·综 述·

循环微小RNA与冠心病诊断

李素芳，任景怡，耿 强，陈 红*

（北京大学人民医院心脏中心，北京 100044）

【摘 要】微小RNA (miRNA)是一类在进化上高度保守的非编码小分子单链RNA（～22个核苷酸），在基因表达调控中发挥至关重要的作用。不同临床分型的冠心病中，循环miRNA表达谱存在明显差异，提示循环miRNA可能成为一类具有冠心病诊断价值的新型生物标志物。本文主要就用于诊断冠心病的循环miRNA研究进展做一综述，为miRNA作为新一代诊断冠心病的生物标志物提供依据。

【关键词】微小RNA；冠状动脉疾病；生物标志物

【中图分类号】 R541.4 【文献标识码】 A 【DOI】 10.3724/SP.J.1264.2014.00089

Circulating microRNA and the diagnosis of coronary heart disease

LI Su-Fang, REN Jing-Yi, GENG Qiang, CHEN Hong*

(Center of Cardiology, Peking University People's Hospital, Beijing 100044, China)

【**Abstract**】 MicroRNA (miRNA) are highly conserved, non-coding, short, single-chain RNA (～22 nt), and play essential roles in regulating gene expression. Many studies have shown that circulating miRNA profiles are significantly varied in different clinical types of coronary artery disease (CAD), which indicates that miRNA may be a new kind of diagnostic biomarker for CAD. In this paper, the research progress in circulating miRNA in diagnosing CAD was reviewed, so as to provide a basis for their application as promising diagnostic biomarker for CAD.

【**Key words**】 microRNA; coronary artery disease; biomarker

This work was supported by the Major Special Project of National Science and Technology "Major New Drugs Creation" (2012ZX09303019), *the National Natural Science Foundation of China* (81270274), *the Natural Science Foundation of Beijing* (7132225,7122198) *and the Special Project of Capital Health Research and Development* (2011-4022-03).

Corresponding author: CHEN Hong, E-mail: chenhongbj@medmail.com.cn

微小RNA（microRNA，miRNA）是一类在进化上高度保守的非编码小分子单链RNA[～22核苷酸（nt）]，在转录后水平负性调控靶基因的表达。目前在人体中已发现1000多个miRNA，约30%的人类蛋白编码基因受到miRNA的调控[1,2]。miRNA参与体内许多生理和病理过程的调控，与心血管疾病、糖尿病、肿瘤、感染等多种疾病的发病或预后密切相关。现有许多研究表明，miRNA不仅在冠状动脉粥样硬化性疾病（冠心病）的发生、发展中具有重要作用，而且它们还存在于血液循环，因为不同临床分型的冠心病具有各自特异的循环miRNA表达谱，使得这些miRNA可能成为一类具有冠心病诊断价值的新型生物标志物[3-7]。

1 miRNA的生成及作用机制

编码miRNA的基因序列通常位于基因间或内含子区域。miRNA的生成先后在细胞核和细胞质中进行（图1）。细胞核内，miRNA基因首先在RNA聚合酶Ⅱ的作用下，转录出长约数千个碱基的初级miRNA（pri-miRNA）。随后pri-miRNA在Drosha酶（属于核酸内切酶Ⅲ家族）和DGCR8组成的酶复合物作用下，生成具有茎环结构的长约70个核苷酸的miRNA前体（pre-miRNA）[8]。之后，pre-miRNA依赖Ran-GTP/Exportin-5被转运到胞

收稿日期：2013-11-11；修回日期：2014-01-08

基金项目：国家科技重大专项"重大新药创制"项目（2012ZX09303019）；国家自然科学基金（81270274）；北京市自然科学基金（7132225，7122198）；首都卫生发展科研专项项目（2011-4022-03）

通信作者：陈 红，E-mail: chenhongbj@medmail.com.cn

质[9]。胞质中，在核酸内切酶Ⅲ家族的另一个成员Dicer酶的剪切作用下，去除pre-miRNA的茎环结构，形成长约22个核苷酸的miRNA双链结构（miRNA/miRNA*）[10]。

