

急性脑梗死患者外周血 microRNA 表达及其与炎症细胞因子的相关性

曹琳, 姚平波, 张平, 聂亚雄, 蒋福生, 罗焱

(南华大学附属南华医院神经内科, 湖南省衡阳市 421002)

[关键词] 急性脑梗死; 炎症细胞因子; microRNA

[摘要] **目的** 探讨急性脑梗死患者外周血 microRNA(miRNA) 的表达及其与炎症细胞因子的相关性和临床意义。**方法** 选取南华大学附属南华医院神经内科和重症监护室急性脑梗死(ACI)患者 60 例(根据临床神经功能缺损程度评分分为轻度 ACI 28 例、中度 ACI 18 例、重度 ACI 14 例)及 20 例正常对照组。分别采集各组的外周静脉血予以实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测 miR-210、miR-145、miR-21、miR-223、miR-497、miR-15a mRNA 的表达;酶联免疫吸附法(ELISA)检测白细胞介素 10(IL-10)及肿瘤坏死因子 α (TNF- α)的水平。**结果** ACI 组患者外周血 miRNA 的表达以及 TNF- α 、TNF- α /IL-10、IL-10 水平均高于正常对照组($P < 0.01$); miRNA 水平随 ACI 病情加重呈逐渐升高趋势,重度 ACI 患者血浆 miR-21 和 miR-223 表达水平均高于轻度 ACI 组和中度 ACI 组(P 均 < 0.01);并且随着 ACI 病情加重, TNF- α 、TNF- α /IL-10、IL-10 水平呈增加趋势,差异均有统计学意义(P 均 < 0.01),而且 ACI 患者死亡组 TNF- α 、TNF- α /IL-10、IL-10 水平均显著高于生存组(P 均 < 0.05);血浆 TNF- α 与 miR-223 水平呈正相关,与 miR-21 水平无相关性;血浆 IL-10 和 TNF- α /IL-10 分别与 miR-21、miR-223 水平呈正相关。**结论** ACI 患者 miR-21、miR-223 表达上调,与 IL-10、TNF- α /IL-10 水平正相关,有望作为 ACI 早期诊断和判断病情严重程度的标志物。

[中图分类号] R741

[文献标识码] A

Relationship Between Expression of microRNA and Inflammatory Cytokines Plasma Level in Patients with Acute Cerebral Infarction

CAO Lin, YAO Ping-Bo, ZHANG Ping, NIE Ya-Xiong, JIANG Fu-Sheng, and LUO Yan

(Department of Neurology, the Affiliated Nanhua Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421002, China)

[KEY WORDS] Acute Cerebral Infarction; Inflammatory Cytokines; microRNA

[ABSTRACT] **Aim** To investigate relationship between the expression of microRNA (miRNA) and inflammatory cytokines in plasma in patients with acute cerebral infarction (ACI) and its clinical significance. **Methods** Sixty patients with ACI were divided into three groups according to clinical neurological deficit score. The patients were further divided into non-survival group and survival group based on their outcomes. 20 Healthy volunteers were enrolled into the control group. The expression levels of plasma miR-210, miR-145, miR-21, miR-223, miR-497, miR-15a were detected by real-time quantitative PCR(qRT-PCR). Tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-10 (IL-10) levels in plasma were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** Expression of miRNA and level of TNF- α , TNF- α /IL-10, IL-10 were significantly increased in patients with ACI compared with normal control group; Expression of miRNA and level of TNF- α , TNF- α /IL-10, IL-10 were gradually increased. Among the patients, the level of TNF- α , TNF- α /IL-10, IL-10 in the survival group were obviously lower than those in the non-survival group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). There was a positive correlation between miR-21, miR-223 and IL-10 and IL-10/TNF- α ($P < 0.01$). **Conclusion** The expression levels of miR-21 and miR-223 in plasma in patients with ACI was significantly upregulated, and

[收稿日期] 2014-12-03

[修回日期] 2015-02-03

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81471310);湖南省自然科学基金资助项目(08JJ3036);衡阳市科技局资助项目(2012KJ63)

[作者简介] 曹琳, 硕士, 主治医师, 主要从事脑血管疾病及其免疫机制研究。通讯作者张平, E-mail 为 zhangping752300@163.com。

had a positive correlation with IL-10 and IL-10/TNF- α , which may be used as early diagnostic markers and can reflect the severity of condition to a certain degree.

