

· 论著 ·

他汀类药物对冠心病患者循环微小 RNA-92a 表达的影响

王虹 陆红梅 阳文辉 罗程 陆山河 周莹 林英忠

【摘要】 目的 探讨他汀类药物对冠心病患者循环微小 RNA-92a(miR-92a)的调节作用,评价 miR-92a 作为新血管内皮损伤治疗靶点的临床应用价值。**方法** 采用病例对照研究方法,分析 236 例冠心病患者的血脂异常率、他汀类药物治疗率以及治疗后低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)达标率;多因素方差分析他汀类药物对合并 2 型糖尿病(DM)冠心病患者 LDL-C 及循环 miR-92a 表达的影响,比较各组治疗后急性冠脉综合征(ACS)的发生率。**结果** 冠心病非他汀类药物治疗患者 LDL-C 未达标率高达 95.7%(112/117),应获得而未得到他汀类药物治疗者占 47.5%(112/236);他汀类药物治疗者 LDL-C 达标率为 27.7%(33/119)。冠心病他汀类药物治疗组 LDL-C(mmol/L)显著低于非治疗组(2.457 ± 0.802 比 3.218 ± 1.130 , $Z = -9.760$, $P = 0.001$),ACS 发生率也显著低于非治疗组(33.6% 比 71.8%, $\chi^2 = 34.491$, $P = 0.001$)。在他汀类药物治疗组中,LDL-C 达标者与未达标者 ACS 发生率无明显差异(33.3% 比 33.7%, $\chi^2 = 0.002$, $P = 0.968$)。稳定型心绞痛(SAP)合并 DM 患者循环 miR-92a 表达显著高于未合并 DM 者(0.492 比 -0.121, $Z = -3.038$, $P = 0.002$);他汀类药物治疗的 SAP 合并 DM 者循环 miR-92a 表达低于非治疗者(0.419 比 0.687, $Z = 1.289$, $P = 0.072$);他汀类药物治疗的 SAP 未合并 DM 患者与非治疗者循环 miR-92a 表达差异无统计学意义(-0.032 比 -0.198, $Z = -0.614$, $P = 0.539$)。多因素方差分析显示:他汀类药物是影响冠心病患者 LDL-C 水平的主要因素($F = 22.863$, $P = 0.001$),合并 DM 是影响 SAP 患者循环 miR-92a 表达的主要因素($F = 9.641$, $P = 0.003$)。**结论** 他汀类药物通过调控循环 miR-92a 表达,对减轻冠心病患者的血管内皮损伤可能具有临床意义。

【关键词】 冠心病; 他汀类药物; 糖尿病; 微小 RNA-92a; 急性冠脉综合征

The influence of statin therapy on circulating microRNA-92a expression in patients with coronary heart disease WANG Hong*, LU Hong-mei, YANG Wen-hui, LUO Cheng, LU Shan-he, ZHOU Ying, LIN Ying-zhong.

*Department of Cardiovascular Disease, Guangxi People's Hospital, Nanning 530021, Guangxi, China

