

股骨头坏死患者血清 miRNA-210, miRNA-23b 检测的应用价值*

朱超¹, 姜彦峰² (1. 陕西中医药大学第一附属医院骨三科, 陕西咸阳 712000;
2. 咸阳市中心医院检验科, 陕西咸阳 712000)

摘要:目的 探讨血清微小 RNA (microRNA, miRNA)-210, -23b 检测在股骨头坏死患者中的临床应用价值。方法 收集 2015 年 1 月~2017 年 1 月于陕西中医药大学第一附属医院骨三科住院行股骨颈骨折内固定手术治疗的 135 例患者的血清及临床资料, 依据是否发生股骨头坏死分为坏死组和非坏死组, 其中坏死组 27 例, 非坏死组 108 例。采用实时荧光定量 PCR (Real time-PCR, RT-PCR) 技术检测血清 miRNA-210, miRNA-23b 的表达。比较分析血清 miRNA-210, miRNA-23b 的变化与股骨头坏死之间的关系。结果 坏死组血清 miRNA-210, miRNA-23b 表达分别为 $(0.19 \pm 0.03, 0.21 \pm 0.05)$; 非坏死组血清 miRNA-210, miRNA-23b 表达分别为 $(0.92 \pm 0.18, 0.87 \pm 0.17)$ 。坏死组血清 miRNA-210, miRNA-23b 表达分别与非坏死组比较显著下调, 其差异均有统计学意义 ($t=35.29, 31.20, P<0.01$)。采用受试者工作特征曲线 (ROC 曲线) 分析血清 miRNA-23b, miRNA-210 的 AUC 分别为 $0.790 (95\% CI: 0.687 \sim 0.892, P=0.000)$ 和 $0.743 (95\% CI: 0.633 \sim 0.854, P=0.000)$ 。miRNA-23b, miRNA-210 在最佳临界值处诊断股骨头坏死的敏感度和特异度分别为 95.7% 和 93.9%, 91.5% 和 92.3%。结果显示血清 miRNA-23b, miRNA-210 的表达对诊断股骨头坏死的发生有临床意义。结论 检测血清 miRNA-210, miRNA-23b 表达可预测股骨头坏死的发生, 估计病情的发展状况。

关键词: 股骨颈骨折复位内固定术; 股骨头坏死; miRNA-210; miRNA-23b

中图分类号: R687.4; Q503 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2017)04-057-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2017.04.016

Application Value of Detecting Serum Micrnas-210, miRNA-23b in the Patients with the Femoral Head Necrosis

ZHU Chao¹, JIANG Yan-feng²

(1. the Third Departement of Orthopaedics, the First Affiliated Hospital of Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Shaanxi Xianyang 712000, China; 2. Departement of Clinical Laboratory, the Central Hospital of Xianyang, Shaanxi Xianyang 712000, China)

Abstract: Objective To investigate the application value of detection of serum miRNA-210, miRNA-23b in the patients with the femoral head necrosis. **Methods** The serum and clinical data of 135 patients with the internal fixation operation for the femoral neck fracture were collected. The patients were divided into the necrosis group (27 cases) and non-necrosis group (108 cases), used the real-time fluorescent quantitative PCR (Real time-PCR, RT-PCR) technology to detect serum miRNA-210, miRNA-23b expression in comparatively analyzing the relationship between the changes of serum miRNA-210, 23b and occurrence of the femoral head necrosis. **Results** The serum microRNA-210, -23b expression in the necrosis group were $0.19 \pm 0.03, 0.21 \pm 0.05$, which in the non-necrosis group were 0.92 ± 0.18 and 0.87 ± 0.17 . The serum microRNA-210, -23b expression in the necrosis group were significantly lower than those in the non-necrosis group, the difference had statistical significance ($P<0.01$). The analysis results from the receiver-operating characteristic curve (ROC curve) showed that AUC of serum miRNA-210, miRNA-23b expression were $0.790 (95\% CI: 0.687 \sim 0.892, P=0.000)$ and $0.743 (95\% CI: 0.633 \sim 0.854, P=0.000)$, respectively. The sensitivity and specificity of miRNA-210 and miRNA-23b at the best threshold in diagnosis of the femoral head necrosis were 95.7% and 93.9%, 91.5% and 92.3%, respectively. The analysis results showed that the serum miRNA-210, -23b expression had clinical significance in diagnosis of the femoral head necrosis. **Conclusion** Detection of serum miRNA-210, -23b expression can predict occurrence of the femoral head necrosis, estimate development condition of the disease.

