

急性脊髓损伤患者外周血 miR-146a 和 miR-155 表达变化及意义

王勤志¹, 高 琨¹, 徐立军¹, 李名武¹, 周 聪¹, 王亚柱²

(1. 鄂东医疗集团黄石市中心医院 创伤骨科, 湖北 黄石 435000; 2. 中国医科大学第四医院 创伤骨科, 辽宁 沈阳 110000)

【摘要】目的: 探讨急性脊髓损伤(ASCI) 患者外周血 miR-146a 和 miR-155 表达变化, 以及与损伤程度的相关性。方法: 选取 ASCI 患者 65 例, 根据 ASIA 标准分为完全损伤组($n=22$) 和不完全损伤组($n=43$) , 同期选取脊柱创伤但神经功能正常者 26 例作为脊髓正常组和健康者 40 例作为对照组, 分别于伤后 12、24、36、48 和 72 h 时, 对照组于体检当日, 利用实时荧光定量 PCR 技术检测外周血中 miR-146a 和 miR-155 表达。结果: 与伤后 12 h 相比, 完全损伤组、不完全损伤组和脊髓正常组患者伤后 24、36、48 和 72 h 时外周血中 miR-146a 和 miR-155 相对表达量均呈先升高后降低, 伤后 24 h 时达最大值, 差异均有统计学意义($P<0.05$) , 伤后 12、24、36、48 和 72 h 时外周血中 miR-146a 和 miR-155 表达量比较: 完全损伤组>不完全损伤组>脊髓正常组>对照组, 差异均有统计学意义($P<0.05$) ; ROC 曲线分析显示, ASCI 患者伤后 24 h 时外周血中 miR-146a 和 miR-155 相对表达量在预测完全性损害时, 两者联合时, 曲线下面积 0.976(95%CI: 0.945~1.000) , 灵敏度 93.0% 特异度 95.5%。结论: AS-CI 患者外周血中 miR-146a 和 miR-155 表达量升高, 可作为评估患者病情严重程度的参考指标。

【关键词】急性脊髓损伤; miR-146a; miR-155; 损伤程度

【中图分类号】R 651.2 **【文献标志码】**A

【DOI】10.3969/j.issn.1002-0217.2018.05.005

Expression and implications of miR-146a and miR-155 level in peripheral blood of patients with acute spinal cord injury

WANG Qinzhi ,GAO Kun ,XU Lijun ,LI Mingwu ,ZHOU Cong ,WANG Yazhu

Department of Trauma Orthopedics ,Huangshi Central Hospital ,Edong Medical Group ,Huangshi 435000 ,China

【Abstract】Objective: To investigate the expression and implications of miR-146a and miR-155 level in peripheral blood of patients with acute spinal cord injury(ASCI) , and the correlation of the indicators with damage degree. **Methods:** A total of 65 patients with ASCI were recruited and were divided into complete injury group($n=22$) and incomplete injury group($n=43$) by the ASIA criteria. Twenty-six patients of spinal trauma with intact neurological function were enrolled in the corresponding period as the normal spinal cord group and 40 healthy subjects were recruited as controls. Real-time fluorescence quantitative PCR was performed to determine the peripheral blood miR-146a and miR-155 levels at 12 ,24 ,36 ,48 and 72 h after injury ,respectively ,in patients in the injury group as well as at the very day in controls undergoing medical examination. **Results:** Peripheral blood levels of miR-146a and miR-155 tended to increase ,then went down at 24 ,36 ,48 and 72 h after injury in patients with either complete or incomplete spinal injury ,compared to the level at 12 h ,and the level was peaked at the 24 h after injury. The difference was significant($P<0.05$) . By comparison of peripheral blood miR-146a and miR-155 expression at 12 ,24 ,36 ,48 and 72 h after injury ,the level was ranked by: the complete injury group the incomplete injury group the normal spinal cord group the control group. ROC curve analysis showed that the relative expression of miR-146a and miR-155 in peripheral blood in patients with AS-CI for predicting complete damage was 0.976(95%CI: 0.945-1.000) under the curve area ,with sensitivity of 93.0% and specificity of 95.5% ,when the two indicators were jointly considered. **Conclusion:** Patients of ASCI have up-regulated expression of miR-146a and miR-155 in peripheral blood ,which may be used as reference indexes to assess the severity of the patient's condition.

