

进展型脑梗死患者 miRNA 的表达水平及临床意义

李效丽

山东省立第三医院, 山东 济南 250031

摘要:目的 探讨进展型脑梗死患者微小 RNA (miRNA) 的表达水平及临床意义。方法 回顾性分析 2016 年 7 月至 2018 年 7 月期间我院收治的 138 例脑梗死患者病例资料。根据斯堪的那维亚卒中量表 (SSS) 将其分为对照组 (稳定型脑梗死, 82 例) 和观察组 (进展型脑梗死, 56 例)。观察组患者按照高级中枢损伤严重程度评定标准 (MESS) 评分为轻度进展 (30 例)、中度进展 (17 例)、重度进展 (9 例) 三个亚组。对观察组出院两个月后进行预后随访, 并将其分为预后不良组及预后良好组。分析进展型脑梗死患者 miRNA 的表达水平及临床意义。结果 进展型脑梗死患者的 miRNA-21、miRNA-223 水平均显著高于稳定型脑梗死患者 ($P < 0.05$); miRNA-21、miRNA-223 的高表达均是进展型脑梗死的危险因素 ($P < 0.05$), 且进展型脑梗死的严重程度与血清 miRNA-21、miRNA-223 的表达水平均呈正相关 ($r = 0.834, P = 0.008$; $r = 0.896, P = 0.001$)。预后不良组患者血清 miRNA-21、miRNA-223 表达水平显著高于预后良好组 ($P < 0.05$); 血清 miRNA-21、miRNA-223 表达水平预测进展型脑梗死预后的 AUC 面积分别为 0.805、0.834, 并分别得出截断值 4.45 (敏感度 77.14%, 特异性 82.28%)、7.06 (敏感度 82.86%, 特异性 73.42%)。结论 进展型脑梗死患者 miRNA-21、miRNA-223 呈高表达, 且其表达水平与脑梗死严重程度呈正相关, 同时对预测进展型脑梗死预后均具有较高的敏感度和特异度, 有可能成为一种早期诊断和预测进展型脑梗死生物标志物。

关键词: 进展型脑梗死; miRNA-21; miRNA-223; 诊断; 预后

中图分类号: R743.3

DOI: 10.16636/j.cnki.jinn.2020.02.004

Expression of microRNAs in patients with progressive cerebral infarction and its clinical significance

LI Xiao-Li. Geriatrics Department, Shandong Provincial Third Hospital, Jinan, Shandong 250031, China

Corresponding author: LI Xiao-Li, Email: lixiaoli20080101@126.com

Abstract: Objective To investigate the expression of microRNAs (miRNAs) in patients with progressive cerebral infarction and its clinical significance. **Methods** A retrospective analysis was performed on the clinical data of 138 patients with cerebral infarction admitted to our hospital from July 2016 to July 2018. According to the Scandinavian Stroke Scale, the patients were divided into control group (stable cerebral infarction, $n = 82$) and observation group (progressive cerebral infarction, $n = 56$). Patients in the observation group were further divided into three subgroups, i. e., mild progression ($n = 30$), moderate progression ($n = 17$), and severe progression ($n = 9$), according to the score of modified Edinburgh-Scandinavian stroke scale. They were followed up for prognosis two months after discharge and divided into poor prognosis group and good prognosis group. An analysis was performed on the expression of miRNAs in patients with progressive cerebral infarction and its clinical significance. **Results** Patients with progressive cerebral infarction had significantly higher levels of miRNA-21 and miRNA-223 than those with stable cerebral infarction ($P < 0.05$). The high expression of miRNA-21 and miRNA-223 was a risk factor for progressive cerebral infarction ($P < 0.05$). The severity of progressive cerebral infarction was positively correlated with serum levels of miRNA-21 and miRNA-223 ($r = 0.834, P = 0.008$; $r = 0.896, P = 0.001$). Patients with poor prognosis had significantly higher expression levels of serum miRNA-21 and miRNA-223 than those with good prognosis ($P < 0.05$); the areas under the receiver operating characteristic curves of serum miRNA-21 and miRNA-223 expression levels in

