

文章编号:1003-2754(2019)09-0790-04

老年痴呆症患者外周血中 LncRNA-BC200 和 LncRNA-17A 水平及应用价值

李晓峰, 张文瑛, 梁铁生

摘要: **目的** 探讨 LncRNA-BC200 和 LncRNA-17A 在老年痴呆患者外周血中的表达情况及临床价值。**方法** 选取 2016 年 1 月~2018 年 12 月于本院收治的 97 例老年痴呆患者(AD 组)和 100 例非老年痴呆(对照组)健康体检者作为研究对象,并采用实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)检测其外周血 LncRNA-BC200 和 LncRNA-17A 水平。对比两组 LncRNA-BC200 和 LncRNA-17A 表达差异,并绘制 ROC 曲线探讨两者对老年痴呆的诊断价值;采用 Pearson 法分析外周血 LncRNA-BC200 和 LncRNA-17A 与认知功能(MMSE 评分)的关系。**结果** 与对照组比较,AD 组外周血 LncRNA-BC200 和 LncRNA-17A 水平明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。绘制 ROC 曲线发现,LncRNA-BC200 和 LncRNA-17A 对 AD 均有一定诊断价值,两者联合可明显提高诊断效能,其曲线下面积为 0.895(95% CI 0.823~0.934),敏感度和特异度分别为 85.82% 和 88.83%。经 Pearson 相关分析发现,外周血 LncRNA-BC200 和 LncRNA-17A 与 MMSE 评分均呈正相关($P < 0.05$),其相关系数分别为 0.725 和 0.684。97 例 AD 患者中,轻度认知功能障碍患者 42 例,中度认知功能障碍患者 31 例,重度认知功能障碍患者 24 例;外周血 LncRNA-BC200 和 LncRNA-17A 在重度、中度和轻度认知功能障碍患者中依次下降,且差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** LncRNA-BC200 和 LncRNA-17A 在 AD 患者外周血中异常高表达,与认知功能密切相关,两者联合可帮助诊断 AD。

关键词: 老年痴呆; LncRNA-BC200; LncRNA-17A; 临床价值

中图分类号: R749.1+6 **文献标识码:** A

Levels of LncRNA-BC200 and LncRNA-17A in peripheral blood of patients with Alzheimer's disease and their application value LI Xiaofeng, ZHANG Wenying, LIANG Tiesheng. (Department of Neurology, Wuhan Donghu Hospital, Wuhan 430074, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expression and clinical value of LncRNA-BC200 and LncRNA-17A in peripheral blood of senile dementia patients. **Methods** 97 patients with Alzheimer's disease (AD group) and 100 healthy persons without Alzheimer's disease (control group) admitted to our hospital from January 2016 to December 2018 were selected as the study subjects. The levels of LncRNA-BC200 and LncRNA-17A in peripheral blood were detected by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR). The difference of LncRNA-BC200 and LncRNA-17A expression between the two groups was compared, and ROC curve was drawn to explore the diagnostic value of the two groups for senile dementia. Pearson method was used to analyze the relationship between LncRNA-BC200 and LncRNA-17A in peripheral blood and cognitive function (MMSE score). **Results** Compared with the control group, the levels of LncRNA-BC200 and LncRNA-17A in peripheral blood of AD group were significantly higher ($P < 0.05$). The ROC curve shows that both LncRNA-BC200 and LncRNA-17A have certain diagnostic value for AD. The combination of them can significantly improve the diagnostic efficiency. The area under the curve is 0.895, 95% CI is 0.823~0.934, and the sensitivity and specificity are 85.82% and 88.83%, respectively. Pearson correlation analysis showed that LncRNA-BC200 and LncRNA-17A in peripheral blood were positively correlated with MMSE score ($P < 0.05$), and their correlation coefficients were 0.725 and 0.684, respectively. Among 97 AD patients, 42 had mild cognitive impairment, 31 had moderate cognitive impairment and 24 had severe cognitive impairment. The levels of LncRNA-BC200 and LncRNA-17A in peripheral blood decreased in turn in patients with severe, moderate and low cognitive impairment ($P < 0.05$). **Conclusion** The abnormal high expression of LncRNA-BC200 and LncRNA-17A in peripheral blood of AD patients is closely related to cognitive function. The combination of them can help to diagnose AD.

