

## 脑梗死患者血清 miR-181c、miR-128b 表达水平及其与 90 天预后的相关性

王志<sup>1</sup>, 金庙通<sup>1</sup>, 杨建邦<sup>2</sup>

(浙江金华广福肿瘤医院 1. 神经内科, 2. 干部病房, 浙江省金华市 321000)

[关键词] 脑梗死; miR-181c; miR-128b

[摘要] **目的** 探讨脑梗死患者血清微小 RNA(miRNA)miR-181c、miR-128b 表达水平及其与 90 天预后的相关性,为 miRNA 在脑梗死诊断和治疗上提供参考意义。**方法** 选取 128 例脑梗死患者以及同期 108 例健康体检者作为研究对象,分别作为研究组和对照组。比较两组研究对象的 miR-181c 和 miR-128b 表达水平,并分析 miR-181c、miR-128b 表达水平与疾病严重程度的相关性以及脑梗死相关危险因素;根据 90 天随访的预后情况分为预后良好组和预后不良组,并对影响 90 天预后的相关因素进行单因素和 Logistic 回归分析,探讨影响疾病发生及预后的独立影响因素。**结果** 研究组吸烟、高血脂、高血压、糖尿病以及心房颤动比例明显高于对照组( $P<0.05$ ),研究组患者 miR-181c、miR-128b 表达水平显著高于对照组,差异具有统计学意义( $P<0.05$ ),Logistic 回归分析结果显示糖尿病、miR-181c、miR-128b 表达水平是脑梗死的独立危险因素( $P<0.05$ );Spearman 相关性分析显示急性脑梗死患者病情严重程度与血清 miR-181c 和 miR-128b 水平呈正相关( $r=0.867, P=0.005; r=0.885, P=0.002$ );预后不良组患者发生高血压、糖尿病、心房颤动的比例和入院时 NIHSS 评分以及血清 miR-181c、miR-128b 水平均显著高于预后良好组( $P<0.05$ ),Logistic 回归分析结果显示入院时 NIHSS 评分及血清 miR-181c、miR-128b 水平均与脑梗死患者 90 天预后存在密切相关性( $P<0.05$ )。**结论** 脑梗死患者血清 miR-181c、miR-128b 表达水平显著高于健康人群,糖尿病、miR-181c、miR-128b 表达水平是脑梗死的危险因素( $P<0.05$ ),miR-181c、miR-128b 表达水平与患者脑梗死严重程度存在显著正相关,且两者表达水平以及 NIHSS 评分均与急性脑梗死患者 90 天预后存在密切联系。

[中图分类号] R741

[文献标识码] A

### Serum levels of miR-181c and miR-128b in patients with cerebral infarction and their correlation with 90-day prognosis

WANG Zhi, JIN Miaotong, YANG Jianbang

(Zhejiang Jinhua Guangfu Cancer Hospital, Jinhua, Zhejiang 321000, China)

[KEY WORDS] cerebral infarction; miR-181c; miR-128b

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the expression of serum microRNA (miRNA) miR-181c and miR-128b in patients with cerebral infarction and its correlation with 90-day prognosis, and provide reference for the diagnosis and treatment of cerebral infarction. **Methods** 128 patients with cerebral infarction admitted to our hospital from January 2015 to June 2018 and 108 healthy subjects in the same period were selected as study subjects and control groups. The expression levels of miR-181c and miR-128b were compared between the two groups, and the correlation between miR-181c, miR-128b expression levels and disease severity, as well as risk factors associated with cerebral infarction were analyzed.

According to the prognosis of 90 days follow-up, the good prognosis group and the poor prognosis group were classified, and the factors affecting the prognosis of 90 d were analyzed by single factor and logistic regression analysis to explore the independent influencing factors affecting the occurrence and prognosis of the disease. **Results** The smoking, hyperlipidemia, hypertension, diabetes and atrial fibrillation rate in the study group were significantly higher than those in the control group ( $P<0.05$ ), and the expression levels of miR-181c and miR-128b in the study group were significantly higher than those in the control group ( $P<0.05$ ).