收稿日期: 2019-11-27; 修回日期: 2020-04-02

作者简介: 李效丽 (1985-), 硕士, 医师, 主要从事老年医学心脑血管病研究。

predicting the prognosis of progressive cerebral infarction were 0.805 and 0.834, respectively; the cut-off values were 4.45 (sensitivity = 77.14%, specificity = 82.28%) and 7.06 (sensitivity = 82.86%, specificity = 73.42%), respectively. **Conclusions** Both miRNA-21 and miRNA-223 are highly expressed in patients with progressive cerebral infarction, and their expression levels are positively correlated with the severity of cerebral infarction. In addition, they have high sensitivity and specificity in predicting the prognosis of progressive cerebral infarction, which can be used as biomarkers for early diagnosis and prediction of progressive cerebral infarction.

Key words: progressive cerebral infarction; miRNA-21; miRNA-223; diagnosis; prognosis

进展型脑梗死在临床上较为常见,指在发病后 6 h ~ 7 d 内,虽经过住院积极治疗,但病情仍呈阶梯式进展或者病情稳定后出现复发甚至加重^[1]。进展型脑梗死在全部脑梗死病例中比例高达 43%,属于一种难治性脑血管病,据相关文献报道,稳定型脑梗死的病死率约为 8.60%,而进展型脑梗死的病死率为 35%,增加 3 倍以上,严重威胁患者生命安全^[2]。虽然目前进展型脑梗死的诊治取得一定成果,但致残率及病死率仍很高,因此发现一种简单便捷、有效可行的早期诊断及判断预后方法显得尤为重要。微小 RNA (miRNA) 是目前国内外研究热点,有报道表示可通过外周血中某些特定 miRNA 水平变化反映脑梗死患者脑组织中 miRNA 水平变化,且外周血 miRNA 经反复冻融或者长期储存后仍具非常高的稳定性,因此有学者认为外周血 miRNA 可作为脑梗死等脑血管疾病新型的生物学标志物^[3-4]。miRNA-21、miRNA-223 作为 miRNA 的重要亚型,目前鲜有其与进展型脑梗死的相关研究报道。因此,本文通过 miRNA-21、miRNA-223 旨在探讨进展型脑梗死患者 miRNA 的表达水平及其临床意义,为临床早期有效诊断进展型脑梗死及预后提供更佳的选择方向。

1 对象与方法

1.1 研究对象

本研究回顾性分析 2016 年 7 月至 2018 年 7 月期间我院收治的脑梗死患者病例 138 例。

纳入标准:(1)符合 2014 年《中国急性缺血性脑卒中诊治指南 2014》中的急性脑梗死诊断标准:①急性起病;②局灶神经功能缺损(一侧面部或肢体无力或麻木、语言障碍等),少数为全面神经功能缺损;③症状或体征持续时间不等(当影像学有显示责任病灶时),或持续 24 h 以上(当缺乏责任病灶时);④排除非血管性原因;⑤脑 CT/MRI 排除出血;(2)发病 6 ~ 24 h 内入院(超溶栓时间窗);(3)性别不限;(4)临床资料完整;(5)入院时 NIHSS 评分 5 ~ 17 分者。

排除标准:①脑膜肿瘤、脑内寄生虫病、颅脑外伤、颅内胶质瘤等;②合并其它感染或者应激情况;③合并严重肝肾功能不全、心律失常、自身免疫疾病等;④其它血液系统疾病;⑤患者资料不完整。

进展型脑梗死参考欧洲进展性卒中研究 (EPSS) 提出的进展性卒中的诊断标准。入选患者采用斯堪的那维亚卒中量表 (Scandinavian Stroke Scale, SSS) 作为评分标准;进展型脑梗死指发病 72 h 内有神经系统损害进行性加重者;发病 72 h 内有意识水平、上肢、下肢或眼球运动降低 ≥ 2 分和(或)语言功能降低 ≥ 3 分者,否则入对照组(稳定型脑梗死组)。最终将所有研究对象分为对照组(稳定型脑梗死 82 例)和观察组(进展型脑梗死 56 例)。其中,观察组患者按照 MESSS 评分为 30 例轻度进展(0 ~ 15 分)、17 例中度进展(16 ~ 30 分)、9 例重度进展(31 ~ 45 分)三个亚组。本研究经我院伦理委员会批准。