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是一种多病因导致的慢性炎症性疾病,也是急性脑梗死(acute cerebral infarction, ACI)发生发展的核心基础及病理基础。目前脑梗死的诊断和治疗取得了很大进展,但致残率及死亡率仍然很高,所以对脑梗死及其并发症的早期诊断和治疗尤为重要。microRNA(miRNA)是新近发现的一类非编码RNA,在转录后水平调节基因表达。既往研究表明,不同疾病人群的血浆miRNA表达不同,其水平可作为疾病的生物学标志物^[1]。现选择与炎症有关的6个miRNA作为研究对象,探讨血浆miRNA在脑梗死中的表达及其与炎性细胞因子的相关性。

1 对象与方法

1.1 临床资料

选择2013年1月~2014年1月南华大学附属南华医院神经内科病房及重症监护室ACI患者60例为ACI组,其中男34例,女26例,年龄54~76岁,平均 64.3 ± 9.7 岁;均为首次发病,且于起病后24 h内入院;符合1995年第四届全国脑血管病学术会议修订的诊断标准,并经头部CT或MRI检查证实。排除:严重肝肾疾病;恶性肿瘤;短暂性脑缺血发作、颅内出血、既往卒中史且遗留后遗症者。以同期20例年龄、性别无统计学差异的本院健康体检人群作为正常对照组,其中男11例,女9例,年龄57~74岁,平均 65.6 ± 8.4 岁。根据预后情况将ACI患者分为死亡组与生存组:其中死亡组16例,男9例,女7例,年龄55~74岁,平均 67.4 ± 6.6 岁;而生存组44例,男25例,女19例,年龄56~75岁,平均 68.6 ± 6.4 岁。根据临床神经功能缺损程度将ACI患者分为轻、中、重度ACI三组:其中轻度ACI组28例,男16例,女12例,年龄54~73岁,平均 66.8 ± 6.2 岁;中度ACI组18例,男10例,女8例,年龄56~74岁,平均 67.7 ± 6.3 岁;重度ACI组14例,男8例,女6例,年龄55~74岁,平均 67.4 ± 6.6 岁。以上各组间性别、年龄均具有可比性。

1.2 实时荧光定量PCR检测miRNA

试剂均购自美国MRC Gene公司。(1)血浆总RNA提取与定量:按miRneasy Mini Kit说明书步骤分离总RNA并进行纯化。紫外分光光度计测定260 nm的吸光度值计算RNA浓度。(2)反转录:按

miScript II反转录试剂盒说明,经反转录合成cDNA。总反应体系20 μ L,反应条件为37 $^{\circ}$ C 60 min, 95 $^{\circ}$ C 5 min。并使用无酶水稀释后-70 $^{\circ}$ C冰箱保存备用。(3)qRT-PCR:引物由MRC Gene公司设计合成,按照miScript SYBR Green Kit说明配制反应混合物,每个反应体系为20 μ L,使用罗氏LightCycler480/荧光定量PCR仪检测。PCR反应条件为95 $^{\circ}$ C预变性30 s;95 $^{\circ}$ C 5 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,重复40个循环进行扩增反应;95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 1 min,95 $^{\circ}$ C 15 s制备溶解曲线。每个样品设3个复孔。采用标准曲线法计算mRNA表达量,并计算其相对表达量(U6和 β -actin校正值)。具体操作参照说明书。

1.3 白细胞介素10及肿瘤坏死因子 α 的检测

应用ELISA检测血浆中白细胞介素10(interleukin-10, IL-10)及肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)的含量,操作步骤严格按试剂盒说明书进行。

1.4 统计学方法

使用SPSS13.0软件包处理数据。数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料两组比较采用 t 检验,多组数据比较采用 F 检验,采用Pearson作相关性分析;计数资料采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同病情程度ACI患者血浆miRNA表达水平

不同病情程度ACI患者血浆miR-210、miR-145、miR-21、miR-223、miR-497、miR-15a表达水平与正常对照组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。miRNA水平随病情加重呈逐渐升高趋势,重度ACI患者血浆miR-21和miR-223表达水平均高于轻、中度ACI组和正常对照组(均 $P < 0.01$),其余各指标轻、中、重度ACI组间差异均无统计学意义($P > 0.05$;表1)。

2.2 血浆TNF- α 和IL-10水平

ACI组IL-10、TNF- α 、TNF- α /IL-10水平均显著高于正常对照组,差异有显著性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);且TNF- α 、TNF- α /IL-10及IL-10水平在轻、中、重度ACI组中,随着病情加重而明显增加,差异有显著性(P 均 < 0.05);死亡组TNF- α 、TNF- α /IL-10及IL-10水平均显著高于生存组(P 均 < 0.05 ;表2和表3)。

