

论著·临床研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.22.020

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20200925.0936.002.html\(2020-09-25\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20200925.0936.002.html(2020-09-25))

急性脑梗死患者外周血微 RNA 的表达及其与炎症因子的关系*

彭飞飞,陶晓晓,章熠,尤丽玲[△]

(台州市第一人民医院神经内科,浙江台州 318020)

[摘要] **目的** 探讨急性脑梗死(ACI)患者外周血微 RNAs(miRNAs)表达情况及其与炎症因子间的相关性。**方法** 选取 2018 年 6 月至 2019 年 8 月该院收治的首次发病的 ACI 患者 316 例为 ACI 组,另选取同期体检的健康志愿者 60 例为对照组。采用定量逆转录 PCR(qRT-PCR)测定各组血浆 miRNA-124、miRNA-128b、miRNA-153、miRNA-424,采用 ELISA 测定血清炎症因子[白细胞介素(IL)-6、IL-8、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、C 反应蛋白(CRP)]。**结果** ACI 组血浆 miRNA-124、miRNA-424 水平明显低于对照组,血浆 miRNA-128b、miRNA-153 及血清 IL-6、IL-8、TNF- α 、CRP 水平明显高于对照组($P<0.05$)。中、重度组 ACI 患者血浆 miRNA-128b、miRNA-153 及血清 IL-6、IL-8、TNF- α 、CRP 水平明显高于轻度组,且重度组明显高于中度组($P<0.05$);中、重度组 ACI 患者血浆 miRNA-124、miRNA-424 水平明显低于轻度组,且重度组明显低于轻度组($P<0.05$)。大、中梗死灶组 ACI 患者血浆 miRNA-128b、miRNA-153 及血清 IL-6、TNF- α 、CRP 水平高于小梗死灶组,且大梗死灶组高于中梗死灶组($P<0.05$);大、中梗死灶组 ACI 患者血浆 miRNA-124、miRNA-424 表达水平明显低于小梗死灶组,且大梗死灶组明显低于中梗死灶组($P<0.05$)。ACI 患者血浆 miRNA-124、miRNA-424 表达水平与血清 IL-6、IL-8、TNF- α 、CRP 水平呈负相关,miRNA-128b、miRNA-153 表达水平与血清 IL-6、IL-8、TNF- α 、CRP 水平呈正相关($P<0.05$)。**结论** ACI 患者循环 miRNAs 存在差异表达,miRNA-124、miRNA-424 呈低表达,而 miRNA-128b、miRNA-153 呈高表达,且与炎症因子水平密切相关,可作为 ACI 病情评估的潜在生物标志物。

[关键词] 脑梗死;微 RNAs;白细胞介素-6;白细胞介素-8;肿瘤坏死因子 α ;C 反应蛋白质

[中图分类号] R743.3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2020)22-3772-06

Peripheral blood expression of microRNA in patients with acute cerebral infarction and its correlation with inflammatory factors*

PENG Feifei, TAO Xiaoxiao, ZHANG Yi, YOU Liling[△]

(Department of Neurology, Taizhou First People's Hospital, Taizhou, Zhejiang 318020, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expression of microRNAs (miRNAs) in peripheral blood of patients with acute cerebral infarction (ACI) and their correlation with inflammatory factors. **Methods** A total of 316 first-onset ACI patients admitted to this hospital from June 2018 to August 2019 were selected as the ACI group, and 60 healthy volunteers who received physical examination during the same period were selected as the control group. The levels of plasma miRNA-124, miRNA-128b, miRNA-153 and miRNA-424 were detected by quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR), and the serum levels of inflammatory factors, including interleukin(IL)-6, IL-8, tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and C-reactive protein (CRP), were measured by ELISA. **Results** The levels of plasma miRNA-124 and miRNA-424 in the ACI group were lower than those in the control group, and the levels of plasma miRNA-128b and miRNA-153, serum IL-6, IL-8, TNF- α and CRP were higher than those in the control group ($P<0.05$). The levels of plasma miRNA-128b and miRNA-153, and serum IL-6, IL-8, TNF- α and CRP in the moderate and severe ACI groups were significantly higher than those in the mild ACI group, and the levels of above indicators in the severe group were higher than those in the moderate group ($P<0.05$). The levels of plasma miRNA-124 and miRNA-424 in the moderate and severe ACI groups were significantly lower than those in the mild ACI group, and the levels of above indicators in the severe group were lower than those in the moderate group ($P<0.05$). The levels of plasma miRNA-128b and miRNA-153, and serum IL-6, TNF- α and CRP in the large and medium infarct size

