

• 论 著 •

急性肺损伤患者血浆 miR-221 及 miR-300 表达水平及与预后相关性分析*

曾宗鼎,邢崇浩,郑辉才,卓越,李 镇,杜 莉,陈 亮,张璐璐
三亚中心医院呼吸内科,海南三亚 572000

摘 要:目的 探讨急性肺损伤 (ALI) 患者血浆 miR-221 及 miR-300 表达水平及其与预后相关性。
方法 选取 2016 年 1 月至 2019 年 6 月该院收治的 ALI 患者 137 例,根据 ALI 患者生存情况分为存活组($n=90$)和死亡组($n=47$)。采用急性生理学及慢性健康状况评分系统 II (APACHE II) 评分标准将 ALI 患者分为低中危组($n=74$)和高危组($n=63$)。采用实时荧光定量 PCR 检测各组血浆 miR-221 及 miR-300 表达水平。应用多因素 Logistic 回归分析 ALI 患者死亡的危险因素。绘制受试者工作特征曲线 (ROC 曲线) 分析血浆 miR-221 及 miR-300 表达水平对 ALI 患者死亡的预测价值。**结果** 死亡组血浆 miR-221 及 miR-300 表达水平均明显高于存活组,差异有统计学意义($P<0.05$)。高危组血浆 miR-221、miR-300 表达水平及病死率均明显高于低中危组,差异有统计学意义($P<0.05$)。多因素 Logistic 回归分析显示,血浆 miR-221($OR=3.270$, $95\%CI:2.247\sim7.115$)及 miR-300($OR=2.683$, $95\%CI:1.715\sim6.207$)表达水平升高是 ALI 患者死亡的独立危险因素。ROC 曲线分析显示,血浆 miR-221 及 miR-300 表达水平预测 ALI 患者死亡的最佳截断值分别为 2.80、1.73,二者联合预测 ALI 患者死亡的曲线下面积(0.907 , $95\%CI:0.858\sim0.974$)最大。**结论** 血浆 miR-221 及 miR-300 表达水平升高与 ALI 患者预后不良相关,且其是 ALI 患者死亡的独立危险因素,二者联合对预测 ALI 患者死亡具有一定的价值。

关键词:急性肺损伤; miR-221; miR-300; 预后
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2021.05.008 **中图法分类号:**R563.8
文章编号:1673-4130(2021)05-0545-05 **文献标志码:**A

Expression levels of plasma miR-221 and miR-300 in patients with acute lung injury and their correlation with prognosis*

ZENG Zongding, XING Chonghao, ZHENG Huicai, ZHUO Yue,
LI Zhen, DU Li, CHEN Liang, ZHANG Lulu

Department of Respiratory Medicine, Sanya Central Hospital, Sanya, Hainan 572000, China

Abstract: Objective To investigate the expression levels of plasma miR-221 and miR-300 in patients with acute lung injury (ALI) and their correlation with prognosis. **Methods** Totally 137 patients with ALI admitted to a hospital from January 2016 to June 2019 were selected and divided into survival group ($n=90$) and death group ($n=47$) according to the survival condition of ALI patients. ALI patients were divided into low middle risk group ($n=74$) and high risk group ($n=63$) according to the acute physiology and chronic health score system II (APACHE II). Real-time fluorescent quantitative PCR was used to detect the expression levels of plasma miR-221 and miR-300 in each group. Multivariate Logistic regression was used to analyze the risk factors of death in ALI patients. Draw the receiver operating characteristic curve (ROC curve) analysis of plasma miR-221 and miR-300 expression levels predicts the value of death in patients with ALI. **Results** The expression levels of plasma miR-221 and miR-300 in the death group were significantly higher than those in the survival group, the difference was statistically significant ($P<0.05$). The expression levels of plasma miR-221, miR-300 and mortality in the high risk group were significantly higher than those in the low middle risk group, the difference was statistically significant ($P<0.05$). Multivariate Logistic regression analysis showed

* 基金项目:海南省医药卫生科研基金项目(18A200005)。
作者简介:曾宗鼎,男,副主任医师,主要从事临床呼吸系统疾病研究。
本文引用格式:曾宗鼎,邢崇浩,郑辉才,等.急性肺损伤患者血浆 miR-221 及 miR-300 表达水平及与预后相关性分析[J].国际检验医学杂志,2021,42(5):545-548.

