

# miR-93、miR-191、miR-499 在颅脑损伤患者血清中的表达及其临床意义

周小龙 宋建荣 吕新文 张鹏

**【摘要】 目的** 探讨 miR-93、miR-191、miR-499 在创伤性脑损伤患者中的表达情况及其临床意义。**方法** 采用实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)方法检测本院 2010 年 9 月~2015 年 9 月收治的 96 例创伤性脑损伤患者以及招募的 49 例健康者中 miR-93、miR-191、miR-499 的表达水平,分析其与脑损伤的损伤程度、临床疗效以及诊断价值的关系。**结果** miR-93、miR-191、miR-499 在创伤性脑损伤患者血清中的表达水平明显高于对照组( $P<0.05$ );轻度、中度和重度三种不同程度脑损伤患者血清中 miR-93、miR-191、miR-499 水平都显著性上升,差异具有统计学意义( $P<0.05$ );而且重度脑损伤患者血清中的 miRNAs 水平最高;治疗后临床疗效好的患者血清中 miR-93、miR-191、miR-499 水平显著低于临床疗效差的患者,差异具有统计学意义( $P<0.05$ );miR-93、miR-191、miR-499 三种 miRNAs ROC 曲线下面积(area under the curve, AUC)分别为 0.952 0(95%CI, 0.906 5~0.997 4;  $P<0.001$ ), 0.874 6(95%CI, 0.793 3~0.955 8;  $P<0.001$ ), 0.780 7(95%CI, 0.671 9~0.889 5;  $P<0.001$ )。**结论** miR-93、miR-191、miR-499 在创伤性脑损伤患者中高表达,可以作为创伤性脑损伤患者的预后和损伤程度指标以及诊断靶标。

**【关键词】** 创伤性脑损伤 miRNAs 诊断 预后 qRT-PCR

**【中图分类号】** R743 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1007-0478(2016)06-0399-05

**【DOI】** 10.3969/j.issn.1007-0478.2016.06.004

**The expression and clinical significance of miR-93, miR-191, miR-499 in the serum of patients with traumatic brain injury** Zhou Xiaolong, Song Jianrong, Lv Xinwen, et al. Department of Neurosurgery, Baoji Central Hospital, Baoji 721008

**【Abstract】 Objective** To investigate the expression and clinical significance of miR-93, miR-191, miR-499 in the serum of patients with traumatic brain injury (TBI). **Methods** Quantitative real-time polymerase chain reaction(qRT-PCR) was used to evaluate these miRNAs levels of TBI patients ( $n=96$ ) and healthy controls ( $n=49$ ), who admitted in our hospital from Sep. 2010 to Sep. 2015, and the severity and clinical outcome of TBI was further analyzed. **Results** The serum miR-93, miR-191, and miR-499 levels significantly elevated in the TBI patients compared with the controls and these levels were much higher in the patients with severe TBI than those with moderate or mild TBI ( $P<0.05$ ); After treatment, the serum miR-93, miR-191, and miR-499 levels were lower in the patients with good outcome than those with poor outcome ( $p<0.05$ ); The AUCs of miR-93, miR-191, and miR-499 were 0.952 0 (95%CI, 0.906 5-0.997 4;  $P<0.001$ ), 0.874 6 (95%CI, 0.793 3-0.955 8;  $P<0.001$ ), 0.780 7 (95%CI, 0.671 9-0.889 5;  $P<0.001$ ), respectively, all the differences of above had statistical significance. **Conclusion** miR-93, miR-191, and miR-499 express distinctly in the TBI patients, can be viewed as potentially valuable indicators of the diagnosis, severity, and prognosis of TBI.

