

临床研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.003845

尿液外泌体 mRNAs 评分指导坏死性小肠结肠炎
患儿手术时机相关研究

吴岳,陶俊峰,刘钟,曾佳瑜,邓志刚,曾强

(江西省妇幼保健院/江西省儿童医学中心,南昌 330000)

【摘要】目的:探索坏死性小肠结肠炎(necrotizing enterocolitis, NEC)患儿尿液外泌体(exosomes, Exo)mRNAs 表达特征。构建 mRNAs 评分用于指导 NEC 患儿手术时机。**方法:**选取本院 2021 年 1 月至 2024 年 3 月收治的 196 例 NEC 患儿作为研究对象。根据是否进行手术干预分为手术组和非手术组。对 4 例手术组患儿和 4 例非手术组患儿尿液 Exo-mRNAs 进行微阵列数据分析。使用 Metascape 在线数据库进行京都基因和基因组(kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)信号通路分析。通过拓扑特征分析筛选核心基因并在临床队列中利用酶联免疫吸附法验证核心基因表达特征。通过 logistic 回归分析构建尿液 Exo-mRNAs 评分。通过受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线分析和比较风险变量曲线下面积(area under the curve, AUC)。**结果:**196 例患儿中,需要手术干预患儿 48 例(32.4%)。手术组和非手术组患儿尿液 Exo-mRNAs 微阵列数据分析识别出 565 个差异表达基因,其中 441 个基因表达上调,124 个基因表达下调。KEGG 信号通路主要富集在细胞色素 P450、胆汁分泌和脂肪消化吸收等信号通路中。2 次拓扑特征分析发现 11 个核心基因:前列腺素内过氧化物合酶 2 (prostaglandin-endoperoxide Synthase 2, PTGS2)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 beta, IL-1 β)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、基质金属蛋白酶 9(matrix metalloproteinase-9, MMP9)、细胞色素 P450 3A4(cytochrome P450 family 3 subfamily A member 4, CYP3A4)、Toll 样受体 2(toll-like receptor 2, TLR2)、钙黏蛋白 1(cadherin 1, CDH1)、细胞色素 P450 2C9(cytochrome P450 family 2 subfamily C member 9, CYP2C9)、细胞色素 P450 2C19(cytochrome P450 family 2 subfamily C member 19, CYP2C19)、CXC 基序趋化因子配体 8(C-X-C motif chemokine ligand 8, CXCL8)和载脂蛋白 C-3(apolipoprotein C-III, APOC3)。手术组患儿尿液 Exo 中 PTGS2、IL-1 β 、MMP9 和 TLR2 表达量增加, CYP3A4、CDH1 和 CYP2C9 表达量降低($P<0.05$)。Exo-mRNAs 评分公式为 $0.704 \times \text{PTGS2}_{\text{表达量}} + 0.426 \times \text{IL-1}\beta_{\text{表达量}} + 0.198 \times \text{TLR2}_{\text{表达量}} - 1.166 \times \text{CYP3A4}_{\text{表达量}}$ 。多因素 logistic 回归分析显示, Exo-mRNAs 评分、胎龄和肠脂肪酸结合蛋白(I-FABP)是 NEC 患儿手术干预风险独立影响变量($P<0.05$)。ROC 曲线分析结果显示, Exo-mRNAs 评分预测手术干预风险的 AUC 为 0.888(0.836-0.929), 均高于单独 Exo-mRNA、胎龄和 I-FABP 的 AUC。**结论:**尿液 Exo-mRNAs 评分可作为指导 NEC 患儿手术时机的非侵入性标志物,为 NEC 患儿积极早期干预和治疗提供理论依据。

【关键词】坏死性小肠结肠炎;新生儿;外泌体;信使核糖核酸;手术;时机

【中图分类号】R722.1

【文献标志码】A

Value of urinary exosome mRNA score in guiding surgical timing in children
with necrotizing enterocolitis

Wu Yue, Tao Junfeng, Liu Zhong, Zeng Jiayu, Deng Zhigang, Zeng Qiang

(Jiangxi Maternal and Child Health Hospital / Jiangxi Children's Medical Center)

【Abstract】Objective: To investigate the expression characteristics of urinary exosome (Exo) mRNAs in children with necrotizing enterocolitis (NEC), and to construct an mRNA score for guiding surgical timing in children with NEC. **Methods:** A total of 196 children with NEC who were admitted to our hospital from January 2021 to March 2024 were enrolled as subjects, and according to whether surgical intervention was performed, they were divided into surgical group and non-surgical group. A microarray data analysis was performed for the urinary Exo-mRNAs of four children in the surgical group and four in the non-surgical group. Metascape online database was used to perform the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) signaling pathway analysis. Topological characterization was performed to identify core genes, and ELISA was used to validate the expression profiles of core genes. A logistic regression analysis was used to construct the urinary Exo-mRNAs score. The

作者介绍:吴岳, Email: wu00yue@163.com,

研究方向:小儿外科。

通信作者:陶俊峰, Email: 304733369@qq.com。

优先出版: <https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20250418.1630.016>

(2025-04-21)

receiver operating characteristic (ROC) curve was used to analyze and compare the area under the ROC curve (AUC) of risk variables.

