

阻塞性睡眠呼吸暂停伴认知障碍患者中血清miR-132表达及意义

王新立¹, 谷 丽², 赵丽梅¹, 李 聪¹, 刘桂阳¹, 张 博¹, 王洪杰¹, 李 涛¹

(1. 济南市第四人民医院神经外科, 山东 济南 250031; 2. 威海市市立医院耳鼻喉科, 山东 威海 264200)

摘 要:【目的】探讨 miR-132 在阻塞性睡眠呼吸暂停(OSA)伴认知障碍患者血清中的表达及其意义。【方法】根据蒙特利尔认知评估(MoCA)评分,将 66 名年龄在 30~60 岁之间的阻塞性睡眠呼吸暂停患者分为两组:认知障碍 OSA 组(OSAI 组, $n=36$)、无认知障碍 OSA 组(OSAN 组, $n=30$), 30 名无 OSA 的成年人作为对照组(HC 组, $n=30$)。对其 3 组分别进行睡眠测试(OCST)和 MoCA 评估,并通过 PCR 检测血清中 miR-132 的相对表达量。【结果】HC 组、OSAI 组及 OSAN 组在年龄、教育程度、性别和高血压方面差异无统计学意义($P>0.05$),与 OSAN 和 HC 组相比,OSAI 组患者血清中 miR-132 的相对表达水平明显上调($P<0.001$),并且与 MoCA 评分呈正相关($r=-0.726, P<0.001$);ROC 分析结果显示曲线下面积(AUC)具有统计学意义,具有认知功能障碍(AUC=0.935, 95%CI: 0.890-0.981, $P<0.001$)和 OSA(AUC=0.787, 95%CI: 0.695-0.879, $P<0.001$)。【结论】血清 miR-132 表达水平升高与 OSA 的诊断及其认知功能障碍密切相关。血清 miR-132 的检测有可能成为 OSA 患者认知功能障碍及诊断的一个潜在指标。

关键词: 阻塞性睡眠呼吸暂停; miR-132; 认知障碍; 蒙特利尔认知评估(MoCA)

中图分类号: R766 文献标志码: A 文章编号: 1672-3554(2019)01-0104-06

Expression and Significance of Serum Mir-132 in Patients with Obstructive Sleep Apnea with Cognitive Impairment

WANG Xin-li¹, GU Li², ZHAO Li-mei¹, LI Cong¹, LIU Gui-yang¹, ZHANG Bo¹, WANG Hong-jie¹,
LI Tao¹

(1. The No.4 Hospital Jinan Shandong, Jinan 250031, China; 2. Weihai Municipal Hospital, Weihai 264200, China)

Corresponding to: LI Tao, E-mail: litao961@163.com

Abstract:【Objective】To explore the relationship between the miR-132 expression in serum and cognitive deficits of OSA.【Methods】66 Chinese adults age 30 to 60 years old were enrolled and categorized into two groups based on Montreal Cognitive Assessment (MoCA) scores: OSA patients with cognitive impairment (OSAI, $n=36$), OSA patients without cognitive impairment (OSAN, $n=30$), and thirty adults without OSA as healthy control group (HC, $n=30$). Out-of-center cardiopulmonary sleep testing (OCST) and MoCA assessment were performed and the relative expression of miR-132 in serum was detected by PCR.【Results】No significant difference was observed in age, education, gender and hypertension ($P>0.05$). The relative expression level of miR-132 was significantly up-regulated in OSAI patient's serum compared to the OSAN and HC patients ($P<0.001$), and had a positive correlation with MoCA score ($r=-0.726, P<0.001$). ROC analyses showed that the areas under the curve (AUC) were statistically significant from the line of identity in OSA with cognitive impairment (AUC=0.935, 95%CI: 0.890-0.981, $P<0.001$) and in OSA (AUC=0.787, 95%CI: 0.695-0.879, $P<0.001$).【Conclusions】Elevated serum miR-132 expression levels are closely related to the diagnosis of

收稿日期: 2018-08-21

基金项目: 山东省医药卫生科技发展计划项目(2016WS0104)

作者简介: 王新立, 硕士, 研究方向: 缺血性脑血管病的介入治疗, E-mail: 991819771@qq.com; 李涛, 通信作者, 博士, 研究方向: 缺血性脑血管病的诊断与治疗, E-mail: litao961@163.com

OSA and its cognitive dysfunction. Detection of serum miR-132 may be a potential indicator of cognitive dysfunction and diagnosis in OSA patients.

