

引用本文:曾浩,陈玉霞,司文.围生期缺血缺氧性脑病的微RNA生物标志物筛选研究[J].安徽医药,2023,27(9):1849-1852.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2023.09.034.



◇临床医学◇

围生期缺血缺氧性脑病的微RNA生物标志物筛选研究

曾浩,陈玉霞,司文

作者单位:深圳市龙华区中心医院神经外科,广东 深圳 518110

通信作者:司文,男,主任医师,硕士生导师,研究方向为脑血管病的显微外科治疗,Email:zhaoyj44@163.com

基金项目:深圳市科技创新委员会基础研究项目(JCYJ20190808154015736);

深圳市龙华区医疗卫生机构区级科研项目(2020191)

摘要: **目的** 研究围生期缺血缺氧性脑病(HIE)的微RNA(miRNA)生物标志物的筛选情况。**方法** 通过动态队列研究法获取2020年1月至2021年1月深圳市龙华区中心医院144例HIE患儿作为受试者。将其根据病情严重程度的差异分作轻度HIE组42例、中度HIE组62例以及重度HIE组40例,另取同期该院50例健康新生儿作为对照组。分别采集所有新生儿脐带血进行测序比较分析差异表达miRNA,筛选3个和HIE相关的miRNA作为早期预测HIE的生物标志物,并分析各组新生儿上述3个miRNA表达情况的差异。采用Spearman相关性分析明确HIE病情严重程度和miRNA表达的关系。此外,将所有HIE患儿按照是否合并脏器损伤分为合并脏器损伤组102例以及未合并脏器损伤组42例,比较两组上述3个miRNA表达情况的差异。此外,检测并比较HIE组和对照组血清诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、内皮素-1水平。**结果** miRNA芯片通过扫描、分析以及标准化处理,结果发现miRNA芯片共检测miRNA达921种。相较于对照组,HIE患儿血浆中有29种miRNA表达异常升高,26种miRNA表达异常下降,选择差异有统计学意义的miRNA实施生物学信息分析,发现了miR-4472、miR-5195-3p以及miR-6794-5p可能具有潜在的预测HIE作用。重度HIE组miR-4472、miR-5195-3p以及miR-6794-5p表达水平分别为 0.71 ± 0.12 、 2.34 ± 0.28 、 2.24 ± 0.24 ,均高于对照组的 0.20 ± 0.04 、 0.78 ± 0.15 、 0.47 ± 0.11 和轻度HIE组的 0.37 ± 0.08 、 0.92 ± 0.18 、 0.89 ± 0.15 以及中度组的 0.55 ± 0.09 、 1.45 ± 0.23 、 1.46 ± 0.20 ,且轻度HIE组、中度HIE组miR-4472、miR-5195-3p以及miR-6794-5p表达水平均高于对照组,中度HIE组miR-4472、miR-5195-3p以及miR-6794-5p表达水平均高于轻度HIE组(均 $P<0.05$)。HIE患儿病情严重程度和miR-4472、miR-5195-3p、miR-6794-5p表达均呈正相关关系(均 $P<0.05$)。合并脏器损伤HIE患儿miR-4472、miR-5195-3p、miR-6794-5p表达水平分别为 0.60 ± 0.09 、 2.05 ± 0.18 、 1.70 ± 0.31 ,均高于未合并脏器损伤组的 0.46 ± 0.03 、 1.58 ± 0.12 、 1.37 ± 0.23 (均 $P<0.05$)。HIE组血清iNOS及内皮素-1水平均高于对照组(均 $P<0.05$)。**结论** HIE的miRNA生物标志物包括miR-4472、miR-5195-3p、miR-6794-5p,且上述miRNA表达水平和患儿病情严重程度以及脏器损伤有关,值得临床重点关注。

关键词: 缺氧缺血,脑; 微RNA; 生物标志物; 新生儿; 围生期

Screening of microRNA biomarkers in perinatal ischemic-hypoxic encephalopathy

ZENG Hao, CHEN Yuxia, SI Wen

Author Affiliation: Department of Neurosurgery, Shenzhen Longhua District Central Hospital, Shenzhen, Guangdong 518110, China

