

循环 miRNA-296-5p 与原发性高血压发病机制的相关性研究

唐春仕¹, 谭利辉², 卢新林¹, 陈文江^{3*}

(1. 郴州市第四人民医院 心血管内科, 湖南 郴州 423000; 2. 郴州市第四人民医院 急诊科, 湖南 郴州 423000; 3. 广东医科大学附属第一医院 心血管内科, 广东 湛江 524001)

[摘要] 目的: 探讨血浆中 miRNA-296-5p 与原发性高血压(EH)的相关性。方法: 选取 EH 患者 80 例和非 EH 患者 80 例, 收集两组患者基本病史、心血管疾病用药情况等一般资料, 采用 qRT-PCR 检测其血浆中循环 miRNA-296-5p 的表达水平, 生物信息学预测 miRNA-296-5p 的靶基因以及其调控的信号通路, ELISA 检测两组患者血浆中 TGF- β 1 和 ACE2 的表达, 并分析两者与 miRNA-296-5p 的相关性。结果: EH 组与非 EH 组在年龄、性别、BMI、基本病史和部分血液生化指标比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); EH 组血浆中循环 miRNA-296-5p 表达水平明显高于非 EH ($P < 0.01$); ROC 曲线分析发现曲线下 miRNA-296-5p 曲线面积为 0.844 5, 95% 可信区间为 (CI) 0.782 5 ~ 0.906 4 ($P < 0.01$), 灵敏度 80.00%, 特异性 90.00%; 生物信息学预测发现 miRNA-296-5p 的靶基因可能为血管转化生长因子- β 1 (TGF- β 1) 和血管紧张素转化酶 2 (ACE2), 可能调控血管转化生长因子/SMAD (TGF- β /SMAD)、磷脂酰肌醇-3 激酶 (PI3K-Akt)、胰岛素/胰岛素生长因子信号通路 (Insulin/IGF)、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 和 NOTCH 等信号通路, 并可能参与多种 circRNA 的调控; ELISA 检测发现 EH 组 TGF- β 1 和 ACE2 的表达明显高于非 EH 组 ($P < 0.01$), miRNA-296-5 与 TGF- β 1、ACE2 均呈正相关 ($r = 0.317 6, 0.417 1$, $P < 0.01$)。结论: 血浆中循环 miRNA-296-5p 可能通过调控 TGF- β 1 和 ACE2 导致 EH 的发生, 并可以作为 EH 新的临床诊断标志物。

[关键词] 血管转化生长因子 β 1; 血管紧张素转化酶 2; 高血压; 生物标志物; 微小 RNA-296-5p

[中图分类号] R544.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2017)03-0360-05

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2017.03.026

Preliminary Study on the Mechanism of miRNA-296-5p in Essential Hypertension

TANG Chunshi¹, TAN Lihui², LU Xinlin¹, CHEN Wenjiang³

(1. Cardiovascular Department, the Fourth People's Hospital of Chenzhou, Chenzhou 423000, Hunan, China; 2. Emergency Department, the Fourth People's Hospital of Chenzhou, Chenzhou 423000, Hunan, China; 3. Cardiovascular Department, the Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Zhanjiang, 524001, Guangdong, China)

[Abstract] **Objective:** To identify the correlation of plasma miRNA-296-5p with essential hypertension (EH). **Methods:** 80 EH cases and 80 non-EH cases with their general information such as case history and medication on cardiovascular disease, then adopting qRT-PCR to test expression level of circulating miRNA-296-5p, and its biological information was predicted. Then the test carried out ELISA to detect the probable target gene of miRNA-296-5p. **Results:** There was no statistical difference in age, gender, BMI, basic history and basic laboratory tests between EH group and non-EH group ($P > 0.05$); the circulating miRNA-296-5p expression level in EH group was significantly higher than non-EH group ($P < 0.01$); ROC curve analysis found that the area under the curve was 0.844 5, and the 95% CI was 0.782 5-0.906 4 ($P < 0.01$); bioinformatics prediction found that

* 通信作者 E-mail: yezi62002413@163.com

网络出版时间: 2017-3-18 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20170318.2320.027.html>

TGF- β 1 and ACE2 might be the target gene of miRNA-296-5p, and might regulate TGF- β /SMAD, PI3K-Akt, Insulin/IGF, MAPK and NOTCH signaling pathways together with regulating multiple circRNA. ELISA revealed that TGF- β 1 and ACE2 expression levels were significantly higher in EH cases ($P < 0.01$); miRNA-296-5 was positively correlated with TGF- β 1 and ACE2 ($r = 0.3176, 0.4171, P < 0.01$). **Conclusion:** Circulating miRNA-296-5p can be a biomarker of EH, and may participate in the mechanism of EH by regulating TGF- β 1 and ACE2.

