

rt-PA 静脉溶栓治疗有效降低急性脑梗死患者外周血 miR-34a 水平及提高 sirt1 水平*

梁恩¹ 谢锡忠^{1*} 陈锐聪² 何嘉伟¹ 何浩彬¹

¹ 广州市番禺区何贤纪念医院卒中中心, 广东广州 511400

² 广州中医药大学第二附属医院神经外科, 广东广州 510120

摘要 目的:探讨重组组织型纤溶酶原激活剂(rt-PA)静脉溶栓治疗对急性脑梗死患者氧化应激及外周血微小 RNA-34a(miR-34a)、沉默信息调节因子 1(sirt1)水平的影响。方法:选取 105 例急性脑梗死患者,按照随机数字表法分为溶栓组 52 例、常规组 53 例,剔除治疗期间死亡病例后,各 50 例。常规组接受常规治疗,溶栓组接受 rt-PA 静脉溶栓+除抗血小板聚集外的常规治疗。比较 2 组住院时间、机械通气时间、神志恢复时间,观察治疗前、后神经功能损伤情况、氧化应激相关指标、炎症因子水平和外周血单个核细胞中 miR-34a、sirt1 表达水平的变化。结果:溶栓组患者住院时间、机械通气时间、神志恢复时间显著短于常规组(P 均 <0.05)。治疗后,2 组患者美国国立卫生研究院卒中量表(NIHSS)评分降低,且溶栓组明显低于常规组(P 均 <0.05);2 组患者血清丙二醛(MDA)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)水平较治疗前降低,且溶栓组低于常规组;超氧化物歧化酶(SOD)水平较治疗前升高,且溶栓组高于常规组(P 均 <0.05)。治疗后 2 组患者外周血单个核细胞中 miR-34a 水平降低,且溶栓组低于常规组,sirt1 水平升高,且溶栓组明显高于常规组(P 均 <0.05)。结论:急性脑梗死患者应用 rt-PA 静脉溶栓治疗效果显著,可明显降低机体炎症反应,有效减轻氧化应激损伤,促进神经功能恢复。

关键词 重组人组织型纤溶酶原激活剂; 静脉溶栓; 急性脑梗死; 氧化应激; 微小 RNA-34a; 沉默信息调节因子 1
中图分类号 R743.3 **文献标识码** A **DOI** 10.11768/nkjwzzzz20220312

rt-PA intravenous thrombolytic therapy can effectively reduce the level of miR-34a and increase the level of sirt1 in peripheral blood of patients with acute cerebral infarction LIANG En¹, XIE Xi-zhong^{1*}, CHEN Rui-cong², HE Jia-wei¹, HE Hao-bin¹. ¹Stroke Center, He Xian Memorial Hospital of Panyu District, Guangdong Guangzhou 511400; ²Department of Neurosurgery, the Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Guangzhou 510120, China

Corresponding author: XIE Xi-zhong, E-mail: xr57th@163.com

Abstract Objective: To investigate the effect of intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator (rt-PA) on oxidative stress, microRNA-34a (miR-34a) and sirt1 in patients with acute cerebral infarction. Methods: A total of 105 patients with acute cerebral infarction were selected and divided into thrombolytic group (52 cases) and conventional group (53 cases) according to the random number table method. After excluding the dead cases during the treatment, there were 50 cases in each group. The conventional group received conventional treatment, while the thrombolytic group received rt-PA intravenous thrombolysis + conventional treatment except anti platelet aggregation. The hospitalization time, mechanical ventilation time and consciousness recovery time of the two groups were compared. The neurological function injury, oxidative stress related indexes, inflammatory factors and the expression levels of miR-34a and sirt1 in peripheral blood mononuclear cells were observed before and after treatment. Results: The hospitalization time, mechanical ventilation time and consciousness recovery time in thrombolytic group were significantly shorter than those in conventional group (all $P < 0.05$). After treatment, the National Institute of Health stroke scale (NIHSS) scores in the two groups decreased, and those in thrombolytic group were significantly lower than those in conventional group (all $P < 0.05$); the levels of malondialdehyde (MDA), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β) in the two groups were lower than those before treatment, and those in thrombolytic group were lower than those in conventional group; the level of superoxide dismutase (SOD) in thrombolytic group was higher than that in the conventional group (all $P < 0.05$). After treatment, the level of miR-34a in the peripheral blood mononuclear cells of the two groups decreased, and that in thrombolytic group was lower than in conventional group,