that the increased expression levels of plasma miR-221 ($OR = 3.270, 95\%CI: 2.247 - 7.115$) and miR-300 ($OR = 2.683, 95\%CI: 1.715 - 6.207$) were independent risk factors for ALI death. ROC curve analysis showed that the plasma miR-221, miR-300 expression levels predicts the optimal cutoff value of death in patients with ALI were 2.80, 1.73, respectively. Two joint predict the area under the curve ($0.907, 95\%CI: 0.858 - 0.974$) of death in patients with ALI were the largest. **Conclusion** Plasma miR-221 and miR-300 expression levels associated with poor prognosis of patients with ALI, are the independent risk factors of death in patients with ALI, and the two joint for predicting death ALI has a certain value.

Key words: acute lung injury; miR-221; miR-300; prognosis

急性肺损伤(ALI)是一种气道及肺实质内急性炎性反应的重症呼吸系统疾病,其起病急骤,病情进展迅速,病死率极高,对患者生命健康造成极大的威胁^[1]。微小核糖核酸(miRNA)作为一类新型的基因调控分子,参与调控细胞的增殖、凋亡、侵袭、迁移和分化等过程,可通过影响靶基因的表达而调控炎症通路和免疫反应,在 ALI 发病过程中起重要作用^[2-3]。近年来的研究发现,miR-221 及 miR-300 在 ALI 中发生差异表达,有望成为治疗 ALI 的潜在靶点^[4-5]。本研究通过检测 ALI 患者血浆 miR-221 及 miR-300 表达水平,探讨血浆 miR-221 及 miR-300 表达水平与 ALI 患者预后的关系,旨在为 ALI 的诊治提供参考依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2016 年 1 月至 2019 年 6 月三亚中心医院收治的 ALI 患者 137 例,男性 87 例、女性 50 例,年龄 31~83 岁,平均(56.82±10.24)岁。纳入标准:符合中华医学会呼吸病学分会制订的 ALI 诊断标准^[6],并结合临床症状及体征确诊。排除标准:临床诊断不明确者,合并恶性肿瘤、血液系统疾病及其他呼吸系统疾病者。本研究经本院伦理委员会批准,并与患者或家属签署知情同意书。

1.2 研究方法 收集 ALI 患者一般资料,包括年龄、性别、体质量指数、病因、心率、呼吸频率、平均动脉压、呼气末正压、动脉二氧化碳分压及动脉血氧分压等。以 ALI 患者发病当天为研究起点,ALI 患者痊愈出院或死亡作为研究终点,将其分为存活组(90 例)和死亡组(47 例)。对所有 ALI 患者采用急性生理学与慢性健康状况评分系统 II (APACHE II)评分系统软件计算 APACHE II 评分值,APACHE II 评分>20 分为高危组(63 例),APACHE II 评分≤20 分为低中危组(74 例)。

1.3 miR-221 及 miR-300 检测 所有 ALI 患者均于

发病当天采集空腹静脉血 5 mL 置于乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝管中,离心分离血浆。采用 ABI 7500 型荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)进行实时荧光定量 PCR。miRNA 逆转录反应体系:5 μL RNA 模板,3 μL U6 及 miRNA 特异性茎环引物,0.15 μL 100 mmol/L 脱氧核糖核苷酸(dNTPs),1.00 μL 逆转录酶(50 U/μL),1.50 μL 10×反转录缓冲液,0.19 μL RNase 抑制剂(20 U/μL),4.16 μL 无菌三蒸水;反应条件:16 ℃ 30 min、42 ℃ 30 min、85 ℃ 5min。PCR 总反应体系为 20 μL:1 μL 引物及探针 Mix(20×),10 μL TaqMan 通用混合物溶液(2×),1.33 μL 反转录产物 cDNA,7.67 μL 无核酸酶的水;扩增条件:95 ℃ 10 min 1 个循环,95 ℃ 15 s、60 ℃ 60 s 进行 45 个循环。每个反应体系中荧光信号达到所设定的阈值的经历的循环数即为 Ct 值,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 miR-221 及 miR-300 的表达水平。