Key words: obstructive sleep apnea; miR-132; cognitive impairment; montreal cognitive assessment (MoCA)

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2019, 40(1): 104-109]

阻塞性睡眠呼吸暂停 (obstructive sleep apnea, OSA) 是一种以间歇性低氧 (intermittent hypoxic, IH) 为特征的慢性睡眠障碍性疾病, 在成年男女中发病率分别为 4% 和 2%^[1]。由于睡眠片段化和 IH 可引起一系列病理生理变化, 如全身炎症、内皮功能障碍和氧化应激等^[2], OSA 患者通常存在不同程度的认知功能障碍^[3-4], 包括记忆、学习和注意力等。认知功能障碍可引起一系列灾难性后果, 例如社会和经济负担等, 某些 OSA 患者可能最终发展为阿尔茨海默病 (Alzheimer disease, AD)^[5]。目前对于 OSA 患者认知功能障碍的病因机制仍存在争议, 认知障碍通常会随着 OSA 严重程度而加重, 但这种趋势不是绝对的线性关系^[6]。文献报道^[7], OSA 伴有认知功能障碍的患者血清中可能存在相关的生物标志物, miRNA 在认知功能和 OSA 相关疾病中起着重要的作用。近年来, 已有报道表明 miR-132 与突触可塑性和认知功能损害有关, 血清 miR-132 的表达与脑卒中后认知功能之间存在显著相关性^[8]。尽管有大量关于 OSA 患者在认知功能障碍方面的研究, 目前尚无 OSA 患者认知障碍与 miR-132 相关性的报导。本研究通过对研究对象进行便携式睡眠呼吸监测 (portable sleep monitor, PM) 和蒙特利尔认知功能评分 (Montreal Cognitive Assessment, MoCA) 以及血清中 miR-132 表达情况进行了研究分析, 探讨 miR-132 在 OSA 患者中的表达意义。

1 材料与方法

1.1 研究对象

收集 2017 年 1 月至 2017 年 12 月于济南市第四人民医院门诊明确诊断的、未经过治疗的睡眠呼吸暂停患者 (66 例), 对所有患者进行认知功能评估。同时选取同期我院查体中心的健康体检者, 经以上检测显示不能诊断为睡眠呼吸暂停且无认知功能障碍的患者作为对照组。根据检查结

果分为: ① OSAI 组, 确诊 OSA 且 MoCA 评分 < 26 分; ② OSAN 组, 确诊 OSA 且 MoCA 评分 ≥ 26 分; ③ HC 组, 不符合 OSA 诊断标准且 MoCA 评分 ≥ 26 分。

所有患者的排除标准是: ① 头部外伤、中风、脑肿瘤和其他脑部疾病; ② 严重的心血管疾病、慢性阻塞性肺病、肝肾功能不全和兴奋剂的使用; ③ 严重焦虑和精神病患者; ④ 日常生活能力严重下降; ⑤ OSA 以外的睡眠障碍, 如失眠。所有研究对象均签署了本研究的知情同意书, 且该项目经济南市第四人民医院伦理委员会批准 (伦理号: LL-201600)。

1.2 资料的收集

收集所有患者的基线资料, 包括性别、年龄、既往史、教育水平、体质量 (kg)、身高 (m) 等。所有受试者年龄均为 30~60 岁, 各组间的年龄、性别和受教育程度相匹配。所有研究对象在空腹 12 h 以上采集肘静脉血 4 mL, EDTA 抗凝, 采血后 3 h 分离出血清做样本。

