

循环 miRNAs 评估颈动脉粥样硬化斑块稳定性的临床意义

程兴 潘小玲 杨雯 胡传琛 陆海鹏 王建伟 应鸣翹 傅亚明 邵慧军 陈红芳

【摘要】目的 探讨 miR-21、miR-126、miR-155、miR-221、miR-222 评估颈动脉粥样硬化斑块稳定性及筛查颈动脉粥样硬化相关脑卒中高危人群的临床价值。**方法** 选择颈动脉不稳定斑块伴脑梗死患者 35 例、颈动脉不稳定斑块患者 41 例、颈动脉稳定斑块患者 28 例,另选择 30 例同期健康体检者作为健康对照组。采用实时定量荧光 PCR(RT-qPCR)法检测 miRNAs 的表达水平并比较。**结果** 脑梗死组、不稳定斑块组、稳定斑块组的 miR-21、miR-155、miR-221、miR-222 表达水平均较健康对照组升高,不稳定斑块组 miR-126 的表达水平较稳定斑块组明显降低,脑梗死组的 miR-126 表达水平较不稳定斑块组也降低,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。脑梗死组中的 miR-126 表达水平与 LDL-C、TC 水平呈明显负相关。**结论** miR-21、miR-126、miR-155、miR-221、miR-222 可能与斑块的增长、不稳定、破裂演变过程密切相关,有望作为评估颈动脉粥样硬化斑块稳定性及筛查颈动脉粥样硬化相关脑卒中高危人群的生物标志物。

【关键词】 miR-21 miR-126 miR-155 miR-221 miR-222

Clinical value of circular miRNAs for assessment of carotid atherosclerosis CHENG Xing, PAN Xiaoling, YANG Wen, et al. Department of Neurology, Zhejiang University Jinhua Hospital, Jinhua 321000, China

【Abstract】Objective To explore the clinical value of miR-21, miR-126, miR-155, miR-221 and miR-222 for assessment of carotid atherosclerosis plaque stability, screening of patients with risk of carotid atherosclerosis-related stroke. **Methods** 35 stroke patients with unstable carotid plaques accompanied, 41 patients with unstable carotid plaques, 28 patients with stable carotid plaques, and 30 healthy subjects were enrolled in this study. The expression levels of microRNAs were quantified by qRT-PCR. **Results** The expression levels of miR-21, miR-155, miR-221 and miR-222 in stroke group, unstable plaques group, and stable plaques group were all significantly higher than those in healthy control group, The expression of miR-126 in unstable plaques group was significantly lower than that in stable plaques group, also the expression of miR-126 in stroke group was significantly lower than that in unstable plaques group (all $P < 0.01$). The miR-126 expression in stroke group was negatively correlated with the circular level of low-density lipoprotein cholesterol(LDL-C) and total cholesterol(TC). **Conclusion** This study suggested that miR-21, miR-126, miR-155, miR-221 and miR-222 may be involved in the growth, instability and rupture of the carotid plaques, and may serve as potential biomarkers for assessment of plaque stability; and screening of patients with risk of carotid atherosclerosis-related stroke.

【Key words】 miR-21 miR-126 miR-155 miR-221 miR-222

缺血性脑卒中易导致患者残疾甚至死亡,其中由于颈动脉粥样硬化斑块破裂、脱落所致的缺血性脑卒中约占 20%。然而,目前临床上缺乏可以有效评估斑块稳定性以便筛选缺血性脑卒中高危人群的生物标志物。miRNAs 是真核生物体内能够可逆性调控基因表达

的一类非编码 RNA,参与几乎所有人体生命活动的主要进程,包括细胞增殖、分化和凋亡等^[1]。本研究选取 5 种可能与动脉粥样硬化斑块形成相关的 miRNAs,即 miR-21、miR-126、miR-155、miR-221、miR-222,比较其在不同类型颈动脉粥样硬化斑块患者中的表达水平,并探讨这些指标评估斑块稳定性的临床意义,现将研究结果报道如下。

