

· 论著 ·

急性心肌梗死患者外周血内皮细胞微粒 miR-126 和线粒体成分及黏附分子表达水平及其临床意义研究

马艺萍¹, 袁玉娟², 尼格热·阿力木¹, 阿卜拉江·艾合麦提¹,
马清玉³, 帕丽达·玉山江¹, 穆叶赛·尼加提^{3*}

1.830000 新疆乌鲁木齐市, 新疆医科大学研究生院

2.830000 新疆乌鲁木齐市, 新疆维吾尔自治区人民医院心血管内科

3.830000 新疆乌鲁木齐市, 新疆维吾尔自治区人民医院急救中心

* 通信作者: 穆叶赛·尼加提, 主任医师/博士生导师; E-mail: muyassar11@aliyun.com

【摘要】 背景 急性心肌梗死(AMI)是全世界心血管疾病发病率和死亡率的主要原因, 尽管目前心肌坏死的生物标志物被广泛应用, 但 AMI 的发病率和死亡率仍然居高不下。**目的** 拟研究内皮细胞微粒(EMPs)内含 miR-126、线粒体成分、黏附分子的表达水平及临床意义。**方法** 纳入 2021 年 9 月—2022 年 9 月于新疆维吾尔自治区人民医院就诊的 AMI 患者 50 例、稳定性冠心病(SCAD)患者 50 例、健康者 50 例, AMI 患者和 SCAD 患者均在本院住院并接受冠状动脉介入治疗(PCI), 健康者均经过本院体检中心的评估。收集三组外周血标本及一般资料, 利用透射电镜观察微粒的形态, 流式细胞术鉴定 EMPs 水平, 荧光定量 PCR 检测 EMPs 中 miR-126 的表达, ELISA 检测 EMPs 中线粒体活性氧(ROS)及内含黏附分子[血管细胞黏附分子 1(VCAM-1)、细胞间黏附分子 1(ICAM-1)、E-选择素、P-选择素]的水平。**结果** 通过透射电镜观察到, 分离的 MPs 膜结构完整, 直径在 100~400 nm。与 Control 组相比, AMI 组血浆 EMPs 中 miR-126 表达水平下降($Z=4.979, P<0.001$), ROS 表达水平升高($Z=9.651, P<0.001$), VCAM-1 表达水平升高($Z=2.336, P=0.019$), ICAM-1 表达水平升高($Z=5.894, P<0.001$), E-选择素表达水平升高($Z=2.730, P=0.019$), P-选择素表达水平升高($Z=6.470, P<0.001$)。多因素 Logistic 回归分析结果显示, miR-126 表达水平降低($OR=0.026, 95\%CI=0.003-0.210, P=0.001$)是 AMI 的保护因素, ROS($OR=1.009, 95\%CI=1.005-1.013, P<0.001$)、P-选择素表达水平升高($OR=1.063, 95\%CI=1.022-1.105, P=0.002$)是 AMI 的危险因素。受试者工作特征曲线(ROC)显示, miR-126 诊断 AMI 的曲线下面积为 0.816, ROS 诊断 AMI 的曲线下面积为 0.892, P-选择素诊断 AMI 的曲线下面积为 0.728, miR-126、ROS、P-选择素联合诊断的曲线下面积为 0.950。**结论** EMPs 中 miR-126、ROS、P-选择素以及三者联合指标均对 AMI 有诊断价值, 并且三者联合指标诊断价值最高, 这表明其可能为 AMI 患者的潜在诊断指标。

【关键词】 急性心肌梗死; 内皮细胞; 微粒; miR-126; 线粒体; 黏附分子; 临床意义

【中图分类号】 R 541.4 **【文献标识码】** A DOI: 10.12114/j.issn.1007-9572.2024.0004

Levels of Endothelial Cell Microparticles miR-126, Mitochondrial Components and Adhesion molecules in Peripheral Blood of Patients with Acute Myocardial Infarction and Their Clinical Significance

MA Yiping¹, YUAN Yujuan², NIGERE Alimu¹, ABULAJIANG Aihemaiti¹, MA Qingyu³, PALIDA Yushanjiang¹, MUYESAI Nijati^{3*}

1.Department of Graduate, Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China

2.Department of Cardiology, People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830000, China

3.Xinjiang Emergency Center, People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830000, China

基金项目: 国家自然科学基金地区基金项目(82060076); 自治区研究生创新项目(XJ2023G202)

引用本文: 马艺萍, 袁玉娟, 尼格热·阿力木, 等. 急性心肌梗死患者外周血内皮细胞微粒 miR-126 和线粒体成分及黏附分子表达水平及其临床意义研究[J]. 中国全科医学, 2024. DOI: 10.12114/j.issn.1007-9572.2024.0004. [Epub ahead of print] [www.chinagp.net]

MA Y P, YUAN Y J, NIGERE Alimu, et al. Levels of endothelial cell microparticles miR-126, mitochondrial components and adhesion molecules in peripheral blood of patients with acute myocardial infarction and their clinical significance [J]. Chinese General Practice, 2024. [Epub ahead of print].

© Editorial Office of Chinese General Practice. This is an open access article under the CC BY-NC-ND 4.0 license.

*Corresponding author: MUYESAI Nijati, Chief physician/Doctoral supervisor; E-mail: muyassar11@aliyun.com

[Abstract] Background Acute myocardial infarction (AMI) is the leading cause of cardiovascular disease morbidity and mortality worldwide, and despite the widespread use of biomarkers for myocardial necrosis, morbidity and mortality of AMI remain high. **Objective** To investigate the expression levels and clinical significance of miR-126, mitochondrial components and adhesion molecules in endothelial microparticles (EMPs). **Methods** A total of 50 patients with AMI, 50 patients with stable coronary artery disease (SCAD) and 50 healthy subjects were enrolled in the People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region from September 2021 to September 2022. AMI patients and SCAD patients were hospitalized in our hospital and received percutaneous coronary intervention (PCI), and all healthy subjects were evaluated by the physical examination center of our hospital. Peripheral blood samples and general data of three groups were collected. The morphology of the microparticles (MPs) was observed by transmission electron microscopy (TEM), the level of EMPs was identified by flow cytometry, and the expression of miR-126 in EMPs was detected by fluorescence quantitative PCR. ELISA was used to detect the levels of mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and intracellular adhesion molecules [vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), E-selectin, and P-selectin] in EMPs. **Results** As observed by TEM, the membrane structure of the isolated MPs was intact and its diameter ranged from 100 to 400 nm. Compared with the control group, the expression of miR-126 in plasma EMPs in the AMI group was significantly decreased ($Z=4.979$, $P<0.001$), the expression of ROS was significantly increased ($Z=9.651$, $P<0.001$), the expression of VCAM-1 was increased ($Z=2.336$, $P=0.019$), and the expression of ICAM-1 ($Z=5.894$, $P<0.001$), E-selectin ($Z=2.730$, $P=0.019$) and P-selectin ($Z=6.470$, $P<0.001$) were increased. Multivariate Logistic regression analysis showed that the decreased expression of miR-126 ($OR=0.026$, $95\%CI=0.003-0.210$, $P=0.001$) was a protective factor for AMI, increased expression of ROS ($OR=1.009$, $95\%CI=1.005-1.013$, $P<0.001$) and P-selectin ($OR=1.063$, $95\%CI=1.022-1.105$, $P=0.002$) were risk factors for AMI. The receiver operator characteristic curve (ROC) showed that the area under the curve of miR-126 for the diagnosis of AMI was 0.816, the area under the curve of ROS for the diagnosis of AMI was 0.892, the area under the curve of P-selectin for the diagnosis of AMI was 0.728, and the area under the curve of miR-126, ROS and P-selectin combined diagnosis was 0.950. **Conclusion** In EMPs, miR-126, ROS, P-selectin and their combined indicators all have diagnostic value for AMI, and the combined indicators of the three have the highest diagnostic value, indicating that they may be potential diagnostic indicators for AMI patients.