Results: Among the 196 children, 48 (32.4%) required surgical intervention. The microarray data analysis of urinary Exo-mRNAs identified 565 differentially expressed genes between the surgical group and the non-surgical group, among which there were 441 up-regulated genes and 124 downregulated genes. The KEGG signaling pathways were mainly enriched in the signaling pathways such as cytochrome P450, bile secretion, and fat digestion and absorption. Two sessions of topological characterization identified 11 core genes, i.e., prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6, matrix metalloproteinase 9 (MMP9), cytochrome p450 3A4 (CYP3A4), toll-like receptor 2 (TLR2), cadherin-1 (CDH1), cytochrome p450 2C9 (CYP2C9), cytochrome p450 2C19, C-X-C motif chemokine ligand 8, and apolipoprotein C-3. For the children in the surgical group, there were significant increases in the expression levels of PTGS2, IL-1 β , MMP9, and TLR2 and significant reductions in the expression levels of CYP3A4, CDH1, and CYP2C9 in urinary Exo ($P < 0.05$). The formula for Exo-mRNAs scoring was $0.704 \times \text{PTGS2}_{\text{expression}} + 0.426 \times \text{IL-1}\beta_{\text{expression}} + 0.198 \times \text{TLR2}_{\text{expression}} - 1.166 \times \text{CYP3A4}_{\text{expression}}$. The multivariate logistic regression analysis showed that Exo-mRNAs score, gestational age, and intestinal fatty acid-binding protein (I-FABP) were independent influencing variables for the risk of surgical intervention in children with NEC ($P < 0.05$). The ROC curve analysis showed that Exo-mRNAs score had an AUC of 0.888 (0.836–0.929) in predicting the risk of surgical intervention, with a significantly higher AUC than Exo-mRNA, gestational age, and I-FABP alone. **Conclusion:** Urinary Exo-mRNAs score can be used as a noninvasive marker for guiding surgical timing in children with NEC, which provides a theoretical basis for the early intervention and treatment of children with NEC.

[Key words] necrotizing enterocolitis; neonate; exosomes; mRNA; surgery; timing

坏死性小肠结肠炎 (necrotizing enterocolitis, NEC) 是新生儿中常见的急性坏死性肠道疾病, 表现为腹胀、腹泻和血便, 具有发病急、进展快和死亡率高等特点^[1]。随着早产儿 (特别是极低和超低体重儿) 存活率提高, NEC 发病率逐渐增加, 约为 13%^[2]。荟萃分析显示 NEC 致死率可达 10%, 而 61% 幸存者会出现严重神经发育迟缓^[3], 9% 幸存者因出现肠衰竭需肠外营养支持治疗^[4]。这些并发症会导致患儿生活质量低下, 给医疗和社会保健系统带来沉重经济负担。

有效预防 NEC 有助于提高治疗效果, 这也意味着需要更精确地确定疾病自然进展和手术干预最佳时机。然而, 超过一半需进行手术干预 NEC 患儿因缺乏明确手术体征而未得到及时治疗, 患儿死亡概率增加^[5]。为此, 研究者从病因、早期诊断和更有效预防措施等方面进行探索, 包括识别反映疾病严重程度或进展的生物标志物或免疫学指标来增强手术干预决策^[6]。然而, 现有研究结论仍无法提供一种准确且有效辅助手术干预时机的决策方法。因此, 寻找更为准确有效的早期生物标志物, 对提高患儿生存率具有重要意义。

近年来, 外泌体 (exosomes, Exo) 作为一种新型的细胞间通讯介质, 受到广泛关注, 其是由细胞分泌的小囊泡, 直径 40~160 nm, 能够携带蛋白质、脂

质、mRNAs、miRNAs 等多种生物分子, 在细胞间传递信息^[7]。Exo 广泛存在于血液、尿液和唾液等各种体液中, 其内容物反映了来源细胞状态和功能, 因而被认为是理想的疾病标志物来源。研究发现肠上皮细胞和中性粒细胞衍生的 Exo 可通过多种病理学机制介导 NEC 发病和进展机制^[8]。尿液作为一种非侵入性、易获取体液样本, 其含有的 mRNAs 已被用作早期诊断和预测 NEC 的新型标志物^[9], 此外, Exo 在多囊体与顶端浆细胞膜融合过程中或通过浆膜直接出芽释放到尿液中, 与尿液中 mRNAs 相比, 尿液 Exo-mRNAs 因包裹在膜结合囊泡内, 具有更高生物学稳定性^[10]。

因此, 可以合理地假设, 通过分析 NEC 中尿液 Exo-mRNAs 特征变化, 可以确定 NEC 进展标志物, 并指导 NEC 早期手术干预时机的决策过程。为此, 本研究通过分析 NEC 患儿尿液 Exo 中 mRNAs 的表达谱特征, 筛选出与手术干预密切相关的 Exo-mRNAs, 随后在临床队列中验证; 最后构建 Exo-mRNAs 评分旨在指导 NEC 患儿手术干预时机。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取本院 2021 年 1 月至 2024 年 3 月收治的 NEC 患儿。纳入标准: ①符合 NEC 诊断标准, NEC 为 Bell 分期 II 期及以

上;②入院时间 ≤ 24 h;③患儿监护人均知情同意本研究并签署同意书;④具有手术指征者均进行手术治疗。排除标准:①其他传染病者;②先天性代谢疾病或染色体异常者;③先天性肠道畸形者;④严重先天性心脏病者;⑤围生期及住院治疗资料不完整。最终本研究共纳入 NEC 患儿 196 例,入院 1 周后,根据患儿是否进行手术干预分为手术组和非手术组。本研究获得伦理委员会批准通过(伦理审查批件号:EC-KY-2024114)。

1.2 方法

1.2.1 数据收集 收集 NEC 患儿入院当天的临床资料,包括胎龄、性别、出生体质量、分娩方式、喂养方式、宫内感染史、白细胞(white blood cell, WBC)、中性粒细胞与淋巴细胞比值(neutrophil-to-lymphocyte ratio, NLR)、血小板(platelet, PLT)、血糖(blood glucose, BG)、C 反应蛋白(C-reactive protein, CRP)、血红蛋白(hemoglobin, Hb)、纤维蛋白原(fibrinogen, FIB)、白蛋白(albumin, Alb)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、肠脂肪酸结合蛋白(intestinal fatty acid-binding protein, I-FABP)和降钙素原(procalcitonin, PCT)。

