

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2022.08.004
文章编号: 1005-8982 (2022) 08-0015-05

儿科感染性疾病·论著

病毒性脑炎患儿血清 microRNA-125b 与病情严重程度及预后的关系*

顾海红^{1,2}, 王培养¹, 顾承萍¹, 黄烈平¹, 蔡荷飞²

(1.舟山市妇女儿童医院 儿科, 浙江 舟山 316000; 2.台州市中心医院 儿科,
浙江 台州 318000)

摘要: 目的 探究病毒性脑炎(VE)患儿血清microRNA-125b(miR-125b)与病情严重程度和预后的关系。**方法** 选取2018年1月—2020年3月在舟山市妇女儿童医院儿科就诊的118例VE患儿(重度组55例,轻度组63例),另取同期该院40例健康体检儿童作为对照组。收集研究对象的一般资料、临床检测结果等。提取血浆RNA,采用实时荧光定量聚合酶链反应检测miR-125b相对表达量。分析miR-125b相对表达量与VE患儿临床特征及预后的关系。采用受试者工作特征曲线下面积评价miR-125b对VE患儿预后的诊断价值,并对VE患儿预后的危险因素进行逐步多因素Logistic回归分析。**结果** 对照组miR-125b相对表达量低于轻度组和重度组($P < 0.05$);重度组miR-125b相对表达量高于轻度组($P < 0.05$)。VE患儿血清miR-125b相对表达量与惊厥、偏瘫、多器官损伤和应激性高血糖呈正相关($r_s = 0.034, 0.017, 0.205$ 和 0.160 ,均 $P < 0.05$),与年龄、患者发热、意识障碍、低钠血症无相关性($P > 0.05$)。血清miR-125b预测VE患儿预后的AUC为0.843(95% CI: 0.752, 0.891)。当临界值为1.725时,诊断的敏感性(87.5%)、特异性(71.2%)和准确性(76.4%)最高。Logistic回归分析结果显示,惊厥、应激性高血糖、miR-125b是VE患儿预后不良的危险因素($P < 0.05$)。**结论** 血清miR-125b与VE的严重程度及预后有关,具有一定的诊断价值。

关键词: 病毒性脑炎; microRNA-125b; 儿童; 预后; 诊断

中图分类号: R725.1

文献标识码: A

Relationship between serum microRNA-125b level and disease severity and prognosis in children with viral encephalitis*

Hai-hong Gu¹, Pei-yang Wang¹, Cheng-ping Gu¹, Lie-ping Huang¹, He-fei Cai¹

(1. Department of Pediatrics, Zhoushan Women and Children's Hospital, Zhoushan, Zhejiang 316000, China; 2. Department of Pediatrics, Taizhou Central Hospital, TaiZhou, Zhejiang 318000, China)

Abstract: Objective to explore the relationship between the serum level of microRNA-125b (miR-125b) and disease severity and prognosis of children with viral encephalitis (VE). **Methods** A total of 118 children with VE (including 55 severe cases and 63 mild cases) seeking medical treatments in the Department of Pediatrics of Zhoushan Women and Children's Hospital from January 2018 to March 2020 were selected, and another 40 healthy children in the hospital during the same period were set as the control group. We collected the clinical data and blood samples of all the participants, and the expression of miR-125b was detected by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). The relationship between the expression of miR-125b and the clinical features and prognosis of children with VE was analyzed. The area under the receiver operating characteristic (ROC) curve

收稿日期: 2021-11-29

* 基金项目: 2016年浙江省医药卫生科技计划项目(No: 2016KYB317)

