

· 论著 ·

微小 RNA-210 在急性脑梗死中的表达及意义

赵菁 高波 翟博智

【摘要】目的 观察急性脑梗死 (ACI) 患者血中微小 RNA-210 (miR-210) 的表达,探讨其诊断 ACI 的临床价值。**方法** 采用回顾性研究方法,选择 2011 年 1 月至 2014 年 3 月发病 48 h 内入住天津市天津医院的 ACI 患者 80 例,选择同期 30 例健康体检者作为对照。取受试者外周血,采用反转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测血清 miR-210 表达;绘制受试者工作特征曲线 (ROC),评价 miR-210 对 ACI 的诊断价值;结合患者接受治疗前的病理生理特征,判定 miR-210 与临床生理指标的关系。**结果** ACI 患者血清中 miR-210 表达明显低于健康对照者 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$: 1.349 ± 0.043 比 1.923 ± 0.107 , $t=6.567$, $P<0.000$)。ROC 曲线分析结果显示,miR-210 诊断 ACI 的敏感度为 90.4%,特异度为 76.2%,ROC 曲线下面积 (AUC) 为 0.804 [95% 可信区间 (95%CI) = 0.700 ~ 0.908]。不同性别、年龄和脑梗死面积 ACI 患者之间 miR-210 表达 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) 无明显差异 (男性与女性: 1.33 ± 0.13 与 1.31 ± 0.06 , $t=3.562$, $P=0.473$; ≤ 60 岁与 >60 岁: 1.32 ± 0.12 与 1.31 ± 0.09 , $t=2.351$, $P=0.264$; 大梗死灶、小梗死灶与腔隙性梗死: 1.31 ± 0.02 , 1.33 ± 0.11 与 1.31 ± 0.06 , $F=1.236$, $P=0.087$),但随脑梗死程度加重,ACI 患者 miR-210 表达 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) 呈逐渐降低趋势 (轻、中、重度: 1.53 ± 0.11 、 1.33 ± 0.11 、 1.08 ± 0.04 , $F=5.394$, $P=0.014$)。**结论** miR-210 在 ACI 患者血清中表达降低,且与疾病严重程度相关,可以作为新的血清学指标用于 ACI 的诊断参考。

【关键词】 微小 RNA-210; 急性脑梗死; 脑梗死程度; 诊断

Expression and its significance of microRNA-210 in serum in acute cerebral infarction Zhao Jing*, Gao Bo, Zhai Bozhi. *Department of Neurology, Tianjin Hospital, Tianjin 300210, China

Corresponding author: Zhao Jing, Email: doctor1gaobo@163.com

【Abstract】Objective To investigate the expression of serum microRNA-210 (miR-210) in patients with acute cerebral infarction (ACI), and to evaluate its clinical significance. **Methods** A retrospective study was conducted. Eighty patients with ACI admitted to Tianjin Hospital from January 2011 to March 2014 within 48 hours of onset were enrolled, and 30 healthy volunteers served as controls. The peripheral blood was collected, and the expression of serum miR-210 was determined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The receiver operating characteristic curve (ROC) was drawn to analyze the role of miR-210 in the diagnosis of ACI. According to the pathological and physiological characteristics of patients receiving treatment, the relationship between miR-210 and clinical physiology index was analyzed. **Results** The expression of miR-210 in serum of patients with ACI was significantly lower than that of the healthy control group ($2^{-\Delta\Delta Ct}$: 1.349 ± 0.043 vs. 1.923 ± 0.107 , $t = 6.567$, $P < 0.000$). ROC analysis results showed that the sensitivity of miR-210 in the diagnosis of ACI was 90.4%, the specificity was 76.2%, and the area under the ROC (AUC) was 0.804 [95% confidence interval (95%CI) = 0.700-0.908]. No difference in expression of miR-210 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) in serum was found in patients of different gender, age, and infarction area (male and female: 1.33 ± 0.13 and 1.31 ± 0.06 , $t = 3.562$, $P = 0.473$; ≤ 60 years and > 60 years: 1.32 ± 0.12 and 1.31 ± 0.09 , $t = 2.351$, $P = 0.264$; large infarction, small infarction, lacunar infarction: respectively 1.31 ± 0.02 , 1.33 ± 0.11 , 1.31 ± 0.06 , $F = 1.236$, $P = 0.087$), or with the severity of cerebral infarction, and there was a tendency in lowering of expression of miR-210 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$, light, medium, severe: 1.53 ± 0.11 , 1.33 ± 0.11 , 1.08 ± 0.04 , $F = 5.394$, $P = 0.014$). **Conclusion** The serum level of miR-210 in ACI was significantly lower than that in normal healthy persons, and it may be an important new serological marker in screening and diagnosis of ACI.

