

老年痴呆症患者血清中miR-132的表达及临床意义

蒋娟莉¹, 喻良², 刘爱东¹, 张建³

(1. 成都医学院第一附属医院神经内科, 四川 成都 610500;

2. 四川省人民医院神经内科, 四川 成都 610041;

3. 成都市青白江区弥牟镇卫生院大内科, 四川 成都 610300)

【摘要】 目的 探究微小RNA-132(miR-132)在老年痴呆症患者血清中的表达水平及临床意义。方法 选择我院80例老年痴呆症患者进行研究,其中阿尔茨海默病(AD)组37例,轻度认知功能障碍(MCI)组43例,另选取同期在我院正常体检者48例作为对照组,实时荧光定量聚合酶链反应法(RT-PCR)测定血清中miR-132水平,比较三组间临床指标以及血清中同型半胱氨酸(Hcy)、总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白(HDL-C)、低密度脂蛋白(LDL-C)、脂联素(ANP)水平、miR-132水平。结果 三组受检者在教育程度、血清LDL-C水平、Hcy、ANP、MMSE评分比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。AD组患者的血清LDL-C水平、Hcy水平高于对照组与MCI组, MCI组血清LDL-C水平、Hcy水平高于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。AD组患者的血清ANP水平、精神状态评分(MMSE)低于对照组和MCI组, MCI组血清ANP水平、MMSE评分低于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。AD组血清miR-132水平低于对照组、MCI组, MCI组miR-132水平低于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。直线相关性分析显示血清miR-132水平与血清Hcy水平呈负相关($r=-0.586, P=0.034$),血清miR-132水平与ANP水平、MMSE评分呈正相关($r=0.562, P=0.041$; $r=0.624, P=0.023$)。结论 miR-132可能参与老年痴呆症的发病过程,可作为老年痴呆症诊断和治疗的血清指标。

【关键词】 老年痴呆;微小RNA-132;同型半胱氨酸;实时荧光定量聚合酶链反应;临床意义

【中图分类号】 R742.5 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2018)03-0312-04

MiR-132 expression in serum of senile patients with dementia and its clinical significance. JIANG Juan-li¹, YU Liang², LIU Ai-dong¹, ZHANG Jian³. 1. Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of Chengdu Medical College, Chengdu 610500, Sichuan, CHINA; 2. Department of Neurology, Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610041, Sichuan, CHINA; 3. Department of Internal Medicine, Chengdu Qingbaijiang District Mi Mou Town Health Center, Chengdu 610300, Sichuan, CHINA

【Abstract】 Objective To investigate the expression of miR-132 in senile dementia patients and its clinical significance. **Methods** Eighty patients with senile dementia in our hospital were selected for the study, including 37 patients of Alzheimer disease (AD group) and 43 patients of mild cognitive impairment (MCI group). Another 48 cases of normal physical examination in our hospital were selected as control group. MiR-132 levels in serum were determined by real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-PCR). The serum homocysteine (Hcy), total cholesterol (TC), triglyceride (TG), high density lipoprotein (HDL-C) and low density lipoprotein (LDL-C), adiponectin (ANP) and

通讯作者:蒋娟莉。E-mail:jiangjuanlis@163.com

- [6] Cortelazzo S, Ponzoni M, Ferreri AJ, et al. Mantle cell lymphoma [J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2012, 82(1): 78-101.
- [7] 闫铁鹏. 吡柔比星为主联合化疗方案治疗老年非霍奇金淋巴瘤[J]. 中国临床实用医学, 2012, 4(2): 151-152.
- [8] 刘悦. 吡柔比星为主联合化疗治疗老年非霍奇金淋巴瘤的临床效果观察[J]. 中国实用医药, 2016, 11(32): 153-154.
- [9] Strobbe L, Van der Schans SA, Heijker S, et al. Evaluation of a panel of expert pathologists: review of the diagnosis and histological classification of Hodgkin and non-Hodgkin lymphomas in a population-based cancer registry [J]. Leuk Lymphoma, 2014, 55(5): 1018-1022.
- [10] Deng Z, Yan F, Jin Q, et al. Reversal of multidrug resistance phenotype in human breast cancer cells using doxorubicin-liposome-microbubble complexes assisted by ultrasound [J]. J Control Release, 2014, 174(4): 109-116.
- [11] 巩箫音, 庄军, 陈亮. 吡柔比星、多柔比星治疗非霍奇金淋巴瘤疗效的超声检查对比研究[J]. 医学信息, 2012, 25(12): 127-128.
- [12] 王羽. CTOP与CHOP方案治疗老年非霍奇金淋巴瘤的对比分析[J]. 中国实用医药, 2013, 8(15): 76-77.
- [13] 韩利杰, 赵晓武, 董秀娟, 等. CTOP与CHOP治疗非霍奇金淋巴瘤的疗效及心脏毒性临床观察[J]. 临床荟萃, 2011, 26(3): 208-211.
- [14] 余延芳, 方志坚, 田小园, 等. CTOP和CHOP方案治疗外周T细胞淋巴瘤的临床随访分析[J]. 中国肿瘤临床与康复, 2011, 18(4): 356-368.
- [15] 王彦艳, 张晋林, 王椿, 等. CTOP与CHOP方案治疗初治侵袭性非霍奇金淋巴瘤患者疗效分析——一项前瞻、开放、随机、多中心临床研究[J]. 中华血液学杂志, 2010, 31(10): 649-653.

