

外吐小体内 microRNA-193b 在阿尔茨海默病患者中的检测*

刘辰庚, 张跃其, 王金玲, 王培昌[△] (首都医科大学宣武医院检验科, 北京 100053)

【摘要】 目的 初步探讨 microRNA-193b(miR-193b)作为阿尔茨海默病(AD)生物标志物的潜在价值。**方法** 使用超速离心法提取痴呆早期 AD(DAT)患者和轻度认知障碍(MCI)患者和健康对照组血清和脑脊液外吐小体并检测其 miR-193b 水平。**结果** MCI 和 DAT 患者脑脊液及血清外吐小体内 miR-193b 水平均低于对照组($P < 0.05$),且 DAT 组低于 MCI 组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 脑脊液和血清外吐小体内 miR-193b 可能为 AD,特别是早期诊断 AD 的标志物。

【关键词】 阿尔茨海默病; 外吐小体; 微小 RNA; 生物标志物

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2015.16.002 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2015)16-2301-03

Detection of exosomal microRNA-193b in patients of Alzheimer's disease* LIU Chen-geng, ZHANG Yue-qi, WANG Jin-ling, WANG Pei-chang[△] (Department of Clinical Laboratory, Xuanwu Hospital, Capital Medical University, Beijing 100053, China)

【Abstract】 Objective To evaluate the potential value of microRNA-193b(miR-193b) as a biomarker in Alzheimer's disease(AD). **Methods** The super centrifugation method was adopted to extract the exosome from serum and cerebrospinal fluid and the level of exosomal miR-193b was detected in the patients with mild cognitive impairment (MCI), patients with dementia of Alzheimer's type(DAT) and healthy control group. **Results** The exosomal miR-193b levels in cerebrospinal fluid of the patients with MCI and DAT were significantly higher than that of the control ($P < 0.05$), moreover the DAT group was lower than the MCI group ($P < 0.05$). The exosomal miR-193b levels in serum of the patients with MCI and DAT were significantly lower than that of the control group ($P < 0.05$). **Conclusion** The exosomal miR-193b in serum and cerebrospinal fluid may be a potential biomarker of AD, especially for its early stage.

【Key words】 Alzheimer's disease; exosome; microRNA; biomarker

阿尔茨海默病(AD)是老年痴呆症中最为重要和常见的类型^[1]。研究表明外吐小体内 microRNA(miR)有作为疾病生物标志物的价值,且可能参与了细胞间的信号传递。本研究在前期研究的提示下,使用实时定量 PCR 检测 AD 患者血清和脑脊液中外吐小体内和总体 miR-193b 的水平,初步探索外吐小体内 miR-193b 作为 AD 生物标志物的潜在价值^[2]。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2012 年 1 月至 2014 年 11 月本院收治的 AD 患者共 79 例,其中轻度认知障碍期患者(MCI)43 例,男 25 例,年龄中位数 63 岁;女 18 例,年龄中位数 65 岁。痴呆期患者(DAT)36 例,男 21 例,年龄中位数 72 岁;女 15 例,年龄中位数 75 岁。MCI 和 DAT 的诊断符合美国国立卫生研究院国立老化研究所和 AD 协会于 2011 年 4 月联合发布,并经我国神经内科学会推荐的诊断标准^[3]。另随机选取性别、年龄匹配的健康者作为对照组。本研究内容已通过本院伦理委员会审核批准。

1.2 标本采集 受试者空腹 12 h 后分别使用肝素抗凝管和促凝管采集静脉血,抽血后 1 h 内以 3 000 r/min 离心 7 min,分离血浆或血清。男性患者 8 例(3 例 MCI,5 例 DAT)抽血后 1 h 内由神经内科医生按照操作规程抽取脑脊液标本 2 mL。

标本在分析前保存于液氮中。

1.3 外吐小体提取 液氮中取出的标本分别置于-80、-20 和 4 °C 冰箱 0.5 h 缓慢复融,之后立即转入玻璃试管。使用预冷的磷酸盐(PBS)缓冲液将标本 1:1 稀释,4 °C 条件下 3 000 r/min 离心 15 min;将上清转移至超速离心管中,避免混入沉淀以防止细胞碎片污染;之后 4 °C 条件下 12 000 r/min 离心 30 min;小心吸出上清液,4 °C 条件下 110 000 r/min 离心 1 h;弃上清液,加入 5 mL 预冷的 PBS 液并充分混匀;使用 0.22 μm 滤器过滤混合液;4 °C 条件下 110 000 r/min 离心 30 min;弃上清液,加入 5 mL 预冷的 PBS 液,混匀后 4 °C 条件下 110 000 r/min 离心 30 min;弃上清液,加入 100 μL 预冷的 PBS 液重悬沉淀,即为外吐小体混合液^[4]。