Key words: Alzheimer's disease; LncRNA-BC200; LncRNA-17A; Clinical value

老年痴呆即阿尔兹海默病 (Alzheimer disease, AD) 是一种起病隐匿、呈进行性发展的神经系统退行性疾病,以记忆障碍、失语、失用、失认等为主要临床表现,严重影响其工作及生活,同时给家庭和社会

收稿日期:2019-07-05;修订日期:2019-08-10

基金项目:湖北省卫生计生西医类重点项目 (WJ2015MB101)

作者单位:(武汉市东湖医院神经内科,湖北 武汉 430074)

通讯作者:梁铁生, E-mail: lx0705n@163.com

带来沉重负担^[1]。近年,我国人口老龄化日益严重,AD患病率明显升高,成为继心血管病、癌症及脑卒中之后威胁我国国民生命健康的又一“杀手”,引起全社会关注^[2]。但到目前为止,临床上仍缺乏AD早期诊断和治疗的有效手段。近年,随高通量技术的不断完善,长链非编码RNA(long noncoding RNA, lncRNA)作用及功能逐渐被探究出来,成为生物学领域的研究热点之一^[3]。越来越多研究表明, lncRNA与AD、帕金森病及亨廷顿病等神经退行性疾病发生发展密切相关^[4,5]。有学者研究发现, LncRNA-BC200和LncRNA-17A在AD患者脑组织中异常表达^[6]。但其在在外周血的表达情况及对AD患者的价值目前探究较少。本研究选取2016年1月~2018年12月于本院收治的97例老年痴呆患者和100例非老年痴呆健康体检者作为研究对象,探讨LncRNA-BC200和LncRNA-17A在老年痴呆患者外周血中的表达情况及临床价值。

1 资料和方法

1.1 研究对象 入组标准:(1)符合美国国立神经病、语言障碍和卒中研究所-阿尔茨海默病及相关疾病协会的“很可能AD”诊断标准;(2)年龄 ≥ 65 岁;(3)简易精神状态量表(mini-mental state examination, MMSE)评分低于最低临界值;(4)Hachinski缺血指数量表 ≤ 4 分。排除标准:(1)合并抑郁症或病史;(2)既往有严重心、肝、脑、肾等内科疾病;(3)合并癌症。遵循以上标准,共纳入97例AD患者,其中男49例,女48例;年龄65~80岁,平均(71.32 $\pm$ 6.55)岁。选取同期于本院进行体检的性别及年龄与之相匹配的100例健康体检者作为对照组。所有患者及家属均签署知情同意书,并通过本院伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 LncRNA-BC200和LncRNA-17A检测

(1)标本收集:抽取两组患者入组后1d空腹静脉血5ml于EDTA抗凝管中,4000 r/min离心10 min分离血清,并用2个新的EP管进行分装(用于LncRNA-BC200和LncRNA-17A检测),于-80℃冰箱保存。(2)总RNA提取:取出EP管解冻,并向其中加Trizol试剂,颠倒混匀,后再向其中加入氯仿,剧烈震荡,离心取上层无色液体至新EP管,加入异丙

醇,混匀,离心弃上清,后加入焦碳酸二乙酯使其溶解。(3)逆转录制备cDNA:参考逆转录试剂盒操作说明书准备反应体系(10 μ l):1 μ l 逆转录酶混合液、1 μ l Oligo Dt Primer、5 μ l 总RNA和3 μ l 双蒸馏水,在PCR仪上进行变性及退火(37℃ 15 min~80℃ 10 s);将制备的cDNA用DEPC液稀释后保存。(4)实时荧光定量PCR:参考荧光定量PCR试剂盒说明书进行,反应体系(25 μ l):上下游引物各1.0 μ l、SYBR® Premix Ex Taq™ 12.5 μ l、cDNA 0.5 μ l和双蒸馏水10 μ l;反应条件:95℃ 3 min 预变性、35个循环(95℃ 30 s 变性、58℃ 30 s 退火、72℃ 30 s 延伸),后绘制熔解曲线分析PCR产物特异性;每孔设置3个复孔,取3孔CT平均值作为最后的CT值,以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示相对表达水平其中以GAPDH为内参基因,LncRNA-BC200上下游引物分别为:5'-CTCAGGGAGGCTAAGAGGCG-3'和5'-ACCCACTCCTCCACCTTTGAC-3';LncRNA-17A上下游引物分别为:5'-CCACCCTGAAGTACACAT-3'和5'-GCAAAGGTGCTAATCTTGACTCTTG-3'。

