

· 论 著 ·

血浆外泌体 miR-212、miR-132 与颅脑损伤严重程度和 Rotterdam CT 评分的关系

龚铭杰 黄 炜 施振华 王君祥

【摘要】目的 探讨血浆外泌体 miR-212、miR-132 水平与颅脑损伤(TBI)严重程度和 Rotterdam CT 评分的关系。**方法** 前瞻性收集 2019 年 3 月~2020 年 10 月收治的 TBI 共 76 例,另选择我院体检的健康成年人 38 例为对照。提取血浆外泌体并采用实时荧光定量 PCR 法检测 miR-212、miR-132 表达水平。**结果** 76 例 TBI 中,轻型 19 例,中型 35 例,重型 22 例。TBI 血浆外泌体 miR-212、miR-132 水平均明显低于对照组($P<0.05$)。与轻型 TBI 比较,中、重型 TBI 组血浆外泌体 miR-132 水平明显降低($P<0.05$);与中型 TBI 比较,重型 TBI 血浆外泌体 miR-212、miR-132 水平明显降低($P<0.05$)。血浆外泌体 miR-212($r=0.396$)、miR-132($r=0.716$)水平与入院 GCS 评分呈明显正相关($P<0.001$)。血浆外泌体 miR-212 水平($r=-0.375$)和 miR-132 水平($r=-0.613$)与入院 Rotterdam CT 评分呈明显负相关($P<0.05$)。**结论** TBI 病人血浆外泌体 miR-132、miR-212 水平明显下降,并且随着 TBI 损伤程度加重和入院 Rotterdam CT 评分增加而明显降低。这提示血浆 miR-132、miR-212 可能是 TBI 潜在的生物标记物。

【关键词】 颅脑损伤;外泌体;血浆;微小核糖核酸;miRNA;miR-132;miR-212;Rotterdam CT 评分

【文章编号】 1009-153X(2021)09-0676-03 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 651.1⁺5; Q 786

Relationship of plasma exosomal levels of miR-212 and miR-132 to severity and Rotterdam CT score of patients with traumatic brain injury

GONG Ming-jie, HUANG Wei, SHI Zhen-hua, WANG Jun-xiang. Department of Neurosurgery, Changshu No.2 People's Hospital, Changshu 215500, China

【Abstract】 Objective To investigate the relationship of plasma exosomal levels of miR-212 and miR-132 to the severity and Rotterdam CT score of patients with traumatic brain injury (TBI). **Methods** A total of 76 TBI patients were enrolled prospectively from March 2019 to October 2020 and 38 healthy volunteers were recruited as the control. The plasma exosomal levels of miR-212 and miR-132 were detected using real-time fluorescent quantitative PCR. **Results** Of 76 TBI patients, 19 suffered from mild TBI, 35 moderate and 22 severe. The plasma exosomal levels of miR-212 and miR-132 in the TBI group significantly decreased compared to those in control group ($P<0.05$). As the severity of TBI increased, the plasma exosomal levels of miR-212 and miR-132 significantly decreased ($P<0.05$). The plasma exosomal levels of miR-212 ($r=0.396$) and miR-132 ($r=0.716$) were positively significantly correlated with the GCS score on admission ($P<0.05$). The plasma exosomal levels of miR-212 ($r=-0.375$) and miR-132 ($r=-0.613$) were negatively significantly correlated with the Rotterdam CT score on admission ($P<0.05$). **Conclusions** The plasma exosomal levels of miR-132 and miR-212 in TBI patients significantly decrease, and they decrease significantly as the severity of TBI increase and the Rotterdam CT score increase. Our results suggest that the plasma exosomal levels of miR-132 and miR-212 may be potential biomarkers of TBI.

