[文章编号]　1007-3949(2020)28-09-0773-05　·临床研究·

外周血 miR-25 表达与急性脑梗死患者凋亡分子含量及 90 天预后的相关性

张子英[1]，王新华[2]，席妹景[3]，闫莹莹[1]

(1. 郑州大学第五附属医院神经康复科，河南省郑州市 450052；2. 郑州大学第五附属医院神经内科，河南省郑州市 450052；3. 濮阳市人民医院急诊科，河南省濮阳市 457000)

[关键词]　急性脑梗死；　miR-25；　凋亡分子；　90 天预后

[摘　要]　**目的**　探讨急性脑梗死患者外周血 miR-25 表达与凋亡分子含量及 90 天预后的相关性。**方法**　选取急性脑梗死患者 162 例为急性脑梗死组，体检健康者 150 例为正常对照组。测定两组外周血 miR-25 及凋亡分子含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 3(Caspase-3)、B 淋巴细胞瘤 2 基因(Bcl-2)的水平。根据改良 Rankin 量表(mRS)评分将随访 90 天的预后情况分为预后良好(mRS 评分≤2 分)和预后不良(mRS 评分>2 分)。比较不同预后急性脑梗死患者的临床资料，并进一步行 Logistic 回归分析，采用受试者工作特征(ROC)曲线评估急性脑梗死患者外周血 miR-25 表达水平对 90 天不良预后的预测价值。**结果**　急性脑梗死组患者外周血 miR-25、Bcl-2 表达水平低于正常对照组，Caspase-3 水平高于正常对照组，差异有统计学意义($P<0.05$)。相关性分析发现，急性脑梗死患者外周血 miR-25 表达水平与 Bcl-2 表达水平呈正相关，与 Caspase-3 表达水平呈负相关($P<0.05$)。急性脑梗死患者随访 90 天预后良好 119 例、预后不良 43 例。不同预后急性脑梗死患者的年龄、发病至治疗时间、入院当天 NIHSS 评分的差异有统计学意义($P<0.05$)，其余临床资料差异无统计学意义($P>0.05$)。Logistic 回归分析发现，年龄较大、入院当天 NIHSS 评分较高、外周血 miR-25 表达水平较低是急性脑梗死患者 90 天预后不良的独立危险因素($P<0.05$)。ROC 曲线发现，外周血 miR-25 表达水平预测急性脑梗死患者 90 天预后不良的截断值为 0.635，AUC 为 0.699(95% CI 0.609～0.789)，对应的敏感度、特异度分别为 72.09%、65.55%。**结论**　急性脑梗死患者外周血 miR-25 表达水平降低，可能参与凋亡分子的表达调控。低水平 miR-25 是急性脑梗死患者预后不良的危险因素，且具有一定早期预测价值。

[中图分类号]　R5　　[文献标识码]　A

Correlation between miR-25 expression in peripheral blood and apoptotic molecules contents, and 90 days prognosis of patients with acute cerebral infarction

ZHANG Ziying[1], WANG Xinhua[2], XI Meijing[3], YAN Yingying[1]

(1. *Department of Neurorehabilitation, the Fifth Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan* 450052, *China*; 2. *Department of Neurology, the Fifth Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan* 450052, *China*; 3. *Emergency Department, People's Hospital of Puyang, Puyang, Henan* 457000, *China*)

[**KEY WORDS**]　acute cerebral infarction;　miR-25;　apoptotic molecules;　prognosis of 90 d

[**ABSTRACT**]　**Aim**　To investigate the correlation between miR-25 expression in peripheral blood and apoptotic molecules contents, and 90 d prognosis of patients with acute cerebral infarction.　**Methods**　162 patients with acute cerebral infarction were selected as the acute cerebral infarction group and 150 healthy people as the normal control group. Peripheral blood levels of miR-25 and apoptotic molecules cysteinyl aspartate specific proteinase-3(Caspase-3), B-cell lymphoma-2(bcl-2) were determined in acute cerebral infarction group and normal control group.　According to the score of modified Rankin scale (mRS), prognosis of 90 d follow-up was divided into: good prognosis(mRS score≤2 points) and poor prognosis(mRS score >2 points).　The clinical data of acute cerebral infarction patients with different prognosis were compared and further Logistic regression analysis was performed.　ROC curve was used to evaluate the predictive value of