* 基金项目: 广东省中医院局科研项目 (No:20141092)

* 通信作者: 谢锡忠, E-mail: xr57th@163.com, 广州市番禺区清河东路 2 号

and the level of sirt1 increased, and that in thrombolytic group was significantly higher than in conventional group (all $P < 0.05$). Conclusions: Intravenous thrombolysis with rt-PA is effective in patients with acute cerebral infarction, which can significantly reduce the inflammatory response, effectively reduce oxidative stress injury, and promote the recovery of neurological function.

Key words Recombinant human tissue plasminogen activator; Intravenous thrombolysis; Acute cerebral infarction; Oxidative stress; microRNA-34a; Silent information regulator 1

急性脑梗死又称为急性缺血性脑卒中,主要是指局部脑组织因各种原因出现缺氧、缺血而引起坏死,从而导致相应的神经功能损伤。临床治疗急性脑梗死的主要原则为尽早疏通闭塞血管,有效改善缺血半暗带区的血流灌注,减少神经功能损伤^[1]。静脉溶栓为治疗急性脑梗死的临床首选措施,可有效减轻患者神经功能损伤,改善患者预后^[2]。本研究探讨重组组织型纤溶酶原激活剂(recombinant tissue plasminogen activator, rt-PA)静脉溶栓治疗对急性脑梗死患者氧化应激及外周血微小 RNA-34a (microRNA-34a, miR-34a)、沉默信息调节因子 1 (silent information regulator 1, sirt1) 水平的影响。

资料与方法

一般资料 选取 2017 年 4 月-2019 年 10 月在广州市番禺区何贤纪念医院卒中中心就诊的 105 例急性脑梗死患者,按照随机数字表法分为溶栓组 52 例、常规组 53 例,剔除治疗期间死亡病例 5 例,其中溶栓组 2 例,常规组 3 例,实际统计病例数 100 例,各组 50 例。2 组性别、年龄、发病至入院时间、梗死部位和面积以及入院时格拉斯哥昏迷 (Glasgow coma scale, GCS) 评分等比较,差异无统计学意义 (P 均 > 0.05),见表 1。

纳入与排除标准 纳入标准:①急性脑梗死的诊断符合《中国各类主要脑血管病诊断要点

2019》^[3] 诊断标准,并经头颅 CT 或 MRI 检查确诊;②首次发病,且均于发病 5 h 内入院就诊;③无溶栓禁忌证;④无精神异常,可顺利配合研究。

排除标准:①经 CT 检查发现存在早期大面积脑梗死征象;②既往存在脑出血史患者;③合并有严重感染性、血液性或自身免疫性疾病患者;④合并心、肝、肾等脏器严重障碍患者;⑤合并颅内、肺等恶性肿瘤患者。本研究经医院伦理委员会审核批准,患者或家属均知情并签署同意书。

方法 常规组患者予以降低颅内压、稳定斑块、纠正水电解质和酸碱失衡、营养神经及抗血小板聚集等常规治疗,连续治疗 14 d。溶栓组患者在常规治疗基础上予以 rt-PA 静脉溶栓治疗。入院后患者静脉用药 rt-PA (规格:18 mg, 生产批号:20090038, 厂家:山东阿华生物药业有限公司),剂量为 0.9 mg/kg,其中前 10% 剂量于 1 ~ 2 min 内静脉推注完成,剩余剂量加入 250 mL 生理盐水中静脉滴注,并于 60 min 内完成。同时接受除抗血小板聚集外的常规治疗,治疗药物、剂量均同常规组。另溶栓治疗后 24 h 患者可进行抗血小板聚集治疗,药物、剂量也同常规组,持续 14 d。治疗期间 2 组患者均接受相同的康复指导并进行康复训练。