1.4 小 RNA 提取及 miR-193b 测定 使用天根公司(TIANGEN) miRcute miR 亲和柱提取小 RNA,按说明书操作。每 100 μL 外吐小体 PBS 溶液加入 100 μL 裂解液,纯化好的小 RNA 溶解于 10 μL RNase-Free dd H₂O 中;同时,提取脑脊液和血清标本中的总小 RNA。20 μL 逆转录体系中含 RNA 模板 0.4 ng,RT Primer Mix 4 μL,5×RT Buffer 4 μL,RNase inhibitor 2 μL,dNTP(2.5 mmol/L) 2 μL,逆转录酶 2 μL。20 μL miR 检测体系中含 miR cDNA 1.0 μL,2×SYBR Green

* 基金项目:国家自然科学基金青年基金资助项目(81401734);教育部博士点基金资助项目(20121107110001)。

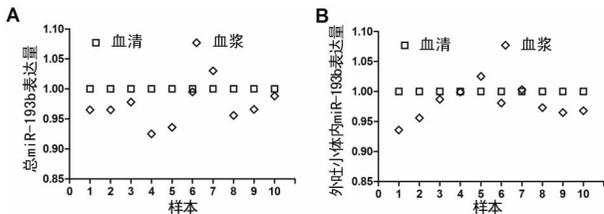
作者简介:刘辰庚,男,主管技师/讲师,博士,主要从事衰老和相关疾病标志物筛选方面的研究。△ 通讯作者,E-mail:pcw1905@126.com。

Mix 10.0 μL, 相应上、下游引物各 0.5 μL。反应条件: 95 °C, 3 min; 95 °C, 25 s; 62 °C, 35 s; 72 °C, 25 s, 35 个循环。以 Ce_miR-39 为内参, 使用 2^{-ΔΔCT} 法计算并统计 miR-193b 组间表达的差异^[5]。

1.5 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行数据处理及统计学分析, 计量资料采用 One-Way ANOVA 分析, 相同患者不同标本检测结果的组间比较使用配对 *t* 检验, 以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

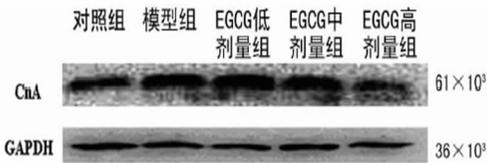
2 结 果

2.1 血清、血浆标本相关性分析 同一受试者血清标本中总体 miR-193b 和外吐小体内 miR-193b 均略高于血浆, 但差异无统计学意义 (*P* > 0.05), 其中对照 4 例, MCI 3 例, DAT 3 例; 2 种标本检测结果均有相关性 (*r*² = 0.987)。见图 1。



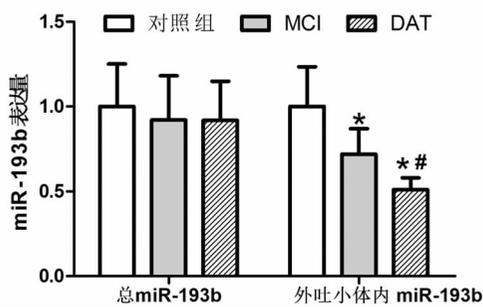
注: 1~4 为对照组标本, 5~7 为 MCI 组标本, 8~10 为 DAT 组标本。

图 1 同一受试者血清 (A) 和血浆 (B) 标本中总体 miR-193b 和外吐小体内 miR-193b 的比较 (*n* = 10)



注: 与对照组比较, * *P* < 0.05; 与 MCI 组比较, # *P* < 0.05。

图 2 MCI 和 DAT 患者脑脊液总体 miR-193b 和外吐小体内 miR-193b 水平检测



注: 与对照组比较, * *P* < 0.05; 与 MCI 组比较, # *P* < 0.05。

图 3 MCI 和 DAT 患者血清总体 miR-193b 和外吐小体内 miR-193b 水平检测

2.2 脑脊液标本检测 MCI 和 DAT 患者脑脊液总体 miR-193b 水平均低于对照组 (*P* < 0.05), 但 MCI 和 DAT 患者组间差异无统计学意义 (*P* > 0.05); MCI 和 DAT 患者脑脊液外吐小体内 miR-193b 水平均低于对照组, 且 DAT 组低于 MCI 组, 差异有统计学意义 (*P* < 0.05)。见图 2。

2.3 血清标本检测 MCI 和 DAT 患者血清总体 miR-193b 水平与对照组差异无统计学意义 (*P* > 0.05), MCI 和 DAT 患者组间差异亦无统计学意义 (*P* > 0.05); MCI 和 DAT 患者血清外吐小体内 miR-193b 水平均低于对照组, 且 DAT 组低于

