

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2022.11.002

血清 miR-520d-3p 和 miR-627 检测在创伤性脑损伤 诊断及预后监测中的临床价值*

闫 静¹, 李 全¹, 李丹丹², 季明德^{1△}

1. 南京中医药大学附属医院检验科, 江苏南京 210029; 2. 南京大学
附属金陵医院检验科, 江苏南京 210002

摘 要:目的 检测创伤性脑损伤(TBI)患者血清 miR-520d-3p 和 miR-627 的表达水平,探讨其作为 TBI 诊断及预后判断指标的价值。方法 采用实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)技术检测 67 例轻度创伤性脑损伤(mTBI)患者(mTBI 组)、67 例重度创伤性脑损伤(sTBI)患者(sTBI 组)及 67 例健康对照者(健康对照组)血清 miR-520d-3p 和 miR-627 表达水平。采用格拉斯哥预后等级评分(GOS)进行预后评价,将 GOS≤3 分者纳入预后差组,GOS>3 分者纳入预后好组。采用受试者工作特征(ROC)曲线评估 miR-520d-3p 和 miR-627 对 TBI 的诊断效能。结果 与健康对照组相比,mTBI 组和 sTBI 组患者血清 miR-520d-3p 和 miR-627 表达水平明显升高($P<0.05$),且 sTBI 组患者血清 miR-520d-3p 和 miR-627 表达水平明显高于 mTBI 组($P<0.05$);TBI 患者治疗后,miR-520d-3p 和 miR-627 表达水平有所下降,差异有统计学意义($P<0.05$);预后差组的 miR-520d-3p 和 miR-627 表达水平明显高于预后好组($P<0.05$)。ROC 曲线分析显示,血清 miR-520d-3p 和 miR-627 区分 mTBI 患者与健康对照者的曲线下面积(AUC)分别为 0.866(95%CI:0.800~0.933, $P<0.05$)和 0.832(95%CI:0.763~0.903, $P<0.05$),区分 sTBI 患者与健康对照者的 AUC 分别为 0.913(95%CI:0.813~0.965, $P<0.05$)和 0.890(95%CI:0.839~0.946, $P<0.05$),区分 mTBI 患者与 sTBI 患者的 AUC 分别为 0.622(95%CI:0.527~0.718, $P<0.05$)和 0.651(95%CI:0.558~0.743, $P<0.05$)。结论 血清 miR-520d-3p 和 miR-627 对诊断 TBI 具有一定的临床应用价值,有望成为新的潜在标志物。

关键词:创伤性脑损伤; miR-520d-3p; miR-627; 受试者工作特征曲线

中图法分类号:R446.1 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2022)11-1446-04

Clinical value of serum miR-520d-3p and miR-627 detection in diagnosis and prognosis monitoring of traumatic brain injury*

YAN Jing¹, LI Quan¹, LI Dandan², JI Mingde^{1△}

1. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing, Jiangsu 210029, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Jinling Hospital of Nanjing University, Nanjing, Jiangsu 210002, China

Abstract: **Objective** To detect the expression levels of serum miR-520d-3p and miR-627 in the patients with traumatic brain injury (TBI), and to explore their value as the diagnostic and prognostic judgment indicators of TBI. **Methods** Serum miR-520d-3p and miR-627 levels were determined by the quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) in 67 cases of mild TBI (mTBI), 67 cases of severe TBI (sTBI) and 67 healthy controls (healthy control group). The prognosis was evaluated by the Glasgow Outcome Scale score (GOS), the cases with the GOS ≤3 points served as the poor prognosis group and those with the GOS >3 points served as the good prognosis group. The receiver operating characteristic (ROC) curve was adopted to evaluate the diagnostic efficiency of miR-520d-3p and miR-627 for diagnosing TBI. **Results** Compared with the healthy control group, the serum miR-520d-3p and miR-627 expression levels in the mTBI and sTBI groups were significantly increased ($P<0.05$), moreover the serum miR-520d-3p and miR-627 levels in the sTBI group were significantly higher than those in the mTBI group ($P<0.05$); after the treatment, the serum miR-520d-3p and miR-627 expression levels were decreased to some extent, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). The serum miR-520d-3p and miR-627 expression levels in the poor prognosis group were significantly higher than those in the good prognosis group ($P<0.05$). The ROC curve analysis showed that the areas under the ROC curve of miR-520d-3p and miR-627 for distinguishing mTBI and healthy