观察指标

①疾病恢复情况:比较 2 组住院时间、机械通气时间、神志恢复时间。②神经功能:依照美国国立卫

表 1 2 组患者临床资料比较

组别	常规组 (n = 50)	溶栓组 (n = 50)	χ^2/t 值	P 值
性别 (男/女)	27/23	29/21	0.162	0.687
年龄 (岁, $\bar{x} \pm s$)	68.02 $\pm$ 7.11	66.81 $\pm$ 7.24	0.843	0.401
发病至入院时间 (h, $\bar{x} \pm s$)	3.47 $\pm$ 0.90	3.56 $\pm$ 0.87	0.508	0.612
梗死部位 [(例) %]				
前循环供血区	28 (56.00)	30 (60.00)	0.164	0.685
后循环供血区	22 (44.00)	20 (40.00)		
梗死面积 [(例) %]				
梗死灶直径 > 4 cm	24 (48.00)	22 (44.00)	0.161	0.688
梗死灶直径 ≤ 4 cm	26 (52.00)	28 (56.00)		
GCS 评分 (分, $\bar{x} \pm s$)	6.27 $\pm$ 1.42	6.14 $\pm$ 1.23	0.489	0.626

生研究院卒中量表(National Institute of Health stroke scale,NIHSS)评估 2 组患者治疗前、后的神经功能,评分越低,表示患者神经功能恢复越好。③氧化应激相关指标及炎症因子水平:分别抽取2组患者治疗前、后空腹外周静脉血 9.0 mL(分为 2 份,各 4.5 mL),其中 1 份以 3 000 转/min 离心 15 min,取上层血清,保存至低温下(−80℃)待检。采用化学比色法测定患者血清超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)水平,采用硫代巴比妥酸比色法测定丙二醛(malondialdehyde,MDA)水平,采用酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay,ELISA)测定血清肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α,TNF-α)和白细胞介素-1β(interleukin-1β,IL-1β)水平。所用试剂盒均购自北京中山生物技术有限公司,检测操作由本院检验科专业医师严格按照试剂盒说明书于有效期内执行。④外周血单个核细胞中 miR-34a、sirt1 水平:取③中另一份外周静脉血,置入肝素抗凝管中,使用 Ficoll-Hypaque 分离液分离提取外周血单个核细胞,利用实时荧光定量(real-time quantitative polymerase chain reaction,RT-qPCR)技术检测患者外周血单个核细胞 miR-34a 和 sirt1 mRNA 表达水平。操作如下:a)按照 Trizol 试剂盒说明书提取细胞中总 RNA;b)取 0.1 g RNA,进行逆转录合成 cDNA;c)加入 5.0 L cDNA,1.0 L 正向和反向引物,进行 PCR 扩增反应,其中引物序列,见表 2。条件如下:95℃ 下 5 s,59℃ 下 30 s,循环 35 次;d)每个样品重复实验 3 次,利用 2^{-ΔΔCt} 法分析患者外周血单个核细胞中 miR-34a、sirt1 mRNA 的相对表达量。

统计学分析 采用 SPSS 25.0 统计学软件,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,行 *t* 检验;计数资料以百分数

(%)表示,行 χ^2 检验。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

住院时间、机械通气时间、神志恢复时间、NIHSS 评分、GCS 评分 溶栓组患者住院时间、机械通气时间、神志恢复时间显著短于常规组(*P* 均 < 0.05)。治疗前,2 组患者 NIHSS 评分比较,差异无统计学意义(*P* > 0.05);治疗后 2 组患者 NIHSS 评分降低,且溶栓组明显低于常规组(*P* 均 < 0.05)。治疗后 2 组患者 GCS 评分比较,差异无统计学意义(*P* > 0.05),见表 3。

治疗前、后氧化应激及炎症因子相关指标 治疗前,2 组患者血清 MDA、SOD、TNF-α、IL-1β 水平比较,差异无统计学意义(*P* 均 > 0.05);治疗后 2 组患者血清 MDA、TNF-α、IL-1β 水平降低,且溶栓组低于常规组;SOD 水平升高,且溶栓组高于常规组(*P* 均 < 0.05),见表 4。

