

## 血清 hsa-miR3173-5p 和 hsa-miR-4297 作为心源性 脑卒中诊断标志物的研究

刘旭阳 孙玉芳 汤舒洁 项涛

(西南交通大学附属医院 成都市第三人民医院急诊科, 四川 成都 610031)

**【摘要】目的** 研究血清 hsa-miR3173-5p 和 hsa-miR-4297 与心源性脑卒中的关联性,及其作为诊断标志物的可行性。**方法** GEO 数据库整合分析筛选出可能的心源性脑卒中特异性 miRNA (hsa-miR3173-5p 和 hsa-miR-4297),通过孟德尔随机化与共定位分析验证两个 miRNA 对心源性脑卒中发病的危险作用,并对它们在 miRNA-mRNA 调控网络中的靶基因进行富集分析来寻找相关通路。纳入 2022 年 3 月—2023 年 1 月于成都市第三人民医院急诊科诊断新发缺血性脑卒中的患者共 103 例,其中心源性脑卒中 22 例(病例组),非心源性脑卒中 81 例(对照组)。采用实时荧光定量聚合酶链反应检测血清 hsa-miR3173-5p 和 hsa-miR-4297 的表达水平,多因素逻辑回归分析其与心源性脑卒中的相关性,采用 ROC 曲线评估预测价值。**结果** 孟德尔随机化分析提示遗传预测的循环血液中 hsa-miR3173-5p 和 hsa-miR-4297 表达增高分别使心源性脑卒中的发病风险增加 46% 和 70%。共定位分析提示循环血液中 hsa-miR3173-5p 和 hsa-miR-4297 的表达与心源性脑卒中存在共享遗传变异的概率分别为 95% 和 86%。病例组血清 hsa-miR3173-5p 和 hsa-miR-4297 表达水平显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ), hsa-miR3173-5p ( $OR = 6.30, 95\% CI 1.79 \sim 22.14, P = 0.004$ ) 和 hsa-miR-4297 ( $OR = 12.38, 95\% CI 1.97 \sim 77.72, P = 0.007$ ) 与心源性脑卒中有显著关联。hsa-miR3173-5p 和 hsa-miR-4297 的 ROC 曲线下面积 (AUC) 分别为 0.705 和 0.624,将 hsa-miR3173-5p 和 hsa-miR-4297 联合心房颤动共同进行分析,其 AUC 为 0.842。**结论** hsa-miR3173-5p 和 hsa-miR-4297 的表达水平与心源性脑卒中中具有密切关联,有望作为心源性脑卒中的诊断标志物。

**【关键词】** 心源性脑卒中;miRNA;诊断标志物

**【DOI】**10.16806/j.cnki.issn.1004-3934.2024.05.019

## Serum hsa-miR3173-5p and hsa-miR-4297 as Diagnostic Markers of Cardiogenic Stroke

LIU Xuyang, SUN Yufang, TANG Shujie, XIANG Tao

(Department of Emergency, The Affiliated Hospital of Southwest Jiaotong University, The Third People's Hospital of Chengdu, Chengdu 610031, Sichuan, China)

**【Abstract】 Objective** To explore the levels of serum hsa-miR3173-5p and hsa-miR-4297 and their feasibility as the diagnostic markers in cardiogenic stroke. **Methods** GEO database integration analysis screened out possible cardiogenic stroke-specific miRNAs (hsa-miR3173-5p and hsa-miR-4297), verified the risk role of the two miRNAs in the development of cardiogenic stroke by Mendelian randomization and colocalization analysis, and their target genes in the miRNA-mRNA regulatory network were enriched to search for related pathways. A total of 103 patients newly diagnosed with ischemic stroke in the emergency department from March 2022 to January 2023 were included, among which 22 cases were cardiogenic stroke (case group) and 81 were non-cardiogenic stroke (control group). The expression levels of serum hsa-miR3173-5p and hsa-miR-4297 were detected by real-time quantitative polymerase chain reaction, and their correlation with cardiogenic stroke was analyzed by multivariable logistic regression. The predictive value was evaluated using the receiver operating characteristic (ROC) curve. **Results** Mendelian randomization analysis suggested that genetically predicted increased expression of hsa-miR3173-5p and hsa-miR-4297 in circulating blood increased the risk of cardiogenic stroke by 46% and 70% respectively. Colocalization analysis suggested that the expression of hsa-miR3173-5p and hsa-miR-4297 in circulating blood has a 95% and 86% probability of shared genetic variation with cardiogenic stroke, respectively. The expression levels of serum hsa-miR3173-5p and hsa-miR-4297 in the case group were significantly higher than in the control group ( $P < 0.05$ ), and hsa-miR3173-5p ( $OR = 6.30, 95\% CI 1.79 \sim 22.14, P = 0.004$ ) and hsa-miR-4297 ( $OR = 12.38, 95\% CI 1.97 \sim 77.72, P = 0.007$ ) were significantly associated with cardiogenic stroke. The area under the ROC curve (AUC) for hsa-miR3173-5p and hsa-miR-4297 were 0.705 and 0.624 respectively, and the AUC of the combined analysis of hsa-

基金项目:成都市卫健委科研课题(2021217)

通信作者:项涛, E-mail:1142752929@qq.com

miR3173-5p and hsa-miR-4297 with atrial fibrillation is 0.842. **Conclusion** The expression levels of hsa-miR3173-5p and hsa-miR-4297 are closely related to cardiogenic stroke, and are promising as diagnostic markers for cardiogenic stroke.

**[Keywords]** Cardiogenic stroke; miRNA; Diagnostic marker

脑卒中是全世界重大公共卫生问题,是第二位常见的死亡原因和第三位致残的主要疾病<sup>[1]</sup>,给社会和家庭造成极大负担。缺血性脑卒中(ischemic stroke, IS)占有脑卒中的 80% 以上<sup>[2]</sup>,目前国际广泛使用的 TOAST 病因学分型将 IS 分为 5 个亚型<sup>[3]</sup>:大动脉粥样硬化(large-artery atherosclerosis, LAA)型、心源性栓塞(cardioembolic, CE)型、小动脉闭塞(small-artery occlusion lacunar, SAO)型、其他明确病因(stroke of other determined etiology, SOE)型和不明原因(stroke of other undetermined etiology, SUE)型,准确分型对临床决策和预后评估至关重要。其中 CE 型病情最重、死亡率最高、预后最差,约占 IS 总数的 20%<sup>[4]</sup>,早期诊断 CE 型脑卒中是 IS 救治的重点和难点之一。

miRNA 在不同疾病中起调控作用,稳定性好,易检测,具有作为疾病诊断标志物的广泛前景<sup>[5]</sup>。本课题组前期基于生物信息学方法,筛选出可能与 CE 型脑卒中相关的特异性 miRNA(hsa-miR3173-5p 和 hsa-miR-4297),现拟研究 hsa-miR3173-5p 和 hsa-miR-4297 在急性 IS 患者中的表达水平,以期提高 CE 型脑卒中患者早期诊断率,为后续治疗方案的选择提供参考。

## 1 资料与方法

### 1.1 生物信息学方法

本课题组前期已经通过生物信息学方法对已发表与脑卒中相关的 miRNA 和 mRNA 高通量数据进行整合分析,运用多种工具、算法分析预测靶向 miRNA-mRNA 关系,然后用 Cytoscape 软件构建由 miRNA 和 mRNA 组成的生物信息调控网络。进一步通过孟德尔随机化与共定位分析验证了两个 miRNA 对 CE 型脑卒中发病的危险作用,通过预测 miRNA 的靶标 mRNA,并分析其功能通路来预测循环 miRNA 参与脑栓塞的分子机制。

### 1.2 研究对象

前瞻性纳入 2022 年 3 月—2023 年 1 月于成都市第三人民医院急诊科就诊并入院治疗的急性 IS 患者共 103 例,所有研究对象均在急诊科完成血液标本采集、病史记录和生命体征测量,并根据美国国立卫生研究院卒中量表(National Institutes of Health Stroke Scale, NIHSS)进行评分<sup>[6]</sup>,在住院期间完成血常规、血生化(包括心肌酶、脑钠肽)、动态心电图、心脏彩超、血管神经影像学/脑血管造影等检查。参考《心源性卒中诊断中国专家共识(2020)》<sup>[7]</sup>,由两名神经内科

