

• 综 述 •

急性缺血性脑卒中中循环 miRNA 的相关研究进展

张家康 王泉雄 陈鑫 杨光 张大明 钟晨 赵世光

【中图分类号】 R743 【文献标识码】 A 【文章编号】 1007-0478(2016)03-0213-03

【DOI】 10.3969/j.issn.1007-0478.2016.03.021

脑血管病是人类三大致死性疾病之一,已成为影响人类身体健康的一大难题。从 1985~1991 年统计的年发病率为 116~219/100 000,其中缺血性脑卒中占脑卒中的 75%。缺血性脑卒中是指由于脑的供血动脉(颈动脉和椎动脉)狭窄或闭塞、脑供血不足导致的脑功能障碍的总称,分为动脉血栓性脑梗死 21.5%、栓塞性脑梗死 7.5%、腔隙性脑梗死 40.6%及其他原因引起的脑梗死或 TIA^[1]。可出现不同的功能缺失表现,使患者的生活质量严重下降。即使经过系统的治疗、康复锻炼后,患者的致残率仍能达到 40%,给人民的生活及国家经济发展带来不小的经济负担。

1 miRNA

miRNA 是由 21~22 个左右的核苷酸组成的内源性的 RNA,在核内 miRNA 基因由 RNA-polII 催化转录形成 pri-miRNA,在 Drosha 酶的作用下去掉帽子结构及多聚腺苷酸尾形成前体 miRNA,经过 Exportin5 的运输,Dicer 酶的剪切、沉默复合体的作用最终形成成熟的 miRNA^[2]。Lee 等人^[3]在 1993 年最先从线虫幼虫研究中发现 lin-4 的存在,能够调节线虫幼虫成熟的时机。7 年后 Reinhart 等人^[4]又在线虫中发现 miRNA 家族 let-7。此后关于 miRNA 的研究越来越多,发现的 miRNA 数量也在不断增加。从 MIRBASE 网站中搜索。可以看到 miRNA 广泛存在于动物、植物、真菌、病毒中,而且单单在人类身体中发现的 miRNA 前体就有 1881 种,成熟体有 2588 种。miRNA 功能涉及发育、病毒防御、造血过程、器官形成、细胞增殖和凋亡、脂肪代谢等^[2],由此为癌症、代谢性疾病等领域的治疗提供指导。这里本研究通过总结 miRNA 在缺血性脑卒中中作为循环生物学标记的研究,希望能对今后的缺血性脑卒中研究及临床治疗方法提供帮助。

2008 年 Lawrie 第 1 次对血清中存在 miRNA 进行了描述,对弥漫性大 B 细胞淋巴瘤患者血清中与肿瘤相关的 microRNA 进行研究发现血清中 MIRN155 (miR-155),MIRN210 (miR-210) and MIRN21 (miR-21)水平较对照组升高,且 MIRN21 与早期复发有关^[5],由此开启了循环中

microRNA 作为各种疾病生物学标记的研究。并且其样本在低于 -80 °C 的情况下也不会被破坏,为相关研究的血液样本保存提供了有力的支持^[6]。为 miRNA 作为血液学诊断标记打下基础。

2 缺血性脑卒中循环 miRNA 研究

目前 miRNA 的分泌机制还不完全清楚,有研究表明 miRNA 在血清中的存在形式主要有脂质小泡和游离两种形式,在细胞与细胞间起信息连接的作用。脂质小泡又包括外质体(大小约 30~100 nm)、微泡(100~1 000 nm)和凋亡小体,但外质体与微泡通过现有的方法是很难准确区分开的^[10, 11]。外质体最早由 Trams 等人^[12]在 1981 年的研究中定义,证明其来源于细胞膜,Valadi 等人^[13]证明释放的外质体含有细胞内 mRNA 和 miRNA,把这些物质转运到靶向细胞,包含在外质体中的 mRNA 和 microRNA 统称为 esRNA。有研究称 miRNA 的分泌是由神经酰胺(一种生物活性脂质类)数量的增加引起的,而神经酰胺的合成与中性神经鞘磷脂酶有关^[14]。

miRNA 在循环中存在于脂质小泡中,所以不会被 RNA 酶破坏。在血清及血浆中游离 miRNA 也能稳定存在。Arroyo 等人^[15]应用差速离心法和尺寸排阻色谱法来描述循环 miRNA 的特性,发现绝大多数 miRNA 与蛋白复合物结合,而不是囊泡。miRNA 也对蛋白酶很敏感,说明蛋白复合物能保护 miRNA 不受 RNA 酶损害,进而发现 Argonaute2(一种调节 miRNA 沉默的关键蛋白)复合物保护循环与膜泡无关的 miRNA 免受 RNA 酶的破坏。只有少数的特殊 miRNA 与囊泡有关。

