

• 论 著 •

miRNA-17-5p、miRNA-103-3p 及 miRNA-144-3p 在急性缺血性脑卒中中的表达及诊断价值研究

黄怡颖, 张 健

(海安市人民医院检验科, 江苏海安 226600)

摘 要:目的 探讨微小 RNA(miRNA)-17-5p、miRNA-103-3p 及 miRNA-144-3p 在急性缺血性脑卒中(AIS)中的表达及临床诊断价值。方法 分别收集该院 50 例非脑卒中患者和 50 例 AIS 患者的血清标本作为对照组和病例组。采用实时荧光定量 PCR 法检测血清中 miRNA-17-5p、miRNA-103-3p 及 miRNA-144-3p 的表达水平,同时将血清中 miRNA-17-5p、miRNA-103-3p 及 miRNA-144-3p 的水平与研究对象的临床诊断价值进行对比分析。结果 病例组血清 miRNA-17-5p、miRNA-103-3p 及 miRNA-144-3p 表达水平均显著高于对照组($P<0.001$)。AIS 患者血清 miRNA-17-5p、miRNA-103-3p 及 miRNA-144-3p 与美国国立卫生院卒中量表(NIHSS)评分呈显著正相关($r=0.605, 0.667, 0.710$, 均 $P<0.05$)。miRNA-17-5p、miRNA-103-3p、miRNA-144-3p 及三者联合区分 AIS 患者与非 AIS 的受试者工作特征曲线下面积分别为 $0.846(95\%CI: 0.757\sim 0.935, P<0.001)$ 、 $0.866(95\%CI: 0.788\sim 0.945, P<0.001)$ 、 $0.935(95\%CI: 0.888\sim 0.982, P<0.001)$ 和 $0.976(95\%CI: 0.953\sim 0.999, P=0.000)$;灵敏度和特异度分别为 84% 和 92% 、 84% 和 88% 、 92% 和 86% 、 92% 和 94% 。结论 miRNA-17-5p、miRNA-103-3p 及 miRNA-144-3p 是 AIS 诊断的潜在标志物。

关键词:缺血性脑卒中; miRNA-17-5p; miRNA-103-3p; miRNA-144-3p

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2020.09.020 **中图法分类号:**R446.1

文章编号:1673-4130(2020)09-1105-04 **文献标识码:**A

Expressions and clinical diagnostic values of miRNA-17-5p, miRNA-103-3p and miRNA-144-3p in acute ischemic stroke

HUANG Yiying, ZHANG Jian

(Department of Clinical Laboratory, Haian People's Hospital, Haian, Jiangsu 226600, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expressions and clinical values of miRNA-17-5p, miRNA-103-3p and miRNA-144-3p in acute ischemic stroke (AIS). **Methods** Serum samples from 50 non AIS patients and 50 AIS patients in the hospital were collected as control group and case group. Real-time quantitative PCR was used to detect the expressions of miRNA-17-5p, miRNA-103-3p and miRNA-144-3p in serum, and the clinical diagnosis values of miRNA-17-5p, miRNA-103-3p and miRNA-144-3p were statically analyzed. **Results** The serum levels of miRNA-17-5p, miRNA-103-3p and miRNA-144-3p in the case group were significantly higher than those in the control group ($P<0.001$). Serum miRNA-17-5p, miRNA-103-3p and miRNA-144-3p were positively correlated with NIHSS($r=0.605, 0.667, 0.710$, all $P<0.05$). The area under the working characteristic curve of the subjects who distinguish AIS patients from non AIS patients by miRNA-17-5p, miRNA-103-3p, miRNA-144-3p and combined detection of three indicators was $0.846(95\%CI: 0.757\sim 0.935, P<0.001)$, $0.866(95\%CI: 0.788\sim 0.945, P<0.001)$, $0.935(95\%CI: 0.888\sim 0.982, P<0.001)$, $0.976(95\%CI: 0.953\sim 0.999, P=0.000)$, the sensitivity and specificity were 84% and 92% , 84% and 88% , 92% and 86% , 92% and 94% , respectively. **Conclusion** miRNA-17-5p, miRNA-103 and miRNA-144-3p are potential markers for AIS diagnosis.

