

论著·临床研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2021.03.005

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20201217.1640.017.html\(2020-12-17\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20201217.1640.017.html(2020-12-17))

血清 miR-223 及 miR-155 对新生儿肺炎的诊断价值研究*

冯琼,林虹,蔡兴俊

(海南省人民医院新生儿科,海口 570311)

[摘要] **目的** 探讨血清微小 RNA(miR)-223、miR-155 在新生儿肺炎患儿中的表达情况,及其对新生儿肺炎的诊断价值。**方法** 选取 2015 年 9 月至 2017 年 9 月该院新生儿科收治的 121 例新生儿肺炎患儿作为新生儿肺炎组,另选取同期于该院正常分娩的 120 例健康新生儿作为对照组。采用全自动荧光免疫分析仪及配套试剂测定研究对象治疗前后血清中降钙素原(PCT)水平,采用全自动酶标仪测定治疗前后血清中白细胞介素-6(IL-6)水平并进行比较;采用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)法检测两组血清中 miR-223、miR-155 相对表达水平并进行比较;Pearson 分析 miR-223、miR-155 与 PCT、IL-6 的相关性;受试者工作特征(ROC)曲线分析 miR-223、miR-155 表达水平对新生儿肺炎的诊断价值。**结果** 与对照组比较,新生儿肺炎组治疗前 miR-223、miR-155、PCT 及 IL-6 水平明显升高($P < 0.05$);两组治疗后 miR-223、miR-155、PCT 及 IL-6 水平比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。与治疗前比较,新生儿肺炎组治疗后 miR-223、miR-155、PCT 及 IL-6 水平明显降低($P < 0.05$)。Pearson 相关性分析显示,两组 miR-223 与 miR-155、PCT、IL-6 表达呈正相关($P < 0.05$),miR-155 与 miR-223、PCT、IL-6 表达呈正相关($P < 0.05$)。ROC 曲线显示,血清 miR-223、miR-155、PCT、IL-6 水平诊断新生儿肺炎的曲线下面积(AUC)分别为 0.886、0.825、0.812、0.831,灵敏度分别为 85.9%、81.5%、82.7%、83.6%,特异度分别为 82.7%、78.7%、77.3%、82.1%;四者联合诊断的 AUC 为 0.956,灵敏度为 96.2%,特异度为 93.8%。**结论** miR-223、miR-155 在新生儿肺炎患儿中高表达,miR-223、miR-155、PCT 及 IL-6 联合检测可明显提高新生儿肺炎的诊断灵敏度及特异度。

[关键词] 婴儿,新生,疾病;肺炎;微小 RNA-223;微小 RNA-155;早期诊断**[中图分类号]** R722**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2021)03-0383-05

Study on the diagnostic value of serum miR-223 and miR-155 for neonatal pneumonia*

FENG Qiong, LIN Hong, CAI Xingjun

(Department of Neonatology, Hainan people's Hospital, Haikou, Hainan 570311, China)

[Abstract] **Objective** To explore the expression of serum microRNA (miR)-223 and miR-155 in children with neonatal pneumonia and their diagnostic value for neonatal pneumonia. **Methods** The 121 neonatal pneumonia patients admitted to the neonatal department of the hospital from September 2015 to September 2017 were selected as the neonatal pneumonia group, and 120 healthy newborns who gave birth in the hospital during the same period were selected as the control group. The automatic fluorescence immunoassay analyzer and supporting reagents were used to determine the serum procalcitonin (PCT) levels of the subjects before and after treatment, and the automatic microplate reader was used to determine the serum interleukin-6 (IL-6) levels before and after treatment. Real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) was used to detect the relative expression levels of miR-223 and miR-155 in the two groups; Pearson was analyzed the correlation among miR-223, miR-155, PCT and IL-6; receiver operating characteristic (ROC) curve was used to analyze the diagnosis of miR-223, miR-155 expression level in neonatal pneumonia. **Results** Compared with the control