[通信作者] 黄烈平, E-mail: huanglp8962@163.com; Tel: 13868219705

(AUC) was calculated to evaluate the prognostic value of miR-125b. Logistic regression analysis was conducted to determine the prognostic risk factors of VE. **Results** Compared with mild group and severe group, the expression of miR-125b in control group was decreased ($P < 0.05$). Besides, the expression of miR-125b in the severe group was higher than that in the mild group ($P < 0.05$). The expression of serum miR-125b was positively correlated with convulsions, hemiplegia, multiple organ injury, and stress hyperglycemia ($r_s = 0.034, 0.017, 0.205$ and 0.160 , respectively, all $P < 0.05$), but was not correlated with age, fever, disturbance of consciousness, hyponatremia, and hypokalemia in children with VE (all $P > 0.05$). The AUC of serum miR-125b level for predicting the prognosis of VE was 0.843 (95% CI: 0.752, 0.891). When the cut-off value was 1.725, the highest sensitivity (87.5%), specificity (71.2%) and accuracy (76.4%) were observed. In addition, convulsions, stress hyperglycemia and miR-125b were factors affecting the prognosis in children with VE. **Conclusions** The expression of serum miR-125b is related to and of certain value for predicting the disease severity and prognosis of VE.

Keywords: viral encephalitis; microRNA-125b; children; prognosis; diagnosis

病毒性脑炎 (viral encephalitis, VE) 是一种中枢系统感染性疾病, 由各种病毒直接侵入中枢神经系统引起^[1]。VE 的临床症状主要表现为发热、呕吐、精神错乱、头痛、精神障碍、意识障碍等^[1]。全球流行病学资料显示, VE 患儿的年发病率从 3.5/10 万 ~ 7.4/10 万上升到 16.0/10 万^[2]。轻度 VE 患儿如能得到快速准确的诊断和治疗, 预后较好; 严重的 VE 患儿易出现神经系统后遗症, 甚至死亡。VE 的诊断较为复杂, 由于其非特异性的临床表现, 目前主要通过脑脊液病原学检查、磁共振成像、脑电图等诊断^[3]。这些传统的诊断方法特异性、敏感性低, 容易错过早期治疗机会。早期临床诊断和治疗是降低发病率和病死率, 改善预后的关键。

近年来, 随着分子生物学领域的迅速发展, 核酸分析技术因高效和经济, 被广泛应用于临床检测、诊断等^[4]。MicroRNA (miRNA) 被证实在调控病毒感染中发挥重要作用, 比如肝脏特异性的 miR-122 促进丙型肝炎病毒的复制, miR-32 限制灵长类泡沫病毒 1 型在人细胞中的积累等。MicroRNA-125b (miR-125b) 作为一种高丰度的 miRNA, 广泛参与各种细胞的代谢过程, 比如肿瘤细胞的增殖、分化、转移及凋亡^[5-6]。有研究表明, miR-125b 是预测多种癌症化学药物治疗反应状态及预后的生物标志物之一^[6-7]。miR-125b 靶向于 3'-人类免疫缺陷病毒的 mRNA, 从而限制病毒复制^[8]。另外, 也有研究表明 miR-125b 与慢性乙型肝炎感染密切相关^[4,9]。因此, 探索 miR-125b 在调控病毒复制和发病机制中的作用可能有助于开发新的治疗方法用于病毒性疾病。然而, 目前对 VE 患儿血清 miR-125b 的研究相对较少, 本研究着重于分析血

清 miR-125b 与 VE 患儿病情严重程度及预后的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2018 年 1 月—2020 年 3 月在舟山市妇女儿童医院儿科就诊的 118 例 VE 患儿为病例组。其中, 男性 60 例, 女性 58 例; 年龄 2 ~ 13 岁, 平均 (6.63 ± 3.88) 岁; 体重 (24.99 ± 10.61) kg。另取同期本院 40 例健康体检儿童作为对照组。其中, 男性 21 例, 女性 19 例; 年龄 1 ~ 13 岁, 平均 (6.72 ± 2.19) 岁; 体重 (25.79 ± 11.01) kg。两组儿童性别、年龄及体重比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 具有可比性。本研究经医院医学伦理委员会批准, 纳入对象签订知情同意书。

