

脑脊液 Tim-3, Let-7b 水平联合预测脑出血开颅术后细菌性脑膜炎的价值

赵跃俊 王真珍

【摘要】 目的 探究脑脊液 T 细胞免疫球蛋白黏蛋白分子-3(T cell immunoglobulin mucin molecule-3, Tim-3)、微小核糖核酸 Let-7b(microRNA Let-7b, Let-7b)联合预测脑出血开颅术后细菌性脑膜炎(Bacterial meningitis, BM)的价值。**方法** 选取 2021 年 6 月-2023 年 6 月本院收治的脑出血开颅术后发生 BM 的 65 例患者和未发生 BM 的 65 例患者,分别纳入 BM 发生组和 BM 未发生组;采用酶联免疫吸附实验(Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)法检测脑脊液 Tim-3 水平,采用实时荧光定量聚合酶链反应(Quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)检测 Let-7b 水平;采用多因素 Logistic 回归分析脑出血开颅术后发生 BM 的影响因素;受试者工作特征曲线(Receiver operating characteristic curve, ROC)分析脑脊液 Tim-3, Let-7b 预测脑出血开颅术后 BM 的价值。**结果** BM 发生组脑脊液 Tim-3, Let-7b 水平均高于 BM 未发生组($P < 0.05$);2 组年龄、脑室外引流占比、格拉斯哥昏迷量表(Glasgow coma scale, GCS)评分、手术时间比较差异显著($P < 0.05$);多因素 Logistic 回归分析显示,脑室外引流、GCS 评分 <12 分、脑脊液 Tim-3, Let-7b 水平升高是影响脑出血开颅术后发生 BM 的危险因素($P < 0.05$);脑脊液 Tim-3, Let-7b 水平联合预测脑出血开颅术后是否发生 BM 的曲线下面积(Area under the curve, AUC)显著大于 Tim-3, Let-7b 水平单独预测的 AUC($P < 0.05$)。**结论** 在脑出血开颅术后 BM 患者脑脊液中 Tim-3, Let-7b 水平升高,对脑出血开颅术后 BM 有一定的预测价值,且二者联合预测价值更高。

【关键词】 脑出血 开颅术 细菌性脑膜炎 T 细胞免疫球蛋白黏蛋白分子-3 微小核糖核酸 Let-7b

【中图分类号】 R743.34 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1007-0478(2024)04-0396-04

【DOI】 10.3969/j.issn.1007-0478.2024.04.014

脑出血是一种破坏性的脑卒中形式,发病 30 d 内的病死率高达 50%,由于脑出血体积与病死率和不良功能预后密切相关,长期以来一直提倡对脑出血进行手术清除^[1]。开颅术是对出血量较大的脑出血患者手术治疗方法,特点是在颅腔内进行,颅内感染是术后的严重并发症,也是影响脑出血患者预后的重要因素^[2]。其中,神经外科手术后的细菌性脑膜炎(Bacterial meningitis, BM)是临床最常见的颅内感染之一,由于手术时间、消毒、人工材料置入等原因造成细菌进入颅内,进而发展成 BM。BM 的发生增加医院护理的总体成本,延迟治疗后神经系统恢复,甚至导致残疾^[3]。因此,早期诊断 BM 对脑出血患者预后极为重要。T 细胞免疫球蛋白黏蛋白分子-3(T cell immunoglobulin mucin molecule-3, Tim-3)水平上调与病原体免疫逃逸有关,是先天免疫细胞的免疫检查点调节剂,而先天免疫细胞在抵

御感染的第一道免疫防线和触发适应性免疫中都起着关键作用^[4]。微小核糖核酸 Let-7b(MicroRNA Let-7b, Let-7b)属于人 let-7 家族,与细胞周期调控、发育和病毒复制有关^[5]。虽然近年来 Tim-3, Let-7 被广泛研究,但多数研究着眼于二者在癌症中的作用机制,关于 Tim-3, Let-7b 在 BM 方面的研究相对较少。因此,本研究拟探讨 Tim-3, Let-7b 水平联合预测脑出血患者开颅术后 BM 的价值,以期为早期筛查 BM 提供临床参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2021 年 6 月-2023 年 6 月本院收治的脑出血开颅术后发生 BM 的 65 例患者和未发生 BM 的 65 例患者,分别纳入 BM 发生组和 BM 未发生组。纳入标准:(1)术后预计生存时间 >1 周;(2)手术至术后 BM 感染时间 <3 周;(3)BM 的诊断符合《中国神经外科重症患者感染诊治专家共识(2017 版)》^[6];(4)成年患者;(5)临床资料完整且签署知情同意书。排除标准:(1)术前已有颅内感染;(2)病毒

