

## 论著·临床研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2022.17.012

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20220422.0953.002.html\(2022-04-22\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20220422.0953.002.html(2022-04-22))miR-29a-3p 与 ELN 在早产儿支气管肺发育不良  
患儿中的表达意义\*

许花芬,冯琼,李春蕾

(海南省人民医院海南医学院附属海南医院新生儿科,海口 570311)

**[摘要]** **目的** 探讨血清微 RNA(miR)-29a-3p、弹性蛋白(ELN)在早产儿支气管肺发育不良(BPD)患儿中的表达意义。**方法** 选取 2019 年 1 月至 2021 年 7 月该院 131 例早产儿为研究对象,分为 BPD 组(34 例)和非 BPD 组(97 例)。采用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)法检测 miR-29a-3p 水平,ELISA 法检测早产儿出生后第 1、7、14 天血清 ELN 水平,并进行相关性、受试者工作特征(ROC)曲线及多因素分析。**结果** 与非 BPD 组比较,BPD 组机械通气时间、吸氧时间更长,最高氧浓度、院内感染率更高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。早产儿出生后第 7、14 天,BPD 组 miR-29a-3p 相对表达水平高于非 BPD 组,ELN 水平低于非 BPD 组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。随着时间推移,BPD 组 miR-29a-3p 相对表达水平逐渐上升,ELN 水平逐渐下降,不同时间点比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。BPD 组早产儿出生后第 7 天 miR-29a-3p 与 ELN 水平呈负相关( $r = -0.571, P < 0.05$ )。早产儿出生后第 7 天 miR-29a-3p、ELN 及其联合预测 BPD 发生的曲线下面积(AUC)分别为 0.863、0.878、0.949。miR-29a-3p( $OR = 2.379, 95\%CI: 1.582 \sim 3.576$ )、ELN( $OR = 0.837, 95\%CI: 0.765 \sim 0.916$ )是早产儿 BPD 发生的独立影响因素( $P < 0.05$ )。**结论** 血清 miR-29a-3p、ELN 水平检测对 BPD 有早期预测价值。

**[关键词]** 支气管肺发育不良;早产儿;微 RNA-29a-3p;弹性蛋白;预测价值;预后

**[中图分类号]** R816.92 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2022)17-2932-04

Significance of miR-29a-3p and ELN expression in premature  
infants with bronchopulmonary dysplasia\*

XU Huaifen, FENG Qiong, LI Chunlei

(Department of Neonatology, Hainan General Hospital, Hainan Affiliated Hospital of Hainan Medical University, Haikou, Hainan 570311, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the expression significance of microRNA (miR)-29a-3p and elastin (ELN) in premature infants with bronchopulmonary dysplasia (BPD). **Methods** A total of 131 premature infants in our hospital were divided into 34 cases in BPD group and 97 cases in non-BPD group. Real-time fluorescent quantitative PCR (qRT-PCR) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method was used to detect miR-29a-3p and ELN on the 1st, 7th, and 14th day of premature infants, and correlation, receiver operating characteristic (ROC) curve and multi factor analysis were carried out. **Results** Compared with the non-BPD group, the mechanical ventilation time and oxygen inhalation time of BPD group were longer, the highest oxygen concentration and nosocomial infection rate were higher, and the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). On the 7th and 14th day after birth, the relative expression level of miR-29a-3p in BPD group was higher than that in non-BPD group, and ELN level was lower than that in non-BPD group, the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). With the passage of time, the serum miR-29a-3p level in BPD group gradually increased, and ELN level gradually decreased, and the difference was statistically significant at different time points ( $P < 0.05$ ). Serum miR-29a-3p and ELN levels of premature infants in BPD group were negatively correlated on the 7th day after birth ( $r = -0.571, P < 0.05$ ). The area under the curve (AUC) of serum miR-29a-3p, ELN and their combination predicting the occurrence of BPD in preterm infants on the 7th day after birth was 0.863 and 0.878, 0.949, respectively. MiR-29a-3p ( $OR = 2.379, 95\%CI: 1.582 - 3.576$ ) and ELN

( $OR=0.837, 95\%CI:0.765-0.916$ ) were independent factors influencing the occurrence of BPD in premature infants ( $P<0.05$ ). **Conclusion** The detection of serum miR-29a-3p and ELN levels has early predictive value for BPD.