1.4 统计学处理 采用 SPSS20.0 统计软件分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两独立样本均数的比较采用成组 *t* 检验。计数资料以百分率(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验。应用多因素 Logistic 回归分析 ALI 患者死亡的危险因素。绘制受试者工作特征曲线(ROC 曲线)分析血浆 miR-221 及 miR-300 表达水平对 ALI 患者死亡的预测价值,ROC 曲线下面积(AUC)比较采用 *Z* 检验。*P*<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 死亡组和存活组一般资料比较 死亡组平均动脉压、呼气末正压及 APACHE II 评分与存活组比较,差异均有统计学意义(*P*<0.05)。两组性别、年龄、体质量指数、病因、呼吸频率、心率、动脉血氧分压及动脉二氧化碳分压比较,差异均无统计学意义(*P*>0.05)。见表 1。

表 1 死亡组和存活组一般资料比较

项目	存活组(<i>n</i> = 90)	死亡组(<i>n</i> = 47)	χ^2/t	<i>P</i>
性别[男性, <i>n</i> (%)]	55(61.1)	32(68.1)	0.648	0.421
年龄($\bar{x} \pm s$, 岁)	56.20 ± 10.17	57.52 ± 10.38	1.562	0.147
体质量指数($\bar{x} \pm s$, kg/m ²)	23.48 ± 2.26	23.14 ± 2.30	0.695	0.542

续表 1 死亡组和存活组一般资料比较

项目	存活组(<i>n</i> = 90)	死亡组(<i>n</i> = 47)	χ^2/t	<i>P</i>
病因[<i>n</i> (%)]			0.173	0.679
感染	62(68.9)	32(68.1)		
创伤	18(20.0)	12(25.5)		
胰腺炎	6(6.7)	2(4.3)		
其他	4(4.4)	1(2.1)		
呼吸频率($\bar{x} \pm s$, 次/min)	25.28 ± 4.83	25.90 ± 5.12	0.914	0.303
心率($\bar{x} \pm s$, 次/min)	105.25 ± 16.13	107.28 ± 17.37	0.940	0.292
平均动脉压($\bar{x} \pm s$, mm Hg)	83.68 ± 16.93	61.62 ± 13.56	4.311	0.030
呼气末正压($\bar{x} \pm s$, cm H ₂ O)	8.40 ± 2.18	12.87 ± 2.68	4.402	0.018
动脉血氧分压($\bar{x} \pm s$, mm Hg)	61.73 ± 14.50	60.48 ± 14.20	0.746	0.517
动脉二氧化碳分压($\bar{x} \pm s$, mm Hg)	37.40 ± 7.28	39.27 ± 7.62	0.985	0.251
APACHE II 评分($\bar{x} \pm s$, 分)	13.50 ± 3.65	24.80 ± 5.52	9.286	<0.001

2.2 死亡组和存活组血浆 miR-221 及 miR-300 表达水平比较 死亡组血浆 miR-221 及 miR-300 表达水平明显高于存活组, 差异均有统计学意义(*P* < 0.05)。见表 2。

表 2 死亡组和存活组血浆 miR-221 及 miR-300 表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	miR-221	miR-300
存活组	90	1.73 ± 0.82	0.92 ± 0.45
死亡组	47	3.96 ± 1.74 ^a	2.70 ± 1.26 ^a

注:与存活组比较,^a*P* < 0.05。

2.3 高危组和低中危组血浆 miR-221、miR-300 表达水平及病死率比较 高危组血浆 miR-221、miR-300 表达水平及病死率均明显高于低中危组, 差异均有统计学意义(*P* < 0.05)。见表 3。

2.4 多因素 Logistic 回归分析 ALI 患者死亡的危险因素 以 ALI 患者是否发生死亡为因变量(死亡组: *Y* = 1, 存活组: *Y* = 0), 将存活组和死亡组有统计学意义的项目: 平均动脉压、呼气末正压、APACHE II 评分、血浆 miR-221 及 miR-300 表达水平进行多因素 Logistic 回归分析, 发现 APACHE II 评分、血浆 miR-221 及 miR-300 表达水平升高是 ALI 患者死亡的独立危险因素, 其 *OR* (95% *CI*) 值分别为 2.490 (1.583 ~ 4.206)、3.270 (2.247 ~ 7.115)、2.683 (1.715 ~ 6.207)。见表 4。

