

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2024.06.011

miR-145 基因多态性与脑梗死的关系及对 miR-145 水平的影响^{*}

黄艳云, 陆青兰, 韦必晓, 杨丽娜, 黄荣透

广西壮族自治区百色市人民医院检验科, 广西百色 533000

摘要:目的 探讨 miR-145 基因 rs41291957、rs353291 位点多态性与脑梗死(IS)的关系及对 miR-145 水平的影响。方法 收集 2021 年 1—12 月百色市人民医院收治的 253 例 IS 患者(IS 组)及同期在该院体检中心体检的 275 例健康者(对照组)血液标本,采用 TaqMan 探针法 SNP 分型技术检测 rs41291957、rs353291 多态性,采用 SYBR Green 实时荧光定量 PCR 检测 miR-145 水平。比较两组 miR-145 水平,以及 rs41291957、rs353291 多态性分布情况,分析 rs41291957、rs353291 位点不同基因型患者 miR-145 水平差异。结果 miR-145 基因 rs41291957、rs353291 位点在 IS 组和对照组中均存在 AA、AG、GG 3 种基因型,且这两个位点在 IS 组和对照组中的基因型分布频率均符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律(均 $P>0.05$),具有群体代表性。miR-145 基因 rs41291957、rs353291 位点的基因型和等位基因在 IS 组与对照组中的分布频率比较,差异均无统计学意义(均 $P>0.05$)。IS 组患者外周血单个核细胞中 miR-145 水平高于对照组,差异有统计学意义($P<0.001$)。但无论是 IS 组或对照组,组内 rs41291957、rs353291 位点不同基因型之间的 miR-145 水平比较,差异均无统计学意义(均 $P>0.05$)。结论 miR-145 基因的 rs41291957、rs353291 位点多态性与 IS 易感性无关。虽然 IS 患者的外周血单个核细胞中 miR-145 水平明显升高,但是 rs41291957、rs353291 位点多态性对 miR-145 水平不具有调节性。

关键词:miR-145; 基因多态性; rs41291957; rs353291; 脑梗死**中图法分类号:**R743.33**文献标志码:**A**文章编号:**1672-9455(2024)06-0775-05**Relationship between miR-145 gene polymorphism and cerebral infarction
and its impact on miR-145 level^{*}**

HUANG Yanyun, LU Qinglan, WEI Bixiao, YANG Lina, HUANG Rongtuo
Department of Clinical Laboratory, Baise Municipal People's Hospital of
Guangxi Zhuang Autonomous Prefecture, Baise, Guangxi 533000, China

Abstract: **Objective** To explore the relationship between polymorphisms at rs41291957 and rs353291 loci of miR-145 gene and cerebral infarction (IS) and its impact on miR-145 expression level. **Methods** The blood samples from 253 cases of IS admitted and treated in this hospital from January to December 2021 and 275 healthy subjects undergoing physical examination in this hospital during the same period were collected. The rs41291957 and rs353291 polymorphisms were detected by the TaqMan probe method SNP typing technique. SYBR Green real-time PCR was employed to detect the miR-145 level. The level of miR-145 and distribution of rs41291957 and rs353291 polymorphisms were compared between the two groups. The differences in miR-145 levels among patients with different genotypes at the rs41291957 and rs353291 loci were analyzed. **Results** The rs41291957 and rs353291 loci of the miR-145 gene in the IS group and control group had three genotypes, AA, AG, and GG. The frequency distribution of these two loci in both the IS group and control group conformed to the Hardy Weinberg's law of genetic balance (all $P>0.05$), having the group representativeness. There was no statistically significant difference in the distribution frequency of genotypes and alleles of rs41291957 and rs353291 of miR-145 gene between the IS group and the control group (all $P>0.05$). The miR-145 level in peripheral blood mononuclear cells in the IS group was higher than that in the control group, and the difference was statistically significant ($P<0.001$). However, whether in the IS group or the control group, there was no statistically significant difference in miR-145 level between different genotypes at the rs41291957 and rs353291 loci within the group (all $P>0.05$). **Conclusion** The rs41291957 and rs353291 loci polymorphisms of the miR-145 gene are not associated with the susceptibility to IS. Although the level of

* 基金项目:广西卫生健康委青年基金自筹课题(Z20190369)。

作者简介:黄艳云,女,副主任技师,主要从事分子生物学和免疫学方向研究。

miR-145 in peripheral blood mononuclear cells of IS patients are significantly elevated, the rs41291957 and rs353291 loci polymorphisms do not have regulatory effects on miR-145 levels.