[Key words] Acute myocardial infarction; Endothelial cell; Microparticles; miR-126; Mitochondria; Adhesion molecules; Clinical significance

急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI) 是一场重大的全球性医疗危机, 导致全球超过 300 万人死亡^[1]。AMI 是缺血性心脏病最常见的急诊形式, 由易损动脉粥样硬化斑块破裂或叠加血栓形成引发, 导致冠状动脉闭塞和低灌注区细胞死亡^[2]。其起病急、病情重, 个体患者病情的发生难以预测。因此, AMI 的早期诊断是重要的, 但在很大程度上未能满足临床的需求。

微粒 (microparticles, MPs) 是直径 100~1 000 nm 的囊泡^[3], 包括内皮细胞来源的微粒 (endothelial cell microparticles, EMPs)、单核细胞来源的微粒和血小板来源的微粒等, 其携带各种生物活性分子 (miRNA 等), 在细胞通讯中发挥关键作用^[4]。内皮功能障碍在免疫炎症反应激活和组织损伤中尤为关键, 此过程中内皮细胞相关的 miR-126, 是内皮细胞中丰富的 miRNA 之一, 具有抗炎抗心肌细胞凋亡的作用。本团队前期研究发现, AMI 患者冠状动脉血中 MPs 相关 miR-126 水平的降低可能与急性冠状动脉血栓形成事件有关^[5]。此外,

miRNA 还通过靶向活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 通路和抗氧化效应物来调节氧化应激。结合国内外研究, MPs 及内含 miRNA 成分通过线粒体 ROS 依赖性途径促进黏附分子表达, 单核细胞黏附、募集和迁移至受损部位加重组织损伤^[6]。然而, EMPs 和 miRNA 作为中间通讯介质对 AMI 后心肌损伤影响的作用尚待明确。因此, 进一步阐明 EMPs 及其内含 miR-126 在黏附分子表达中的作用, 为探索 AMI 后助于心肌修复的微环境提供新的思路。

本研究在冠状动脉造影前收集 AMI 患者、稳定性冠心病 (stable coronary artery disease, SCAD) 患者和健康人外周血, 通过透射电镜检测 MPs, 纳米颗粒追踪分析 MPs, 使用 $CD_{31}^{+}CD_{42b}^{-}$ 标记 EMPs, 进行 EMPs 定性定量分析, 检测 EMPs 中 miR-126 表达含量及 EMPs 内含 ROS 水平变化, 测定 EMPs 表面血管细胞黏附分子 1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)、细胞间黏附分子 1 (intercellular cell adhesion molecule-1,

ICAM-1)、P-选择素和E-选择素表达情况。分析EMP_s内含miR-126、线粒体成分、黏附分子水平及临床意义,探讨AMI后EMP_s及其miR-126通过ROS依赖性途径在调控黏附分子表达中的作用,为有效延长AMI治疗时间窗和减少并发症提供科学依据。

1 研究对象与方法

1.1 研究对象与分组

纳入2021年9月—2022年9月于新疆维吾尔自治区人民医院就诊的AMI患者50例(AMI组),SCAD患者50例(SCAD组),健康者50例(Control组)。AMI患者和SCAD患者均在本院住院并接受冠状动脉介入治疗(percutaneous coronary intervention, PCI),健康者为体检健康者。所有纳入者基线资料完整,采集一般资料和生化指标。本研究已获得新疆维吾尔自治区人民医院伦理委员会审批(批件号:KY2020041046),患者均被告知并签署知情同意书。

1.1.1 纳入标准:(1)AMI为测量升高或降低的心脏生物标志物(首选肌钙蛋白),至少有1项超过参考上限值第99%百分位值以及至少包含以下1种情况:①心肌缺血体征;②新出现的或推测的明显的ST段改变或新出现的左束支传导阻滞;③心电图出现病理性Q波;④新出现的存活心肌丢失或新出现的局部室壁运动异常的影像证据;⑤血管造影或解剖发现冠状动脉内血栓。所有患者经冠状动脉造影证实冠状动脉病变(具体参考:《急性ST段抬高型心肌梗死诊断和治疗指南》^[7],欧洲心脏病学会非ST段抬高型急性冠状动脉综合征管理指南^[8])。

(2)SCAD为冠状动脉固定性严重狭窄的基础上,由于心肌负荷的增加引起的短暂缺血缺氧临床综合征。选取冠状动脉造影术中诊断冠心病,同时需要行支架植入术患者(具体参考《稳定性冠心病诊断和治疗指南》^[9])。

(3)体检胸部X线片、心电图、肝肾功能、生化指标正常,无其他疾病史,视为健康者。

1.1.2 排除标准:(1)严重肝肾功能不全;(2)肿瘤性疾病;(3)造血系统疾病;(4)类风湿、系统性红斑狼疮和干燥综合征;(5)脑梗死和肺栓塞。

1.1.3 标本采集:静息状态下采集Control组外周血,AMI组和SCAD组患者均在冠状动脉造影前静息状态下进行外周血采集,均为5~10 mL。AMI患者在胸痛发作24 h内,用枸橼酸钠抗凝管收集(美国BD公司),但在操作过程中需要注意:用枸橼酸钠抗凝管收集的标本,通过3 000×g离心10 min,取血浆三等份分到小试管中-80℃保存,以便后期用于EMP_s鉴定和miR-126定量分析,线粒体成分、黏附分子水平测定。

1.2 主要仪器与试剂

主要仪器:显微镜(NIKON, H550S)、酶标仪(Thermo fisher, Multiskan 51119000)、组织摊片机(浙江科迪仪器设备, KD-P)及电热恒温培养箱(常州智博瑞, SHZ-82)等。试剂:无水乙醇(国药集团化学试剂, 100092683)、二甲苯(国药集团化学试剂, 1330-20-7)、苏木素(珠海贝索, BA4097)、伊红染液(珠海贝索, BA4099)等。

