

血浆 miR-499 在脓毒症合并心肌损伤的诊断价值

杨永丽, 何 静*, 肖志英
(湖北省中山医院综合 ICU, 湖北 武汉 430032)

摘要:【目的】探讨血浆 miR-499 水平在脓毒症合并心肌损伤的诊断价值。【方法】选择我院收治的脓毒症患者 112 例,根据患者有无合并心肌损伤分为脓毒症心肌损伤组(A 组, $n = 45$)、脓毒症未合并心肌损伤组(B 组, $n = 67$)。采用实时荧光定量技术检测患者血浆 miR-499 水平。同期 20 例健康志愿者为对照(NC 组)。【结果】脓毒症心肌损伤组 miR-499 水平明显高于脓毒症未合并心肌损伤组及正常对照组($P < 0.01$);脓毒症合并重度心肌损伤患者(LVEF $< 30\%$)血浆 miR-499 表达水平高于脓毒症合并轻度心肌损伤患者($30\% \leq \text{LVEF} < 50\%$)($P < 0.05$);用 ROC 曲线分析 miR-499 在脓毒症合并心肌损伤中的诊断价值,得到 ROC 曲线下面积为 0.889(95%CI 0.821 ~ 0.957)。【结论】脓毒症心肌损伤患者外周血 miR-499 表达水平显著升高,且和心肌损伤程度正相关,提示 miR-499 的检测可作为脓毒症心肌损伤的判断指标。

关键词:脓毒症;心肌损伤;miR-499;诊断价值

中图分类号:R363 文献标志码:A 文章编号:1672-3554(2015)02-0279-05

Plasma miR-499 Predicts for Sepsis with Myocardial Damage

YANG Yong-li, HE Jing*, XIAO Zhi-ying
(Department of GICU, Hubei Zhong Shan Hospital, Wuhan 430032, China)
Corresponding author: HE Jing, E-mail:hejingzsy@126.com

Abstract:【Objective】To assess the value of plasma miR-499 to predict sepsis with myocardial damage.【Methods】The blood specimens from 112 patients with sepsis were collected after admission. According to the occurrence of myocardial damage, they were classified into sepsis with myocardial damage patients (45 cases) and sepsis without myocardial damage patients (67cases). A total of 20 healthy subjects were enrolled as control group. Plasma miR-499 was assessed using real-time polymerase chain reaction.【Results】In plasma from sepsis with myocardial damage patients, cardiac myocyte-associated miR-499 was highly elevated, as compared with sepsis without myocardial damage patients and control subjects ($P < 0.01$). Receiver operating characteristic curve analysis revealed an area under the curve of 0.889 for miR-499.【Conclusion】Cardiac damage initiates the detectable release of cardiomyocyte-specific miR-499 into the circulation. Plasma miR-499 can be markers for the diagnosis of myocardial damage after sepsis.

Key words: sepsis; myocardial damage; miR-499; diagnosis

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2015, 36(2): 279-283]

脓毒症(sepsis)是感染导致的全身炎症反应综合征,也是诱发感染性休克、多器官功能障碍综合征的首要病因。病情进展迅速,病死率高,临床救治困难,是危重病患者死亡的首要原因。脓毒症可导致心肌损伤^[1-4],近 50% 脓毒症患者出现不同程度心肌抑制,病死率可高达 70% ~ 90%^[5]。因此,如何早期识别、及时诊断脓毒症合并心

肌损伤,是提高治疗脓毒症心肌损伤成功率的关键所在。miR-499 是一种心肌特异性的微小核糖核酸,研究发现,在急性心梗患者^[6-10],血浆 miR-499 水平显著升高,和患者心肌病变程度及死亡率正相关,可能成为诊断急性心梗的有效指标。但 miR-499 在脓毒症合并心肌损伤的诊断作用并不明确。本研究旨在探讨血浆 miR-499 水平在脓毒

收稿日期:2014-08-17

基金项目:中华医学会临床医学科研专项基金(14030300567);

作者简介:杨永丽,硕士,E-mail:yangyongli2008@126.com,* 通信作者:何静,E-mail:hejingzsy@126.com

症合并心肌损伤的诊断价值。

1 材料与方 法

1.1 一般资料

我院 2012 年 3 月至 2014 年 5 月收治住院的脓毒症患者 112 例。原发病分布:慢性阻塞性肺疾病合并感染 39 例,重症肺炎 18 例,肠穿孔并腹腔感染 21 例,肾结石并泌尿系感染 13 例,手术后败血症 13 例,其他 8 例。纳入同期健康患者 20 例作为对照组。

