

微小 RNA-499 对脓毒症患者心肌损伤的诊断价值

杨永丽 何静 肖志英

【摘要】目的 探讨微小 RNA-499 (miR-499) 水平对脓毒症患者心肌损伤的诊断价值。**方法** 回顾性分析湖北省中山医院 2012 年 3 月至 2014 年 5 月收治 112 例脓毒症患者的临床资料。统计入院 24 h 内急性生理学及慢性健康状况评分系统 II (APACHE II) 评分; 超声心动图检查评估的左室射血分数 (LVEF); 采用双位点酶免疫法检测的心肌肌钙蛋白 I (cTnI) 水平; 采用免疫荧光法检测的 N 末端 B 型钠尿肽前体 (NT-proBNP) 水平; 采用双抗体夹心免疫发光法测定的 C-反应蛋白 (CRP) 及降钙素原 (PCT) 水平; 采用反转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测的血浆 miR-499 表达。以同期 20 例健康体检者作为对照组。采用 Pearson 分析 miR-499 与 LVEF、NT-proBNP、cTnI 及 APACHE II 评分的相关性; 绘制受试者工作特征曲线 (ROC), 评估 miR-499 对脓毒症心肌损伤的诊断价值。**结果** 与健康对照组比较, 脓毒症组患者心肌损伤严重, APACHE II 评分 (分: 23.45 ± 8.03 比 1.70 ± 0.90)、CRP (mg/L: 154 ± 64 比 8 ± 3)、PCT ($\mu\text{g/L}$: 14.65 ± 2.95 比 0.05 ± 0.02)、NT-proBNP (ng/L: $2\ 082.5 \pm 124.4$ 比 125.0 ± 81.5) 及 cTnI ($\mu\text{g/L}$: 3.7 ± 2.1 比 <0.01) 均明显升高, LVEF (0.523 ± 0.132 比 0.673 ± 0.122) 明显降低 (均 $P < 0.001$)。脓毒症组血浆 miR-499 水平较健康对照组升高了 (6.45 ± 1.06) 倍 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$: 6.46 ± 1.54 比 0.96 ± 0.14 , $t = 19.736$, $P < 0.001$)。脓毒症患者血浆 miR-499 水平与 LVEF 呈明显负相关 ($r = -0.492$, $P = 0.014$), 与 NT-proBNP、cTnI 呈显著正相关 ($r_1 = 0.551$, $r_2 = 0.614$, 均 $P = 0.001$), 而与 APACHE II 评分无相关性 ($r = 0.277$, $P = 0.163$)。血浆 miR-499 诊断脓毒症心肌损伤的 ROC 曲线下面积 (AUC) 为 0.838 [95% 可信区间 (95%CI) = 0.753 ~ 0.924], 当截断值为 5.53 时, 敏感度为 86.7%, 特异度为 90.8%。**结论** 脓毒症患者外周血 miR-499 表达水平升高, 可能成为脓毒症心肌损伤的诊断指标。

【关键词】 脓毒症; 心肌损伤; 微小 RNA-499; N 末端 B 型钠尿肽前体; 心肌肌钙蛋白 I; 左室射血分数

脓毒症是感染导致的全身炎症反应综合征 (SIRS), 也是诱发感染性休克、多器官功能障碍综合征 (MODS) 的首要病因^[1]。心脏是脓毒症时最常累及的器官之一, 如并发心肌损伤^[2-6], 病死率可高达 50% ~ 90%^[7-8]。因此, 早期识别、及时诊断脓毒症合并心肌损伤, 是提高脓毒症心肌损伤生存率的关键。微小 RNA-499 (miR-499) 是一种心肌特异性微小核糖核酸, 研究发现, 急性心肌梗死 (AMI) 及病毒性心肌炎患者血浆 miR-499 升高水平与心肌损伤程度呈正相关^[9-13]。但 miR-499 是否与脓毒症心肌损伤相关并不明确。本研究旨在观察脓毒症患者血浆 miR-499 与心功能障碍指标 N 末端 B 型钠尿肽前体 (NT-proBNP)、心肌肌钙蛋白 I (cTnI)、左室射血分数 (LVEF) 的相关性, 探讨 miR-499 对脓毒症心肌损伤的诊断价值。

1 资料与方法

1.1 病例入选及排除标准: 采用回顾性研究方法, 选择 2012 年 3 月至 2014 年 5 月本院收治的成年脓毒症患者; 诊断均符合 2001 年美国胸科医师协会 / 危重病医学会 (ACCP/SCCM) 的脓毒症诊断标准^[14-15]。排除标准: ① 年龄 < 18 岁; ② 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; ③ 心肺复苏术后; ④ 合并急性冠脉综合征; ⑤ 合并慢性肾功能不全; ⑥ 合并慢性心功能不全; ⑦ 妊娠期。以同期 20 例健康体检者作为对照。

