

急性缺血性脑卒中患者血清 miR-433-5p 表达水平及其与 Hcy 及 MMP-9 的相关性研究

王 景, 董 坤, 黄 优, 陈海恋, 林兆信, 何超明

(三亚中心医院/海南省第三人民医院神经内科, 海南三亚 572000)

摘要:目的 探讨急性缺血性脑卒中 (acute ischemic stroke, AIS) 患者血清微小核糖核酸 (micro RNA, miR) -433-5p 表达与同型半胱氨酸 (homocysteine, Hcy) 及基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9) 的相关性, 为 AIS 的诊疗提供依据。**方法** 选取 2019 年 1 月~2021 年 3 月三亚中心医院收治的 106 例 AIS, 采用美国国立卫生研究院卒中量表 (NIHSS) 评分分为轻度组 ($n=30$, NIHSS 评分 <5 分)、中度组 ($n=48$, $5 \leq$ NIHSS 评分 ≤ 20 分)、重度组 ($n=28$, national institute of health stroke scale, NIHSS 评分 >20 分)。另选择 60 例健康体检正常者作为对照组。采用实时荧光定量 PCR 检测各组血清 miR-433-5p 表达水平。应用 ROC 曲线分析血清 miR-433-5p, Hcy 及 MMP-9 水平对 AIS 诊断的价值, Pearson 相关分析 AIS 患者血清 miR-433-5p 表达水平与 Hcy 及 MMP-9 的相关性。**结果** AIS 组血清 miR-433-5p (2.96 ± 0.94), Hcy ($19.14 \pm 5.30 \mu\text{mol/L}$) 及 MMP-9 ($151.36 \pm 29.75 \mu\text{g/L}$) 水平高于对照组 (0.81 ± 0.17 , $5.65 \pm 1.13 \mu\text{mol/L}$, $77.93 \pm 11.28 \mu\text{g/L}$), 差异均有统计学意义 ($t=16.718, 14.216, 10.152$, 均 $P < 0.001$)。重度组血清 miR-433-5p (4.36 ± 1.20), Hcy ($29.12 \pm 6.48 \mu\text{mol/L}$) 及 MMP-9 ($227.15 \pm 48.20 \mu\text{g/L}$) 水平均高于中度组 (2.80 ± 0.91 , $18.20 \pm 4.86 \mu\text{mol/L}$, $140.83 \pm 25.64 \mu\text{g/L}$) 和轻度组 (1.83 ± 0.57 , $11.35 \pm 3.24 \mu\text{mol/L}$, $85.27 \pm 11.93 \mu\text{g/L}$), 差异均有统计学意义 ($t=9.847 \sim 14.636$, 均 $P < 0.001$)。ROC 曲线显示, miR-433-5p 诊断 AIS 的曲线下面积 (AUC) 最大 (0.851 , $95\% \text{CI}: 0.792 \sim 0.908$), 其敏感度和特异度分别为 89.4% , 82.0% 。相关分析显示, AIS 患者血清 miR-433-5p 表达水平与 Hcy 及 MMP-9 均呈正相关 ($r=0.842, 0.714$, $P < 0.01$)。**结论** 血清 miR-433-5p 表达水平在 AIS 患者中明显升高, 且与 Hcy 及 MMP-9 水平相关, 有望作为 AIS 诊断的有用标志物。

关键词: 急性缺血性脑卒中; 微小核糖核酸 -433-5p; 同型半胱氨酸; 基质金属蛋白酶 -9

中图分类号: R743.3; R392.11 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414 (2022) 03-087-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2022.03.018

Expression of Serum miR-433-5p and Its Correlation with Hcy and MMP-9 in Patients with Acute Ischemic Stroke

WANG Jing, DONG Kun, HUANG You, CHEN Hai-lian, LIN Zhao-xin, HE Chao-ming (Department of Neurology, Sanya Central Hospital/ the Third People's Hospital of Hainan Province, Hainan Sanya 572000, China)