[收稿日期]　2020-04-27　　[修回日期]　2020-06-06

[基金项目]　河南省医学科技攻关计划联合共建项目(2018020259)

[作者简介]　张子英，硕士，主治医师，研究方向为神经康复，E-mail 为 sunb1191@163.com。

miR-25 expression level in peripheral blood of acute cerebral infarction patients for adverse prognosis at 90 days. **Results** Expression levels of miR-25 and bcl-2 in peripheral blood of acute cerebral infarction group were lower than those in normal control group, levels of Caspase-3 were higher than those in normal control group ($P<0.05$). Correlation analysis found that the expression level of miR-25 in peripheral blood of acute cerebral infarction patients was positively correlated with the expression level of bcl-2, negatively correlated with expression level of Caspase-3 ($P<0.05$). Patients with acute cerebral infarction were followed up for 90 days, including 119 patients with good prognosis, 43 patients with poor prognosis. The differences in age, onset treatment time and NIHSS score on the day of admission in acute cerebral infarction patients with different prognosis were statistically significant ($P<0.05$), while the differences in other clinical data were not statistically significant ($P>0.05$). Logistic regression analysis found that: older age, higher NIHSS score on the day of admission, low expression level of miR-25 in peripheral blood were independent risk factors for poor prognosis in patients with acute cerebral infarction on 90 day ($P<0.05$). ROC curve found that, cut-off value of miR-25 expression level in peripheral blood predicting the poor prognosis of patients with acute cerebral infarction on the 90 d was 0.635, AUC was 0.699 (95% CI 0.609 ~ 0.789). The corresponding sensitivity and specificity were 72.09% and 65.55%, respectively. **Conclusions** Expression level of miR-25 in peripheral blood of patients with acute cerebral infarction decreases, which may be involved in the expression regulation of apoptotic molecules. Low level of miR-25 is a risk factor for poor prognosis and has certain early prediction value.

急性脑梗死是脑血供突然中断所致脑组织软化、坏死,由于国内老龄人口增加等原因,该病的发病率逐年递增,患者经治疗后可遗留不同程度肢体运动、认知等功能障碍,已经成为威胁中国中老年人群健康及生命安全的最重要疾病之一[1-2]。溶栓是治疗急性脑梗死重要的再灌注治疗手段,但急性脑梗死患者溶栓治疗后的预后存在较大差异,缺血再灌注损伤可能是影响溶栓治疗预后的重要病理因素。因此,寻找影响急性脑梗死溶栓治疗预后、参与脑缺血再灌注损伤的分子可能对患者预后改善具有重要意义。

微小 RNA (microRNA, miRNA) 是一种内源性、非编码的小 RNA 分子,通过与靶基因 mRNAs 3′端非翻译区特异性结合而实现调控靶基因表达的作用,miR-25 是一种在心脑血管中发挥重要作用的 miR,张军峰等[3]细胞研究显示:在脑缺血再灌注损伤的细胞模型中,miR-25 的表达水平明显减少。Zhang 等[4]动物实验显示:大鼠脑缺血再灌注损伤过程中 miR-25 表达减少,过表达 miR-25 能够减轻脑缺血再灌注损伤,提示 miR-25 可能参与了脑梗死的发生发展。基于此,本研究将以急性脑梗死患者为对象,具体分析外周血 miR-25 表达水平与凋亡分子的相关性及对 90 天预后的预测价值,旨在为临床评估急性脑梗死患者预后提供新思路。