Abstract: **Objective** To study the screening of microRNA (miRNA) biomarkers in perinatal ischemic-hypoxic encephalopathy (HIE). **Methods** A total of 144 HIE infants were obtained as subjects from January 2020 to January 2021 in Shenzhen Longhua District Central Hospital by the dynamic cohort study method. According to the severity of the disease, they were divided into a mild HIE group (42 cases), a moderate HIE group (62 cases) and a severe HIE group (40 cases), and 50 healthy infants in the same period of time were selected as the control group. The umbilical cord blood of all neonates was sequenced and analyzed for differentially expressed miRNAs, three HIE-related miRNAs were screened as biomarkers for the early prediction of HIE, and the differences in the expression of the above three miRNAs were analyzed in the infants of each group. Spearman correlation analysis was used to clarify the relationship between HIE disease severity and miRNA expression. In addition, all HIE infants were divided into 102 cases in the group with organ damage and 42 cases in the group without organ damage according to whether they had organ damage, and the differences in the expression of the above three miRNAs between the two groups were compared. In addition, the serum levels of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and endothelin-1 were measured and compared between the HIE and control group. **Results** A total of 921 miRNAs were detected by miRNA microarray through scanning, analysis and standardization. Compared with the control group, the plasma expression of 29 miRNAs was abnormally elevated, and 26 miRNAs were abnormally decreased in HIE patients. Biological information analysis was performed to select the miRNAs with the most significant differences, and miR-4472, miR-5195-3p, and miR-6794-5p were found

to have a potential predictive role in HIE. The expression levels of miR-4472, miR-5195-3p, and miR-6794-5p in the severe HIE group were 0.71 ± 0.12 , 2.34 ± 0.28 , and 2.24 ± 0.24 , respectively, which were higher than those in the control group (0.20 ± 0.04 , 0.78 ± 0.15 , 0.47 ± 0.11), the mild HIE group (0.37 ± 0.08 , 0.92 ± 0.18 , 0.89 ± 0.15) and the moderate group (0.55 ± 0.09 , 1.45 ± 0.23 , 1.46 ± 0.20). The expression levels of miR-4472, miR-5195-3p, and miR-6794-5p in the mild and moderate HIE groups were higher than those in the control group, and the expression levels of miR-4472, miR-5195-3p, and miR-6794-5p in the moderate HIE group were higher than those in the mild group (all $P<0.05$). There was a positive correlation between the severity of HIE and the expression of miR-4472, miR-5195-3p and miR-6794-5p (all $P<0.05$). The expression levels of miR-4472, miR-5195-3p, and miR-6794-5p in HIE patients with combined organ injury were 0.60 ± 0.09 , 2.05 ± 0.18 , and 1.70 ± 0.31 , respectively, which were higher than those in the non combined organ injury group (0.46 ± 0.03 , 1.58 ± 0.12 , 1.37 ± 0.23 , all $P<0.05$). The levels of serum iNOS and endothelin-1 in the HIE group were higher than those in the control group ($P<0.05$). **Conclusion** The miRNA biomarkers of HIE include miR-4472, miR-5195-3p and miR-6794-5p, and the expression levels of the above miRNAs are related to the severity of the disease and organ injury in infants, which are worthy of clinical attention.

Key words: Hypoxia-ischemia, brain; MicroRNA; Biomarkers; Neonatal; Perinatal stage

围生期缺氧缺血性脑病(HIE)主要是指因多种原因共同作用导致的缺氧窒息,继而引起部分或完全缺氧或(和)脑血流减少导致的脑缺氧缺血性损害^[1]。患儿主要表现特征涵盖意识障碍、原始反射异常以及肌张力改变等,可能伴有多脏器的不同程度损伤,预后不良^[2]。因此,如何有效早期诊断HIE具有极其重要的意义。既往,临床上主要是通过核磁共振以及脑电图等手段实现对HIE的诊断,但均存在耗时较长的缺陷,可能导致患儿的最佳治疗时期错过^[3]。因此,利用患儿脐血进行快速、准确、无创的生物标志物检测无疑是最佳的解决方案。目前,高通量测序以及检测技术得到显著的发展,若能通过上述技术筛查出脐带血血液中和缺氧状态相关的生物标志物,并结合高通量自动快速检测设备检测分子标志物可有效提高HIE诊断的准确性^[4],继而为医疗手段或神经保护药物的使用时机和药物剂量提供依据。本研究通过HIE的微RNA(miRNA)生物标志物的筛选,为临床治疗提供支持。