在神经细胞中 miR-124 表达最为丰富,具有神经元特异性,在星形胶质细胞中不表达,降低 miR-124 可能降低神经退行性变疾病中神经元的比例,限制增殖促进分化^[7]。

在 Weng 等人的一项研究中发现 miR-124 只在中枢神经系统中表达,在对大鼠 MCAO 模型血浆中的 miR-124 进行监测后发现,血浆中的 miR-124 在 6 h 后开始升高,且能维持 48 h,提示其可能作为脑缺血的生物学标记^[8]。

研究表明 miR-125b-2p 促进胶质瘤细胞生长、成熟、抗凋亡^[9]。主动脉的内皮细胞在暴露于氧化甘油磷脂中后 miR-27a * /miR-27a-5p 的表达水平上升^[10]。在神经细胞调

亡模型中 miR-422a 的表达水平在第 12 h 下降,并且 miR-422a 与 bcl-w 呈负相关^[11]。Sugunavathi epramaniam 等人^[12]通过 FDR 错误控制法,变化倍数等方法从 314 个 miRNA 中筛选出了 105 个与脑卒中有关的 miRNA,其中有 58 个下调、47 个上调,而与急性缺血性脑卒中有关的有 26 个 miRNA。随后应用分级层聚统计, TaqMan 低密度芯片 (TLDA)、ROC 曲线分析等方法选出 miR-125b-2*, -27a*, -422a, -488 和 -627,在人的脑缺血急性期(1-7d)明显高于恢复期,且在大鼠模型中 6 h 都会增高,在急性缺血性脑卒中中具有诊断价值。

miR-106b-5p/miR-106b 在胶质瘤中高表达,促进胶质瘤细胞生长,抑制凋亡^[13],在内皮细胞介导的血管生成中抑制内皮细胞产生^[14],在下肢动脉缺血的小鼠中敲除 miR-106b 后血管生成障碍^[15]。hsa-miR-320 能够抑制大鼠心脏内皮细胞迁移及血管生成^[16],在心肌缺血再灌注损伤中表明明显降低,敲除-320 后通过增加 Hsp20 减少心脏缺血再灌注所诱导的心肌损伤^[17],在神经退行性变过程中 miR-320 水平升高^[18]。敲除 miR-30-5p 后通过上调 SEPT7 抑制胶质瘤细胞,促进凋亡^[19]。Wang^[6]对急性脑缺血性脑卒中的样本进行统计分析筛选后发现,13 个 miRNA 存在上调,而 4 个则为下调(hsa-miR-30d-5P, hsa-miR-320e, hsa-miR-320d, hsa-miR-26b-5p 文字中显示,图中显示为 miR-720),然后根据生物指标可能在脑卒中发生后的变化是渐进性的这一点出发,找出了 4 个可以有助于临床诊断的 miRNA,其中 miR-106b-5p 和 miR-4306 上调,而 miR-320e 和 320d 下调。

miR-30a 下调能通过提高 bcl-1 引起的自噬,缺血性对脑损伤起保护作用^[20]。miR-126 抑制后有助于血管内皮细胞增殖、迁移及血管生成^[21]促进神经突生芽,但抑制后对抗 STS 和 A β 1-42 的毒性起神经保护作用^[22] let-7b 通过作用于核受体 TLX 和 cyclin1 来促进神经干细胞增殖及分化^[23]。Guangwen Long 等人^[24]根据以往对 AMI 的研究及缺血性脑卒中与其具有同样的缺血特点,选择对 miR-30a, miR-126 和 let-7b 进行研究,通过对 197 个缺血性脑卒中患者在不同时间的血液样本收集,并与 50 名健康患者进行对照,用 qRT-PCR 分析血样 miRNA 水平,发现这 3 种 miRNA 也可以作为诊断缺血性脑卒中的循环生物标记。

miRNA-223 通过 GluR2 和谷氨酸受体的 NR2B 亚基起到中枢神经保护作用^[25]。Wang 收集急性缺血性脑卒中患者第 72 h 的血样,并用 ELISA 检测导致 miRNA-223 下调的相关因子,并通过分析 miRNA-223 与 NIHSS 评分, TOAST 亚型和脑梗死体积之间的关系。对 12 只 CD-1 鼠的大脑中动脉进行缝合阻断 24 h 后收集血样进行 real-time PCR 检测显示,miR-223 在急性缺血性脑卒中不论在血液还是脑组织中都会升高,但在体内实验并没有发现 miR-223 与 IGF-1 有关,提示 miR-223 增高可能通过其他途径参与脑卒中早期的炎症反应^[26]。