Abstract: Objective To investigate the correlation between serum miR-433-5p expression and homocysteine (Hcy) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in patients with acute ischemic stroke (AIS), so as to provide basis for the diagnosis and treatment of AIS. **Methods** 106 cases of AIS admitted to Sanya Central Hospital from January 2019 to March 2021 were selected. The national institutes of health stroke scale (NIHSS) score were used to divide the patients into mild group ($n=30$, NIHSS score <5), moderate group ($n=48$, $5 \leq$ NIHSS score ≤ 20), and severe group ($n=28$, NIHSS score >20). Another 60 healthy subjects were selected as control group. Real-time fluorescent quantitative PCR was used to detect the expression of serum miR-433-5p in each group. The diagnostic value of serum levels of miR-433-5p, Hcy and MMP-9 in AIS patients were analyzed by ROC curve. Pearson correlation analysis of serum levels of miR-433-5p and their correlation with Hcy and MMP-9 in AIS patients. **Results** The levels of serum miR-433-5p (2.96 ± 0.94), Hcy ($19.14 \pm 5.30 \mu\text{mol/L}$) and MMP-9 ($151.36 \pm 29.75 \mu\text{g/L}$) in AIS group were higher than those in control group (0.81 ± 0.17 , $5.65 \pm 1.13 \mu\text{mol/L}$, $77.93 \pm 11.28 \mu\text{g/L}$), the differences were statistically significant ($t=16.718, 14.216, 10.152$, all $P < 0.001$). The levels of serum miR-433-5p (4.36 ± 1.20), Hcy ($29.12 \pm 6.48 \mu\text{mol/L}$) and MMP-9 ($227.15 \pm 48.20 \mu\text{g/L}$) in severe group were higher than those in moderate group (2.80 ± 0.91 , $18.20 \pm 4.86 \mu\text{mol/L}$, $140.83 \pm 25.64 \mu\text{g/L}$) and mild group (1.83 ± 0.57 , $11.35 \pm 3.24 \mu\text{mol/L}$, $85.27 \pm 11.93 \mu\text{g/L}$), the differences were statistically significant ($t=9.847 \sim 14.636$, all $P < 0.001$). ROC curve showed

基金项目: 海南省医药卫生科研基金项目 (18A200005)。

作者简介: 王景 (1981-), 本科, 女, 副主任医师, 主要从事临床神经内科疾病研究, E-mail: a58398895a@163.com。

that the area under the curve (AUC) of miR-433-5p in the diagnosis of AIS was the largest (0.851, 95% CI: 0.792 ~ 0.908), with a sensitivity of 89.4% and specificity of 82.0%, respectively. Relevant analysis showed that levels of serum miR-433-5p were positively correlated with Hcy and MMP-9 in patients with AIS ($r=0.842, 0.714, P < 0.01$). **Conclusion** Serum miR-433-5p expression level was significantly increased in AIS patients, and were correlated with Hcy and MMP-9 levels, which is expected to be a useful marker for AIS diagnosis.

Keywords: acute ischemic stroke; miR-433-5p; homocysteine; matrix metalloproteinase-9

急性缺血性脑卒中 (acute ischemic stroke, AIS) 是严重危害人类生命健康和生活质量的急性脑血管疾病^[1]。微小核糖核酸 (microRNA, miRNA) 是一类非编码小分子 RNA, 参与 AIS 的发生发展^[2]。研究表明, miR-433-5p 的异常表达与 AIS 的发生发展密切相关, 有望作为 AIS 诊断的潜在指标^[3]。同型半胱氨酸 (homocysteine, Hcy) 及基质金属蛋白酶-9 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9) 可反映动脉粥样硬化斑块发展程度, 参与 AIS 的组织损伤和炎症反应过程, 是 AIS 发生的主要危险因素^[4-5]。本研究通过检测血清 miR-433-5p 在 AIS 中表达情况, 分析其与 Hcy 及 MMP-9 的相关性, 探讨 miR-433-5p 对 AIS 的诊断价值, 有助于指导 AIS 的诊疗。

