

论著·临床研究

脑出血疾病患者脑脊液中 NSE、S100 β 及 miR-124-3p、miR-146a-5p 检测的临床意义*

杨 奇¹, 史清海², 牛莉莉³, 王 黎², 李 凯², 邓梦芸², 胡慧婷², 伏建峰^{2 Δ}

(1. 石河子大学医学院, 新疆石河子 832002; 2. 新疆军区总医院全军临床检验诊断中心, 新疆乌鲁木齐 830000; 3. 新疆昌吉州人民医院检验科, 新疆昌吉 831100)

摘要:目的 探讨脑出血疾病患者脑脊液(CSF)中神经元特异性烯醇化酶(NSE)、酸性钙结合蛋白(S100 β)及差异表达的 miRNA 在疾病诊断与病情评估中的价值。方法 选择脑出血(ICH)疾病患者 26 例, 依据格拉斯哥评分(GCS)将其分为轻度 ICH 组(13 例)、重度 ICH 组(13 例), 并选取 22 例同期排除脑部疾病住院病人作为对照, 采用实时荧光定量 PCR 检测所有入组对象 CSF 样本中的 15 个靶标微小 RNA(miRNA), 同时采用生化及化学发光方法检测 β_2 微球蛋白(β_2 -MG)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、乳酸(LAC)、乳酸脱氢酶(LD)、微量清蛋白(mAlb)、NSE、S100 β , 统计分析上述指标在诊断脑出血的效能及评估病情中的价值。结果 轻度 ICH 组 CSF NSE: 17.48(8.64, 26.86) ng/mL, S100 β : 1.40(0.38, 2.11) μ g/L, 重度 ICH 组 CSF NSE: 18.55(8.86, 24.69) ng/mL, S100 β : 1.51(1.10, 4.64) μ g/L, 明显高于对照组[NSE: 2.93(2.48, 3.83) ng/mL, S100 β : 0.43(0.25, 0.88) μ g/L], 差异有统计学意义($P < 0.05$); ICH 患者 CSF NSE 的水平与出血量显著相关($r = 0.86$; $P < 0.01$); 与对照组比较, ICH 组 CSF miR-124-3p 和 miR-146a-5p 显著上调, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。CSF 中 NSE、S100 β 、miR-124-3p、miR-146a-5p 诊断 ICH 的曲线下面积(AUC)分别为 0.931 [95% 置信区间(95%CI): 0.857~0.892]、0.795(95%CI: 0.670~0.921)、0.667(95%CI: 0.512~0.822) 和 0.878(95%CI: 0.776~0.844)。CSF 中 NSE、S100 β 两者联合诊断 ICH 的 AUC 为 0.945, 灵敏度为 84.6%, 特异度为 98.2%。结论 CSF 中 NSE、S100 β 、miR-124-3p、miR-146a-5p 的检测对于 ICH 的辅助诊断具有一定价值, 尤其 NSE、S100 β 可反映脑组织损伤严重程度。

关键词: 脑出血; 神经元特异性烯醇化酶; S100 β ; 微小 RNA; 诊断

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2019.11.005 **中图法分类号:** R446.1

文章编号: 1673-4130(2019)11-1302-06 **文献标识码:** A

Clinical significance of detection of NSE, S100 β , miR-124-3p and miR-146a-5p in cerebrospinal fluid of patients with cerebral hemorrhage*

YANG Qi¹, SHI Qinghai², NIU Lili³, WANG Li², LI Kai²,
DENG Mengyu², HU Huiting², FU Jianfeng^{2 Δ}

(1. School of Medicine, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832002, China; 2. National Military Clinical Diagnosis Center, General Hospital of Xinjiang Military Command, Urumqi, Xinjiang 830000, China; 3. Department of Clinical Laboratory, Changji People's Hospital, Changji, Xinjiang 831100, China)

Abstract: **Objective** To investigate the value of neuron-specific enolase (NSE), acidic calcium-binding protein (S100 β) and differentially expressed miRNA in cerebrospinal fluid (CSF) in patients with cerebral hemorrhage disease in disease diagnosis and disease assessment. **Methods** 26 patients with cerebral hemorrhage (ICH) disease were enrolled and divided into mild ICH group (13 cases) and severe ICH group (13 cases) according to Glasgow score (GCS). 22 patients who were excluded from brain diseases in the same period were selected as the control group. Biochemical and chemiluminescence methods were used to detect β_2 microglobulin (β_2 -MG), aspartate aminotransferase (AST), lactic acid (LAC), lactate dehydrogenase (LD), microalbumin (mAlb), NSE, S100 β . The efficacy of the above indicators in the diagnosis of cerebral hemorrhage