在解旋酶的作用下，通常其中一条链的miRNA*被降解，另一条链即为成熟的miRNA。后者进入RNA诱导沉默复合体（RNA-induced silencing complex，RISC），通过碱基配对结合到靶mRNA 3’端非翻译区（3’-untranslated region，3’-UTR），在转录后水平通过诱导靶mRNA降解或抑制其翻译，进而抑制靶基因的表达。其中miRNA的“种子区”（seed region，即miRNA 5’端第2～第8个核苷酸）与靶点序列的高度互补至关重要，其余序列则在miRNA与靶基因的结合过程中起辅助作用[11]。

2 循环miRNA的来源及特点

早在2008年有关肿瘤的研究中就发现，miRNA广泛存在于血液循环中[12]。循环miRNA可来源于多种细胞，如血小板、红细胞、白细胞（淋巴细胞、巨噬细胞、粒细胞）、内皮细胞、肌细胞等[11-13]，在不同的疾病状态或病理刺激下，循环miRNA表达谱存在差异，其细胞来源也有所不同[14]。进一步研究发现，机体组织或细胞可能是通过微颗粒、外泌体、凋亡小体、蛋白复合物或高密度脂蛋白的方式，将miRNA释放到血液中，但其确切机制目前尚不十分清楚。

一方面，循环miRNA在血液中以微颗粒、外泌体等形式存在，性质十分稳定，能够免受RNA酶的降解、耐反复冻融、耐酸碱及耐沸水煮，并可以在室温下长时间放置。另一方面，miRNA的表达具有组织特异性或高表达性，在某一病变的早期，这些组织特异表达或高表达的miRNA便可出现特定的变化，从而使其在发病的最早阶段即被检测到[15]。上述特性使循环miRNA具备了作为生物标志物用于诊断疾病的潜力。

3 循环miRNA是诊断冠心病的新一代生物学标志物

越来越多的研究提示，循环miRNA可能会成为一种理想的冠心病新型标志物（表1）。由于心肌或血管存在特异表达或高表达的miRNA，故冠心病患者可因心肌或血管受损，将细胞内这些miRNA释放至血液中，导致循环miRNA表达谱发生特征性变化。而且通过real-time PCR的方法可对循环miRNA进行较为精确的定量分析。正是依据miRNA的上述特点和优势，迄今已发现了一系列具有冠心病诊断价值的循环miRNA。