性或真菌性脑膜炎；(3)合并颅内恶性肿瘤；(4)合并自身免疫性疾病；(5)非初次开颅手术；(6)凝血功能障碍；(7)有精神疾病；(8)深静脉血栓；(9)有脓毒血症；(10)妊娠期或哺乳期妇女。本研究获得医学伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 观察指标的收集 收集 2 组患者年龄、性别、身体质量指数 (Body mass index, BMI)、吸烟史、饮酒史、糖尿病史、出血部位、脑室外引流情况、美国麻醉师协会 (American society of anesthesiologists, ASA) 分级、格拉斯哥昏迷量表 (Glasgow coma scale, GCS) 评分、手术时间等资料。

1.2.2 Tim-3 水平检测 2 组患者均于术后第 3 d 在无菌条件下行后腰椎穿刺术,采集患者脑脊液样本 3 mL,储存于 -20℃;采用酶联免疫吸附实验 (Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 检测 Tim-3 表达水平,试剂盒 (货号为 E-HAVCR2-H-1) 购自广州伟伯科技有限公司。

1.2.3 Let-7b 水平检测 采用实时荧光定量聚合酶链反应 (Quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 检测脑脊液中 Let-7b 的相对表达水平;使用 miRNeasy Serum 试剂盒 (货号为 217184, 上海博竞生物科技有限公司) 提取脑脊液中总 RNA,反转录后使用 CG-05 荧光定量 PCR 仪 (力康生物医疗科技控股有限公司) 检测 Let-7b 表达水平,反应条件:95℃ 预变性 10 min,95℃ 变性 10 min,60℃ 退火 10 s,72℃ 延伸 30 s,40 个循环;以核小 RNA-U6 (Small nuclear RNA-U6, U6) 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算 Let-7b 相对表达水平。引物序列见表 1。

表 1 引物序列		
引物	Let-7b	U6
上游引物	5'-TGAGGTAGTAG GTTGTGTGGTT-3'	5'-AGAGAAGATTAG CATGGCCCT-3'
下游引物	5'-GATCCAGTATC AGGGTCCGAG-3'	5'-AGTGCAGGGTCCG AGGTATT-3'

1.2.4 统计学处理 采用 SPSS25.0 软件;脑脊液 Tim-3、Let-7b 水平等计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,2 组比较采用独立样本 t 检验;计数资料以例数、频数 (n) 或百分率 (%) 表示,2 组比较行 χ^2 检验;采用多因素 Logistic 回归分析脑出血开颅术后发生 BM 的影响因素;ROC 分析脑脊液 Tim-3、Let-7b 水平预测脑出血开颅术后 BM 的价值;Tim-

3、Let-7 水平联合预测与两者单独预测的 AUC 比较采用 Z 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2 组患者脑脊液 Tim-3、Let-7b 水平比较

BM 发生组脑脊液 Tim-3、Let-7b 水平均高于 BM 未发生组 ($P < 0.05$) (表 2)。

表 2 2 组患者脑脊液 Tim-3、Let-7b 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)			
组别	例数	Tim-3 (ng/mL)	Let-7b
BM 发生组	65	8.29 ± 2.06	1.63 ± 0.86
BM 未发生组	65	2.35 ± 0.64 *	1.01 ± 0.23 *

注:与 BM 发生组比较, * $P < 0.05$

2.2 影响脑出血开颅术后发生 BM 的单因素分析

2 组患者性别、BMI、吸烟史、饮酒史、糖尿病史、出血部位、ASA 分级比较差异不显著 ($P > 0.05$);2 组年龄、脑外室引流占比、GCS 评分、手术时间比较差异显著 ($P < 0.05$) (表 3)。

表 3 2 组患者一般资料比较 ($\bar{x} \pm s$)				
资料	BM 发生组 ($n = 65$)	BM 未发生组 ($n = 65$)	t/χ^2	P
性别 [$n(\%)$]				
男	39(52.70)	35(47.30)	0.502	0.479
女	26(46.43)	30(53.57)		
年龄 ($\bar{x} \pm s$, 岁)	58.63 ± 2.68	55.47 ± 2.84	6.524	0.000
BMI ($\bar{x} \pm s$, kg/m ²)	23.18 ± 2.34	23.54 ± 2.36	0.873	0.384
有吸烟史 [$n(\%)$]	27(52.94)	24(47.06)	0.290	0.590
有饮酒史 [$n(\%)$]	20(52.63)	18(47.37)	0.149	0.700
有糖尿病史 [$n(\%)$]	22(55.00)	18(45.00)	0.578	0.447
出血部位 (基底节) [$n(\%)$]	31(47.69)	34(52.31)	0.277	0.599
脑室外引流 [$n(\%)$]	13(72.22)	5(27.78)	4.127	0.042
ASA 分级 [$n(\%)$]				
<2 级	57(51.82)	53(48.18)	0.945	0.331
≥2 级	8(40.00)	12(60.00)		
GCS 评分 [$n(\%)$]				
≥12 分	51(45.95)	60(54.05)	4.993	0.025
<12 分	14(73.68)	5(26.32)		
手术时间 [$n(\%)$]				
<3 h	36(43.37)	47(56.63)	4.032	0.045
≥3 h	29(61.70)	18(38.30)		