1.3 实验方法

1.3.1 MP_s的透射电子显微镜(TEM)检测:血浆样本1 550×g常温离心15 min,将血浆上清转移至新的离心管中。18 800×g离心30 min,将上清去除,加入磷酸盐缓冲液(PBS)重悬沉淀,18 800×g离心30 min,沉淀即为MP_s,用戊二醛固定后备用。取5~10 μL MP_s溶液加到Formvar-carbon载样铜网上;取100 μL PBS加到封口膜上,用镊子将铜网(Formvar膜面朝下)放在PBS液滴上清洗。将铜网放在50 μL 1%戊二醛液滴上5 min;将铜网放在100 μL ddH₂O洗2 min(洗8次);将铜网放在50 μL草酸双氧铈液滴上(pH 7.0)5 min;将铜网放在50 μL甲基纤维素液滴上10 min,冰上操作;铜网放到样品台顶端的不锈钢环上,在滤纸上吸去多余液体。空气干燥5~10 min;将铜网放在样品盒里,TECNAI 10透射电子显微镜下拍摄电镜照片。

1.3.2 MP_s的纳米颗粒追踪(NTA)分析:MP_s使用1 mL PBS重悬。取50 μL MP_s样本加入100 μL PBS稀释后加入到nanosight粒径分析检测台,检测MP_s粒径大小。

1.3.3 EMP_s的流式细胞学检测:将血浆样本从-80℃冰箱中取出,室温静置10 min使其溶化,待血浆溶化成液体后,上下轻轻颠倒混匀,取400 μL血浆样本转移至新的EP管中,1 550×g常温离心15 min。将上清转移至新的EP管中,18 800×g离心30 min,去除上清,加入500 μL PBS缓冲液重悬沉淀,18 800×g,常温离心30 min,沉淀为分离的MP_s。MP_s沉淀加入400 μL PBS-1% BSA溶液重悬,分离100 μL的样本至新的EP管中,分别加入FITC-CD₃₁和PE-CD_{42b}抗体,按照1:100的比例加入。抗体轻轻混匀后室温避光孵育1 h。抗体避光孵育后,将样本置于离心机中,18 800×g常温离心30 min,沉淀中加入400 μL PBS缓冲液混匀,立刻用流式细胞仪检测。流式细胞仪检测时,使用FSC和SSC观察MP_s的大小及复杂性分布,圈取MP_s的散点簇,再使用FL1(CD₃₁)和FL2(CD_{42b})进行分析,分析CD₃₁⁻CD_{42b}⁻、CD₃₁⁺CD_{42b}⁻、CD₃₁⁺CD_{42b}⁺所占全部MP_s细胞的比例。

1.3.4 EMP_s内含miR-126的PCR检测:取200 μL血浆样本1 550×g常温离心15 min,将血浆上清转移至

新的离心管中, $18\ 800\times g$ 离心 30 min, 将上清去除, 加入 PBS 重悬沉淀, $18\ 800\times g$, 离心 30 min, 沉淀即为微粒, 加入 0.5 mL RNAiso plus, 充分裂解后转移至 EP 管中。加入氯仿 100 μL , 用力振摇 15 s, 室温静置 15 min, 离心 ($4\ ^\circ\text{C}$, $12\ 000\times g$, 15 min)。加入 50 μL DEPC 水溶解, 紫外分光光度计检测浓度, $-80\ ^\circ\text{C}$ 冰箱保存。

逆转录实验步骤按照 miRcute 增强型 miRNA cDNA 第一链合成试剂盒, 具体逆转录体系如下: 试剂 (Total RNA, 1 μg ; $2\times$ miRNA RT Reaction Buffer, 5 μL ; miRNA RT Enzyme Mix, 1 μL ; DEPC 水, 补至 10 μL), 注: 按照以上方法混合后, 置于 PCR 仪中进行反转录, 条件为 $42\ ^\circ\text{C}$ 60 min, $95\ ^\circ\text{C}$ 3 min。荧光定量 PCR (cDNA, 2 μL ; PCR 上游引物, 0.4 μL ; PCR 下游引物, 0.4 μL ; SYBR Green solution, 10 μL ; 灭菌双蒸水, 7.2 μL ; 总量, 20 μL)。反应条件: $95.0\ ^\circ\text{C}$, 2 min; $95.0\ ^\circ\text{C}$ 、3 s, $60.0\ ^\circ\text{C}$ 、30 s, 40 个循环; $95.0\ ^\circ\text{C}$ 、15 s, $60.0\ ^\circ\text{C}$ 、1 min, $95.0\ ^\circ\text{C}$ 、15 s。

1.3.5 EMPs 线粒体 ROS 的 ELISA 检测: 将血浆样本从 $-80\ ^\circ\text{C}$ 冰箱中取出, 室温静置 10 min 使其溶化, 待血浆溶化成液体后, 上下轻轻颠倒混匀, 取 200 μL 血浆样本转移至新的 EP 管中, $1\ 550\times g$ 常温离心 15 min。将上清转移至新的 EP 管中, $18\ 800\times g$ 离心 30 min, 去除上清, 加入 500 μL PBS 重悬沉淀, $18\ 800\times g$, 常温离心 30 min, 沉淀为分离的微粒。将 96 孔板中置于荧光酶标仪中, 设置激发光波长为 396 nm, 发射波长为 610 nm 时检测每个样本的荧光 OD 值。

1.3.6 EMPs 内含黏附分子的 ELISA 检测: 将血浆样本从 $-80\ ^\circ\text{C}$ 冰箱中取出, 室温静置 10 min 使其溶化, 待血浆溶化成液体后, 上下轻轻颠倒混匀, 取 400 μL 血浆样本转移至新的 EP 管中, $1\ 550\times g$ 常温离心 15 min。将包被好的 96 孔板取出, 加入标准品和样本, 贴上封口膜。置于 $37\ ^\circ\text{C}$ 培养箱中孵育。培养 2 h 后, 去

除溶液。每孔加入 100 μL 生物素标记的抗体, 贴上封口膜。置于 $37\ ^\circ\text{C}$ 培养箱中孵育。每孔加入 90 μL TMB 反应底物, 贴上封口膜。置于 $37\ ^\circ\text{C}$ 培养箱中避光孵育。每孔加入 50 μL 终止缓冲液, 轻轻混匀。在酶标仪上 450 nm 波长处检测吸光度。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 26.0 软件进行统计学分析, 计量资料进行正态性检验, 符合正态分布的计量资料采用 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 两组间比较采用 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析。不符合正态分布的计量资料采用 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示, 组间比较采用秩和检验。计数资料以相对数表示, 组间比较采用 χ^2 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 三组一般资料和实验室检查指标比较

