

miRNA-21 在新生儿缺氧缺血性脑病 患儿血清中表达的意义

石计朋¹, 栗延伟², 桑桂梅¹, 王卫卫¹, 郭洪旭¹, 唐成和¹

1. 新乡医学院第一附属医院新生儿科, 河南 新乡 453100; 2. 新乡医学院第三附属医院

摘要: **目的** 探讨新生儿缺氧缺血性脑病(hypoxic-ischemic brain damage, HIE)患儿血清 miRNA-21 表达及其对新生儿 HIE 发生发展的意义,为新生儿 HIE 的早期诊断和预后提供科学依据。 **方法** 将 2015 年 3 月-2016 年 11 月在新乡医学院第一附属医院出生的新生儿,分为:缺氧缺血组(HIE 组)51 例并用神经节苷脂对其进行治疗;正常对照组 28 例,共计 79 例。两组于生后 24~48 h 内及治疗 15 d 后分别采静脉血 5 ml。利用实时荧光定量 PCR 检测血清 miRNA-21 和低氧诱导因子 1 α (HIF-1 α)的表达水平。 **结果** 治疗前 HIE 组与对照组比较,HIE 组血清 miRNA-21 含量(5.25 \pm 2.17)显著高于对照组(1.21 \pm 0.10)($P<0.05$);血清 HIF-1 α 含量(8.76 \pm 3.23)高于对照组(1.28 \pm 0.10)($P<0.05$)。治疗 15 d 后,HIE 组血清 miRNA-21 含量(2.13 \pm 1.06)和 HIF-1 α 含量(3.64 \pm 3.34)与治疗前(5.25 \pm 2.17、8.76 \pm 3.23)相比,均显著降低($P<0.05$)。 **结论** 血清 miRNA-21 和 HIF-1 α 高表达与新生儿缺氧缺血性脑病相关,有望作为新生儿缺氧缺血性脑病早期诊断和预后的生物学指标。

关键词: 缺氧缺血性脑病;新生儿;微小 RNA-21;缺氧诱导因子-1 α

中图分类号:R722.12 **文献标识码:**A **文章编号:**1006-3110(2018)06-0655-04 DOI:10.3969/j.issn.1006-3110.2018.06.005

Significance of serum miRNA-21 expression in neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy

SHI Ji-peng*, LI Yan-wei, SANG Gui-mei, WANG Wei-wei, GUO Hong-xu, TANG Cheng-he

基金项目:河南省医学科技攻关计划项目(201602148);河南省神经修复重点实验室开放课题(HNSJXF-2016-017)

作者简介:石计朋(1981-),男,河南太康人,硕士,主治医师,研究方向:新生儿脑损伤。

通信作者:唐成和,E-mail:tch8275@163.com。

人员有关恶性淋巴瘤诊治规范的培训,做到早诊早治,规范治疗与心理支持,降低疾病所带来的医疗与心理负担。三是加强对恶性淋巴瘤的监测与病因学的相关研究,明确重庆市恶性淋巴瘤的高影响因素,提出相关的防控策略。

参考文献

- [1] 张敏,李广灿,张玉玲,等. 2003-2007 年中国恶性淋巴瘤发病与死亡分析[J]. 中国肿瘤,2012,21(3):190-196.
- [2] 张玉玲,虞吉好,郑荣寿,等. 中国 2009 年恶性淋巴瘤发病与死亡分析[J]. 中国肿瘤,2013,22(5):338-343.
- [3] Chen WQ,Zheng RS,Zuo TT,et al. National cancer incidence and mortality in China,2012[J]. Chin J Cancer Res,2016,28(1):1-11.
- [4] 袁延楠,杨雷,孙婷婷,等. 1998-2010 年北京市户籍居民恶性淋巴瘤发病情况[J]. 中华预防医学杂志,2014,48(8):669-674.
- [5] 汪洋辉,毛伟敏,李辉章,等. 2000-2009 年浙江省肿瘤登记地区淋巴瘤发病与死亡分析[J]. 中国肿瘤,2014,23(3):180-186.
- [6] 王琳,谢贤和,陈岩菊,等. 中国人群恶性淋巴瘤发病影响因素的 Meta 分析[J]. 实用肿瘤杂志,2010,25(4):477-480.
- [7] 刘志刚,徐才刚. 淋巴瘤的发病现状与影响因素[J]. 西部医学,2013,25(7):961-964.
- [8] 杨功焕,王俊芳,万霞,等. 影响中国人群疾病死亡因素的定量分析[J]. 中华流行病学,2005,26(12):934-938.

