

# 重症肺炎患者支气管肺泡灌洗液 微小 RNA-127-5p 的表达及诊断价值

王昭君 刘勤富 王晓红 王妍柏 张璐 周文杰 杨晓军

750004 宁夏回族自治区银川,宁夏医科大学总医院重症医学科(王昭君、刘勤富、王晓红、张璐、周文杰、杨晓军),脑脊液研究室(王妍柏)

通讯作者:杨晓军, Email: yxjicu@163.com

DOI: 10.3760/ema.j.issn.2095-4352.2017.07.004

**【摘要】** 目的 探讨微小 RNA-127-5p (miR-127-5p) 在重症肺炎患者支气管肺泡灌洗液 (BALF) 中的表达变化及其对重症肺炎的诊断价值。方法 收集 2015 年 1 月至 12 月宁夏医科大学总医院重症医学科收治的 30 例重症肺炎患者及 10 例非呼吸道感染术后患者 (需辅助通气) 的 BALF。采用 miRNA 芯片技术对两组患者 BALF 中的 miRNA 进行筛选,初步建立重症肺炎 BALF 的 miRNA 差异表达谱,筛选出其中有明显差异表达的 miRNA,采用实时荧光定量聚合酶链反应 (PCR) 检测 BALF 中 miR-127-5p 的表达水平;绘制受试者工作特征曲线 (ROC),评估 BALF 中 miR-127-5p 表达对重症肺炎的诊断价值。结果 40 例患者中无剔除病例,均纳入最终分析。初步分析筛选建立了重症肺炎患者 BALF 中 miRNA 差异表达谱,并筛选出其中 40 个表达上调的 miRNA 和 113 个表达下调的 miRNA。重症肺炎患者 BALF 中 miR-127-5p 表达量明显低于非呼吸道感染术后患者 ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ :  $0.578 \pm 0.226$  比  $1.004 \pm 0.337$ ), 差异有统计学意义 ( $t=4.552$ ,  $P=0.000$ )。ROC 曲线分析显示, miR-127-5p 诊断重症肺炎的 ROC 曲线下面积 (AUC) 为 0.855 [95% 可信区间 (95%CI) = 0.721 ~ 0.989,  $P=0.001$ ]; 当临界值取 0.840 时, 敏感度为 86.7%, 特异度为 70.0%, 阳性似然比为 2.89, 阴性似然比为 0.19。**结论** BALF 中 miR-127-5p 可作为诊断重症肺炎的分子标志物。

**【关键词】** 肺炎, 重症; 微小 RNA; 支气管肺泡灌洗液; 微小 RNA-127-5p

**基金项目:** 国家自然科学基金 (81450031); 宁夏回族自治区自然科学基金 (NZ14142)

**Expressions of microRNA-127-5p in bronchoalveolar lavage fluid of patients with severe pneumonia and its diagnostic value** Wang Zhaojun, Liu QinFu, Wang Xiaohong, Wang Yanbo, Zhang Jun, Zhou Wenjie, Yang Xiaojun  
Department of Critical Care Medicine, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China (Wang ZJ, Liu QF, Wang XH, Zhang J, Zhou WJ, Yang XJ); Department of Cerebrospinal Fluid Research, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China (Wang YB)