[**Key words**] transforming growth factor-beta1; angiotensin converting enzyme 2; hypertension; biomarkers; circRNA-296-5p

我国心血管病(包括冠心病、心力衰竭、高血压等)现患人数大约 2.9 亿人,而其中高血压患者约占 2.7 亿,且 50% ~ 60% 的脑卒中和 40% ~ 50% 的心肌梗死都与高血压有关。原发性高血压(essential hypertension, EH)的发病机制主要与遗传机制(单基因、多基因遗传模式和基因多态性等)、大动脉弹性减退、周围血管阻力升高、肾脏排钠能力下降、交感神经系统 α 受体功能亢进、压力感受器功能下降和血小板功能减退等有关^[2]。研究显示,微小 RNA(microRNA, miRNA)可能参与心脏的发育和多种心血管疾病(动脉粥样硬化、心肌梗死、心力衰竭、高血压、肺动脉高压、心律失常和心肌病等)的发生发展^[3-4]; miRNA-let-7e、miRNA-22、miRNA-23b、miRNA-130a、miRNA-150、miRNA-155、miRNA-191、miRNA-451、miRNA-1246、miRNA-26a、miRNA-487 和 miRNA-505-3p 等都可能通过调控血管内皮细胞和血管平滑肌细胞的形态与功能等参与 EH 的发病机制^[5]。本研究通过测定 EH 患者血浆 miRNA-296-5p、血管转化生长因子- β 1(transforming growth factor-beta 1, TGF- β 1)和血管紧张素转换酶 2(angiotensin-converting enzyme 2, ACE2)水平,探讨 miRNA-296-5p 与 EH 发病的关系和 EH 患者血浆 miRNA-296-5p 与 TGF- β 1 和 ACE2 相关性,探讨 EH 发病机制。

1 材料与方法

1.1 标本来源

2015 年 6 月 ~ 9 月入院的 EH 患者 80 例作为实验组,另外纳入同时期入院的非 EH 的心血管病患者 80 例作为对照组,收集两组患者基本病史、心血管疾病用药情况,采集患者入院 4 h 内静脉血 2 mL, 4 $^{\circ}\text{C}$, 2 500 r/min 离心 10 min 分离血浆待查。

1.2 方法

1.2.1 血浆 miRNA-296-5p 检测 用 miRNAcute miRNA 提取分离试剂盒(广州真知生物有限公司)柱式分离提取并纯化其 miRNA,然后按照其配套的 miRNAcute miRNA cDNA 第一链合成试剂盒(广州真知生物有限公司)将 miRNA 逆转录合成 cDNA,最后按照 miRNAcute miRNA SYBR Green 荧光定量检测试剂盒(广州真知生物有限公司)及试剂盒中的下游引物进行荧光定量检测。hsa-miRNA-296-5p (MIMAT0000690, AGGGCCCCCCCCUCAAUCCUGU)的上游引物和内参 U6 引物由广州真知生物有限公司提供,下游引物为试剂盒通用引物。所有操作步骤均按照试剂盒说明书进行,荧光定量过程:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 20 s、60 $^{\circ}\text{C}$ 退火、延伸 34 s,共 30 个循环。本研究采用 $2^{-\Delta\text{Ct}}$ 相对定量方法进行数据分析: $\Delta\text{Ct}(\text{实验组}) = \text{Ct}(\text{实验组目标基因}) - \text{Ct}(\text{实验组内参基因})$, $\Delta\text{Ct}(\text{对照组}) = \text{Ct}(\text{对照组目标基因}) - \text{Ct}(\text{对照组内参})$ 。

1.2.2 miRNA-296-5p 生物信息学预测 采用 targetScan、microRNA.org 和 miRanda 等生物信息学在线软件预测 miRNA-296-5 的靶基因,然后采用 starBase 预测其基本生物信息学功能和可能参与调控的信号通路。