Logistic regression analysis showed that the diabetes and expression levels of miR-181c and miR-128b were independent risk factors for cerebral infarction ( $P<0.05$ ); Spearman correlation analysis

showed that the severity of acute cerebral infarction was positively correlated with serum miR-181c and miR-128b levels ( $r=0.867$ ,  $P=0.005$ ;  $r=0.885$ ,  $P=0.002$ ); The incidence of hypertension, diabetes, atrial fibrillation, NIHSS score at admission, and serum miR-181c and miR-128b levels were significantly higher in patients with poor prognosis than those with good prognosis ( $P<0.05$ ). **Conclusion** Logistic regression analysis showed that NIHSS score and serum miR-181c and miR-128b levels were significantly correlated with the 90-day prognosis of patients with acute cerebral infarction.

脑梗死是脑卒中的一种常见类型疾病,具有高发病率、高致残率、高死亡率和高复发率,故临床上及早发现、诊断和干预治疗对于有效改善患者预后具有重要意义<sup>[1]</sup>。微小 RNA (miRNA) 是生物体内广泛存在的一类内源性且高度保守的非编码单链 RNA,参与生物体细胞增殖和分化、凋亡、免疫和代谢及炎症反应等重要生理过程<sup>[2-3]</sup>。已有研究结果显示脑梗死后外周血中特定 miRNA 表达水平变化可以反映脑组织中 miRNA 水平变化,且目前外周血 miRNA 可以被灵敏、准确检测,故外周血相关 miRNA 有望作为脑梗死等脑部缺血性疾病的新型生物学标志物。miR-181c、miR-128b 作为 miRNA 的重要亚型,两者均与脑梗死的发生存在密切联系<sup>[4]</sup>。本研究观察脑梗死患者血清 miR-181c、miR-128b 表达水平并探讨其与患者 90 天预后的相关性,旨在为 miRNA 在脑梗死诊断和治疗上提供参考意义。

## 1 资料和方法

### 1.1 病例资料

选取 2015 年 1 月至 2018 年 6 月于我院收治的 128 例脑梗死患者以及同期健康体检者作为研究对象,分别作为研究组和对照组,根据 90 天随访的预后情况分为预后良好组和预后不良组。其中研究组男性 78 例,女性 50 例;NIHSS 评分轻度、中度和重度患者分别为 58 例、52 例和 18 例;年龄 52~72 岁,平均(62.58±5.69)岁;平均发病时间(2.65±0.32)天。对照组男性 70 例,女性 38 例;年龄 50~74 岁,平均(63.05±5.45)岁。两组患者的性别( $\chi^2=0.377$ ,  $P=0.539$ )、年龄( $t=0.644$ ,  $P=0.520$ )等一般资料差异无显著性( $P>0.05$ ),具有可比性。所有患者均签署知情同意书,本研究获得我院伦理委员会批准。

纳入标准:①所有患者均符合《各类脑血管疾病诊断要点》中关于脑梗死的诊断标准<sup>[5]</sup>;②所有患者均经头颅 MRI 或头部 CT 检查确诊为脑梗死;③第一次发病,就诊时间均在发病 1 周内;④无严重心、肝、肺、肾功能不全;⑤患者年龄≥18 周岁;⑥签

署知情同意书。

排除标准:①合并认知功能受损者;②有严重精神疾病、恶性肿瘤及严重心、肝、肺、肾功能不全或伴有代谢性疾病者;③临床资料不完整或未签署知情同意书者。

### 1.2 临床资料收集

全面收集所有研究对象的临床资料,包括性别、年龄、发病时间、入院时美国国立卫生研究院卒中量表评分(NIHSS 评分)、疾病史(糖尿病、高血脂、高血压、冠心病、心房颤动等)等信息。并根据 NIHSS 评分标准将所有患者脑梗死程度进行分级。其中病情轻度组:<5 分;中度组:5~15 分;重度组≥16 分<sup>[6]</sup>。并于患者出院后第 90 天采取门诊回访或相关工作人员电话联系等方式对患者的短期预后进行随访,并根据随访得到的信息填写患者改良 Rankin 量表评分(mRS),其中预后不良是指 mRS>2,预后良好是指 mRS≤2<sup>[7]</sup>。