1.2 入选和排除标准

脓毒症诊断标准:已明确诊断或疑似感染,并伴有如下某些征象:①一般指标:发热(中心体温 $>38.3\text{ }^{\circ}\text{C}$),低体温(中心体温 $<36.0\text{ }^{\circ}\text{C}$),心率 $>90\text{ 次}/\text{min}$,呼吸 $>30\text{ 次}/\text{min}$,意识改变,明显水肿或液体正平衡($>20\text{ mL}/\text{kg}$,持续 24 h 以上),高糖血症(血糖 $>7.7\text{ mmol}/\text{L}$)而无糖尿病史;②炎症反应参数:白细胞增多($>12\times 10^9/\text{L}$)或减少($<4\times 10^9/\text{L}$)或白细胞计数虽正常但不成熟白细胞 $>10\%$,血浆 C 反应蛋白、降钙素原升高;③血流动力学参数:低血压(收缩压 $<90\text{ mmHg}$,平均动脉压 $<65\text{ mmHg}$,或成人收缩压下降 $>40\text{ mmHg}$),混合静脉血氧饱和度 $>70\%$,心排指数 $>3.5\text{ L}/(\text{min}\cdot\text{m}^2)$;④器官功能障碍:低氧血症($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2<300\text{ mmHg}$);急性少尿[尿量 $<0.5\text{ mL}/(\text{kg}\cdot\text{h})$],肌酐(SCr)增加 $>5\text{ mg}/\text{L}$,凝血异常[国际标准化比率(INR) >1.5 或活化部分凝血激酶时间(APTT) $>60\text{ s}$],腹胀,血小板减少症($<100\times 10^9$),高胆红素血症(总胆红素 $>40\text{ mg}/\text{L}$),高乳酸血症($>3\text{ mmol}/\text{L}$)毛细血管再充盈时间延长或皮肤出现花斑。

排除标准:①心脏手术后,包括冠状动脉旁路移植术、瓣膜置换术、先天性心脏病外科手术;②心肺复苏术后;③急性冠脉综合征;④慢性肾功能不全。⑤慢性心功能不全。

心肌损伤组纳入标准^[1]:最终确诊为脓毒症患者;cTnI 水平高于正常(正常值:cTnI $<0.01\text{ }\mu\text{g}/\text{L}$)和/或左室射血分数下降(LVEF $<50\%$)。非心肌损伤组纳入标准:最终确诊为脓毒症患者;cTnI 水平和左室射血分数均正常。

1.3 样本收集

患者入院 24 h 内采集肘静脉血液 2~3 mL

置于内含 EDTA 的真空管,使用离心机 3 000 r/min($r=15\text{ cm}$)离心血液,取上清于去 RNAase 的 EP 管内,取血清分成 3 等分,储存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。用于检测 C 反应蛋白(CRP)、降钙素原(PCT)、心肌钙蛋白 I(cTnI)、白细胞(WBC)、N 末端 B 型利钠肽原(NT-proBNP)的外周血与用于提取 miRNA 的外周血同时采集,及时送我院化实验室检验。

1.4 研究方法

计算患者入院 24 h 急性生理和慢性健康状态评分 II (APACHE II) 及超声心动图检测患者 EF 值。采用双抗体夹心免疫发光法检测血清 PCT、CRP,采用双位点酶免疫法检测 cTnI,采用免疫荧光法检测 NT-proBNP。上述指标均由我院检验科检测。

血浆 miR-499 的测定用 Trizol 提取总 RNA,按照试剂说明书进行逆转录反应,利用 SYBRGreen 法进行 miRNA 表达的检测。miR-499 及 U6 逆转录及 PCR 引物由广州锐博生物科技有限公司合成,以 U6 为内参, $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 值为统计参数,相对定量法进行结果分析处理。

1.5 统计学分析

所得数据应用 SPSS19.0 软件进行统计学处理。正态分布的计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两组之间比较采用两独立样本 t 检验,计数资料采用 χ^2 检验。比较受试者工作特征曲线(ROC 曲线)分析曲线下面积(AUC)。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 患者临床特征

符合纳入脓毒症标准的患者 112 例,健康对照 20 例。脓毒症患者主要感染来源为肺部(57 例)及腹部(34 例)。112 例脓毒症患者中,38 例轻度脓毒症,47 例严重脓毒症,27 例感染性休克。其中,脓毒症合并心肌损伤 45 例,未合并心肌损伤 67 例。脓毒症组及健康对照组年龄、性别及合并疾病无显著性差异($P>0.05$)。脓毒症合并心肌损伤组与脓毒症未合并心肌损伤组相比,NT-proBNP、cTnI、LVEF 及 28 d 死亡率有显著差异($P<0.01$),而感染来源、合并疾病、APACHE II 评分、CRP、PCT、WBC 及脓毒症分级所占比例均无显著性差异($P>0.05$;表 1)。