1.2.3 TGF- β 1 和 ACE2 水平 采用酶联免疫(ELISA)法,按照 ELISA 试剂盒(深圳柏万森生物有限公司)的说明书对样本人群血浆的 TGF- β 1 和 ACE2 进行定量检测。

1.3 统计学分析

采用 GraphPad Prism 5(GraphPad Software Inc, CA, USA)进行数据分析,所有计量资料采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,数据比较用 t 检验;定量资料用率表示,数据比较用 χ^2 检验或 Fisher 检验。

2 结果

2.1 一般情况及部分生化指标

EH 组患者收缩压和舒张压与非 EH 组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$);其他疾病影响因素如年龄、性别、体重指数(BMI)和吸烟等基本病史,血脂、血糖等基本生化指标比较差异无统计学意义($P > 0.05$);两组患者使用钙通道阻滞剂(CCB)差异有统计学意义($P < 0.01$)外,其他如 β 受体阻滞剂、血管紧张素转换酶抑制剂(ACEI)和其受体拮抗剂(ARB)使用情况比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),见表1。

表 1 入选人群一般情况及部分生化指标
Tab.1 General condition and some biochemistry indexes of people enrolled in the research

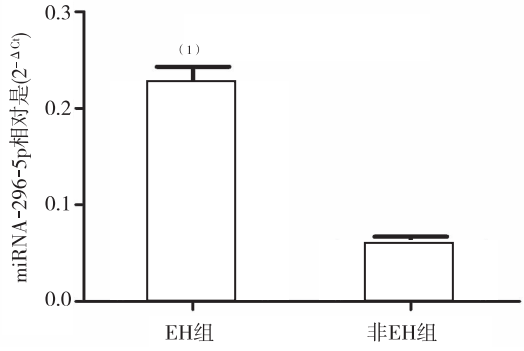
指标	EH 组	非 EH 组	P
年龄(岁)	65.11 ± 1.18	63.59 ± 1.63	>0.05
性别(男/女)	53/27	49/31	>0.05
BMI(kg/m ²)	27.61 ± 4.52	28.92 ± 4.05	>0.05
吸烟史(n)	45	40	>0.05
冠心病(n)	37	48	>0.05
糖尿病(n)	29	33	>0.05
心房颤动(n)	21	22	>0.05
收缩压(mmHg)	165.81 ± 8.36	112.62 ± 3.23	<0.01
舒张压(mmHg)	95.05 ± 9.11	71.65 ± 8.63	<0.01
使用药物			
β受体阻滞剂(n)	55	46	>0.05
CCB(n)	50	26	<0.01
ACEI(n)	35	27	>0.05
ARB(n)	38	42	>0.05
血清肌酐(μmol/L)	89.46 ± 10.30	85.01 ± 5.25	>0.05
血糖(mmol/L)	5.59 ± 0.21	5.69 ± 0.27	>0.05
总胆固醇(mmol/L)	4.71 ± 0.28	4.67 ± 0.37	>0.05
甘油三酯(mmol/L)	1.57 ± 0.08	1.52 ± 0.08	>0.05
高密度脂蛋白(nmol/L)	1.40 ± 0.08	1.37 ± 0.05	>0.05
低密度脂蛋白(nmol/L)	2.98 ± 0.36	2.75 ± 0.14	>0.05

2.2 血浆 miRNA-296-5p

EH 患者血浆中 miRNA-296-5p 的表达水平($0.223\ 5 \pm 0.019\ 6, n = 80$)较非 EH 患者($0.060\ 8 \pm 0.006\ 2, n = 80$)增多,差异无统计学意义($P < 0.01$),EH 组血浆中 miRNA-296-5p 的表达约为非 EH 组的 4 倍,见图 1。

2.3 血浆中 miRNA-296-5p ROC 曲线分析

对两组患者血浆中 miRNA-296-5p 进行接受者操作特性曲线(ROC 曲线)分析,发现 ROC 曲线



(1) 与非 EH 组比较, $P < 0.01$

图 1 两组患者血浆中 miRNA-296-5p 比较
Fig.1 Results analysis of real time fluorescent PCR on plasma miRNA-296-5p