3 缺血性脑卒中循环 miRNA 研究的局限性

由于 miRNA 在不同的细胞作用的机制不尽相同,是上调或下调所反映出的细胞特异性就值得关注,以上实验得出的循环生物标记组合是否也会反映其他疾病的发生或是特定的病理过程,还未有相关实验加以说明。如前文所述,研究中涉及的 miRNA 在神经及血管等领域起到的作用,研究人员已经做了一定的实验,但循环 miRNA 做为脑卒中生物学标记的研究相对有限,而在其他疾病或组织中涉及相关 miRNA 的研究,例如循环 miR-223 增高与 C 反应蛋白的水平有关,与早期类风湿性关节炎有关^[27],说明 miRNA 可以在不同的组织中起作用,而把单一的 miRNA 作为一种疾病循环生物标记是缺乏特异性的。

缺血性脑卒中的 CT 阳性表现要到 24~48 h 后, MRI 表现阳性是在缺血 4 h 后,有研究表明静脉溶栓 6 h 内有效,而能够在发病 3h 内进行静脉 rtPA 溶栓治疗,在降低死亡或生活依赖风险方面具有明确益处,其功能独立的机率提高 30%^[28]。由此可以看出,急性缺血性脑卒中的治疗时间点预后非常重要,已治疗越及时,则预后越好。在上述研究中都未能将诊断的时间提升到 3 h 内, Sugunavathi Sepramaniam 等人证明大鼠的循环 miRNA 生物学标记有意义的时间是在 6 h,而人的则是在一周内的变化数据;同样 wang 等人的实验在采集患者血样时,将 0~3 h, 3~6 h, 6~12 h, 12~24 h 个采集血样,但遗憾的是没有给出这些时间段筛选出的循环 miRNAs 的相应变化曲线。Guangwen Long 等人将时间点设在 72 h,也未能满足快速诊断的条件。以后的相关研究应更多集中在缺血性脑卒中早期特别是 3 h 以内,循环 miRNA 变化及其诊断意义。

4 结束语

本研究希望有一种简单、便携、快捷、成本低廉的检测方法能满足对急性缺血性脑卒中的治疗要求。从以上几点出发,循环生物学标记是一项前景广阔的研究方向。通过进一步的实验研究,找到能将诊断急性缺血性脑卒中的时间点提前到 6 h 内,甚至 3 h 内的合适的 microRNAs,将为防止或减轻脑组织缺血后发生的一系列炎症反应,水肿,坏死以及由此带来的功能障碍,降低患者的病死率和致残程度提供重要帮助。

值得注意的是,在 Wang 和 Sugunavathi Sepramaniam 的两组实验给出的缺血性脑卒中后可能上调与下调的 miRNA 绝大多数并不相同,但都对急性缺血性脑卒中的诊断具有较高的灵敏度和准确性,并且根据不同的预设筛选条件得出了不同的合适条件的 miRNA,而结果都是阳性的,这些都说明能作为急性缺血性脑卒中检测标准的生物学标记组合不止一个,以后的研究可能会有更多的循环生物标记组合被发现。

