

血浆 miR-181a-5p 可评估急性脑梗死的病情及预后*

谷履冰 胥明 陶先明*

重庆医科大学附属大足医院(重庆市大足区人民医院)神经内科,重庆 402360

摘要 目的:探讨急性脑梗死(ACI)患者血浆中微小 RNA(miR)-181a-5p 的表达水平及临床价值。方法:收集 148 例 ACI 患者(ACI 组)的临床资料,根据美国国立卫生研究院卒中量表(NIHSS)评分将其分为:轻度 72 例、中度 35 例、重度 41 例。ACI 患者发病 4.5 h 内用阿替普酶静脉溶栓治疗。根据出院后第 90 天的预后情况,将患者分为预后良好组(102 例)和预后不良组(46 例)。另选取同期健康体检者 100 例为对照组。用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测血浆 miR-181a-5p 表达水平;酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血浆中凋亡分子 B 淋巴细胞瘤-2 基因(Bcl-2)和含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(caspase-1)表达水平。相关性检验用 Pearson 分析;用 Logistic 多因素回归分析影响预后的因素;绘制受试者工作特征(ROC)曲线,分析血浆 miR-181a-5p 预测预后的价值,计算曲线下面积(AUC)、灵敏度及特异性。结果:与对照组比较,ACI 组血浆 miR-181a-5p 和 caspase-1 表达水平较高,而 Bcl-2 表达水平较低(P 均 <0.05)。miR-181a-5p 与 caspase-1 呈正相关($r=0.176, P=0.032$),与 Bcl-2 呈负相关($r=-0.209, P=0.011$)。轻度、中度和重度 ACI 患者血浆 miR-181a-5p 表达水平分别为 (1.35 ± 0.32) 、 (1.79 ± 0.20) 、 (2.34 ± 0.59) ,经单因素方差分析,组间比较差异有统计学意义($F=32.001, P<0.001$),病情越重,血浆 miR-181a-5p 表达水平越高。与预后良好组比较,预后不良组年龄更大,入院时 NIHSS 评分、血浆 miR-181a-5p 和 caspase-1 水平较高,而 Bcl-2 水平较低(P 均 <0.05)。多因素分析显示,年龄、入院时 NIHSS 评分及血浆 miR-181a-5p 水平是 ACI 患者预后不良的独立影响因素($OR=1.532, 1.832, 3.111, P$ 均 <0.05)。血浆 miR-181a-5p 预测不良预后的 AUC 为 0.856 (95% CI: 0.815 ~ 0.886, $P<0.01$),灵敏度为 89.56%,特异性为 70.12%。结论:ACI 患者血浆中 miR-181a-5p 表达水平明显升高,对 ACI 病情和预后的早期评估有一定价值。

关键词 血浆; miR-181a-5p; 急性脑梗死; 凋亡; 预后

中图分类号 R743.3 **文献标识码** A **DOI** 10.11768/nkjwzzzz20230310

Plasma miR-181a-5p can evaluate the condition and prognosis of acute cerebral infarction GU Lv-bing, XU Ming, TAO Xian-ming*. Department of Neurology, Dazu Hospital Affiliated to Chongqing Medical University (Dazu District People's Hospital of Chongqing), Chongqing 402360, China

Corresponding author: TAO Xian-ming, E-mail: 850116555@qq.com

Abstract Objective: To investigate the expression level and clinical value of miR-181a-5p in plasma of patients with acute cerebral infarction (ACI). Methods: The clinical data of 148 patients with ACI (ACI group) were collected. According to the National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS), there were 72 mild patients, 35 moderate patients, and 41 severe patients. Patients with ACI were treated with intravenous alteplase within 4.5 h of onset. According to the prognosis on the 90th day after discharge, patients were divided into a good prognosis group (102 cases) and a poor prognosis group (46 cases). In addition, 100 normal people who underwent physical examination were selected as the control group. Plasma miR-181a-5p expression level was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the apoptosis molecule B-lymphoma-2 gene (Bcl-2) and cysteinyl aspartate specific proteinase 1 (caspase-1) in plasma. Pearson analysis was used for correlation test, Logistic multivariate analysis of prognostic factors. The receiver operating characteristic (ROC) curve was drawn to analyze the value of miR-181a-5p in predicting prognosis, and the area under the curve (AUC), sensitivity and specificity were calculated. Results: Compared with the control group, the plasma expression levels of miR-181a-5p and caspase-1 in the ACI group were increased, and the expression level of Bcl-2 was reduced (all $P<0.05$). miR-181a-5p was positively correlated with caspase-1 ($r=0.176, P=0.032$) and negatively correlated with Bcl-2 ($r=-0.209, P=0.011$). The expression levels of plasma miR-181a-5p in patients with mild, moderate and severe ACI were (1.35 ± 0.32) , (1.79 ± 0.20) , and (2.34 ± 0.59) , respectively. After one-way analysis of variance, there were statistically significant differences between groups ($F=32.001, P<0.01$), the

