

文章编号:1003-2754(2019)06-0527-04

血浆 microRNA-135a 及 microRNA-210 在轻度认知损害患者中的检测价值

胡轶虹, 白春艳, 李宗树, 吕金珠, 杨春丽, 孙宏侠

摘要: 目的 探讨血浆 microRNA-135a、microRNA-210 在轻度认知损害患者中的诊断价值。方法 收集于我院就诊的轻度认知损害患者及健康体检者的血液标本共 80 例,其中 AMC 组 28 例,VD-MCI 28 例,AD-MCI 24 例,采用 RT-qPCR 的方法进行血浆 miRNA 检测。结果 VD-MCI 组血浆 microRNA-135a 为 $(4.17 \times 10^{-7} \pm 8.35 \times 10^{-8})$; AD-MCI 组血浆 microRNA-135a 为 $(2.83 \times 10^{-7} \pm 1.72 \times 10^{-7})$; AMC 组血浆 microRNA-135a 为 $(9.87 \times 10^{-7} \pm 5.66 \times 10^{-7})$ 。3 组患者组间比较存在显著差异 ($F = 30.76, P = 0.00, P < 0.05$)。VD-MCI 组血浆 microRNA-210 为 $(4.27 \times 10^{-5} \pm 1.09 \times 10^{-5})$; AD-MCI 组血浆 microRNA-210 为 $(6.96 \times 10^{-5} \pm 2.48 \times 10^{-5})$; AMC 组血浆 microRNA-210 为 $(1.30 \times 10^{-5} \pm 7.07 \times 10^{-6})$ 。3 组患者组间比较存在显著差异 ($F = 80.43, P = 0.00, P < 0.05$)。3 组患者 MMSE 评分与两个检测指标间无明显相关性 ($P > 0.05$)。结论 血浆 microRNA-135a 及 microRNA-210 检测可辅助诊断轻度认知功能损害,对 AD-MCI 诊断价值更大。

关键词: 轻度认知损害; 微小 RNA; 生物标志物

中图分类号:R749.1 文献标识码:A

The detection of plasma microRNA-135a and microRNA-210 in the patient of mild cognitive impairment HU Yi-hong, BAI Chunyan, LI Zongshu, et al. (Department of Neurology, Jilin Province People's Hospital, Changchun 130021, China)

Abstract: **Objective** To evaluate the clinical value of plasma microRNA-135a, microRNA-210 in the detection of mild cognitive impairment. **Methods** The plasma samples of 80 subjects were collected from our hospital. There were 28 people with VD-MCI, 24 people with AD-MCI and 28 age-matched control (AMC). RT-qPCR was applied to test the level of microRNA-135a and microRNA-210. **Results** The levels of microRNA-135a in plasma were $(4.17 \times 10^{-7} \pm 8.35 \times 10^{-8})$, $(2.83 \times 10^{-7} \pm 1.72 \times 10^{-7})$ and $(9.87 \times 10^{-7} \pm 5.66 \times 10^{-7})$ in VD-MCI, AD-MCI and AMC. There were difference among three groups ($F = 30.76, P = 0.00, P < 0.05$). The levels of microRNA-210 in plasma were $(4.27 \times 10^{-5} \pm 1.09 \times 10^{-5})$, $(6.96 \times 10^{-5} \pm 2.48 \times 10^{-5})$ and $(1.30 \times 10^{-5} \pm 7.07 \times 10^{-6})$ in VD-MCI, AD-MCI and AMC. There were difference among three groups ($F = 80.43, P = 0.00, P < 0.05$). There were no correlations between the MMSE score and the two biomarkers ($P > 0.05$). **Conclusions** The plasma microRNA-135a and microRNA 210 were potential biomarkers of MCI, especially for AD-MCI.

Key words: Mild cognitive impairment (MCI); MicroRNA; Biomarker

随着全球老龄化的进程,阿尔茨海默病成为全球医疗界急于攻克的难题之一。临床病理研究指出本病有个比较长的临床前阶段;事实上认为脑组织病理,包括淀粉样斑及神经纤维缠结,早于典型神经细胞死亡及后续认知及行为症状出现的 10 ~ 20 y^[1]。因此,体液和影像的生物学标志物能在症状初期或临床前阶段得到证实,在这一时期干预治疗,可能更好的保留认知功能^[2]。本研究聚焦于轻度认知损害阶段,检测患者的血浆 microRNA-135a 及 microRNA-210,探讨其作为 MCI 早期诊断标志物的价值。

