

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2023.04.022

癫痫患者外周血 CD69、miR-130b-3p 表达水平及其临床意义

赵锦华, 杨霖崧[△], 吴亚欣, 贾丽娟, 李文强, 惠宇航

咸阳市第一人民医院神经内科, 陕西咸阳 712000

摘要:目的 探讨 CD69、miR-130b-3p 在癫痫患者外周血中的表达水平及其临床意义。方法 选取 2018 年 2 月至 2019 年 2 月该院神经内科收治的 95 例癫痫患者作为癫痫组, 根据病情严重程度分为轻度 31 例, 中度 22 例, 重度 42 例。另选取同期来该院进行健康体检的健康者 60 例作为对照组。采用流式细胞仪检测两组外周血 CD69 表达水平, 采用实时荧光定量聚合酶链反应检测两组外周血 miR-130b-3p 表达水平; 采用 Pearson 相关分析癫痫患者外周血 CD69 与 miR-130b-3p 表达水平的相关性; 采用 Logistic 回归分析影响癫痫发生的影响因素。结果 与对照组比较, 癫痫组外周血 CD69、miR-130b-3p 表达水平明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。外周血 CD69、miR-130b-3p 表达水平在轻度、中度、重度癫痫患者中依次升高, 两两比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。癫痫患者外周血 CD69 与 miR-130b-3p 表达水平呈正相关 ($r = 0.546, P < 0.05$)。外周血 CD69、miR-130b-3p 表达水平升高是癫痫发生的危险因素 ($P < 0.05$)。结论 癫痫患者外周血 CD69、miR-130b-3p 呈高表达, 二者均与患者病情严重程度有关。

关键词: 癫痫; 外周血; CD69; miR-130b-3p

中图法分类号: R446.9; R745

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2023)04-0531-04

The expression levels and clinical significance of CD69 and miR-130b-3p in peripheral blood of patients with epilepsyZHAO Jinhua, YANG Linsong[△], WU Yaxin, JIA Lijuan, LI Wenqiang, HUI Yuhang

Department of Neurology, Xianyang First People's Hospital, Xianyang, Shaanxi 712000, China

Abstract: Objective To investigate the expression levels and clinical significance of CD69 and miR-130b-3p in peripheral blood of patients with epilepsy. **Methods** A total of 95 patients with epilepsy admitted to the Department of Neurology of Xianyang First People's Hospital from February 2018 to February 2019 were selected as the epilepsy group, which were divided as mild 31 cases, moderate 22 cases and severe 42 cases according to the severity of the disease. In addition, 60 healthy persons who came to Xianyang First People's Hospital for physical examination during the same period were selected as the control group. Flow cytometry was used to detect the expression level of CD69 in peripheral blood of the two groups, and real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction was used to detect the expression level of miR-130b-3p in peripheral blood of the two groups. The correlation between the expression level of CD69 and miR-130b-3p in peripheral blood of patients with epilepsy was analyzed by Pearson test. Logistic regression analysis was used to analysis the factors affecting the occurrence of epilepsy. **Results** Compared with those in the control group, the expression levels of CD69 and miR-130b-3p in the peripheral blood of the epilepsy group increased significantly ($P < 0.05$). The expression levels of CD69 and miR-130b-3p in peripheral blood increased in turn in patients with mild, moderate and severe epilepsy, the differences were statistically significant ($P < 0.05$). The expression level of CD69 in peripheral blood of patients with epilepsy correlated positively with miR-130b-3p ($r = 0.546, P < 0.05$). The increased expression levels of CD69 and miR-130b-3p in peripheral blood were risk factors for epilepsy ($P < 0.05$). **Conclusion** CD69 and miR-130b-3p expressed highly in peripheral blood of patients with epilepsy, which might relate to the severity of the patient's disease condition.