表 1 患者临床基本特征
Table 1 Clinical characteristic of the patients

	NC group(<i>n</i> = 20)	A group(<i>n</i> = 45)	B group(<i>n</i> = 67)	<i>P</i> value
Male	12(60.0%) ¹⁾	29(64.4%)	38(56.7%)	0.514
Age	65 ± 19 ¹⁾	68 ± 23	64 ± 21	0.326
Source of infection				
Lung(<i>n</i>)	0	23(51.1%) ³⁾	34(50.8%)	0.732
Abdomen(<i>n</i>)	0	14(31.1%) ³⁾	20(29.8%)	0.531
Blood(<i>n</i>)	0	5(11.1%) ³⁾	8(11.9%)	0.767
Others(<i>n</i>)	0	3(6.7%) ³⁾	5(7.5%)	0.384
APACHE II score	1.7 ± 0.8	23.95 ± 8.93 ³⁾	22.05 ± 6.52	0.532
CRP(mg/L)	8 ± 3	154 ± 54 ³⁾	149 ± 43	0.432
PCT(ng/mL)	0.05 ± 0.02	14.85 ± 2.95 ³⁾	16.12 ± 4.51	0.243
WBC (× 10 ⁹ /L)	5.67 ± 2.14	14.98 ± 3.94 ³⁾	12.28 ± 4.21	0.487
Sepsis status				
Sepsis(<i>n</i>)	0	15(33.4%) ³⁾	23(34.3%)	0.629
Severe sepsis(<i>n</i>)	0	19(42.2%) ³⁾	28(41.8%)	0.798
Sepsis shock(<i>n</i>)	0	11(24.4%) ³⁾	16(23.9%)	0.564
Co-morbid conditions				
CHD(<i>n</i>)	3(15.0%) ¹⁾	6(13.3%)	11(16.4%)	0.134
COPD(<i>n</i>)	3(15.0%) ¹⁾	8(17.8%)	10(14.9%)	0.324
Diabetes (<i>n</i>)	1(5.0%) ¹⁾	3(6.7%)	5(7.5%)	0.450
Cancer(<i>n</i>)	2(10.0%) ¹⁾	5(11.1%)	6(8.9%)	0.246
28-day mortality(%)	0	24(53.3%) ²⁾	23(34.3%)	< 0.01
NT-proBNP(ng/L)	125 ± 81.5	2382.9 ± 104.3 ²⁾	396.4 ± 78.3	< 0.01
cTnI(μg/L)	<0.01	1.7 ± 0.6 ²⁾	<0.01	< 0.01
LVEF(%)	64.6 ± 18.4	45.3 ± 12.1 ²⁾	59.2 ± 8.6	< 0.01
30% ≤ LVEF < 50%	0	31(68.9%)	–	–
LVEF < 30%	0	14(31.1%)	–	–

NC group: Healthy controls; A group: sepsis with myocardial damage; B group: sepsis without myocardial damage; NC group VS A group and B group: 1) $P > 0.05$; A group VS B group: 2) $P < 0.01$; 3) $P > 0.05$.

2.2 miR-499 表达量的变化

脓毒症合并心肌损伤组血浆 miR-499 水平显著高于脓毒症未合并心肌损伤组及健康对照组 ($P < 0.01$), 其中, 脓毒症合并重度心肌损伤患者 (LVEF < 30%) 血浆 miR-499 水平高于脓毒症合并轻度心肌损伤患者 (30% ≤ LVEF < 50%) ($P < 0.05$); 而脓毒症未合并心肌损伤组血浆 miR-499 水平与健康对照组相比, 无统计学意义 ($P > 0.05$; 图 1)。

2.3 脓毒症患者 miR-499 与 LVEF、cTnI 的相关性

脓毒症患者血浆 miR-499 水平与 LVEF 负相关 ($r = -0.46, P < 0.05$), 与血 cTnI 水平正相关性 ($r = 0.59, P < 0.01$)。