Key words: acute ischemic stroke; miRNA-17-5p; miRNA-103-3p; miRNA-144-3p

作者简介:黄怡颖,女,技师,主要从事临床检验研究。

本文引用格式:黄怡颖,张健. miRNA-17-5p、miRNA-103-3p 及 miRNA-144-3p 在急性缺血性脑卒中中的表达及诊断价值研究[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(9): 1105-1108.

急性缺血性脑卒中(AIS)是脑卒中的最常见类型之一,其特点为高患病率、高致残率、高死亡率及高复发率,已经成为严重的公共卫生问题^[1-3]。但是目前尚未研发出特效药物对 AIS 进行有效治疗和控制,因此,深入探索及研究 AIS 具有重要的临床意义和诊断价值。微小 RNA(miRNA)是一类小的单链调节 RNA,其通过调节靶 mRNA 的表达从而广泛参与转录后的生物过程^[4-6]。超过 60% 的人类蛋白质编码基因含有至少一个保守的 miRNA 结合位点,大多数蛋白质编码基因受 miRNA 调控^[7-8]。近年来已有大量研究证实,AIS 患者的病理过程可与血清 miRNA 的表达密切相关,但具体机制仍需进一步研究^[9-11]。本研究通过对比健康人群和 AIS 患者血清中 miRNA-17-5p、miRNA-103-3p 及 miRNA-144-3p 的水平,探索三者在 AIS 患者中的临床诊断价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集本院 2017 年 4 月至 2018 年 4 月 AIS 患者 50 例为病例组。病例组男 28 例,女 22 例;平均年龄(52.3±5.8)岁;高血压患者 22 例,糖尿病患者 14 例,高血脂患者 20 例。纳入标准:(1)患者符合全国脑血管病学术会议修正的《各类脑血管疾病诊断要点》中 AIS 中的诊断标准^[12],同时经头颅 CT 或 MRI 检查证实。(2)计算美国国立卫生院卒中量表(NIHSS)评分,评分范围:0~1 分为正常或近乎正常;>1~4 分为轻度卒中/小卒中;>4~15 分为中度卒中;>15~20 分为中重度卒中;>20~42 分为重度卒中。同时选择本院同期非 AIS 患者 50 例作为对照组,并且与病例组年龄、性别等相匹配,排除脑卒中病史、头部手术史等疾病。对照组男 25 例,女 25 例;平均年龄(55.1±7.5)岁;高血压患者 18 例,糖尿病患者 16 例,高血脂患者 23 例。2 组患者年龄、性别及疾病史方面比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见表 1。本研究已经过本院伦理委员会批准,所有受试者均签署知情同意书。

1.2 标本采集 所有受试者的血液标本均在空腹状态下采集,将受试者的静脉血 3~5 mL 收集装进试管中,离心后,将获取的血清置于一 20℃ 冰箱保存,冻存检测样本以备后续实验检测。

1.3 检测方法 血清 miRNA-17-5p、miRNA-103-3p 及 miRNA-144-3p 的水平均采用实时荧光定量 PCR(RT-PCR)进行检测,试剂盒购自上海百蕊生物科技有限公司。所有实验操作均严格遵循试剂盒说明书进行。RT-PCR 测量仪购自德国 Qiagen 公司,小型高速冷冻离心机购自德国 Eppendorf 公司。首先,提取血清中总 RNA,采用去除基因组反转录试剂盒,将待测标本反转录为 cDNA,采用 RT-PCR 进行检测。

反应溶液为 20.0 μL 体系,分别为 SYBR GREEN Mix 8.0 μL,上游引物 0.8 μL,下游引物 0.8 μL,cDNA 4.0 μL,最后加入无 RNA 酶水 6.4 μL。反应条件:95℃ 5 min;95℃ 30 s,58℃ 30 s,72℃ 30 s,采用 38 个循环。miRNA-17-5p 的上游引物序列为 5'-CCA GGA TCC TTT ATA GTT GTT AGA GTT TG-3',下游引物序列为 5'-CGG AAT TCT AAT CTA CTT CAC TAT CTG CAC-3'。miRNA-103-3p 的上游引物序列为 5'-GAG CAG CAT TGT ACA G-3',下游引物序列为 5'-GTG CAG GGT CCG AGG T-3'。miRNA-144-3p 的上游引物序列为 5'-GGC GTA CAG TAT AGA TGA T-3',下游引物序列为 5'-GAG CAG GCT GGA GAA-3'。β-actin 的上游引物序列为 5'-CCC ATC TAT GAG GGT TAC GC-3',下游引物序列为 5'-TTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC-3'。本实验的研究结果均采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法换算三者的相对表达量。