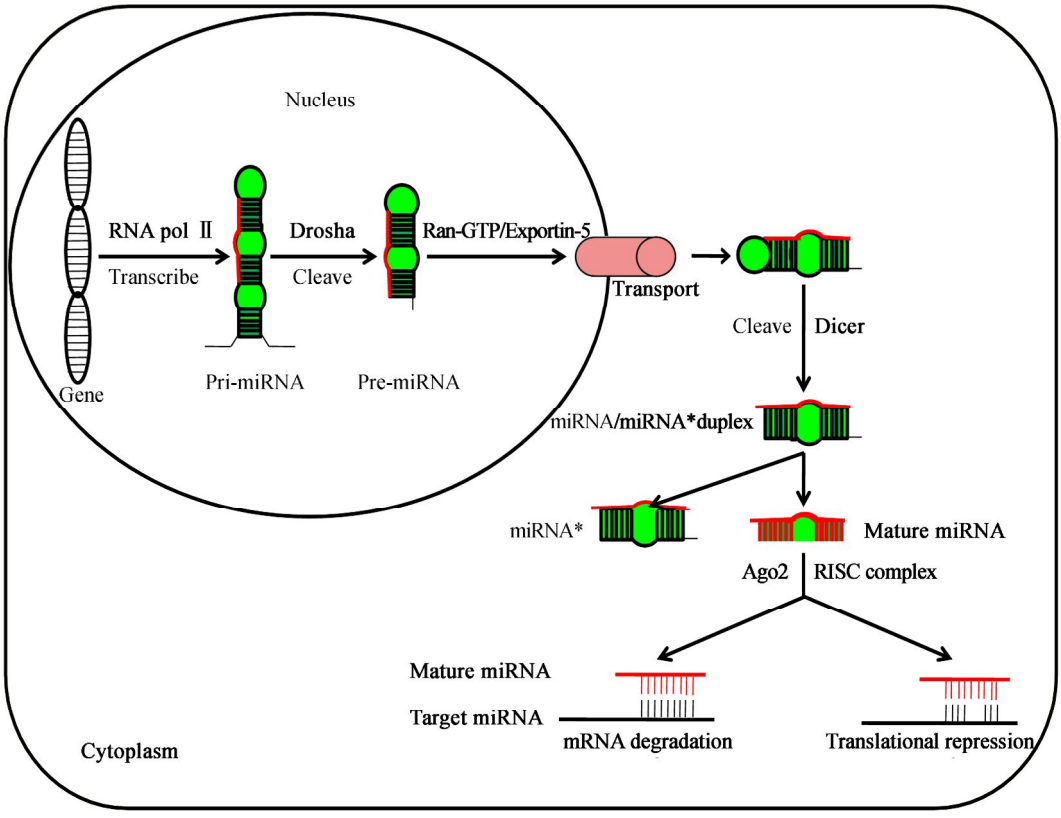


图1 miRNA的生成及作用机制

Figure 1 Biogenesis pathway of microRNA and their potential regulation mechanisms

表1 循环miRNA在诊断冠心病中的研究
Table 1 Researchs on circulating miRNA as biomarker in coronary heart disease

CAD type	Study population	Up-regulated circulating miRNA	Down-regulated circulating miRNA	Sample	Author
AMI	AMI group(n = 33) Healthy controls(n = 30)	miR-1, miR-133a, miR-208a, miR-499	–	Plasma	Wang, *et al*[13]
	AMI group(n = 33) Healthy controls(n = 17)	miR-1, miR-133a/b, miR-499-5p	miR-122, miR-375	Plasma	D'Alessandra, *et al*[16]
	AMI group(n = 93) Healthy controls(n = 66)	miR-1	–	Plasma	Ai, *et al*[17]
	AMI group(n = 92) Healthy controls(n = 99)	miR-1, miR-21, miR-133a, miR-423-5p, miR-499-5p	–	Plasma	Olivieri, *et al*[18]
	AMI group(n = 31) Healthy controls(n = 20)	miR-1	–	Plasma	Cheng, *et al*[19]
	AMI group(n = 32) Healthy controls(n = 36)	miR-1, miR-133a, miR-208b, miR-499	miR-223	Plasma	Corsten, *et al*[20]
Angina	Stable angina(n = 67) Healthy controls(n = 31)	miR-133, miR-208a	miR-126, miR-17, miR-92a, miR-145, miR-155	Plasma	Fichtlscherer, *et al*[21]
	Stable angina(n = 12) Healthy controls(n = 12)	miR-140, miR-182	–	Whole blood	Taurino, *et al*[22]
	Stable angina(n = 25) Healthy controls(n = 20)	miR-135a	miR-147	Monocyte	Hoekstra, *et al*[12]
	Untable angina(n = 25) Stable angina(n = 25)	miR-198, miR-134, miR-370	–	Monocyte	Hoekstra, *et al*[12]

CAD: coronary artery disease; AMI: artery myocardial infarction

3.1 循环miRNA与急性心肌梗死（AMI）

虽然在临床工作中，心肌细胞的骨架蛋白——心脏肌钙蛋白I/T（cardiac troponin I/T，cTnI或cTnT）以其高度敏感性和特异性广泛应用于急性心肌梗死（acute myocardial infarction，AMI）的诊断，但它也有其自身的局限性，如：在AMI超早期（0～6h内），血液中并不能检测到；各医院cTn的检测方法尚未标准化，不同检测方法测得的cTn值可能会不同。这些均不利于AMI更早期的诊断。目前关于循环miRNA的临床研究均提示，miRNA具有潜在的AMI诊断价值[13,16−19,23]，因为心肌特异表达或高表达的miRNA（如miRNA-1，miRNA-21，miNAR-133，miRNA-208a，miRNA-499等）存在于细胞质内，当心肌细胞受到损伤后，这些miRNA会比cTn更快地释放到血液中，使其用于早期诊断AMI成为可能。

