

脓毒症心肌病患者循环 miR-155 诊断价值的研究

陶金松¹, 郑若龙^{1*}, 李健¹, 魏峰¹, 徐霞¹, 王惠²

¹江阴市人民医院心血管内科, 江苏 江阴 214400; ²常州市第一人民医院心血管内科, 江苏 常州 213000

[摘要] 目的:探讨脓毒症心肌病(sepsis-induced cardiomyopathy, SIC)早期血浆 miR-155 水平的变化,与血浆 B 型利钠肽(B-type natriuretic peptide, BNP)、肌钙蛋白 T(cardiac troponin T, cTnT)的相关性,评估 miR-155 是否可作为早期诊断 SIC 的新型生物标记物。方法:收集 31 例江阴市人民医院心血管内科救治 SIC 患者入院即刻血浆样本及 24 例健康对照者血浆样本。逆转录实时定量 PCR(qRT-PCR)检测样本 miR-155 的表达水平,并与 cTnT 和 BNP 进行相关性分析。qRT-PCR 检测 SIC 患者血浆 miR-155 表达水平,绘制 ROC 曲线评估诊断价值。结果:循环 miR-155 在 SIC 患者血浆中含量较对照组增高($P=0.004$)。相关性分析表明血浆 miR-155 含量与 BNP、cTnT 呈正相关;ROC 曲线分析发现 miR-155 对 SIC 的诊断效能 AUC 为 0.905。结论:SIC 早期血浆中 miR-155 的变化水平与血浆 BNP、cTnT 的相关性好,有望成为 SIC 的早期诊断生物标记物。

[关键词] 脓毒症心肌病;miR-155;循环 miRNA

[中图分类号] R542.2

[文献标志码] B

[文章编号] 1007-4368(2018)11-1545-03

doi:10.7655/NYDXBNS20181112

脓毒症心肌病(sepsis-induced cardiomyopathy, SIC)因其早期发现难、病情进展迅速、临床救治困难、且病死率高,仍是临床上常见的急危重症之一,亟待探索新的诊治方法^[1]。因此,寻找有效的早期诊断相关的生物标记物是降低 SIC 患者病死率的关键。

MicroRNA(miRNA)是一类高度保守、小分子量(约 22 bp 大小)、内源性的 RNAs,通过与目标 mRNA 的 3'-非编码区(3'-untranslated region, 3' UTR)完全或者部分的互补配对来进行切割或者翻译抑制功能,从而调节转录后靶基因的表达^[2]。近年来随着人们研究的不断深入,miRNA 在多种心血管疾病例如动脉粥样硬化、心肌肥大、缺血再灌注损伤等疾病中表达异常,并参与了疾病调控^[3-5]。此外,miRNA 也是重要的炎症相关调节因子,发挥十分重要的诊疗作用^[6]。但是关于 miRNA 在脓毒症心血管障碍中的作用目前仍知之甚少。

本课题组前期工作发现 miR-155 是脂多糖导致心肌病的关键 miRNA,在脂多糖所致的心肌病中,抑制 miR-155 可以保护心脏功能,具有抗凋亡功能^[7]。因此本研究旨在前期研究基础上,进一步寻找并探索循环 miR-155 是否具有 SIC 相关生物标记物的潜力,并验证其临床诊断价值。

[基金项目] 江阴市卫计委科研基金(KY20146-082)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: 13861638136@163.com

1 对象和方法

1.1 对象

江阴市人民医院 2015 年收治的 31 例 SIC 患者及 24 例健康对照者被纳入本研究。所有入组者均签署知情同意书,并经本院伦理委员会批准。其中 24 例健康对照者为健康体检人群,无心电图异常表现及心血管疾病。脓毒症诊断标准参照最新版“脓毒症和脓毒性休克的管理”^[8]。脓毒症定义为感染引起的 SOFA 评分[Sequential (Sepsis-Related) organ Failure Assessment Score]在基线水平上升高 ≥ 2 分。SIC 为在脓毒症或脓毒症休克的患者中左室射血分数 $\leq 50\%$ 并且有超过基线 $\geq 10\%$ 的下降,通常情况下这些改变能 2 周内恢复正常^[9]。在征得患者及家属知情同意后,入院 24 h 内留取 2 mL 外周血液标本于 EDTA 抗凝管中,经 1 500 g 室温条件下离心 15 min 后,留取上清即血浆,移入 RNA-Free 的 EP 管中,并立即置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

1.2 方法

1.2.1 血浆 RNA 的提取

运用 Ambion 试剂盒(Thermo Scientific 公司,美国)提取血浆 RNA,具体操作步骤参照试剂盒说明书进行。NanodropND2000 分光光度计(Thermo Scientific 公司,美国)进行血浆 RNA 浓度及纯度检测。测定 $D(260\text{ nm})/D(280\text{ nm})$ 比值及 $D(260\text{ nm})$