Corresponding author: Yang Xiaojun, Email: yxjicu@163.com

**【Abstract】** **Objective** To observe differential expressions of microRNA-127-5p (miR-127-5p) in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of patients with severe pneumonia and the value of miR-127-5p in the diagnosis of severe pneumonia. **Methods** Thirty severe pneumonia patients and 10 non-respiratory infection patients who needed mechanical ventilation after surgery admitted to Department of Critical Care Medicine of General Hospital of Ningxia Medical University from January to December in 2015 were enrolled, whose specimens of BALF were collected. The differential expressions of miRNA in BALF of patients in both groups were screened by miRNA chip technique to preliminarily establish miRNA differential expression profiles in BALF of severe pneumonia, and the miRNAs which were up-regulated and down-regulated were screened out. The expression levels of miR-127-5p were determined using a real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (PCR). The value of miR-127-5p expression in the diagnosis of severe pneumonia was evaluated with receiver-operating characteristic curve (ROC). **Results** All of the 40 patients were enrolled in the final analysis. Differential expression spectrum of miRNA in severe pneumonia patients was initially built, in which 40 miRNAs were up-regulated and 113 miRNAs were down-regulated. Compared with non-respiratory infection patients, the expressions of miR-127-5p were significantly lowered in severe pneumonia patients ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ :  $0.578 \pm 0.226$  vs.  $1.004 \pm 0.337$ ) with statistical difference ( $t = 4.552$ ,  $P = 0.000$ ). ROC curve analysis showed that the area under ROC curve (AUC) of miR-127-5p for diagnosis of severe pneumonia was 0.855 [95% confidence interval (95%CI) = 0.721-0.989,  $P = 0.001$ ], with the optimal sensitivity and specificity of 86.7% and 70.0% respectively with 0.840 as the critical value, and the positive likelihood ratio was 2.89, the negative likelihood ratio was 0.19. **Conclusion** miR-127-5p in BALF could be used as a new biomarker for the diagnosis of severe pneumonia.

**【Key words】** Severe pneumonia MicroRNA; Bronchoalveolar lavage fluid; MicroRNA-127-5p

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China (81450031); National Natural Science Foundation of Ningxia Hui Autonomous Region (NZ14142)

重症肺炎是重症加强治疗病房(ICU)患者院内死亡的重要原因之一<sup>[1-2]</sup>。近年研究提示ICU细菌耐药率逐渐升高<sup>[3-4]</sup>。微小RNA(miRNA)是一组广泛存在于真核细胞生物中,长度约为21~23个核苷酸组成的非编码RNA,是已知最大基因家族的一名重要成员,通过与信使RNA(mRNA)的3'非翻译区(UTR)结合,可引起翻译的抑制和(或)mRNA的降解,从而抑制蛋白质的合成,达到基因调控的最终目的。作为一种基因表达的负性调节因子,miRNA可以调控其靶mRNA的稳定性及翻译效率,参与免疫调节,B淋巴细胞、T淋巴细胞、单核细胞和嗜中粒细胞的发育、分化、增殖,以及抗体的产生。研究表明,miRNA可以被释放到细胞外环境中,在人体血浆、血清、体液和各种组织中均可以被检测到,使miRNA可能成为对临床疾病的诊断及预后有重要意义的生物学标志物<sup>[5-7]</sup>。研究显示miR-127相关基因与肺部发育等有一定相关性<sup>[8]</sup>,且miR-127相关基因可通过细胞通路抑制肺部炎症反应<sup>[9]</sup>,但相关临床研究较少。因此,本研究探讨重症肺炎患者支气管肺泡灌洗液(BALF)中miR-127-5p的表达,以明确其在重症肺炎中的诊断价值。

## 1 资料与方法

**1.1 研究对象的选择:**选择2015年1月至12月宁夏医科大学总医院重症医学科收治的患者作为研究对象,根据患者诊断结果分为重症肺炎组和非呼吸道感染组。

**1.1.1 纳入标准:**年龄>14岁;重症肺炎组患者诊断符合2007年美国感染疾病学会/美国胸科学会(IDSA/ATS)修订的成人社区获得性肺炎(CAP)共识指南标准<sup>[10]</sup>;非呼吸道感染组为ICU中非呼吸道感染且需要呼吸机辅助通气的术后患者。

**1.1.2 排除标准:**年龄<14岁;妊娠期;有血管炎、类风湿关节炎等结缔组织病史。

**1.1.3 剔除标准:**收集BALF过程中操作不符合无菌原则者;中途退出研究或放弃治疗者。

**1.2 伦理学:**本研究符合医学伦理学标准,经医院医学伦理委员会审核批准(审批号:2014-03-04),所有检测以及治疗均获得患者本人或其家属的知情同意。

**1.3 BALF样本收集及运送:**应用电子纤维支气管镜对入选患者肺段和亚肺段进行盐水灌洗,收集患者BALF 20 mL(避免患者经口污染环节),置于无菌集痰管中,-80℃冻存,以备基因芯片检测及聚合酶

链反应(PCR)验证。本研究BALF的收集和运送过程均严格按照无菌操作规程进行。

**1.4 RNA的提取、标记与芯片杂交:**采用TRIzol法提取BALF中RNA,并进行纯化,应用NanoDrop ND-1000分光光度仪测定BALF中的RNA浓度,采用电泳法检测BALF中RNA的完整性。所有标本RNA在波长260 nm和280 nm处的吸光度(A)比值( $A_{260}/A_{280}$ )均大于1.8。BALF的RNA标记和杂交根据丹麦Exiqon公司提供的方法进行。

