

· 临床论著 ·

银杏酮酯分散片联合常规治疗对合并颈动脉不稳定斑块高血压病患者血清 MicroRNA-21 及 MMP-9 的影响

廖清池¹ 柳书可^{1,2} 胡艳丽¹ 周胜华³

摘要 **目的** 探讨银杏酮酯分散片对合并颈动脉不稳定斑块高血压病患者血清 MicroRNA-21(miR-21)及金属基质蛋白-9(MMP-9)的影响。**方法** 将 120 例颈动脉彩超提示颈动脉不稳定斑块的高血压病患者,采用随机数字表法分为对照组和试验组,每组 60 例,两组在常规降压治疗的基础上加用拜阿司匹林及瑞舒伐他汀治疗,试验组在此基础上加服银杏酮酯分散片治疗,疗程 3 个月。采用实时荧光定量 PCR 法检测血清 miR-21 水平,ELISA 法检测血清 MMP-9、hs-CRP 水平。**结果** 与本组治疗前比较,治疗后试验组 miR-21、MMP-9 及 hs-CRP 水平下降($P<0.05$);与对照组比较,试验组血清 miR-21、MMP-9 及 hs-CRP 水平平均降低($P<0.05$)。**结论** 银杏酮酯分散片联合常规治疗能降低合并颈动脉不稳定斑块高血压病患者血清 miR-21 及 MMP-9 水平。

关键词 银杏酮酯分散片;不稳定斑块;微小 RNA-21;金属基质蛋白-9

Effects of *Ginkgo Biloba* Extract Dispersible Tablets Combined with Routine Treatment on Serum MicroRNA-21 and MMP-9 Levels in Hypertensive Patients with Carotid Vulnerable Plaque

LIAO Qing-chi¹, LIU Shu-ke^{1,2}, HU Yan-li¹, and ZHOU Sheng-hua³ 1 Department of Cardiology, Northern Jiangsu People's Hospital Affiliated to Yangzhou University, Jiangsu (225001); 2 Graduate School of Dalian Medical University, Liaoning (116000); 3 Department of Cardiology, the Second Xiangya Hospital Affiliated to Central South University, Changsha (410011)

ABSTRACT Objective To investigate the effects of *Ginkgo biloba* extract dispersible Tablets on serum mircoRNA-21 (miR-21) and matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) levels in hypertensive patients with carotid vulnerable plaque. **Methods** Totally 120 eligible hypertensive patients with vulnerable carotid plaque determined by ultrasound were randomly assigned to the control group and the treatment group according to random number digit table, 60 in each group. All patients received routine treatment of hypertension control with aspirin and rosuvastatin, while those in the experimental group additionally took *Ginkgo biloba* extract dispersible Tablets, the therapeutic course for all was 3 months. The serum miR-21 level was detected by Real-time fluorescent quantitative PCR, and serum MMP-9 and hs-CRP levels were tested by ELISA. **Results** Compared with before treatment in the same group, the levels of miR-21, MMP-9 and hs-CRP decreased in the experimental group after treatment ($P<0.05$); and compared with the control group, serum miR-21, MMP-9 and hs-CRP levels decreased in the experimental group ($P<0.05$). **Conclusion** *Ginkgo biloba* extract dispersible Tablets combined with routine treatment could decrease the levels of serum miR-21 and MMP-9 in hypertensive patients with vulnerable carotid plaque.

KEYWORDS *Ginkgo biloba* extract dispersible Tablets; vulnerable plaque; MicroRNA-21; matrix metalloproteinase 9

基金项目:扬州市自然科学基金资助项目(No.YZ2014045)

作者单位:1. 扬州大学附属苏北人民医院心内科(江苏 225001); 2. 大连医科大学研究生院(辽宁 116000); 3. 中南大学湘雅二医院心内科(长沙 410011)

通讯作者:廖清池, Tel: 0514-87373265, E-mail: lqchyl@163.com

DOI: 10. 7661/j. cjim. 20200530. 233

心脑血管疾病目前为全球第一大死因^[1],而不稳定斑块破裂是导致急性心脑血管疾病的共同病理机制,动脉粥样斑块的稳定性牵涉到诸多复杂因素,如氧化应激、炎症反应等^[2],临床研究表明银杏酮酯分散片可有效抑制氧化应激^[3],然而对炎症反应的抑制作用尚少。

