

论著·临床研究

血浆 miRNA-497 在小儿脓毒症心肌损伤中的表达及其临床意义

吴忠璟¹ 陈亚凤¹ 王海岛² 高芳虹¹

(1. 海口市妇幼保健院检验科, 海南 海口 570102; 2. 海口市妇幼保健院儿科, 海南 海口 570102)

[摘要] **目的** 探讨血浆 miRNA-497 在小儿脓毒症心肌损伤中的表达及其临床意义。**方法** 纳入 148 例脓毒症患儿, 依据其是否发生心肌损伤分为心肌损伤组 (58 例) 和非心肌损伤组 (90 例), 比较两组血浆 miRNA-497、心肌肌钙蛋白 I (cTnI)、肌酸激酶同工酶 (CK-MB)、N 末端 B 型钠尿肽前体 (NT-proBNP)、降钙素原 (PCT)、C-反应蛋白 (CRP) 水平及左室射血分数 (LVEF) 的变化。绘制受试者工作特征曲线 (ROC), 评价血浆 miRNA-497、cTnI、CK-MB 对心肌损伤的诊断价值。应用 Pearson 相关分析法分析 miRNA-497 与 cTnI、CK-MB、NT-proBNP、PCT、CRP 及 LVEF 的相关性。**结果** 心肌损伤组血浆 miRNA-497、cTnI、CK-MB、NT-proBNP、PCT 及 CRP 水平均明显高于非心肌损伤组 ($P<0.05$)。血浆 miRNA-497、cTnI、CK-MB 及三项联合诊断心肌损伤的曲线下面积 (AUC) 分别为 0.918、0.931、0.775、0.940。miRNA-497 的最佳阈值为 2.05 时, 其诊断心肌损伤的敏感度和特异度较好, 分别为 90.4% 和 91.2%。相关分析显示, 心肌损伤患儿血浆 miRNA-497 与 cTnI 的相关性较好 ($r=0.728$, $P<0.01$)。**结论** 血浆 miRNA-497 对小儿脓毒症心肌损伤的诊断价值与 cTnI 相当, 有望作为早期诊断心肌损伤的潜在标志物。

[中国当代儿科杂志, 2018, 20(1): 32-36]

[关键词] 脓毒症; 心肌损伤; miRNA-497; 敏感度; 特异度; 儿童

Expression of plasma miRNA-497 in children with sepsis-induced myocardial injury and its clinical significance

WU Zhong-Jing, CHEN Ya-Feng, WANG Hai-Dao, GAO Fang-Hong. Department of Clinical Laboratory, Haikou Maternal and Child Health Care Hospital, Haikou 570102, China (Email: A522198993@163.com)

Abstract: Objective To study the expression of plasma miRNA-497 in children with sepsis-induced myocardial injury and its clinical significance. **Methods** A total of 148 children with sepsis were enrolled. According to the presence or absence of myocardial injury, these children were divided into myocardial injury group ($n=58$) and non-myocardial injury group ($n=90$). The two groups were compared in terms of the changes in plasma levels of miRNA-497, cardiac troponin I (cTnI), creatine kinase-MB (CK-MB), N-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-proBNP), procalcitonin (PCT), and C-reactive protein (CRP) and left ventricular ejection fraction (LVEF). The receiver operating characteristic (ROC) curve was plotted to evaluate the value of plasma miRNA-497, cTnI, and CK-MB in the diagnosis of myocardial injury. A Pearson correlation analysis was used to determine the correlation of miRNA-497 with cTnI, CK-MB, NT-proBNP, PCT, CRP, and LVEF. **Results** Compared with the non-myocardial injury group, the myocardial injury group had significantly higher plasma levels of miRNA-497, cTnI, CK-MB, NT-proBNP, PCT, and CRP ($P<0.05$). Plasma miRNA-497, cTnI, and CK-MB when measured alone or in combination had an area under the ROC curve of 0.918, 0.931, 0.775, and 0.940 respectively. At the optimal cut-off value of 2.05, miRNA-497 had a sensitivity of 90.4% and a specificity of 91.2%. The correlation analysis showed that there was a good correlation between plasma miRNA-497 and cTnI in children with myocardial injury ($r=0.728$, $P<0.01$). **Conclusions** Plasma miRNA-497 has a similar value as cTnI in the diagnosis of sepsis-induced myocardial injury in children and may be used as a potential marker for early diagnosis of myocardial injury.

[Chin J Contemp Pediatr, 2018, 20(1): 32-36]