1.2.2 AD患者认知功能评判标准 本研究采用MMSE评判AD患者认知功能,具体包括20个题目,涉及即刻记忆、常识、记忆、地点定向等,得分越低则提示认知功能越差。其中患者教育程度不同其判定为AD的MMSE评分不同:文盲 ≤ 17 分,小学程度 ≤ 20 分,中学程度(含中专) ≤ 22 分,大学程度(含大专) ≤ 23 分。AD严重程度分级:轻度认知功能障碍MMSE ≥ 21 分,中度认知功能障碍MMSE 10~20分,重度认知功能障碍MMSE ≤ 9 分。

1.3 统计学方法 用SPSS 19.0统计学软件分析本研究所有数据。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间用 t 检验比较,3组间比较用单因素方差分析;计数资料用 χ^2 检验比较;绘制ROC曲线分析LncRNA-BC200和LncRNA-17A对AD的诊断价值;用Pearson法分析外周血LncRNA-BC200和LncRNA-17A与MMSE评分的关系;以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组外周血LncRNA-BC200和LncRNA-17A水平比较 与对照组比较,AD组外周血LncRNA-BC200和LncRNA-17A水平明显升高,差异

有统计学意义($P < 0.05$)(见表1)。

2.2 外周血 LncRNA-BC200 和 LncRNA-17A 对 AD 的诊断价值 绘制 ROC 曲线发现(见图1), LncRNA-BC200 和 LncRNA-17A 对 AD 均有一定诊断价值,两者联合可明显提高诊断效能(见表2)。

2.3 外周血 LncRNA-BC200 和 LncRNA-17A 与 MMSE 评分的关系 经 Pearson 相关分析发现,外周血 LncRNA-BC200 和 LncRNA-17A 与 MMSE 评分均呈正相关($P < 0.05$),其相关系数分别为 0.725 和 0.684。

2.4 外周血 LncRNA-BC200 和 LncRNA-17A 与 AD 严重程度的关系 97 例 AD 患者中,轻度认知功能障碍患者 42 例,中度认知功能障碍患者 31 例,重度认知功能障碍患者 24 例;外周血 LncRNA-BC200 和 LncRNA-17A 在重度、中度和轻度认知功能障碍患者中依次下降,且差异有统计学意义($P < 0.05$)(见表3)。

表1 两组外周血 LncRNA-BC200 和 LncRNA-17A 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	LncRNA-BC200	LncRNA-17A
AD 组	97	1.89 ± 0.42	1.56 ± 0.35
对照组	100	1.15 ± 0.34	1.07 ± 0.22
<i>t</i>		13.611	11.802
<i>P</i>		0	0

表2 外周血 LncRNA-BC200 和 LncRNA-17A 对 AD 的诊断价值分析

指标	AUC	95% CI	<i>P</i>	敏感度 (%)	特异度 (%)
LncRNA-BC200	0.751	0.723 ~ 0.789	0.028	68.49	70.11
LncRNA-17A	0.704	0.682 ~ 0.837	0.042	62.45	65.23
LncRNA-BC200 + LncRNA-17A	0.895	0.823 ~ 0.934	0	85.82	88.83

表3 外周血 LncRNA-BC200 和 LncRNA-17A 与 AD 严重程度的关系($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	LncRNA-BC200	LncRNA-17A
重度认知功能障碍	42	1.92 ± 0.54	1.84 ± 0.48
中度认知功能障碍	31	1.61 ± 0.27	1.56 ± 0.35
轻度认知功能障碍	24	1.43 ± 0.15	1.23 ± 0.19
<i>F</i>		12.841	15.203
<i>P</i>		0.001	0.001

