

## 老年急性缺血性脑卒中患者血清 miR-150-5p 及 miR-148b-3p 的表达及其临床意义

郝玉青, 刘艳丽, 王芳芳, 王巧改, 张盼

中国人民解放军联勤保障部队第九八〇医院检验科, 河北 石家庄 050000

**摘要:**目的 探讨老年急性缺血性脑卒中(AIS)患者血清 miR-150-5p 及 miR-148b-3p 的表达水平及其临床意义。方法 选取本院收治的 178 例老年 AIS, 按照美国国立卫生研究院卒中量表(NIHSS)评分分为:轻度组(52 例, NIHSS 评分 < 5 分)、中度组(83 例, 5 分 ≤ NIHSS 评分 ≤ 20 分)、重度组(43 例, NIHSS 评分 > 20 分)。另选择 65 例健康体检正常者作为对照组。采用实时荧光定量 PCR 检测各组血清 miR-150-5p 及 miR-148b-3p 表达水平。应用 ROC 曲线分析血清 miR-150-5p 及 miR-148b-3p 表达水平对老年 AIS 诊断的价值。采用多因素 logistic 回归分析影响老年 AIS 的危险因素。结果 AIS 组血清 miR-125b-5p 及 miR-148b-3p 水平明显低于对照组 ( $P < 0.01$ )。重度组血清 miR-125b-5p 及 miR-148b-3p 水平均明显低于中度组和轻度组 ( $P < 0.01$ )。血清 miR-150-5p 及 miR-148b-3p 表达水平诊断老年 AIS 的最佳临界值分别为 2.82、1.46, 两项联合诊断老年 AIS 的 AUC (95% CI) 为 0.927 (0.868 ~ 0.991), 其敏感度和特异度为 93.0% 和 86.5%。多因素 logistic 回归分析显示, miR-150-5p ( $OR = 3.107$ , 95% CI: 2.194 ~ 6.715) 及 miR-148b-3p ( $OR = 2.602$ , 95% CI: 1.713 ~ 4.350) 低表达是老年 AIS 发生的独立危险因素。结论 血清 miR-150-5p 及 miR-148b-3p 表达水平在老年 AIS 患者中明显降低, 是老年 AIS 发生的独立危险因素, 有望作为老年 AIS 诊断的生物学标志物。

**关键词:**急性缺血性脑卒中; miR-150-5p; miR-148b-3p

中图分类号: R743.3

DOI: 10.16636/j.cnki.jinn.2020.02.002

## Expression and clinical significance of serum miR-150-5p and miR-148b-3p in elderly patients with acute ischemic stroke

HAO Yu-Qing, LIU Yan-Li, WANG Fang-Fang, WANG Qiao-Gai, ZHANG Pan. Department of clinical Laboratory, Ninety-eighty Hospital of the Joint Logistics Support Force of the Chinese People's Liberation Army, Shijiazhuang, Hebei 050000, China

Corresponding author: HAO Yu-Qing, Email: hanlaimama@163.com

**Abstract: Objective** To investigate the expression and clinical significance of serum miR-150-5p and miR-148b-3p in elderly patients with acute ischemic stroke (AIS). **Methods** A total of 178 elderly patients with AIS admitted to our hospital were enrolled. According to the National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS), they were divided into mild group ( $n = 52$ , NIHSS score < 5), moderate group ( $n = 83$ ,  $5 \leq$  NIHSS score  $\leq 20$ ), and severe group ( $n = 43$ , NIHSS score > 20). Sixty-five healthy subjects on physical examination were selected as control group. Real-time PCR was used to determine the expression of serum miR-150-5p and miR-148b-3p in each group. A receiver operating characteristic curve was used to analyze the diagnostic value of serum miR-150-5p and miR-148b-3p levels for elderly AIS patients. Multivariate logistic regression was applied to analyze the risk factors for AIS in the elderly. **Results** Serum miR-125b-5p and miR-148b-3p levels were significantly lower in the AIS group than in the control group ( $P < 0.01$ ), and they were significantly lower in the severe group than in the moderate and mild groups ( $P < 0.01$ ). The optimal cut-off values of serum miR-150-5p and miR-148b-3p levels for diagnosing AIS in the elderly were 2.82 and 1.46, respectively. The area under the curve for the combination of the two indicators in diagnosis of elderly AIS was 0.927 (95% confidence interval [CI]: 0.868 –