1 对象和方法

1.1 对象 选取 2016 年 9 月至 2017 年 3 月我院神经内科就诊的脑梗死组患者 35 例(脑梗死组),其中男

DOI:10.12056/j.issn.1006-2785.2019.41.11.2018-2245

基金项目:浙江省科技厅公益计划项目(2016C33228);浙江省医药卫生科技计划项目(2015KYB417)

作者单位:321000 浙江大学金华医院神经内科

通信作者:陈红芳,E-mail:jhchf894@163.com

24 例,女 11 例,年龄 50~84(69.3±10.6)岁;同期体检中心经多普勒彩超证实存在颈动脉不稳定斑块患者 41 例(不稳定斑块组),男 24 例,女 17 例,年龄 45~90(66.0±11.2)岁;稳定斑块患者 28 例(稳定斑块组),男 16 例,女 12 例,年龄 58~82(68.3±5.8)岁;另选健康体检者 30 例作为健康对照组,其中男 16 例,女 14 例,年龄 54~78(66.7±7.2)岁。脑梗死组患者诊断均符合 2014 年中国急性缺血性脑卒中诊治指南标准,经头颅 MRI 检查证实为颈内动脉系统的脑梗死,且经多普勒彩超证实合并存在颈动脉不稳定斑块。所有受试者均排除急慢性炎症、恶性肿瘤及血液系统疾病,并均签署知情同意书。

1.2 研究方法

1.2.1 一般资料比较 记录并比较 4 组对象吸烟、饮酒情况及高血压、糖尿病、冠心病、房颤患病率,记录并比较各组血脂 4 项水平(LDL-C、HDL-C、TG、TC)。

1.2.2 实时定量荧光 PCR(RT-qPCR)检测 引物设计及合成委托上海吉玛制药技术有限公司进行,各基因的引物序列见表 1。以 Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司)、氯仿提取血浆总 RNA,异丙醇沉淀回收 RNA,75% 乙醇洗涤 RNA 沉淀,焦炭酸二乙酯(DEPC)水溶解,得到 RNA 溶液。利用提取的总 RNA,加入特异性引物,用 DEPC 水定容至 12μl,70℃温浴 5min,迅速置冰上 10s。离心,加入 4μl 反应缓冲液、2μl dNTP、1μl RNA 酶抑制剂、1μl RevertAidTMM-MuLV 逆转录酶(加拿大 Fermentas 公司),37℃温浴 5min,42℃温浴 1h,70℃温浴 10min 后终止反应。Q-PCR 利用 SYBR Green I PCR 试剂盒(上海吉玛制药技术有限公司)完成。PCR 反应条件:95℃ 10min;然后进入 95℃ 15s,60℃ 1min 的循环(共 40 次),每个反应有 3 次重复。以 5S rRNA 作为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算相对表达量,各组相比

表 1 RT-qPCR 反应引物序列

基因	引物序列
miR-21	茎环引物:5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCCG- ACTGGATACGACTCAACA-3' 上游引物:5'-CCGCTTATCAGACTGATGTT-3' 下游引物:5'-CGCAGGGTCCGAGGTATTCC-3'
miR-126	茎环引物:5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCCG- ACTGGATACGACCCGATT-3' 上游引物:5'-TATGCGGTCGTATCCAG-3' 下游引物:5'-CAGGGTCCGAGGTATTCC-3'
miR-155	茎环引物:5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCCG- ACTGGATACGACACCCCT-3' 上游引物:5'-TTCGAGGGTCCGAGGTA-3' 下游引物:5'-CCAGTGCAGGGTCCGAGGTATT-3'
miR-221	茎环引物:5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCCG- ACTGGATACGACGAAACC-3' 上游引物:5'-TCCTCGGTTTCCTCGTATC-3' 下游引物:5'-GCAGGGTCCGAGGTATTCC-3'
miR-222	茎环引物:5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCCG- ACTGGATACGACACCAG-3' 上游引物:5'-TACATCTGGCTACTGGGTGTCGTATC-3' 下游引物:5'-TCGCAGGGTCCGAGGTATTCC-3'
5S rRNA	上游引物:5'-GTCTACGGCCATACCACCCTGAA-3' 下游引物:5'-AAGCCTACAGCACCCGGTATTCC-3'