### 1.3 血清 miR-181c、miR-128b 表达水平测定

分别于患者入院后第 2 天清晨抽取空腹静脉血 5 mL,立马采用离心机 3 500 r/min 离心 15 min,取上清液-30℃冰箱保存。统一取出血清并加入细胞裂解液将细胞裂解,然后采用总 RNA 提取试剂盒(购于赛默飞世尔中国公司)提取血清中的总 RNA,使用紫外分光光度计(UV)测定提取出总 RNA 浓度,样品 A260/A280≥1.80 视为合格。然后采用反转录试剂盒(购于赛默飞世尔中国公司)将总 RNA 进行反转录,分别得到模板单链 cDNA,然后使用 PCR 试剂盒对 cDNA 进行 PCR。miR-181c 的 PCR 反应条件为 95℃ 5 min,95℃ 40 s,60℃ 20 s,72℃ 15 s;miR-128b 的 PCR 反应条件为 95℃ 9 min,95℃ 20 s,60℃ 10 s,72℃ 20 s;连续循环 40 次,然后采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  分别计算血清 miR-181c 和 miR-128b 相对表达量(RQ)<sup>[8]</sup>。

### 1.4 统计学分析

采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析,计量资料用  $\bar{x}\pm s$  表示,组间比较采用独立样本  $t$  检验,计数资料采用百分比表示,组间比较采用  $\chi^2$  检验;对生存影响因素进行单因素分析,并采用非条件 Logistic 回归进行多因素分析, $P<0.05$  表示差异具有统计

学意义。

## 2 结果

### 2.1 基线临床资料

两组患者性别( $\chi^2=0.377, P=0.539$ )、年龄( $t=0.644, P=0.520$ )等一般资料差异无显著性( $P>0.05$ ),具有可比性;研究组吸烟、高血脂、高血压、糖尿病以及心房颤动比例明显高于对照组( $P<0.05$ ;表1)。

表 1. 两组患者基线临床资料比较

Table 1. The comparison of basic information between the two groups

临床资料	研究组 (n=128)	对照组 (n=108)	t/ $\chi^2$	P
男/女(例)	78/50	70/38	0.377	0.539
年龄(岁)	62.58±5.69	63.05±5.45	0.644	0.520
吸烟史[例(%)]	85(66.41)	54(50.00)	6.513	0.011
喝酒史[例(%)]	40(31.25)	35(32.41)	0.036	0.849
高血脂[例(%)]	65(50.78)	41(37.96)	3.890	0.049
高血压[例(%)]	78(60.94)	35(32.41)	19.106	<0.01
糖尿病[例(%)]	71(55.47)	39(36.11)	8.820	0.003
冠心病[例(%)]	3(2.34)	2(1.85)	0.068	0.794
心房颤动 [例(%)]	15(11.72)	3(2.78)	6.646	0.010

### 2.2 血清 miR-181c 和 miR-128b 表达水平

研究组患者 miR-181c 和 miR-128b 表达水平显著高于对照组,差异具有统计学意义( $P<0.05$ ;表2)。

表 2. 两组患者血清 miR-181c 和 miR-128b 表达水平比较

Table 2. Comparison of serum miR-181c and miR-128b expression levels between the two groups

分 组	n	miR-181c	miR-128b
对照组	108	1.18±0.23	1.09±0.15
研究组	128	1.55±0.18 <sup>a</sup>	2.14±0.21 <sup>a</sup>

a 为  $P<0.05$ ,与对照组比较。

### 2.3 脑梗死相关危险因素 Logistic 回归分析

分别以是否发生脑梗死(是=1,否=0)为因变量,以吸烟、高血脂、高血压、糖尿病、心房颤动以及 miR-181c、miR-128b 表达水平作为自变量,采用逐

步回归方法,Wald 卡方检验进行 Logistic 回归分析,结果发现糖尿病及 miR-181c、miR-128b 表达水平是脑梗死的危险因素( $P<0.05$ ;表3)。

表 3. 脑梗死相关影响因素 Logistic 回归分析结果

Table 3. Logistic regression analysis of influencing factors related to cerebral infarction