3.1.1 循环miRNA与ST段抬高型心肌梗死 Wang等[13]以肌细胞内的表达丰富或心肌特异表达的miRNAs，如miRNA-1，miRNA-133，miRNA-499，miRNA-208a为检测指标，来评价这些miRNA是否可以作为诊断AMI的标志物，且优于cTnI。最终他们发现，与健康志愿者（n = 30）、非AMI冠心病患者（n = 16）或患有其他心血管疾病的患者相比，AMI患者（n = 33）血浆中miRNA-1，miRNA-133a，miRNA-499和miRNA-208的含量均显著升高。特别是miRNA-208a，在AMI患者出现心肌梗死（myocardial infarction，MI）症状后4h内，即可以检测到，而此时血浆中cTnI水平尚未升高。他们通过受试者工作特征曲线（receiver operator characteristic curve，ROC曲线）分析发现，在4个miRNA中，miRNA-208a诊断AMI的特异性为100%、敏感性为90.9%。该研究结果提示，血液循环中miRNA-208a可能是优于cTnI、早期诊断AMI更为特异和敏感的心肌损伤标志物。D'Alessandra等[16]的研究表明，AMI患者血浆miRNA-1，miRNA-133a和miRNA-133b的达峰时间均早于cTnI。与健康对照组（n = 17）相比，AMI患者（n = 33）miRNA-1、miRNA-133a、miRNA-133b达峰时间在发病后2～3h，而cTnI的达峰时间则出现在发病后3～4h。

此外，也有一些非心脏特异或高表达的miRNA——miRNA-30a和miRNA-195具有潜在的AMI诊断价值。Long等[23]的研究表明，循环miRNA-30a在患者发病后4h开始高表达，miRNA-195高表达则出现在发病后8h。通过ROC曲线分析发现，它们诊断AMI特异性及敏感性均 > 90%。遗憾的是，它们的表达变化出现时间及达峰时间均晚于cTnI。

3.1.2 循环miRNA与非ST段抬高型心肌梗死（non-ST elevation myocardial infarction，NSTEMI） 由于NSTEMI患者常缺乏典型症状和明显的心电图改变，且心肌炎、急性充血性心力衰竭（congestive heart failure，CHF）等非冠心病也可引起cTn的升高，故可能会延误病情的诊治。miRNA作为诊断AMI的潜在标志物，对此类患者的早期诊治具有

重要意义。

Olivieri等[18]以伴有CHF的老年NSTEMI患者[n = 92，年龄（82.6 ± 6.9）岁]、未患AMI的CHF患者[n = 81，年龄（81.3 ± 6.8）岁]、健康受试者[n = 99，年龄（79.5 ± 5.4）岁]为研究对象，以循环中miRNA-1，miRNA-21，miRNA-133a，miRNA-208a，miRNA-423-5p（在心力衰竭患者循环中升高[24]）和miRNA-499-5p为检测指标，来筛选用于诊断此类患者的循环miRNA标志物。研究发现，与健康对照组相比，急性NSTEMI患者miRNA-499-5p升高最明显，达80倍之多，其余4个miRNA升高3～10倍。与CHF患者相比，急性NSTEMI患者miRNA-499-5p和miRNA-21的水平明显增加。值得一提的是，与cTnT或超敏cTnT（hs-CTnT）相比，miRNA-499-5p在鉴别诊断NSTEMI（n = 31）和急性CHF患者（n = 32）的过程中，具有更高的诊断正确率[miRNA-499-5p ROC曲线下面积（area under the ROC curve，AUC）= 0.86，cTnT AUC = 0.68，hs-cTnT AUC = 0.70]。

3.2 循环miRNA与心绞痛

目前临床上尚不存在特异诊断心绞痛的生物标志物，其确诊主要依赖患者的临床症状及冠状动脉造影检查。因为miRNA与动脉粥样硬化的发展进程密切相关[25]，如miRNA-126调节单核细胞的黏附、miRNA-92a调节血管新生、miRNA-133a/b与miRNA-145调节平滑肌细胞增殖及凋亡等。这些均提示，冠心病患者在未出现MI前，其循环miRNA表达谱可能已出现异常。因此，循环miRNA可能成为诊断心绞痛的有效生物标志物。