1 材料和方法

1.1 实验分组 (1)正常对照组 (AMC),年龄 ≥ 60 岁,保留正常的日常生活活动能力,无神经系

统疾病、精神疾病及其他可导致认知功能损害的医疗情况;(2)轻度认知损害组 (MCI),年龄 ≥ 60 岁,用简易智力状态检查量表 (MMSE) 及临床痴呆评定量表 (CDR) 进行认知功能临床评价。认知损害诊断标准:(1) $28 \geq \text{MMSE} \geq 21$;(2)非痴呆;(3)记忆力减退主诉;(4)保存一般认知功能;(5)较完整的日常生活活动能力(允许 2 个或更少的问题:电话、准备三餐、理财、完成家务);(6)根据教育程度的校正:12 y 以下 +1 分;6 y 以下 +2 分。根据头部 CT

收稿日期:2019-04-09;修订日期:2019-06-02

基金项目:吉林省自然科学基金(No. 20160101178JC)

作者单位:(吉林省人民医院神经内科,吉林 长春 130021)

通讯作者:孙宏侠, E-mail:984897342@qq.com

或 MRI 影像学检查及 Hachinski 缺血量表评分分为:(1)VD-MCI 组: Hachinski 缺血量表评分 ≥ 7 分伴有影像学脑血管病改变;(2)AD-MCI 组: Hachinski 缺血量表评分 < 4 分且无影像学脑血管病改变。3 组均行全面体格检查和神经系统检查,实验室检查(即血常规、尿常规、血生化、维生素 B12 和叶酸水平、甲状腺功能、同型半胱氨酸)和神经影像学(即核磁共振或 CT)检查。本研究所有受试者均知情同意。

1.2 标本采集 空腹 12 h 后,用 EDTA 真空采血管采血,立即在 $1380 \times g$ 离心 5 min。样本保存在 $4^\circ C$ 等待血浆制备,其后用 1.5 ml Eppendorf 管分装,储存在 $-80^\circ C$,直到进一步使用。

1.3 小 RNA 提取及 microRNA-135a 及 microRNA-210 测定 应用 miRNeasy Mini Kit (Qiagen, 德国),逆转录试剂盒 (Qiagen, 德国),按照说明书进行 RT-qPCR,以 cel-miR-39 为外参,使用 $2^{-\Delta CT}$ 法计算 microRNA-135a 及 microRNA-210 水平。

1.4 统计学分析 不同组间定量数据的比较应用配对 t 检验。对于分类变量应用 χ^2 检验。多个组间定量数据比较用 ANOVA 方差分析。miRNA 水平与 MMSE 评分相关性用 Pearson 相关系数分析。

2 结果

2.1 临床资料 筛选 2016 年 - 2018 年于吉林省人民医院神经内科门诊及住院患者,根据入组标准,共筛选出 80 人,年龄为 60 ~ 94 岁,其中 AMC 为 28 人,男 13 人,女 15 人,年龄中位数 69 岁;VD-MCI 28 人,男 19 人,女 9 人,年龄中位数 72 岁;AD-MCI 组 24 人,男 13 人,女 11 人,年龄中位数 73 岁。采用 χ^2 检验对 3 组患者的性别构成进行分析,结果

显示 3 组患者的性别构成并无统计学差异 ($P = 0.199, P > 0.05$),应用 t 检验对年龄进行比较,差异无显著性 ($P > 0.05$) (见表 1)。

2.2 血浆 microRNA-135a 检测 AMC 组患者血浆 microRNA-135a 水平为 $(9.87 \times 10^{-7} \pm 5.66 \times 10^{-7})$;VD-MCI 组患者血浆 microRNA-135a 水平为 $(4.17 \times 10^{-7} \pm 8.35 \times 10^{-8})$;AD-MCI 组血浆 microRNA-135a 水平为 $(2.83 \times 10^{-7} \pm 1.72 \times 10^{-7})$ 。采用 ANOVA 方差分析对 3 组患者的血浆 microRNA-135a 进行分析,结果显示 3 组患者组间 microRNA-135a 水平存在显著差异 ($F = 30.76, P = 0.00, P < 0.05$) (见图 1、表 2)。