【Key words】 microRNA-210; Acute cerebral infarction; Degree of cerebral infarction; Diagnosis

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2014.12.013

作者单位: 300210 天津市天津医院神经内科 (赵菁、翟博智), 心内科 (高波)

通信作者: 赵菁, Email: doctor1gaobo@163.com

脑梗死是目前严重危害人类健康的疾病之一,具有致残率和致死率高的特点,针对其发病机制、早期诊断等方面的研究具有重大意义。微小 RNA

(microRNA, miRNA) 是长约 17~25 个核苷酸的非编码单链 RNA 分子,具有高度保守性、时序性和组织特异性。在功能上,miRNA 可通过引发表靶 mRNA 的降解和(或)翻译抑制,从而介导转录后的基因沉默,调节蛋白质的表达,在神经系统分化、发育以及神经系统疾病的发生发展等过程中均发挥了重要的作用^[1]。目前的研究发现,在大脑中可能存在某些特有的 miRNA,其异常表达与神经系统功能紊乱密切相关^[2]。脑缺血后脑内一些基因被诱导或抑制,这可能与 miRNA 导致 mRNA 的降解或翻译抑制有关^[3]。miR-210 是一种缺氧激活因子^[4],其在脑梗死中的作用如何,目前尚未完全阐明。本研究通过检测急性脑梗死(ACI)患者血清中 miR-210 的表达,探讨其在 ACI 诊断中的参考价值。

1 资料与方法

1.1 研究对象:采用回顾性研究方法,收集 2011 年 1 月至 2014 年 3 月 ACI 发病 48 h 内住院患者 80 例,其中男性 53 例,女性 27 例;年龄 38~79 岁,平均(57.0±1.1)岁;根据美国国立卫生研究院脑卒中量表(NIHSS)的评分标准,轻度 27 例、中度 33 例、重度 20 例。所有患者采血前均未进行过扩容、扩血管及溶栓治疗,无创伤及手术;并且除外其他癌症、感染或免疫疾病者。选择同期的健康体检人群 30 例作为对照组,其中男性 20 例,女性 10 例;平均年龄(56.0±0.9)岁。两组性别、年龄及高血压、糖尿病、高血脂等合并症比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$),说明两组资料均衡,具有可比性。

本研究符合医学伦理学标准,经医院伦理委员会批准,并得到患者或家属的知情同意。

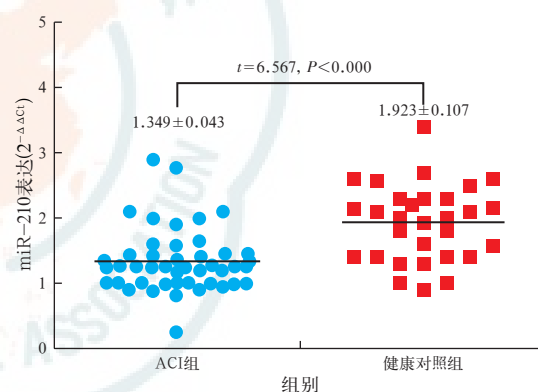
1.2 检测指标及方法

1.2.1 血样采集及 RNA 的提取:取 ACI 患者发病 48 h 内的静脉血 3 mL,枸橼酸钠抗凝,离心取血清,液氮中保存待测。样本血清总 RNA 的提取按照 RNA 提取试剂盒(TRIZOL Reagent, 美国 Invitrogen 公司)的操作步骤进行,提取的总 RNA 浓度和纯度利用紫外分光光度计(NanoDrop ND-1000N, 美国 THERMO 公司)进行测定,最后用琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 提取的质量,并将符合浓度和质量要求的 RNA 溶液于 -80 °C 保存备用。