表 1. 不同病情程度 ACI 患者外周血 miRNA 水平的比较($\bar{x} \pm s$)Table 1. Comparison of miRNA expression based on different clinical classification($\bar{x} \pm s$)

分 组	n	miR-210(10^{-4})	miR-145(10^{-4})	miR-497(10^{-4})	miR-21(10^{-4})	miR-15a(10^{-4})	miR-223(10^{-4})
正常对照组	20	4.52 ± 2.70	7.07 ± 1.91	2.38 ± 0.69	2.36 ± 0.66	5.92 ± 2.19	4.02 ± 1.94
轻度 ACI 组	28	6.32 ± 3.26 ^a	8.27 ± 2.11 ^a	2.82 ± 0.70 ^a	2.88 ± 0.92 ^a	7.51 ± 2.94 ^a	5.44 ± 2.56 ^a
中度 ACI 组	18	6.46 ± 3.34 ^a	8.32 ± 1.99 ^a	3.02 ± 0.78 ^a	3.92 ± 1.05 ^{ab}	7.82 ± 3.05 ^a	6.99 ± 2.98 ^a
重度 ACI 组	14	6.87 ± 3.91 ^a	9.02 ± 2.14 ^a	3.32 ± 0.85 ^a	5.63 ± 1.61 ^{abc}	8.02 ± 3.22 ^a	9.85 ± 3.21 ^{abc}

a 为 $P < 0.05$, 与正常对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与轻度 ACI 组比较; c 为 $P < 0.01$, 与中度 ACI 组比较。

表 2. 各组外周血 TNF- α 、IL-10 和 TNF- α /IL-10 水平的比较($\bar{x} \pm s$)Table 2. Comparison of the level of TNF- α , IL-10 and TNF- α /IL-10 in different groups($\bar{x} \pm s$)

分 组	n	TNF- α (ng/L)	IL-10(ng/L)	TNF- α /IL-10
正常对照组	20	6.32 ± 1.74	11.60 ± 4.42	0.64 ± 0.34
ACI 组	60	72.90 ± 14.12 ^a	27.68 ± 6.68 ^a	2.50 ± 0.78 ^a
生存组	44	68.85 ± 13.83	27.17 ± 6.48	2.48 ± 0.73
死亡组	16	172.44 ± 36.52 ^b	68.25 ± 17.10 ^b	9.42 ± 1.85 ^b

a 为 $P < 0.05$, 与正常对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与生存组比较。

表 3. 不同病情程度 ACI 患者外周血 TNF- α 、IL-10 和 TNF- α /IL-10 水平的比较($\bar{x} \pm s$)Table 3. TNF- α , IL-10 and TNF- α /IL-10 levels in ACI patients with different pathogenetic condition degree($\bar{x} \pm s$)

分 组	n	TNF- α (ng/L)	IL-10(ng/L)	TNF- α /IL-10
轻度 ACI 组	28	68.98 ± 14.02	27.48 ± 7.03	2.61 ± 0.81
中度 ACI 组	18	98.68 ± 18.12 ^a	40.18 ± 0.08 ^a	4.19 ± 1.28 ^a
重度 ACI 组	14	169.75 ± 36.22 ^{ab}	62.27 ± 16.68 ^{ab}	8.86 ± 1.76 ^{ab}

a 为 $P < 0.01$, 与轻度 ACI 组比较; b 为 $P < 0.01$, 与中度 ACI 组比较。

2.3 血浆 miRNA 与 TNF- α 、IL-10 的相关性分析

血浆 TNF- α 与 miR-223 水平呈正相关 ($r = 0.334, P = 0.003$), 与 miR-21 水平无相关性 ($r = -0.080, P = 0.481$); 血浆 IL-10 与 miR-21、miR-223 水平均呈正相关 ($r = 0.540, P = 0.000$ 和 $r = 0.309, P = 0.008$); TNF- α /IL-10 与 miR-21、miR-223 水平均呈正相关 ($r = 0.566, P = 0.000$ 和 $r = 0.378, P = 0.001$)。

