

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2016.12.025

View this article at: http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2016.12.025

外周血miR-494及Let-7e在诊断急性缺血性脑卒中患者中的临床价值

包元飞¹, 王新², 王玲玲³

(1. 南通市第三人民医院神经内科, 江苏 南通 226000; 2. 南通大学神经再生研究所, 江苏 南通 226000; 3. 南通市第一人民医院检验科, 江苏 南通 226000)

[摘要] 目的: 通过检测急性缺血性脑卒中患者与正常对照组外周血中miR-494及Let-7e的表达水平, 探讨其与急性缺血性脑卒中的关系。方法: 收集67例急性缺血性脑卒中患者及50例非卒中正常健康人群, 采用实时荧光定量PCR法(Quantitative Real-time PCR, QRT-PCR)检测血浆中miR-494及Let-7e表达水平, 比较两组外周血中表达水平的差异。并对miR-494及Let-7e行ROC曲线分析, 分析其对急性缺血性脑卒中的诊断价值。进一步将急性缺血性脑卒中患者分为预后不佳组(MRS 3-6)和预后良好组(MRS 0-2), 分析其在两组之间的差异。结果: 急性缺血性脑卒中患者外周血中的miR-494(1.71±1.14)及Let-7e(1.43±0.93)的表达水平较正常对照组外周血明显升高($P < 0.05$)。miR-494及Let-7e ROC曲线下面积分别为0.777、0.756。预后不良组的miR-494(2.04±0.11 vs. 1.46±0.05)及Let-7e(1.68±0.61 vs. 1.24±0.27)表达水平均较预后良好组显著升高, 两组之间有统计学差异($P < 0.05$)。结论: miR-494及Let-7e可能与急性缺血性脑卒中相关, 对急性缺血性脑卒中患者的临床诊断和预后判断具有潜在的应用价值。

[关键词] 缺血性脑卒中; miR-494; Let-7e; 实时荧光定量PCR法; MRS评分

Clinical value of miR-494 and Let-7e in peripheral blood of acute ischemic stroke patients

BAO Yuanfei¹, WANG Xin², WANG Lingling³

(1. Department of Neurology, Nantong 3rd People's Hospital, Nantong Jiangsu 226000; 2. Department of Nerve Regeneration Institute of Nantong University, Nantong Jiangsu 226001; 3. Department of clinical laboratory, Nantong First People's Hospital, Nantong Jiangsu 226000, China)

Abstract **Objective:** To investigate the circulating levels of miRNA-494 and Let-7e in acute ischemic stroke patients and normal control group, and explore its relationship with acute ischemic stroke. **Methods:** 67 newly-diagnosed acute ischemic stroke patients enrolled in our hospital and 50 controls from physical examination health center of our hospital were chosen in our study. The expression levels of whole blood miR-494 and Let-7e were detected by real-time fluorescent quantitative PCR (QRT-PCR). The receiver operating characteristic curve (ROC) analysis were conducted to assess the performance of the miR-494 and Let-7e in acute ischemic stroke, and to explore

收稿日期 (Date of reception): 2016-10-05

通信作者 (Corresponding author): 包元飞, Email: baoyuanfei2010@163.com

基金项目 (Foundation item): 国家青年基金项目 (31400918). This work was supported by National Youth Foundation of China (31400918).

the diagnosis value for acute ischemic stroke. Patients with acute ischemic stroke were further divided into poor prognosis group (MRS3-6) and good prognosis group pulse (MRS 0-2) to analysis the differences between the two groups. **Results:** The expression of the miR-494 and Let-7e in acute ischemic stroke increased significantly than normal control group ($P<0.05$). Area of miR-494 and Let-7e under the ROC curve were 0.777 and 0.756. The expression of miR-494 and Let-7e in poor prognosis group were relatively increased than good prognosis group, and the difference between two groups was significant ($P<0.05$). **Conclusion:** The expression levels of miR-494 and Let-7e may associated with acute ischemic stroke, and may be used as a diagnosis and prognosis of acute ischemic stroke.

