

本文引用格式:马阳,庄艳华,玉山江·尼亚孜,等.左向右分流型先天性心脏病肺动脉高压患儿血清 miR-210 和 miR-451 的表达及诊断价值[J].安徽医学,2023,44(6):718-721.DOI:10.3969/j.issn.1000-0399.2023.06.022

左向右分流型先天性心脏病肺动脉高压患儿血清 miR-210 和 miR-451 的表达及诊断价值

马 阳 庄艳华 玉山江·尼亚孜 马 玉 李秋霞

[摘要] **目的** 探讨左向右分流型先天性心脏病(CHD)肺动脉高压(PAH)患儿血清微小核糖核酸(miR)-210 和 miR-451 的表达及诊断价值。**方法** 选取2020年1月至2022年1月乌鲁木齐市第一人民医院收治的114例CHD患儿,根据指南对PAH的诊断,将其分为CHD组($n=53$)和CHD-PAH组($n=61$)。收集并比较两组患儿一般资料、生化检查、肺动脉压参数以及外周血 miR-210 和 miR-451 表达水平。采用受试者工作特征(ROC)曲线分析 miR-210 和 miR-451 在 CHD-PAH 中的诊断价值, Pearson 相关分析 miR-210、miR-451 与尿素氮、不对称二甲基精氨酸和平均肺动脉压的相关性,多元 logistic 回归分析 CHD-PAH 的危险因素。**结果** CHD-PAH 组患儿外周血 miR-210 和 miR-451 表达水平分别为 (1.36 ± 0.57) 和 (3.52 ± 1.23) , 低于 CHD 组, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。ROC 曲线分析结果显示, miR-210、miR-451 和二者联合诊断的曲线下面积分别为 0.737、0.725 和 0.840。Pearson 相关显示, CHD-PAH 患儿外周血 miR-210 和 miR-451 水平与 BNP、ADMA 和 mPAP 呈负相关 ($P<0.05$)。多元 logistic 回归分析显示, miR-210 <1.12 、miR-451 <2.52 和 PVR 升高是 CHD-PAH 发病的危险因素。**结论** CHD-PAH 患儿外周血 miR-210 和 miR-451 降低, miR-210 和 miR-451 联合检测对 CHD-PAH 具有较高的诊断价值, miR-210 <1.12 、miR-451 <2.52 和 PVR 升高是 CHD-PAH 发病的危险因素。

[关键词] miR-210; miR-451; 左向右分流型先天性心脏病; 肺动脉高压

doi:10.3969/j.issn.1000-0399.2023.06.022

先天性心脏病(congenital heart disease, CHD)是常见的出生缺陷,在我国发病率约为 2.9%^[1],肺动脉高压(pulmonary arterial hypertension, PAH)是左向右分流型 CHD 常见和致命的副作用之一,我国约 47.5% 的先心病患儿患有 PAH^[2]。CHD-PAH 早期没有典型的临床体征,因此寻找特异性诊断和治疗标志物至关重要。微小核糖核酸(MicroRNA, miR)是一类高度保守的内源性非蛋白编码 RNA 分子,在心血管疾病的发生发展中起着重要作用^[3]。miR-210 是新发现的对抗心血管疾病具有多重保护作用的 miRNA,可通过调节细胞凋亡保护心肌细胞免受缺血及再灌注损伤^[4]。miR-451 可影响肺动脉内皮细胞和平滑肌细胞的功能,在 PHA 患儿和缺氧诱导的 PAH 大鼠模型中均明显下降^[5]。本研究旨在评估 miR-210 和 miR-451 在 CHD-PAH 患儿血清中的表达及其临床意义,为疾病的诊断和治疗寻找新的靶点和理论基础。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2020 年 1 月至 2022 年 1 月乌

鲁木齐市第一人民医院收治的 114 例左向右分流型 CHD 患儿,根据指南^[6]中对 PAH 的诊断,将其分为 CHD 组($n=53$)和 CHD-PAH 组($n=61$)。纳入标准:①年龄 ≤ 14 岁者;②经常规检查、心脏听诊和超声心动图确诊为左向右分流型 CHD^[7]者;③临床资料完整者。排除标准:①其他病因引起的 PAH 者;②合并恶性肿瘤或严重免疫系统疾病者;③肝、肾等其他重要器官功能障碍者。所有患儿均接受超声心动图检查以确定左向右分流型 CHD 的类型,包括室间隔缺损(ventricular septal defect, VSD)、动脉导管未闭(patent ductus arteriosus, PDA)和房间隔缺损(atrial septal defect, ASD)。本研究经医院伦理委员会批准(伦理号:XJ20191137),患儿父母均在参与研究前获得书面知情同意。