1.2.2 尿液收集与 Exo 提取 入院当天患儿确诊后,使用 10 mL 无菌容器收集患儿晨尿标本,采用差速离心法去除细胞和其他大颗粒杂质后置于 -80°C 保存。按照制造商说明,使用 ExoQuick exosomes 快速提取试剂盒(EXOQ5A-1, SBI)提取 3 mL 尿液 Exo。简言之,尿液样本在 4°C 下以 $10\,000\times g$ 离心 30 min 除去较大颗粒。随后将上清液转移至超速离心管中,按 1:1 比例添加 ExoQuick 试剂,在 4°C 下以 $100\,000\times g$ 离心 70 min。弃去上清液后将尿液 Exo 重悬于磷酸盐缓冲液中保存于 -80°C ,以备后续实验。48 例手术组患儿手术时间与尿液采集时间的差值为 (4.25 ± 1.08) d。

1.2.3 纳米颗粒跟踪分析 使用 Nanosight NS300 系统(Malvern Instruments, 英国)对 Exo 进行纳米颗粒跟踪分析(nanoparticle tracking analysis, NTA),以确定颗粒大小和数量。根据制造商说明,将尿液 Exo 样品在无颗粒磷酸盐缓冲溶液中稀释(1:3 000)。随后在 25°C 恒流(流速=50)条件下进行分析。使用 NTA 3.1.54 软件分析数据。

1.2.4 透射电子显微镜 使用透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)鉴定 Exo 形态。简言之,将 10 μL Exo 溶液静置于 200 目铜网上 20 min。随后用蒸馏水冲洗网格 3 次,用乙酸铀酞对 Exo 进行阴性染色 2 min 后风干铜网,随后用 TEM 进行观察鉴定。

1.2.5 蛋白质印迹(Western blot, WB) 使用 WB 分析确认 Exo 相关膜蛋白存在。根据制造商说明,使用 BCA™ 蛋白定量试剂盒(P0010, 碧云天)定量蛋白质浓度。经 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,转移至聚偏二氟乙烯膜上,随后以 5% BSA 封闭膜 1 h。随后使用抗鼠 CD9(1:1 000, ab236630, Abcam)和抗鼠 TSG101(1:1 000, ab30871, Abcam)在 4°C 下孵育过夜。二抗室温孵育 1 h。随后使用 Tanon3500 凝胶成

像和照相系统显影。

1.2.6 尿液 Exo-mRNAs 提取与微阵列数据分析 从手术组和非手术组患儿中各随机选择 4 例进行尿液 Exo 的 mRNAs 微阵列数据分析。根据制造商说明,使用 miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit (217204, Qiagen)提取尿液 Exo 中总 RNA。使用 500 μL 含异硫氰酸胍的 Qiazol 缓冲液溶解尿液 Exo。加入 100 μL 氯仿将混合物涡旋并在 4°C 下以 $14\,000\times g$ 离心 15 min。随后在上清液中加入 1.5 mL 无水乙醇,混合物由提取柱(Qiagen S.A.)离心后分别用 RWT 缓冲液和 REP 缓冲液洗涤。用 20 μL 无 RNase 水洗脱 RNA,随后用 Nanodrop 进行定量。如前所述,使用 miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit (217204, Qiagen)提取尿液 Exo 中总 RNA。并用 NanoDrop 光谱仪评估 RNA 质量和浓度,随后通过 Prime-Script RT 试剂盒逆转录为 cDNA 并将其标记为荧光探针,将标记后的 cDNA 片段杂交到微阵列芯片上,随后使用安捷伦扫描仪对微阵列芯片进行扫描,使用 Feature Extraction 软件分析微阵列图像并获取原始数据。NEC 患儿尿液 Exo-mRNAs 微阵列数据分析

1.2.7 差异表达基因和功能富集分析 使用 R 包 limma 分析差异表达基因,阈值设置为 $|\text{LogFC}|>2$ 和 $\text{adj.}P<0.05$ 。将差异表达基因导入 Metascape (<http://metascape.org/gp/index.html#/main/step1>)平台中,在“Input as species”和“Analysis as species”中均选择“H.sapiens”进行京都基因和基因组(kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)信号通路分析,绘制尿液 Exo-mRNAs 功能富集分析图。

1.2.8 基因拓扑特征分析 将差异表达基因导入 STRING 数据库(<http://string-db.org/cgi/input.pl>)中构建蛋白质-蛋白质相互作用网络。随后将输出数据导入 Cytoscape 3.8.0 软件中,使用“cytoNCA”插件进一步进行拓扑特征分析,并根据每个节点的度中心性(degree centrality, DC)和中介中心性(between centrality, BC)识别核心基因。

1.2.9 酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)验证核心基因 根据制造商说明,使用相应 ELISA Kit 试剂盒验证核心基因表达量。简言之,将待验证抗人抗体包被于酶标板上,随后依次加入生物素化的相应抗人抗体和辣根过氧化物酶标记的亲本素,使相应抗人抗体与结合在包被抗体上的待验证抗人抗体结合,生物素与亲和素特异性结合而形成免疫复合物。随后加入显色底物 TMB, TMB 在辣根过氧化物酶的催化下呈现蓝色,加终止液后变成黄色。随后用酶标仪在 450 nm 波长处测吸光度(absorbance, A)值,基因浓度与 A_{450} 值之间成正比,通过绘制标准曲线计算出样品中核心基因浓度。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 22.0、GraphPad Prism 9.5、Medcalc 22.0 和 Cytoscape 3.8.0 软件处理数据。计数资料用百分率(%)表示,组间比较采用卡方检验。正态分布的计量资料