1.3 OSA 诊断标准

根据第三版国际睡眠障碍分类 (ICSD-3)^[9] 的最新诊断标准, 本研究采用的是单独满足 C 条件: 当使用 PSG 或 OCST 时, 平均值为睡眠期间每小时发生 15 次或更多次重大阻塞性呼吸事件, 具体包括阻塞性和混合性呼吸暂停, 低通气或呼吸努力相关性觉醒, 即可诊断为 OSA。

1.4 睡眠监测

采用凯迪泰多导睡眠诊断分析系统 (型号: SW-SM2000 CB, 中国苏州) 进行睡眠监测, 所有监测均在家里完成, 总监测时间不少于 7 h, 次日由技术人员进行数据分析。监测前 48 h 内禁止饮用含酒精或含咖啡因的饮料和镇静药物。呼吸暂停低通气指数 (apnea hypopnea index, AHI) 计算为每小时睡眠时呼吸暂停次数与每小时睡眠低通气的次数的比值^[9]。

1.5 认知功能评估及标准

认知功能由取得资质的专业人员进行评估,

包括视空间与执行能力、命名、注意力、语言、抽象、延时回忆及定向力,总 MoCA 评分低于 26 表示认知障碍^[10]。在 OCST 后一天的早餐后 1 h 进行 MoCA 评分,以避免血糖波动对检查结果的影响。所有上述评估均在安静舒适的环境中进行。

1.6 miR-132 表达水平测定

用 miRNeasy 血清/血浆试剂盒从血清中提取总 RNA,严格按照其说明书操作。用 Nano Drop Lite 分光光度计检测 RNA 浓度。用 miScript II RT Kit(德国 Qiagen 公司)进行逆转录,反应体积为 20 μ L。用 miScript SYBR Green PCR Kit 检测目标 miRNA 的表达。在 ABI 7500 型 PCR 仪(美国 ABI 公司)上进行实时 PCR,条件为:95 $^{\circ}$ C, 15 min, 94 $^{\circ}$ C 15 s 40 个循环,55 $^{\circ}$ C, 30 s, 70 $^{\circ}$ C, 30 s。在 40 个循环结束时,用公式 $\lg 2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算 miR-132 的相对表达,选取 miR-16 作为内参。

1.7 统计分析

使用 SPSS 21.0 统计软件包(IBM)进行统计分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组间比较采用单因素方差,两两比较采用 LSD 检验。计数资料组间比较采用 χ^2 检验,Spearman 相关系数用于分析 miR-132 的相对表达水平与其他变量之间的关系。采用 ROC 曲线分析方法,评价 miR-132 对 OSA 患者认知功能障碍的诊断价值, $P <$

0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 一般临床资料比较

如表 1 所示,OSA 患者的 AHI 评分明显高于 HC 组($P < 0.001$)。在性别($P = 0.744$)、年龄($P = 0.718$)、文化程度($P = 0.154$)、BMI($P = 0.073$)、高脂血症($P = 0.438$)、高血压($P = 0.129$)等指标 3 组间无显著性差异($P > 0.05$)。

2.2 三组 MoCA 量表比较

OSAI 组与 OSAN 组和 HC 组的 MoCA 总分比较,差异有统计学意义($P < 0.001$),在视空间与执行力、命名能力、注意力、语言能力、抽象能力、记忆力、定向力 7 个认知域的得分低于后两组,差异均有统计学意义($P < 0.05$;表 2)。

2.3 认知功能与 miR-132 表达水平的相关性

OSAI 患者血清 miR-132 的相对表达水平明显上调($P < 0.001$;图 1),Spearman 相关分析结果显示 miR-132 的相对表达与 MoCA 评分呈正相关($r = -0.726, P < 0.001$;图 2)。

