

·综述·

微小 RNA 在脓毒症临床实践中的应用

葛晨 董士民

脓毒症是指感染(可疑或确诊)及其引起的全身炎症反应^[1],是危重病、严重创伤、烧伤、大手术以及术后感染等常见的并发症。据统计,严重脓毒症和脓毒性休克的病死率为 40%~50%,甚至高达 80%^[2],已经成为重症监护病房(ICU)患者的主要死亡原因。虽然近年来关于国际脓毒症的指南已得到广泛应用,但病死率仍未达到可令人接受的程度。因此,寻找脓毒症的生物标志物,早期进行病情程度评估和预后判断,及时临床干预治疗,阻抑其向严重脓毒症发展,对降低脓毒症患者病死率具有重要意义。最近微小 RNA(microRNA, miRNA)在脓毒症中的应用价值受到人们的重视,成为脓毒症相关研究的热点。

miRNA 是一类长度为 21~25 个核苷酸的內源性非编码单链 RNA 分子。目前人类基因组已被检测出大约有 700 种 miRNA,其作用的靶基因可调控人类 30%以上的基因表达。它通过识别靶 mRNA 的 3' 非翻译区(3'UTR)并与之互补结合,抑制靶 mRNA 翻译或促进其降解^[3-5]。研究显示,miRNA 广泛参与人体生长、分化、免疫应答及炎症反应等生理过程,并且其表达及功能失调可能导致心血管疾病、肿瘤、白血病和全身炎症反应综合征(SIRS)等病理现象^[6-8]。现将近几年 miRNA 在脓毒症应用方面的相关研究进展进行综述。

1 miR-150

有研究通过基因芯片技术分析全基因组 miRNA 的表达谱,比较健康对照组和早期脓毒症组外周血白细胞中 miRNA 的表达,发现 miR-150、miR-486、miR-182 和 miR-342-5P 的表达存在差异,而且 miR-150 在两组中表达差异最为显著;通过聚合酶链反应(PCR)进一步证实,在脓毒症第 1 天,血浆中 miR-150 表达水平即显著降低($P=0.001$)^[9],说明血浆中 miR-150 可能作为脓毒症早期诊断的生物学标志物,且 miR-150 表达水平与评价病情严重程度的序贯器官衰竭评分(SOFA)相关。研究发现,脓毒症早期血清白细胞介素-18(IL-18)水平升高,且脓毒症死亡者 IL-18 水平高于存活者,提示血清 IL-18 水平可用来评价脓毒症病情严重程度^[10]。还有研究发现,miR-150 与 IL-18 的基因编码序列是互补的,提示 miR-150/IL-18 可用于脓毒症病情严重程度的评价。但也有研究显示,miR-150 不能用于脓毒症和 SIRS 患者的鉴别诊断^[11]。

2 miR-146a 和 miR-223

脓毒症患者存在明显的核转录因子- κ B(NF- κ B)活化,

伴随着肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的过量表达^[12]。刘芬等^[13]通过对脂多糖(LPS)刺激的大鼠肺泡巨噬细胞转染 miR-146a 前体发现,肺泡巨噬细胞中炎症因子 TNF- α 表达水平下调,表明 miR-146a 能抑制 LPS 诱导的炎症反应。而曾振国等^[14]也通过干预促进 miR-146a 表达后发现,炎症反应减轻;也有研究表明其同时对固有免疫也有特殊的调节作用^[15]。Wang 等^[16]通过对 50 例脓毒症患者、30 例 SIRS 患者和 20 例健康对照者血清 miRNA 表达水平进行定量 PCR 分析发现,脓毒症患者血清 miR-146a 和 miR-223 水平较 SIRS 患者及健康对照者显著降低,脓毒症患者血清 IL-6 水平高于 SIRS 患者,而 C-反应蛋白(CRP)含量相差不大。应用受试者工作特征曲线(ROC 曲线)分析比较了 miRNA 和炎症因子预测脓毒症的价值,结果显示,miR-223 的 ROC 曲线下面积(AUC)最大,为 0.858[95%可信区间(95%CI)为 0.748~0.968],特异度和敏感度分别为 100%和 80%;而 miR-146a 的 AUC 为 0.804(95%CI 为 0.679~0.928),特异度和敏感度分别为 100%和 63.3%;IL-6 的 AUC 低于 miR-223 和 miR-146a,为 0.785(95%CI 为 0.669~0.901)。由此研究提示血清 miR-223 和 miR-146a 可能成为新的诊断脓毒症的生物学标志物,更重要的是这两种 miRNA 可以区分脓毒症和非感染 SIRS。但是由于该研究样本量小,未对血清中 miR-146a 和 miR-223 水平与疾病严重程度进行相关性分析,故其应用价值尚需进一步探讨。