【Key words】 Traumatic brain injury; Plasma; Exosome; MicroRNA; miR-132; miR-212; Rotterdam CT score

颅脑损伤(trumatic brain injury, TBI)是目前导致成年人群意外死亡的主要原因之一^[1]。颅脑 CT 是临床诊断 TBI 的基础。Rotterdam CT 评分对预测 TBI 预后有一定的临床价值^[2]。炎症反应是导致 TBI 继发性损伤的机制之一^[3]。外泌体微小核糖核酸

(microRNA, miRNA)可以通过模式识别受体(pattern-recognition receptor, PRR)参与炎症反应^[4, 5]。研究发现 miR-212/132 在中枢神经系统中呈高度表达,与突触可塑性、记忆形成和神经突生长有关^[6]。本文探讨血浆外泌体 miR-212、miR-132 水平与 TBI 病人损伤程度和 Rotterdam CT 评分的关系。

1 资料与方法

1.1 研究对象 前瞻性收集 2019 年 3 月~2020 年 10 月收治的 TBI 共 76 例,其中男 43 例,女 33 例;年龄 18~79 岁,平均(48.70 ± 14.32)岁;交通事故伤 36 例,

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2021.09.007

基金项目:苏州市青年科技项目(KJXW2020067)

作者单位:215500 江苏,徐州医科大学附属常熟医院(常熟市第二人民医院)神经外科(龚铭杰、黄 炜、施振华、王君祥)

通讯作者:王君祥, E-mail: hospital2003@163.com

高空坠落伤 18 例,异物打击伤 9 例,其他原因 13 例;轻型 19 例,中型 35 例,重型 22 例。排除合并阿尔茨海默病、帕金森病、脑部肿瘤或其他器质性脑综合征等以及酗酒或滥用药物病人。另外,选取我院体检 38 例健康成年人作为对照,其中男 21 例,女 17 例;年龄 18~78 岁,平均(49.80±15.91)岁。本研究获得我院医学伦理委员会批准。

1.2 血浆外泌体 miR-212、miR-132 的检测 收集全血样本,2 h 内以 3 000 转/min 离心 10 min(4 ℃),收集血浆-80 ℃保存备用。血浆解冻后,3 000 转/min 离心 5 min,去除循环细胞或碎片。取上清液 50 μl,加入外泌体提取试剂 10 μl,4 ℃孵育 30 min,然后室温 1 000 g 离心 10 min,使用缓冲液重悬沉淀,得到血浆外泌体。使用电镜观察外泌体提取情况。免疫印迹法鉴定外泌体表面特异性抗原表达^[7]。

取 200 μl 血浆外泌体样本,用 TRIzol 试剂提取总 RNA,PrimeScript First-Strand cDNA 合成试剂盒(日本 Takara 公司)逆转成 cDNA。取 2.0 μl 的 cDNA 模板和 cDNAs PrimeScript RT Master Mix 试剂盒(日本 Takara 公司)进行 PCR 反应:95 ℃、15 min,94 ℃、15 s,55 ℃、30 s,70 ℃、1 min,40 个循环。miR-212 正向引物 5'-GGCACCTTGGCTCTAGACTG-3',反向 5'-GTCGGTGGCCGTGACTG-3'。miR-132 正向引物 5'-CGACCATGGCTGTAGACTGT-3',反向 5'-GTCTCCAGGGCAACCGTG-3'。U6 和 18S rRNA 作为内源性对照。用 2^{-ΔΔCT}法计算相对表达量。

1.3 Rotterdam CT 评分 入院进行脑部 CT 扫描,用于 Rotterdam CT 评分^[8]。初始 CT 图像通过医学图像归档和通讯系统进行复阅,并由 2 位专家独立完成 Rotterdam CT 评分:①基底池受压程度;②中线偏移度;③硬膜外血肿;④脑室内或蛛网膜下腔出血。

1.4 统计学方法 应用 SPSS 21.0 软件分析;正态分布计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验;非正态分布计量资料采用 Mann-Whitney U;计数资料采用 χ^2 检验;采用相关系数分析相关性;*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 外泌体的鉴定结果 电镜观察外泌体呈圆形、椭圆形,具有完成的双层脂质包膜结构,直径在 50~120 nm。免疫印迹法检测发现 CD9、CD63 和 CD81 膜蛋白表达阳性。见图 1。

2.2 TBI 病人血浆外泌体 miR-212、miR-132 的变化与对照组比较,TBI 组血浆外泌体 miR-212、miR-132 水平明显降低(*P*<0.001,表 1)。

2.3 TBI 病人血浆外泌体 miR-212、miR-132 水平与损伤严重程度的关系 与轻型 TBI 比较,中、重型 TBI 组血浆外泌体 miR-132 水平明显降低(*P*<0.05,表 2);与中型 TBI 比较,重型 TBI 血浆外泌体 miR-212、miR-132 水平明显降低(*P*<0.05,表 2)。血浆外泌体 miR-212(*r*=0.396)、miR-132(*r*=0.716)水平与入院 GCS 评分呈明显正相关(*P*<0.001)。