Keywords ischemic stroke; microRNA-494; Let-7e; real-time fluorescent quantitative PCR; modified rank in scale

脑卒中是常见的严重威胁人类健康的脑血管疾病,有发病率高、致残率高及病死率高的特点,其中以缺血性脑卒中最为多见,约占总数的80%^[1]。该病常见的危险因素有吸烟、肥胖、高血压、高脂血症、糖尿病、冠心病及相关家族史等等。影像学检查是目前对急性缺血性脑卒中诊断和预后判断的主要依据,但是影像学检查有其时间局限性及经济局限性等缺点。因此,积极寻找缺血性脑卒中患者血浆特异性标志物尤为重要。

MicroRNAs(miRNAs)是一类18~25 nt的非编码单链RNA,调节着人类1/3的基因。近年来临床研究^[2]证实miRNA广泛参与缺血性脑卒中的发生、发展过程,可作为缺血性脑卒中诊断、监测病情及预后的新型标志物。miR-494作为一种新型的miRNA,与肿瘤侵犯、肿瘤转移、促进细胞迁移等密切相关。其在肾癌细胞高表达,而在黑色素瘤、前列腺癌组织样本和去势治疗抵抗的前列腺癌细胞系中表达下调,miR-494超表达可抑制前列腺癌转移和复发。研究^[3,4]还发现miR-494对结直肠癌患者是一个独立的预后指标。

近期研究^[5,6]发现,外周血循环miR-494和Let-7e水平与外周动脉疾病相关,抑制miR-494可减少颈动脉粥样硬化病变的发展,增加斑块的稳定性,尚缺乏miR-494和Let-7e在脑卒中诊断的研究报道。本研究采用实时荧光定量PCR法(Quantitative Real-time PCR, QRT-PCR)技术检测急性缺血性脑卒中的患者及正常健康人血浆中miR-494及Let-7e的表达水平,探讨其与急性缺血性脑卒中的关系,从而寻找更方便、准确性更高的急性缺血性脑卒中的诊断及判断预后的方法。

1 对象与方法

1.1 研究对象

入选标准:选取2016年4月至2016年6月我院

神经内科就诊的急性缺血性脑卒中患者67例,排除静脉溶栓及血管内支架取栓患者,同时选取同期本院健康体检者50例,分别设为病例组和正常对照组,2组成员性别构成及年龄分布等差异无统计学意义($P>0.05$)(表1)。急性缺血性脑卒中患者的诊断均符合2010年中国急性缺血性脑卒中诊治指南标准^[7],经伦理委员会同意并批准,所有患者及正常健康人均签署了知情同意书。所选择的正常对照组均经病史询问、体格检查及一般生化指标检查,并经头颅CT和MRI检查核实,排除自身免疫性疾病,恶性肿瘤,高热,严重的肝胆、呼吸系统等感染及应用降脂药物,应用类固醇类和阿片类药、非固醇类消炎镇痛药等患者。

具体排除标准如下:1)缺血性脑卒中急性期有严重并发症者;2)合并有自身免疫性疾病、恶性肿瘤、血液性疾病、心梗及冠心病的患者;3)严重的肝胆、呼吸系统等感染、发热等应激状态的患者;4)未签署知情同意书,拒绝参加临床研究的患者;5)脑出血;6)复发性脑梗死。

1.2 试剂及方法

1.2.1 试剂及仪器

MiRNeasy Mini Kit (QIAGEN, 货号: 27104); Bulge-Loop miRNA qRT-PCR Primer Set试剂盒(锐博生物, 货号: MQP-0102); 荧光定量PCR仪(德国roche); 酶标仪(美国BioTek); 荧光PCR引物及探针使用Primer Express软件设计。

1.2.2 QRT-PCR 检测外周血中 miR-494 及 Let-7e 的表达水平

急性缺血性脑卒中患者在发病后6h采集静脉血,对照组空腹采集静脉血,全血储存至-80℃冰箱备用,用于提取总RNA。利用miRNeasy Mini Kit试剂盒提取总miRNA;然后按照Bulge-Loop miRNA qRT-PCR Primer Set试剂盒的使用说明,检测miR-494及Let-7e的表达水平,U6作为内参基

因, 应用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 的方法计算所测标本miR-494及Let-7e的相对表达量, 各样本重复3次。mRNA相对变化计算公式: $\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ ($\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{miR-494/Let-7e}} - \Delta Ct_{\text{U6}}$), $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{卒中组}} - \Delta Ct_{\text{正常组}}$, 相对表达量 = $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。

引物设计如下: U6-F, 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3'; U6-R, 5'-AACGCTTCACGAATTGCGT-3'; miR-494-stem-loop RT, 5'-GTCGTA TCCAGTGCGTGTCGTGGAGTCGGCAATTGC ACTGGATACGACGAGGTTTC-3'; miR-494-F, 5'-TGAAACATACACGGGA-3'; miR-494-R: 5'-TATCCAGTGCGTGTCGTGGA-3'; Let-7e-stem-loop RT: 5'-GTCGTATCCAGTGC GTGTCGTGG AGTCGGCAATTGCACTGGATACGACA ACTAT AC-3'; Let-7e-F: 5'-TGAGGTAGGAGTTGT-3'; Let-7e-R: 5'-TATCCAGTGCGTGTCGTGGA-3'。