2.4 miR-132 对 OSA 和 OSA 认知功能障碍的筛查

通过 ROC 曲线分析血清 miR-132 相对表达量

表 1 三组一般资料比较

Group	HC (n=30)	OSAN (n=30)	OSAI (n=36)	[n(%) or $\bar{X} \pm S$]	
				F/ χ^2	P
Male(%)	21(70%)	23(76.7%)	28(77.8%)	0.593	0.744
Age/years	42.5 \pm 7.1	43.2 \pm 6.6	41.8 \pm 7.4	0.332	0.718
Education/years	8.4 \pm 2.9	10.0 \pm 3.8	9.6 \pm 3.0	1.906	0.154
BMI/(kg/m ²)	26.8 \pm 3.4	27.4 \pm 2.8	28.5 \pm 2.9	2.698	0.073
Hyperlipidemia	8(26.7%)	10(33.3%)	15(34.4%)	1.653	0.438
Hypertension	7(23.3%)	12(40%)	17(47.2%)	4.101	0.129
AHI/h	3.7 \pm 3.2	24.0 \pm 4.3 ¹⁾	46.7 \pm 13.6 ²⁾³⁾	16.49	<0.001
MoCA score	27.83 \pm 1.34	26.97 \pm 1.19	19.61 \pm 2.69 ²⁾³⁾	184.778	<0.001
miR-16 Ct value	25.49 \pm 1.07	25.21 \pm 1.01	25.19 \pm 0.82	0.944	0.392
miR-132 relative expression ⁵⁾	-0.93 \pm 0.12	-0.89 \pm 0.11 ⁴⁾	-0.65 \pm 0.13 ²⁾³⁾	51.143	<0.001

HC: Health Control; OSAN: Obstructive sleep apnea patients without cognitive impairment; OSAI: obstructive sleep apnea patients with cognitive impairment; BMI: Body mass index; AHI: Apnea hypopnea index; MoCA: Montreal cognitive assessment. LSD after ANOVA test, 1) $P < 0.001$ between OSAN and HC group; 2) $P < 0.001$ between OSAI and HC group; 3) $P < 0.001$ between OSAI and OSAN group; 4) $P = 0.025$ between OSAN and HC group; 5) The data were logarithm-transformed to normalize Ct values ($\lg 2^{-\Delta\Delta Ct}$). miR-16 was used as the internal control.

表 2 三组 MoCA 量表各认知域评分比较

Table 2 Comparison of scores in each cognitive domain of MoCA among the three groups ($\bar{x} \pm s$)

Group	HC (n=30)	OSAN (n=30)	OSAI (n=36)	F	P
Visuospatial/ Executive	4.80 ± 0.48	4.46 ± 0.82	4.03 ± 0.91 ¹⁾²⁾	8.348	<0.001
Naming	2.93 ± 0.25	2.80 ± 0.48	2.42 ± 0.60 ¹⁾²⁾	10.472	<0.001
Attention	5.50 ± 0.73	5.33 ± 0.88	3.11 ± 1.17 ²⁾³⁾	65.103	<0.001
Language	2.67 ± 0.55	2.67 ± 0.55	1.72 ± 0.91 ²⁾³⁾	20.045	<0.001
Abstraction	1.77 ± 0.43	1.80 ± 0.41	1.39 ± 0.64 ¹⁾⁴⁾	6.616	0.002
Delayed Recall	4.33 ± 0.76	4.13 ± 0.97	2.03 ± 0.91 ²⁾³⁾	70.000	<0.001
Orientation	5.87 ± 0.35	5.80 ± 0.41	4.89 ± 1.06 ²⁾³⁾	19.579	<0.001
MoCA	27.83 ± 1.34	26.97 ± 1.19	19.61 ± 2.69 ²⁾³⁾	185.128	<0.001

HC: Health Control; OSAN: Obstructive Sleep Apnea patients without cognitive impairment; OSAI: Obstructive Sleep Apnea patients with cognitive impairment; MoCA: Montreal Cognitive Assessment. LSD after ANOVA test, 1) $P < 0.05$ between OSAN and OSAI group; 2) $P < 0.001$ between HC and OSAI group; 3) $P < 0.001$ between OSAN and OSAI group; 4) $P < 0.05$ between HC and OSAI group.

