

呼吸道合胞病毒感染患儿外周血 NDR1 和 miR-146a 表达水平及其临床意义

王海峰¹, 张越², 舒放¹, 白云¹, 薛飞肖¹, 史珊珊¹, 孙大庆¹

(1. 西北大学附属医院 / 西安市第三医院检验科, 西安 710082; 2. 西安市儿童医院中心实验室, 西安 710002)

摘要: **目的** 探讨丝氨酸蛋白激酶 1(Nuclear Dbf2 p-related kinase 1, NDR1) 和微小核糖核酸 (micro RNA, miR) -146a 在呼吸道合胞病毒 (*Respiratory syncytial virus*, RSV) 感染患儿外周血清中的表达情况及临床意义。**方法** 收集 2019 年 7 月~2020 年 5 月西北大学附属医院 (西安市第三医院) 检验科、西安市儿童医院就诊的 77 例 RSV 感染患儿作为研究对象。按照病情严重程度分为重症组 36 例, 轻症组 41 例。同时选取 53 例同期来医院体检的健康儿童为对照组。采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 法检测外周血清中 miR-146a 表达水平; 酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测 NDR1 水平; Pearson 法分析 NDR1 与 miR-146a 表达的相关性及二者与相关炎症因子表达的相关性。受试者工作特征曲线 (ROC) 评估血清 NDR1 和 miR-146a 水平对 RSV 感染严重程度的诊断价值。**结果** 与对照组相比, RSV 感染患儿外周血中 NDR1 水平 (9.95 ± 2.38 pg/L vs 6.46 ± 1.12 pg/L) 下调, miR-146a 表达水平 (1.03 ± 0.17 vs 2.12 ± 0.43) 上调, 差异具有统计学意义 ($t_{\text{miR-146a}}=17.519$, $t_{\text{NDR1}}=11.204$, 均 $P < 0.05$)。RSV 感染重症组、轻症组及对照组中 hs-CRP, IL-4, IL-5, IL-6, IL-2 和 IFN- γ 比较差异均有统计学意义 ($F=67.825, 564.775, 256.06, 202.992, 77.579, 320.470$, 均 $P < 0.05$)。RSV 感染患儿血清 NDR1 水平与 IL-2, IFN- γ 表达均呈正相关 ($r=0.473, 0.620$, 均 $P < 0.05$), 与 hs-CRP, IL-4, IL-5, IL-6 水平呈负相关 ($r=-0.259, -0.559, -0.422, -0.505$, 均 $P < 0.05$); miR-146a 与 hs-CRP, IL-4, IL-5, IL-6 水平均呈正相关 ($r=0.381, 0.636, 0.421, 0.570$, 均 $P < 0.05$), 与 IL-2, IFN- γ 水平呈负相关 ($r=-0.646, -0.744$, 均 $P < 0.05$); RSV 感染患儿外周血清中 NDR1 与 miR-146a 表达水平呈负相关 ($r=-0.225$, $P < 0.05$); ROC 结果显示, 血清 NDR1, miR-146a 水平预测重症 RSV 感染患儿的曲线下面积 (AUC) 分别为 0.911 (95%CI: 0.823 ~ 0.964), 0.741 (95%CI: 0.628 ~ 0.834), 敏感度分别为 82.93%, 68.29%, 特异度分别为 88.89%, 75.00%, 二者联合预测重症 RSV 感染患儿的 AUC 为 0.925 (95%CI: 0.842 ~ 0.973), 敏感度和特异度分别为 90.24% 和 83.33%。**结论** NDR1 在 RSV 感染患儿外周血清中呈低表达, miR-146a 呈高表达, 二者可作为评估患儿病情发展的潜在指标。

关键词: 呼吸道合胞病毒感染; 丝氨酸 / 苏氨酸激酶 38; 微小核糖核酸 -146a

中图分类号: R373.14; R392.11 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414 (2022) 03-011-05

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2022.03.023

Expression Levels of NDR1 and miR-146a in Peripheral Blood of Children with Respiratory Syncytial Virus Infection and Their Clinical Significance

WANG Hai-feng¹, ZHANG Yue², SHU Fang¹, BAI Yun¹, XUE Fei-xiao¹, SHI Shan-shan¹, SUN Da-qing¹