病例组按 VE 严重程度分为轻度组 (63 例) 和重度组 (55 例)。轻度组仅包括伴有头痛、头晕和颈部僵硬等症状; 重度组患儿表现为意识障碍、谵妄、不安、脑神经麻痹、肢体瘫痪、不自主运动、泌尿系统紊乱和抽搐。本研究一共鉴定出 10 种病毒, 包括脊髓灰质炎病毒、柯萨奇病毒 A 和 B、埃可病毒、流行性腮腺炎病毒、单纯疱疹病毒及腺病毒等。

1.2 纳入与排除标准

1.2.1 纳入标准 ①急性或亚急性发作; ②有脑实质病变的症状和体征; ③发病前 1 周出现呼吸道感染、腹泻或发热; ④腮腺炎或三叉神经带状疱疹; ⑤脑脊液常规检查异常; ⑥脑电图异常; ⑦ PCR 检查病毒阳性。

1.2.2 排除标准 自身免疫性脑炎、脓毒症相关性脑病等。

1.3 标本收集与处理

病例组患儿在入院后第2天上午6:00~9:00穿刺抽取静脉全血10 mL,置于抗凝管。对照组儿童于体检当天上午6:00~9:00空腹采集等体积静脉全血。按照标准Ficoll密度梯度离心,将血浆置于1 mL无核酸酶EP管(上海碧云天生物技术有限公司),置于超低温冰箱保存。

1.4 实时荧光定量聚合酶链反应检测 miR-125b 的表达

按照RNA提取试剂盒(日本TaKaRa公司)说明书提取血清总RNA,逆转录获得cDNA。采用实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)检测血清miR-125b相对表达量。miR-125b和miR-16(内参基因)的引物分别为5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTCACAG-3'和5'-AAAATATGGAACGCTTCACGAATTTG-3',长度50 bp。qRT-PCR反应条件:95℃预变性3 min,95℃变性30 s,58℃退火30 s,72℃延伸30 s,共计35个循环。每个样品平行测试3次,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因相对表达量, $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{病例组}} - \Delta Ct_{\text{对照组}}$, $\Delta Ct = Ct_{\text{目标基因}} - Ct_{\text{内参基因}}$ 。

1.5 VE 患儿的治疗及结局

VE患儿保持呼吸道通畅,维持水电解质平衡、氧气摄入和能量供应。对高热患儿采用物理降温 and 医学降温治疗,必要时进行人工冬眠。采用中西医结合抗病毒治疗,严重者静脉注射免疫球蛋白。对颅内压升高和惊厥患儿分别采用对症治疗。呼吸衰竭患儿采用辅助通气治疗,危重患儿送至儿童重症监护室。患儿在治疗3周后进行评估。神经系统后遗症(痛、意识障碍、精神症状、惊厥)患儿纳入预后不良组,无神经系统异常者纳入预后良好组。其中不良预后组39例,男性21例,女性18例;年龄(6.82±3.76)岁;肢体瘫痪6例,语言障碍5例,智力迟钝8例,癫痫7例,视力障碍1例;≥2种后遗症10例;2例死亡。预后良好组79例,男性39例,女性40例;年龄(6.54±3.76)岁。预后不良组与预后良好组性别、年龄等基线特征比较,差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。

1.6 统计学方法

数据分析采用SPSS 21.0统计软件。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,比较用方差分析,进

一步两两比较用Tukey检验;计数资料以构成比或率(%)表示,比较用 χ^2 检验;绘制受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线;影响因素的分析采用单因素和多因素Logistic回归模型;相关性分析用Spearman法。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 miR-125b 相对表达量比较

重度组、轻度组、对照组miR-125b相对表达量分别为(2.81±0.54)、(1.9±0.26)和(1.0±0.51),经方差分析,差异有统计学意义($F=5.339, P=0.006$)。进一步两两比较结果:对照组miR-125b相对表达量低于轻度组和重度组($P<0.05$);重度组miR-125b相对表达量高于轻度组($P<0.05$)。

2.2 血清 miR-125b 与 VE 患儿临床症状的关系

在VE患儿中,血清miR-125b与年龄、发热、意识障碍、低钠血症、无相关性($P>0.05$);血清miR-125b与惊厥、多器官损伤、应激性高血糖及偏瘫呈正相关($P<0.05$)。见表1。