* 基金项目:浙江省医药卫生科技计划项目(2020KY1043)。 作者简介:彭飞飞(1986—),主治医师,本科,主要从事脑血管病研究。

[△] 通信作者, E-mail: yll1025@163.com。

groups were significantly higher than those in the small infarct size group, and the levels of above indicators in the large infarct size group were higher than those in the medium infarct size group ($P < 0.05$). The levels of plasma miRNA-124 and miRNA-424 in the large and medium infarct size groups were significantly lower than those in the small infarct size group, and the levels of above indicators in the large infarct size group were lower than those in the medium infarct size group ($P < 0.05$). The plasma miRNA-124 and miRNA-424 levels were negatively correlated with serum IL-6, IL-8, TNF- α and CRP levels, while plasma miRNA-128b and miRNA-153 levels were positively correlated with serum IL-6, IL-8, TNF- α and CRP levels ($P < 0.05$) in ACI patients. **Conclusion** There are differential expressions of circulating miRNAs in ACI patients, with high expression of miRNA-124 and miRNA-424 and low expression of miRNA-128b and miRNA-153, which are closely correlated with levels of inflammatory factors, and can be used as the potential biomarkers for assessment of ACI.

[Key words] brain infarction; microRNAs; interleukin-6; interleukin-8; tumor necrosis factor-alpha; C-reactive protein

急性脑梗死(acute cerebral infarction, ACI)是全球范围内的高发病率和死亡率高疾病之一,首发 ACI 即便经临床控制病情后也容易伴发神经功能后遗症,或具有高复发率,严重影响患者的身心健康^[1]。因此,寻找能够反映 ACI 早期病理生理改变的血液生物学标志物,对于疾病的早期诊断、病因识别、治疗指导、病情变化预测及预后评估具有重要意义。microRNA(miRNA, miRNAs)是一类重要的基因表达调控因子,在机体细胞的增殖、分化、凋亡及凋谢等过程中具有重要调节作用^[2]。循环 miRNAs 具有稳定性好、检测简便且敏感等特点,成为当前临床早期筛查、诊断鉴别多种疾病的新型生物学标志物。已有研究表明,ACI 患者多种循环 miRNAs 表达异常,且与病情严重程度具有一定相关性^[3]。炎症反应在 ACI 的发生、发展过程中具有重要作用,且与 ACI 后脑组织损伤相关病理生理改变密切相关,故研究炎症相关 miRNAs 在 ACI 中的作用及其是否能够作为生物学标志物具有重要意义^[4]。本研究检测分析了 ACI 患者的循环 miRNA-124、miRNA-128b、miRNA-153、miRNA-424 表达情况,并分析其与脑梗死面积、病情严重程度及血清炎症因子水平的相关性,初步探讨 ACI 患者多种循环 miRNA 表达的意义,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2018 年 6 月至 2019 年 8 月本院收治的首次发病的 ACI 患者 316 例为 ACI 组,男 201 例,女 115 例;年龄 45~75 岁,平均(58.02±6.43)岁;体重指数(BMI)18.5~27.5 kg/m²,平均(21.43±2.05)kg/m²;61 例(19.30%)有吸烟史。纳入标准:(1)ACI 诊断符合《中国急性缺血性脑卒中诊治指南 2014》^[5]中相关诊断标准,且经头颅 CT 检查或磁共振成像(MRI)检查证实;(2)首次发病,且在发病 72 h 内入院;(3)临床资料完整。排除标准:(1)合并严重心、肝、肺、肾功能不全者;(2)合并传染性、急慢性炎症性疾病、自身免疫性疾病者;(3)合并周围血管性病、心肌梗死者;(4)合并家族性遗传病史、恶性肿瘤

者;(5)正在使用抗生素者;(6)近期有颅脑创伤史、大型外科手术史者;(7)脑出血者。另选取同期门诊接受健康体检且年龄、性别相匹配的健康志愿者 60 例作为对照组,男 35 例,女 25 例,年龄 40~75 岁,平均(56.69±6.21)岁;BMI 18.5~27.5 kg/m²,平均(21.71±2.13)kg/m²;7 例(11.67%)有吸烟史。两组年龄、性别、BMI、吸烟史比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。本研究设计获得医院伦理学委员会审核批准,所有受试者均自愿且签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 研究分组

ACI 组按照发病后 3 d 头颅 CT 测量情况,并按照 Pullicino 公式^[6]计算脑梗死体积(cm^3)=长×宽×CT 扫描阳性层数×层厚/2。根据梗死灶体积分为小梗死灶组($< 5 \text{ cm}^3$, $n = 147$)、中梗死灶组($5 \sim 10 \text{ cm}^3$, $n = 101$)和大梗死灶组($> 10 \text{ cm}^3$, $n = 68$)^[7]。根据美国国立卫生研究院卒中量表评分(NIHSS)进行病情严重程度分组,分为轻度组(< 5 分, $n = 143$)、中度组($5 \sim 15$ 分, $n = 139$)和重度组(≥ 16 分, $n = 34$)。