收稿日期: 2019-07-15; 修回日期: 2019-12-14

作者简介: 郝玉青 (1981-), 女, 本科, 主管技师, 主要从事临床脑血管疾病检验诊断研究。Email: hanlaimama@163.com。

0.991), with a sensitivity of 93.0% and a specificity of 86.5%. The multivariate logistic regression analysis showed that low expression of miR-150-5p (odds ratio [OR] = 3.107, 95% CI: 2.194 – 6.715) and miR-148b-3p (OR = 2.602, 95% CI: 1.713 – 4.350) were independent risk factors for AIS in the elderly. **Conclusions** Significantly reduced levels of serum miR-150-5p and miR-148b-3p are independent risk factors for AIS in the elderly, and can be potential biomarkers for the diagnosis of AIS in the elderly.

**Key words:** acute ischemic stroke; miR-150-5p; miR-148b-3p

急性缺血性脑卒中 (acute ischemic stroke, AIS) 是老年人群常见的中枢神经系统血管疾病,其发病率、致残率及死亡率均较高,已成为世界范围内致死和致残的主要原因之一<sup>[1]</sup>。随着我国经济的发展和人民生活水平的提高,人口老龄化越来越明显,而老年 AIS 的发病率在逐年增加,给社会及患者家庭带来了沉重的负担<sup>[2]</sup>。微小核糖核酸 (microRNA, miRNA) 作为一种在真核生物中高度保守的非编码小分子 RNA,通过调节基因表达参与脑卒中的发生发展,有望作为 AIS 诊断及预后的潜在生物学标志物<sup>[3]</sup>。近年来的研究发现,miR-150-5p 及 miR-148b-3p 在 AIS 中存在异常表达,参与调控 AIS 的病理生理过程,为 AIS 的治疗提供了新的靶点<sup>[4,5]</sup>。但 miR-150-5p 及 miR-148b-3p 能否成为 AIS 辅助诊断的新型生物学标志物,目前尚未明确。本研究通过检测老年 AIS 患者血清 miR-150-5p 及 miR-148b-3p 表达水平,探讨 miR-150-5p 及 miR-148b-3p 对老年 AIS 诊断的价值,旨在为老年 AIS 的诊断及靶向治疗提供参考依据。

## 1 对象与方法

### 1.1 研究对象

收集 2016 年 1 月 1 日至 2018 年 12 月 31 日在中国人民解放军联勤保障部队第九八〇医院收治的老年 AIS 患者 178 例,其中男性 121 例,女性 57 例,年龄 65 ~ 86 岁,平均年龄 (76.20 ± 6.58) 岁。

纳入标准:①符合《中国急性缺血性脑卒中诊治指南 (2014 年)》<sup>[6]</sup> 诊断标准,且年龄 ≥ 65 岁;②在发病 24 h 内入院,且经头颅 CT 或 MRI 检查显示有缺血性病灶。

排除标准:①出血性卒中、脑外伤、高血压脑病、脑炎及其他种类的脑血管疾病者;②存在严重心肺疾病、肝肾功能不全、严重感染、多发性硬化、恶性肿瘤及血液系统疾病者;③合并有意识障碍或精神症状者。

另选择同期我院健康体检正常者 65 例作为对照组,其中男性 45 例,女性 20 例,年龄 65 ~ 85 岁,平均年龄 (75.90 ± 6.42) 岁。

本研究经我院伦理委员会批准,并与患者或家属签署知情同意书。

### 1.2 研究方法

采用前瞻性研究方法。根据美国国立卫生研究院卒中量表 (National Institutes of Health Stroke Scale, NIHSS) 评分评估患者的神经功能缺损程度,其中 < 5 分为轻度神经功能缺损,52 例 (轻度组); 5 ~ 20 分为中度神经功能缺损,83 例 (中度组); > 20 分为重度神经功能缺损,43 例 (重度组)。记录所有研究对象的一般资料,包括年龄、性别、体质指数、基础疾病、心率及血压等。