**[Key words]** bronchopulmonary dysplasia; premature infants; microRNA-29a-3p; elastin; predictive value; prognosis

支气管肺发育不良(bronchopulmonary dysplasia, BPD)大多数发生于胎龄 $<32$ 周的早产儿,其发病不利于早产儿预后<sup>[1-2]</sup>。寻找 BPD 早期标志物进行诊断并干预,有利于降低发病率和致残率。微 RNA (microRNA, miR)-29a 可抑制靶基因 mRNA 翻译,从而对其发挥转录后调控作用<sup>[3]</sup>。弹性蛋白(elastin, ELN)可为各血管壁细胞提供骨架结构,与心血管疾病发生有关<sup>[4]</sup>。ZHONG 等<sup>[5]</sup>研究显示,BPD 小鼠肺组织中 miR-29a-3p 表达上调,ELN 表达下调,但目前仍缺少 miR-29a-3p、ELN 在 BPD 早产儿血清中的表达研究。因此,本研究通过检测不同时间点血清 miR-29a-3p、ELN 的表达水平,探讨二者在 BPD 早产儿中的价值,现报道如下。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取 2019 年 1 月至 2021 年 7 月本院新生儿科收治的 131 例早产儿为研究对象。纳入标准:(1)所有 BPD 早产儿符合 BPD 诊断标准<sup>[6]</sup>,其诊断要点为:低出生体重,早产,超过 21%的氧气治疗至少 28 d 或纠正胎龄 36 周仍需氧气治疗,伴有进行性或持续性呼吸功能不全,有明显肺部影像学表现;(2)胎龄 $\leq 32$ 周、体重 $\leq 1500$  g,存活 28 d 以上者;(3)早产儿病历资料齐全,研究符合伦理标准,经家长同意,并签署同意书。排除标准:(1)有其他严重肺部疾病者;(2)有严重肺外感染者;(3)有先天性心脏病、先天性畸形、先天性代谢紊乱者。根据 BPD 诊断标准将其分为 BPD 组(34 例)和非 BPD 组(97 例)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 资料采集

收集整理两组胎龄、性别、出生体重、剖宫产、机械通气时间、吸氧时间、最高氧浓度、院内感染等一般资料。

#### 1.2.2 血清 miR-29a-3p、ELN 水平检测

采集两组早产儿出生后第 1、7、14 天静脉血标本,分离血清,保存备用。采用 RNA 提取试剂盒(北京康瑞纳生物科技有限公司)提取血清总 RNA,检测浓度后逆转录试剂盒(定州百克赛斯生物科技有限公司)将其逆转录为目标 cDNA。实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)法检测 miR-29a-3p 水平,反应体系:cDNA 模板(50 ng/ $\mu$ L)2  $\mu$ L,上下游引物(10  $\mu$ mol/L)各 0.8  $\mu$ L, Hieff qPCR SYBR<sup>®</sup> Green Master Mix (2 $\times$ ,上海翌圣生物科技股份有限公司)10  $\mu$ L, Rox reference dye(50 $\times$ ,上海经科化学科技有限公司)0.4  $\mu$ L,无核酸酶的水 6.0  $\mu$ L。选用 U6 为内参基因,采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法计算血清 miR-29a-3p 相对表达水平。所用引物委托美国 Invitrogen 公司合成,miR-29a-3p 上游引物 5'-GTA TCC GGT GAG TCC AAG CGC-3',下游引物 5'-GCT AGA CAG ATC CCA GTA C-3'; U6 上游引物 5'-CAT GAT GCA CGG CAA AGC ATC-3',下游引物 5'-GTA ATT ACC CGT CTC CGT GTC-3'。采用 ELISA 法检测血清 ELN 水平(试剂盒购自武汉益普生物科技有限公司)。

### 1.3 统计学处理

采用 SPSS25.0 软件进行数据分析,计量资料以  $\bar{x}\pm s$  表示,比较采用  $t$  检验或方差分析;计数资料以频数或百分率表示,比较采用  $\chi^2$  检验;相关性分析采用 Pearson 法及 Spearman 法;预测价值采用受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线分析,曲线下面积(area under curve, AUC)比较行  $Z$  检验;logistic 回归分析影响因素,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 两组一般资料比较