MCI 组, 差异有统计学意义 (*P* < 0.05)。见图 3。

3 讨 论

随着研究的不断深入, miR 在 AD 发生和发展中的作用被更多地揭示, 越来越多的研究结果提示相关 miR 表达的失控可能在 AD 中扮演了重要角色。miR 在疾病中的改变主要包括在转录水平表达的上调或下调; 参与 miR 转录后加工相关因子的表达失控而导致的 miR 转录后表达的上调或下调; 以及 miR 基因的突变等。随着芯片技术、高通量测序技术和实时荧光定量 PCR 技术的不断进步和检测成本的不断降低, 已有越来越多的研究着眼于探索 miR 这一潜在的疾病标志物。目前已经发现并被 miR Base 数据库收录的人类 miR 分子已近 2 000 种, 其中绝大部分的 miR 分子在不同病理和生理状况下都有表达, 并且多数 miR 能够在人体液中检出^[6-8]。

目前可能应用于 AD 诊断的标志物主要是蛋白类标志物, 例如 tau 蛋白、p-tau 蛋白、t-tau 蛋白和 BACE-1 酶活性等, 如前所述, 这些蛋白在脑脊液中的阳性率和阴性率较为满意, 但在血液标本中则不甚理想。虽然脑脊液的生化改变较好地反映脑组织病理生理改变, 但由于血脑屏障的存在, 能进入外周血的生物大分子的数量远少于其在脑脊液中的数量, 使得丰度较低的脑源性标志物即使在血液中也难以被有效地检出。而对于 AD 患者, 特别是 pre-MCI 和 MCI 患者而言, 对其进行 CSF 检查往往得不到患者的理解, 故寻找血液、尿液等更易获得的体液标本中的 AD 标志物尤为关键。循环 miR 具有作为生物标志物的几大优势: 首先, 它们在血液中能稳定地存在, 离体后也能在血液标本中保存较长时间, 且其受 pH 值、温度变化、反复冻融等影响较小^[9]。其次, 大多数 miR 在种属间较为保守, 这使得大部分在动物模型上初步发现的潜在 miR 标志物在人体内也能被检测到。第三, 以现在的分子生物学技术, 大部分实验室均能较好地进行血液标本 miR 的分离和定量检测^[10]。

困扰研究者的一大问题是 miR 的来源——相应 miR 的改变是不是疾病特异性的, 是否受到健康组织正常代谢的影响。另外, 目前认为体液中的 miR 除和一些蛋白结合而免于被降解之外, 还能存在于外吐小体和微囊泡中。有学者甚至认为, 细胞就是以外吐小体和微囊泡形式对外分泌 miR, 这些外吐小体和微囊泡可能包含了分泌细胞要传达给外界的信息^[11]。事实上, Benner^[12]早在 1988 年就曾提出“细胞外通讯 RNA”假说, 并认为细胞外 RNA 在细胞增殖和分化中起重要作用。已有研究证实组成血脑屏障的内皮细胞能分泌微囊泡, 但其是否能分泌外吐小体目前尚未见报道^[13-14]。本研究结果提示, miR-193b 在血清中的存在形式可能有 2 种——外吐小体内和外吐小体外, 且 miR-193b 在脑脊液和外周血之间的转移很可能主要以外吐小体为载体; 换言之, 组成血脑屏障的内皮细胞也能够分泌外吐小体, 这种含有不同浓度 miR 的外吐小体很可能包含了脑组织向外周组织所传递的信息。

本研究结果表明, MCI 和 DAT 患者血清总体 miR-193b 的检测与健康对照组差异无统计学意义, 而当提取外吐小体检测后发现, 外吐小体内的 miR-193b 在 MCI 和 DAT 患者中均出现了明显变化, 且 MCI 患者血清外吐小体内 miR-193b 明显低于 DAT 患者, 提示外吐小体内 miR-193b 可能有助于 AD 的诊断, 特别是早期诊断。结合脑脊液检测结果, 不难发现血清外吐小体内 miR-193b 的降低的原因之一可能是脑脊液

向外周血分泌的外吐小体内 miR-193b 水平的降低。

综上所述,血清外吐小体内 miR-193b 可能为 AD,特别是早期诊断 AD 的标志物。

参考文献

[1] Henriksen K, O'Bryant SE, Hampel H, et al. The future of blood-based biomarkers for Alzheimer's disease[J]. *Alzheimers Dement*, 2014, 10(1):115-131.

[2] Liu CG, Wang JL, Li L, et al. MicroRNA-135a and-200b, potential Biomarkers for Alzheimer's disease, regulate β secretase and amyloid precursor protein[J]. *Brain Res*, 2014, (1583):55-64.