变量	$\beta$	S. E.	Wald $\chi^2$	P 值	OR 值	95% CI
吸烟	3.586	0.365	96.524	0.12	36.089	17.648 ~ 73.803
糖尿病	2.158	0.428	25.422	0.025	8.654	3.740 ~ 20.023
高血脂	1.586	0.232	46.734	0.526	4.884	3.100 ~ 7.696
高血压	2.251	0.158	202.972	0.083	9.497	6.968 ~ 12.945
心房颤动	2.325	0.265	76.976	0.235	10.227	6.084 ~ 17.191
miR-181c	1.247	0.251	24.682	0.001	3.480	2.128 ~ 5.691
miR-128b	2.689	0.158	289.646	0.003	14.717	10.798 ~ 20.059

### 2.4 急性脑梗死患者病情严重程度与血清 miR-181c 和 miR-128b 表达水平相关性分析

与病情轻度组比较,病情中度组和病情重度组患者血清 miR-181c、miR-128b 表达水平差异有统计学意义( $P<0.05$ );血清 miR-181c 和 miR-128b 表达水平随病情加重而升高(表4)。经 Spearman 相关性分析,急性脑梗死患者病情严重程度与血清 miR-181c、miR-128b 表达水平呈正相关( $r=0.867, P=0.005; r=0.885, P=0.002$ )。

表 4. 血清 miR-181c、miR-128b 表达水平与急性脑梗死患者病情严重程度关系

Table 4. Correlation between serum miR-181c, miR-128b expression levels and severity of acute cerebral infarction

分 组	n	miR-181c	miR-128b
病情轻度组	58	1.37±0.19	1.87±0.18
病情中度组	52	1.53±0.18 <sup>a</sup>	2.02±0.18 <sup>a</sup>
病情重度组	18	1.64±0.21 <sup>ab</sup>	2.38±0.23 <sup>ac</sup>

a 为  $P<0.01$ ,与病情轻度组比较;b 为  $P<0.05$ ,c 为  $P<0.01$ ,与病情中度组比较。

### 2.5 急性脑梗死患者 90 天预后影响因素分析

90 天后随访中失访患者 6 例,共有 122 例患者进入研究分析。其中 72 例患者预后良好,50 例患者预后不良(包括 5 例死亡,18 例脑梗死复发)。分析结果发现,预后不良组患者发生高血压、糖尿病、心房颤动的比例及入院时 NIHSS 评分、血清 miR-181c 和 miR-128b 表达水平均显著高于预后良好组( $P<0.05$ ;表5)。

表 5. 急性脑梗死患者 90 天预后影响因素分析

Table 5. Analysis of factors affecting prognosis in patients with acute cerebral infarction at 90 days

临床资料	预后不良组 (n=72)	预后良好组 (n=50)	t/ $\chi^2$	P
男/女(例)	40/32	35/15	2.600	0.107
年龄(岁)	61.45±5.36	62.75±5.45	1.308	0.193
吸烟史[例(%)]	50(69.44)	31(62.00)	0.733	0.392
喝酒史[例(%)]	21(29.17)	18(36.00)	0.634	0.426
高血脂[例(%)]	42(58.33)	23(46.00)	1.803	0.179
高血压[例(%)]	50(69.44)	24(48.00)	4.251	0.039
糖尿病[例(%)]	42(58.33)	18(36.00)	5.686	0.017
冠心病[例(%)]	2(2.78)	1(2.00)	0.074	0.785
心房颤动 [例(%)]	13(18.05)	1(2.00)	7.488	0.006
入院时 NIHSS 评分	9.15±1.20	4.58±0.89	24.139	<0.01
miR-181c	1.62±0.20	1.39±0.18	6.504	<0.01
miR-128b	2.28±0.19	1.92±0.21	9.856	<0.01

## 2.6 脑梗死患者 90 天预后影响因素的 Logistic 回归分析

将表 5 中对脑梗死具有统计学意义的影响因素进行 Logistic 回归分析,患者入院时 NIHSS 评分及血清 miR-181c、miR-128b 表达水平均与脑梗死患者 90 天预后存在密切相关性( $P<0.05$ ;表 6)。

表 6. 脑梗死患者 90 天预后相关影响因素 Logistic 回归分析结果

Table 6. Logistic regression analysis results of prognostic factors influencing patients with cerebral infarction for 90 days