(1. Department of Clinical Laboratory, the Affiliated Hospital of Northwest University/Xi'an No.3 Hospital, Xi'an 710082, China; 2. Central Laboratory, Xi'an Children's Hospital, Xi'an 710002, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expression and clinical significance of Nuclear Dbf2p-related kinase 1 (NDR1) and micro RNA (miR) -146a in the peripheral serum of children infected with *Respiratory syncytial virus* (RSV). **Methods** Blood samples of children with RSV infection in the Affiliated Hospital of Northwest University/Xi'an No.3 Hospital, Xi'an Children's Hospital from July 2019 to May 2020 were collected. According to the severity of the disease, there were 36 cases in the severe group and 41 cases in the mild group. At the same time, 53 healthy children who came to the hospital for physical examination during the same period were selected as the control group. The expression level of miR-146a in peripheral blood was detected by real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR). NDR1 was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The correlation between the expression of NDR1 and miR-146a and the expression of related inflammatory factors was analyzed by Pearson method. Receiver operating characteristic curve (ROC) was used to assess the diagnostic value of serum NDR1 and miR-146a levels for the severity of RSV infection. **Results** Compared with the control group, the level of NDR1

基金项目: 陕西省科学技术厅重点研发计划项目 (2021SF-036)。

作者简介: 王海峰 (1971-), 男, 主任技师, 主要研究方向: 临床检验管理与诊断, E-mail: xasyjykhf@sina.com。

(9.95 ± 2.38 pg/L vs 6.46 ± 1.12 pg/L) in peripheral blood of children infected with RSV was significantly down-regulated, and the expression level of miR-146a (1.03 ± 0.17 vs 2.12 ± 0.43) was up-regulated. All were statistically significant ($t_{\text{miR-146a}}=17.519$, $t_{\text{NDR1}}=11.204$, all $P < 0.05$). There were significant differences in hs-CRP, IL-4, IL-5, IL-6, IL-2 and IFN- γ in RSV infection severe group, mild group and control group ($F=67.825, 564.775, 256.06, 202.992, 77.579, 320.470$, all $P < 0.05$). The serum NDR1 level in children with RSV infection was positively correlated with IL-2 and IFN- γ expression ($r=0.473, 0.620$, all $P < 0.05$), and negatively correlated with hs-CRP, IL-4, IL-5 and IL-6 levels ($r=-0.259, -0.559, -0.422, -0.505$, all $P < 0.05$); MiR-146a was positively correlated with hs-CRP, IL-4, IL-5 and IL-6 levels ($r=0.381, 0.636, 0.421, 0.570$, all $P < 0.05$), and negatively correlated with IL-2 and IFN- γ levels ($r=-0.646, -0.744$, all $P < 0.05$). The expression levels of NDR1 and miR-146a in the peripheral serum of children infected with RSV were negatively correlated ($r=-0.225$, $P < 0.05$). ROC results showed that the area under the curve (AUC) of serum NDR1 and miR-146a levels predicting children with severe RSV infection was 0.911 (95%CI: 0.823 ~ 0.964) and 0.741 (95%CI: 0.628 ~ 0.834), the sensitivity was 82.93% and 68.29%, and the specificity was 88.89% and 75.00%, respectively. The AUC of the combination of the two predicting children with severe RSV infection was 0.925 (95%CI: 0.842 ~ 0.973), and the sensitivity and the specificity were 90.24%, 83.33%, respectively.

Conclusion The low expression of NDR1 and high expression of miR-146a in peripheral blood of children with RSV infection can be used as potential indicators to evaluate the disease progression of children..