Key words: miR-145; gene polymorphism; rs41291957; rs353291; ischemic stroke

脑梗死(IS)是一种致残率高、致死率高的复杂性脑血管疾病,微小 RNA (miRNA)在其发病与进展过程中发挥了关键性的作用^[1]。作为一种基因转录后的调控因子,miRNA 能够调控目标 mRNA 的表达从而介入多种生命活动如细胞生长、分裂、衰退或发育等^[2]。miRNA 被广泛视为多种癌症的抑制因子,其在肿瘤生长发育、凋亡、侵袭和转移中起着关键作用^[3-4]。此外,miR-145 也被证明是血管平滑肌细胞最丰富的 miRNA,其水平相对较小的变化会显著影响血管稳态,与动脉粥样硬化相关疾病的发生和发展密切相关^[5-7]。以往的诸多研究结果表明,miR-145 在 IS 患者中表达失衡,其异常表达在 IS 病理学中起着至关重要的作用,或将成为 IS 的生物标志物和(或)治疗目标^[8-12]。但导致 miR-145 在 IS 中表达失衡的分子机制尚不清楚。单核苷酸多态性(SNP)可能是 miR-145 调控的重要因素。已有多项研究表明,miR-145 基因 SNP 与多种疾病的易感性有关,并影响 miR-145 的表达^[5,7,9,13]。鉴于此,本研究筛选了 miR-145 基因中次要等位基因频率较高且与多种疾病易感性有关的 rs41291957、rs353291 位点,探讨其与 IS 的关系,并评估 miR-145 在 IS 患者中的表达及其与这 2 个位点 SNP 之间的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 从 2021 年 1—12 月在本院神经内科住院患者中筛选出 253 例初次确诊为 IS 的患者,其中男 153 例、女 100 例,平均年龄(63.4±11.1)岁。IS 诊断符合《中国急性缺血性脑卒中诊治指南 2018》中

的相关诊断标准,并经过临床、实验室及射影像学等一系列检查综合确诊。另选取同期在本院体检中心体检的 275 例健康者作为对照组,其中男 147 例、女 128 例,平均年龄(61.9±9.5)岁。两组性别、年龄比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。排除标准:脑出血、颅内感染、肿瘤、自身免疫性疾病和传染类疾病;患严重影响肝、肾、心功能的疾病。这些个体都是非亲缘关系的广西地区人口。本研究经本院医学伦理委员会批准。所有研究对象均对本研究知情同意并签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 收集标本 收集所有研究对象清晨空腹静脉血 3~5 mL(EDTA-K₂ 抗凝),用于基因组 DNA 提取和单个核细胞的分离。所有标本存储于-70 ℃冰箱备用。

1.2.2 基因组 DNA 提取和分析 使用由重庆中元汇吉生物技术股份有限公司供应的核酸提取试剂盒(磁珠法)进行全血基因组 DNA 检测,并严格按照说明书操作。在完成 DNA 样本提取后使用紫外分光光度计检测其质量和浓度。

1.2.3 引物的设计与合成 利用 NCBI 搜索含有 rs41291957、rs353291 位点的长度适宜的 DNA 片段,然后使用 Prime 3.0 软件为这些片段设计引物,并将其交给北京擎科生物科技公司来生产,而探针引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。引物序列信息如表 1 所示。

