

·论 著·

血清外泌体 miR-125a-5p 和 miR-99b-5p 在心力衰竭诊断中的价值

杨丽 戴婷婷 刘丹 李鹏飞

[摘要] 目的 采用微阵列和荧光定量PCR(qRT-PCR)技术评估在心力衰竭中具有诊断效能的miRNA。方法 用微阵列探索心力衰竭患者血清中的miRNA表达谱,并用qRT-PCR方法检测候选miRNA的表达水平。然后,采用受试者工作特征(ROC)曲线分析候选miRNA的诊断价值。结果 与健康对照者相比,miR-125a-5p和miR-99b-5p在心力衰竭患者的血清外泌体中明显下调,其ROC曲线下面积(AUC)分别为0.73和0.72。此外,miR-125a-5p和miR-99b-5p的联合检测比单个miRNA具有更高的诊断价值,其AUC达到0.80。结论 miR-125a-5p和miR-99b-5p的表达水平在心力衰竭患者的血清外泌体中显著下调,可作为心力衰竭诊断的新型循环生物标志物。miR-125a-5p和miR-99b-5p联合后的诊断效能高于其单独使用。

[关键词] microRNA; 心力衰竭; 诊断标志物; 血清外泌体

The value of serum exosomes miR-125a-5p and miR-99b-5p in the diagnosis of heart failure YANG Li, DAI Tingting, LIU Dan, et al. Department of Critical Care Medicine, Zhenhai Hospital of Traditional Chinese Medicine, Ningbo 315200, China.

[Abstract] **Objective** We utilized microarray and quantitative PCR (qRT-PCR) techniques to evaluate the diagnostic potential of miRNAs in heart failure. **Methods** We used microarray to explore the miRNA expression profile in the serum of heart failure patients and evaluated the expression levels of candidate miRNAs using the qRT-PCR method. The diagnostic value of candidate miRNAs was analyzed using receiver operating characteristic (ROC) curve. **Results** Compared with the healthy control, miR-125a-5p and miR-99b-5p were downregulated in the serum exosomes of patients with heart failure, the areas under the ROC curve (AUC) was 0.73 and 0.72, respectively. Furthermore, the combined detection of miR-125a-5p and miR-99b-5p has higher diagnostic value than individual miRNAs, with an AUC of 0.80. **Conclusion** The expression levels of miR-125a-5p and miR-99b-5p are significantly downregulated in the serum exosomes of heart failure patients, potentially serving as novel circulating biomarkers for the diagnosis of heart failure. The diagnostic performance of miR-125a-5p combined with miR-99b-5p is higher than individual index.

[Key words] microRNA; heart failure; diagnostic biomarkers; serum exosomes

心力衰竭是由于心脏结构或功能异常导致心室充盈或射血能力受损的一组复杂临床综合征^[1]。

DOI: 10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2024.005.003

基金课题: 2020年镇海区公益类科技计划项目(2020S03)

作者单位: 315200 浙江宁波, 宁波市镇海中医医院重症医学科(杨丽、戴婷婷、李鹏飞), 呼吸内科(刘丹)

通讯作者: 李鹏飞, Email: 492490449@qq.com

传统上心力衰竭的诊断主要依赖临床表现、超声心动图和多种循环生物标志物^[2,3]。这些生物标志物也可在肾功能衰竭等患者中检测到^[3]。最新的研究表明微小RNA(microRNA, miRNA)与心力衰竭发生发展密切相关^[4]。然而关于外泌体miRNA作为心力衰竭诊断的标志物以及作用机制尚不明确。本研究拟通过对心力衰竭患者血清外泌体miRNA进行筛选, 探讨血清外泌体miRNA在心力衰竭诊疗中的潜

在临床应用价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本研究于2020年6月至2022年6月在宁波市镇海区中医医院收集了50例心力衰竭患者和50例健康对照者的血浆。本次研究得到了医院伦理委员会的批准。所有患者均签署了知情同意书。

1.2 数据库分析心力衰竭患者血液中差异表达的miRNA 通过分析GEO数据库中的GSE136547数据集得到差异表达的miRNA,将上调和下调最显著的20个miRNA进行聚类分析。