### 1.3 miR-150-5p 及 miR-148b-3p 检测

所有患者均于入院当天抽取静脉血 5 mL 置于未加抗凝剂的肝素离心管中,于室温,2 500 r/min 离心 15 min,吸取上层血清 400 μL,加入 1 mL 提取剂 (Trizol),于 -70℃ 保存。

按照总 RNA 快速提取试剂盒说明书从中提取总 RNA。在 ABI 7500 型荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司) 上进行实时荧光定量聚合酶链反应 (RT-PCR)。

以 U6 为内参,miRNA 逆转录反应体系 15 μL: 5 μL RNA 模板,3 μL U6 及 miRNA 特异性茎环引物,0.15 μL 的 100 mmol/L 脱氧核糖核苷酸 (dNTPs),1.00 μL 逆转录酶 (50 U/μL),10 × 反转录缓冲液 1.50 μL,0.19 μL RNase 抑制剂 (20 U/μL),4.16 μL 无菌三蒸水。反应条件:16℃ 30 min、42℃ 30 min、85℃ 5 min。

扩增反应体系为 20 μL: 1 μL 引物及探针 Mix (20 ×),10 μL TaqMan 通用混合物溶液 (2 ×),1.33 μL 反转录产物 cDNA,7.67 μL 无核酸酶的水。扩增条件:95℃ 预变性 10 min,95℃ 变性 15 s、60℃ 复性 60 s 进行 45 个循环。

每个反应体系中荧光信号达到设定阈值所经历的循环数即为 Ct 值,采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算 miR-150-5p 及 miR-148b-3p 的相对表达水平,其中  $\Delta Ct = Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{U6}$ 。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 22.0 统计软件分析。计量资料以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,多组间均数的比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 SNK-*q* 检验检验;两独立样本均数的比较采用成组 *t* 检验。计数资料以百分率 (%) 表示,组间比较采用  $\chi^2$  检验。绘制受试者工作特征曲线 (ROC 曲线) 分析血清 miR-150-5p 及 miR-148b-3p 表达水平对老年 AIS 诊断的价值,曲线下面积 (AUC) 比较采用 *Z* 检验。采用多因素 logistic 回归分析影响老年 AIS 的危险因素。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AIS 组和对照组的临床一般资料比较

AIS 组和对照组的性别、年龄、体质指数、基础疾病、吸烟史、饮酒史、收缩压及舒张压比较,差异均无统计学意义 (*P* > 0.05)。见表 1。

表 1 AIS 组和对照组的临床一般资料比较 [n(%); $\bar{x} \pm s$ ]

项目	对照组 ( <i>n</i> = 65)	AIS 组 ( <i>n</i> = 178)	$\chi^2/t$ 值	<i>P</i> 值
性别 (男性)	45 (69.2)	121 (68.0)	0.035	0.853
年龄 (岁)	75.90 ± 6.42	76.20 ± 6.58	0.820	0.446
体质指数 (kg/m <sup>2</sup> )	23.17 ± 2.16	23.28 ± 2.24	0.672	0.557
糖尿病史	8 (12.3)	38 (21.3)	2.536	0.111
高血压史	10 (15.4)	43 (24.2)	2.149	0.143
高脂血症史	11 (16.9)	41 (23.0)	1.057	0.304
吸烟史	19 (29.2)	60 (33.7)	0.435	0.510
饮酒史	21 (32.3)	66 (37.1)	0.472	0.492
收缩压 (mmHg)	143.80 ± 9.84	145.60 ± 10.26	1.215	0.246
舒张压 (mmHg)	82.16 ± 6.17	84.20 ± 6.83	1.402	0.181