与非 BPD 组比较,BPD 组机械通气时间、吸氧时间更长,最高氧浓度、院内感染率更高,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见表 1。

表 1 两组一般资料比较

项目	非 BPD 组( $n=97$ )	BPD 组( $n=34$ )	$t/\chi^2$	$P$
胎龄( $\bar{x}\pm s$ ,周)	30.12 $\pm$ 1.17	30.09 $\pm$ 0.84	0.137	0.891
男[ $n(\%)$ ]	46(47.42)	16(47.06)	0.001	0.971
出生体重( $\bar{x}\pm s$ ,g)	1407.42 $\pm$ 243.16	1379.24 $\pm$ 267.09	0.567	0.572
剖宫产[ $n(\%)$ ]	67(69.07)	23(67.65)	0.024	0.877

续表 1 两组一般资料比较

项目	非 BPD 组( $n=97$ )	BPD 组( $n=34$ )	$t/\chi^2$	$P$
机械通气时间( $\bar{x}\pm s, d$ )	3.75 $\pm$ 1.02	15.42 $\pm$ 3.98	26.653	<0.001
吸氧时间( $\bar{x}\pm s, d$ )	18.06 $\pm$ 3.02	43.26 $\pm$ 7.42	27.677	<0.001
最高氧浓度( $\bar{x}\pm s, \%$ )	30.74 $\pm$ 7.45	40.96 $\pm$ 9.83	<0.001	<0.001
院内感染[ $n(\%)$ ]	8(8.25)	12(35.29)	14.236	<0.001

## 2.2 两组不同时间点血清 miR-29a-3p、ELN 水平比较

早产儿出生后第 7、14 天, BPD 组 miR-29a-3p 相对表达水平高于非 BPD 组, ELN 低于非 BPD 组, 差异有统计学意义( $P<0.05$ )。随着时间推移, BPD 组 miR-29a-3p 相对表达水平逐渐上升, ELN 水平逐渐下降, 不同时间点比较差异有统计学意义( $P<0.05$ ), 见表 2。

表 2 两组不同时间点血清 miR-29a-3p、ELN 水平比较( $\bar{x}\pm s$ )

项目	非 BPD 组( $n=97$ )	BPD 组( $n=34$ )	$t/\chi^2$	$P$
miR-29a-3p				
第 1 天	1.01 $\pm$ 0.22	1.02 $\pm$ 0.21	0.231	0.818
第 7 天	1.06 $\pm$ 0.23	1.56 $\pm$ 0.36 <sup>a</sup>	9.316	<0.001
第 14 天	1.07 $\pm$ 0.23	2.13 $\pm$ 0.36 <sup>ab</sup>	19.750	<0.001
ELN(ng/mL)				
第 1 天	46.88 $\pm$ 3.74	46.96 $\pm$ 3.76	0.107	0.915
第 7 天	46.90 $\pm$ 3.78	39.64 $\pm$ 3.80 <sup>a</sup>	9.624	<0.001
第 14 天	46.86 $\pm$ 3.72	30.15 $\pm$ 3.84 <sup>ab</sup>	22.352	<0.001

<sup>a</sup>:  $P<0.05$ , 与同组第 1 天比较; <sup>b</sup>:  $P<0.05$ , 与同组第 7 天比较。

## 2.3 BPD 组 miR-29a-3p、ELN 水平与一般资料的相关性

Pearson 法及 Spearman 法分析结果显示, BPD 组早产儿出生后第 7 天 miR-29a-3p 与 ELN 水平呈负相关( $P<0.05$ ), 且机械通气时间、吸氧时间、最高氧浓度、院内感染与 miR-29a-3p 呈正相关, 与 ELN 呈负相关( $P<0.05$ ), 见图 1、表 3。

## 2.4 miR-29a-3p、ELN 水平对早产儿 BPD 的预测价值

以是否发生 BPD 为状态变量绘制 ROC 曲线, 结果显示, 早产儿出生后第 7 天 miR-29a-3p、ELN 及其联合预测 BPD 发生的 AUC 分别为 0.863(0.773, 0.953)、0.878(0.819, 0.937)、0.949(0.905, 0.993), 且联合预测 AUC 均大于 miR-29a-3p、ELN 单独预测 AUC( $Z=1.687, 1.908, P<0.05$ ), 灵敏度分别为 76.5%、82.4%、94.1%, 特异度分别为 89.7%、79.4%、86.6%, 见图 2。