健康对照组的表达倍数差异采用 log₂ 转换。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 18.0 统计软件。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析;计数资料以百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验;健康对照组与脑梗死组中 miRNAs 和血脂水平的相关性采用 Pearson 相关分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 4 组对象的一般资料比较 见表 2。

表 2 4 组对象的一般资料比较

组别	n	吸烟 [n(%)]	饮酒 [n(%)]	高血压 [n(%)]	糖尿病 [n(%)]	冠心病 [n(%)]	房颤 [n(%)]	LDL-C (mmol/L)	HDL-C (mmol/L)	TG (mmol/L)	TC (mmol/L)
脑梗死组	35	14(40.0)	13(37.1)	21(60.0)	7(20.0)	2(5.7)	2(5.7)	3.19 ± 0.73	1.08 ± 0.29**	1.51 ± 0.72	4.74 ± 0.93**
不稳定斑块组	41	14(34.1)	12(29.3)	19(46.3)	3(7.3)	2(4.9)	1(2.4)	3.13 ± 0.86	1.23 ± 0.26	1.66 ± 0.76	4.60 ± 1.01*
稳定斑块组	28	12(42.8)	12(42.9)	18(64.3)	2(7.1)	2(7.1)	2(7.1)	2.89 ± 0.54	1.20 ± 0.23	1.68 ± 0.76	4.39 ± 0.59
健康对照组	30	6(20.0)	5(16.7)	11(36.7)	5(16.7)	3(10)	0(0.0)	2.75 ± 0.78	1.31 ± 0.28	1.62 ± 0.74	4.07 ± 0.96
χ^2/F 值		4.135	5.357	5.924	4.007	0.763	3.550	2.459	4.348	0.355	3.363
P值		0.257	0.147	0.115	0.261	0.858	0.314	0.066	0.006	0.785	0.021

注:与健康对照组比较,* $P < 0.05$;** $P < 0.01$

由表 2 可见,4 组对象吸烟、饮酒、高血压、糖尿病、冠心病、房颤患病率差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。

脑梗死组、不稳定斑块组的 TC 水平明显高于健康对照组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。脑梗死组的

HDL-C 水平明显低于健康对照组,差异有统计学意义($P<0.01$)。

2.2 4 组对象的 miR-21、miR-126、miR-155、miR-221、miR-222 表达水平比较 见表 3。

表 3 4 组对象的 miR-21、miR-126、miR-155、miR-221、miR-222 表达水平比较

组别	n	miR-21	miR-126	miR-155	miR-221	miR-222
脑梗死组	35	1.97 ± 1.01**	0.38 ± 0.23 ^{▲▲}	2.16 ± 0.93**	2.85 ± 0.87**	3.10 ± 1.34**
不稳定斑块组	41	2.38 ± 0.97**	0.60 ± 0.45 ^{△△}	2.25 ± 1.13**	2.51 ± 1.56**	2.92 ± 0.97**
稳定斑块组	28	2.15 ± 1.26**	0.94 ± 0.36	2.31 ± 1.52**	2.47 ± 1.22**	2.76 ± 1.24**
健康对照组	30	1.00 ± 0.50	1.00 ± 0.30	1.00 ± 0.53	1.00 ± 0.51	1.00 ± 0.50
F 值		12.579	22.138	10.282	16.221	26.263
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与健康对照组比较,** $P<0.01$;与稳定斑块组比较,^{△△} $P<0.01$;与不稳定斑块组比较,^{▲▲} $P<0.01$

由表 3 可见,脑梗死组、不稳定斑块组、稳定斑块组的 miR-21、miR-155、miR-221、miR-222 表达水平均明显高于健康对照组,差异均有统计学意义(均 $P<0.01$)。不稳定斑块组的 miR-126 表达水平低于稳定斑块组,