2.5 血浆 miR-221 及 miR-300 表达水平预测 ALI

患者死亡的价值 血浆 miR-221 及 miR-300 表达水平预测 ALI 患者死亡的最佳截断值分别为 2.80、1.73。miR-221 及 miR-300 二者联合预测 ALI 患者死亡的 AUC 明显高于单项 miR-221、miR-300, 差异有统计学意义(*Z* = 4.426、4.705, *P* < 0.05), 其灵敏度和特异度为 92.0% 和 84.2%。见图 1 和表 5。

表 3 高危组和低中危组血浆 miR-221、miR-300 表达水平及病死率比较

组别	<i>n</i>	miR-221 ($\bar{x} \pm s$)	miR-300 ($\bar{x} \pm s$)	病死率 [<i>n</i> (%)]
低中危组	74	2.04 ± 0.96	1.18 ± 0.63	5(6.8)
高危组	63	3.57 ± 1.62 ^a	2.36 ± 1.05 ^a	42(66.7) ^a

注:与低中危组比较,^a*P* < 0.05。

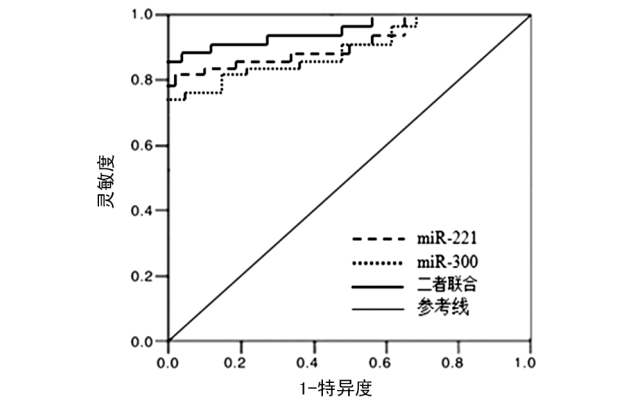


图 1 血浆 miR-221 及 miR-300 表达水平预测 ALI 患者死亡的 ROC 曲线

表 4 多因素 Logistic 回归分析 ALI 患者死亡的危险因素

因素	β	<i>SE</i>	<i>Wald</i>	<i>OR</i> (95% <i>CI</i>)	<i>P</i>
平均动脉压	0.068	0.017	1.914	0.972(0.862 ~ 1.270)	0.183
呼气末正压	0.140	0.028	1.983	1.184(0.915 ~ 1.658)	0.107

续表 4 多因素 Logistic 回归分析 ALI 患者死亡的危险因素

因素	β	SE	Wald	OR(95%CI)	P
APACHE II 评分	0.973	0.725	7.116	2.490(1.583~4.206)	<0.001
miR-221	1.360	0.940	10.520	3.270(2.247~7.115)	<0.001
miR-300	1.150	0.782	8.905	2.683(1.715~6.207)	<0.001

表 5 血浆 miR-221 及 miR-300 表达水平预测 ALI 患者死亡的价值

项目	最佳截断值	AUC(95%CI)	灵敏度(%)	特异度(%)	阳性预测值(%)	阴性预测值(%)	阳性似然比	阴性似然比
miR-221	2.80	0.835(0.776~0.895)	84.2	78.3	81.5	81.6	3.880	0.202
miR-300	1.73	0.802(0.748~0.863)	81.7	76.0	79.2	79.0	3.404	0.241
二者联合	—	0.907(0.858~0.974)	92.0	84.2	87.4	89.0	5.822	0.095

注：—表示无数据。

3 讨 论

ALI 是一种病死率高、严重危害人类健康的疾病。如何早期预测 ALI 患者病情严重程度及预后,进而针对其进行个体化治疗,对提高临床预后及降低病死率具有重要意义。ZHENG 等^[7]研究表明,miRNA 参与了 ALI 的发生、发展,在 ALI 炎性反应和细胞凋亡中起着重要的调控作用,将有望成为 ALI 的新型生物标志物和治疗新靶点。

