

• 论 著 • DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2022.09.017

脐带血 miR-499-5p、PTEN 在缺氧缺血性脑病 新生儿中的水平变化及临床意义

王红娥

新郑市人民医院新生儿科, 河南郑州 451100

摘要:目的 探讨缺氧缺血性脑病(HIE)新生儿脐带血微小 RNA-499-5p(miR-499-5p)、磷酸酯酶与张力蛋白同源物(PTEN)水平变化及临床意义。方法 选取 2018 年 1 月至 2020 年 4 月该院收治的 61 例 HIE 新生儿为研究对象,根据 HIE 严重程度分为 HIE 轻度、中度和重度组,分别为 27 例、21 例、13 例,选取同期 50 例健康新生儿作为对照组。于研究对象出生后 6 h 内采集静脉血进行血清 S100B 和神经元特异性烯醇化酶(NSE)水平检测,于研究对象出生后 1 h 内采集脐带血进行 miR-499-5p、PTEN 水平检测。对研究对象进行新生儿行为神经测定(NBNA)评分,并对 HIE 新生儿在出生后 40 周和 52 周时进行 Gesell 发育诊断量表评价。结果 HIE 轻度、中度、重度组 miR-499-5p 水平、NBNA 评分明显低于对照组,PTEN、S100B、NSE 水平明显高于对照组,且随着 HIE 严重程度的增加,miR-499-5p 水平、NBNA 评分逐渐下降,PTEN、S100B、NSE 水平逐渐升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。miR-499-5p、PTEN、S100B、NSE 联合检测诊断新生儿 HIE 的曲线下面积为 0.896。HIE 轻度、中度、重度组出生后 40 周、52 周时的发展商数(DQ)明显低于对照组,且随着 HIE 严重程度的增加,新生儿出生后 40 周、52 周时的 DQ 逐渐下降,差异有统计学意义($P < 0.05$)。HIE 新生儿 miR-499-5p 水平与出生后 40 周、52 周时的 DQ 呈正相关($P < 0.05$),PTEN、S100B、NSE 水平与出生后 40 周、52 周时的 DQ 呈负相关($P < 0.05$)。结论 脐带血中 miR-499-5p 和 PTEN 水平与新生儿 HIE 的发生、发展有关,且在 HIE 诊断和预后评估中具有一定价值,可为临床治疗提供参考。

关键词:缺氧缺血性脑病; 新生儿; 微小 RNA-499-5p; 磷酸酯酶与张力蛋白同源物

中图分类号:R722.1

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2022)09-1218-04

Changes and clinical significance of miR-499-5P and PTEN levels in umbilical cord blood of neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy

WANG Honge

Department of Neonatology, Xinzheng People's Hospital, Zhengzhou, Henan 451100, China

Abstract: **Objective** To investigate the changes and clinical significance of microRNA-499-5p (miR-499-5p), phosphatase and tensin homolog (PTEN) levels in umbilical cord blood of neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE). **Methods** A total of 61 HIE neonates admitted to the hospital from January 2018 to April 2020 were selected as the research objects. According to the severity of HIE, they were divided into mild, moderate and severe HIE groups, with 27 cases, 21 cases and 13 cases respectively. A total of 50 healthy neonates were selected as the control group during the same period. The venous blood was collected within 6 h after birth to detect the levels of serum S100B and neuron-specific enolase (NSE). The umbilical cord blood was collected within 1 h after birth to detect the levels of miR-499-5p and PTEN. Study subjects were assessed with the Neonatal Behavioral Neurological Assessment (NBNA) score, and the HIE neonates were assessed with the Gesell developmental diagnostic scale at 40 and 52 weeks after birth. **Results** The level of miR-499-5p and NBNA score in mild, moderate and severe HIE groups were significantly lower than those in the control group, and the levels of PTEN, S100B and NSE were significantly higher than those in the control group, and with the increase of the severity of HIE, the level of miR-499-5p and NBNA score gradually decreased, and the levels of PTEN, S100B and NSE gradually increased, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). The area under the curve of combined detection of miR-499-5p, PTEN, S100B and NSE for the diagnosis of neonatal HIE was 0.896. The development quotient (DQ) in the mild, moderate and severe HIE groups at 40 and 52 weeks after birth was significantly lower than that in the control group, and with the increase of