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81871020); 全军后勤科研计划面上项目(CLZ15C005)。

作者简介: 杨奇, 男, 硕士研究生在读, 主要从事脑损伤标志物方面的研究。 Δ 通信作者, E-mail: dxpjf@163.com。

本文引用格式: 杨奇, 史清海, 牛莉莉, 等. 脑出血疾病患者脑脊液中 NSE、S100 β 及 miR-124-3p、miR-146a-5p 检测的临床意义[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(11): 1302-1307.

and the value in the assessment of the condition were analyzed. **Results** CSF NSE in the mild ICH group was 17.48 (8.64, 26.86) ng/mL, S100 β was 1.40 (0.38, 2.11) μ g/L. CSF NSE in severe ICH group was 18.55 (8.86, 24.69) ng/mL, S100 β was 1.51 (1.10, 4.64) μ g/L, which were significantly higher than those in the control group [NSE: 2.93 (2.48, 3.83) ng/mL, S100 β : 0.43 (0.25, 0.88) μ g/L], and the differences were statistically significant ($P < 0.05$); The level of CSF NSE in patients with ICH was significantly correlated with the amount of bleeding ($r = 0.86, P < 0.01$). Compared with the control group, CSF miR-124-3p and miR-146a-5p were significantly up-regulated in the ICH group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). The area under curve (AUC) of ICH in NSE, S100 β , miR-124-3p, and miR-146a-5p in CSF were 0.931 [95% confidence interval (95% CI): 0.857–0.892], 0.795 (95% CI: 0.670–0.921), 0.667 (95% CI: 0.512–0.822) and 0.878 (95% CI: 0.776–0.844). The AUC of combined diagnosis of NSE and S100 β in CSF for ICH was 0.945, the sensitivity was 84.6%, and the specificity was 98.2%. **Conclusion** The detection of NSE, S100 β , miR-124-3p and miR-146a-5p in CSF has certain value for the auxiliary diagnosis of ICH, especially NSE and S100 β can reflect the severity of brain tissue damage.

Key words: cerebral hemorrhage; neuron-specific enolase; S100 β ; miRNA; diagnosis

脑出血(ICH)占急性脑卒中的 15%~20%, 具有高发病率和高病死率^[1]。ICH 后, 血脑屏障(BBB)损伤, 脑水肿和炎症等病理生理过程被激活, 参与相关过程的分子可能是诊断及病情评估潜在生物标志物^[2]。脑脊液(CSF)是具有许多重要功能一种体液, 并与中枢神经系统(CNS)的细胞外环境直接接触, 是 CNS 各种物质代谢的媒介^[3]。神经元特异性烯醇化酶(NSE)和酸性钙结合蛋白(S100 β)属于 CNS 的结构蛋白质, 被广泛用作 CNS 组织损伤的特异性生物标志物^[4]。到目前为止, 大多数研究主要集中在血液中, 考虑到脑或脊髓与 CSF 之间的紧密解剖和功能关系, 在 CNS 损伤时 CSF 中特异性结构蛋白浓度可能迅速且明显增加^[5]。微小 RNA(miRNA)是短的非编码 RNA(20~24 个核苷酸), 其在脑组织中含量丰富, 人体体液的基因表达谱和 ICH 实验模型已经提示 miRNA 是重要的基因调节因子且与神经系统疾病息息相关^[6], 而目前 ICH 患者 CSF 中 miRNA 表达变化的研究报道相对较少。本研究通过分析 ICH 患者 CSF NSE、S100 β 表达水平及发生显著改变的 miRNA, 探讨其对脑出血疾病的诊断价值及对病情的评估。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2016 年 3 月至 2018 年 4 月期间在新疆军区总医院神经外科确诊的新发 ICH 26 例患者作为病例组, 其中基底节出血 15 例, 丘脑出血 4 例, 脑干出血 4 例, 脑叶出血 3 例; 男 15 例, 女 11 例, 年龄(56.70 $\pm$ 14.50)岁, 出血量 35.00(23.25, 65.45) mL。对照组 22 例; 男 14 例, 女 8 例, 年龄(34.86 $\pm$ 12.46)岁。诊断符合中国脑出血诊治指南(2014)诊断标准, 并符合纳入标准: (1)均为原发性出血病例; (2)经临床医生系统评估(病史、神经系统检查、影像学检查(CT/MRI)符合自发性脑出血指针; 排除标准: (1)先天性血管病、血管炎; 自身免疫系统疾病; (2)颅脑手术史、外伤史、肿瘤史(肺癌、黑色素瘤)、血