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81603358)。

作者简介:闫静,女,技师,主要从事临床检验诊断学研究。△ 通信作者,E-mail:mingdej1982@163.com。

controls were 0.866 (95%CI:0.800–0.933, $P<0.05$) and 0.832 (95%CI:0.763–0.903, $P<0.05$) respectively, which for distinguishing sTBI and healthy controls were 0.913 (95%CI:0.813–0.965, $P<0.05$) and 0.890 (95%CI:0.839–0.946, $P<0.05$), which for distinguishing mTBI from sTBI were 0.622 (95%CI:0.527–0.718, $P<0.05$) and 0.651 (95%CI:0.558–0.743, $P<0.05$) respectively. **Conclusion** Serum miR-520d-3p and miR-627 levels have a certain clinical application value in the diagnosis of TBI, which is expected to be the new potential markers.

Key words: traumatic brain injury; miR-520d-3p; miR-627; receiver operating characteristic curve

创伤性脑损伤(TBI)的发病率正逐年上升,在年轻人及儿童中尤为突出。重度创伤性脑损伤(sTBI)的高致死率、高致残性严重影响人类的生命健康和生活质量。尽管绝大多数轻度创伤性脑损伤(mTBI)患者伤后无须治疗,但部分患者会持续进展为脑震荡综合征,并在认知、行为、精神等方面表现出不同程度的功能障碍^[1]。目前临床上主要依靠患者的临床症状、体征、影像学检查,如电子计算机断层扫描(CT)、磁共振成像(MRI)、单光子发射计算机断层成像术(SPECT)和实验室检查[神经胶质纤维酸性蛋白(GFAP)、钙结合蛋白 B(S100B)、微管相关蛋白 Tau、髓鞘碱性蛋白(MBP)、神经元特异性烯醇化酶(NSE)]等对 TBI 进行诊断,然而这些检测方法在 sTBI 的疗效评估与预后评估方面存在不同程度的局限性,并且针对影像学表现正常的 mTBI 患者,大部分实验室检查指标的敏感性极低,给 mTBI 的判定带来一定的困扰^[2]。因此,目前迫切需要寻找一种简便、特异的新型生物标志物判断 TBI 患者的病情、疗效及预后情况,这对 mTBI 患者能够及时进行治疗具有重要的临床意义。

微小核糖核酸(miRNA)是一类内源性高度保守的非编码单链小 RNA,在转录后调控基因表达,参与调控多种生物学过程^[3]。目前,多项研究显示 TBI 患者血清 miRNA 表达水平发生明显变化,miRNA 具有潜在的生物学诊断价值^[3-6]。因此,本研究旨在对不同严重程度 TBI 患者及其治疗前后血清 miR-520d-3p 和 miR-627 的表达水平进行分析,探讨其与预后的关系,以期对 TBI 的诊断、疗效评估、预后监测提供新的方法。

1 资料与方法

1.1 一般资料 将 2014 年 7 月至 2017 年 7 月在北京大学附属金陵医院确诊的 134 例 TBI 患者及 67 例健康对照者(健康对照组)纳入研究。健康对照组中男 54 例、女 13 例,年龄(49.30±11.82)岁。采用格拉斯哥昏迷指数评分(GCS)系统,将 GCS>12 分的 TBI 患者纳入 mTBI 组(67 例),其中男 48 例、女 19 例,年龄(45.67±15.13)岁;GCS≤8 分的 TBI 患者纳入 sTBI 组(67 例),其中男 54 例、女 13 例,年龄(49.22±11.80)岁。TBI 患者纳入标准:(1)头颅创伤 24 h 以内;(2)近期无其他手术史及药物治疗史。另外,所有 TBI 患者于伤后 6 个月利用格拉斯哥预后

