quality of life in epilepsy in a multi-ethnic urban population[J]. Epilepsy Behav,2013,27(2):283-285.  
 [8] 朱丹彤,肖波,谢光洁,等. 成年癫痫病人的生活质量及其影响因素[J]. 中华神经科杂志,2002,35(3):139-141.  
 [9] 陈雅瑜,肖波,龙莉莉. 癫痫患者生活质量及影响因素的研究进展[J]. 癫痫杂志,2017,3(6):497-501.  
 [10] 夏露,欧舒春,李蓉,等. 新诊断癫痫患者早期药物治疗反应与长期预后的研究[J]. 临床内科杂志,2018,35(7):464-466.  
 [11] Thijs RD, Surges R, O'Brien TJ, et al. Epilepsy in adults[J]. Lancet, 2019,393(10172):689-701.

(收稿日期:2019-04-22)

(本文编辑:张一冰)



[DOI]10.3969/j.issn.1001-9057.2020.05.018

http://www.lcnkzz.com/CN/10.3969/j.issn.1001-9057.2020.05.018

· 论著摘要 ·

2 型糖尿病合并冠心病患者微小 RNA-30a 和几丁质酶-3 样蛋白-1 水平变化及其与冠状动脉病变的相关性

秦少华 王新舜 杜玉祥 曹宝国

[关键词] 2 型糖尿病; 冠心病; 冠状动脉病变; 微小 RNA-30a; 几丁质酶-3 样蛋白-1

糖尿病是冠心病(CAD)的等危症,二者彼此独立又相互联系。2018 年美国糖尿病协会发布的指南<sup>[1]</sup>推荐,对于糖尿病合并无症状 CAD 患者,在有效控制心血管疾病危险因素的前提下,A 级证据并不推荐将冠状动脉(简称冠脉)检查用于糖尿病患者筛查 CAD。慢性炎症反应是糖尿病和 CAD 共同的病理基础。Li 等<sup>[2]</sup>发现炎症因子可刺激血管壁局部活化的特定颗粒

细胞大量分泌几丁质酶-3 样蛋白-1(YKL-40),通过促进血管内皮细胞的粘附、趋化、迁移等损伤血管内皮功能及细胞外基质重建,从而参与动脉粥样硬化斑块的形成和进展。既往研究结果显示,微小 RNA(miRNA,miR)-30a 参与炎症反应和内皮细胞凋亡过程<sup>[3-4]</sup>。由此可见,miR-30a 和 YKL-40 均与慢性炎症反应相关。我们通过探讨血清 miR-30a 和 YKL-40 在糖尿病合并 CAD 患者中的表达情况及其在冠脉病变过程中的作用,旨在为评估糖尿病合并 CAD 患者冠脉病变严重程度提供辅助参考依据。

**对象与方法**

1. 对象:2018 年 1 月~12 月因不明原因胸痛于我院行冠脉造影(CAG)的 2 型糖尿病(T2DM)患者 116 例,其中男 77 例,女 39 例,年龄 37~83 岁,平均年龄(65.34 ± 10.87)岁,85 例确诊为 CAD(T2DM 合并 CAD 组),31 例为单纯 T2DM 患者(单纯 T2DM 组)。排除标准:(1)1 型糖尿病、妊娠期糖尿病、继发性糖尿病、糖尿病急性并发症;(2)合并先天性心脏病、心肌炎、急/慢性感染、心肌梗死、严重肝肾功能不全、恶性肿瘤;(3)曾接受静脉溶栓、介入治疗、搭桥手术。选取同期因胸痛行 CAG 及常规检查结果均正常,且糖耐量试验正常者 30 例作为对照组,其中男 19 例,女 11 例,年龄 34~82 岁,平均年龄为(66.78 ± 12.03)岁。本研究经我院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)CAG:由两位副主任医师以上级别的介入专家根据 Judkin's 法依次进行右侧和左侧冠脉造影,采用 CRSPC 图像处理系统定量分析冠状动脉病变支数和狭窄程度。Gensini 评分为 0~30 分为冠脉轻度病变,31~60 分为冠脉中度病变,>60 分为冠脉重度病变。

(2)血液样本采集及常规实验室检查:3 组受试者均于入院次日清晨采集空腹外周静脉血 5 ml,37℃ 静置 30 min,1 000 r/min 离心 5 min,离心半径为 10 cm,取上清液,置于 -80℃ 冰箱保存用于提取血清总 RNA。同时采集外周静脉血 3 ml,置于乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝管中,2 h 内送检生化指标,包括甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)等。同时 3 组受试者均行口服葡萄糖耐量试验(OGTT)。

