

血清 microRNA-423-5p 在脑血栓形成早期诊断中的作用研究

林仲辉¹, 谢剑灵¹, 陈志武¹, 马琪林²

(1. 福建厦门市中医院神经内科, 福建 厦门 361009

E-mail: forestlzh@aliyun.com;

2. 福建厦门大学附属第一医院神经内科, 福建 厦门 361001)

摘要: **目的** 探讨血清 microRNA-423-5p 在脑血栓形成早期诊断中的应用价值。**方法** 采用 TaqMan-PCR 方法检测 100 例脑血栓患者(疾病组)及 100 例高危对照者(对照组)血清 microRNA-423-5p 的表达水平,通过受试者工作特征曲线分析血清 microRNA-423-5p 水平在脑血栓形成早期诊断中的应用价值。**结果** 与对照组比较,疾病组具有更高的 microRNA-423-5p 血清水平,疾病组相对表达值为 (7.78 ± 3.30) , 对照组相对表达值为 (3.54 ± 0.83) , P 值为 6.69×10^{-23} ; 受试者工作特征曲线分析结果显示血清 microRNA-423-5p 可有效从对照个体中区分脑血栓患者,受试者工作特征曲线下面积达到 $0.87(0.82 \sim 0.93)$, 诊断的敏感性与特异性分别为 79.00% 和 98.60% , 最佳诊断界点值为 4.64 。**结论** 血清 microRNA-423-5p 是一种有效的脑血栓形成早期诊断血清标志物。

关键词: microRNA-423-5p; 脑血栓; 诊断

中图分类号: R743.32

文献标识码: A

文章编号: 1001-5817(2016)06-0586-03

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2016.06.010

脑血栓形成是最常见的脑梗死类型,常发生在脑动脉主干或皮质支动脉,主要由于动脉粥样硬化导致血管增厚、管腔狭窄、闭塞、血流缓慢,进而血栓形成,最终导致脑局灶性梗死和相应神经系统病变^[1]。因此,如何在早期诊断或预测脑血栓形成是防治脑梗死的重要课题。研究表明:在脑血栓形成过程中,存在血液流变学与分子成分的变化,其中 microRNA 尤其引人关注。microRNA 是一类非编码微小分子 RNA,长约 20 bp,功能主要为调节基因的表达,参与细胞生长、增殖、分化等生命过程;而且,它们在不同的生理或病理状态下呈现差异性表达,并具有组织器官特异性^[2],提示可作为某些疾病的诊断或预测标志物。已有研究报告,血清 microRNA-423-5p 表达在静脉血栓形成患者中呈现上调^[3]。本研究拟探讨血清 microRNA-423-5p 在脑血栓形成早期诊断中的应用价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2013 年 1 月—2014 年 12 月在厦门市中医院和厦门市第一医院神经内科住院的脑血栓病例 100 例为疾病组。根据《2014 中国急性缺血性脑卒中诊断指南》^[4] 及《神经病学》^[5] 制定入选标准:①安静休息或清晨睡醒时急性起病;②局灶神经功能缺损,如一侧面部或肢体无力或麻木、语言障碍等;③有脑血管高危因素,如高血压、糖尿病、高脂血症、吸烟、动脉粥样硬化等;④临床表现可通过某一动脉供血区功能障碍来解释;⑤头颅 CT 或 MRI 检查发现责任病灶,并可确认为脑血栓形成者;⑥采血时,病程处于超

早期(发病后 1~6 h 内);⑦意志清楚,志愿参与本次研究。排除标准为:有败血症、感染性心内膜炎、风湿病等基础性病变的既往病史或客观依据者;未经 CT 和 MRI 确诊者;采血时,病程已超过 6 h 者;有意识障碍或不愿意参与本次研究者。收集同医院同期进行体检发现有脑血管病高危因素,如高血压病、糖尿病、高脂血症、吸烟、动脉粥样硬化的非脑梗死体检者 100 例为对照组。

1.2 方法

1.2.1 血清收集与处理 发病后 1~6 h 内空腹抽外周全血 3 ml,经 3 000 r/min 离心 3 min 后,取上清液置 -80 °C 保存备用。