表 1 rs41291957、rs353291 引物序列信息

位点	引物名称	序列(5'-3')	大小(bp)
rs41291957	rs41291957-g F	AATTACAACAGCCTCTCGg	146
	rs41291957-a F	GAATTACAACAGCCTCTCGa	
	rs41291957 R	GCACTGCACCTCAGGC	
	rs41291957probe-FAM	FAM-AGCCCAAGTCCCTCTAACACC-BHQ1	
rs353291	rs353291 F	AGGGTGGGTAGAGATGCC	114
	rs353291 R	AAAACCTTAAGTCTTCGTTTCGATTT	
	rs353291 probe-FAM	FAM-TGTTCTCTGGCTGCaTTCC-BHQ1	
	rs353291 probe-VIC	VIC-TGTTCTCTGGCTGCgTTCC-BHQ1	

1.2.4 rs41291957、rs353291 位点多态性检测 采用 TaqMan 探针法荧光定量 PCR 检测。PCR 扩增反应体系为上、下游引物各 0.4 μL,探针引物 0.2 μL,2×AceQ qPCR Probe Master Mix(Vazyme)10 μL,DNA 模板 1 μL,加双蒸水至总体积 20 μL。按照上

述体系完成加样后,把加好样品的反应板置于德国 Analytik Jena qTOWERE 2.2 荧光定量 PCR 仪中进行反应。PCR 循环参数:95 ℃预变性反应 3 min,然后 40 个循环(95 ℃变性 15 s,56 ℃复性 15 s,72 ℃延伸 20 s)。反应结束后根据扩增曲线的峰型和信号强

度并结合人工校验进行基因型判断,以保证试验结果的准确性。

1.2.5 外周血单个核细胞中 miR-145 水平的检测
利用 Trizol 技术从外周血单个核细胞中提取总 RNA,提取产物使用紫外分光光度计评估其纯度,如果 A_{260}/A_{280} 落在 1.9~2.1,则该 RNA 样本满足实验要求。接着,采用由宝生物工程(大连)公司提供的试剂盒来检测基因 mRNA 的表达水平。然后采用反转录试剂盒(Mir-X miRNA First-Strand Synthesis Kit, Takara)将 RNA 合成为 cDNA,再根据 cDNA 2 μ L、SYBR Advantage Premix 12.5 μ L、正向及反向引物各 0.5 μ L、ROX Dye 0.5 μ L、去离子水 9 μ L 的比例进行 PCR。使用相对定量分析 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 miR-145 相对表达水平。

1.3 观察指标 (1)比较 IS 组和对照组 rs41291957、rs353291 位点多态性分布情况。(2)比较 IS 组和对照组 miR-145 水平。(3)分析 rs41291957、rs353291 位点不同基因型研究对象的 miR-145 水平。

1.4 统计学处理 使用 SPSS23.0 软件进行数据处理。计数资料以例数、百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,多组间两两比较采用 LSD- t 检验。群体遗传平衡采用 Hardy-Weinberg 平衡定律检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两组 rs41291957、rs353291 多态性遗传平衡评估 IS 组和对照组 rs41291957、rs353291 的基因型分

布均符合 Hardy-Weinberg 平衡定律的要求($P>0.05$),具有群体代表性。见表 2。

表 2 两组 rs41291957、rs353291 多态性 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验结果

位点	组别	基因型	实际频数	预计频数	χ^2	P
rs41291957	对照组	GG	141	140	0.148	0.701
		AG	110	113		
		AA	24	23		
	IS 组	GG	120	120	0.009	0.923
		AG	108	109		
		AA	25	25		
rs353291	对照组	GG	58	53	1.357	0.244
		AG	126	136		
		AA	91	86		
	IS 组	GG	49	49	0.006	0.939
		AG	124	125		
		AA	80	80		

2.2 不同性别研究对象 miR-145 基因 rs41291957、rs353291 多态性分布情况比较 IS 组和对照组中,不同性别间 rs41291957、rs353291 基因型及等位基因的分布频率比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。见表 3。

2.3 IS 组和对照组 miR-145 基因 rs41291957、rs353291 多态性分布情况比较 rs41291957、rs353291 位点的基因型频率和等位基因频率在 IS 组与对照组间比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。见表 4。

表 3 各组不同性别研究对象 miR-145 基因 rs41291957、rs353291 多态性分布情况比较[$n(\%)$]