* 基金项目:重庆市科技计划项目(No:2018HBRC015)

* 通信作者:陶先明, E-mail: 850116555@qq.com, 重庆市大足区棠香街道二环南路 1073 号

more severe the disease, the higher the expression level of miR-181a-5p in plasma. Compared with the good prognosis group, the poor prognosis group had higher age, NIHSS score on admission, miR-181a-5p and caspase-1 levels, but lower Bcl-2 levels ($P < 0.05$). Multivariate analysis showed that age ($OR = 1.532$), NIHSS score on admission ($OR = 1.832$) and plasma miR-181a-5p ($OR = 3.111$) level were independent influencing factors of poor prognosis in ACI patients ($P < 0.05$). The AUC of plasma miR-181a-5p for predicting poor prognosis was 0.856 (95% CI: 0.815-0.886, $P < 0.01$), and the sensitivity and specificity were 89.56% and 70.12%, respectively. Conclusion: The expression level of miR-181a-5p in the plasma of ACI patients was significantly increased, which has a certain value for the early assessment of ACI disease and prognosis.

Key words Plasma; miR-181a-5p; Acute cerebral infarction; Apoptosis; Prognosis

急性脑梗死(acute cerebral infarction, ACI)是指各种原因导致的脑部血液供应障碍,进而导致脑组织局部缺氧缺血,引起一系列神经功能缺损的临床综合征^[1]。溶栓是治疗 ACI 的重要方法,但是患者预后的差异较大,缺血再灌注损伤是其重要的影响因素^[2]。微小 RNA(microRNA, miRNA)是长度约为 22 个核苷酸的非编码单链 RNA 分子,参与转录后基因表达调控,miR-181a-5p 与细胞凋亡密切相关,可参与脑缺血损伤^[3,4]。本研究分析血浆 miR-181a-5p 水平与凋亡分子的关系及其对 ACI 患者预后的评估价值。

资料与方法

一般资料 收集 2019 年 6 月-2021 年 4 月重庆医科大学附属大足医院收治的 ACI 患者 148 例(ACI 组)为研究对象,纳入标准:①首次发病;②符合《中国急性缺血性脑卒中诊治指南 2018》^[5] ACI 的诊断标准;③符合溶栓适应证发病至接受溶栓时间 < 4.5 h;④随访资料完整。排除标准:①既往有脑出血病史;②急慢性感染性疾病;③妊娠和哺乳期妇女;④服用糖皮质激素。另选取同期在医院进行健康体检者 100 例为对照组。ACI 组 148 例(男 82,女 66),年龄 49 ~ 75 岁,平均 (67.0 ± 8.2) 岁;平均体重指数(body mass index, BMI)为 (23.70 ± 3.10) kg/m²。根据美国国立卫生研究院卒中量表(National Institute of Health Stroke Scale, NIHSS)评分^[6],分为轻度 72 例(1 ~ 4 分)、中度 35 例(5 ~ 15 分)、重度 41 例(> 15 分)。对照组 100 例(男 61,女 39),年龄 54 ~ 77 岁,平均 (66.0 ± 6.2) 岁;平均 BMI 为 (23.14 ± 2.77) kg/m²。2 组性别、年龄及 BMI 比较,差异无统计学意义(P 均 > 0.05)。本研究经医院伦理委员会批准,所有患者或家属均知情并签署同意书。

