

miRNA-15a及miRNA-182在脓毒症中的表达与疾病严重程度和预后的关系

施孝海 黄志平 刘卫怀 陆志峰 高捷 张俊峰

[摘要] 目的 探索血microRNA-15a(miR-15a)及microRNA-182(miR-182)表达情况与脓毒症的严重程度和预后的关系。方法 选择55例脓毒症患者,通过实时荧光定量聚合酶链反应(RT-qPCR)检测miR-15a和miR-182的表达,并记录其他临床数据、炎症指标和28 d预后。分析比较脓毒症组与脓毒症性休克组、28 d内生存组与死亡组在血miR-15a与miR-182、临床数据、炎症指标间的差异,以及比较28 d内生存组与死亡组同血循环miR-15a与miR-182动态变化之间的关系。结果 55例患者诊断为脓毒症28例、脓毒症性休克27例。在0 h时,脓毒症组降钙素原(PCT)水平和序贯器官衰竭评估(SOFA)评分明显低于脓毒症性休克组($t=-2.78, Z=642.00, P<0.05$);miR-182相对表达量明显低于脓毒症性休克组($t=-5.81, P<0.05$)。55例患者28 d内生存45例,死亡10例。在0 h时,生存组患者的C-反应蛋白(CRP)、PCT水平和SOFA评分均低于死亡组(t 分别=-2.97、-2.05, $Z=79.00, P<0.05$);miR-182相对表达量明显低于死亡组($t=-3.92, P<0.05$)。在72 h时,生存组患者的CRP、PCT水平和SOFA评分均低于死亡组(t 分别=-4.28、-3.95, $Z=5.50, P<0.05$);miR-182相对表达量明显低于死亡组,miR-15a相对表达量明显高于死亡组(t 分别=-5.31、3.31, $P<0.05$)。脓毒症生存组患者72 h的CRP、PCT、miR-182的下降程度明显大于死亡组(t 分别=-3.12、-3.51、-10.19, $P<0.05$),而miR-15a的回升程度明显大于死亡组($t=11.19, P<0.05$)。结论 miR-15a和miR-182可作为一种潜在的生物标志物,有助于脓毒症患者的疾病严重程度分层和预后判断。

[关键词] microRNA-15a; microRNA-182; 脓毒症; 预后

Expressions of miRNA-15a and miRNA-182 in sepsis and its correlation with disease severity and prognosis SHI Xiaohai, HUANG Zhiping, LIU Weihuai, et al. Department of General Surgery, Beilun People's Hospital, Ningbo 315800, China.

[Abstract] Objective To explore the plasma miRNA-15a and miRNA-182 expressions with in sepsis and its correlation with disease severity and prognosis. **Methods** A total of 55 patients with sepsis were selected. The expressions of circulating miRNA-15a and miRNA-182 were detected by RT-qPCR, and other clinical data, inflammatory biomarkers and 28-day prognosis were recorded. The differences of circulation miRNA-15a and miRNA-182, clinical data and inflammatory biomarkers between sepsis group and septic shock group, survival group and death group were analyzed and compared, and the dynamic changes of circulating miRNA-15a and miRNA-182 between survival group and death group were compared. **Results** Among the 55 patients, 28 were diagnosed as sepsis and 27 were diagnosed as septic shock. At 0h, the levels of procalcitonin (PCT) and sequential organ failure assessment (SOFA) score in septic group were lower than those in septic shock group ($t=-2.78, Z=642.00, P<0.05$), and the relative expression of miR-182 was lower than that in septic shock group ($t=-5.81, P<0.05$). Of the 55 patients, 45 survived and 10 died within 28 days. At 0h, PCT and SOFA in the survival group were lower than those in the death group ($t=-2.97, -2.05, Z=79.00, P<0.05$), and the relative expression of miRNA-182 was lower than that in the death group ($t=-3.92, P<0.05$). At 72 h, the CRP, PCT

and SOFA of the survival group were lower than those of the death group ($t=-4.28, -3.95, Z=5.50, P<0.05$), the relative expression of miR-182 was lower than that of the death group, but the relative expression of miRNA-15a was higher than that of

DOI:10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2022.003.008

基金项目:宁波市医学科技计划项目(2018A42)

作者单位:315800 浙江宁波,宁波市北仑区人民医院普外科

the death group, the differences were statistically significant ($t=-5.31, 3.31, P<0.05$). The CRP, PCT and miRNA-182 in the survival group of sepsis at 72h was lower than that in the death group ($t=-3.12, -3.51, -10.19, P<0.05$), the miRNA-15a in survival group was higher than that in death group ($t=11.19, P<0.05$). **Conclusion** MiRNA-15a and miRNA-182 can be used as potential biomarkers to help to stratify the disease severity and judge the prognosis of patients with sepsis.