以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用独立样本 t 检验。多因素 logistic 回归分析 NEC 患儿手术干预风险的独立影响因素。采用受试者工作特征 (receiver operating characteristic, ROC) 曲线分析并计算相关变量曲线下面积 (area under the curve, AUC)。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 手术组和非手术组患儿临床资料比较

196 例患儿中, 需要手术干预患儿 48 例 (32.4%)。手术组患儿胎龄 ($P<0.001$) 和 PLT ($P=0.002$) 低于非手术组患儿, 宫内感染史比例 ($P=0.038$)、NLR ($P=0.003$)、BG ($P=0.003$)、CRP ($P=0.011$)、IL-6 ($P<0.001$)、I-FABP ($P<0.001$) 和 PCT ($P=0.016$) 高于非手术组患儿, 2 组差异有统计学意义 (表 1)。

2.2 尿液 Exo 鉴定

采用 NTA (图 1A) 和 TEM (图 1B) 鉴定 Exo。Exo 大小不一, 呈类圆形或椭圆形双层脂质膜囊泡, 直径约为 150 nm。

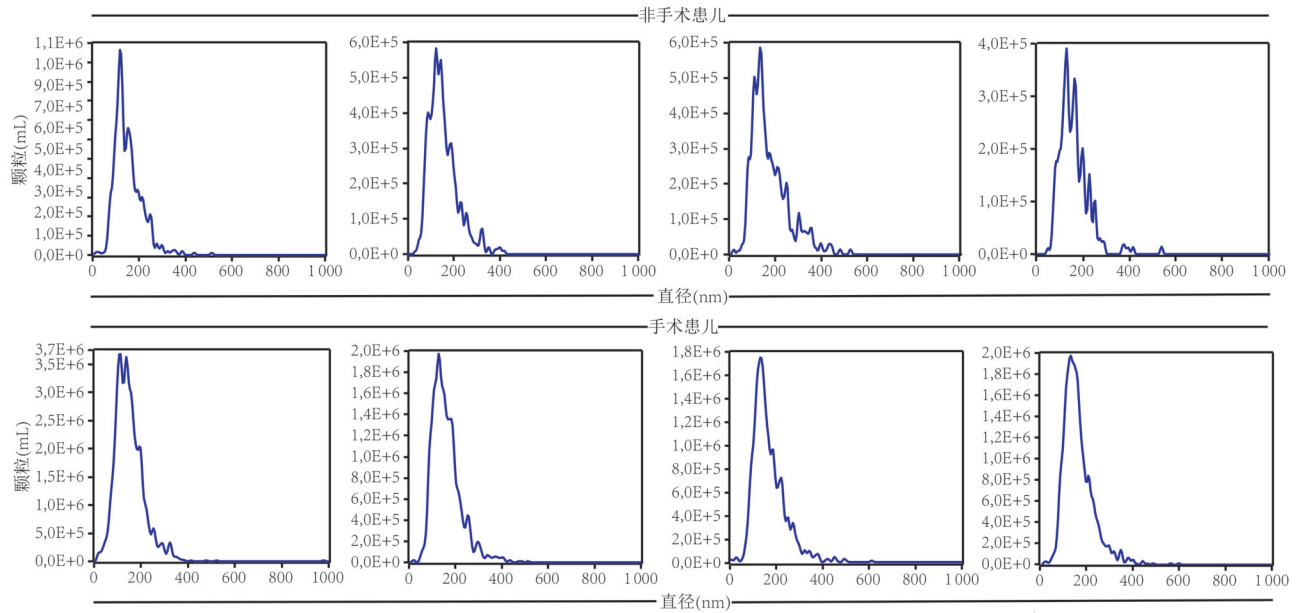
WB 分析证实尿液 Exo 中存在 CD9 和 TSG101 表达 (图 1C), 表明本研究已成功提取尿液 Exo。

2.3 手术组和非手术组患儿尿液 Exo-mRNAs 差异表达、功能富集及拓扑分析

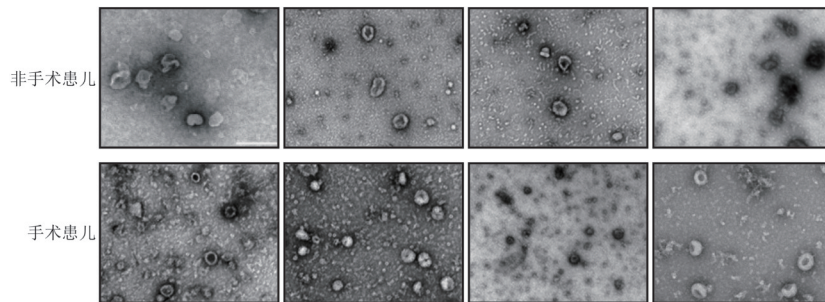
通过对手术组和非手术组患儿尿液 Exo-mRNAs 的微阵列数据分析, 共识别出 565 个差异表达基因, 其中 441 个基因表达上调, 124 个基因表达下调 (图 2A)。将 565 个差异表达基因导入 Metascape 数据库中, KEGG 信号通路主要富集在细胞色素 P450、胆汁分泌和脂肪消化吸收等信号通路中 (图 2B)。为探索核心基因, 对 565 个基因进行 2 次拓扑特征分析 (每次保留前 20% 基因), 共发现 11 个核心基因: 前列腺素内过氧化物合酶 2 (prostaglandin-endoperoxide synthase 2, PTGS2)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 beta, IL-1 β)、IL-6、基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinase 9, MMP9)、细胞色素 P450 3A4 (cytochrome p450 3A4, CYP3A4)、Toll 样受体 2 (toll-like receptor 2, TLR2)、钙黏蛋白 1 (cadherin-1, CDH1)、细胞色素 P450 2C9 (cytochrome p450 2C9, CYP2C9)、细胞色素 P450 2C19 (cytochrome p450 2C19, CYP2C19)、CXC 基序