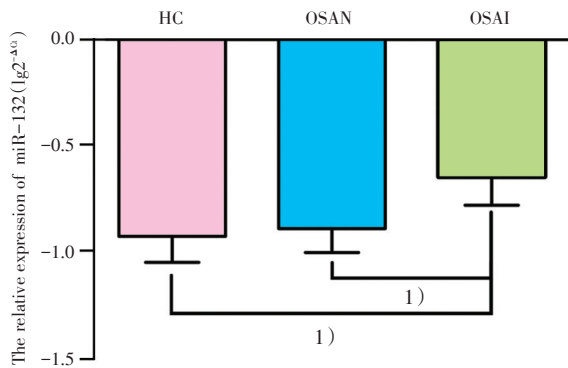


图 1 miR-132 的相对表达量

Fig.1 Analysis of the relative expression level of miR-132

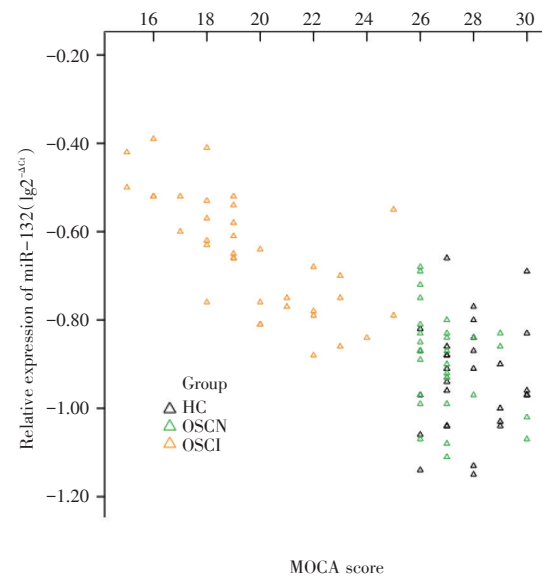


图 2 认知功能与血清 miR-132 相对表达水平的相关性

Fig.2 Correlation between cognitive function and the relative expression level of serum miR-132

在 OSAI 和 OSA 的敏感性和特异性。曲线下面积 (AUC) 在 OSAI 的曲线上有显著性差异 ($AUC = 0.935, 95\%CI: 0.890 \sim 0.981, P < 0.001$; 图 3)。曲线下面积在 OSA 组的曲线上有显著性差异 ($AUC = 0.787, 95\%CI: 0.695 \sim 0.879, P < 0.001$; 图 4)。

3 讨论

OSA 是人群中最常见的睡眠障碍之一,表现为在睡眠过程中频繁打鼾、反复发生间歇性缺氧和高碳酸血症,易引起睡眠结构紊乱、睡眠不足及脑功能受损,导致白天嗜睡过多、认知功能障碍等

症状。OSA 患者通常存在不同程度的认知功能障碍^[3-4],包括记忆、学习和注意力等。我们研究也发现:OSAI 组在视空间与执行力、命名能力、注意力、语言能力、抽象能力、记忆力、定向力等 7 个认知域的得分均低于 OSAN 组和 HC 组 ($P < 0.05$), OSA 患者在记忆力、学习力及注意力等方面存在认知功能障碍。