1 资料与方法

1.1 一般资料 通过动态队列研究法获取深圳市龙华区中心医院2020年1月至2021年1月144例HIE患儿作为受试者。将其根据病情严重程度的差异分作轻度HIE组42例、中度HIE组62例以及重度HIE组40例,另取同期该院50例健康新生儿作为对照组。各组基线资料差异无统计学意义($P>0.05$),可比性较高,见表1。入组标准:(1)HIE患儿均符合中华医学会儿科学会新生儿组修订的新生儿HIE诊断标准^[5];(2)均为足月单胎妊娠;(3)娩出后24 h内入院接受诊治。排除标准:(1)合并败血症或(和)脑膜炎等并发症;(2)伴有先天性畸形或遗传性疾病;(3)正参与其他研究。本研究获深圳市龙华区中心医院伦理委员会批准(批号2019-072-02),患儿监护人或近亲属对研究方案签署知情同意书。

1.2 研究方法 (1)脐带血采集及处理:在受试者

表1 各组新生儿基线资料对比

组别	例数	性别(男/女)/例	胎龄/(周, $\bar{x}\pm s$)	出生体质量/(g, $\bar{x}\pm s$)
对照组	50	27/23	39.58 ± 1.23	$3\ 215.22\pm 412.73$
轻度HIE组	42	23/19	39.52 ± 1.22	$3\ 215.22\pm 412.73$
中度HIE组	62	35/27	39.59 ± 1.23	$3\ 221.57\pm 414.69$
重度HIE组	40	22/18	39.59 ± 1.24	$3\ 218.51\pm 414.92$
$F(\chi^2)$ 值		(1.06)	1.13	1.50
P 值		0.623	0.578	0.520

注:HIE为缺氧缺血性脑病。

娩出之后,分别采集200 μ L的脐带血保存在无RNA酶EP管内,滴加1 mL的Trizol LS[赛默飞世尔科技(中国)有限公司]充分混匀,保存至 $-80\ ^\circ\text{C}$ 冰箱中备用。(2)总RNA提取:首先将标本进行冰上溶解处理,滴加200 μ L的氯仿混匀,进行时长为10 min的静置处理,之后开展时长为15 min的12 000 r/min离心处理。采集上层水相400 μ L并放置于无RNA酶的EP管内,继续滴加400 μ L异丙醇混匀。冰上静置10 min后以14 000 r/min为离心条件离心15 min。之后去除上清液,取沉淀物加入乙醇清洗后12 000 r/min离心5 min。吸去乙醇,晾干后,加入10 μ L去酶水,液氮速冻RNA溶液,样品用干冰运输交给公司进行二代测序。(3)二代转录组测序及差异表达基因分析:通过第二代测序技术实现,并筛选reads数 >2 的差异基因,阈值为FDR(false discovery rate) <0.05 , $\log_2\text{FC}$ [fold change (condition 2/condition 1) for a gene] >2 或 $\log_2\text{FC}<-2$,根据以上条件得出差异表达的miRNA。(4)候选miRNA关联性分析:筛选出与HIE分度正相关或负相关的候选miRNA,通过两变量关联性分析方法进行分析每个miRNA与HIE分度的相关性,将HIE临床分度为有序分类变量并设为 x ,临床分度Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ分别对应为值1、2、3,将miRNA的reads数作为连续定量变量,设为 y 。因双变量中含有一有序分类变量,因此SPSS应采用

Spearman 关联性分析方法进行分析其相关性。根据其秩相关系数 r_s 筛选出 $3\sim 5$ 个 $-1\leq r_s\leq -0.5$ 或 $1\geq r_s\geq 0.5$,且 $P\leq 0.05$ 的miRNA,作为预测HIE的miRNA生物标志物。(5)分组方式:将所有HIE患儿按照是否合并脏器损伤分为合并脏器损伤组102例以及未合并脏器损伤组42例。(6)血清诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、内皮素-1水平检测:检测方式均为酶联免疫吸附测定,操作以试剂盒(购自上海西唐生物科技有限公司)说明书为准。