1.2.2 反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 miR-210 表达:miRNA 反转录总体积为 25 μ L,其中 RNA 1 μ L(250 ng)、引物 1 μ L、4 种核糖三磷酸混合液 2 μ L、10 \times 上样缓冲液 2.5 μ L、RNA 抑

制酶 0.3 μ L、反转录酶 0.5 μ L、无 RNA 酶的双蒸水 17.7 μ L。反转录条件:16 °C 30 min、42 °C 30 min、85 °C 5 min、4 °C 保存。荧光定量 PCR 反应总体积为 20 μ L,其中 cDNA 2 μ L、2 \times SYBR 荧光混合液 10 μ L、上下游引物各 1 μ L、灭菌 ddH₂O 6 μ L。反应条件:95 °C 2 min;95 °C 30 s、60 °C 1 min,35 个循环后 72 °C 5 min,4 °C 保存。通过仪器获取 PCR 产生的荧光强度,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因的表达量。

1.3 统计学处理:采用 SPSS 2.0 软件对数据进行统计分析,呈正态分布的计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 t 检验。通过受试者工作特征曲线(ROC)判断 miR-210 对 ACI 诊断的敏感度和特异度,以及 miR-210 与其他临床参数的关系。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。



注:ACI 为急性脑梗死,miR-210 为微小 RNA-210

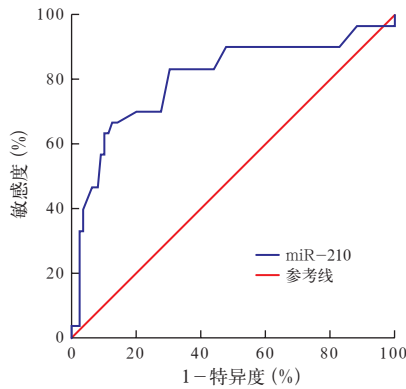
图 1 ACI 患者发病 48 h 内及健康对照者血清 miR-210 表达的比较

2 结果

2.1 miR-210 在 ACI 中的表达(图 1):荧光定量 PCR 检测结果发现,ACI 患者血清 miR-210 表达显著低于健康体检者($t=6.567, P < 0.000$)。

2.2 血清 miR-210 水平对 ACI 的诊断价值(图 2):利用 ROC 曲线分析 miR-210 水平对于 ACI 的诊断意义,结果显示,ROC 曲线下面积(AUC)为 0.804,95% 可信区间(95%CI)=0.700~0.908,敏感度为 90.4%,特异度为 76.2%。由此可见,miR-210 表达水平在一定程度上可以用来协助诊断 ACI。

2.3 miR-210 表达水平与 ACI 患者临床病理参数的关系(表 1):不同性别、年龄和梗死面积患者之间 miR-210 表达比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$);而随梗死程度加重,miR-210 表达呈降低趋势($P < 0.05$)。



注: miR-210 为微小 RNA-210, ACI 为急性脑梗死, ROC 曲线为受试者工作特征曲线
图 2 血清 miR-210 水平诊断 ACI 的 ROC 曲线

表 1 80 例 ACI 患者血清 miR-210 表达水平与临床病理参数的关系

病理特征	例数 (例)	miR-210 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	检验值	P 值
性别 男性	53	1.33 ± 0.13	$t = 3.562$	0.473
女性	27	1.31 ± 0.06		
年龄 ≤ 60 岁	39	1.32 ± 0.12	$t = 2.351$	0.264
> 60 岁	41	1.31 ± 0.09		
梗死程度 轻度	27	1.53 ± 0.11	$F = 5.394$	0.014
中度	33	1.33 ± 0.11		
重度	20	1.08 ± 0.04		
梗死面积 大梗死灶	15	1.31 ± 0.02	$F = 1.236$	0.087
小梗死灶	47	1.33 ± 0.11		
腔隙性梗死	18	1.31 ± 0.06		