1.2.2 RNA 提取与逆转录 取血清 200 μ l,根据产品说明书 miRNeasy Serum/Plasma Kit(德国 QiaGen 公司,产品批号:217184)提取血清样本中的总 RNA;采用 ABI 公司所生产的 cDNA 合成试剂盒 TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit(产品批号:4366569),根据产品说明书合成 cDNA 后,置 -80 °C 保存备用。

1.2.3 血清 microRNA-423-5p 检测 采用 ABI 公司生产的 TaqMan-PCR 检测试剂盒 TaqMan Universal Master Mix II(产品批号:4440041)检测血清 microRNA-423-5p 的表达水平。TaqMan-PCR 反应总体积为 5 μ l,具体如下:1 \times TaqMAN Universal Master Mix II, 1 \times TaqMan 探针与引物(产品批号:4427975)以及 15 ng cDNA,反应条件为 95 °C 预变性 30 s \rightarrow 95 °C 15

s 和 60 °C 1 min, 重复 49 个循环。每样本 PCR 反应重复 3 次, 并设立阳性、阴性及空白对照以监控检测质量。由于本研究所采用的 RNA 提取试剂盒及逆转录试剂盒所提取的 RNA 和合成的 cDNA 已含有 U6, 因此, 采用 U6 作为内参来分析血清 microRNA-423-5p 的相对表达水平, 具体根据 $2^{-\Delta Ct}$ 公式计算:

$$\Delta Ct = Ct_{miR-423-5p} - Ct_{U6}$$

1.3 统计学方法 组间差异比较采用 χ^2 检验、*t* 检验或 Mann-Whitney *U* 检验来比较分析; 血清 microRNA-423-5p 水平对脑血栓形成的风险价值通过多因素 Logistic 回归模型来评价。在该模型中, 采用退步法并根据 Likelihood-Ratio 检验来筛选进入模型的有效变量; 采用受试者工作特征曲线来评价 microRNA-423-5p 对脑血栓早期诊断的价值, 根据特异性与敏感性分布数据, 选用二者平均值最大者所对应的 microRNA-423-5p 表达值为最佳截断点, 所有统计分析均通过 SPSS 18 版本来完成, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 两组基线资料对比 两组在年龄、性别、血糖值、血脂各指标值、吸烟例数、酗酒例数的差异无统计学意义。但 microRNA-423-5p 在两组的分布差别具有统计学意义, 见表 1。疾病组的相对表达值为 (7.78 ± 3.30) , 具有更高的 microRNA-423-5p 血清水平, 与对照组 (3.54 ± 0.83) 比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$), 见图 1。

表 1 两组研究对象临床资料

特征	对照组 (n=100)	疾病组 (n=100)
男性 (n, %)	91(91.00)	91(91.00)
年龄 (岁)		
≤40	10(10.00)	13(13.00)
41~45	17(17.00)	11(11.00)
46~50	13(13.00)	13(13.00)
51~55	9(9.00)	11(11.00)
56~60	17(17.00)	22(22.00)
≥61	34(34.00)	30(30.00)
吸烟 (n, %)	88(88.00)	85(85.00)
酗酒 (n, %)	86(86.00)	90(90.00)
c 血糖 / (mmol · L ⁻¹)	4.66 ± 1.22	4.79 ± 2.79
c 血总胆固醇 / (mmol · L ⁻¹)	5.96 ± 0.60	6.01 ± 2.61
c 血甘油三酯 / (mmol · L ⁻¹)	2.03 ± 0.83	2.08 ± 1.49
c 高密度脂蛋白 / (mmol · L ⁻¹)	0.83 ± 0.36	0.81 ± 0.54
c 低密度脂蛋白 / (mmol · L ⁻¹)	3.54 ± 1.01	3.60 ± 1.06
microRNA-423-5p	3.54 ± 0.83	7.78 ± 3.30 ^a