(3)血清 miR-30a 水平检测:采用 Trizol 试剂提取血清总 RNA。采用凝胶电泳和分光光度法检测 RNA 纯度和浓度。取 1 μg RNA,加入逆转录茎环引物和 M-MLV 逆转录酶进行逆转录反应。将 cDNA 保存于 -20℃ 冰箱备用。按照 3 步法进行实时定量聚合酶链反应。以组织 cDNA 为模板,小分子 U6 为内参,加入 TaqDNA 聚合酶、引物、SYBR Green I Msater 配制 20 μl 反应体系,95℃ 30 s 预变性,95℃ 变性 5 s,60℃ 退火 30 s,循环 42 次,72℃ 延伸 30 s。miR-30a 引物序列:上游引物:5'-TGG

CCT TGT ACC GAT TGC TG-3';下游引物:5'-GCT GCT CTT CCT TTC CTG TGT TG-3');U6 引物:上游引物:5'-AAC TGT GCC AAC CAG TCC AA-3';下游引物:5'-TCT TCT CAA ATG CCC TTT CAT CA-3')。收集荧光信号,以 2<sup>-ΔΔCt</sup> 表示 miR-30a 相对表达水平。

(4)血清 YKL-40 水平检测:采用人酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(上海江莱生物科技有限公司)检测血清 YKL-40 水平。

(5)双荧光素酶报告基因检测 miR-30a 和 YKL-40 的靶向关系:通过在线生物学信息数据库(www.microrna.org)预测 miR-30a 的靶基因,采用 XbaI 和 FseI(10 U/μl)对 pGL3.0 荧光素酶报告载体进行双酶切,在 T4 DNA 连接酶作用下,将设计好的 miR-30a mimics 序列连接至 pGL3.0 载体上,并进行扩增。利用基因突变技术将结合位点序列进行突变,构建 YKL-40 突变质粒。用 YKL-40 野生质粒、突变质粒分别与 miR-30a mimics 共转染细胞,后续操作按照试剂盒说明书进行,采用 Promega GloMax™ 20/20 发光检测仪检测荧光素酶活性。双荧光素酶报告基因检测试剂盒购于美国 Sigma 公司。

3. 统计学处理:应用 SPSS 17.0 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,多组间比较采用方差分析,两两比较采用 LSD-t 检验;计数资料以例数和百分比表示,组间比较采用  $\chi^2$  检验。相关性分析采用 Pearson 相关性分析。采用受试者工作特征(ROC)曲线评估血清 miR-30a 和 YKL-40 诊断 T2DM 患者合并 CAD 的价值。以 P<0.05 为差异有统计学意义。

**结 果**

1.3 组受试者一般资料和临床资料比较:3 组受试者性别、年龄、BMI、吸烟史、血脂、血压比较差异均无统计学意义(P>0.05)。3 组受试者空腹血糖(FPG)、OGTT 2 h 血糖(2h PG)、糖化血红蛋白(HbA1c)、血清 miR-30 及 YKL-40 水平比较,差异均有统计学意义(P<0.05),其中单纯 T2DM 组和 T2DM 合并 CAD 组患者 FPG、2h PG、HbA1c 及血清 YKL-40 水平均高于对照组,血清 miR-30a 水平低于对照组(P<0.05);且 T2DM 合并 CAD 组患者血清 miR-30a 水平低于单纯 T2DM 组,血清 YKL-40 水平高于单纯 T2DM 组(P<0.05)。见表 1。

2. 双荧光素酶报告基因检测结果:图 1 显示的是 miR-30a 序列与 YKL-40 的互补结构域。将野生型 YKL-40 3'-UTR 的基

**表 1** 3 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 <sup>2</sup> )	吸烟史 [例,(%)]	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)	LDL-C (mmol/L)	HDL-C (mmol/L)
对照组	30	19/11	66.78 ± 12.03	23.01 ± 2.62	7(23.33)	3.94 ± 0.78	1.28 ± 0.26	2.22 ± 0.83	1.21 ± 0.18
单纯 T2DM 组	31	17/14	64.83 ± 11.79	23.43 ± 3.04	6(19.35)	4.15 ± 0.91	1.35 ± 0.41	2.48 ± 0.76	1.18 ± 0.23
T2DM 合并 CAD 组	85	60/25	66.49 ± 11.25	22.89 ± 2.95	25(29.41)	4.23 ± 1.02	1.36 ± 0.38	2.51 ± 0.96	1.14 ± 0.26
$\chi^2/F$ 值		2.600	0.281	0.393	1.336	1.027	0.541	1.194	1.047
P 值		0.273	0.753	0.676	0.513	0.361	0.583	0.306	0.354