等级评分(GOS)进行预后评价,将 GOS≤3 分的患者作为预后差组,GOS>3 分的患者作为预后好组。本研究的所有研究对象均知情同意,且得到伦理委员会批准(文件号:2015NZGKJ-019)。3 组研究对象的年龄、性别、舒张压、收缩压比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。见表 1。

表 1 3 组研究对象的一般资料比较					
组别	<i>n</i>	年龄 ($\bar{x}\pm s$,岁)	男/女 (<i>n</i> / <i>n</i>)	舒张压 ($\bar{x}\pm s$,mm Hg)	收缩压 ($\bar{x}\pm s$,mm Hg)
健康对照组	67	49.30±11.82	54/13	80.09±12.56	135.11±17.72
mTBI 组	67	45.67±15.13	48/19	80.10±12.54	134.07±17.81
sTBI 组	67	49.22±11.80	54/13	80.91±14.56	137.85±22.09
<i>F</i> / χ^2		1.700	2.062	0.386	0.413
<i>P</i>		0.185	0.357	0.468	0.389

1.2 仪器与试剂 采用上海医疗器械公司的高速离心机分离血清;检测仪器为美国 Applied Biosystems (ABI)公司的 7300 型 PCR 仪;提取 RNA 的试剂采用索莱宝公司的酸性水饱和酚和上海国药集团试剂公司的分析纯级氯仿、异丙醇、无水乙醇;RNA 保存于 DEPC 处理水(美国 Sigma 公司)中;反转录及实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)体系所用试剂购自大连 TaKaRa 公司;miR-520d-3p 和 miR-627 探针及人工合成的 peu-miR-2911 购自美国 ABI 公司。

1.3 方法

1.3.1 标本采集与处理 采用真空采血促凝管收集健康对照者的清晨空腹血(禁食 12 h 以上)和 TBI 患者(入院时首次采集,以及经 2~8 周治疗后采集,病情好转者出院当日再次采集)的空腹静脉血标本 3.5 mL。所有受试者的血标本均离心后取上层血清,并置于-80℃保存备用。

1.3.2 血清 miR-520d-3p 和 miR-627 表达水平测定 采用 Trizol 提取法提取血清中的总 RNA。通过反转录反应体系及 TaqMan 探针将 miR-520d-3p 和 miR-627 分别反转录为 cDNA,反应条件为 16℃ 30 min, 42℃ 30 min, 85℃ 5 min。采用 ABI 7300 qRT-PCR 系统进行扩增反应,反应条件为 95℃ 5 min, 95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 共 40 个循环。以 miR-2911 作为外参,在标本提取过程中加入 20 μL 106 fmol/L miR-2911 (5'-GGCCGGGGACGGGCUGGGA-3'),监测标本提取过程,并将待测 miRNA 与 miR-2911 同时检测。

扩增结束后根据扩增曲线设定统一阈值,用仪器自带的分析软件分析扩增曲线,获得待测 miRNA 与 miR-2911 的 Ct 值,miR-520d-3p 和 miR-627 的表达水平采用相对定量法($2^{-\Delta Ct}$, $\Delta Ct = Ct_{miRNA} - Ct_{miR-2911}$)进行计算。为了降低误差,每次实验设 3 个复孔,结果取平均值。