1.2 实验方法

1.2.1 数据收集 通过电子病例收集患儿性别、年龄等一般临床资料,收集所有患儿清晨空腹静脉血,离心后取上层血清在 -80°C 冷冻保存。采用 DXC800 全自动生化分析仪(Beckman Coulter)测定血清总胆固醇(total cholesterol, TC)、三酰甘油(triglycerides, TG)、谷草转

作者单位:830000 新疆乌鲁木齐 乌鲁木齐市第一人民医院内科(马阳,玉山江·尼亚孜)

832000 新疆石河子 石河子市人民医院神经内科(庄艳华)

831300 新疆五家渠 五家渠市兵团第六师总医院检验科(马玉)

830000 新疆乌鲁木齐 新疆生产建设兵团总医院手麻科(李秋霞)

氨酶(spartate aminotransferase, AST)、谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)、肌酐(serum creatinine, SCr)水平。采用酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测脑钠肽(brain natriuretic peptide, BNP)和不对称二甲基精氨酸(asymmetric dimethylarginine, ADMA)水平。试剂盒均购自武汉MSK生物技术有限公司,操作严格按照试剂盒说明书进行。所有患儿均在基础麻醉下进行右心导管检查(right heart catheterization, RHC),测量平均肺动脉压(mean pulmonary artery pressure, mPAP)和肺毛细血管楔压(pulmonary capillary wedge pressure, PCWP),计算肺血管阻力(pulmonary vascular resistance, PVR)。PAH诊断标准^[6]为PCWP≤15 mmHg, PVR>3 WU, mPAP≥25 mmHg。

1.2.2 血清 miR-210 和 miR-451 表达检测 使用逆转录-聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)检测血清 miR-210 和 miR-451 水平。收集患儿空腹静脉血,离心得上清液。向血清中加入 TRIzol 试剂提取总 RNA,通过紫外分光光度计检测 RNA 的纯度和浓度。严格按照试剂盒的说明,使用荧光定量 PCR MasterMix(SYBR Green)对总 RNA 进行逆转录。然后用 Prime Script RT Master Mix 试剂盒(Takara Bio)进行 PCR 扩增。扩增系统:10 μLSYBR qPCR 混合物,0.8 μL 正向和反向引物,2 μL cDNA 产物,0.4 μL 50 倍 ROX 参照染料,用双蒸水补至 20 μL。PCR 反应条件:95℃预变性 35 s,94℃变性 30 s,60℃退火 40 s,72℃延伸 30 s,共 40 个循环。引物由 Sangon 生物工程有限公司开发并合成,引物序列见表 1, GAPDH 作为内部参照,通过 2^{-ΔΔCt} 计算 miR-210 和 miR-451 的相对表达水平。

表1 miR-210和miR-451的引物序列

基因	位置	序列
miR-210	正向	5'-GTGCAGGGGTCCGAGGT-3'
	反向	5'-TATCTGTGCGTGACAGCGGCT-3'
miR-451	正向	5'-CACCTATCGTGCTGAAGTT-3'
	反向	5'-GAATGCACTGCACAATATT-3'
GAPDH	正向	5'-TTGCCATCAATGACCCCTTCA-3'
	反向	5'-CGCCCCACTTGATTTTGGGA-3'

1.3 统计学方法 应用 SPSS 24.0 软件对数据进行统计分析,符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间均数比较采用 *t* 检验。偏态分布计量资料以 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示,使用 Mann-Whitney *U* 检验。计数资料以百分比表示,采用 χ^2 检验。使用受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线分析 miR-210 和 miR-451 在 CHD-PAH 中的诊断价值。使用 Pear-

son 相关分析 miR-210 和 miR-451 与 BNP、ADMA 和 mPAP 的相关性,多元 logistic 回归分析进一步确定与 CHD-PAH 相关的危险因素。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患儿一般资料比较 两组患儿性别、年龄、TC、TG、AST、ALT、BUN 和 SCr 水平比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。CHD-PAH 组患儿血清 BNP、ADMA 水平, mPAP 和 PVR 均高于 CHD 组, PCWP 低于 CHD 组, 差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