下面积(area under the curve, AUC)为 0.844 5, 95% 可信区间(confidence interval, CI)为 0.782 5 ~ 0.906 4 ($P < 0.01$); miRNA-296-5p 截断值(cut-off)为 $> 0.098\ 4$, 其灵敏性为 80.00%, 95% CI 为 69.56% ~ 88.11%, 特异性为 90.00%, 95% CI 为 81.24% ~ 95.58%, 见图 2。

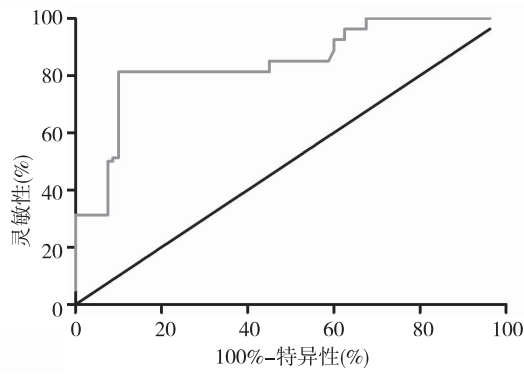


图 2 血浆中 miRNA-296-5p 表达的 ROC 曲线
Fig.2 ROC curve of plasma miRNA-296-5p expression

2.4 两组患者血浆 miRNA-296-5p 生物信息学分析

采用 targetScan、microRNA.org 和 miRanda 预测 miRNA-296-5p 的靶基因,发现靶基因有: TGFB1 (TGF- β 1)、ACE2、TGFB3、SMAD4、NGFR、STAT3、IGF2、TNFRSF1B、COL4A4、MAPKAPK2、HMG2、NOTCH、ZNF629、STAG2、NLGN2、TCERG1 和 PTEN 等。采用 starBase 预测 miRNA-296-5p 可调控的信号通路有: 血管转化生长因子信号通路(TGF- β /SMAD signaling pathway)、磷脂酰肌醇-3 激酶信号通路(PI3K-Akt signaling pathway)、细胞外基质受体相互作用信号通路(ECM-receptor interaction)、胰岛素/胰岛素生长因子信号通路(Insulin/

IGF pathway – protein kinase B signaling cascade)、丝裂原活化蛋白激酶用信号通路(MAPK signaling pathway)和 NOTCH 相关信号通路(genes involved in signaling by NOTCH)等,其功能可以参与调控血管紧张素转化酶 2 相关心脏功能、急性心肌梗死、血管生长、凝血酶活化和小细胞肺癌等。采用 CircNet 软件对 miRNA-296-5p 可能调控的靶基因及其可能相互调控的环状 RNA(circular RNA, circRNA)进行生物信息学分析,发现 miRNA-296-5p 参与调控多个基因和 circRNA,见图 3。

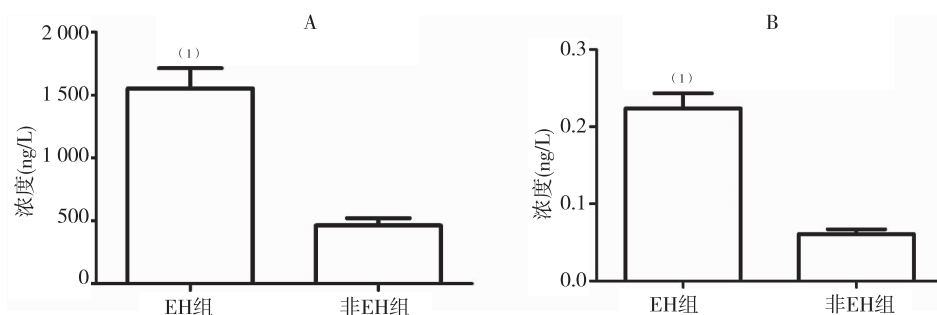
2.5 血浆中 TGF-β1 和 ACE2 水平

对两组患者血浆中 TGF-β1 和 ACE2 的 EL-

LISA 检测(各自标准曲线的 $R^2 > 0.99$)发现,EH 组血浆中 TGF-β1 的含量为 $(1\,552 \pm 161.7)$ ng/L,较非 EH 组 (462.0 ± 58.85) ng/L($n = 80$)明显升高($P < 0.01$),ACE2 在两组患者血浆中含量较低,EH 组含量 $(9.973 \pm 0.990\,5)$ ng/L($n = 80$)较非 EH 组 (1.995 ± 0.198) ng/L($n = 80$)明显升高($P < 0.01$),见图 3A 和 3B。