2.2 AIS 组和对照组血清 miR-150-5p 及 miR-148b-3p 表达水平比较

AIS 组血清 miR-150-5p 及 miR-148b-3p 表达水平明显低于对照组,差异均有统计学意义 (*P* < 0.01)。见表 2。

表 2 AIS 组和对照组血清 miR-150-5p 及 miR-148b-3p 表达水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	miR-150-5p	miR-148b-3p
对照组	65	4.16 ± 1.38	2.75 ± 0.94
AIS 组	178	2.05 ± 0.72	0.87 ± 0.31
<i>t</i> 值		13.527	12.280
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

2.3 不同神经功能缺损患者血清 miR-150-5p 及 miR-148b-3p 水平比较

重度组血清 miR-150-5p 及 miR-148b-3p 表达水平均明显低于中度组和轻度组,差异均有统计学意义 (*P* < 0.01);且中度组血清 miR-150-5p 及 miR-148b-3p 表达水平均明显低于轻度组,差异均有统计学意义 (*P* < 0.01)。见表 3。

表 3 不同神经功能缺损患者血清 miR-150-5p 及 miR-148b-3p 表达水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	miR-150-5p	miR-148b-3p
轻度组	52	3.17 ± 1.05	1.62 ± 0.63
中度组	83	1.93 ± 0.68 <sup>a</sup>	0.81 ± 0.26 <sup>a</sup>
重度组	43	1.20 ± 0.41 <sup>ab</sup>	0.30 ± 0.12 <sup>ab</sup>
<i>F</i> 值		9.715	6.984
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

注:a 为与轻度组比较,*P* < 0.01; b 为与中度组比较,*P* < 0.01

2.4 miR-150-5p 及 miR-148b-3p 对老年 AIS 诊断的价值

血清 miR-150-5p 及 miR-148b-3p 表达水平诊断老年 AIS 的最佳临界值分别为 2.82、1.46。两项联合诊断老年 AIS 的 AUC (95% *CI*) 为 0.927 (0.868 ~ 0.991) 明显高于单项 miR-150-5p [0.837 (0.780 ~ 0.893)] 及 miR-148b-3p [0.816 (0.758 ~ 0.874)],差异有统计学意义 (*Z* = 4.974、5.210, *P* < 0.05),其敏感度和特异度为 93.0% 和 86.5%。见表 4 和图 1。

表 4 miR-150-5p 及 miR-148b-3p 对老年 AIS 诊断的价值

项目	最佳临界值	AUC(95% <i>CI</i> )	敏感度 (%)	特异度 (%)	阳性预测值 (%)	阴性预测值 (%)	阳性似然比	阴性似然比
miR-150-5p	2.82	0.837 (0.780 ~ 0.893)	85.2	78.0	80.6	83.4	3.873	0.190
miR-148b-3p	1.46	0.816 (0.758 ~ 0.874)	82.4	76.3	79.2	80.2	3.477	0.231
两项联合	-	0.927 (0.868 ~ 0.991)	93.0	86.5	89.0	91.6	6.889	0.081

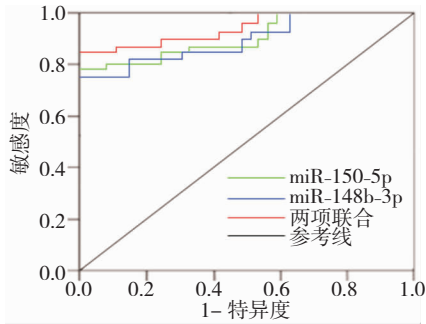


图 1 miR-150-5p 及 miR-148b-3p 诊断老年 AIS 的 ROC 曲线

表 5 多因素 logistic 回归分析影响老年 AIS 的危险因素

因素	<i>B</i>	<i>SE</i>	Wald $\chi^2$ 值	<i>OR</i> 值	95% <i>CI</i>	<i>P</i> 值
miR-150-5p	1.205	0.484	5.160	3.107	2.194 ~ 6.715	0.012
miR-148b-3p	1.062	0.297	4.658	2.602	1.713 ~ 4.350	0.026