1 资料和方法

1.1 一般资料

选取 2018 年 10 月至 2019 年 10 月郑州大学第五附属医院收治的急性脑梗死患者 162 例作为急性脑梗死组,其中男性 84 例、女性 78 例,年龄 (68.49±9.12) 岁 (51 ~ 78 岁),体质指数 (BMI) (23.84±2.12) kg/m^2 (21 ~ 27 kg/m^2)。纳入标准:(1)急性起病,经头颅 CT 及头颅核磁共振检查,符合中华医学会神经病学分会制定的《中国急性缺血性脑卒中诊治指南 2014》[5]中对急性脑梗死的定义;(2)首次发病、既往无相关病史;(3)发病至接受溶栓的时间≤4.5 h,符合溶栓适应证;(4)临床资料完整、规律,接受随访。排除标准:(1)既往脑出血、脑外伤、脑肿瘤病史及手术史;(2)合并恶性肿瘤性疾病;(3)合并急慢性感染性疾病、血栓性疾病;(4)妊娠或者哺乳期女性。取同期在本院进行体检的健康志愿者 150 例作为正常对照组,均经体检证实心、肝、肾功能正常,既往无心脑血管疾病史,其中男性 74 例、女性 76 例,年龄 (68.71±9.20) 岁 (47 ~ 78 岁),BMI (23.76±2.09) kg/m^2 (21 ~ 26 kg/m^2)。两组的基础资料差异无统计学意义 ($P>0.05$),具有可比性。

1.2 外周血 miR-25 及凋亡分子表达水平检测

入院即刻留取研究对象的外周静脉血标本 5 mL×2 份,其中 1 份采用 Trizol 抽提细胞总 RNA,Prime Script™ 反转录试剂盒合成第 1 链 cDNA,在 CFX96 qPCR 检测系统中进行 Real-time PCR 反应。反应条件如下:95 ℃预变性 30 s,95 ℃变性 5 s,60 ℃退火 30 s,共计 40 个循环。将小 RNA U6 作为参考,测定 miR-25 表达情况,以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算相对表达量。另一份分离血清后,采用酶联免疫吸附法

(ELISA)测定凋亡分子含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 3(cysteinyl aspartate specific proteinase-3, Caspase-3)、B 淋巴细胞瘤 2 基因(B-cell lymphoma-2,Bcl-2)的水平。

1.3　急性脑梗死预后相关因素的收集

根据急性脑梗死患者的病历资料,收集预后相关的因素,包括性别、年龄、BMI、慢性病史(高血压、糖尿病、冠心病)、生活习惯(吸烟、饮酒)、发病至治疗时间、入院当天美国国立卫生研究院卒中量表(national institutes of health stroke scale,NIHSS),以及入院 24 h 内的实验室指标(空腹血糖、血小板和血肌酐)。

1.4　急性脑梗死患者 90 天预后的随访

急性脑梗死患者入院后开始随访,第 90 天时采用改良 Rankin 量表(modified rankin scale,mRS)进行评价,mRS 评分≤2 分为预后良好、mRS 评分>2 分为预后不良。

1.5　统计学方法

使用软件 SPSS20.0 对数据进行统计学分析,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。计数资料以例数及百分率表示,两组间比较采用 χ^2 检验;计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示,两组间比较采用独立样本 t 检验。将单因素分析中有差异的指标纳入 Logistic 回归模型,使用受试者工作特征(ROC)曲线分析外周血 miR-25 表达水平对急性脑梗死患者 90 天预后的预测价值。

2　结　果

2.1　两组外周血 miR-25 及凋亡分子表达水平的比较

急性脑梗死组患者外周血 miR-25、Bcl-2 表达水平低于正常对照组,Caspase-3 水平高于正常对照组,差异有统计学意义($P<0.05$;表 1)。相关性分析发现,急性脑梗死患者外周血 miR-25 表达水平与 Bcl-2 表达水平呈正相关,与 Caspase-3 表达水平呈负相关($r=0.673$、-0.712,$P=0.027$、0.018)。

2.2　急性脑梗死组不同预后患者临床资料的比较

急性脑梗死患者随访 90 天,根据预后可分为预后良好者 119 例、预后不良者 43 例。不同预后急性脑梗死患者间的年龄、发病至治疗时间、入院当天 NIHSS 评分、miR-25、Caspase-3、Bcl-2 等差异有统计学意义($P<0.05$),其余临床资料差异无统计学意义($P>0.05$;表 2)。

