

· 论 著 ·

血清 miR-33a、miR-29c、miR-126 联合检测对脑动脉粥样硬化的诊断价值

何 麟¹, 陈 忠¹, 赵春勤², 张浩春¹, 邓功建¹, 董先成¹

达州市中心医院:1. 脑血管病及介入治疗科;2. 泌尿外科, 四川达州 635000

摘 要:目的 探讨血清 miR-33a、miR-29c、miR-126 联合检测对脑动脉粥样硬化的诊断价值。方法 选择 2018 年 1 月至 2020 年 1 月该院收治的脑动脉粥样硬化患者 120 例为研究组, 同期体检健康者 120 例为对照组。根据不同脑动脉硬化严重程度将患者分为单动脉组(23 例)、双动脉组(53 例)、多动脉组(44 例)。采用实时荧光定量 PCR 检测研究组与对照组及不同脑动脉粥样硬化严重程度患者血清 miR-33a、miR-29c、miR-126 的相对表达水平。采用受试者工作特征曲线(ROC 曲线)分析血清 miR-33a、miR-29c、miR-126 对脑动脉粥样硬化的诊断价值。结果 研究组血清 miR-33a、miR-29c、miR-126 的相对表达水平明显高于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。血清 miR-33a、miR-29c、miR-126 在不同脑动脉粥样硬化严重程度患者中的相对表达水平差异有统计学意义($P < 0.05$)。血清 miR-33a、miR-29c、miR-126 单项检测对脑动脉粥样硬化诊断的灵敏度分别为 95.00%、93.00%、92.00%, 特异度分别为 95.00%、92.00%、91.00%。血清 miR-33a、miR-29c、miR-126 联合检测对脑动脉粥样硬化诊断的灵敏度为 96.67%, 特异度为 90.00%, 准确度为 93.33%。结论 血清 miR-33a、miR-29c、miR-126 可作为联合诊断脑动脉粥样硬化的潜在标志物。

关键词:miR-33a; miR-29c; miR-126; 脑动脉粥样硬化; 诊断

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2021.09.020 **中图法分类号:**R743.1

文章编号:1673-4130(2021)09-1110-04 **文献标志码:**A

Diagnostic value of combined detection of serum miR-33a, miR-29c and miR-126 in cerebral atherosclerosis

HE Lin¹, CHEN Zhong¹, ZHAO Chunqin², ZHANG Haochun¹, DENG Gongjian¹, DONG Xiancheng¹

1. Department of Cerebrovascular disease and Interventional Therapy; 2. Department of Urology, Dazhou Central Hospital, Dazhou, Sichuan 635000, China

Abstract: **Objective** To explore the diagnostic value of combined detection of serum miR-33a, miR-29c, and miR-126 for cerebral atherosclerosis. **Methods** Totally 120 patients with cerebral atherosclerosis admitted to the hospital from January 2018 to January 2020 were selected as the study group, and 120 healthy people were selected as the control group. According to the severity of atherosclerosis, the study group was divided into single artery group (23 cases), double artery group (53 cases) and multi artery group (44 cases). The relative expression levels of miR-33a, miR-29c and miR-126 were detected by real-time fluorescent quantitative PCR in the study group, control group and patients with different severity of cerebral atherosclerosis. The diagnostic value of serum miR-33a, miR-29c and miR-126 for cerebral atherosclerosis was analyzed by receiver operating characteristic curve (ROC curve). **Results** The relative expression levels of miR-33a, miR-29c and miR-126 in the study group were significantly higher than those in the control group ($P < 0.05$). The relative expression levels of serum miR-33a, miR-29c and miR-126 in diagnosis of different severity of cerebral atherosclerosis were significantly different ($P < 0.05$). The sensitivity of serum miR-33a, miR-29c and miR-126 in patients with cerebral atherosclerosis were 95.00%, 93.00% and 92.00% respectively, the specificity was 95.00%, 92.00% and 91.00% respectively. The sensitivity of combined detection of serum miR-33a, miR-29c and miR-126 in diagnosis of cerebral atherosclerosis was 96.67%, the specificity was 90.00%, the accuracy was 93.33%. **Conclusion** Serum miR-33a, miR-29c and miR-126 can be used as potential markers for combined diagnosis of cerebral atherosclerosis.