【Key words】 acute spinal cord injury; miR-146a; miR-155; degree of injury

由于神经损伤后具有不可逆性^[1] ,故急性脊髓损伤(acute spinal cord injury ,ASCI) 具有较高的致残、致死率。研究表明^[2] ,对于脊髓未完全损伤的 ASCI 患者,早期采取合理的诊治措施可在一定程度

基金项目: 辽宁省自然科学基金项目(2013021031)

收稿日期: 2018-01-01

作者简介: 王勤志(1985-) ,男,主治医师,硕士(电话) 13545498822 (电子信箱) 694826581@qq.com;

高 琨,男,主治医师(电子信箱) 694826581@qq.com 通信作者。

上促进神经恢复,改善患者预后。有研究指出^[3],免疫炎症反应在 ASCI 病程进展中发挥重要作用。微小 RNA(micro RNA ,miRNA) 作为广泛存在于机体内高度保守的短链非编码 RNA ,在组织发育、器官形成、代谢等多种生物学功能中发挥重要作用^[4],miR-146a 和 miR-155 作为 miRNA 重要类型,参与调控了免疫和炎症反应过程^[5]。本研究拟对 ASCI 患者外周血中 miR-146a 和 miR-155 变化进行分析,探讨其在 ASCI 患者早期病情评估中的意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2013 年 1 月~2016 年 12 月在黄石市中心医院就诊的 ASCI 患者 65 例,男性 42 例,女性 23 例,平均年龄(50.2±8.6)岁,致伤原因:坠落伤 8 例,交通事故 43 例,摔伤 12 例,重物砸伤 2 例。损伤部位:颈椎损伤 54 例,胸腰椎损伤 11 例。纳入标准:①年龄>18 岁,有明确的外伤史,经影像学检查明确;②入院时距离创伤发生在 8 h 内。排除标准:①有严重颅脑损伤者;②心肝肾等重要脏器严重功能障碍者;③既往有脊髓或颅脑损伤史者;④急慢性感染、恶性肿瘤、脑血管疾病、自身免疫系统疾病、血液系统疾病者;⑤近半年内接受过脊髓或颅脑手术者。根据美国脊髓损伤协会制定的分类标准(ASIA 标准)分组:完全损伤组(A 级)和不完全损伤组(B、C、D 级)。完全损伤组 22 例,男性 15 例,女性 7 例,平均年龄(50.8±8.9)岁,损伤部位:颈椎损伤 15 例,胸腰椎损伤 7 例;不完全损伤组 43 例,男性 25 例,女性 18 例,平均年龄(49.7±8.4)岁,损伤部位:颈椎损伤 28 例,胸腰椎损伤 15 例。同期,选取脊柱创伤但神经功能正常者 26 例作为脊髓正常组(ASIA 标准: E 级),男性 19 例,女性 7 例,平均年龄(50.4±8.6)岁,损伤部位:颈椎损伤 15 例,胸腰椎损伤 11 例。从体检中心选取健康者 40 例作为对照组,排除标准同 ASCI 患者,其中,男性 23 例,女性 17 例,平均年龄(48.9±8.1)岁,入选对象性别、年龄等一般资料无差异。本研究通过医院伦理委员会批准,所有入选对象或其家属均知情同意。

1.2 方法

1.2.1 治疗方法 所有 ASCI 患者于伤后 8 h 内采取大剂量甲泼尼龙冲击治疗,先给予 30 mg/kg 剂量静脉泵注 45 min; 15 min 后按 5.4 mg/(kg·h) 的剂量持续静脉滴注 23 h。所有 ASCI 患者 MRI 检查均示有颈或胸腰脊髓压迫,于 48 h 内进行前路减压植骨内固定手术治疗。所有患者术后随访 6 个月以上,随访过程中未出现失访病例,并于 6 个月随访时

对神经功能进行评价。

1.2.2 标本采集和处理 所有患者分别于伤后 12、24、36、48 和 72 h 时,对照组于体检当日,抽取肘静脉血 5 mL,3000 r/min 离心 10 min,留取血浆,保存于-80℃冰箱以备检。