三组吸烟史、高血压史、糖尿病史、天冬氨酸氨基转移酶 (AST)、乳酸脱氢酶 (LDH)、肌酸激酶同工酶 (CK-MB)、葡萄糖 (GLU)、肌酐 (Crea) 及阿司匹林、氯吡格雷、 β 受体阻滞剂、血管紧张素转换酶抑制剂 (ACEI) / 血管紧张素 II 受体拮抗剂 (ARB)、他汀类用药史比较, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); 三组年龄、性别、BMI、饮酒史、血小板计数 (PLT)、C 反应蛋白 (CRP)、纤维蛋白原 (FIB)、总胆固醇 (TC)、三酰甘油 (TG)、高密度脂蛋白 (HDL)、低密度脂蛋白 (LDL)、丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、尿素氮 (BUN) 比较, 差异均无统计学意义 ($P>0.05$), 见表 1。

2.2 三组 MPs 透射电镜下表现

通过透射电镜观察到, 分离的 MPs 膜结构完整, 轮廓清晰, 圆盘状结构呈形态均一的类球形, 直径大小不一, 为 100~400 nm, 见图 1。

2.3 三组 MPs 的 NTA 水平比较

由 NTA 检测结果可知, Control 组 MPs 粒径几乎在

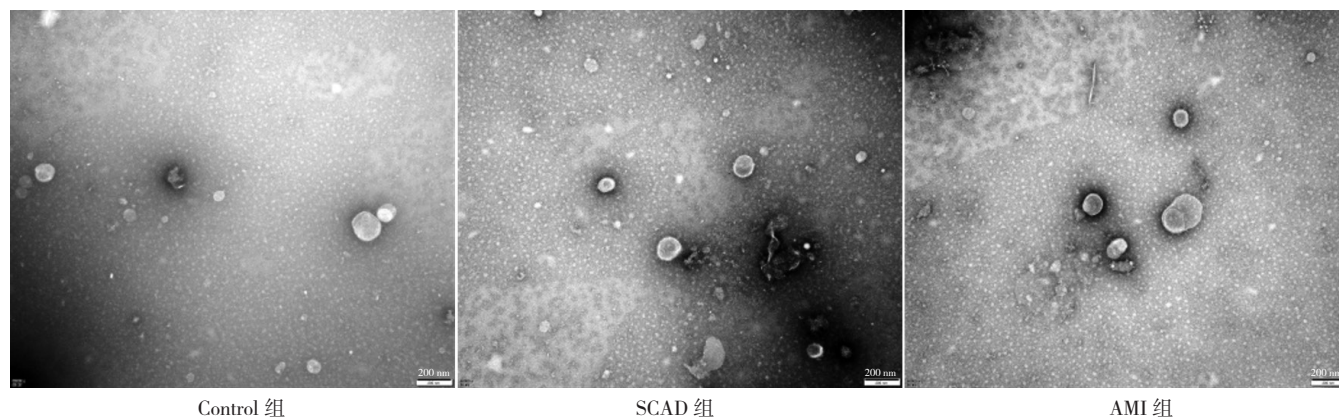


图 1 MPs 透射电镜检测

Figure 1 TEM detection of MPs

600 nm 以内, 而 AMI 组和 SCAD 组在 600~800 nm 处仍有少量 MPs 存在, 见图 2。

2.4 EMPs 的流式检测情况

从图中可以看出, 血浆中分离的 MPs 表面 TSG101、HSP70 蛋白阳性, 说明分离的样本为 EMPs,

见图 3。流式检测结果显示, 三组 CD_{31}^{+}/CD_{42b}^{-} MPs、 CD_{31}^{+}/CD_{42b}^{+} MPs、 CD_{31}^{-}/CD_{42b}^{-} MPs 水平比较, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$); 其中, AMI 组 CD_{31}^{+}/CD_{42b}^{-} MPs 水平均高于 Control 组、SCAD 组, 差异有统计学意义 ($P<0.005$), 见图 4 和表 2。

表 1 三组一般资料和实验室检查指标比较

Table 1 Comparison of general data and laboratory examination indicators among the three groups

组别	例数	年龄 (岁)	性别 [例 (%)]		BMI (kg/m ²)	吸烟 [例 (%)]	饮酒 [例 (%)]	高血压 [例 (%)]	糖尿病 [例 (%)]
			男	女					
Control 组	50	54.8 ± 8.8	25 (50.0)	25 (50.0)	24.6 ± 3.3	5 (10.0)	2 (4.0)	0	0
SCAD 组	50	58.9 ± 8.8	32 (64.0)	18 (36.0)	25.6 ± 3.3	16 (32.0)	7 (14.0)	27 (54.0)	21 (42.0)
AMI 组	50	59.3 ± 14.3	36 (72.0)	14 (28.0)	25.8 ± 3.0	20 (40.0)	8 (16.0)	20 (40.0)	12 (24.0)
检验统计量值		4.190 ^a	1.494 ^b		2.001 ^a	12.150 ^b	4.113 ^b	36.501 ^b	25.874 ^b
P 值		0.123	0.474		0.139	0.002	0.128	<0.001	<0.001

组别	PLT (×10 ⁹ /L)	CRP [M (P ₂₅ , P ₇₅), mg/L]		FIB [M (P ₂₅ , P ₇₅), g/L]		TC [M (P ₂₅ , P ₇₅), mmol/L]		TG [M (P ₂₅ , P ₇₅), mmol/L]		HDL [M (P ₂₅ , P ₇₅), mmol/L]	
Control 组	239.00 ± 49.37	1.47 (0.69, 3.34)		2.95 (2.65, 3.36)		4.28 (3.77, 4.96)		1.37 (1.10, 1.53)		1.03 (0.88, 1.18)	
SCAD 组	230.14 ± 64.92	1.22 (0.62, 2.70)		3.10 (2.74, 3.58)		4.23 (3.26, 5.13)		1.51 (1.04, 2.07)		0.95 (0.85, 1.17)	
AMI 组	237.06 ± 57.26	1.71 (0.95, 4.96)		3.32 (2.77, 3.74)		4.49 (3.78, 5.45)		1.18 (0.96, 1.74)		0.99 (0.82, 1.18)	
检验统计量值	0.328 ^a	4.654		5.704		2.386		4.494		1.110	
P 值	0.721	0.098		0.058		0.303		0.106		0.574	

