

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2021.09.014  
文章编号: 1005-8982 (2021) 09-0072-05

实验研究·论著

## 缺血缺氧性脑病新生儿 microRNA-21 表达 及临床价值

卞伟妮, 吴新婷

(西安医学院第二附属医院, 陕西 西安 710038)

**摘要:** **目的** 探讨新生儿缺血缺氧性脑病(HIE)患儿血清microRNA-21(miR-21)表达水平的变化, 以及恢复期miR-21与神经行为检测(NBNA)评分的相关性。**方法** 选取2018年3月—2019年6月西安医学院第二附属医院56例HIE患儿(HIE组)及同期60例正常新生儿(对照组), 检测患儿出生后24 h血清miR-21表达水平的差异, 进行统计学检验并绘制ROC曲线。检测HIE患儿接受常规治疗7 d后miR-21表达水平及治疗30 d后的NBNA评分, 并进行相关性分析。**结果** HIE组miR-21表达水平较对照组升高( $P < 0.05$ ); 血清miR-21对缺氧缺血性脑病的AUC值为0.758(95% CI: 67.32, 85.78), 敏感性为89.47%(95% CI: 0.972, 2.641), 特异性为92.83%(95% CI: 0.953, 2.487); HIE患儿治疗7 d后血浆miR-21表达水平与治疗30 d后的NBNA评分呈负相关( $r = -0.746, P < 0.05$ )。**结论** miR-21对HIE具有早期诊断意义, miR-21对HIE的病情进展具有早期预测效果, 为HIE的早期诊断和病情进展提供新的依据和生物学标志物。

**关键词:** 缺血缺氧性脑病; 新生儿; microRNA-21; NBNA评分; ROC曲线

**中图分类号:** R742

**文献标识码:** A

## Clinical value of microRNA-21 in neonatal hypoxic ischemic encephalopathy

Wei-ni Bian, Xin-ting Wu

(The Second Affiliated Hospital of Xi'an Medical University, Xi'an, Shaanxi 710038, China)

**Abstract: Objective** To investigate the changes of serum microRNA-21 (miR-21) expression and the correlation between miR-21 and NBNA scores in neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE). **Methods** Totally 56 children with HIE and 60 normal newborns were enrolled. The difference of plasma miR-21 expression was detected 24 h after birth. Statistical analysis was performed and ROC curve was drawn. Correlation analysis was performed to detect the expression of miR-21 after 7 days of routine treatment and the NBNA score of brain function after 30 days of treatment. **Results** The expression of miR-21 in the HIE group was significantly higher than that in the control group ( $P < 0.05$ ). The AUC value of serum miR-21 in hypoxic ischemic encephalopathy was 0.758 (95% CI: 67.32, 85.78), the sensitivity was 89.47% (95% CI: 0.972, 2.641), and the specificity was 92.83% (95% CI: 0.953, 2.487). There was a negative correlation between plasma miR-21 and NBNA scores after 30 days of treatment ( $r = -0.746, P < 0.05$ ). **Conclusion** MiR-21 has early diagnostic significance and early predictive effect for HIE. This study provides a new basis and biomarkers for the early diagnosis and progression for HIE.

**Keywords:** hypoxia-ischemia, brain; infant, newborn; microRNA-21; nbna score; roc curve

收稿日期: 2020-09-11

[通信作者] 吴新婷, E-mail: 361735882@qq.com; Tel: 18710420518

新生儿缺氧缺血性脑病(hypoxic-ischemic encephalopathy, HIE)是围生期新生儿发生窒息后产生的严重并发症,可造成新生儿神经系统脑水肿和脑坏死<sup>[1]</sup>。临床研究显示,约50%的脑瘫患儿是由HIE引起的。引发HIE原因较多,如母体妊娠高血压、胎盘异常、胎盘早剥、胎儿发育迟缓、脐带脱落、分娩中出现脐带绕颈和打结等<sup>[2]</sup>。因此,发现新的生物学标志物用于早期诊断HIE及预测HIE的预后显得尤为重要<sup>[3-4]</sup>。

MicroRNA是一条具有20~25个核苷酸序列的内源性非编码RNA,广泛参与到器官发育,细胞增殖、分化、迁移和凋亡,肿瘤发生及代谢等各种生理病理过程<sup>[5-7]</sup>。本实验通过检测血清microRNA-21(miR-21)在HIE患儿和正常新生儿之间的表达差异,以及与脑功能评分(NBNA)的关系,以探究miR-21在HIE诊断和预后预测的临床意义。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究对象