注: 与对照组比较, a: $P < 0.001$

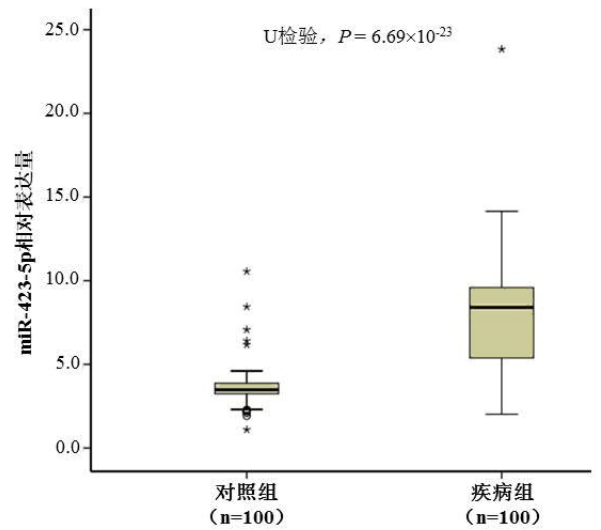


图 1 血清 microRNA-423-5p 在疾病组与对照组中的表达差异

2.2 Logistic 回归分析和受试者工作特征曲线 多因素 Logistic 回归分析显示, 血清 microRNA-423-5p 水平对脑血栓形成的风险价值为 2.49 (1.89~3.29), 对应 P 值为 8.62×10^{-11} 。受试者工作特征曲线分析结果显示, 血清 microRNA-423-5p 能有效区分疾病组与对照组 ($P = 3.23 \times 10^{-30}$), 受试者工作特征曲线下面积 (AUC) 为 0.87 (0.82~0.93), 最佳截点为 4.64, 对应敏感性与特异性分别为 79.00% 和 98.60% (见图 2A)。为分析性别对研究结果的影响, 我们对男性研究对象进行了分析, 结果显示受试者工作特征曲线 AUC 为 0.87 (0.81~0.93), 最佳截点为 4.52, 对应敏感性与特异性分别为 83.50% 和 96.70% (见图 2B)。

3 讨论

脑血栓形成是一种严重危害中老年人群的常见神经系统疾病, 主要由脑动脉粥样硬化所导致, 该病的超早期诊断是进行溶栓治疗并最终痊愈的重要前提。目前虽有 CT 或 MRI 检查可提供很大的帮助, 但由于 CT 一般需要 24 h 才显影, 而 MRI 等候时间较长, 因此, 如何超早期识别脑血栓形成过程中的超早期变化, 寻找到超早期诊断或预警的血清标志物是一个重要的科学问题。

近年来的研究表明: 血清 microRNA 可能是一个很有潜在价值的血清标志物。microRNA 是一类小分子非编码 RNA, 长约 20~30 个碱基, 主要通过作用靶向编码基因的转录产物而进行转录后调控, 在人类生理与病理过程中均发挥着重要的作用^[6]。而且值得关注的是, 这类小分子可稳定表达于血清中, 并呈现组织特异性, 提示它们可以作为疾病早期诊断或预警的重