Corresponding author: LIN Ying-zhong, Email: yingzhonglin@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the modulatory function of statin therapy on circulating microRNA-92a (miR-92a) in patients with coronary heart disease (CHD), and to evaluate the possibility of miR-92a as a new target of treatment for endothelial dysfunction. **Methods** A case control study was conducted. Prevalence of abnormal blood fat content, statin treatment rate, and attainment rate of low density lipoprotein-cholesterol (LDL-C) lowered to expected level in 236 patients with CHD were analyzed. Relationship between statin therapy in patients with type 2 diabetes mellitus (DM), and level of LDL-C and circulating miR-92a expression was analyzed by multivariate general linear factorial analysis. The incidence of acute coronary syndrome (ACS) was compared in patients with CHD receiving statin therapy in all groups. **Results** Prevalence of abnormal LDL-C was 95.7% (112/117) in CHD patients of non-statin therapy group, and 47.5% (112/236) of patients with CHD who should receive statin therapy but did not. Attainment rate of lowering of LDL-C to expected level in statin therapy group was 27.7% (33/119). LDL-C level (mmol/L) was significantly lower in statin therapy group than that in non-statin therapy group (2.457 ± 0.802 vs. 3.218 ± 1.130 , $Z = -9.760$, $P = 0.001$), and incidence of ACS was significantly lower in statin therapy group than that in non-statin therapy group (33.6% vs. 71.8%, $\chi^2 = 34.491$, $P = 0.001$). There was no significant difference in incidence of ACS between patients with or without attaining the expected low value of LDL-C in statin therapy group (33.3% vs. 33.7%, $\chi^2 = 0.002$, $P = 0.968$). Circulating miR-92a expression was significantly higher in patients with stable angina pectoris (SAP) complicated with DM than those without DM (0.492 vs. -0.121, $Z = -3.038$, $P = 0.002$). It was found that statin therapy could down regulate miR-92a expression in patients with SAP complicated with DM as compared with that with non-statin therapy (0.419 vs. 0.687, $Z = 1.289$, $P = 0.072$). There was no significant difference in circulating miR-92a expression between statin therapy and non-statin therapy in patients with SAP without co-existing DM (-0.032 vs. -0.198, $Z = -0.614$, $P = 0.539$). Multivariate general linear factorial analysis showed that statin therapy was the major influential factor on LDL-C level in patients with CHD ($F = 22.863$, $P = 0.001$), and complicating DM was the major influential factor on circulating miR-92a expression in patients with SAP ($F = 9.641$, $P = 0.003$). **Conclusion** Regulation of circulating miR-92a expression may be considered as a new clinical target for statin treating endothelial dysfunction in patients with CHD.

【Key words】 Coronary heart disease; Statin; Diabetes mellitus; MicroRNA-92a; Acute coronary syndrome

微小 RNA (microRNAs, miRs) 是近年发现的影响细胞内基因表达的重要调节器, miRs 与炎症反应过程及内皮功能关系密切^[1-2], 其中 miR-92a 过表达可减少抗动脉粥样硬化血流调控性转录因子 (KLF2) 表达^[3]。KLF2 是内皮系统形成及血管功能稳定的关键调控因子^[4], 在 mRNA 及蛋白质水平调控内皮型一氧化氮合酶 (eNOS) 及血栓调节蛋白 (TM)^[5], 进而引发炎症反应, 促进炎症细胞与内皮细胞的黏附和血栓形成。他汀类药物能有效控制心血管事件发生。本研究中通过分析比较他汀类药物治疗冠心病患者的血脂水平与急性冠脉综合征 (ACS) 发生率的关系, 以及对循环 miR-92a 表达的影响, 探讨冠心病的有效治疗方法。

1 资料和方法

1.1 研究对象: 采用病例对照研究方法, 选择 2010 年 3 月至 2011 年 3 月在本院心内科住院的冠心病患者 236 例, 其中 ACS 124 例 [包括急性心肌梗死 (AMI) 81 例, 不稳定型心绞痛 (UAP) 43 例], 稳定型心绞痛 (SAP) 112 例; 合并 2 型糖尿病 (DM) 60 例。心绞痛诊断依据文献^[6-7]标准; ST 段抬高型心肌梗死 (STEMI) 诊断依据文献^[8]标准; DM 诊断依据文献^[9]标准。排除 1 型 DM、恶性肿瘤、外周血管病变、增生性视网膜病变、炎症、急性出血、有输血史及使用促红细胞生成素者、绝经前妇女。

本研究经医院伦理委员会审议后同意实施, 患者均签署知情同意书。

1.2 分组及他汀类药物治疗: 患者在入院前一直未间断服用他汀类药物者归为他汀组; 入院前从未服用他汀类药物或者此次发病前停药 1 周以上者归为非他汀组。入院后服用他汀类药物种类为阿托伐他汀、辛伐他汀、瑞舒伐他汀、普伐他汀、氟伐他汀, 按药物使用说明要求服用至患者出院。在入院前连续服用他汀类药物的时间平均 2 个月 (最长 1 年, 最短 1 个月)。

1.3 检测指标及方法: 入组病例入院后次日晨取样测定循环 miRNA-92a 及血脂指标低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C)。