Key words:miR-33a; miR-29c; miR-126; cerebral atherosclerosis; diagnosis

作者简介:何麟,男,副主任医师,主要从事脑、脊髓血管病的手术及介入治疗研究。

本文引用格式:何麟,陈忠,赵春勤,等. 血清 miR-33a、miR-29c、miR-126 联合检测对脑动脉粥样硬化的诊断价值[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(9): 1110-1113.

缺血性卒中的特点是高发病率和高病死率^[1]。80%的缺血性卒中是由动脉粥样硬化造成的动脉闭塞或狭窄引起的^[2]。动脉粥样硬化是由高脂血症伴随的血管壁慢性炎症所致,这种炎症由多种细胞类型引发,如内皮细胞、平滑肌细胞和巨噬细胞^[3]。微小RNA(miRNA)是内源性非编码单链RNA,可通过识别位于mRNA靶标3'非翻译区(3'UTR)的结合位点来调节基因表达,参与多种生物学功能^[4-5]。血清中的miRNA常作为各种疾病的潜在生物标志物,如大肠癌、心肌梗死和急性粒细胞性白血病^[6]。已有研究显示,脑动脉粥样硬化患者血清miR-33a、miR-29c、miR-126的表达失调^[7-9]。本研究主要探讨血清miR-33a、miR-29c、miR-126联合检测对脑动脉粥样硬化的诊断价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择2018年1月至2020年1月在本院收治的脑动脉粥样硬化患者120例为研究组,其中男54例,女66例,平均年龄(61.4±11.3)岁。脑动脉粥样硬化是指脑动脉狭窄明显(≥50%),所有患者均接受CT和(或)核磁共振、脑多普勒超声、脑部超声、脑部磁共振脑血管成像、CT血管造影或数字减影血管造影、心脏超声检查或其他检查,以识别脑血管疾病和心脏病。排除患有确定或不确定病因、严重心脏病、近期心肌梗死或心绞痛疾病、严重感染、严重肾病或肝病、血栓性疾病或患有心脏栓塞性卒中的患者。根据动脉粥样硬化(≥50%)时闭塞的动脉数量确定脑动脉粥样硬化的严重程度,并将研究组分为单动脉组(23例)、双动脉组(53例)和多动脉组(44例)。另选择同期体检健康者120例为对照组,其中男60例,女60例,平均年龄(60.5±14.2)岁。研究组和对照组性别、年龄等一般资料比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。本研究得到本院伦理委员会的批准,并获得所有参与者的知情同意。

1.2 RNA提取与实时荧光定量PCR(qPCR) 2组受试者清晨抽取静脉血3 mL。将标本储存在未装有任何抗凝剂的试管中,4℃静置过夜,之后在室温下以3 000 r/min的速度离心10 min,取上清液即为血清。将血清小心地转移至Eppendorf管中,并保存至-80℃直至进一步处理。使用Trizol LS试剂从400 μL血清中提取总RNA(Takara,中国大连)。使用PrimeScript® miRNA cDNA合成试剂盒(Takara,日本)反转录成cDNA。qPCR采用RotorGENE-3000和RotorGene6 qPCR检测系统(Corbett Research America)一步法进行3个重复。所有miRNA引物均购自大连Takara公司。miRNA表达正常化用小核仁RNA U6。

1.3 统计学处理 使用Windows操作系统的SPSS17.0软件进行统计分析。在重复实验中使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算miRNA的相对表达水平,变化倍数=2-(平均值 $\Delta Ct_{\text{靶标}}$)-(平均值 $\Delta Ct_{\text{校正剂}}$), $\Delta Ct=Ct_{\text{靶标}}-Ct_{\text{校正剂}}$ 。每个样品的miRNA分数计算为miRNA的反向标准化信号,并通过减去常数(最小分数)进行调整,以使分数范围从0开始。采用受试者工作特征曲线(ROC曲线)分析血清miR-33a、miR-29c、miR-126对脑动脉粥样硬化的诊断价值。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,进一步两两比较采用LSD- t 检验,两组比较采用两独立样本 t 检验;计数资料以率表示,采用 χ^2 检验。以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 研究组与对照组血清miR-33a、miR-29c、miR-126的相对表达水平比较 血清miR-33a、miR-29c、miR-126的相对表达水平在研究组明显高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表1。

表1 研究组与对照组血清miR-33a、miR-29c、miR-126的相对表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	miR-33a	miR-29c	miR-126
研究组	120	1.93±0.34	1.34±0.19	1.64±0.24
对照组	120	0.05±0.01	0.11±0.03	0.08±0.02