表 1 手术组和非手术组患儿临床资料比较 ($\bar{x} \pm s; n, \%$)

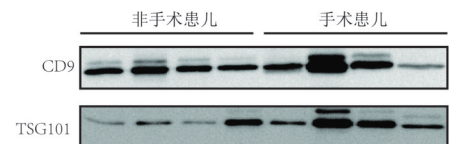
项目	手术组 ($n=48$)	非手术组 ($n=148$)	t/χ^2 值	P 值
胎龄 (周)	32.35 \pm 1.82	33.76 \pm 2.48	4.225	<0.001
性别			1.558	0.212
女	27 (56.25)	98 (66.22)		
男	21 (43.75)	50 (33.78)		
出生体质量 (g)			1.556	0.212
≥ 2500	20 (41.67)	77 (52.03)		
< 2500	28 (58.33)	71 (47.97)		
分娩方式			0.332	0.564
阴道分娩	25 (52.08)	70 (47.30)		
剖宫产	23 (47.92)	78 (52.70)		
喂养方式			0.230	0.632
母乳喂养	26 (54.17)	86 (58.11)		
其他	22 (45.83)	62 (41.89)		
宫内感染史			4.284	0.038
否	20 (41.67)	87 (58.78)		
是	28 (58.33)	61 (41.22)		
WBC ($\times 10^9/L$)	6.80 \pm 2.81	7.02 \pm 2.07	0.607	0.545
NLR	2.58 \pm 0.97	2.14 \pm 0.85	3.040	0.003
PLT ($\times 10^9/L$)	200.91 \pm 35.38	221.12 \pm 39.82	3.135	0.002
BG (mmol/L)	4.58 \pm 1.24	3.97 \pm 0.98	3.116	0.003
CRP (mg/dL)	36.65 \pm 4.02	35.16 \pm 3.28	2.577	0.011
Hb (g/L)	121.35 \pm 29.31	129.14 \pm 30.52	1.551	0.123
FIB (g/L)	2.63 \pm 0.87	2.60 \pm 0.34	0.230	0.819
Alb (g/L)	28.90 \pm 5.27	30.14 \pm 3.43	1.536	0.130
IL-6 (ng/L)	119.08 \pm 14.57	110.91 \pm 12.99	3.671	<0.001
I-FABP (ng/L)	7.20 \pm 3.46	5.17 \pm 2.13	3.835	<0.001
PCT (ng/L)	9.02 \pm 2.26	8.13 \pm 2.19	2.431	0.016



A. NEC患儿尿液Exo的NTA结果



B. TEM观察NEC患儿尿液Exo形态结果



C. WB检测CD9、TSG101蛋白表达水平

图1 尿液Exo鉴定

趋化因子配体8(C-X-C motif chemokine ligand 8, CXCL8)和载脂蛋白C-3(apolipoprotein C-3, APOC3)(图2C)。

2.4 尿液Exo中11个核心基因表达特征验证

非手术组及手术组在IL-6、CYP2C19、CXCL8、APOC3方面的比较差异无统计学意义($P>0.05$)。与非手术组患儿相比,手术组患儿尿液Exo中PTGS2($P<0.001$)、IL-1 β ($P<0.001$)、MMP9($P=0.004$)和TLR2($P=0.004$)表达量增加,CYP3A4($P<0.001$)、CDH1($P=0.002$)和CYP2C9($P=0.018$)表达量降低,2组差异有统计学意义(表2)。

2.5 影响Exo-mRNAs评分构建及多因素logistic回归分析

将表2中单因素有差异的7个核心基因(PTGS2、IL-1 β 、MMP9、TLR2、CYP3A4、CDH1、CYP2C9)作为自变量纳入多因素logistic回归模型中,以NEC患儿入院1周内是否进行手术为因变量(非手术=0,手术=1),结果显示,尿液Exo中核心基因PTGS2、IL-1 β 、TLR2、CYP3A4是NEC患儿手术干预风险独立影响变量($P<0.05$)(表3)。基于多因素Logistic回归分析结果 β 值构建Exo-mRNAs评分:0.704 \times PTGS2_{表达量}+0.426 \times IL-1 β _{表达量}+0.198 \times TLR2_{表达量}-1.166 \times CYP3A4_{表达量}。手术组患儿Exo-mRNAs评分(6.13 \pm 1.49)分高于非手术组患

儿Exo-mRNAs评分(3.30 \pm 1.69)分,2组差异有统计学意义($t=10.394, P<0.001$)。

2.6 影响坏死性小肠结肠炎患儿手术时机的多因素logistic回归分析

将胎龄、宫内感染(是=1,否=0)、NLR、PLT、BG、CRP、IL-6、I-FABP、PCT、Exo-mRNAs评分作为自变量纳入多因素logistic回归模型中,以NEC患儿入院1周内是否进行手术为因变量(非手术=0,手术=1),结果显示,胎龄、I-FABP和Exo-mRNAs评分是NEC患儿手术干预风险独立影响变量($P<0.05$)(表4)。

2.7 相关变量ROC曲线分析

ROC曲线分析结果显示,PTGS2、IL-1 β 、TLR2、CYP3A4、胎龄、I-FABP及Exo-mRNAs评分预测手术干预风险的(AUC=0.735, 95%CI=0.667~0.795)、(AUC=0.733, 95%CI=0.665~0.793)、(AUC=0.627, 95%CI=0.555~0.695)、(AUC=0.781, 95%CI=0.716~0.837)、(AUC=0.704, 95%CI=0.634~0.767)、(AUC=0.698, 95%CI=0.629~0.761)和(AUC=0.888, 95%CI=0.836~0.929),见表5。