位点	组别	性别	n	基因型			等位基因	
				GG	AG	AA	G	A
rs41291957	对照组	男	147	70(47.6)	64(43.5)	13(8.9)	204(69.4)	90(30.6)
		女	128	71(55.5)	46(35.9)	11(8.6)	188(73.4)	68(26.6)
		χ^2			1.815			1.096
		P			0.404			0.295
	IS 组	男	153	70(45.8)	70(45.8)	13(8.4)	210(68.6)	96(31.4)
		女	100	50(50.0)	38(38.0)	12(12.0)	138(69.0)	62(31.0)
		χ^2			1.832			0.008
		P			0.400			0.930
rs353291	对照组	男	147	31(21.1)	62(42.2)	54(36.7)	124(42.2)	170(57.8)
		女	128	27(21.1)	64(50.0)	37(28.9)	118(46.1)	138(53.9)
		χ^2			2.181			0.852
		P			0.336			0.356
	IS 组	男	153	34(22.2)	72(47.1)	47(30.7)	140(45.8)	166(54.2)
		女	100	15(15.0)	52(52.0)	33(33.0)	82(41.0)	118(59.0)
		χ^2			2.029			1.109
		P			0.363			0.292

表 4 两组间 rs41291957、rs353291 多态性分布情况比较[n(%)]

位点	组别	n	基因型			等位基因	
			GG	AG	AA	G	A
rs41291957	对照组	275	141(51.3)	110(40.0)	24(8.7)	392(71.3)	158(28.7)
	IS 组	253	120(47.4)	108(42.7)	25(9.9)	348(68.8)	158(31.2)
	χ^2			0.813		0.784	
	P			0.666		0.376	
rs353291	对照组	275	58(21.1)	126(45.8)	91(33.1)	242(44.0)	308(56.0)
	IS 组	253	49(19.4)	124(49.0)	80(31.6)	222(43.9)	284(56.1)
	χ^2			0.565		0.002	
	P			0.754		0.967	

2.4 IS 组和对照组 miR-145 水平比较 IS 组患者外周血单个核细胞中 miR-145 水平为 4.68 ± 1.02 ，显著高于对照组的 2.70 ± 0.83 ，差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。

2.5 miR-145 基因 rs41291957、rs353291 位点不同基因型 miR-145 水平比较 对 IS 组或对照组进行组内分析，rs41291957 和 rs353291 位点各基因型之间 miR-145 水平比较，差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 5。

表 5 miR-145 基因 rs41291957、rs353291 位点不同基因型 miR-145 水平比较($\bar{x} \pm s$)

基因型	对照组	IS 组 rs41291957	IS 组 rs353291
GG	2.53 ± 0.81	4.60 ± 1.00	4.70 ± 1.02
AG	2.63 ± 0.73	4.90 ± 1.13	4.90 ± 1.13
AA	2.94 ± 0.93	4.54 ± 0.94	4.44 ± 0.91
F	1.025	0.524	0.761
P	0.368	0.596	0.473

注：此处对照组选择的是 rs41291957 和 rs353291 同时为 GG、AG、AA 的样本。

3 讨 论

IS 被确定作为一种复杂的脑血管疾病，受各种环境和遗传因素的影响。SNP 是人类基因组中最常见的遗传变异类型。位于 miRNA 中的 SNP 被称为 miRSNPs，这种 miRSNPs 可能通过改变自身的转录翻译过程或对 miRNA-mRNA 的相互作用施加影响来发挥作用，从而影响个体患病风险^[14-15]。目前已有多个 miRSNPs 被证明与 IS 风险密切相关^[16-17]。近年来的研究发现，miR-145 基因 rs41291957 和 rs353291 SNP 不仅与慢性肾脏疾病^[18]、腹主动脉瘤^[19]等多种疾病的易感性相关，而且与动脉粥样硬化、冠状动脉疾病的风险相关^[5,7]。由于 IS 的重要病理学基础是动脉粥样硬化，因此，miR-145 的 rs41291957、rs353291 位点 SNP 可能在 IS 发生中起作用。为此，本研究在广西人群中进行了二者之间的相关性研究。本研究结果显示，miR-145 基因