1 材料与方法

1.1 研究对象 收集 2019 年 1 月 ~ 2021 年 3 月在三亚中心医院收治的 106 例 AIS, 其中男性 72 例, 女性 34 例, 年龄 37 ~ 86 (58.12 ± 9.64) 岁。纳入标准: ①符合《中国急性缺血性脑卒中诊治指南 (2018 年)》^[6] 诊断标准; ②经头颅 CT 或 MRI 检查显示缺血性病灶。排除标准: 脑外伤及其他脑血管疾病者。根据美国国立卫生研究院卒中量表 (national institutes of health stroke scale, NIHSS) 评估患者的神经功能缺损程度, 其中轻度神经功能缺损 30 例 (轻度组, NIHSS 评分 < 5 分), 中度神经功能缺损 48 例 (中度组, $5 \leq$ NIHSS 评分 ≤ 20 分), 重度神经功能缺损 28 例 (重度组, NIHSS 评分 > 20 分)。另选择健康体检正常者 60 例作为对照组, 其中男性 42 例, 女性 18 例, 年龄 40 ~ 85 (59.37 ± 9.10) 岁。各组性别、年龄等资料比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

1.2 仪器与试剂 ABI 7500 型荧光定量 PCR 仪 (ABI 公司); PCR 试剂盒, 逆转录试剂盒和 TRIzol 试剂盒 (Qiagen 公司); AU5800 全自动生化分析仪 (贝克曼), HCY 试剂盒 (上海生物科技有限公司), MMP-9 试剂盒 (武汉赛培生物科

技有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 miR-433-5p: 采集研究对象静脉血 3 ml, 离心分离血清, 应用实时荧光定量聚合酶链反应检测 miR-433-5p。上游引物: 5'-ATACTGGCATCATGACTGTAC-3', 下游引物: 5'-GC ATCGATGTAAGTGTGAGT-3'。PCR 总反应体系为 20 μ l: 1 μ l 引物及探针 Mix, 10 μ l TaqMan 通用混合物溶液, 1.33 μ l 反转录产物互补 DNA, 7.67 μ l 无核酸酶的水; 扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s, 45 个循环。

1.3.2 Hcy 及 MMP-9 检测: 另采集研究对象静脉血 2 ml, 使用贝克曼 AU5800 全自动生化分析仪检测 Hcy 水平; 采用酶联免疫吸附法测定 MMP-9 水平。

1.4 统计学分析 SPSS20.0 统计软件分析, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用方差分析, 两两比较采用 SNK- q 检验; 组间比较采用 t' 检验。绘制受试者工作特征曲线 (ROC) 分析血清 miR-433-5p, Hcy 及 MMP-9 水平对 AIS 的诊断价值。相关性分析采用 Pearson 相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AIS 组和对照组血清 miR-433-5p, Hcy 及 MMP-9 水平比较 与对照组比较, AIS 组血清 miR-433-5p (2.96 ± 0.94 vs 0.81 ± 0.17), Hcy ($19.14 \pm 5.30 \mu\text{mol/L}$ vs $5.65 \pm 1.13 \mu\text{mol/L}$) 及 MMP-9 水平 ($151.36 \pm 29.75 \mu\text{g/L}$ vs $77.93 \pm 11.28 \mu\text{mol/L}$) 升高, 差异均有统计学意义 ($t=16.718, 14.216, 10.152$, 均 $P < 0.001$)。

2.2 不同神经功能缺损患者血清 miR-433-5p, Hcy 及 MMP-9 水平比较 见表 1。与中度组和轻度组比较, 重度组血清 miR-433-5p, Hcy 及 MMP-9 水平均升高 ($t=9.847 \sim 14.636$, 均 $P < 0.05$), 且中度组血清 miR-433-5p, Hcy 及 MMP-9 水平均高于轻度组 ($t=11.713, 8.425, 7.732$, 均 $P=0.000$), 差异均有统计学意义。

表 1 不同神经功能缺损患者血清 miR-433-5p, Hcy 及 MMP-9 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