选取2018年3月—2019年6月西安医学院第二附属医院新生儿HIE患儿56例(HIE组)。其中,男性31例,女性25例;剖宫产20例,顺产36例;胎龄38~40周,平均(39.1±0.8)周;出生体重2 750~4 100 g,平均(3 219.7±251.6)g。纳入标准:符合世界卫生组织制定的新生儿缺氧缺血性脑病的诊断标准<sup>[8]</sup>;母体妊娠期间无其他并发症;出生体重2 630~4 000 g;胎龄37~42周。排除标准:先天性病变引发的脑损伤者;伴有颅内出血、宫内窘迫因素引发的感染和抽搐;对本研究结果会产生影响的感染性病变、肝肾功能障碍者。同时选取健康新生儿60例为对照组。其中男性28例,女性32例;剖宫产22例,顺产38例;胎龄38~40周,平均(39.0±0.6)周;出生体重2 600~4 215 g,平均(3 180±247.2)g。

### 1.2 研究对象血液样本采集

HIE组在出生后24 h(急性期)、7 d(恢复期)分别采集2 ml股静脉血;对照组于出生后24 h采集2 ml股静脉血。血液样品于常温下放置1 h后3 000 r/min离心20 min,取上层1 ml血清至EP管中,于-80℃冰箱冷冻保存。

### 1.3 试剂

RNAsimple总RNA提取试剂盒(DP419)购自天根(北京)生物科技有限公司,PCR引物由上海生物工程股份有限公司合成,引物序列信息见表1。实时定量PCR试剂盒购自大连宝生物工程股份有限公司。实时定量PCR仪购自美国Bio-Red公司。置入-80℃冰箱冷冻保存(购自美国Thermo Fisher公司)。

表1 引物序列

基因	引物序列	引物长度/bp
miR-21	正向: 5'-GGCAGCCTAGCTTATCAGACT-3'	21
	反向: 5'-GTGCAGGCTCCGAGGTATTC-3'	20
GAPDH	正向: 5'-CCACTAGGCGCTCACTGTT-3'	19
	反向: 5'-TGGAATTTGCCATGGGTGGA-3'	20

### 1.4 实时荧光定量PCR检测miRNA的表达

通过总RNA提取试剂盒提取血液样本中的总RNA,进行擦除DNA和逆转录操作,得到cDNA用于逆转录,按照PCR试剂盒说明书配制逆转录体系。实时荧光定量PCR采取二步法,条件如下:95℃预变性30 s;PCR反应,95℃预变性5 s,60℃变性30 s。共循环40次。通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法检测miR-21的表达水平。

### 1.5 新生儿神经行为测定

出生后30 d对两组新生儿进行新生儿神经行为测定(neurobehavioral measurement in neonates, NBNA)<sup>[9]</sup>,包括27项行为能力和20项神经反射,总分40分,评分越高表明新生儿神经功能越好。

### 1.6 统计学方法

数据分析采用SPSS 17.0统计软件。计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,比较用 $t$ 检验;计数资料以例(%)表示,比较用 $\chi^2$ 检验;相关性分析用Pearson法,绘制ROC曲线。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 一般情况比较

两组性别构成、生产方式、体重、胎龄比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表2。

表2 两组一般情况的比较

组别	男/女/ 例	剖宫产/ 例	顺产/ 例	体重/ (g, $\bar{x} \pm s$ )	胎龄/ (周, $\bar{x} \pm s$ )
对照组	28/32	22	38	3 180.0 $\pm$ 247.2	39.0 $\pm$ 0.6
HIE组	31/25	20	36	3 219.7 $\pm$ 251.6	39.1 $\pm$ 0.8
<i>t</i> / $\chi^2$ 值	0.875	0.011		0.857	0.765
<i>P</i> 值	0.346	0.915		0.393	0.446

## 2.2 两组血清 miR-21 表达水平的比较

在HIE发生的急性期(出生后24 h), HIE组患儿血清 miR-21 表达水平与对照组新生儿比较, 差异有统计学意义( $t=10.470, P=0.000$ ), HIE组患儿血清 miR-21 表达水平( $1.857 \pm 0.136$ )高于对照组新生儿( $0.826 \pm 0.127$ )。见图1。