rs41291957、rs353291 位点在 IS 组和对照组中均存在 AA、AG、GG 3 种基因型，且这 2 个位点在 IS 组和对照组中的基因型频率分布均符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律。这表明所选择的研究样本可以有效地反映这 2 个 SNP 位点存在于目标人口的情况，具有群体代表性，且这种多态性在群体中不存在性别间的差异。但是 rs41291957 和 rs353291 的基因型频率和等位基因频率分布在 IS 组与对照组间比较，差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)，提示 miR-145 rs41291957 和 rs353291 多态性不会影响广西人群 IS 发病。与上述研究结果相比，本研究结果未发现这 2 个 SNP 与 IS 易感性有关联，可能的原因是本研究与上述研究的疾病和人群不同。即便同一种疾病，也会因研究人群的不同导致结果不一致。不同的地理、种族群体因遗传背景相差较大，往往具有独特的遗传易感性位点。例如，WEI 等^[9]报道，miR-145 基因 rs4705342 TC/CC 基因型与中国南方汉族人群 IS 风险降低相关；然而，ZHU 等^[20]报道，rs4705342 SNP 与中国北方汉族人群 IS 风险无关。

近几年多项研究结果发现，miR-145 在 IS 患者中差异表达与 IS 的发生密切相关，miR-145 有望成为一种新的无创的特异性生物标志物来识别 IS^[8,11]。本研究数据也显示，IS 组患者外周血单个核细胞中 miR-145 水平显著高于对照组，这与以往的研究结果一致，支持 miR-145 可能是新一代 IS 预测指标的观点。目前，关于 miR-145 与 IS 的研究主要集中在 miR-145 水平及其调控机制上，但导致其在 IS 中表达失调的分子机制鲜有研究。SNP 可能是 miR-145 调控的重要因素。已有多项研究表明，miR-145 基因 rs41291957、rs353291 位点与多种疾病的易感性相关，并影响 miR-145 的表达。例如，HALL 等^[5]研究发现，rs41291957 A 等位基因的存在与成熟 miR-143 和 miR-145 水平显著增加有关，并影响冠状动脉疾病的发病风险。另有研究报道，与 miR-145 rs353291 TT 基因型的个体相比，C 等位基因携带者对动脉粥样硬化的易感性增加且 miR-145 水平降低^[7]。这些研究结果表明，miR-145

基因 rs41291957、rs353291 位点与 miR-145 水平之间存在明显的基因型、表型相关性。然而遗憾的是,本研究在对 IS 组或对照组进行组内分析时,这 2 个位点各基因型之间 miR-145 水平差异均无统计学意义($P>0.05$),提示 rs41291957 和 rs353291 位点 SNP 对 miR-145 的水平不具有调节作用。本研究结果与其他研究结果相反,这可能是同一个 SNP 在不同疾病中调控机制不同的原因,miR-145 在 IS 中异常表达可能是其他分子机制引起的。

综上所述,本研究进一步确认 miR-145 在 IS 患者外周血单个核细胞中水平升高,为其作为 IS 潜在的生物诊断标志物提供了支持。但是,miR-145 基因 rs41291957、rs353291 位点多态性与 IS 易感性不存在关联性,且对 miR-145 水平也不具有调节作用。基因多态性在不同种族及地理人群间存在异质性,本研究只针对广西地区人群,该结论可能不适用于其他种族和其他地区群体。现阶段的文献中几乎没有涉及 miR-145 基因 rs41291957、rs353291 多态性与 IS 遗传风险之间关联的研究报告,两者之间是否有关联,还需要更多的数据支持,包括从更多地域和民族背景的人口或者更大规模的团队中收集信息。

参考文献

[1] LI G, MORRIS-BLANCO K C, LOPEZ M S, et al. Impact of microRNAs on ischemic stroke: from pre- to post-disease[J]. *Prog Neurobiol*, 2018, 163: 59-78.

[2] VISHNOI A, RANI S. MiRNA Biogenesis and regulation of diseases: an updated overview[J]. *Methods Mol Biol*, 2023, 2595: 1-12.

