

血清微小RNA 32-3p作为急性缺血性脑卒中潜在非侵入性生物标志物的研究

韩冰^{1#} 姚远^{1,2#} 郭小亮¹ 李攀¹ 袁军¹ 朱润秀^{1*}

(¹内蒙古自治区人民医院神经内科, 呼和浩特 010017; ²内蒙古大学生命科学学院, 呼和浩特 010021)

摘要 该文检测了在急性缺血性脑卒中(acute ischemic stroke, AIS)患者血清中微RNA 32-3p(miR-32-3p)水平, 探讨了其与AIS发病的相关性。采用实时荧光定量聚合酶链反应法(RT-qPCR)测定89例AIS患者及89例健康对照者血清miR-32-3p水平。运用生物学数据库预测miR-32-3p的靶基因, 采用DAVID数据库对靶基因集合进行功能注释分析。结果显示, 与对照组相比较, AIS组血清miR-32-3p水平升高约3.28倍, 差异极显著性($P < 0.001$)。miR-32-3p可能参与缺血性卒中的脑缺血性损伤、再灌注损伤和脑缺血后细胞凋亡。结果表明, 血清miR-32-3p水平升高与AIS有密切相关性, 其可能为AIS的潜在生物标志物之一。

关键词 急性缺血性脑卒中; 微RNA 32-3p; 生物标志物

The Study of Serum MicroRNA 32-3p as Potential Noninvasive Biomarker in the Diagnosis of Acute Ischemic Stroke

Han Bing^{1#}, Yao Yuan^{1,2#}, Guo Xiaoliang¹, Li Pan¹, Yuan Jun¹, Zhu Runxiu^{1*}

(¹Department of Neurology of Inner Mongolia People's Hospital, Hohhot 010017, China;

²School of Life Sciences, Inner Mongolia University, Hohhot 010021, China)

Abstract This work was aim to explore the association and role of serum miR-32-3p in patients with acute ischemic stroke (AIS). Blood samples were obtained from AIS patients ($n=89$) and controls (healthy, $n=89$). miR-32-3p was measured by RT-qPCR. Bioinformatics database assay was used to predict comprehensively target genes, and the gene ontology and enriched pathway of target genes were analyzed by DAVID database. The results showed that the serum miR-32-3p level was significantly increased about 3.28 times in stroke patients compared with the controls ($P < 0.001$). The miR-32-3p was associated with the cerebral ischemia, reperfusion injury and apoptosis after cerebral ischemia. The results suggested that the miR-32-3p level was significantly increased in serum of patients, and serum miR-32-3p might be a novel potential biomarker for clinical diagnosis of AIS.

Keywords acute ischemic stroke; miR-32-3p; biomarker

我国已经进入老龄化社会, 脑卒中发生率以每年8.7%左右的速度在上升, 已成为一个突出的公共

卫生问题。缺血性脑卒中(ischemic stroke, IS)作为脑卒中最为常见的类型, 是一种受遗传及环境共同

收稿日期: 2017-06-16 接受日期: 2017-08-23

内蒙古自治区自然科学基金项目(批准号: 2017BS0315、2017MS08156、2014MS0803)资助的课题

#共同第一作者

*通讯作者。Tel: 0471-3286206, E-mail: zhurunxiu@163.com

Received: June 16, 2017 Accepted: August 23, 2017

This work was supported by the Natural Science Foundation of Inner Mongolia (Grant No.2017BS0315, 2017MS08156, 2014MS0803)