组别	LDL [M (P ₂₅ , P ₇₅), mmol/L]		ALT [M (P ₂₅ , P ₇₅), U/L]		AST [M (P ₂₅ , P ₇₅), U/L]		LDH [M (P ₂₅ , P ₇₅), U/L]		CK-MB [M (P ₂₅ , P ₇₅), ng/mL]		GLU [M (P ₂₅ , P ₇₅), mmol/L]	
Control 组	2.49 (2.12, 3.15)		23.00 (19.00, 30.00)		25.00 (21.00, 27.00)		186.50 (170.75, 212.50)		1.21 (0.70, 1.97)		4.55 (4.22, 5.10)	
SCAD 组	2.69 (1.97, 3.35)		20.10 (16.40, 28.48)		22.45 (16.13, 28.00)		189.80 (157.25, 224.45)		2.04 (0.84, 12.62)		5.12 (4.39, 6.00)	
AMI 组	2.84 (2.18, 3.67)		24.00 (17.00, 33.00)		30.50 (22.50, 65.25)		210.32 (177.82, 265.48)		11.30 (3.27, 66.95)		6.16 (5.20, 7.76)	
检验统计量值	1.877		2.041		17.931		7.253		44.342		41.377	
P 值	0.391		0.360		<0.001		0.027		<0.001		0.001	

组别	Crea [M (P ₂₅ , P ₇₅), μmol/L]		BUN [M (P ₂₅ , P ₇₅), mmol/L]		阿司匹林 [例 (%)]		氯吡格雷 [例 (%)]		β 受体阻滞剂 [例 (%)]		ACEI/ARB [例 (%)]		他汀类 [例 (%)]	
Control 组	57.40 (48.70, 70.13)		5.30 (4.31, 6.51)		0		0		0		0		0	
SCAD 组	73.80 (65.09, 82.53)		6.08 (4.53, 7.12)		43 (86.0)		41 (82.0)		34 (68.0)		22 (44.0)		48 (96.0)	
AMI 组	73.65 (65.24, 83.93)		5.90 (4.55, 6.66)		46 (92.0)		47 (94.0)		42 (84.0)		29 (58.0)		48 (96.0)	
检验统计量值	29.459		2.012		109.799 ^b		107.936 ^b		79.587 ^b		40.820 ^b		133.333 ^b	
P 值	<0.001		0.366		<0.001		<0.001		<0.001		<0.001		<0.001	

注: SCAD= 稳定性冠状动脉疾病, AMI= 急性心肌梗死, PLT= 血小板计数, CRP=C 反应蛋白, FIB= 纤维蛋白原, TC= 总胆固醇, TG= 三酰甘油, HDL= 高密度脂蛋白, LDL= 低密度脂蛋白, ALT= 丙氨酸氨基转移酶, AST= 天冬氨酸氨基转移酶, LDH= 乳酸脱氢酶, CK-MB= 肌酸激酶同工酶, GLU= 葡萄糖, Crea= 肌酐, BUN= 尿素氮, ACEI/ARB= 血管紧张素转换酶抑制剂 / 血管紧张素 II 受体拮抗剂; ^a 为 F 值, ^b 为 χ^2 值, 余检验统计量值为 Z 值。