2.3 多因素 Logistic 回归分析脑出血开颅术后发生 BM 的影响因素

以脑出血开颅术后是否发生 BM 作为因变量 (是 = 1, 否 = 0), 以年龄 (实测值)、脑室外引流 (是 = 1, 否 = 0)、GCS 评分 (<12 分 = 1, ≥12 分 = 0)、手术时间 (≥3 h = 1, <3 h = 0)、Tim-3 水平 (实测值)、Let-7b 水平 (实测值) 作为自变量进行多因素

Logistic 回归分析显示,脑室外引流、GCS 评分<12 分、脑脊液 Tim-3、Let-7b 水平升高是影响脑出血开颅术后发生 BM 的危险因素($P<0.05$)(表 4)。

表 4 多因素 Logistic 回归分析脑出血开颅术后发生 BM 的影响因素

自变量	B	SE	wald χ^2	P	OR	95%CI
年龄	0.379	0.350	1.178	0.278	1.462	0.736~2.903
脑室外引流	1.725	0.536	10.361	0.001	5.614	1.963~16.052
GCS 评分	1.578	0.439	12.827	0.000	4.847	2.050~11.459
手术时间	0.500	0.329	2.306	0.129	1.648	0.865~3.141
Tim-3	1.621	0.458	12.520	0.000	5.056	2.060~12.407
Let-7b	1.714	0.517	10.986	0.001	5.549	2.014~15.286

2.4 脑脊液 Tim-3、Let-7b 水平预测脑出血开颅术后 BM 的价值

以脑脊液 Tim-3、Let-7b 水平做检验变量,以脑出血开颅术后是否发生 BM 作为因变量(是 = 1,否 = 0)绘制 ROC 显示,脑脊液 Tim-3、Let-7b 水平联合预测脑出血开颅术后是否发生 BM 的 AUC 为 0.865(95% CI = 0.794 ~ 0.918),其敏感性为 92.31%,特异性为 80.00%,约登指数为 0.723,两者水平联合预测的 AUC 显著大于 Tim-3 单独预测的 AUC($Z = 2.205, P = 0.028$)及 Let-7b 单独预测的 AUC($Z = 2.195, P = 0.028$)(表 5、图 1)。

表 5 脑脊液 Tim-3、Let-7b 水平预测脑出血开颅术后 BM 的价值

指标	最佳截断值	AUC	95%CI	P	敏感性	特异性	约登指数
Tim-3	4.36 ng/ml	0.731	0.646~0.805	0.000	73.85%	83.08%	0.569
Let-7b	1.30	0.749	0.665~0.821	0.000	75.38%	84.62%	0.600
两者联合	-	0.865	0.794~0.918	0.000	92.31%	80.00%	0.723

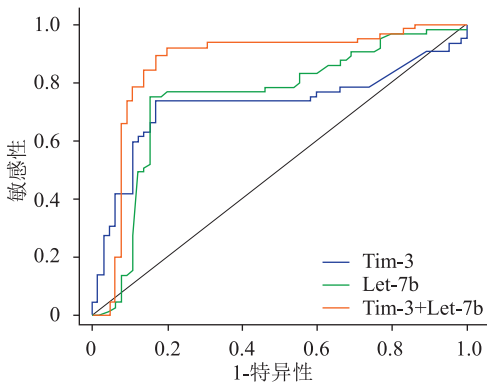


图 1 脑脊液 Tim-3、Let-7b 水平预测脑出血开颅术后 BM 的价值

3 讨论

尽管神经外科开颅技术不断提高,无菌技术要

求不断改进,但 BM 仍时有发生。为了降低发病率和病死率,快速诊断并及时开始适当的抗菌药物治疗和辅助地塞米松治疗至关重要。然而,由于临床症状和脑脊液参数不具有特异性,加上传统方法(细菌培养和革兰氏染色)的检出率非常低,并且需要数天才能得到结果,因此对早期快速准确诊断的帮助较小^[7]。因此,早期预测术后 BM 的发生对于克服临床早期识别颅内感染的困难和改善手术预后尤为重要。