作者简介:王红娥,女,主管护师,主要从事新生儿疾病的临床护理研究。

本文引用格式:王红娥. 脐带血 miR-499-5p、PTEN 在缺氧缺血性脑病新生儿中的水平变化及临床意义[J]. 检验医学与临床, 2022, 19(9): 1218-1221.

the severity of HIE, the DQ of the neonates decreased gradually at 40 and 52 weeks after birth, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). The level of miR-499-5p in HIE neonates was positively correlated with DQ at 40 and 52 weeks after birth ($P < 0.05$), and the levels of PTEN, S100B and NSE were negatively correlated with DQ at 40 and 52 weeks after birth ($P < 0.05$). **Conclusion** The levels of miR-499-5p and PTEN in umbilical cord blood are related to the occurrence and development of neonatal HIE, and have certain value in the diagnosis and prognosis evaluation of neonatal HIE, could provide reference for clinical treatment.

Key words: hypoxic-ischemic encephalopathy; neonates; microRNA-499-5p; phosphatase and tensin homolog

新生儿出生前、出生时和出生后窒息是导致新生儿缺氧缺血性脑病(HIE)发病和死亡的重要因素。25%的新生儿 HIE 会出现严重的永久性神经系统后遗症,包括智力低下、脑瘫和癫痫等^[1]。微小 RNA(miRNA)是一组非编码 RNA,长度为 18~22 个核苷酸,其在人体体液中稳定存在,并且可以从血清中检出^[2]。miRNA 已被证明与多种疾病的发病机制有关,可以作为较好的疾病诊断指标^[3]。微小 RNA-374a 和微小 RNA-181b 与 HIE 疾病进展有关^[4]。最近的一项研究显示,微小 RNA-499-5p(miR-499-5p)可抑制 C 反应蛋白的产生并在新生大鼠 HIE 中发挥神经保护功能^[5]。位于人类 19 号染色体上的磷酸酯酶与张力蛋白同源物(PTEN)基因编码一种双磷酸酶,可使蛋白质和脂质底物脱磷酸化^[6]。此外,PTEN 是磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B (PI3K/Akt) 信号通路的负调节因子,与缺氧缺血性损伤有关^[7]。PTEN 可调节肿瘤组织和健康组织中的血管生成,而脑微血管生成对于脑损伤后功能恢复是非常必要的^[8]。然而,目前

尚不明确脑组织中 miR-499-5p 减轻缺血缺氧损伤的功能是否依赖于 PTEN 信号通路。因此,本研究对 HIE 新生儿脐带血中的 miR-499-5p、PTEN 水平进行了分析,并探讨其关系,现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2018 年 1 月至 2020 年 4 月本院收治的 61 例 HIE 新生儿为研究对象,纳入标准:(1)足月新生儿;(2)HIE 诊断通过脑部 MRI 证实。排除标准:(1)合并颅内出血、电解质紊乱或产伤引起的惊厥;(2)合并高胆红素血症、宫内感染或严重脑发育不良引起的脑损伤。根据新生儿 HIE 严重程度判断标准,将 HIE 新生儿分为 HIE 轻度、中度和重度组,分别为 27 例、21 例、13 例。选取同期 50 例健康新生儿作为对照组,对照组均为新生儿疾病筛查无异常且无围生期窒息或神经系统疾病的新生儿。各组新生儿性别、分娩方式、体质量、胎龄比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性,见表 1。本研究经本院医学伦理委员会批准。

表 1 各组一般资料比较

组别	n	性别(n)		分娩方式(n)		体质量($\bar{x} \pm s$, g)	胎龄($\bar{x} \pm s$, 周)
		男	女	顺产	剖宫产		
对照组	50	27	23	28	22	3 482 $\pm$ 387	39.58 $\pm$ 0.48
HIE 轻度组	27	14	13	16	11	3 512 $\pm$ 403	39.43 $\pm$ 0.54
HIE 中度组	21	10	11	11	10	3 539 $\pm$ 468	39.44 $\pm$ 0.53
HIE 重度组	13	6	7	7	6	3 635 $\pm$ 398	39.17 $\pm$ 0.48
χ^2/F		0.286		0.487		0.506	2.404
P		0.965		0.937		0.679	0.072