1.3 外泌体的分离 根据说明书步骤,使用总外泌体分离试剂盒(由美国Invitrogen生产)分离外泌体。首先将血浆在离心机中以3 000 r/min,4℃离心30 min以去除细胞和碎片。然后,取400 μL上清即血清转移至新离心管中,再加入80 μL的外泌体分离试剂。涡旋混匀后,在4℃下孵育30 min。孵育结束后将混合物在4℃,12 000 g条件下离心10 min。然后弃上清,加入磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)重悬外泌体。外泌体的大小经过粒径检测设备分析,保证其范围在40~100 nm之间。

1.4 电子显微镜检查 首先取20 μL新鲜分离的外泌体滴在铜网上,固定5 min后使用电子显微镜检查。再用2%磷钨酸溶液对样品进行染色,5 min后用干滤纸吸去多余的液体,再将样品放置于60 W白炽灯下烘烤4 min。最后使用Tecnai Spirit G2 BioTWIN透射电子显微镜(由美国FEI公司生产)观察样品,拍照记录。

1.5 蛋白质印迹法 按照说明书的步骤使用BCA试剂盒(由中国新赛美生产)对血浆外泌体进行蛋白质定量,向外泌体中加入0.25倍体积上样缓冲液(由中国索莱宝生产),混匀后100℃煮沸5 min,使用10% SDS-PAGE(由中国新赛美生产)分离蛋白质,然后将分离的蛋白质转移到PVDF膜(由美国密理博生产)上,使用5%的脱脂奶粉(由中国索莱宝生产)封闭后使用TBST溶液(由中国索莱宝生产)洗膜,分别加入一抗CD9(由美国Abcam生产)和CD63(由美国Abcam生产),4℃下孵育过夜。使用TBST溶液洗膜后再加入兔二抗(由美国Abcam生产),室温下孵育1 h,使用ECL化学发光液(由美国advansta生产)显色,拍照记录。

1.6 RNA提取 按照步骤使用TRIzol LS(由美国

ambion生产)试剂提取血清RNA。首先,往250 μL血清中加入750 μL的TRIzol LS,充分涡旋混匀后在4℃,12 000 g条件下离心10 min,将上清转移至新离心管中,再加入200 μL氯仿,涡旋混匀后在4℃下静置5 min,4℃,12 000 g条件下离心15 min。将上清转移至新离心管中,再加入500 μL异丙醇(由中国沪试生产),颠倒混匀后在4℃下静置10 min,在4℃,12 000 g条件下离心5 min。弃上清后用75%乙醇洗涤沉淀,最后用无酶水溶解沉淀,并用超微量分光光度计检测RNA浓度。

1.7 实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 使用NovoScript® Plus All-in-one 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix试剂盒将RNA逆转录为cDNA,然后用NovoStart®SYBR qPCR SuperMix plus进行qPCR检测。以GAPDH为内参,使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法对数据进行统计分析。

1.8 稳定性测试 首先将提取的RNA分别置于25℃、4℃、-20℃、-80℃环境中,通过qRT-PCR检测miR-99b-5p和miR-125a-5p的表达,再通过冻存0、4、8、16、32 h后继续检测miR-99b-5p和miR-125a-5p的表达。

1.9 统计学方法 使用GraphPad 9.0软件对实验数据进行统计分析(每个实验至少重复三次)。采用非参数检测方法检验心力衰竭患者和健康对照者血液中miRNA的表达差异。受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线用于评估miRNA在心力衰竭样本中的诊断效率,Z检验用于比较曲线下面积(area under curve, AUC)。设 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GEO数据库分析心力衰竭患者血液中差异表达的miRNA 见封二图1

由封二图1可见,通过GEO数据库分析,发现了心力衰竭患者血液中差异表达的miRNA。

2.2 候选miRNA的表达谱分析 为了确定最稳定和可靠的候选miRNA,基于封二图1B的聚类结果,结合文献搜索,本次研究选择了5个miRNA作为候选分子。qRT-PCR检测5个候选miRNA分子在20例心力衰竭患者血清外泌体中的表达,见图1。

