

• 论 著 •

重度脑外伤患者血清 miR-146a 水平与继发性癫痫的相关性分析*

李雄飞, 胡 伟, 周明安, 田少斌[△]

湖北省天门市第一人民医院神经外科, 湖北天门 431700

摘 要:目的 探讨重度脑外伤患者血清微小 RNA-146a(miR-146a)水平与继发性癫痫的相关性。方法 选取 2018 年 1 月至 2020 年 2 月该院重度脑外伤住院患者 104 例为研究对象,按照是否继发癫痫分为重度脑外伤继发性癫痫组 61 例,单一重度脑外伤组 43 例,同期选择该院体检健康者 70 例为对照组。采用酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测血清中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)水平,采用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)测定 miR-146a 水平, Pearson 相关分析 miR-146a 与 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 相关性,对影响继发性癫痫的相关因素进行 Logistic 回归分析。结果 与对照组相比,重度脑外伤继发性癫痫组、单一重度脑外伤组患者血清 miR-146a、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平较高($P<0.05$),与单一重度脑外伤组相比,重度脑外伤继发性癫痫组患者血清 miR-146a、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平较高($P<0.05$)。Pearson 相关分析显示重度脑外伤继发性癫痫患者血清 miR-146a 与 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平呈正相关($r=0.580, 0.505, 0.474, P<0.05$)。多因素 Logistic 回归分析显示 miR-146a、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平升高是重度脑外伤继发性癫痫的危险因素。结论 重度脑外伤继发性癫痫患者血清 miR-146a 水平上调,检测血清 miR-146a 水平有助于诊断重度脑外伤继发性癫痫的发生。

关键词:重度脑外伤; 继发性癫痫; 微小 RNA-146a

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2021.08.012

中图法分类号:R651.1

文章编号:1673-4130(2021)08-0945-04

文献标志码:A

Correlation between serum miR-146a level and secondary epilepsy in patients with severe brain injury*

LI Xiongfei, HU Wei, ZHOU Ming'an, TIAN Shaobin[△]

Department of Neurosurgery, First People's Hospital of Tianmen, Tianmen, Hubei 431700, China

Abstract: **Objective** To explore the correlation between serum miR-146a level and secondary epilepsy in patients with severe brain injury. **Methods** A total of 104 inpatients with severe brain trauma were selected from January 2018 to February 2020, according to whether or not secondary epilepsy occurred, they were divided into severe brain trauma with secondary epilepsy group ($n=61$) and simplex severe brain trauma group ($n=43$). At the same time, 70 cases of healthy people in the same period were selected as control group. The levels of serum tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) and interleukin-1 β (IL-1 β) were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), and the level of miR-146a was measured by real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR). Pearson analysis was used to analyze the correlations between miR-146a and TNF- α , IL-6, IL-1 β . Logistic regression analysis was used to analyze the related factors affecting secondary epilepsy. **Results** Compared with the control group, the levels of serum miR-146a, TNF- α , IL-6 and IL-1 β were significantly higher in the severe brain trauma with secondary epilepsy group and the simplex severe brain trauma group ($P<0.05$). Compared with the simplex severe brain trauma group, the levels of serum miR-146a, TNF- α , IL-6 and IL-1 β in the severe brain trauma with secondary epilepsy group were significantly higher ($P<0.05$). Pearson correlation analysis showed that serum miR-146a was positively correlated with TNF- α , IL-6 and IL-1 β levels in patients with severe brain trauma with secondary epilepsy ($r=0.580, 0.505, 0.474, P<0.05$). Multivariate Logistic regression analysis showed that high levels of serum miR-146a, TNF- α , IL-6 and IL-1 β were risk factors for severe brain trauma with secondary epilepsy. **Conclusion** The serum miR-146a level is up-regulated in severe brain trauma with secondary epilepsy. Detection of serum miR-

* 基金项目:湖北省卫生和计划生育委员会科研项目(WJ2017MB129)。

作者简介:李雄飞,男,主治医师,主要从事脑血管疾病诊治方面的研究。 [△] 通信作者, E-mail:1527541840@qq.com。

本文引用格式:李雄飞,胡伟,周明安,等.重度脑外伤患者血清 miR-146a 水平与继发性癫痫的相关性分析[J].国际检验医学杂志,2021,42(8):945-948.