1.2.2 血液标本采集

患者于入院 1 h 内采血,对照组于体检当日晨取外周空腹静脉血 5 mL,室温下自然凝固 10~20 min,3 000 r/min 离心 10 min,留取上清液储存于-80 °C 冰箱中,采用 EP 管收集血浆置于-20 °C 冰箱中统一待测,均在 2 h 内完成检测。

1.2.3 血清炎症因子检测

采用 ELISA 测定血清白细胞介素(IL)-6、IL-8、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、C 反应蛋白(CRP)水平。

1.2.4 循环 miRNAs 检测

(1)RNA 提取:取 250 μL 血浆标本,加入 750 μL Trizol 充分混匀,静置 5 min 后加入 200 μL 三氯甲烷,旋涡混匀 15 s,室温静置 3 min。混合液于 4 °C 以 12 000 r/min 离心 15 min。转移 500 μL 上清液至 EP 管中,加入 4 °C 预冷异丙醇 500 μL 颠倒混匀,-20 °C 保存过夜。4 °C 以 13 000 r/min 离心 15 min,以 80% 乙醇进行 RNA 沉淀洗涤,4 °C 以 7 500 r/min

离心 5 min, 弃上清液, 适度干燥数分钟使乙醇挥发, 加入 Nuclease-Free 双蒸水 20~30 μL 充分溶解 RNA, 所得溶液置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存待测。(2) 总 RNA 质检: 采用分光光度仪测定所提取总 RNA 的吸光度(A)值, 记录 260、280 nm 处 $A(A_{260}$ 和 $A_{280})$ 值, 计算 A_{260}/A_{280} 比值, 以比值 1.8~2.0 视为纯度较高。计算总 RNA 浓度(mg/L)= $A_{260} \times$ 稀释倍数 $\times 40$ 。(3) 定量逆转录 PCR(qRT-PCR)检测: 取 2.0 μL 引物混合物、2.0 μL 缓冲液、1.5 μL DEPC 水、0.5 μL 逆转录酶和 4.0 μL RNA 充分混匀进行逆转录, 操作参照 TaqMan miRNA 逆转录试剂盒说明。逆转录温度条件设置: $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 50 min, $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 min, $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 h。qRT-PCR 采用实时 PCR 系统完成, 所有样品均制作 3 个复孔进行检测。反应体系包括: 上下游引物各 0.2 μL , SYBR 5.0 μL , 灭菌水 2.4 μL , Cdna 2.0 μL , Rox 0.2 μL , 混匀后加入相应 PCR 管内, 短暂离心且反应液均在试管底部后, 启动 PCR 仪器预热, 置入反应八联管进行反应。反应程序: 预变性 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 min; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 20 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 15 s, 循环 40 次。溶解曲线 $70\sim 95\text{ }^{\circ}\text{C}$, 每 20 秒升温 $1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。引物序列见表 1, U6 作为内参引物。(4) 产物分析: 采用 PCR 系统配套软件进行荧光定量 PCR 采集信号分析, 获取目标引物及目标基因的标准曲线及扩增曲线。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{ct}}$ 法表示各基因差异表达的相对定量(RQ), 计算 miRNA-124、miRNA-128b、miRNA-153、miRNA-424 的相对表达水平。

1.3 统计学处理

采用 SPSS22.0 统计软件进行分析, 计量资料均符合正态分布、方差齐性, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用独立样本 t 检验, 多组比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD- t 检验; 计数资料以例数或百分比表示, 组间比较采用 χ^2 检验; 等级资料采用秩和检验; 相关性分析采用 Pearson 秩相关分析, 以相关系数(r)描述相关程度, 取值范围 $-1.0\sim 1.0$,

$|r| < 0.3$ 为弱相关性, $0.3\sim 0.5$ 为低度相关性, $>0.5\sim 0.8$ 为显著相关性, >0.8 为高度相关性。以双侧 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 PCR 引物名称及序列

引物名称	方向	引物序列
U6	正向	5'-CTCGCTTCGGCAGCACATATACT -3'
	反向	5'-ACGCTTCACGAATTTGCGTGTGTC-3'
miRNA-124	正向	5'-GCTAAGGCACGCGGTG-3'
	反向	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'
miRNA-128b	正向	5'-GGAAGGGGGCCGATA -3'
	反向	5'-AAAGAGACCGGTTCACTGTGAG-3'
miRNA-153	正向	5'-TCATTTTTGTGATGTTGCAGCT -3'
	反向	5'-TCCACCACCCAGTTGCTGTA-3'
miRNA-424	正向	5'-GGCTAGTCAGCAGCAATTCATGT -3'
	反向	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'

2 结 果

2.1 两组血浆 miRNAs 表达水平比较

ACI 组血浆 miRNA-128b、miRNA-153 表达水平较对照组升高, miRNA-124、miRNA-424 表达水平较对照组下降, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

