

# 帕金森病患者血清中 miRNA-153 和 miRNA-223 的表达研究

单岩东, 曾晓云, 罗志秀, 伍俊伊, 周洁, 毛正盛

**摘要:** 探讨帕金森病(PD)患者血清中 miRNA-153 和 miRNA-223 的表达水平及其临床应用价值,以及 PD 患者血清中 miRNA-153 和 miRNA-223 的表达水平与 Hoehn-Yahr(H-Y)分级的相关性。**方法** 定量检测 35 例 PD 患者(PD 组)和 40 名健康体检者(健康对照组)的血清 miRNA-153 和 miRNA-223 相对表达,评定 PD 患者的 Hoehn-Yahr 分级,并对结果进行分析。**结果** PD 组血清 miRNA-153 相对表达明显低于健康对照组( $t = 5.71; P < 0.01$ ); PD 组血清 miRNA-223 相对表达也明显低于健康对照组( $t = 6.07; P < 0.01$ ); PD 组血清 miRNA-153 相对表达与 Hoehn-Yahr(H-Y)分级呈负相关( $r = -0.4504, P < 0.01$ )。**结论** 血清 miRNA-153 和 miRNA-223 有可能作为诊断 PD 的生物学标志物;血清 miRNA-153 有可能成为评估 PD 病程进展的指标。

**关键词:** 帕金森病; miRNA-153; miRNA-223; 生物学标志物

中图分类号:R742.5 文献标识码:A

**Expression of miRNA-153 and miRNA-223 in serum of patients with Parkinson's disease.** SHAN Yandong, ZENG Xiaoyun, LUO Zhixiu, et al. (Wuhan Fourth Hospital; Puai Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430033, China)

**Abstract: Objective** To explore the expression levels of miRNA-153 and miRNA-223 in the serum of patients with Parkinson's disease(PD) and their clinical value, as well as the correlation between the expression of miRNA-153 and miRNA-223 in the serum of PD patients and Hoehn-Yahr(H-Y) scales. **Methods** The relative expression levels of serum miRNA-153 and miRNA-223 in 35 patients with PD(PD group) and 40 healthy people(healthy control group) were quantitatively detected. The H-Y scales of PD patients were evaluated. The results were analyzed. **Results** The relative expression levels of serum miRNA-153 in PD group were significantly lower than that in healthy control group( $t = 5.71; P < 0.01$ ). The relative expression levels of serum miRNA-223 in PD group were also significantly lower than that in healthy control group( $t = 6.07; P < 0.01$ ). There was a negative correlation between the relative expression levels of serum miRNA-153 and H-Y scales in PD group( $r = -0.4504, P < 0.01$ ). **Conclusion** Serum miRNA-153 and miRNA-223 may be used as biomarkers for the diagnosis of PD; serum miRNA-153 may become an indicator for evaluating the progress of PD.

**Key words:** Parkinson's disease; miRNA-153; miRNA-223; Biomarkers

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是一种常见的神经系统退行性疾病,其发病率随年龄增长而增加,在 65 岁以上人群中的发病率可达 2%<sup>[1]</sup>。PD 的病理特征是中脑黑质致密部多巴胺能神经元的选择性变性丢失<sup>[2]</sup>,其症状包括典型的运动症状(震颤、强直、姿势步态异常和运动迟缓)和非运动症状(嗅觉减退、睡眠障碍、感觉异常等)。有研究估算了过去的 25 y 间 PD 的诊断准确率,为 80%<sup>[3]</sup>。但是有研究指出,在 PD 的早期阶段(H-Y 分级 1 级),PD 病程在 5 y 内的诊断准确率为 53%,而病程在 3 y 内的诊断准确率仅为 26%<sup>[4]</sup>。目前,PD 的诊断主要依赖于临床医师对其临床症状和体征的评估,

而缺乏敏感性和特异性都较好的临床诊断标记物。

目前认为 PD 是遗传易感性与环境因素相互作用的结果,其中遗传因素对 PD 的发病起着重要作用。MicroRNA(miRNA)是一种非蛋白质编码 RNA,在正常和疾病状态的各个过程中均具有重要的调节作用<sup>[5]</sup>。由于 miRNA 在疾病进展中的异常表达,因