1.3 随访方法和生存时间计算

对急性缺血性脑卒中患者在3个月时进行随访(首选门诊随访, 若有困难者则电话随访), 对其进行MRS评分, 将患者分为预后良好组(MRS 0~2分)和预后不佳组(MRS 3~6分), 分析miR-494及Let-7e在两组患者之间的差异。

1.4 统计学处理

统计学方法采用SPSS18.0软件。所有计量资

料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 样本均数间的比较先进行方差齐性检验, 方差相等时采用 t 检验分析。并制作受试者工作特征曲线(receive operating characteristic curve, ROC), 计算ROC曲线下面积, 分析miR-494及Let-7e对于急性缺血性脑卒中的诊断价值。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 急性缺血性脑卒中患者及健康对照者的临床基本信息

急性缺血性脑卒中患者及健康对照者的临床基本信息见表1。两组间的性别、年龄、高血压、糖尿病、吸烟(每天10支并吸烟1年以上)、既往有TIA病史、总胆固醇、高密度脂蛋白、低密度脂蛋白等均无显著性差异($P>0.05$)。表明本研究的基线基本匹配。

2.2 miR-494及Let-7e在急性缺血性脑卒中和正常对照组外周血中的表达水平

用QRT-PCR的方法检测外周血中miR-494及Let-7e的表达情况, 结果如图1所示, 与正常对照组相比, 急性缺血性脑卒中患者外周血中的miR-494表达水平为 1.71 ± 1.14 , Let-7e的表达水平为 1.43 ± 0.93 , 均较正常对照组明显升高, 具有显著性差异(miR-494: $t=4.397$, $P=0.0117$; Let-7e: $t=3.271$, $P=0.021$)。

表1 急性缺血性脑卒中患者及健康对照者的临床基本信息

Table 1 Clinical basic information of acute ischemic stroke patients and healthy controls

临床指标	急性缺血性卒中组	正常对照组	P
例数/例	67	50	—
性别(男/女)	39/28	22/28	0.13
年龄/岁	70.5 \pm 9.76	68.04 \pm 7.25	0.57
高血压/例	29	20	0.82
糖尿病/例	19	13	0.83
吸烟/例	14	8	0.58
TIA病史/例	10	7	0.90
总胆固醇/(mmol/L)	4.24 \pm 1.06	4.17 \pm 1.21	0.89
高密度脂蛋白/(mmol/L)	1.07 \pm 0.28	0.99 \pm 0.25	0.14
低密度脂蛋白/(mmol/L)	2.57 \pm 0.86	2.59 \pm 0.93	0.89
发病时间/d	3.14 \pm 2.31	—	—

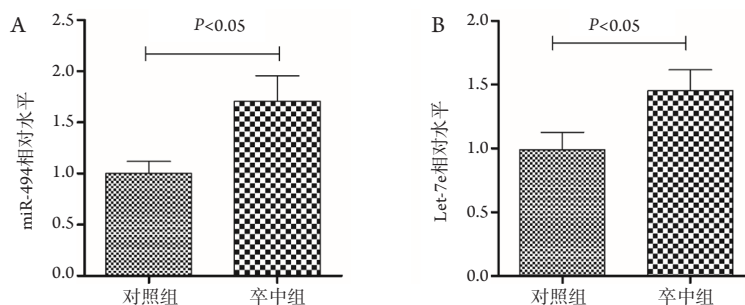


图1 miR-494及Let-7e在急性缺血性脑卒中和正常对照组外周血中的表达

Figure 1 Expression level miR-494 and Let-7e in peripheral blood of acute ischemic stroke and normal control group

2.3 急性缺血性脑卒中患者外周血 miR-494 及 Let-7e ROC 曲线分析

在所分析的急性缺血性脑卒中患者, 对外周血 miR-494 及 Let-7e 表达水平行 ROC 曲线分析, 结果表明(图2)两者曲线下面积分别为 0.777、0.756, 提示对急性缺血性脑卒中的诊断具有较高的临床诊断价值。miR-494 最佳截断点 1.542, 灵敏度 64.2%, 特异度 90%。Let-7e 最佳截断点 1.547, 灵敏度 62.7%, 特异度 92.0%。