液病史、心脑血管卒中史; (3)近期口服抗凝、抗血小板药物; (4)无法配合抽取 CSF 患者。脑出血组病情严重程度按照格拉斯哥昏迷评分(GCS)分为轻度 ICH 组(高 GCS 评分组)、重度 ICH 组(低 GCS 评分组)各 13 例。对照组选取同期住院经头颅 CT/MRI 证实无 CNS 疾病(脑血管、感染、脱髓鞘、变性疾病)、无心脑血管病史, 且 CSF 常规检查均在正常参考范围内。所有 CSF 样本的采集均经患者本人或家属同意, 并签署知情同意书。用于本项目研究的临床样本已获得新疆军区总医院伦理委员会的审核。

1.2 方法

1.2.1 试剂与仪器 MiRNA 的测定采用 qRT-PCR 法, 主要试剂及仪器包括: miRcute miRNA 提取分离试剂盒(离心柱型), miRcute miRNA cDNA 第一链合成试剂盒, miRcute 增强型荧光定量检测试剂盒(SYBR Green), 外参引物(CR100-01, TIANGEN, 北京), 余 miRNA 引物均购自天根生化科技(TIANGEN, 北京), 见表 1; β_2 -微球蛋白(β_2 -MG, 货号: BM7513, 北京利德曼)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST, 货号: 05850819190, 上海罗氏诊断)、乳酸(LAC, 货号: 05171881190, 上海罗氏诊断)、乳酸脱氢酶(LD, 货号: 05169330190, 上海罗氏诊断)、微量清蛋白(mAlb, 货号: 04469658190, 上海罗氏诊断)、NSE(货号: 12133113122, 上海罗氏诊断)、S100 β (货号: 03175243190, 上海罗氏诊断); Cobas 全自动荧光定量 PCR 分析仪 Z480、Cobas e701、Cobas e602 全自动生化仪均购自罗氏公司; BIO-RED T100 PCR 仪购自美国伯乐公司。

1.2.2 CSF 样本收集 收集研究对象入院 48 h 内 CSF 样本 3~5 mL, 使用无菌管收集, 上下轻轻颠倒混匀 8 次后, 立即置于 4 $^{\circ}$ C 或冰盒中运送, 将 CSF 转移至 1.5 mL 无 RNA 酶离心管中, 2 000 r/min 离心 10 min; 将上清转移至 1.5 mL 无 RNA 酶离心管中, 弃去细胞及组织沉淀; 每管吸入 500 μ L 上清进行封

装标记,并置于-80℃保存备用。

表 1 miRNA 成熟序列及对应引物

miRNA 全称	miRNA 成熟序列	编号	引物货号
hsa-miR-124-3p	UAA GGC ACG CGG UGA AUG CCA A	MIMAT0000422	CD201-0007
hsa-miR-146a-5p	UGA GAA CUG AAU UCC AUG GGU U	MIMAT0000449	CD201-0013
hsa-miR-21-5P	UAG CUU AUC AGA CUG AUG UUG A	MIMAT0000076	CD201-0092
hsa-miR-29c-3P	UAG CAC CAU UUG AAA UCG GUU A	MIMAT0000681	CD201-0404
hsa-miR-214-3p	ACA GCA GGC ACA GAC AGG CAG U	MIMAT0000271	CD201-0295
hsa-miR-9-5p	UCU UUG GUU AUC UAG CUG UAU GA	MIMAT0000441	CD201-0142
hsa-miR-16-5p	UAG CAG CAC GUA AAU AUU GGC G	MIMAT0000069	CD201-0235
hsa-miR-30e-5p	UGU AAA CAU CCU UGA CUG GAA G	MIMAT0000692	CD201-0340
hsa-miR-221-3P	AGC UAC AUU GUC UGC UGG GUU UC	MIMAT0000278	CD201-0097
hsa-miR-125b-5P	UCC CUG AGA CCC UAA CUU GUG A	MIMAT0000423	CD201-0047
hsa-miR-320C	AAA AGC UGG GUU GAG AGG GU	MIMAT0005793	CD201-0568
hsa-miR-26b-5p	UUC AAG UAA UUC AGG AUA GGU	MIMAT0000083	CD201-0321
hsa-let-miR-7c-5P	UGA GGU AGU AGG UUG UAU GGU U	MIMAT0000064	CD201-0388
hsa-miR-29c-3P	UAG CAC CAU UUG AAA UCG GUU A	MIMAT0000681	CD201-0404
hsa-miR-182-5p	UUU GGC AAU GGU AGA ACU CAC AC	MIMAT0000259	CD201-0077