## 2.5 影响早产儿 BPD 发生的多因素 logistic 回归分析

将早产儿是否发生 BPD 作为因变量, 多因素 logistic 回归分析结果显示, miR-29a-3p、ELN 是早产儿 BPD 发生的独立影响因素( $P<0.05$ ), 见表 4。

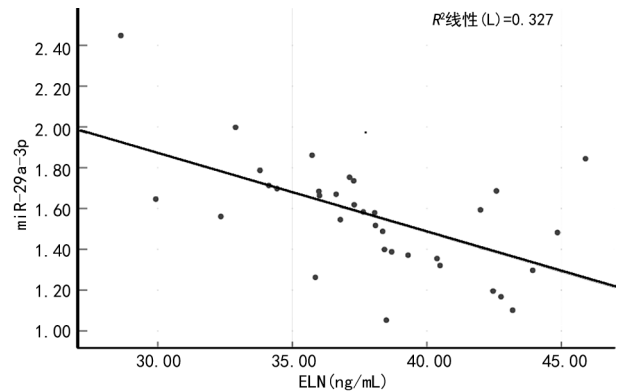


图 1 BPD 组 miR-29a-3p 与 ELN 水平相关性

表 3 BPD 组 miR-29a-3p、ELN 与一般资料的相关性分析

项目	miR-29a-3p		ELN	
	$r$	$P$	$r$	$P$
机械通气时间	0.504	0.008	-0.496	0.010
吸氧时间	0.523	0.004	-0.530	0.001
最高氧浓度	0.520	0.002	-0.527	0.001
院内感染	0.514	<0.001	-0.526	<0.001

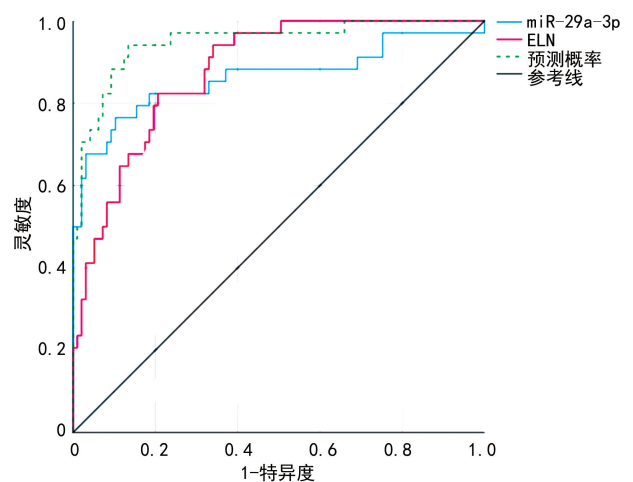


图 2 血清 miR-29a-3p、ELN 水平预测早产儿 BPD 的 ROC 曲线

表 4 影响早产儿 BPD 发生的多因素 logistic 回归分析

项目	B	SE	Wald	P	OR	95%CI
miR-29a-3p	0.867	0.208	17.362	<0.001	2.379	1.582~3.576
ELN	-0.178	0.046	14.962	<0.001	0.837	0.765~0.916
机械通气时间	0.041	0.107	0.148	0.701	1.042	0.845~1.285
吸氧时间	0.216	0.227	0.905	0.342	1.241	0.795~1.936
最高氧浓度	0.135	0.132	1.052	0.305	1.145	0.884~1.483