2.2 血清miR-33a、miR-29c、miR-126单项或联合检测对脑动脉粥样硬化的诊断价值分析 ROC曲线分析结果显示,miR-33a单项检测对脑动脉粥样硬化诊断的ROC曲线下面积为0.95±0.02(95%CI=0.918 6~0.981 9),当miR-33a的阳性临界值为0.882 6,其诊断灵敏度为95.00%,特异度为95.00%。miR-29c单项检测对脑动脉粥样硬化诊断的ROC曲线下面积为0.93±0.02(95%CI=0.887 8~0.965 0),当miR-29c的阳性临界值为1.143 0,其诊断灵敏度为93.00%,特异度为92.00%。miR-126单项检测对脑动脉粥样硬化诊断的ROC曲线下面积为0.91±0.02(95%CI=0.871 6~0.955 3),当miR-126的阳性临界值为1.406 0,其诊断灵敏度为92.00%,特异度为91.00%。

将患有脑动脉粥样硬化的定义为真阳性,未患有脑动脉粥样硬化的为真阴性。以miR-33a的阳性临界值0.882 6、miR-29c的阳性临界值1.143 0、miR-126的阳性临界值1.406 0为诊断界限,三者满足其一者为联合诊断阳性。血清miR-33a、miR-29c、miR-126联合检测对脑动脉粥样硬化诊断的灵敏度为96.67%,特异度为90.00%,准确度为93.33%。见表2。

2.3 血清miR-33a、miR-29c、miR-126在不同脑动脉粥样硬化严重程度患者中的相对表达水平 血清

miR-33a、miR-29c、miR-126 在不同脑动脉粥样硬化严重程度患者中的相对表达水平差异有统计学意义 ($P<0.05$);且单动脉组患者的相对表达水平均低于双动脉组,双动脉组患者的表达水平均低于多动脉组,差异有统计学意义 ($P<0.05$)。见表 3。

表 2 血清 miR-33a、miR-29c、miR-126 联合检测对脑动脉粥样硬化的诊断四格表 (n)

联合诊断	病理结果		合计
	阳性	阴性	
阳性	116	12	128
阴性	4	108	112
合计	120	120	240

表 3 血清 miR-33a、miR-29c、miR-126 在不同脑动脉粥样硬化严重程度患者中的相对表达水平 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	miR-33a	miR-29c	miR-126
单动脉组	23	1.75±0.14	1.26±0.02	1.45±0.03
双动脉组	53	1.95±0.03	1.30±0.01	1.49±0.05
多动脉组	44	2.00±0.02	1.43±0.06	1.92±0.14
F		4.367	4.722	7.206
P		0.015	0.011	0.001

3 讨 论

脑动脉粥样硬化是缺血性卒中的最重要机制^[10]。然而,目前尚未发现评估脑动脉粥样硬化的特异性血清生物标志物^[11-12]。在本研究中,血清 miR-33a、miR-29c、miR-126 单项检测诊断脑动脉粥样硬化的灵敏度分别为 95.00%、93.00%、92.00%,特异度分别为 95.00%、92.00%、91.00%。miRNA 以高度稳定的形式存在于循环系统中,它们对核糖核酸酶、冻融循环和其他剧烈的实验条件具有抵抗力^[13-14]。血清样品可以在-20℃或-80℃的温度下保存数月,而不会显著降解 miRNA^[15]。因此,miRNA 被认为是理想的候选生物标志物。本研究结果显示,血清 miR-33a、miR-29c、miR-126 联合检测对脑动脉粥样硬化的诊断灵敏度为 96.67%,特异度为 90.00%,准确度为 93.33%,显示了较好的诊断效能。

本研究结果显示,血清 miR-33a、miR-29c、miR-126 的相对表达水平在研究组和对照组差异有统计学意义 ($P<0.05$);血清 miR-33a、miR-29c、miR-126 在不同脑动脉粥样硬化严重程度患者中的相对表达水平差异有统计学意义 ($P<0.05$)。表明血清 miRNA 是由于发生缺血性卒中后,从受损或循环的脑细胞释放而增加的,这与 MAYR 等^[16]的早期研究结果一致。炎症和免疫反应在动脉粥样硬化的发生和发展