新近 Wang 等^[17]应用相对定量 PCR 方法分析 6 例非感染 SIRS 患者和 4 例脓毒症患者的 miR-146a,结果显示脓毒症患者 miR-146a 表达水平明显下降($P=0.01$);随后研究者又对 8 例非感染 SIRS 患者和 10 例脓毒症患者进行了同样的分析,也得出相同结果($P=0.027$)。但是根据 miR-146a 的标准曲线计算第一组患者的绝对量发现,两组 miR-146a 表达未见明显差异;同样应用 ROC 曲线对第二组患者进行分析得出,miR-146a 的 AUC 为 0.813,当 miR-146a 相对表达量为 7.79 时,miRNA-146a 作为预测指标的特异度和敏感度分别为 87.5%和 60.0%。

3 miR-499-5p

Wang 等^[18]收集 166 例 ICU 的脓毒症患者和 24 例健康对照者的血样,采用 PCR 方法定量检测 miR-223、miR-15b、miR-483-5p、miR-499-5p、miR-122 和 miR-193b 的表达水平。该研究结果显示,轻微脓毒症患者的 miRNA 表达水平与健康对照者有显著不同;而严重脓毒症、脓毒性休克患者只有 miR-223($P<0.001$)、miR-499-5p($P=0.001$)、miR-122($P=0.001$)和 miR-193b($P<0.001$)与健康对照者相比显示出差别;但在这 4 种 miRNA 中,只有 miR-223($P=0.035$)和

miR-499-5p ($P<0.001$)能区分轻微脓毒症、严重脓毒症和脓毒性休克。研究人员应用 ROC 曲线得出 miR-499-5p 和 miR-223 的 AUC 分别为 0.686 (95%CI 为 0.592 ~ 0.779) 和 0.608 (95%CI 为 0.519 ~ 0.697); 当 miR-223 相对表达量为 0.625 时,其评价脓毒症严重程度的特异度达 83.72%。随后,研究者用 logistic 回归模型分析 miR-223、miR-499-5p、SOFA 评分、急性生理学与慢性健康状况评分系统 II (APACHE II) 评分、CRP 和血清降钙素原(PCT),结果只有 miR-499-5p 和 SOFA 评分进入了回归分析的最后方程,最终得出结论,miR-499-5p 和 SOFA 评分在评价轻微脓毒症、严重脓毒症和脓毒性休克方面要优于其他指标。

4 miR-574-5p 和 miR-297

Wang 等^[19]筛选出 118 例脓毒症患者,并对其进行定量 PCR 分析;同时应用基因芯片技术对 12 例存活患者和 12 例死亡患者进行全基因组 miRNA 分析,以识别差异表达的 miRNA。结果发现 miR-574-5p 和 miR-297 在两组间统计学差异明显,且 miR-574-5p 与 SOFA 评分联合评估脓毒症患者病情严重程度和预后的 AUC 为 0.932,特异度为 91.84%,敏感度为 78.13%;应用微阵列分析技术发现,miR-574-5p 与脓毒症患者的死亡呈正相关,而 miR-297 与脓毒症患者的生存相关。