主任医师共同对入组患者进行诊断和 TOAST 病因学分型,根据结果分为病例组(CE 型脑卒中)和对照组(非 CE 型脑卒中)。

纳入标准:(1)发病 72 h 以内,诊断标准参考《中国急性缺血性脑卒中诊治指南 2018》<sup>[8]</sup>;(2)首次发病患者;(3)既往诊断脑卒中,无明显神经功能缺失,再发 IS 的患者。排除标准:(1)出血性脑卒中,包括脑梗死后出血的患者;(2)有神经系统、免疫系统疾病,近期使用免疫抑制剂、激素等药物的患者;(3)接受放化疗治疗的恶性肿瘤患者;(4)关键指标缺失的病例。

本研究已通过成都市第三人民医院伦理委员会批准(伦理审批号 2021-S-30),所有研究对象及家属均已签署同意书。

### 1.3 标本采集和 miRNA 检测

符合标准的患者,均在到达急诊科 1 h 内完成血液标本采集,采取梯度离心方法,放置于  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱中冷冻保存,24 h 内行总 RNA 提取、纯化。miRNA 检测步骤如下:(1)血浆 miRNA 的提取;(2)血浆 miRNA 浓度及纯度的鉴定;(3)RNA Poly(A)加尾;(4)逆转录为 cDNA;(5)实时荧光定量聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)技术检测目标 miRNA 相对表达;(6)PCR 数据的采集和处理;(7)血清 miRNA 表达量的数据处理方法为  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  法。

### 1.4 统计学方法

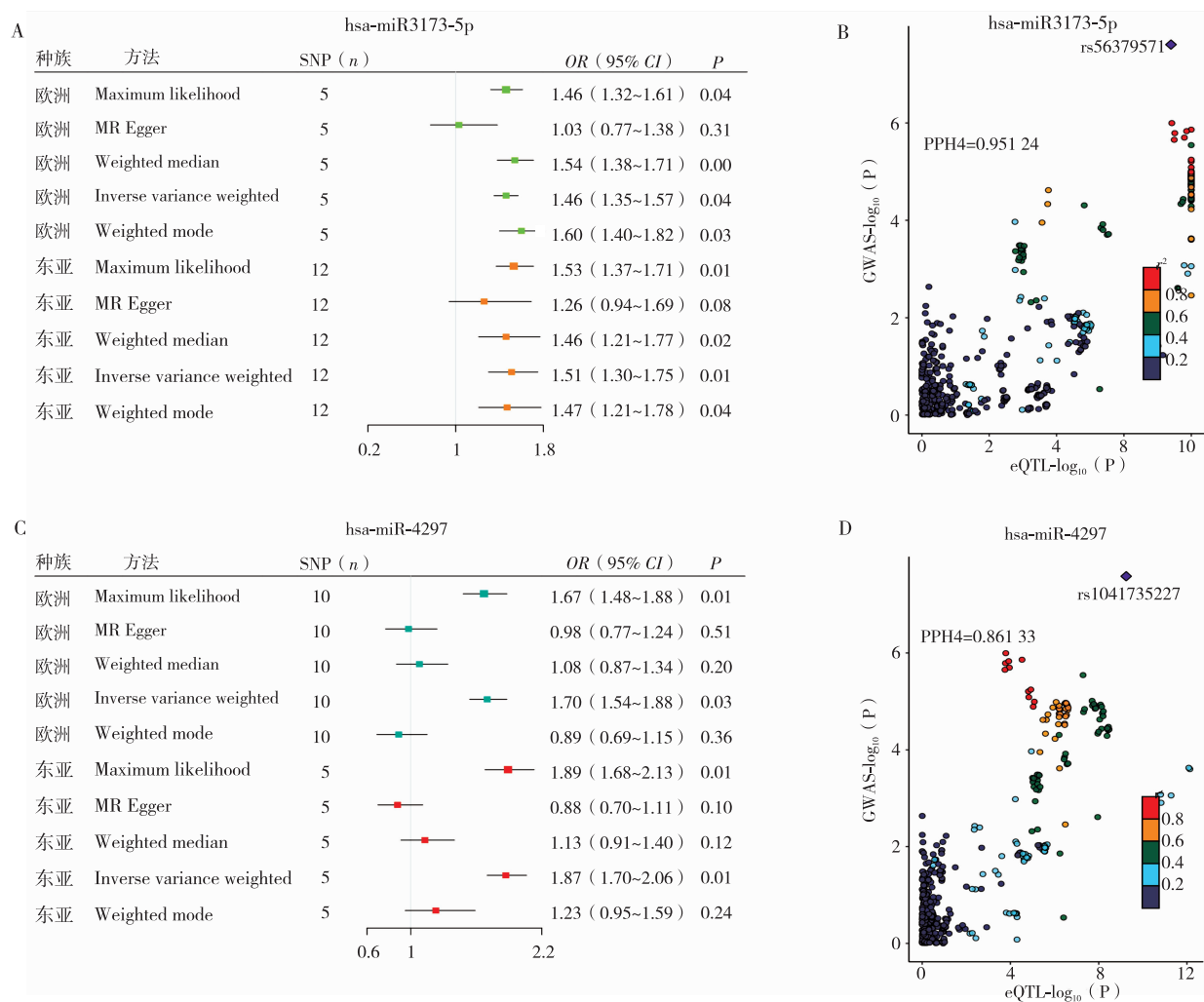
采用 R 4.2.2 软件和 SPSS 21.0 软件进行统计学分析。满足正态分布和方差齐性的计量资料以均数  $\pm$  标准差表示,组间比较选择独立样本  $t$  检验;非正态分布的计量资料采用中位数(四分位数间距)表示,组间比较采用 Mann-Whitney  $U$  检验。本研究多组比较中,各组数据均通过正态性和方差齐性检验,采用单因素方差分析。将单因素分析有意义的指标纳入多因素逻辑回归分析。用 ROC 曲线评估 hsa-miR3173-5p 和 hsa-miR-4297 对 CE 型脑卒中的预测价值,并计算曲线下面积(area under the curve, AUC),以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 孟德尔随机化分析和共定位分析

基于 miRNA eQTL 数据的孟德尔随机化分析提示,遗传预测循环血液中的 hsa-miR3173-5p 和 hsa-miR-4297 表达增高,可使 CE 型脑卒中的发病风险分别增加 46% 和 70%(图 1A 和 1C)。共定位分析提示

循环血液中 hsa-miR3173-5p 和 hsa-miR-4297 的表达 和 86% (图 1B 和 1D)。  
与 CE 型脑卒中存在共享遗传变异的概率分别为 95%



注:SNP,单核苷酸多态性;GWAS,全基因组关联分析。

图1 孟德尔随机化分析 hsa-miR3173-5p 和 hsa-miR-4297 与 CE 型脑卒中的发病风险及共定位分析

## 2.2 两组患者的一般情况

病例组的性别、年龄、血压、吸烟、饮酒、高血压、糖尿病、血常规、凝血、肝肾功能、血脂和对照组差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。病例组中合并心房颤动

(房颤)10 例、合并冠心病 10 例,比例明显高于对照组,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。病例组 NIHSS 评分高于对照组,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),见表 1。

表1 两组患者的一般资料

项目	对照组 (n = 81)	病例组 (n = 22)	$t/Z/\chi^2$	P
性别(男/女)	48/33	12/10	0.16	0.691
年龄/岁	72.28 ± 11.30	75.32 ± 11.57	-1.11	0.269
收缩压/mm Hg	153.64 ± 19.26	156.73 ± 27.08	-0.61	0.545
舒张压/mm Hg	82.30 ± 12.23	86.18 ± 12.22	-1.32	0.189
吸烟史/[n(%)]	33(40.74)	7(31.82)	0.58	0.446
饮酒史/[n(%)]	20(24.69)	3(13.64)	1.22	0.270
高血压/[n(%)]	46(56.79)	15(68.18)	0.93	0.335
糖尿病/[n(%)]	22(27.16)	7(31.82)	0.19	0.667
冠心病/[n(%)]	13(16.05)	10(45.45)	8.63	0.003
房颤/[n(%)]	10(12.35)	10(45.45)	12.12	<0.001