微小 RNA (MicroRNA-21, miR-21) 是一类非编码单链小分子 RNA,通过 mRNA 转录后抑制或诱导其降解调节基因表达。资料表明 miR-21 已被证实与斑块稳定性密切相关^[4],其机制可能与其升高金属基质蛋白-9(matrix metalloproteinase 9, MMP-9)水平有关,而 MMP-9 是一重要炎症因子,是导致斑块破裂的重要原因^[5]。本研究主要探讨银杏酮酯分散片对颈动脉不稳定斑块患者血清 miR-21 及 MMP-9 的影响,从而为其在合并有颈动脉不稳定斑块的高血压病患者中的应用提供新的依据。

资料与方法

1 诊断标准

1.1 高血压病诊断标准 依据《中国高血压防治指南 2010》诊断标准^[6],即收缩压 ≥ 140 mmHg 和(或)舒张压 ≥ 90 mmHg。

1.2 不稳定斑块的检测及判定标准 参照文献^[7]。颈动脉彩超检查采用 GE 公司彩色多普勒超声显像仪,探头频率 7.5 MHz,由专人实施检查,嘱患者卧位,头部低枕略后仰并偏向检查对侧,先后检查双侧颈总动脉、颈内动脉、颈外动脉。根据超声回声的强弱将颈动脉斑块分为不同类型。硬斑呈强回声,软斑呈中等或弱回声,混合斑回声介于硬斑及软斑之间,本研究将软斑和混合斑定义为不稳定性斑块。

2 纳入标准 (1)符合高血压病诊断标准;(2)年龄 30~75 岁;(3)颈动脉彩超提示颈动脉不稳定斑块者;(4)签署书面知情同意。

3 排除标准 高脂血症;高尿酸血症;糖尿病;既往中风病史及严重心脏病史(如心肌梗死、心力衰竭、心脏瓣膜病、心脏外科手术);急慢性炎症;血液病;恶性肿瘤;重要器官严重功能障碍以及既往接受降压药物以外药物治疗的患者等。

4 一般资料 选择 2017 年 4 月—2018 年 5 月在江苏省苏北人民医院门诊及住院常规行颈动脉彩超提示颈动脉不稳定斑块的高血压患者,结合既往研究^[8]、显著性水平(双侧 $\alpha = 0.05$)及把握度($1 - \beta = 90\%$)等因素,应用 PowerAndSampleSize 在线样本

量计算工具估算样本量,选取患者 120 例,采用随机数字表法分为对照组和试验组,每组 60 例。两组患者在性别、年龄、吸烟者比例、入组时收缩压(systolic blood pressure, SBP)、舒张压(diastolic blood pressure, DBP)、血清总胆固醇(total cholesterol, TC)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein-cholesterol, HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein-cholesterol, LDL-C)、尿酸(uric acid, UA)及同型半胱氨酸(homocysteine, HCY)水平方面比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$,表 1)。本研究经过苏北人民医院伦理委员会批准(No. 2017KY-187)。

表 1 两组患者一般资料比较

项目	对照组(60 例)	试验组(60 例)
性别(男/女)	38/22	36/24
年龄(岁, $\bar{x} \pm s$)	58.1 $\pm$ 12.3	60.1 $\pm$ 13.2
吸烟者(例)	15/60	17/60
SBP(mmHg, $\bar{x} \pm s$)	138.00 $\pm$ 21.57	134.00 $\pm$ 18.80
DBP(mmHg, $\bar{x} \pm s$)	86.00 $\pm$ 11.24	83.00 $\pm$ 12.42
TC(mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	4.47 $\pm$ 0.66	4.20 $\pm$ 0.83
HDL-C(mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	1.16 $\pm$ 0.34	1.21 $\pm$ 0.35
LDL-C(mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	2.97 $\pm$ 0.69	2.76 $\pm$ 0.44
UA(mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	324.83 $\pm$ 91.43	326.43 $\pm$ 78.74
HCY(μ mol/L, $\bar{x} \pm s$)	5.40 $\pm$ 2.94	5.50 $\pm$ 2.71