#These authors contributed equally to this work

*Corresponding author. Tel: +86-471-3286206, E-mail: zhurunxiu@163.com

网络出版时间: 2017-10-25 17:21:11

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20171025.1721.006.html>

影响的多基因、多因素的慢性疾病。目前,脑卒中的诊断还是依赖于CT、核磁影像学。然而,临床上血液检查相对简便,能够克服上述不足。随着近年来研究的不断深入,众多数据支撑血清中的循环microRNAs(miRNAs)不仅稳定性高而且与缺血性脑卒中的关联密切,使其成为缺血性脑卒中理想的诊断标志物或治疗靶标。

miRNAs是近年来发现的一类内源性单链小分子非编码RNA,大小为18~25个核苷酸,通过与靶mRNA的3'非翻译区结合,在转录后水平降解mRNA或者抑制mRNA的翻译,从而影响靶基因的表达^[1-2]。miRNAs参与调节人体发育的生理或疾病的病理过程,如妊娠、心血管病、神经系统性疾病等^[3-5]。随着miRNA研究的深入,miRNA家族成员逐渐补充,全球成立了miRNA文库,对新的miRNA进行登记和命名,到目前为止,已有3 518个物种的miRNA登记注册,同时有越来越多的研究报道miRNA与缺血性脑卒中之间的关系。目前已经发现多种miRNAs参与了缺血性脑卒中的病理过程。例如,大鼠脑缺血再灌注24 h,血浆miR-19b、miR-290、miR-292-5p水平升高,这些上调的miRNAs可能成为脑卒中的实验室诊断标志物。最近有研究报道,Dicer酶的缺乏可导致神经元逐渐变性,而果蝇Dicer酶的靶基因miR-8则可以调节miRNA成熟的关键环节,从而阻止神经元变性^[6]。miR-146A/G等位基因被报道与缺血性脑卒中相关^[7]。

我们之前在大鼠缺血性脑卒中模型中进行了miRNAs转录组分析,通过比较缺血性脑卒中和健康大鼠外周静脉血miRNAs含量的变化,发现了新的、可能的miRNAs分子标志物miR-32-3p,通过实时荧光定量聚合酶链式反应法(RT-qPCR)对转录组结果进行验证,发现相较于假手术组,miR-32-3p水平在成年雄性SD大鼠单纯脑卒中组中升高(6.23±0.71),差异具有显著性($P<0.01$)(未发表数据)。miR-32-3p在缺血性脑卒中患者中水平和调节机制并未见报道。本研究利用实时荧光定量PCR的方法检测miR-32-3p缺血性脑卒中患者与健康人外周静脉血中的水平差异,旨在筛选诊断缺血性脑卒中的血清生物标志物。

1 对象与方法

1.1 一般资料

本研究连续收集2016年6月至2016年12月内蒙古

自治区人民医院神经内科和急诊科就诊的发病14 d内年龄大于60岁的急性缺血性脑卒中患者共89例(AIS组)。所有入选患者根据病史、神经功能缺损、临床辅助检查、核磁共振和磁共振血管成像结果,均符合全国第四届脑血管病学术会议制定的脑梗死诊断标准^[8]。对照组来自同期本院体检中心健康普查的健康随机个体共89例(对照组):入选和排除标准参考前期研究^[9]。所有研究对象或家属均知情同意并签署知情同意书。本研究已得到了内蒙古自治区人民医院伦理委员会批准。

1.2 miRNAs提取和逆转录

所有受测者均采用普通生化管抽取静脉血2 mL,常温下2 000 r/min离心5 min,收集上层血清500 μ L, -80 $^{\circ}$ C保存备用。采用Qiagen miRNeasy[®] Serum/Plasma(Qiagen公司)试剂盒操作步骤进行miRNAs的提取,血清量使用200 μ L,使用miRNeasy[®] Serum/Plasma Spike-In Control(Qiagen公司)进行miRNAs的质量控制。cDNA的合成按照TaqMan[®] MicroRNA Reverse Transcription Kit California 94404(Applied Biosystems公司)逆转录试剂盒操作步骤进行(Clontech公司)。逆转录使用茎环法,miR-39内参基因茎环引物为:5'-GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACA AAG C-3', miR-32-3p茎环引物为:5'-GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TCGC ACT GGA TAC GAC AAA TAT-3'。