2.6 TGF-β1、ACE2 表达与 miRNA-296-5p 相关性

血浆中 TGF-β1 与 miRNA-296-5 的 Pearson 相关系数为 $0.317\,6$,95% CI 为 $0.170\,8 \sim 0.450\,6$ ($P < 0.01$);ACE2 与 miRNA-296-5 的 Pearson 相关系数为 $0.417\,1$,95% CI 为 $0.280\,1 \sim 0.537\,5$ ($P < 0.01$)。



注:A 为 TGF-β1,B 为 ACE2,⁽¹⁾与非 EH 组比较, $P < 0.01$

图 3 两组患者血浆 TGF-β1 和 ACE2 表达

Fig. 3 Expression of plasma TGF-β1 and ACE2 of both groups

3 讨论

我国高血压患者普遍存在“三高、三低、三不”现象,“三高”即高患病率、高危害性、高增长趋势;“三低”即知晓率低、治疗率低、控制率低;“三不”即患者不长期规律服药、不坚持测量血压、不重视非药物治疗,因此,其防治显得尤为重要,而防治的关键在于对其发病机制的研究,从而做到早诊断、早治疗、早预防。miRNA 与心血管疾病的研究目前主要是在冠心病、心力衰竭、心律失常、肺动脉高压等方面,关于 miRNA 与 EH 的研究还处于起步阶段。尤其是近几年来血液、尿液、关节液、脑脊液等发现了循环 miRNA(circulating miRNA)的表达,为 miRNA 与心血管疾病发病机制的研究带了可靠途径^[6]。目前研究表明 miRNA-296-5p 主要参与鼻咽癌、前列腺癌、乳腺癌、胃癌等癌症的发病,关于其与心血管的研究较少,主要发现其可能与心脏病和 EH 有关^[7]。然而都只是初步的研究,对于其具体机制还有待进一步重复和验证。

本研究通过对 160 例样本人群研究发现,EH 患者血浆中循环 miRNA-296-5p 表达明显升高($P < 0.01$),约为非 EH 患者的 4 倍,该结果提示 EH 患者血浆中 miRNA-296-5p 的表达较非 EH 患者明显升高,说明 miRNA-296-5p 可能参与 EH 的发病机制过程。通过 ROC 分析发现其 AUC 为 $0.844\,5$ ($P < 0.01$),当 miRNA-296-5p 截断值(cut-off) $> 0.098\,4$,其灵敏性为 80.00% ,特异性为 90.00% ,从该结果可以认为血浆中 miRNA-296-5p 可以作为 EH 临床诊断的新型生物标志物,并在 EH 的临床诊治中起到一定作用;关于高血压与标志物研究有其必要性,因为高血压患病人群庞大(目前估算我国有 2.66 亿高血压患者),而且高血压具有波动大、假性多见等特点,通过标志物检测可以准确判断是否真正患有高血压^[8-9]。现在临床上诊断高血压主要依靠血压计进行多次血压测量,该方法较为直观和可靠,但是对部分患者,尤其是不方便进行血压测量的患者,如果尝试其他方法进行血压诊断也是可以积极探索的,从该结果来看,采用血浆中循环 miRNA-296-5p 的表达来诊断