Keywords: respiratory syncytial virus infection; serine/threonine kinase 38; miR-146a

呼吸道合胞病毒 (*respiratory syncytial virus*, RSV) 是 5 岁以下儿童呼吸道感染最常见的病原体, 具有高度传染性, 对小儿生长发育造成了严重影响, 临床症状可表现在毛细支气管炎、肺炎, 严重者会出现呼吸衰竭甚至造成死亡^[1]。迄今为止还没有临床批准的 RSV 疫苗^[2]。其发病机制也仍不清楚, 因此了解 RSV 感染的相关重要因素、早期诊断、加强防治, 对临床工作具有重要意义^[3-4]。微小核糖核酸 (micro RNA, miR) -146a 是 miR-146 家族成员之一, 具有组织表达和功能特异性。陈辉国等^[5-6]人发现肺癌组织和细胞中 miR-146a 呈现低表达, 可能通过减弱对 Notch1/Hes-1 信号通路的抑制作用, 促进肺癌细胞增殖、侵袭以及转移, 有望成为肺癌新的生物治疗靶点。NDR1 也称为丝氨酸 / 苏氨酸激酶 38 (serine/threonine kinase 38, STK38), 是 NDR/LATS 激酶家族中一种普遍表达且高度保守的丝氨酸 / 苏氨酸激酶。NDR1 是各种细胞过程的关键调节因子, 包括中心体复制、细胞凋亡和肿瘤发生^[7]。本研究旨在通过检测 RSV 感染患儿外周血清中 NDR1, miR-146a 的表达情况, 探讨二者在 RSV 感染中的作用及关系。

1 材料与方法

1.1 研究对象 选取 2019 年 7 月 ~ 2020 年 5 月在西北大学附属医院 / 西安市第三医院、西安市儿童医院儿科确诊为 RSV 感染的患儿 77 例, 按照病情严重程度分为重症组 ($n=36$) 和轻症组 ($n=41$)。重症组中男性 20 例, 女性 16 例, 平均年龄 1.61 ± 0.49 岁; 轻症组中男性 23 例, 女性 18 例, 平均年龄 1.54 ± 0.50 岁。

纳入标准: ①所有患儿符合诸福棠主编第 8 版《实用儿科学》^[8] 中小儿 RSV 感染诊断标准; ②无严重的基础性疾病或慢性疾病; ③无过敏性病史。

排除标准: ①免疫缺陷; ②支气管、肺发育不良; ③先天性心脏病、家族哮喘史; ④先天性气道畸形; ⑤排除临床资料不完整者; 同时选取 53 例同期来医院体检的健康儿童为对照组, 其中男性 30 例, 女性 23 例, 年龄 1~5 (1.62 ± 0.63) 岁。两组年龄、性别比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。本研究经本院伦理委员会批准, 样品收集均取得受试者知情且同意。

1.2 试剂与仪器 RNA 提取试剂盒 (北京天根生化有限公司); qRT-PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司); Nano Drop 2000 超微量分光光度计 (深圳市宇德立生物科技有限公司); AceQ qPCR SYBR® Green Mix (上海叶舟生物科技有限公司); miScript SYBR® Green qPCR Kit (德国 QIAGEN 公司); qRT-PCR 引物序列由上海生工生物公司合成等; 人呼吸道合胞病毒抗原 (RSV Antigen) ELISA 试剂盒 (上海江莱生物科技有限公司); IL-4, IL-5, IL-6, IL-2 ELISA 试剂盒 (武汉菲恩生物科技有限公司); hs-CRP, IFN- γ ELISA 试剂盒 (上海酶联生物科技有限公司); NDR1 ELISA 试剂盒 (武汉华美生物工程有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 标本采集: 患儿于治疗前, 健康儿童于体检当日清晨空腹采集静脉血 3ml, 3 000r/min 离心处理 30min, 取上层血清置于 -80°C 保存备用。

1.3.2 NDR1 和 miR-146a 水平检测: 采用酶联免疫吸附法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 检测血清 NDR1 水平, 具体操作严格按照说明书进行。按照 TRIzol 说明书分别提取总 RNA, 检测其纯度和完整度。分光光度计测定总 RNA 浓度, 取 $1 \mu\text{g}$ 总 RNA 作为模板, 采用反转

录试剂盒进行反转录,获得 cDNA。采用实时定量荧光 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 检测血清 miR-146a 表达水平。反应体系为:正、反向引物各 1 μ l, AceQ qPCR SYBR[®] Green Mix 10 μ l, 50 ng/ μ l 的 cDNA 模板 1 μ l, 无 RNA 酶的灭

菌水 3 μ l。反应条件:95 $^{\circ}$ C 下预变性 10 min; 然后以 95 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C 10 s; 60 $^{\circ}$ C 30 s 的条件进行, 共设 40 个循环, 所有条件均按照检测系统严格进行。采用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法对血清 miR-146a 表达水平进行定量分析。miR-146a1 及内参 U6 的引物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物序列