5 治疗方法 所有患者试验期间血压控制在 110~140/70~90 mmHg,降压药主要选择钙拮抗剂、血管紧张素酶转换酶抑制剂、血管紧张素受体拮抗剂及利尿剂,降压药物的使用在两组间差异无统计学意义,两组患者均接受瑞舒伐他汀钙片(新托妥,10 mg/片,南京正大天晴制药有限公司,批号:170121)每次 1 片,每晚 1 次,当血压低于 150/90 mmHg 时,对照组予阿司匹林肠溶片(100 mg/片,德国拜耳医药保健有限公司,批号:170318)每次 1 片,每日 1 次,试验组加服银杏酮酯分散片(银欣可,0.15 g/片,江苏神龙药业有限公司,批号:170704)每次 1 片,1 日 3 次,两组分别治疗 3 个月。

6 观察指标及检测方法 所有患者在治疗前和治疗 1 个月清晨抽取患者空腹外周静脉血样本 10 mL,注入无菌柠檬酸盐试管中,置入冰中以 1 500 $\times g$ 离心 20 min,分别留取血浆及血清,血浆储存于 -80 $^{\circ}$ C 液氮中备用。采用实时荧光定量 PCR 法测定血浆 miR-21 相对表达水平,酶联免疫吸附测定 MMP-9 表达水平,放射免疫法测定血清 hs-CRP 水平。

7 统计学方法 所有数据分析均使用 SPSS

19.0 统计软件进行,数值资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,符合正态分布的资料组间比较行独立样本 t 检验,组内比较采用配对 t 检验,非正态分布资料的组间比较行 Mann-Whitney U 检验;计数资料组间比较进行 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 病例完成情况(图 1) 对照组其中 1 例体检时发现转氨酶升高至正常值 2 倍以上,考虑与瑞舒伐他汀治疗有关,予停用该药后 2 周复查转氨酶恢复正常,后患者不愿继续参加该临床研究而被排除,最终纳入分析为 59 例,试验组纳入分析 60 例。所有患者试验期间未发生明显心脑血管事件。

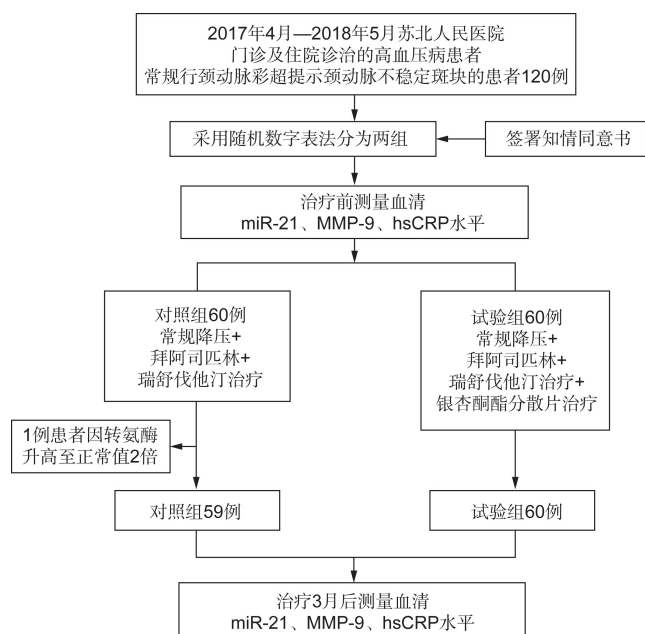


图 1 病例流程图

2 两组 miR-21、MMP-9 及 hs-CRP 表达水平比较(表 2) 两组治疗前血清 miR-21、MMP-9 及 hs-CRP 水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。与本组治疗前比较,治疗后两组 miR-21、MMP-9 及 hs-CRP 水平均有下降,试验组下降幅度差异有统计学意义($P < 0.05$);与对照组比较,试验组 miR-21、MMP-9 及 hs-CRP 表达水平降低($P < 0.05$)。

表 2 两组 miR-21、MMP-9 及 hs-CRP 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	时间	miR-21	MMP-9($\mu\text{g/L}$)	hs-CRP(mg/L)
对照	59	治疗前	0.78 $\pm$ 0.17	477.62 $\pm$ 65.34	6.42 $\pm$ 1.40
		治疗后	0.65 $\pm$ 0.16	439.00 $\pm$ 57.92	6.14 $\pm$ 1.34
试验	60	治疗前	0.74 $\pm$ 0.16	484.16 $\pm$ 68.32	6.58 $\pm$ 1.46
		治疗后	0.32 $\pm$ 0.09 ^{*△}	324.00 $\pm$ 52.54 ^{*△}	3.16 $\pm$ 0.89 ^{*△}