- [9] 国家癌症中心,卫生部疾病预防控制局. 中国肿瘤登记年报[M]. 北京:军事医学科学出版社,2012:109-112.
- [10] Chen WQ, Zheng RS, Zeng HM, et al. Annual report on status of cancer in China,2011[J]. Chin J Cancer Res,2015,27(1):2-12.
- [11] Li CY,Ye YC,Liang GY, et al. Cancer incidence and mortality survey in Wuwei, Gansu province, Northwestern China from 2003 to 2012: a retrospective population-based study[J]. Chin Med J(Engl), 2016, 129(6):636-644.
- [12] 全国肿瘤登记中心,卫生部疾病预防控制局. 2008 年中国肿瘤登记年报[M]. 北京:军事科学出版社,2009:108-111.
- [13] 全国肿瘤登记中心,卫生部疾病预防控制局. 2009 年中国肿瘤登记年报[M]. 北京:军事科学出版社,2010:70-71.
- [14] 全国肿瘤登记中心,卫生部疾病预防控制局. 2010 年中国肿瘤登记年报[M]. 北京:军事科学出版社,2011:76-77.
- [15] 国家癌症中心,卫生部疾病预防控制局. 2011 年中国肿瘤登记年报[M]. 北京:军事科学出版社,2012:88-90.
- [16] 黄小梅. 重庆市人口老龄化现状与对策研究[J]. 重庆行政(公共论坛),2013,14(1):54-56.
- [17] 徐才刚,郑素萍,黄杰,等. 四川省恶性淋巴瘤发病与环境因素的病例对照研究[J]. 中华流行病学杂志,2003,24(10):875-878.
- [18] 徐才刚,朱焕玲,吴泰相,等. 恶性淋巴瘤发病与病毒感染的配对病例-对照研究[J]. 四川大学学报(医学版),2004,35(2):247-250.

收稿日期:2017-06-12

* Department of Neonatology, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical College, Xinxiang, Henan 453100, China

Corresponding author: TANG Cheng-he, E-mail: tch8275@163.com

Abstract: **Objective** To explore the expression of serum microRNA-21 (miRNA-21) in neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE) and its significance in the occurrence and development of HIE in neonatal patients, and to provide a scientific basis for the early diagnosis and prognosis of HIE in neonates. **Methods** Seventy-nine neonates born in the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical College from March 2015 to November 2016 were divided into the HIE group (n=51) and the normal control group (n=28). 51 neonatal patients in the HIE group were treated with ganglioside, 5 ml of venous blood were collected from each neonate in the two groups within 24–48 hours of birth and after 15 days of therapy. The expression levels of serum miRNA-21 and hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) were detected by real-time fluorescence quantitative PCR. **Results** Before the treatment, the serum levels of miRNA-21 and HIF-1 α were significantly higher in the HIE group than in the control group ((5.25 \pm 2.17) vs. (1.21 \pm 0.10), (8.76 \pm 3.23) vs. (1.28 \pm 0.10), both $P<0.001$). After 15 days of therapy, the serum levels of miRNA-21 and HIF-1 α were significantly declined as compared with those before the treatment ((2.13 \pm 1.06) vs. (5.25 \pm 2.17), (3.64 \pm 3.34) vs. (8.76 \pm 3.23), both $P<0.05$). **Conclusions** High expression of serum miRNA-21 and HIF-1 α is correlated with HIE in neonates, which may be used as biological indicators for the early diagnosis and prognosis of neonatal HIE.