2.2 两组患儿血清 miR-210 和 miR-451 水平比较 CHD-PAH 组患儿外周血 miR-210 表达水平为(0.94±0.12), miR-451 为(1.33±0.49); CHD 组患儿外周血 miR-210 表达水平为(1.36±0.57), miR-451 为(3.52±1.23), 差异均有统计学意义($t=5.617, P<0.001; t=12.793, P<0.001$)。

2.3 miR-210 和 miR-451 单独或联合检测对 CHD-PAH 的诊断价值 以右心导管检查的诊断结果为金标准,以 CHD-PAH 患儿为对象,分别以 miR-210 和 miR-451 为检验变量,绘制 ROC 曲线,结果显示,联合诊断的曲线下面积为 0.840,高于 miR-210 和 miR-451 单一指标,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表 3、图 1。

2.4 miR-210 和 miR-451 水平的相关性分析 Pearson 相关分析显示,CHD-PAH 患儿外周血 miR-210 水平与 BNP、ADMA 和 mPAP 均呈负相关($r=-0.424, P=0.002; r=-0.535, P=0.001; r=-0.282, P=0.041$), miR-451 水平与 BNP、ADMA 和 mPAP 均呈负相关($r=-0.326, P=0.015; r=-0.628, P=0.001; r=-0.478, P=0.005$)。

2.5 影响患儿发生 CHD-PAH 的多元 logistic 回归分析以一般资料中差异有统计学意义的 BNP(实际值)、ADMA(实际值)、mPAP(实际值)、PCWP(实际值)、PVR(实际值)、miR-210(赋值: $<1.12=1, >1.12=0$)和 miR-451(赋值: $<2.52=1, >2.52=0$)为自变量,以是否发生 CHD-PAH(赋值:是=1,否=0)为因变量,采用条件-进入法进行多元 logistic 回归分析,结果显示,miR-210 <1.12 、miR-451 <2.52 和 PVR 升高是 CHD-PAH 发病的危险因素。见表 4。

3 讨论

左向右分流型 CHD 是儿童最常见的 CHD 类型, PAH 是此类患儿常见的晚期表现,可导致右心衰竭甚

表 2 两组患儿一般资料比较($\bar{x}\pm s$)

指标	CHD组(n=53)	CHD-PAH组(n=61)	t/Z/ χ^2 值	P值
年龄(月)	36(29,66)	35(22,54)	1.012	0.303
性别(男/女,例)	27/26	33/28	0.113	0.736
疾病类型(ASD/VSD/PDA,例)	22/19/12	26/21/14	0.026	0.987
TC(mmol/L)	4.9(3.7,6.0)	4.5(3.8,5.7)	0.825	0.673
TG(mmol/L)	1.4(0.9,2.5)	1.3(0.4,2.3)	0.494	0.836
AST(U/L)	19.85±8.43	20.72±8.23	0.557	0.579
ALT(U/L)	22.52±8.37	23.25±10.46	0.407	0.685
BUN(mmol/L)	5.10±1.56	5.31±1.12	0.833	0.407
SCr(μ mol/L)	53.58±7.88	56.42±10.76	1.587	0.115
BNP(μ g/L)	135.47±14.16	276.62±47.53	20.821	<0.001
ADMA(μ mol/L)	4.34±1.32	6.37±2.22	5.821	<0.001
mPAP(mmHg)	19.05±6.26	39.75±10.59	12.460	<0.001
PCWP(mmHg)	21.79±6.63	9.83±3.64	12.144	<0.001
PVR(WU)	2.03±0.19	11.14±6.03	10.987	<0.001

注:TC为总胆固醇,TG为三酰甘油,AST为谷草转氨酶,ALT为谷丙转氨酶,BUN为尿素氮,SCr为肌酐,BNP为脑钠肽,ADMA为不对称二甲基精氨酸,mPAP为平均肺动脉压,PCWP为肺毛细血管楔压,PVR为肺血管阻力。

表 3 miR-210 和 miR-451 单独或联合的 ROC 曲线分析

指标	临界值	灵敏度(%)	特异度(%)	曲线下面积	95%CI	P值
miR-210	1.12	73.48	70.29	0.737	0.702~0.827	<0.001
miR-451	2.52	71.40	60.26	0.725	0.698~0.752	<0.001
联合	-	86.79	68.85	0.840	0.803~0.882	<0.001