[3] 贾建平, 陆璐, 张逸驰, 等. 美国国立老化研究所与阿尔茨海默症协会诊断指南写作组:阿尔茨海默症源性轻度认知障碍诊断标准推荐[J]. *中华神经内科学杂志*, 2012, 45(5):345-351.

[4] Schageman J, Zeringer E, Li M, et al. The complete exosome workflow solution:from isolation to characterization of RNA cargo[J]. *Biomed Res Int*, 2013, 2013(6):643-653.

[5] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) method[J]. *Methods*, 2001, 25(4):402-408.

[6] Junn E, Mouradian MM. MicroRNAs in neurodegenerative diseases and their therapeutic potential[J]. *Pharmacol Ther*, 2012, 133(2):142-150.

[7] Blennow K, Hampel H, Weiner M, et al. Cerebrospinal

fluid and plasma biomarkers in Alzheimer disease[J]. *Nat Rev Neurol*, 2010, 6(3):131-144.

[8] Rembach A, Faux NG, Watt AD, et al. Changes in plasma amyloid beta in a longitudinal study of aging and Alzheimer's disease[J]. *Alzheimers Dement*, 2014, 10(1):53-61.

[9] Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(30):10513-10518.

[10] Yu JT, Liu QY, Tan L, et al. Circulating miR-125b as a biomarker of Alzheimer's disease[J]. *J Neurol Sci*, 2014, 336(1/2):52-56.

[11] Kooijmans SA, Vader P, Van Dommelen SM, et al. Exosome mimetics;a novel class of drug delivery systems[J]. *Int J Nanomedicine*, 2012, 7(9):1525-1541.

[12] Benner SA. Extracellular communicator RNA[J]. *FEBS Lett*, 1988, 233(2):225-228.

[13] Dommelen SM, Vader P, Lakhali S, et al. Microvesicles and exosomes: opportunities for cell-derived membrane vesicles in drug delivery[J]. *J Control Release*, 2012, 161(2):635-644.

[14] Lee TH, D'Asti E, Magnus N, et al. Microvesicles as mediators of intercellular communication in cancer--the emerging science of cellular debris[J]. *Semin Immunopathol*, 2011, 33(5):455-467.

(收稿日期:2015-02-10 修回日期:2015-05-10)

(上接第 2300 页)

[3] 陈鸿伟. 体外循环心脏术后急性肾衰竭患者血清胱抑素 C、尿白细胞介素 18 和肌酐的变化及其临床意义[J]. *医学研究杂志*, 2011, 40(5):122-124.

[4] 车妙琳, 钱家麒, 戴慧莉, 等. 联合应用标志物在心脏手术后急性肾衰竭的早期诊断[J]. *中华肾脏病杂志*, 2011, 27(3):164-169.

[5] 邹颖刚, 王欢, 耿嘉男. Clusterin 在急性肾衰竭诊断中的意义[J]. *中国实验诊断学*, 2013, 17(5):982-983.

[6] 赵飞. 急性肾衰竭新型早期诊断标志物研究进展及评价[J]. *医学综述*, 2010, 16(19):2927-2930.

[7] Parikh CR, Devarajan P. New biomarkers of acute kidney injury[J]. *Crit Care Med*, 2008, 36(S4):159-165.

[8] Che M, Xie B, Xue S, et al. Clinical usefulness of novel biomarkers for the detection of acute kidney injury following elective cardiac surgery[J]. *Nephron Clin Pract*, 2010, 115(1):66-72.

[9] 高海燕. 患者缺氧缺血性脑病血清胱抑素 C 的变化及临床意义的研究[J]. *中国药物与临床*, 2013, 13(6):763-765.

[10] 侯静, 余翼. 白细胞介素 18 与急性肾衰竭[J]. *实用医院临床杂志*, 2010, 7(5):153-155.

[11] 姜毅, 贾金康. 尿 IL-18 水平对急性肾衰竭的早期诊断作用[J]. *国际泌尿系统杂志*, 2006, 26(4):560-562.

[12] Parikh CR, Jani A, Melnikov VY, et al. Urinary interleukin-18 is a marker of human acute tubular necrosis[J]. *Am J Kidney Dis*, 2004, 43(3):405-414.

[13] Washburn KK, Zappitelli M, Arian AA, et al. Urinary interleukin-18 is an acute kidney injury biomarker in critically ill children[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2008, 23(2):566-572.

[14] 梁仲城, 彭契六, 周凤燕. 血清胱抑素 C 对糖尿病肾病早期诊断的意义[J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2009, 10(10):905-906.

[15] Conti M, Moutereau S, Zater M, et al. Urinary cystatin C as a special marker of tubular dysfunction[J]. *Clin Chem Lab Med*, 2006, 44(3):288-291.

(收稿日期:2015-02-22 修回日期:2015-04-21)