[Key words] microRNA-15a; microRNA-182; sepsis; prognosis

脓毒症是由感染引起的全身炎症反应综合征^[1]。脓毒症每年影响全球数百万人,导致其中高达四分之一甚至更高的人死亡^[2]。早期发现并采取适当的治疗可以改善预后。微小RNA(microRNA, miRNA)是一组新的小分子(20~24个核苷酸)。畸变的miRNA表达与感染、炎症和脓毒血症有着密切的相关性^[3]。已有研究显示miR-15a及microRNA-182(miR-182)在脓毒症的诊断与预后预测上具有较高的临床应用价值^[4],有可能成为脓毒症的新兴生物标志物之一,但缺乏其在脓毒症患者中的动态变化特征的相关研究。本次研究旨在探索循环miR-15a及miR-182在脓毒症患者中的表达特点及其与脓毒症的严重程度和预后的关系。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择2019年12月至2021年3月宁波市北仑区人民医院外科重症监护室和普通外科病区收治的脓毒症患者。入组标准为:①脓毒症的诊断标准符合第三版关于脓毒症和脓毒症休克定义的国际共识^[5];②自愿参加本次研究;③年龄18岁以上,80岁以下。排除标准为:预计24~48 h内可能出院的。研究方案经本院伦理委员会批准。所有参与者或其监护人签署知情同意书。共有55例患者被纳入本次研究,其中男性35例、女性20例;年龄36~78岁,平均年龄(61.10±10.00)岁;感染部位:腹腔28例、泌尿系11例、肺部14例、其他部位2例;合并症分布:慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)10例、心肌病史12例、慢性肾病5例、肝硬化2例。

1.2 方法 收集入组患者的一般临床资料,包括年龄、性别、吸烟、COPD史、心脏病史、慢性肾功能衰竭史、肝硬化史,检测血红蛋白(hemoglobin, Hb)、白细胞(white blood cell, WBC)、C-反应蛋白(C-reactive protein, CRP)、降钙素原(procalcitonin, PCT)等水平,并进行序贯器官衰竭评估(sequential organ

failure assessment score, SOFA)等。所有入组患者随访28 d,记录28 d内预后结果。

研究对象分别在入组后0 h、24 h、48 h及72 h用抗凝管采集血样。所有血样采集后立即进行血浆分离处理。离心后,收集血浆并在-80℃下储存直至测定。使用实时荧光定量聚合酶链反应(real time fluorescent quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)测定血浆中miR-15a及miR-182的相对表达。并计算72 h与0 h的CRP、PCT、miR-15a与miR-182的差值。比较脓毒症组与脓毒症性休克组及28 d内生存组与死亡组在CRP、PCT及miR-15a与miR-182等方面的差异,以及与CRP、PCT、miR-15a、miR-182动态变化之间的关系。

1.3 统计学方法 采用SPSS 20.0进行统计分析。正态资料采用均值±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用 t 检验;偏态资料采用中位数(四分位数法)表示,采用惠特尼 U 检验;计数资料采用例(%)表示,采用 χ^2 检验。设 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 55例患者诊断为脓毒症28例、脓毒症性休克27例。两组患者入组时临床指标和miR-15a、miR-182相对表达量比较见表1

由表1可见,两组患者在性别、感染部位、年龄、入组时WBC、CRP等方面比较,差异均无统计学意义($\chi^2=0.01, 2.09, t$ 分别=-1.09、-1.94、-1.12, P 均>0.05);两组在合并症方面(COPD、心脏病史、慢性肾病及肝硬化)比较,差异均无统计学意义(χ^2 分别=0.00、0.00、1.86、2.15, P 均>0.05)。在入组时,脓毒症组患者的Hb高于脓毒症性休克组($t=3.45, P<0.05$),PCT水平和SOFA评分低于脓毒症性休克组,差异均有统计学意义($t=-2.78, Z=642.00, P$ 均<0.05)。脓毒症组miR-182相对表达量明显低于脓毒症性休克组,差异均有统计学意义($t=-5.81, P<0.05$),而两组的miR-15a相对表达量比较,差异无统计学意义($t=-1.21, P>0.05$)。