**【Key words】** Traumatic brain injury miRNAs Diagnosis Prognosis qRT-PCR

创伤性脑损伤(Traumatic brain injury, TBI)是受外部压力导致脑功能减弱的一种疾病,具有很高的致死和致残率<sup>[1]</sup>。TBI 根据 Glasgow coma scale (GCS)评分可分为轻度、中度和重度脑损伤三种<sup>[2]</sup>。TBI 包

括异质性损伤,可导致神经功能和行为功能发生紊乱,因此很难评价相关损伤的预后和监测相关损伤。

微小 RNA(MicroRNAs, miRNAs)是一类可调控转录水平基因表达的小非编码 RNA。越来越多的证据表明许多疾病的患者血液中 miRNAs 具有特异性表达模式<sup>[3]</sup>。大量研究也表明 TBI 后患者血清中 miRNA 的表达发生改变。已有研究报道发

现 miR-93、miR-191、miR-499 在大鼠创伤性脑损伤之大脑皮层以及海马中显著上调<sup>[4]</sup>。但是这些 miRNA 的表达程度在 TBI 患者中的表达情况、与 TBI 的严重程度、临床治疗效果以及诊断价值还没有相关研究。

本研究旨在探讨血清中 miR-93、miR-191、miR-499 在 TBI 患者中的表达水平以及与临床治疗效果的相关性,并且进一步评价作为 TBI 生物标志物的诊断价值。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

收集从 2010 年 9 月~2015 年 9 月经本院诊治的创伤性脑损伤患者 96 例,所有患者都经过本院两名专家的诊断,而且经确认无神经系统性疾病史、无酗酒及滥用药物史、无脑损伤史。平均住院时间( $1.14 \pm 0.25$ )个月,平均年龄( $48.5 \pm 16.5$ )岁。从本院体检健康的人群中招募了 49 名身体健康者作为对照,平均年龄( $46.6 \pm 8.6$ )岁。神经功能状态的损伤程度通过 Glasgow coma scale(GCS)<sup>[2]</sup>评分系统进行评价,GCS 评分为 13~15 分作为轻度创伤性脑损伤,评分为 9~12 分作为中度创伤性脑损伤,评分为 3~8 分作为重度创伤性脑损伤。患者临床治疗效果在损伤后 9 个月通过 Glasgow outcome scale(GOS)评价体系进行打分,3~5 分表示治疗效果好,1-2 分表示治疗效果差。所有参与该项研究的患者和健康者都签署了知情同意书,同时本研究经过本院伦理委员会批准。

### 1.2 血清样本收集

创伤性脑损伤患者从发生损伤到 24 h 内的血清,从第 1 次收集完后每隔 24 h 收集 1 次,共收集 21 次。血液样本收集后立刻进行处理。分离血清 3 000 r/min,离心 15 min,  $-80^{\circ}\text{C}$  保存待测。

### 1.3 RNA 提取和实时定量 PCR(real-time quanti-

tive PCR,qRT-PCR)

用 1 步法 phenol/chloroform RNA 提取试剂盒从 100  $\mu\text{L}$  血清中提取总 RNA,Nanodrop 测定总 RNA 的含量和浓度,所有 RNA 测量吸光度(A)值,保证 RNA 的完整性( $A_{260}/A_{280} > 2.0$ )。总 mRNA 按照 TaKaRa 公司逆转录试剂盒操作说明书逆转录成 cDNA。用 TaqMan miRNA 探针试剂盒(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)进行 real-time PCR 扩增,反应体系:1  $\mu\text{L}$  cDNA (500 ng/20  $\mu\text{L}$ ),0.6  $\mu\text{L}$  primer (10 pmol/L),9  $\mu\text{L}$  2 $\times$  SYBR Green PCR Master Mix,无 RNase 水 8.4  $\mu\text{L}$ 。反应条件:95  $^{\circ}\text{C}$  2 min 预热,95  $^{\circ}\text{C}$  15 s 变性,55  $^{\circ}\text{C}$  30 s 退火,68  $^{\circ}\text{C}$  30 s 延伸,40 个循环。