表 1 2 组患者的临床基线资料比较				
临床资料	对照组($n=50$) 病例组($n=50$)		χ^2	P
性别(n)			0.361	0.548
男	25	28		
女	25	22		
年龄($\bar{x}\pm s$,岁)	54.84±2.32	53.44±3.09	0.732	0.466
高血压病史(n)			0.542	0.461
有	18	22		
无	31	28		
糖尿病史(n)			0.190	0.663
有	16	14		
无	34	36		
高血脂(n)			0.367	0.545
有	23	20		
无	27	30		

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件对各组数据进行统计分析,计数资料以频数和百分比(%)表示,采用 χ^2 检验分析;计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表达,组间比较采用 t 检验;线性相关性采用 Pearson 相关,采用受试者工作特征曲线(ROC 曲线)计算 miRNA-17-5p、miRNA-103-3p 及 miRNA-144-3p 的临床诊断价值, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 2 组血清中 miRNA-17-5p、miRNA-103-3p 及 miRNA-144-3p 的表达水平比较 与对照组相比,病例组血清中 miRNA-17-5p、miRNA-103-3p 及 miRNA-144-3p 的水平显著升高,差异均有统计学意义($P<0.05$),见表 2。

2.2 血清中 miRNA-17-5p、miRNA-103-3p 及 miRNA-144-3p 的水平与 AIS 临床特征间的相关性 相关分析结果显示,血清中 miRNA-17-5p、miRNA-103-3p 及 miRNA-144-3p 与 AIS 患者 NIHSS 评分呈显著正相关,差异均有统计学意义($r=0.605, P=0.000$; $r=0.667, P=0.000$; $r=0.710, P=0.000$)。见表 3。

表 2 2 组患者血浆中 miRNA-17-5p、miRNA-103-3p 与 miRNA-144-3p 表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

指标	对照组($n=50$)	病例组($n=50$)	P
miRNA-17-5p	7.60 $\pm$ 0.82	21.39 $\pm$ 1.22	0.000
miRNA-103-3p	7.29 $\pm$ 1.18	27.21 $\pm$ 1.34	0.000
miRNA-144-3p	6.30 $\pm$ 0.98	21.03 $\pm$ 1.22	0.000

表 3 血清中 miRNA-17-5p、miRNA-103-3p 及 miRNA-144-3p 的水平与 NIHSS 评分相关性

指标	r	P
miRNA-17-5p	0.605	0.000
miRNA-103-3p	0.667	0.000
miRNA-144-3p	0.701	0.000

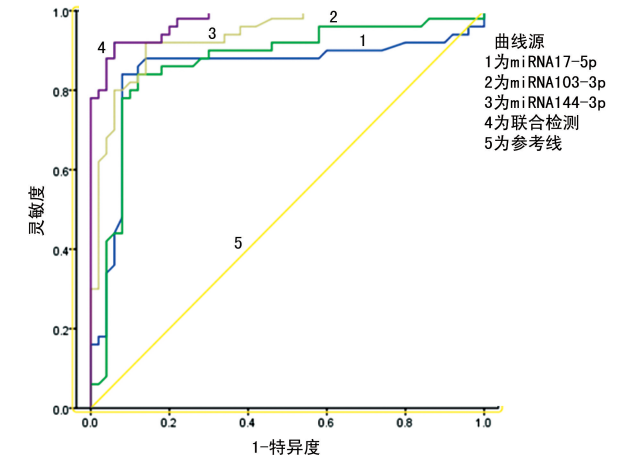


图 1 miRNA-17-5p、miRNA-103-3p、miRNA-144-3p 及三者联合对 AIS 的 ROC 曲线

表 4 miRNA-17-5p、miRNA-103-3p、miRNA-144-3p 及三者联合检测 ROC 曲线下面积

指标	曲线 下面积	95%CI	灵敏度 (%)	特异度 (%)
miRNA-17-5p	0.846	0.757~0.935	84	92
miRNA-103-3p	0.866	0.788~0.945	84	88
miRNA-144-3p	0.935	0.888~0.982	92	86
联合检测	0.976	0.953~0.999	92	94