**1.5 数据采集、标准化及差异基因检测:**采集芯片后,通过GenePix Pro 6.0软件读取芯片并扫描图像,同时提取探针信号值,相同的探针取中值合并,保留所有BALF样品中信号值均 $\geq 30.0$ 的探针,对全部芯片进行中值标准化,筛选BALF标本中差异表达探针,以表达差异倍数变化 $> 1.5$ 且 $P < 0.05$ 为筛选标准,并绘制火山图。应用PCR方法检测miR-127-5p表达量,用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 表示<sup>[11]</sup>。

**1.6 统计学方法:**应用SPSS 19.0软件进行统计学分析。计量资料先进行正态性检验,符合正态分布的计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较采用独立样本 $t$ 检验;不符合正态分布的计量资料以中位数(四分位数)[ $M(Q_L, Q_U)$ ]表示,组间比较采用非参数检验。绘制受试者工作特征曲线(ROC),分析BALF中miR-127-5p表达对重症肺炎的诊断价值。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

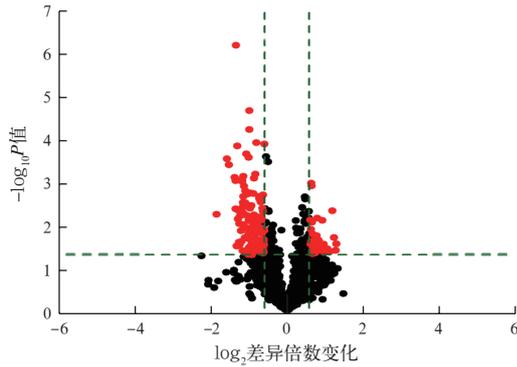
**2.1 两组患者基线资料比较(表1):**本研究共收集30例重症肺炎及10例非呼吸道感染术后患者的BALF,无剔除病例,均纳入最终分析。40例患者中,男性27例,女性13例;年龄14~90岁,平均( $57.5 \pm 18.0$ )岁。两组患者性别及基础疾病构成比较差异无统计学意义(均 $P > 0.05$ ),但重症肺炎组患者年龄明显大于非呼吸道感染组( $P < 0.05$ ),可能由于老年患者各器官功能衰退、免疫功能降低,相比年轻患者更易发生重症肺炎。

**2.2 差异表达miRNA的筛选(图1):**通过火山图分析两组间的BALF中差异表达miRNA谱,最终筛选出BALF中40个表达上调的miRNA和113个表达下调的miRNA。

**2.3 两组BALF中miR-127-5p的表达水平(图2):**重症肺炎组患者BALF中miR-127-5p的表达量明显低于非呼吸道感染组患者,差异有统计学意义( $t = 4.552, P = 0.000$ )。

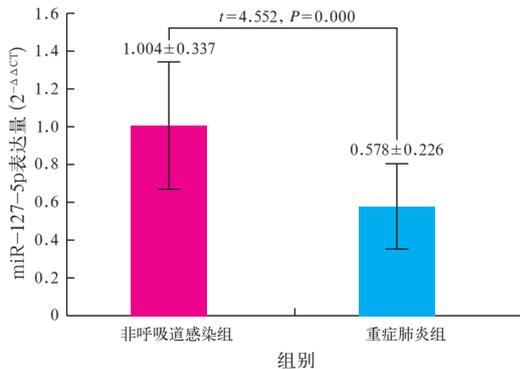
表1 重症肺炎与非呼吸道感染两组重症加强治疗病房(ICU)患者基线资料比较

组别	例数(例)	性别(例)		年龄(岁, $\bar{x} \pm s$ )	基础疾病(例)						
		男性	女性		外伤	肿瘤	高血压	糖尿病	冠心病	脑血管疾病	肺部疾病
重症肺炎组	30	21	9	61.8 ± 14.9	7	6	2	6	3	3	7
非呼吸道感染组	10	6	4	47.0 ± 22.7	4	2	1	0	0	1	0
$\chi^2/t$ 值		0.342		-2.368	6.577						
P 值		0.559		0.023	0.362						