Keywords: the internal fixation operation for the femoral neck fracture; the femoral head necrosis; miRNA-210; miRNA-23b

股骨颈骨折是髋部最常见的骨折之一。股骨头坏死的机率较高。微小 RNA (microRNA, miRNA) 是一类短的 (大约 20~22 个核苷酸) 非编码 RNA, 其作用机制为介导 RNA 在翻译水平干

* 作者简介: 朱超 (1975—), 男, 硕士研究生, 副主任医师, 研究方向: 股骨头坏死的诊断与治疗, E-mail: 280310216@qq.com。

通讯作者: 姜彦峰 (1973—), 男, 主管检验师, 研究方向: 疾病的基因诊断, E-mail: 13892998280@163.com。

扰蛋白质的表达^[1]。近年来的研究结果显示 miRNAs 参与骨细胞的代谢和骨骼疾病的病变发展过程,尤其在股骨头坏死的病理过程中发挥重要作用。本研究采用实时逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)技术检测股骨颈骨折复位内固定术患者血清中 miRNA-23b, miRNA-210 的表达,来发现这两种标志物在股骨头坏死发生机制中的作用,进而为其诊断和治疗提供基因依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象 选取 2015 年 1 月~2017 年 1 月于陕西中医药大学第一附属医院骨三科住院行股骨颈骨折内固定手术的 135 例患者,依据是否发生股骨头坏死分为坏死组和非坏死组。其中坏死组 27 例,男性 11 例,女性 15 例,年龄 55.7 ± 3.9 岁,体重质量 56.8 ± 5.3 kg; 非坏死组 108 例,男性 42 例,女性 66 例,年龄 56.7 ± 3.6 岁,体重质量 55.2 ± 5.8 kg。两组患者的性别、年龄、体重质量比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。股骨头坏死诊断标准^[2]:X 线和 CT 检查显示早期表现为骨小梁模糊或股骨头密度不均匀;中晚期可见大块骨碎裂、塌陷及股骨头不完整,甚至出现骨性关节炎的改变。所有患者符合骨折手术切开复位内固定指征。排除标准:长期使用大剂量激素或者酗酒患者;恶性肿瘤导致的病理性股骨颈骨折;并发其他部位的骨折患者。本研究得到本院医学伦理委员会的同意以及所有参与者的知情同意。

1.2 试剂和仪器 RNA 提取采用 mirVANA PARIS 试剂盒。PCR 试剂盒采用上海久盛医疗用品有限公司产品。lightCycler 荧光 PCR 仪采用德国 Roche 公司产品。

1.3 研究方法

1.3.1 标本采集:所有患者禁食 12 h 后采集静脉血。采集的血液于 4°C 3 000 r/min 离心 10 min,取上清液,再于 4°C 3 000 r/min 离心 10 min,取上清液,将所得的血清标本分装于无 RNA 酶的冻存管中, -80°C 保存。

1.3.2 RNA 提取:采用 Trizol 法提取血清中的总 RNA,采用 RT-PCR 技术研究股骨头坏死患者血清中 miRNA-23b, miRNA-210 的表达。

1.3.3 miRNAs 表达量测定:①RNA 提取:在冰上融化血清,吸取 100 μl ,加入等体积的变性液,涡旋混匀,在冰上孵育 5 min;再加入等体积的酸/酚/氯仿,涡旋混匀 1 min,冷冻离心 5 min,重复此步骤三次,再与 1.25 倍体积的无水乙醇充分混合,过柱,洗柱 2 次,将所得的 RNA 用缓冲液稀释;混匀后,加样于 1 g/dl 琼脂糖凝胶的样品孔内进行电泳。电泳条件:70 伏电压电泳 15 min。电泳后