由图1可见,miR-99b-5p和miR-125a-5p在心力衰竭患者血清外泌体中的表达比健康对照者血

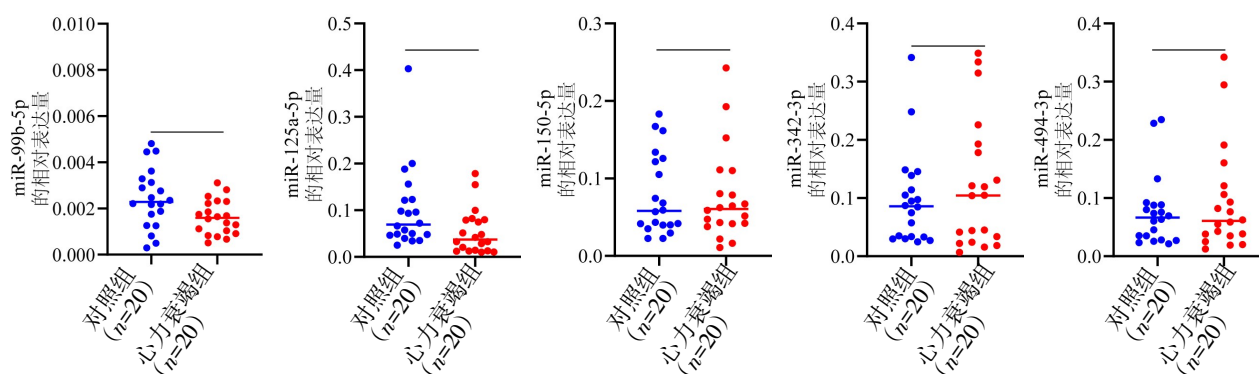


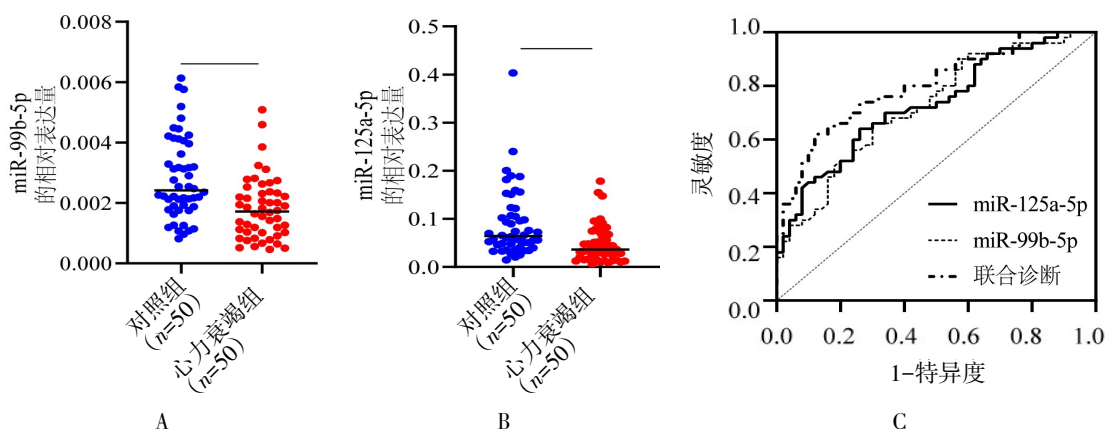
图1 5个候选miRNA在血清外泌体中的表达

清外泌体中显著降低,而其他三个分子并没有显著差异。

2.3 血清外泌体的检测鉴定 为了评估外泌体质量,分离得到血清外泌体后,通过电子显微镜观察外泌体的形态和大小(见封二图2A),并通过Western blot检测血清外泌体标志物的CD9和

CD63的表达水平(见封二图2B),结果表明外泌体质量良好。

2.4 miRNA的诊断价值 为了研究miR-99b-5p和miR-125a-5p的诊断价值,本次研究采用qPCR检测了50例样本中的表达量,并进行了ROC分析,见图2。



注:A:血清外泌体中miR-99b-5p的表达;B:血清外泌体中miR-125a-5p的表达;C:miR-99b-5p和miR-125a-5p联合诊断ROC曲线。