1.3 miRNAs定量

根据Mir-X[™] miRNA qRT-PCR SYBR[®] Kit(Clontech公司)试剂盒操作步骤进行。cDNA模板稀释20倍后使用,以miR-39为内参基因^[10],定量上游引物:5'-CAC TCC GTC ACC GGG TGT AAA TC-3';定量下游引物:5'-TCC AGT GCA GGG TCC GAG GT-3'。miR-32-3p定量上游引物:5'-GAA TTT AGT GTG TGT GAT ATT TGT CG-3';定量下游引物:5'-CAG TGC AGG GTC CGA GGT AT-3'。反应条件按照试剂盒说明书进行。采用2^{- $\Delta\Delta C_T$} 法计算相对水平,每个样本进行3次重复试验。

1.4 生物信息学分析

使用生物信息学软件数据库预测miR-32-3p可能的靶基因,取其三者数据库(miRanda、picTar、targetScanS)共有交集作为靶基因的集合,并通过DAVID基因注释软件数据库对靶基因集合的功能进

行富集分析。

1.5 统计学分析

所有数据采用SPSS 13.0进行统计分析。计量资料数据采用计量资料描述以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组之间比较采用 t 检验或者卡方检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床资料

AIS组与对照组在性别结构、年龄、血脂和总胆固醇方面差异无统计学意义。AIS组在高血压史、吸烟、饮酒史、既往脑卒中或者短暂性脑缺血发作史、糖尿病史、血甘油三酯、低/高密度脂蛋白、同型半胱氨酸和尿酸方面明显高于对照组($P < 0.05$) (表1)。

2.2 血清miR-32-3p水平

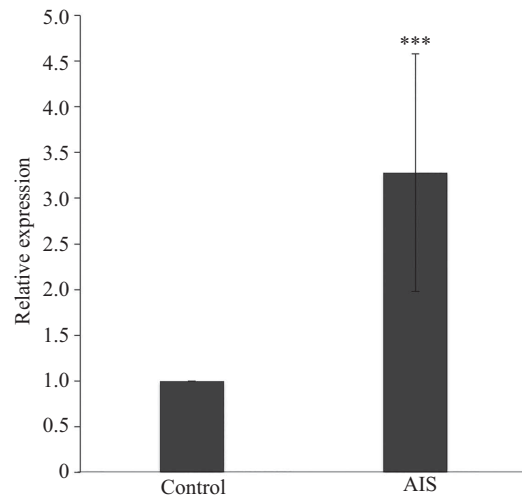
运用RT-qPCR检测AIS组和对照组血清miR-32-3p水平, 与对照组比较, AIS组血清miR-32-3p水平明显升高(3.28 ± 1.31), 差异有显著性($P < 0.001$) (图1)。

2.3 生物信息学对miR-32-3p功能的预测及分析

使用生物信息学软件数据库预测miR-32-3p可能的靶基因, 取其三个数据库共有交集靶基因集合, 共包含342个基因。基因本体论富集分析结果显示, miR-32-3p预测靶基因集合的分子功能主要富集在离子结合、信号转导和DNA复制等(表2), 靶基因集

合的生物学过程主要富集在G蛋白信号通路、p38丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路和T细胞凋亡等(表3)。

有研究发现, G蛋白偶联受体介导雌激素对脑缺血损伤的保护, 该作用可能与抑制B细胞淋巴瘤基因-2相关X蛋白(B cell lymphoma-2 associated X protein, Bax)及细胞色素(cytochrome, Cyt)介导的细胞凋亡有关^[11]。p38介导了脑缺血后神经元凋亡, 缺



*** $P < 0.001$, 与对照组比较。

*** $P < 0.001$ vs control group.

图1 AIS组与对照组血清miR-32-3p水平比较

Fig.1 The comparison of serum levels of miR-32-3p between the AIS group and the control group