治疗前、后外周血单个核细胞中 miR-34a、sirt1 水平 治疗前,2 组患者外周血单个核细胞中 miR-34a、sirt1 水平比较,差异无统计学意义(*P* 均 > 0.05);治疗后 2 组患者外周血单个核细胞中 miR-34a 水平降低,且溶栓组低于常规组;sirt1 水平升高,且溶栓组明显高于常规组(*P* 均 < 0.05),见表 5、图 1。

讨 论

rt-PA 是一种血栓溶解剂,属于糖蛋白,在静脉注射进入人体后,可结合纤维蛋白,促进无活性的纤溶酶原激活为具有活性的纤溶酶,进而加速血栓溶解,改善血管狭窄或阻塞,恢复脑部供血,挽救半暗带区神经细胞,减轻脑供血持续不足引起的脑损害;

表 2 miR-34a、sirt1 mRNA 及内参 U6 序列

指标	正向引物 5′—3′	反向引物 5′—3′
miR-34a	ATGGTTTCGTGGGTGGCACTGTCTTAGCTGG	GCAGGGTCCGAGGTATTC
sirt1 mRNA	GGAGGAGCTGGATTTCGGGACTGAT	GGTGAACAATTCTCTGTACCTGCACA
U6	CTCGCTTCGGCAGCACA	AACGCTTCACGAATTTGCGT

表 3 2 组住院时间、机械通气时间、神志恢复时间、NIHSS 评分、GCS 评分比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例	住院时间 (d)	机械通气时间 (d)	神志恢复时间 (h)	NIHSS 评分(分)		治疗后 GCS 评分 (分)
					治疗前	治疗后	
常规组	50	29.45 ± 4.12	6.16 ± 1.23	48.76 ± 6.42	14.56 ± 3.57	8.98 ± 1.88 [#]	12.08 ± 2.53
溶栓组	50	21.67 ± 3.24 [*]	4.27 ± 0.91 [*]	36.58 ± 5.29 [*]	14.68 ± 3.44	6.87 ± 1.53 ^{##}	12.12 ± 2.56
<i>t</i> 值	—	10.796	8.735	10.353	0.171	6.155	0.079
<i>P</i> 值	—	< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.864	< 0.001	0.938

注:与常规组比较,^{*}*P* < 0.05;与本组治疗前比较,[#]*P* < 0.05

表 4 2 组患者治疗前、后氧化应激及炎症因子相关指标($\bar{x} \pm s$)

组别	例	SOD(mmol/L)		MDA(mmol/L)	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
常规组	50	69.85 ± 11.87	116.71 ± 16.38 [#]	10.11 ± 2.01	5.02 ± 0.96 [#]
溶栓组	50	69.24 ± 10.66	128.49 ± 18.67 ^{*#}	10.23 ± 2.13	4.57 ± 0.82 ^{*#}
<i>t</i> 值		0.270	3.354	0.290	2.520
<i>P</i> 值		0.787	0.001	0.773	0.013

组别	例	TNF-α(ng/L)		IL-1β(ng/L)	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
常规组	50	15.31 ± 2.89	6.12 ± 1.36 [#]	12.01 ± 2.71	5.62 ± 1.22 [#]
溶栓组	50	15.46 ± 3.02	3.25 ± 0.78 ^{*#}	12.14 ± 2.68	3.74 ± 1.08 ^{*#}
<i>t</i> 值		0.254	12.944	0.241	8.159
<i>P</i> 值		0.800	<0.001	0.810	<0.001

注:与常规组比较,**P*<0.05;与本组治疗前比较,[#]*P*<0.05

表 5 2 组患者治疗前、后外周血单个核细胞中 miR-34a、sirt1 水平($\bar{x} \pm s$)

组别	例	miR-34a		sirt1	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
常规组	50	1.91 ± 0.56	1.62 ± 0.48 [#]	0.59 ± 0.14	0.71 ± 0.21 [#]
溶栓组	50	1.94 ± 0.60	1.24 ± 0.37 ^{*#}	0.62 ± 0.16	0.86 ± 0.24 ^{*#}
<i>t</i> 值		0.258	4.434	0.998	3.326
<i>P</i> 值		0.797	<0.001	0.321	0.001