表 1. 两组外周血 miR-25 及凋亡分子表达水平的比较

Table 1. Comparison of expression levels of miR-25 and apoptosis molecules in peripheral blood between the two groups

分组	n	miR-25	Caspase-3(μg/L)	Bcl-2(ng/L)
正常对照组	150	0.89±0.22	14.12±1.87	193.27±25.48
急性脑梗死组	162	0.66±0.11	22.34±3.10	114.64±18.32
t		11.808	28.085	31.466
P		0.000	0.000	0.000

表 2. 90 天后不同预后急性脑梗死患者临床资料的比较

Table 2. Comparison of clinical data of acute cerebral infarction patients with different prognosis after 90 days

指标	预后良好组(n=119)	预后不良组(n=43)	P
男[例(%)]	61	23	0.802
年龄(岁)	65.38±9.23	70.17±8.45	0.003
BMI(kg/m^2)	23.17±2.31	22.98±2.64	0.657
高血压史[例(%)]	52(43.70)	21(48.84)	0.562
糖尿病史[例(%)]	40(33.61)	16(37.21)	0.671
冠心病史[例(%)]	25(21.01)	8(18.60)	0.737
吸烟史[例(%)]	41(34.45)	15(34.88)	0.959
饮酒史[例(%)]	38(31.93)	13(30.23)	0.837
收缩压(mmHg)	141.28±22.38	147.69±21.42	0.106
舒张压(mmHg)	82.59±16.84	86.48±13.86	0.177
发病至治疗时间(h)	2.63±0.51	5.92±0.72	0.000
NIHSS 评分(分)	10.37±1.95	14.85±2.01	0.000
空腹血糖(mmol/L)	5.51±0.68	5.48±0.62	0.800
血小板($\times10^9$/L)	183.48±22.17	183.20±20.84	0.943
血肌酐(μmol/L)	68.34±7.34	69.10±8.52	0.578
miR-25	0.68±0.09	0.61±0.08	0.000
Caspase-3(μg/L)	19.23±2.51	34.28±5.19	0.000
Bcl-2(ng/L)	128.56±17.10	93.46±12.18	0.000

2.3　急性脑梗死患者 90 天预后影响因素的 Logistic 回归分析

以急性脑梗死患者 90 天预后作为应变量(0=预后良好,1=预后不良),将表 2 中具有差异的指标作为自变量,经 Logistic 回归分析发现,年龄、入院当天 NIHSS 评分、发病至治疗时间、外周血 miR-25 表达水平是急性脑梗死患者 90 天预后不良的影响因素($P<0.05$;表 3)。

2.4　miR-25 预测急性脑梗死患者 90 天预后不良的 ROC 曲线

ROC 曲线发现,外周血 miR-25 表达水平预测

急性脑梗死患者 90 天预后不良的截断值为 0.635，AUC 为 0.699（95% CI 0.609～0.789），对应的敏感度、特异度分别为 72.09%、65.55%（图 1）。

表 3. 急性脑梗死患者 90 天预后影响因素的 Logistic 回归分析

Table 3. Logistic regression analysis of 90 d prognostic factors in patients with acute cerebral infarction

因素	β 值	Wald 值	OR	95% CI	*P*
年龄	1.785	4.492	2.182	1.725～2.631	0.024
发病至治疗时间	1.625	3.461	2.056	1.342～1.984	0.035
入院当天 NIHSS 评分	1.992	7.492	4.621	2.182～3.726	0.011
miR-25	−1.846	6.486	0.645	1.927～2.583	0.024
Caspase-3	0.462	0.873	1.021	0.726～1.648	0.647
Bcl-2	−0.517	0.934	0.932	0.814～1.559	0.512