基因名称	正向引物 5'-3'	反向引物 5'-3'
miR-146a	ATAGGATCCATCATGCATGGCTCATTTT	ATAGGATCCAGCTACTTGGAACCCCTGCTT
U6	CTTCGGCAGCACATATACTAAAT	CAGGGGCCATGCTAAATCTTC

1.3.3 血清中炎症因子水平检测:采用双抗体夹心酶联免疫 (ELISA) 法检测血清中超敏 C 反应蛋白 (hs-CRP), 白细胞介素 -2 (IL-2), 白细胞介素 -4 (IL-4), 白细胞介素 -5 (IL-5), 白细胞介素 -6 (IL-6) 和干扰素 - γ (IFN- γ) 表达水平, 具体操作严格按照说明进行。

1.4 统计学分析 利用 SPSS 22.0 进行统计学分析, 计数资料采用例 (n) 表示, 行卡方 (χ^2) 检验; 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 行 t 检验, 多组数据利用单因素方差分析; 采用 Pearson 法分析 NDR1 与 miR-146a 表达的相关性。利用受试者工作特征曲线 (receiver operating characteristic curve, ROC) 评价血清 NDR1 和 miR-146a 水平对 RSV 感染严重程度的诊断价值。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 2 三组血清 NDR1, miR-146a 及免疫功能指标水平比较

项目	轻症组 ($n=36$)	重症组 ($n=41$)	对照组 ($n=53$)	F	P	t_1	P_1	t_2	P_2	t_3	P_3
性别 (男/女)	20/16	23/18	30/23	9.000	0.342	0.002	0.962	0.002	0.961	0.010	0.922
年龄 (岁)	1.61 \pm 0.49	1.54 \pm 0.50	1.62 \pm 0.63	0.267	0.766	0.782	0.845	0.981	0.996	0.118	0.996
miR-146a	1.82 \pm 0.38	2.13 \pm 0.45	1.03 \pm 0.17	132.039	0.000	5.650	0.000	22.017	0.000	15.227	0.000
NDR1 (pg/L)	6.65 \pm 1.36	4.35 \pm 1.11	9.95 \pm 2.38	115.647	0.000	7.940	0.000	21.229	0.000	12.047	0.000
hs-CRP (mg/L)	211.73 \pm 62.45	249.26 \pm 63.78	124.52 \pm 35.02	67.825	0.000	4.347	0.007	15.865	0.000	10.682	0.000
IL-2 (pg/L)	1.08 \pm 0.45	0.85 \pm 0.23	2.65 \pm 1.12	77.579	0.000	1.860	0.389	13.429	0.000	15.987	0.000
IL-4 (pg/L)	11.45 \pm 2.23	19.62 \pm 2.33	4.39 \pm 2.02	564.775	0.000	23.208	0.000	21.209	0.000	47.520	0.000
IL-5 (pg/L)	36.25 \pm 5.85	46.52 \pm 13.89	8.30 \pm 2.32	256.06	0.000	19.538	0.000	6.775	0.000	28.491	0.000
IL-6 (ng/L)	46.52 \pm 13.23	80.78 \pm 20.12	21.65 \pm 7.56	202.992	0.000	19.032	0.000	11.540	0.000	28.491	0.000
IFN- γ (ng/L)	25.56 \pm 7.88	9.62 \pm 2.51	1.61 \pm 0.72	320.470	0.000	22.461	0.000	35.689	0.000	12.395	0.000

注: 重症组 vs 轻症组 t_1 , P_1 ; 重症组 vs 对照组 t_2 , P_2 ; 轻症组 vs 对照组 t_3 , P_3 。

2.3 NDR1 和 miR-146a 表达与炎症因子水平的相关性分析 见表 3。对 NDR1 和 miR-146a 的表达量分别与临床指标水平进行相关性分析, 结果表明血清 NDR1 水平与 IL-2, IFN- γ 表达均呈正相关 (均 $P < 0.05$), 与 hs-CRP, IL-4, IL-5 和 IL-6 水平呈负相关 (均 $P < 0.05$); 而 miR-146a 与 hs-CRP, IL-4, IL-5, IL-6 水平均呈正相关 (均 $P < 0.05$), 与 IL-2, IFN- γ 水平呈负相关 (均 $P < 0.05$)。