中起关键作用^[17],miR-126 的上调抑制了血管细胞黏附分子-1 和肿瘤坏死因子 α 的表达,限制了白细胞对内皮的黏附,减少了与动脉粥样硬化过程有关的炎症反应^[18]。以往研究表明,miR-29c 通过调节编码细胞外基质蛋白(如胶原蛋白 A 和 3A)的 miRNA 靶标来调节脑动脉粥样硬化^[19]。由 miR-33a 和 miR-33b 组成的 miR-33 家族是 miRNA 介导的脂质代谢调控最典型的 miRNA 之一,而脂质代谢异常是动脉粥样硬化的基础^[20]。巨噬细胞特异性 miR-33 的丢失减少了高脂血症条件下的脂质蓄积和炎症,从而减少斑块负担,缓解动脉粥样硬化^[5]。抗 miR-33 治疗是降低动脉粥样硬化的潜在治疗手段。但是,研究组血清 miR-33a、miR-29c、miR-126 相对表达水平升高的原因尚不清楚。血清中的 miRNA 可能主要是由病变细胞释放的,因此,在细胞受伤或变性时会增加,这间接表明 miR-33a、miR-29c、miR-126 在脑血管系统正常发育中起重要作用。

综上所述,血清 miR-33a、miR-29c、miR-126 可作为联合诊断脑动脉粥样硬化的潜在生物标志物。

参考文献

[1] CHANG Y, HUANG W, SUN Q, et al. MicroRNA-634 alters nerve apoptosis via the PI3K/Akt pathway in cerebral infarction[J]. Int J Mol Med, 2018, 42(4): 2145-2154.

[2] 于玲,曹丽娟,孙静,等. 苏木乙酸乙酯提取液靶向调控 miRNA-99a 抑制动脉粥样硬化的作用机制研究[J]. 中国中医急症, 2019, 28(4): 27-31.

[3] LEI C, HECKER P I, TONG L, et al. Impact of microRNA-33a/b antagonism on atherosclerosis regression and stabilization in a nonhuman primate model[J]. Atheroscl Suppl, 2018, 32(1): 19-20.

[4] TANG F, YANG T L. microRNA-126 alleviates endothelial cells injury in atherosclerosis by restoring autophagic flux via inhibiting of PI3K/Akt/mTOR pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 495(1): 1482-1489.

[5] 周丽,任娟,秦欢,等. 血清 hs-CRP、Cys C、UA 水平与 H 型高血压合并脑梗死患者动脉粥样硬化程度的关系研究[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(12): 1465-1467.

[6] 张克连,郭静宜,戴若竹. 虾青素对 ApoE 基因敲除小鼠动脉粥样硬化的降脂、抗氧化和抗炎作用研究[J]. 中国免疫学杂志, 2020, 36(7): 794-798.

[7] GAO J, YANG S, WANG K, et al. Plasma miR-126 and miR-143 as potential novel biomarkers for cerebral atherosclerosis[J]. J Stroke Cerebrov Dis, 2019, 28(1): 38-43.

[8] PRICE N L, ROTLLAN N, CANFRÁN-DUQUE A, et al. Genetic dissection of the impact of miR-33a and miR-33b during the progression of atherosclerosis[J]. Cell reports, 2017, 21(5): 1317-1330.

[9] HUANG Y Q, LI J, HUANG C, et al. Plasma microRNA-29c levels are associated with carotid intima-media thickness and is a potential biomarker for the early detection of atherosclerosis[J]. *Cellul Physiol Biochem*, 2018, 50(2):452-459.

[10] RAMALHO L S, DS SILVEIRA L A M, FONSECA B C, et al. Width of sulcus and thickness of gyrus in patients with cerebral atherosclerosis; a new tool for the prevention of vascular cognitive impairment[J]. *Rev Assoc Med Bras*, 2018, 64(8):684-691.

[11] NAVARRO E, ADRIAN M, CRUZADO J M, et al. Unveiling ncRNA regulatory axes in atherosclerosis progression[J]. *Clin Transl Med*, 2020, 9(1):5-13.

[12] BUDDHA S S, POTHINENI R B. WP133; intra cerebral atherosclerosis is the major risk factor for stroke in post coronary artery bypass graft surgery patients[J]. *Europ J Med Res*, 2009, 14(9):1055-1062.

[13] LI Y, XIAO L, LI J, et al. microRNA profiling of diabetic atherosclerosis in a rat model[J]. *Europ J Med Res*, 2018, 23(1):55-59.

[14] SU Y, YUAN J, ZHANG F, et al. microRNA-181a-5p and microRNA-181a-3p cooperatively restrict vascular inflammation and atherosclerosis[J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(5):365-371.