续表

项目	对照组( <i>n</i> = 81)	病例组( <i>n</i> = 22)	<i>t</i> / <i>Z</i> / $\chi^2$	<i>P</i>
红细胞/( $\times 10^{12} \cdot L^{-1}$ )	4.61 ± 0.68	4.46 ± 0.62	0.88	0.382
白细胞/( $\times 10^9 \cdot L^{-1}$ )	7.81 ± 2.54	7.27 ± 1.95	0.93	0.353
血小板/( $\times 10^9 \cdot L^{-1}$ )	182(155 ~ 215)	180(137 ~ 261)	-0.09	0.929
凝血酶原时间/s	11.60(11.00 ~ 13.00)	12.45(11.70 ~ 13.03)	-1.52	0.128
部分活化凝血酶时间/s	29.40(27.30 ~ 35.15)	30.05(27.48 ~ 35.53)	-0.28	0.781
凝血酶时间/s	16.40(15.75 ~ 17.55)	16.65(15.80 ~ 17.70)	-0.77	0.442
纤维蛋白原/( $mg \cdot dL^{-1}$ )	3.47(2.93 ~ 3.95)	3.29(2.91 ~ 3.64)	-0.78	0.435
肌酐/( $\mu mol \cdot L^{-1}$ )	82.20(64.20 ~ 99.15)	73.05(61.38 ~ 86.08)	-1.56	0.118
尿素氮/( $mmol \cdot L^{-1}$ )	6.01(4.78 ~ 7.31)	5.65(4.41 ~ 7.34)	-0.02	0.987
血糖/( $mmol \cdot L^{-1}$ )	6.29(5.02 ~ 9.58)	6.77(5.56 ~ 9.29)	-0.36	0.717
白蛋白/( $g \cdot L^{-1}$ )	37.30 ± 2.89	36.11 ± 3.28	1.67	0.098
谷丙转氨酶/( $U \cdot L^{-1}$ )	15.90(11.15 ~ 21.65)	18.55(12.03 ~ 22.78)	-1.35	0.178
谷草转氨酶/( $U \cdot L^{-1}$ )	20.20(16.95 ~ 24.70)	24.05(19.43 ~ 29.55)	-1.53	0.126
高密度脂蛋白胆固醇/( $mmol \cdot L^{-1}$ )	1.22 ± 0.28	1.29 ± 0.31	-1.10	0.276
低密度脂蛋白胆固醇/( $mmol \cdot L^{-1}$ )	2.95 ± 0.77	2.96 ± 1.04	-0.04	0.973
甘油三酯/( $mmol \cdot L^{-1}$ )	1.14(0.82 ~ 1.95)	1.31(0.81 ~ 2.01)	-0.12	0.904
总胆固醇/( $mmol \cdot L^{-1}$ )	4.87 ± 1.10	4.94 ± 1.43	-0.25	0.807
NIHSS 评分/分	6(4 ~ 12)	9(6 ~ 17)	-2.14	0.033

注:1 mm Hg=0.133 3 kPa。

### 2.3 两组患者 hsa-miR3173-5p 和 hsa-miR-4297 的表达水平

hsa-miR3173-5p 在病例组和对照组表达量分别为 1.44 ± 0.67 和 0.98 ± 0.56, hsa-miR-4297 在病例组和对照组表达量分别为 0.94 ± 0.46 和 0.72 ± 0.39。hsa-miR3173-5p 和 hsa-miR-4297 在病例组的表达水平均高于对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 2。

表 2 hsa-miR3173-5p 和 hsa-miR-4297 表达水平

组别	<i>n</i>	hsa-miR3173-5p	hsa-miR-4297
对照组	81	0.98 ± 0.56	0.72 ± 0.39
病例组	22	1.44 ± 0.67	0.94 ± 0.46
<i>t</i>		-3.30	-2.21
<i>P</i>		0.001	0.030

### 2.4 对照组中不同 TOAST 分型患者的 hsa-miR3173-5p 和 hsa-miR-4297 表达水平

将对照组中患者根据 TOAST 病因学分型进行分组,由于本研究中 SOE 型无入组患者,故对照组患者分为 LAA 组、SAO 组、SUE 组。将 3 组患者 hsa-miR3173-5p 和 hsa-miR-4297 表达水平进行对比,差异均无统计学意义( $P > 0.05$ ),见表 3。

### 2.5 多因素逻辑回归分析

结合既往文献报告 CE 型脑卒中的危险因素<sup>[7]</sup>,以是否发生 IS 为因变量,将单因素分析中  $P < 0.05$  的变量进行逻辑回归分析,结果显示房颤、hsa-miR3173-

5p 和 hsa-miR-4297 是 CE 型脑卒中发生的危险因素,见表 4。

表 3 对照组中不同 TOAST 分型组的 hsa-miR3173-5p 和 hsa-miR-4297 表达水平

组别	<i>n</i>	hsa-miR3173-5p	hsa-miR-4297
LAA 组	43	0.94 ± 0.57	0.70 ± 0.38
SAO 组	31	1.05 ± 0.56	0.74 ± 0.37
SUE 组	7	0.88 ± 0.60	0.76 ± 0.58
<i>F</i>		0.47	0.10
<i>P</i>		0.630	0.909

表 4 多因素逻辑回归分析

项目	<i>OR</i>	95% <i>CI</i>	<i>P</i>
冠心病	3.55	0.96 ~ 13.51	0.063
房颤	5.90	1.34 ~ 26.08	0.019
NIHSS 评分	1.08	0.97 ~ 1.20	0.174
hsa-miR3173-5p	6.30	1.79 ~ 22.14	0.004
hsa-miR-4297	12.38	1.97 ~ 77.72	0.007

### 2.6 hsa-miR3173-5p 和 hsa-miR-4297 作为 CE 型脑卒中诊断标志物可行性分析

采用 ROC 曲线的方法分别分析 hsa-miR3173-5p 和 hsa-miR-4297 作为 CE 型脑卒中分子标志物的可行性(图 2)。结果显示,hsa-miR3173-5p 的 AUC 为 0.705( $P < 0.05$ ); hsa-miR-4297 的 AUC 为 0.624( $P > 0.05$ );将 hsa-miR3173-5p、hsa-miR-4297 和房颤进行联合分析, AUC 为 0.842( $P < 0.05$ ),见表 5。

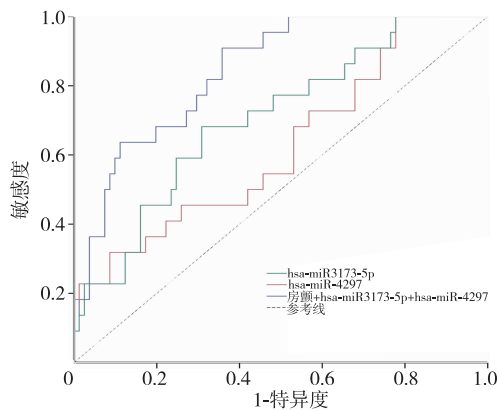


图2 hsa-miR3173-5p 和 hsa-miR-4297 联合房颤对 CE 型脑卒中预测值的 ROC 曲线

表5 miRNA 作为 CE 型脑卒中诊断标志物可行性分析

	AUC	95% CI	P
hsa-miR3173-5p	0.705	0.59 ~ 0.83	0.003
hsa-miR-4297	0.624	0.49 ~ 0.76	0.075
房颤 + hsa-miR3173-5p + hsa-miR-4297	0.842	0.76 ~ 0.92	<0.001

## 2.7 脑卒中患者发病相关 hsa-miR3173-5p 和 hsa-miR-4297 及靶基因的生物学功能

利用 miRDB 和 TargetScan Human 等数据库预测了两个未被研究的 miRNA (hsa-miR3173-5p 和 hsa-miR-4297) 的靶基因(564 和 833 个),见图 3。对靶基

