

- analgesia [J]. *Curr Med Res Opin*, 2016, 32(8): 1435-1440.
- [5] Klumpner T T, Lange E M, Ahmed H S, et al. An in vitro evaluation of the pressure generated during programmed intermittent epidural bolus injection at varying infusion delivery speeds [J]. *J Clin Anesth*, 2016, 34: 632-637.
- [6] Hogan Q. Distribution of solution in the epidural space: examination by cryomicrotome section [J]. *Reg Anesth Pain Med*, 2002, 27(2): 150-156.
- [7] Lange EMS, Wong C A, Fitzgerald P C, et al. Effect of epidural infusion bolus delivery rate on the duration of labor analgesia: A randomized clinical trial [J]. *Anesthesiology*, 2018, 128(4): 745-753.
- [8] 鲁恒, 黄绍强, 胡建英, 等. 低浓度与超低浓度罗哌卡因间断硬膜外给药用于分娩镇痛的效果及对产科结局的影响 [J]. *复旦学报(医学版)*, 2017, 44(4): 498-502.
- [9] Schrock S D, Harraway-Smith C. Labor analgesia [J]. *Am Fam Physician*, 2012, 85(5): 447-454.
- [10] Kelly A, Tran Q. The optimal pain management approach for a laboring patient: A review of current literature [J]. *Cureus*, 2017, 9(5): e1240.
- [11] Capogna G, Camorcia M, Stirparo S, et al. Programmed intermittent epidural bolus versus continuous epidural infusion for labor analgesia: the effects on maternal motor function and labor outcome. A randomized double-blind study in nulliparous women [J]. *Anesth Analg*, 2011, 113(4): 826-831.
- [12] Kaynar A M, Shankar K B. Epidural infusion: continuous or bolus [J]? *Anesth Analg*, 1999, 89(2): 534.
- [13] Wong C A, Ratliff J T, Sullivan J T, et al. A randomized comparison of programmed intermittent epidural bolus with continuous epidural infusion for labor analgesia [J]. *Anesth Analg*, 2006, 102(3): 904-909.

miRNA-210在新生儿窒息早期外周血中差异表达的分析

金雅¹, 肖珮^{2*}, 赵青², 罗琼², 黄磊瑛¹ (广东省东莞市第三人民医院 1. 儿保科; 2. 新生儿科, 广东东莞 523320)

摘要: 目的 分析miRNA-210在新生儿窒息早期外周血中的表达。方法 选取窒息新生儿27例为窒息组, 于出生后1、48 h采集外周血标本, 同时与健康新生儿26例(正常组)作为对照, 通过定时定量聚合酶链反应(RT-PCR)检测miRNA-210的表达变化, 分析早期脑损伤灵敏度与特异度。结果 与正常组比较, 窒息新生儿的miRNA-210水平均有升高, 以窒息48 h者更为显著($P < 0.01$); 窒息1、48 h的患儿与正常组比较, 其曲线下面积均有统计学意义($P < 0.05$ 或 0.01), 灵敏度分别为40.7%、74.1%, 特异度分别为88.5%、100.0%。结论 miRNA-210可作为新生儿窒息脑损伤后早期诊断的有效生物学指标。

关键词: miRNA-210; 新生儿窒息; 灵敏度; 特异度

中图分类号: R 722.12

文献标志码: A

文章编号: 2096-3610(2018)05-0564-04

Analysis of differential expression of miRNA-210 in peripheral blood of neonatal asphyxiated

JIN Ya¹, XIAO Pei^{2*}, ZHAO Qing², LUO Qiong², HUANG Lei-ying¹ (1. Child Health Section; 2. Department of Neonatology; Dongguan No.3 People's Hospital, Dongguan 523320, China)

Abstract: Objective To analyze the expression of miRNA-210 in peripheral blood of neonatal asphyxia. Methods In this study, 27 asphyxiated neonates were selected as the asphyxia group, all peripheral blood samples were collected at 1 and 48 h after birth, and 26 healthy neonates (normal group) were taken as the control group, and the expression changes of miRNA-210 were detected by timed quantitative polymerase chain reaction (RT-PCR) to analyze the sensitivity and specificity of early brain injury. Results Compared with the normal group, the levels of miRNA-210 in neonates with asphyxia were all