### 3 讨 论

早产儿肺部慢性疾病 BPD 的发病率呈上升趋势,且严重威胁早产儿生命安全<sup>[7]</sup>。研究显示,机械通气相关因素均是引起 BPD 发生的危险因素,机体长时间的高氧暴露,使体内氧化和抗氧化系统平衡被打破,体内氧化应激反应会导致肺组织的结构和功能出现异常<sup>[8]</sup>。实现 BPD 早期预测是改善早产儿肺功能发育的重要前提。

miR 已被证实与 BPD 的发病机制有关,miR-29 家族的 miR-29a 下调可减轻 BPD 小鼠的肺损伤、促进细胞增殖、抑制细胞凋亡<sup>[9-10]</sup>。本研究结果显示,随时间推移,BPD 早产儿血清 miR-29a-3p 水平逐渐上升,ELN 水平逐渐下降,miR-29a-3p、ELN 表达趋势与 ZHONG 等<sup>[5]</sup>动物模型实验结果一致。此外,HU 等<sup>[3]</sup>研究中抑制 miR-29a 可减轻高氧诱导的新生小鼠 BPD,与本研究结果中 miR-29a-3p 与 BPD 的关系基本一致。推测本研究中血清 miR-29a-3p 水平上升后对靶基因 ELN 发挥转录后调控作用,抑制其翻译成蛋白,使其在肺组织中的弹性支架作用减弱,造成肺部发育不良,推动 BPD 的发生。此外,本研究相关性结果考虑可能是由于部分 BPD 早产儿出生后长时间暴露于机械通气及高氧环境中,造成肺部反复感染,而肺部感染可能会引起血清 miR-29a-3p 表达水平升高,miR-29a-3p 负调控 ELN 使其表达降低,影响肺部发育、造成肺损伤,而肺损伤又使吸氧时间、机械通气时间延长,形成恶性循环,促进 BPD 的发生、发展。NDZI 等<sup>[11]</sup>研究发现,与健康对照组相比,活动性肺结核患者中 hsa-miR-29a-3p 明显上调,进一步证明了血清 miR-29a-3p 表达水平与肺部感染的关系。

本研究 ROC 曲线分析结果显示,血清 miR-29a-3p、ELN 联合预测 BPD 的 AUC、灵敏度有明显升高。结合多因素分析结果,推断血清 miR-29a-3p、ELN 表达水平的良好调节可能是预防及改善 BPD 发生、发展的新策略。DENG 等<sup>[12]</sup>研究显示,异常肺泡形成和过度紊乱的 ELN 积聚也可能是 BPD 的主要病理特征。表明 ELN 过度表达和积聚同样不利于支气管肺发育,今后仍需进一步探究 ELN 在支气管肺发育中的平衡状态。

综上所述,miR-29a-3p、ELN 是 BPD 发生的影响因素,检测早产儿血清 miR-29a-3p、ELN 表达水平可早期预测 BPD 发生。今后将扩大样本量,探究机械通气、吸氧时间等是否影响 miR-29a-3p、ELN 表达水平。

### 参考文献

- [1] ZIMMERMANN L J I, KOSTENZER J, MADDER S. Tackling bronchopulmonary dysplasia to improve preterm health: a call for family-centered care at World Prematurity Day 2020 [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2020, 319 (5): 867-870.
- [2] NAKAMURA E, MATSUNAGA S, ONO Y, et al. Risk factors for neonatal bronchopulmonary dysplasia in extremely preterm premature rupture of membranes: a retrospective study [J]. *BMC Pregnancy Childbirth*, 2020, 20 (1): 662-677.
- [3] HU Y, XIE L, YU J, et al. Inhibition of microRNA-29a alleviates hyperoxia-induced bronchopulmonary dysplasia in neonatal mice via upregulation of GAB1 [J]. *Mol Med*, 2019, 26 (1): 3-21.
- [4] COCCIOLONE A J, HAWES J Z, STAIC UL-ESCU M C, et al. Elastin, arterial mechanics, and cardiovascular disease [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2018, 315 (2): 189-205.
- [5] ZHONG Q, WANG L, QI Z, et al. Long non-coding RNA TUG1 modulates expression of elastin to relieve bronchopulmonary dysplasia via sponging miR-29a-3p [J]. *Front Pediatr*, 2020, 8 (1): 1-17.
- [6] HIGGINS R D, JOBE A H, KOSO-THOMAS M, et al. Bronchopulmonary dysplasia: executive summary of a workshop [J]. *J Pediatr*, 2018, 197 (1): 300-308. (下转第 2941 页)