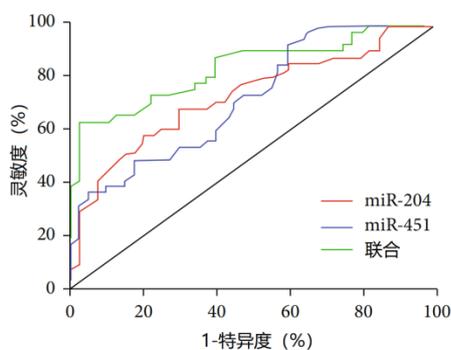


图 1 miR-210 和 miR-451 单独或联合诊断 CHD-PAH 的 ROC 曲线

至死亡。右心导管检查是 CHD-PAH 诊断的金标准,但该检查具有一定的侵入性,临床应用受到限制。PAH 的病理生理学表现与各种 miRNA 的差异表达密切相关^[8-9],且 miRNA 检测简便,损伤风险较低,有利于大规模筛查,提高诊疗效率,更具有实用性和可操作性。

本研究结果显示,CHD-PA 组患儿血清 BNP、ADMA 水平高于 CHD 组,与以往研究^[10]结果一致。BNP 主要由心室肌细胞合成和分泌,参与调节血压、血容量和水盐平衡,是反映心脏功能的标志物^[11]。ADMA 是一种内源性一氧化氮合酶抑制剂,可诱导内皮功能障碍,在心血管疾病的发生和发展中起着重要作用^[12]。

表 4 影响患儿发生 CHD-PAH 的多元 logistic 回归分析

变量	回归系数	标准误	Wald χ^2 值	OR 值	95%CI	P 值
BNP	0.279	0.743	1.537	1.347	0.947~1.733	0.422
ADMA	1.876	0.422	0.970	1.286	0.819~3.211	0.539
mPAP	0.238	0.343	12.775	1.351	0.940~1.941	0.074
PCWP	0.826	0.148	1.275	2.023	0.424~3.420	0.164
PVR	3.167	0.649	2.227	6.097	3.124~5.011	<0.01
miR-210<1.12	3.455	0.729	2.554	3.783	1.226~5.103	<0.01
miR-451<2.52	3.145	0.608	2.139	2.686	1.189~4.856	<0.01
常数项	1.099	0.355	1.905	0.009	-	0.002

注:BNP为脑钠肽,ADMA为不对称二甲基精氨酸,mPAP为平均肺动脉压,PCWP为肺毛细血管楔压,PVR为肺血管阻力。

本研究结果显示,CHD-PAH组患儿外周血 miR-210和 miR-451 表达低于 CHD 组,CHD-PAH 组患儿外周血 miR-210、miR-451 表达与 BNP、ADMA 和 mPAP 呈负相关,与相关研究^[13-16]结果相似。本研究 ROC 曲线结果显示,miR-210 和 miR-451 的曲线下面积分别为 0.737 和 0.725,二者联合诊断的曲线下面积为 0.840,比单独诊断具有更高的价值,表明同时检测血清 miR-210 和 miR-451 表达水平可为 CHD-PAH 患儿的诊断提供帮助。

本研究结果显示,miR-210<1.12、miR-451<2.52 和 PVR 升高是 CHD-PAH 的危险因素。PAH 肺动脉平滑肌细胞中 miR-210 下调导致增殖-凋亡失衡,通过肺动脉平滑肌细胞中的 NFAT 和 HIF-1 激活,有助于远端肺动脉血管重塑^[17-18]。PVR 是评价肺循环血流动力学的静态指标,其改善与 6 分钟步行距离、世界卫生组织心功能分类和心脏指数的改善一致^[19]。青少年和儿童的 PVR 与成人相似,正常儿童的 PVR 通常小于 2WU,PVR>3WU 对毛细血管前肺动脉高压的诊断具有重要意义^[20]。

综上所述,CHD-PAH 患儿外周血 miR-210、miR-451 降低,miR-210 和 miR-451 联合检测对 CHD-PAH 具有较高的诊断价值,miR-210<1.12、miR-451<2.52 和 PVR 升高是 CHD-PAH 的危险因素。但本研究为单中心临床研究,样本量相对较小,还需要进一步的体内和体外研究。