本研究中死亡组血浆 miR-221 及 miR-300 表达水平均明显高于存活组,高危组血浆 miR-221、miR-300 表达水平及病死率均明显高于低中危组,差异有统计学意义($P<0.05$)。这说明血浆 miR-221 及 miR-300 表达水平升高与 ALI 患者的病情严重程度有关,血浆 miR-221 及 miR-300 表达水平高的 ALI 患者预后较差,发生死亡的风险较高。WANG 等^[8]研究表明,ALI 肺组织 miR-221 表达水平显著升高,miR-221 的上调则加重了脂多糖诱导的肺部炎症,在 ALI 炎症调节中发挥重要作用。CAO 等^[9]研究发现,在 ALI 患者 miRNA 表达水平明显升高,且 miRNA 表达水平变化与 ALI 患者病情严重程度和预后密切相关。

本研究应用多因素 Logistic 回归分析,APACHE II 评分、血浆 miR-221 及 miR-300 水平升高是 ALI 患者死亡的独立危险因素。CHHANGANI 等^[10]研究显示,随着 APACHE II 评分分值增高,重症患者医院感染率、住院病死率均明显升高,APACHE II 评分对预测重症患者的预后有一定的应用价值。本研究 ROC 曲线显示,miR-221 及 miR-300 二者联合预测 ALI 患者死亡的 AUC 最大,其灵敏度和特异度较高。说明 miR-221 及 miR-300 二者联合检测有助于提高预测 ALI 患者死亡的价值。ZHAO 等^[11]研究指出,miR-221 的表达增强了脂多糖刺激下促炎细胞因子的产生,可加重急性肺损伤和炎性反应,提示 miR-

221 的异常表达参与炎症性肺疾病的发生发展。FERRUELO 等^[12]研究认为,miRNA 是一类新的基因表达途径,在炎症或凋亡中发挥重要作用,可作为 ALI 诊断及预后的生物标志物。LU 等^[13]研究发现,miRNA 与 ALI 的疾病发展和疾病严重性有关,可作为 ALI 预后评估的生物标志物,同时也为临床治疗 ALI 提供新的思路。但本研究为单中心的小样本研究,其结论可能存在一定的片面性和局限性,今后仍需更多的临床研究来证实。

血浆 miR-221 及 miR-300 表达水平升高与 ALI 患者预后不良相关,是 ALI 患者死亡的独立危险因素,有望作为预测 ALI 患者预后的新型生物标志物。

参考文献

[1] TOY P. Update on transfusion-related acute lung injury [J]. Clin Adv Hematol Oncol, 2019, 17(7): 378-381.

[2] PARK J, JEONG S, PARK K, et al. Expression profile of microRNAs following bone marrow-derived mesenchymal stem cell treatment in lipopolysaccharide-induced acute lung injury[J]. Exp Ther Med, 2018, 15(6): 5495-5502.

[3] PATTARAYAN D, THIMMULAPPA R K, RAVIKUMAR V, et al. Diagnostic potential of extracellular microRNA in respiratory diseases[J]. Clin Rev Allergy Immunol, 2018, 54(3): 480-492.

[4] LEE H, ZHANG D, WU J, et al. Lung epithelial cell-derived microvesicles regulate macrophage migration via microRNA-17/221-induced integrin β 1 recycling[J]. J Immunol, 2017, 199(4): 1453-1464.

[5] CAO W, DAI H, YANG S, et al. Increased serum miR-300 level serves as a potential biomarker of lipopolysaccharide-induced lung injury by targeting $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ [J]. Pharmazie, 2017, 72(1): 5-9.

[6] 宋元林, 白春学. 急性肺损伤和急性呼吸窘迫综合征[J]. 中华急诊医学杂志, 2012, 21(3): 229-234.

[7] ZHENG Y, LIU S Q, SUN Q, et al. Pla-(下转第 553 页)

PDGF-B 和 PDGFR-β 蛋白参与了 SLE 肾损伤的发病机制,对 LN 的判断具有重要临床价值。

参考文献

[1] 任雪景,阎磊,李纳,等. T 淋巴细胞亚群和血脂水平与系统性红斑狼疮疾病活动度的相关性研究[J]. 中华实用诊断与治疗杂志,2019,33(2):132-135.

[2] ALMAANI S,MEARA A,ROVIN B H. Update on lupus nephritis[J]. Clin J Am Soc Nephrol,2017,12(5):825-835.

[3] HUBER L,BIRK R,ROTTER N,et al. Effect of small-molecule tyrosine kinase inhibitors on PDGF-AA/BB and PDGFRα/β expression in SCC according to HPV16 status [J]. Anticancer Res,2020,40(2):825-835.