表1 VE患儿临床症状与血清miR-125b的相关性

因素	r_s 值	P 值
年龄	-0.003	0.679
发热	0.006	0.428
意识障碍	0.013	0.508
惊厥	0.034	0.005
多器官损伤	0.205	0.023
应激性高糖	0.160	0.012
低钠血症	0.009	0.417
偏瘫	0.017	0.035

2.3 血清 miR-125b 对 VE 患儿预后的预测价值

血清miR-125b预测VE患儿预后的曲线下面积(area under the curve, AUC)为0.843;当截断值为1.725时,诊断敏感性为87.5%(95% CI: 0.752, 0.891)、特异性为71.2%(95% CI: 0.812, 0.921)、准确性为76.4%(95% CI: 0.659, 0.781),具有良好的预测价值。见图1。

2.4 VE 患儿预后影响因素的单因素分析

单因素分析提示,惊厥[OR=2.190(95% CI: 1.101, 4.806)]、多器官损伤[OR=2.371(95% CI:

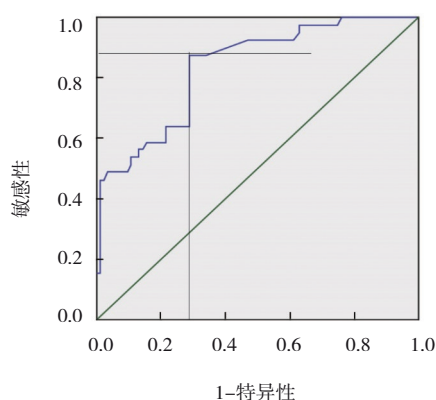


图1 miR-125b预测VE患儿预后的ROC曲线

1.211, 4.861)、应激性高血糖 [$\hat{O}R=5.271$ (95% CI: 2.138, 12.245)]、偏瘫 [$\hat{O}R=4.654$ (95% CI: 1.385, 9.633)]、miR-125b [$\hat{O}R=0.329$ (95% CI: 0.132, 0.531)] 是VE患儿预后的影响因素 ($P < 0.05$)。见表2。

2.5 VE患儿预后影响因素的多因素分析

采用逐步多因素 Logistic 回归模型分析惊厥、偏瘫、多器官损伤、应激性高血糖、miR-125b 对预后的影响,引入水准为 0.05,剔除水准为 0.10,

表2 VE患儿预后影响因素的单因素分析参数

自变量	Wald χ^2	P 值	$\hat{O}R$	95% CI	
				下限	上限
年龄	0.78	0.182	0.935	0.460	1.979
性别	0.58	0.152	0.683	0.300	1.614
发热	0.42	0.121	0.592	0.247	1.635
意识障碍	0.53	0.235	1.264	0.683	2.791
惊厥	21.00	0.028	2.190	1.101	4.806
多器官损伤	25.20	0.016	2.371	1.211	4.861
应激性高血糖	18.20	0.032	5.271	2.138	12.245
低钠血症	0.610	0.268	1.884	0.879	5.527
偏瘫	28.10	0.021	4.654	1.385	9.633
miR-125b	20.10	0.021	0.329	0.132	0.531

结果:惊厥 [$\hat{O}R=4.634$ (95% CI: 1.497, 15.752)]、应激性高血糖 [$\hat{O}R=6.931$ (95% CI: 1.144, 43.271)] 和 miR-125b [$\hat{O}R=5.647$ (95% CI: 1.155, 28.276)] 是VE患儿预后不良的危险因素 ($P < 0.05$)。见表3。

表3 VE患儿预后影响因素的多因素分析参数

自变量	b	S_b	Wald χ^2	P 值	$\hat{O}R$	95% CI	
						下限	上限
惊厥	1.53	0.97	22.82	0.015	4.634	1.497	15.752
应激性高血糖	1.94	1.01	47.09	0.036	6.931	1.144	43.271
偏瘫	-0.25	1.31	0.35	0.541	0.778	0.124	3.513
miR-125b	1.73	0.92	37.68	0.031	5.647	1.155	28.276
多器官损伤	-1.30	1.21	0.05	0.067	0.272	0.065	1.087