2.2 不同病情严重程度 ACI 患者血浆 miRNAs 表达水平比较

中、重度组血浆 miRNA-128b、miRNA-153 表达水平明显高于轻度组, 且重度组高于中度组($P < 0.05$); 中、重度组血浆 miRNA-124、miRNA-424 表达水平明显低于轻度组, 且重度组低于轻度组($P < 0.05$), 见表 3。相关性分析显示, ACI 病情严重程度与血浆 miRNA-128b、miRNA-153 表达水平呈正相关($r = 0.861, 0.824, P < 0.05$), 与 miRNA-124、miRNA-424 表达水平呈负相关($r = -0.886, -0.641, P < 0.05$)。

表 2 两组血浆 miRNAs 表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	miRNA-124	miRNA-128b	miRNA-153	miRNA-424
ACI 组	316	0.83 ± 0.27	2.16 ± 0.62	1.82 ± 0.44	0.65 ± 0.21
对照组	60	1.22 ± 0.35	1.05 ± 0.31	0.71 ± 0.23	0.98 ± 0.33
t		9.747	13.539	19.039	10.054
P		< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

表 3 不同病情严重程度 ACI 患者血浆 miRNAs 表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	miRNA-124	miRNA-128b	miRNA-153	miRNA-424
轻度组	143	1.02 ± 0.30	1.85 ± 0.39	1.65 ± 0.34	0.81 ± 0.23
中度组	139	0.84 ± 0.25^a	2.03 ± 0.51^a	1.84 ± 0.50^a	0.64 ± 0.20^a
重度组	34	0.64 ± 0.21^{ab}	2.39 ± 0.64^{ab}	2.01 ± 0.53^{ab}	0.55 ± 0.16^{ab}
F		6.983	6.321	4.926	6.241
P		0.006	0.011	0.023	0.013

^a: $P < 0.05$, 与轻度组比较; ^b: $P < 0.05$, 与中度组比较。

2.3 不同梗死灶大小 ACI 患者血浆 miRNAs 表达水平比较

大梗死灶组 miRNA-124、miRNA-424 表达水平明显低于中、小梗死灶组($P < 0.05$),且中梗死灶组明显低于小梗死灶组($P < 0.05$);中、大梗死灶组 miRNA-128b 表达水平明显高于小梗死灶组($P < 0.05$),但中、大梗死灶组间比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);大梗死灶组 miRNA-153 表达水平明显高于中、小梗死灶组($P < 0.05$),但中、小梗死灶组间比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 4。miRNA-124、miRNA-424 与梗死灶大小呈负相关($r = -0.471, -0.355, P < 0.05$),miRNA-128b、miRNA-153 与梗死灶大小无明显相关性($r = 0.213, 0.201, P > 0.05$)。

2.4 两组血清 IL-6、IL-8、TNF- α 及 CRP 水平比较

ACI 组血清 IL-6、IL-8、TNF- α 、CRP 水平均明显高于对照组($P < 0.05$),见表 5。

2.5 不同病情严重程度 ACI 患者血清 IL-6、IL-8、

TNF- α 及 CRP 水平比较

中、重度组血清 IL-6、IL-8、TNF- α 、CRP 水平明显高于轻度组,且重度组高于中度组($P < 0.05$),见表 6。

2.6 不同梗死灶大小 ACI 患者血清 IL-6、IL-8、TNF- α 及 CRP 水平比较

不同梗死灶大小 ACI 患者血清 IL-6、TNF- α 、CRP 水平比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$),且大梗死灶组 $>$ 中梗死灶组 $>$ 小梗死灶组;不同梗死灶大小 ACI 患者血清 IL-8 水平比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 7。

2.7 ACI 患者 miRNAs 与血清炎性因子的相关性分析

ACI 患者血浆 miRNA-124、miRNA-424 表达水平与血清 IL-6、IL-8、TNF- α 、CRP 水平呈负相关,miRNA-128b、miRNA-153 表达水平与血清 IL-6、IL-8、TNF- α 、CRP 水平呈正相关($P < 0.05$),见表 8。

表 4 不同梗死灶大小 ACI 患者血浆 miRNAs 表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	miRNA-124	miRNA-128b	miRNA-153	miRNA-424
小梗死灶组	147	0.88 \pm 0.36	1.89 \pm 0.34	1.62 \pm 0.43	0.70 \pm 0.33
中梗死灶组	101	0.79 \pm 0.25 ^a	2.25 \pm 0.54 ^a	1.72 \pm 0.46	0.68 \pm 0.21 ^a
大梗死灶组	68	0.61 \pm 0.20 ^{ab}	2.33 \pm 0.56 ^a	1.95 \pm 0.47 ^{ab}	0.61 \pm 0.17 ^{ab}
F		5.782	7.012	5.311	2.121
P		0.016	0.005	0.020	0.045