表1 两组患者入组时临床指标比较

临床参数	脓毒症组 (n=28)	脓毒症性休克组 (n=27)
性别/例	男性	18
	女性	10
感染部位/例	腹部	15
	泌尿系统	5
	肺部	7
	其他部位	1
COPD/例	有	5
	无	23
心肌病史/例	有	6
	无	22
慢性肾病/例	有	4
	无	24
肝硬化/例	有	0
	无	28
年龄/岁	59.68 ± 10.83	62.63 ± 9.10
WBC/10 ⁹ /L	12.09 ± 4.62	15.08 ± 6.62
Hb/g/L	12.05 ± 2.08	10.07 ± 2.20*
CRP/mg/L	116.61 ± 55.82	134.56 ± 62.94
PCT/ng/ml	15.81 ± 12.94	29.43 ± 4.25*
SOFA/分	4.00(3.00, 5.00)	7.00(5.00, 8.00)*
miR-15a相对 表达量	0.24 ± 0.10	0.28 ± 0.12
miR-182相对 表达量	4.37 ± 0.84	6.05 ± 1.28*

注: *: 与脓毒症组比较, $P < 0.05$ 。

2.2 55例患者28 d内死亡10例, 生存45例。两组患者临床特征比较见表2

由表2可见, 两组患者在性别、感染部位、年龄等方面比较, 差异均无统计学意义(χ^2 分别=0.07、2.31, $t=-0.68$, P 均 >0.05)。在合并症方面, 生存组患者合并慢性肾病的例数少于死亡组, 差异有统计学意义($\chi^2=6.47$, $P < 0.05$), 其余合并症, 组间比较, 差异均无统计学意义(χ^2 分别=1.15、0.48、1.41, P 均 >0.05)。

在0 h时, 生存组的CRP、PCT水平和SOFA评分均低于死亡组(t 分别=-2.97、-2.05, $Z=79.00$, P 均 <0.05)。miR-182相对表达量要明显低于死亡组($t=-3.92$, $P < 0.05$), 两组的miR-15a相对表达量比较, 差异无统计学意义($t=-0.93$, $P > 0.05$)。在72 h

时, 生存组患者的CRP、PCT水平和SOFA评分均低于死亡组(t 分别=-4.28、-3.95, $Z=5.50$, P 均 <0.05)。miR-182相对表达量明显低于死亡组, miR-15a相对表达量明显高于死亡组(t 分别=-5.31、3.31, P 均 <0.05)。

表2 两组患者临床特征比较

临床参数	生存组 (n=45)	死亡组 (n=10)
性别/例	男性	29
	女性	16
感染部位/例	腹部	22
	泌尿系统	10
	肺部	12
	其他部位	1
COPD/例	有	7
	无	38
心肌病史/例	有	9
	无	36
慢性肾病/例	有	2*
	无	43
肝硬化/例	有	1
	无	44
年龄/岁	60.72 ± 9.71	63.13 ± 11.92
CRP/mg/L	0 h	114.91 ± 54.24*
	72 h	55.93 ± 34.69*
PCT/ng/ml	0 h	20.07 ± 15.71*
	72 h	7.02 ± 11.40*
SOFA/分	0 h	4.00(3.00, 6.00)*
	72 h	3.00(2.00, 4.50)*
miR-15a相对 表达量	0 h	0.25 ± 0.10
	72 h	0.40 ± 0.18*
miR-182相对 表达量	0 h	4.90 ± 1.12*
	72 h	3.94 ± 1.24*

注: *: 与死亡组比较, $P < 0.05$ 。

2.3 CRP、PCT、miRNA表达动态变化特点与脓毒症患者28 d预后关系见表3

由表3可见, 生存组患者72 h的CRP、PCT、miR-182的下降程度明显大于死亡组, 差异均有统计学意义(t 分别=-3.12、-3.51、-10.19, P 均 <0.05); miR-15a的回升程度明显大于死亡组, 差异有统计学意义($t=11.19$, $P < 0.05$)。

表3 CRP、PCT、miRNA表达的动态变化与患者28 d预后关系

指标	生存组	死亡组
△CRP/%	-51.02 ± 21.15	-12.50 ± 37.81*
△PCT/%	-71.40 ± 20.12	-27.18 ± 38.58*
△miR-15a/%	62.08 ± 33.62	-27.30 ± 17.80*
△miR-182/%	-19.87 ± 14.66	36.20 ± 20.18*

注: *:与生存组比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

脓毒症在重症监护室和腹部外科中是一种较为常见且致命的全身炎症反应综合征,早期诊断和治疗能明显提高患者的预后。然而,目前临床实践中的生物标志物如CRP、PCT和白介素-6对脓毒症的早期诊断和预后还不够敏感或特异性不高^[6]。因此,探索有助于脓毒症的诊断和预后分析的生物标志物具有较高的临床价值。