1.4 统计学处理 采用 SPSS21.0 软件进行数据分析,采用 GraphPad Prism 8 软件进行作图。数据分析前以 Kolmogorov-Smimov 法检验数据是否为正态分布,若计量资料符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,方差齐时组间两两比较采用 LSD- t 检验,方差不齐时用 Tamhane's T_2 检验;若计量资料呈偏态分布,则以 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示,两组间比较采用 Mann-Whitney U 检验,多组间比较采用 Kruskal-Wallis H 检验;配对资料,若两组资料差值呈正态分布,采用配对 t 检验;若差值呈非正态分布,采用 Wilcoxon 符号秩检验。计数资料以率或例数表示,组间比较采用 χ^2 检验。采用受试者工作特征(ROC)曲线分析、计算血清 miR-520d-3p 和 miR-627 鉴别诊断 mTBI 和 sTBI 的效能并计算曲线下面积(AUC)及其 95%CI。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 3 组血清 miR-520d-3p 和 miR-627 表达水平比较 qRT-PCR 检测结果显示,与健康对照组相比, mTBI 组和 sTBI 组患者血清 miR-520d-3p 和 miR-627 表达水平均明显升高,且 sTBI 组患者血清 miR-520d-3p 和 miR-627 表达水平明显高于 mTBI 组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 3 组血清 miR-520d-3p 和 miR-627 的表达水平比较[M(P ₂₅ , P ₇₅)]			
组别	n	miR-520d-3p	miR-627
健康对照组	67	13.59(8.71,19.79)	6.97(4.17,13.45)
mTBI 组	67	46.09(25.41,82.98) ^a	19.70(13.39,33.32) ^a
sTBI 组	67	66.95(25.41,82.98) ^{ab}	32.81(17.92,57.07) ^{ab}

注:与健康对照组比较,^a $P < 0.05$;与 mTBI 组比较,^b $P < 0.05$ 。

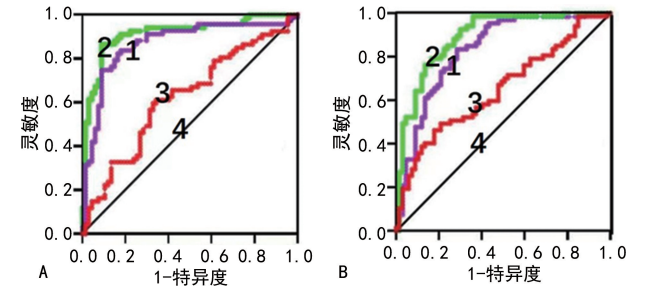
2.2 TBI 患者治疗前后血清 miR-520d-3p 和 miR-627 表达水平比较 分析所纳入研究的 TBI 患者入院时及经 2~8 周治疗后的血清 miR-520d-3p 和 miR-627 的水平变化,qRT-PCR 检测结果显示,与治疗前相比,治疗后患者的 miR-520d-3p 和 miR-627 表达水平明显降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 3。

2.3 不同预后的 TBI 患者血清 miR-520d-3p 和 miR-627 表达水平比较 预后差组 37 例,预后好组 97 例。结果显示,与预后好组相比,预后差组的 miR-520d-3p 和 miR-627 表达水平明显较高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 4。

表 3 TBI 患者治疗前后血清 miR-520d-3p 和 miR-627 表达水平比较[M(P ₂₅ , P ₇₅)]		
时间	miR-520d-3p	miR-627
治疗前	60.08(31.82,84.22)	35.49(20.15,56.67)
治疗后	32.50(6.21,71.89)	25.33(16.77,48.80)
Z	4.609	5.110
P	0.030	0.021

表 4 不同预后的 TBI 患者血清 miR-520d-3p 和 miR-627 表达水平比较[$M(P_{25}, P_{75})$]			
组别	n	miR-520d-3p	miR-627
预后好组	97	47.94(27.30,88.74)	23.23(14.48,41.45)
预后差组	37	67.09(46.99,97.05)	33.81(18.54,55.12)
Z		-2.283	-2.134
P		0.022	0.033