* 基金项目:国家自然科学基金地区科学基金项目(81860007);海南省卫生厅科学研究课题(琼卫 2012PT-13)。 作者简介:冯琼(1981-),副主任医师,本科,主要从事新生儿疑难疾病的诊治研究。

group, the levels of miR-223, miR-155, PCT and IL-6 were significantly higher in the neonatal pneumonia group before treatment ($P < 0.05$), after treatment, there was no statistical significant difference in the levels of miR-223, miR-155, PCT and IL-6 between the two group ($P > 0.05$). Compared with before treatment, the levels of miR-223, miR-155, PCT and IL-6 in the neonatal pneumonia group after treatment were significantly lower ($P < 0.05$); Pearson correlation analysis showed that miR-223 was positively correlated with miR-155, PCT and IL-6 ($P < 0.05$), while miR-155 was positively correlated with miR-223, PCT and IL-6 ($P < 0.05$); ROC showed that area under the curve (AUC) of miR-223, miR-155, PCT, IL-6 for neonatal pneumonia was 0.886, 0.825, 0.812, 0.831, respectively, while sensitivity was 85.9%, 81.5%, 82.7%, 83.6%, respectively, and specificity was 82.7%, 78.7%, 77.3%, and 82.1%, respectively. AUC of the combined diagnosis of the four was 0.956, sensitivity was 96.2%, and specificity was 93.8%. **Conclusion** MiR-223 and miR-155 highly expresses in neonatal pneumonia, the combined detection of miR-223, miR-155, PCT and IL-6 significantly improves the diagnostic sensitivity and specificity.

[Key words] infant, newborn, diseases; pneumonia; microRNA-223; microRNA-155; early diagnosis

新生儿肺炎是新生儿常见病,可于宫内、分娩过程中或出生后发病,主要由不同病原体(如细菌、病毒、支原体、真菌等)感染引起,其是引起新生儿死亡的主要原因,有报道围生期新生儿肺炎病死率达10%~20%^[1],对新生儿生存质量、生长发育造成严重影响。因此,早期诊断新生儿肺炎、及时采取相应积极措施进行干预是提高新生儿存活率及生存质量的关键。临床上通常经验性使用广谱抗生素对新生儿肺炎进行治疗,以至于不规范使用抗菌药物导致患儿产生大量耐药菌株,对后续治疗效果带来严重影响^[2-3]。新生儿肺炎早期临床表现不明显,病原学检查往往比较滞后,缺乏快速、灵敏、特异的诊断指标^[4]。以往研究常以白细胞计数、白细胞介素-6(IL-6)等评价机体炎性反应程度,但此类指标灵敏度、特异度较低^[5]。因此,寻求有效、准确的生物学指标对诊断新生儿肺炎意义重大。微小RNA(miRNA/miR)是一类高度保守、内源性、非编码核苷酸,与机体免疫功能异常存在密切关系^[6]。邵慧芝等^[7]研究发现,与健康儿童比较,重症肺炎患儿外周血 miR-223 水平明显升高,可作为重症肺炎早期诊断标志物之一。张薇等^[8]研究发现,与健康对照组比较,支原体肺炎患儿外周血 miR-155 表达水平明显升高,推测 miR-155 参与支原体肺炎的发生、发展。然而,有关 miR-223、miR-155 在新生儿肺炎中表达情况的研究却鲜有报道,故本研究同时探讨新生儿肺炎患儿血清 miR-223、miR-155 表达情况,以为诊断新生儿肺炎提供一定参考,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2015 年 9 月至 2017 年 9 月本院新生儿科收治的 121 例新生儿肺炎患儿作为新生儿肺炎组。纳

入标准:(1)符合临床新生儿肺炎诊断标准^[9];(2)足月产;(3)临床资料完整。排除标准:(1)伴有其他感染性疾病;(2)一般情况较差;(3)临床资料不完整。另选取同期于本院正常分娩的 120 例健康新生儿作为对照组。所有新生儿均为单胎。本研究经本院医学伦理委员会批准,所有标本采集均取得患者及家属知情同意并签字。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂与仪器