注: ACI 为急性脑梗死, miR-210 为微小 RNA-210

3 讨论

ACI 是由于脑动脉闭塞导致脑组织缺血、缺氧, 由此产生的一系列炎症反应、细胞死亡、凋亡与血管再生等病理改变, 临床表现为神经功能障碍。有研究发现, 缺血、缺氧条件下可以导致细胞内 miRNA 变化, miRNA 与低氧反应密切相关, 多种 miRNA 参与了大脑缺血、缺氧及再灌注损伤中的细胞凋亡过程^[5-6]。曾秋婷等^[7]认为, 富氢液减轻大鼠全脑缺血/再灌注损伤的机制与下调海马 miR-210 和 miR-21 表达有关。高法梁等^[8-9]研究认为, 脑缺血后 miR-210 表达显著上调, miR-210 可能在促进脑缺血后血管新生过程中起重要作用。miRNA 可能通过调控细胞凋亡基因、细胞周期基因、血管内皮生长因子基因而发挥作用^[10]。张振辉等^[11]研究发现, miRNA 在调控免疫细胞的炎症反应过程中具有重要作用。王中华等^[12]研究发现, 在脓毒症过程中, miRNA 与炎症因子间相互促进表达, 从而启动了炎症信号“瀑布”效应。刘芬等^[13-14]研究发现, miRNA

参与了炎症分子的表达, 与炎症反应密切相关, 同时参与调控免疫细胞, 对炎症反应具有调控作用。

在正常情况下, 血液中某些 miRNA 的存在较为稳定^[15-16], 其异常表达对于疾病诊断具有一定意义^[16-19]。鉴于外周采血的方便性及 RNA 提取的可操作性, 使得人们可通过检测血清中 miRNA 水平来对某些疾病进行早期诊断。目前研究发现, 很多 miRNA 可以用来鉴定癌症的发生, 如 miR-141、miR-449 等^[20-21]。研究结果显示, ACI 患者外周血中 miRNA 水平也具有明显的表达差异^[22]。近年来, 无论是在体内还是体外实验中, 外周血或脑组织中 miRNA 的表达谱在卒中患者及模型动物中已有相关研究^[23-26]。国内任妙丹等^[27]研究发现, 心肺复苏后脑皮质与凋亡相关的 miRNA 发生变化, 可能参与了细胞凋亡、再灌注损伤的调控。

在体外实验中 miR-210 是缺氧条件下唯一能够被上调的 miRNA。有研究发现, miR-210 可被低氧诱导因子-1 α (HIF-1 α) 特异性诱导^[25,28], miR-210 启动子携带有功能性低氧反应元件, 在低氧暴露时, 可被 HIF-1 α 辨认, 诱导 miR-210 转录^[29]。目前已经鉴定出很多基因是 miR-210 的靶基因^[22-26,30], 包括迁移/黏附分子相关基因 HOXA3、APC、CLASP2、P4HB、PTPN1、MDGA1 和 MIDI1P1, 血管生成相关基因 EFNA3 和 ELK3, 蛋白修饰及转录相关基因 PTAR1 和 TNPO1, 染色质异构相关基因 CBX1、XIST、NIPBL 和 SMCHD1, 核酸结合蛋白相关基因 RAD52 和 CPEB2, 发育相关基因 HOXA1 和 HOXA3, 线粒体代谢相关基因 ISCU 和 ATP11C, 细胞生存和增殖相关基因 ACVR1 β 、E2F3 和 MNT, 分化相关基因 EFNA3、BDNF 和 ACVR1b。miR-210 则通过这些基因参与了细胞迁移、血管生成、蛋白修饰、染色质异构、核酸相关、发育、线粒体代谢、细胞增殖和分化等^[22,26]。

miR-210 在低氧环境下参与了细胞调控, 在缺血性脑损伤中也具有重要作用。近期研究发现, 脑组织及血液中均存在 miR-210^[31], 但其在 ACI 中的表达却鲜有报道, 因此我们检测了 ACI 患者外周循环中 miR-210 的表达及其与临床生理指标的相关性。结果发现, ACI 患者血清中 miR-210 表达较健康对照者显著降低。经过 ROC 曲线拟合, 其敏感度为 90.4%, 特异度为 76.2%, 可见 miR-210 的循环水平对于 ACI 的鉴定具有一定的指导意义。本研究还发现, miR-210 表达水平与患者的年龄、性别及