3 讨 论

As 易损斑块破裂及血栓形成是 ACI 的重要发病机制, 炎性细胞因子和炎症免疫细胞因子构成级联网络参与 ACI 后继发性脑损伤的病理生理过程。

最近研究发现, miRNA 是一类长 21~25 个核苷酸的内源性非编码单链 RNA 分子, 其广泛参与细胞生长、发育、分化及凋亡等各个环节的调控, 并与生理状态的改变以及疾病的发生、发展密切相关, 在不同疾病和不同组织表达不同, 且成熟的 miRNA 以不同的方式调控基因的表达即通过转录后水平影响炎性细胞因子和炎症因子信号通路来调节失衡的炎症反应^[2]。本研究发现, ACI 患者外周血 miR-210、miR-145、miR-21、miR-223、miR-497、miR-15a 表达显著高于正常对照组; 血浆 TNF- α 与 miR-223 水平呈正相关; 血浆 IL-10 和 TNF- α /IL-10 分别与 miR-21、miR-223 水平均呈正相关。提示成熟 miRNA 表达增加可促使机体炎症反应, 参与 ACI 的炎症反应。

目前研究已证实 miRNA 参与调节炎性细胞和介质的表达^[3]。而 ACI 的发生发展过程中与炎症反应及免疫功能紊乱密切相关^[4]。miRNA 作为转录后调节基因, 在细胞受到内外源的刺激信号后, 早期即参与激活磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B (PI3K/Akt) 信号通路、JAK 激酶/信号转导和转录激活因子 (JAK/STAT) 通路等脑梗死相关信号途径和免疫功能调控^[5,6]。最近有学者对 miRNA 在动脉粥样硬化脑梗死的发生发展一系列过程中的调控作用进行深入研究, 进行了与脑梗死有关的循环 miRNA 体内外实验并通过基因芯片研究发现 miRNA 的表达存在差异性^[7]。此外近年有较多文献报道关于 miRNA 参与机体免疫反应, 所以在本研究中选取以 miRNA 作为研究对象, 检测其在脑梗死患者血浆中的表达水平^[8]。结果发现, 脑梗死患者血浆中 miR-21、miR-210、miR-15a、miR-223、miR-497、miR-145 表达较正常对照组显著增高, 根据临床神经功能缺损程度将患者分为轻、中、重度 ACI 三组, miR-21、miR-210、miR-15a、miR-223、miR-497、miR-145 表达水平随着病情加重而有增加趋势, 重度 ACI 患者血浆 miR-21 和 miR-223 表达水平均高于

轻、中度 ACI 组和正常对照组 (均 $P < 0.01$), 中度 ACI 组 miR-223 表达水平高于正常对照组 ($P < 0.05$)。提示 miR-21 和 miR-223 水平可作为 ACI 的生物学标志物, 某种程度上也能评估病情严重程度。

JAK 激酶/信号转导和转录激活因子 (JAK/STAT) 信号途径在发挥抗炎和修复作用中起到关键性作用, 调控通路涉及到多种炎症因子^[9]。而许多 miRNA 均是 JAK/STAT 途径中重要的调控因子。核因子 κ B (nuclear factor κ B, NF- κ B) 是许多炎症因子的转录因子, 激活后使机体大量生成 TNF- α 、IL-6、IL-2 和 IL-1 β 等炎症细胞因子, 激发炎症反应, 同时产生 IL-10、IL-5 和 IL-4 等抗炎因子, 导致促炎反应和 (或) 抗炎反应动态失衡即免疫状态失衡。研究发现 miR-21、miR-223 与 NF- κ B 有关。当机体受到炎症刺激并诱导单核细胞 miR-21 激活, 与靶点 IL-1 受体关联激酶 1 (IL-1 receptor-associated kinase 1, IRAK1) 和 TNF 受体相关因子 6 (TNF receptor associated factor-6, TRAF-6) 配对并在转录后水平抑制它们的表达, 抑制 IL-1 β 、TNF- α 等炎症介质的产生, 而 miR-21 这种负反馈调控作用只有在严重的炎症反应时才会出现, 本组中 miR-21 水平在 ACI 组升高, 且重度 ACI 组高于轻度 ACI 组, 及死亡组高于生存组也证明了这一点^[10-12]。此外 NF- κ B 活性受 NF- κ B 激酶抑制剂 (inhibitor of NF- κ B kinases, IKK) 调控, 而 IKK α 是 miR-223 的重要靶点。本研究中血浆 miR-223 水平在不同病情程度 ACI 患者及死亡组升高, 其机制可能为机体受到炎症刺激时血浆 miR-223 表达量升高, 抑制 IKK α , 导致 NF- κ B 激活, 触发多种级联反应而加重炎症^[13]。