脑梗死组的 miR-126 表达水平低于不稳定斑块组,差异均有统计学意义(均 $P<0.01$)。

2.3 miRNAs 表达水平与血脂 4 项水平的相关性 见表 4。

表 4 miRNAs 表达水平与血脂 4 项水平的相关性

组别	n	miR-21		miR-126		miR-155		miR-221		miR-222	
		r 值	P 值	r 值	P 值	r 值	P 值	r 值	P 值	r 值	P 值
脑梗死组	35										
LDL-C		0.272	0.146	-0.358	0.050	0.247	0.188	0.248	0.187	0.268	0.152
HDL-C		0.175	0.355	-0.232	0.218	0.084	0.658	0.110	0.562	0.080	0.674
TC		0.290	0.120	-0.383	0.037	0.242	0.197	0.264	0.159	0.264	0.159
TG		0.147	0.438	-0.309	0.097	0.233	0.216	0.197	0.298	0.210	0.266
健康对照组	30										
LDL-C		-0.057	0.745	-0.211	0.224	-0.132	0.450	-0.157	0.369	-0.183	0.293
HDL-C		-0.058	0.741	0.130	0.456	0.056	0.751	0.056	0.748	0.160	0.360
TC		-0.088	0.615	-0.184	0.290	-0.064	0.713	-0.093	0.595	-0.244	0.159
TG		-0.088	0.615	-0.146	0.402	0.020	0.911	-0.021	0.906	-0.087	0.619

由表 4 可见,脑梗死组的 miR-126 表达水平与 LDL-C、TC 水平呈负相关,而 miR-21、miR-155、miR-221、miR-222 与血脂水平无明显相关性。

3 讨论

动脉粥样硬化是累及中等或大血管的慢性血管炎症性疾病,目前认为其病理机制涉及血管内皮功能的失调引起管壁粥样硬化斑块的沉积,进一步发展导致血管的缺血、闭塞。miRNAs 可通过调控血管内皮细胞的功能,参与血管平滑肌细胞从非增殖状态到增殖状态的转化,与动脉粥样硬化形成密切相关。本研究选取迄今为止文献报道在人体或动物实验中发现可能与动脉粥样硬化相关的其中 5 种 miRNAs,即 miR-21、miR-126、miR-155、miR-221、miR-222,进一步探究其在不同类型颈动脉粥样硬化斑块的表达差异。

通过比较 5 种 miRNAs 在脑梗死组、不稳定斑块组、稳定斑块组及健康对照组血浆中的表达水平,我们发现的确存在 miRNAs 表达水平的明显变化。其中,miR-21、miR-155、miR-221、miR-222 在脑梗死组、不稳定斑块组、稳定斑块组患者中均明显升高,提示其可能起到促进动脉粥样硬化形成的作用。有研究表明,动脉血管中 miR-21 的异常过表达易导致新生血管内膜损伤从而增加心血管事件风险^[2-3]。Raitoharju 等^[4]发现 miR-21 在颈动脉粥样硬化患者中的表达水平显著上升,与我们的研究结果相一致。miR-155 与内皮细胞炎症应答及机体免疫系统功能密切相关,通过调控内皮细胞一氧化氮合酶而影响血管内皮的舒张,从而促进动脉粥样硬化的发生^[5]。在动脉粥样硬化小鼠的外周血和巨噬细胞中,miR-155 的表达水平明显升高,敲除或抑制 miR-155 可明显缩小斑块的大小及抑制巨噬细胞

的积聚^[6-7]。而 miR-221、miR-222 的生物学功能则被认为具有细胞特异性：在血管平滑肌细胞中，miR-221、miR-222 具有促进细胞增殖、迁移、凋亡的作用，而在血管内皮细胞中其作用则恰好相反^[8]。本研究值得关注的另一个发现，miR-126 在脑梗死组、不稳定斑块组、稳定斑块组之间存在显著梯度性的下降。miR-126 在血管内皮细胞中高度表达，与血管重塑密切相关，可调控血管细胞黏附分子 1、单核细胞趋化蛋白等相关靶基因的表达^[9]。目前研究认为，miR-126 的表达升高可起到抗动脉粥样硬化作用。在大鼠线栓法大脑中动脉闭塞模型中，血清 miR-126 的表达水平被检测到明显的降低^[10]。目前认为，斑块的稳定性主要与其内部脂质含量相关，其中主要指的是氧化 LDL-C^[11]。另外，我们在脑梗死组与健康对照组比较中发现，miR-126 的表达水平与 LDL-C、TC 水平呈明显负相关。因而，本研究首次揭示 miR-126 可能与颈动脉粥样硬化斑块的发展、演变密切相关，并且有望成为预测脑卒中风险评估的生物标志物。