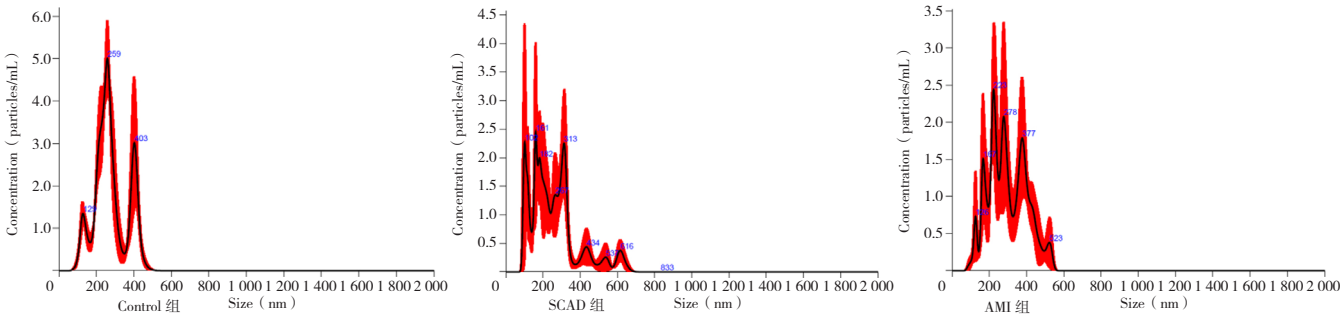


图 2 MPs NTA 检测
Figure 2 NTA detection of MPs

ChinaXiv:202404.00068v1

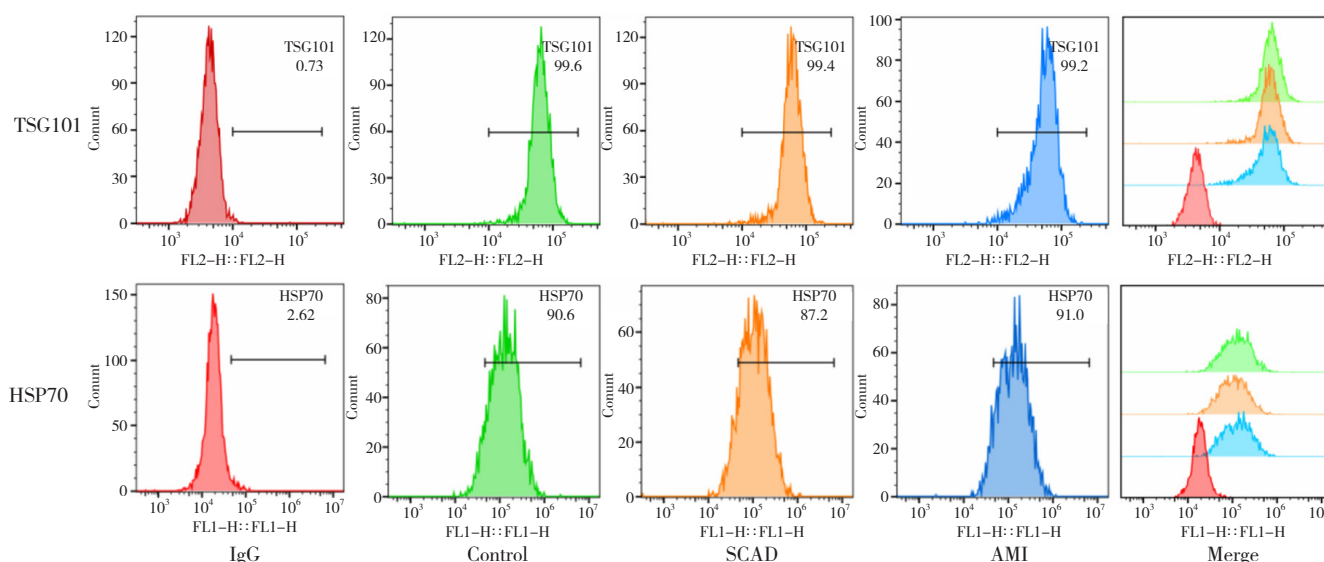


图3 EMPs 流式鉴定图

Figure 3 Flow identification of EMPs

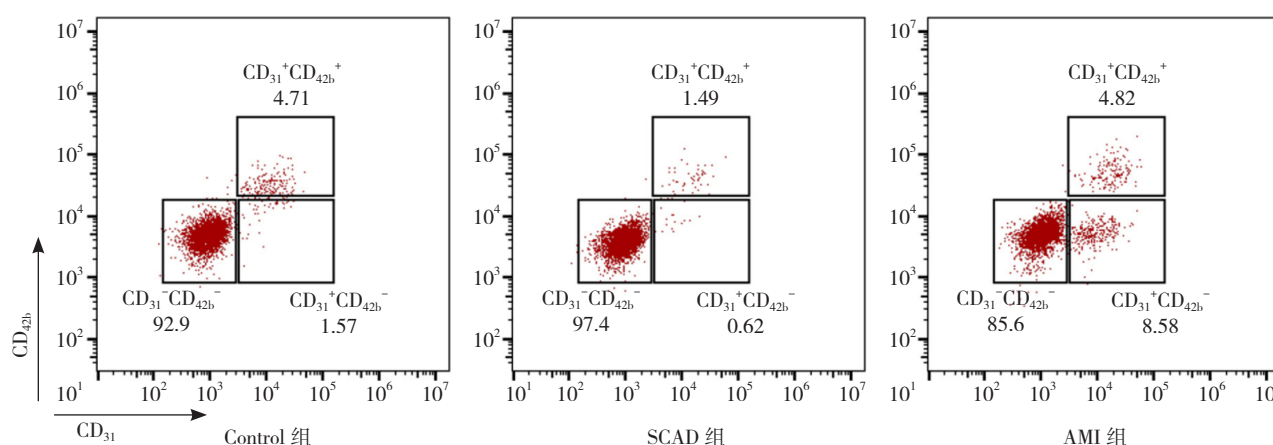


图4 EMPs 流式图

Figure 4 Flow of EMPs

表2 三组 EMPs 流式细胞学比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of flow cytometry of the three groups of EMPs

组别	例数	CD ₃₁ ⁺ /CD _{42b} ⁻ MPs	CD ₃₁ ⁺ / CD _{42b} ⁺ MPs	CD ₃₁ ⁻ /CD _{42b} ⁻ MPs
Control 组	50	1.87 ± 0.72	3.37 ± 1.75	93.36 ± 1.57
SCAD 组	50	1.63 ± 0.62	3.25 ± 1.60	94.02 ± 1.38
AMI 组	50	9.06 ± 2.64	4.09 ± 1.40	84.88 ± 3.50
F 值		341.10	4.16	234.40
P 值		<0.001	0.018	<0.001

注: MPs= 微粒。

2.5 三组 EMPs 内含 miR-126 水平比较

Control 组血浆 EMPs 中 miR-126 表达水平为 0.97 (0.67, 1.53), SCAD 组血浆 EMPs 中 miR-126 表达水平为 1.22 (0.63, 2.12), AMI 组血浆 EMPs 中 miR-126 表达水平为 0.45 (0.32, 0.73), 三组血浆 EMPs 中 miR-126 表达水平比较, 差异有统计学意义 ($Z=40.459$,

$P<0.001$); 其中, AMI 组血浆 EMPs 中 miR-126 表达水平低于 Control 组、SCAD 组, 差异有统计学意义 ($P<0.001$)。

2.6 三组 EMPs 线粒体 ROS 水平比较

Control 组血浆 EMPs 中 ROS 表达水平为 (180 627.41 ± 98 230.28), SCAD 组血浆 EMPs 中 ROS 表达水平为 (454 913.43 ± 159 697.70), AMI 组血浆 EMPs 中 ROS 表达水平为 (782 150.95 ± 309 841.66), 三组血浆 EMPs 中 ROS 表达水平比较, 差异有统计学意义 ($Z=94.296$, $P<0.001$); 其中, SCAD 组血浆 EMPs 中 ROS 表达水平高于 Control 组, AMI 组血浆 EMPs 中 ROS 表达水平高于 Control 组、SCAD 组, 差异有统计学意义 ($P<0.001$)。

2.7 三组 EMPs 内含黏附分子水平比较

三组血浆 EMPs 中 VCAM-1、ICAM-1、E- 选择素、P- 选择素表达水平比较, 差异均有统计学意义

表 3 三组 EMPs 中黏附分子比较
Table 3 Comparison of adhesion molecules in EMPs among the three groups

组别	例数	VCAM-1	ICAM-1	E- 选择素	P- 选择素 [$M(P_{25}, P_{75})$]
Control 组	50	64.85 ± 22.46	12.14 ± 6.75	16.65 ± 7.22	19.02 (11.46, 32.60)
SCAD 组	50	78.96 ± 34.18	22.33 ± 12.48	23.39 ± 9.90	41.09 (23.74, 57.36)
AMI 组	50	78.90 ± 32.72	28.66 ± 14.73	22.31 ± 11.31	46.09 (37.33, 64.67)
$F(Z)$ 值		6.713	36.030	13.251	46.278 ^a
P 值		0.035	<0.001	0.001	<0.001

注: VCAM-1= 血管细胞黏附分子 1, ICAM-1= 细胞间黏附分子 1; ^a 为 Z 值。

义 ($P<0.05$)。其中, SCAD 组和 AMI 组 VCAM-1、ICAM-1、E- 选择素、P- 选择素表达水平平均高于 Control 组, AMI 组 ICAM-1 表达水平高于 SCAD 组, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 见表 3。

2.8 Logistic 回归分析

以是否发生 AMI 为因变量 (赋值: 是 =1, 否 =0), 对研究指标 miR-126、ROS、VCAM-1、ICAM-1、E- 选择素和 P- 选择素分别进行单因素 Logistic 回归分析, 发现 miR-126、ROS、ICAM-1、和 P- 选择素具有统计学意义 ($P<0.001$)。进一步地, 将 miR-126、ROS、ICAM-1、P- 选择素, 以及临床认为对 AMI 的发生发展具有影响作用的自变量如吸烟、年龄、性别 (赋值: 男 =1, 女 =0)、BMI、TC、TG、糖尿病 (赋值: 是 =1, 否 =0) 和高血压 (赋值: 是 =1, 否 =0) 同时纳入多因素 Logistic 回归分析, 结果显示, miR-126 是 AMI 发生的保护因素, ROS、P- 选择素是 AMI 发生的危险因素 ($P<0.05$), 见表 4。