1.3.1 血脂测定: 入院后禁饮酒、高脂膳食, 于次日清晨采集空腹 12 h 以上静脉血, 检测 LDL-C, 以

LDL-C < 1.8 mmol/L 判定为 LDL-C 达标^[10]。

1.3.2 循环 miR-92a 测定: TRIzol 试剂购自美国 Invitrogen 公司, miR-92a、内参基因 snRNA U6 引物及定量聚合酶链反应 (PCR) 检测试剂盒购自美国 GeneCopoeia 公司; 细胞梯度分离液购自美国 Sigma 公司。分离外周血单个核细胞, 一步法抽提外周血单个核细胞总 RNA, 按试剂说明书操作; 实时逆转录-PCR (RT-PCR) 检测 miR-92a。以上由经验丰富的 PCR 实验技师专人操作, 采用双盲法, 结合扩增曲线及溶解曲线分析, 排除不合适的扩增样本, 将符合要求的 miR-92a 及 U6 荧光定量 PCR 原始数据输入系统自动分析获取 Ct 值, 取 2 次的平均值, 用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 miR-92a 的表达量, 以经 Johnson 转换后数值表示。

1.4 统计学处理: 使用 SPSS 17.0 软件进行统计分析, 正态分布计量资料用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 非正态分布用中位数 (四分位数) [$M(Q_L, Q_U)$] 表示; 计量资料用 F 检验, 若方差齐性检验 $P < 0.05$, 采用两个独立样本非参数检验; 计数资料用 χ^2 检验。以 LDL-C、miR-92a 为因变量, 对他汀类药物治疗、合并 DM 等因素的影响进行多因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组基本情况比较 (表 1): 他汀组 119 例, 非他汀组 117 例; 两组男性和老年人比例、合并症、既往史等比较差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$), 具有可比性。

表 1 是否采用他汀类药物治疗两组冠心病患者一般情况

组别	例数	男性 [例(%)]	≥60岁 [例(%)]	合并症[例(%)]		既往史[例(%)]	
				高血压	糖尿病	吸烟	冠心病
他汀组	119	86(72.3)	76(63.9)	78(65.5)	31(26.1)	43(36.1)	7(5.9)
非他汀组	117	85(72.6)	71(60.7)	75(64.1)	29(24.8)	36(30.8)	11(9.4)

2.2 他汀类药物治疗对冠心病患者 LDL-C 水平与 ACS 发生率的影响 (表 2): 冠心病患者非他汀组患者 LDL-C 未达标率 95.7% (112/117), 应获得而未得到他汀类药物治疗者占 47.5% (112/236); 他汀组患者 LDL-C 达标率 27.7% (33/119)。说明冠心病患者血脂异常率高, 近半数冠心病患者应获得而未得到他汀类药物治疗, 他汀类药物治疗率低, 他汀类药物治疗 LDL-C 达标率低。

他汀组 LDL-C 显著低于非他汀组 ($Z = -9.760$, $P = 0.001$); 他汀组未达标患者 LDL-C 水平显著低于非他汀组未达标患者 ($Z = -3.613$, $P = 0.001$)。表

明用他汀类药物调脂治疗冠心病患者能显著降低 LDL-C, 尽管 LDL-C 达标率低, 但他汀类药物未达标冠心病患者 LDL-C 水平显著低于非他汀类药物治疗者。

他汀组 ACS 发生率显著低于非他汀组 ($\chi^2=34.491, P=0.001$), 他汀组 LDL-C 达标者与未达标者 ACS 发生率比较差异无统计学意义 ($\chi^2=0.002, P=0.968$)。说明用他汀类药物调脂治疗冠心病可显著降低 ACS 事件发生; 他汀类药物治疗的冠心病患者尽管 LDL-C 不达标, ACS 发生率亦显著降低, 并且与他汀类药物治疗 LDL-C 达标者相近。

2.3 冠心病患者循环 miR-92a 表达 (表 2): 他汀组与非他汀组及他汀组和非他汀组中 LDL-C 达标者与未达标者循环 miR-92a 表达比较差异均无统计学意义, 说明循环 miR-92a 与 LDL-C 两者临床意义及影响因素不尽相同。