2.4 血浆 miR-499 水平对脓毒症并发心肌损伤的诊断意义

用 ROC 曲线分析血浆 miR-499 水平在脓毒症合并心肌损伤的诊断价值, 得到 ROC 曲线下面积为 0.889, 95% 可信区间为 0.821 ~ 0.957。当血浆 miR-499 的 cut-off 值为 5.5 倍数时, 其诊断脓毒症合并心肌损伤的敏感度 86.7%、特异度 90.8%。用 ROC 曲线分析血浆 cTnI 水平在脓毒症合并心肌损伤的诊断价值, 得到 ROC 曲线下面积为 0.922, 95% 可信区间为 0.859 ~ 0.985。血浆 cTnI 的 cut-off 值为 0.46 μg/L 时, 其诊断脓毒症合并心肌损伤的敏感度 86.7%、特异度 100% (图 2)。

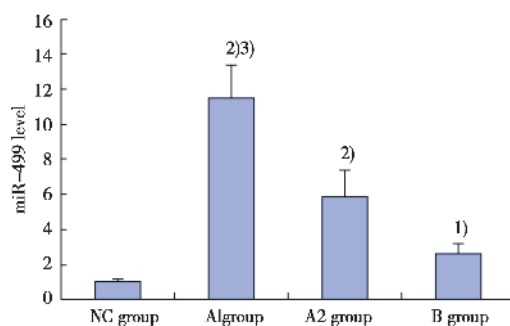


图 1 不同组别血浆 miR-499 表达量

Fig.1 Comparison of serum miR-499 between different groups

NC group: Healthy controls; A1 group: sepsis with severe myocardial damage (LVEF<30%); A2 group: sepsis with mild myocardial damage (30%≤LVEF<50%); B group: sepsis without myocardial damage

Compared to NC group, 1) $P > 0.05$; Compared to NC group and B group, 2) $P < 0.01$; Compared to A2 group, 3) $P < 0.05$.

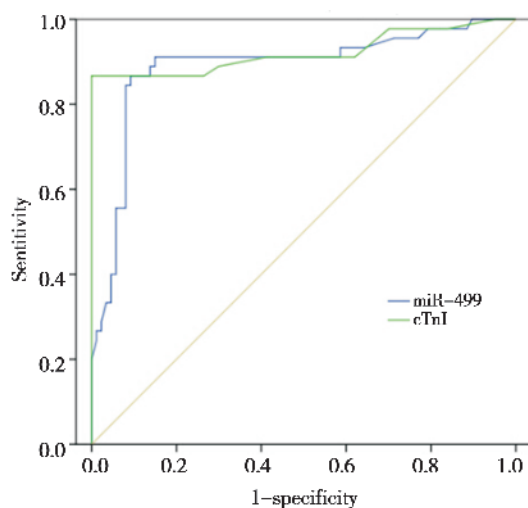


图 2 miR-499 及 cTnI 的 ROC 曲线

Fig.2 ROC-curve of miR-499 and cTnI

3 讨论

脓毒症是由感染导致的全身炎症反应综合征。近年来,脓毒症的发病率日趋增高,且其病死率仍居高不下。导致脓毒症死亡的原因很多,其中心功能障碍是其最严重的并发症之一,也是导致脓毒症死亡的重要原因之一^[5]。早期识别并治疗脓

毒症心肌损伤是提高患者生存率的关键。目前,心肌损伤的主要诊断指标为 cTnI 和超声心动图^[11],但其均存在一定的局限性,因此,寻找新的有效的诊断指标具有重要的临床意义。

miRNAs 是一类长约 21 ~ 25 个核苷酸的非编码单链 RNA 分子,其序列高度保守。其在转录后水平特异性识别靶 mRNA 的 3'末端非编码区(3'-UTR)上的相应靶点,从而抑制特定靶基因而发挥调节作用。目前研究发现,与人类密切相关的 miRNAs 达近千种,它们广泛参与细胞生长、分化、凋亡、血管再生及细胞转移等^[12-15]各个环节的调控,在生理及病理状态发挥重要调控作用。

近年来,循环 miRNAs 因其在血液中的稳定表达,使其可能为疾病诊断提供重要信息,从而引起了人们的极大兴趣。miR-499 是一种由心肌细胞特异性表达的微小核苷酸,研究表明,在急性心梗患者^[6-10],随着心肌细胞损伤程度增加,miR-499 由损伤心肌细胞产生并释放入血增加,引起血浆 miR-499 水平显著增高,从而为诊断急性心梗提供了可能。另外 Maarten F 等^[11]在病毒性心肌炎的研究中也发现,血浆 miR-499 水平与病毒性心肌炎的病变程度正相关,提示 miR-499 可能成为心肌细胞损伤的诊断指标。