组别	例数	收缩压 (mmHg)	舒张压 (mmHg)	FPG (mmol/L)	2h PG (mmol/L)	HbA1c (%)	miR-30a	YKL-40 (ng/ml)
对照组	30	124.73 ± 14.41	95.64 ± 8.71	5.02 ± 0.79	7.81 ± 1.45	5.73 ± 0.65	1.00 ± 0.18	42.74 ± 11.30
单纯 T2DM 组	31	130.48 ± 17.25	92.93 ± 10.45	8.37 ± 1.12 <sup>a</sup>	12.97 ± 1.94 <sup>a</sup>	8.74 ± 1.13 <sup>a</sup>	0.72 ± 0.29 <sup>a</sup>	68.73 ± 26.85 <sup>a</sup>
T2DM 合并 CAD 组	85	132.46 ± 20.18	93.28 ± 9.73	8.89 ± 1.13 <sup>a</sup>	13.79 ± 2.20 <sup>a</sup>	8.85 ± 1.24 <sup>a</sup>	0.45 ± 0.22 <sup>ab</sup>	94.96 ± 34.79 <sup>ab</sup>
$\chi^2/F$ 值		1.927	0.779	148.295	99.318	90.691	67.420	36.225
P 值		0.149	0.401	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与对照组比较,<sup>a</sup>P<0.05;与单纯 T2DM 组比较,<sup>b</sup>P<0.05

表 2 血清 miR-30a 和 YKL-40 诊断 T2DM 患者合并 CAD 的 ROC 曲线分析结果

指标	截点值	敏感度 (%)	特异度 (%)	约登指数	AUC	95% CI	P 值
miR-30a	0.41	70.0	62.5	0.325	0.717	0.478 ~ 0.853	0.001
YKL-40	89.76 ng/ml	62.7	67.2	0.299	0.682	0.490 ~ 0.802	0.005
miR-30a 联合 YKL-40	12.85	83.5	70.0	0.535	0.869	0.624 ~ 0.957	0.001



图 1 miR-30a 序列与 YKL-40 的互补结构域

因报告质粒同 miR-30a mimics 共转染后, 荧光酶活性被明显减弱 ( $P < 0.05$ ), 其对荧光酶活性的抑制作用达 48.62%, 而将突变型 YKL-40 的基因报告质粒与 miR-30a mimics 共转染后, 其未对荧光素酶活性产生明确影响。

3. 不同冠脉病变程度 T2DM 合并 CAD 患者血清 miR-30a 和 YKL-40 水平比较: 轻、中、重度病变组 T2DM 合并 CAD 患者血清 miR-30a ( $0.62 \pm 0.23$  比  $0.43 \pm 0.27$  比  $0.35 \pm 0.18$ ) 比和 YKL-40 水平 [ $(85.58 \pm 29.15)$  ng/ml 比  $(100.62 \pm 32.17)$  ng/ml 比  $(117.98 \pm 41.13)$  ng/ml] 比较差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 其中中、重度病变组患者血清 miR-30a 水平均低于轻度病变组, 血清 YKL-40 水平高于轻度病变组 ( $P < 0.05$ ); 重度病变组患者血清 miR-30a 水平低于中度病变组, 血清 YKL-40 水平高于中度病变组 ( $P < 0.05$ )。

4. 血清 miR-30a 和 YKL-40 水平的相关性分析: Pearson 相关分析结果显示, 在单纯 T2DM 患者和 T2DM 合并 CAD 患者中, 血清 miR-30a 与 YKL-40 水平均呈负相关 ( $r = -0.365$ 、 $-0.589$ ,  $P$  均  $< 0.001$ ), 而在对照组受试者中, 血清 miR-30a 和 YKL-40 水平无相关性 ( $r = -0.075$ ,  $P = 0.673$ )。

5. 血清 miR-30a 和 YKL-40 诊断 T2DM 患者合并 CAD 的价值: ROC 曲线分析结果显示, 血清 miR-30a 及 miR-30a 联合 YKL-40 的 ROC 曲线下面积 (AUC) 均  $> 0.7$  ( $P < 0.05$ ), 其诊断价值相对较高。见图 2 和表 2。

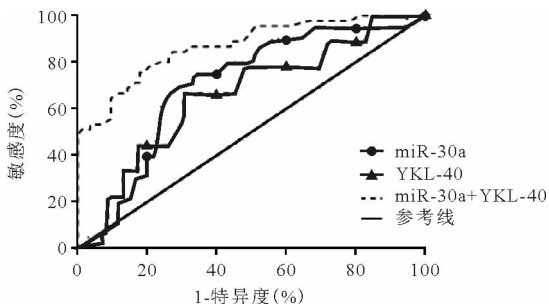


图 2 血清 miR-30a 和 YKL-40 诊断 T2DM 患者合并 CAD 的 ROC 曲线

讨 论

YKL-40 由中性粒细胞、巨噬细胞等合成<sup>[5]</sup>。王昌敏等<sup>[6]</sup>证实血清 YKL-40 在急性冠脉综合征患者中的表达水平明显升高, 且与高敏 C 反应蛋白 (hs-CRP)、P 选择素水平呈正相关。钱琦等<sup>[7]</sup>也发现 CAD 患者血清 YKL-40 水平高于健康人群。表明 YKL-40 可能参与动脉粥样硬化的发生发展, 且可能反映