值。 $D(260\text{ nm})/D(280\text{ nm})$ 比值在1.8~2.0之间时RNA质量佳,并根依据 $D(260\text{ nm})$ 计算RNA浓度。按照逆转录试剂盒 miRNA qRT-PCR Detection Kit (Bio-Rad公司,美国)进行血浆中 miRNA 的逆转录和后续的定量检测,具体操作步骤参照试剂盒说明书进行。提取的cDNA置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

1.2.2 qRT-PCR 的检测

miRNA 引物由广州市锐博生物科技有限公司设计,SYBR Green(Bio-Rad公司,美国)用于检测血浆 miR-155 的含量,以血浆 cel-39 作为内对照。在 Mastercyclerrealplex Real-Time PCR7900 仪器(Eppendorf公司,美国)上按照逆转录试剂盒 miRNA qRT-PCR Detection Kit(Bio-Rad公司,美国)进行血浆中 miRNA 的定量检测。反应条件: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 3 min; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s 40个循环;反应结束后,熔解曲线加热到 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$,后降至 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$,在20 min内再逐渐升温至 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 持续15 s,记录荧光信号的变化。荧光定量PCR反应均重复3次。

1.3 统计学方法

采用 GraphPad Prism 5 软件进行数据分析并作

图。ROC曲线绘制及曲线下面积(area under curve, AUC)的计算来评估目的 miRNA 诊断准确性。Pearson 相关分析两组血浆中 miRNA 表达水平差异、与临床资料的相关性。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血浆 miR-155 的水平

SIC 患者和健康对照者血浆中 miR-155 的表达水平,分别为 45.12 ± 12.64 和 2.06 ± 0.87 ,差异有统计学意义($P=0.004$)。

2.2 miR-155 血浆表达水平与临床参数相关性分析

SIC 组与健康对照组相比,两组在年龄、性别等方面未见统计学差异,具有可比性;而白细胞数量差异有统计学意义($P < 0.001$,表1)。本研究进一步将 miR-155 血浆表达水平与表1临床相关参数进行分析,血浆 miR-155 水平与血浆中的 B 型利钠肽(B-type natriuretic peptide, BNP)、肌钙蛋白 T(cardiac troponin T, cTnT)水平呈正相关,其相关性系数 r 分别为 0.730 和 0.669,但 miR-155 的表达水平与白细胞、C 反应蛋白及降钙素原无明显相关性。

表1 SIC患者与健康对照的临床资料

指标	健康对照组($n=24$)	SIC组($n=31$)	P 值
年龄(岁) ^a	48(21~68)	51(16~86)	0.477
男(例)	13	17	0.960
病死率[$n(\%)$]	0	1(3.2)	—
白细胞($\times 10^9$ 个/L) ^a	6.53(1.23~11.03)	24.36(8.72~61.74)	<0.001
C反应蛋白(mg/L) ^a	4.85(3.1~9.8)	80.56(5.15~195.00)	<0.001
降钙素原($\mu\text{g/L}$) ^a	0.102(0.026~0.408)	38.56(0.07~100.00)	<0.001
BNP(ng/L) ^a	33.63(11.43~78.65)	104 81.60(889.00~35 000.00)	<0.001
cTnT(ng/mL) ^a	0.008(0.001~0.024)	154.36(4.91~1 835.00)	0.035

a: $M(\text{Min} \sim \text{Max})$ 。

2.3 血浆 miR-155 对于 SIC 的诊断价值

通过 ROC 曲线分析,可明确血浆中差异性表达的 miR-155 对诊断 SIC 的意义。结果显示在 SIC 患者中,血浆 miR-155 ROC 的 AUC 为 0.905 (图1)。miR-155 的 AUC 具有统计学意义,灵敏度、特异度较高,表现出较强的诊断价值。

3 讨论

miRNA 作为一种小分子广泛参与机体内生理环境的稳定和许多疾病病理过程的发生发展,并可分泌到循环外周血中,血浆中可以检测到的 miRNA 被称之为循环 miRNA^[10]。近年来研究报道揭示了血

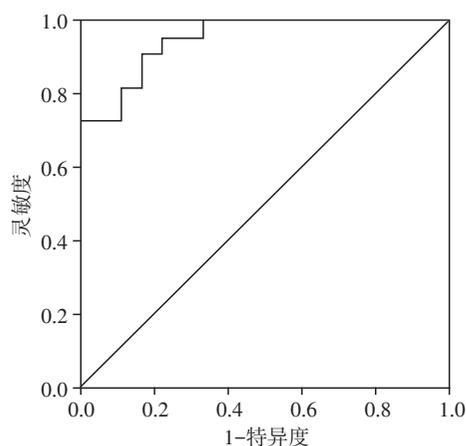


图1 血浆 miR-155 对 SIC 的诊断效能

浆 miRNA 作为新型生物标记物,在不同心血管疾病过程中的研究进展^[11]。其中研究人员发现在冠状动脉粥样硬化患者中血浆 miR-155 水平与患者斑块负荷量呈正相关,薄帽的纤维粥样斑块的出现往往提示易损斑块,与急性冠脉事件密切相关^[12]。研究还指出循环 miR-155 的差异表达有较强的诊断薄帽纤维粥样斑块的能力,提示循环 miR-155 也可能具有诊断冠脉粥样硬化的效能。通过对比肥厚型心肌病与心脏淀粉样变患者血浆中 miRNA 的表达谱,结果显示 miR-155 在肥厚型心肌病组织中下调,进一步统计分析显示循环 miR-155 能较好鉴别区分肥厚型心肌病与心脏淀粉样变,是肥厚心肌病的特异性生物标记物^[13]。此外,还有一项研究指出血浆中的 miR-155 可能通过调控靶基因 Angiotensin Receptor Type 1(AT1) 的基因多态性而参与致命性心律失常的发生^[14]。而关于循环 miR-155 是否参与 SIC 的进程尚不明确。