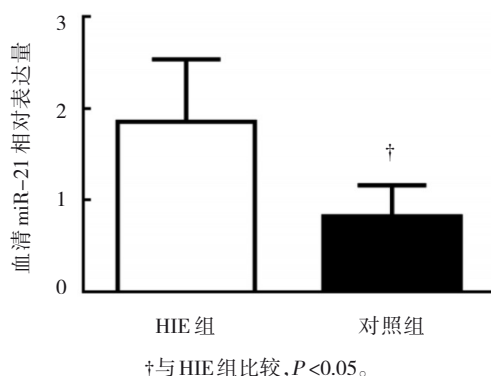


图1 血清 miR-21 表达水平的比较

## 2.3 急性期 miR-21 表达的诊断学意义

通过绘制 miR-21 在两组血清中表达水平的 ROC 曲线, 评价 miR-21 对新生儿 HIE 的诊断效能。ROC 曲线下面积以 0.5 作为参考界值, miR-21 表达水平对 HIE 预测的 ROC 曲线下面积为 0.758 (95% CI: 67.32, 85.78)。结果提示, 血清 miR-21 的表达水平对诊断新生儿 HIE 具有较高的诊断价值。见图2。

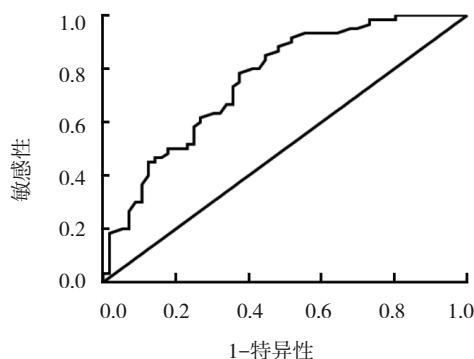


图2 miR-21 诊断新生儿 HIE 的 ROC 曲线

## 2.4 恢复期 miR-21 表达水平与 NBNA 的相关性分析

新生儿 HIE 患儿治疗 7 d 时 miR-21 血清表达水平与恢复 30 d 时 NBNA 评分呈负相关 ( $r=-0.746, P=0.000$ )。见图3。

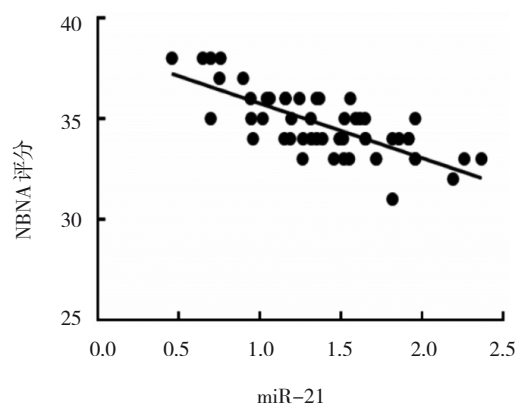


图3 恢复期 miR-21 与 NBNA 评分的相关性

## 3 讨论

近年来随着居民生活水平的提高, 产前和新生儿护理条件得到显著改善。但 HIE 仍然是全世界新生儿发病和死亡的重要原因<sup>[10]</sup>。新生儿 HIE 并非罕见病, 在新生儿中的发病率约为 2‰ ~ 3‰。在一些发展中国家, 其发生频率甚至可上升到 26‰。这些 HIE 患儿中约 24% 在急性期死亡; 其余存活的新生儿中, 也会伴随脑瘫 (10% ~ 20%), 视觉和听觉障碍 (约 40%) 以及运动和行为损害, 例如癫痫, 整体发育迟缓和自闭症等后遗症<sup>[11-12]</sup>。HIE 对社会和家庭带来了巨大的经济和心理负担, 现在已有大量的研究聚焦 HIE 的诊断、干预和治疗。

HIE 可以发生于产前, 围生期或产后等各个时期, 呈急性或慢性发展<sup>[13]</sup>。在损伤的潜伏期 (1 ~ 6 h), 发生氧化代谢、炎症和凋亡级联反应的激活。HIE 损伤后 6 ~ 48 h, 发生高能磷酸化合物的消耗以及兴奋性神经递质和自由基的释放<sup>[14-15]</sup>。在急性缺血长达 1 个月后, 发生晚期细胞死亡, 受伤的大脑重塑和星形胶质细胞的增生<sup>[16-18]</sup>。HIE 的基本病理过程包括: 线粒体损伤、自由基生成、一氧化氮合酶 (NOS) 的激活、炎症反应、神经元细胞凋亡。