在本研究中我们分别通过凯迪泰多导睡眠诊

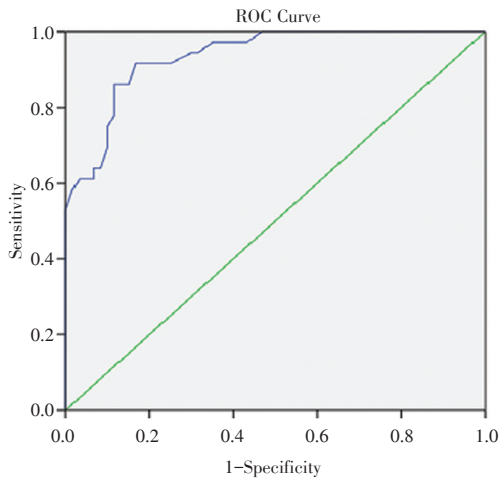


图3 miR-132与OSAI的ROC曲线

Fig.3 ROC representing OSAI diagnostic tests with miR-132

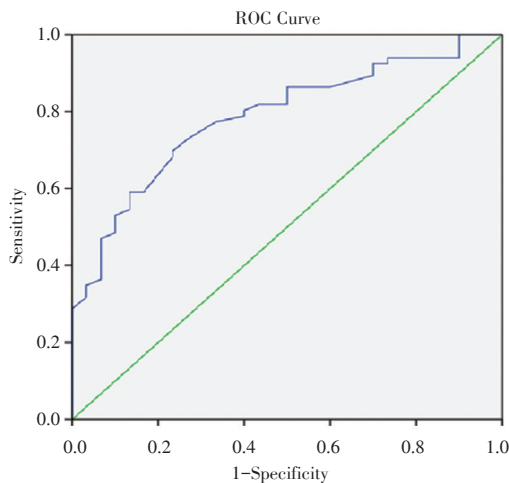


图4 miR-132与OSA的ROC曲线

Fig.4 ROC curve representing OSA diagnostic tests with miR-132

断分析系统及MoCA对各组进行睡眠监测及认知障碍评分。多导睡眠监测(Polysomnography, PSG)是目前诊断OSA的金标准,具有诊断OSA的可行性、准确性和有效性等优点^[11],研究结果也表明OSA患者的AHI评分($t=-16.49, P<0.001$)明显高于HC组,说明PM对OSA的诊断率较高。MoCA是当前的国际认知筛查量表中最广泛应用的量表之一^[12],可快速识别患者认知功能障碍,具有高灵敏度和简单、快速和可重复性、可行性等特点,故本研究通过采用MoCA对各组进行认知

障碍评估。但是,MoCA分数易受性别、年龄和教育程度的影响。在这项研究中,三组患者的性别、年龄和文化程度差异没有统计学意义($P>0.05$),提示本研究结果不受上述因素的影响。我们的数据显示,OSAI组与OSAN组和HC组的MoCA总分均存在统计学差异($P<0.001$),表明OSA患者存在一定程度的认知功能障碍,尤其是在注意力、记忆力等方面。

越来越多的临床研究和动物实验证明miR-132与认知功能障碍之间存在相关性^[13]。miR-132是高度保守的miRNA,其通过转录因子cAMP结合蛋白从人染色体17的基因缺口区进行转录^[14]。研究发现,重度抑郁障碍患者外周血miR-132显著升高,miR-132可能是控制海马神经可塑性和神经元存活的关键步骤之一^[15]。miR-132是一种重要的活动依赖性认知调节因子,且必须保持在一定范围内表达,以确保正常的学习和记忆形成^[16]。相关研究已经发现,内源性miR-132在整个海马的兴奋性细胞层中表达,并且在响应于空间学习任务时可诱导miR132的表达。此外,miR132是正常的细胞信号通路的一部分,其将联想学习能力与记忆形成相关联,并且其表达的失调导致认知功能受损^[16]。在本研究中,我们招募的66名OSA受试者和30名健康对照者,年龄、性别、BMI和受教育程度相匹配。我们发现OSAI组中miR-132表达水平显著上调($P<0.001$)。此外,miR-132的相对表达与MoCA评分之间的显著负相关($r=-0.726, P<0.001$),我们推测miR-132通过调控某种信号通路导致OSA患者认知功能障碍。同样利用ROC曲线评价miR-132对OSAI和OSA的诊断价值,曲线下面积分别为0.935、0.787,其灵敏度及特异度均较高,提示miR-132有可能作为OSAI和OSA的诊断和治疗的潜在靶点。

在这项研究中,尽管年龄、性别、教育水平相匹配,但仍有一些局限性问题需要解决,例如:①将儿童OSA排除在外;②在特定时间窗口获得基因表达变化的限制同样性,只有在两组与其年龄、性别和教育水平相匹配时才观察到高度逆相关,认知评分与血清中的miR-132表达水平之间也需要未来的研究与更大的队列来定义他们的具体关系。因此,需要对不同人群和不同年龄的患者进行前瞻性调查,也需要相应的MRI、fMRI等图像支持。