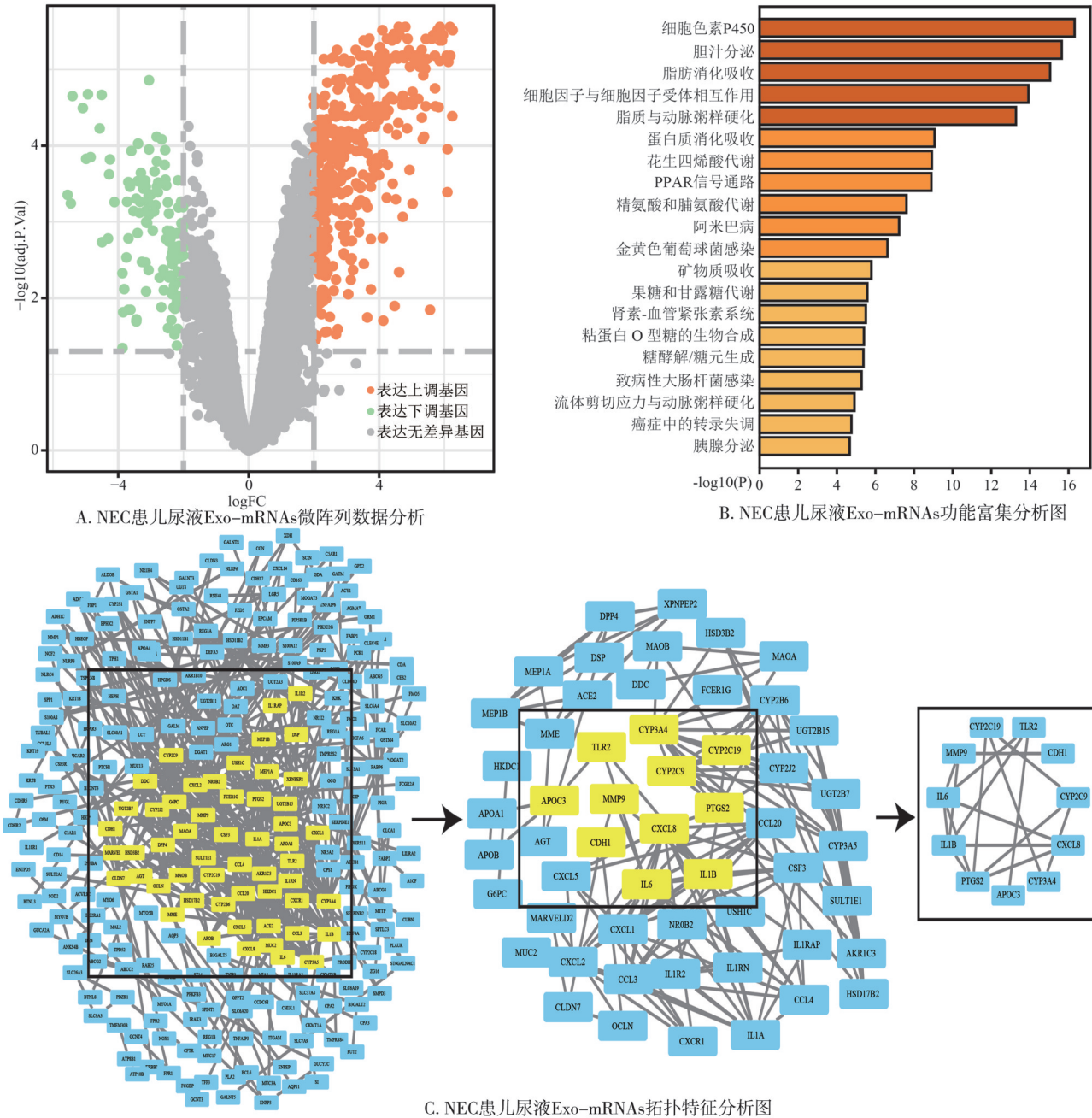


图2 手术组和非手术组患儿尿液 Exo-mRNAs 差异表达、功能富集及拓扑分析

表2 尿液 Exo 中 11 个核心基因表达特征验证 ($\bar{x} \pm s$)

基因	手术组 (n=48)	非手术组 (n=148)	t/χ^2 值	P 值
<i>PTGS2</i>	6.36 ± 1.76	4.89 ± 1.42	5.273	<0.001
<i>IL-1β</i>	7.81 ± 1.12	6.61 ± 1.83	5.396	<0.001
<i>IL-6</i>	9.53 ± 2.36	9.43 ± 3.41	0.243	0.809
<i>MMP9</i>	10.71 ± 2.55	9.26 ± 3.12	2.930	0.004
<i>CYP3A4</i>	3.65 ± 0.62	4.48 ± 0.99	6.889	<0.001
<i>TLR2</i>	13.05 ± 3.04	11.44 ± 3.91	2.954	0.004
<i>CDH1</i>	5.22 ± 0.57	5.73 ± 1.65	3.166	0.002
<i>CYP2C9</i>	5.47 ± 1.38	5.99 ± 1.03	2.417	0.018
<i>CYP2C19</i>	3.79 ± 1.48	3.97 ± 1.54	0.770	0.442
<i>CXCL8</i>	6.65 ± 1.32	7.09 ± 2.42	1.588	0.114
<i>APOC3</i>	3.82 ± 0.83	4.12 ± 1.40	1.834	0.069

表 3 多因素 logistic 回归分析结果

变量	β	SE	Wald χ^2	OR(95%CI)	P
PTGS2	0.705	0.156	20.516	2.024(1.492~2.745)	<0.001
IL-1 β	0.426	0.150	8.032	1.531(1.141~2.056)	0.005
MMP9	0.152	0.079	3.710	1.164(0.997~1.359)	0.054
CYP3A4	-1.166	0.264	19.540	0.312(0.186~0.522)	<0.001
TLR2	0.198	0.07	7.984	1.219(1.063~1.399)	0.005
CDH1	-0.144	0.187	0.592	0.866(0.600~1.249)	0.442
CYP2C9	-0.311	0.201	2.392	0.733(0.494~1.087)	0.122