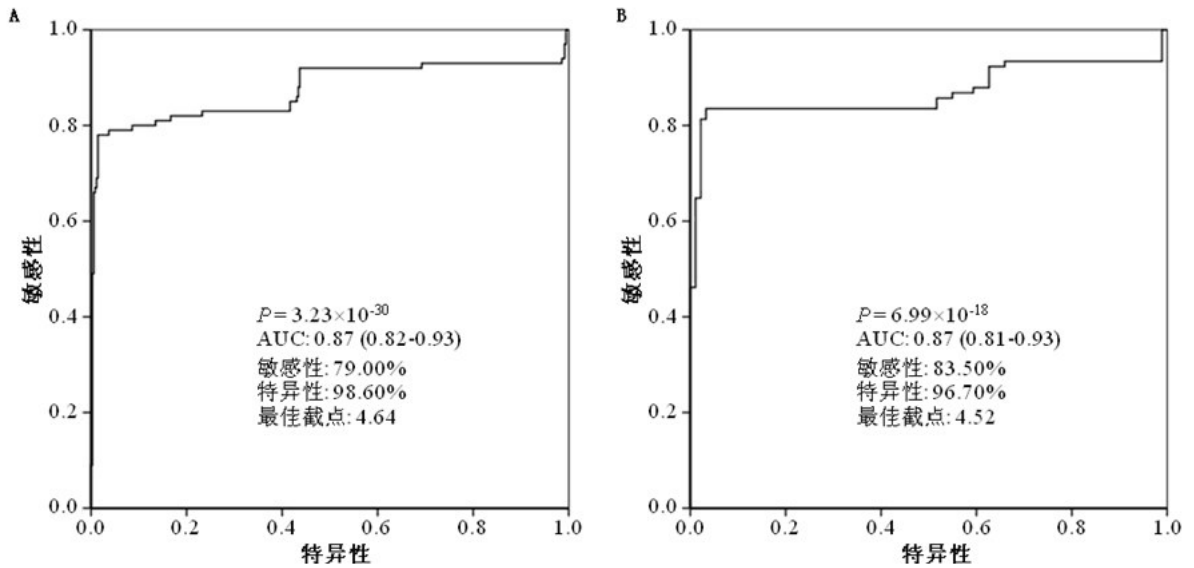


图2 血清 microRNA-423-5p 在区分疾病组与对照组的受试者工作特征曲线

注:图2A为基于所有研究对象的受试者工作特征曲线;图2B为基于所有男性研究对象的受试者工作特征曲线

要标志物^[2,7]。而 microRNA-423-5p 是一种重要的外周血清标志物,最早被报道与心脏功能有关,也与一些肿瘤如肠癌等存在关联性^[8-9]。最近被认为是一种与动脉粥样硬化密切相关的重要标志物^[1,10-11],如谭艳武等^[11]报道在不同类型的冠心病中,microRNA-423-5p 呈现血清差异性表达,这种差异与病变程度呈正相关。笔者的研究结果显示:在脑血栓形成的患者血清中 microRNA-423-5p 水平明显上调。Starikova 等^[3]报道:在外周静脉血栓形成患者中,这种 microRNA-423-5p 血清水平也明显上调。这些结果提示,血清 microRNA-423-5p 对静脉血栓形成来说是一个有价值的标志物,也许可以用于静脉血栓形成的早期预警。本研究进一步证实了血清 microRNA-423-5p 可有效从带有血栓形成危险因素的个体中区分具有脑动脉血栓形成的患者,并具有较高的敏感性和特异性,这些说明该指标对临床上预测脑血栓发生的危险性有较重要的实际应用价值。

此外,由于部分患者(主要是女性患者)不愿意参与本次研究,男性患者比率偏高,尽管基于男性研究对象的分层分析获得了相类似的结果,但可能存在一定的选择性偏倚,因此基于一个更大样本并含足够女性研究对象的研究有助于提高本研究的可靠性。

参考文献:

- [1] 李艳敏,张红明,谈红,等.慢性充血性心力衰竭患者血浆 miR-423-5p 的表达及意义[J].国际心血管病杂志,2014,41(3):189-191.
- [2] Zhao L,Chen X,Cao Y. New role of microRNA: carcino-

genesis and clinical application in cancer[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai),2011,43(11):831-839.

- [3] Starikova I, Jamaly S, Sorrentino A, et al. Differential expression of plasma miRNAs in patients with unprovoked venous thromboembolism and healthy control individuals[J]. Thromb Res,2015,136(3):566-572.
- [4] 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.
- [5] 吴江.神经病学[M].北京:人民卫生出版社,2014:158-166.
- [6] Rogelj B,Giese KP. Expression and function of brain specific small RNAs[J]. Rev Neurosci,2004,15(3):185-198.
- [7] Di Stefano V, Zaccagnini G, Capogrossi MC, et al. microRNAs as peripheral blood biomarkers of cardiovascular disease[J]. Vascul Pharmacol,2011,55(4):111-118.
- [8] Lu X, Lu J. The significance of detection of serum miR-423-5p and miR-484 for diagnosis of colorectal cancer[J]. Clin Lab,2015,61(1-2):187-190.
- [9] Fang Z,Tang J,Bai Y,et al. Plasma levels of microRNA-24, microRNA-320a, and microRNA-423-5p are potential biomarkers for colorectal carcinoma[J]. J Exp Clin Cancer Res,2015,34(1):86.
- [10] 杨阳,罗义,黄建楷,等.心力衰竭患者循环 miR-423-5p 的表达及其与左室肥厚的相关性[J].中国循环杂志,2014,29(z1):18-19.
- [11] 谭艳武,罗伟陵,李进,等. miR-423-5p 在冠心病不同亚型临床病人的诊断意义[J].湖南师范大学学报:医学版,2015,12(3):26-29.

收稿日期:2016-08-03;修回日期:2016-12-06