2.4 TBI 病人血浆外泌体 miR-212、miR-132 水平与 Rotterdam CT 评分的关系 血浆外泌体 miR-212 水平(*r*=-0.375)和 miR-132 水平(*r*=-0.613)与 Rotterdam CT 评分呈明显负相关(*P*<0.05)。

3 讨论

TBI 的脑损伤包含两个过程:急性损伤以及急性损伤结束后的慢性期(包含神经炎症、氧化应激、神经细胞凋亡等过程)。TBI 后,小胶质细胞被激活,释放多种活性物质,包括外泌体^[9]。外泌体具有较低的免疫原性,可以穿透多种生物屏障,同时携带

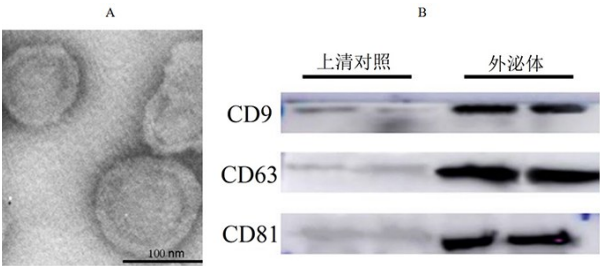


图 1 血浆外泌体的鉴定
A. 电镜观察;B. 免疫印迹法检测外泌体特征性膜蛋白

表 1 TBI 病人血浆外泌体 miR-212、miR-132 水平变化

组别	例数 (例)	血浆外泌体 miRNA 水平	
		miR-212	miR-132
对照组	38	1.01±0.16	1.01±0.14
TBI 组	76	0.69±0.22*	0.68±0.27*

注:与对照组相应值比,* *P*<0.05;TBI. 颅脑损伤;miRNA. 微小核糖核酸

表 2 TBI 病人血浆外泌体 miR-212、miR-132 水平与损伤严重程度的关系

组别	例数 (例)	血浆外泌体 miRNA 水平	
		miR-212	miR-132
轻型 TBI 组	19	0.74(0.54~0.99)	0.92(0.81~1.14)
中型 TBI 组	35	0.77(0.63~0.88)	0.73(0.53~0.82)*
重型 TBI 组	22	0.51(0.43~0.67)*#	0.39(0.34~0.49)*#

注:与轻型 TBI 组比,* *P*<0.05;与中型 TBI 组比,# *P*<0.05;TBI. 颅脑损伤;miRNA. 微小核糖核酸

大量的特异性分子,为体内的“通讯使者”^[10]。研究表明,外泌体含有大量 miRNA,为 TBI 的潜在生物标志分子^[11]。动物实验发现,miR-212/132 在大脑中呈普遍高表达,其靶基因(PDCD4、Ptgs2 等)可通过影响内皮祖细胞的再生、影响血脑屏障、树突形态以及胶质细胞的分化等过程参与神经系统疾病的发生^[12]。miR-212、miR-132 都位于人类 17 号染色体,具有一定的同源性,可以共同调控下游靶基因。Burek 等^[13]研究发现 miR-212/132 可抑制紧密连接蛋白,改变低氧条件下血脑屏障的通透性。Xu 等^[14]发现,神经元分泌含 miR-132 的外泌体对维持脑血管的完整性具有重要作用。