2.4 TBI 患者血清 miR-520d-3p 和 miR-627 表达水平的诊断价值 绘制 ROC 曲线,分析血清 miR-520d-3p 和 miR-627 对 TBI 的诊断效能。结果显示,血清 miR-520d-3p 诊断 mTBI 的 AUC 为 0.866(95%CI: 0.800~0.933, $P < 0.05$),诊断 sTBI 的 AUC 为 0.913(95%CI: 0.813~0.965, $P < 0.05$),鉴别诊断 mTBI 与 sTBI 的 AUC 为 0.622(95%CI: 0.527~0.718, $P < 0.05$),见图 1A。血清 miR-627 诊断 mTBI 的 AUC 为 0.832(95%CI: 0.763~0.903, $P < 0.05$),诊断 sTBI 的 AUC 为 0.890(95%CI: 0.839~0.946, $P < 0.05$),鉴别诊断 mTBI 与 sTBI 的 AUC 为 0.651(95%CI: 0.558~0.743, $P < 0.05$),见图 1B。



注:A 为 miR-520d-3p;B 为 miR-627;1 为区分 mTBI 患者与健康对照者;2 为区分 sTBI 患者与健康对照者;3 为区分 mTBI 与 sTBI 患者;4 为参考线。

图 1 miR-520d-3p 与 miR-627 诊断及鉴别诊断 mTBI 和 sTBI 的 ROC 曲线

3 讨 论

临床上判定 TBI 的首选检查方法是 CT,但其敏感性较低,尤其是大部分 mTBI 患者的影像学表现无异常变化,临床医生仅能根据经验和 GCS 进行判断,难以准确判定 mTBI。尽管 MRI 可以提高对微小病灶的检出率,但费用昂贵,患者难以负担,限制了其的推广和应用。目前已知的实验室大分子蛋白标志物

对于 TBI 的诊断缺乏特异性^[4]。因此,寻找一种新型、特异的生物标志物显得尤为重要。

miRNA 具有高度保守性、时序性和组织器官特异性,且可调节人体各个系统的生理功能及参与疾病的发生、发展^[5]。目前已发现多种 miRNA 高表达于中枢神经系统,并参与调节神经细胞发育、分化等重要生理过程^[6-7]。多项研究结果提示 miRNA 与 TBI 的严重程度密切相关,是诊断 TBI 潜在的生物标志物^[2-3]。

本研究前期采用低密度芯片技术筛选出 miR-520d-3p 和 miR-627,结合 qRT-PCR 技术分析、验证两种 miRNA 在不同严重程度的 TBI 患者血清中的特异性表达情况,并观察了 TBI 患者治疗好转后的 miR-520d-3p 和 miR-627 表达水平变化情况。同时,结合患者出院后 6 个月 GOS 进行综合分析,判断其预后情况。结果发现,miR-520d-3p 和 miR-627 在不同严重程度的 TBI 患者血清中都呈高表达,且 sTBI 组的表达水平明显高于 mTBI 组,提示 miR-520d-3p 和 miR-627 可能与疾病的严重程度密切相关。因此,有理由推测表达水平升高的 miR-520d-3p 和 miR-627 可能通过调控某种蛋白进而使颅脑损伤后的病情恶化。本研究结果提示,miR-520d-3p 和 miR-627 可以作为 TBI 患者潜在的诊断标志物,尤其为影像学表现正常的 mTBI 的诊断提供了较大的帮助,降低漏诊率。当患者病情好转,炎症指标基本恢复正常,脑水肿等症明显减轻后,miR-520d-3p 和 miR-627 的表达水平也明显下降,提示 miR-520d-3p 和 miR-627 可为疗效观察提供有效的基因学依据。另外,预后差组的 miR-520d-3p 与 miR-627 的表达水平明显高于预后好组,提示 miR-520d-3p 和 miR-627 的表达水平与预后密切相关,可以作为 TBI 患者预后判断的敏感指标。鉴于此,笔者推测血清 miR-520d-3p 和 miR-627 可能参与 TBI 病理过程的发生、发展,当脑组织受损时,神经细胞主动或被动释放 miR-520d-3p 和 miR-627,并通过血脑屏障释放到血液中,本课题组也会在后续开展相关机制的研究。