注:与常规组比较,**P*<0.05;与本组治疗前比较,[#]*P*<0.05

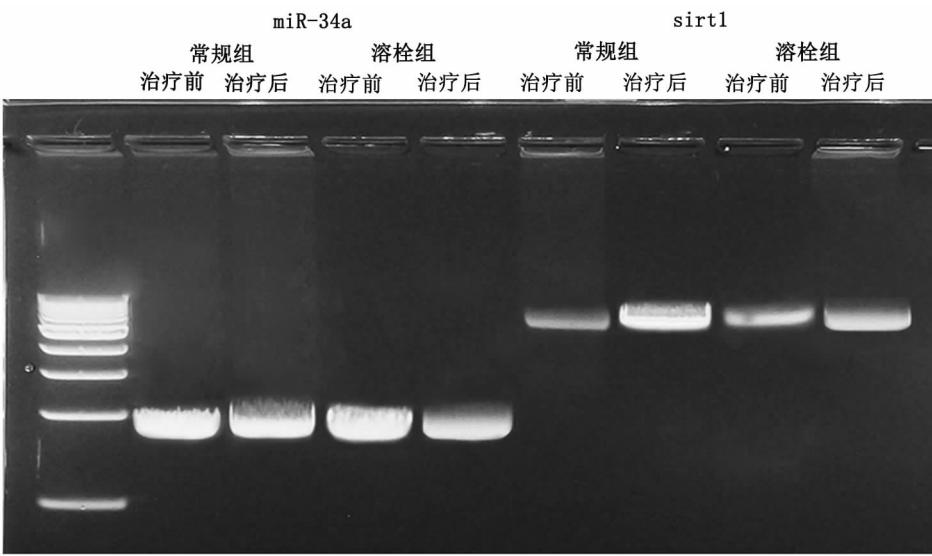


图 1 2 组患者治疗前、后外周血单个核细胞中 miR-34a、sirt1 灰度值

另外,rt-PA 是在天然 t-PA 分子结构的基础上经过改造得到的,具有较好的安全性,在保证疗效同时,对患者凝血系统的作用较小,一般不会引起出血,已成为临床治疗脑梗死的重要药物^[4]。本研究中,溶栓组患者住院时间、机械通气时间、神志恢复时间均显著短于常规组,说明 rt-PA 静脉溶栓治疗更有利于患者的康复。治疗后 2 组患者 NIHSS 评分均降低,且溶栓组明显低于常规组,说明 rt-PA 静脉溶栓可明显减轻患者神经功能损伤,促进神经功能恢复。

有研究显示,氧化应激反应、炎症因子在急性脑梗死的发生及发展中发挥重要作用,脑梗死后患者神经细胞受到损伤,产生大量自由基及炎症因子,从而使机体出现较强的炎症反应和氧化应激反应,损害患者神经功能^[5,6]。而血清 SOD、MDA 水平是间接评估氧化应激反应程度常用的实验室指标。TNF-α、IL-1β 是常见的炎症因子,在缺血缺氧性脑组织损伤中扮演重要角色^[5,7]。本研究提示 rt-PA 静脉溶栓可在一定程度上抑制机体氧化应激反应程度,降

低炎症因子水平。miR-34a 编码基因位于 1p36.2 上,参与调控细胞的凋亡、衰老过程。miR-34a 下调能够保护心肌细胞、血管内皮细胞、肝细胞等,减轻其氧化应激损伤。Chua 等^[8]报道,脑梗死时,miR-34a 水平升高可导致神经元损伤和死亡,而抑制其表达可提高神经元的存活率,保护神经。sirt1 是一种与细胞代谢密切相关的辅酶烟酰胺腺嘌呤二核苷酸依赖的组蛋白去乙酰化酶,为 miR-34a 作用的靶基因之一,可减轻氧化应激损伤,发挥保护细胞、减少细胞凋亡的作用^[9]。研究发现 miR-34a 与 sirt1 共同参与颈动脉粥样硬化不稳定斑块形成过程。Ren 等^[10]临床研究显示,miR-34a 在脑卒中患者血液中表达明显增加,对卒中相关临床结局产生一定影响。本研究中 2 组患者治疗后外周血单个核细胞中 miR-34a 水平降低,sirt1 水平升高,且治疗后溶栓组外周血单个核细胞中 miR-34a 水平明显低于常规组,sirt1 水平明显高于常规组,提示 rt-PA 静脉溶栓可尽快纠正患者外周血单个核细胞中 miR-34a、sirt1 水平,从而迅速缓解患者临床症状。

参考文献

1 蒋陈晓,杨婷,郝有丽,等. D-二聚体水平对急性脑梗死患者溶栓疗效的预测意义[J]. 内科急危重症杂志,2020,26(1):38-40,65.