[15] 刘亚密, 曾召林, 陈姣姣, 等. microRNA 调节细胞自噬影

响动脉粥样硬化[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2018, 26(12):95-101.

[16] MAYR M, ZAMPETAKI A, KIECHL S, et al. microRNA biomarkers for failing hearts[J]. *Europ Heart J*, 2013, 34(36):2782-2783.

[17] CHEN L Y, XIA X D, ZHAO Z W, et al. microRNA-377 inhibits atherosclerosis by regulating triglyceride metabolism through the DNA methyltransferase 1 in apolipoprotein E-knockout mice[J]. *Circ J*, 2018, 82(11):1522-1529.

[18] GAO J, KONG R, ZHOU X, et al. MiRNA-126 expression inhibits IL-23 mediated TNF- α or IFN- γ production in fibroblast-like synoviocytes in a mice model of collagen-induced rheumatoid arthritis[J]. *Apoptosis*, 2018, 23(11/12):607-615.

[19] ULRICH V, ROTLLAN N, ARALDI E, et al. Chronic miR-29 antagonism promotes favorable plaque remodeling in atherosclerotic mice[J]. *EMBO Mol Med*, 2016, 8(6):643-653.

[20] DISTEL E, BARRETT T J, CHUNG K, et al. miR33 inhibition overcomes deleterious effects of diabetes mellitus on atherosclerosis plaque regression in mice[J]. *Cir Res*, 2014, 115(9):759-769.

(收稿日期:2020-09-18 修回日期:2020-12-28)

(上接第 1109 页)

[5] JEFFREY G P, GORDON L, RAMM G. Hepatocellular carcinoma surveillance in Australia; time to improve the diagnosis of cirrhosis and use liver ultrasound[J]. *M J A*, 2020, 212(7):23-25.

[6] USAI-SATTA P, GIANNETTI C, OPPIA F, et al. The north American consensus on breath testing; the controversial diagnostic role of lactulose in SIBO[J]. *Am J Gastroenterol*, 2018, 113(3):440-446.

[7] JONES M L, CHUANG E, WAHL C, et al. Accuracy of glucose breath testing for small intestine bacterial overgrowth (SIBO) using endoscopy aspirate cultures as a reference standard; a meta-analysis[J]. *Am J Gastroenterol*, 2019, 114(2):659-660.

[8] ARUN K C, PAVITRA L, KRISHNAMURTHY A. RRI as diagnostic and follow up indicator in cirrhosis of the liver with hepatorenal syndrome and refractory ascites[J]. *J Assoc Physicians India*, 2019, 67(4):22-25.

[9] GALLAGHER C, SANDERS P, WONG C X. Anticoagulation for atrial fibrillation in cirrhosis of the liver; are low-dose non-vitamin K oral anticoagulants a reasonable alternative to warfarin[J]. *J Am Heart Assoc*, 2019, 8(5):11-13.

[10] WEERSINK R A, BOUMA M, BURGER D M, et al. Evi-

dence-based recommendations to improve the safe use of drugs in patients with liver cirrhosis[J]. *Drug Safety*, 2018, 41(9):1-11.

[11] COSTACHE I I, GARLEANU I, MITU O, et al. Correlations between biochemical profile and echocardiographic parameters in patients with cirrhosis of the liver without previous cardiovascular abnormalities[J]. *Revista de Chimie-Bucharest-Original*, 2018, 69(8):2213-2216.

[12] 张梦婷, 李修岭, 李毅, 等. 肝硬化与小肠细菌过度生长的关系[J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2019, 33(3):254-256.

[13] AHMADVAND A, ROBERT R, JOHN B, et al. The biopsychosocial-digital approach to health and disease; call for a paradigm expansion[J]. *J Med Internet Res*, 2018, 20(5):189-191.

[14] OSTROVERKHOV P, SEMKINA A, NIKITIN A, et al. Human serum albumin as an effective coating for hydrophobic photosensitizes immobilization on magnetic nanoparticles[J]. *J Magnet Magnet Mater*, 2019, 475(3):108-114.

[15] ARUN K C, PAVITRA L, KRISHNAMURTHY A. RRI as diagnostic and follow up indicator in cirrhosis of the liver with hepatorenal syndrome and refractory ascites[J]. *J Assoc Physic India*, 2019, 67(4):22-25.

(收稿日期:2020-08-26 修回日期:2020-12-30)