表 4 手术干预风险的多因素 logistic 回归分析结果

变量	β	SE	Wald χ^2	OR(95%CI)	P
胎龄	-0.392	0.125	9.787	0.676(0.528~0.864)	0.002
宫内感染	1.059	0.583	3.304	2.884(0.920~9.037)	0.069
NLR	0.504	0.293	2.956	1.656(0.932~2.942)	0.086
PLT	-0.011	0.007	2.121	0.989(0.975~1.004)	0.145
BG	0.492	0.288	2.906	1.635(0.929~2.878)	0.088
CRP	0.148	0.088	2.869	1.160(0.977~1.377)	0.090
IL-6	0.031	0.021	2.113	1.032(0.989~1.076)	0.146
I-FABP	0.298	0.102	8.592	1.348(1.104~1.646)	0.003
PCT	0.173	0.134	1.665	1.189(0.914~1.548)	0.197
Exo-mRNAs 评分	1.092	0.211	26.772	2.981(1.971~4.508)	<0.001

表 5 相关变量 ROC 曲线分析

变量	AUC	最佳截断值	Youden 指数	灵敏度(%)	特异度(%)	95%CI	P
PTGS2	0.735	>6.91	0.460	50.00	95.95	0.667~0.795	<0.001
IL-1 β	0.733	>6.97	0.461	79.17	66.89	0.665~0.793	<0.001
TLR2	0.627	>11.69	0.270	75.00	52.03	0.555~0.695	0.003
CYP3A4	0.781	\leq 4.4	0.497	89.58	60.14	0.716~0.837	<0.001
胎龄	0.704	\leq 34.0	0.416	87.50	54.05	0.634~0.767	<0.001
I-FABP	0.698	>8.3	0.474	52.08	95.27	0.629~0.761	<0.001
Exo-mRNAs 评分	0.888	>5.457 8	0.607	70.83	89.86	0.836~0.929	<0.001

3 讨论

NEC是由多种致病因素引起的急性坏死性肠道疾病,可伴随肠狭窄、短肠综合征和生长发育异常等后遗症,严重影响患儿生活和健康^[11]。早期诊断和手术治疗是降低 NEC 患儿死亡率和改善预后最有效手段,但手术干预时机很难确定。目前,肠穿孔是 NEC 常用手术指征。然而,只有少数患儿有典型肠坏死表现,且当患儿出现典型表现时,提示病情已经恶化,手术为时已晚^[12]。因此,寻找简单有效指导新生儿 NEC 手术干预决策的新型生物标志物,对改善患儿预后至关重要。

尿液 Exo 中的 mRNAs 是一种稳定存在于人体尿液中的新型生物标志物,已被广泛用于预测多种临床疾病^[10]。本研究通过对手术组和非手术组患儿尿液 Exo 中 mRNAs 微阵列数据分析发现有 565 个差异表达基因。功能富集分析显示这些基因的功能主要富集在细胞色素 P450、胆汁分泌和脂肪消化吸收等信号通路中,部分信号通路也被证实参与 NEC

进展^[13]。为进一步探索核心基因,对 565 个基因进行 2 次拓扑特征分析后发现 11 个核心基因。随后,通过 ELLSA 检测证实手术组患儿尿液 Exo 中 PTGS2、IL-1 β 、MMP9 和 TLR2 表达量增加,CYP3A4、CDH1 和 CYP2C9 表达量降低。PTGS2 又称环氧化酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2), NEC 可引起肠细胞对促炎分子 COX-2 的 p38 依赖性释放增强全身炎症反应,加重 NEC 严重程度^[14],此外,TLR2 也可介导不成熟的先天性免疫反应加重 NEC 病情^[15]。IL-1 β 可促进新生儿 NEC 的急性肠损伤,加重 NEC 病情^[16]。这些研究结果表明 PTGS2、IL-1 β 和 TLR2 通过不同生理病理学机制加重 NEC 病情,增加手术干预风险。而 MMP9 和 CYP3A4 在 NEC 中的具体机制尚未报道,本研究结合功能富集分析,认为 MMP9 和 CYP3A4 可能通过介导胆汁分泌和脂肪消化吸收等信号通路参与 NEC 发病机制^[17-18]。尿液 Exo 在形成过程中有选择性地富集了来源细胞的蛋白质、miRNA 等信息分子,所以通过对尿液 Exo 所携带的生物学信息可以了解到结肠细胞的生理病理改变,

进而有望寻找到新型生物标志物对 NEC 患儿手术时机进行早期预测。IL-1 β 作为白细胞介素家族中重要的一员,在异常状态下可以被大量激活,由无活性的前体在转化酶的催化下剪切后成为有活性的成熟的 IL-1 β ,在被巨噬细胞分泌后不仅在局部组织发挥作用,更能通过内分泌的方式与远处的靶细胞表面受体相结合,引起全身的炎症反应。本研究结果显示,手术组尿液 Exo 中核心基因 IL-1 β 表达水平明显高于非手术组,且尿液 Exo 中核心基因 IL-1 β 是 NEC 患儿手术干预风险独立影响变量,这对 NEC 患儿手术时机的早期诊断具有一定的指导意义。