变量	$\beta$	S. E.	Wald $\chi^2$	P 值	OR 值	95% CI
高血压	3.256	0.325	100.370	0.098	29.586	15.647 ~ 55.941
糖尿病	2.625	0.215	149.067	0.125	8.958	5.878 ~ 13.653
心房颤动	2.658	0.241	121.640	0.352	12.358	7.706 ~ 19.819
入院时 NIHSS 评分	2.526	0.145	303.480	0.005	11.269	8.481 ~ 14.973
miR-181c	1.365	0.124	121.177	0.000	3.578	2.806 ~ 4.562
miR-128b	2.365	0.214	122.133	0.002	15.288	10.051 ~ 23.255

## 3 讨论

miRNA 是一种由 20~25 个核苷酸组成的人体内源性非编码小分子 RNA,可参与调节胚胎发育、细胞分化凋亡等多种生物学过程。虽然脑特异性

miRNA 主要表达于中枢神经系统内,在促进神经系统发育方面发挥重要作用,而大多数 miRNA 在组织细胞和血液、尿液、羊水等体液中丰富表达,外周血中 miRNA 含量测定相比于组织中 miRNA 含量测定更为简单方便,且检测方法准确性高<sup>[8]</sup>。甘晴等<sup>[9]</sup>报道多种严重疾病如脑梗死、心肌梗死、帕金森病、肿瘤、糖尿病患者的外周血血清 miRNA 表达明显异常于健康人体。故外周血 miRNA 有望成为疾病诊断治疗以及预后判断的一种新型生物学标志物。miR-181c、miR-128b 作为 miRNA 的重要亚型,研究报道两种 miRNA 与脑梗死的发生和预后存在紧密联系<sup>[10]</sup>。本研究结果显示急性脑梗死患者血清 miR-181c、miR-128b 表达水平显著高于对照组( $P<0.05$ ),糖尿病及 miR-181c、miR-128b 表达水平是脑梗死的危险因素( $P<0.05$ )。糖尿病作为脑梗死疾病发生和预后的重要危险因素,主要是因为持续高血糖会导致患者血管内皮损伤和动脉粥样硬化,从而加剧神经功能损伤导致脑梗死发生<sup>[11]</sup>。外周血 miR-181c、miR-128b 表达水平显著升高提示 miR-181c、miR-128b 可能参与了急性脑梗死的病理发生过程。

NIHSS 评分是临床上常用于评估脑梗死患者神经功能损伤程度的指标,从而评价脑梗死患者的短期预后情况。本文通过对急性脑梗死患者病情严重程度与血清 miR-181c、miR-128b 水平进行分析,发现两者表达水平与脑梗死病情严重程度呈正相关( $r=0.867, P=0.005; r=0.885, P=0.002$ )。提示血清 miR-181c、miR-128b 表达水平高低对脑梗死严重程度具有提示意义。miR-128b 作为脑特异性 miRNA,其在外周血中检测到高含量并且与病情严重程度呈正相关,是因为发生脑梗死时破坏了血脑屏障,脑特异性的 miR-128b 经过破坏的血脑屏障进入外周血,且脑梗死越严重,miR-128b 表达水平越高<sup>[12]</sup>。而脑梗死会造成神经元损伤,miR-181c 与神经元损伤和线粒体功能发挥存在密切联系。神经元主要依靠线粒体提供能量,故 miR-181c 水平越高会加剧线粒体功能紊乱,从而导致神经元损害更严重<sup>[13]</sup>。杜守治等<sup>[14]</sup>研究表明急性脑梗死患者外周血 miR-128b、miR-153 显著高于对照组,与脑梗死严重程度存在显著正相关,miR-210 表达水平与脑梗死严重程度存在负相关,与本文研究结果类似。对影响患者 90 天预后的影响因素进行分析,单因素结果显示预后不良组患者发生高血压、糖尿病、心房颤动的比例及入院时 NIHSS 评分以及血清 miR-181c、miR-128b 表达水平均显著高于预后良好组( $P$