2 史帝,周昊,王苗. 静脉溶栓治疗急性脑梗死患者的临床疗效及对氧化应激指标水平与神经功能的影响[J]. 卒中与神经疾病,2019,26(4):394-397.

3 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. 中国各类主要脑血管病诊断要点 2019[J]. 中华神经科杂志,2019,52(9):710-715.

4 Law SW,Levine SR. Support for IV tPA in ischaemic stroke in elderly people[J]. Nat Rev Neurol,2016,12(1):8-9.

5 刘素君,蒲国明,李源,等. 参麻益智方联合西酞普兰治疗脑梗死合并认知功能障碍的疗效及其对炎症因子和氧化应激的影响研究[J]. 实用心脑血管病杂志,2021,29(6):77-81.

6 白一蕾,付志新. APACHE II 评分对静脉溶栓治疗的重症脑梗死患者病情评估的价值[J]. 内科急危重症杂志,2021,27(2):135-137.

7 孙瑾,吴瑞杰,朱军,等. 静脉应用 rt-PA 联合亚低温治疗对急性脑梗死患者 NIHSS 评分、颅内压和血清 SOD、MDA 水平的影响[J]. 卒中与神经疾病,2018,25(4):381-384.

8 Chua CEL,Tang BL. miR-34a in Neurophysiology and Neuropathology[J]. J Mol Neurosci,2019,67(2):235-246.

9 Zhu H,Lin Y,Liu Y. miR-34a increases inflammation and oxidative stress levels in patients with necrotizing enterocolitis by downregulating SIRT1 expression[J]. Mol Med Rep,2021,24(3):664-670.

10 Ren X,Engler-Chiurazzi EB,Russell AE,et al. MiR-34a and stroke: Assessment of non-modifiable biological risk factors in cerebral ischemia[J]. Neurochem Int,2019,127(1):73-79.

(2021-08-21 收稿 2022-03-07 收稿)

《中华物理医学与康复杂志》征订启事

《中华物理医学与康复杂志》是中华医学会主办的物理医学与康复(康复医学)专业的高水平学术期刊。本刊严格贯彻党和国家的卫生工作方针政策,本着理论与实践相结合、提高与普及相结合的原则,积极倡导百花齐放、百家争鸣;全面介绍物理治疗、物理医学与康复领域内领先的科研成果和新理论、新技术、新方法、新经验以及对物理因子治疗、康复临床、疗养等有指导作用,且与康复医学密切相关的基础理论研究,及时反映我国康复治疗、物理医学与康复、康复医学的重大进展;同时密切关注国际康复医学发展的新动向,促进国内外物理治疗、物理医学与康复的学术交流。

《中华物理医学与康复杂志》为月刊,大 16 开,内芯 96 页码,中国标准刊号:ISSN 0254-1424 CN 42-1666/R,邮发代号:38-391,每月 25 日出版;每册定价 30 元,全年 360 元整。热忱欢迎国内外物理治疗、物理医学与康复、康复医学领域以及神经内科、神经外科、骨科等相关科室的各级医务工作者踊跃订阅、投稿。订购办法:①邮局订阅:按照邮发代号 38-391,到全国各地邮局办理订阅手续。②直接订阅:通过邮局汇款至《中华物理医学与康复杂志》编辑部订购,各类订户汇款时务请注明所需的杂志名称及年、卷、期、册数等。

编辑部地址:430100 武汉市蔡甸区中法新城同济专家社区平层 E 栋《中华物理医学与康复杂志》编辑部;电话:(027)-69378391;E-mail:cjpmr@tjh.tjmu.edu.cn;杂志投稿网址:www.cjpmr.cn。