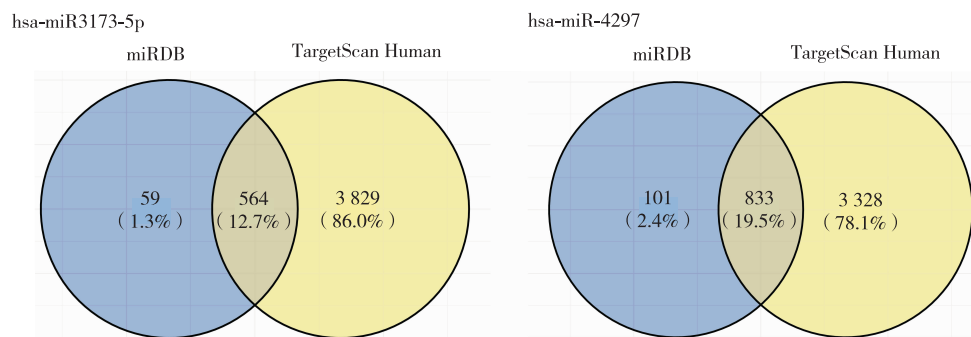


图3 hsa-miR3173-5p 和 hsa-miR-4297 的靶基因预测

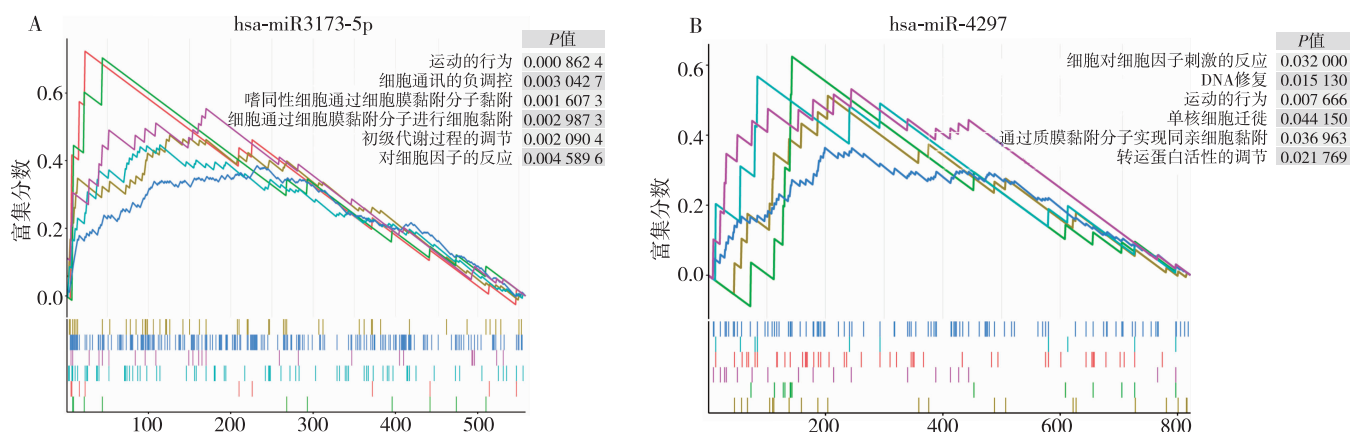


图4 hsa-miR3173-5p 和 hsa-miR-4297 的靶基因富集分析

因的富集分析提示,hsa-miR3173-5p 的靶基因主要富集在“嗜同性细胞通过细胞膜黏附分子黏附、运动的行为、细胞通过细胞膜黏附分子进行细胞黏附、对细胞因子的反应”等细胞黏附和细胞因子相关通路(图 4A)。而 hsa-miR-4297 的靶基因主要富集在“通过质膜黏附分子实现同亲细胞黏附、运动的行为、单核细胞迁徙、细胞对细胞因子刺激的反应”等细胞黏附、细胞迁移和细胞因子相关通路(图 4B)。

## 3 讨论

由心脏和主动脉弓的栓子引起的脑栓塞称为 CE 型脑卒中,相较于其他类型,CE 型脑卒中病因复杂、病情严重<sup>[8-10]</sup>,且发病率在急性 IS 患者中不断升高<sup>[11]</sup>。对其确诊分型主要依赖于病史及心电图、心脏超声、磁共振成像、脑血管造影等辅助检查寻找病因学证据<sup>[11]</sup>,但在实际工作中,部分检查需提前预约,且存在费用偏高的情况,完成度不尽人意,导致了患者早期 TOAST 分型准确度较差<sup>[11-12]</sup>。国内外研究者尝试寻找 CE 型脑卒中的预测指标,其中脑钠肽和 N 末端脑钠肽前体被证实有一定预测价值<sup>[13]</sup>,但其主要适用于心力衰竭患者的评估,对 CE 型脑卒中诊断特异性低。寻找合适的 CE 型脑卒中诊断标志物,有利于更高效、准确地筛选出 CE 型脑卒中患者,从而实现制定系统化、个体化的诊疗策略和选择最佳的二级预防措施<sup>[11]</sup>。

miRNA 具备调控作用,有着稳定性好、容易检测的优点,是良好的疾病诊断标志物<sup>[14]</sup>。已有相关研究<sup>[15-16]</sup>证实,miRNA 在大脑不同种类细胞中具有很高的表达水平,可作为生物标志物来区分脑卒中亚型。有研究<sup>[17-18]</sup>发现,在出血性脑卒中患者血浆中,miR-124-3p 水平高于 IS 患者,而 miR-16 水平低于 IS 患者;Li 等<sup>[19]</sup>发现 115 个 miRNA 在 IS 中差异表达;Modak 等<sup>[20]</sup>发现,与健康对照组相比,在 CE 型脑卒中患者中观察到 14 个 miRNA 的显著差异表达。因此,本研究选择 miRNA 作为研究对象来预测 CE 型脑卒中。目前,微阵列和转录组测序技术(RNA-seq)已被广泛用于测量转录物、发现异常表达基因和识别新的生物标志物,并采用生物信息学方法处理这些数据。GEO 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)为全球研究者提供了微阵列和 RNA-seq 数据。本研究前期利用 GEO 数据库,通过生物信息学方法对已发表脑栓塞相关的 miRNA 和 mRNA 高通量数据进行整合分析并进一步全面检索中英文文献,发现 7 个 miRNA 有相关文献报道(hsa-let-7b-5p、hsa-miR-3148、hsa-miR-185-5p、hsa-miR-32-3p、hsa-miR-133b、hsa-miR-940 和 hsa-miR-1237-3p),涉及肿瘤、神经系统疾病、呼吸系统疾病等多种疾病,但是 hsa-miR3173-5p 和 hsa-miR-4297 两个 miRNA 截至目前(2022.02.03)没有任何文献报道。本研究基于 miRNA eQTL 数据的孟德尔随机化分析提示遗传预测的循环血液中 hsa-miR3173-5p 和 hsa-miR-4297 表达增高分别使 CE 型脑卒中的发病风险增加 46% 和 70%,共定位分析提示循环血液中 hsa-miR3173-5p 和 hsa-miR-4297 的表达与 CE 型脑卒中存在共享遗传变异的概率分别为 95% 和 86%。因此推测它们可能与 CE 型脑卒中有关,而在 miRNA-mRNA 调控网络中的靶基因富集分析提示,其很有可能通过“嗜同性细胞通过细胞膜黏附分子黏附、运动的行为、细胞通过细胞膜黏附分子进行细胞黏附、对细胞因子的反应”等细胞黏附和细胞因子相关通路导致 CE 型脑卒中。

本研究中,CE 型脑卒中患者外周血 hsa-miR3173-5p 和 hsa-miR-4297 表达水平明显高于对照组,将对照组进行亚组分析,发现 hsa-miR3173-5p 和 hsa-miR-4297 表达水平在 LAA 组、SAO 组和 SUE 组中无明显差异,因此考虑 hsa-miR3173-5p 和 hsa-miR-4297 可能在 CE 型脑卒中特异性表达。纳入患者的各临床指标,单因素分析显示冠心病、房颤、NIHSS 评分、hsa-miR3173-5p 和 hsa-miR-4297 是 CE 型脑卒中的危险因素,进一步行多因素逻辑回归分析,房颤、hsa-miR3173-5p 和 hsa-miR-4297 仍与 CE 型脑卒中显著相

关。分别将 hsa-miR3173-5p 和 hsa-miR-4297 进行 ROC 曲线分析,结果显示 hsa-miR3173-5p 的 AUC 为 0.705,具有一定的准确度,而 hsa-miR-4297 的 AUC 为 0.624( $P > 0.05$ ),单独作为诊断标志物的效能较差。房颤是 CE 型脑卒中的独立危险因素<sup>[7]</sup>,并且由于血液中 miRNA 具有相关性,不同 miRNA 进行疾病预测具有联合作用<sup>[21]</sup>,因此将房颤、hsa-miR3173-5p 和 hsa-miR-4297 进行联合分析,发现其具有较好的准确度(AUC 为 0.842),且差异有统计学意义。因此,本研究推测 hsa-miR3173-5p 和 hsa-miR-4297 的表达水平升高可能与 CE 型脑卒中发病风险增加有关,后续期待纳入更多的样本量来评估预测价值。

研究发现,在患胶质瘤的女性患者中,miR-4297 与平均血小板体积呈正相关<sup>[22]</sup>,血小板与血管炎症反应、血栓形成、动脉硬化密切相关<sup>[23]</sup>。本研究中 hsa-miR-4297 表达水平与血小板数量呈正相关,考虑 hsa-miR-4297 可能在血小板的合成代谢过程中起了一定作用。进一步对 hsa-miR3173-5p 和 hsa-miR-4297 的靶基因进行蛋白质相互作用网络分析提示,hsa-miR3173-5p 靶基因的 hub 基因主要是 STAT3、HTT、AP2B1,而 hsa-miR-4297 靶基因的 hub 基因主要是 PRKACB、MED1、AKT2、CAMK2A、PTEN 等。本研究是国内外首个关于特异性血清 miRNA 作为 CE 型脑卒中诊断标志物的研究,相关 miRNA 及其具体调控方式还缺乏报告,其靶基因与 CE 型脑卒中的具体机制尚需更深入的探索。