注:与本组治疗前比较,^{*} $P < 0.05$;与对照组比较,[△] $P < 0.05$

讨 论

高血压病在我国发病率高,是导致脑卒中等心脑血管病的重要原因之一^[9],高血压病患者易合并颈动脉斑块,其中的不稳定斑块在一定诱因下可发生斑块破裂,斑块破裂可导致急性脑血管事件发作。因此常规筛查出合并有不稳定颈动脉斑块的高血压病患者并对其进行早期干预有利于降低急性脑血管事件。斑块稳定性除与氧化应激有关外,炎症反应亦是导致动脉不稳定斑块破裂的重要原因,MMP-9 及 hs-CRP 是重要的炎性标记物,在动脉斑块的发生、发展以及破裂方面均起重要作用^[10, 11]。近来研究发现 miR-21 与炎症反应密切相关^[12],可能是导致不稳定斑块破裂的重要危险因子^[4]。

hs-CRP 作为重要的炎性反应标志物^[13],其血浆水平有助于判断动脉粥样硬化斑块性质。不稳定动脉粥样硬化斑块患者血浆中 hs-CRP 浓度可明显升高。hs-CRP 可能通过增加血管通透性,促进血管平滑肌硬化增生,不断扩大动脉粥样硬化斑块以及促使巨噬细胞及内皮细胞等多种细胞释放多种蛋白酶等途径导致不稳定斑块破裂并形成血栓^[14]。

MMP 为一类蛋白激酶家族,可以降解胶原蛋白等细胞外基质成分。MMP-9 是其家族中的重要一员,研究发现 MMP-9 作为一种炎症反应的指标,其水平亦可反映动脉斑块的稳定性。MMP-9 水平增高可导致斑块不稳定而促进斑块破裂,并进一步导致急性心脑血管事件^[15]。

miR-21 为一类非编码单链小分子 RNA,主要通过 mRNA 转录后抑制或诱导其降解对基因表达起调节作用。研究表明 miR-21 与多种恶性肿瘤的发生发展及预后密切相关并在促进血管新生中起重要作用^[16],近来有研究证实 miR-21 与冠心病患者冠脉斑块不稳定性密切相关^[4, 17],其作用通过调节 MMP-9 来实现^[18]。

银杏酮酯分散片为新一代银杏叶提取物,银杏黄酮和银杏内酯为其主要活性成分,有活血化瘀、通脉舒络之功效,用于血瘀所致的胸痹等症,如治疗冠心病心绞痛等心血管病^[19]。既往研究表明银杏酮酯分散片可有效降低心脑血管事件可能与其抑制氧化应激反应有关^[20],而有关银杏酮酯分散片对炎症反应的抑制作用则研究甚少^[21]。银杏酮酯分散片在冠心病心绞痛患者中应用的临床报道较多,而在合并不稳定颈动脉斑块的高血压病患者中的应用研究较少,本研究通过超声筛查颈动脉不稳定斑块患者作为研究对象,探

讨论银杏酮酯分散片对合并有不稳定颈动脉斑块高血压病患者中循环 miR-21 及 MMP-9 等表达的影响。结果表明银杏酮酯分散片治疗组及常规治疗对照组在性别、年龄、吸烟、合并高血压、高尿酸血症、糖尿病、冠心病以及中风等方面差异无统计学意义,最大程度上排除了上述因素对本研究的干扰作用。治疗组按说明书剂量给予银杏酮酯分散片治疗,发现治疗后 3 个月 miR-21、MMP-9 以及 hs-CRP 均下降,且显著低于对照组,差异均有统计学意义,银杏酮酯分散片除可能直接降低 MMP-9 水平外,亦有可能通过降低 miR-21 水平而进一步降低 MMP-9。对照组组内比较上述指标有下降趋势,但差异无统计学意义,可能与本研究观察时间过短有关。此外,本研究并未观察银杏酮酯分散片在治疗过程中对患者血压及血脂的影响,银杏酮酯分散片对 miR-21、MMP-9 以及 hs-CRP 的影响是否与血压及血脂变化有关仍需进一步研究。本研究结果表明,银杏酮酯分散片可能通过有效抑制合并有不稳定斑块高血压病患者体内炎症反应,对抑制斑块破裂起到积极作用。