TRIzol 试剂(货号 MN562J2)、逆转录试剂盒(货号 J6547M)、实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)试剂盒(货号 N5643MJ)购自美国 Sigma 公司、SYBR Premix ExTaq 试剂盒(货号 N5643MJ)PrimeScript RT reagent 试剂盒(货号 ND6527J)、IL-6 ELISA 试剂盒(货号 726-NDY)均购自北京中衫金桥公司;实时荧光定量 PCR 分析仪(型号 7500)、分光光度计(型号 UV-3672)购自美国 Sigma 公司;全自动荧光免疫分析仪(型号 VI-DAS30)购自法国梅里埃公司;全自动酶标仪(型号 COBAS 601)购自德国罗氏公司。

1.2.2 标本采集及保存

根据所有患儿病原学检测结果及病情,对其进行相应抗菌治疗,分别于治疗前、后抽取静脉血 3 mL。对照组采集脐带血 3 mL,离心 10 min(2 000 r/min),分离得血清,于-80℃冰箱内保存,待测。

1.2.3 观察指标

采用全自动荧光免疫分析仪及配套试剂测定受试者治疗前、后血清中降钙素原(PCT)水平,采用全自动酶标仪测定血清中 IL-6 水平,以上操作严格按照仪器、试剂及试剂盒说明书进行。观察治疗前、后水平变化。

1.2.4 qRT-PCR 检测血清 miR-223、miR-155 相对

表达水平

采用 Trizol 试剂提取两组新生儿治疗前、后血清总 RNA,按照试剂盒说明书进行操作,使用分光光度计测定 RNA 浓度和纯度,1%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。以 RNA 为模板,按照 PrimeScript RT reagent 试剂盒说明书进行逆转录反应,以 cDNA 为模板,参照 SYBR Premix ExTaq 试剂盒进行 qRT-PCR 反应。反应体系 20.0 μL:2×UltraSYBR mix-

ture 10.0 μL,cDNA 模板(25 ng/μL)2.0 μL,上下游引物各 2.0 μL,ddH₂O 4.0 μL。反应条件:预变性 95 °C 30 s,变性 95 °C 5 s,退火 60 °C 30 s,延伸 72 °C 20 s,共 40 个循环。引物由大连宝生生物工程有限公司设计并合成,miR-223、miR-155 均以 U6 作为内参基因。采用 2^{-ΔΔCt} 方法计算两组新生儿血清中 miR-223、miR-155 相对表达水平。引物设计见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物

基因	正向引物 5'-3'	反向引物 5'-3'
U6	AAGGTGAAGGTCGGAGTCAAC	GGGGTCATTGATGGCAACAATA
miR-223	ATTGGAACGATACAGAGAAGATT	GGAACGCTTCACGAATTTG
miR-155	GGGAAUAGUAGCUGUCAATT	UUUGACAGCUACUAUUCCTT

1.3 统计学处理

采用 SPSS19.0 软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较采用 *t* 检验;采用 Pearson 分析相关性,绘制受试者工作特征(ROC)曲线评价诊断价值,并计算曲线下面积(AUC),以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两组一般资料

两组性别、胎龄、年龄、出生方式比较,差异无统计学意义(*P* > 0.05),见表 2。

2.2 两组 miR-223、miR-155、PCT、IL-6 相对表达水平比较

与对照组比较,新生儿肺炎组治疗前 miR-223、miR-155、PCT 及 IL-6 水平明显升高(*P* < 0.05);两组治疗后 miR-223、miR-155、PCT 及 IL-6 水平比较,差异无统计学意义(*P* > 0.05)。与治疗前比较,新生