ROC 曲线分析显示,血清 miR-520d-3p 和 miR-627 不仅可以较好地地区分健康人和 sTBI 患者,对健康人和 mTBI 患者也有较好的区分作用。同时对 mTBI 和 sTBI 也具有一定的鉴别诊断能力。由此可见,miR-520d-3p 和 miR-627 不仅反映颅脑损伤的严重程度,对评估疗效和预后有重要意义,而且还可作为 TBI 潜在的诊断标志物。

TBI 的发病机制非常复杂,目前相关报道常涉及神经细胞凋亡、炎症反应、可塑性改变等^[8]。研究发现,miR-520d-3p 和 miR-627 在神经系统性疾病中发挥着重要的生理、病理作用。DESHPANDE 等^[9]证实,miR-520d-3p 通过靶向抑制信号调节蛋白 α 的表达,进而促进星形胶质细胞恶性程度的升高,提示 miR-520d-3p 可作为星形细胞瘤的诊断标志物。FAN 等^[10]发现,miR-627 通过靶向 NR2C2 蛋白调控神经胶质细胞瘤的恶化。然而,目前较缺乏 miR-520d-3p 和 miR-627 在 TBI 发病机制中的研究。本课题组后续将在动物与细胞水平上开展机制研究,以期 TBI 的诊断、治疗提供理论依据。

参考文献

[1] WEISZ H A, KENNEDY D, WIDEN S, et al. MicroRNA sequencing of rat hippocampus and human biofluids identifies acute, chronic, focal and diffuse traumatic brain injuries[J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 3341.

[2] STENBERG J, HABERG A K, FOLLESTAD T, et al. Cognitive reserve moderates cognitive outcome after mild traumatic brain injury[J]. Arch Phys Med Rehab, 2020, 101(1): 72-80.

[3] SCHINDLER C R, WOSCHEK M, VOLLRATH J T, et al. MiR-142-3p expression is predictive for severe traumatic brain injury (TBI) in trauma patients[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(15): 5381.

[4] VUOKILA N, ARONICA E, KOROTKOV A, et al. Chronic regulation of miR-124-3p in the perilesional cortex after experimental and human TBI[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(7): 2418.

[5] MARTINEZ B, PELOW P V. MicroRNAs in blood and cerebrospinal fluid as diagnostic biomarkers of multiple sclerosis and to monitor disease progression[J]. Neural Regen Res, 2020, 15(4): 606-619.

[6] MEN Y, YELICK J, JIN S, et al. Exosome reporter mice reveal the involvement of exosomes in mediating neuron to astroglia communication in the CNS[J]. Nature Commun, 2019, 10(1): 4136.

[7] WANG Z, SHEN L, WANG Y, et al. Integrated analysis of miRNA and mRNA expression in the blood of patients with Alzheimer's disease[J]. Mol Med Rep, 2020, 22(2): 1053-1062.

[8] KHELLAF A, KHAN D Z, HELMY A. Recent advances in traumatic brain injury [J]. J Neurol, 2019, 266 (11): 2878-2889.

[9] DESHPANDE R P, SEKHAR C K, PANIGRAHI M, et al. SIRP alpha protein downregulates in human astrocytoma: presumptive involvement of hsa-miR-520d-5p and hsa-miR-520d-3p[J]. Mol Neurobiol, 2017, 54(10): 8162-8169.

[10] FAN Z, ZHENG J, XUE Y, et al. NR2C2-uORF targeting UCA1-miR-627-5p-NR2C2 feedback loop to regulate the malignant behaviors of glioma cells[J]. Cell Death Dis, 2018, 9(12): 1165.