(收稿日期:2017-07-16)

miR-132 levels were compared between three groups. **Results** There were significant differences in education level, serum LDL-C level, Hcy, ANP and MMSE scores between the three groups ($P<0.05$). Serum LDL-C levels and Hcy levels in group AD were significantly higher than those in control group and MCI group, and the serum levels of LDL-C and Hcy in group MCI were significantly higher than those in control group ($P<0.05$). The level of ANP in the serum and mental status score (MMSE) in AD group were significantly lower than those in control group and MCI group, and the level of ANP in the serum and MMSE score in MCI group were significantly lower than those in control group ($P<0.05$). The level of serum miR-132 in AD group was significantly lower than that in control group and MCI group, miR-132 level in MCI group was significantly lower than that of control group ($P<0.05$). Linear correlation analysis showed that serum miR-132 level was negatively correlated with serum Hcy levels ($r=-0.586$, $P=0.034$), and miR-132 levels in the serum were positively correlated with ANP levels and MMSE scores ($r=0.562$, $P=0.041$; $r=0.624$, $P=0.023$). **Conclusion** miR-132 may be involved in the pathogenesis of Alzheimer's disease, and can be used as a serum marker for the diagnosis and treatment of Alzheimer's disease.

【Key words】 Alzheimer disease; miR-132; Homocysteine; Real-time quantitative polymerase chain reaction; Clinical significance

老年痴呆症属于神经系统退行性疾病,随着年龄的增加,发病率逐渐升高,阿尔茨海默病(Alzheimer, AD)较常见,调查显示年龄80岁以上发病率为30%,患病后大部分患者不能得到及时治疗出现不同程度认知障碍,严重影响患者生活质量,给家庭带来经济负担^[1]。近年来较多研究表明微小RNA (microRNA, miRNA)中 miRNA-132在神经系统相关疾病如AD、胎儿畸形、帕金森病、精神分裂症中发挥重要作用^[2], miRNA-132基因水平呈现不同程度降低,最近研究表明沉默 miRNA-132能够导致大量神经元细胞凋亡^[3]。为探究 miRNA-132在老年痴呆症患者中的作用机制,本研究通过对我院老年痴呆症患者血清中 miRNA-132进行测定,分析其与临床指标的相关性,旨在为老年痴呆症预后、治疗提供一定的参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集2015年7月至2016年11月在我院神经内科进行治疗的80例老年痴呆症患者作为研究对象,男性48例,女性32例;年龄58~89岁,平均(71.36±8.37)岁。其中AD者37例,男性22例,女性15例,平均年龄(73.64±7.92)岁;轻度认知功能障碍(MCI)者43例,男性26例,女性17例,平均年龄(75.64±7.35)岁。另选取同期在我院进行体检的正常者48例作为对照组,其中男性27例,女性21例,平均年龄(76.43±8.67)岁。三组受检者性别、年龄比较差异均无统计学意义($P>0.05$),见表1。

1.2 纳入与排除标准 纳入标准:(1)AD组患者简易智能精神状态量表(MMSE)评分在14~23分;MCI组 MMSE评分 ≥ 24 分。(2)AD组患者均符合美国国家衰老研究所(National Institute of Aging, NIA)与阿尔茨海默病学会(Alzheimer's Association, AA) AD诊断标准(2011版)^[4], MCI组患者符合 Petersen 等^[5]修订的 MCI 诊断标准;(3)年龄 ≥ 55 岁。排除标准:(1)存在意识障碍者;(2)肝、肾功能严重受损、贫血、听觉障碍;