1.2.3 数据采集 采集患者入院初的基本病历资料,包括姓名、年龄、既往史、初步诊断、CSF 常规检查、GCS 评分、出血量(入院时 CT 按多田公式计算[血量(mL)=π×长(cm)×宽(cm)×高(cm)/6])。收集研究对象入院 48 h 内血常规、凝血四项、清蛋白等检查结果。

1.2.4 CSF 游离 miRNA 提取、检测 提取及检测 miRNA 严格按照 TIANGEN 提取及检测试剂盒试验流程进行。佩戴一次性手套和口罩,所使用枪头、EP 管均为 RNASE Free,其余实验相关器材均经去 RNA 酶处理。由于 CSF 中 miRNA 含量低,提取出的 RNA 样本 OD_{260/280} 的测定结果不可靠,本文未列出浓度。在待检测 CSF 标本中均加入外参 1 μL(cel miRNA-39, TIANGEN 提供,参考 Ct 值范围:6~8)为质检参考指标。提取:将 200 μL CSF 样本用 miReute miRNA 提取分离试剂、氯仿、无水乙醇进行一系列的提取及分离,最终从离心柱洗脱获得 20 μL 提取物。检测方法:每份 CSF 样本提取物进行逆转录反应合 cDNA 第一链,总反应体系为 20 μL,(反应条件:42℃ 60 min 逆转录,95℃ 3 min 酶失活),并使用特异性上游引物进行扩增,以 2 μL 的 cDNA 为模板(1:4 稀释),总反应体系为 20 μL(反应条件:95℃ 预变性 15 min,95℃ 变性 20 s,65℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,35 个循环)。以扩增曲线和熔炼曲线综合评估 Ct 的可靠性,并采用 2^{-ΔΔCt} 法计算 miRNA 的相对表达量。

1.2.5 CSF 生化指标的检测 按照自动生化仪、化

学发光分析仪及相对应的试剂盒操作流程,检测 CSF 中下列生化指标:β₂-MG、AST、LAC、LD、mAlb、NSE、S100β。

1.3 统计学处理 本研究数据均采用 SPSS21.0 软件建立数据库并进行统计学分析,符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,呈非正态分布的计量资料以[M(P₂₅, P₇₅)]表示;各组间差异水平使用 Kruskal-Wallis H 检验;计数资料比较采用 χ^2 检验;多组之间比较使用单因素方差分析;CSF 中 NSE、S100β 水平与脑出血的相关性分析应用 Pearson 直线相关进行处理;绘制受试者工作特征曲线(ROC),并计算曲线下面积(AUC),分析存在统计学差异指标单独及联合对 ICH 的诊断效能,P<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 一般资料 两组在糖尿病史、吸烟史、饮酒史、白细胞计数(WBC)、纤维蛋白原比较差异无统计学意义(P>0.05);而高血压史、高脂血症、GCS 评分比较差异有统计学意义(P<0.05),且 ICH 组中高血压病和高脂血症人数明显多于对照组,见表 2。

2.2 CSF 部分生化指标比较

2.2.1 ICH 组与对照组 CSF 生化指标比较 按照 GCS 评分将 ICH 组分为轻度 ICH 组、重度 ICH 组,与对照组相比,轻度 ICH 组、重度 ICH 组 CSF 血糖(GLU)、血浆清除率(CL)、LD 差异无统计学意义(P>0.05);轻度 ICH 组 CSF 尿蛋白(PRO)、清蛋白指数(QAlb, QAlb=CAIb/SAIb)、mAlb 明显高于对照组;重度 ICH 组、轻度 ICH 组 β₂-MG、AST、LAC

水平均明显高于对照组;而 NSE、S100β 在重度 ICH 组、轻度 ICH 组高于对照组,重度 ICH 组高于轻度 ICH 组,3 组间差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 3。

表 2 病例组和对照组一般资料比较

	ICH 组($n=26$)	对照组($n=22$)	$\chi^2/t/Z$	P
高血压病[$n(\%)$]	18(78.26)	3(11.11)	22.185	0.000
糖尿病[$n(\%)$]	10(43.48)	9(33.33)	0.750	0.386
高脂血症[$n(\%)$]	19(82.61)	12(44.44)	9.166	0.002
吸烟史[$n(\%)$]	6(26.09)	5(18.52)	0.534	0.465
饮酒史[$n(\%)$]	7(30.43)	3(11.11)	3.200	0.074
WBC($\bar{x}\pm s, \times 10^9/L$)	8.46 ± 2.68	5.86 ± 0.46	2.866	0.076
纤维蛋白原($\bar{x}\pm s, g/L$)	2.78 ± 1.75	2.56 ± 0.66	1.224	0.176
GCS 评分[$M(P_{25}, P_{75})$, 分]	9.00(6.25, 14.50)	15.00(15.00, 15.00)	3.791	0.000
出血量[$M(P_{25}, P_{75})$, mL]	35.00(23.25, 65.45)	—	—	—