梗死面积无关,但与患者疾病的严重程度有一定相关性,并且随着严重程度的增加,miR-210 表达水平呈递减趋势。Zeng 等^[32]研究发现,急性脑缺血患者 miR-210 表达显著降低,但与患病程度无关,与本研究结果不一致。

综上所述,本研究发现 miR-210 在 ACI 患者的血清中表达降低,与病情严重程度相关,并且作为新的血清学指标在 ACI 诊断中具有重要参考价值。对于 miRNA 与某些临床疾病的关系还需要更大样本进行对比研究。

参考文献

[1] Gao FB. Posttranscriptional control of neuronal development by microRNA networks [J]. Trends Neurosci, 2008, 31 (1): 20-26.

[2] Rogava EI. Small RNAs in human brain development and disorders [J]. Biochemistry (Mosc), 2005, 70 (12): 1404-1407.

[3] Tang Y, Lu A, Aronow BJ, et al. Genomic responses of the brain to ischemic stroke, intracerebral haemorrhage, kainate seizures, hypoglycemia, and hypoxia [J]. Eur J Neurosci, 2002, 15 (12): 1937-1952.

[4] Ivan M, Harris AL, Martelli F, et al. Hypoxia response and microRNAs: no longer two separate worlds [J]. J Cell Mol Med, 2008, 12 (5A): 1426-1431.

[5] 张煜,郭军. 微小 RNA 与缺血性脑损伤[J]. 中国医学科学院学报, 2012, 34 (4): 418-421.

[6] 张丹丹,沈静,刘芳. 微小 RNA 与糖尿病血管新生[J]. 国际内分泌代谢杂志, 2013, 33 (1): 40-42, 45.

[7] 曾秋婷,高玮,邹瑜,等. 富氢液对大鼠全脑缺血再灌注时海马 miR-210 和 miR-21 表达的影响[J]. 中华麻醉学杂志, 2013, 33 (2): 239-241.

[8] 高法梁,娄远蕾,阮琼芳,等. 缺血性脑损伤大鼠 MicroRNA 210 的动态变化[J]. 实验与检验医学, 2010, 28 (3): 230-232.

[9] 高法梁,汪洪,娄远蕾,等. 缺血性脑损伤后 MicroRNA 210 及其靶基因 ephrinA3 的表达变化[J]. 中华实验外科杂志, 2010, 27 (2): 264.

[10] 文全庆,贾延劼,王明闯,等. 大鼠脑缺血急性期脑组织 miRNA 的表达变化[J]. 重庆医科大学学报, 2008, 33 (Z1): 23-26, 40.

[11] 张振辉,陈晓辉,江子欣,等. 微小 RNA-141 对人单核细胞合成高迁移率族蛋白 B1 的调控作用[J]. 中华危重病急救医学, 2013, 25 (10): 604-607.

[12] 王中华,梁艳冰,唐皓,等. 微小 RNA-155 在脓毒症小鼠肝脏内的表达变化及作用研究[J]. 中国危重病急救医学, 2012, 24 (3): 154-157.

[13] 刘芬,曾振国,聂成,等. 转染微小 RNA-146a 对肺泡巨噬细胞肿瘤坏死因子- α 表达的影响[J]. 中华危重病急救医学, 2013, 25 (6): 335-338.

[14] 刘芬,江榕,李勇,等. 微小 RNA-132 在脂多糖诱导大鼠肺泡巨噬细胞炎症反应中的表达变化[J]. 中华危重病急救医学, 2014, 26 (2): 80-83.

[15] Zen K, Zhang CY. Circulating microRNAs: a novel class of biomarkers to diagnose and monitor human cancers [J]. Med Res Rev, 2012, 32 (2): 326-348.

[16] Chen X, Ba Y, Ma L, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases [J]. Cell Res, 2008, 18 (10): 997-1006.

[17] Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105 (30): 10513-10518.

[18] Resnick KE, Alder H, Hagan JP, et al. The detection of differentially expressed microRNAs from the serum of ovarian cancer patients using a novel real-time PCR platform [J]. Gynecol Oncol, 2009, 112 (1): 55-59.