的琼脂糖凝胶在紫外透射分析仪下观察。若 RNA 在 5s, 18 s 和 28s 条带清晰可见,表示 RNA 可用于反转录。②RNA 纯度检测:用紫外分光光度计测定 RNA 溶液在 260 nm 和 280 nm 波长下的光密度值。若 $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ 的比值在 1.7~2.0 间则考虑总 RNA 溶液无杂质。将合格的总 RNA 于 -80°C 保存备用。③RNA 反转录:根据 TaqMall microRNA Reverse Transcripts Kits 操作说明书进行 RT-PCR。采用 β -actin 作为内对照,用 pfimer5 软件设计引物,miRNA-23b 引物序列为正义链:5'-AATCGGAAGCCTAACTACAGCG-3',反义链:5'-GTCCCAGATGAGCATTGGCA-3',扩增产物长度为 310bp。miRNA-210 的引物序列为正义链:5'-TTAATGCTAATCGTGACT-3',反义链:5'-ACCTGAGAGTAGACCAGA-3',产物长度 330bp。 β -actin 的引物序列为正义链:5'-AGGCACTGGGGCTTCATCTGAC-3',反义链:5'-GCCTTCATCCCTTTGCTTAG-3',产物长度为 630bp。PCR 反应体系如下:10 μl 2 \times Taqman 通用的 PCR 预混物,1 μl 20 \times miRNA 特异性引物,1.33 μl cDNA,7.67 μl 水;反应条件: 95°C 变性 10 min, 95°C 15 s, 60°C 1 min, 50 个循环,置于 4°C 结束反应。在扩增体系中,内参照 β -actin 分别与 miRNA-23b, miRNA-210 在同一体系中共同扩增。④miRNAs 表达量计算:将扩增产物进行电泳。电泳后,在图像处理系统上分析、计算,得出 miRNA-23b, miRNA-210, β -actin 的光密度,以 β -actin 的光密度为参考物,求出 miRNA-23b, miRNA-210 光密度的变化值(ΔCT),以 $2^{-\Delta\text{CT}}$ 得到 miRNA-23b, miRNA-210 相对表达量。

1.4 统计学分析 资料采用 SPSS21 统计软件进行分析,计量数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,其差异的比较采用 t 检验。计数资料比较采用卡方检验。采用受试者工作特征曲线(ROC 曲线)评价血清 miRNA-23b, miRNA-210 的临床意义。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 影响因素分析 股骨颈骨折患者按受伤时间分类,其中 <12 h 者 38 例, $12 \sim 48$ h 者 75 例, >48 h 者 22 例;三段时间发生股骨头坏死者依次为 4 例, 14 例和 9 例。采用 Garden 分型对股骨颈骨折分类,I 型 18 例, II 型 22 例, III 型 64 例, IV 型 31 例;各型发生坏死者依次为 0 例, 3 例, 11 例, 13 例。按复位方法进行分类,其中闭合复位者 51 例,发生坏死者 14 例;切开复位 84 例,发生坏死者 13 例。采用 Garden 指数对股骨颈骨折后的复位质量进行评判,I 级 55 例, II 级 41 例, III 级 30 例, IV 级

9例。各级发生坏死者依次为2例,8例,14例,3例。受伤时间 >48 h的股骨头缺血性坏死发生率与受伤时间 <12 h比较显著增高,差异有统计学意义($\chi^2=2.50, P=0.037$),与 $12\sim48$ h比较,差异无统计学意义($\chi^2=0.39, P=0.536$)。骨折分型为Ⅲ和Ⅳ型的股骨头缺血性坏死的发生率与Ⅰ型比较显著增高,差异有统计学意义($\chi^2=5.16, 10.92, P=0.000, 0.000$);Ⅱ型和Ⅰ型比较则差异无统计学意义($\chi^2=1.39, P=0.233$)。复位方式选择闭合式的股骨头缺血性坏死的发生率与选择开放式的患者比较显著增高,差异有统计学意义($\chi^2=2.53, P=0.033$);复位质量为Ⅱ~Ⅳ级的患者股骨头缺血性坏死的发生率与Ⅰ型的比较显著增高,差异有统计学意义($\chi^2=6.97, 15.37, 11.30$, 均 $P=0.000$);综上所述,导致股骨颈骨折内固定术后患者股骨头缺血性坏死发生率升高的因素主要有受伤至手术时间 >48 h、骨折分型Ⅲ~Ⅳ型、复位方式选择闭合式及Garden指数为Ⅱ~Ⅳ级。