参考文献

- [1] 高漫辰,张凤文,潘湘斌.《中国心血管健康与疾病报告 2019》先天性心脏病部分解读[J].中国胸心血管外科临床杂志,2021,28(4):384-387.
- [2] 孙晔,杨蕊华.炎症因子与先天性心脏病患儿肺动脉高压关系的研究进展[J].医学综述,2022,28(5):894-898.
- [3] 王婷霞.微小RNA在肺动脉高压发病中的作用研究进展[J].国际儿科学杂志,2018,45(5):345-348.
- [4] 冯莉莉,王朝华,李贺,等.扩张型心肌病血清 miR-210、β2-MG 及 TGF-β1 水平的表达及其临床意义[J].现代生物医学进展,2022,22(4):688-692,717.
- [5] 郭海旭,雷桅.microRNA 在肺动脉高压进展中作用及机制的研究进展[J].山东医药,2020,60(14):109-112.
- [6] 中华医学会小儿外科分会心脏学组,国家儿童医学中心心血管专科联盟.儿童先天性心脏病相关性肺高压诊断与治疗指南[J].中华小儿外科杂志,2022,43(11):966-980.
- [7] GALIE N,HUMBERT M,VACHIER Y J L,et al.2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension:the joint task force for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS): endorsed by:association for European Paediatric and Congenital Cardiology(AEPC),International Society for Heart and Lung Transplantation(ISHLT)[J].Eur Respir J,2015,46(4):903-75.
- [8] 张卫芳,徐菲,陶泽颖,等.微小RNA在肺动脉高压PASMCs表型转化中的研究进展[J].中国药理学通报,2022,38(4):506-511.
- [9] 潘婉,李伟,徐永君,等.先天性心脏病患儿血清微小RNA-148b-3p 表达水平及临床意义[J].陕西医学杂志,2022,51(3):334-337.
- [10] JI D,QIAO Y,GUAN X,et al.Serum miR-204 and miR-451 expression and diagnostic value in patients with pulmonary artery hypertension triggered by congenital heart disease[J].Comput Math Methods Med,2022,2022:94-108.
- [11] 李淑芬,李乐雯,官碧琪,等.AECPD 合并肺动脉高压患者动脉血气分析指标、BNP 及 PCT、D-D 变化[J].湖南师范大学学报(医学版),2022,19(3):105-108.
- [12] NI G H,CHENG J F,LI Y J,et al.Effect of profilin-1 on the asymmetric dimethylarginine-induced vascular lesion-associated hypertension[J].Kaohsiung J Med Sci,2022,38(2):149-156.
- [13] HUANG H,WU F,YANG J,et al.Increased plasma level of miR-210 as a potential diagnostic marker for chronic obstructive pulmonary disease induced pulmonary hypertension [J].Clin Lab,2020,66(6):1147-1155.
- [14] GHOLAMINEIAD A,ZARE N,DANA N,et al.A meta-analysis of microRNA expression profiling studies in heart failure[J].Heart Fail Rev,2021,26(4):997-1021.
- [15] LV X W,HE Z F,ZHU P P,et al.MiR-451-3p alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury by inhibiting MAP1LC3 B-mediated autophagy[J].Inflamm Res,2021,70(10-12):1089-1100.
- [16] FENG L,YANG X,LIANG S,et al.Silica nanoparticles trigger the vascular endothelial dysfunction and prethrombotic state via miR-451 directly regulating the IL6R signaling pathway [J].Part Fibre Toxicol,2019,16(1):16-27.
- [17] 邸金,刘彩霞.先天性心脏病伴肺动脉高压患儿血清 HIF-1α 和 miR-210 的动态变化及意义[J].中国妇幼保健,2021,36(5):1066-1070.
- [18] 郭海旭,雷桅.microRNA 在肺动脉高压进展中作用及机制的研究进展[J].山东医药,2020,60(14):109-112.
- [19] DENG J.Clinical application of pulmonary vascular resistance in patients with pulmonary arterial hypertension[J].J Cardiothorac Surg,2021,16(1):3-11.
- [20] RATWATTE S,ANDERSON J,STRANGE G,et al.Pulmonary arterial hypertension with below threshold pulmonary vascular resistance[J].Eur Respir J,2020,56(1):190-204.

(2022-12-19 收稿)

(本文编校:周雪春,张迪)