1.2 方法

1.2.1 指标检测 (1)出生后 6 h 内从新生儿的股静脉采集血液标本,4℃下离心,分离血清,采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测 S100B 和神经元特异性烯醇化酶(NSE)水平。(2)在新生儿出生后 1 h 内采集脐带血,离心分离血清,采用 Trizol 试剂(美国,赛默飞世尔)从脐带血中提取总 RNA,使用 miRNA RT-PCR 试剂盒(日本, Takara)将其逆转录为 cDNA;分别采用 U6 和 GAPDH 作为内参,采用 SYBR Green

I Master Mix 试剂盒(美国,赛默飞世尔)检测 miR-499-5p、PTEN 水平。miR-499-5p 上游引物 5'-GGC-CGTTAAGACTTGCAGTG-3',下游引物 5'-GG-GAAGCAGCACAGACTTG-3',长度 92 bp;PTEN 上游引物 5'-TGTGGTCTGCCAGCTAAAGG-3',下游引物 5'-CGGCTGAGGGAAGTCAAAGT-3',长度 94 bp;U6 上游引物 5'-CGAGCGCCACTTCAGAATA-3',下游引物 5'-CTCACGGCGCTTCATCAGAT-3',长度 139 bp;GAPDH 上游引物 5'-CGGATG-

CACCAATGTTTCGTC-3', 下游引物 5'-ACGCGTT-GCTCACAATGTTTC-3', 长度 78 bp。反应条件: 95 °C 10 min, 95 °C 30 s, 60 °C 25 s, 75 °C 15 s, 40 个循环。使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 miR-499-5p、PTEN 水平。

1.2.2 新生儿行为神经测定(NBNA)评分 新生儿出生后第 7 天进行 NBNA 评分, 包括主动能力、被动肌张力、主动肌张力、原始反射和一般评价 5 个部分, 总分 40 分, NBNA 评分 < 35 分为异常。

1.2.3 Gesell 发育诊断量表评价 HIE 新生儿在出生后 40 周和 52 周时采用 Gesell 发育诊断量表进行智能评价, 并计算发展商数(DQ)。

1.3 统计学处理 采用 SPSS21.0 软件进行数据分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间

比较采用方差分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验; 计数资料以例数或百分数表示, 组间比较采用 χ^2 检验; 采用 Pearson 相关进行相关性分析; 采用受试者工作特征曲线(ROC 曲线)进行诊断效能评估。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组检测指标及 NBNA 评分比较 HIE 轻度、中度、重度组 miR-499-5p 水平、NBNA 评分明显低于对照组, PTEN、S100B、NSE 水平明显高于对照组, 且随着 HIE 严重程度的增加, miR-499-5p 水平、NBNA 评分逐渐下降, PTEN、S100B、NSE 水平逐渐升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 见表 2。

表 2 各组检测指标及 NBNA 评分比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	miR-499-5p	PTEN	S100B($\mu\text{g/L}$)	NSE($\mu\text{g/L}$)	NBNA 评分(分)
对照组	50	1.27 ± 0.17	5.12 ± 0.81	0.59 ± 0.24	13.32 ± 3.86	39.26 ± 2.32
HIE 轻度组	27	1.02 ± 0.15 ^a	15.24 ± 0.76 ^a	0.92 ± 0.31 ^a	35.27 ± 15.28 ^a	35.12 ± 1.37 ^a
HIE 中度组	21	0.86 ± 0.13 ^{ab}	23.48 ± 1.72 ^{ab}	1.42 ± 0.51 ^{ab}	57.42 ± 18.25 ^{ab}	33.28 ± 1.42 ^{ab}
HIE 重度组	13	0.52 ± 0.15 ^{abc}	28.65 ± 1.82 ^{abc}	1.94 ± 0.57 ^{abc}	74.37 ± 18.53 ^{abc}	30.08 ± 1.51 ^{abc}
<i>F</i>		93.640	193.127	58.721	109.821	109.121
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与 HIE 轻度组比较, ^b $P < 0.05$; 与 HIE 中度组比较, ^c $P < 0.05$ 。