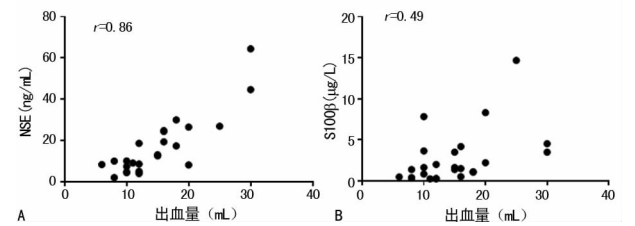
注:—表示无数据

表 3 ICH 组与对照组 CSF 生化指标比较

项目	对照组($n=22$)	轻度 ICH 组($n=13$)	重度 ICH 组($n=13$)	P^a	P^b	P^c
GLU(mmol/L, $\bar{x}\pm s$)	3.39 ± 0.67	3.41 ± 1.38	3.54 ± 1.40	>0.05	>0.05	>0.05
CL(mmol/L, $\bar{x}\pm s$)	118.59 ± 4.36	115.55 ± 8.37	119.74 ± 12.03	>0.05	>0.05	>0.05
LAC(mmol/L, $\bar{x}\pm s$)	1.86 ± 0.84	3.34 ± 1.34	4.19 ± 1.14	<0.05	<0.05	>0.05
PRO[g/L, $M(P_{25}, P_{75})$]	0.23(0.18, 0.35)	0.48(0.34, 0.89)	0.53(0.36, 1.53)	<0.05	>0.05	>0.05
QAlb[g/L, $M(P_{25}, P_{75})$]	5.02(4.06, 7.37)	12.88(8.16, 23.48)	17.49(8.76, 40.39)	<0.05	>0.05	>0.05
β_2 -MG[mg/L, $M(P_{25}, P_{75})$]	1.1(0.70, 1.32)	2.70(1.65, 4.50)	4.4(1.65, 9.15)	<0.05	<0.05	>0.05
AST[U/L, $M(P_{25}, P_{75})$]	10.00(5.00, 13.25)	19.00(15.00, 26.50)	31.00(26.50, 40.50)	<0.05	<0.05	>0.05
LD[U/L, $M(P_{25}, P_{75})$]	7.50(5.75, 10.50)	52.00(29.50, 90.50)	54.00(27.00, 149.0)	>0.05	>0.05	>0.05
mAlb[mg/L, $M(P_{25}, P_{75})$]	125.35(63.90, 196.60)	215.20(157.10, 351.55)	328.80(214.30, 719.30)	<0.05	>0.05	>0.05
NSE[ng/L, $M(P_{25}, P_{75})$]	2.93(2.48, 3.83)	17.48(8.64, 26.86)	18.55(8.86, 24.69)	<0.05	<0.05	<0.05
S100β[μg/L, $M(P_{25}, P_{75})$]	0.43(0.25, 0.88)	1.40(0.38, 2.11)	1.51(1.10, 4.64)	<0.05	<0.05	<0.05

注: P^a 为对照组与轻度 ICH 组 P 值, P^b 为对照组与重度 ICH 组 P 值, P^c 为轻度 ICH 组与重度 ICH 组 P 值

2.2.2 ICH 患者出血量与 CSF NSE、S100β 水平相关性研究 为了研究改变的 CSF NSE、S100β 水平是否与脑出血量有关,笔者使用了 Pearson 相关系数来确定是否存在相关性。发现 CSF NSE 的水平与 ICH 患者出血量显著相关($r=0.86; P<0.01$),见图 1A; CSF S100β 的水平与 ICH 患者出血量有相关性($r=0.49; P<0.05$),见图 1B。