(3)病例资料不完整。

1.3 样品收集 所有研究对象均在清晨空腹状态下采集静脉血3 mL,置于真空管中13 000 r/min离心10 min,收集上清液进行后续指标测定。

1.4 miR-132提取及含量的测定 参照 miRNA 试剂盒步骤对血清中 miRNA 进行提取,采用反转录试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA,置于-80℃冷冻保存。miR-132 cDNA 序列为:序列为:5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACCGACC ATG-3', RT-PCR 引物均由广州锐博公司设计合成,F: 5'-GCCGATAACAGTCTACAGC-3'; R: 5'-CAGTGCAG GGTCCGAGG-3',以 U6 作为内参,引物序列为:F: 5'-TGCGGGTGCTCCGCTTCGGCAGC-3', R: 5'-CAGT GCAGGGTCCGAGGT-3',反应体系:10 μ L 2 \times SYBR Mix,上下游引物各1 μ L, H₂O 8 μ L, cDNA 模板1 μ L。按照反应程序95℃ 3 min, 94℃ 10 s, 60℃ 20 s, 72℃ 2 min, 30个循环, 72℃ 10 min。利用CFX manager 3.0软件进行Cq值分析,以 β -actin作为内参基因按照2^{- $\Delta\Delta$ Cq}算法进行基因相对定量表达分析。

1.5 观察指标与测定方法 所有研究对象在进行检测时除去衣服、鞋、帽,测量体重、身高,根据计算公式 BMI=体重/身高²进行计算。采用简易智力状态检查量表(Mini-mental State Examination, MMSE)进行评定^[6],患者均在安静环境中进行评定,评定内容主要包括定向力、记忆力、注意力与计算力、回忆力、语言表达能力等项目,分值分别为10分、3分、5分、3分、9分,总分为30分,超过27分表示认知功能正常,分数越高,认知功能越好。受教育小于12年则在总分上加一分进行校准。对备份血清中同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy),总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoproteins, HDL-C)和低密度脂蛋白胆固醇(low density lipo pro tein, LDL-C)、脂联素(adiponectin,

ANP)进行检测。所用设备为日立7600自动生化测定仪,采用酶法测定TG、TC、Hcy、ANP含量,试剂盒来源于北京九强生物科技有限公司;循环酶法测定血清Hcy,试剂盒来源于上海东方顺宇生物科技有限公司;采用直接法测定HDL-C、LDL-C水平。上述指标均按照仪器以及试剂盒说明书严格操作。

1.6 统计学方法 应用SPSS21.0软件进行统计分析,计数资料采用率表示,采用 χ^2 检验,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 t 检验,相关性采用直线相关分

析检验,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 三组受检者临床资料比较 三组研究对象在教育程度、血清LDL-C水平、Hcy、ANP、MMSE评分比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。AD组患者的血清LDL-C水平、Hcy水平高于对照组与MCI组,MCI组血清LDL-C水平、Hcy水平高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。AD组患者的血清ANP水平、MMSE评分低于对照组与MCI组,MCI组血清ANP水平、MMSE评分低于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$),见表1。