MicroRNA (miRNA) 是由基因组内的短反向重复编码的约 22 个核苷酸的内源非编码单链 RNA<sup>[19]</sup>。第一个 miRNA, lin-4, 于 1993 年在线虫中被发现。

脊椎动物中 miRNA 的存在于 2001 年得到证实。目前,已有超过 800 种 miRNA 在人类中被克隆和测序,并且人类基因组中 miRNA 基因的估计数量高达 1 000。miR-21 由单个基因编码,在各种脊椎动物物种中表现出强大的进化保守性<sup>[20]</sup>。

本研究发现,miR-21 在新生儿 HIE 急性期大量表达,可作为新生儿 HIE 的早期标志物,为 HIE 的诊断提供新的生物学标志物。而在 HIE 恢复期,给予常规治疗的 HIE 患儿,发病后 7 d 的 miR-21 表达水平与发病 30 d 后 NBNA 评分呈负相关,说明恢复早期 miR-21 水平对 HIE 患儿后期神经功能恢复具有预测作用,为 HIE 的后期康复治疗提供重要依据。miR-21 的生物学作用在肿瘤研究中得到了很好的证实。实际上,已发现 miR-21 在多种肿瘤组织中过表达,同时 miR-21 可作为胰腺癌、结肠癌等多种癌症的生物学标志物。在免疫系统,miR-21 可通过介导 Th17 细胞分化参与多种自身免疫性疾病的发展<sup>[20-22]</sup>。在循环系统中,miR-21 通过肾素-血管紧张素系统、炎症因子激活和内皮功能障碍参与高血压的发病和靶器官的损伤<sup>[23]</sup>。而 miR-21 在 HIE 患儿疾病发生、发展中发挥的作用可能包括以下几个方面:①miR-21 通过直接作用于 PDCD4 分子调节免疫功能,降低 IL-6 水平,升高 IL-10 水平<sup>[24-25]</sup>,并可以调节 Smad7 分子通过 Th17 细胞调节免疫功能<sup>[26-27]</sup>;②miR-21 通过 PTEN-Akt 信号通路作用于 Caspase-3、Caspase-9、Bcl-2、Bax 等分子,抑制神经元细胞凋亡;③miR-21 通过 PDCD4 分子和 PTEN-Akt 信号通路抑制星形胶质细胞的增生,表性变化和病理性肥大。

综上所述,本研究通过观察新生儿 HIE 患儿血清 miR-21 表达水平和 NBNA 评分,发现 miR-21 表达水平在 HIE 发病早期上升,并且在恢复期 miR-21 水平与 NBNA 评分呈负相关。miR-21 对 HIE 具有早期诊断意义,miR-21 对 HIE 的病情进展具有早期预测效果,为 HIE 的早期诊断和病情进展提供新的依据和生物学标志物。