为提高预测手术干预风险准确性,减少单一标志物可能带来的误判风险,本研究构建包含 PTGS2、IL-1 β 、CYP3A4 和 TLR2 的 Exo-mRNAs 评分。多因素 logistic 回归分析结果证实 Exo-mRNAs 评分独立于胎龄和 I-FABP 与患儿手术干预风险相关,既往研究发现,胎龄越小新生儿在 NEC 发病前接受更多输血,手术干预风险更高^[19];I-FABP 是分布于肠黏膜中的蛋白质,可作为判断 NEC 小肠损伤严重程度和预测手术干预风险的有效指标^[1]。本研究通过 ROC 曲线分析比较诊断指标预测手术干预风险的性能,其结果显示 Exo-mRNAs 评分预测手术干预风险的 AUC 为 0.888(0.836~0.929),显著高于单独 Exo-mRNA、胎龄和 I-FABP 预测手术干预风险的 AUC 值。表明尿液 Exo-mRNAs 评分具有极高的准确预测手术干预风险性能,为预测患儿手术干预时机提供新思路。

本研究存在一定局限性。首先,患儿测序数据样本较小,可能无法充分反映患儿尿液 Exo-mRNAs 表达特征;其次,PTGS2、IL-1 β 、CYP3A4 和 TLR2 影响 NEC 严重程度机制需体外实验验证;最后,未阐明 PTGS2、IL-1 β 、CYP3A4 和 TLR2 与信号通路间相互作用的具体机制。

综上所述,尿液 Exo-mRNAs 评分可指导 NEC 患儿手术时机,为患儿积极早期干预和治疗提供理论依据。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突

作者贡献声明 吴岳:设计研究方案,实施研究过程,论文撰写;陶俊峰:提出研究思路,论文审核;刘钟、曾佳瑜:分析试验数据;资料搜集整理;邓志刚、曾强:进行统计学分析,论文修改

参 考 文 献

- [1] Wang Q, Jin K, Su X, et al. Predictive value of serum markers in the operation evaluation of neonatal necrotizing enterocolitis[J]. *Transl Pediatr*, 20, 12(5): 897-906.
- [2] Corebima BIRV, Rohsiswatmo R, Santosaningsih D, et al. Novel scoring system for early diagnosis of necrotizing enterocolitis: integrat-

ing clinical and laboratory data with urinary caveolin-1 levels[J]. *Arch Med Sci*, 2023, 20(2): 444-456.

- [3] Jones IH, Hall NJ. Contemporary outcomes for infants with necrotizing enterocolitis—a systematic review[J]. *J Pediatr*, 2020, 220: 86-92.
- [4] Bethell GS, Hall NJ. Recent advances in our understanding of NEC diagnosis, prognosis and surgical approach[J]. *Front Pediatr*, 2023, 11: 1229850.
- [5] Yu DY, Yang HR, Zhong C, et al. Pneumonia, lymphocytes and C-reactive protein are valuable tests for predicting surgical intervention in necrotizing enterocolitis[J]. *Front Pediatr*, 2023, 11: 1231627.
- [6] Tepas JJ 3rd, Leaphart CL, Plumley D, et al. Trajectory of metabolic derangement in infants with necrotizing enterocolitis should drive timing and technique of surgical intervention[J]. *J Am Coll Surg*, 2010, 210(5): 847-854.
- [7] Kalluri R, LeBleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes[J]. *Science*, 2020, 367(6478): eaau6977.
- [8] Chen WJ, Wang XY, Yan XY, et al. The emerging role of exosomes in the pathogenesis, prognosis and treatment of necrotizing enterocolitis[J]. *Am J Transl Res*, 2020, 12(11): 7020-7033.
- [9] Sylvester KG, Ling XB, Liu GY, et al. Urine protein biomarkers for the diagnosis and prognosis of necrotizing enterocolitis in infants[J]. *J Pediatr*, 2014, 164(3): 607-612.
- [10] El Fekih R, Hurley J, Tadigotla V, et al. Discovery and validation of a urinary exosome mRNA signature for the diagnosis of human kidney transplant rejection[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2021, 32(4): 994-1004.
- [11] Neu J. Necrotizing enterocolitis: the future[J]. *Neonatology*, 2020, 117(2): 240-244.
- [12] 中国医师协会新生儿科医师分会循证专业委员会. 新生儿坏死性小肠结肠炎临床诊疗指南(2020)[J]. *中国当代儿科杂志*, 2021, 23(1): 1-11.
- [13] Liu X, Zhang X, Li L, et al. Bioinformatics analysis of potential key genes and pathways in neonatal necrotizing enterocolitis[J]. *BMC Pediatr*, 2022, 22(1): 658.
- [14] Hackam DJ, Upperman JS, Grishin A, et al. Disordered enterocyte signaling and intestinal barrier dysfunction in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis[J]. *Semin Pediatr Surg*, 2005, 14(1): 49-57.
- [15] Nanthakumar N, Meng D, Goldstein AM, et al. The mechanism of excessive intestinal inflammation in necrotizing enterocolitis: an immature innate immune response[J]. *PLoS One*, 2011, 6(3): e17776.
- [16] Kaminsky LW, Al-Sadi R, Ma TY. IL-1 β and the intestinal epithelial tight junction barrier[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 767456.
- [17] Chen JZ, Zhao KN, Chen C. The role of CYP3A4 in the biotransformation of bile acids and therapeutic implication for cholestasis[J]. *Ann Transl Med*, 2014, 2(1): 7.
- [18] Yin H, Chu A, Liu S, et al. Identification of DEGs and transcription factors involved in *H. pylori*-associated inflammation and their relevance with gastric cancer[J]. *PeerJ*, 2020, 8: e9223.
- [19] Garg PM, Paschal JL, Ware J, et al. Gestational age-specific hematological patterns in preterm infants following necrotizing enterocolitis[J]. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2022, 35(25): 10093-10102.

(收稿:2024-10-22;修回:2025-03-03;录用:2025-03-05)

(责任编辑:李青颖)

本文引用格式:

吴岳,陶俊峰,刘钟,等.尿液外泌体mRNAs评分指导坏死性小肠结肠炎患儿手术时机相关研究[J]. *重庆医科大学学报*, 2026, 51(3): 431-438.