基金项目: 东莞市社会科技发展项目(No.2014108101011)

收稿日期: 2018-08-17; **修订日期:** 2018-10-15

作者简介: 金雅(1980-), 女, 学士, 副主任医师。

通信作者: 肖珮(1974-), 女, 学士, 主任医师。

increased, and the increase was more significant at 48 h ($P<0.01$). The area under the curve was statistically significant ($P<0.05$ or 0.01), and the sensitivities were 40.7% and 74.1%, respectively and the specificities were 88.5% and 100.0%, respectively. Conclusion miRNA-210 can be used as an effective biomarker for early diagnosis of asphyxia brain injury in neonates.

Key words: miRNA-210; neonatal asphyxia; sensitivity; specific degrees

目前,脑损伤引起的新生儿窒息是我国新生儿致残和死亡最常见的原因之一,发病率与致残率高,其机制多未明晰,传统指标和临床症状特异性局限,或主观分析为主,或灵敏度、特异性、稳定性均不理想,出现阳性意义时多已滞后于病理生理改变,且个体对缺氧的耐受性差异大,早期诊断、预后判断困难是目前困扰儿科学界的难题之一^[1],故在脑损伤启动之前早期识别窒息缺氧以尽早针对性治疗阻断损伤成为亟待解决的关键问题。本课题通过应用实时定量PCR技术检测实验组(窒息足月儿组)及正常组(正常足月儿组)血清的miRNA-210水平,探讨miRNA-210在新生儿窒息早期脑损伤的发生、修复过程中的变化。

1 资料和方法

1.1 病例与分组

选取2015年1月—2016年12月在我院新生儿科住院的新生儿窒息足月患儿27例,胎龄37~42周,平均胎龄(40.62 ± 0.71)周,体质量2.6~4.1 kg,平均(3.55 ± 0.42) kg; Apgar评分2~7分,平均(4.53 ± 0.72)分,均符合美国儿科学会(ADP)和妇产科学会(ACOG) 1996年共同制定的新生儿窒息诊断标准。入选标准:(1)脐动脉血显示严重代谢性混合型酸中毒pH<7.0;(2) Apgar评分0~3分,并且持续时间>5 min;(3)新生儿早期神经系统表现,如惊厥、昏迷或肌张力低下等;(4)出生早期有多器官功能不全的证据,如合并多脏器(3个或3个以上脏器)损伤和(或)缺氧缺血性脑病者可诊断重度窒息。剔除标准:(1)排除存在先天性遗传代谢病、新生儿出血症、新生儿溶血症、感染性休克、产伤至颅内出血等可能影响可比性的其他严重疾病;(2)经过2周治疗、观察,结合实验室结果及头颅MRI可排除新生儿窒息诊断者。另设同期出生健康新生儿26名为正常组,胎龄37~42周,平均胎龄(40.55 ± 0.68)周,体质量2.6~4.0 kg,平均(3.42 ± 0.65) kg,生后Apgar评分均为10分,血气分析无缺氧改变,随访评分正常。两组间的胎龄、体质量比较差异无统计学意义。所有新生儿家属均自愿签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 设备 微量分光光度计(ALLSHENG, Nano-100)、电泳仪(Tanon, EPS300)、紫外透射分析仪(Hema, UV-3A)、基因扩增仪(Hema, Hema 9600)、Real-time Quantitative PCR(ABI, StepOne Plus)。

1.2.2 试剂及主要材料 HiPure Blood/Liquid RNA Kit (Magen, R4163)、M-MLV Reverse Transcriptase (Promega, M1705)、ChamQ SYBR qPCR Master Mix (Vazyme, Q341-03)。