2.3 血浆 microRNA-210 检测 AMC 组患者血浆 microRNA-210 水平为 $(1.30 \times 10^{-5} \pm 7.07 \times 10^{-6})$;VD-MCI 组血浆 microRNA-210 水平为 $(4.27 \times 10^{-5} \pm 1.09 \times 10^{-5})$;AD-MCI 组血浆 microRNA-210 水平为 $(6.96 \times 10^{-5} \pm 2.48 \times 10^{-5})$ 。采用 ANOVA 方差分析对 3 组患者的血浆 microRNA-210 进行分析,结果显示 3 组间存在显著差异 ($F = 80.43, P = 0.00, P < 0.05$) (见表 2、图 2)。

2.4 MMSE 评分与 microRNA 水平相关性分析 对 VD-MCI 组的 MMSE 评分与血浆 microRNA 两个指标进行 Pearson 相关性分析,统计结果显示,MMSE 评分与血浆 microRNA-135a 水平间 ($r = 0.20, P = 0.31, P > 0.05$),与血浆 microRNA-210 水平间 ($r = -0.12, P = 0.56, P > 0.05$) 并无明显统计学相关性。对 AD-MCI 组的 MMSE 评分与血浆 microRNA 两个指标进行 Pearson 相关性分析,结果显示,MMSE 评分与血浆 microRNA-135a 水平间 ($r = 0.24, P = 0.25, P > 0.05$);血浆 microRNA-210 水平间 ($r = -0.28, P = 0.18, P > 0.05$) 并无显著相关性。

表 1 入组患者基本临床资料

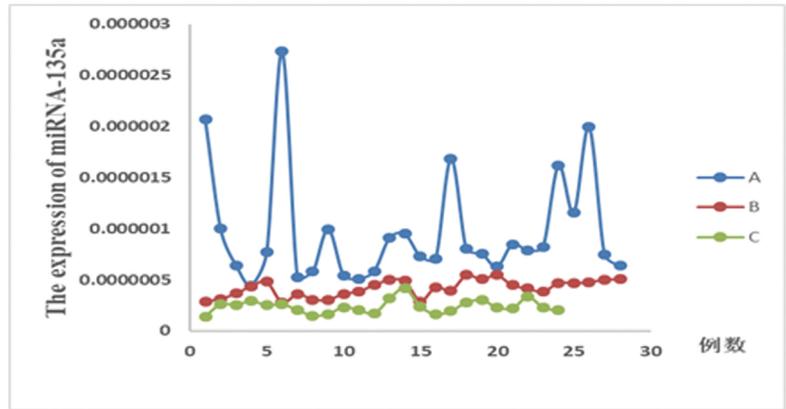
	60 ~ 69 岁	70 ~ 79 岁	80 ~ 89 岁	90 以上	男性	女性	总人数
MC	17	9	2	0	13	15	28
VD-MCI	11	11	6	0	19	9	28
AD-MCI	7	12	3	2	13	11	24

3 组患者年龄及性别均无明显差异 $P > 0.05$

表 2 3 组患者的血浆 microRNA-135a 及 microRNA-210 检测比较

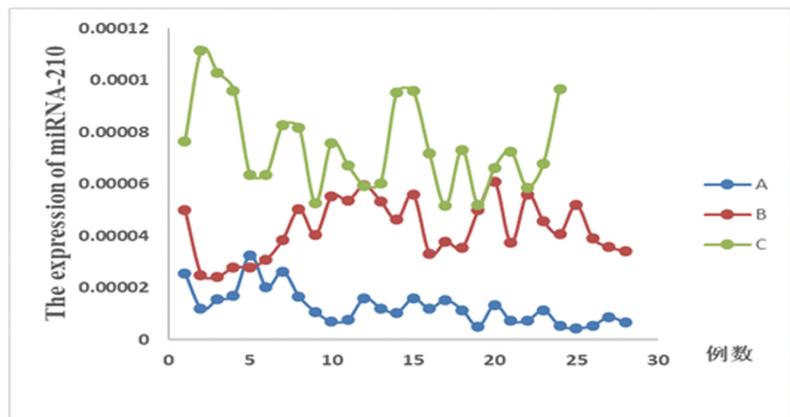
	MMSE	microRNA-135a	microRNA-210
AMC	29.58 \pm 0.49	$9.87 \times 10^{-7} \pm 5.66 \times 10^{-7}$	$1.30 \times 10^{-5} \pm 7.07 \times 10^{-6}$
VD-MCI	23.21 \pm 2.50	$4.17 \times 10^{-7} \pm 8.35 \times 10^{-8}$	$4.27 \times 10^{-5} \pm 1.09 \times 10^{-5}$
AD-MCI	24.72 \pm 3.08	$2.83 \times 10^{-7} \pm 1.72 \times 10^{-7}$	$6.96 \times 10^{-5} \pm 2.48 \times 10^{-5}$