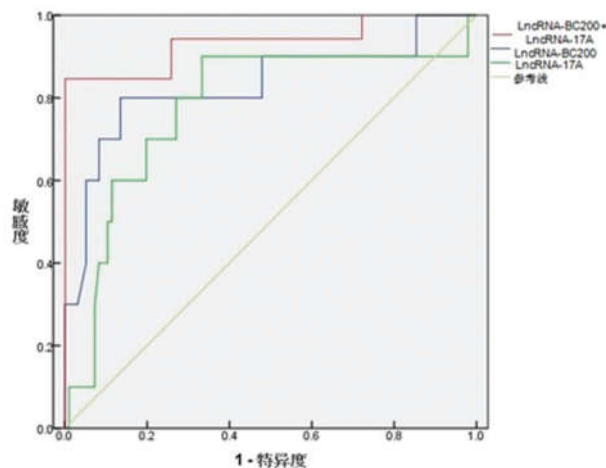


图1 LncRNA-BC200 和 LncRNA-17A 诊断 AD 的 ROC 曲线图

3 讨论

到目前为止,国内外缺乏诊断 AD 的早期敏感指标,有文献报道,全球 AD 患者中仅 1/3 患者获得早期诊断及干预,大部分患者确诊时已处于 AD 晚期,给患者生活带来极大伤害^[7]。因此寻找敏感、有效、方便且经济的诊断方法已迫在眉睫。LncRNA 通常由 RNA 聚合酶 II 转录而成,是一种长度超过 200 个核苷酸的不编码蛋白质的核酸分子,从而被认为是“垃圾”分子^[8]。近年,随分子技术的不断发展,LncRNA 作用及生物学功能逐渐被挖掘,认为与剂量补偿效应、表观遗传调控、细胞周期调控和细胞分化调控等众多生命活动密切相关^[9]。研究发现,LncRNA 可广泛存在于人类血液、体液及组织中,且血浆 LncRNA 在经过反复冻融后仍可保持稳定,而外周血标本获取便捷、经济,促进了血液 LncRNA 研究的快速发展^[10,11]。近年来,越来越多表观遗传学研究表明,lncRNA 可参与神经系统疾病的发生与发展,当其表达或功能异常,可直接或间接导致神经退行性疾病的发生^[12]。

LncRNA-BC200 可在人类神经细胞中特异性表达,主要通过特定调节机制参与神经元细胞突触小体的形成,在一般正常组织中均为较低表达;但近年有研究发现,其在 AD 患者海马组织中显著高表达,且与临床症状等密切相关,提示 LncRNA-BC200 对 AD 具有一定价值^[13]。但尚未涉及其在 AD 患者外

周血中的研究。在本研究中,AD组外周血 LncRNA-BC200 水平明显高于对照组,从外周血水平发现了价值,后来通过绘制 ROC 曲线图发现外周血 LncRNA-BC200 可帮助诊断 AD,这与王瑶等^[14]部分研究结果基本一致,再次突出了外周血 LncRNA-BC200 检测对 AD 的价值。LncRNA-17A 是近年 Massone 等^[15]在研究中发现的一种与 AD 相关的新 LncRNA,在 AD 患者脑组织中高表达,主要通过介导 GABA 信号通路及 A β 产生参与 AD 发生发展。Wang 等^[16]发现 LncRNA-17A 通过调控 SH-SY5Y 细胞系的自噬和凋亡构建 AD 模型,从细胞水平探讨了其价值,但始终未涉及其临床相关研究。而本研究发现,AD 患者外周血 LncRNA-17A 水平明显高于正常体检者,后通过 ROC 曲线发现其在诊断 AD 上具有一定价值,从临床外周血水平初步探讨了 LncRNA-17A 对 AD 患者的价值。而研究还发现与单项指标比较,LncRNA-BC200 和 LncRNA-17A 联合可明显提高其诊断效能,为 AD 患者诊疗作出了一定的贡献。认知功能障碍是 AD 患者主要特征之一,准确判断认知功能障碍及严重程度对 AD 患者十分重要,但目前临床多以 MMSE 等作为其判断标准,是一种主观性评价方案,在一定程度上缺乏客观性^[17]。本研究通过 Pearson 相关分析发现,外周血 LncRNA-BC200 和 LncRNA-17A 与 MMSE 评分均呈明显正相关,且在重度、中度和低度认知功能障碍患者中依次下降,提示 AD 患者外周血 LncRNA-BC200 和 LncRNA-17A 水平越高,其认知功能障碍越严重,有望成为 AD 患者认知功能障碍评价的客观性指标。