^a: $P < 0.05$,与小梗死灶组比较;^b: $P < 0.05$,与中梗死灶组比较。

表 5 两组血清 IL-6、IL-8、TNF- α 、CRP 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	IL-6(ng/L)	IL-8(μ g/L)	TNF- α (ng/mL)	CRP(mg/L)
ACI 组	316	48.32 \pm 10.71	30.34 \pm 10.52	54.71 \pm 15.42	7.49 \pm 1.02
对照组	60	38.23 \pm 6.17	21.09 \pm 6.83	20.16 \pm 5.79	4.21 \pm 0.55
t		7.073	6.550	17.112	24.231
P		< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

表 6 不同病情严重程度 ACI 患者血清 IL-6、IL-8、TNF- α 及 CRP 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	IL-6(ng/L)	IL-8(μ g/L)	TNF- α (ng/mL)	CRP(mg/L)
轻度组	143	44.02 \pm 6.93	28.24 \pm 7.14	38.24 \pm 9.05	6.71 \pm 0.85
中度组	139	47.75 \pm 8.14 ^a	31.41 \pm 8.23 ^a	49.19 \pm 14.36 ^a	8.05 \pm 1.04 ^a
重度组	34	50.96 \pm 12.21 ^{ab}	36.58 \pm 12.64 ^{ab}	60.47 \pm 16.85 ^{ab}	8.86 \pm 1.13 ^{ab}
F		4.641	5.170	10.591	12.019
P		0.030	0.019	< 0.001	< 0.001

^a: $P < 0.05$,与轻度组比较;^b: $P < 0.05$,与中度组比较。

表 7 不同梗死灶大小 ACI 患者血清 IL-6、IL-8、TNF- α 、CRP 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	IL-6(ng/L)	IL-8(μ g/L)	TNF- α (ng/mL)	CRP(mg/L)
小梗死灶组	147	45.87 \pm 8.02	30.14 \pm 8.32	50.21 \pm 8.15	6.82 \pm 0.91
中梗死灶组	101	48.96 \pm 10.64 ^a	32.29 \pm 8.54	55.85 \pm 9.17 ^a	8.42 \pm 1.13 ^a
大梗死灶组	68	51.54 \pm 9.79 ^{ab}	30.43 \pm 9.01	58.36 \pm 10.21 ^{ab}	8.91 \pm 1.15 ^{ab}
F		4.492	1.023	4.321	6.759
P		0.033	0.125	0.040	0.010

^a: $P < 0.05$,与小梗死灶组比较;^b: $P < 0.05$,与中梗死灶组比较。

表 8 ACI 患者 miRNAs 与血清炎症因子的相关性分析

指标	IL-6		IL-8		TNF- α		CRP	
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
miRNA-124	-0.522	0.014	-0.387	0.031	-0.461	0.020	-0.442	0.023
miRNA-128b	0.861	<0.001	0.743	<0.001	0.821	<0.001	0.865	<0.001
miRNA-153	0.831	<0.001	0.715	<0.001	0.804	<0.001	0.817	<0.001
miRNA-424	-0.467	0.019	-0.521	0.014	-0.572	0.010	-0.491	0.013

3 讨 论

miRNAs 是一组内源性非编码小分子 RNA, 主要由 20~25 个核苷酸所组成, 约占人类整个基因组的 2% 以上, 且参与调节 30% 左右的蛋白质编码基因, 基因调节功能较为广泛, 且各 miRNA 之间可能存在拮抗或协同等相互作用^[8]。脑部特异性 miRNAs 多在中枢神经系统内表达, 且在神经系统的发育及功能维护上具有重要作用, 在其他大部分脏器中无表达或仅微量表达^[9]。新近研究发现, 人体外周血中分布有稳定的 miRNAs, 因其具有较高的 RNA 酶耐受性, 不容易被降解, 故其在外周血液循环中的表达具有较好的稳定性, 且检测方法便捷、准确且敏感, 有望成为多种疾病的诊断及病情评估等的新型生物学标志物^[10]。尽管 miRNAs 的功能及其作用机制尚未完全阐明, 但已有研究发现其在细胞、组织或疾病中的表达具有很强的特异性^[11]。已有研究表明, miRNAs 在不同疾病中的表达模式不同, 多种 miRNAs 被发现在脓毒症、帕金森病、恶性肿瘤、心肌梗死、ACI 等疾病中具有明显差异表达^[12-13]。动物研究显示, 脑缺血后脑组织及外周血中 miRNAs 表达谱具有明显异常改变, 且血液中部分特异性 miRNAs 与脑组织中 miRNAs 表达变化趋势基本一致^[14]。提示 miRNAs 可能参与了脑缺血及其相关病理生理变化过程, 且外周血中特异性 miRNAs 表达变化可能在一定程度上反映脑组织中 miRNAs 变化及脑组织缺血后病理生理改变。