2.4 他汀类药物治疗对 SAP 合并 DM 患者循环 miR-92a 表达的影响 (表 3): SAP 合并 DM 组循环 miR-92a 表达上调, 并显著高于 SAP 未合并 DM 组 ($Z=-3.038, P=0.002$); 在 SAP 合并 DM 患者中, 他汀类药物治疗者循环 miR-92a 表达低于非他汀类药物治疗者 ($Z=1.289, P=0.072$), 说明 SAP 合并 DM 患者经过他汀类药物治疗后循环 miR-92a 表达下调; 在 SAP 未合并 DM 患者中, 他汀类药物治疗者与非他汀类药物治疗者循环 miR-92a 表达差异无统计学意义 ($Z=-0.614, P=0.539$)。

2.5 多因素方差分析: 以 LDL-C、循环 miR-92a 为因变量, 分析他汀类药物治疗、合并 DM 等因素对冠心病患者的影响。结果显示: 冠心病患者 LDL-C 水平主要受他汀类药物治疗的影响 ($F=22.863, P=0.001$); SAP 患者循环 miR-92a 表达的主要影响因素是 DM ($F=9.641, P=0.003$)。

3 讨论

血脂异常是冠心病的主要危险因素, 调脂治疗是防治冠心病的主要措施。ACS 的主要病理机制是

表 3 他汀类药物治疗 SAP 合并与未合并 DM 患者

		循环 miR-92a 表达比较				
组别	他汀类药物治疗	例数	miR-92a 表达情况			
			M	95%CI	最小值	最大值
SAP 合并 DM 组	总体	26	0.492 ^a	0.187, 1.007	-1.165	2.593
	接受	20	0.419	-0.003, 1.065	-1.165	2.593
	未接受	6	0.687	0.436, 1.200	0.492	1.274
SAP 未合并 DM 组	总体	71	-0.121	-0.304, 0.143	-1.992	2.241
	接受	51	-0.032	-0.270, 0.233	-1.547	2.241
	未接受	20	-0.198	-0.741, 0.262	-1.992	1.844

注: SAP: 稳定型心绞痛, DM: 糖尿病, miR-92a: 微小 RNA-92a,

95%CI: 95%可信区间; 与 SAP 未合并 DM 组比较, ^a $P<0.01$

动脉粥样硬化斑块破裂或侵蚀, 伴不同程度的血栓重叠形成或远端血管血栓形成。本研究以 LDL-C $< 1.8 \text{ mmol/L}$ (70 mg/dl) 为血脂达标的判定基准, 结果显示, 冠心病患者血脂异常率高, 他汀类药物治疗率低; 但经他汀类药物调脂治疗后 LDL-C 显著降低, ACS 发生率也显著低于未接受他汀类药物治疗者。Nicholls 等^[11]研究发现, 负荷剂量的他汀类药物可以使冠状动脉(冠脉)粥样斑块明显减退, 临床随机试验已证实他汀类药物可预防心血管事件^[12]。有数个重要的临床试验证实他汀类药物治疗 6 个月以上即可减少心脏事件^[13]。上述结果均表明, 他汀类药物治疗可显著降低冠心病患者 ACS 发生率, 提高冠心病患者他汀类药物受治率是治疗关键。

动脉粥样硬化血栓形成是一个源于脂质的全身免疫炎症反应。本研究结果显示, 尽管他汀类药物治疗冠心病患者 LDL-C 达标率不高 (27.7%), 但他汀类药物治疗 LDL-C 未达标冠心病患者 LDL-C 水平仍显著低于非他汀类药物治疗未达标者, ACS 发生率也明显降低, 与他汀类药物治疗 LDL-C 达标患者相近。这可能与他汀类药物独立于降脂作用之外的其他作用有关。有报道他汀类药物可增加血管 eNOS 的表达及活性, 继而使一氧化氮(NO)水平增高^[14]; 他汀类药物还可通过磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶(PI3K/Akt)途径增加内皮祖细胞(EPC)分化, 动员 EPC 从骨髓中进入外周循