IL-10/TNF- α 往往可反映机体免疫失衡状态, 比值越高, 提示机体处于抗炎反应状态^[14]。本研究轻、中、重度 ACI 组血浆 TNF- α 、IL-10 和 TNF- α /IL-10 水平与正常对照组比较差异均有统计学意义。此外, TNF- α 、TNF- α /IL-10 及 IL-10 水平随着病情加重而明显增加, 考虑与本组高龄患者免疫调节功能低, 且病情较重, 再者部分血标本留取的时间点已经过了 TNF- α 分泌的高峰, 患者处于抗炎反应的主要阶段有关。进一步统计学分析结果显示血浆 miR-21 和 miR-223 水平与 IL-10、TNF- α /IL-10 水平呈正相关, 提示它们有助于对患者预后和免疫失衡状态的判断。

总之, ACI 患者血浆 miR-21 和 miR-223 表达量显著升高, 它们能反映机体炎症反应状态, 为揭示

缺血性脑卒中发生的“神经网络编码”提出了一个新的方向, 为有效预防、诊断和治疗 ACI 患者带来新的希望, 且在某种程度上可作为判断疾病严重程度的指标。期待成为基因转录水平早期诊断脑梗死和判断预后的新的生物学标志物, 也为脑梗死的分子基因学靶向治疗提供新的防治思路。

[参考文献]

- [1] 周竹娟, 朱洁, 李黔宁, 等. microRNA 与缺血缺氧的关系研究进展[J]. 卒中与神经疾病, 2013, 20(6): 378-380.
- [2] Kumar S, Kim CW, Simmons RD, et al. Role of flow-sensitive microRNAs in endothelial dysfunction and atherosclerosis mechanosensitive athero-miRs[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2014, 34(10): 2206-2216.
- [3] 刘芬, 江榕, 李勇, 等. 微小 RNA-132 在脂多糖诱导大鼠肺泡巨噬细胞炎症反应中的表达变化[J]. 中华危重病急救医学, 2014, 26(2): 80-83.
- [4] 蒋福生, 张平, 张新华. 急性脑梗死患者免疫调节性 T 淋巴细胞表达与预后的关系[J]. 中国动脉硬化杂志, 2013, 21(10): 923-926.
- [5] Rink C, Khanna S. MicroRNA in ischemic stroke etiology and pathology[J]. Physiol Genomics, 2011, 43(10): 521-528.
- [6] Rink C, Khanna S. MicroRNA in ischemic stroke etiology and pathology[J]. Physiol Genomics, 2011, 43(10): 521-529.
- [7] 宋晓微, 薛素芳, 赵绿妍, 等. microRNA 表达谱在动脉粥样硬化脑梗死调控中的研究进展[J]. 中华医学杂志, 2014, 94(33): 2636-638.
- [8] Zhao J, Gao B, Zhai B. Expression and its significance of microRNA-210 in serum in acute cerebral infarction[J]. Chin Critic Care Med, 2014, 26(12): 910-913.
- [9] 李欣, 魏红艳, 胡春林, 等. SAPK/JNK 信号通路在脑梗死后神经元凋亡中的作用[J]. 华中科技大学学报, 2011, 27(8): 552-556.
- [10] Yuan M, Zhan Q, Duan X, et al. A functional polymorphism at miR-491-5p binding site in the 3'-UTR of MMP-9 gene confers increased risk for atherosclerotic cerebral infarction in a Chinese population[J]. Atherosclerosis, 2013, 226(2): 447-452.
- [11] Santovito D, Mandolini C, Marcantonio P, et al. Overexpression of microRNA-145 in atherosclerotic plaques from hypertensive patients[J]. Expert Opin Ther Targets, 2013, 17(3): 217-223.
- [12] Zhou J, Zhang J. Identification of miRNA-21 and miRNA-24 in plasma as potential early stage markers of acute cerebral infarction[J]. Mol Med Rep, 2014, 10(2): 971-976.
- [13] Li S, Chen H, Ren J, et al. MicroRNA-223 inhibits tissue factor expression in vascular endothelial cells[J]. Atherosclerosis, 2013, 237(2): 514-520.
- [14] Bossa AS, Salemi VM, Ribeiro SP, et al. Plasma cytokine profile in tropical endomyocardial fibrosis: predominance of TNF- α , IL-4 and IL-10[J]. PLoS One, 2014, 9(10): 1-5.

(此文编辑 许雪梅)