综上所述,hsa-miR3173-5p 和 hsa-miR-4297 与 CE 型脑卒中密切相关,联合分析时具有较好的预测性,有望成为 CE 型脑卒中的诊断标志物。对其具体靶基因调节机制、不同时间点的表达水平变化、早期干预是否有利于患者预后等问题,有待进一步研究。

## 参考文献

- [1] GBD 2016 DALYs and HALE Collaborators. Global, regional, and national disability-adjusted life-years (DALYs) for 333 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE) for 195 countries and territories, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016 [J]. *Lancet*, 2017, 390(10100):1260-1344.
- [2] Wu S, Wu B, Liu M, et al. Stroke in China: advances and challenges in epidemiology, prevention, and management [J]. *Lancet Neurol*, 2019, 18(4): 394-405.
- [3] Wolf ME, Sauer T, Alonso A, et al. Comparison of the new ASCO classification with the TOAST classification in a population with acute ischemic stroke [J]. *J Neurol*, 2012, 259(7):1284-1289.
- [4] O'Carroll CB, Barrett KM. Cardioembolic stroke [J]. *Continuum (Minneapolis)*, 2017, 23(1, Cerebrovascular Disease):111-132.
- [5] Yu L, Zheng Y, Ju B, et al. Research progress of miRNA-disease association prediction and comparison of related algorithms [J]. *Brief Bioinform*, 2022, 23(3):bbac066.

(下转封三)

## CTRP2 与主动脉夹层发生的相关性研究

李旭 王志维

(武汉大学人民医院心血管外科, 湖北 武汉 430000)

**【摘要】目的** 检测 C1q 肿瘤坏死因子相关蛋白 2 (CTRP2) 在患者主动脉、小鼠主动脉以及小鼠主动脉血管平滑肌细胞中的表达水平, 分析其与主动脉夹层 (AD) 发病之间的相关性。**方法** 利用 GEO 数据库分析 CTRP2 在 AD 患者和非 AD 患者中的表达差异。选择 2021 年 6 月—2022 年 12 月在武汉大学人民医院的 6 例确诊为急性 Stanford A 型 AD 患者的主动脉标本作为夹层组, 6 例心脏移植患者的主动脉作为对照组, 通过 Western blot 法检测夹层组与对照组的 CTRP2 表达差异。将 24 只 C57BL/6 雄性 3 周龄野生型小鼠随机分为对照组和夹层组, 夹层组用含有 0.25%  $\beta$ -氨基丙腈的饲料喂养 4 周, 取主动脉组织用石蜡包埋, 标本切片后用免疫组织化学法检测 CTRP2 表达差异。细胞实验分为对照组和夹层组, 分别用磷酸盐缓冲溶液和不同浓度的血管紧张素 II 处理小鼠主动脉血管平滑肌细胞后提取细胞, 用 Western blot 法检测 CTRP2 表达水平。**结果** 免疫组织化学和 Western blot 法检测结果显示 CTRP2 在夹层组的患者主动脉、小鼠主动脉以及小鼠主动脉血管平滑肌细胞中的表达均显著升高。**结论** CTRP2 蛋白表达水平在对照组和夹层组中的表达存在差异, 与 AD 的发生具有相关性, 有望成为治疗 AD 的新靶点。

**【关键词】** 主动脉夹层; C1q 肿瘤坏死因子相关蛋白 2; 治疗靶点

**【DOI】** 10.16806/j.cnki.issn.1004-3934.2024.05.020

## The Correlation Between CTRP2 and Occurrence of Aortic Dissection

LI Xu, WANG Zhiwei

(Department of Cardiovascular Surgery, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430000, Hubei, China)

**【Abstract】Objective** To detect the expression level of C1q tumor necrosis factor-related protein 2 (CTRP2) in the aorta of patients, aorta of mouse and mouse aortic vascular smooth muscle cells, and to analyze its correlation with the pathogenesis of aortic dissection (AD). **Methods** The GEO database analyzed the difference in expression of CTRP2 in patients with and without AD. The aortic specimens of patients diagnosed with acute Stanford type A AD in Renmin Hospital of Wuhan University from June 2021 to December 2022 were selected as the dissection group ( $n=6$ ), and the aorta of heart transplant patients was used as the control group ( $n=6$ ), and the difference in CTRP2 expression between the dissection group and the control group was detected by Western blot method. Twenty-four C57BL/6 male 3-week-old wild-type mice were randomly classified into control group and dissection group, and the dissection group was fed with feed containing 0.25%  $\beta$ -aminopropionitrile for 4 weeks. The aorta tissue was embedded with paraffin, and the specimens were sectioned and detected the difference in CTRP2 expression by immunohistochemistry. The cells were divided into control group and dissection group, and mouse aortic vascular smooth muscle cells were extracted after treating with PBS and different concentrations of angiotensin II. The expression level of CTRP2 was detected by Western blot method. **Results** The results of immunohistochemistry and Western blot showed that the expression of CTRP2 in the aorta of patients, aorta of mouse and mouse aortic vascular smooth muscle cells in the dissected group were significantly increased. **Conclusion** There are differences in the expression level of CTRP2 protein in the control group and the dissection group, which is correlated with the occurrence of AD, and is expected to become a new therapeutic target for AD.

**【Keywords】** Aortic dissection; C1q tumor necrosis factor-related protein 2; Therapeutic target

主动脉夹层 (aortic dissection, AD) 是指血液通过主动脉内膜的裂口进入主动脉壁, 并沿着主动脉长轴方向向下延伸, 使主动脉内膜与中膜分离形成夹层, 是一种致死率极高的心血管疾病。据统计, 急性 AD 的发病率占急性主动脉综合征的 80% ~ 90%, 为

2.65 ~ 3.50/10万人年<sup>[1]</sup>。主动脉壁由动态变化的细胞群和细胞外基质构成, 以适应人体血流动力学变化, 当主动脉壁发生应激和损伤时, 会导致平滑肌细胞迁移和减少, 细胞外基质降解, 炎症发生, 构成 AD 发生的病理基础<sup>[2]</sup>。截至目前, 手术治疗仍是 AD 患



者唯一的治疗方式,尚无有效的药物治疗,因此寻找具有针对性的治疗靶点更为急迫。

通过利用 GEO (Gene Expression Omnibus) 数据库对 AD 患者主动脉数据集 GSE57691 分析发现, C1q 肿瘤坏死因子相关蛋白 (C1q tumor necrosis factor-related protein, CTRP) 2 在 AD 患者主动脉中的表达显著高于正常主动脉。CTRP 是一类由脂肪组织分泌的激素,在结构上与脂联素极为相似。CTRP 参与糖类、脂类代谢和血管扩张等生理病理过程<sup>[3]</sup>, 与心血管疾病和代谢性疾病, 如糖尿病的发生发展密切相关<sup>[4-5]</sup>。有研究<sup>[6]</sup>显示, CTRP2 在冠状动脉疾病患者中的表达明显高于健康人, 并且与疾病严重程度呈正相关, 表明其可能是心血管疾病发生的危险因素。尚未有研究涉及 CTRP2 与 AD 之间的联系, 本研究主要通过检测 CTRP2 在夹层组与对照组之间的表达差异, 探讨 CTRP2 与 AD 发生之间的相关性, 为 AD 的治疗寻找新的靶点。

## 1 材料与方法

### 1.1 CTRP2 在 AD 患者主动脉中的表达分析

通过 GEO 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) 提取与 AD 相关的数据集 GSE57691, 通过 GEO2R 功能分析 CTRP2 在 49 例 AD 患者和 10 例非 AD 患者中的表达差异。

### 1.2 人体组织样本

随机选取 2021 年 6 月—2022 年 12 月在武汉大学人民医院的 6 例确诊为急性 Stanford A 型 AD 患者的主动脉标本作为夹层组, 6 例心脏移植患者的主动脉标本作为对照组。纳入标准: 经 CT 血管造影检查确诊为 AD, 且夹层的撕裂口位于升主动脉。排除标准: (1) 合并冠心病等其他血管疾病; (2) 合并肝肾等重要脏器疾病。本方案经武汉大学人民医院临床研究伦理委员会批准 (审批号: 20201107)。本试验中所涉及的临床标本获得了所有患者和捐赠者的同意, 并签署知情同意书。