3.2.1 循环miRNA与稳定型心绞痛 Fichtlscherer等[21]研究发现，稳定型心绞痛患者（n = 67）与健康对照者（n = 31）相比，前者血浆中内皮细胞来源的miRNA-126，miRNA-17，miRNA-92a及平滑肌细胞来源的miRNA-145水平明显降低，而心肌细胞来源的miRNA-133a和miRNA-208a水平明显升高。血管高表达的miRNA在循环中出现下调，提示这些miRNA可能在细胞内表达受抑制或被其病变血管所摄取。而具有抗心肌细胞凋亡作用、心肌来源的miRNA-133a在循环中出现上调，提示处于冠心病早期的患者，其心肌细胞可能已经出现损伤。上述这些循环miRNA出现异常，可能成为冠心病患者心肌损伤的早期预警信号。

需要指出的是，常用心血管药物可以影响循环miRNA的表达谱[26,27]。稳定冠心病患者循环中内皮祖细胞来源的miRNA-221，miRNA-222水平及外周血单核细胞来源的miRNA-146a，miRNA-146b水平明显升高，应用阿托伐他汀（atorvastatin）与血管紧张素Ⅱ受体拮抗剂治疗12个月后，miRNA-221，miRNA-222，miRNA-146a和miRNA-146b的表达水平较前明显降低。这些研究提示，在寻找用于诊断该疾病的循环miRNA标志物时，可能要避开容易受到药物影响的miRNA。

3.2.2 循环miRNA与不稳定型心绞痛 目前关于不稳定型心绞痛患者循环miRNA表达谱的研究相对较少。Hoekstra等[12]研究发现，与稳定型心绞痛相比，不稳定型心绞痛患者外周血单核细胞中的miRNA-198，miRNA-134和miRNA-370水平均明显升高。该研究提示，可以寻找不稳定型心绞痛与稳定型心绞痛患者差异表达的循环miRNA，用于两种不同类型的冠心病患者的鉴别诊断。

4 问题及展望

虽然众多临床研究均发现了具有冠心病诊断价值的miRNA，但这些研究的规模均较小，因而仍可能具有一定的偶然性；且检测miRNA的血液标本处理方式不统一，有些是血浆标本，有些则是血清标本，新近还出现了全血标本；最常用的血浆标本又分富血小板血浆、乏血小板血浆、无血小板血浆，这种经过不同离心力获得血浆标本，miRNA的表达谱是不一样的[30]。故要寻找用于诊断疾病的miRNA，必须要统一血液标本的处理方式。此外，miRNA的检测借助实时PCR技术，这一检测手段虽然敏感，但与cTn的检测技术相比，步骤较多，报送时间不占优势，限制了其在临床的应用。

虽然目前关于循环miRNA作为诊断疾病标志物的研究尚处于起步阶段，距临床应用还有相当远的距离，但现有的研究结果均提示，循环miRNA可能会成为稳定型心绞痛、不稳定型心绞痛、AMI患者早期预警标志物。随着研究的深入，研究规模的扩大，检测技术手段的不断进步，相信未来会有特异的、敏感的miRNA作为冠心病的诊断指标，进入临床检验项目之中。

【参考文献】

[1] Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets[J]. Cell, 2005, 120(1): 15−20.

[2] Berezikov E, Guryev V, van de Belt J, *et al*. Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes[J]. Cell, 2005, 120(1): 21−24.

[3] Urbich C, Kuehbacher A, Dimmeler S. Role of microRNAs in vascular diseases, inflammation, and angiogenesis[J]. Cardiovasc Res, 2008, 79(4): 581−588.

[4] Gupta SK, Bang C, Thum T. Circulating microRNAs as biomarkers and potential paracrine mediators of cardiovascular disease[J]. Circ Cardiovasc Genet, 2010, 3(5): 484−488.

[5] Bauersachs J, Thum T. Biogenesis and regulation of cardiovascular microRNAs[J]. Circ Res, 2011, 109(3): 334−347.