中枢神经系统被认为是外周免疫系统的免疫特权区域之一,因为存在多种屏障如血脑屏障和神经实质周围的脑膜^[8]。在中枢神经系统感染中有维持中枢神经系统稳态的先天性和适应性免疫系统参与。许多免疫细胞如局限性巨噬细胞、外周募集的白细胞和 CD4/CD8 T 细胞都可以参与神经炎症反应、病原体清除和损伤修复^[9]。Tim-3 是一种免疫球蛋白和粘蛋白结构域家族细胞表面分子,最初在 CD4 Th1 细胞和 CD8 毒性 T 细胞上鉴定出。Tim-3 是半乳糖凝集素-9 (Galectin-9, Gal-9) 的受体, Gal-9 在病毒感染期间在功能失调的 T 细胞上表达。据报道,感染各种病毒、细菌和寄生虫的人群中循环 Gal-9 水平升高^[10]。有研究发现,病毒慢性感染状态的患者体内 Gal-9/Tim-3 信号通路分子表达水平与病毒载量呈正相关^[11]。Tim-3 不仅是病毒感染中 T 细胞耗竭的关键组分,在细菌感染中也至关重要。关于 Tim-3 在实验性自身免疫性脑脊髓炎模型小鼠中的作用初步研究表明, Tim-3 对 Th1 反应和巨噬细胞活化、功能具有抑制作用^[12];在慢性鼠伤寒沙门氏菌感染模型中铁通过刺激 Tim-3 表达水平上调来抑制幼稚 CD4 T 细胞分化为分泌保护性 γ 干扰素 (Interferon-gamma, IFN- γ) 的 Th1 淋巴细胞^[13]。此外,李志新等^[14]研究发现,细菌性颅内感染患者 Tim-3 水平高于结核性和病毒性感染患者, Tim-3 可作为判断颅内感染类型的标志物。Let-7 是第 1 个在人类基因组中发现的 miRNA,在先天性和适应性免疫细胞感染期间直接靶向宿主因子的各种转录(请核实)体^[15]。先天免疫系统是区分微生物和宿主的第一道防线, Toll 样受体在病原体检测和炎症反应的启动中起着关键作用,炎症反应在细菌感染期间引发特异性适应性免疫反应。Let-7b 作为 Let-7 家族一员,在神经细胞、单核细胞等细胞中存在,参与细胞增殖分化、肿瘤增殖及机体炎症反应等过程^[16]。路雁惠等^[17]研究发现,脑脊液

外泌体中 Let-7b 的表达水平可作为结核性脑膜炎的临床诊断标志物;马战友等^[18]研究指出在中枢神经系统感染患者中病毒性脑膜炎患者脑脊液 Let-7b 水平高于结核性脑膜炎患者。然而,目前尚无关于 Tim-3 和 Let-7b 在脑出血术后 BM 中的研究。本研究结果显示,BM 发生组脑脊液 Tim-3,Let-7b 水平高于 BM 未发生组,提示脑出血开颅术后 BM 的发生可能与 Tim-3,Let-7b 水平升高有关。多因素 Logistic 回归分析显示,Tim-3,Let-7b 水平是影响脑出血开颅术后 BM 的因素,进一步验证 Tim-3,Let-7b 参与了术后 BM 的发生。究其原因可能是 BM 患者脑组织中的炎症反应破坏血脑屏障的通透性,细菌经血液播散进入脑膜和脑实质,加上中枢神经免疫功能受到抑制,抗感染能力下降,加剧感染风险,导致 Tim-3,Let-7b 水平上升。

ROC 显示, Tim-3, Let-7b 水平联合预测脑出血患者开颅术后 BM 的 AUC 显著高于二者单独预测的 AUC,提示 Tim-3,Let-7b 水平联合对脑出血开颅术后 BM 的预测价值更高,值得在临床推广。此外,本研究还发现 2 组年龄、脑室外引流占比、GCS 评分、手术时间比较差异显著,且多因素 Logistic 回归分析表明脑室外引流、GCS 评分<12 分是影响脑出血患者开颅术后发生 BM 的危险因素,提示临床预测 BM 时可考虑将年龄、脑室外引流、GCS 评分、手术时间等纳入检测指标,以提高判断的准确性。分析其原因可能是 GCS 评分<12 分患者处于深昏迷状态,机体正常功能受损,免疫力低下,易发生感染^[19];脑室外引流导管置留时间较长等原因增加了颅内感染的风险,导致术后 BM 的发生^[20];年龄较大患者免疫力低下、手术时间较长均增加了病原体感染的风险。

综上所述,在脑出血开颅术后 BM 患者脑脊液中 Tim-3,Let-7b 水平升高,对脑出血开颅术后 BM 有一定的预测价值,且二者水平联合预测价值更高。但本研究为单中心样本研究,研究例数较少,可能存在误差,后续需扩大研究范围、增大样本量来进一步验证研究结果。

参 考 文 献

[1] Magid-Bernstein J, Girard R, Polster S, et al. Cerebral hemorrhage: pathophysiology, treatment, and future directions[J]. *Circ Res*, 2022, 130(8): 1204-1229.