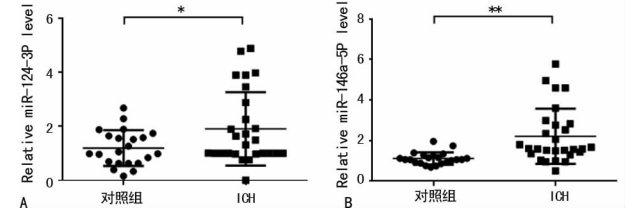


注:A 为 NSE, B 为 S100β

图 1 ICH 组和对照组 CSF NSE、S100β 水平与出血量的相关性研究结果

2.3 ICH 患者 CSF miRNA 表达研究 本研究应用

qRT-PCR 方法检测文献报道的与中枢神经系统疾病相关的 15 个靶标 miRNA,探索其在脑出血疾病中的潜在诊断与病情评估价值。与对照组比较,ICH 组 CSF miR-124-3p、miR-146a-5p 显著上调($P<0.05$),见图 2;而 miR-21-5p、miR-29c-3p、miR-214-3p、miR-9-5p、miR-16-5p、miR-30e-5p、miR-221-3p、miR-125b-5p、miR-320c、miR-26b-5p、miR-7c-5p、miR-29c-3p、miR-182-5p 差异无统计学意义($P>0.05$)。



注:与对照组比较,ICH 患者 CSF miR-124-3p(A)、miR-146a-5p(B)水平显著上调(* $P<0.05$, ** $P<0.01$)

图 2 ICH 组和对照组 CSF 中差异表达 miRNA 的研究结果

2.4 CSF 中 NSE、S100β、miR-124-3p、miR-146a-5p 诊断 ICH 的效能研究 CSF 中 NSE、S100β、miR-124-3p、miR-146a-5p 诊断 ICH 的 AUC 分别为 0.931 [95% 置信区间 (95% CI): 0.857~0.892]、0.795 [95% CI: 0.670~0.921]、0.667 [95% CI: 0.512~0.822] 和 0.878 [95% CI: 0.776~0.844]。CSF 中 NSE、S100β 两者联合诊断 ICH 的 AUC 为 0.965, 灵敏度 84.6%, 特异度为 98.2%。当 NSE 含达到 0.62 ng/mL, 诊断 ICH 的灵敏度为 80.8%, 特异度为 95.5%; 当 S100β 的水平为 0.43 μg/L, 诊断 ICH 的灵敏度为 76.9%, 特异度为 77.3%; 当 miR-124-3p 相对表达量是 0.45 时, 其诊断 ICH 的灵敏度为 80.8%, 特异度为 50.1%; 当 miR-146a-5p 相对表达量是 0.55 时, 其诊断 ICH 的灵敏度为 81.8%, 特异度为 86.4%。见图 3。

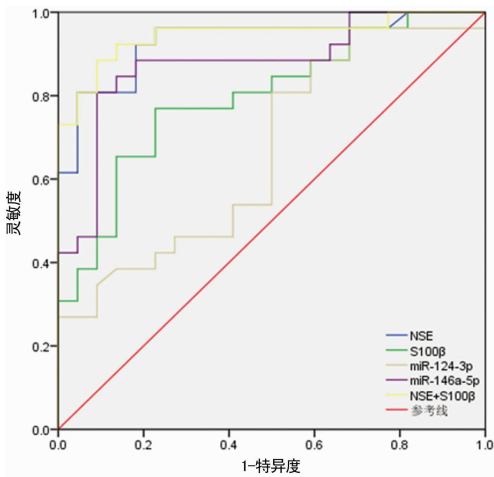


图 3 ICH 组和对照组 CSF 中 NSE、S100β、miR-124-3p、miR-146a-5p 单独及 NSE、S100β 联合诊断效能

3 讨论

脑出血是一种病因复杂、病程进展迅速的一种疾病^[7]。脑出血继发性损伤如细胞凋亡、血肿周围水肿、炎症细胞、因子激活、血管内皮损伤等严重危害着患者生存质量^[8]。而依赖于 CSF、影像学检查及神经功能评估的常规检查多反映疾病结局。CSF 是直接接触脊髓、神经元细胞的并在脑室内循环的体液, 当出现神经细胞损害后, 某些神经特异性分子的变化可在一定程度上反映受损脑组织的局部事件, 是包括 ICH 在内中枢神经系统疾病诊断标志物的理想来源^[9]。因此基于疾病原发灶 CSF 的生化标志物或分子标志物的检测可直接、客观地为临床辅助诊断、病情评估提供参考, 进一步挖掘 CSF 样本的潜在价值并为脑出血损伤机制的深入研究提供了可能。

S100β 是一种主要位于中央(主要是星形胶质细胞)和周围神经系统的神经胶质细胞中的一种酸性糖蛋白, 在细胞损伤或应激活化时释放, 能反映神经元细胞、胶质细胞损伤^[10]。NSE 是在由神经元细胞形