脓毒症是一种由细菌感染引起的全身炎症反应综合征,可造成全身多器官功能损害,心脏是其重要靶器官之一。因此脓毒症引起的心血管功能障碍被称为 SIC。SIC 与心肌缺血及心力衰竭的生化指标如 cTnT 以及 BNP 水平有关^[15-16]。但 cTnT 和 BNP 对 SIC 的早期诊断并不敏感。

本研究结果显示,SIC 组患者血浆 miR-155 较健康对照组明显升高,差异有统计学意义(图 1),并通过相关性分析指出 miR-155 与 BNP、cTnT 水平呈正相关。进一步绘制 ROC 曲线表明,miR-155 对 SIC 的早期诊断敏感性和特异性均较高,提示循环 miR-155 能够作为诊断 SIC 的生物标记物。

本研究通过小样本研究初步提示 miR-155 具有作为脓毒症心血管功能障碍生物标记物的潜力,但临床数据缺乏综合分析,其是否有助于早期强化治疗、提高抢救成功率,尚待更大规模临床研究进一步验证。

[参考文献]

- [1] Zaky A, Deem S, Bendjelid K, et al. Characterization of cardiac dysfunction in sepsis: An ongoing challenge [J]. Shock, 2014, 41(1): 12-24
- [2] Barwari T, Joshi A, Mayr M. MicroRNAs in cardiovascular disease [J]. J Am Coll Cardiol, 2016, 68(23): 2577-2584
- [3] Nazari-Jahantigh M, Egea V, Schober A, et al. MicroRNA-specific regulatory mechanisms in atherosclerosis [J]. J

Mol Cell Cardiol, 2015, 89(1): 35-41

- [4] Seok HY, Chen J, Kataoka M, et al. Loss of microRNA-155 protects the heart from pathological cardiac hypertrophy [J]. Cir Res, 2014, 114(10): 1585-1595
- [5] Wang C, Zhang C, Liu L, et al. Macrophage-derived miR-155-containing exosomes suppress fibroblast proliferation and promote fibroblast inflammation during cardiac injury [J]. Mol Ther, 2017, 25(1): 192-204
- [6] Alexander M, Hu R, Runtsch MC, et al. Exosome-delivered microRNAs modulate the inflammatory response to endotoxin [J]. Nat Commun, 2015, 6(1): 7321
- [7] Wang H, Bei Y, Huang P, et al. Inhibition of mir-155 protects against lps-induced cardiac dysfunction and apoptosis in mice [J]. Mol Ther, 2016, 5(10): e374
- [8] Howell MD, Davis AM. Management of sepsis and septic shock [J]. JAMA, 2017, 317(8): 847-848
- [9] Sato R, Kuriyama A, Takada T, et al. Prevalence and risk factors of sepsis-induced cardiomyopathy: A retrospective cohort study [J]. Medicine, 2016, 95(39): e5031
- [10] Kumarswamy R, Thum T. Non-coding RNAs in cardiac remodeling and heart failure [J]. Cir Res, 2013, 113(6): 676-689
- [11] Sayed AS, Xia K, Salma U, et al. Diagnosis, prognosis and therapeutic role of circulating miRNAs in cardiovascular diseases [J]. Heart lung Cir, 2014, 23(6): 503-510
- [12] Leistner DM, Boeckel JN, Reis SM, et al. Transcoronary gradients of vascular miRNAs and coronary atherosclerotic plaque characteristics [J]. Eur Heart J, 2016, 37(22): 1738-1749
- [13] Derda AA, Thum S, Lorenzen JM, et al. Blood-based microRNA signatures differentiate various forms of cardiac hypertrophy [J]. Inter J Cardiol, 2015, 196(1): 115-122
- [14] Blanco RR, Austin H, Vest RN, et al. Angiotensin receptor type 1 single nucleotide polymorphism 1166a/c is associated with malignant arrhythmias and altered circulating miR-155 levels in patients with chronic heart failure [J]. J Cardiac Fail, 2012, 18(9): 717-723
- [15] Post F, Weilemann LS, Messow CM, et al. B-type natriuretic peptide as a marker for sepsis-induced myocardial depression in intensive care patients [J]. Criti Care Med, 2008, 36(11): 3030-3037
- [16] Lim W, Qushmaq I, Devereaux PJ, et al. Elevated cardiac troponin measurements in critically ill patients [J]. Archi Inter Med, 2006, 166(22): 2446-2454

[收稿日期] 2018-03-03