表 2 是否采用他汀类药物治疗两组冠心病患者 LDL-C 达标情况及 ACS、SAP 发生率和循环 miR-92a 表达比较

组别	LDL-C 达标情况	LDL-C (mmol/L)		ACS 发生率 [% (例 / 例)]	SAP 发生率 [% (例 / 例)]	miR-92a			
		例数	$\bar{x} \pm s$			例数	M	Q _L	Q _U
他汀组	总体	119	2.457 $\pm$ 0.802 ^a	33.6 (40/119) ^a	66.4 (79/119)	104	-0.005	-0.549	0.628
	达标	33	1.522 $\pm$ 0.188	33.3 (11/ 33)	66.7 (22/ 33)	31	-0.063	-0.709	1.646
	未达标	86	2.816 $\pm$ 0.640 ^a	33.7 (29/ 86)	66.3 (57/ 86)	73	-0.005	-0.492	0.468
非他汀组	总体	117	3.218 $\pm$ 1.130	71.8 (84/117)	28.2 (33/117)	103	0.044	-0.592	0.516
	达标	5	1.278 $\pm$ 0.148	80.0 (4/ 5)	20.0 (1/ 5)	4	0.193	-1.482	0.342
	未达标	112	3.370 $\pm$ 0.963	71.4 (80/112)	28.6 (32/112)	99	-0.035	-0.592	0.516

注: LDL-C: 低密度脂蛋白胆固醇, ACS: 急性冠脉综合征, SAP: 稳定型心绞痛, miR-92a: 微小 RNA-92a; 与非他汀类药物组比较, ^a $P<0.01$

环,减少 EPC 的凋亡^[15-16],从而使 DM 患者心脏事件发生率降低。本研究结果同时也显示,他汀类药物治疗 LDL-C 达标的冠心病患者仍有 1/3 发生 ACS,提示冠心病患者 ACS 的发生除与脂质代谢障碍有关外,还与内皮功能损伤和障碍有关。

有研究发现,miRs 与炎症反应过程有密切的关系^[1-2]。DM 患者血管内皮功能损伤明显,进而导致动脉粥样硬化加重,增加冠心病发生风险^[17]。本课题组前期的研究显示,AMI 患者循环 miR-92a 上调,经皮冠状动脉介入术(PCI)患者循环 miR-92a 表达下调^[18]。本研究的多因素方差分析显示,冠心病患者 LDL-C 水平主要受他汀类药物因素影响;SAP 患者循环 miR-92a 表达的主要影响因素是 DM;SAP 合并 DM 患者 miR-92a 表达显著上调,表明循环 miR-92a 过表达与糖代谢异常有关。而经他汀类药物治疗后,SAP 合并 DM 患者循环 miR-92a 表达较非治疗者下调,SAP 未合并 DM 患者循环 miR-92a 表达与非治疗者差异无统计学意义,表明他汀类药物治疗可以使 SAP 合并 DM 患者的冠脉炎症反应和内皮损伤减轻,其机制可能是通过减少血管、内皮的黏附分子及核转录因子- κ B(NF- κ B)表达,抑制单核细胞与内皮细胞的黏附,从而减少血管内皮的损伤^[19-20];减少中性粒细胞和单核细胞的趋化效应,从而起到抑制炎症细胞聚集的作用^[21];还可能通过抑制巨噬细胞、淋巴细胞的生长和活性,减少炎症细胞生成白细胞介素-6(IL-6)、细胞间黏附分子-1(ICAM-1)等细胞因子减轻炎症反应^[22]。