项目	轻度组 ($n=30$)	中度组 ($n=48$)	重度组 ($n=28$)	F 值	P 值
miR-433-5p	1.83 ± 0.57	2.80 ± 0.91	4.36 ± 1.20	12.918	< 0.001
Hcy ($\mu\text{mol/L}$)	11.35 ± 3.24	18.20 ± 4.86	29.12 ± 6.48	9.650	< 0.001
MMP-9 ($\mu\text{g/L}$)	85.27 ± 11.93	140.83 ± 25.64	227.15 ± 48.20	7.934	< 0.001

2.3 血清 miR-433-5p, Hcy 及 MMP-9 水平对 AIS 的诊断价值 见表 2 和图 1。miR-433-5p 诊断 AIS 的 AUC 为 0.851 (95%CI: 0.792 ~ 0.908), 高于 Hcy (0.756, 95%CI: 0.695 ~ 0.814) 及 MMP-9 (0.698,

95%CI: 0.637 ~ 0.756), 差异有统计学意义 ($Z=6.472, 8.151$, 均 $P < 0.05$), 敏感度和特异度分别为 89.4% 和 82.0%。

表 2 血清 miR-433-5p, Hcy 及 MMP-9 水平对 AIS 的诊断价值

项目	最佳临界值	AUC (95%CI)	敏感度 (%)	特异度 (%)	阳性预测值 (%)	阴性预测值 (%)
miR-433-5p	1.96	0.851 (0.792 ~ 0.908)	89.4	82.0	85.3	86.2
Hcy($\mu\text{mol/L}$)	14.63	0.756 (0.695 ~ 0.814)	75.2	72.8	75.0	73.6
MMP-9($\mu\text{g/L}$)	118.35	0.698 (0.637 ~ 0.756)	70.6	67.5	71.2	68.2

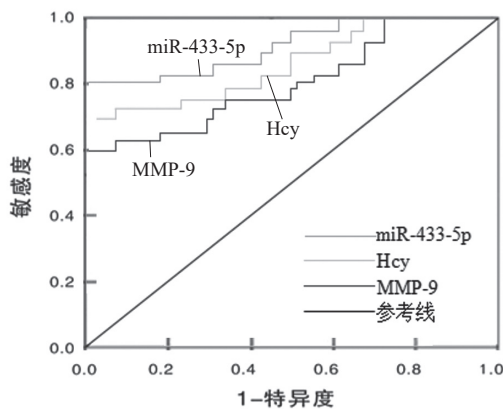


图 1 血清 miR-433-5p, Hcy 及 MMP-9 水平诊断 AIS 的 ROC 曲线

2.4 miR-433-5p 与 Hcy, MMP-9 的相关性分析 见图 2。Pearson 相关分析显示, AIS 患者血清 miR-433-5p 表达水平与 Hcy 及 MMP-9 均呈正相关

($r=0.842, 0.714$, 均 $P < 0.01$)。

3 讨论

急性缺血性脑卒中 (AIS) 是最常见的脑卒中类型, 其致残率和死亡率较高, 位居全球第二位, 早期诊断、早期治疗及早期康复对该病的救治至关重要。目前, 关于 AIS 的早期诊断具有较大的挑战性, 仍需要改进 AIS 的诊断生物标志物。同型半胱氨酸 (Hcy) 作为人体内的含硫氨基酸, 是动脉粥样硬化发生的危险因素, 对判断脑卒中预后具有较好的帮助^[7]。基质金属蛋白酶-9 (MMP-9) 是一种基质金属蛋白酶, 通过诱导下游炎症因子, 促进氧化应激损伤, 参与动脉粥样硬化及脑梗死发生^[8]。miRNA 是一类内源性非编码 RNA 分子, 可在转录后调节基因表达, 参与神经修复、炎症和氧化应激, 在 AIS 发生过程中扮演重要角色^[9]。ZHAO 等^[10] 研究指出, miRNA 异常表达与动脉粥样硬化斑块的形成及破裂有关, 参与脑卒中的发生。