收稿日期:2020-11-12;修订日期:2021-02-06

基金项目:武卫生计生办[2014]92 号(WX14CS9)

作者单位:[武汉市第四医院(华中科技大学同济医学院附属普爱医院),湖北 武汉 430033]

通讯作者:单岩东, E-mail: syd027@163.com

此 miRNA 可以作为诊断 PD 以及其他疾病的生物标志物<sup>[6,7]</sup>。多个研究证实了 miRNA-153 和 miRNA-223 与 PD 病理改变之间的密切联系<sup>[8~10]</sup>。本研究将定量检测 miRNA-153 和 miRNA-223 在 PD 患者血清中的表达,评价其诊断 PD 的效能,以期 PD 的诊断提供生物学标志物。

## 1 材料与方法

**1.1 研究对象** 选择 2018 年 1 月至 2019 年 6 月在武汉市第四医院住院的 PD 患者 35 例为研究对象(PD 组),其中男性 16 例,女性 19 例,平均年龄(65.12 ± 10.37)岁。另选取同期本院体检中心的健康体检者 40 例为对照组,其中男性 18 例,女性 22 例,平均年龄(63.71 ± 9.89)岁。两组受试者的年龄、性别无统计学差异( $P > 0.05$ )。所有受试者签署知情同意书,本研究经我院伦理委员会审核批准。

**1.2 PD 纳入标准** 由两名神经科医生根据英国 PD 脑库的诊断标准诊断为原发性 PD。

**1.3 PD 排除标准** ①继发性 PD;②帕金森综合征;③PD 阳性家族史者;④患有脑血管疾病及其他全身系统严重疾病者。

**1.4 收集血清样本** 抽取 PD 患者和健康体检者的空腹肘静脉血 5 ml,置入含 EDTA-K2 抗凝剂的真空采血管中,静置 30 min,然后放入离心机,3000 转 10 min,取上清液置于离心管中,放入 -80 °C 冰箱保存。

**1.5 RNA 的提取及逆转录** 按照血清 RNA 提取试剂盒(北京天根公司)说明书操作提取血清标本中的总 RNA,后用紫外分光光度计检测吸光度值,选取比值在 1.8 ~ 2.0 的 RNA 样本,放入 -80 °C 冰箱。将上述 RNA 样本采用逆转录试剂盒(Reverta Ace qRT-PCR Master Mix)逆转录为 cDNA,置入 -80 °C 备用。

**1.6 实时定量 PCR (qRT-PCR) 检测 miR-153 和 miR-223 的表达** 根据 GenBank 中的基因序列号,用 Primer Primer 5.0 软件设计引物(上海生工合成),U6 作为内参。miR-153 的上游引物序列:5'-TCAATGCCTATCAATTATGC-3',下游引物序列:5'-CTAACGTACGATTCCATAGG-3';miR-223 的上游引物序列:5'-ATTCTGTACCGTATCGGCC-3',下游引物序列:5'-

TACCGGTACTATCCTAGAA-3';U6 的上游引物序列:5'-CTCGCTTCGGCAGCAC-3',下游引物序列:5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'。PCR 反应在 ABI 7500 Fast 荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)上进行,程序为:95 °C 30 s,60 °C 20 s,72 °C 45 s,共 40 个循环。实验所得数据运用公式  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  进行分析。

**1.7 统计学方法** 采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析,GraphPad Prism 8.0 软件进行作图。计数资料的组间比较采用  $\chi^2$  检验;计量资料的数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用两独立样本的  $t$  检验,相关性分析采用 Spearman 等级相关。以受试者工作曲线(receiver operator characteristic curve, ROC)的曲线下面积(area under curve, AUC)及灵敏度和特异度来评价血清 miRNA-153 和 miRNA-223 对 PD 的诊断价值。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 miRNA-153 和 miRNA-223 在 PD 组和健康对照组血清中的表达** 本研究中,PD 组血清中 miRNA-153 的相对表达水平(1.87 ± 0.64)明显低于对照组(2.76 ± 0.71),差异有统计学意义( $t = 5.71; P < 0.01$ )(见图 1A);PD 组血清 miRNA-223 的相对表达水平(1.62 ± 0.64)与健康对照组(2.72 ± 0.89)相比,也明显下降,差异有统计学意义( $t = 6.07; P < 0.01$ )(见图 1B)。