[2] Wang LY, Cao XH, Shi LK, et al. Risk factors for intracranial infection after craniotomy: a case-control study[J]. *Brain Be-*

hav, 2020, 10(7): e01658.

[3] Bao MY, Xie HT, Gao P, et al. Current diagnosis and potential obstacles for post-neurosurgical bacterial meningitis[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2022, 26(17): 6351-6360.

[4] Wang Z, Li G, Dou S, et al. Tim-3 promotes listeria monocytogenes immune evasion by suppressing major histocompatibility complex class I[J]. *J Infect Dis*, 2020, 221(5): 830-840.

[5] Yeh YJ, Tseng CP, Hsu SD, et al. Dual effects of Let-7b in the early stage of hepatitis C virus infection[J]. *J Virol*, 2021, 95(4): e01800-e01820.

[6] 中华医学会神经外科学分会, 中国神经外科重症管理协作组. 中国神经外科重症患者感染诊治专家共识(2017)[J]. *中华医学杂志*, 2017, 97(21): 1607-1614.

[7] 刘元君, 许伟, 杨芳. 脑脊液降钙素原、IGF-2 及 CD64 联合预测脑出血开颅术后细菌性脑膜炎的价值[J]. *临床和实验医学杂志*, 2023, 22(8): 835-839.

[8] Morimoto K, Nakajima K. Role of the immune system in the development of the central nervous system[J]. *Front Neurosci*, 2019, 13(1): 916-926.

[9] Zhao L, Li PP, Xu ZA, et al. Diagnosis of post-neurosurgical bacterial meningitis in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage based on the immunity-related proteomics signature of the cerebrospinal fluid[J]. *Front Neurol*, 2023, 14: 1166598.

[10] Iwasaki-Hozumi H, Chagan-Yasutan HRE, Ashino Y, et al. Blood levels of galectin-9, an Immuno-Regulating molecule, reflect the severity for the acute and chronic infectious diseases[J]. *Biomolecules*, 2021, 11(3): 430.

[11] 张林林, 冯涛, 赵耀, 等. HSV-2 感染与急性缺血性脑卒中患者 Galectin 9/Tim-3 信号通路及预后的关系[J]. *中华医院感染学杂志*, 2023, 33(14): 2116-2120.

[12] Banerjee H, Kane LP. Immune regulation by Tim-3 [J]. *F1000Res*, 2018, 7: 316.

[13] Pfeifhofer-Obermair C, Tymoszek P, Nairz M, et al. Regulation of Th1 T cell differentiation by Iron via upregulation of T cell immunoglobulin and mucin containing protein-3 (TIM-3)[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 637809.

[14] 李志新, 扈园园, 刘春红, 等. 神经介入治疗后颅内感染患者脑脊液 PCT、IFN- γ 、Tim-3 及 sICAM-1 表达及意义[J]. *中华医院感染学杂志*, 2022, 32(21): 3278-3281.

[15] Jiang S. Recent findings regarding Let-7 in immunity[J]. *Cancer Lett*, 2018, 434: 130-131.

[16] Zajdel M, Rymkiewicz G, Sromek M, et al. Tumor and cerebrospinal fluid microRNAs in primary central nervous system lymphomas[J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(11): 1647.

[17] 路雁惠, 郭斌, 张锐毅, 等. 结核性脑膜炎患者脑脊液外泌体中 Let-7b 的表达水平及临床意义[J]. *中风与神经疾病杂志*, 2018, 35(12): 1107-1110.

[18] 马战友, 高丽丽, 张俊廷, 等. 中枢神经系统感染脑脊液 Caveolin-1、Let-7b、MMP-9 及 IL-1 β 表达水平及意义[J]. *中华医院感染学杂志*, 2022, 32(18): 2781-2784.

[19] 谢激, 王东. 脑室出血外引流术后颅内感染的危险因素分析[J]. *东南国防医药*, 2023, 25(2): 151-155.

[20] 陈冲. 脑室外引流术后继发颅内感染相关危险因素分析[D]. 昆明: 昆明医科大学, 2022.