方法

1. 临床资料采集。采集性别、年龄、病史、血压、脑梗死部位、责任大血管分布和入院时 NIHSS 评分

等一般资料。

2. 逆转录-聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)检测血浆 miR-181a-5p 表达水平。入院后即刻取受试者肘静脉血 5 mL,乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝,4℃,3 000 转/min 离心 15 min,留存血浆。用去核酸酶的 1.5 mL 塑料离心管分装。采用 mir-Vana PARIS 试剂盒(美国 Ambion 公司)提取血浆中总 RNA,用 U2800 紫外分光光度检测仪测定纯度。随后用反转录试剂盒(日本 TAKARA 公司)提取 cRNA,操作严格按照试剂盒说明书进行。用 SYBR Premix Ex Taq TM 荧光定量试剂盒(日本 TAKARA 公司)进行 PCR 反应,反应条件为:95℃ 预变性 30 s,95℃ 变性 5 s,60℃ 退火 30 s,合计 40 个循环。以 U6 为内参基因,测定血浆 miR-181a-5p 相对表达量,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算。引物序列:miR-181a-5p 上游 5'-AGCAGGCTGACACTG-GAGTT-3';下游 5'-CAGCACATGCAGGAACAAAA-3';U6 上游 5'-ATTGGAACGATACAGAGAAGATT-3';下游 5'-GGAACGCTTCACGAATTTG-3'。

3. 酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测血浆中凋亡分子表达水平。用 ELISA 法检测血浆中 B 淋巴细胞瘤-2 基因(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)和含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(cysteiny aspartate specific proteinase 1, caspase-1)表达水平,试剂盒购自武汉博士德生物科技有限公司,严格按照试剂盒说明书进行检测。

4. 随访。出院后对 ACI 患者进行门诊随访,第 90 天时进行改良 Rankin 量表(mRS)评分,评分 > 2 分为预后不良; ≤ 2 分为预后良好^[7]。根据预后情况,将患者分为预后良好组 102 例和预后不良组 46 例。

统计学分析 采用 SPSS 20.0 统计学软件,计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,2 组间比较采用 t 检验,3 组间比较采用单因素方差分析;计数资料用百分数(%)表示,组间比较用 χ^2 检验;相关性检验用 Pearson 分析;Logistic 多因素分析影响预后的因素;

绘制受试者工作特征 (receiver operating characteristic,ROC) 曲线,分析血浆 miR-181a-5p 预测预后的价值,计算曲线下面积 (area under curve, AUC)、灵敏度和特异性。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

2 组血浆 miR-181a-5p、caspase-1、Bcl-2 表达水平 与对照组比较,ACI 组 miR-181a-5p 和 caspase-1 表达水平更高,而 Bcl-2 表达水平更低 (P 均 < 0.05),见表 1。Pearson 分析结果显示,miR-181a-5p 与 caspase-1 呈正相关 ($r = 0.176, P = 0.032$),与 Bcl-2 呈负相关 ($r = -0.209, P = 0.011$)。

表 1 2 组血浆 miR-181a-5p、caspase-1、Bcl-2 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例	miR-181a-5p	caspase-1 ($\mu\text{g/L}$)	Bcl-2 (ng/L)
ACI 组	148	1.87 ± 0.53	32.01 ± 6.12	87.13 ± 20.12
对照组	100	0.91 ± 0.17	17.03 ± 7.34	156.00 ± 34.67
t 值		20.534	16.832	17.922
P 值		<0.01	<0.01	<0.01

ACI 病情严重程度不同患者血浆 miR-181a-5p 表达水平 轻度、中度和重度 ACI 患者血浆 miR-181a-5p 表达水平分别为 (1.35 ± 0.32)、(1.79 ± 0.20)、(2.34 ± 0.59),经单因素方差分析,组间比较差异有统计学意义 ($F = 32.001, P < 0.001$),提示病情越重,血浆 miR-181a-5p 表达水平越高。

ACI 不同预后患者的临床资料 与预后良好组比较,预后不良组年龄更大,入院时 NIHSS 评分、血浆 miR-181a-5p 及 caspase-1 水平更高,而 Bcl-2 水平更低 (P 均 < 0.05),见表 2。