### 1.4 统计学处理

采用 SPSS 18.0 统计软件。miRNAs 数据用平均值  $\pm$  SEM 表示,其他计量资料采用平均值  $\pm$  SD 表示;采用单因素方差分析(one-way ANOVA)比较各组间差异;用接受者操作特征(receiver operating characteristic,ROC)曲线分析评价 miRNAs 在创伤性脑损伤诊断中的价值。其中以  $\alpha = 0.05$ ,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 创伤性脑损伤患者血清中 miR-93,miR-191,miR-499 表达情况

三种 miRNA 与对照组相比表达都显著性升高。这三种 miRNAs 在受伤后 24 h 之内表达都显著性升高,与对照组相比,差异具有统计学意义( $t = 9.87$ ,  $P < 0.001$ ;  $t = 6.73$ ,  $P < 0.001$ ;  $t = 6.05$ ,  $P < 0.01$ );在 2~7 d,这三种 miRNAs 在血清中浓度达到峰值,差异具有统计学意义( $t = 12.54$ ,  $P < 0.001$ ;  $t = 7.86$ ,  $P < 0.001$ ;  $t = 8.45$ ,  $P < 0.001$ );在 8~14 以及 15~21 d 患者血清中三种 miRNAs 浓度下降,但与对照组相比,差异还具有统计学意义。

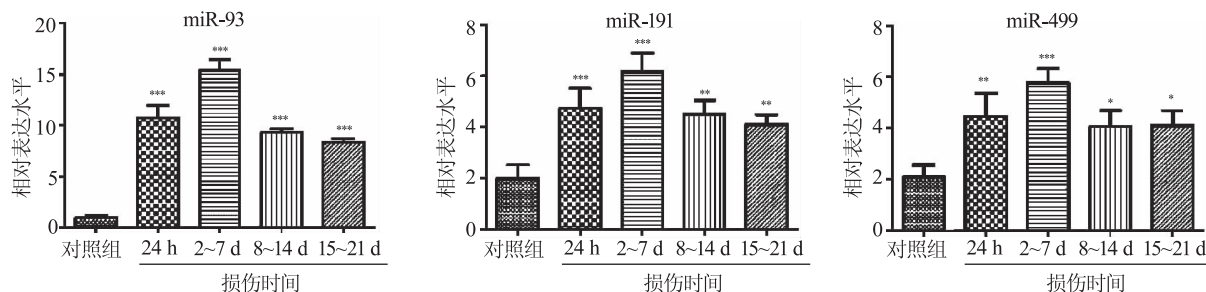


图 1 创伤性脑损伤后患者血清中三种 miRNAs 的表达水平 与对照组相比,\*  $P < 0.05$ ,\*\*  $P < 0.01$ ,\*\*\*  $P < 0.001$

2.2 miR-93,miR-191,miR-499 表达水平与患者损伤程度的关系

如图 2 所示,与对照组相比,三种不同程度脑损伤患者血清中三种 miRNAs 浓度都显著性上升,差异具有统计学意义( $P$  均 $<0.05$ ),而且重度脑损伤患者血清中的 miRNAs 浓度最高,与轻度 and 中度脑损伤患者相比,差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。

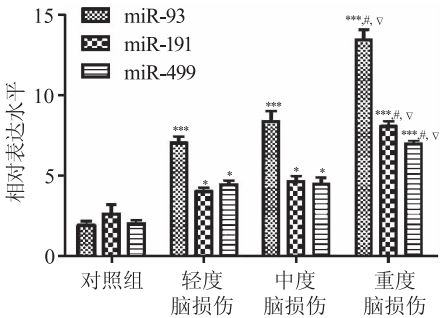


图 2 miR-93,miR-191,miR-499 表达与患者损伤程度的关系 与对照组相比,\*  $P<0.05$ ,\*\*  $P<0.01$ ,\*\*\*  $P<0.001$ ;与轻度脑损伤相比,#  $P<0.05$ ;与中度脑损伤相比,Δ  $P<0.05$