### 1.3 实验试剂

CTRP2 抗体 (Santa Cruz, 美国)、 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白 ( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA) 抗体 (塞维尔, 中国)、 $\beta$ -actin 抗体 (塞维尔, 中国)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体 (三鹰, 中国)、抗兔二抗 (Cell Signaling Technology, 美国) 和抗鼠二抗 (Cell Signaling Technology, 美国)。

### 1.4 动物模型

24 只 3 周龄野生型 C57BL/6 雄性小鼠均由武汉大学动物实验中心提供, 饲养期间室温控制在 20 ~

25 °C, 期间小鼠均可自由进食饮水。将小鼠采用数字表法随机分入夹层组 ( $n = 12$ ) 和对照组 ( $n = 12$ )。夹层组小鼠用含有 0.25%  $\beta$ -氨基丙腈的饲料喂养, 对照组用正常的维持饲料喂养。期间观察小鼠的生存情况, 对于死亡的小鼠立即进行解剖, 将发生夹层的局部主动脉组织用 4% 多聚甲醛固定过夜, 石蜡包埋后进行切片。造模时间达到 4 周后, 将所有存活小鼠统一取材。动物实验通过了武汉大学人民医院实验动物福利伦理审查 (审批号: 20201107)。

### 1.5 细胞模型

将小鼠主动脉血管平滑肌细胞 (mouse aortic vascular smooth muscle cells, MOVAS) 放置在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基进行培养。显微镜下观察到细胞密度为 70% 时, 用不含血清的培养基饥饿处理细胞 12 h 后, 将细胞分为 4 组进行处理: 磷酸盐缓冲溶液 (phosphate buffered saline, PBS), 血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) ( $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), Ang II ( $2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 和 Ang II ( $4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )。处理 36 h 后收集细胞提取蛋白。

### 1.6 Western blot 检测

将组织或细胞用 PBS 洗涤后, 加入用蛋白酶抑制剂和放射免疫沉淀法裂解缓冲液按 1 : 100 配好的裂解液, 在冰上裂解, 液氮研磨仪研磨组织。在 4 °C 和 12 000 r/min 的条件下离心 20 min。将收集的上清液用二喹啉甲酸法测定蛋白浓度, 剩余蛋白加入适量 Loading Buffer ( $5 \times$ ) 加样缓冲液。将蛋白用 10% 的十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳进行电泳, 然后转印到聚偏二氟乙烯膜上, 用 5% 的脱脂牛奶封闭 2 h。加入一抗 (CTRP2, 1 : 200) 并在 4 °C 孵育过夜。次日, 磷酸盐吐温缓冲液洗涤 3 次后加入相对应的抗兔 IgG 或抗鼠 IgG, 室温下孵育 1 h。磷酸盐吐温缓冲液洗涤 3 次后用化学发光仪 (Bio-Rad, 美国) 对膜进行显影, 检测 CTRP2 蛋白表达信号, 并用 Image J 软件对检测结果进行半定量分析。

### 1.7 免疫荧光检测

将切片在 65 °C 的烘箱中烘烤 2 h 后, 在二甲苯、无水乙醇、95% 酒精、85% 酒精、75% 酒精和 50% 酒精中水化以溶解剩余石蜡, 磷酸盐吐温缓冲液洗涤后用 0.2% Triton 溶液破膜 15 min, 然后在枸橼酸缓冲溶液中进行微波煮沸进行修复。自然冷却 2 h 后, 滴加山羊血清封闭 30 min, 滴加一抗 [CTRP2, 1 : 50;  $\alpha$ -SMA, 1 : 200], 4 °C 孵育过夜。室温下复温 1 h, 磷酸盐吐温缓冲液洗涤 3 次后滴加二抗孵育 1 h, 磷酸盐吐温缓冲液洗涤 3 次。4', 6-二脒基-2-苯基吲哚染核 5 min, 滴加抗荧光淬灭封片剂后封片, 于荧光显微镜下观察。



### 1.8 实时荧光定量聚合酶链反应

采用 TRIzol 法提取各组细胞的信使 RNA (messenger RNA, mRNA), 并用逆转录试剂盒将提取的 mRNA 逆转录为互补脱氧核糖核酸, 实时荧光定量聚合酶链反应 (real-time fluorescent quantitative PCR, qRT-PCR) 检测 CTRP2 mRNA 的表达水平。CTRP2 的上游引物为 5'-GACAGGCAACCGTGGAAAAC-3', 下游引物为 5'-AGGGTCGTAGAAGAGGCCAT-3'。α-SMA 的上游引物为 5'-GGACGTACAACCTGGTATTGTGC-3', 下游引物为 5'-TCGGCAGTAGTCACTAAGGA-3'。GAPDH 的上游引物为 5'-AGGTCGGTGTGAACGGATTTC-3', 下游引物为 5'-GGGGTCGTTGATGGCAACA-3'。

### 1.9 统计学方法

采用 Graphpad 软件进行统计学分析, 至少取 3 次独立实验结果。两组间比较采用独立样本 *t* 检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 CTRP2 在人体主动脉组织中的生物信息学表达结果

通过对 GEO 数据库相关数据集中 49 例 AD 患者

和 10 例非 AD 患者的分析, 结果显示 CTRP2 在 AD 患者的主动脉中表达较非 AD 患者的主动脉中表达显著增高, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 见图 1。

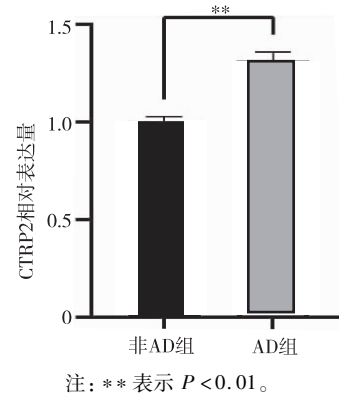
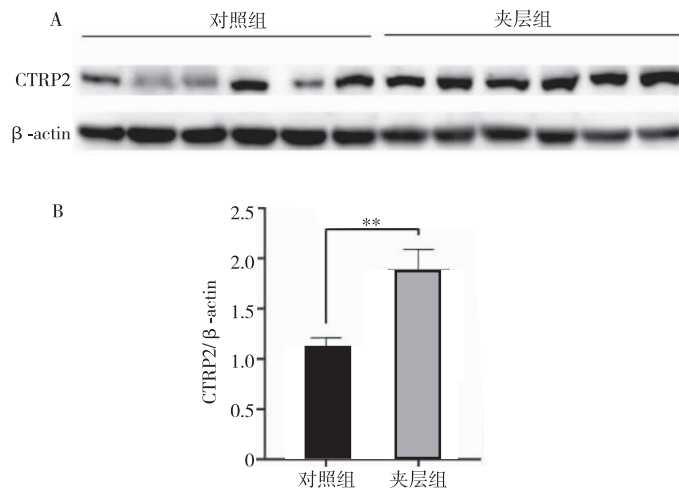


图1 数据集 GSE57691 中 CTRP2 在人体主动脉中的表达

### 2.2 CTRP2 在人体主动脉组织中的表达

通过 Western blot 法检测 CTRP2 在人体主动脉的表达水平, 结果显示 CTRP2 在夹层组的表达显著高于对照组, 通过 Image J 软件对结果进行半定量分析, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 见图 2。



注: A 图为 Western blot 法检测结果, B 图为 CTRP2 与 β-actin 比值; \*\* 表示  $P < 0.01$ 。

图2 Western blot 法检测人体主动脉 CTRP2 的表达

### 2.3 CTRP2 在小鼠主动脉组织中的表达

通过免疫荧光染色反映 CTRP2 在小鼠主动脉的表达, 结果显示夹层组的小鼠主动脉中 α-SMA 荧光强度较对照组减弱 ( $P < 0.05$ ), 表明夹层组 MOVAS 发生了从收缩型向合成型的转化。与此同时, 夹层组 CTRP2 的荧光强度较对照组明显增强, 表明 CTRP2 在夹层组小鼠主动脉中表达较对照组明显增高, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 见图 3。