本研究查阅相关数据库及文献, 筛选出脑特异性 miRNAs 的集中亚型进行研究, 结果显示, ACI 组的外周血 miRNA-128b、miRNA-153 表达水平明显高于对照组, miRNA-124、miRNA-424 表达水平明显低于对照组 ($P < 0.05$)。证实 miRNAs 异常表达可能参与了 ACI 的发生, 且提示 ACI 后 miRNA-128b、miRNA-153 高表达及 miRNA-124、miRNA-424 低表达可能参与 ACI 的病理生理过程。NIHSS 是评价 ACI 严重程度的重要指标, 本研究结果显示, ACI 患者的血液 miRNA-128b、miRNA-153 表达水平与基于 NIHSS 的病情程度分级呈高度正相关, 即随着病情严重程度的加重, miRNA-128b、miRNA-153 表达水平越高; 而 miRNA-124、miRNA-424 水平则与病情程度分级呈高度(显著)负相关, 即病情越严重 miR-

NA-424 水平越低, 这对疾病程度的评价具有一定的提示作用。JEYASEELAN 等^[15]的动物研究显示, 大鼠脑缺血 24 h 后脑组织中 miRNAs 表达谱呈现特异性变化, 且部分高表达 miRNAs 在外周血中亦呈现明显高表达, 并与脑缺血性损伤标志物相关。LIU 等^[16]的动物研究表明, 脑缺血小鼠在缺血 4 h 内血清 miRNA-424 表达水平显著降低, 而提高 miRNA-424 表达有利于缩小脑梗死体积并减轻脑水肿。比较不同脑梗死面积患者的血液 miRNAs 显示, 仅 miRNA-124、miRNA-424 表达水平在不同梗死灶组间两两比较有明显差异, 认为血浆 miRNAs 表达水平可能与脑梗死灶大小的相关性有限。分析其原因, 可能是由于脑损伤后血浆特异性 miRNAs 水平升高, 多因脑组织中 miRNAs 经受损血脑屏障而进入血液循环^[17]。血脑屏障的受损程度虽与梗死灶大小有关, 但这种相关性并不绝对, 且还与发病时间、梗死灶分布位置、病情严重程度(如脑水肿程度)等多因素有关, 大脑关键部位如语言区、脑干等即便是小梗死也可能引起严重神经功能受损。

ACI 的病理生理过程包括氧化应激反应、氧自由基损伤、炎性反应等。其中, 神经炎性反应所产生的炎性递质与细胞因子在 ACI 的发生、发展过程中具有重要作用, 且参与脑组织修复过程的正向或负向调节作用^[18]。炎性反应激活被认为是 ACI 早期梗死病灶及周围缺血半暗带神经元损伤的主要病理生理机制之一, 多种免疫细胞在局部募集并释放出多种炎性递质, 导致脑组织损伤进一步加重^[19]。目前已证实, 促炎因子高表达与抗炎因子低表达已被证实与脑梗死面积、预后不良等密切相关^[20]。CRP 多因炎性反应、创伤等诱导产生, 可增强吞噬细胞的吞噬功能、激活补体系统等而参与多种病理生理过程; IL-6 和 TNF- α 均主要由单核-巨噬细胞分泌, 是临床应用较多的炎性指标, 其水平升高多提示机体炎症状态^[21]。IL-8 主要由血管内皮细胞、单核细胞等产生, 可诱导中性粒细胞的趋化、聚集和黏附, 具有极强的趋化作用, 能够趋化炎性因子、中性粒细胞等在炎症局部聚集, 并诱导其产生活性氧化代谢物而导致组织细胞损伤^[22]。本研究中, ACI 组血清 IL-6、IL-8、TNF- α 、CRP 水平均高于对照组, 且随着病情严重程度的升高而升高 ($P < 0.05$)。但在不同病灶面积患者中, 虽然 IL-6、

TNF- α 、CRP 水平有明显差异,但组间 IL-8 水平未见明显差异,考虑为神经炎性反应程度并非单纯受梗死灶体积大小影响,这与 miRNAs 变化具有一定的相似性。进一步相关性分析显示,ACI 患者血液 miRNA-128b、miRNA-153 表达水平与血清 IL-6、IL-8、TNF- α 、CRP 水平呈正相关,而 miRNA-124、miRNA-424 表达水平与血清 IL-6、IL-8、TNF- α 、CRP 水平呈负相关($P < 0.05$)。推测 miRNAs 可能与炎性因子相互影响、相互作用而参与 ACI 的发生、发展过程,miRNA-128b、miRNA-153 高表达可加重炎性反应,促进血管斑块、血栓的形成,并与 ACI 病情严重程度密切相关。同时,miRNA-124、miRNA-424 不足或低表达可能影响某些关键信号通路,导致炎性反应增强,进而参与 ACI 的发生、发展过程,但具体作用机制还有待进一步研究阐明。