1.2.3 miRNA-210检测 (1)标本采集:每组分别于生后1、48 h采集外周血5 mL。(2)引物设计:根据序列,用Primer Premier5搜索引物。hsa-mir-210-RT: GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCA CTGGATACGACCAAGTGT。(3)RNA提取:总RNA和miRNA的抽提步骤按照Trizol试剂盒说明书进行。RNA质量检测采用超微量紫外分光光度计测定RNA浓度和纯度。记录A260%的比值。RNA纯度检测:RNA溶液的A260/A280的比值f比值范围1.8~2.1为纯度合格。琼脂糖凝胶电泳法电泳检测确定样品总RNA质量。无RNA酶的水溶解RNA,保存于-80℃。取出1 μL RNA,使用Nano-100进行定量,根据定量结果进行逆转录。(4)cDNA 逆转录:实验体系。M-MLV Reverse Transcriptase: RNA 2 μg、Primer Mix 1 μL、RNase-free water至15 μL、70℃ 5 min,冰上5 min; 5×buffer 5 μL、2 mol/L dNTP 6.25 μL、M-MLV 1 μL、RNase-free water 12.75 μL,共25 μL,42℃ 60 min。(5)QPCR扩增、相对定量:参照Taq酶和microRNA assay说明书,行实时定量PCR检测miRNA-210的表达水平。检测系统为ABI 7900 实时定量 PCRsystem, U6为内参。实验体系: ChamQ SYBR qPCR Master Mix 10 μL、F primer(10 μm) 1 μL、R primer(10 μm) 1 μL、cDNA 模板 1.5 μL、Nuclease-Free Water 6.5 μL,共20 μL。反应条件:热变性 95℃ 120 s 1周、变性 95℃ 15 s,退火延伸 60℃ 30 s 40周、溶解曲线 60~95℃;上机进行目标基因扩增。目标基因的相对表达量计算公式为: $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-[(\Delta Ct)_{\text{实验组}} - (\Delta Ct)_{\text{对照组}}]}$ 。

1.3 统计学处理

使用SPSS 21.0软件进行统计分析,符合正态分布的计量资料用均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间差异比较采用 t 检验,不符合正态分布的计量资料用中位数和四分位数间距[$M(Q)$]表示,组间差异比较采用秩和检验,统计量值为卡方值。计数资料用例数和百分比[$n(\%)$]表示,组间差异比较采用确切概率法,miRNA210的诊断价值分析采用ROC曲线,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 新生儿窒息组与正常组外周血miRNA-210的表达

与正常组比较,窒息新生儿的miRNA-210水平明显升高,且以窒息48 h者更为显著($P < 0.05$),见表1、图1。

表1 新生儿窒息组与正常组外周血miRNA-210的表达

组别	<i>n</i>	miRNA-210	χ^2 值	<i>P</i> 值
正常组	26	0.54(0.89)		
窒息1 h	27	0.84(0.76) ^a	32.580	<0.001
窒息48 h	27	1.87(1.96) ^{ab}		

与正常组比较: ^a $P < 0.05$; 与窒息1 h组比较: ^b $P < 0.05$

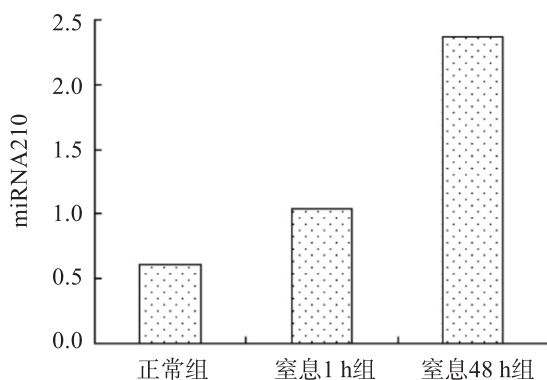


图1 新生儿窒息组与正常组外周血miRNA-210的表达

表2 miRNA-210在新生儿窒息外周血表达的ROC曲线下面积

组别	曲线下面积	标准误	<i>P</i> 值	曲线下面积的95%可信区间
窒息后1 h与正常组	0.671	0.074	0.033	0.526~0.816
窒息后48 h与正常组	0.926	0.034	<0.01	0.860~0.992

成脑损伤的诊断及治疗带来困难。目前新生儿窒息后脑损伤诊断、分度及预判预后的方法中,通过具备异常产科病史、脐动脉血气分析、Apgar评分主观分析为主,缺乏客观判定的理化因素,生后神经系统症状及持续时间、影像学表现(MRI)、NBNA评分等综合分析判定灵敏度、特异性、稳定性不理想,