图2 miRNA的诊断价值

由图2可见,miR-99b-5p和miR-125a-5p的AUC值分别为0.72和0.73,表明检测方法是有效的,两者联合诊断的AUC值为0.80,更具准确性。

2.5 miR-99b-5p和miR-125a-5p的稳定性实验 见图3、4

由图3、4可见,将提取的RNA分别在25℃、4℃、-20℃和-80℃存放,检测得到的Ct值无显著变化,存放0、4、8、16、32h也无明显变化,反复冻融也不明显影响Ct值,表明miR-99b-5p和miR-125a-5p能稳定存在。

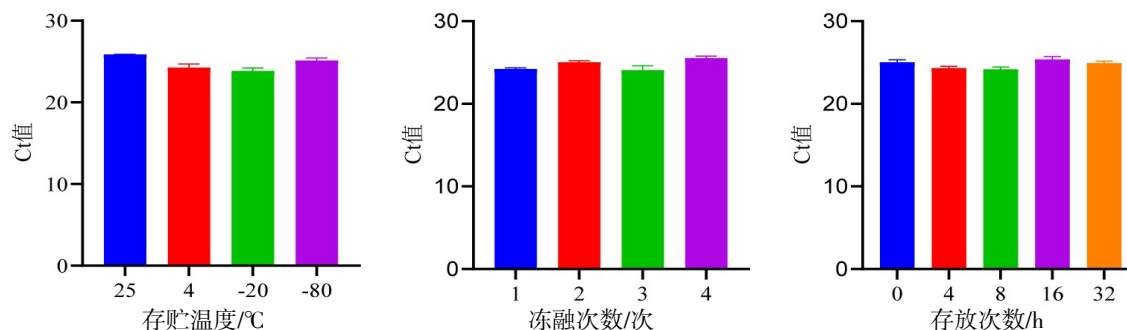


图3 miR-99b-5p的稳定性实验

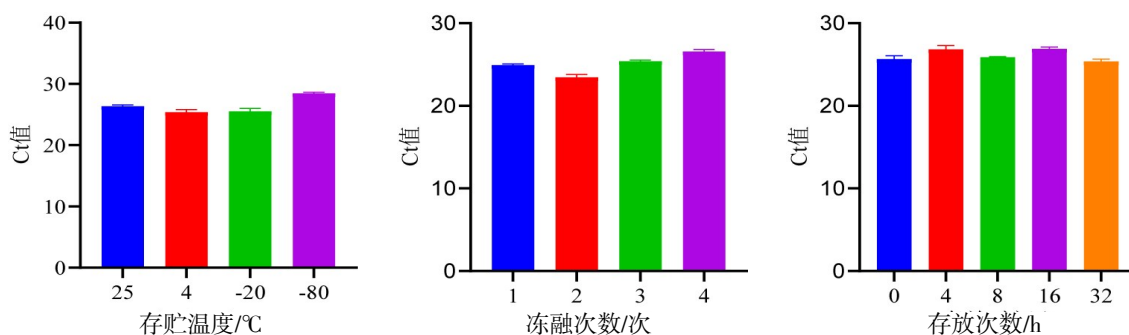


图4 miR-125a-5p的稳定性实验

3 讨论

心力衰竭通常是由心肌梗死或缺血性心肌病导致的心肌损伤和坏死引起的。此外,心脏压力或容量超负荷等多种原因引起的心肌结构和功能异常也是引发心力衰竭的重要原因之一。这些异常容易导致心脏的射血或充盈松弛功能障碍,从而引发一系列复杂的临床综合征。一般认为这是各种心血管疾病的终末阶段^[5,6]。近年来的实验研究表明,miRNA在心力衰竭的发展过程中起着重要作用,特别是在心肌细胞肥大、心肌纤维化、心肌损伤和凋亡、心肌电重构等方面。因此,miRNA有可能成为心力衰竭诊断的重要生物标志物,并为心力衰竭的治疗提供新的靶向。