表 4 AMI 影响因素的单因素和多因素 Logistic 回归分析

Table 4 Logistic regression analysis of influencing factors for AMI

变量	单因素回归分析			多因素回归分析		
	OR 值	95%CI	P 值	OR 值	95%CI	P 值
miR-126	0.079	0.027~0.229	<0.001	0.026	0.003~0.210	0.001
ROS	1.007	1.005~1.010	<0.001	1.009	1.005~1.013	<0.001
P- 选择素	1.041	1.022~1.060	<0.001	1.063	1.022~1.105	0.002
ICAM-1	1.069	1.039~1.100	<0.001	1.031	0.976~1.089	0.280
吸烟	2.508	1.193~5.271	0.015	0.400	0.095~1.691	0.213
年龄	1.020	0.989~1.052	0.211	0.986	0.922~1.054	0.671
性别	1.940	0.932~4.039	0.077	1.105	0.153~7.964	0.921
BMI	1.065	0.958~1.185	0.244	0.854	0.671~1.087	0.201
TC	1.279	0.969~1.688	0.083	2.005	1.033~3.892	0.040
TG	1.015	0.776~1.327	0.914	0.816	0.456~1.460	0.493
糖尿病	0.842	0.375~1.888	0.676	6.897	1.254~37.928	0.026
高血压	0.555	0.271~1.137	0.108	0.421	0.086~2.052	0.284

注: ROS= 活性氧。

2.9 miR-126、ROS、P- 选择素对 AMI 的诊断价值

受试者工作特征曲线 (ROC) 显示, miR-126 的曲线下面积为 0.816, ROS 的曲线下面积为 0.892, P- 选

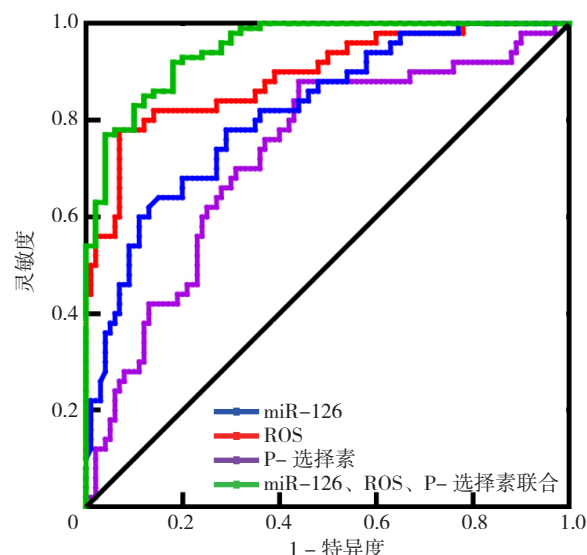


图 5 miR-126、ROS、P- 选择素联合预测 AMI 患者的 ROC 曲线
Figure 5 ROC curve of miR-126, ROS, and P-selectin combined to predict AMI patients

择素的曲线下面积为 0.728, miR-126、ROS、P- 选择素联合诊断的曲线下面积为 0.950, 见图 5。

3 讨论

AMI 是一种严重的心血管疾病 (cardiovascular disease, CVD), 也是全球发病和死亡的主要原因。脂肪酸和胆固醇的积累参与了动脉粥样硬化过程, 随后的炎症和免疫系统受累驱动晚期纤维斑块的发展, 累积病灶的溃疡或破裂和急性血栓形成导致 AMI 的发生^[10]。尽管 AMI 发病率很高, 但其早期诊断仍是一个重大的临床挑战。

本研究通过对 AMI 患者外周血中 EMPs 的成分分析, 提示了 AMI 急性事件的潜在发病机制, 为认识该病提供了新的方向。考虑 AMI 患者与 SCAD 患者的临床差异, 主要与急性和稳定状态的病理生理学有关, 选择 SCAD 患者和健康者分别作为对照。本团队既往研究发现, MPs 在 CVD 的发生和发展中起着极其重要的作用^[11]。因此, 在这项研究中, 分析 AMI 患者外周血中 EMPs 内含 miR-126、线粒体成分、黏附分子水平及临床意义, 探讨 AMI 后 EMPs 及其 miR-126 通过 ROS 依赖性途径

在调控黏附分子表达中的作用,为有效延长AMI治疗时间窗和减少并发症提供科学依据。

本研究首先对AMI患者、SCAD患者、健康者外周血中的MPs进行了鉴定,通过透射电镜可以观察到,分离的MPs膜结构完整,直径大小不一,为100~400 nm。因此,证实了在AMI患者外周血中MPs的存在。MPs膜结构完整,才能将各种物质(包括核酸)输送到影响细胞表型的局部和远处细胞。MPs是由各种活化和凋亡细胞产生释放的,包括EMPs等,由于MPs上的表面标志物反映其亲本细胞来源,因此这些蛋白质可用于选择性分离和鉴定细胞类型特异性MPs。在本研究中,血浆中分离的MPs表面TSG101、HSP70蛋白阳性,说明分离的样本为MPs。内皮细胞来源的MPs是由于活化(CD_{62e}^+)或细胞凋亡(CD_{31}/CD_{42b}^-)而从内皮脱落的小膜囊泡。用 CD_{31}^+/CD_{42b}^- 标记内皮细胞来源的MPs,发现AMI患者血浆中 CD_{31}^+/CD_{42b}^- 标记的EMPs水平与SCAD患者和健康者血浆中 CD_{31}^+/CD_{42b}^- 标记的EMPs水平相比显著升高。研究表明,miRNA在多种疾病的发生和发展中起着重要作用^[12-13],与CVD相关的miRNA水平的变化引起了人们的关注,因为其具有重要的诊断价值。本研究发现,AMI患者外周血中获得的EMPs中的miR-126水平显著低于SCAD患者及健康者;然而,导致这种现象的具体分子机制仍然未知,需要探索。

急性心肌缺血期间的线粒体功能障碍是AMI后细胞死亡的关键决定因素,因为线粒体在产生维持正常心脏收缩功能所需的ATP方面发挥着关键作用^[14]。本研究发现,AMI患者外周血中EMPs内含ROS水平显著高于SCAD患者及健康者。笔者推测,AMI后EMPs通过递送miR-126,激活线粒体诱导ROS水平增高,从而介导内皮细胞早衰。有趣的是,AMI患者冠状动脉内皮细胞释放更多与炎症相关的MPs,其表面表达丰富的VCAM-1。研究发现,VCAM-1是miR-126的直接靶点基因^[15],miR-126通过与VCAM-1的3'非翻译区相结合^[16],抑制VCAM-1蛋白质和mRNA表达水平,减少单核细胞在内皮细胞的黏附和募集^[17],从而发挥抗炎修复作用。本研究发现,与健康者比较,AMI患者血浆EMPs中VCAM-1、ICAM-1、E-选择素及P-选择素表达上调。JASIEWICZ等^[18]研究表明,急性冠脉综合症的循环衰竭直接影响肝血流量,导致肝细胞功能障碍以及AST升高。众所周知,吸烟、年龄、性别、BMI、TC、TG、糖尿病和高血压在对AMI疾病的发生发展过程中具有重要作用。本研究中,EMPs中的miR-126、ROS、P-选择素和ICAM-1分别纳入单因素Logistic回归分析,同时将吸烟、年龄、性别、BMI、TC、TG、糖尿病和高血压与AMI发生相关的指