1.2 临床资料收集

收集所有患者临床资料,包括年龄、性别、发病时间、合并疾病种类(冠心病、高血脂、糖尿病、高血压等),入院时 SSS 评分、MESSS 评分、miRNA-21、miRNA-223 水平等。并对观察组患者在出院两个月后进行短期预后随访(电话回访或门诊回访),并根据随访信息及改良 Rankin 量表(mRS)将患者分为预后不良组(mRS > 2)及预后良好组(mRS ≤ 2)。

1.3 血清 miRNA-21、miRNA-223 水平检测

取患者入院后第 2 天清晨空腹静脉血 4 mL,立即离心(3 500 r/min) 15 min,取上层清液并冷冻储存(-30℃)。统一取出血清样本并将细胞裂解,使用赛默飞世尔中国公司提供的总 RNA 提取试剂盒对血清样本中的总 RNA 进行提取,然后使用紫外分光光度计测定总 RNA 浓度,样品 A260/A280 ≥ 1.80 表示合格;使用赛默飞世尔中国公司提供的反转录试剂盒将总 RNA 反转录得到单链 cDNA,

后应用聚合酶链式扩增 (PCR) 试剂盒对单链 cDNA 进行 PCR。PCR 反应条件为 95℃ 预变性 30 s, 95℃ 5 s, 60℃ 30 s, 重复 40 个循环进行扩增反应; 95℃ 15 s, 60℃ 60 s, 95℃ 15 s 制备溶解曲线。每份样品设置 3 个复孔。mRNA 表达量采用标准曲线法进行计算。所有操作均严格按照说明书执行。

1.4 统计学方法

本研究使用 SPSS 20.0 软件对所有数据进行处理。计量资料用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间比较采用成组 t 检验; 多组间比较采用单因素方差分析; 组间两两比较采用 SNK- q 检验。计数资料用率 (%) 表示, 组间比较用 χ^2 检验。采用多因素 logistic 回归分析脑梗死进展的危险因素。绘制受试者工作特征曲线 (ROC) 分析血清 miRNA-21、miRNA-223 表达水平预测进展型脑梗死预后的价值, 曲线下面积 (AUC) 比较采用 Z 检验。采用 Spearman 法进行相关分析。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组组患者基线资料比较

对照组和观察组患者在性别、年龄、斑块 Crouse 积分、吸烟史、饮酒史、合并糖尿病及冠心病等基线资料比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 有可比性。观察组的高血压、高血脂比例及 miRNA-21、miRNA-223 水平均显著高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 对照组患者和观察组患者基线资料比较 [n (%); $\bar{x} \pm s$]

项目	对照组 ($n=82$)	观察组 ($n=56$)	t/χ^2 值	P 值
性别 (男/女)	51(62.2)/ 31(37.8)	33(58.9)/ 23(41.1)	0.149	0.699
年龄 (岁)	62.50 \pm 6.22	63.64 \pm 6.30	0.802	0.411
饮酒史	46(56.1)	30(53.6)	0.086	0.770
吸烟史	39(47.6)	24(42.9)	0.297	0.586
斑块 Crouse 积分 (分)	6.54 \pm 0.35	6.57 \pm 0.38	0.477	0.634
高血压	38(46.3)	37(66.1)	5.221	0.022
高血脂	32(39.0)	35(62.5)	7.341	0.007
糖尿病	30(36.6)	21(37.5)	0.012	0.913
冠心病	2(2.4)	1(2.0)	0.062	0.804
miRNA-21 水平	2.44 \pm 0.60	4.06 \pm 0.92	2.368	0.020
miRNA-223 水平	4.64 \pm 0.90	7.25 \pm 2.05	2.514	0.013

2.2 进展型脑梗死相关影响因素 logistic 分析

以是否为进展型脑梗死 (否 = 0, 是 = 1) 为因

变量, 以高血压、高血脂、miRNA-21 及 miRNA-223 表达水平为自变量, 进行 logistic 回归分析, 结果显示 miRNA-21 及 miRNA-223 高表达是进展型脑梗死的危险因素 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 进展型脑梗死相关影响因素 logistic 分析