Key words: epilepsy; peripheral blood; CD69; miR-130b-3p

癫痫是由各种原因导致的大脑神经元异常放电, 是一种临时性、突发性脑功能紊乱的临床综合征, 严重影响患者的生活质量和生命安全^[1-2]。癫痫发病机制复杂, 目前病因尚未完全明确, 探讨与癫痫发作相

关的基因或蛋白的表达有积极意义。CD69 在急性病变, 如脑血管损伤、心肌梗死、大手术等严重创伤中会导致外周血淋巴细胞亚群活性发生改变, 即外周血 T 细胞的 CD69 表达上调^[3]。研究显示, CD69 与缺血

性脑卒中后的脑损伤有关^[4]。微小核糖核酸(miRNA)是一类内源性非编码RNA,多种miRNA参与神经元坏死、异常通路形成及神经胶质细胞增生等病理过程,从而调节皮质发育及脑功能,在癫痫的发生及调控中起重要作用^[5-6]。有研究显示,精神分裂症患者miR-130b表达上调,且在治疗后其表达降低^[7]。但关于CD69、miR-130b-3p在癫痫方面的研究相对较少,因此,本研究通过检测癫痫患者外周血CD69、miR-130b-3p表达水平,探讨二者与癫痫发生、发展的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取2018年2月至2019年2月本院神经内科收治的95例癫痫患者作为癫痫组。(1)纳入标准:①符合《临床诊疗指南:癫痫病分册》^[8]癫痫诊断标准,均采用一线抗癫痫药物单药或多药联合治疗患者;②根据患者家族史、脑电图、体格检查等确

诊患者。(2)排除标准:①既往有脑外伤史、手术史患者;②伴有神经及其他系统疾病患者;③合并听力、视力障碍及失语等患者;④近期服用过抗焦虑、抗抑郁药物或其他影响认知功能药物的患者。95例患者中男55例,女40例;年龄28~47岁;癫痫的发作类型:局灶性发作34例,全面性发作24例,全面性发作合并局灶性发作30例,不明类型7例。根据病情严重程度将癫痫患者分为轻度(2个月发作1次或更少)31例,中度(1个月发作<4次,但2个月发作>1次)22例,重度(1个月发作≥4次)42例。另选取同期来本院进行健康体检的健康者60例作为对照组,其中男33例,女27例;年龄27~48岁。癫痫组与对照组的性别、年龄等一般资料比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),具有可比性,见表1。所有研究对象均自愿加入本研究,并签署知情同意书,本研究经本院医学伦理委员会审核通过。

表1 两组一般资料比较[n(%)或 $\bar{x}\pm s$]

组别	n	性别				年龄(岁)	体质量指数
		男	女				
对照组	60	33(55.00)	27(45.00)		36.55±4.41	21.83±3.65	
癫痫组	95	55(57.89)	40(42.11)		35.53±5.30	22.09±3.31	
χ^2/t			0.126		1.234	0.458	
P			0.723		0.216	0.648	

组别	n	病程				居住地	
		<1年	1~<3年	3~<6年	≥6年	城市	农村
对照组	60	—	—	—	—	35(58.33)	25(41.67)
癫痫组	95	29(30.53)	19(20.00)	25(26.32)	22(23.16)	53(55.79)	42(44.21)
χ^2/t			—			0.097	
P			—			0.755	

注:—为无数据。

1.2 仪器与试剂 库尔特 Epics XL 型流式细胞仪购自美国贝克曼库尔特公司;实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)仪购自济南千司生物技术有限公司。TRIzol 试剂购自 Invitrogen 公司;反转录试剂盒(货号 J6547M)、qRT-PCR 试剂盒均购自北京天根生化科技有限公司;miR-130b-3p、U6 引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。

1.3 方法

1.3.1 标本采集 采集癫痫患者在发作后24h及对照者健康体检时的空腹外周静脉血4mL,分为2份,1份置于抗凝管中,用于检测外周血CD69表达水平;另1份室温放置2h自然凝固,4℃及12000r/min条件下,离心15min,取上层血清分装至无菌离心管,标记后-80℃冰箱冻存,用于检测miR-130b-3p表达水平。

1.3.2 流式细胞仪检测外周血CD69表达水平 在对照管和检测管中加入100μL乙二胺四乙酸二钠

(EDTANa₂)抗凝全血,同时加入20μL法国产荧光标记单抗IgG2a-PE及P-gp-PE,使其混合均匀,进行15min的避光染色,采用同型IgG作为阴性对照,在Q-Prep标本制备仪上自动溶血、固定,调整好流式细胞仪光路后检测标本。计数10⁴以上个细胞。