表1 三组受检者临床资料比较

临床特征	对照组($n=48$)	MCI组($n=43$)	AD组($n=37$)	χ^2/F 值	P 值
教育程度(例)				6.035	0.043
高中学历以上	36	26	18		
初中及以下	12	17	19		
头部遭受重创(例)	3	4	6	2.326	0.313
高血压(例)	16	11	9	1.406	0.593
BMI ($\text{kg}/\text{m}^2, \bar{x}\pm s$)	22.84 \pm 1.62	22.59 \pm 1.53	22.27 \pm 1.75	1.272	0.284
TG ($\text{mmol}/\text{L}, \bar{x}\pm s$)	1.96 \pm 0.93	1.86 \pm 0.88	1.74 \pm 0.83	0.645	0.526
TC ($\text{mmol}/\text{L}, \bar{x}\pm s$)	5.17 \pm 0.66	5.21 \pm 0.74	5.28 \pm 0.76	0.248	0.781
LDL-C ($\text{mmol}/\text{L}, \bar{x}\pm s$)	2.41 \pm 0.89	2.73 \pm 0.88 ^a	2.96 \pm 0.94 ^{ab}	4.137	0.018
HDL-C ($\text{mmol}/\text{L}, \bar{x}\pm s$)	1.31 \pm 0.44	1.34 \pm 0.52	1.36 \pm 0.49	0.106	0.899
Hcy ($\mu\text{mol}/\text{L}, \bar{x}\pm s$)	15.07 \pm 3.96	17.46 \pm 5.27 ^a	21.43 \pm 9.08 ^{ab}	10.895	0.000
ANP ($\mu\text{g}/\text{mL}, \bar{x}\pm s$)	12.48 \pm 3.17	9.26 \pm 3.04 ^a	6.67 \pm 2.86 ^{ab}	28.906	0.000
MMSE评分(分, $\bar{x}\pm s$)	28.64 \pm 3.95	25.16 \pm 6.25 ^a	19.64 \pm 4.37 ^b	14.663	0.000

注:与对照组比较,^a $P<0.05$;与MCI组比较,^b $P<0.05$ 。

2.2 三组受检者血清miR-132表达水平比较 AD组血清miR-132水平低于对照组、MCI组,MCI组miR-132水平低于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$),见表2。

表2 三组受检者血清miR-132表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	miR-132
对照组	48	1.08 \pm 0.28
MCI组	43	0.72 \pm 0.24
AD组	37	0.55 \pm 0.18
F 值		11.570
P 值		0.000

2.3 血清miR-132表达与临床指标的相关性 直线相关性分析显示,血清miR-132水平与血清Hcy水平呈负相关($r=-0.586, P=0.034$),血清miR-132水平与ANP水平、MMSE评分呈正相关($r=0.562, P=0.041; r=0.624, P=0.023$)。

3 讨论

老年性痴呆症是指认知功能出现障碍的临床综合病症,病理学主要表现形成老年斑,血管出现淀粉样病变、神经原出现纤维缠结等,在前脑基底、海马以及大脑皮层容易形成老年斑、神经原缠结。老年性痴呆症发病原因较复杂,主要涉及年龄、神经传递障

碍、遗传、细胞骨架改变、炎症反应等。相关学者通过检测老年痴呆症患者外周血细胞凋亡因子Fas/FasL^[6],证明其与患者发生痴呆呈正相关,因此通过测定外周血相关指标水平,可检测患者病情严重程度。

Hcy是含硫基的氨基酸,相关研究显示Hcy能够激活相关神经受体释放氧自由基,使钙离子浓度过高,进而使神经细胞中毒凋亡^[7]。国内较多研究表明在患者发生老年痴呆前外周血中Hcy水平升高,升高至原水平的2倍以上可认为是导致老年痴呆症发生的危险因素^[8]。本研究通过比较两者一般资料发现AD组血清Hcy水平高于对照组与MCI组,MCI组血清Hcy水平高于对照组,提示Hcy可能参与老年痴呆症发生。相关调查显示高血脂与老年性痴呆症的发生相关^[9],本研究显示AD组LDL-C高于对照组与MCI组,MCI组血清LDL-C水平高于对照组,与相关文献报道一致,提示LDL-C可作为鉴别老年性痴呆症病情程度的参考指标。ANP是脂肪组织分泌的蛋白,近期研究显示血清中高浓度ANP能够保护AD,主要通过保护血管内皮功能、调节系统中枢炎症反应、调控脂类代谢等途径发挥作用^[10]。此外,还有研究显示血清中ANP浓度较高的MCI患者病情进展速度慢于水平较低者^[11],表明ANP是AD进展的保护因子。本研究显示AD组