综上所述,ACI 患者具有外周血 miRNAs 谱差异表达,主要表现为 miRNA-128b、miRNA-153 高表达和 miRNA-124、miRNA-424 低表达,且与 ACI 病情严重程度相关,可在一定程度上反映 ACI 早期病情严重程度。同时,外周血 miRNA-128b、miRNA-153 表达水平与血清炎性因子 IL-6、IL-8、TNF- α 、CRP 水平呈正相关,而 miRNA-124、miRNA-424 表达水平与炎性因子水平呈负相关。miRNAs 异常表达可能与炎性反应相辅相成而参与 ACI 的发病过程,血 miRNAs 监测有可能作为 ACI 的潜在生物学标志物。

参考文献

- [1] 徐耀铭,齐晓飞,王姝瑶,等.急性脑梗死早期进展相关危险因素的临床研究[J].中风与神经疾病杂志,2018,35(6):548-549.
- [2] 李武英,金俊,陈健,等.脑梗死和脑出血患者外周血中循环 microRNA 表达谱差异的初步分析[J].实用医学杂志,2014,30(11):1750-1753.
- [3] 杜守治,董斌,齐中华.急性心肌梗死和急性脑梗死 miRNA 疾病标志物的初步筛查[J].中国医科大学学报,2017,46(8):681-685.
- [4] 江钰,万智,吕光耀,等.急性脑梗死患者血清 miR-151a-3p 和 miR-210 的表达及其与炎性因子的关系[J].疑难病杂志,2018,17(10):1112-1116.
- [5] 中华医学会神经病学分会,中华医学会神经病学分会脑血管病学组.中国急性缺血性脑卒中诊治指南 2014[J].中华神经科杂志,2015,48(4):246-257.
- [6] PULLICINO P, NELSON R F, KENALL B E, et al. Small deep infarcts diagnosed on computed tomography[J]. Neurology, 1980, 30(10): 1090-1096.
- [7] 黄如训,郭玉璞.脑卒中的分型分期治疗(建议草案)[J].中国神经精神疾病杂志,2001,27(1):73.
- [8] LIU Y, ZHANG J, HAN R, et al. Downregulation of serum brain specific miRNA is associated with inflammation and infarct volume in acute ischemic stroke[J]. J Clin Neurosci, 2015, 22(2):291-295.
- [9] FISCHER L, HUMMEL M, KORFEL A, et al. Differential micro-RNA expression in primary CNS and nodal diffuse large B-cell lymphomas [J]. Neuro Oncol, 2011, 13(10):1090-1098.
- [10] GAMBARI R, BROGNARA E, SPANDIDOS D A, et al. Targeting oncomiRNAs and mimicking tumor suppressor miRNAs: new trends in the development of miRNA therapeutic strategies in oncology (Review)[J]. Int J Oncol, 2016, 49(1):5-32.
- [11] ETHERIDGE A, LEE I, HOOD L, et al. Extracellular microRNA: a new source of biomarkers [J]. Murat Res, 2011, 717(1/2):85-90.
- [12] 李韶威,刘靖华. microRNA 作为脓毒症早期诊断生物标志物的研究进展[J].基础医学与临床, 2016, 36(11):1591-1595.
- [13] 甘晴,陈洁晶,欧明林,等.非编码 RNA 相关重大疾病发病机制和生物标志物筛选的研究进展[J].医学综述,2016,22(18):3565-3568.
- [14] 李晟,叶荣苹,刘伟,等.非编码 RNA 与脑卒中疾病的研究进展[J].中华老年心脑血管病杂志,2015,17(4):440-444.
- [15] JEYASEELAN K, LIM K Y, ARMUGAM A. MicroRNA expression in the blood and brain of rats subjected to transient focal ischemia by middle cerebral artery occlusion [J]. Stroke, 2008, 39(3):959-966.
- [16] LIU P, ZHAO H, WANG R, et al. MicroRNA-424 protects against focal cerebral ischemia and reperfusion injury in mice by suppressing oxidative stress[J]. Stroke, 2015, 46(2):513-519.
- [17] 冯锦丽,王卫.急性脑梗死患者循环 miR-124 表达水平与脑梗死体积、神经功能缺损程度的关系及其诊断价值[J].卒中与神经疾病,2018,25(1):21-24,38.
- [18] 张瑛,戴启荷,陈立.急性脑梗死患者神经功能恢复情况与炎症因子水平的相关性分析[J].安徽医学,2016,37(5):578-581.
- [19] 鲁建华,虞冬辉.急性脑梗死与炎症的关系探讨[J].中国实用神经疾病杂志,2017,20(2):24-26.