变量	B	SE	Wald	P 值	$OR(95\% CI)$
高血压	0.290	0.931	0.097	0.755	1.337(0.215 ~ 8.293)
高血脂	1.874	1.424	1.731	0.118	6.511(0.399 ~ 106.105)
miRNA-21	2.205	1.737	5.623	0.020	9.072(0.616 ~ 133.692)
miRNA-223	2.312	1.496	7.038	0.007	10.093(0.538 ~ 189.505)

2.3 进展型脑梗死严重程度与 miRNA-21、miRNA-223 水平相关性分析

中度组、重度组患者的 miRNA-21、miRNA-223 水平显著高于轻度组, 重度组的 miRNA-21、miRNA-223 水平显著高于中度组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 血清 miRNA-21、miRNA-223 表达水平随病情加重而升高 (表 3)。经 Spearman 相关性分析, 进展型脑梗死严重程度与血清 miRNA-21、miRNA-223 表达水平呈正相关 ($r = 0.834$, $P = 0.008$; $r = 0.896$, $P = 0.001$)。

表 3 进展型脑梗死严重程度与 miRNA-21、miRNA-223 水平相关性分析 ($\bar{x} \pm s$)

病情分组	例数	miRNA-21	miRNA-223
轻度组	30	3.02 \pm 0.75	5.68 \pm 1.52
中度组	17	4.11 \pm 1.06 ^a	7.10 \pm 2.03 ^a
重度组	9	5.70 \pm 1.44 ^{ab}	9.96 \pm 2.82 ^{ab}

注: a 表示与轻度组比较, $P < 0.05$; b 表示与中度组比较, $P < 0.05$

2.4 两个月预后不良组与预后良好组 miRNA-21、miRNA-223 表达水平比较

两个月后对 56 例进展型脑梗死患者进行随访, 发现 36 例预后良好 (预后良好组), 20 例预后不良 (预后不良组, 包括 9 例复发、2 例死亡)。预后不良组患者血清 miRNA-21、miRNA-223 表达水平显著高于预后良好组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 两个月预后不良组与预后良好组 miRNA-21、miRNA-223 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

预后分组	例数	miRNA-21	miRNA-223
预后良好组	36	3.76 \pm 1.06	6.88 \pm 2.04
预后不良组	20	5.18 \pm 1.50	8.94 \pm 2.43
t 值		2.990	2.813
P 值		0.005	0.007

2.5 血清 miRNA-21、miRNA-223 表达水平预测进展型脑梗死预后的 ROC 曲线分析

血清 miRNA-21、miRNA-223 表达水平预测进展型脑梗死预后的 AUC 面积分别为 0.805、0.834。见图 1、表 5。

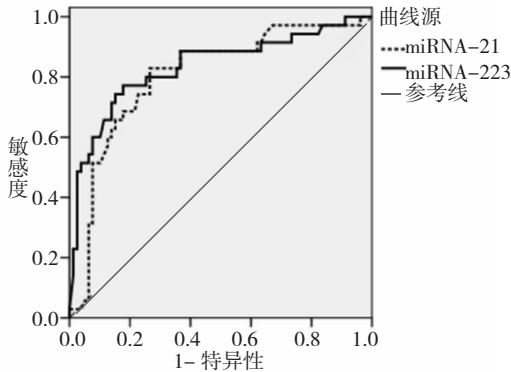


图 1 血清 miRNA-21、miRNA-223 表达水平预测进展型脑梗死预后的 ROC 曲线分析

表 5 血清 miRNA-21、miRNA-223 表达水平预测进展型脑梗死预后的 ROC 曲线分析

参数	曲线下面积	截断值	灵敏度(%)	特异度(%)	P 值	95% CI
miRNA-223 水平	0.834	7.06	82.86	73.42	0.000	0.745 ~ 0.923
miRNA-21 水平	0.805	4.45	77.14	82.28	0.000	0.716 ~ 0.894