2.2 miR-499-5p、PTEN、S100B、NSE 诊断新生儿 HIE 的效能 miR-499-5p、PTEN、S100B、NSE 单独检测诊断新生儿 HIE 的曲线下面积(AUC)分别为 0.824、0.698、0.816、0.781; 上述指标联合检测的 AUC 为 0.896。

2.3 miR-499-5p 靶向 PTEN 的表达 Starbase 在线软件预测到 miR-499-5p 与 PTEN 存在结合位点 chr10:89729614-89729621[+], 见图 1。



图 1 miR-499-5p 靶向 PTEN 的表达

2.4 各组 DQ 比较 HIE 轻度、中度、重度组出生后 40 周、52 周时的 DQ 明显低于对照组, 且随着 HIE 严重程度的增加, 新生儿出生后 40 周、52 周时的 DQ 逐渐下降, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 见表 3。

表 3 各组 40 周、52 周时的 DQ 比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	40 周时的 DQ	52 周时的 DQ
对照组	50	89.25 ± 4.32	91.21 ± 6.83
HIE 轻度组	27	81.12 ± 5.83 ^a	87.26 ± 5.37 ^a
HIE 中度组	21	76.52 ± 6.37 ^{ab}	82.47 ± 4.78 ^{ab}
HIE 重度组	13	71.39 ± 6.42 ^{abc}	76.12 ± 5.48 ^{abc}
<i>F</i>		53.732	26.432
<i>P</i>		<0.001	<0.001

注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与 HIE 轻度组比较, ^b $P < 0.05$; 与

HIE 中度组比较, ^c $P < 0.05$ 。

2.5 DQ 与 miR-499-5p、PTEN、S100B、NSE 水平的相关性分析 相关性分析结果显示, HIE 新生儿 miR-499-5p 水平与出生后 40 周、52 周时的 DQ 呈正相关($P < 0.05$), PTEN、S100B、NSE 水平与出生后 40 周、52 周时的 DQ 呈负相关($P < 0.05$), 见表 4。

表 4 DQ 与 miR-499-5p、PTEN、S100B、NSE 水平的相关性分析

指标	40 周时的 DQ		52 周时的 DQ	
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
miR-499-5p	0.502	0.003	0.494	0.042
PTEN	-0.512	0.009	-0.486	0.005
S100B	-0.476	0.006	-0.487	0.002
NSE	-0.523	0.006	-0.492	0.011

3 讨 论

早期诊断、及时治疗对于降低 HIE 新生儿神经系统后遗症的发生率至关重要。S100B 是一种胶质神经营养蛋白, 主要位于胶质细胞和施万细胞中, 在星形胶质细胞的增殖、分化和神经系统病变中扮演着重要角色^[9]。NSE 是反映神经元损伤严重程度的生物标志物, 神经元退行性病变、坏死或血脑屏障破坏时其水平显著升高。NSE 在 HIE 严重程度评估方面具有较高的准确性, 还可以作为 HIE 诊断和预后判断的

生物标志物^[10]。本研究中, HIE 新生儿与健康新生儿比较, S100B、NSE 水平明显升高, 且随着 HIE 严重程度的增加, S100B、NSE 水平逐渐升高, 提示 S100B、NSE 与 HIE 的发生、发展有关。进一步评估 S100B、NSE 对 HIE 的诊断效能, 结果显示, AUC 分别为 0.816、0.781, 具有一定价值。然而 S100B、NSE 水平升高也可以在其他疾病中被检测到, 包括新生儿感染性脑损伤。