高血压也是一种新型并可以便捷进行的方式。

对于 miRNA 的研究,目前都需要借助生物信息学分析,筛选其靶基因和可能调控信号通路等,我们通过生物信息学分析发现,miRNA-296-5p 可能主要是通过调控 TGF- β 1、IGF2、NGF、TNF 等因子、调控细胞基质相关基因与通路(如 COL4A4、TGF- β /SMAD)、调控 ACE2 等基因从而导致心脏功能改变、心肌梗死、血管生成等。TGF- β 1 是一种参与多种心血管疾病(如心肌梗死、高血压、心力衰竭等)的炎症因子,而 ACE2 则是近年来发现的与高血压等心血管疾病密切有关的基因^[10-11],因此,本文选择 TGF- β 1 和 ACE2 作为 miRNA-296-5p 的可能靶基因,进行后续实验验证。ELISA 检测发现 EH 患者血浆中 TGF- β 1 和 ACE2 的表达都明显升高($P < 0.01$),而且通过相关性分析发现,TGF- β 1 与 miRNA-296-5 的 Pearson 相关系数为 0.317 6 ($P < 0.01$),ACE2 与 miRNA-296-5 的 Pearson 相关系数为 0.417 1 ($P < 0.01$),提示 TGF- β 1 和 ACE2 可能与 EH 的发生有关,而且也可能是 miRNA-296-5p 的靶基因。circRNA 是 RNA 领域最新的研究热点,研究表明 circRNA 分子富含 miRNA 结合位点,在细胞中起到 miRNA 海绵(miRNA sponge)的作用,进而解除 miRNA 对其靶基因的抑制作用,升高靶基因的表达水平,通过与疾病关联的 miRNA 相互作用,circRNA 在疾病中发挥着重要的调控作用,而且由于其稳定性,可以作为疾病的诊断标志物^[12]。本文通过生物信息学分析发现,miRNA-296-5p 可能参与多种 circRNA(circ-ARF.6、circ-RIPK1 和 circ-CTDP1.6 等)和相关基因的调控,如果将 miRNA-296-5p 与其相关 circRNA 进行联合诊断,应该对高血压的防治有更深远意义。

综上所述,miRNA-296-5p 可能参与 EH 的发病机制,并可以作为诊治 EH 新型标志物,可能通过调控 TGF- β 1、ACE2 以及相关 TGF- β /SMAD、PI3K-Akt、Insulin/IGF、MAPK 信号通路等参与 EH 发生发展。本研究只是一个临床小样本的初步研究,并未进行动物模型、细胞功能、靶基因载体构建与验证等实验,因此对于 miRNA-296-5p 与 EH 的发病机制,还有待后续大样本、单中心和功能实验

的证实。

4 参考文献

- [1] 陈伟伟,高润霖,刘力生,等.《中国心血管病报告 2014》概要[J].中国循环杂志,2015(7):617-622.
- [2] Seravalle G, Mancia G, Grassi G. Role of the sympathetic nervous system in hypertension and hypertension-related cardiovascular disease[J]. High Blood Press Cardiovasc Prev, 2014 (2):89-105.
- [3] 陈文江,陈灿.微 RNA 与心房颤动发病机制的研究进展[J].医学综述,2015(5):801-803.
- [4] Philippen LE, Dirkx E, da Costa-Martins PA, et al. Non-coding RNA in control of gene regulatory programs in cardiac development and disease[J]. J Mol Cell Cardiol, 2015 (15):1-5.
- [5] Li M, Zhang J. Circulating microRNAs: potential and emerging biomarkers for diagnosis of cardiovascular and cerebrovascular diseases [J]. Biomed Res Int, 2015 (145):730535.
- [6] 廖玉华. MicroRNAs 将成为心血管病诊断和治疗的标记物[J].临床心血管病杂志,2015(9):922-923.
- [7] Lu F, Andris HE, Moore XL, et al. Circulating microRNAs as biomarkers for diffuse myocardial fibrosis in patients with hypertrophic cardiomyopathy [J]. J Transl Med, 2015(13):314.
- [8] 孙宁玲,Chen JW,王继光,等.亚洲高血压合并左心室肥厚诊治专家共识[J].中华高血压杂志,2016 (07):619-627.
- [9] 王继光,吴兆苏,孙宁玲,等.动态血压监测临床应用中国专家共识[J].中华高血压杂志,2015(8):727-730.
- [10] Mendoza-Torres E, Oyarzún A, Mondaca-Ruff D, et al. ACE2 and vasoactive peptides: novel players in cardiovascular/renal remodeling and hypertension [J]. Ther Adv Cardiovasc Dis, 2015(4):217-37.
- [11] Chu PL, Le TH. Role of collectrin, an ACE2 homologue, in blood pressure homeostasis[J]. Curr Hypertens Rep, 2014(11):490.
- [12] Meng X, Li X, Zhang P, et al. Circular RNA: an emerging key player in RNA world [J]. Brief Bioinform, 2016(2):45.

(2016-12-22 收稿,2016-03-01 修回)

中文编辑:刘平;英文编辑:赵毅