本研究通过对比观察脓毒症合并心肌损伤患者、脓毒症未合并心肌损伤患者及健康对照者的血浆 miR-499 水平,发现脓毒症合并心肌损伤患者血浆 miR-499 水平显著升高,并随心肌损伤程度的加重,其表达水平进一步升高,提示血浆 miR-499 水平的高低可反应心肌损伤的程度。另外本研究结果显示,脓毒症合并心肌损伤患者 28 天死亡率明显高于脓毒症未合并心肌损伤患者,与已有研究结果一致^[5]。

本研究还发现,用 ROC 曲线分析血浆 miR-499 水平在脓毒症合并心肌损伤的诊断价值,得到 ROC 曲线下面积为 0.889。而血浆 cTnI 水平在脓毒症合并心肌损伤患者,得到 ROC 曲线下面积为 0.922。上述结果表明,血浆 miR-499 可能成为脓毒症合并心肌损伤的诊断指标之一。

因此,血浆 miR-499 反应脓毒症合并心肌损伤病情严重程度,可以作为病情变化检测指标。但本实验仍存在不足,未研究 miR-499 水平是否在脓毒症所致心肌损伤中起作用,我们将进一步于动物实验中进行论证。

参考文献

- [1] Y-Hassan S, Settergren M, Henareh L. Sepsis-induced myocardial depression and takotsubo syndrome [J]. *Acute Card Care*, 2014, 16(3): 102-109.
- [2] Antonucci E, Fiaccadori E, Donadello K, et al. Myocardial depression in sepsis: from pathogenesis to clinical manifestations and treatment [J]. *J Crit Care*, 2014, 29(4): 500-511.
- [3] Zaky A, Deem S, Bendjelid K, et al. Characterization of cardiac dysfunction in sepsis: an ongoing challenge [J]. *Shock*, 2014, 41(1): 12-24.
- [4] Rudiger A, Singer M. The heart in sepsis: from basic mechanisms to clinical management [J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2013, 11(2): 187-195.
- [5] Flierl MA, Rittirsch D, Huber-Lang MS, et al. Molecular events in the cardiomyopathy of sepsis [J]. *Mol Med*, 2008, 14(5-6): 327-336.
- [6] 李颖庆, 李欣, 胡春林, 等. 循环 microRNA-499 与肌钙蛋白 T 早期诊断急性心肌梗死[J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2012, 33(6): 787-791.
- Li YQ, Li X, Hu CL, et al. Circulating miR-499 and cTnI early predict for myocardial infarction [J]. *Journal of Sun Yat-sen University (Medical Sciences)*, 2012, 33(6): 787-791.
- [7] Cheng C, Wang Q, You W, et al. MiRNAs as biomarkers of myocardial infarction: a Meta-Analysis [J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e88566.
- [8] Olivieri F, Antonicelli R, Spazzafumo L, et al. Admission levels of circulating miR-499-5p and risk of death in elderly patients after acute non-ST elevation myocardial infarction [J]. *Int J Cardiol*, 172(2): e276-278.
- [9] Li C, Fang Z, Jiang T, et al. Serum microRNAs profile from genome-wide serves as a fingerprint for diagnosis of acute myocardial infarction and angina pectoris [J]. *BMC Med Genomics*, 2013, 6: 16.
- [10] Oerlemans MI, Mosterd A, Dekker MS, et al. Early assessment of acute coronary syndromes in the emergency department: the potential diagnostic value of circulating microRNAs [J]. *EMBO Mol Med*, 2012, 4(11): 1176-1185.
- [11] Corsten MF, Dennert R, Jochems S, et al. Circulating MicroRNA -208b and MicroRNA -499 Reflect Myocardial Damage in Cardiovascular Disease [J]. *Circ Cardiovasc Genet*, 2010, 3(6): 499-506.
- [12] Ando H, Asai T, Koide H, et al. Advanced cancer therapy by integrative antitumor actions via systemic administration of miR-499 [J]. *J Control Release*, 2014, 181: 32-39.
- [13] Wojtas B, Ferraz C, Stokowy T, et al. Differential miRNA expression defines migration and reduced apoptosis in follicular thyroid carcinomas [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2014, 388(1-2): 1-9.
- [14] Bronze-da-Rocha E. Micronas expression profiles in cardiovascular diseases [J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014: 985408.
- [15] Wang J, Jia Z, Zhang C, et al. MiR-499 protects cardiomyocytes from H₂O₂-induced apoptosis via its effects on Pdcd4 and Pacs2 [J]. *RNA Biol*, 2014, 11(4): 339-350.

(编辑 孙慧兰)