血清 ANP 水平低于对照组与 MCI 组, MCI 组血清 ANP 水平低于对照组, 表明 ANP 与 AD 的发生相关。

miR-132 主要存在于海马组织中, 在神经元中特异表达, 参与神经元的分化、成熟以及功能形成过程。相关学者研究显示 miR-132 过表达会使神经突触分支以及树突棘数量增加, 沉默 miR-132 后会影 响神经树突的发育^[12]。国外较多研究显示 miR-132 与脑部疾病发生相关, 如 AD、无脑畸形儿, 且基因表达水平均降低^[13]。动物研究显示 miR-132 适量表达能够使神经突触的可塑性增强, 当其表达量超过正常生理水平的 3 倍以上则对大鼠的认知造成一定的障碍^[14]。过表达 miR-132 转基因研究显示小鼠神经元发育发生异常, 以及认知功能出现一定缺陷^[15]。本研究结果显示 AD 组血清 miR-132 水平低于对照组、MCI 组, MCI 组 miR-132 水平低于对照组, 表明患者出现认知功能缺陷可能与 miR-132 表达下降有关。机体 miR-132 水平受性别、年龄以及患者其他血清指标的影响, 本研究相关性分析结果显示血清 miR-132 水平与血清 Hcy 水平呈负相关, 与 ANP 水平、MMSE 评分呈正相关, 表明随着血清 Hcy 水平升高、ANP 水平的降低以及患者精神状态评分的下降, 患者血清 miR-132 水平逐渐降低, 可反映患者认知功能缺陷程度。

综上所述, 通过测定老年痴呆症患者血清中 miR-132 水平能够为老年痴呆症患者预诊断、治疗提供一定的参考, 还可以作为病情预后评估的参考指标, 但本研究结果可能受患者样本数量以及自身基础疾病等影响, 后续将会扩大样本量、排除其他影响因素, 进一步验证结果。

参 考 文 献

- [1] 宋昕, 洪羽蓉, 胡秋莹. 阿尔兹海默病发病原因及机制的研究进展[J]. 临床和实验医学杂志, 2015, 14(10): 871-872.
- [2] Yuan J, Huang H, Zhou X, et al. MicroRNA-132 Interact with p250GAP/Cdc42 pathway in the hippocampal neuronal culture model of acquired epilepsy and associated with epileptogenesis process [J]. Neural Plast, 2016, 2016: 5108489.
- [3] 宋红涛, 过伟, 孙欣羊, 等. 精神分裂症患者血浆 miRNA 表达水平与精神症状的关系研究[J]. 解放军医学杂志, 2014, 39(5): 388-391.
- [4] Tamaoka A. Alzheimer's disease: definition and National institute of neurological and communicative disorders and Stroke and the Alzheimer's disease and related disorders association (NINCDS-ADRDA) [J]. Nihon Rinsho, 2011, 69 Suppl 10 Pt 2: 240-245.
- [5] Petersen RC, Smith GE, Waring SC, et al. Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome [J]. Arch Neurol, 1999, 56(3): 303-308.
- [6] 许静, 蒲传强. Fas/FasL 在神经系统疾病作用的研究进展[J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2013, 40(3): 297-298.
- [7] 余洋, 何峰. 高同型半胱氨酸血症对 2 型糖尿病患者周围神经传导速度的影响[J]. 重庆医学, 2016, 45(32): 4569-4571.
- [8] 蔡超群, 周毅, 周正艳, 等. 尿 AD7c-NTP、血浆 Hcy 与老年性痴呆患者的关系[J]. 实用医学杂志, 2013, 29(14): 2304-2306.
- [9] 宋红, 付霞, 陈博. 血糖、血脂异常对老年痴呆患者认知状况的影响[J]. 重庆医学, 2015, 44(20): 2847-2849.
- [10] 王雪梅, 魏琴, 段明军, 等. 重组腺病毒介导脂联素对人脐静脉内皮细胞损伤的作用和机制[J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(1): 115-121.
- [11] 李金生, 王卫东, 赵倩, 等. 中老年 2 型糖尿病患者脂联素水平与轻度认知功能障碍的关系[J]. 中国临床保健杂志, 2015, 18(6): 586-589.
- [12] 蒋昕, 罗居东, 张舒羽. miR-212/132 簇生物学功能研究进展[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2014, 21(11): 880-884.
- [13] 王雪银, 李宜培, 程相树, 等. 过表达 miR-132 改善阿尔茨海默病样学习记忆障碍[J]. 中国病理生理杂志, 2016, 32(1): 41-45.
- [14] 姜磊, 谢冰, 张睿, 等. 血清 miR-206 和 miR-132 联合检测在轻度认知障碍诊断中的价值[J]. 中华检验医学杂志, 2016, 39(7): 529-531.
- [15] Aten S, Hansen KF, Hoyt KR, et al. The miR-132/212 locus: a complex regulator of neuronal plasticity, gene expression and cognition [J]. RNA Dis, 2016, 3(2): 168-172.

(收稿日期: 2017-06-22)