2.3 miR-93,miR-191,miR-499 表达水平与患者治疗后临床疗效的相关性

如图 3 所示,miR-93,miR-191,miR-499 在 A 组中浓度高于 B 组,差异具有统计学意义( $t=8.62$ ,  $P<0.001$ ;  $t=5.39$ ,  $P<0.01$ ;  $t=5.25$ ,  $P<0.01$ )。

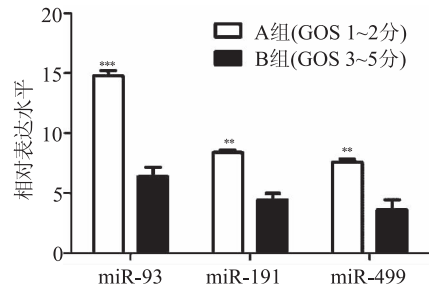


图 3 miR-93,miR-191,miR-499 表达与患者治疗临床疗效的相关性 与 B 组相比,\*\*  $P<0.01$ ,\*\*\*  $P<0.001$

2.4 miR-93,miR-191,miR-499 表达水平与其诊断价值的关系

如图 4 所示,其中 miR-93,miR-191,miR-499 三种 miRNAs ROC 曲线下面积 (area under the curve,AUC) 分别为 0.952 0 (95%CI = 0.906 5 ~ 0.997 4;  $P<0.001$ ),0.874 6 (95%CI = 0.793 3 ~ 0.955 8;  $P<0.001$ ),0.780 7 (95%CI = 0.671 9 ~ 0.889 5;  $P<0.001$ )。

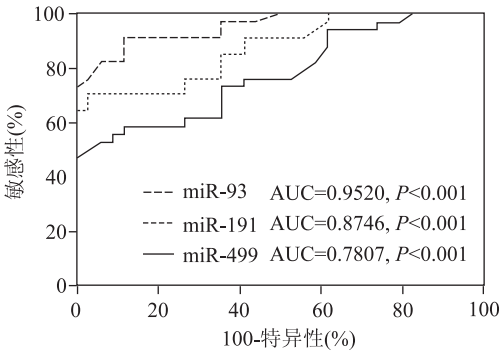


图 4 创伤性脑损伤患者血清中 miR-93, miR-191 and miR-499 表达水平的 ROC 分析

3 讨论

到目前为止,只有 Redell 团队报道发现重度创伤性脑损伤患者血液中 miRNAs 表达发生改变,其中 33 个表达下调,19 个表达上调<sup>[5]</sup>。但是在这项研究中 TBI 患者样本数较少,而且 miRNAs 长期表达的变化也未进行研究,特别是 miRNAs 和患者临床治疗效果的关系也未进行研究。某些 miRNA miR-93,miR-191 和 miR-499 已经在大鼠大脑皮层以及海马被发现表达上调。但这几个 miRNAs 在创伤性脑损伤患者中的表达情况还未见相关报道。因此,本研究目的是探讨 miR-93,miR-191,miR-499 在 TBI 患者中的表达情况以及这三个 miRNAs 与患者脑损伤程度、临床治疗效果、诊断价值的关系。

本研究结果发现与对照组相比,创伤性脑损伤患者血清中这三个 miRNA 显著上调,而且在 2~7 d,这三种 miRNAs 在血清中浓度达到峰值。另外,可通过这三个 miRNAs 表达情况判断患者脑损伤的严重程度。结果表明 miR-93,miR-191,miR-499 可作为创伤性脑损伤患者诊断和进展监控的新型标志物以及可能参与到创伤性脑损伤患者病理发生过程中。

miRNAs 表达失调与细胞增殖、凋亡、周期进展、肿瘤发生等生理和病理过程有关。几项研究已表明创伤性脑损伤后在大鼠大脑皮层、海马以及血液中的 miRNAs 表达发生改变<sup>[4, 6]</sup>。Ping 等<sup>[7]</sup>研究发现大鼠在创伤性脑损伤后 48 和 72 h 大脑皮层中 miR-93 表达上调 2 倍多。另外,也有相关研究发现大鼠的大脑皮层和海马在创伤性脑损伤后 miR-191,miR-499 表达上调<sup>[8]</sup>。也有越来越多证据表明血清中 miRNAs 主要来自于组织中,特别是受疾病