3 讨论

VE 是病毒直接感染引发神经功能障碍的脑实质炎症。VE 的临床表现多样,预后差,早期诊断及治疗是影响预后的重要因素。由于疾病的复杂性、缺乏特异性的临床症状及有限的诊断设备,使VE患儿的诊断具有挑战性。因此,寻求新的VE诊断方法成为急需解决的问题。

miR-125b 有 miR-125b-1 和 miR-125b-2 2 个前体,其编码基因分别位于第 11 号染色体和第 21 号染色体上,但是两者具有相同成熟的 miR-125b 碱基序列^[10]。有研究发现,在不同的恶性肿瘤中,miR-125b 作用不同,miR-125b 的表达在恶性肿瘤的诊断及预后评估中具有重要价值^[5]。有研究发现,在原发性肝

细胞癌患者中,血清 miR-125 相对表达量显著低于正常对照,进一步发现其与患者临床症状密切相关,比如与肝细胞癌肿瘤大小、肝硬化及 TNM 分期有关^[11]。miR-125 诊断原发性肝细胞癌的 AUC 为 0.917,敏感性和特异性高达 85.9% 和 93.5%。本研究发现,血清 miR-125b 在感染性疾病中具有重要作用。血清 miR-125b 预测 VE 患儿预后的 AUC 为 0.843;当截断值为 1.725 时,诊断敏感性(87.5%)、特异性(71.2%)和准确性(76.4%)最高,具有良好的预后价值。这些发现与其他感染性疾病类似。在脓毒症中,miR-125b 可以减少心肌单核巨噬细胞及中性粒细胞的趋化、聚集,降低肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 和白细胞介素-1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β) 等

炎症因子的表达,减轻脓毒症对心脏的损伤,提高生存率^[12-13]。

本研究发现,miR-125b在VE患儿中高表达,且重度组也高于轻症组,提示miR-125b与VE病情严重程度呈正相关。分析其原因,可能与炎症反应、血管内皮细胞损伤有关。既往研究发现,TNF- α 是miR-125b的靶基因之一,同时miR-125b的过度表达可能减少和抑制TNF- α 的合成。有研究发现TNF- α 与VE病情严重程度呈正相关^[13],本研究中重度组miR-125b高于轻症组,提示当疾病程度加重时,miR-125b发挥正反馈保护作用。另外,血管内皮细胞损伤在VE的发病机制中起重要作用。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)在血管内皮细胞中具有高特异性,与VE的病理过程及发病机制密切相关^[14]。另外也有研究报道,VEGF基因翻译存在miR-125b结合位点。根据基因相互作用推测,VEGF可能是miR-125b的靶基因之一,可被miR-125b过表达下调。

另外,本研究还证实惊厥、偏瘫、多器官损害、应激性高血糖、miR-125对VE患儿预后有影响。并且癫痫、应激性高血糖和miR-125b是VE患儿预后不良的危险因素。有证据支持癫痫发作时间与VE预后密切相关,发作时间越长,预后越差^[9]。影响预后的另一个危险因素是应激性高血糖,其可加速内环境紊乱,病情恶化被认为是直接影响VE预后的因素之一。此外,miR-125b上调可促进疾病增殖和迁移^[15],并证实可以作为胃癌和胶质母细胞瘤预后的生物标志物。本研究提示早期治疗VE时,需要密切关注癫痫状态及血糖变化,避免出现VE所致的神经功能障碍。

综上所述,miR-125b在VE患儿中高表达,且与VE病情严重程度呈正相关,提示miR-125b在VE的预测和诊断中具有重要作用,有望为VE的早期诊断和治疗提供理论依据。然而,miR-125b在VE中的作用机制尚不清楚,仍然需要探究miR-125b在其他感染性疾病中的作用。