2.4 RSV 感染患儿血清中 NDR1 与 miR-146a 表达的相关性 Pearson 法分析结果显示, RSV 感染患儿外周血清中 NDR1 与 miR-146a 表达呈负相关,

2 结果

2.1 RSV 组和对照组外周血中 NDR1 和 miR-146a 水平比较 RSV 组 NDR1 表达水平低于对照组 (6.46 ± 1.12 pg/L vs 9.95 ± 2.38 pg/L), 差异有统计学意义 ($t=11.204$, $P < 0.05$); RSV 组 miR-146a 水平高于对照组 (2.12 ± 0.43 vs 1.03 ± 0.17), 差异有统计学意义 ($t=17.519$, $P < 0.05$)。

2.2 三组研究对象血清 NDR1 和 miR-146a 及免疫功能指标水平比较 见表 2。三组性别、年龄比较差异无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。RSV 重症组患儿血清中 miR-146a, hs-CRP, IL-4, IL-5 和 IL-6 水平均高于对照组和轻症组, 其中轻症组高于对照组 (均 $P < 0.05$); NDR1, IL-2, IFN- γ 水平均低于轻症组和对照组, 其中轻症组低于对照组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。

差异有统计学意义 ($r=-0.225$, $P < 0.05$)。

2.5 血清中 NDR1, miR-146a 水平对 RSV 感染严重程度的诊断价值 见图 1。ROC 结果显示, 血清 NDR1, miR-146a 水平预测重症 RSV 感染患儿的 AUC 分别为 0.911 (95%CI: 0.823 ~ 0.964), 0.741 (95%CI: 0.628 ~ 0.834), 对应的敏感度分别为 82.93% 和 68.29%, 特异度分别为 88.89% 和 75.00%, 血清 miR-146a, NDR1 水平联合预测重症 RSV 感染患儿的 AUC 为 0.925 (95%CI: 0.842 ~ 0.973), 敏感度和特异度分别为 90.24%, 83.33%。

表3 RSV组 NDR1 和 miR-146a 表达水平与炎症因子水平的相关性

参数	NDR1		miR-146a	
	r	P	r	P
hs-CRP	-0.259	0.005	0.0381	0.001
IL-2	0.473	0.000	-0.646	0.000
IL-4	-0.559	0.006	0.636	0.000
IL-5	-0.422	0.014	0.421	0.000
IL-6	-0.505	0.000	0.570	0.000
IFN- γ	0.620	0.000	-0.744	0.000

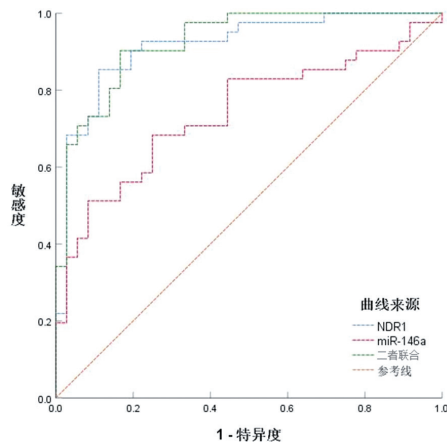


图1 血清 NDR1 和 miR-146a 水平诊断重症 RSV 感染患儿的 ROC 曲线

3 讨论

呼吸道合胞病毒 (RSV) 是儿童因急性细支气管炎和病毒性肺炎而住院的最常见原因, RSV 与支气管哮喘发作密切相关, 严重者会造成肺功能异常, 影响儿童正常发育^[9]。据估计, 全世界每年有多达 20 万人死亡^[10-11]。