综上所述,本研究结果提示,循环 miR-92a 水平可评价冠脉炎症及血管内皮功能,通过调控循环 miR-92a 改善血管内皮损伤可能具有临床应用价值。

参考文献

- [1] O'Connell RM, Rao DS, Baltimore D. MicroRNA regulation of inflammatory responses. *Annu Rev Immunol*, In press 2012.
- [2] Lee YH, Na HS, Jeong SY, et al. Comparison of inflammatory microRNA expression in healthy and periodontitis tissues. *Biocell*, 2011, 35:43-49.
- [3] Wu W, Xiao H, Laguna-Fernandez A, et al. Flow-dependent regulation of Krüppel-like factor 2 is mediated by microRNA-92a. *Circulation*, 2011, 124:633-641.
- [4] Nayak L, Lin Z, Jain MK. "Go with the flow": how Krüppel-like factor 2 regulates the vasoprotective effects of shear stress. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 15: 1449-1461.
- [5] Parmar KM, Larman HB, Dai G, et al. Integration of flow-dependent endothelial phenotypes by Krüppel-like factor 2. *J Clin Invest*, 2006, 116:49-58.
- [6] 中华医学会心血管病学分会, 中华心血管病杂志编辑委员会. 慢性稳定性心绞痛诊断与治疗指南. *中华心血管病杂志*, 2007, 35:195-206.
- [7] 中华医学会心血管病学分会, 中华心血管病杂志编辑委员会. 不稳定性心绞痛和非 ST 段抬高心肌梗死诊断与治疗指南. *中华心血管病杂志*, 2007, 35:295-304.
- [8] Thygesen K, Alpert JS, White HD. Universal definition of myocardial infarction. *Eur Heart J*, 2007, 28:2525-2538.
- [9] American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 2010, 33 Suppl 1:S62-69.
- [10] Reiner Z, Catapano AL, De Backer G, et al. ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: the Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS). *Eur Heart J*, 2011, 32:1769-1818.
- [11] Nicholls SJ, Ballantyne CM, Barter PJ, et al. Effect of two intensive statin regimens on progression of coronary disease. *N Engl J Med*, 2011, 365:2078-2087.
- [12] Nakamura M, Yamashita T, Yajima J, et al. Impact of early statin initiation on secondary prevention in Japanese patients with coronary artery disease. *J Cardiol*, 2011, 57:172-180.
- [13] Kizer JR, Madias C, Wilner B, et al. Relation of different measures of low-density lipoprotein cholesterol to risk of coronary artery disease and death in a meta-regression analysis of large-scale trials of statin therapy. *Am J Cardiol*, 2010, 105:1289-1296.
- [14] Berthe MC, Bernard M, Rasmussen C, et al. Arginine or citrulline associated with a statin stimulates nitric oxide production in bovine aortic endothelial cells. *Eur J Pharmacol*, 2011, 670:566-570.
- [15] Tousoulis D, Kaski JC, Antoniadis C, et al. Beneficial effects of statin treatment after myocardial infarction: is progenitor cell mobilization the missing link?. *Int J Cardiol*, 2008, 130:301-303.
- [16] Schmidt-Lucke C, Fichtlscherer S, Rössig L, et al. Improvement of endothelial damage and regeneration indexes in patients with coronary artery disease after 4 weeks of statin therapy. *Atherosclerosis*, 2010, 211:249-254.
- [17] Taslipinar A, Yaman H, Yilmaz MI, et al. The relationship between inflammation, endothelial dysfunction and proteinuria in patients with diabetic nephropathy. *Scand J Clin Lab Invest*, 2011, 71:606-612.
- [18] 王虹, 林英忠, 陆红梅, 等. ST 段抬高型心肌梗死患者循环 miRNA-92a 表达的研究. *中国危重病急救医学*, 2011, 23:718-722.
- [19] 胡长军. 他汀类药物在缺血性脑血管疾病中的研究进展. *中国中西医结合急救杂志*, 2011, 18:190-192.
- [20] 方玉强, 黄岚, 李爱民, 等. 循环内皮脂酶阳性细胞比例与超敏 C-反应蛋白在冠心病患者临床预后中的作用. *中国危重病急救医学*, 2007, 19:644-646.
- [21] Hsieh CH, Jeng SF, Hsieh MW, et al. Statin-induced heme oxygenase-1 increases NF- κ B activation and oxygen radical production in cultured neuronal cells exposed to lipopolysaccharide. *Toxicol Sci*, 2008, 102:150-159.
- [22] 方玉强, 何多芬, 杨成明, 等. 调脂和抗血小板治疗对内皮脂肪酶表达的影响. *中国危重病急救医学*, 2010, 22:663-665.

(收稿日期:2012-01-29)

(本文编辑:李银平)