儿肺炎组治疗后 miR-223、miR-155、PCT 及 IL-6 水平明显降低(*P* < 0.05),见表 3。

表 2 两组一般资料比较

项目	对照组 (<i>n</i> = 120)	新生儿肺炎组 (<i>n</i> = 121)	<i>t</i> /χ ²	<i>P</i>
男/女(<i>n</i> / <i>n</i>)	58/62	60/61	0.038	0.846
孕周($\bar{x} \pm s$,周)	38.25 ± 10.66	38.13 ± 10.18	0.089	0.929
年龄($\bar{x} \pm s$,d)	16.57 ± 7.26	15.68 ± 7.35	0.036	0.851
顺产/剖宫产(<i>n</i> / <i>n</i>)	79/41	82/39	0.033	0.855

2.3 两组 miR-223、miR-155 及 PCT、IL-6 相关性分析

Pearson 相关性分析显示,两组 miR-223 与 miR-155、PCT、IL-6 表达呈正相关(*P* < 0.05),miR-155 与 miR-223、PCT、IL-6 表达亦呈正相关(*P* < 0.05),见表 4。

表 3 两组 miR-223、miR-155、PCT、IL-6 相对表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

项目	对照组(<i>n</i> = 120)	新生儿肺炎组(<i>n</i> = 121)		<i>F</i>	<i>P</i>
		治疗前	治疗后		
miR-223	5.89 ± 1.66	16.77 ± 5.32 ^a	5.96 ± 1.73 ^b	415.919	<0.001
miR-155	2.19 ± 0.62	6.36 ± 1.86 ^a	2.25 ± 0.68 ^b	491.277	<0.001
PCT(ng/mL)	5.72 ± 2.21	10.53 ± 3.39 ^a	5.76 ± 2.25 ^b	129.206	<0.001
IL-6(pg/mL)	11.58 ± 3.63	72.77 ± 22.15 ^a	11.06 ± 3.35 ^b	886.967	<0.001

^a: *P* < 0.05,与对照组比较;^b: *P* < 0.05,与治疗前比较。

2.4 miR-223、miR-155、PCT、IL-6 对新生儿肺炎诊断的 ROC 曲线

以血清 miR-223、miR-155、PCT、IL-6 水平为检验变量绘制 ROC 曲线,结果显示血清 miR-223、miR-

155、PCT、IL-6 水平诊断新生儿肺炎的 AUC 分别为 0.886(0.833,0.939)、0.825(0.750,0.901)、0.812(0.737,0.891)、0.831(0.839,0.903),截断值分别为 11.36、4.32 和 8.13 ng/mL、35.69 pg/mL,灵敏度分

别为 85.9%、81.5%、82.7%、83.6%，特异度分别为 82.7%、78.7%、77.3%、82.1%；两者联合诊断的 AUC 为 0.956(0.961,0.953)，灵敏度为 96.2%，特异度为 93.8%，见图 1。

表 4 两组 miR-223、miR-155 及 PCT、IL-6 相关性分析

变量	miR-223		miR-155	
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
PCT	0.496	0.023	0.447	0.041
IL-6	0.511	0.001	0.562	0.016
miR-223	—	—	0.588	0.033
miR-155	0.425	0.016	—	—

—:无数据。

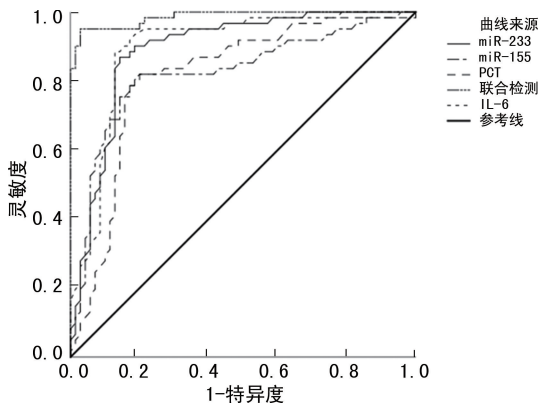


图 1 miR-223、miR-155、PCT、IL-6 对新生儿肺炎诊断的 ROC 曲线

3 讨论

新生儿肺炎是新生儿时期常见病、多发病，临床表现往往不典型，常与其他疾病并发，漏诊、误诊率较高，且由于新生儿特殊的生理、免疫状态，使得病情变化较快，极易出现窒息、呼吸衰竭，严重者出现循环衰竭甚至死亡^[10]。因此，预防新生儿肺炎的发生，及早做出准确诊断并采取积极措施进行干预是研究的热点。