146a level is helpful to prevent severe brain trauma with secondary epilepsy.

Key words:severe brain trauma; secondary epilepsy; miR-146a

脑外伤是常见的神经外科急症,脑外伤患者主要临床特征有认知功能、语言功能障碍。有研究发现,神经炎症反应是脑损伤的并发症之一,神经炎症治愈难,容易复发,最终导致患者神经功能受损^[1-2]。继发性癫痫是重度脑外伤常见的并发症。癫痫是由于脑部神经元异常导致的中枢神经系统功能失常,癫痫反复发作会导致脑功能损伤。相关文献显示,微小 RNA 参与神经系统疾病和脑缺血所致神经损伤^[3];也有研究显示,微小 RNA 在癫痫的发生中起重要作用^[4]。微小 RNA-146a(miR-146a)是一种调节 Toll 样受体(TLRs)信号通路和炎症因子受体信号通路的内源性调节因子,在炎症性疾病中发挥重要作用^[5]。但是目前鲜有文献报道重度脑外伤患者中 miR-146a 与癫痫发病的关系。本文旨在研究重度脑外伤患者血清 miR-146a 水平与继发性癫痫之间相关性,为早期干预和治疗重度脑外伤继发性癫痫提供新依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2018 年 1 月至 2020 年 2 月本院收治的重度脑外伤住院患者 104 例为研究对象,其中男 60 例,女 44 例;年龄 23~76 岁,平均(38.92±15.86)岁。按照是否继发癫痫分为重度脑外伤继发性癫痫组 61 例,单一重度脑外伤组 43 例。纳入标准:(1)重度脑外伤诊断标准参照《重型颅脑损伤救治指南》^[6];(2)癫痫的诊断依据 2010 年国际抗癫痫联盟(ILAE)制定的癫痫发作和癫痫综合征的分类方法^[7],结合临床表现、脑电图、头颅 MRI、家族史等诊断为原发性癫痫;(3)重度脑外伤后出现 2 次以上癫痫发作;(4)外伤前无癫痫病史,无家族遗传史。排除标准:(1)有脑出血、脑梗死病史;(2)有脑血管畸形者;(3)患有自身免疫性疾病者;(4)有癫痫病史或家族遗传癫痫者;(5)其他原因引起继发性癫痫者;(6)临床资料不全者。重度脑外伤继发性癫痫患者脑外伤后 24 h 内出现癫痫 11 例,2 周内发作 35 例,1 个月内发作 15 例。选取同期本院体检健康者 70 例为对照组,其中男 40 例,女 30 例;年龄 22~78 岁,平均(39.14±16.12)岁。重度脑外伤患者与对照组年龄、性别比较差异无统计学意义($P>0.05$)。本研究征得

所有受试者和其家属同意,并签署知情同意书;本研究通过本院伦理委员会批准。

1.2 仪器与试剂 人肿瘤坏死因子- α (TNF- α)酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒、人白细胞介素-6(IL-6)ELISA 试剂盒(北京博奥森生物技术有限公司,批号 bsk11014、bs-0782R);白细胞介素-1 β (IL-1 β)ELISA 试剂盒(武汉默沙克生物公司,批号 69-86579);miRNA 提取试剂盒(日本 Takara 公司,批号 RA207004);RNA SYBR Green PCR Kit 荧光定量 PCR 试剂盒(上海康朗生物科技有限公司,批号 KL101-969);逆转录试剂盒(美国赛默飞世尔科技有限公司,批号 Q6099);Multiskan FC 型全自动酶标仪(美国 Thermo 公司);5427R 型艾本德台式高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司);SmartSpec Plus 型核酸纯度分析仪(美国伯乐公司);CFX96 型荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司)。

1.3 方法

1.3.1 标本采集和处理 脑外伤患者入院 24 h 内、对照组入院体检当天抽取研究对象静脉血 4 mL,装入 EP 管中,室温静置 35 min 后,4 ℃、4 000 r/min 离心 10 min,收集上清液,分装,保存于-80 ℃备用。