参 考 文 献 :

- [1] DOMINGUES R B. Viral encephalitis: current treatments and future perspectives[J]. Central Nervous System Agents In Medicinal chemistry, 2012, 12(4): 277-285.
- [2] THOMPSON C, KNEEN R, RIORDAN A, et al. Encephalitis in children[J]. Archives of disease in childhood, 2012, 97(2): 150-161.
- [3] GAO Q L, MA Y X, YUAN D W, et al. MicroRNA-125b in peripheral blood: a potential biomarker for severity and prognosis of children with viral encephalitis[J]. Neurol Sci, 2017, 38(8): 1437-1444.
- [4] TIAN Z Q, ZHANG J, HE H Y, et al. miR-525-3p mediates antiviral defense to rotavirus infection by targeting nonstructural protein 1[J]. Biochimica Et Biophysica Acta Molecular Basis of Disease, 2017, 1863(12): 3212-3225.
- [5] WEI X T, CHEN D, LV T, et al. Serum microRNA-125b as a potential biomarker for glioma diagnosis[J]. Mol Neurobiol, 2016, 53(1): 163-170.
- [6] 曹作增,王梅,沈晓萍,等. 子宫内膜异位症患者血浆miR-125a-3p、miR-140-5p的水平变化及临床意义[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(12): 1487.
- [7] WU M W, TAN X D, LIU P, et al. Role of exosomal microRNA-125b-5p in conferring the metastatic phenotype among pancreatic cancer cells with different potential of metastasis[J]. Life Sciences, 2020, 255(2): 125-127.
- [8] MANTRI C K, PANDHARE DASH J, MANTRI J V, et al. Cocaine enhances HIV-1 replication in CD4⁺T cells by down-regulating miR-125b[J]. PLoS One, 2012, 7(12): e51387.
- [9] GRECO F, COCUZZA M D, SMILARI P, et al. Nonconvulsive status epilepticus complicating epstein-barr virus encephalitis in a child[J]. Case Reports in Pediatrics, 2014, 2014(2): 213-215.
- [10] 李莉,孙颖颖,王怡璐等. miR-125b在急性加重期慢性阻塞性肺疾病患者血浆中的表达及与肺功能和炎症细胞因子的关系[J]. 现代生物医学进展, 2020, 20(5): 944.
- [11] 陈鹏飞,霍显浩,刘文庆等. miR-125b抑制胶质瘤细胞增殖作用机制研究[J]. 肿瘤代谢与营养电子杂志, 2020, 7(1): 64.
- [12] HAYASAKA D, SHIRAI K, AOKI K, et al. TNF- α acts as an immunoregulator in the mouse brain by reducing the incidence of severe disease following Japanese encephalitis virus infection[J]. PLoS One, 2013, 8(8): e71643.
- [13] 万琦,余宝刚等. miR-125b通过TLR4/NF- κ B信号通路对心脏成纤维细胞增殖和迁移的影响[J]. 吉林大学学报(医学版), 2020, 46(2): 286.
- [14] 杨风华,王华,张俊梅,等. 病毒性脑炎患儿脑脊液中VEGF20VCAM-1变化及其意义[J]. 中国当代儿科杂志, 2008, 10(3): 285-289.
- [15] JIANG F Z, LIU T, HE Y Y, et al. miR-125b promotes proliferation and migration of type II endometrial carcinoma cells through targeting TP53INP1 tumor suppressor in vitro and in vivo[J]. BMC Cancer, 2011, DOI:10.1186/1471-2407-11-425.

(童颖丹 编辑)

本文引用格式: 顾海红,王培养,顾承萍,等. 病毒性脑炎患儿血清microRNA-125b与病情严重程度及预后的关系[J]. 中国现代医学杂志, 2022, 32(8): 15-19.

Cite this article as: GU H H, WANG P Y, GU C P, et al. Relationship between serum microRNA-125b level and disease severity and prognosis in children with viral encephalitis[J]. China Journal of Modern Medicine, 2022, 32(8): 15-19.