综上所述,血浆中 miR-21、MMP-9 以及 hs-CRP 水平与颈动脉斑块不稳定程度密切相关,而服用银杏酮酯分散片可显著降低合并有不稳定颈动脉斑块高血压患者的 miR-21、MMP-9 以及 hs-CRP 水平,有利于稳定颈动脉斑块,这可能是降低心脑血管事件发生的主要机制之一。本研究提示对于合并有不稳定颈动脉斑块例的高血压病人在常规降压治疗达标并予阿司匹林及他汀类药物治疗的基础上,加用银杏酮酯分散片治疗可进一步抑制炎症反应,可能有助于稳定颈动脉斑块。

利益冲突:无。

参 考 文 献

- [1] Higashi Y, Gautam S, Delafontaine P, et al. IGF-1 and cardiovascular disease[J]. Growth Horm IGF Res, 2019, 45: 6-16.
- [2] Huang A, Young TL, Dang VT, et al. 4-phenylbutyrate and valproate treatment attenuates the progression of atherosclerosis and stabilizes existing plaques[J]. Atherosclerosis, 2017, 266: 103-112.
- [3] 俞建,胡文志. 银杏酮酯分散片对冠心病稳定性心绞痛氧化应激的影响[J]. 天津中医药, 2017, 34(2): 103-105.
- [4] Jin H, Li DY, Chernogubova E, et al. Local delivery of miR-21 stabilizes fibrous caps in vulnerable atherosclerotic lesions[J]. Mol Ther, 2018, 26(4): 1040-1055.
- [5] Kyriakidis K, Antoniadis P, Choksy S, et al. Comparative study of protein expression levels of five plaque biomarkers and relation with carotid plaque type classification in patients after carotid endarterectomy[J]. Int J Vasc Med, 2018; 4305781.
- [6] 中国高血压防治指南修订委员会. 中国高血压防治指南 2010[J]. 中华高血压杂志, 2011, 19(8): 701-743.
- [7] 王建华, 高宇, 张敏郁. 动脉粥样硬化易损斑块的影像学诊断进展[J]. 中国医学影像技术, 2014, 30(9): 1322-1325.
- [8] 王玲. 通窍涤痰方对急性脑梗死病人细胞因子、血管内皮功能及外周血单核细胞 microRNA-155、microRNA-212 表达的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2019, 17(21): 3303-3307.
- [9] Costa SM, Lima CA, Nobre A, et al. Hypertension bearers with high risk/big risk of cardiovascular diseases and socioeconomic and health indicators[J]. Rev Assoc Med Bras, 2018, 64(7): 601-610.
- [10] Hu C, Dong ZL. MicroRNA-212 promotes the recovery function and vascular regeneration of endothelial progenitor cells in mice with ischemic-stroke through inactivation of the notch signaling pathway via downregulating MMP9 expression[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(5): 7090-7103.
- [11] Ebrahimi M, Heidari-Bakavoli AR, Shoeibi S, et al. Association of serum hs-CRP levels with the presence of obesity, diabetes mellitus, and other cardiovascular risk factors[J]. J Clin Lab Anal, 2016, 30(5): 672-676.
- [12] Gryshkova V, Fleming A, McGhan P, et al. miR-21-5p as a potential biomarker of inflammatory infiltration in the heart upon acute drug-induced cardiac injury in rats[J]. Toxicol Lett, 2018, 286: 31-38.
- [13] Li FH, Wang Y, Liu XL, et al. The silencing of ApoC3 suppresses oxidative stress and inflammatory responses in placenta cells from mice with preeclampsia via inhibition of the NF-kappaB signaling pathway[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 107: 1377-1384.
- [14] Avan A, Tavakoly Sany SB, Ghayour-Mobarhan M, et al. Serum C-reactive protein in the prediction of cardiovascular diseases: Overview of the latest clinical studies and public health practice[J]. J Cell Physiol, 2018, 233(11): 8508-8525.
- [15] Doddapattar P, Jain M, Dhanesha N, et al. Fi-