5 miR-122

脓毒症患者存在过度的炎症反应,同时也存在凝血功能障碍^[20],而且仅通过常规凝血指标的变化不能准确反映治疗结果的全面性^[21]。Wang 等^[22]研究表明,血清中 miRNA 水平与脓毒症凝血功能也具有一定的相关性。研究者收集 123 例初入 ICU 和 45 例分别入住 ICU 1、3、5、7、10、14 d 的脓毒症患者,根据国际血栓和出血学会的弥散性血管内凝血(DIC)评分系统将脓毒症患者分为凝血异常组和凝血正常组,结果发现凝血异常组脓毒症患者血清中 miR-122 的表达水平显著升高。同时研究人员还发现,血清中 miR-122 水平分别与活化部分凝血活酶时间(APTT, $R=0.426$, $P=0.008$)、纤维蛋白原(FIB, $R=0.398$, $P=0.008$)、抗凝血酶 III ($R=0.913$, $P<0.001$)相关;而且血清 miR-122 水平与丙氨酸转氨酶(ALT)和天冬氨酸转氨酶(AST)的 Pearson 相关系数分别为 0.663 和 0.445。邓婕等^[23]的研究也得出同样结论,认为血清 miR-122 可以作为早期脓毒症的特异性诊断标志物。

6 miR-133a

Tacke 等^[24]通过对盲肠结扎穿孔术模型小鼠研究后发现,miR-133a 表达发生显著变化。随后研究人员将 miR-133a 用于人类研究也发现,血清 miR-133a 表达水平在脓毒症患者中明显增加;相关性分析表明,血清 miR-133a 水平与疾病严重程度、炎症和细菌感染的经典标志物、器官损伤程度明显相关,可评价疾病预后及转归。

7 其他

Wang 等^[25]采用定量 PCR 技术对 117 例脓毒症存活患者及 97 例脓毒症死亡患者血清中的 miRNA 进行了检测,发现脓毒症死亡组 miR-16 ($P<0.001$)和 miR-223 ($P<0.001$)的

表达水平显著低于脓毒症存活组,而 miR-122 ($P<0.001$)、miR-15a ($P=0.015$)、miR-193b ($P<0.001$)和 miR-483-5p ($P<0.001$)的表达水平则均较脓毒症存活组显著升高;且这 6 个 miRNA 预测脓毒症病死率的 AUC 从 0.610 (95%CI 为 0.523 ~ 0.697) 到 0.790 (95%CI 为 0.719 ~ 0.861)。同时对这 6 个 miRNA、APACHE II 评分及 SOFA 评分进行多因素 logistic 回归分析,结果显示 miR-16 是降低脓毒症患者死亡风险的相关因素,而 miR-193b、miR-483-5p、miR-15a 及 APACHE II 评分则被认定是脓毒症患者死亡的危险因素。还有研究发现,miR-15a 可以区分脓毒症和 SIRS,而 miR-16 可以作为区分脓毒症和健康对照的标志物^[26]。

Barnett 等^[27]通过定量 PCR 发现,脓毒症生存组 miR-21、miR-183、miR-301a、miR-652、miR-672 表达较健康对照组上调;并发现脓毒症生存组和死亡组中有 18 种 miRNA 调节异常,其中包括 miR-15b、miR-178a、miR-672 等,结果提示 miRNA 可能与脓毒症预后相关。

Wang 等^[28]还通过对 9 例脓毒症存活患者和 9 例脓毒症死亡患者进行生物信息学软件分析和 Solexa 测序技术分析测得 650 个 miRNA,其中有 6 个新的 miRNA 在 24 例脓毒症死亡者和 32 例脓毒症存活者中通过定量 PCR 发现有差异表达,且这 6 个 miRNA 与 SOFA 评分、APACHE II 评分联合评价脓毒症患者预后及转归的 AUC 达 0.969,敏感度为 100%,特异度为 82.6%。