miRNA 是内源性非编码小 RNA 分子^[12], 通过靶向多个转录本, 调控大约 30% 的基因和大多数遗传途径, 在包括发育和分化、细胞增殖、细胞凋亡和代谢在内的多种生物过程中发挥着重要作用^[13]。近年来很多研究发现 miRNA 能够调节 RNA 病毒感染相关的炎症应答。一些研究者已经在小鼠模型上成功运用小分子干扰 RNA 减少 RSV 的复制, 有望成为诊断 RSV 感染的侵入性生物标志物以及治疗 RSV 感染的新靶标^[14]。王宽锋等^[15]人发现婴幼儿 RSV 肺炎单个核细胞 (PBMCS) 中 miR-146a 表达异常升高, 可为临床早期诊断提供理论依据。本研究中 RSV 感染患儿外周血清中 miR-146a 水平显著升高, 随着疾病严重程度的加重而升高, 提示 miR-146a 可能与 RSV 的发生、发展以及疾病严重程度有关; RSV 患儿 hs-CRP, IL-4, IL-5 和 IL-6 表达升高, IL-2 和 IFN- γ 表达降低, 表明机体感染病毒后, 体内发生剧烈的炎症反应, 从而促使了炎症因子的大量释放, 进而加重病情。miR-146a 与 IL-2,

IFN- γ , hs-CRP, IL-4, IL-5, IL-6 均相关, 提示 miR-146a 可能通过影响机体内炎症因子指标, 影响 RSV 的发生, 并进一步影响疾病的发展进程, 由此提示在临床工作中可关注以上指标有望为病情控制和有效治疗提供重要参考。ROC 结果显示 miR-146a 水平可在一定程度预测重症 RSV 感染患儿的发生。

NDR1 广泛参与肿瘤的发生发展, 控制着重要的细胞过程, 如形态变化、中心体复制、细胞增殖和凋亡。最近的研究表明, NDR1 在感染和炎症的调节中也发挥着重要作用^[16]。有研究发现, NDR1 正向调控抗病毒天然免疫反应, 和健康人群相比, 感染 RSV 病人外周血中 NDR1 的表达量显著下调。本研究中 RSV 感染患儿外周血清中 NDR1 表达水平显著降低, 且随着疾病严重程度的升高而逐渐降低, 提示 NDR1 与疾病的发生发展过程密切相关, 其表达与疾病的严重程度密切相关。血清 NDR1 水平与 IL-2, IFN- γ , hs-CRP, IL-4, IL-5, IL-6 水平均有相关性, 这些结果表明 NDR1 与 miR-146a 相一致, 均可能在调节炎症和损伤反应中发挥关键作用。研究进一步发现, 外周血清中 NDR1 与 miR-146a 表达水平呈负相关, 提示 miR-146a 可能通过对 NDR1 的表达进行调控, 并影响体内炎症因子的分泌, 参与 RSV 的发生, 其具体作用机制有待进一步研究。ROC 结果显示联合检测 NDR1, miR-146a 水平对预测呼吸道合胞病毒感染病的诊断效能及敏感度高于单一指标检测。

综上所述, NDR1 在呼吸道合胞病毒感染患儿外周血清中低表达, miR-146a 高表达, 二者呈显著负相关, 二者可能通过某种机制参与 RSV 感染病的发生、发展, 还可作为 RSV 疾病的早期诊断指标, 具有重要的临床意义。本研究尚存在不足之处, 没有探究二者在疾病中发挥作用的确切机制, 需扩大样本量对其进行深入探讨研究。

参考文献:

- [1] 金鑫, 杨丽, 张梅, 等. 呼吸道合胞病毒感染不同气道上皮细胞的病变特点及易感性分析 [J]. 病毒学报, 2022, 38(2):371-377.
JIN Xin, YANG Li, ZHANG Mei, et al. Characteristics and susceptibility of Respiratory syncytial virus infection in different airway epithelial cells [J]. Chinese Journal of Virology, 2022, 38(2):371-377.
- [2] 褚雨敏, 李彦染, 郝玲, 等. 呼吸道合胞病毒感染患儿临床特征及免疫功能分析 [J]. 中国病原生物学杂志, 2021, 16(4):482-485.
CHU Limin, LI Yanran, HAO Ling, et al. Clinical characteristics and immune function of pediatric patients with a respiratory tract infection [J]. Journal of Pathogen Biology, 2021, 16(4): 482-485.
- [3] 阿斯姆古丽·吾布力, 曹玲. 小儿重症呼吸道合胞病毒感染相关危险因素研究进展 [J]. 北京医学, 2019, 41(11):1033-1036.

(下转第 156 页)