1.3.3 qRT-PCR检测外周血miR-130b-3p表达水平 采用TRIzol试剂提取所有研究对象外周血中的总RNA,并以反转录试剂盒中的方法将其反转录为cDNA,进行qRT-PCR,每份标本重复3次。反应条件:94℃15s;60℃30s;70℃10s;39个循环。以U6作为内参基因,反应结束后确认qRT-PCR的扩增曲线和溶解曲线,采用2^{-ΔΔCt}法计算miR-130b-3p的相对表达量。引物序列见表2。

1.4 统计学处理 采用SPSS22.0统计软件进行数据处理及统计学分析。呈正态分布、方差齐的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本t检验,多

组间比较采用方差分析,多组间的两两比较采用 SNK-*q* 检验;计数资料以例数或百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验;采用 Pearson 相关分析癫痫患者外周

血 CD69 与 miR-130b-3p 表达水平的相关性;采用多因素 Logistic 回归分析癫痫发生的影响因素。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 2 qRT-PCR 引物序列

项目	正向引物 5'-3'	反向引物 5'-3'
miR-130b-3p	GCCGCCAGTGAATGATGAA	GTGCAGGTCGCCAGGT
U6	GCTTCGGCAGCACATATACTAA	AACGCTTCACGAATTTGCGT

2 结 果

2.1 两组外周血 CD69、miR-130b-3p 表达水平比较 与对照组比较,癫痫组外周血 CD69、miR-130b-3p 表达水平明显升高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 两组外周血 CD69、miR-130b-3p 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	CD69 (%)	miR-130b-3p
对照组	60	2.16 ± 0.68	1.05 ± 0.30
癫痫组	95	5.13 ± 1.36	3.54 ± 1.00
<i>t</i>		15.708	18.742
<i>P</i>		<0.001	<0.001

2.2 不同严重程度癫痫患者外周血 CD69、miR-130b-3p 表达水平比较 与轻度患者比较,中度、重度患者外周血 CD69、miR-130b-3p 表达水平明显升高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);与中度患者比较,重度患者外周血 CD69、miR-130b-3p 表达水平明显升高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 4。

2.3 癫痫患者外周血 CD69 与 miR-130b-3p 表达水

平的相关性 Pearson 相关分析结果显示,癫痫患者外周血 CD69 与 miR-130b-3p 表达水平呈正相关 ($r = 0.546, P < 0.05$)。

表 4 不同严重程度癫痫患者外周血 CD69、miR-130b-3p 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

严重程度	<i>n</i>	CD69 (%)	miR-130b-3p
轻度	31	2.26 ± 0.71	1.25 ± 0.38
中度	22	4.97 ± 1.49 ^a	3.89 ± 1.17 ^a
重度	42	7.64 ± 2.12 ^{ab}	5.53 ± 1.65 ^{ab}
<i>F</i>		96.996	104.032
<i>P</i>		<0.001	<0.001

注:与轻度比较,^a $P < 0.05$;与中度比较,^b $P < 0.05$ 。

2.4 Logistic 回归分析癫痫发生的影响因素 将是否发生癫痫作为因变量 (是 = 1, 否 = 0),排除年龄等混杂因素后,以外周血 CD69、miR-130b-3p 表达水平作为自变量,进行 Logistic 回归分析,结果显示,外周血 CD69、miR-130b-3p 表达水平升高是癫痫发生的危险因素 ($P < 0.05$)。见表 5。

表 5 Logistic 回归分析癫痫发生的影响因素

变量	<i>B</i>	<i>SE</i>	Wald χ^2	<i>df</i>	<i>P</i>	<i>OR</i>	95% <i>CI</i>
CD69	0.671	0.314	4.565	1	0.033	1.956	1.057~3.619
miR-130b-3p	0.670	0.297	5.087	1	0.024	1.954	1.092~3.497