综上所述,miRNA 可能在脓毒症发生前高危患者的预防、发生后的诊疗和预后中发挥重大的作用。但迄今为止,有关 miRNA 在脓毒症中作用机制的研究并不完善,目前对已发现的脓毒症相关 miRNA 并没有完全精确的定位,对下游表达产物的变化有哪些影响,各个 miRNA 之间如何相互影响、相互作用等问题都处在起步阶段,而且至今并没有关于 miRNA 与脓毒症功能的直接研究。若要阐明 miRNA 在脓毒症中的调控通路和作用机制,探索脓毒症的靶向药物以及最佳治疗方案尚待进一步研究。

参考文献

- [1] 高戈,冯喆,常志刚,等. 2012 国际严重脓毒症及脓毒性休克诊疗指南[J]. 中华危重病急救医学,2013,25(8):501-505.
- [2] Galley HF. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis [J]. Br J Anaesth,2011,107(1):57-64.
- [3] Zhang C. MicroRNAs: role in cardiovascular biology and disease[J]. Clin Sci (Lond),2008,114(12):699-706.
- [4] Shi M,Guo N. MicroRNA expression and its implications for the diagnosis and therapeutic strategies of breast cancer [J]. Cancer Treat Rev,2009,35(4):328-334.
- [5] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell,2004,116(2):281-297.
- [6] Du T, Zamore PD. microPrimer: the biogenesis and function of microRNA[J]. Development,2005,132(21):4645-4652.
- [7] Calin GA,Croce CM. Genomics of chronic lymphocytic leukemia microRNAs as new players with clinical significance [J]. Semin Oncol,2006,33(2):167-173.
- [8] Lv G, Shao S, Dong H, et al. MicroRNA-214 protects cardiac myocytes against H_2O_2 -induced injury [J]. J Cell Biochem, 2014,115(1):93-101.
- [9] 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.
- [10] 孙荣青, 张少雷. 脓毒症早期血清白细胞介素-18 和 10 在疾病严重程度及预后评估中的价值研究[J]. 中国危重病急救医学, 2011, 23(5):299-301.
- [11] 曾小莉, 张韶岩, 张京岚, 等. 微小 RNA-150 在脓毒症患者外周白血细胞的表达及其临床意义[J]. 中国呼吸与危重监护杂志, 2011, 10(04):360-364.
- [12] 马朋林. 全身炎症反应综合征发生机制及临床干预[J]. 中华儿科杂志, 2006, 44(8):599-601.
- [13] 刘芬, 曾振国, 聂成, 等. 转染微小 RNA-146a 对肺泡巨噬细胞肿瘤坏死因子- α 表达的影响[J]. 中华危重病急救医学, 2013, 25(6):335-338.
- [14] 曾振国, 龚洪翰, 李勇, 等. 参附注射液对脂多糖诱导的肺泡巨噬细胞微小 RNA-146a 表达的影响[J]. 中国危重病急救医学, 2012, 24(3):166-169.
- [15] 李智鑫. miRNA-146a 与脓毒症[J]. 中国急救医学, 2013, 33(3):275-277.
- [16] Wang JF, Yu ML, Yu G, et al. Serum miR-146a and miR-223 as potential new biomarkers for sepsis [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 394(1):184-188.
- [17] Wang L, Wang HC, Chen C, et al. Differential expression of plasma miR-146a in sepsis patients compared with non-sepsis-SIRS patients[J]. Exp Ther Med, 2013, 5(4):1101-1104.
- [18] Wang HJ, Zhang PJ, Chen WJ, et al. Four serum microRNAs identified as diagnostic biomarkers of sepsis [J]. J Trauma Acute Care Surg, 2012, 73(4):850-854.
- [19] Wang H, Meng K, Chen WJ, et al. Serum miR-574-5p: a prognostic predictor of sepsis patients[J]. Shock, 2012, 37(3):263-267.
- [20] 梁英健, 张晓娟, 李鑫, 等. 脓毒症患者血中组织因子、血管性血友病因子与肿瘤坏死因子- α 改变的临床意义[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2012, 19(2):104-106.
- [21] 唐丽群, 彭娜, 潘志国, 等. 血必净注射液对严重脓毒症患者凝血指标及预后的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2012, 19(3):132-136.
- [22] Wang HJ, Deng J, Wang JY, et al. Serum miR-122 levels are related to coagulation disorders in sepsis patients [J]. Clin Chem Lab Med, 2014, 52(6):927-933.
- [23] 邓婕, 王慧娟, 苏龙翔, 等. 血清 MicroRNA-122 作为脓毒症诊断特异性标志物的研究[J]. 武警医学, 2013, 24(5):383-386.
- [24] Tacke F, Roderburg C, Benz F, et al. Levels of circulating miR-133a are elevated in sepsis and predict mortality in critically ill patients[J]. Crit Care Med, 2014, 42(5):1096-1104.
- [25] Wang HJ, Zhang PJ, Chen WJ, et al. Serum microRNA signatures identified by Solexa sequencing predict sepsis patients' mortality: a prospective observational study[J]. PLoS One, 2012, 7(6):e38885.
- [26] Wang HJ, Zhang PJ, Chen WJ, et al. Evidence for serum miR-15a and miR-16 levels as biomarkers that distinguish sepsis from systemic inflammatory response syndrome in human subjects [J]. Clin Chem Lab Med, 2012, 50(8):1423-1428.
- [27] Barnett RE, Keskey RC, Rao JM, et al. Poor outcome in bacterial peritonitis is associated with dysregulated microRNAs and an increased inflammatory response [J]. Surgery, 2013, 154(3):521-527.
- [28] Wang HJ, Zhang PJ, Chen WJ, et al. Characterization and Identification of novel serum microRNAs in sepsis patients with different outcomes[J]. Shock, 2013, 39(6):480-487.