本研究符合医学伦理学标准, 经医院伦理委员会批准。

1.2 观察指标及方法: 记录患者性别、年龄、感染情况, 入院 24 h 内急性生理学及慢性健康状况评分系统 II (APACHE II) 评分; LVEF、cTnI、NT-proBNP、C-反应蛋白 (CRP)、降钙素原 (PCT) 及 miR-499。

以超声心动图检查评估 LVEF 水平; 双位点酶免疫法检测 cTnI 水平。免疫荧光法检测 NT-proBNP 水平^[16]。双抗体夹心免疫发光法测定 CRP 和 PCT 水平, 反转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测血浆 miR-499 表达, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法统计参数。

1.3 统计学分析: 应用 SPSS 19.0 软件进行统计学处理。正态分布计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间比较采用两独立样本 t 检验; 计数资料采用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法; 相关性分析采用 Pearson 分析。绘制受试者工作特征曲线 (ROC), 评估血浆 miR-499 水平对脓毒症心肌损伤的诊断价值。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 患者一般临床特征: 共纳入脓毒症患者 112 例, 男性 67 例, 女性 45 例; 平均年龄 (66 ± 22) 岁; 感染源: 肺部 57 例 (占 50.9%), 腹部 34 例 (占 30.4%), 血源性 13 例 (占 11.6%),

表 1 脓毒症患者入院 24 h 内 APACHE II 评分、心功能指标及血浆 miR-499 表达与健康对照者的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数 (例)	APACHE II (分)	CRP (mg/L)	PCT ($\mu\text{g/L}$)	NT-proBNP (ng/L)	cTnI ($\mu\text{g/L}$)	LVEF	miR-499 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)
健康对照组	20	1.70 \pm 0.90	8 \pm 3	0.05 \pm 0.02	125.0 \pm 81.5	< 0.01	0.673 \pm 0.122	0.96 \pm 0.14
脓毒症组	112	23.45 \pm 8.03	154 \pm 64	14.65 \pm 2.95	2 082.5 \pm 124.4	3.7 \pm 2.1	0.523 \pm 0.132	6.46 \pm 1.54
<i>t</i> 值		20.597	20.643	36.875	116.872	76.325	2.203	19.736
<i>P</i> 值		< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

注: APACHE II 为急性生理学及慢性健康状况评分系统 II, CRP 为 C-反应蛋白, PCT 为降钙素原, NT-proBNP 为 N 末端 B 型钠尿肽前体, cTnI 为心肌肌钙蛋白 I, LVEF 为左室射血分数, miR-499 为微小 RNA-499

其他 8 例 (占 7.1%); 脓毒症分级: 一般脓毒症 38 例, 严重脓毒症 47 例, 脓毒性休克 27 例。以同期 20 例健康体检者作为对照组, 男性 12 例, 女性 8 例; 平均年龄 (65 \pm 19) 岁。两组性别及年龄比较差异无统计学意义 (均 $P > 0.05$), 说明资料均衡, 具有可比性。

2.2 两组心功能指标 (表 1): 与健康对照组比较, 脓毒症组 APACHE II 评分、CRP、PCT、NT-proBNP 及 cTnI 均明显升高, LVEF 明显降低, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.001$)。

2.3 两组 miR-499 表达量 (表 1): 脓毒症组血浆 miR-499 水平较健康对照组升高了 (6.45 \pm 1.06) 倍, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。

2.4 脓症患者 miR-499 与 LVEF、NT-proBNP、cTnI 及 APACHE II 评分的相关性分析 (表 2): 脓症患者血浆 miR-499 水平与 LVEF 呈负相关 ($P < 0.05$), 与 NT-proBNP、cTnI 水平呈正相关 (均 $P < 0.01$), 而与 APACHE II 评分无相关性 ($P > 0.05$)。

表 2 脓症患者血浆 miR-499 与 LVEF、NT-proBNP、cTnI 及 APACHE II 评分的相关性

指标	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值
miR-499 与 LVEF	-0.492	0.014
miR-499 与 NT-proBNP	0.551	0.001
miR-499 与 cTnI	0.614	0.001
miR-499 与 APACHE II	0.277	0.163

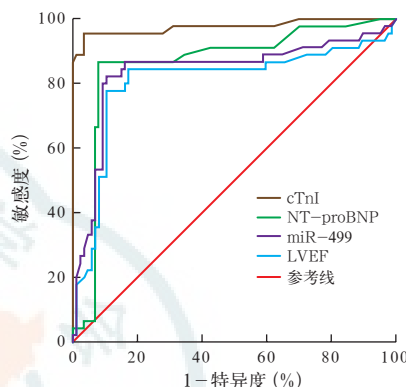
注: miR-499 为微小 RNA-499, LVEF 为左室射血分数, NT-proBNP 为 N 末端 B 型钠尿肽前体, cTnI 为心肌肌钙蛋白 I, APACHE II 为急性生理学及慢性健康状况评分系统 II