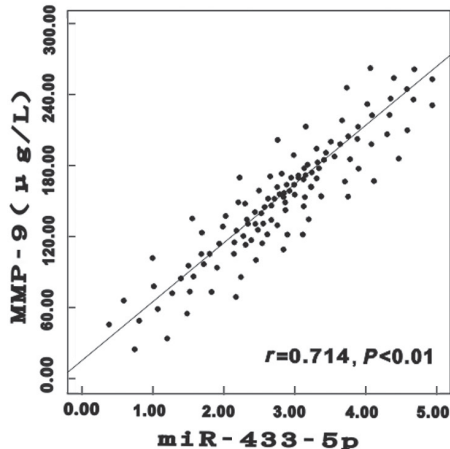
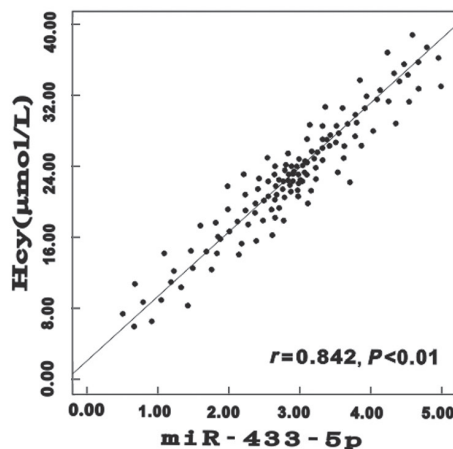


图 2 miR-433-5p 与 Hcy, MMP-9 的相关性

本研究显示, 与对照组比较, AIS 组血清 miR-433-5p, Hcy 及 MMP-9 水平升高, 重度组血清 miR-433-5p, Hcy 及 MMP-9 水平均高于中度组和轻度组, 说明血清 miR-433-5p, Hcy 及 MMP-9 水平升高与 AIS 患者的神经功能缺损的严重程度有关, 可能参与 AIS 的发生发展。以往的研究认为, Hcy 水平升高是促进脑卒中患者病情发生及进展的

危险因素, 对判断脑卒中患者的病情严重程度及预后有很大帮助^[11]。ZHENG 等^[12] 研究发现, 血清 MMP-9 水平在 AIS 患者中明显升高, 且与患者的病情严重程度有关, MMP-9 对评估脑卒中患者病情进展情况具有一定的价值。另有研究表明, miRNA 通过靶向作用于多种蛋白在脑卒中的免疫炎症反应、细胞凋亡及氧化应激反应的过程起了

重要的调节作用,可为脑卒中的诊断、治疗及预后提供新的策略^[13]。本研究 ROC 曲线分析显示,血清 miR-433-p 诊断 AIS 的 AUC 高于 Hcy 及 MMP-9,其最佳临界值取 1.96 时,诊断 AIS 的敏感度和特异度较高。由此可见,与 Hcy 及 MMP-9 相比,miR-433-5p 诊断 AIS 的敏感度和特异度较高,对 AIS 诊断具有较高的临床应用价值,有望作为 AIS 诊断的分子标志物。CAO 等^[14]研究表明,AIS 患者存在 miRNA 差异表达,其对 AIS 诊断具有很好的前景,未来有望作为 AIS 诊断的有用标志物。本研究相关分析显示,AIS 患者 miR-433-5p 水平与 Hcy 及 MMP-9 均呈正相关,提示 miR-433-5p 可能与 Hcy 及 MMP-9 共同促进动脉粥样硬化形成,在 AIS 的发生发展中发挥重要作用。因此,我们推测 miR-433-5p 的高表达可能与 AIS 发生有关。另有研究认为,miRNA 在基因表达和分泌的转录后调控中发挥着重要作用,参与了 AIS 的发生发展,其作为 AIS 诊断和预后敏感生物标志物具有巨大的潜力,将为临床上 AIS 诊疗带来很大的帮助^[15]。

综上所述,血清 miR-433-5p 表达水平在 AIS 患者中明显升高,且与 Hcy 及 MMP-9 水平呈正相关,miR-433-5p 有望作为 AIS 诊断的有用标志物。但本研究的样本例数不多,而且为单中心的临床分析,未来仍需更大样本的多中心研究来证实,使其更好的应用于临床。