3 讨论

miRNA 是一类长度为 18 ~ 25 个核苷酸组成的内源性单链非编码 RNA 分子,通过影响靶基因的表达,参与 AIS 中一系列复杂的病理生理过程启动,并促进了 AIS 的进程<sup>[7-8]</sup>。研究表明,miRNA 参与降解细胞外基质、调控斑块内细胞凋亡、调节血管内皮功能与血管重塑以及影响动脉粥样硬化斑块的形成和破裂,并且在神经元破坏、修复及病灶局部炎症反应过程发挥重要作用,为 AIS 的治疗提供了新的靶点<sup>[9-10]</sup>。Xu 等<sup>[11]</sup>研究发现,AIS 中差异表达的 miRNA 可能参与炎症介质的释放及内皮细胞功能紊乱,促进动脉粥样硬化斑块的形成及破裂,影响卒中的发生。亦有研究认为,miRNA 可通过碱基互补配对方式识别靶基因 3' 非编码区降解靶信使 RNA 或阻遏靶信使 RNA 的翻译,参与调控 AIS 的病理生理过程,如动脉粥样硬化、脑水肿和脑缺血再灌注损伤<sup>[12]</sup>。

本研究显示,AIS 组血清 miR-150-5p 及 miR-148b-3p 表达水平明显低于对照组,提示 miR-150-5p 及 miR-148b-3p 表达水平降低可能参与 AIS 的发生发展。本研究中预后不良组血清 miR-150-5p 及 miR-148b-3p 表达水平明显低于预后良好组,而且不同神经功能缺损患者血清 miR-150-5p 及 miR-148b-3p 表达水平存在差异,神经功能缺损越严重,miR-150-5p 及 miR-148b-3p 表达水平下调越明显。提示血清 miR-150-5p 及 miR-148b-3p 表达水平下调与 AIS 神经功能缺损的严重程度相关,有望成为判断老年 AIS 患者病情严重

2.5 多因素 logistic 回归分析影响老年 AIS 的危险因素

以 AIS 为因变量,年龄、体质指数、收缩压、舒张压、甘油三酯、总胆固醇、高密度脂蛋白、低密度脂蛋白、miR-150-5p 及 miR-148b-3p 为自变量,进行多因素 logistic 回归分析,结果显示 miR-150-5p 及 miR-148b-3p 低表达是老年 AIS 发生的独立危险因素,其 *OR* (95% *CI*) 值分别为 3.107 (2.194 ~ 6.715)、2.602 (1.713 ~ 4.350)。见表 5。

程度的生物学标志物。Gacoñ 等<sup>[13]</sup>研究表明,miRNA 是基因表达的重要调节因子,与 AIS 的发生发展密切相关,对临床预测、诊断及治疗 AIS 具有重要意义。Wu 等<sup>[14]</sup>研究发现,miRNA 表达与脑卒中患者神经功能缺损严重程度有关,可作为评估 AIS 神经缺陷严重性的生物学指标。本研究进一步应用 ROC 曲线分析,结果显示血清 miR-150-5p 及 miR-148b-3p 表达水平诊断老年 AIS 的最佳临界值分别为 2.82、1.46,两项联合诊断老年 AIS 的曲线下面积最大,其敏感度和特异度相对较高,有助于提高老年 AIS 诊断的准确性。Wang 等<sup>[15]</sup>研究表明,部分 miRNA 在 AIS 患者中存在差异表达,这些 miRNA 在诊断 AIS 中具有重要的价值,可作为 AIS 诊断的非侵入性生物学标志物,并可为 AIS 治疗提供新的靶点。此外,本研究还发现 miR-150-5p 及 miR-148b-3p 低表达是老年 AIS 发生的独立危险因素。易朝晖等<sup>[16]</sup>研究也发现,缺血性脑卒中患者 miR-150-5p 表达水平显著低于对照者,且 miR-150-5p 低表达与缺血性脑卒中发生具有显著关联,有望作为诊断缺血性脑卒中的生物学标志物。