1.3.2 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测外周血 miR-146a 的表达 将样品和试剂在常温下复融,打开超净工作台灭菌 30 min。在无菌超净工作台和冰盒上提取总 RNA,用核酸纯度分析仪测量 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 是否在 1.8~2.0,并将提取的 RNA 分装保存于-80 ℃备用。依据 cDNA 逆转录步骤,按照逆转录参数合成 cDNA。采用 qRT-PCR 测定 miR-146a 水平,在避光环境下严格按照荧光定量 PCR 试剂盒操作步骤,利用 qRT-PCR 仪按照设定程序进行操作。程序设定参数为 94 ℃预热 1 min,94 ℃ 25 s,60 ℃ 25 s,72 ℃ 20 s,共 35 个循环。总反应体系(20.0 μL):SYBR Green mix 10.0 μL ,上下游引物各 2.0 μL ,cDNA 模板 3.0 μL ,ddH₂O 3.0 μL 。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,每例样本重复操作 3 次,记录 Ct 值,以 U6 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 算法计算 miR-146a 相对表达量。引物见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物序列

基因	正向引物 5'-3'	反向引物 5'-3'
miR-146a	CAACACCAGTCGATGGGCTGT	GTGCAGGGTCCGAGGT
U6	ATTGGAACGATACAGAGAAGATT	GGAACGCTTCACGAATTTG

1.3.3 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平检测 采用 TNF- α 、IL-6、IL-1 β ELISA 试剂盒检测所有受试者血清 TNF-

α 、IL-6、IL-1 β 水平。

1.4 统计学处理 采用 SPSS22.0 软件对数据进行

分析。计数资料采用百分数表示,组间比较采用 χ^2 检验;计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用LSD-*t*检验;采用Pearson相关分析对各指标间的相关性进行分析;采用多因素Logistic回归对重度脑外伤继发性癫痫的相关因素进行分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 3组受试者血清 miR-146a 水平比较 与对照组相比,重度脑外伤继发性癫痫组、单一重度脑外伤组患者血清 miR-146a 水平较高($P<0.05$),与单一重度脑外伤组相比,重度脑外伤继发性癫痫组患者血清 miR-146a 水平较高($P<0.05$)。见表2。

2.2 3组受试者血清 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平比较 与对照组相比,重度脑外伤继发性癫痫组、单一重度脑外伤组患者血清 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平较高($P<0.05$),与单一重度脑外伤组相比,重度脑外伤继发性癫痫组患者血清 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平较高($P<0.05$)。见表3。

2.3 重度脑外伤继发性癫痫患者血清 miR-146a 水

平与血清 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平相关性分析 重度脑外伤继发性癫痫患者血清 miR-146a 与 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平呈正相关($r=0.580、0.505、0.474, P<0.05$)。

表 2 3 组受试者血清 miR-146a 水平比较($\bar{x}\pm s$)		
组别	<i>n</i>	miR-146a
对照组	70	1.04±0.26
单一重度脑外伤组	43	1.68±0.78 [*]
重度脑外伤继发性癫痫组	61	2.63±0.91 ^{*#}
<i>F</i>		88.526
<i>P</i>		<0.001

注:与对照组相比,^{*} $P<0.05$;与单一重度脑外伤组相比,[#] $P<0.05$ 。

2.4 影响重度脑外伤继发性癫痫多因素分析 以是否发生继发性癫痫为因变量,以血清 miR-146a、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平为自变量进行多因素 Logistic 回归分析,结果显示血清 miR-146a、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平升高是重度脑外伤继发性癫痫的危险因素($P<0.05$)。见表4、表5。

表 3 3 组受试者血清 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平比较 (ng/mL, $\bar{x}\pm s$)				
组别	<i>n</i>	TNF- α	IL-6	IL-1 β
对照组	70	12.36±4.21	8.67±2.13	0.91±0.16
单一重度脑外伤组	43	18.64±7.64 [*]	10.25±3.68 [*]	1.83±0.93 [*]
重度脑外伤继发性癫痫组	61	25.38±8.39 ^{*#}	13.46±4.38 ^{*#}	3.65±1.26 ^{*#}
<i>F</i>		59.834	32.030	159.534
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001