ACI 患者预后不良的影响因素分析 以预后是否良好为因变量,将表 2 中差异有统计学意义的指标作为自变量,Logistic 多因素分析结果显示,年龄、入院时 NIHSS 评分及血浆 miR-181a-5p 是 ACI 患者预后不良的独立影响因素 (P 均 < 0.05),见表 3。

血浆 miR-181a-5p 水平预测 ACI 患者预后的价值分析 ROC 曲线显示,血浆 miR-181a-5p 水平预测 ACI 患者不良预后的 AUC 为 0.856 (95% CI: 0.815 ~ 0.886, $P < 0.001$),灵敏度为 89.56%,特异性为 70.12%,见图 1。

表 2 ACI 不同预后患者的临床资料比较

指标	预后不良组 (n=46)	预后良好组 (n=102)	t/χ^2 值	P 值
年龄 (岁, $\bar{x} \pm s$)	69.10 ± 5.12	64.09 ± 6.01	5.214	<0.01
男性 [例 (%)]	24 (52.17)	58 (56.86)	0.282	0.595
高血压 [例 (%)]	20 (43.48)	48 (47.06)	0.164	0.686
糖尿病 [例 (%)]	14 (30.43)	30 (29.41)	0.085	0.771
收缩压 (mmHg, $\bar{x} \pm s$)	156.18 ± 23.12	154.01 ± 27.10	0.479	0.632
舒张压 (mmHg, $\bar{x} \pm s$)	89.21 ± 13.24	88.34 ± 12.11	0.379	0.705
责任梗死部位 [例 (%)]				
前循环	20 (43.48)	53 (51.96)	0.913	0.339
后循环	26 (56.52)	49 (48.04)		
责任大血管分布 [例 (%)]				
颈内动脉	6 (13.04)	17 (16.67)	0.483	0.784
大脑中动脉	18 (39.13)	45 (44.12)		
基底动脉	22 (47.83)	40 (39.21)		
入院时 NIHSS 评分 (分, $\bar{x} \pm s$)	13.05 ± 4.17	9.51 ± 4.18	4.776	<0.01
miR-181a-5p ($\bar{x} \pm s$)	2.15 ± 0.77	1.47 ± 0.58	5.834	<0.01
caspase-1 ($\mu\text{g/L}$, $\bar{x} \pm s$)	35.23 ± 11.02	30.42 ± 9.14	2.585	0.011
Bcl-2 (ng/L , $\bar{x} \pm s$)	82.00 ± 20.14	93.24 ± 17.23	3.281	0.001

表 3 ACI 患者预后不良的 Logistic 多因素分析

因素	回归系数	Wald 值	OR 值 (95% CI)	P 值
年龄	1.001	4.311	1.532 (1.612 ~ 3.371)	0.034
入院时 NIHSS 评分	1.321	5.232	1.832 (1.869 ~ 3.520)	0.009
miR-181a-5p	1.786	9.087	3.111 (1.867 ~ 9.183)	<0.001
caspase-1	0.501	0.883	1.021 (0.812 ~ 1.472)	0.687
Bcl-2	-0.515	0.912	0.917 (0.823 ~ 1.500)	0.509