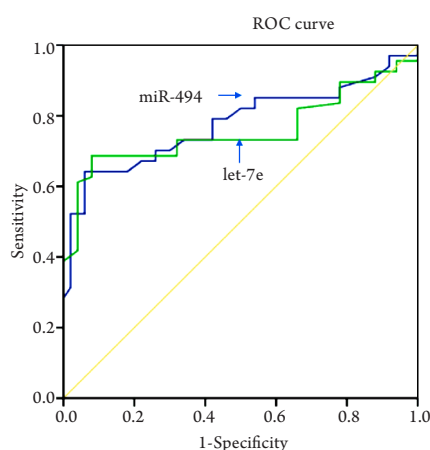


图2 miR-494及Let-7e的ROC曲线

Figure 2 ROC curve of miR-494 and the Let-7e

2.4 miR-494 及 Let-7e 与急性缺血性脑卒中预后的关系

在 67 例急性缺血性脑卒中患者中, 有 8 例定义为预后不佳组 (MRS 3~6), 有 59 例定义为预后良好组 (MRS 0~2), 比较 miR-494 及 Let-7e 在两组之间的差异(图3)。与预后良好组相比, 预后不佳组的 miR-494 表达水平较预后良好组明显升高 (2.04 ± 0.11 vs. 1.46 ± 0.05), 预后不佳组的 Let-7e 表达水平较预后良好组明显升高 (1.68 ± 0.61 vs. 1.24 ± 0.27), 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

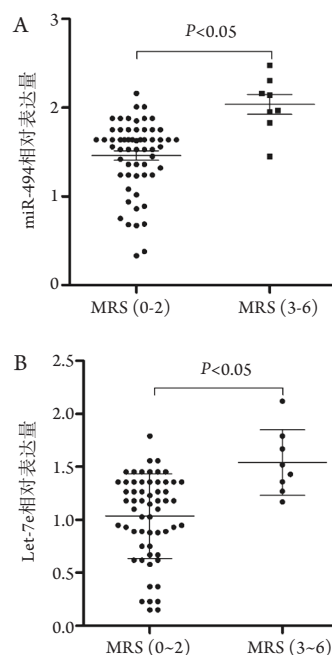


图3 miR-494及Let-7e在预后良好组(MRS 0~2)和预后不佳组(MRS 3~6)之间的差异

Figure 3 The difference of miR-494 and the Let-7e in good prognosis group (MRS 0~2) and poor prognosis group (MRS 3~6)

3 讨论

MicroRNAs(miRNAs)是一类18~25 nt的非编码单链RNA, 在多种肿瘤发生发展中起重要作用, 现研究发现它还参与缺血性脑卒中的发生、发展过程, 如动脉粥样硬化、脑水肿、缺血再灌注损伤等方面^[7-8]。缺血性脑卒中血浆和组织中miRNA的表达谱可发生显著变化。

Let-7e是由22个核苷酸构成的内源性非编码RNA。作为Let-7 miRNA基因家族的一员, 参与调节细胞分裂、增殖及炎症反应^[9]。研究报道其在青年人口腔上皮癌及腹主动脉瘤患者外周血高表达^[6,10]; 在心力衰竭急性期及免疫抑制的中枢神经移植小

鼠中, 血Let-7e表达上调^[11-12]; 阿尔茨海默病患者血中Let-7e-5p表达下调^[13]; 对于脑梗患者Let-7e特异性高达73.4%和敏感性达82.8%^[14]。但miR-494及Let-7e与急性缺血性脑卒中的研究报道甚少, 因此本研究通过检测急性缺血性脑卒中的患者及正常健康人血浆中miR494及Let-7e的表达水平, 探讨其对于急性缺血性脑卒中诊断、预后的价值。

由于miRNA仅约20 nt的长度, 且外周循环中含量很低。QRT-PCR是目前验证miRNA数据的金标准, 因此本研究采用QRT-PCR法检测急性缺血性脑卒中患者及正常健康人血浆中miR-494及Let-7e表达水平, 比较两组外周血中表达水平的差异, 并判断其对于急性缺血性脑卒中的诊断价值。进一步将急性脑梗死患者分为预后不佳组(MRS 3~6分)和预后良好组(MRS 0~2分), 评价血浆miRNA判断急性脑梗死患者预后的价值。结果表明, 急性缺血性脑卒中患者外周血中的miR-494及Let-7e的表达水平显著升高, miR-494及Let-7e ROC曲线下面积分别为0.777、0.756, 提示可能与急性缺血性脑卒中相关, 并对急性缺血性脑卒中的诊断具有较高的临床价值。在67例急性脑卒中患者中, 有8例定义为预后不佳组(MRS 3~6分), 有59例定义为预后良好组(MRS 0~2分), 结果发现预后不佳组的miR-494及Let-7e平均表达水平均较预后良好组明显升高, 两组之间有显著性差异。提示miR-494及Let-7e可作为急性脑卒中诊断潜在的生物标志物, 并与预后相关。这两个具有潜在临床价值的miRNAs, 它在诊断和预测脑梗死的预后方面可能有重要的作用。其通过调控其mRNA靶基因的表达, 发挥极其重要的生物学作用, 具体的调控机制可进行下一步研究。