目前,在脓毒症发生机制中,越来越深刻的遗传机制已经被发现,其中miRNA在脓毒症病因学的调节中发挥着重要作用^[3]。miRNA在脓毒症的免疫反应和炎症调节中发挥着重要作用^[4],被认为是基因表达调节网络中的一个重要组成部分。畸变的miRNA表达被认为是一种过度调节机制,如发育、衰老、细胞死亡等,但是也会抑制一些复杂疾病如感染、炎症和脓毒症^[3]。与传统的蛋白质标记物相比,miRNA相对稳定,而且miRNA相对较小,不经过后处理修饰,化学结构不那么复杂。研究发现,在感染患者的血液中存在miRNA的表达谱。已经被证实有许多miRNA在脓毒症患者中存在表达的上调或下调^[4]。本次研究结果也证实以上结论。

miR-182最早由Vasilescu等^[7]发现,同健康受试者相比,脓毒症患者的miR-182表达存在明显的上调。Moore等^[8]的动物实验证实,在大鼠模型中miR-182存在表达上调,进一步通过生物信息学方法认为,miR-182能够影响脓毒症相关信号通路的表达。Zhou等^[4]在2015年再次确认了在人类脓毒症患者中miR-182表达的上调。本次研究结果进一步发现miR-182的高表达与疾病的严重程度相关,而miR-182的高表达也与患者的预后密切相关。miR-182作为一种促炎基因,能促进器官损伤。Vasilescu等^[9]通过对脓毒症患者的循环miRNA表达网的预测,认为miR-182能够影响脓毒症相关基因,比如ATP13A3、CDKN1A、GSK3B等基因的表达,

进一步证实了这个推测。

miR-15a是一种炎症相关的miRNA,据在各种疾病中发挥抗炎作用,能通过直接靶向VEGF和FGF抑制血管生成^[10]。但循环miR-15a在脓毒症患者的表达特点的观点仍有分歧。Goodwin等^[11]研究认为,同脓毒症组相比miR-15a在脓毒症性休克患者中表达存在下调。miR-15a可能通过几种潜在机制影响内皮功能障碍和休克的发展。目前,有研究发现miR-15a可以靶向和抑制在脓毒症环境中增加血管通透性的基因,包括VEGFA、VEGFC和Mylk^[12]。因此,降低miR-15a的水平可以解除对这些基因的抑制,从而促进休克的发生。与之相反的是,Wang等^[13]研究认为,miR-15a是新生儿脓毒症诊断和预后的潜在生物标志物,miR-15a表达的上调能够抑制脂多糖诱导的炎症通路。这些矛盾的研究结果提示,miR-15a在脓毒症中可能具有双向调节的作用。本次研究结果显示生存患者入院72 h、28 d miR-15a的表达明显高于死亡患者,提示miR-15a的高表达是预后改善的指标之一。

综上所述,miR-182与miR-15a可能可作为一种新型生物标志物,具有促进脓毒症患者的疾病分层和预后分析的临床应用价值。本次研究有几个局限性。首先,研究是在一个单一的中心进行的,由于患者大多来自国内的同一地区,可能存在选择偏差;其次,研究没有探究miR-182、miR-15a促进脓毒症发展或进展的分子机制;第三,研究未评估长期临床结果。因此,多中心研究和较长的随访时间,以及体内和体外实验是进一步研究的方向。

参考文献

- 1 中华医学会重症医学分会.中国严重脓毒症/脓毒性休克治疗指南(2014)[S].全科医学临床与教育,2015,13(4):365-367.
- 2 Stoller J, Halpin L, Weis M, et al. Epidemiology of severe sepsis: 2008-2012 [J]. J Crit Care, 2016, 31(1): 58-62.
- 3 Bandiera S, Pfeffer S, Baumert TF, et al. MiR-122-A key factor and therapeutic target in liver disease [J]. J Hepatol, 2015, 62(2): 448-457.
- 4 Zhou J, Chaudhry H, Zhong Y, et al. Dysregulation in microRNA expression in peripheral blood mononuclear cells of sepsis patients is associated with immunopathology [J]. Cytokine, 2015, 71(1): 89-100.