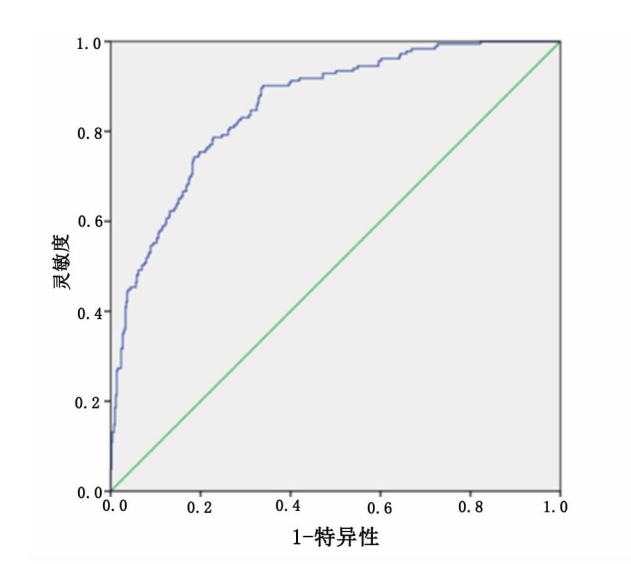


图1 血浆 miR-181a-5p 水平预测 ACI 患者不良预后的 ROC 曲线

讨论

miR-181a-5p 参与肿瘤细胞的增殖、侵袭、凋亡和耐药等生物学行为^[8~10]。文献报告 miR-181a-5p 可通过调节神经细胞凋亡而参与大脑缺血损伤^[11]。miR-181a-5p 调控细胞凋亡的机制尚不清楚,可能与其调控人克虏伯样因子 6(human kruppel like factor 6,KLF6)^[12]等有关。本研究发现,ACI 患者血浆中 miR-181a-5p 表达水平明显升高。Wu 等^[13]也发现,缺血性脑卒中和短暂性缺血发作患者血清 miR-181a-5p 表达水平也高于健康人。本研究中,血浆 miR-181a-5p 与 caspase-1 呈正相关,与 Bcl-2 呈负相关,提示 miR-181a-5p 可能通过调节细胞凋亡而参与 ACI 的发生,但是具体的调控机制尚需要深入研究。

ACI 患者在第 90 天时病情较为稳定,此时可以评估患者的预后情况^[14]。本研究中与预后良好组比较,预后不良组年龄更大,入院时 NIHSS 评分、miR-181a-5p 及 caspase-1 水平较高。Logistic 多因素分析显示年龄、入院时 NIHSS 评分是 ACI 患者预后的独立影响因素,这与既往报道一致^[14]。多因素分析还发现血浆 miR-181a-5p 是 ACI 预后的独立影响因素,且对 ACI 预后的早期评估有较高价值。

参考文献

- 1 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.
- 2 王洪娟,李召晨,刘延丽. 房颤脑卒中风险评分可评估急性脑梗死患者 rt-PA 静脉溶栓治疗的预后[J]. 内科急危重症杂志,2022,28(3):196-199.
- 3 Qi M,He L,Ma X,et al. MiR-181a-5p is involved in the cardiomyocytes apoptosis induced by hypoxia-reoxygenation through regulating SIRT1[J]. Biosci Biotechnol Biochem,2020,84(7):1353-1361.
- 4 Arvola O,Kaidonis G,Xu L,et al. Hippocampal sub-regional differences in the microRNA response to forebrain ischemia[J]. Mol Cell Neurosci,2019,98:164-178.
- 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 2018[J]. 中华神经科杂志,2018,51(9):666-682.
- 6 张磊,刘建明. 美国国立卫生研究院卒中量表[J]. 中华神经外科杂志,2014,30(1):79.
- 7 泮露萍,金皎蕾,黄睿,等. 经颅多普勒在急性脑梗死患者动脉内机械取栓后神经功能预后评估中的应用[J]. 中华危重病急救医学,2020,32(7):835-839.
- 8 Wen X,Li S,Guo M,et al. miR-181a-5p inhibits the proliferation and invasion of drug-resistant glioblastoma cells by targeting F-box protein 11 expression[J]. Oncol Lett,2020,20(5):235.
- 9 Liu Y,Cheng T,Du Y,et al. LncRNA LUCAT1/miR-181a-5p axis promotes proliferation and invasion of breast cancer via targeting KLF6 and KLF15[J]. BMC Mol Cell Biol,2020,21(1):69.
- 10 Li L,Ye D,Liu L,et al. Long noncoding RNA SNHG7 accelerates proliferation migration and invasion of Non-small cell lung cancer cells by suppressing miR-181a-5p through AKT/mTOR signaling pathway[J]. Cancer Manag Res,2020,12:8303-8312.
- 11 Song X,Xue Y,Cai H. Down-Regulation of miR-181a-5p prevents cerebral ischemic injury by upregulating En2 and activating Wnt/ β -catenin Pathway[J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2021, 30(3):105485.
- 12 Liang X,Xu W. miR-181a-5p regulates the proliferation and apoptosis of glomerular mesangial cells by targeting KLF6[J]. Exp Ther Med,2020,20(2):1121-1128.
- 13 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.
- 14 白超博,佘剑非. Apelin-13 与急性脑梗死患者发病及 90 天预后相关性分析[J]. 脑与神经疾病杂志,2018,(9):551-555.

(2021-09-30 收稿 2023-02-13 修回)