注:VD-MCI 组及 AD-MCI 组血浆 microRNA-135a 明显下降,且 AD-MCI 组下降更为明显 ($P < 0.05$);VD-MCI 组及 AD-MCI 组血浆 microRNA-210 明显升高,且 AD-MCI 组升高更为明显 ($P < 0.05$)



注:A代表AMC组;B代表VD-MCI组;C代表AD-MCI组。VD-MCI组及AD-MCI组血浆microRNA-135a明显下降,且AD-MCI组下降更为明显($P < 0.05$)

图1 血浆microRNA-135a检测结果曲线图



注:A代表AMC组;B代表VD-MCI组;C代表AD-MCI组。VD-MCI组及AD-MCI组血浆microRNA-210明显升高,且AD-MCI组升高更为明显($P < 0.05$)

图2 血浆microRNA-210检测结果曲线图

3 讨论

目前,AD和其他形式的痴呆的诊断基于分析患者的认知功能。神经元之间的淀粉样斑块,神经纤维tau蛋白缠结和脑组织的整体萎缩是AD的特点,有很多基于这些现象而尝试开发诊断检查。最近发表的数据显示高灵敏度的AD检测,包括作为生物标记物的脑脊液(CSF)中 β 淀粉样蛋白1-42,总tau蛋白,磷酸化tau 181P蛋白的检测^[3,4]。然而,CSF的侵袭性收集过程限制了这些检测方法的日常临床使用。新的成像技术,包括体内检测 β 淀粉样蛋白沉积的PET扫描^[5~7],越来越敏感特异,但不适合初次筛选。一些团队基于大量的分析人类血液中蛋白质或抗体^[8~10],报道了关于AD诊断的血液化验分析,这极大的鼓舞了科学工作者继续在此方向进行深入探讨。

microRNA(miRNA)是一类非编码小分子RNA,

通过调控转录后基因表达发挥其生物学功能。近年来研究发现,miRNA在大脑发育、神经元分化、突触联系和树突棘形成等过程中发挥重要作用^[11]。而miRNA表达异常参与了阿尔茨海默病等认知功能障碍性疾病的发病过程,且这种表达异常不仅在病变脑区可以检测到,在血浆、脑脊液等外周体液亦可发现^[12]。这些发现使得将miRNA作为标记物早期检测和评估认知功能障碍成为可能。更为重要的是,由于可以靶向调节多种基因,miRNA可能是我们进一步理解认知功能障碍发病机制和研发新型药物的关键分子^[13]。

国内学者刘辰庚等研究发现,APP/PS1双转基因AD小鼠模型海马组织中microRNA-135a较野生型小鼠显著下调,且AD小鼠模型CSF和血清中的microRNA-135a亦显著下调^[14]。由于microRNA-135a相对BACE1和 $A\beta$ 42而言处于生物级联作用

的上游,故 microRNA-135a 可能对于 AD 的早期诊断有潜在帮助。这个猜想也在与 A β 42 阳性率的横向比较中得以印证-外周血 microRNA-135a 可能是较 A β 42 更适宜的 AD 诊断,特别是早期诊断的标志物^[15]。本研究发现 microRNA-135a 在轻度认知损害患者中降低,在 AD 源性 MCI 中降低更为明显,与刘辰庚的实验研究一致,证明 microRNA-135a 可作为 AD 源性 MCI 早期筛选诊断标志物。

microRNA-210 的上调与很多实体肿瘤相关,而且它的升高常提示预后不良。新近研究发现, microRNA-210 与细胞循环调节、细胞再生、分化、血管再生等有关^[16~18]。然而,在活体内, microRNA-210 在缺血后的神经形成中起促进作用^[19]还是抑制作用^[20]仍处于争论中。Lou^[21]等研究认为, microRNA-210 参与了在脑缺血后的血管新生,在缺血后的脑组织中表达增加。本研究发现,在轻度认知损害的患者中, microRNA-210 明显升高,在 AD 源性 MCI 中升高更为明显,这与我们的实验设想有差距。因此,需要我们继续扩大研究的样本量,并对入组的患者进行随访研究。总之,今后还需要对特定 miRNA 的靶基因、上下游通路及其是否具有逆转认知下降的功能进行更为深入的研究和机制探讨。