2.3 ROC 曲线分析 采用 ROC 曲线评价血清 miRNA-17-5p、miRNA-103-3p、miRNA-144-3p 及三者联合对 AIS 的诊断价值,结果提示 miRNA-17-5p、

miRNA-103-3p、miRNA-144-3p 及三者联合区分 AIS 患者与非 AIS 的曲线下面积分别为 0.846(95%CI: 0.757~0.935, $P=0.000$)、0.866(95%CI: 0.788~0.945, $P=0.045$)、0.935(95%CI: 0.888~0.982, $P=0.001$)和 0.976(95%CI: 0.953~0.999, $P=0.000$);灵敏度和特异度分别为 84%和 92%、84%和 88%、92%和 86%、92%和 94%,见图 1、表 4。

3 讨 论

AIS 是一种多生物因子、多信号通路参与的神经系统疾病,具有发病急和预后差的特点,给我国公民带来沉重的精神压力和经济负担^[13-15]。虽然已有相关研究证实,超敏 C 反应蛋白及胶原纤维酸性蛋白可作为 AIS 的生物标志物,但目前临床中仍未应用 AIS 的特异性血清标志物^[16-19]。同时,随着 miRNA 参与 AIS 机制研究的逐渐深入,可通过检测患者外周血液中 miRNA 表达的变化来监测 AIS 的发展过程,因此,miRNA 极有可能成为 AIS 新的诊断标志物^[20-21]。

近年来,已有研究证实,miRNA-17-5p 在自发性高血压性卒中大鼠的血清中显著上升,而 miRNA-17-5p 也广泛参与脑血管慢性后遗症的病理过程,这些研究结果表明 miRNA-17-5p 与脑血管疾病密切相关,但具体机制仍然不明^[22]。本研究发现 AIS 患者血清中 miRNA-17-5p 的水平显著上升,且与脑卒中患者 NIHSS 评分呈正相关,进一步证实 miRNA-17-5p 可增加 AIS 患病风险,这与前期基础研究结果也相一致。

miRNA-103-3p 可能通过正向调节靶基因 srebfl1 的表达进而参与肝脏脂质代谢途径,最终可影响代谢综合征的发生发展^[23]。而国内研究也表明,miRNA-103-3p 可导致心血管疾病的发生发展^[24]。本研究结果显示,AIS 患者的血清 miRNA-103-3p 表达水平显著高于对照,笔者认为这可能是由于脑脊液中的 miRNA 进入患者外周血而引起血清水平升高。本研究结果表明,miRNA-144-3p 水平在病例组显著增加,并且与 NIHSS 评分呈正相关,这一结果表明 miRNA-144-3p 可能显著增加 AIS 的患病风险,同时笔者认为这可能通过诱导神经元凋亡从而加剧 AIS 的发生发展。ROC 曲线下面积结果显示,血清中 miRNA-17-5p、miRNA-103-3p 及 miRNA-144-3p 对 AIS 患者具有一定的诊断价值,当联合 miRNA-17-5p、miRNA-103-3p 及 miRNA-144-3p 指标时诊断 AIS 患者的灵敏度达 92%,特异度达 94%,这一结果提示联合 miRNA-17-5p、miRNA-103-3p 及 miRNA-144-3p 三者检测对 AIS 的诊断具有更小的误诊率和漏诊率,也为临床应用提供了可靠的理论基础。

4 讨 论

综上所述,miRNA-17-5p、miRNA-103-3p 与

miRNA144-3p 表达水平与 AIS 的患病风险有一定的关系,而三者联合检测可进一步提高 AIS 患者的诊断率,但是否与 AIS 的预后有关仍需作进一步深入研究。