3 讨 论

癫痫是临床上比较常见的中枢神经系统疾病,临床表现以反复性、短暂性、发作性的中枢神经系统功能紊乱最为突出。相关研究显示,世界总人口中 5%~7% 的人群受癫痫疾病的折磨,部分癫痫患者需要使用抗癫痫药物进行长期治疗以控制病情,抗癫痫药物的使用可对患者神经系统和胃功能造成一定影响,从而影响癫痫患者的生活质量,且近年来癫痫的发病率呈现明显的上升趋势^[9-11]。

CD69 是 T 细胞活化后最早表达的抗原,当其表达后可作为辅助刺激分子,使细胞进一步活化和增殖,属于自然杀伤(NK)细胞信号传递复合体基因家族的一员,在活化的 NK 细胞及 T 细胞表面均可表

达,在未活化的 NK 细胞及 T 细胞上均不表达,故 CD69 可作为一种活化诱导分子来反映细胞的活化状态。此外,CD69 也是 NK 细胞杀伤活化性受体之一,其可以传递活化信号,反映 NK 细胞的杀伤功能和活化状态,在 NK 细胞没有杀伤功能时,CD69 表达缺失^[12]。杨立利等^[13] 研究结果表明,急性脊髓损伤患者 CD69 水平明显高于健康对照者,表明外周血淋巴细胞对急性脊髓损伤的刺激产生了积极的免疫应答。本研究结果表明,癫痫组外周血 CD69 表达水平高于对照组 ($P < 0.05$);与轻度患者比较,中度和重度患者外周血 CD69 表达水平升高,与中度患者比较,重度患者外周血 CD69 表达水平升高,提示 CD69 水平升高可能与癫痫的严重程度有关。此外,Logistic 回归分

析结果表明,外周血 CD69 表达水平升高是癫痫发生的危险因素,进一步提示 CD69 可能在癫痫病情进展中发挥一定作用。

miRNA 参与调节免疫反应、神经元可塑性,且 miRNA 转录后处理参与了神经系统的生理学过程及信号通路的基因表达调控^[14]。目前研究认为,血清 miRNA 主要从患者组织细胞中主动分泌进入血液循环,血清 miRNA 表达水平可反映病变组织内的情况^[15]。HU 等^[16]研究发现,大鼠癫痫模型中大脑组织与外周血中的 miRNA-34a、miRNA-22、miRNA-125a、miRNA-21 表达水平均升高。本研究发现,癫痫组外周血 miR-130b-3p 表达水平高于对照组($P < 0.05$),且随着癫痫患者病情严重程度加重,外周血 miR-130b-3p 表达水平不断升高,提示 miR-130b-3p 表达水平上调可能参与癫痫的发生及疾病进展。本研究中 Logistic 回归分析发现,外周血 miR-130b-3p 表达水平升高是癫痫发生的危险因素,提示检测 miR-130b-3p 表达水平可能对评估癫痫发生有积极意义。此外,Pearson 相关分析结果显示,癫痫患者外周血 CD69 与 miR-130b-3p 表达水平呈正相关($P < 0.05$),提示 CD69、miR-130b-3p 表达可能共同参与疾病发展,检测二者表达水平对于评估癫痫患者病情具有一定的参考价值。

综上所述,癫痫患者外周血中 CD69、miR-130b-3p 呈高表达,检测 CD69、miR-130b-3p 表达水平可能对评估癫痫患者病情严重程度有帮助。

参考文献

- [1] 王晓爽,国琦,朱亚飞,等. 癫痫患者外周血 miR-134 表达及意义[J]. 中风与神经疾病杂志,2020,37(2):154-157.
- [2] 陈刚. 癫痫患者血清和脑脊液 miR-146a 的表达及其与炎症细胞因子的相关性研究[J]. 慢性病学杂志,2020,21(5):794-795.
- [3] ROWBOTHAM D S, HOWDLE P D, TREJDOSIEWICZ L K. Peripheral cell-mediated immune response to mycobacterial antigens in inflammatory bowel disease[J]. Clin Exp Immunol, 1995, 102(3):456-461.
- [4] BRAIT V H, MIRÓ-MUR F, PÉREZ-DE-PUIG I, et al.