<0.05)。Logistic 回归分析显示入院时 NIHSS 评分及血清 miR-181c、miR-128b 表达水平与脑梗死患者 90 天预后存在密切相关性( $P<0.05$ )。NIHSS 评分是反映患者脑梗死严重程度的指标,患者脑梗死越严重,神经功能恢复状况越差,预后越差<sup>[4,15]</sup>。

综上所述,脑梗死患者血清 miR-181c、miR-128b 表达水平显著高于健康人群,糖尿病及 miR-181c、miR-128b 表达水平是脑梗死的危险因素( $P<0.05$ ),且 miR-181c、miR-128b 表达水平与患者脑梗死严重程度存在显著正相关,两者表达水平以及 NIHSS 评分均与急性脑梗死患者 90 天预后存在密切联系。

#### [参考文献]

- [1] Naess H, Kurtz M, Thomassen L, et al. Serial NIHSS scores in patients with acute cerebral infarction[J]. *Acta Neurol Scand*, 2016, 133(6): 415-420.
- [2] Niu J, Xue A, Chi Y, et al. Induction of miRNA-181a by genotoxic treatments promotes chemotherapeutic resistance and metastasis in breast cancer[J]. *Oncogene*, 2016, 35(10): 1302-1313.
- [3] Choi GH, Ko KH, Kim JO, et al. Association of miR-34a, miR-130a, miR-150 and miR-155 polymorphisms with the risk of ischemic stroke[J]. *Int J Mol Med*, 2016, 38(1): 345-352.
- [4] Fang C, Li Q, Min G, et al. MicroRNA-181c ameliorates cognitive impairment induced by chronic cerebral hypoperfusion in rats[J]. *Mol Neurobiol*, 2017, 54(10): 1-16.
- [5] 王新德. 各类脑血管疾病诊断要点[J]. *中华神经科杂志*, 1996, 12(6): 379-380.
- [6] 江丽杰, 胡镜清, 易丹辉, 等. 基于广义估计方程的缺血性中风病中医证候要素动态变化与 NIHSS 评分变化纵向相关性分析[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2017, 23(2): 221-225.
- [7] 周佩莉, 袁怀武, 计仁杰, 等. 缺血性卒中急性期患者认知障碍症状学的分型[J]. *中国脑血管病杂志*, 2016, 13(6): 281-286.
- [8] Gambari R, Brognara E, Spandidos DA, et al. Targeting oncomiRNAs and mimicking tumor suppressor miRNAs: new trends in the development of miRNA therapeutic strategies in oncology (Review) [J]. *Int J Oncol*, 2016, 49(1): 5-32.
- [9] 甘晴, 陈洁晶, 欧明林, 等. 非编码 RNA 相关重大疾病发病机制和生物标志物筛选的研究进展[J]. *医学综述*, 2016, 22(18): 3565-3568.
- [10] Chen SJ, Wu P, Sun LJ, et al. miR-204 regulates epithelial-mesenchymal transition by targeting SP1 in the tubular epithelial cells after acute kidney injury induced by ischemia-reperfusion[J]. *Oncol Rep*, 2017, 37(2): 1148-1156.
- [11] 杨书英, 王勇强, 王兵, 等. 替格瑞洛与氯吡格雷联合阿司匹林对糖尿病合并急性脑梗死患者神经功能恢复及血清 VEGF、MMP-9、Ang- II 的影响[J]. *中国新药与临床杂志*, 2017, 36(12): 744-747.
- [12] 彭彬, 吴大玉, 孙家兰, 等. 急性脑梗死早期血中 miRNAs 水平与脑侧支循环建立的关系[J]. *中风与神经疾病杂志*, 2016, 33(2): 100-103.
- [13] 张仕娟, 刘月华, 李乃坤, 等. 急性脑梗死患者血清 miR-181c 水平与认知功能受损的关系[J]. *山东医药*, 2016, 56(38): 90-92.
- [14] 杜守治, 董斌, 齐中华. 急性心肌梗死和急性脑梗死 miRNA 疾病标志物的初步筛查[J]. *中国医科大学学报*, 2017, 46(8): 681-685.
- [15] Naess H, Kurtz M, Thomassen L, et al. Serial NIHSS scores in patients with acute cerebral infarction[J]. *Acta Neurol Scand*, 2016, 133(6): 415-420.

(此文编辑 许雪梅)