参 考 文 献

- [1] Mehndiratta MM, Khan M, Mehndiratta P, et al. Stroke in Asia: geographical variations and temporal trends[J]. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2014, 85(12): 1308-1312.
- [2] 俞焙素, 刘炳亚. miRNA 的生物学特性和功能[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2007, 27(5): 621-623.
- [3] Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14[J]. Cell, 1993, 75(5): 843-854.
- [4] Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in Caenorhabditis elegans[J]. Nature, 2000, 403(6772): 901-906.
- [5] Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, et al. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma[J]. Br J Haematol, 2008, 141(5): 672-675.
- [6] Wang W, Sun G, Zhang L, et al. Circulating microRNAs as novel potential biomarkers for early diagnosis of acute stroke in humans[J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2014, 23(10): 2607-2613.
- [7] Sonntag KC, Woo TU, Krichevsky AM. Converging miRNA functions in diverse brain disorders: a case for miR-124 and miR-126[J]. Exp Neurol, 2012, 235(2): 427-435.
- [8] Weng H, Shen C, Hirokawa G, et al. Plasma miR-124 as a biomarker for cerebral infarction[J]. Biomed Res, 2011, 32(2): 135-141.
- [9] Li X, Zheng J, Chen L, et al. Predictive and prognostic roles of abnormal expression of tissue miR-125b, miR-221, and miR-222 in glioma[J]. Mol Neurobiol, 2016, 53(1): 577-583.
- [10] Romay MC, Che N, Becker SN, et al. Regulation of NF- κ B signaling by oxidized glycerophospholipid and IL-1 β induced miRs-21-3p and -27a-5p in human aortic endothelial cells[J]. J Lipid Res, 2015, 56(1): 38-50.
- [11] 李朝晖, 李天题, 王芬, 等. H₂O₂ 诱导 PC12 细胞凋亡中 Mi-croRNA 表达及 bcl-w 调控机制[J]. 中山大学学报(医学科学版), 2009, 30(z2): 34-40.
- [12] Sepramaniam S, Tan JR, Tan KS, et al. Circulating microRNAs as biomarkers of acute stroke[J]. Int J Mol Sci, 2014, 15(1): 1418-1432.
- [13] Liu F, Gong J, Huang W, et al. MicroRNA-106b-5p boosts glioma tumorigenesis by targeting multiple tumor suppressor genes[J]. Oncogene, 2014, 33(40): 4813-4822.
- [14] 艾丽菲热·买买提, 陈红, 任景怡. 微小 RNA-106b 参与内皮细胞介导的血管新生作用机制研究[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2014, 16(6): 633-636.
- [15] Semo J, Sharir R, Afek A, et al. The 106b~25 microRNA cluster is essential for neovascularization after hindlimb ischaemia in mice[J]. Eur Heart J, 2014, 35(45): 3212-3223.
- [16] Wang X, Huang W, Liu G, et al. Cardiomyocytes mediate anti-angiogenesis in type 2 diabetic rats through the exosomal transfer of miR-320 into endothelial cells[J]. J Mol Cell Cardiol, 2014, 74: 139-150.
- [17] Song CL, Liu B, Diao HY, et al. The protective effect of microRNA-320 on left ventricular remodeling after myocardial ischemia-reperfusion injury in the rat model[J]. Int J Mol Sci, 2014, 15(10): 17442-17456.
- [18] Saba R, Goodman CD, Huzarewich RL, et al. A miRNA signature of prion induced neurodegeneration[J]. PLoS One, 2008, 3(11): e3652.
- [19] Jia Z, Wang K, Wang G, et al. MiR-30a-5p antisense oligonucleotide suppresses glioma cell growth by targeting SEPT7[J]. PLoS One, 2013, 8(1): e55008.
- [20] Wang P, Liang J, Li Y, et al. Down-regulation of miRNA-30a alleviates cerebral ischemic injury through enhancing beclin 1-mediated autophagy[J]. Neurochem Res, 2014, 39(7): 1279-1291.
- [21] Goerke SM, Kiefer LS, Stark GB, et al. miR-126 modulates angiogenic growth parameters of peripheral blood endothelial progenitor cells[J]. Biol Chem, 2015, 396(3): 245-252.
- [22] Kim W, Noh H, Lee Y, et al. MiR-126 regulates growth factor activities and vulnerability to toxic insult in neurons[J]. Mol Neurobiol, 2016, 53(1): 95-108.
- [23] Zhao CN, Sun GQ, Li SX, et al. MicroRNA let-7b regulates neural stem cell proliferation and differentiation by targeting nuclear receptor TLX signaling[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(5): 1876-1881.
- [24] Long G, Wang F, Li H, et al. Circulating miR-30a, miR-126 and let-7b as biomarker for ischemic stroke in humans[J]. BMC Neurol, 2013, 13: 178.
- [25] Fazi F, Rosa A, Fatica A, et al. A minicircuitry comprised of microRNA-223 and transcription factors NFI-A and C/EBP α regulates human granulopoiesis[J]. Cell, 2005, 123(5): 819-831.
- [26] Wang Y, Zhang Y, Huang J, et al. Increase of circulating miR-223 and insulin-like growth factor-1 is associated with the pathogenesis of acute ischemic stroke in patients[J]. BMC Neurol, 2014, 14: 77.
- [27] Filkov M, Aradi B, Senolt L, et al. Association of circulating miR-223 and miR-16 with disease activity in patients with early rheumatoid arthritis[J]. Ann Rheum Dis, 2014, 73(10): 1898-1904.
- [28] 澳大利亚国家卒中基金会专家工作组, 崔贵祥, 殷翠萍, 等. 急性卒中临床处理指南[J]. 中华脑血管病杂志(电子版), 2008, 2(5): 3.

(2015-03-07 收稿 2015-09-25 修回)

• 消 息 •

更正启示

本刊编辑因工作失误, 将 2016 年第 2 期英文审校关景霞误写成了关果霞, 特此更正, 并向她致以深深的歉意!

《卒中与神经疾病》编辑部