成的一种的水解酶, 神经元细胞膜功能与结构受损时, NSE 从胞质释放至细胞间隙和 CSF 中^[11], 并在 CSF 中有较高的浓度^[12]。此外, NSE 和 S100β 也可由一些神经外胚层来源的肿瘤细胞产生, 如小细胞肺癌时血液中 NSE 水平可升高^[13], 恶性黑色素瘤时血液 S100β 的水平可升高^[14], 因此检测 CSF 中神经特异性蛋白更能特异、客观地反映脑损伤程度。文献报道, 动脉瘤性蛛网膜下腔出血患者 CSF 高水平 NSE、S100β 提示脑损伤程度严重且更易出现不良结局(脑梗死、血管痉挛和颅内高压)^[15], 而本研究针对急性 ICH 病例, 发现重度 ICH 组(低 GCS 评分组)CSF-S100β、NSE 水平显著高于轻度 ICH 组(高 GCS 评分组), 且 ICH 患者 CSF S100β、NSE 的水平与出血量均显著正相关, 表明 CSF NSE、S100β 水平对判断患者病情严重程度具有积极意义, 这与以往文献报道的研究结论基本一致。基础研究已证实 NSE、S100β 水平在脑损伤自适应调节后升高并参与神经损伤后的修复^[16], 是具有应用前景的脑损伤标志物。为了进一步检验 CSF NSE、S100β 对 ICH 的诊断效能, 笔者又将 NSE 与 S100β 进行 ROC 分析, 明确了两者联合检测可提高灵敏度至 84.6%, 提高特异度至 98.2%, 因此 CSF NSE、S100β 联合检测更能有效辅助诊断 ICH 及评估脑损伤程度。

miRNA 是一类内源性非编码 RNA 加工成熟的, 仅由 20~24 个核苷酸组成的短链 RNA, 其作为调节剂在 CNS 相关疾病的病理生理过程中发挥重要作用^[17]。不断有研究揭示脑出血后 miRNA 表达谱发生改变并在一系列继发损伤中扮演着重要的角色。IWUCHUK-WU 等^[18]通过检测 ICH 确诊患者 CSF 中的 miRNA 表达谱, 发现 211 个差异表达 miRNA, 高表达的 miRNA 包括: miR-204-5p (2 075 倍)、miR-125b-5p (108 倍)、miR-9-5p (299 倍)、miR-338-3p (146 倍)、miR-187-3p (21 倍)、miR-9-3p (299 倍)。SØRENSEN 等^[19]研究发现 ICH 患者 CSF 中部分 miRNA 的水平明显高于血浆, 而调控炎症相关基因的 miRNA 大量减少表明其可能受到系统调节影响。本研究针对 ICH 病例, 选择了文献报道的与中枢神经系统疾病相关的 15 个靶标 miRNA, 实验结果表明: ICH 患者 CSF miR-124-3p、miR-146a-5p 表达量显著高于对照组。研究表明, miR-124-3p 过表达后可抑制神经毒性, 包括减少神经细胞凋亡、神经炎症和氧化应激, 并可在体外减弱甲基苯基吡啶碘化(MPP)诱导的神经损伤^[20]。而 miR-146a 与 ICH 诱导的脑水肿发展相关的生物学过程有关, 包括先天免疫反应、白细胞激活、转化生长因子-β 信号传导和平滑肌细胞增殖^[21]。因此, miR-124-3p、miR-146a-5p 与出血所致脑组织损伤的病理生理过程是相关的, 支持本研究的结果, 其可作为诊断脑出血及评估脑损伤的生物标志物。同时也为 miRNA 参与脑损伤相关的机制研究提供了新的方向。

4 结 论

ICH 后 CSF 蛋白水平(NSE、S100 β)和基因水平(miR-124-3p、miR-146a-5p)标志物的检测可用于 ICH 的辅助诊断, NSE、S100 β 不仅可以反映脑组织损伤程度, 也可用来评估 ICH 出血严重程度。与此同时, 本研究也具有一定的临床局限性, 如 CSF 样本不易获取、CSF 采集时机差异、miRNA 水平个体差异、入组病例数较少等, 仍需多中心、大样本加以验证。