[6] Fichtlscherer S, Zeiher AM, Dimmeler S. Circulating microRNAs: biomarkers or mediators of cardiovascular diseases[J]? Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011, 31(11): 2383−2390.

[7] Hartmann D, Thum T. MicroRNAs and vascular (dys)function[J]. Vasc Pharmacol, 2011, 55(4): 92−105.

[8] Han J, Lee Y, Yeom KH, *et al*. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex[J]. Cell, 2006, 125(5): 887−901.

[9] Lund E, Guttinger S, Calado A, *et al*. Nuclear export of microRNA precursors[J]. Science, 2004, 303(5654): 95−98.

[10] Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, *et al*. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing[J]. Nature, 2005, 436(7051): 740−744.

[11] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell, 2004, 116(2): 281−297.

[12] Hoekstra M, van der Lans CA, Halvorsen B, *et al*. The peripheral blood mononuclear cell microRNA signature of coronary artery disease[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 394(3): 792−797.

[13] Wang GK, Zhu JQ, Zhang JT, *et al*. Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans[J]. Eur Heart J, 2010, 31(6): 659−666.

[14] Diehl P, Fricke A, Sander L, *et al*. Microparticles: major transport vehicles for distinct microRNAs in circulation[J]. Cardiovasc Res, 2012, 93(4): 633−644.

[15] Etheridge A, Lee I, Hood L, *et al*. Extracellular microRNA: a new source of biomarkers[J]. Mutat Res, 2011, 717(1-2): 85−90.

[16] D'Alessandra Y, Devanna P, Limana F, *et al*. Circulating microRNAs are new and sensitive biomarkers of myocardial infarction[J]. Eur Heart J, 2010, 31(22): 2765−2773.

[17] Ai J, Zhang R, Li Y, *et al*. Circulating microRNA-1 as a potential novel biomarker for acute myocardial infarction[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 391(1): 73−77.

[18] Olivieri F, Antonicelli R, Lorenzi M, *et al*. Diagnostic potential of circulating miR-499-5p in elderly patients with acute non ST-elevation myocardial infarction[J]. Int J Cardiol, 2013, 167(2): 531−536.

[19] Cheng YH, Tan N, Yang J, *et al*. A translational study of circulating cell-free microRNA-1 in acute myocardial infarction[J]. Clin Sci (Lond), 2010, 119(2): 87−95.

[20] Corsten MF, 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.

[21] Fichtlscherer S, De Rosa S, Fox H, *et al*. Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease[J]. Circ Res, 2010, 107(5): 677−684.

[22] Taurino C, Miller WH, McBride MW, *et al*. Gene expression profiling in whole blood of patients with coronary artery disease[J]. Clin Sci (Lond), 2010, 119(8): 335−343.

[23] Long G, Wang F, Duan Q, *et al*. Circulating miR-30a, miR-195 and let-7b associated with acute myocardial infarction[J]. PLoS One, 2012, 7(12): e50926.

[24] Tijsen AJ, Creemers EE, Moerland PD, *et al*. MiR423-5p as a circulating biomarker for heart failure[J]. Circ Res, 2010, 106(6): 1035−1039.

[25] Santovito D, Mezzetti A, Cipollone F. MicroRNAs and atherosclerosis: new actors for an old movie[J]. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2012, 22(11): 937−943.

[26] Minami Y, Satoh M, Maesawa C, *et al*. Effect of atorvastatin on microRNA 221/222 expression in endothelial progenitor cells obtained from patients with coronary artery disease[J]. Eur J Clin Invest, 2009, 39(5): 359−367.

[27] Takahashi Y, Satoh M, Minami Y, *et al*. Expression of miR-146a/b is associated with the Toll-like receptor 4 signal in coronary artery disease: effect of renin-angiotensin system blockade and statins on miRNA-146a/b and Toll-like receptor 4 levels[J]. Clin Sci (Lond), 2010, 119(9): 395−405.

[28] Willeit P, Zampetaki A, Dudek K, *et al*. Circulating microRNAs as novel biomarkers for platelet activation[J]. Circ Res, 2013, 112(4): 595−600.

（编辑：张青山）