成熟 miRNA 是长度为 20~23 个核苷酸的单链 RNA 分子，是基因表达的重要调节剂，通常会降低 mRNA 稳定性。miRNA 靶向主要是通过 miRNA 5' 端(“种子”区域)与 mRNA 编码区和非翻译区(UTR)内的位点之间的特定碱基配对相互作用实现的。其在调节生物学过程(如免疫细胞谱系的发生、分化和成熟及维持免疫稳态、正常功能)中起着重要作用^[11]。但有研究报道，miRNA 家族中 miR-223^[12]、miR-155^[13]在肺炎继发脓毒症患者中、支原体感染肺炎模型小鼠中有较高的临床诊断价值。因此推测 miR-223、miR-155 异常表达与新生儿肺炎发生有关，且有一定的诊断价值。本研究探讨新生儿肺炎患儿血清 miR-223、miR-155 表达情况，以期寻找准确、有效

的新生儿肺炎早期诊断指标提供一定参考。颜保松等^[14]研究发现，肺结核组患者外周血中 miR-223 水平明显高于健康对照组，且对肺结核具有较高诊断价值。本研究结果显示，新生儿肺炎组患儿治疗前血清中 miR-223 水平明显高于对照组，治疗后血清 miR-223 恢复至正常水平，提示 miR-223 可能与新生儿肺炎发生、发展关系密切。周好好等^[15]研究发现，与正常对照组比较，哮喘模型组小鼠肺组织中 miR-155 水平明显升高，推测 miR-155 可能参与了哮喘发病过程。本研究显示，新生儿肺炎组患儿治疗前血清中 miR-155 水平明显高于对照组，治疗后血清中 miR-155 水平同样恢复至正常水平，提示 miR-155 可能参与了新生儿肺炎发病过程。

以往有学者以 PCT、IL-6 等感染性标志物在新生儿肺炎患儿中的表达情况对病情做出诊断^[16]。但有研究显示，PCT、IL-6 等在新生儿肺炎患儿血清中高表达，与新生儿肺炎发生、发展关系密切，但 IL-6 灵敏度、特异度较低^[17]。本研究结果显示，与对照组比较，新生儿肺炎组患儿治疗前血清中 PCT、IL-6 水平明显升高，治疗后，血清中 PCT、IL-6 水平恢复正常水平；与治疗前比较，新生儿肺炎组患儿治疗后血清中 PCT、IL-6 水平明显降低，与以往研究趋势一致，这提示 PCT、IL-6 与新生儿肺炎发生、发展关系密切。正常情况下，血液循环中 PCT、IL-6 水平较低，炎症反应中 PCT、IL-6 水平升高。研究显示，PCT、IL-6 水平与病情严重程度相关，可以反映炎症损伤的严重程度^[18]。本研究进一步发现，血清 miR-223 与 miR-155、PCT、IL-6 表达呈正相关，miR-155 与血清 miR-223、PCT、IL-6 表达呈正相关。提示血清 miR-223、miR-155 与 PCT、IL-6 一样具有早期评估新生儿肺炎的能力。

综上所述，miR-223、miR-155 异常高表达可能与新生儿肺炎发生、发展有关，具有评估新生儿肺炎的能力，且 miR-223、miR-155、PCT 及 IL-6 联合检测明显提高了对新生儿肺炎的诊断灵敏度及特异度，可为临床对新生儿肺炎的诊断提供一定参考。然而本研究并未对 miR-223、miR-155、PCT 及 IL-6 在新生儿肺炎患儿中的具体作用机制进行阐述，因此，后期应进行大样本量的研究并对具体机制进行探讨。

参考文献

- [1] 朱慧,路妍妍,田耕.未足月胎膜早破产妇及新生儿结局的影响因素分析[J].实用医学杂志,2018,34(12):2046-2048.