本研究测定了与动脉粥样硬化斑块形成、演变密切相关的 5 种 miRNAs 在不同类型颈动脉粥样硬化斑块，即脑梗死组、不稳定斑块组、稳定斑块组及健康对照血浆中的表达水平。我们发现 miR-21、miR-155、miR-221、miR-222 在脑梗死组、不稳定斑块组、稳定斑块组中均明显升高，提示可能起着促进动脉粥样硬化形成的作用。而 miR-126 在脑梗死组、不稳定斑块组、稳定斑块组之间存在显著梯度性的下降，揭示 miR-126 可能与颈动脉粥样硬化斑块的发展、演变密切相关，并且有望成为预测脑卒中风险评估的生物标志物，值得后续更大样本或多中心的病例对照研究进行进一步的论证。

4 参考文献

- [1] van Rooij E. The art of microRNA research[J]. *Circ Res*, 2011, 108(2): 219-234. DOI:10.1161/CIRCRESAHA.110.227496.
- [2] Ji R, Cheng Y, Yue J, et al. MicroRNA expression signature and antisense-mediated depletion reveal an essential role of MicroRNA in vascular neointimal lesion formation[J]. *Circ Res*, 2007, 100(11): 1579-1588. DOI:10.1161/CIRCRESAHA.106.141986.
- [3] Fan X, Wang E, Wang X, et al. MicroRNA-21 is a unique signature associated with coronary plaque instability in humans by regulating matrix metalloproteinase-9 via reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs[J]. *Exp Mol Pathol*, 2014, 96(2): 242-249. DOI:10.1016/j.yexmp.2014.02.009.
- [4] Raitoharju E, Lyytikäinen LP, Levula M, et al. miR-21, miR-210, miR-34a, and miR-146a/b are up-regulated in human atherosclerotic plaques in the Tampere Vascular Study[J]. *Atherosclerosis*, 2011, 219(1): 211-217. DOI:10.1016/j.atherosclerosis.2011.07.020.
- [5] Sun HX, Zeng DY, Li RT, et al. Essential role of microRNA-155 in regulating endothelium-dependent vasorelaxation by targeting endothelial nitric oxide synthase[J]. *Hypertension*, 2012, 60(6): 1407-1414. DOI:10.1161/HYPERTENSIONAHA.112.197301.
- [6] Du F, Yu F, Wang Y, et al. MicroRNA-155 deficiency results in decreased macrophage inflammation and attenuated atherogenesis in apolipoprotein E-deficient mice[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014, 34(4): 759-767. DOI:10.1161/ATVBAHA.113.302701.
- [7] Nazari-Jahantigh M, Wei Y, Noels H, et al. MicroRNA-155 promotes atherosclerosis by repressing Bcl6 in macrophages[J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(11): 4190-4202. DOI:10.1172/JCI61716.
- [8] Liu X, Cheng Y, Yang J, et al. Cell-specific effects of miR-221/222 in vessels: molecular mechanism and therapeutic application[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2012, 52(1): 245-255. DOI:10.1016/j.yjmcc.2011.11.008.
- [9] Maitrias P, Metzinger-Le Meuth V, Nader J, et al. The Involvement of miRNA in Carotid-Related Stroke[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2017, 37(9): 1608-1617. DOI:10.1161/ATVBAHA.117.309233.
- [10] Kim JM, Jung KH, Chu K, et al. Atherosclerosis-Related Circulating MicroRNAs as a Predictor of Stroke Recurrence[J]. *Transl Stroke Res*, 2015, 6(3): 191-197. DOI:10.1007/s12975-015-0390-1.
- [11] Derksen WJ, Peeters W, van Lammeren GW, et al. Different stages of intraplaque hemorrhage are associated with different plaque phenotypes: a large histopathological study in 794 carotid and 276 femoral endarterectomy specimens[J]. *Atherosclerosis*, 2011, 218(2): 369-377. DOI:10.1016/j.atherosclerosis.2011.07.104.

(收稿日期:2018-09-04)

(本文编辑:杨丽)