2.5 血浆 miR-499、LVEF、NT-proBNP 及 cTnI 水平对脓毒症心肌损伤的诊断价值 (图 1; 表 3): ROC 曲线分析结果显示, 与 LVEF、NT-proBNP 及 cTnI 相比, 血浆 miR-499 对脓毒症心肌损伤同样具有诊断价值, 当截断值为 5.53 时, 敏感度为 86.7%, 特异度为 90.8%。

3 讨论

脓毒症是局部或全身感染引起的 SIRS, 可导致 MODS, 其中又以心功能障碍最为常见。脓毒症所致的心功能障碍主要表现为心脏收缩功能、射血分数显著降低, 左心室舒张功能受损以及血管低反应性等^[2-4, 6, 17]。对于脓毒症诱导的心功能障碍, 早期诊断和治疗是提高存活率的关键。因此, 寻找新的反映心肌损伤特异性较高的指标具有重要临床意义。

miRNAs 是一类长约 21 ~ 25 个核苷酸的非编码单链



注: miR-499 为微小 RNA-499, LVEF 为左室射血分数, NT-proBNP 为 N 末端 B 型钠尿肽前体, cTnI 为心肌肌钙蛋白 I, ROC 为受试者工作特征曲线

图 1 血浆 miR-499、LVEF、NT-proBNP 及 cTnI 水平诊断脓毒症心肌损伤的 ROC 曲线

表 3 血浆 miR-499、LVEF、NT-proBNP 及 cTnI 水平诊断脓毒症心肌损伤的 ROC 曲线分析

指标	AUC	95%CI	截断值	敏感度 (%)	特异度 (%)
miR-499	0.838	0.753 ~ 0.924	5.53	86.7	90.8
LVEF	0.802	0.715 ~ 0.832	0.45	73.7	76.4
NT-proBNP	0.862	0.788 ~ 0.934	1 291	89.7	87.4
cTnI	0.972	0.845 ~ 0.932	0.46	93.7	97.4

注: miR-499 为微小 RNA-499, LVEF 为左室射血分数, NT-proBNP 为 N 末端 B 型钠尿肽前体, cTnI 为心肌肌钙蛋白 I, ROC 为受试者工作特征曲线, AUC 为 ROC 曲线下面积, 95%CI 为 95% 可信区间

RNA 分子, 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^[18]。研究发现, miRNAs 广泛参与细胞增殖^[19-21]、分化^[22]、凋亡^[23-25]及细胞转移^[26]等环节, 在生理及病理状态发挥重要的调控作用。miRNAs 在心力衰竭 (心衰) 过程中发挥重要的调控作用, 在高糖刺激下, 心肌细胞 miR-1 通过抑制热休克蛋白 (HSP60、HSP70) 表达, 加速心肌细胞凋亡^[27]; miR-1 还可抑制胰岛素样生长因子基因 3c-UTR 表达, 使线粒体功能下降、细胞色素 C 释放, 促进细胞凋亡^[28]。高表达的 miR-133 通过调控其靶基因 Kruppel 样因子 15 (KLF15), 降低葡萄糖转运体 4 (Glut 4) 水平, 减少心肌葡萄糖摄取, 影响心肌能量代谢^[29], 加重心衰。

miR-499 是一种由心肌细胞特异性表达的微小核糖核酸, 研究表明, 在 AMI 患者, miR-499 由损伤心肌细胞产生并释

放入血,血浆 miR-499 水平明显增高,且与心肌损伤程度相关^[9-13]。Corsten 等^[30]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呈正相关,提示 miR-499 可能成为心肌细胞损伤的诊断指标。本研究结果也显示脓毒症患者血浆 miR-499 水平显著升高,与上述研究结果一致。

cTnI 是反映心肌细胞损伤特异性和敏感性极高的指标^[31];LVEF 水平可反映左心室功能,其数值与左心功能呈正相关;NT-proBNP 主要由心室肌细胞分泌,可直接反映心室压力,在心肌损伤合并心衰时,NT-proBNP 水平显著升高^[32]。研究发现,在脓毒症早期即有心肌收缩及舒张功能下降,cTnI 水平升高,病理结果显示广泛心肌出血,心肌纤维变性坏死,炎性细胞浸润^[20]。本研究结果表明,脓症患者 NT-proBNP 及 cTnI 水平升高,LVEF 值下降,表明脓症患者存在心肌损伤;相关性分析显示,患者血浆 miR-499 水平与 LVEF 呈负相关,与 NT-proBNP 及 cTnI 呈正相关;进一步 ROC 曲线分析结果显示,miR-499 诊断脓症患者心肌损伤与其他指标同样具有较高的敏感性和特异性。表明 miR-499 可反映脓毒症心肌损伤变化,可能成为心肌损伤的潜在诊断指标。