参考文献:

- [1] HERPICH F, RINCON F. Management of acute ischemic stroke[J]. Critical Care Medicine, 2020, 48(11): 1654-1663.
- [2] EYILETEN C, SHARIF L, WICIK Z, et al. The relation of the Brain-Derived neurotrophic factor with microRNAs in neurodegenerative diseases and ischemic stroke[J]. Molecular Neurobiology, 2021, 58(1): 329-347.
- [3] KIJPAISALRATANA N, NIMSAMER P, KHAMWUT A, et al. Serum miRNA125a-5p, miR-125b-5p, and miR-433-5p as biomarkers to differentiate between posterior circulation stroke and peripheral vertigo[J]. BMC Neurology, 2020, 20(1): 372.
- [4] WU Xiaoyan, ZHOU Qionggui, CHEN Qing, et al. Association of homocysteine level with risk of stroke: A dose-response meta-analysis of prospective cohort studies[J]. Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases, 2020, 30(11): 1861-1869.
- [5] CHEN Chunyu, CHANG Fengchi, LEE I H, et al. Involvement of matrix metalloproteinase 9 in vertebral arterial dissection with posterior circulation ischemic stroke[J]. Journal of the American Heart Association, 2020, 9(19): e016743.
- [6] 中华医学会神经病学分会,中华医学会神经病学分会脑血管病学组.中国急性缺血性脑卒中诊治指南 2018[J].中华神经科杂志,2018,51(9): 666-682. Chinese Society of Neurology, Chinese Stroke Society, Chinese Medical Associations. Chinese guidelines for diagnosis and treatment of acute ischemic stroke 2018 [J]. Chinese Journal of Neurology, 2018,51 (9): 666-682.
- [7] LARSSON S C, TRAYLOR M, MARKUS H S. Homocysteine and small vessel stroke: A mendelian randomization analysis[J]. Annals of Neurology, 2019, 85(4): 495-501.
- [8] ZHOU L, KOU D Q. Correlation between acute myocardial infarction complicated with cerebral infarction and expression levels of MMP-2 and MMP-9[J].European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 2019, 23(1): 297-302.
- [9] GHOREISHY A, KHOSRAVI A, GHAEMMAGHAMI A. Exosomal microRNA and stroke: A review[J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2019, 120(10): 16352-16361.
- [10] ZHAO Xinyi, CHEN Xingmei, WU Xulong, et al. Machine learning analysis of microRNA expression data reveals novel diagnostic biomarker for ischemic stroke[J]. Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases, 2021, 30(8): 105825.
- [11] HARRIS S, RASYID A, KURNIAWAN M, et al. Association of high blood homocysteine and risk of increased severity of ischemic stroke events[J]. The International Journal of Angiology, 2019, 28(1): 34-38.
- [12] ZHENG Xiaowei, ZHONG Chongke, ZHU Zhengbao, et al. Association between serum matrix metalloproteinase-9 and poor prognosis in acute ischemic stroke patients:The role of dyslipidemia[J]. Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases, 2021, 31(1): 209-215.
- [13] SUN Sujuan, LI Litao, DONG Lipeng, et al. Circulating mRNA and microRNA profiling analysis in patients with ischemic stroke[J]. Molecular Medicine Reports, 2020, 22(2): 792-802.
- [14] CAO Wenzhai, ZHANG Ting, WANG Lizhen, et al. Diagnostic performance of circulating microRNAs in acute ischemic stroke: A protocol for systematic review and meta-analysis[J]. Medicine(Baltimore), 2020, 99(40): e22353.
- [15] BEJLERI J, JIRSTRÖM E, DONOVAN P, et al. Diagnostic and prognostic circulating microRNA in acute stroke: a systematic and bioinformatic analysis of current evidence[J]. Journal of Stroke, 2021, 23(2): 162-182.

收稿日期: 2021-01-28

修回日期: 2021-11-18