血清 miR-132 表达水平升高与 OSA 诊断及其认知功能障碍密切相关。在我们的研究中,血清 miR-132 的检测有可能成为 OSA 患者认知功能障

碍及诊断的一个潜在指标,但对于血清 miR-132 如何具体参与 OSA 的调节机制仍需进一步研究。

参考文献

- [1] Ruchała M, Bromińska B, Cyrańska-Chyrek E, et al. Obstructive sleep apnea & hormones: A novel insight[J]. Arch Med Sci, 2017, 13(4): 875-884.
- [2] Xu M, Yang Y, Zhang J. Levels of neuroglobin in serum and neurocognitive impairments in Chinese patients with obstructive sleep apnea [J]. Sleep Breathing, 2013, 17(2):573-582.
- [3] Vollono C, Testani E, Losurdo A, et al. Migraine, arousal and sleep deprivation: comment on: "sleep quality, arousal and pain thresholds in migraineurs: a blinded controlled polysomnographic study"[J]. J Headache Pain, 2013, 14(1):50.
- [4] Esposito M, Antinolfi L, Gallai B, et al. Executive dysfunction in children affected by obstructive sleep apnea syndrome: an observational study [J]. Neuropsychiatr Dis Treat, 2013, 9:1087.
- [5] Sales LV, Bruin VMSD, D'Almeida V, et al. Cognition and biomarkers of oxidative stress in obstructive sleep apnea[J]. Clinics, 2013, 68(4): 449-455.
- [6] Elad B, Lavie P. Effect of sleep apnea on cognition and mood [J]. Int Rev Psychiatr, 2005, 17(4): 277-282.
- [7] An Z, Wang D, Yang G, et al. Role of microRNA-130a in the pathogenesis of obstructive sleep apnea hypopnea syndrome-associated pulmonary hypertension by targeting the Gax gene [J]. Medicine, 2017, 96(20).
- [8] Huang S E, Zhao J, Huang D, et al. Serum miR-132 is a risk marker of post-stroke cognitive impairment[J]. Neurosci Lett, 2016, 615:102-106
- [9] Ito E, Inoue Y. The International Classification of Sleep Disorders, third edition. American Academy of Sleep Medicine. Includes bibliographies and index [J]. Nihon Rinsho Jpn J Clin Med, 2015, 73(6): 916.
- [10] Horton DK, Hynan LS, Lacritz LH, et al. An Abbreviated Montreal Cognitive Assessment (MoCA) for Dementia Screening [J]. Clin Neuropsychol, 2015, 29(4):413-425.
- [11] Xu L, Han F, Keenan B T, et al. Validation of the Nox-T3 Portable Monitor for Diagnosis of Obstructive Sleep Apnea in Chinese Adults [J]. J Clin Sleep Med, 2017, 13(5):675.
- [12] Chen C, Dong YH, Merchant R, et al. The Montreal cognitive assessment (MoCA) is superior to the mini-mental state examination (MMSE) in detecting patient's with moderate cognitive impairment, no-dementia (CIND) and at high risk of dementia [J]. Alzheimers Dementia, 2011, 7(4):S240-S241.
- [13] Shaltiel G, Hanan M, Wolf Y, et al. Hippocampal microRNA-132 mediates stress-inducible cognitive deficits through its acetylcholinesterase target [J]. Brain Structure Function, 2013, 218(1):59-72.
- [14] Kano M, Seki N, Kikkawa N, et al. miR-145, miR-133a and miR-133b: Tumor-suppressive miRNAs target FSCN1 in esophageal squamous cell carcinoma [J]. Int J Cancer, 2010, 127(12):2804-2814.
- [15] Aten S, Hansen KF, Snider K, et al. miR-132 couples the circadian clock to daily rhythms of neuronal plasticity and cognition [J]. Learning Memory, 2018, 25(5):214-229.
- [16] Hansen KF, Karelina K, Sakamoto K, et al. miRNA-132: a dynamic regulator of cognitive capacity [J]. Brain Structure Function, 2013, 218(3):817-831.

(编辑 刘清海)