[参考文献]

- [1] Bateman RJ, Xiong C, Benzinger T, et al. The dominantly inherited Alzheimer network clinical and biomarker changes in dominantly inherited Alzheimer's disease[J]. *N Engl J Med*, 2012, 367:795-804.
- [2] Craig-Schapiro R, Fagan AM, Holtzman DM. Biomarkers of Alzheimer's disease[J]. *Neurobiol Dis*, 2009, 35:128-140.
- [3] Fagan AM, Shaw LM, Xiong C, et al. Comparison of analytical platforms for cerebrospinal fluid measures of β amyloid 1-42, total tau, and P-tau(181) for identifying Alzheimer disease amyloid plaque pathology[J]. *Arch Neurol*, 2011, 68:1137-1144.
- [4] De Meyer G, Shapiro F, Vanderstichele H, et al. Alzheimer's disease neuroimaging initiative. diagnosis-independent Alzheimer disease biomarker signature in cognitively normal elderly people[J]. *Arch Neurol*, 2010, 67:949-956.
- [5] Mistur R, Mosconi L, Santi SD, et al. Current challenges for the early detection of Alzheimer's disease: brain imaging and CSF studies[J]. *J Clin Neurol*, 2009, 5:153-166.
- [6] Miller G. Alzheimer's biomarker initiative hits its stride[J]. *Science*, 2009, 326:386-389.
- [7] Schmand B, Eikelenboom P, van Gool WA. Value of neurophysiological tests, neuroimaging, and biomarkers for diagnosing Alzheimer's disease in younger and older age cohorts[J]. *J Am Geriatr Soc*, 2001, 59:1705-1710.
- [8] Ray S, Britschgi M, Herbert C, et al. Classification and prediction of clinical Alzheimer's diagnosis based on plasma signaling proteins[J]. *Nat Med*, 2007, 13:1359-1362.
- [9] Reddy MM, Wilson R, Wilson J, et al. Identification of candidate IgG biomarkers for Alzheimer's disease via combinatorial library screening[J]. *Cell*, 2011, 144:132-142.
- [10] Nagele E, Han M, Demarshall C, et al. Diagnosis of Alzheimer's disease based on disease-specific autoantibody profiles in human sera[J]. *PLoS One*, 2011, 6:e23112.
- [11] Ebert S, Sharp A. Roles for microRNAs in conferring robustness to biological processes[J]. *Cell*, 2012, 149(3):515-524.
- [12] Dong H, Li J, Huang L, et al. Serum MicroRNA serve as novel biomarker for the diagnosis of Alzheimer's disease[J]. *Disease Markers*, 2015, 2015(625659).
- [13] Zhao Y, Alexandrov PN, Lukiw WJ. Anti-micro RNAs as novel therapeutic agents in the clinical management of Alzheimer's disease[J]. *Frontiers in neuroscience*, 2016, 10:59.
- [14] Liu CG, Wang JL, Li L, et al. MicroRNA-384 regulates both amyloid precursor protein and β -secretase expression and is a potential biomarkers for Alzheimer's disease[J]. *Int J Mol Med*, 2014, 34:160-166.
- [15] 刘辰庚, 孟双, 张跃其, 等. microRNA-135a 在阿尔茨海默病患者中的检测价值[J]. *中国老年学杂志*, 2016, 36(1):152-153.
- [16] Paul P, Chakraborty A, Sarkar D, et al. Interplay between miRNAs and human diseases: a review[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233:2007-2018.
- [17] Rupaimoole R, Slack FJ. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2017, 16:203-222.
- [18] Ren CX, Leng RX, Fan YG, et al. MicroRNA-210 and its theranostic potential[J]. *Expert Opin Ther Target*, 2016, 20:1325-1338.
- [19] Zeng L, He X, Wang Y, et al. MicroRNA-210 overexpression induces angiogenesis and neurogenesis in the normal adult mouse brain[J]. *Gene Ther*, 2014, 21:37-43.
- [20] Ma Q, Dasgupta C, Li Y, et al. Inhibition of microRNA-210 provides neuroprotection in hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats[J]. *Neurobiol Dis*, 2016, 89:202-212.
- [21] Lou YL, Guo F, Liu F, et al. MiR-210 activates notch signaling pathway in angiogenesis induced by cerebral ischemia[J]. *Mol Cell Biochem*, 2012, 370:45-51.