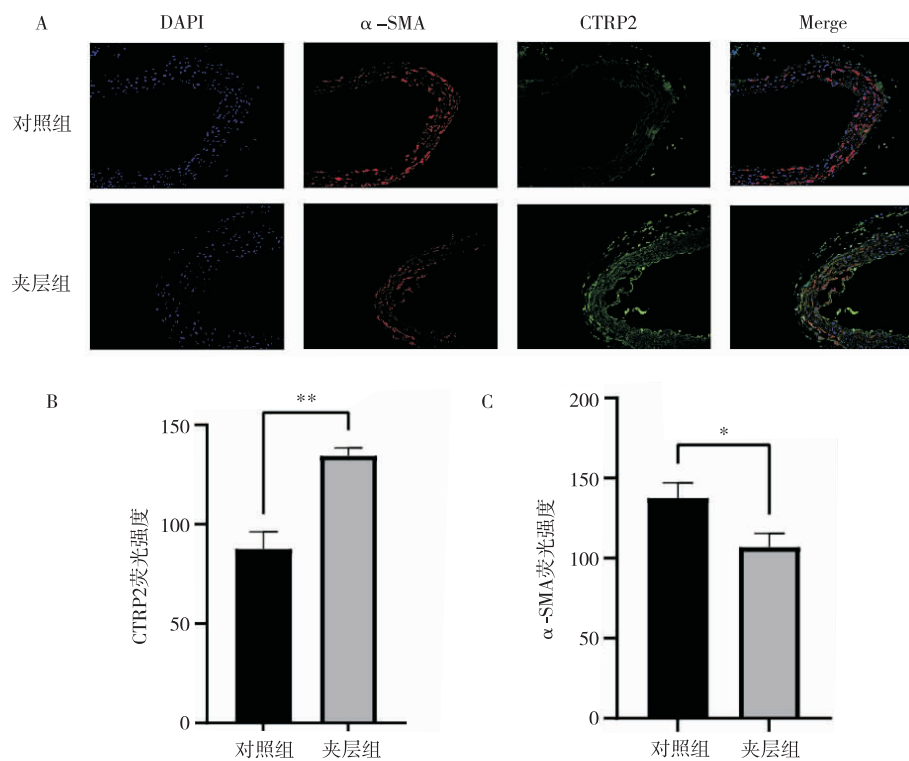
### 2.4 CTRP2 在 MOVAS 中的表达

Western blot 法检测不同浓度 Ang II 处理下的

CTRP2 表达情况, 结果显示实验组的 CTRP2 表达量均较对照组明显增高, 并且随 Ang II 浓度升高而增高, 见图 4。

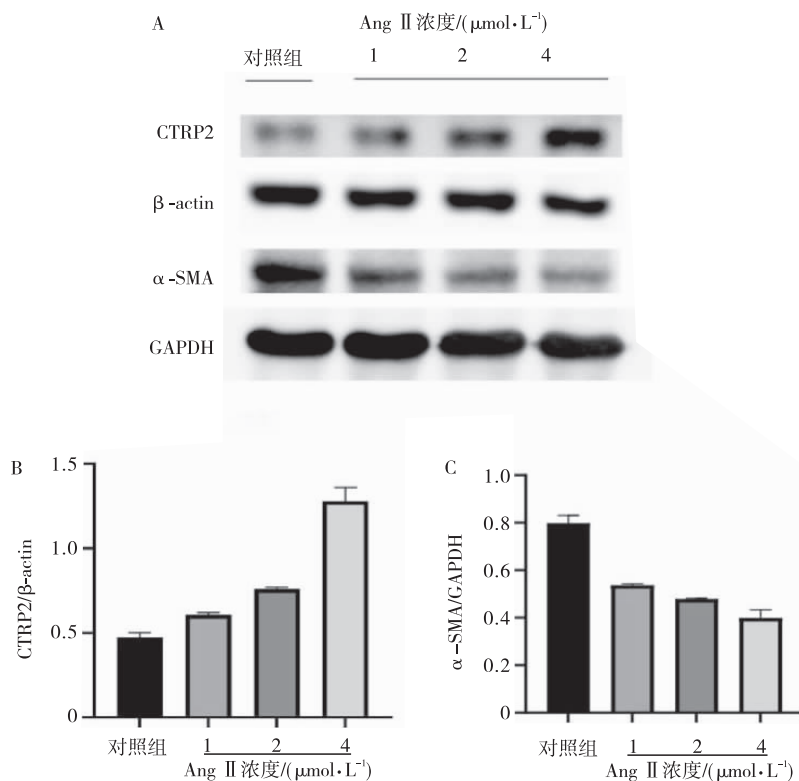
### 2.5 CTRP2 mRNA 在 MOVAS 中的表达

qRT-PCR 法检测 CTRP2 在 MOVAS 中 mRNA 的表达水平, 结果显示与对照组相比, 实验组的 CTRP2 mRNA 表达水平增高 ( $P < 0.01$ ), 并随着 Ang II 浓度升高而增高。同时 α-SMA 在 MOVAS 中 mRNA 的表达水平随着 Ang II 浓度升高而逐渐降低, 表明 Ang II 可诱导 MOVAS 从收缩型向合成型转变, 见图 5。



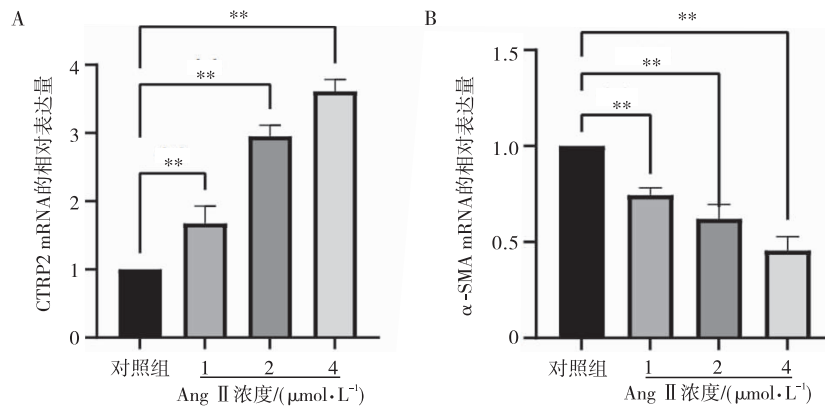
注:A 图为免疫组织化学检测小鼠主动脉 CTRP2 表达,B 图为 CTRP2 的荧光强度,C 图为  $\alpha$ -SMA 的荧光强度;\* 表示  $P < 0.05$ , \*\* 表示  $P < 0.01$ , DAPI 表示 4',6-二脒基-2-苯基吡啶, Merge 表示图片合并。

图 3 小鼠主动脉组织免疫组织化学染色



注:A 图为不同处理组细胞蛋白 Western blot 法检测结果,B 图为 CTRP2 与  $\beta$ -actin 比值,C 图为  $\alpha$ -SMA 与 GAPDH 比值。

图 4 Western blot 法检测细胞模型中 CTRP2 的表达



注: \*\* 表示  $P < 0.01$ 。

图5 qRT-PCR 法检测细胞模型中 CTRP2 mRNA 的表达

### 3 讨论

AD 作为病死率极高的急性心血管疾病,其病因及发病机制至今仍未明确。平滑肌细胞是主动脉中层的重要组成部分,当其发生表型转化、凋亡、迁移等,会导致主动脉中层退变,引发 AD 的发生。本文通过生物信息学的方法发现 CTRP2 在夹层患者主动脉中的表达明显升高,继而通过人体主动脉标本、动物模型以及细胞模型进行验证,进一步证实 CTRP2 在夹层组的表达明显高于对照组。因此推断,CTRP2 与 AD 的发生发展存在紧密的联系。

CTRP 在人体不同器官内的分布具有特异性,如在心肌组织中 CTRP9 表达含量较多<sup>[7]</sup>,在骨骼肌中 CTRP15 分布最多<sup>[8]</sup>。截至目前,CTRP 家族已陆续发现 15 个成员,结构上均具有 4 个共同结构域,并且其中一个与脂联素同源<sup>[9]</sup>。而脂联素主要通过增强肌肉和肝脏的胰岛素敏感性来控制全身能量代谢<sup>[10-11]</sup>,这让最初针对 CTRP 的研究主要集中在代谢异常相关疾病,如 CTRP2 参与脂肪组织的分解和肝脏脂质的代谢<sup>[12]</sup>,CTRP3 在腺苷酸活化蛋白激酶信号通路下,可通过改善内皮细胞功能来改善糖尿病微血管病变<sup>[13]</sup>。但越来越多的研究显示 CTRP 家族与心血管疾病存在关联,Lu 等<sup>[14]</sup>在冠状动脉疾病患者的血清、动脉内膜切除标本、主动脉粥样硬化斑块中的检测结果显示,与对照组相比,冠状动脉疾病患者的样本中 CTRP1 的表达量显著增高,并与疾病严重程度正相关。将小鼠 CTRP1 基因敲除后,小鼠的主动脉粥样硬化作用明显降低。

但目前 CTRP2 的具体生物学功能尚不明确,并且尚未有研究探讨 CTRP2 与 AD 发病之间是否存在联系。试验数据表明人的体重指数与 CTRP2 的蛋白表达量呈正相关,肥胖人群的 CTRP2 表达会上调。当敲除 CTRP2 后,小鼠脂肪组织中主要的脂溶酶在 mRNA 和蛋白水平上的表达增强,同时增强蛋白激酶 A 底物