3 讨论

进展型脑梗死的病因及病理极为复杂,通常情况下,进展型脑梗死发病突然、进展快,若得不到及时有效的诊断,极可能会耽误最佳治疗时机。因此,便捷有效的早期诊断方法和预测生物标志物可极大帮助临床作出正确治疗方案并对患者预后做出准确判断。目前,多数观点认为动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是脑梗死的主要病理学基础,而炎症反应在 AS 的发生发展过程中具有重要影响^[5-6]。有专家提出,AS 可视为一种慢性炎症性疾病,许多炎症因子及相关细胞均参与其中^[7]。一方面,病情发展会促进炎症反应加剧,另一方面,炎症反应反过来加快病情恶化。戚游等^[8]发现,进展型脑梗死患者肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-6 (IL-6)、IL-8 表达水平显著高于稳定型脑梗死患者,且病情越严重其表达水平越高,呈正相关性。可见, TNF- α 、IL-6、IL-8 等参与的炎症反应也是影响进展型脑梗死预后的重要原因。

miRNA 是一种内源性非编码小分子 RNA,在不同组织和不同疾病中的表达水平不同,而外周血中 miRNA 表达水平的检测相对于组织中 miRNA 的检测更简单便捷,且 miRNA 血清样本在极低温度下(低于 -80°C)仍能保存完好,此为 miRNA 作为血液学诊断标记的重要优势^[9-11]。

miRNA-21 是近年来发现的与脑梗死相关 miRNA,在动脉粥样硬化中出现显著上调,可提高细胞对脂类的摄取,提升炎症细胞分子的分泌,导致细胞坏死进而形成噬斑,进而形成动脉粥样硬化。miR-223 在血小板中高表达,并参与血小板功能的调控,在血栓性心脑血管疾病的病理生理过程中发挥重要作用。本研究经过单因素分析及多因素 logistic 回归分析发现,进展型脑梗死患者的 miRNA-21、miRNA-223 表达水平均显著高于稳定型脑梗死患者,miRNA-21、miRNA-223 的高表达均是进展型脑梗死的危险因素,其原因可能是 miRNA-21、miRNA-223 参与了进展型脑梗死的病理发展过程。曹琳等^[12]研究发现,ACI 患者 miRNA-21 表达明显上调,与 IL-10 等炎症因子水平呈正相关,是 ACI 早期诊断和判断病情严重程度的重要标志物。虞莉娜等^[13]亦发现 miRNA-21 参与 ACI 的病理生理学过程,miRNA-21 水平高低与 ACI 的病情程度和恢复情况密切相关。

有研究表示,动脉粥样硬化患者 miRNA-223 的表达明显高于正常对照,且 Gensini 评分与 miRNA-223 表达显著相关^[14]。本研究发现,进展型脑梗死的严重程度与血清 miRNA-21、miRNA-223 的表达水平均呈正相关,说明 miRNA-21、miRNA-223 参与急性脑梗死的炎症反应。既往研究亦发现^[15-17],急性脑梗死患者血清 miRNA-21、miRNA-223 表达水平显著高于健康人群,且 TNF- α 水平与 miRNA-223 水平呈正相关,IL-10、TNF- α /IL-10 与 miRNA-21、miRNA-223 表达水平均呈正相关,miRNA-21、miRNA-223 在血清中高表达与进展型脑梗死严重程度呈正相关,其原因可能是血脑屏障在脑梗死发病时遭到破坏,脑特异性的 miRNA-21、miRNA-223 穿过遭受破坏的血脑屏障进入外周血,且病情越严重,其表达越高^[18-19]。可见,血清中 miRNA-21、miRNA-223 表达水平可作为进展型脑梗死的生物学标志物,同时有助于评估病情严重程度。

同时,本研究对进展型脑梗死患者两个月后的随访发现,预后不良组患者血清 miRNA-21、miRNA-

223 表达水平显著高于预后良好组。且经 ROC 曲线分析显示,miRNA-21、miRNA-223 的表达水平预测进展型脑梗死预后的 AUC 面积分别为 0.805、0.834,并分别得出截断值 4.45 (敏感度 = 77.14%, 特异性 = 82.28%)、7.06 (敏感度 = 82.86%, 特异性 = 73.42%)。可见 miRNA-21、miRNA-223 的表达水平对预测进展型脑梗死预后均具有较高的敏感度和特异度。同时结果提示,当 miRNA-21 表达 > 4.45 及 miRNA-223 > 7.06 时,应提早予以相应有效的干预措施。