注:红色圆点代表差异倍数变化>1.5且P<0.05的差异表达miRNA,其中有43个表达上调的miRNA和113个表达下调的miRNA

图1 重症肺炎与非呼吸道感染两组重症加强治疗病房(ICU)患者支气管肺泡灌洗液(BALF)中差异表达的微小RNA(miRNA)谱



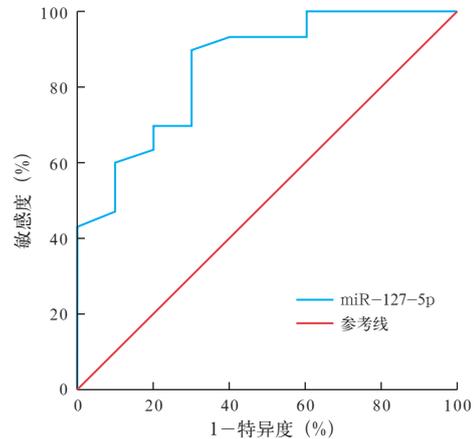
注: BALF 为支气管肺泡灌洗液, miR-127-5p 为微小 RNA-127-5p

图2 重症肺炎与非呼吸道感染两组重症加强治疗病房(ICU)患者 BALF 中 miR-127-5p 表达比较

2.4 miR-127-5p 对重症肺炎的诊断价值(图3): 采用 ROC 曲线评价 miR-127-5p 对重症肺炎的诊断价值,结果显示, BALF 中 miR-127-5p 表达诊断重症肺炎的 ROC 曲线下面积(AUC)为 0.855, 95% 可信区间(95%CI)为 0.721 ~ 0.989, 标准误为 0.068, P=0.001; 当临界值取 0.840 时, 敏感度 86.7%, 特异度 70.0%, 阳性似然比 2.89, 阴性似然比 0.19。

### 3 讨论

miRNA 在各种生物发育及疾病的发生发展过程中具有重要作用,其中因 miRNA 在生命活动中起到调控作用而受到很多研究者的关注。研究表明, miRNA 在诊断心肌损伤过程中有一定意义<sup>[12]</sup>,且与脓毒症、全身炎症反应相关指标有相关性<sup>[13-15]</sup>。



注: BALF 为支气管肺泡灌洗液, miR-127-5p 为微小 RNA-127-5p, ROC 曲线为受试者工作特征曲线

图3 BALF 中 miR-127-5p 表达诊断重症肺炎的 ROC 曲线

miRNA 主要通过调节 Toll 样受体(TLR)以及细胞因子的应答来参与先天免疫,在人体先天性免疫应答、特异性免疫应答中扮演了非常重要的角色。Xie 等<sup>[8]</sup>的研究提示, miR-127 通过 IgG Fcγ 受体 I 参与抑制肺部炎症反应。同时关于 miR-127 相关基因, Bhaskaran 等<sup>[9]</sup>的研究提示 miR-127 在胚胎肺发育过程中起调节作用。

本研究通过收集 30 例 ICU 重症肺炎患者以及 10 例非呼吸道感染需机械通气术后患者的 BALF, 对 BALF 中 miRNA 进行提取、纯化,初步分析筛选,建立了重症肺炎患者 BALF 中 miRNA 差异表达谱,筛选出其中 43 个表达上调的 miRNA 和 113 个表达下调的 miRNA。有研究表明,肺损伤动物模型肺组织及 BALF 中 miR-127 表达下调<sup>[14]</sup>。本研究也显示,与非呼吸道感染患者相比,重症肺炎患者 BALF 中 miR-127-5p 表达明显下调,证实 miR-127-5p 可能参与调节人重症肺炎肺损伤。ROC 曲线分析显示, BALF 中 miR-127-5p 表达诊断重症肺炎的 AUC 为 0.855, 当临界值取 0.840 时, 敏感度为 86.7%, 特异度为 70.0%, 提示可尝试将 BALF 中 miR-127-5p 作为临床预测重症肺炎发生的基因学诊断依据。