综上所述,LncRNA-BC200 和 LncRNA-17A 在 AD 患者外周血中异常高表达,与认知功能密切相关,两者联合可帮助诊断 AD,为 AD 患者诊疗提供更多可能。后续可通过扩大样本量和收集范围进行大样本多中心研究,提高本文结果可信度,为其推广贡献一份力量。

[参考文献]

[1] 杜 蘅,袁晓东. 阿尔茨海默病病因及发病机制研究进展[J].

山东大学学报(医学版),2017,55(10):21-27.

- [2] 朱 琼,陈星星. 阿尔茨海默病的流行病学调查及国内康复治疗现状分析[J]. 中华物理医学与康复杂志,2017,39(11):866-869.
- [3] 韩 聪,胡建宏,胡 娜,等. 长链非编码 RNA 研究进展[J]. 生物技术通讯,2018,29(1):123-130.
- [4] 李 文,赵 斌,郑春燕,等. 长链非编码 RNA 调控神经退行性疾病的研究进展[J]. 中华老年心脑血管病杂志,2017,19(1):100-102.
- [5] Wan P, Su W, Zhuo Y. The Role of Long Noncoding RNAs in Neurodegenerative Diseases[J]. Mol Neurobiol, 2017, 54(3):2012-2021.
- [6] 唐 海. 长链非编码 RNA 在神经退行性疾病中的研究进展[J]. 解剖学研究,2016,38(5):409-413.
- [7] Anand R, Gill KD, Mahdi AA. Therapeutics of Alzheimer's disease: past, present and future [J]. Neuropharmacology, 2014, 76:27-50.
- [8] 姜贵先,罗 溪,刘文文,等. LncRNA 的筛选及其保守性[J]. 医学综述,2017,23(20):3968-3972.
- [9] 史欢欢,李 斌,史文珍,等. 长链非编码 RNA 的作用机制[J]. 生命科学研究,2018,22(3):229-234.
- [10] 邓 桢,苏日古,黄自坤. 循环 lncRNA 作为疾病诊断潜在标志物的研究进展[J]. 中华医学杂志,2017,97(24):1913-1917.
- [11] 钱佳诚,芮鑫森,李永峰,等. 外周血长链非编码 RNA 与肿瘤关系的研究进展[J]. 中国医药,2018,13(4):628-632.
- [12] 徐楚帆,江 来. LncRNA 分子生物学属性及其在中枢神经系统发育中的调控作用[J]. 上海交通大学学报(医学版),2017,37(2):262-266.
- [13] Luo Q, Chen Y. Long noncoding RNAs and Alzheimer's disease [J]. Clinical Interventions in Aging, 2016, 29(11):867-872.
- [14] 王 瑶,杨 超,邓克廷,等. 血清长链非编码 RNA BC200 水平在阿尔茨海默病诊疗中的应用价值[J]. 华中科技大学学报(医学版),2018,47(5):589-593.
- [15] Massone S, Vassallo I, Fiorino G, et al. 17A, a novel noncoding RNA, regulates GABA B alternative splicing and signaling in response to inflammatory stimuli and in Alzheimer disease[J]. Neurobiol Dis, 2011, 41(2):308-317.
- [16] Wang X, Zhang M, Liu H. LncRNA17A regulates autophagy and apoptosis of SH-SY5Y cell line as an in vitro model for Alzheimer's disease [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2019, 83(4):609-621.
- [17] 袁 杰. 自制益气补肾中药复方辨证治疗阿尔兹海默病患者的 MMSE、ADL、HDS 评分及效果探讨研究[J]. 吉林中医药, 2017, 37(8):792-794.