Key words: hypoxic-ischemic encephalopathy; neonate; microRNA-21 (miRNA-21); hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α)

缺氧缺血性脑病(hypoxic-ischemic brain damage, HIE)是最常见的新生儿中枢神经系统疾病,预后差,死亡率高。但临床上尚无有效地早期诊断和治疗的方法,因此如何早期评价病情及减轻脑组织损伤程度尤为重要。研究发现^[1],微小 RNA(microRNAs, miRNA)在中枢神经系统发育及相关疾病的发生、发展过程中起着重要的作用,血清中 miRNA 的异常表达也可作为 HIE 早期诊断的标志物^[2-3]。目前 miRNA21 表达与 HIE 发生的关系尚不十分清楚,因此,本研究通过采用实时荧光定量 PCR(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)技术检测神经节苷脂治疗 HIE 前后患儿血清中 miRNA-21 和缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)的表达水平。HIF-1 α 在低氧条件下才能稳定表达,在组织缺氧损伤的发生发展过程中起着极其重要的作用,血清 HIF-1 α 含量在一定程度上反映了缺血组织的损伤程度。因此,本文通过探讨 miRNA-21 和 HIF-1 α 在 HIE 患儿治疗前后血清中的变化初步揭示了 miRNA-21 和 HIF-1 α 关系,为阐明 HIE 的发病机制提供理论基础,同时也为临床上早期诊断和基因治疗 HIE 提供潜在的生物学指标。

1 对象与方法

1.1 研究对象 选取 2015 年 3 月–2016 年 11 月在新乡医学院第一附属医院分娩胎龄>37 周、体重>2 500 g、按照 HIE 的诊断标准^[4]、诊断为 HIE 患者并排除先天发育畸形的足月新生儿为 HIE 组,共 51 例,采用神经节苷脂(ganglioside, GMI)治疗,40 mg/d+5%葡萄糖注射液静脉点滴,治疗 15 d。正常新生儿 28 例

为对照组(未进行 GMI 治疗),分别在生后 24~48 h 内和在 HIE 组 GMI 治疗后第 15 d 时,采静脉血 5 ml,4 ℃ 3 500 r/min 离心 10 min 后取上清,-80 ℃ 保存备用。本研究经新乡医学院第一附属医院伦理委员会批准,监护人知情同意。

1.2 方法

1.2.1 仪器与试剂 血清 RNA 提取试剂盒(美国 ABI 公司),qRT-PCR 试剂盒(美国 ABI 公司),内参 U6 和 β -actin、miRNA-21 和 HIF-1 α , RT-PCR 引物(上海生工),qRT-PCR 仪(美国 ABI 公司)。NanoDrop2000 微量分光光度计(美国 Thermo Scientific 公司)。神经节苷脂(齐鲁制药有限公司,国药准字 H20056783)。

1.2.2 血清总 RNA 抽提和纯化 通过 Trizol 一步法提取血清总 RNA。利用 NanoDrop2000(Thermo Scientific 公司)微量分光光度计,测定所提取的 RNA 浓度。

1.2.3 cDNA 制备 反应体系为 20 μ l:血清 RNA 2 μ g、引物 0.8 μ l、10 mM dNTP 0.4 μ l、M-MLV 反转录酶 0.3 μ l、5 \times 的缓冲液 4 μ l、RNase Inhibitor 0.4 μ l,然后补 DEPC 水至 20 μ l。轻弹反应液混匀后,37 ℃ 水浴 1 h。85 ℃ 5 min,4 ℃ 保存。

1.2.4 MicroRNA real-time PCR 依照实时荧光定量 PCR 试剂盒说明书,miRNA21 反应体系以 U6 为内参(HIF-1 α ,以 β -actin 为内参),25 μ l 反应体系:5 μ l cDNA、1 μ l 上下游引物(10 μ mol/L)、0.4 μ l TaqDNA 聚合酶(2.5 U/ μ l),用 PCR 反应液补足 25 μ l。qRT-PCR 反应条件:95 ℃ 30 s;95 ℃ 5 s,60 ℃ 30 s,40 cycles。引物如下所见。miRNA21:(70 bp)上游引物:

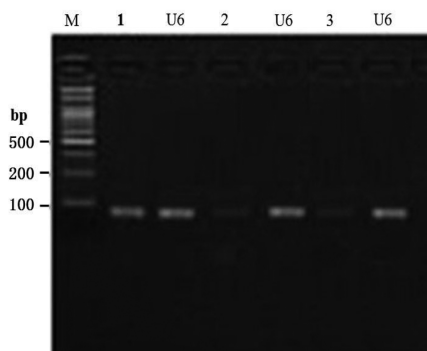
5'-GAAATGCCTCACAGCTATCGT-3';下游引物:5'-CCTCCACAAAGAGCCACC-3';HIF-1 α :(465 bp) 上游引物:5'-ACAGGTTTCCAGCACGC-3';下游引物:5'-CATCGAGAAAGAGTCTACG-3'。

1.3 结果分析 使用计算机分析软件自动分析显示循环阈值(cycle threshold, Ct)和荧光值的动态曲线。计算各样本的 Δ Ct值, Δ Ct=(目的 miRNA Δ Ct - 内参 Ct)即为各样本的相对定量 $2^{-\Delta$ Ct,HIE 组与对照组的差异用 $2^{-\Delta\Delta$ Ct来表示,即 $2^{-\Delta\Delta$ Ct}=(Δ Ct 实验组 - Δ Ct 对照组)。

1.4 统计方法 用 SPSS 17.0 软件包进行统计分析,所有数值采用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,对照组和治疗组之间比较采用 t 检验(总体方差齐)或 t' 检验(总体方差不齐),治疗组治疗前后比较采用配对 t 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

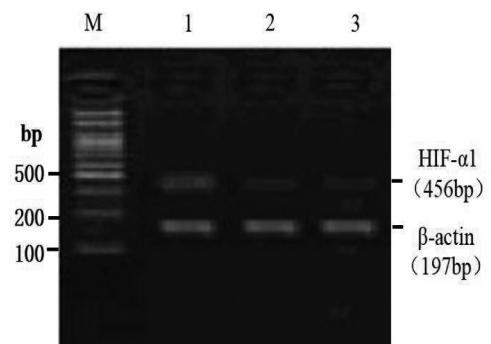
2.1 miRNA-21 的 qRT-PCR 结果分析 正常组血清 miRNA-21 的含量为(1.21 ± 0.10),HIE 组血清 miRNA-21 的含量升高到(5.25 ± 2.17),二者之间差异有统计学意义($t=6.78, P=0.001$)。当应用了神经节苷脂进行治疗 15 d 以后,血清中 miRNA-21 的含量降低到(2.13 ± 1.06),与治疗前血清 miRNA-21 含量相比,差异有统计学意义($t=3.17, P=0.01$)。见图 1。



注:M:marker;U6:内参;1:HIE 组 miRNA-21 mRNA 含量;2:正常组 miRNA-21 mRNA 含量;3:治疗 15 d 后 miRNA-21 mRNA 含量。

图 1 qRT-PCR 检测血清中 miRNA-21 mRNA 的表达情况

2.2 HIF-1 α mRNA 的 qRT-PCR 结果分析 正常组血清中 HIF-1 α mRNA 的含量为(1.28 ± 0.10),而在 HIE 组血清中 HIF-1 α mRNA 的含量升高到(8.76 ± 3.23),二者之间差异有统计学意义($t=10.53, P<0.001$)。HIE 组在治疗 15 d 后血清中 HIF-1 α mRNA 含量降至(3.64 ± 3.34),与治疗前血清 HIF-1 α mRNA 含量相比,差异有统计学意义($t=8.67, P=0.036$),见图 2。