研究发现, miR-499-5p 在大鼠心肌梗死区域水平降低, 同时在心力衰竭大鼠模型中其表达也明显下调, miR-499-5p 通过保护心肌细胞免受应激诱导的细胞凋亡而发挥心脏保护作用, 通过靶向钙调神经磷酸酶和动力蛋白相关蛋白-1 减少细胞凋亡, 从而减轻心肌梗死和心脏功能障碍的严重程度^[11]。研究表明, miR-499 在改善脑损伤后运动功能和神经功能方面发挥着一定作用^[12]。PTEN 位于人类 19 号染色体上, 编码一种使蛋白质去磷酸化的磷酸酶, 对 PI3K/Akt 信号通路具有负调节作用, 可调控缺氧缺血性损伤; 此外, PTEN 还可以调节血管生成, 对于脑损伤的功能恢复有重要作用^[8,13]。本研究中, HIE 新生儿的 miR-499-5p 水平明显低于健康新生儿, PTEN 明显高于健康新生儿, 且随着 HIE 严重程度的增加, miR-499-5p 水平逐渐下降, PTEN 水平逐渐升高, 提示 miR-499-5p、PTEN 与 HIE 的发生、发展有关。进一步通过 Starbase 在线软件预测到 miR-499-5p 与 PTEN 存在结合位点, miR-499-5p 可能通过抑制 PTEN 水平, 对 HIE 新生儿脑损伤起到保护作用。此外, 本研究还发现, 将 NSE、S100B、miR-499-5p 和 PTEN 联合检测用于诊断 HIE 的效能最高, AUC 为 0.896, 可用于 HIE 的临床辅助诊断; 同时, 上述 4 项指标与 HIE 新生儿出生后 40 周、52 周时的 DQ 具有相关性, 提示其与 HIE 新生儿的智能发展有关, 在预后评估方面可能也具有一定的价值, 有待临床深入研究。

参考文献

[1] WASSINK G, DAVIDSON J O, DHILLON S K, et al. Therapeutic hypothermia in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy[J]. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2019, 19(2):2.

[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] ZHANG G, 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.

[4] HUANG J, LU W, DOYCHEVA D M, et al. IRE1 α inhibition attenuates neuronal pyroptosis via miR-125/NLRP1 pathway in a neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy rat model[J]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17(1):152.

[5] JIA H, QU M, FAN G, et al. miR-499-5p suppresses C-reactive protein and provides neuroprotection in hypoxic-ischemic encephalopathy in neonatal rat [J]. *Neurosci Res*, 2020, 161:44-50.

[6] HOU K, LI G, ZHAO J, et al. Bone mesenchymal stem cell-derived exosomal microRNA-29b-3p prevents hypoxic-ischemic injury in rat brain by activating the PTEN-mediated Akt signaling pathway [J]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17(1):46.

[7] DAI C, WU B, CHEN Y, et al. Aagab acts as a novel regulator of NEDD4-1-mediated Pten nuclear translocation to promote neurological recovery following hypoxic-ischemic brain damage[J]. *Cell Death Differ*, 2021, 28(8):2367-2384.

[8] ZHAO D, QIN X P, CHEN S F, et al. PTEN inhibition protects against experimental intracerebral hemorrhage-induced brain injury through PTEN/E2F1/ β -Catenin Pathway[J]. *Front Mol Neurosci*, 2019, 12:281.

[9] LI M, YE M, ZHANG G. Aberrant expression of miR-199a in newborns with hypoxic-ischemic encephalopathy and its diagnostic and prognostic significance when combined with S100B and NSE[J]. *Acta Neurol Belg*, 2021, 121(3):707-714.

[10] YANG L, LI D, CHEN S. Hydrogen water reduces NSE, IL-6, and TNF- α levels in hypoxic-ischemic encephalopathy[J]. *Open Med (Wars)*, 2016, 11(1):399-406.

[11] LI Y, LU J, BAO X, et al. MiR-499-5p protects cardiomyocytes against ischaemic injury via anti-apoptosis by targeting PDCD4 [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(24):35607-35617.

[12] YANG T, SONG J, BU X, et al. Elevated serum miR-93, miR-191, and miR-499 are noninvasive biomarkers for the presence and progression of traumatic brain injury[J]. *J Neurochem*, 2016, 137(1):122-129.

[13] 李德渊, 屈艺, 李晋辉, 等. 磷酸酶 PTEN 在新生大鼠缺氧缺血性脑损伤神经元凋亡中的作用[J]. *四川大学学报(医学版)*, 2014, 45(5):767-771.

(收稿日期:2021-10-26 修回日期:2021-12-09)