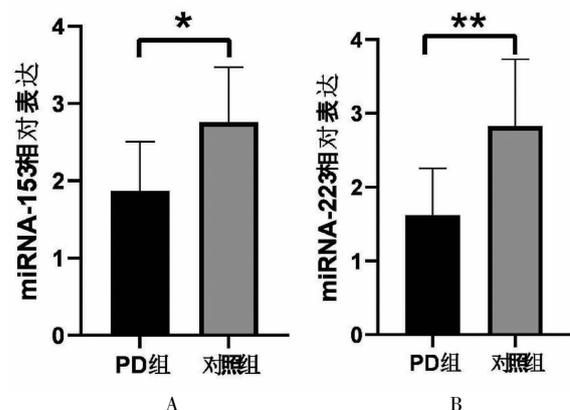


图1 PD组血清 miRNA-153 和 miRNA-223 相对表达均明显低于健康对照组(\* $P < 0.01$ ; \*\* $P < 0.01$ )

**2.2 血清 miRNA-153、miRNA-223 和 miRNA153 + miRNA-223 对 PD 的诊断价值** 根据 ROC 分析所

示,血清 miRNA-153 作为诊断 PD 的 AUC 为 0.8279,其敏感性和特异性分别为 72.65% 和 81.24%; miRNA-223 作为诊断 PD 的 AUC 为 0.8404,敏感性和特异性分别为 75.03% 和 77.14%; 血清 miRNA-153 + miRNA-223 作为诊断 PD 的 AUC 为 0.8589,敏感性和特异性分别为 77.34% 和 82.51%。血清 miRNA-153 和 miRNA-223 单独诊断 PD 的 AUC 的差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 血清 miRNA-153 + miRNA-223 联合检测与分别单独应用血清 miRNA-153、miRNA-223 诊断 PD 的 AUC 相比,差异无统计学意义, ( $P > 0.05$ ) (见表 1、图 2)。

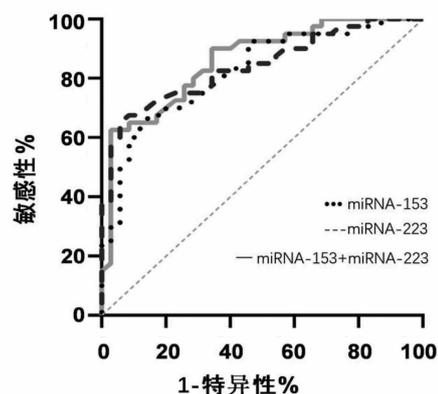


图2 血清 miRNA-153、miRNA-223 以及 miRNA-153 + miRNA-223 诊断 PD 的 ROC

表 1 血清 miRNA-153 和 miRNA-223 的诊断价值分析

检测方法	AUC	敏感性%	特异性%	Youden 指数
miRNA-153	0.8279	72.65	81.24	0.5389
miRNA-223	0.8404	75.03	77.14	0.5217
miRNA - 153 + miRNA-223	0.8589	77.34	82.51	0.5591

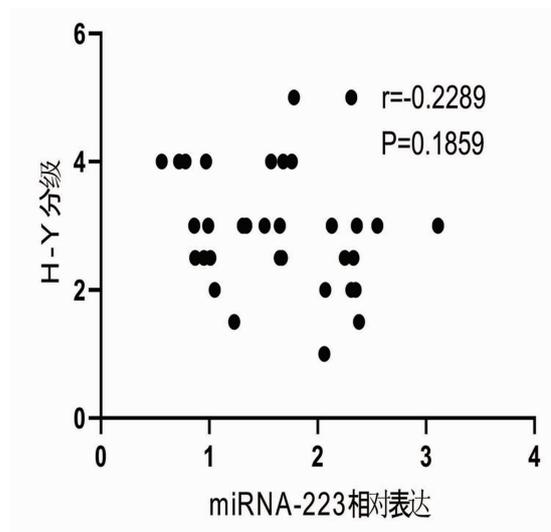
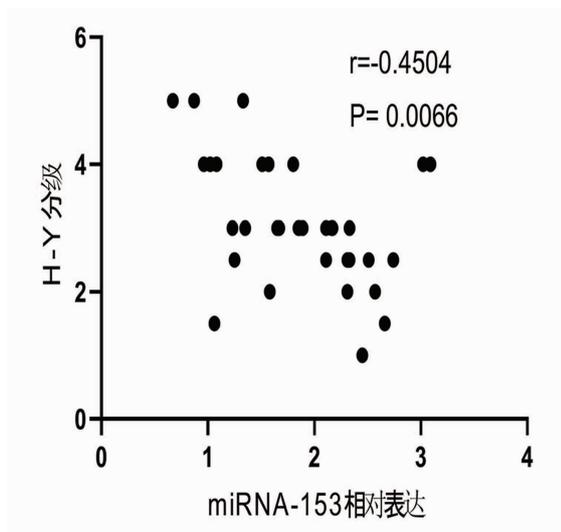