标分别纳入单因素Logistic回归分析。进一步将miR-126、ROS、P-选择素、ICAM-1、吸烟、年龄、性别、BMI、TC、TG、糖尿病和高血压纳入多因素Logistic回归分析,结果表明miR-126、ROS、P-选择素与AMI的发生独立相关,miR-126是AMI的保护因素,ROS、P-选择素是AMI的危险因素。同时,本研究通过ROC曲线分析,EMPs中miR-126、ROS、P-选择素以及三者联合指标均对AMI有诊断价值,并且三者联合指标诊断价值最高,这表明其可能为AMI患者的潜在诊断指标。

然而,本研究还存在一定的局限性。由于本研究的血样取自外周,并无重复监测EMPs相关miR-126、ROS、P-选择素的水平。而且,本研究样本量非常小,计划在未来扩大样本量,以确保结果的稳健性。本研究团队还旨在收集随访数据,以研究EMPs相关miR-126、ROS、P-选择素水平与AMI患者预后之间的关系。此外,还需要研究将冠状动脉血中EMPs中miR-126、ROS、P-选择素水平与AMI急性血栓事件的发生联系起来的分子机制。

作者贡献:马艺萍负责论文起草、最终版本修订。袁玉娟、尼格热·阿力木、帕丽达·玉山江负责统计学分析、绘制图表等。马清玉、阿卜拉江·艾合麦提负责实验研究。穆叶赛·尼加提教授提出研究思路、设计方案。

本文无利益冲突。

参考文献

- [1] SACHDEVA P, KAUR K, FATIMA S, et al. Advancements in myocardial infarction management: exploring novel approaches and strategies [J]. *Cureus*, 2023, 15 (9): e45578. DOI: 10.7759/cureus.45578.
- [2] WU X K, REBOLL M R, KORF-KLINGEBIEL M, et al. Angiogenesis after acute myocardial infarction [J]. *Cardiovasc Res*, 2021, 117 (5): 1257-1273. DOI: 10.1093/cvr/cvaa287.
- [3] MA Y P, YUAN Y J, AILI Z, et al. Proteomics analysis of coronary blood microparticles in patients with acute myocardial infarction [J]. *Cardiol J*, 2023, 30 (2): 286-296. DOI: 10.5603/CJ.a2022.0081.
- [4] DELLA CORTE V, TODARO F, CATALDI M, et al. Atherosclerosis and its related laboratory biomarkers [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24 (21): 15546. DOI: 10.3390/ijms242115546.
- [5] YUAN Y J, MA Y P, AILI Z, et al. Reductions in extracellular vesicle-associated microRNA-126 levels in coronary blood after acute myocardial infarction: a retrospective study [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2022, 9: 1046839. DOI: 10.3389/fcvm.2022.1046839.
- [6] MARCOUX G, MAGRON A, SUT C, et al. Platelet-derived extracellular vesicles convey mitochondrial DAMPs in platelet concentrates and their levels are associated with adverse reactions [J]. *Transfusion*, 2019, 59 (7): 2403-2414. DOI:

10.1111/trf.15300.

- [7] 急性 ST 段抬高型心肌梗死诊断和治疗指南 (2019) [J] . 中华心血管病杂志, 2019, 47 (10) : 766-783. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-3758.2019.10.003.
- [8] COLLET J P, THIELE H, BARBATO E, et al. 2020 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation [J] . Eur Heart J, 2021, 42 (14) : 1289-1367. DOI: 10.1093/eurheartj/ehaa575.
- [9] 中华医学会心血管病学分会介入心脏病学组, 中华医学会心血管病学分会动脉粥样硬化与冠心病学组, 中国医师协会心血管内科医师分会血栓防治专业委员会, 等. 稳定性冠心病诊断与治疗指南 [J] . 中华心血管病杂志, 2018, 46 (9) : 680-694. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-3758.2018.09.004.
- [10] PARKER S J, CHEN L L, SPIVIA W, et al. Identification of putative early atherosclerosis biomarkers by unsupervised deconvolution of heterogeneous vascular proteomes [J] . J Proteome Res, 2020, 19 (7) : 2794-2806. DOI: 10.1021/acs.jproteome.0c00118.
- [11] YUAN Y J, MAITUSONG M, MUYESAI N. Association of endothelial and red blood cell microparticles with acute myocardial infarction in Chinese: a retrospective study [J] . Ann Palliat Med, 2020, 9 (4) : 1564-1570. DOI: 10.21037/apm-20-397.
- [12] KONTIDOU E, COLLADO A, PERNOW J, et al. Erythrocyte-derived microRNAs: emerging players in cardiovascular and metabolic disease [J] . Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2023, 43 (5) : 628-636. DOI: 10.1161/ATVBAHA.123.319027.
- [13] IWAŃCZYK S, LEHMANN T, CIEŚLEWICZ A, et al. Circulating miRNA-451a and miRNA-328-3p as potential markers of coronary artery aneurysmal disease [J] . Int J Mol Sci, 2023, 24 (6) : 5817. DOI: 10.3390/ijms24065817.
- [14] RAMACHANDRA C J A, HERNANDEZ-RESENDIZ S, CRESPO-AVILAN G E, et al. Mitochondria in acute myocardial infarction and cardioprotection [J] . EBioMedicine, 2020, 57: 102884. DOI: 10.1016/j.ebiom.2020.102884.
- [15] TANG Y Y, CHEN Y, GUO Q Q, et al. MiR-126-loaded immunoliposomes against vascular endothelial inflammation in vitro and vivo evaluation [J] . Pharmaceutics, 2023, 15 (5) : 1379. DOI: 10.3390/pharmaceutics15051379.
- [16] FU X, NIU T S, LI X D. MicroRNA-126-3p attenuates intracerebral hemorrhage-induced blood-brain barrier disruption by regulating VCAM-1 expression [J] . Front Neurosci, 2019, 13: 866. DOI: 10.3389/fnins.2019.00866.
- [17] FAN X, CHEN X L, FENG Q, et al. Downregulation of GATA6 in mTOR-inhibited human aortic endothelial cells: effects on TNF- α -induced VCAM-1 expression and monocytic cell adhesion [J] . Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2019, 316 (2) : H408-H420. DOI: 10.1152/ajpheart.00411.2018.
- [18] JASIEWICZ M, SIEDLACZEK M, KASPRZAK M, et al. Elevated serum transaminases in patients with acute coronary syndromes: do we need a revision of exclusion criteria for clinical trials? [J] . Cardiol J, 2023, 30 (5) : 747-752. DOI: 10.5603/CJ.a2021.0081.

(收稿日期: 2024-01-10; 修回日期: 2024-03-30)

(本文编辑: 贾萌萌)