- bronectin containing extra domain a induces plaque destabilization in the innominate artery of aged apolipoprotein E-deficient mice[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2018, 38(3): 500-508.
- [16] Halimulati M, Duman B, Nijati J, et al. Long non-coding RNA TCONS_00024652 regulates vascular endothelial cell proliferation and angiogenesis via microRNA-21[J]. *Exp Ther Med*, 2018, 16(4): 3309-3316.
- [17] Barwari T, Rienks M, Mayr M. MicroRNA-21 and the vulnerability of atherosclerotic plaques[J]. 2018, 26(4): 938-940.
- [18] Fan X, Wang E, Wang X, et al. MicroRNA-21 is a unique signature associated with coronary plaque instability in humans by regulating matrix metalloproteinase-9 via reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs[J]. *Exp Mol Pathol*, 2014, 96(2): 242-249.
- [19] Li S, Zhang X, Fang Q, et al. *Ginkgo biloba* extract improved cognitive and neurological functions of acute ischaemic stroke: a randomised controlled trial[J]. *Stroke Vasc Neurol*, 2017, 2(4): 189-197.
- [20] 王琦伟, 秦勇, 许文杰, 等. 银杏酮酯辅助治疗对脑梗死伴高同型半胱氨酸血症患者炎症反应、黏附分子及氧化抗氧化功能的影响[J]. *海南医学院学报*, 2017, 23(23): 3310-3313.
- [21] 袁本红. 银杏酮酯分散片对脑卒中患者血清炎症因子水平、神经功能的影响[J]. *药物评价研究*, 2018, 41(7): 1276-1279.
- (收稿: 2019-03-28 在线: 2020-06-29)
责任编辑: 白霞

欢迎订阅 2020 年《中国中西医结合杂志》

《中国中西医结合杂志》是由中国科学技术协会主管、中国中西医结合学会和中国中医科学院主办的中西医结合综合性学术期刊。1981 年创刊,由中国科学院院士陈可冀教授担任总编辑。设有述评、专家论坛、专题笔谈、临床论著、基础研究、临床报道、综述、学术探讨、思路与方法学、临床试验方法学、病例报告、中医英译、会议纪要等栏目。本刊多次获国家科委、中宣部、新闻出版署及国家中医药管理局颁发的全国优秀期刊奖;2001 年被新闻出版署评为“双效期刊”,列入中国期刊方阵;2002—2017 年 15 次被评为“百种中国杰出学术期刊”;2012—2017 年连续评为“中国最具国际影响力学术期刊”;3 次获中国科协择优支持基础性和高科技学术期刊专项资助;4 次获“国家自然科学基金重点学术期刊专项基金”资助;4 次获“中国科协精品科技期刊工程项目期刊”,2018 年共计 22 篇论文入选“F5000 中国精品科技期刊顶尖学术论文”;2015 年 5 月荣获中国科协精品科技期刊 TOP 50 项目;2018 年入选“中文科技期刊精品建设计划”。本刊被多种国内外知名检索系统收录,如:中国科学引文数据库、中国生物医学文献数据库、美国《化学文摘》(CA)、俄罗斯《文摘杂志》(AJ)、日本《科学技术文献速报》(JST)、美国《乌利希期刊指南》(Ulrich's PD)、波兰《哥白尼索引》(IC)、英国《国际农业与生物科学研究中心》(CABI)、WHO 西太平洋地区医学索引(WPRIM)等;为中国科技论文统计源期刊、中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊,被编入北京大学图书馆《中文核心期刊要目总览》,每年影响因子及总被引频次在中西医结合期刊中均名列前茅。

《中国中西医结合杂志》为大 16 开本,月刊,128 页;铜版纸印刷,彩色插图。国内定价:30.00 元/期。全年定价:360.00 元。国际标准刊号:ISSN 1003-5370,国内统一刊号:CN 11-2787/R,国内邮发代号:2-52,国外代号:M640。国内外公开发售,在各地邮局均可订阅,也可直接汇款至本社邮购。

地址:北京市海淀区西苑操场 1 号,中国中西医结合杂志社,邮政编码:100091;电话:010-62886827, 62876547, 62876548;传真:010-62876547-815;E-mail: cjm@cjm.cn;网址: <http://www.cjm.cn>。