影响的组织,比如脑组织等。由损伤脑组织释放的 miRNAs 很可能是创伤性脑损伤患者血液中 miRNAs 差异表达的主要原因<sup>[9]</sup>。最近也有报道发现由细胞或者组织分泌到血液中的 miRNAs 在细胞通讯过程中具有重要作用<sup>[10]</sup>。这些外分泌 miRNAs 通过微管, Ago 蛋白以及高密度脂蛋白的运输到靶细胞,然后由靶细胞转化成激活形式发挥作用<sup>[11-12]</sup>。因此,本研究推断创伤性脑损伤患者血清中 miR-93, miR-191 以及 miR-499 持续稳定高表达可能是由于患者大脑皮层或者海马发生损伤,然后外分泌进入到血清中。但是对该问题很有必要进一步深入研究。

本研究也发现与轻度和中度脑损伤患者相比,重度创伤性脑损伤患者血清中的 miR-93, miR-191 以及 miR-499 存在显著性高表达,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),而且这三种 miRNAs 表达在临床治疗效果差的患者血清中要显著高于临床治疗效果好的患者。因此,这三种 miRNAs 或许参与到创伤性脑损伤的发生、进展以及修复过程。创伤性脑损伤的病理复杂,与炎症,凋亡和神经元再生等有关。Montalban 等<sup>[13]</sup>发现 miR-93 受神经营养素调控,靶向与神经元相关的信号通路蛋白。另外, Brett 等<sup>[14]</sup>报道发现 miR-93 与 FoxO3 结合,调控胰岛素生长因子信号通路,在神经干细胞稳态方面发挥重要作用。同时,也有报道发现 miR-191 可抑制脑源性神经因子表达,从而抑制脑发育和大脑海马神经再生<sup>[15-16]</sup>。Li 等<sup>[17]</sup>报道 miR-499 主要参与到细胞增殖、凋亡、周期、骨架重塑等生理过程。因此,推断这三种 miRNAs 是重要的基因调控因子,在创伤性脑损伤后的病理以及脑修复过程中具有重要功能,但这三种 miRNAs 在创伤性脑损伤中的具体功能以及机制还需要进一步深入的研究。

本研究有以下几方面的缺陷。第一方面,样本数较小,主要是纳入标准所限,体现在两点:一是本研究所有的患者的血清样本收集都是患者在医院注册完成后进行的;二是患者的住院时间为至少 1 个月,因此血清样本收集的时间截至到第 21 d;第二方面,对 miRNAs 的变化检测评价是一个短期而不是长期过程,长期的监测更有利于确定 miRNAs 与创伤性脑损伤的相关性。本研究创伤性脑损伤患者的临床治疗效果是在损伤后 9 个月用 GOS 评分进行评价的,而血清中 miRNAs 浓度的检测是在 1 个月内(21 d),这主要是因为患者出院后血清样本不

容易获取。尽管存在上面的一些缺陷,与其他一些仅检测 3~7 d 内患者血清中生物标志物浓度的相关研究<sup>[18]</sup>相比,本研究已经做了很大改善;第三方面, miR-93, miR-191 以及 miR-499 也有可能由其他细胞和组织分泌产生,因此不能排除来自脑外组织释放这三种 miRNAs 的可能。

总之,结果表明外伤性脑损伤患者血清中 miR-93, miR-191, miR-499 表达上调。同时,这三个 miRNA 与外伤性脑损伤的严重程度以及患者临床病理特征有关。所以,miRNAs 在创伤性脑损伤的发生和进展中发挥重要作用,而且可以作为 TBI 潜在的诊断与预后指标。