本研究尚存在缺陷,主要是样本量较小,且属回顾性研究,因此仍需更大规模样本更具前瞻性的研究予以进一步证实。

综上所述,进展型脑梗死患者 miRNA-21、miRNA-223 呈高表达,且其表达水平与脑梗死严重程度呈正相关,同时对预测进展型脑梗死预后均具有较高的敏感度和特异度,具有极高的临床价值,可作为一种便捷有效地早期诊断和预测进展型脑梗死的生物标志物。

参 考 文 献

- [1] 王静悦,张江,彭延波. 研究不同脑梗死分型对进展型缺血性脑卒中的影响[J]. 河北医学, 2019, 25(9): 1462-1466.
- [2] 戚游. 血浆炎症因子差异与进展型脑梗死关联性的研究[D]. 安徽省合肥市:安徽医科大学, 2018.
- [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] 王兴萍,王鹏,程度,等. 血清 miR-155 及缺氧诱导因子 1 α 的表达对急性脑梗死的诊断价值[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2019, 22(2): 124-131.
- [5] 李蒙蒙,朱明肃,李红闪,等. 缺血性脑卒中患者糖化血红蛋白与血浆致动脉粥样硬化指数的相关性研究[J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2019, 46(1): 74-77.
- [6] Ichihara S, Suzuki Y, Iwase Y, et al. Abstract 11379: Carbon Nanotubes Promotes Atherosclerosis Due to Enhancing Inflammatory Responses Triggered by Inflammasome Activation [J]. Circulation, 2018, 138 (Suppl_1 Su): A11379.
- [7] 盖昱辛,盛宝英,韩凤,等. 进展性脑梗死患者血清

HMGB1、FKN 动态变化研究[J]. 中风与神经疾病杂志, 2017, 34(2): 141-144.

- [8] 戚游,王玉. 血浆炎症因子变化与进展性脑梗死关联性的研究[J]. 中风与神经疾病杂志, 2016, 33(12): 1087-1090.
- [9] 张家康,王泉雄,陈鑫,等. 急性缺血性脑卒中中循环 miRNA 的相关研究进展[J]. 卒中与神经疾病, 2016, 23(3): 213-215.
- [10] 关晶晶,张颖,刘玉洁. 血浆 miRNA-1、miRNA-21 对冠心病合并糖尿病患者 PCI 术后支架内再狭窄的影响[J]. 中国应用生理学杂志, 2018, 34(4): 304-308.
- [11] Yin KJ, Hamblin M, Chen YE. Angiogenesis-regulating microRNAs and Ischemic Stroke [J]. Curr Vasc Pharmacol, 2015, 13(3): 352-365.
- [12] 曹琳,姚平波,张平,等. 急性脑梗死患者外周血 miRNA 表达及其与炎症细胞因子的相关性[J]. 中国动脉硬化杂志, 2015, 23(3): 277-280.
- [13] 虞莉娜,席刚明,刘进香,等. 急性脑梗死患者血清中 miR-215p 与炎症因子的相关性分析[J]. 河北医科大学学报, 2016, 37(6): 632-635.
- [14] Guo JF, Zhang Y, Zheng QX, et al. Association between elevated plasma microRNA-223 content and severity of coronary heart disease [J]. Scand J Clin Lab Inv, 2018, 78(5): 373-378.
- [15] 徐宵峰,王双双,林少沂,等. miRNA-223 在冠状动脉粥样硬化性心脏病发展过程中的调控机制[J]. 生命的化学, 2019, 39(2): 360-366.
- [16] Lu G, Wong MS, Xiong MZQ, et al. Circulating MicroRNAs in Delayed Cerebral Infarction After Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage [J]. J Am Heart Assoc, 2017, 6(4): e005363.
- [17] 朱晓彤. miRNA-21 在动脉粥样硬化炎症反应中的作用[D]. 天津市:天津医科大学, 2017.
- [18] Qu YM, Sun X, Yan XL, et al. Identification of microRNAs and messenger RNAs involved in human umbilical cord mesenchymal stem cell treatment of ischemic cerebral infarction using integrated bioinformatics analysis [J]. Neural Regen Res, 2019, 14(9): 1610-1616.
- [19] 王志,金庙通,杨建邦. 脑梗死患者血清 miR-181c、miR-128b 表达水平及其与 90 天预后的相关性[J]. 中国动脉硬化杂志, 2019, 27(6): 517-521.