参考文献

- [1] SHAH S, KOBAN Y, LE B H A, et al. Iris Hypoplasia as the Presenting Sign of Retinoblastoma in a Child With a 13q Deletion[J]. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus*, 2018, 55: e10-13.
- [2] DELSIN L E A, SALOMAO K B, PEZUK J A, et al. Expression profiles and prognostic value of miRNAs in retinoblastoma[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2019, 145(1): 1-10.
- [3] GAO F Y, LIU Q Y, YUAN L, et al. Upregulation of microRNA-132 in gastric cancer promotes cell proliferation via retinoblastoma 1 targeting[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(5): 7005-7010.
- [4] PARK Y L, KIM S H, PARK S Y, et al. Forkhead-box A1 regulates tumor cell growth and predicts prognosis in colorectal cancer[J]. *Int J Oncol*, 2019, 54(6): 2169-2178.
- [5] LI J, ZHANG S, ZHU L, et al. Role of transcription factor FOXA1 in non-small cell lung cancer[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(1): 509-521.
- [6] WILSON M W, QADDOUMI I, BILLUPS C, et al. A clinicopathological correlation of 67 eyes primarily enucleated for advanced intraocular retinoblastoma[J]. *Br J Ophthalmol*, 2011, 95(4): 553-558.
- [7] KALIKI S, PATEL A, IRAM S, et al. Retinoblastoma in India: clinical presentation and outcome in 1 457 patients (2 074 eyes)[J]. *Retina*, 2019, 39(2): 379-391.
- [8] CORREA-ACOSTA A, GONZÁLEZ-ALVIAR M E, GAVIRIA-BRAVO M L. Retinoblastoma and optic nerve enhancement in a brain magnetic resonance scan: is it always a metastasis? [J]. *Arch Soc Esp Ophthalmol*, 2018, 93(5): 251-254.
- [9] GOLABCHI K, SOLEIMANI-JELODAR R, AG HADOOST N, et al. MicroRNAs in retinoblastoma: potential diagnostic and therapeutic biomarkers[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(4): 3016-3023.
- [10] DING J, LU X. Expression of miR-204 in pediatric retinoblastoma and its effects on proliferation and apoptosis of cancer cells [J]. *Oncol Lett*, 2018, 16(6): 7152-7157.
- [11] ZHOU P, LI X. Serum miR-338-5p has potential for use as a tumor marker for retinoblastoma[J]. *Oncol Lett*, 2019, 18(1): 307-313.
- [12] CHEN Y, ZHU H, WANG Y, et al. MicroRNA-132 plays an independent prognostic role in pancreatic ductal adenocarcinoma and acts as a tumor suppressor [J]. *Technol Cancer Res Treat*, 2019, 18: 1533033818824314.
- [13] WANG Y Z, HAN J J, FAN S Q, et al. miR-132 weakens proliferation and invasion of glioma cells via the inhibition of Gli1[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(7): 1971-1978.
- [14] LIN M, PAN J, CHEN Q, et al. Overexpression of FOXA1 inhibits cell proliferation and EMT of human gastric cancer AGS cells [J]. *Gene*, 2018, 642: 145-151.
- [15] WANG L L, XIU Y L, CHEN X, et al. The transcription factor FOXA1 induces epithelial ovarian cancer tumorigenesis and progression[J]. *Tumour Biol*, 2017, 39(5): 1010428317706210.
- [16] KIM J, JIN H, ZHAO J C, et al. FOXA1 inhibits prostate cancer neuroendocrine differentiation[J]. *Oncogene*, 2017, 36(28): 4072-4080.
- [17] CHEN X, LI M, ZHOU H, et al. MiR-132 targets FOXA1 and exerts tumor-suppressing functions in thyroid cancer [J]. *Oncol Res*, 2019, 27(4): 431-437.
- (收稿日期: 2020-03-26 修回日期: 2020-08-12)
- (上接第 3777 页)
- [20] 陈勇, 杜晓红, 余树春, 等. 老年胃肠肿瘤根治术患者全麻术后早期认知功能障碍的危险因素[J]. *中国老年学杂志*, 2016, 36(9): 2160-2162.
- [21] 郜乐乐, 常永超, 程丽妞, 等. 急性脑梗死患者血清循环 miR-424 表达变化及其与炎症反应、脂代谢的关系[J]. *山东医药*, 2018, 58(43): 59-62.
- [22] 来小音, 汪璐, 张盼, 等. 脑梗死患者血中 IL-6、IL-8 及 TNF- α 水平与血液凝固状态的相关性分析[J]. *神经损伤与功能重建*, 2019, 14(6): 275-277, 295.
- (收稿日期: 2020-02-18 修回日期: 2020-06-22)