表1 AIS组与对照组一般临床资料比较

Table 1 Clinical characteristics of AIS group compared with control group

	AIS组 AIS group	对照组 Control group	P值 P value
Number	89	89	
Age, mean (SD)	65±5.9	64±2.7	0.063
Female sex	43(48%)	42(47%)	0.881
Smoking	33(37%)	11(12%)	<0.001
Hypertension	51(57%)	33(37%)	0.007
History of alcohol intake	22(25%)	8(9%)	0.008
Diabetes mellitus	18(20%)	8(9%)	0.034
Hyperlipemia	21(24%)	10(16%)	0.301
PHS/TIA	8(8%)	0(0%)	0.004
TC (mmol/L)	4.23±1.67	4.01±0.87	0.132
TG (mmol/L)	2.17±0.60	1.56±0.30	0
Hcy (μmol/L)	24.03±2.17	13.26±2.07	<0.001
LDL-C (mmol/L)	4.43±0.65	2.89±0.12	<0.001
HDL-C (mmol/L)	0.88±0.45	1.06±0.12	<0.001
UA (μmol/L)	413.2±14.7	355.3±21.6	<0.001

PHS/TIA: 既往脑卒中或者短暂性脑缺血发作史; TC: 总胆固醇; TG: 甘油三酯; Hcy: 同型半胱氨酸; LDL-C: 低密度脂蛋白-胆固醇; HDL-C: 高密度脂蛋白-胆固醇; UA: 尿酸。

PHS/TIA: previous history of stroke or transient ischemic attacks; TC: total cholesterol; TG: triglyceride; Hcy: homocysteine; LDL-C: low-density lipoprotein cholesterol; HDL-C: high-density lipoprotein cholesterol; UA: uric acid.

血性脑卒中的星形胶质细胞模型中,缺血区的神经元和星形胶质细胞中p38的活性增强,提示p38可能参与了脑缺血损伤过程的信号转导^[12]。大鼠局灶性脑缺血再灌注24 h,缺血区脑组织p38的活性增强并伴随神经元的凋亡,表明p38在脑缺血后神经元凋亡的过程中起重要作用^[13]。

表2 miR-32-3p预测靶基因的基因本体论分析分子功能结果
Table 2 The molecular function of predicted target genes of miR-32-3p by GO term

分子功能 Molecular function	基因数量 The number of genes
Membrane	84
Zinc ion binding	60
Transcription factor activity	59
Integral to membrane	56
Transcription	55
Nucleotide binding	53
Metal ion binding	51
Signal transduction	39
DNA replication	44
Transferase activity	42
ATP binding	41
Protein binding	125
Calcium binding	22
RNA binding	13

另有研究证明,缺血性脑卒中后有的T细胞亚群对脑组织有损伤性作用,有的T细胞亚群有保护作用,如辅助性T细胞或杀伤T细胞可增大脑缺血后脑梗死的体积和加重神经系统损害,而调节性T细胞可能会减小脑梗死体积和减弱感觉功能障碍。T细胞相关的细胞因子如肿瘤坏死因子、白细胞介素-2、白细胞介素-6和白细胞介素-8会加重脑组织损伤,而抗炎因子如白细胞介素-4、白细胞介素-10可能产生脑保护作用^[14]。

以上数据库分析提示,miR-32-3p可能参与缺血性卒中的脑缺血性损伤、再灌注损伤和脑缺血后细胞凋亡。

3 讨论

本研究发现,与对照组比较,AIS组患者血清miR-32-3p水平明显上升,并进一步通过生物信息学数据库分析了其可能的靶基因功能,探讨其在缺血性脑卒中的意义。

到目前为止,关于miR-32-3p是否参与及如何参与AIS发病后损伤和损伤后修复的相关研究尚未见报道。起初,miR-32被发现在多种肿瘤的发病过程中为致癌基因^[15-16]。miR-32水平升高能够使受损的细胞继续存活,从而导致肿瘤的发生及进展。本研

表3 miR-32-3p预测靶基因的基因本体论分析生物学过程结果
Table 3 The biological process of predicted target genes of miR-32-3p by GO term