(收稿日期:2014-02-27)

(本文编辑:李银平)

·读者·作者·编者·

本刊常用的不需要标注中文的缩略语(三)

腹腔内压力(Intraperitoneal pressure, IAP)

腹腔内高压(Intra abdominal hypertension, IAH)

腹腔灌注压(Abdominal perfusion pressure, APP)

平均动脉压(mean arterial pressure, MAP)

中心静脉压(central venous pressure, CVP)

动脉血氧分压(arterial partial pressure of oxygen, PaO₂)

动脉血二氧化碳分压

(arterial partial pressure of carbon dioxide, PaCO₂)

呼气末二氧化碳分压

(end tidal carbon dioxide partial pressure, P_{ET}CO₂)

气道峰压(peak inspiratory pressure, PIP)

气道平台压(platform of the airway pressure, Pplat)

脉搏(经皮)血氧饱和度(percutaneous oxygen saturation, SpO₂)

左室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)

氧合指数(oxygenation index, PaO₂ / FiO₂, OI)

心肌肌钙蛋白 T(cardiac troponin T, cTnT)

肌酐清除率(creatinine clearance rate, CCr)

丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)

天冬氨酸转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)

乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)

超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)

谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)

二胺氧化酶(diamine oxidase, DAO)

碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AKP)

谷氨酰胺转移酶(glutamine transferase, GST)

单核细胞趋化蛋白-1

(monocyte chemo-attractant protein-1, MCP-1)

诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)

肠脂肪酸结合蛋白(intestinal fatty acid binding protein, IFABP)

总胆红素(total bilirubin, TBil)

N 末端 B 型钠尿肽前体

(N-terminal pro-B-type natriuretic peptide, NT-proBNP)

活化部分凝血活酶时间

(activated partial thromboplastin time, APTT)

凝血酶原时间(prothrombin time, PT)

凝血酶时间(thrombin time, TT)

国际标准化比值(international normalized ratio, INR)

基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMP)

天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶

(cysteine-containing aspartate-specific proteases, caspase)

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌

(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)

甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌

(methicillin sensitive *Staphylococcus aureus*, MSSA)