2.2 ROC曲线分析结果

窒息1、48 h的患儿与正常组比较,曲线下面积均有统计学意义($P < 0.05$ 或 0.01),其灵敏度分别为40.7%、74.1%,特异度分别为88.5%、100.0%。详见表2、图2。

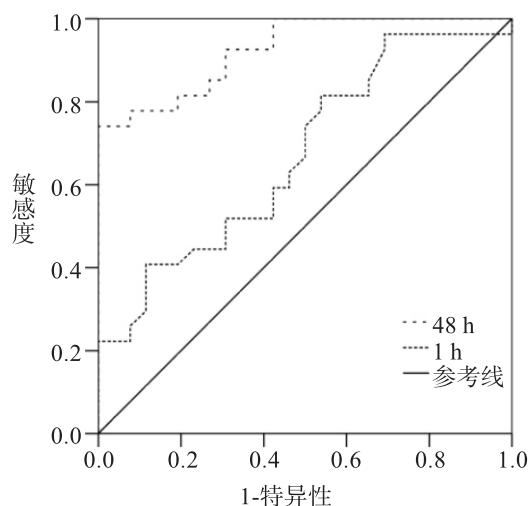


图2 miRNA-210在新生儿窒息1、48 h外周血表达的特异性与敏感度

3 讨论

新生儿窒息是指由于产前、产时或产后的各种病因,使胎儿缺氧而发生宫内窘迫或娩出过程中发生呼吸、循环障碍,导致生后不能建立正常自主呼吸所致低氧血症、高碳酸血症和酸中毒及全身多脏器损伤。缺氧主要引起脑水肿及神经元坏死,缺血主要引起脑血管梗死及白质软化。按脏器损害发生率高低依次为脑、心、肾、肺、胃肠^[2],脏器损害程度随着损害个数的增加而增加,同时病死率也逐渐增加^[3]。

该病发病机制复杂,临床表现特异性差,所以其诊断标准中主观判断占较大比例,客观指标大多灵敏度、特异性、稳定性不理想,给新生儿窒息造

且出现阳性意义时均已滞后于脑损伤发生、发展。有学者提出,miRNA可能作为一种生物学标志对血管性疾病的发生发展进行预测,并对组织受损程度进行评价^[4]。因此,寻找新的与窒息后缺氧缺血性脑损伤相关的指标,以早期诊断、正确评估脑细胞的损伤程度及预后具有重要的临床意义。

本课题选取近年来新揭开的基因调节途径—miRNA作为关注点,其特点是有高度的进化保守性,和严格的时空性及组织特异性,且作用于病理生理改变之前^[5-6]。miRNA是一类长度为22 nt左右的内源性非编码RNA,通过碱基序列互补配对的方式对靶标mRNA的表达,参与对基因进行转录后表达的细胞发生、增殖、分化、生长、代谢和凋亡等生物学过程的调控,从而控制基因的表达,这将是基因靶向治疗的理论基础^[7-8]。

miRNA-210为突出的缺氧特异性miRNA,在神经细胞内表达存在时空特异性^[9],一定程度上能促进缺血区神经功能修复,但其相关调控机制仍未完全明了,在体外缺氧环境下其表达稳定上调^[10]。Fasanaro等^[11]证实,体外缺氧刺激可上调miRNA-210在人脐静脉内皮细胞(HUVE-12)中的表达,并进而促进HUVE-12形成血管。首次证实了体外缺氧环境下miRNA-210促进血管形成的作用。

在miRNA-210与新生儿窒息脑损伤的严重程度及预后转归领域,目前国内外鲜见相关文献报道。本课题通过应用实时定量PCR技术检测窒息组(窒息足月儿)及正常组(正常足月儿组)血清miRNA-210水平,与正常组比较,窒息新生儿miRNA-210水平明显升高,且以窒息48 h者更为显著($P<0.05$),窒息组生后24~48 h表达水平比生后1 h表达水平上调更加明显,考虑与生后24~48 h是脑水肿的高峰期相关,推断miRNA-210可能参与窒息后脑损伤的发生、修复过程。