1.3 统计学方法 数据处理软件选择SPSS 22.0。以 $\bar{x}\pm s$ 表示计量数据,开展正态性检验及方差齐性检验,符合正态分布,两组比较行两独立样本 t 检验。多组间对比行单因素方差分析。计数资料以例(%)表示,开展 χ^2 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 芯片检测结果分析 miRNA芯片通过扫描、分析及标准化处理,结果发现miRNA芯片共检测miRNA达921种。相较于对照组,HIE患儿血浆中有29种miRNA表达异常升高,26种miRNA表达异常下降,选择差异有统计学意义的miRNA实施生物学信息分析,发现了miR-4472、miR-5195-3p以及miR-6794-5p可能具有潜在的预测HIE作用。

2.2 各组新生儿miR-4472、miR-5195-3p以及miR-6794-5p表达对比 重度HIE组miR-4472、miR-5195-3p以及miR-6794-5p表达水平均高于对照组和轻度HIE组以及中度组,且轻度HIE组、中度HIE组miR-4472、miR-5195-3p以及miR-6794-5p表达水平均高于对照组,中度HIE组miR-4472、miR-5195-3p以及miR-6794-5p表达水平均高于轻度HIE组(均 $P<0.05$),见表2。

表2 各组新生儿miR-4472、miR-5195-3p以及miR-6794-5p表达对比/ $\bar{x}\pm s$

组别	例数	miR-4472	miR-5195-3p	miR-6794-5p
对照组	50	0.20±0.04	0.78±0.15	0.47±0.11
轻度HIE组	42	0.37±0.08 ^①	0.92±0.18 ^①	0.89±0.15 ^①
中度HIE组	62	0.55±0.09 ^{①②}	1.45±0.23 ^{①②}	1.46±0.20 ^{①②}
重度HIE组	40	0.71±0.12 ^{①②③}	2.34±0.28 ^{①②③}	2.24±0.24 ^{①②③}
F 值		10.53	14.29	16.40
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

注:HIE为缺氧缺血性脑病。

①与对照组相比, $P<0.05$ 。②与轻度HIE组相比, $P<0.05$ 。③与中度HIE组相比, $P<0.05$ 。

2.3 HIE患儿病情严重程度和miR-4472、miR-5195-3p、miR-6794-5p表达的关系分析 HIE患儿病情严重程度和miR-4472、miR-5195-3p、miR-6794-5p表达均呈正相关关系(均 $P<0.05$),见表3。

表3 HIE患儿病情严重程度和miR-4472、miR-5195-3p、miR-6794-5p表达的Spearman相关性分析

相关指标	HIE患儿病情严重程度	
	r_s 值	P 值
miR-4472	0.52	0.005
miR-5195-3p	0.58	0.001
miR-6794-5p	0.62	<0.001

注:HIE为缺氧缺血性脑病。

2.4 HIE患儿合并脏器损伤和miR-4472、miR-5195-3p、miR-6794-5p表达的关系分析 合并脏器损伤HIE患儿miR-4472、miR-5195-3p、miR-6794-5p表达水平均高于未合并脏器损伤组(均 $P<0.05$),见表4。

表4 HIE患儿合并脏器损伤和miR-4472、miR-5195-3p、miR-6794-5p表达的关系分析/ $\bar{x}\pm s$

组别	例数	miR-4472	miR-5195-3p	miR-6794-5p
合并脏器损伤组	102	0.60±0.09	2.05±0.18	1.70±0.31
未合并脏器损伤组	42	0.46±0.03	1.58±0.12	1.37±0.23
t 值		9.84	15.54	6.22
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

注:HIE为缺氧缺血性脑病。

2.5 两组血清iNOS及内皮素-1水平对比 HIE组血清iNOS及内皮素-1水平均高于对照组(均 $P<0.05$),见表5。

表5 两组血清iNOS及内皮素-1水平对比/ $\bar{x}\pm s$

组别	例数	iNOS/(U/mL)	内皮素-1/(ng/L)
对照组	50	21.05±3.16	34.58±9.28
HIE组	144	47.11±6.23	241.93±32.15
t 值		28.31	44.89
P 值		<0.001	<0.001