综上所述,血清 miR-150-5p 及 miR-148b-3p 水平在老年 AIS 患者中呈低表达,是老年 AIS 发生的独立危险因素,且与神经功能缺损的严重程度相关,两项联合诊断老年 AIS 的价值较高,有望作为老年 AIS 诊断的生物学标志物,并可能为老年 AIS 的临床治疗提供新的思路和依据。但本研究为单中心研究,病例来源较单一,缺乏多中心的研究结果,未来仍需大规模多中心的前瞻性研究来进一步

证实 miR-150-5p 及 miR-148b-3p 在老年 AIS 患者中的临床应用价值。

### 参 考 文 献

- [1] Harada S, Inatomi Y, Nakajima M, et al. Clinical characteristics of oldest-old patients with ischemic stroke[J]. *Rinsho Shinkeigaku*, 2019, 59(3): 125-132.
- [2] Chen Z, Jiang B, Ru X, et al. Mortality of Stroke and Its Subtypes in China: Results from a Nationwide Population-Based Survey[J]. *Neuroepidemiology*, 2017, 48(3-4): 95-102.
- [3] Jolana L, Kamil D. The Role of microRNA in Ischemic and Hemorrhagic Stroke[J]. *Curr Drug Deliv*, 2017, 14(6): 816-831.
- [4] Scherrer N, Fays F, Mueller B, et al. MicroRNA 150-5p Improves Risk Classification for Mortality within 90 Days after Acute Ischemic Stroke[J]. *J Stroke*, 2017, 19(3): 323-332.
- [5] Cheng X, Kan P, Ma Z, et al. Exploring the potential value of miR-148b-3p, miR-151b and miR-27b-3p as biomarkers in acute ischemic stroke[J]. *Biosci Rep*, 2018, 38(6): 1033.
- [6] 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.
- [7] Zhang Y, Chen Z, Tang Y, et al. Association between procalcitonin levels and carotid atherosclerosis in acute ischemic stroke patients[J]. *Int J Neurosci*, 2018, 128(3): 237-242.
- [8] Dewdney B, Trollope A, Moxon J, et al. Circulating MicroRNAs as Biomarkers for Acute Ischemic Stroke: A Systematic Review[J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2018, 27(3): 522-530.
- [9] Gorur A, Celik A, Yildirim DD, et al. Investigation of possible effects of microRNAs involved in regulation of lipid metabolism in the pathogenesis of atherosclerosis[J]. *Mol Biol Rep*, 2019, 46(1): 909-920.
- [10] Lu Y, Thavarajah T, Gu W, et al. Impact of miRNA in Atherosclerosis[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2018, 38(9): e159-e170.
- [11] Xu W, Gao L, Zheng J, et al. The Roles of MicroRNAs in Stroke: Possible Therapeutic Targets[J]. *Cell Transplant*, 2018, 27(12): 1778-1788.
- [12] Laffont B, Rayner KJ. MicroRNAs in the Pathobiology and Therapy of Atherosclerosis[J]. *Can J Cardiol*, 2017, 33(3): 313-324.
- [13] Gacón J, Badacz R, St?pień E, et al. Diagnostic and prognostic micro-RNAs in ischaemic stroke due to carotid artery stenosis and in acute coronary syndrome: a four-year prospective study[J]. *Kardiol Pol*, 2018, 76(2): 362-369.
- [14] Wu J, Fan CL, Ma LJ, et al. Distinctive expression signatures of serum microRNAs in ischaemic stroke and transient ischaemic attack patients[J]. *Thromb Haemost*, 2017, 117(5): 992-1001.
- [15] Wang Y, Ma Z, Kan P, et al. The Diagnostic Value of Serum miRNA-221-3p, miRNA-382-5p, and miRNA-4271 in Ischemic Stroke[J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2017, 26(5): 1055-1060.
- [16] 易朝晖, 黄素丽, 张艳炜, 等. 外周血 miR-200c-3p、miR-99b-5p 和 miR-150-5p 作为缺血性脑卒中生物标记物的研究[J]. *中华神经医学杂志*, 2015, 14(6): 597-603.