注:与对照组相比,^{*} $P<0.05$;与单一重度脑外伤组相比,[#] $P<0.05$ 。

表 4 变量赋值		
变量	赋值说明	
继发性癫痫	未发生继发性癫痫=0	发生继发性癫痫=1
miR-146a	miR-146a<2.63 为 0	miR-146a≥2.63 为 1
TNF- α	TNF- α <25.38 ng/mL 为 0	TNF- α ≥25.38 ng/mL 为 1
IL-6	IL-6<13.46 ng/mL 为 0	IL-6≥13.46 ng/mL 为 1
IL-1 β	IL-1 β <3.65 ng/mL 为 0	IL-1 β ≥3.65 ng/mL 为 1

表 5 影响重度脑外伤继发性癫痫的多因素分析						
因素	β	SE	Wald χ^2	<i>P</i>	OR	95%CI
miR-146a	0.785	0.327	5.757	0.004	2.192	1.637~2.934
TNF- α	0.665	0.361	3.692	0.013	1.945	1.612~2.345
IL-6	0.536	0.296	3.275	0.018	1.709	1.359~2.148
IL-1 β	0.636	0.328	3.760	0.009	1.889	1.574~2.267

3 讨 论

继发性癫痫是重度脑外伤后常见的严重并发症,进一步加重了脑组织病理和神经损伤^[8]。继发性癫

痫使重度脑外伤致残率、病死率不断上升。有研究显示,癫痫发病过程与炎症因子和神经系统炎症相关^[9]。神经系统炎症在癫痫发作过程中发挥着重要作用,这与脑损伤有重要关系^[10]。TNF- α 、IL-6、IL-1 β 是与神经系统炎症相关的细胞因子,在癫痫发作中发挥重要作用^[11]。恽鸿博等^[9]研究发现脑梗死继发癫痫组和单一脑梗死组患者血清 TNF- α 、IL-1 β 水平明显高于健康体检组,脑梗死继发癫痫组患者血清 TNF- α 、IL-1 β 水平明显高于单一脑梗死组患者。本研究发现,与对照组相比,重度脑外伤继发性癫痫组、单一重度脑外伤组患者血清 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平显著较高,与单一重度脑外伤组相比,重度脑外伤继发性癫痫组患者血清 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平明显较高,提示炎症因子 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 在继发性癫痫发病过程中可能发挥重要作用。

近年来研究发现,微小 RNA 在癫痫疾病发病过程中具有重要作用^[4]。miR-146a 是第一个被发现的具有免疫调节作用的微小 RNA,在炎性反应、细胞分化、免疫反应等生物学过程中发挥重要作用^[12]。LV

等^[13]发现 miR-146a 能影响巨核细胞增殖、分化,可能通过 TLR4 信号通路调控血小板免疫炎症反应。DENG 等^[14]也发现 miR-146a 在人星形胶质细胞中水平呈上升趋势,且 miR-146a 可通过抑制 TLR4 信号通路调节炎症细胞因子释放。ORGANISTA-JUÁREZ 等^[15]发现颞叶癫痫患者大脑新皮层 miR-146a 水平显著上调,且与癫痫发作频率相关。ANSARI 等^[16]报告阿尔茨海默病患者的反应性星形胶质细胞中 miR-146a 水平显著增加,miR-146a 可能参与了大脑发育和神经变性。本研究发现,重度脑外伤继发性癫痫组、单一重度脑外伤组患者血清 miR-146a 水平皆显著高于对照组($P < 0.05$),重度脑外伤继发性癫痫组血清 miR-146a 水平显著高于单一重度脑外伤组($P < 0.05$),提示 miR-146a 可能参与重度脑外伤继发性癫痫的发生。ZHANG 等^[17]研究发现癫痫大鼠脑组织中 miRNA-146a 水平显著高于对照组,且与促炎细胞因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的水平变化相同,本研究进一步发现,miR-146a 与 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 呈正相关($P < 0.05$),提示重度脑外伤患者 miR-146a 可能通过影响 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 进一步影响继发性癫痫发作。进一步分析发现 miR-146a、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平升高是影响继发性癫痫的危险因素,提示检测血清 miR-146a 水平可为临床诊断继发性癫痫的发生提供参考依据。

综上所述,重度脑外伤继发性癫痫患者血清 miR-146a 水平上调,miR-146a 是影响继发性癫痫的危险因素,监测重度脑外伤患者血清 miR-146a 有助于诊断继发性癫痫的发生。本研究由于样本数量有限,研究结果具有一定的局限性。本课题组将进一步增加样本量探讨重度脑外伤患者血清 miR-146a 与继发性癫痫的关系。