2.2 各组血清 miRNA-23b, miRNA-210 检测结果比较 坏死组血清 miRNA-23b, miRNA-210 水平($0.21 \pm 0.05, 0.19 \pm 0.03$)分别与非坏死组 miRNA-23b, miRNA-210 ($0.87 \pm 0.17, 0.92 \pm 0.18$)比较呈现下调,其差异均有统计学意义($t=31.20, 35.29, P<0.01$)。

2.4 ROC 曲线分析 血清 miRNA-23b, miRNA-210 的 AUC 分别为 0.790 (95% CI: 0.687~0.892, $P=0.000$)和 0.743 (95% CI: 0.633~0.854, $P=0.000$)。根据 SPSS 统计结果计算出 miRNA-23b, miRNA-210 在最佳临界值处诊断股骨头坏死发生的敏感度和特异度分别为 95.7%和 93.9%, 91.5%和 92.3%。以上提示血清 miRNA-23b, miRNA-210 对股骨头坏死的发生有诊断意义。血清 miRNA-23b, miRNA-210 ROC 曲线见图 1。

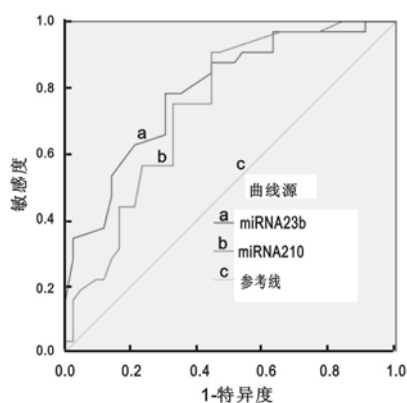


图1 检测 miRNA-23b, miRNA-210 在诊断股骨头坏死中的 ROC 曲线

3 讨论 股骨颈骨折手术治疗时,采用切开复位可能引起髋关节周围血管挫伤,导致血管内膜损伤引起血小板聚集黏附,最终形成栓塞,堵塞血管,使股骨头供血不足,导致慢性的股骨头缺血性坏死^[3]。

miRNAs 在股骨头坏死发病过程中的调控机制日益引起研究者的重视。研究认为 miRNAs 在骨代谢、骨细胞分化、细胞凋亡及新生血管形成中可能发挥关键的调控作用。Germana 等^[4]建立小鼠后肢缺血模型研究 miRNA-210 的作用机制,他们通过抑制组织 miRNA-210 的表达后发现缺血部位组织细胞凋亡增加。Yamasaki 等^[5]通过对股骨头坏死患者的研究证实,上调 miRNA-210 促进股骨头坏死区的血管生成及骨修复。Yuan 等^[6]发现 miRNA-210 在激素性股骨头坏死患者组织中呈现差异表达,认为 miR-210 可能促进细胞的生成和分化。本实验结果显示,坏死组血清 miR-210 的表达显著下调,推测其可能与股骨颈骨折复位手术后患者骨微血管内皮细胞的受损有关,其表达的下调是引起的股骨头微循环障碍导致股骨头坏死发生的重要原因。

近年来的研究表明,miRNA-23b 在肺、心脏等富含血管内皮细胞的组织器官中呈现高表达^[7]。miRNA-23b 的靶基因及多条相关信号通路,在细胞凋亡、增殖、分化,血管形成及干细胞分化方面具有重要的调节作用^[7]。Zhou 等^[8]的研究认为 miRNA-23b 表达与调节内皮细胞功能及维持血管的完整性有关。miRNA-23b 的过表达可能与新生血管的形成有关。另外的研究认为上调 miR-23b 可能抑制骨微血管内皮细胞的凋亡和促进新生血管形成,其对激素性股骨头坏死的防治具有正向作用^[7]。本实验结果显示,坏死组的血清 miR-23b 的表达显著下调,推测 miR-23b 通过调控细胞凋亡或血管形成,最终干预股骨头坏死的病理过程。