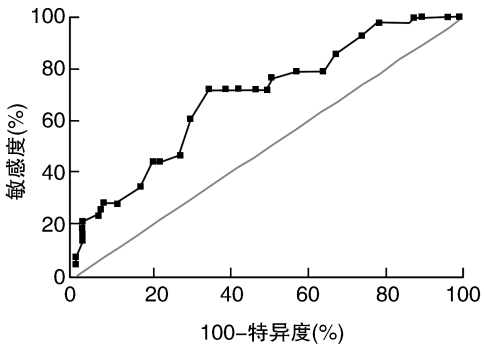

图 1. miR-25 预测急性脑梗死患者 90 天预后不良的 ROC 曲线

Figure 1. ROC curve of miR-25 predicting poor prognosis in 90 days in patients with acute cerebral infarction

3 讨 论

miRNA 参与人体各个生命过程，也在多种疾病的发生发展过程中扮演重要角色。研究发现 miR-25 在乳腺癌[6]、非小细胞肺癌[7]等恶性肿瘤的病情进展过程中发挥一定调控作用；在关于 miR-25 及神经细胞的研究中发现，抑制 miR-25 可加重糖尿病周围神经病变[8]，miR-25 可通过抑制 ITGAV 和 PEDF 介导大鼠视网膜退行性变[9]。既往的基础研究提示 miR-25 在脑缺血再灌注损伤中起保护作用[3-4]，但其在急性脑梗死患者中的变化及临床意义上缺乏直接证据。本文测定急性脑梗死患者、健康志愿者的外周血 miR-25 表达水平发现，急性脑梗死患者 miR-25 表达水平存在异常下降，这与张军峰等[3]研究中 miR-25 的表达变化趋势一致，提示 miR-25 表达减少可促进急性脑梗死病情进展。进一步分析研究对象血清 Caspase-3、Bcl-2 等凋亡分子水平后发现，急性脑梗死患者存在凋亡执行分子 Caspase-3 水平增加及抗凋亡分子 Bcl-2 水平下降，且 miR-25 表达水平与 Bcl-2 表达水平呈正相关，与 Caspase-3 表达水平呈负相关，提示 miR-25 可调控凋亡分子表达、miR-25 水平降低使其抑制凋亡作用减弱，可能是疾病加重的内在原因之一。

急性脑梗死起病迅速，可在短时间内引发严重炎症反应、氧化应激及神经元凋亡，随坏死病灶扩大迅速加剧神经功能损伤，最终表现为肢体功能、语言、认知功能等不同程度障碍[10-11]。文献[12]指出急性脑梗死患者 90 天的病情较为稳定，可用于评估治疗预后，本文纳入不同 90 天预后的急性脑梗死患者临床资料发现，不同预后患者在年龄、发病至治疗时间、入院当天 NIHSS 评分、miR-25、Caspase-3、Bcl-2 等方面存在明显差异，而在其他资料分布上大致相似。进一步经 Logistic 回归分析发现，Caspase-3、Bcl-2 水平对急性脑梗死患者 90 天预后不良的影响不甚明显，而其余 4 个因素均是影响患者预后的独立因素。随年龄增长人体神经功能退行性变程度增加，对缺血耐受性也下降，文献[13-14]也明确年龄是影响急性脑梗死患者预后的重要因素之一。发病后治疗时间间隔越长，缺血灶周围继发性脑水肿越明显，神经细胞经历长时间的缺血缺氧更易发生不可逆性凋亡。入院当天 NIHSS 评分可大概评估患者的脑损伤严重程度，脑梗死病情较重的患者治疗结局不理想的概率更高。低水平 miR-25 对急性脑梗死患者 90 天不良预后的直接影响作用被明确，可能与其对凋亡分子的调控及对具体神经元凋亡的影响相关。

急性脑梗死早期治疗对病情的优化作用最大，后续随病程延长、功能损伤的逆转难度增加，故早期预测预后并采取积极的干预措施具有重要的临

床意义。鉴于 miR-25 低表达对急性脑梗死患者 90 天不良预后的影响，本研究进一步分析其对预后的早期预测价值，经 ROC 曲线分析发现，外周血 miR-25 表达水平预测急性脑梗死患者 90 天预后不良的截断值为 0.635，AUC 为 0.699（95% CI 0.609 ~ 0.789），对应的敏感度、特异度分别为 72.09%、65.55%，可见早期测定急性脑梗死患者外周血 miR-25 表达水平对其 90 天预后具有一定预测价值，但关于该指标的实践应用有待更多临床研究开展以明确。