参考文献

- [1] KEEP R F, HUA Y, XI G H. Intracerebral haemorrhage: mechanisms of injury and therapeutic targets[J]. *Lancet Neurol*, 2012, 11(8): 720-731.
- [2] ZHENG H W, WANG Y L, LIN J X, et al. Circulating MicroRNAs as potential risk biomarkers for hematoma enlargement after intracerebral hemorrhage[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2012, 18(12): 1003-1011.
- [3] FENG W, FENG Y. MicroRNAs in neural cell development and brain diseases[J]. *Sci China Life Sci*, 2011, 54(12): 1103-1112.
- [4] GATLI G, ANIK A, ACAR S, et al. Brain injury markers: S100 calcium-binding protein B, neuron-specific enolase and glial fibrillary acidic protein in children with diabetic ketoacidosis [J]. *Pediatr Diabetes*, 2018, 19(5): 1000-1006.
- [5] HAJDUKOVA L, SOBEK O, PRCHALOVA D, et al. Biomarkers of brain damage: S100B and NSE concentrations in cerebrospinal fluid-A normative study[J]. *Biomed Res Int*, 2015, 89(12): 379071.
- [6] YANG T, GU J W, KONG B, et al. Gene expression profiles of patients with cerebral hematoma following spontaneous intracerebral hemorrhage[J]. *Mol Med Rep*, 2014, 10(4): 1671-1678.
- [7] 李武英, 金俊, 陈健, 等. 脑梗死和脑出血患者外周血中循环 microRNA 表达谱差异的初步分析[J]. *实用医学杂志*, 2014, 30(11): 1750-1753.
- [8] 张极星, 张艳国, 赵亮, 等. 急性期脑出血患者血清 ICAM-1, MMP-9, TNF- α , IL-6 水平和出血灶周围水肿脑组织体积的相关性[J]. *山东医药*, 2017, 57(27): 58-60.
- [9] POWERS C J, DICKERSON R, ZHANG S W, et al. Human cerebrospinal fluid microRNA: temporal changes following subarachnoid hemorrhage[J]. *Physiol Genomics*, 2016, 48(5): 361-366.
- [10] KIISKI H, LÅNGSJÖ J, TENHUNEN J, et al. S100B, NSE and MMP-9 fail to predict neurologic outcome while

elevated S100B associates with milder initial clinical presentation after aneurysmal subarachnoid hemorrhage[J]. *J Neurol Sci*, 2018, 390(2): 129-134.

- [11] 王广斌, 季泰令. S100B 蛋白、NSE 作为脑损伤标志物的研究进展[J]. *中国老年学杂志*, 2011, 31(5): 890-892.
- [12] GONZÁLEZ-GARCÍA S, GONZÁLEZ-QUEVEDO A, FERNÁNDEZ-CONCEPCIÓN O, et al. Short-term prognostic value of serum neuron specific enolase and S100B in acute stroke patients[J]. *Clin Biochem*, 2012, 45(16/17): 1302-1307.
- [13] XU L, LINA W, XUEJUN Y. The diagnostic value of serum CEA, NSE and MMP-9 for on-small cell lung cancer [J]. *Open Med (Wars)*, 2016, 11(1): 59-62.
- [14] CASMIRO M, MAITAN S, DE PASQUALE F, et al. Cerebrospinal fluid and serum neuron-specific enolase concentrations in a normal population [J]. *Eur J Neurol*, 2005, 12(5): 369-374.
- [15] MORITZ S, WARNAT J, BELE S, et al. The prognostic value of NSE and S100B from serum and cerebrospinal fluid in patients with spontaneous subarachnoid hemorrhage[J]. *J Neurosurg Anesthesiol*, 2010, 22(1): 21-31.
- [16] 齐英斌, 许卓, 李丽, 等. 急性脑梗死患者血清中 NSE 与 S-100 β 蛋白的表达情况及其与脑损伤严重程度的相关性[J]. *中国实验诊断学*, 2015, 18(12): 2024-2026.
- [17] STOICEA N, DU A, LAKIS D C, et al. The MiRNA journey from theory to practice as a CNS biomarker[J]. *Front Genet*, 2016, 7(82): 11.
- [18] IWUCHUKWU I, NGUYEN D, SULAIMAN W. MicroRNA profile in cerebrospinal fluid and plasma of patients with spontaneous intracerebral hemorrhage [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2016, 22(12): 1015-1018.
- [19] CHAUDHRY S R, STOFFEL-WAGNER B, KINFELT M, et al. Elevated systemic IL-6 levels in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage is an unspecific marker for Post-SAH complications[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(12): 2580.
- [20] GENG L J, LIU W, CHEN Y. miR-124-3p attenuates MPP+-induced neuronal injury by targeting STAT3 in SH-SY5Y cells[J]. *Exp Biol Med*, 2017, 242(18): 1757-1764.
- [21] ZHU Y, WANG J L, HE Z Y, et al. Association of altered serum MicroRNAs with perihematomal edema after acute intracerebral hemorrhage [J]. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0133783.

(收稿日期: 2018-11-22 修回日期: 2019-02-10)