图3 PD 组血清 miRNA-153、miRNA-223 相对表达水平与H-Y分级相关性分析的散点图

2.3 PD 组血清 miRNA-153、miRNA-223 的相对表达与 H-Y 分级的相关性分析 根据分析所示,PD 组血清 miRNA-153 的相对表达 ( $1.87 \pm 0.64$ ) 与 H-Y 分级 ( $3.07 \pm 0.99$ ) 呈负相关 ( $r = -0.4504, P < 0.01$ ); PD 组血清 miRNA-223 的相对表达 ( $1.62 \pm 0.64$ ) 与 H-Y 分级 ( $3.07 \pm 0.99$ ) 无明显相关性 ( $r = -0.2289, P > 0.1$ ) (见图 3)。

### 3 讨论

PD 是一种慢性、进展性的神经系统变性疾病,目前尚无法治愈。明确诊断是 PD 在临床方面的一大难题,尤其是在疾病的早期阶段。因此临床急需准确可靠的 PD 诊断临床标记物。PD 的病理特征是中脑黑质致密部和纹状体中的多巴胺能神经元进行性退化,并形成纤维状内含物:路易体和路易神经突。 $\alpha$ -突触

核蛋白是路易体和路易神经突含有的一种重要物质,其大小为 14 kDa,多位于突触前末端和核膜中,主要作用为参与 N-乙酰马来酰亚胺敏感因子受体介导的胞吐作用和突触小泡的转运<sup>[11]</sup>。基因或环境的改变极易引起  $\alpha$ -突触核蛋白发生错误折叠,蛋白质出现寡聚体,纤维性蛋白质逐渐增多,可溶性改变,继而路易小体出现,最终导致多巴胺能神经元受损。多项研究发现 miRNA-153 和 miRNA-223 通过调控  $\alpha$ -突触核蛋白,进而与 PD 的发病及疾病的进展产生密切联系<sup>[8,9]</sup>。Annamaria 等的研究发现<sup>[10]</sup>,PD 患者的血清 miRNA-223 表达明显下调。也有团队对 PD 患者脑脊液 miRNA-153 的表达进行了研究,发现脑脊液 miRNA-153 的表达明显上调<sup>[12]</sup>;而在另一项研究中,PD 患者血清 miRNA-153 的表达明显下调<sup>[13]</sup>。Marisa 等对 PD 患者唾液中 miRNA-153 和 miRNA-223 的表达进行了研究,发现 miRNA-153 和 miRNA-223 的表达均明显下调<sup>[14]</sup>。我们的研究发现,与健康对照人群相比,PD 患者血清 miRNA-153 和 miRNA-223 的表达均明显下调;血清 miRNA-153 和 miRNA-223 作为诊断 PD 的 AUC 分别为 0.8279 和 0.8404,而且敏感性和特异性均良好,因此可作为诊断 PD 的生物学标记物。血清 miRNA-153 和 miRNA-223 单独诊断 PD 的价值无明显差异;而且血清 miRNA-153 联合 miRNA-223 诊断 PD 的价值无明显提升。