综上,重症肺炎患者 BALF 中 miR-127 表达下调,在诊断重症肺炎中有一定价值,其在肺损伤中的免疫应答和基因调控机制仍有待进一步研究。

## 参考文献

- [1] 杨洋. Sprague-Dawley 大鼠胎肺组织 miRNA 差异表达谱分析[D]. 南京: 南京医科大学, 2012.  
Yang Y. The expression profile of microRNAs in fetal lung development of Sprague-Dawley rats [D]. Nanjing: Nanjing Medical University, 2012.
- [2] 蒲清璐, 刘国跃, 王洪亮, 等. MicroRNAs 与急性呼吸窘迫综合征关系的研究进展[J]. 遵义医学院学报, 2016, 39 (5): 535-538, 546.  
Pu QH, Liu GY, Wang HL, et al. Research progress of relationship between microRNAs and acute respiratory distress syndrome [J]. J Zunyi Med Univ, 2016, 39 (5): 535-538, 546.
- [3] 刘海峰, 周柱江, 胡靖青, 等. 综合重症加强治疗病房医院感染的常见致病菌分析以及耐药性监测结果[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2015, 22 (4): 382-385. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2015.04.012.  
Liu HF, Zhou ZJ, Hu JQ, et al. A survey on distribution and drug resistance of pathogens causing nosocomial infection in general intensive care unit [J]. Chin J TCM WM Crit Care, 2015, 22 (4): 382-385. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2015.04.012.
- [4] 黄露萍, 刘俊慧. 499 株鲍曼不动杆菌临床分布及耐药性分析[J]. 实用检验医师杂志, 2016, 8 (2): 97-99. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2016.02.010.  
Huang LP, Liu JH. Analysis on infection distribution and drug resistance of 499 strains *Acinetobacter baumannii* [J]. Chin J Clin Pathol, 2016, 8 (2): 97-99. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2016.02.010.
- [5] Goodwin AJ, Guo C, Cook JA, et al. Plasma levels of microRNA are altered with the development of shock in human sepsis: an observational study [J]. Crit Care, 2015, 19: 440. DOI: 10.1186/s13054-015-1162-8.
- [6] Yang YL, Li Y, Liang RY, et al. Dynamic expression of microRNA-127 during porcine prenatal and postnatal skeletal muscle development [J]. J Integr Agric, 2014, 13 (6): 1331-1339.
- [7] Cortez MA, Bueso-Ramos C, Ferdin J, et al. MicroRNAs in body fluids—the mix of hormones and biomarkers [J]. Nat Rev Clin Oncol, 2011, 8 (8): 467-477. DOI: 10.1038/nrclinonc.2011.76.
- [8] Xie T, Liang J, Liu N, et al. MicroRNA-127 inhibits lung inflammation by targeting IgG Fc  $\gamma$  receptor I [J]. J Immunol, 2012, 188 (5): 2437-2444. DOI: 10.4049/jimmunol.1101070.
- [9] Bhaskaran M, Wang Y, Zhang H, et al. MicroRNA-127 modulates fetal lung development [J]. Physiol Genomics, 2009, 37 (3): 268-278. DOI: 10.1152/physiolgenomics.90268.2008.
- [10] Mandell LA, Wunderink RG, Anzueto A, et al. Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society consensus guidelines on the management of community-acquired pneumonia in adults [J]. Clin Infect Dis, 2007, 44 Suppl 2: S27-72. DOI: 10.1086/511159.
- [11] Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR [J]. Nucleic Acids Res, 2005, 33 (20): e179. DOI: 10.1093/nar/gni178.
- [12] 杨永丽, 何静, 肖志英. 微小 RNA-499 对脓毒症患者心肌损伤的诊断价值[J]. 中华危重病急救医学, 2015, 27 (3): 218-220. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.03.012.  
Yang YL, He J, Xiao ZY. Value of microRNA-499 in prediction of myocardial damage in sepsis [J]. Chin Crit Care Med, 2015, 27 (3): 218-220. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.03.012.
- [13] How CK, Hou SK, Shih HC, et al. Expression profile of MicroRNAs in gram-negative bacterial sepsis [J]. Shock, 2015, 43 (2): 121-127. DOI: 10.1097/SHK.0000000000000282.
- [14] 汪勤, 赵春辉, 蔡琴, 等. 脓毒症患者外周血微小 RNA-155 和调节性 T 细胞表达的关系[J]. 中华危重病急救医学, 2014, 26 (3): 179-183. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2014.03.011.  
Wang Q, Zhao CH, Cai Q, et al. Expression of microRNA-155 and regulative T cell in sepsis patients and their relationship [J]. Chin Crit Care Med, 2014, 26 (3): 179-183. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2014.03.011.
- [15] 孙玲玲, 李莉, 严静. 长链非编码 RNA 与脓毒症相关的研究进展[J]. 中华危重病急救医学, 2017, 29 (2): 181-183. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2017.02.018.  
Sun LL, Li L, Yan J. Progress in relationship of the long non-coding RNA and sepsis [J]. Chin Crit Care Med, 2017, 29 (2): 181-183. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2017.02.018.