利用 ROC 曲线评价 miRNA-210, miRNA-23b 的结果显示,两标志物检测在诊断股骨头坏死的发生中有临床意义($P<0.01$)。提示两标志物可能参与股骨头坏死的病理过程,可能与其发病机制密切相关。进一步的研究显示导致股骨颈骨折内固定术后患者股骨头缺血性坏死发生的因素主要有受伤时间 >48 h、骨折分型Ⅲ~Ⅳ型、复位方式选择闭合式及Garden指数为Ⅱ~Ⅳ级。检测血清 miRNA-210, miRNA-23b 表达结合上述股骨头缺血性坏死发生的因素可用来评价该疾病的发生及病程的进展,并为其早期进行干预治疗提供依据。

(下转 151 页)

虽然与股骨头坏死相关 miRNAs 的研究仍处于探索阶段,miRNAs 在股骨头坏死病理过程中的具体调控机制及信号通路尚不完全明确,但 miRNA 在股骨头坏死的研究已显示出广阔的前景,对股骨头坏死的早期诊断、治疗具有重大的临床意义。深入研究 miRNAs 调控机制,可能为股骨头坏死的早期诊断和治疗提供更多选择。

参考文献:

- [1] 徐庆雷,朱宝林,马小波,等. 类风湿关节炎患者外周血单个核细胞 microRNA-206 表达水平的变化及意义[J]. 现代检验医学杂志,2014,29(5):64-66.
Xu QL, Zhu BL, Ma XB, et al. Level of microRNA-206 in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis and their significance[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2014, 29(5): 64-66.
- [2] 刘福尧,刘承伟,吴声忠. 不同置钉方式修复中青年移位型股骨颈骨折:复位质量及股骨头坏死率对比[J]. 中国组织工程研究,2015,19(31):4983-4988.
Liu FY, Liu CW, Wu SZ. Different screw placement schemes in the treatment of middle-aged and young patients with displaced femoral neck fracture: reduction quality and femoral head necrosis rate[J]. Chinese Journal of Tissue Engineering Research, 2015, 19(31): 4983-4988.
- [3] 赵红星,黄媛霞,梁秋冬,等. 股骨颈骨折复位内固定术后股骨头坏死的相关危险因素分析[J]. 西安交通大学学报(医学版),2016,37(6):906-909.
Zhao HX, Huang YX, Liang QD, et al. The correla-

tion factors for femoral head necrosis after internal fixation in femoral neck fracture[J]. Journal of Xi'an Jiaotong University (Medical Edition), 2016, 37(6): 906-909.

- [4] Zaccagnini G, Maimone B, Di Stefano V, et al. Hypoxia-induced miR-210 modulates tissue response to acute peripheral ischemia[J]. Antioxid Redox Signal, 2014, 21(8): 1177-1188.
- [5] Yamasaki K, Nakasa T, Miyaki S, et al. Angiogenic microRNA-210 is present in cells surrounding osteonecrosis[J]. J Orthop Res, 2012, 30(8): 1263-1270.
- [6] Yuan H, Christina VR, Guo C, et al. Involvement of microRNA-210 demethylation in steroid-associated osteonecrosis of the femoral head[J]. Scientific Reports, 2015(6): 20046.
- [7] 赵丁岩,郭万首,俞庆声,等. 淫羊藿苷对激素诱导损伤骨微血管内皮细胞微小 RNA 表达的影响[J]. 中国组织工程研究,2016,20(15):2140-2147.
Zhao DY, Guo WS, Yu QS, et al. Effects of icariin on microRNAs expression in bone microvascular endothelial cells in steroids-induced femoral head lesions[J]. Chinese Journal of Tissue Engineering Research, 2016, 20(15): 2140-2147.
- [8] Zhou Q, Gallagher R, Ufret-Vincenty R, et al. Regulation of angiogenesis and choroidal neovascularization by members of microRNA-23~27~24 clusters[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108(20): 8287-8292.

收稿日期:2017-04-09

修回日期:2017-05-24