1.2.3 利用实时荧光定量 PCR 技术检测外周血中 miR-146a 和 miR-155 表达 取血浆,解冻,加入细胞裂解液,用 Trizol 总 RNA 提取试剂盒(购自美国 Promega 公司)提取总 RNA,并检测纯度。利用反转录试剂盒(购自日本 Toyobo 公司)将总 RNA 逆转录为 cDNA,逆转录条件:16℃ 30 min,42℃ 30 min,85℃ 5 min。用 PCR 试剂盒(购自日本 Toyobo 公司)以 cDNA 模板进行扩增,引物序列见表 1。PCR 反应条件:95℃ 10 min,95℃ 15 s,56℃ 60 s,74℃ 30 s,连续进行 40 次循环,每个样品均设 3 个平行反应复孔。利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算血浆中 miR-146a 和 miR-155 相对表达量。

表 1 引物序列

引物	序列(5'-3')
miR-146a	上游: CACGGACCTGAAGAACACTGG
	下游: AGAAATGAAATTAGAACACACATCAATCC
miR-155	上游: ACCCTGCTGGATGAACGTAG
	下游: CATGTGGCTTGAAGTTGAG
U6	上游: ATCCGCAAAGACCTGT
	下游: GGGTGAACACTAAG

1.3 统计学处理 采用 SPSS 18.0 软件分析,计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间不同时点资料比较采用重复测量资料的方差分析;利用受试者工作特征曲线(ROC 曲线)分析 ASCI 患者外周血在鉴别完全性损伤中的价值。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ASCI 患者治疗后神经功能恢复情况 术后 6 个月时,完全损伤组(A 级) 22 例患者中,有 3 例(13.6%)神经功能改善,16 例(72.7%)神经功能无明显改善,3 例(13.6%)分别于创伤后 10、11 和 15 d 时死亡;不完全损伤组(B、C、D 级) 43 例患者,30 例(69.8%)神经功能改善,13 例(30.2%)神经功能无改善。

2.2 ASCI 患者、脊髓正常组和对照组不同时点外周血中 miR-146a 表达 与伤后 12 h 相比,完全损伤组、不完全损伤组和脊髓正常组患者伤后 24、36、48 和 72 h 时外周血中 miR-146a 相对表达量均呈先升高后降低,伤后 24 h 时达最大值($P<0.05$);四组

患者伤后 12、24、36、48 和 72 h 时外周血中 miR-146a 表达量比较: 完全损伤组>不完全损伤组>脊髓

正常组>对照组, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$) ,见表 2、3。

表 2 ASCI 患者不同时间点外周血中 miR-146a 表达

组别	n	伤后 12 h	伤后 24 h	伤后 36 h	伤后 48 h	伤后 72 h
完全损伤组	22	2.00±0.10 ^{bcd}	2.41±0.15 ^{abcd}	2.16±0.10 ^{abcd}	1.93±0.09 ^{abcd}	1.64±0.07 ^{abcd}
不完全损伤组	43	1.64±0.13 ^{bc}	2.13±0.13 ^{abc}	1.88±0.07 ^{abc}	1.72±0.10 ^{abc}	1.45±0.09 ^{abc}
脊髓正常组	26	1.40±0.06 ^b	1.74±0.11 ^{ab}	1.61±0.13 ^{ab}	1.31±0.11 ^{ab}	1.23±0.08 ^{ab}

注: 对照组外周血 miR-146a 水平为 1.06±0.10, 与伤后 12 h 相比 $a P<0.05$; 与对照组相比 $b P<0.05$; 与脊髓正常组相比 $c P<0.05$; 与不完全损伤组相比 $d P<0.05$ 。

表 3 ASCI 患者和对照组不同时间点外周血中 miR-146a 表达重复测量方差分析

变异来源	df	SS	MS	F	P
分组	3	84.258	28.086	1284.484	0.000
检测时间	3.533	16.832	4.764	561.895	0.000
分组×时间	10.599	7.663	0.723	85.273	0.000

注: Mauchly 球形检验统计量 $W=0.777 P=0.000$ 。

2.3 ASCI 患者、脊髓正常组和对照组不同时间点外

周血中 miR-155 表达 与伤后 12 h 相比, 完全损伤组、不完全损伤组和脊髓正常组患者伤后 24、36、48 和 72 h 时外周血中 miR-155 相对表达量均呈先升高后降低, 伤后 24 h 时达最大值 ($P<0.05$) ; 3 组患者伤后 12、24、36、48 和 72 h 时及对照组外周血中 miR-155 表达量比较: 完全损伤组>不完全损伤组>脊髓正常组>对照组, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$) ,见表 4、5。