CD69 plays a beneficial role in ischemic stroke by dampening endothelial activation[J]. Circ Res, 2019, 124(2):279-291.

- [5] 王小木,贾瑞华,姜翌,等. 抑制 miR-134 治疗大鼠癫痫持续状态实验研究[J]. 中华神经外科疾病研究杂志,2018,17(4):327-331.
- [6] 郑希院,赵志敏,薛林霞,等. 癫痫患者 miR-146a、miR-124、IL-1、Dcx 表达水平及临床意义[J]. 中西医结合心脑血管病杂志,2020,18(24):4280-4283.
- [7] 刘佳辰,许琪. miR-130b 促进小鼠胚胎发育过程中大脑皮质神经元的迁移[J]. 基础医学与临床,2017,37(7):959-962.
- [8] 中国抗癫痫协会. 临床诊疗指南:癫痫病分册[M]. 北京:人民卫生出版社,2015:35-38.
- [9] OGUZ A E, TEKURK P, YAPICI Z, et al. Eyelid myoclonic status epilepticus: a rare phenotype in spinal muscular atrophy with progressive myoclonic epilepsy associated with ASAH1 gene mutation[J]. Seizure, 2016, 42(1):49-51.
- [10] HAWKINS N A, KEARNEY J A. Confirmation of an epilepsy modifier locus on mouse chromosome 11 and candidate gene analysis by RNA-Seq[J]. Genes Brain Behav, 2012, 11(4):452-460.
- [11] 申冬冬. 癫痫患者外周血 P-糖蛋白水平检测的临床意义[J]. 中国实用医药,2012,7(19):128-129.
- [12] 岑慧,郭兰萍,黎东明,等. 肺癌患者外周血 NK 细胞表达 CD69 的临床意义[J]. 广东医学,2004,25(2):156-157.
- [13] 杨立利,贾连顺,苟三怀,等. 急性脊髓损伤患者外周血淋巴细胞 CD69 的检测及其临床意义[J]. 颈腰痛杂志,2003,24(1):4-6.
- [14] 郭志转,王佃晖,陈彦军. 微 RNA 和 APLN 对癫痫发作后神经元损伤调控机制研究[J]. 中华生物医学工程杂志,2019,25(4):427-431.
- [15] 肖慧娟,廖建湘,蒋莉. 微小核糖核酸 miR-146a-5p、miR-23a-3p 在儿童耐药性癫痫血清中的表达[J]. 中国神经精神疾病杂志,2013,39(8):500-503.
- [16] HU K, ZHANG C, LONG L, et al. Profile of microRNAs in rat hippocampus following lithium-pilocarpine-induced status epilepticus[J]. Neurosci Lett, 2011, 488(3):252-257.

(收稿日期:2022-08-10 修回日期:2022-10-21)

(上接第 530 页)

- [J]. 血栓与止血学,2021,27(5):801-802.
- [15] 凌莉,李小强,张素平,等. 急性脑梗死合并 2 型糖尿病患者大血小板比率和平均血小板体积的变化[J]. 实用医学杂志,2015,31(13):2127-2129.
- [16] 王建飞,彭瑜,张锦,等. 急性冠状动脉综合征患者大血小板比率与冠状动脉病变的相关性[J]. 临床心血管病杂志,2013,29(7):489-491.
- [17] 邵璇璇,贾建安,吴黎黎,等. HBV 感染者 DNA 载量分层与血小板相关参数关系[J]. 安徽医科大学学报,2018,53(6):976-979.

- [18] 齐林,刘永芳. 乙型肝炎病毒 DNA 与血清标志物的关系[J]. 国际检验医学杂志,2017,38(1):130-131.
- [19] 李珍瑶,黄小兵,李健茹,等. 不同 HBV-DNA 载量乙型肝炎肝硬化患者血小板参数及 D-二聚体检测的临床意义[J]. 标记免疫分析与临床,2017,24(6):639-641.
- [20] 郭静,李从荣. 慢性乙型肝炎患者 HBV DNA 载量与血小板及 APRI 的相关研究[J]. 检验医学,2018,33(4):321-323.

(收稿日期:2022-06-16 修回日期:2022-10-08)