参考文献

- [1] XU C, DIAO Y F, WANG J, et al. Intravenously infusing the secretome of Adipose-Derived mesenchymal stem cells ameliorates neuroinflammation and neurological functioning after traumatic brain injury[J]. *Stem Cells Dev*, 2020, 29(4): 222-234.
- [2] SULHAN S, LYON K A, SHAPIRO L A, et al. Neuroinflammation and blood-brain barrier disruption following traumatic brain injury: pathophysiology and potential therapeutic targets[J]. *J Neurosci Res*, 2020, 98(1): 19-28.
- [3] MEI J, WANG H, JIN M, et al. Exosomes from MiR-30d-5p-ADSCs Reverse Acute Ischemic Stroke-Induced, Autophagy-Mediated Brain Injury by Promoting M2 Microglial/Macrophage Polarization[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 47(2): 864-878.
- [4] CAVA C, MANNA I, GAMBARDELLA A, et al. Potential role of miRNAs as theranostic biomarkers of epilepsy[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2018, 13(1): 275-290.
- [5] SU Y L, WANG X, MANN M, et al. Myeloid cell-targeted miR-146a mimic inhibits NF- κ B-driven inflammation and leukemia progression in vivo[J]. *Blood*, 2020, 135(3): 167-180.
- [6] 高亮. 美国第四版《重型颅脑损伤救治指南》解读[J/CD]. *中华神经创伤外科电子杂志*, 2017, 3(6): 321-324.
- [7] 秦兵, 段现来. 解读国际抗癫痫联盟分类和术语委员会对发作和癫痫分类框架术语及概念修订的最新报告(2010)[J]. *中华神经医学杂志*, 2011, 10(2): 109-114.
- [8] 颜甘玲, 蔡明玲. 复方丹参滴丸联合抗癫痫药物对外伤性癫痫患者炎症因子和生化指标的影响[J]. *现代中西医结合杂志*, 2019, 28(21): 2328-2331.
- [9] 恽鸿博, 滕晓鹏, 杨丽荣. 脑梗死继发癫痫患者血清 miR-146a 表达与脑电图严重程度及炎症因子水平的关系[J]. *河北医药*, 2019, 41(10): 1478-1481.
- [10] RANA A, MUSTO A E. The role of inflammation in the development of epilepsy[J]. *J Neuroinflammation*, 2018, 15(1): 144-156.
- [11] ALAPIRTTI T, LEHTIMÄKI K, NIEMINEN R, et al. The production of IL-6 in acute epileptic seizure: a video-EEG study[J]. *J Neuroimmunol*, 2018, 316(1): 50-55.
- [12] 徐吉淋, 王路乔, 梁倩, 等. miR-146a 对血小板免疫炎症功能的影响[J]. *重庆医学*, 2019, 48(13): 2175-2179.
- [13] LV Z C, CAO X Y, GUO Y X, et al. Effects of MiR-146a on repair and inflammation in rats with spinal cord injury through the TLR/NF- κ B signaling pathway[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(11): 4558-4563.
- [14] DENG M, DU G, ZHAO J, et al. miR-146a negatively regulates the induction of proinflammatory cytokines in response to Japanese encephalitis virus infection in microglial cells[J]. *Arch Virol*, 2017, 162(6): 1495-1505.
- [15] ORGANISTA-JUÁREZ D, JIMÉNEZ A, ROCHA L, et al. Differential expression of miR-34a, 451, 1260, 1275 and 1298 in the neocortex of patients with mesial temporal lobe epilepsy[J]. *Epilepsy Res*, 2019, 157(1): 106188-106196.
- [16] ANSARI A, MAFFIOLETTI E, MILANESI E, et al. miR-146a and miR-181a are involved in the progression of mild cognitive impairment to alzheimer's disease[J]. *Neurobiol Aging*, 2019, 82(1): 102-109.
- [17] ZHANG H, QU Y, WANG A. Antagonist targeting microRNA-146a protects against lithium-pilocarpine-induced status epilepticus in rats by nuclear factor- κ B pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(4): 5356-5361.