生物学过程 Biological process	基因数量 The number of genes
Repression of pain sensation by the transcriptional regulator DREAM	4
G protein signaling	11
Agrin in postsynaptic differentiation	5
MAPK signaling pathway	7
G13 signaling pathway	5
Angiotensin II mediated activation of JNK pathway via Pyk2 dependent signaling	4
p38MAPK signaling pathway	4
Signaling of hepatocyte growth factor receptor	4
mTOR signaling pathway	3
Melanocyte development and pigmentation pathway	2
Neuropeptides VIP and PACAP inhibit the apoptosis of activated T cells	3
Calcium channels	3
Wnt signaling	4
Calmodulin-dependent protein kinase activation	2
Integrin signaling pathway	3
Fc Epsilon receptor I signaling in mast cells	3

究发现, AIS患者血清miR-32-3p水平明显升高, 而生物信息学分析显示, miR-32-3p的靶基因有可能参与G蛋白信号通路、p38MAPK信号通路和T细胞凋亡等。这提示, miR-32-3p可能在脑卒中发病中起着重要的调节作用, 而这种调节作用可能通过其靶基因本身的功能和参与的信号通路。其中, MAPK信号通路广泛存在于各种动物细胞中, 是细胞内信号传导的交汇点, 可将细胞外信息传递至细胞核, 直接调节转录因子活性, 调控基因表达。p38是MAPK信号通路的重要成员, 在全身性炎症反应、休克、细胞迁移、细胞凋亡、心血管疾病等方面发挥着重要作用^[7]。最近研究发现, p38信号通路与脑缺血性损伤有密切关系^[12]。G蛋白信号通路通过调节细胞内信号通路参与血管再生、炎症等病理过程^[11,19]。

总之, 血清miR-32-3p与AIS有密切相关性, 其水平升高可作为诊断AIS的潜在血清生物标志物之一, 为AIS血清学诊断和治疗提供了新的思路。我们正在用栓栓法制备成的可控性急性大鼠脑卒中模型观察miR-32-3p靶标mRNA、相关信号通路关键因子的表达情况, 进而检测鼠神经缺陷、脑梗死面积、脑水肿情况以及凋亡水平, 以期在动物模型中揭示miR-32-3p对急性脑卒中的影响及机制。

参考文献 (References)

- Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature* 2004; 431(7006): 350-5.
- Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009; 136(2): 215-33.
- Gilad S, Meiri E, Yegorov Y, Benjamin S, Lebanony D, Yerushalmi N, *et al.* Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS One* 2008; 3(9): e3148.
- Wang Z, Luo X, Lu Y, Yang B. miRNAs at the heart of the matter. *J Mol Med* 2008; 86(7): 771-83.
- Kapsimali M, Kloosterman WP, de Bruijn E, Rosa F. MicroRNAs show a wide diversity of expression profiles in the developing and mature central nervous system. *Genome Biol* 2007; 8(8): R173.
- Kadkhodazadeh M, Jafari AR, Amid R, Ebadian AR, Alipour MM, Mollaverdi F, *et al.* MiR146a and MiR499 gene polymorphisms in Iranian periodontitis and peri-implantitis patients. *J Long Term Eff Med Implants* 2013; 23(1): 9-16.
- Jeon YJ, Kim SY, Rah H, Choi DH, Cha SH, Yoon TK, *et al.* Association of the miR-146aC>Q, miR-149T>C, miR-196a2I>C, and miR-499A>G polymorphisms with risk of spontaneously aborted fetuses. *Am J Reprod Immunol* 2012; 68(5): 408-17.
- 王新德. 各类脑血管疾病诊断要点. *中华神经科杂志*(Wang Xinde. Diagnostic points of various cerebrovascular diseases. *Chinese Journal of Neurology*) 1996; 6: 379-80.
- 朱润秀, 袁军, 李攀, 张艳梅, 赵琰, 冯银玲, 等. 急性脑梗死患者神经功能缺损程度与ox-LDL、hs-CRP、Hcy、IMT的相关性研究. *北京医学*(Zhu Runxiu, Yuan Jun, Li Pan, Zhang Yanmei, Zhao Yan, Feng Yinling. *et al.* Research on plasma levels of ox-LDL, hs-CRP, Hcy and carotid intima medial thickness in patients with acute cerebral infarction. *Beijing Medical Journal*) 2015; 37(5): 441-4.
- Popov A, Szabo A, Mandys V. Small nucleolar RNA U91 is a new internal control for accurate microRNAs quantification in pancreatic cancer. *BMC Cancer* 2015; 15(1): 774.
- 范雅倩, 梁楚玲, 熊逸潇, 裴兰露曦, 张子越, 柳威, 等. G蛋白偶联雌激素受体介导的雌激素减轻缺血性脑卒中大鼠神经损伤的作用及机制探讨. *中华老年心脑血管病杂志*(Fan Yaqian, Liang Chuling, Xiong Yixiao, Pei Lanluxi, Zhang Ziyue, Liu Wei, *et al.* Role of GPER-mediated estrogens in alleviating nerve injury in ischemic stroke rats and its mechanism. *Chinese Journal of Geriatric Heart Brain and Vessel Diseases*) 2016; 18(10): 1086-9.
- Choudhury GR, Ryou MG, Poteet E, Yi W, He R, Sun F, *et al.* Involvement of p38 MAPK in reactive astrogliosis induced by ischemic stroke. *Brain Res* 2014; 1551(11): 45-58.
- 李浩, 张多斌, 吴岚, 冯华坤. 丹参酮IIA对脑缺血再灌注损伤大鼠磷酸化p38MAPK和MMP-9表达及细胞凋亡的影响. *中风与神经疾病*(Li Hao, Zang Duobin, Wu Lan, Feng Hhuakun. Effects of tanshinone IIA on expressions of phosphorylated p38MAPK and MMP-9 and neural cell apoptosis following cerebral ischemic reperfusion injury in rats. *Journal of Apoplexy and Nervous Diseases*) 2013; 30(3): 229-33.
- 徐姗姗, 简志宏, 熊晓星. T淋巴细胞在缺血性脑卒中的作用. *国际神经病学神经外科学杂志*(Xu Shanshan, Jian Zhihong, Xiong Xiaoxing. The role of T lymphocyte in ischemic stroke. *Journal of International Neurology and Neurosurgery*) 2015; 42(5): 467-70.
- Pichiorri F, Suh SS, Ladetto M, Kuehl M, Palumbo T, Drandi D, *et al.* MicroRNAs regulate critical genes associated with multiple myeloma pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(35): 12885-90.
- Ambs S, Prueitt RL, Yi M, Hudson RS, Howe TM, Petrocca F, *et al.* Genomic profiling of microRNA and mRNA reveals deregulated microRNA expression in prostate cancer. *Cancer Res* 2008; 68(15): 6162-70.
- Petillo D, Kort EJ, Anema J, Furge KA, Yang XJ, Teh BT, *et al.* MicroRNA profiling of human kidney cancer subtypes. *Int J Oncol* 2009; 35(1): 109.
- 刘会, 荣季冬, 袁国军, 张曙影. 阿托伐他汀对慢性心力衰竭小鼠心肌组织赖氨酰氧化酶表达的影响. *中华老年心脑血管病杂志*(Liu Hui, Rong Jidong, Yuan Guojun, Zhang Shuying. Effect of atorvastatin on expression of lysyl oxidase in myocardial tissue of mice with chronic heart failure and its mechanism. *Chinese Journal of Geriatric Heart Brain and Vessel Diseases*) 2013; 15(6): 628-31.
- 金宗禄, 何晓英. 蛋白酶活化受体1促进脑卒中后血管新生作用的研究进展. *山东医药*(Jin Zonglu, He Xiaoying. The research progress of the effect of protease activated receptor 1 on angiogenesis after stroke. *Shandong Medical Journal*) 2016; 56(44): 108-10.