冠脉病变的严重程度。本研究中, 单纯 T2DM 组和 T2DM 合并 CAD 组患者血清 YKL-40 水平均高于对照组, T2DM 合并 CAD 组患者血清 YKL-40 水平高于单纯 T2DM 组, 且随着冠脉病变程度的加重, 血清 YKL-40 水平逐渐升高, 表明糖尿病患者本身就存在慢性炎症反应, 且随着冠心病的进展, 炎症反应逐渐加重。

miR-30a 在心肌细胞和血管内皮细胞中高表达。Huang 等<sup>[8]</sup>研究结果显示, miR-30a 可能通过调控下游炎症因子, 影响血管内皮细胞增殖、迁移、粘附等过程。本研究中, 我们首先通过在线生物学数据库信息推断 YKL-40 可能是 miR-30a 的下游靶基因, 二者具有互补结合序列, 通过双荧光素酶报告基因检测结果进一步从分子水平证实 miR-30a 和 YKL-40 之间的靶向关系。因此, 我们推测 miR-30a 可联合 YKL-40 用于量化冠脉病变的进程。本研究中, 单纯 T2DM 组和 T2DM 合并 CAD 组患者血清 miR-30a 水平均低于对照组, T2DM 合并 CAD 组患者血清 YKL-40 水平低于单纯 T2DM 组, 且随着冠脉病变程度的加重, 血清 YKL-40 水平逐渐降低; Pearson 相关分析结果显示, 在单纯 T2DM 患者和 T2DM 合并 CAD 患者中血清 miR-30a 与 YKL-40 水平均呈负相关; ROC 曲线分析结果显示, 血清 miR-30a 及 miR-30a 联合 YKL-40 诊断 T2DM 患者合并 CAD 的价值相对较高, 因此, 我们推测 miR-30a 和 YKL-40 相互作用、共同参与冠脉粥样硬化过程。

综上所述, miR-30a 及其下游靶分子 YKL-40 不仅参与 T2DM 和 CAD 血管炎症反应过程, 而且与其冠脉病变程度密切相关。血清 miR-30a 水平降低和 YKL-40 水平升高可在一定程度上预警 T2DM 患者发生心血管并发症, 且有望成为诊断 T2DM 合并 CAD 的指标之一, 对于 T2DM 患者合并 CAD 的预防有一定的指示作用。

参 考 文 献

- [1] American Diabetes Association. Cardiovascular disease and risk management: standards of medical care in diabetes-2018[J]. Diabetes Care, 2018, 41 (Suppl 1):S86-S104.
- [2] Li TM, Liu SC, Huang YH, et al. YKL-40-induced inhibition of miR-590-3p promotes interleukin-18 expression and angiogenesis of endothelial progenitor cells[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(5):920.
- [3] Tan P, Wang HQ, Zhang JK, et al. Rapamycin-induced miR-30a downregulation inhibits senescence of VSMCs by targeting Beclin1[J]. Int J Mol Med, 2019, 43(3):1311-1320.
- [4] 林美萍, 王建军. 微小 RNA-126 和微小 RNA-155 在冠心病合并糖尿病耐量减低患者中的表达及阿卡波糖的干预作用[J]. 临床内科杂志, 2019, 36(2):108-112.
- [5] 郑学鸣, 刘慧峰, 华先平, 等. 阿托伐他汀对射血分数保留型慢性心力衰竭患者心室重构及血清几丁质酶 3 样蛋白 1 和基质金属蛋白酶 9 水平的影响[J]. 中国医药, 2019, 14(4):489-492.
- [6] 王昌敏, 陈程, 赵进, 等. 急性冠脉综合征不同病程、不同疾病类型患者 YKL-40、IL-35、脂联素等表达特征分析[J]. 标记免疫分析与临床, 2018, 25(9):1276-1280.
- [7] 钱琦, 龙明智, 陈忠, 等. YKL-40 和超敏 C 反应蛋白与冠心病的相关性[J]. 江苏医药, 2012, 38(17):2043-2045.
- [8] Huang YM, Li WW, Wu J, et al. The diagnostic value of circulating microRNAs in heart failure[J]. Exp Ther Med, 2019, 17(3):1985-2003.

(收稿日期:2019-07-11)

(本文编辑:周三凤)