注:M:Marker;1:HIE 组;2:正常对照组;3:治疗 15 d 后。

图 2 RT-PCR 检测 HIF-1 α mRNA 表达情况

3 讨论

新生儿 HIE 引起的呼吸功能障碍是导致全身低氧血症,各个器官功能损伤的重要因素。严重的 HIE 患儿可导致死亡,存活者也多伴有神经系统后遗症,如智力低下、脑瘫等^[4-6]。因此,HIE 严重威胁着患儿的生命健康^[7-8]。临床上如能早期诊断和及时干预,对改善其预后有着十分重要的现实意义。因此,寻找新的生物学标记物及判断预后的指标,都有着极其重要的临床意义。研究发现微小 RNA(miRNA)能够在血液中稳定表达,且能够较好的反映疾病状态^[3, 9-11]。目前,临床上已应用人血清中 miRNA 的改变,能够对肿瘤做出早期的诊断,并且作为肿瘤的一种新型生物学标志物^[12-13]。研究发现 miRNA-21 也可作为神经组织特异性标志物^[14]。

在研究 HIE 中,本试验发现 miRNA-21 在正常组中有轻度表达,一旦发生 HIE 后,血液中的 miRNA-21 含量显著性升高,比正常组高出 5 倍,提示 miRNA-21 的升高可能与新生儿 HIE 相关,同时也有研究证实 miRNA 包括 miRNA-21 在神经细胞的发育、分化、神经系统的疾病发生、发展等过程中发挥重要作用^[1]。He 等^[15]研究发现在缺血脊髓中过表达的 miRNA-21 能够通过抑制 TNF- α 家族成员 Fas 配体基因(FASLG)蛋白和程序性细胞死亡因子(PDCD4)蛋白表达,保护缺氧缺血的神经细胞,进而减少神经细胞的凋亡。Jiang 等^[16]通过研究大鼠脊髓损伤模型发现,高表达的 miRNA-21 能够通过抑制 PDCD4 基因,以促进神经突的增生,进而促进损伤脊髓的修复。由此可见,高表达的 miRNA-21 能够保护受损的神经细胞,促进神经细胞修复。

为了进一步研究 miRNA-21 对 HIE 的保护作用机制,本实验结合相关文献报道^[17-18]:HIF-1 α 在低氧条件下才能稳定表达,可通过转录及转录后调控,使缺

氧组织对缺氧刺激产生耐受性,并且通过激活血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF),改善脑缺血后的能量代谢、血液动力学变化等。因此,本实验又进一步检测了血清 HIF-1 α mRNA 的表达水平。结果发现在 HIE 发生后,HIF-1 α mRNA 与正常组相比明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。可以说,HIF-1 α 也是与 HIE 有关的重要调控基因。笔者推测当 HIE 发生时,miRNA-21 的表达上调,能够作用于靶基因的 HIF-1 α ,使其表达上调,进而在血清中高表达,从而发挥其对脑组织的保护作用。

神经节苷脂(GMI)能够明显改善 HIE 患儿的临床症状,减轻神经系统损伤,促进受损神经元功能恢复,从而提高 HIE 的治愈率,减少神经系统后遗症^[19-21],因此被临床上广泛应用于 HIE 的治疗。本实验在 GMI 进行治疗 15 d 后,患儿的主要临床症状明显减轻,再次检测血清中 miRNA-21 和 HIF-1 α 时发现,二者均明显的降低,提示 miRNA-21 可能通过调节 HIF-1 α 的表达来干预 HIE 的发生和发展。由此可推测:miRNA-21 在 HIE 的发生中显著升高可能预示着 HIE 的发生,可作为早期诊断 HIE 的生物学标记物。在经治疗后显著性的降低,提示 miRNA-21 又可能作为评估 HIE 预后的有用指标具有重要的意义。但 miRNA-21 能否成为 HIE 潜在的基因治疗靶点,有待今后更深入的研究。