- [2] 钱耀先,陈俊,王燕,等. 孕妇 B 群链球菌携带情况及对新生儿结局的影响[J]. 检验医学与临床, 2019,16(14):1969-1971.
- [3] 何瑞堂,吴雪,杨越,等. NICU 新生儿肺炎克雷伯菌感染的耐药分析[J]. 中国实验诊断学, 2017,21(12):2158-2159.
- [4] 赵佳,臧国礼,陈仕宇,等. 肺脏超声与 X 线在新生儿感染性肺炎诊断中的应用比较[J]. 重庆医学, 2020,49(10):1627-1630.
- [5] LIU S, HOU Y, CUI H. Clinical values of the early detection of serum procalcitonin, C reactive protein and white blood cells for neonates with infectious diseases[J]. Pak Medical Sci, 2016,32(6):1326-1329.
- [6] KUMAR K S M, VISHNU B B. Role of microRNAs in the development and function of innate immune cells[J]. Int Rev Immunol, 2017, 36(3):154-175.
- [7] 邵慧芝,吕勤,陈赫赫. microRNA-223 在重症肺炎患儿血浆中的表达意义及其与预后的关系[J]. 中国医师杂志, 2016,18(3):402-405.
- [8] 张薇,孙浩森,王洁. 肺炎患儿外周血 miR-146a、miR-155 表达水平及其与 T 淋巴细胞亚群和炎症因子的关系[J]. 热带医学杂志, 2019,19(11):1404-1407.
- [9] 刘红,冯国隽,杨红梅,等. 肺部超声联合肺潮气功能检查对新生儿肺炎的诊断[J]. 中国临床研究, 2018,31(8):1102-1105.
- [10] 黄森,罗蓉,符州. 儿童重症腺病毒肺炎不良预后的危险因素分析[J]. 中国当代儿科杂志, 2017,19(2):159-162.
- [11] VOS P D, LEEDMAN P J, FILIPOVSKA A, et al. Modulation of miRNA function by natural and synthetic RNA-binding proteins in cancer[J]. Cell Mol Life Sci, 2019, 76(19):3745-3752.
- [12] 张文平,朱敏,田翠杰,等. 循环 miRNA 在老年肺炎患者继发脓毒症中的诊断价值[J]. 中华老年医学杂志, 2018,37(7):783-787.
- [13] 许长娣,周瑶,赵德育,等. 肺炎支原体肺炎患儿外周血及小鼠模型 miRNAs 差异表达[J]. 安徽医科大学学报, 2018,53(4):567-570.
- [14] 颜保松,王静,罗杰,等. miR-101、miR-223 和 miR-424 在肺结核诊断中的价值[J]. 重庆医学, 2016,45(14):1902-1905.
- [15] 周好好,黄翠萍. 支气管哮喘小鼠肺组织 miR-155 的变化及对环氧合酶-2 的影响[J]. 国际呼吸杂志, 2019,39(11):807-813.
- [16] 胡玲,黎小年. 降钙素原联合超敏 C 反应蛋白在小儿支气管肺炎诊治过程中的应用价值[J]. 中国综合临床, 2018,34(5):412-415.
- [17] 成小蓉,杜丽. 射干麻黄汤加减联合布地奈德对寒痰郁肺型小儿毛细支气管炎患者治疗效果观察[J]. 中国中医基础医学杂志, 2019,25(8):1104-1107.
- [18] 徐明均,刘国攀,贾元元,等. 人胎盘间充质干细胞移植降低急性肺损伤小鼠肺组织炎症因子水平[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2018,34(2):105-109.

(收稿日期:2020-04-28 修回日期:2020-09-12)