综上,血浆 miR-499 能反映脓毒症心肌损伤,可作为心肌细胞损伤程度的检测指标,但其具体机制仍需进一步用动物实验加以论证。

参考文献

- [1] 梁华平,姚咏明,王正国.关注脓毒症及其结局的预测研究[J].中国危重病急救医学,2005,17(12):709-711.
- [2] Y-Hassan S, Settergren M, Henareh L. Sepsis-induced myocardial depression and takotsubo syndrome [J]. *Acute Card Care*, 2014, 16(3): 102-109.
- [3] 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.
- [4] Zaky A, Deem S, Bendjelid K, et al. Characterization of cardiac dysfunction in sepsis: an ongoing challenge [J]. *Shock*, 2014, 41(1): 12-24.
- [5] Rudiger A, Singer M. The heart in sepsis: from basic mechanisms to clinical management [J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2013, 11(2): 187-195.
- [6] 潘小进,孙华.兔脓毒症早期心肌功能的变化[J].中华危重病急救医学,2004,16(6):355-357.
- [7] Vieillard-Baron A, Caille V, Charron C, et al. Actual incidence of global left ventricular hypokinesia in adult septic shock [J]. *Crit Care Med*, 2008, 36(6): 1701-1706.
- [8] 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.
- [9] Sayed AS, Xia K, Yang TL, et al. Circulating microRNAs: a potential role in diagnosis and prognosis of acute myocardial infarction [J]. *Dis Markers*, 2013, 35(5): 561-566.
- [10] Cheng C, Wang Q, You W, et al. MiRNAs as biomarkers of myocardial infarction: a meta-analysis [J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e88566.
- [11] 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*, 2014, 172(2): e276-278.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] 姚咏明,盛志勇,林洪远,等.2001年国际脓毒症定义会议关于脓毒症诊断的新标准[J].中华危重病急救医学,2006,18(11):645.
- [15] 姚咏明,盛志勇,林洪远,等.脓毒症定义及诊断的新认识[J].中华危重病急救医学,2004,16(6):321-324.
- [16] 任众环,王金良. B 型钠尿肽在诊治充血性心力衰竭中的价值[J].中国中西医结合急救杂志,2003,10(5):319-321.
- [17] 庄海舟,张淑文,李昂,等.中药 912 液对脓毒症大鼠心肌损伤保护的实验研究[J].中国中西医结合急救杂志,2008,15(1):16-19.
- [18] Vidigal JA, Ventura A. The biological functions of miRNAs: lessons from in vivo studies [J]. *Trends Cell Biol*, 2014 [2014-01-20]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25484347>. [published online ahead of print December 4, 2014].
- [19] 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.
- [20] Bronze-da-Rocha E. MicroRNAs expression profiles in cardiovascular diseases [J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014: 985408.
- [21] 高辉,成威,彭娜.微小 RNA-370 在心肌梗死后纤维化中的作用[J].心肺血管病杂志,2014,33(5):733-737.
- [22] 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.
- [23] 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.
- [24] 谈红,李艳敏,张红明,等.慢性充血性心力衰竭患者血浆 miR-423-5p 和 miR-210-3p 的表达变化[J].临床心血管病杂志,2014,30(12):1081-1085.
- [25] 王艳,李家富.微小 RNA 与心血管疾病的研究进展[J].检验医学与临床,2014,11(23):3367-3369.
- [26] 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.
- [27] Xu C, Lu Y, Pan Z, et al. The muscle-specific microRNAs miR-1 and miR-133 produce opposing effects on apoptosis by targeting HSP60, HSP70 and caspase-9 in cardiomyocytes [J]. *J Cell Sci*, 2007, 120(Pt 17): 3045-3052.
- [28] Yu XY, Song YH, Geng YJ, et al. Glucose induces apoptosis of cardiomyocytes via microRNA-1 and IGF-1 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 376(3): 548-552.
- [29] Horie T, Ono K, Nishi H, et al. MicroRNA-133 regulates the expression of GLUT4 by targeting KLF15 and is involved in metabolic control in cardiac myocytes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 389(2): 315-320.
- [30] 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.
- [31] 马光,洪广亮,赵光举,等.脓症患者血浆 B 型钠尿肽和肌钙蛋白 I 的变化及意义[J].中国中西医结合急救杂志,2014,21(2):99-103.
- [32] 孙红. N-末端脑钠肽前体及心肌肌钙蛋白 I 与慢性心力衰竭的关系[J].中国中西医结合急救杂志,2011,18(4):235-236.

(收稿日期:2014-08-20)

(本文编辑:保健媛)