[19] Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, et al. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma [J]. Br J Haematol, 2008, 141 (5): 672-675.

[20] Zhang HL, Qin XJ, Cao DL, et al. An elevated serum miR-141 level in patients with bone-metastatic prostate cancer is correlated with more bone lesions [J]. Asian J Androl, 2013, 15 (2): 231-235.

[21] Li M, Zhang Q, Wu L, et al. Serum miR-499 as a novel diagnostic and prognostic biomarker in non-small cell lung cancer [J]. Oncol Rep, 2014, 31 (4): 1961-1967.

[22] Chen Z, Li Y, Zhang H, et al. Hypoxia-regulated microRNA-210 modulates mitochondrial function and decreases ISCU and COX10 expression [J]. Oncogene, 2010, 29 (30): 4362-4368.

[23] Favaro E, Ramachandran A, McCormick R, et al. MicroRNA-210 regulates mitochondrial free radical response to hypoxia and krebs cycle in cancer cells by targeting iron sulfur cluster protein ISCU [J]. PLoS One, 2010, 5 (4): e10345.

[24] Fasanaro P, Greco S, Lorenzi M, et al. An integrated approach for experimental target identification of hypoxia-induced miR-210 [J]. J Biol Chem, 2009, 284 (50): 35134-35143.

[25] Fasanaro P, D'Alessandra Y, Di Stefano V, et al. MicroRNA-210 modulates endothelial cell response to hypoxia and inhibits the receptor tyrosine kinase ligand Ephrin-A3 [J]. J Biol Chem, 2008, 283 (23): 15878-15883.

[26] Chan SY, Loscalzo J. MicroRNA-210: a unique and pleiotropic hypoxamir [J]. Cell Cycle, 2010, 9 (6): 1072-1083.

[27] 任妙丹,何爱文,陈寿权,等. 心肺复苏后大鼠皮质区凋亡相关性微小 RNA 的表达变化[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2014, 21 (2): 95-98.

[28] Camps C, Buffa FM, Colella S, et al. hsa-miR-210 Is induced by hypoxia and is an independent prognostic factor in breast cancer [J]. Clin Cancer Res, 2008, 14 (5): 1340-1348.

[29] Huang X, Ding L, Bennewith KL, et al. Hypoxia-inducible mir-210 regulates normoxic gene expression involved in tumor initiation [J]. Mol Cell, 2009, 35 (6): 856-867.

[30] Chan SY, Zhang YY, Hemann C, et al. MicroRNA-210 controls mitochondrial metabolism during hypoxia by repressing the iron-sulfur cluster assembly proteins ISCU1/2 [J]. Cell Metab, 2009, 10 (4): 273-284.

[31] Zhao A, Li G, Péc'h M, et al. Serum miR-210 as a novel biomarker for molecular diagnosis of clear cell renal cell carcinoma [J]. Exp Mol Pathol, 2013, 94 (1): 115-120.

[32] Zeng L, Liu J, Wang Y, et al. MicroRNA-210 as a novel blood biomarker in acute cerebral ischemia [J]. Front Biosci (Elite Ed), 2011, 3: 1265-1272.

(收稿日期: 2014-08-22)

(本文编辑: 李银平)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

本刊关于临床试验和伦理的一般要求

临床试验注册号应是从 WHO 认证的一级临床试验注册中心获得的全球唯一的注册号。临床试验注册号排印在摘要结束处。以“临床试验注册”(Trial registration)为标题(字体、字号与摘要的其他小标题相同),写出注册机构名称和注册号。前瞻性临床试验研究的论著摘要应含有 CONSORT 声明(Consolidated Standards of Reporting Trial; <http://www.consort-statement.org/home>)列出的基本要素。医学伦理问题及知情同意须遵循医学伦理基本原则。当论文的主体是以人为研究对象时,作者应说明其遵循的程序是否符合负责人体试验的委员会(单位性的、地区性的或国家性的)所制订的伦理学标准。提供该委员会的批准文件(批准文号著录于论文中)及受试对象或其亲属的知情同意书。