[4] OLSEN R S,DIMBERG J,GEFFERS R,et al. Possible role and therapeutic target of PDGF-D signalling in colorectal cancer[J]. Cancer Invest,2019,37(2):99-112.

[5] BUHL E M,DJUDJAJ S,JANKA B,et al. The role of PDGF-D in healthy and fibrotic kidneys[J]. Kidney Int,2016,89(4):848-861.

[6] 陈志强. 美国风湿病学会对系统性红斑狼疮修订的最新标准[J]. 国外医学(皮肤性病学分册),1998,35(6):367-368.

[7] LUTALO P M,JORDAN N,D'CRUZ D P. Which dose of steroids and which cytotoxics for severe lupus [J]. Presse Med,2014,43(6):157-165.

[8] TANG Y Z,ZHANG W R,ZHU M F,et al. Lupus nephritis pathology prediction with clinical indices[J]. Sci

Rep,2018,8(1):10231-10237.

[9] YI Y,YANG M Y,WANG K,et al. Excessive activation of the TLR9/TGF-β1/PDGF-B pathway in the peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus[J]. Arthritis Res Ther,2017,19(1):70-81.

[10] BUHL E M,DJUDJAJ S,KLINKHAMMER B M,et al. Dysregulated mesenchymal PDGFR-β drives kidney fibrosis[J]. EMBO Mol Med,2020,12(3):11021-11028.

[11] CHAIGNE B,CHIZZOLINI C,PERNEGER T,et al. Impact of disease activity on health-related quality of Life in systemic lupus erythematosus-a cross-sectional analysis of the swiss systemic lupus erythematosus cohort study (SSCS)[J]. BMC Immunol,2017,18(1):17-18.

[12] ALAN S,SALVA E,YILMAZ I,et al. The effectiveness of chitosan-mediated silencing of PDGF-B and PDGFR-β in the mesangial proliferative glomerulonephritis therapy [J]. Exp Mol Pathol,2019,110(10):104280-104288.

[13] SALVA E,ÖZBAS S,AKBUGA T J,et al. The inhibition of glomerular mesangial cell proliferation by siPDGF-B and siPDGFRβ containing chitosan nanoplexes[J]. AAPS Pharm Sci Tech,2017,18(4):1031-1042.

[14] CHAUHAN S K,VIKAS V S,RICHA R,et al. Distinct autoantibody profiles in systemic lupus erythematosus patients are selectively associated with TLR7 and TLR9 upregulation[J]. J Clin Immunol,2013,33(5):954-964.

(收稿日期:2020-05-11 修回日期:2021-01-06)

(上接第 548 页)

sma microRNAs levels are different between pulmonary and extrapulmonary ARDS patients; a clinical observational study[J]. Ann Intensive Care,2018,8(1):23.

[8] WANG T,JIANG L,WEI X,et al. Inhibition of miR-221 alleviates LPS-induced acute lung injury via inactivation of SOCS1/NF-κB signaling pathway[J]. Cell Cycle,2019,18(16):1893-1907.

[9] CAO Y,LYU Y I,TANG J,et al. MicroRNAs;novel regulatory molecules in acute lung injury/acute respiratory distress syndrome[J]. Biomed Rep,2016,4(5):523-527.

[10] CHHANGANI N P,AMANDEEP M,CHOUDHARY S,et al. Role of acute physiology and chronic health evaluation II scoring system in determining the severity and prognosis of critically ill patients in pediatric intensive

care unit[J]. Indian J Crit Care Med,2015,19(8):462-465.

[11] ZHAO D,ZHUANG N,DING Y,et al. MiR-221 activates the NF-κB pathway by targeting A20[J]. Biochem Biophys Res Commun,2016,472(1):11-18.

[12] FERRUELO A,PENUELAS Ó,LORENTE J A. MicroRNAs as biomarkers of acute lung injury[J]. Ann Transl Med,2018,6(2):34.

[13] LU X G,KANG X,ZHAN L B,et al. Circulating miRNAs as biomarkers for severe acute pancreatitis associated with acute lung injury [J]. World J Gastroenterol,2017,23(41):7440-7449.

(收稿日期:2020-05-10 修回日期:2021-01-09)