注:HIE为缺氧缺血性脑病,iNOS为一氧化氮合酶。

3 讨论

临床表现、影像学检查和脑电图检查是目前临床上广泛用以诊断HIE的手段,但其无法判断脑缺氧缺血后的损伤实质,且灵敏度以及特异度均较低,对后续治疗用药影响较大,存在一定的局限性^[6-8]。随着高通量测序技术的日益发展,大规模人群样本的疾病相关生物标志物筛选得以实现^[9-10]。生物标志物可反映生理状态或疾病过程中细胞变化情况,包括miRNA、细胞代谢物以及蛋白质等小分子,可用于预测患病概率、辅助诊断以及预后评估中。其中miRNA主要是指一类约由20个核苷酸组成的非编码RNA,其可通过和靶mRNA的互补序列特异性结合,继而调控相关靶基因的表达,进一步参与多种疾病的发生、发展过程^[11-12]。有研究报

道显示,miRNA与人类癌症、中枢神经系统疾病以及心血管疾病均有密切相关,可能是多种疾病诊断、治疗以及预后的潜在生物标志物^[13-14]。

本研究结果发现,相较于对照组,HIE患儿血浆中有29种miRNA表达异常升高,26种miRNA表达异常下降。这在既往相关研究报道中得以佐证,说明了存在一部分miRNA和HIE的发生、发展有关。然而,另有研究报道发现miRNA-210在HIE中存在异常表达^[15],而在本研究中并未检测到该miRNA的异常改变。导致上述差异发生的原因可能和医疗技术的飞速发展以及医疗条件的日益完善有关;此外,实验过程中难免存在一定的偏倚,从而导致结果出现偏颇。此外,miR-4472、miR-5195-3p以及miR-6794-5p可能具有潜在的预测HIE作用,且上述3种miRNA在HIE患儿中均存在异常高表达,并随着HIE患儿病情的加重,其表达升高。提示了miR-4472、miR-5195-3p、miR-6794-5p可能是HIE的miRNA生物标志物。究其原因,上述3种miRNA可通过调控下游靶基因的表达,进一步参与HIE的发生、发展过程。然而,关于其具体作用机制有待进一步研究明确,亦为我们今后的研究提供了新的方向以及思路。另外,合并脏器损伤HIE患儿合并脏器损伤和miR-4472、miR-5195-3p、miR-6794-5p表达水平均高于未合并脏器损伤组。分析原因,可能是上述3种miRNA参与了HIE各脏器损伤的病理过程^[16-17]。这反映了上述3种miRNA表达水平的检测可能有助于临床预测HIE患儿的合并脏器损伤情况,可为已出现多脏器功能不全趋势但尚未出现显著表现病人提供早期预警指导,继而为临床诊治提供指导依据,达到改善预后的目的。然而,miRNA在心肌缺氧缺血损伤以及其他多种情况下均可能出现异常表达^[18-19],因此,需开展进一步试验明确各脏器组织特异相关的miRNA表达。此外,本研究所检测的样本为脐带血,其中miR-4472、miR-5195-3p、miR-6794-5p表达可能受多种因素的干扰,今后的研究可以考虑采集多种不同类型标本进行试验,提高数据的可信度。HIE组血清iNOS及内皮素-1水平均高于对照组。考虑原因,可能是iNOS和内皮素-1在HIE的发生、发展过程中具有调节平衡作用。

综上所述,miR-4472、miR-5195-3p、miR-6794-5p可能是HIE的潜在miRNA生物标志物,上述miRNA表达水平和患儿病情严重程度以及脏器损伤有关,可能有助于辅助诊断HIE以及预测脏器损伤发生情况,值得临床重点关注。然而,本研究尚且存在一定的有待完善之处,在今后的相关研究中,应增加样本量,以获取更为准确、可靠的数据。