最近,外泌体miRNA作为疾病的新型生物标志物受到了广泛的关注,并已被证明对病理生理学进展有重大影响^[7]。同时,miRNA在外泌体中的富集和稳定性表明其作为疾病标志物的潜力。有研究表明,Xie等^[8]发现,miR-27a在心力衰竭患者外周血外泌体中的表达水平明显高于健康对照组,miR-27a在慢性心力衰竭诊断中的AUC为0.835,具有较高的诊断价值。尽管如此,关于外泌体miRNA在心力衰竭诊断中的研究仍然很少。本次研究从GEO数据中提取了5个差异表达的miRNA(即miR-99b-5p、miR-125a-5p、miR-342-3p、miR-494-3p和miR-150-5p)进行验证,结果显示,miR-125a-5p和miR-99b-5p的表达水平在心力衰竭患者血清外泌体中显著下调,其余3个miRNA的表达水平在两组间均无明显差异,这提示血清外泌体miR-125a-5p和miR-99b-5p有可能成为心力衰竭的诊断标志物。

本次研究通过ROC曲线评估血清外泌体miR-125a-5p和miR-99b-5p在心力衰竭中的诊断价值,结果表明miR-125a-5p和miR-99b-5p有较高的诊断效能,AUC分别为0.73和0.72。两者联合诊断时其AUC为0.80,能较好区分心力衰竭和健康人群,而且其诊断效能高于单独使用miR-125a-5p和

miR-99b-5p。miR-125a-5p作为疾病的早期诊断标志物已有相关的报道。Li等^[9]研究发现miR-125a-5p可作为胃癌早期诊断的标志物,且与肿瘤的分期密切相关。Li等^[10]研究发现血浆外泌体miR-125a-5p和miR-141-5p可作为前列腺癌诊断生物标志物,并与前列腺特异性抗原的表达呈正相关。除了作为疾病的诊断标志物,miR-125a-5p还在多种疾病的发生和发展过程中扮演着重要的角色。Xu等^[11]研究发现miR-125a-5p通过靶向PTPN1和MAP3K11并激活JNK/MAPK信号通路,抑制肝癌细胞增殖,诱导细胞凋亡。Zhang等^[12]研究发现miR-125a-5p通过靶向FUT4抑制膀胱癌的进展。因此推测血清外泌体miR-125a-5p可能通过调控某些信号通路参与心力衰竭的发生发展。

在本研究中,血清外泌体miR-99b-5p是另一个表达下调的诊断标志物,而在其他疾病中miR-99b-5p也具有诊断价值。Ning等^[13]研究发现,miR-99b-5p可作为结直肠癌早期诊断的标志物,并与肿瘤的预后相关。这也为未来的研究提供了一个方向,以进一步了解其在心力衰竭中的作用机制。

与此同时,外泌体miRNA显示出良好的诊断性能,不仅因为其高特异性和敏感性,还因为其自身的结构和在血液中的稳定性。本次研究通过在室温下长期储存,反复冷冻和解冻实验发现,外泌体miRNA的表达水平都不会改变。

本研究存在一定的不足。首先,miR-125a-5p和miR-99b-5p只在50对心力衰竭患者和健康对照中进行验证,需要进一步扩大样本量,提高数据的可信度。其次,由于临床病理因素的部分缺失,miR-125a-5p和miR-99b-5p的表达与临床的相关性未进行研究。这些不足是下一步的研究方向。

综上所述,血清外泌体miR-125a-5p和miR-99b-5p有望作为心力衰竭的无创诊断标志物,且具有较高的诊断效能。

(下转第420页)