Rotterdam CT 评分是临床应用比较广泛的评分系统,包含对中线移位、中脑基底池受压、颅内出血的位置等多个影像学特征的评估,这些指标与颅内压升高密切相关。基底池的受压程度是预测 TBI 病人预后的重要因素,初次 CT 检查时脑池缺失或不可见的病人,预后不良风险增加近 4 倍^[15]。显著的中线移位是 TBI 手术治疗的指征,中线移位还与许多神经后遗症有关,中线移位是临床评估 TBI 严重程度的重要参数^[16]。中线移位>5 mm 的病人,手术的风险增大^[17]。Rotterdam CT 评分还包含对脑出血情况的评估。李浩浩等^[18]研究表明 Rotterdam CT 评分增加与 TBI 预后不良有关。我们发现 TBI 病人血清外泌体 miR-212、miR-132 水平与 Rotterdam CT 评分呈明显负相关,提示血清外泌体 miR-212、miR-132 水平在一定程度上反映 TBI 病人的脑部影像学特征。此外,术前 GCS 评分也与 TBI 病人的预后显著相关^[19]。本文结果显示 TBI 病人血清外泌体 miR-212、miR-132 与术前 GCS 评分呈明显负相关。随着 TBI 病情的加重,血浆外泌体 miR-132、miR-212 水平明显降低。因此,我们认为,血清外泌体 miR-212、miR-132 水平不仅能反映 TBI 病人脑部 CT 影像学特征,同时对病人短期预后预测也具有一定价值。

综上所述,TBI 病人血浆外泌体 miR-132、miR-212 水平明显下降,并且随着 TBI 损伤程度加重和 Rotterdam CT 评分增加而随之降低。这提示血浆 miR-132、miR-212 可能是 TBI 潜在的生物标记物。

【参考文献】

- [1] Kerr N, de Rivero Vaccari JP, Dietrich WD, *et al.* Neural-respiratory inflammasome axis in traumatic brain injury [J]. *Exp Neurol*, 2020, 323: 113080.
- [2] Katar S, Aydin Ozturk P, Ozel M, *et al.* The use of rotterdam CT score for prediction of outcomes in pediatric traumatic brain injury patients admitted to emergency service [J]. *Pediatr Neurosurg*, 2020, 55(5): 237-243.
- [3] Willis EF, MacDonald KPA, Nguyen QH, *et al.* Repopulating microglia promote brain repair in an IL-6-dependent manner [J]. *Cell*, 2020, 180(5): 833-846.e16.
- [4] Vignard V, Labbé M, Marec N, *et al.* MicroRNAs in tumor exosomes drive immune escape in melanoma [J]. *Cancer Immunol Res*, 2020, 8(2): 255-267.
- [5] Rodríguez-Gómez JA, Kavanagh E, Engskog-Vlachos P, *et al.* Microglia: agents of the CNS pro-inflammatory response [J]. *Cells*, 2020, 9(7): 1717.
- [6] Aten S, Page CE, Kalidindi A, *et al.* miR-132/212 is induced by stress and its dysregulation triggers anxiety-related behavior [J]. *Neuropharmacology*, 2019, 144: 256-270.
- [7] Zhang W, Ou X, Wu X. Proteomics profiling of plasma exosomes in epithelial ovarian cancer: a potential role in the coagulation cascade, diagnosis and prognosis [J]. *Int J Oncol*, 2019, 54(5): 1719-1733.
- [8] 汪 军,谢 鹏,董 鑫,等. Rotterdam CT 评分和 Hel-sinki CT 评分在颅脑损伤预后评估中的价值[J]. *中国临床神经外科杂志*, 2020, 25(7): 468-470.
- [9] Korotkov A, Puhakka N, Gupta SD, *et al.* Increased expression of miR142 and miR155 in glial and immune cells after traumatic brain injury may contribute to neuroinflammation via astrocyte activation [J]. *Brain Pathol*, 2020, 30(5): 897-912.
- [10] Pascual M, Ibáñez F, Guerri C. Exosomes as mediators of neuron-glia communication in neuroinflammation [J]. *Neural Regen Res*, 2020, 15(5): 796-801.
- [11] Atif H, Hicks SD. A review of microRNA biomarkers in traumatic brain injury [J]. *J Exp Neurosci*, 2019, 13: 1179069519832286.
- [12] Xiao X, Jiang Y, Liang W, *et al.* miR-212-5p attenuates ferroptotic neuronal death after traumatic brain injury by targeting Ptgs2 [J]. *Mol Brain*, 2019, 12: 78.
- [13] Burek M, König A, Lang M, *et al.* Hypoxia-Induced microRNA-212/132 alter blood-brain barrier integrity through inhibition of tight junction-associated proteins in human and mouse brain microvascular endothelial cells [J]. *Transl Stroke Res*, 2019, 10(6): 672-683.

(下转第 681 页)