(收稿日期: 2017-03-14)

## • 科研新闻速递 •

吸入糖皮质激素联合  $\beta$ -受体激动剂治疗 ARDS 的随机对照临床试验

目前, 针对急性呼吸窘迫综合征 (ARDS) 患者肺损伤的治疗尚缺乏有效药物。吸入糖皮质激素和  $\beta$ -受体激动剂的早期治疗可能通过减少肺部炎症和增强肺泡液体清除来抑制 ARDS 的进展。因此, 有研究者进行了一项多中心双盲随机对照临床研究。研究者纳入了美国 5 个学术研究中心急诊科存在 ARDS 发生风险的成人患者。干预措施为雾化吸入布地奈德/福莫特罗或安慰剂持续 5 d。主要研究指标为 5 d 内血氧饱和度与吸入氧浓度比值 (S/F) 随时间的变化情况; 其他研究指标包括机械通气情况和 ARDS 发生率。结果显示: 从 2013 年 9 月 3 日至 2015 年 6 月 9 日共纳入 61 例患者; 入组至首次用药的中位时间均小于 9 h。安慰剂对照组有更多患者在入组时即出现休克 (例: 14 比 3)。治疗组 S/F 随时间延长显著增加 ( $P=0.02$ )。与治疗组相比, 安慰剂对照组有更多患者发生 ARDS (例: 7 比 0), 并需要机械通气治疗 (53% 比 21%)。研究者据此得出结论: 早期吸入布地奈德/福莫特罗在 ARDS 高危患者是可行的, 并可改善患者氧合。这些结果支持进一步研究吸入糖皮质激素和  $\beta$ -受体激动剂预防 ARDS 的疗效。

喻文, 罗红敏, 编译自《Crit Care Med》, 2017, 45 (5): 798-805

## 导致 CRRT 治疗患者不良预后的相关因素分析

连续性肾脏替代治疗 (CRRT) 是危重患者的透析模式之一。尽管加强了透析护理, 但透析患者的病死率仍很高。有学者利用中国台湾台北健康预防研究数据库进行了一项回顾性队列研究, 其目标是调查导致这类患者预后不良的相关因素。研究者纳入了 2007 年至 2011 年接受 CRRT 的危重患者, 并将患者分为急性肾损伤 (AKI) 组和终末期肾脏疾病 (ESRD) 组。主要评价指标为院内病死率, 次要评价指标为长期存活情况和需要长期透析的比例。结果显示: 研究共纳入 15 453 例患者, AKI 组 13 204 例, ESRD 组 2 249 例; 总住院病死率为 66.5%。两组间住院病死率差异无统计学意义 [调整后的优势比 (OR) = 0.93, 95% 可信区间 (95% CI) = 0.84 ~ 1.02]。年龄、慢性肝病和癌症病史是两组患者住院死亡的独立危险因素。高血压与 AKI 患者住院病死率增高有关。年龄、冠状动脉疾病和入住重症加强治疗病房 (ICU) 是 AKI 患者长期依赖透析的危险因素。研究者据此得出结论: AKI 和 ESRD 患者接受 CRRT 后疗效均不佳。年龄越大、慢性肝病和癌症的发生率越高, 患者病死率越高。存在冠状动脉疾病和入住 ICU 的 AKI 高龄患者的肾功能恢复率较低。

喻文, 罗红敏, 编译自《PLoS One》, 2017, 12 (5): e0177759