参考文献

- [1] ZHANG GY, YE M, LI M. Deregulated miR-384 serves as a biomarker in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy and alleviates microglia-mediated neuroinflammation [J]. *Mol Biol Rep*, 2020, 47(7): 5411-5420.
- [2] YANG G, ZHAO Y. Overexpression of miR-146b-5p ameliorates neonatal hypoxic ischemic encephalopathy by inhibiting IRAK1/TRAF6/TAK1/NF- α B signaling [J]. *Yonsei Med J*, 2020, 61(8): 660-669.
- [3] 曾志涌, 黎云鹏, 赵树华, 等. 不同阶段缺氧缺血性脑病大鼠大脑皮层信使RNAs及微小RNAs表达谱分析[J]. *中华神经医学杂志*, 2019, 18(8): 785-789.
- [4] 肖甜甜, 杨琳, 吴冰冰, 等. 合并围生期缺氧的新生儿脑病遗传因素分析[J]. *中华儿科杂志*, 2021, 59(4): 280-285.
- [5] 中华医学会儿科学分会新生儿学组. 新生儿缺氧缺血性脑病诊断标准[J]. *中华儿科杂志*, 2005, 43(8): 584-584.
- [6] 陈小娜, 姜毅. 2018昆士兰临床指南: 缺氧缺血性脑病介绍[J]. *中华新生儿科杂志(中英文)*, 2019, 34(1): 77-78.
- [7] 姜淑萍, 朱洪斌, 刘芳, 等. 新生儿缺氧缺血性脑病血清HMGB1、脂蛋白a水平变化及临床意义[J]. *中国医药导报*, 2021, 18(8): 25-28, 49.
- [8] 李刚, 郑继爱, 于鹏. MRI检查在新生儿缺氧缺血性脑病中的应用[J]. *中国妇幼保健*, 2021, 36(1): 220-223.
- [9] 雷瑞美, 杨燕, 董旭霞. 新生儿缺氧缺血性脑病头颅CT检查的应用及临床价值[J]. *中国妇幼保健*, 2021, 36(10): 2416-2419.
- [10] 于扬, 司振妍. 3.0T核磁共振敏感加权成像在新生儿缺氧缺血性脑病诊断中的价值分析[J]. *中国基层医药*, 2019, 26(3): 272-275.
- [11] 陈博威, 郑飘, 易健, 等. 六味地黄汤治疗新生儿缺血缺氧性脑病lncRNA-miRNA-mRNA转录网络整合分析[J]. *中国中医药信息杂志*, 2021, 28(7): 27-34.
- [12] 王丽敏, 顾珺, 沈朝斌. 微小RNA在新生儿缺血缺氧性脑病中的表达[J/CD]. *中华妇幼临床医学杂志(电子版)*, 2019, 15(5): 497-503. DOI: 10.3877/cma.j.issn.1673-5250.2019.05.004.
- [13] 刘春阳, 曾会勤, 刘敏, 等. MicroRNA在缺氧缺血性脑病调控机制中的研究进展[J]. *海南医学院学报*, 2020, 26(24): 1907-1913.
- [14] CHEN D, DIXON BJ, DOYCHEVA DM, et al. IRE1 α inhibition decreased TXNIP/NLRP3 inflammasome activation through miR-17-5p after neonatal hypoxic-ischemic brain injury in rats [J]. *J Neuroinflammation*, 2018, 15(1): 32-33.
- [15] LI B, DASGUPTA C, HUANG L, et al. MiRNA-210 induces microglial activation and regulates microglia-mediated neuroinflammation in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy [J]. *Cell Mol Immunol*, 2020, 17(9): 876-991.
- [16] 石计朋, 栗延伟, 桑桂梅, 等. miRNA-21在新生儿缺氧缺血性脑病患者血清中表达的意义[J]. *实用预防医学*, 2018, 25(6): 655-658.
- [17] 张旭, 朱雯, 何梦藻, 等. miRNA表达谱在缺氧缺血性脑病新生儿血浆中的变化及意义[J]. *浙江医学*, 2017, 39(16): 1333-1336, 1344.
- [18] 王明章, 贾玲, 尹旭, 等. 新生儿缺氧缺血性脑病患者外周血单核细胞Toll样受体3和微小RNA-210的表达水平及意义[J]. *中国妇幼保健*, 2018, 33(20): 4749-4753.
- [19] 刘春阳, 曾会勤, 刘敏, 等. MicroRNA在缺氧缺血性脑病调控机制中的研究进展[J]. *海南医学院学报*, 2020, 26(24): 1907-1913.

(收稿日期: 2022-03-17, 修回日期: 2022-05-24)