[3] ZEINALI T, MANSOORI B, MOHAMMADI A, et al. Regulatory mechanisms of miR-145 expression and the importance of its function in cancer metastasis[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109: 195-207.

[4] YE D, SHEN Z, ZHOU S. Function of microRNA-145 and mechanisms underlying its role in malignant tumor diagnosis and treatment[J]. *Cancer Manag Res*, 2019, 11: 969-979.

[5] HALL I F, CLIMENT M, VIVIANI ANSELMINI C, et al. rs41291957 controls miR-143 and miR-145 expression and impacts coronary artery disease risk[J]. *EMBO Mol Med*, 2021, 13(10): e14060.

[6] CORDES K R, SHEEHY N T, WHITE M P, et al. MiR-145 and miR-143 regulate smooth muscle cell fate and plasticity[J]. *Nature*, 2009, 460(7256): 705-710.

[7] LV Y, YI Y, JIA S, et al. The miR-145 rs353291 C allele increases susceptibility to atherosclerosis[J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2020, 25(3): 577-592.

[8] JIA L, HAO F, WANG W, et al. Circulating miR-145 is

associated with plasma high-sensitivity C-reactive protein in acute ischemic stroke patients[J]. *Cell Biochem Funct*, 2015, 33(5): 314-319.

[9] WEI Y S, XIANG Y, LIAO P H, et al. An rs4705342 T>C polymorphism in the promoter of miR-143/145 is associated with a decreased risk of ischemic stroke[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 34620.

[10] XUE W S, WANG N, WANG N Y, et al. MiR-145 protects the function of neuronal stem cells through targeting MAPK pathway in the treatment of cerebral ischemic stroke rat[J]. *Brain Res Bull*, 2019, 144: 28-38.

[11] 刘丽娇, 杨秀丽, 徐祥辉, 等. 血清 miR-124、miR-145 检测对急性缺血性脑卒中的诊断价值[J]. *中国实用神经疾病杂志*, 2020, 23(4): 330-334.

[12] 刘宏伟, 姚建辉, 刘鹏军, 等. miR-145 靶向 PDCD4 在缺血性脑卒中的作用机制[J]. *昆明医科大学学报*, 2020, 41(4): 18-24.

[13] WANG S C, TSAI C W, CHANG W S, et al. Genetic variants in miR-145 gene are associated with the risk of asthma in Taiwan[J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 15155.

[14] LIU X, HAN Z, YANG C. Associations of microRNA single nucleotide polymorphisms and disease risk and pathophysiology[J]. *Clin Genet*, 2017, 92(3): 235-242.

[15] CORREIA DE SOUSA M, GJORGJIEVA M, DOLICKA D, et al. Deciphering miRNAs' action through miRNA editing[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(24): 6249.

[16] 雷茗, 谭昱, 黄艳云, 等. 微小 RNA-181 基因家族单核苷酸多态性和基因表达水平与缺血性脑卒中遗传易感性的关系[J]. *解剖学报*, 2022, 53(4): 470-478.

[17] ZOU D, LIU C, ZHANG Q, et al. Association between polymorphisms in microRNAs and ischemic stroke in an Asian population: evidence based on 6 083 cases and 7 248 controls[J]. *Clin Interv Aging*, 2018, 13: 1709-1726.

[18] SARGAZI S, HEIDARI NIA M, MIRANI SARGAZI F, et al. Functional miR143/145 cluster variants and haplotypes are associated with chronic kidney disease: a preliminary case-control study and computational analyses[J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2021, 193(5): 1532-1544.

[19] HASEMAKI N, ANDREOU N P, LEGAKI E, et al. Association of miRNA-145 single nucleotide polymorphisms in abdominal aortic aneurysms[J]. *In Vivo*, 2022, 36(3): 1120-1125.

[20] ZHU R, LIU X, HE Z. Association of miR-122, miR-124 miR-126 and miR-143 gene polymorphisms with ischemic stroke in the northern Chinese Han population[J]. *Int J Neurosci*, 2019, 129(9): 916-922.