- gy, microbiology, and risk factors associated with mortality and multi-drug resistance[J]. *BMC Infect Dis*, 2021, 21(1): 636.
- 2 Himmelsbach V, Knabe M, Ferstl PG, et al. Colonization with multidrug-resistant organisms impairs survival in patients with hepatocellular carcinoma[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2022, 148(6): 1465-1472.
 - 3 Chen Y, Chen X, Liang Z, et al. Epidemiology and prediction of multidrug-resistant bacteria based on hospital level[J]. *J Glob Antimicrob Resist*, 2022, 29: 155-162.
 - 4 Tan PY, Huo M, Zhou XH, et al. Development and validation of a nomogram for predicting the risk of nursing home-acquired pneumonia[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2022, 26(22): 8276-8288.
 - 5 Jabłońska B, Mrowiec S. Nutritional status and its detection in patients with inflammatory bowel diseases[J]. *Nutrients*, 2023, 15(8): 1991.
 - 6 Cao J, Xu H, Li W, et al. Nutritional assessment and risk factors associated to malnutrition in patients with esophageal cancer[J]. *Curr Probl Cancer*, 2021, 45(1): 100638.
 - 7 黄勋, 宗志勇, 刘正印, 等. 多重耐药菌医院感染预防与控制中国专家共识[J]. *中国感染控制杂志*, 2015, 14(1): 1-9.
 - 8 中华人民共和国卫生部. 医院感染诊断标准(试行)[S]. *中华医学杂志*, 2001, 87(5): 61-67.
 - 9 Narala S, Li SQ, Klimas NK, et al. Application of least absolute shrinkage and selection operator logistic regression for the histopathological comparison of chondrodermatitis nodularis helices and hyperplastic actinic keratosis[J]. *J Cutan Pathol*, 2021, 48(6): 739-744.
 - 10 Ito M, Kuga Y, Yamagishi T, et al. Evaluation of secondary ions related to plant tissue using least absolute shrinkage and selection operator[J]. *Biointerphases*, 2020, 15(2): 021010.
 - 11 Redden MD, Chin TY, van Driel ML. Surgical versus non-surgical management for pleural empyema[J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2017, 3(3): CD10651.
 - 12 Palacios-Baena ZR, Giannella M, Manissero D, et al. Risk factors for carbapenem-resistant Gram-negative bacterial infections: A systematic review[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2021, 27(2): 228-235.

(收稿日期 2023-11-10)

(本文编辑 葛芳君)

(上接第395页)

参考文献

- 1 Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B, et al. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: A report of the American college of cardiology foundation/American heart association task force on practice guidelines[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2013, 62(16): e147-239.
- 2 Baman JR, Ahmad FS. Heart failure[J]. *JAMA*, 2020, 324(10): 1015.
- 3 Pourafkari L, Tajlil A, Nader N D. Biomarkers in diagnosing and treatment of acute heart failure[J]. *Biomark Med*, 2019, 13(14): 1235-1249.
- 4 Hulot JS, Masurkar N. miRNA-based therapeutics for heart failure: Why not? [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2020, 75(15): 1801-1803.
- 5 Kennel PJ, Schulze PC. A review on the evolving roles of MiRNA-based technologies in diagnosing and treating heart failure[J]. *Cells*, 2021, 10(11): 3191.
- 6 Boorsma EM, Ter Maaten JM, Damman K, et al. Congestion in heart failure: A contemporary look at physiology, diagnosis and treatment[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2020, 17(10): 641-655.
- 7 Lakshmi S, Hughes TA, Priya S. Exosomes and exosomal RNAs in breast cancer: A status update[J]. *Eur J Cancer*, 2021, 144: 252-268.
- 8 Xie Y, Hang JZ, Zhang N, et al. Clinical significance of MiR-27a expression in serum exosomes in patients with heart failure[J]. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2022, 67(5): 324-331.
- 9 Li RX, Hu ZH, Wang ZY, et al. miR-125a-5p promotes gastric cancer growth and invasion by regulating the Hippo pathway[J]. *J Clin Lab Anal*, 2021, 35(12): e24078.
- 10 Li W, Dong Y, Wang KJ, et al. Plasma exosomal miR-125a-5p and miR-141-5p as non-invasive biomarkers for prostate cancer[J]. *Neoplasma*, 2020, 67(6): 1314-1318.
- 11 Xu X, Tao Y, Niu Y, et al. miR-125a-5p inhibits tumorigenesis in hepatocellular carcinoma[J]. *Aging*, 2019, 11(18): 7639-1662.
- 12 Zhang YL, Zhang DH, Lv J, et al. MiR-125a-5p suppresses bladder cancer progression through targeting FUT4 [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 108: 1039-1047.
- 13 Ning SF, Chen YS, Li SR, et al. Exosomal miR-99b-5p secreted from mesenchymal stem cells can retard the progression of colorectal cancer by targeting FGFR3[J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2023, 19(8): 2901-2917.

(收稿日期 2023-11-14)

(本文编辑 葛芳君)