### 参 考 文 献

- [1] Cooper DJ, Presneill J. Hypothermia for intracranial hypertension after traumatic brain injury[J]. *N Engl J Med*, 2016, 374(14):1383-1385.
- [2] Heather NL, Derrai JG, Beca J, et al. Glasgow coma scale and outcomes after structural traumatic head injury in early childhood[J]. *PLoS One*, 2013, 8(12):e82245.
- [3] Wu J, Song J, Wang C, et al. Identification of serum microRNAs for cardiovascular risk stratification in dyslipidemia subjects[J]. *Int J Cardiol*, 2014, 172(1):232-234.
- [4] Hu Z, Yu D, Almeida-Suhett C, et al. Expression of miRNAs and their cooperative regulation of the pathophysiology in traumatic brain injury[J]. *PLoS One*, 2012, 7(6):e39357.
- [5] Redell JB, Moore AN, Ward NH, et al. Human traumatic brain injury alters plasma microRNA levels[J]. *J Neurotrauma*, 2010, 27(12):2147-2156.
- [6] Redell JB, Dash PK. Altered expression of miRNA-21 and its targets in the hippocampus after traumatic brain injury[J]. *J Neurosci Res*, 2011, 89(2):212-221.
- [7] Lei P, Li Y, Chen X, et al. Microarray based analysis of microRNA expression in rat cerebral cortex after traumatic brain injury[J]. *Brain Res*, 2009, 1284:191-201.
- [8] Redell JB, Dash PK. Traumatic brain injury alters expression of hippocampal microRNAs: potential regulators of multiple pathophysiological processes[J]. *J Neurosci Res*, 2009, 87(6):1435-1448.
- [9] Almeida-Suhett CP, Li Z, Marini AM, et al. Temporal course of changes in gene expression suggests a Cytokine-Related mechanism for Long-Term hippocampal alteration after controlled cortical impact[J]. *J Neurotrauma*, 2014, 31(7):683-690.
- [10] Chen X, Liang H, Zhang J, et al. Secreted microRNAs: a new form of intercellular communication[J]. *Trends Cell Biol*, 2012, 22(3):125-132.
- [11] Pegtel, M D. M D van de Garde, and J M Middeldorp, Viral miRNAs exploiting the endosomal-exosomal pathway for intercellular cross-talk and immune evasion[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1809(11/12):715-721.

- 
- [12] Creemers EE, Pinto YM. Circulating microRNAs: novel biomarkers and extracellular communicators in cardiovascular disease? [J]. *Circ Res*, 2012, 110(3):483-495.
- [13] Montalban E, Mattugini N, Ciarapica RA, et al. MiR-21 is an Ngf-Modulated MicroRNA That Supports Ngf Signaling and Regulates Neuronal Degeneration in PC12 Cells[J]. *Neuromolecular Med*, 2014, 16(2):415-430.
- [14] Brett JO, Renault VM, Rafalski VA, et al. The microRNA cluster miR-106b~25 regulates adult neural stem/progenitor cell proliferation and neuronal differentiation[J]. *Aging (Albany NY)*, 2011, 3(2):108-124.
- [15] Varendi K, Kumar A, H rma MA, et al. miR-1, miR-10b, miR-155, and miR-191 are novel regulators of BDNF[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2014, 71(22):4443-4456.
- [16] Ohta K, Hoshino H, Wang J, et al. MicroRNA-93 activates c-Met/PI3K/Akt pathway activity in hepatocellular carcinoma by directly inhibiting PTEN and CDKN1A [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(5):3211-3224.
- [17] Li X, Wang J, Jia Z, et al. MiR-499 regulates cell proliferation and apoptosis during late-stage cardiac differentiation via Sox6 and cyclin D1[J]. *PLoS One*, 2013, 8(9):e74504.
- [18] Mondello S, Buki A, Barzo P, et al. CSF and plasma amyloid- $\beta$  temporal profiles and relationships with neurological status and mortality after severe traumatic brain injury[J]. *Sci Rep*, 2014, 4:6446.

(2016-04-08 收稿)