(下转第234页)

独立危险因素,基于危险因素建立的列线图模型可有效预测和量化继发血栓的风险,有助于医护人员记忆和理解模型的临床意义,从而进一步改善房颤患者的预后。

同时,本研究存在一定的不足之处,如本研究为单中心研究,研究对象主要来自本医疗机构内就诊患者,且样本量较小,不具有广泛性与代表性,因此后期仍需进一步扩大样本量在多中心进行进一步验证。

参考文献

- Margulescu AD, Mont L. Persistent atrial fibrillation vs paroxysmal atrial fibrillation: Differences in management [J]. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 2017, 15(8): 601-618.
- Atzema CL, Singh SM. Acute management of atrial fibrillation: From emergency department to cardiac care unit [J]. *Cardiol Clin*, 2018, 36(1): 141-159.
- Gundlund A, Xian Y, Peterson ED, et al. Prestroke and poststroke antithrombotic therapy in patients with atrial fibrillation results from a nationwide cohort [J]. *JAMA Network Open*, 2018, 1(1): e180171.
- 李雪博,舒尚志,李小雪,等.心外膜脂肪组织体积与心房颤动的相关性研究[J]. *临床心血管病杂志*, 2019, 318(12): 47-52.
- 陈永利,陈娟,杨丽,等.组织因子和组织因子途径抑制物在心房颤动患者心源性卒中急性期的变化[J]. *中华高血压杂志*, 2020, 28(1): 50-54.
- Wintgens LIS, Vorselaars VMM, Klaver MN, et al. Left atrial appendage closure in atrial fibrillation patients with prior major bleeding or ineligible for oral anticoagulation [J]. *Neth Heart J*, 2019, 27(12): 613-620.
- Poggesi A, Barbato C, Galmozzi F, et al. Role of biological markers for cerebral bleeding risk STRATification in patients with atrial fibrillation on oral anticoagulants for primary or secondary prevention of ischemic Stroke (strat-AF study): study design and methodology [J]. *Medicina (Kaunas)*, 2019, 55(10): 626.
- Jaakkola S, Kiviniemi TO, Airaksinen KEJ. Cardioversion for atrial fibrillation - how to prevent thromboembolic complications? [J]. *Ann Med*, 2018, 50(7): 549-555.
- 谢秀峰,陈凤英. 473例心房颤动患者复律前抗凝与血栓栓塞风险评估 [J]. *内蒙古医科大学学报*, 2020, 42(4): 387-389, 397.
- 雷明,焦琳阳,代晗星.经食管实时三维超声心动图定量评价非瓣膜病性房颤-二尖瓣反流患者心脏功能的研究 [J]. *影像科学与光化学*, 2020, 38(5): 91-96.
- 李厚忠,郭金兴,张胜强,等. FGF-1对TGF- β -1诱导的H9c2心肌细胞凋亡与Caspase-3, Caspase-8和Caspase-9表达的关系研究 [J]. *中国现代医学杂志*, 2018, 28(7): 30-35.
- Topcuoglu MA, Haydari D, Ozturk S, et al. Plasma levels of coagulation and fibrinolysis markers in acute ischemic stroke patients with lone atrial fibrillation [J]. *Neurol Sci*, 2000, 21(4): 235-240.

(收稿日期 2021-03-08)

(本文编辑 葛芳君)

(上接第225页)

- Singer M, Deutschman CS, Seymour C, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3) [J]. *JAMA*, 2016, 315(8): 801-810.
- Bloos F, Reinhart K. Rapid diagnosis of sepsis [J]. *Virulence*, 2014, 5(1): 154-160.
- Vasilescu C, Rossi S, Shimizu M, et al. MicroRNA fingerprints identify miR-150 as a plasma prognostic marker in patients with sepsis [J]. *PLoS One*, 2009, 4(10): e7405.
- Moore CC, McKillop IH, Huynh T. MicroRNA expression following activated protein C treatment during septic shock [J]. *J Surg Res*, 2013, 182(1): 116-126.
- Vasilescu C, Dragomir M, Tanase M, et al. Circulating miRNAs in sepsis-A network under attack: An in-silico prediction of the potential existence of miRNA sponges in sepsis [J]. *PLoS One*, 2017, 12(8): e0183334.
- Yin KJ, Olsen K, Hamblin M, et al. Vascular endothelial cell-specific microRNA-15a inhibits angiogenesis in hindlimb ischemia [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(32): 27055-27064.
- Goodwin AJ, Guo C, Cook JA, et al. Plasma levels of microRNA are altered with the development of shock in human sepsis: An observational study [J]. *Crit Care*, 2015, 19: 440.
- Gavard J, Gutkind JS. VEGF Controls endothelial-cell permeability promoting β -arrestin-dependent Endocytosis VE-cadherin [J]. *Nat Cell Biol*, 2006, 8(11): 1223-1234.
- Wang X, Wang X, Liu X, et al. miR-15a/16 are upregulated in the serum of neonatal sepsis patients and inhibit the LPS-induced inflammatory pathway [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(4): 5683-5690.

(收稿日期 2021-12-01)

(本文编辑 高金莲)