本研究还分析了 PD 患者血清 miRNA-153 和 miRNA-223 的相对表达与 PD 患者 H-Y 分级的相关性。我们发现,PD 患者血清 miRNA-153 的相对表达与 H-Y 分级之间具有明显的相关性,呈负相关;而 PD 患者血清 miRNA-223 的相对表达与 H-Y 分级无相关性。因此,血清 miRNA-153 的相对表达有可能成为评价 PD 病程进展的一项指标。

综上所述,PD 患者血清 miRNA-153 和 miRNA-223 的相对表达均明显下调,可作为诊断 PD 的生物学标志物;PD 患者血清 miRNA-153 与 H-Y 分级呈负相关,可用于评估 PD 的病程进展情况。但是,本研究还

存在着很多局限性:样本量较少;对照组为健康人群,进一步的临床应用尚需纳入与其他神经系统疾病(非 PD 所致的运动障碍性疾病和变性疾病);血清 miRNA-153 的表达是否能准确评价 PD 的病程进展等。这都需要进一步的深入研究。

### [参考文献]

- [1] Alberto A, Michael AS. The Epidemiology of Parkinson's Disease; Risk Factors and Prevention[J]. *Lancet Neurol*, 2016, 15(12):1257-1272.
- [2] Liu JN, Li TX, Thomas JM, et al. Synphilin-1 Attenuates Mutant LRRK2-induced Neurodegeneration in Parkinson's Disease Models [J]. *Hum Mol Genet*, 2016, 25(4):672-680.
- [3] Rizzo G, Copetti M, Arcuti S, et al. Accuracy of clinical diagnosis of Parkinson disease: a systematic review and meta-analysis [J]. *Neurology*, 2016, 86(6):566-576.
- [4] Adler CH, Beach TG, Hentz JG, et al. Low clinical diagnostic accuracy of early vs advanced Parkinson disease: clinicopathologic study [J]. *Neurology*, 2014, 83(5):406-412.
- [5] Vienberg S, Geiger J, Madsen S, et al. MicroRNAs in Metabolism [J]. *Acta Physiol (Oxf)*, 2019, (2):346-361.
- [6] Paola P, Margherita G, Maria P, et al. Circulating miR-127-3p as a Potential Biomarker for Differential Diagnosis in Frontotemporal Dementia [J]. *J Alzheimers Dis*, 2018, 65(2):455-464.
- [7] Qiu ZW, Li H, Wang JW, et al. miR-146a and miR-146b in the Diagnosis and Prognosis of Papillary Thyroid Carcinoma [J]. *Oncol Rep*, 2017, 38(5):2735-2740.
- [8] Marisa C, Song W, Ariana ZT, et al. Glial HMOX1 Expression Promotes Central and Peripheral  $\alpha$ -synuclein Dysregulation and Pathogenicity in Parkinsonian Mice [J]. *Glia*, 2019, 67(9):1730-1744.
- [9] Goun J, Yoon-Seong K. Mitochondrial ROS-mediated Post-Transcriptional Regulation of  $\alpha$ -synuclein Through miR-7 and miR-153 [J]. *Neurosci Lett*, 2017, 661(10):132-136.
- [10] Valletunga A, Ragusa M, Mauro SD, et al. Identification of circulating microRNAs for the differential diagnosis of Parkinson's disease and Multiple System Atrophy [J]. *Front Cell Neurosci*, 2014, 8:156.
- [11] Giuliana F, Tillmann P, Amberley DS, et al. Structural Basis of Synaptic Vesicle Assembly Promoted by  $\alpha$ -synuclein [J]. *Nat Commun*, 2016, 7(9):12563.
- [12] Gui YX, Liu H, Zhang LS, et al. Altered microRNA Profiles in Cerebrospinal Fluid Exosome in Parkinson Disease and Alzheimer Disease [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(35):37043-37053.
- [13] Zhang X, Yang R, Hu BL, et al. Reduced Circulating Levels of miR-433 and miR-133b Are Potential Biomarkers for Parkinson's Disease [J]. *Front Cell Neurosci*, 2017, 11(7):170.
- [14] Marisa C, Lamin J, Julia MG, et al. Salivary microR-153 and microR-223 Levels as Potential Diagnostic Biomarkers of Idiopathic Parkinson's Disease [J]. *Mov Disord*, 2020, 35(3):468-477.