综上所述，急性脑梗死患者外周血 miR-25 表达水平异常下降，且对凋亡分子具有直接调控作用。低水平 miR-25 是急性脑梗死患者 90 天预后不良的独立危险因素，且对其预后具有早期预测价值，可能在日后此类患者的早期靶向干预方面发挥重要作用。受限于本研究样本量较小，miR-25 预测急性脑梗死患者预后的 ROC 曲线分析虽然差异有统计学意义，但曲线下面积较小、预测价值有限，今后应继续收集病例、增加样本量来进一步验证 miR-25 对急性脑梗死患者预后的预测价值。

[参考文献]

[1] Guo J, Wang J, Guo Y, et al. Association of aspirin resistance with 4-hydroxynonenal and its impact on recurrent cerebral infarction in patients with acute cerebral infarction [J]. Brain Behav, 2020, 10(3): e01562.

[2] Deguchi I, Osada T, Kimura H, et al. A case of acute cerebral infarction associated with an accessory middle cerebral artery in a patient who underwent thrombectomy[J]. Acute Med Surg, 2019, 7(1): e459.

[3] 张军峰, 赵朝华, 郝佳晖, 等. MicroRNA-25 在脑缺血再灌注损伤诱导的细胞凋亡过程中的作用[J]. 解剖学报, 2018, 49(5): 584-587.

[4] Zhang JF, Shi LL, Zhang L, et al. MicroRNA-25 negatively regulates cerebral ischemia/reperfusion injury-induced cell apoptosis through Fas/FasL pathway[J]. J Mol Neurosci, 2016, 58(4): 507-516.

[5] 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 2014[J]. 中华神经科杂志, 2015, 48(4): 246-257.

[6] 吴唐维, 蒋丽媛, 张天竺, 等. miR-25 对三阴乳腺癌侵袭转移的影响及其潜在机制[J]. 中华检验医学杂志, 2019, 42(2): 104-111.

[7] 李世荣, 刘 艳, 王振明, 等. 血清 miR-483-5p、miR-21 和 miR-25 检测在非小细胞肺癌诊断中的价值[J]. 山东医药, 2019, 59(23): 19-22.

[8] Zhang Y, Song C, Liu J, et al. Inhibition of miR-25 aggravates diabetic peripheral neuropathy[J]. Neuroreport, 2018, 29(11): 945-953.

[9] Zhang J, Wang J, Zheng L, et al. miR-25 mediates retinal degeneration via inhibiting ITGAV and PEDF in rat[J]. Curr Mol Med, 2017, 17(5): 359-374.

[10] 李福泰, 姚春虹, 慕廷民, 等. 急性脑梗死患者炎症因子与同型半胱氨酸、纤维蛋白原相关性研究[J]. 陕西医学杂志, 2019, 48(1): 71-73.

[11] 王继升, 姜 宇, 徐建红, 等. 血清炎症因子与急性脑梗死出血性转化的相关性研究[J]. 中西医结合心脑血管杂志, 2019, 17(2): 277-279.

[12] 刘金城, 姚 璇, 冯玉华, 等. 急性脑梗死患者血浆 β-淀粉样蛋白水平变化及临床意义[J]. 山东医药, 2019, 59(34): 1-4.

[13] Zhou M, Huang Z. Effect of comprehensive cerebral protection program on cerebral oxygen metabolism and vascular endothelial function in elderly patients with acute cerebral infarction[J]. Iran J Public Health, 2019, 48(2): 299-304.

[14] 刘乃瑞. 急性心肌梗死介入治疗后急性脑梗死发生情况及危险因素分析[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2019, 22(5): 491-497.

（此文编辑　朱雯霞）