表 4 ASCI 患者不同时间点外周血中 miR-155 表达

组别	n	伤后 12 h	伤后 24 h	伤后 36 h	伤后 48 h	伤后 72 h
完全损伤组	22	2.15±0.16 ^{bcd}	2.54±0.14 ^{abcd}	2.26±0.11 ^{abcd}	2.04±0.11 ^{abcd}	1.79±0.09 ^{abcd}
不完全损伤组	43	1.85±0.12 ^{bc}	2.36±0.14 ^{abc}	2.05±0.11 ^{abc}	1.95±0.11 ^{abc}	1.67±0.12 ^{abc}
脊髓正常组	26	1.54±0.11 ^b	1.88±0.12 ^{ab}	1.77±0.10 ^{ab}	1.72±0.11 ^{ab}	1.50±0.08 ^{ab}

注: 对照组外周血 miR-146a 水平为 1.06±0.10, 与伤后 12 h 相比 $a P<0.05$; 与对照组相比 $b P<0.05$; 与脊髓正常组相比 $c P<0.05$; 与不完全损伤组相比 $d P<0.05$ 。

表 5 ASCI 患者和对照组不同时间点外周血中 miR-155 表达重复测量方差分析

变异来源	df	SS	MS	F	P
分组	3	87.708	29.236	1234.651	0.000
检测时间	4	13.754	3.439	369.493	0.000
分组×时间	12	7.537	0.628	67.492	0.000

注: Mauchly 球形检验统计量 $W=0.887 P=0.089$ 。

2.4 ASCI 患者伤后 24 h 时外周血中 miR-146a 和 miR-155 表达量在鉴别完全性损伤中的价值 ROC 曲线分析显示, ASCI 患者伤后 24 h 时外周血中 miR-146a 和 miR-155 相对表达量在预测完全性损害时, 曲线下面积分别为 0.904 (95% CI: 0.830 ~ 0.978) 和 0.808 (95% CI: 0.695 ~ 0.920) , 当分别取 2.31 和 2.52 时, 灵敏度为 72.7% (16/22) 和 59.1% (13/22) , 特异度为 93.0% (40/43) 和 90.7% (39/43) ; 两者联合时, 曲线下面积 0.976 (95% CI: 0.945 ~ 1.000) , 灵敏度 93.0% (20/22) , 特异度 95.5% (41/43) , 见图 1。

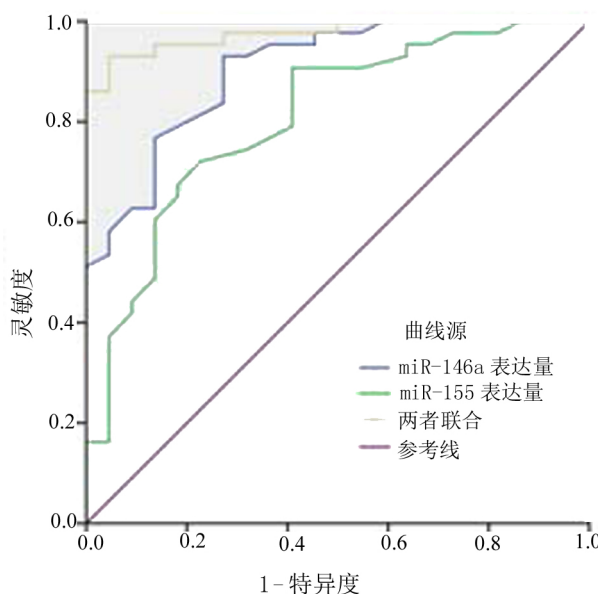


图 1 ASCI 患者伤后 24 h 时外周血中 miR-146a 和 miR-155 表达量在鉴别完全性损害中的价值

3 讨论

ASCI 作为脊髓外科常见的危重症,包括原发性损伤和继发性损伤,对于原发性损伤,治疗的关键在于尽量控制风险,减少继发性损伤并促进神经功能恢复^[6]。科学评估患者病情严重程度对指导治疗尤为重要,但也是脊柱外科研究的重点和难点。目前,临床上判定 ASCI 严重程度主要依靠临床表现及影像学检查,但该方法对设备及检查条件要求较高,且无法实时观察患者病情变化,同时,由于脊髓休克期时间长短不一,限制了对神经功能的评定^[7]。