参考文献

- Lopez AD, Mathers CD, Ezzati M, et al. Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data[J]. *Lancet*, 2006, 367(9524): 1747-1757.
- Vijayan M, Reddy PH. Peripheral biomarkers of stroke: Focus on circulatory microRNAs[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1862(10): 1984-1993.
- Dutta P, Haller E, Sharp A, et al. MIR494 reduces renal cancer cell survival coinciding with increased lipid droplets and mitochondrial changes[J]. *BMC Cancer*, 2016, 16:33.
- Sun HB, Chen X, Ji H, et al. miR-494 is an independent prognostic factor and promotes cell migration and invasion in colorectal cancer by directly targeting PTEN[J]. *Int J Oncol*, 2014, 45(6): 2486-2494.
- Wezel A, Welten SM, Razawy W, et al. Inhibition of microRNA-494 reduces carotid artery atherosclerotic lesion development and increases plaque stability[J]. *Ann Surg*, 2015, 262(5): 841-847; discussion 847-848.
- Stather PW, Sylvius N, Sidloff DA, et al. Identification of microRNAs associated with abdominal aortic aneurysms and peripheral arterial disease[J]. *Br J Surg*, 2015, 102(7): 755-766.
- 中华医学会神经病学分会脑血管病学组急性缺血性脑卒中诊治指南撰写组. 中国急性缺血性脑卒中诊治指南2010[J]. *中国临床医生*, 2011, 39(3): 67-73.
The Chinese medical association branch of neurology cardiovascular epidemiology group. The diagnosis and treatment of acute ischemic stroke guide 2010[J]. *Journal of Chinese Physician*, 2011, 39(3): 67-73.
- Economou EK, Oikonomou E, Siasos G, et al. The role of microRNAs in coronary artery disease: From pathophysiology to diagnosis and treatment[J]. *Atherosclerosis*, 2015, 241(2): 624-633.
- Rao R, Nagarkatti P, Nagarkatti M. Role of miRNA in the regulation of inflammatory genes in staphylococcal enterotoxin B-induced acute inflammatory lung injury and mortality[J]. *Toxicol Sci*, 2015, 144(2): 284-297.
- Hilly O, Pillar N, Stern S, et al. Distinctive pattern of let-7 family microRNAs in aggressive carcinoma of the oral tongue in young patients[J]. *Oncol Lett*, 2016, 12(3): 1729-1736.
- Marques FZ, Vizi D, Khammy O, et al. The transcardiac gradient of cardio-microRNAs in the failing heart[J]. *Eur J Heart Fail*, 2016, 18(8): 1000-1008.
- Wu SC, Rau CS, Yang JC, et al. Identification of circulating miRNAs in a mouse model of nerve allograft transplantation under fk506 immunosuppression by Illumina small RNA deep sequencing[J]. *Dis Markers*, 2015, 2015: 863192.
- Satoh J, Kino Y, Niida S. MicroRNA-Seq data analysis pipeline to identify blood biomarkers for Alzheimer's disease from public data[J]. *Biomark Insight*, 2015, 10: 21-31.
- Peng G, Yuan Y, Wu S, et al. MicroRNA let-7e is a potential circulating biomarker of acute stage ischemic stroke[J]. *Transl Stroke Res*, 2015, 6(6): 437-445.

本文引用: 包元飞, 王新, 王玲玲. 外周血miR-494及Let-7e在诊断急性缺血性脑卒中患者中的临床价值[J]. *临床与病理杂志*, 2016, 36(12): 2028-2032. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2016.12.025

Cite this article as: BAO Yuanfei, WANG Xin, WANG Lingling. Clinical value of miR-494 and Let-7e in peripheral blood of acute ischemic stroke patients[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2016, 36(12): 2028-2032. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2016.12.025