- F, et al. Renal damage in primary aldosteronism: a systematic review and meta-analysis[J]. *J Hypertens*, 2020, 38(1):3-12.
- [11] FALLO F, PILON C, URBANET R. Primary aldosteronism and metabolic syndrome [J]. *Horm Metab Res*, 2012, 44(3):208-214.
- [12] WU V, CHUEH S J, CHEN L, et al. Risk of new-onset diabetes mellitus in primary aldosteronism[J]. *J Hypertens*, 2017, 35(8):1698-1708.
- [13] AKEHI Y, YANASE T, MOTONAGA R, et al. High prevalence of diabetes in patients with primary aldosteronism (PA) associated with subclinical hypercortisolism and prediabetes more prevalent in bilateral than unilateral PA: a large, multicenter cohort study in Japan[J]. *Diabetes Care*, 2019, 42(5):938-945.
- [14] HU Y, ZHANG J, LIU W, et al. Determining the prevalence of primary aldosteronism in patients with new-onset type 2 diabetes and hypertension[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2020, 105(4):1079-1085.
- [15] SAIKI A, OTSUKI M, TAMADA D, et al. Diabetes mellitus itself increases cardio-cerebrovascular risk and renal complications in primary aldosteronism[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2020, 105(7):e2531-2537.
- [16] OHASHI K, HAYASHI T, WATANABE Y, et al. Primary aldosteronism with type 2 diabetes mellitus requires more antihypertensive drugs for blood pressure control: a retrospective observational study[J]. *J Clin Med Res*, 2018, 10(1):56-62.
- [17] KNOWLTON A A, LEE A R. Estrogen and the cardiovascular system [J]. *Pharmacol Ther*, 2012, 135(1):54-70.
- [18] NISHIMOTO K, UMAKOSHI H, SEKI T, et al. Diverse pathological lesions of primary aldosteronism and their clinical significance [J]. *Hypertens Res*, 2021, 44(5):498-507.
- [19] GOMEZ-SANCHEZ C E, QI X, VELARDE-MIRANDA C, et al. Development of monoclonal antibodies against human CYP11B1 and CYP11B2 [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2014, 383(1):111-117.
- [20] GIOCO F, SECCIA T M, GOMEZ-SANCHEZ E P, et al. Adrenal histopathology in primary aldosteronism[J]. *Hypertension*, 2015, 66(4):724-730.
- [21] OMATA K, TOMLINS S A, RAINEY W E. Aldosterone-producing cell clusters in normal and pathological states[J]. *Horm Metab Res*, 2017, 49(12):951-956.
- [22] ONO Y, NAKAMURA Y, MAEKAWA T, et al. Different expression of 11 $\beta$ -hydroxylase and aldosterone synthase between aldosterone-producing microadenomas and macroadenomas [J]. *Hypertension*, 2014, 64(2):438-444.

(收稿日期:2021-10-18 修回日期:2022-03-15)

(上接第 2935 页)

- [7] LOI B, VIGO G, BARALDI E, et al. Lung ultrasound to monitor extremely preterm infants and predict bronchopulmonary dysplasia: a multicenter longitudinal cohort study[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2021, 203(11):1398-1409.
- [8] 张红专, 蔡成, 李娟, 等. 长链非编码 RNA MAL-AT1 与白细胞介素-6 在早产儿支气管肺发育不良中表达的意义[J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2021, 36(7):533-536.
- [9] LAL C V, OLAVE N, TRAVERS C, et al. Exosomal microRNA predicts and protects against severe bronchopulmonary dysplasia in extremely premature infants [J]. *JCI Insight*, 2018, 3(5):1-14.
- [10] FISEROVA B, KUBICZKOVA L, SEDLARI KOVA L, et al. The miR-29 family in hematological malignancies [J]. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 2015, 159(1):184-191.
- [11] NDZI E N, NKENFOU C N, MEKUE L M, et al. MicroRNA hsa-miR-29a-3p is a plasma biomarker for the differential diagnosis and monitoring of tuberculosis [J]. *Tuberculosis (Edinb)*, 2019, 114(1):69-76.
- [12] DENG S, ZHANG H, HAN W, et al. Transforming growth factor- $\beta$ -neutralizing antibodies improve alveolarization in the oxygen-exposed newborn mouse lung[J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2019, 39(2):106-116.

(收稿日期:2021-10-18 修回日期:2022-03-28)