的磷酸化,促进甘油三酯等脂肪组织的分解<sup>[12]</sup>。这些结果表明 CTRP2 表达量增多会导致脂质代谢紊乱。而脂质代谢紊乱在 AD 中起着重要作用。研究<sup>[15]</sup>表明,氧化型低密度脂蛋白会诱导血管平滑肌细胞形成泡沫细胞样表型,继而通过激活核因子  $\kappa\text{B}$  通路诱导细胞发生炎症反应,并通过活性氧和蛋白水解酶对血管壁造成损伤。所以研究推测 CTRP2 可能通过调控脂质代谢的方式对血管平滑肌造成损伤,进而导致 AD 的发生。Li 等<sup>[16]</sup>在实验中发现,CTRP2 可诱导心肌细胞腺苷酸活化蛋白激酶和丝氨酸/苏氨酸激酶磷酸化,增强心肌细胞对葡萄糖的摄取。因此,CTRP2 在 AD 患者中的高表达可能与主动脉平滑肌细胞的葡萄糖摄取和能量代谢异常有关。

综上所述,本研究表明了 CTRP2 与 AD 的相关性,但其在 AD 发生发展中所发挥的作用尚不清楚,具体机制有待进一步研究。AD 作为死亡率极高的心血管疾病,亟需新的早期诊断方法和治疗手段,本研究旨在为 AD 提供新的研究方向和治疗靶点。

### 参考文献

- [1] Bossone E, Eagle KA. Epidemiology and management of aortic disease: aortic aneurysms and acute aortic syndromes [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2021, 18 (5): 331-348.
- [2] Shen YH, Lemaire SA, Webb NR, et al. Aortic aneurysms and dissections series [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2020, 40 (3): e37-e46.
- [3] Peterson JM, Seldin MM, Tan SY, et al. CTRP2 overexpression improves insulin and lipid tolerance in diet-induced obese mice [J]. *PLoS One*, 2014, 9 (2): e88535.
- [4] Bai B, Ban B, Liu Z, et al. Circulating C1q complement/TNF-related protein (CTRP) 1, CTRP9, CTRP12 and CTRP13 concentrations in type 2 diabetes mellitus; in vivo regulation by glucose [J]. *PLoS One*, 2017, 12 (2): e0172271.
- [5] Si Y, Fan W, Sun L. A review of the relationship between CTRP family and coronary artery disease [J]. *Curr Atheroscler Rep*, 2020, 22 (6): 22.
- [6] Ilbeigi D, Khoshfetrat M, Afrisham R, et al. Serum C1q/TNF-related protein-2 (CTRP2) levels are associated with coronary artery disease [J]. *Arch Med Res*, 2020, 51 (2): 167-172.

- [7] Appari M, Breitbart A, Brandes F, et al. C1q-TNF-related protein-9 promotes cardiac hypertrophy and failure[J]. *Circ Res*, 2017, 120(1):66-77.
- [8] Seldin MM, Wong GW. Regulation of tissue crosstalk by skeletal muscle-derived myonectin and other myokines[J]. *Adipocyte*, 2012, 1(4):200-202.
- [9] Schäffler A, Buechler C. CTRP family: linking immunity to metabolism[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2012, 23(4):194-204.
- [10] Fang H, Judd L. Adiponectin regulation and function[J]. *Compr Physiol*, 2018, 8(3):1031-1063.
- [11] Khoramipour K, Chamari K, Hekmatikar AA, et al. Adiponectin: structure, physiological functions, role in diseases, and effects of nutrition[J]. *Nutrients*, 2021, 13(4):1180.
- [12] Lei X, Wong GW. C1q/TNF-related protein 2 (CTRP2) deletion promotes adipose tissue lipolysis and hepatic triglyceride secretion[J]. *J Biol Chem*, 2019, 294(43):15638-15649.
- [13] Yan Z, Cao X, Wang C, et al. C1q/tumor necrosis factor-related protein-3 improves microvascular endothelial function in diabetes through the AMPK/eNOS/NO<sup>-</sup> signaling pathway[J]. *Biochem Pharmacol*, 2022, 195:114745.
- [14] Lu L, Zhang RY, Wang XQ, et al. C1q/TNF-related protein-1: an adipokine marking and promoting atherosclerosis[J]. *Eur Heart J*, 2016, 37(22):1762-1771.
- [15] Chen Z, Xue Q, Cao L, et al. Toll-like receptor 4 mediated oxidized low-density lipoprotein-induced foam cell formation in vascular smooth muscle cells via Src and Sirt1/3 pathway[J]. *Mediators Inflamm*, 2021, 2021:6639252.
- [16] Li L, Aslam M, Siegler BH, et al. Comparative analysis of CTRP-mediated effects on cardiomyocyte glucose metabolism: cross talk between AMPK and Akt signaling pathway[J]. *Cells*, 2021, 10(4):905.

收稿日期:2023-06-19

(上接第 475 页)

- [6] Kwah LK, Diong J. National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS) [J]. *J Physiother*, 2014, 60(1):61.
- [7] 中华医学会老年医学分会老年神经病学组, 心源性卒中诊断中国专家共识撰写组. 心源性卒中诊断中国专家共识 (2020) [J]. *中华老年医学杂志*, 2020, 39(12):1369-1378.
- [8] 中华医学会神经病学分会, 中华医学会神经病学分会脑血管病学组. 中国急性缺血性脑卒中诊治指南 2018 [J]. *中华神经科杂志*, 2018, 51(9):666-682.
- [9] Bjerkreim AT, Khanevski AN, Thomassen L, et al. Five-year readmission and mortality differ by ischemic stroke subtype[J]. *J Neurol Sci*, 2019, 403:31-37.
- [10] Kelley RE, Kelley BP. Heart-brain relationship in stroke[J]. *Biomedicines*, 2021, 9(12):1835.
- [11] Fan ZX, Liu RX, Liu GZ. Development and refinement of diagnostic and therapeutic strategies for managing patients with cardiogenic stroke: an arduous journey[J]. *World J Clin Cases*, 2023, 11(4):719-724.
- [12] Bogiatzi C, Hackam DG, McLeod AI, et al. Secular trends in ischemic stroke subtypes and stroke risk factors[J]. *Stroke*, 2014, 45(11):3208-3213.
- [13] Wu Z, Zhao M, He M, et al. Validation of the use of B-type natriuretic peptide point-of-care test platform in preliminary recognition of cardioembolic stroke patients in the ED[J]. *Am J Emerg Med*, 2015, 33(4):521-526.
- [14] Zeng X, Zhang X, Zou Q. Integrative approaches for predicting microRNA function and prioritizing disease-related microRNA using biological interaction networks[J]. *Brief Bioinform*, 2016, 17(2):193-203.
- [15] Vidigal JA, Ventura A. The biological functions of miRNAs: lessons from in vivo studies[J]. *Trends Cell Biol*, 2015, 25(3):137-147.
- [16] Martins M, Rosa A, Guedes LC, et al. Convergence of miRNA expression profiling,  $\alpha$ -synuclein interactome and GWAS in Parkinson's disease[J]. *PLoS One*, 2011, 6(10):e25443.
- [17] Leung LY, Chan CP, Leung YK, et al. Comparison of miR-124-3p and miR-16 for early diagnosis of hemorrhagic and ischemic stroke[J]. *Clin Chim Acta*, 2014, 433:139-144.
- [18] Martinez B, Peplow PV. Blood microRNAs as potential diagnostic markers for hemorrhagic stroke[J]. *Neural Regen Res*, 2017, 12(1):13-18.
- [19] Li P, Teng F, Gao F, et al. Identification of circulating microRNAs as potential biomarkers for detecting acute ischemic stroke[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2015, 35(3):433-447.
- [20] Modak JM, Roy-O'Reilly M, Zhu L, et al. Differential microRNA expression in cardioembolic stroke[J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2019, 28(1):121-124.
- [21] Zampetaki A, Willeit P, Tilling L, et al. Prospective study on circulating microRNAs and risk of myocardial infarction[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2012, 60(4):290-299.
- [22] Xu W, Huang L, Xie B, et al. Serum microRNA-4297 is a sex-specific predictive biomarker of glioma grade and prognosis[J]. *Front Neurol*, 2022, 13:888221.
- [23] Poredos P. Interrelationship between venous and arterial thrombosis[J]. *Int Angiol*, 2017, 36(4):295-298.

收稿日期:2023-07-06