动物实验表明^[8],大鼠急性脊髓损伤后 miRNA 表达谱发生变化。miR-146a 和 miR-155 作为 miRNA 重要类型,在免疫及炎症反应中发挥重要作用,可通过抑制相应的靶分子表达而增加炎症因子生成^[9]。本研究尝试对 ASCI 患者外周血中 miR-146a 和 miR-155 表达进行监测,结果显示,与伤后 12 h 相比,完全损伤组、不完全损伤组和脊髓正常组患者伤后 24、36、48 和 72 h 时外周血中 miR-146a 和 miR-155 相对表达量均呈先升高后降低,伤后 24 h 时达最大值,分析原因,ASCI 患者早期继发了炎症反应,而随着治疗措施的干预,在一定程度上抑制了炎症反应,从而减轻了炎症反应,所以出现了 miR-146a 和 miR-155 表达量降低。本研究结果显示,不同时间点患者外周血中 miR-146a 和 miR-155 相对表达量均为:完全损伤组>不完全损伤组>脊髓正常组>对照组,说明 miR-146a 和 miR-155 表达与脊髓损伤及损伤严重程度有关,同时,脊髓正常组患者外周血中 miR-146a 和 miR-155 相对表达量高于对照组,亦提示脊柱创伤会导致外周血中 miR-146a 和 miR-155 表达量升高,但升高幅度要低于 ASCI 患者。ROC 结果显示,ASCI 患者伤后 24 h 时外周血中 miR-146a 和 miR-155 相对表达量联合在预测完全性损害时,具有较好的灵敏度和特异度,提示 ASCI 患者伤后 24 h 时 miR-146a 和 miR-155 表达量可作

为评估 ASCI 患者病情严重程度的参考指标。

综上所述,ASCI 患者外周血中 miR-146a 和 miR-155 表达量升高,且随时间而变化,可作为评估患者病情严重程度的参考指标,对指导患者手术时机选择具有一定参考价值,但鉴于本研究样本量有限,尚需进一步开展大规模的临床研究以确证。

【参考文献】

- [1] THEISEN CC, SACHDEVA R, AUSTIN S *et al.* Exercise and peripheral nerve grafts as a strategy To promote regeneration after acute or chronic spinal cord injury [J]. *J Neurotrauma*, 2017, 34 (10): 1909-1914.
- [2] LYON KA, HUANG JH. An improved way to predict neurologic recovery in acute spinal cord injury [J]. *Neurology*, 2017, 89(16): 1654-1655.
- [3] WANG YH, CHEN J, ZHOU J *et al.* Reduced inflammatory cell recruitment and tissue damage in spinal cord injury by acellular spinal cord scaffold seeded with mesenchymal stem cells [J]. *Exp Ther Med*, 2017, 13(1): 203-207.
- [4] YU X, ZHENG H, CHAN MT *et al.* MicroRNAs: new players in cataract [J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(9): 3896-3903.
- [5] KONG H, YIN F, HE F *et al.* The effect of miR-132, miR-146a, and miR-155 on MRP8/TLR4-induced astrocyte-related inflammation [J]. *J Mol Neurosci*, 2015, 57(1): 28-37.
- [6] 汪靖宇, 刘天健, 王琳琳, 等. 急性脊髓损伤 I 临床治疗进展 [J]. *中华急诊医学杂志*, 2017, 26(4): 470-472.
- [7] MARTIN ND, KEPLER C, ZUBAIR M *et al.* Increased mean arterial pressure goals after spinal cord injury and functional outcome [J]. *J Emerg Trauma Shock*, 2015, 8(2): 94-98.
- [8] 黄江湖. MicroRNA-21 在急性脊髓损伤中的作用及川芎嗪的抗凋亡作用机制研究 [D]. 长沙: 中南大学, 2013.
- [9] YAVARI R, BADALZADEH R, ALIPOUR MR *et al.* Modulation of hippocampal gene expression of microRNA-146a/microRNA-155-nuclear factor-kappa B inflammatory signaling by troxerutin in healthy and diabetic rats [J]. *Indian J Pharmacol*, 2016, 48(6): 675-680.