#### 参 考 文 献 :

- [1] 朱雅芸,谢纯平,区薛宜,等.新生儿缺氧缺血性脑病(HIE)应用超声诊断的临床价值分析[J].现代医用影像学,2019,28(10):2331-2332.
- [2] 曹郴宁.磁共振(MRI)多序列组合和超声(US)在新生儿缺氧缺血性脑病(HIE)中的对比研究[D].衡阳:南华大学,2019.
- [3] 尉胜男,张志红,郑建民,等.新生儿 HIE 患儿 MRI 图像表现及与预后相关性研究[J].中国 CT 和 MRI 杂志,2020,18(8):1-3.
- [4] 翁海美,林明静,周丽霞.影响重度新生儿缺氧缺血性脑病预后的 LOGISTIC 因素分析[J].河北医学,2020,26(5):840-845.
- [5] 孟庆国.CASC2 及 miRNA-21 在 STEMI 患者急诊 PCI 前后循环中的表达变化[D].青岛:青岛大学,2019.
- [6] 许薇,姚少侠,苟小林.血清 miRNA-21 和 miRNA-192 表达与糖尿病肾病的相关性研究[J].河北医科大学学报,2019,40(12):1460-1464.
- [7] 李妹叶.熊果酸通过下调 miRNA-21 作用于 PTEN/PI3K/AKT 通路抑制肺癌 A549 细胞[D].泸州:西南医科大学,2019.
- [8] 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,2005,8:584.
- [9] 张晓燕,芦红茹,宋红霞,等.20 项新生儿行为神经测定评分法对早产儿脑发育及脑损伤的评价[J].中国儿童保健杂志,2010,18(2):159-162.
- [10] 杨书.MR 检查在新生儿缺氧缺血性脑病(HIE)应用[J].影像研究与医学应用,2018,2(1):103-104.
- [11] 王玉雯,臧丽娇,董淑祯,等.新生儿缺氧缺血性脑病血清电解质、血乳酸与预后分析[J].潍坊医学院学报,2018,40(6):447-449.
- [12] 彭艳,洪敏昌,李浩,等.MRI 检查及弥散加权成像(DWI)在诊断新生儿缺氧缺血性脑病中的应用[J].影像研究与医学应用,2018,2(14):141-142.
- [13] 张明静.S100B 蛋白水平与新生儿缺氧缺血性脑病关系的 Meta 分析[D].石家庄:河北医科大学,2019.
- [14] 刘莉,陈光耀,张玉,等.神经节苷脂联合胞磷胆碱及亚低温疗法对新生儿缺氧缺血性脑病血清 VEGF、sICAM-1 水平及预后的影响[J].医学综述,2020,26(4):823-828.
- [15] 曾志涌,黄玉玲,黎云鹏.miRNA-134 对缺氧缺血性脑病动物模型的调控作用及机制探讨[J].中华神经医学杂志,2018,17(9):925-928.
- [16] 康莺歌,常晶,姚爱梅.神经生长因子联合头部亚低温对缺氧缺血性脑病新生儿脑损伤及预后的影响[J].中国实用神经疾病杂志,2020,23(12):1091-1094.
- [17] 王文辉,冷建刚,李庆海,等.新生儿缺氧缺血性脑病的治疗进展[J].医学理论与实践,2020,33(12):1922-1924.
- [18] 汪瑾,胡旭红.亚低温治疗前温度控制对新生儿缺氧缺血性脑病预后的影响[J].中国儿童保健杂志,2020,28(7):817-820.
- [19] 李恩萍,史天云,王博,等.血浆 miRNA-200b 及 miRNA-21 在上皮性卵巢癌中的表达及临床意义[J].癌症进展,2020,18(3):258-261.
- [20] 李艳,李新宇.妊娠糖尿病患者外周血 miRNA-21 检测的临床应用价值[J].现代检验医学杂志,2020,35(2):35-38.

- [21] NEGROI I, HOSTIUC S, SARTELLI M, et al. MicroRNA-21 as a prognostic biomarker in patients with pancreatic cancer - a systematic review and meta-analysis[J]. *Am J Surg*, 2017, 214(3): 515-524.
- [22] TSUKAMOTO M, IINUMA H, YAGI T, et al. Circulating exosomal MicroRNA-21 as a biomarker in each tumor stage of colorectal cancer[J]. *Oncology*, 2017, 92(6): 360-370.
- [23] WANG S W, WAN X C, RUAN Q G. The MicroRNA-21 in autoimmune diseases[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(6): 864.
- [24] 王平军, 曾其毅. miR-21 在脂多糖诱导人肾皮质近曲小管上皮细胞炎症反应中的变化及其作用[J]. *山东医药*, 2018, 58(48): 29-32.
- [25] 陈绵龄, 马硕一. miR-21 通过靶向 PDCD4 调控三阴性乳腺癌细胞的迁移和侵袭[J]. *癌变·畸变·突变*, 2020, 32(4): 292-297.
- [26] 谭晓勇. miR-21 调控 PTEN 和 SMAD7 调节 PI3K/AKT 信号通路在二甲双胍抗血管生成中的作用及机制[D]. 泸州: 西南医科大学, 2017.
- [27] 扎西吉, 咸育婷. 自身免疫性肝病患者外周血 miR-21, miR-155 表达及其与 Th17, Treg 细胞平衡的关系[J]. *胃肠病学和肝病学杂志*, 2020, 29(5): 581-586.

(张西倩 编辑)

**本文引用格式:** 卞伟妮, 吴新婷. 缺血缺氧性脑病新生儿 microRNA-21 表达及临床价值[J]. *中国现代医学杂志*, 2021, 31(9): 72-76.

**Cite this article as:** BIAN W N, WU X T. Clinical value of microRNA-21 in neonatal hypoxic ischemic encephalopathy[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2021, 31(9): 72-76.