参考文献

- [1] Cao DD, Li L, Chan WY. MicroRNAs: key regulators in the central nervous system and their implication in neurological diseases[J]. Int J Mol Sci, 2016,17(6):E842.
- [2] Ponnusamy V, Kapellou O, Yip E, et al. A study of microRNAs from dried blood spots in newborns after perinatal asphyxia: a simple and feasible biosampling method[J]. Pediatr Res, 2016,79(5):799-805.
- [3] Looney AM, Walsh BH, Moloney G, et al. Downregulation of umbilical cord blood levels of miR-374a in neonatal hypoxic ischemic encephalopathy[J]. J Pediatr, 2015,167(2):269-273.
- [4] Teslenko EL, Danyanovich EV, Damjanovi, et al. Saccadic dysfunction in patients with hypoxic-ischemic encephalopathy[J]. J Integr Neurosci, 2017. Epub ahead of print.
- [5] Laptook AR, Shankaran S, Tyson JE, et al. Effect of therapeutic hypothermia initiated after 6 hours of age on death or disability among newborns with hypoxic-ischemic encephalopathy: a randomized clinical trial[J]. JAMA, 2017,318(16):1550-1560.
- [6] Nabetani M, Shintaku H, Hamazaki T. Future perspectives of cell therapy for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy[J]. Pediatr Res,

2017. Epub ahead of print.

- [7] Hayes BC, Doherty E, Grehan A, et al. Neurodevelopmental outcome in survivors of hypoxic ischemic encephalopathy without cerebral palsy[J]. Eur J Pediatr, 2018,177(1):19-32.
- [8] Arteaga O, Avarez A, Revuelta M, et al. Role of antioxidants in neonatal hypoxic-ischemic brain injury: new therapeutic approaches[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(2):E265.
- [9] Santangelo A, Imbrucè P, Gardenghi B, et al. A microRNA signature from serum exosomes of patients with glioma as complementary diagnostic biomarker[J]. J Neurooncol, 2018,136(1):51-62.
- [10] Qiu J, Zhou XY, Zhou XG, et al. Neuroprotective effects of microRNA-210 on hypoxic-ischemic encephalopathy[J]. Biomed Res Int, 2013, 2013:350419.
- [11] Thyagarajan A, Shaban A, Sahu RP. MicroRNA-directed cancer therapies: implications in melanoma intervention[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2018, 364(1):1-12.
- [12] Liang L, Zhang L, Cui D, et al. Identification of the key miRNAs associated with survival time in stomach adenocarcinoma[J]. Oncol Lett, 2017, 14(4):4563-4572.
- [13] Xu YF, Hannafon BN, Ding WQ. microRNA regulation of human pancreatic cancer stem cells[J]. Stem Cell Investig, 2017, 4:5.
- [14] İlhan-Mutlu A, Wagner L, Preusser M. Circulating biomarkers of CNS tumors: an update[J]. Biomark Med, 2013, 7(2):267-285.
- [15] He F, Ren Y, Shi E, et al. Overexpression of microRNA-21 protects spinal cords against transient ischemia[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2016, 152(6):1602-1608.
- [16] Jiang Y, Zhao S, Ding Y, et al. MicroRNA21 promotes neurite outgrowth by regulating PDCD4 in a rat model of spinal cord injury[J]. Mol Med Rep, 2017, 16(3):2522-2528.
- [17] Liu Y, Nie HG, Zhang KK, et al. A feedback regulatory loop between HIF-1 α and miR-21 in response to hypoxia in cardiomyocytes[J]. FEBS Lett, 2014, 588(17):3137-3146.
- [18] Mace TA, Collins AL, Wojcik SE, et al. Hypoxia induces the overexpression of microRNA-21 in pancreatic cancer cells[J]. J Surg Res, 2013, 184(2):855-860.
- [19] Sheng L, Li Z. Adjuvant treatment with monosialoganglioside may improve neurological outcomes in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy: a meta-analysis of randomized controlled trials[J]. PLoS One, 2017, 12(8):e0183490.
- [20] Hu W, Chao Y, Geng X. Neuroprotective strategies for patients with acute myocardial infarction combined with hypoxic ischemic encephalopathy in the ICU[J]. Hellenic J Cardiol, 2017,58(6):427-431.
- [21] Zhu XY, Ye MY, Zhang AM, et al. Influence of one-year neurologic outcome of treatment on newborns with moderate and severe hypoxic-ischemic encephalopathy by rhuEP0 combined with ganglioside (GM1)[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2015, 19(20):3955-3960.

收稿日期:2017-11-19