ROC曲线分析结果显示,与正常组比较,窒息1 h组曲线下面积为0.671 (0.526~0.816),其差异有统计学意义($P<0.05$),表明1 h时miRNA-210有一定诊断价值,其灵敏度为40.7%,特异度为88.5%;48 h组分析曲线下面积为0.926 (0.860~0.992),其差异有统计学意义($P<0.05$),表明24~48 h时miRNA-210有较高的诊断价值,其灵敏度为74.1%,特异度为100.0%。本实验结果支持miRNA-210为早期诊断新生儿窒息灵敏而特异的有效生物指标。

值得进一步研究的是,在新生小鼠经结扎左侧颈总动脉并缺氧3天处理后的模型为窒息组的miRNA-210水平比假手术组上调,过表达亚组比抑制表达亚组脑水肿程度高,推测其可能为脑水肿保护性因子^[12]。本实验重点聚焦新生儿窒息发生后早期的发现和诊断,根据脑水肿高峰期为窒息后24~48 h,可延续72 h至1周,故选择采集标本时间为窒息发生时最近时间点(1 h)和脑水肿出现的早期高峰发

生时间(48 h)。在持续缺氧72 h后的小鼠模型中,是否存在窒息发生后miRNA-210反应性升高,随后因的保护性作用而消耗以致其水平下降,有待进一步在人体进行扩大试验,对多时间点进行监测,以为针对下调miRNA-210的治疗机制收集更多有意义数据。

综上所述,miRNA-210在新生儿窒息患儿不同时相外周血中的表达高于健康者,可能参与脑缺氧损伤的发生、发展以及修复等过程,是新生儿窒息早期诊断的有效生物学指标。在后续的研究中,需要深入对miRNA-210具体参与窒息脑损伤的机制进行研究,为窒息早期针对性治疗找到切入点。

参考文献:

- [1] 王彩华,姚丽萍,韩艳宾,等. 窒息新生儿缺氧缺血性脑病研究新进展[J]. 包头医学院学报, 2010, 26(2): 112-113.
- [2] 虞靖虹,廖志勤. 新生儿窒息后多器官损害临床分析[J]. 广东医学院学报, 2001, 19(2): 117-118.
- [3] 刘书艳. 窒息新生儿器官功能损害的发生率、程度及临床特点分析[J]. 中外医疗, 2013, 32(4): 99-99.
- [4] Liu D Z, Tian Y, Ander B P, et al. Brain and blood microRNA expression profiling of ischemic stroke, intracerebral hemorrhage, and kainate seizures [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2010, 30(1): 92-101.
- [5] 刘强,郑秀峰. miRNA研究进展[J]. 重庆医学, 2009, 38(15): 1970-1972.
- [6] Boyd S D. Everything you wanted to know about small RNA but were afraid to ask[J]. Lab Invest, 2008, 88(6): 569-578.
- [7] Berezikov E, Cuppen E, Plasterk R H. Approaches to microRNA discovery [J]. Nature Genet, 2006, 38: S2-7.
- [8] Pillai R S. MicroRNA function: multiple mechanisms for a tiny RNA[J]. RNA, 2005, 11(12): 1753-1761.
- [9] 高法梁,娄远蕾,阮琼芳. 缺血性脑损伤大鼠MicroRNA-210的动态变化[J]. 实验与检验医学, 2010, 28(3): 230-232.
- [10] Zeng L, Liu J, Wang Y, et al. MicroRNA-210 as a novel blood biomarker in acute cerebral ischemia [J]. Front Biosci (Elite Ed), 2011, 3: 1265-1272.
- [11] Fasanaro P, D'Alessandra Y, Di Stefano V, et al. MicroRNA-210 modulates endothelial cell response to hypoxia and inhibits the receptor tyrosine kinase ligand Ephrin-A3[J]. J Biol Chem, 2008, 283(23): 15878-15883.
- [12] Zhao L, Zhou X Y, Zhou X G, et al. Role of miRNA-210 in hypoxic-ischemic brain edema in neonatal rats[J]. Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi, 2016, 18(8): 770-774.