参考文献

- [1] 王慧媛,杨莉,赵志刚. 神经保护剂在缺血性脑卒中的应用现状[J]. 中国医药导报, 2016, 13(27): 67-70.
- [2] KRÓL W, ZAREK A, WILK A, et al. Transthoracic echocardiography in the assessment of cardiogenic causes of ischaemic stroke[J]. Neurol Neurochir Pol, 2019, 53(2): 156-161.
- [3] LI Y, ZHONG W, JIANG Z, et al. New progress in the approaches for blood-brain barrier protection in acute ischemic stroke[J]. Brain Res Bull, 2019, 144(2019): 46-57.
- [4] FRIEDMAN R C, FARH K H, BURGE C B, et al. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs[J]. Genome Research, 2008, 19(1): 92-105.
- [5] 汤志雄, 苟德明. miRNA 调控成肌分化的研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2017, 37(10): 109-116.
- [6] GETANEH Z, ASRIE F, MELKU M. MicroRNA profiles in B-cell non-Hodgkin lymphoma[J]. J Int Federat clin chem, 2019, 30(2): 195-214.
- [7] FLYNT A S, LAI E C. Biological principles of microRNA-mediated regulation: shared themes amid diversity[J]. Nat Rev Genet, 2008, 9(11): 831-842.
- [8] 夏飞迪. miRNA-靶位点配对的序列特征研究[D]. 广州: 广东工业大学, 2018.
- [9] JICKLING G C, ANDER B P, XINHUA Z, et al. MicroRNA expression in peripheral blood cells following acute ischemic stroke and their predicted gene targets[J]. PLoS One, 2014, 9(6): e99283.
- [10] LI P, TENG F, GAO F, et al. Identification of circulating microRNAs as potential biomarkers for detecting acute ischemic stroke[J]. Cell Mol Neurobiol, 2015, 35(3): 433-447.
- [11] DU K, ZHAO C, WANG L, et al. MiR-191 inhibit angiogenesis after acute ischemic stroke targeting VEZF1[J]. Aging (Albany NY), 2019, 11(9): 2762-2786.
- [12] 王新德. 各类脑血管疾病诊断要点[J]. 中华神经科杂志, 1996, 41(6): 379-380.
- [13] ZENG Z, ZHANG Y, LIANG X, et al. Qingnao dripping pills mediate immune-inflammatory response and MAPK signaling pathway after acute ischemic stroke in rats[J]. J Pharmacol Sci, 2019, 139(3): 143-150.
- [14] LI F, ZHAO H, HAN Z, et al. Xuesaitong may protect against ischemic stroke by modulating microglial phenotypes and inhibiting neuronal cell apoptosis via the STAT3 signaling pathway[J]. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2019, 18(2): 115-123.
- [15] 余叶菁. 急性缺血性卒中认知损害相关因素及其对短期预后的影响[D]. 合肥: 河北医科大学, 2015.
- [16] 周行. 血清超敏 C-反应蛋白及同型半胱氨酸在缺血性进展性脑卒中的诊断意义[J]. 中国实验诊断学, 2013, 17(5): 960-961.
- [17] 张春和, 金艳, 王艳玲. S100 β 蛋白、胶原纤维酸性蛋白与急性缺血性脑卒中的相关性研究[J]. 中国实用医刊, 2012, 39(5): 38-41.
- [18] QIN C, ZHAO X, MA X, et al. Proteomic profiling of plasma biomarkers in acute ischemic stroke due to large vessel occlusion[J]. J Transl Med, 2019, 17(1): 214.
- [19] TULANTCHED D S, MIN Z, FENG W. Comparison of plasma PARK7 and NDKA diagnostic value in acute stroke[J]. Future Sci OA, 2019, 5(5): 375.
- [20] 袁梅, 周成芳, 汤永红, 等. 急性缺血性脑卒中患者血清 miRNA-335 表达水平及临床意义[J]. 中国动脉硬化杂志, 2015, 23(6): 589-593.
- [21] 张誓伟. miRNA-221、miRNA-622、miRNA-649 在缺血性脑卒中患者外周血中的表达及意义[J]. 医学研究与教育, 2017, 34(2): 14-18.
- [22] 张凤江, 周金桥, 赵新炜, 等. 微小 RNA-17-5p 在脑恶性胶质瘤患者血清和肿瘤组织的表达及其对 U87MG 和 U251 体外作用[J]. 中华实验外科杂志, 2017, 34(7): 1206-1209.
- [23] ANA G, FERNÁNDEZ-QUINTELA A, JONATAN M, et al. Are miRNA-103, miRNA-107 and miRNA-122 involved in the prevention of liver steatosis induced by resveratrol[J]. Nutrients, 2017, 9(4): 360.
- [24] 庄凯丽. miR-103-3p 对心肌细胞 ERG 基因表达影响的相关研究[D]. 宁波: 宁波大学, 2017.

(收稿日期: 2019-09-22 修回日期: 2020-01-02)