Key words: Sepsis; Myocardial injury; miRNA-497; Sensitivity; Specificity; Child

[收稿日期] 2017-09-05; [接受日期] 2017-11-01

[基金项目] 海南省医药卫生科研基金项目 (16A50275)。

[作者简介] 吴忠璟, 男, 本科, 主管检验师。

近年来,小儿脓毒症的发病率及病死率有升高的趋势,其中并发心肌损伤是导致患儿死亡的主要原因之一^[1-2]。部分脓毒症患儿早期心肌损伤症状不明显,如何尽早诊断心肌损伤一直是临床医生面临的难题。目前,心肌损伤的主要诊断指标为心肌肌钙蛋白I(cardiac troponin I, cTnI)、肌酸激酶同工酶(creatine kinase isoenzyme, CK-MB)、N末端B型钠尿肽前体(N terminal B type natriuretic peptide precursors, NT-proBNP)和超声心动图结果,但其均存在一定的局限性。因此,寻找一种早期诊断心肌损伤的新型标志物对指导脓毒症患儿的诊疗具有重要意义。微小核糖核酸(microRNA, miRNA)是一类非编码核苷酸的单链小分子RNA,参与细胞的增殖、分化、凋亡等多种生物过程,并与脓毒症的发生和发展密切相关^[3]。近年来的研究表明,miRNA-497在心肌梗死患者中异常表达,有望作为心肌梗死的生物学标志物或治疗靶点^[4]。本研究通过检测脓毒症患儿血浆miRNA-497、cTnI、CK-MB、NT-proBNP、降钙素原(procalcitonin, PCT)、C-反应蛋白(c-reactive protein, CRP)水平及左室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)的变化,分析miRNA-497与脓毒症患儿心肌损伤的相关性,探讨miRNA-497对小儿脓毒症心肌损伤的诊断价值,为脓毒症患儿心肌损伤的早期诊断及靶向治疗提供依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取2014年1月至2017年5月海口市妇幼保健院收治的脓毒症患儿148例作为研究对象,其中男96例,女52例,年龄6个月至12岁(平均 4.1 ± 1.4 岁)。脓毒症的诊断符合2012版脓毒症国际指南诊断标准^[5]。下列病例被排除:长期应用激素、免疫抑制剂;原有心脏疾病、血液系统疾病或接受抗凝治疗;伴有严重肝脏、肾脏及恶性肿瘤;病历资料不完整者。

1.2 病例分组

依据所纳入的脓毒症患儿是否发生心肌损伤分为心肌损伤组(58例)和非心肌损伤组(90例)。

心肌损伤组纳入标准为^[6]:cTnI水平高于正常(正常值:cTnI<0.15 ng/mL)和/或LVEF<50%。非心肌损伤组纳入标准:cTnI水平和LVEF均正常。

1.3 标本采集与检测

患儿入院后次日清晨空腹取静脉血5 mL,置于EDTA抗凝管中,3000 r/min离心5 min分离血浆,向分离的血浆中加入1 mL miRNeasy试剂。按照总miRNA快速提取试剂盒(miRNeasy血浆提取试剂盒)说明书从中提取总miRNA。在ABI 7500型荧光定量PCR仪上进行实时荧光定量聚合酶链反应(RT-PCR)。每个反应体系中荧光信号达到所设定的阈值经历的循环数即为Ct值,以U6为内参照,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算miRNA-497的相对表达水平,其中 $\Delta Ct = Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{U6}$ 。使用日立7080系列全自动生化分析仪及SSJ-2-2多功能免疫检测仪进行cTnI、CK-MB、NT-proBNP、PCT及CRP检测。

1.4 心功能测定

应用荷兰Philips公司的IU22型心脏彩色多普勒超声诊断仪评估LVEF。探头频率2.0~4.0 MHz。参数取自同一心动周期,计算3个心动周期的平均值。操作过程由经验丰富的两位主治医师共同完成。

1.5 统计学分析

采用SPSS 17.0统计软件对数据进行统计学分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用独立样本 t 检验。计数资料用例数和百分率(%)表示,组间比较采用卡方检验。两个指标间的相关性评估采用Pearson相关分析。绘制受试者工作特征曲线(ROC),评价各指标对心肌损伤的诊断价值。曲线下面积(area under curve, AUC)的比较采用 Z 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组临床特征的比较

心肌损伤组的LVEF明显低于非心肌损伤组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。两组的性别、年龄及感染部位比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表1。

表 1 两组临床特征的比较

组别	n	性别 (男/女, 例)	年龄 ($\bar{x} \pm s$, 岁)	感染部位 [n(%)]						LVEF ($\bar{x} \pm s$, %)
				肺部感染	腹腔感染	皮肤软组织感染	泌尿系感染	颅内感染	血源性感染	
非心肌损伤组	90	56/34	4.1 $\pm$ 1.4	38(42)	24(27)	7(8)	5(6)	3(3)	7(8)	60 $\pm$ 11
心肌损伤组	58	40/18	4.3 $\pm$ 1.3	28(48)	18(31)	3(5)	1(2)	6(10)	8(14)	46 $\pm$ 13
$\chi^2(t)$ 值		0.704	(0.512)	0.523	0.331	0.380	1.331	3.036	1.401	(8.724)
P 值		0.402	0.541	0.470	0.565	0.538	0.249	0.081	0.237	<0.001

注: [LVEF] 左室射血分数。

2.2 两组血浆 miRNA-497、cTnI、CK-MB、NT-proBNP、PCT 及 CRP 水平的比较

心肌损伤组血浆 miRNA-497、cTnI、CK-

MB、NT-proBNP、PCT 及 CRP 水平均明显高于非心肌损伤组, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 见表 2。

表 2 两组血浆 miRNA-497、CTnI、CK-MB、NT-proBNP、PCT 及 CRP 水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	miRNA-497	cTnI (ng/mL)	CK-MB (U/L)	NT-proBNP (ng/L)	PCT (μ g/L)	CRP (mg/L)
非心肌损伤组	90	1.7 $\pm$ 0.7	0.08 $\pm$ 0.02	20 $\pm$ 9	438 $\pm$ 85	12.2 $\pm$ 2.4	142 $\pm$ 37
心肌损伤组	58	4.2 $\pm$ 1.1	4.15 $\pm$ 1.37	34 $\pm$ 17	2587 $\pm$ 119	17.8 $\pm$ 5.9	161 $\pm$ 53
t 值		25.847	36.275	15.146	12.851	5.192	4.875
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.003	0.008

注: [miRNA-497] 微小核糖核酸 -497; [cTnI] 心肌肌钙蛋白 I; [CK-MB] 肌酸激酶同工酶; [NT-proBNP] N 末端 B 型钠尿肽前体; [PCT] 降钙素原; [CRP] C-反应蛋白。

2.3 miRNA-497、cTnI 及 CK-MB 对心肌损伤的诊断价值

miRNA-497、cTnI 及 CK-MB 三项联合诊断心肌损伤的 AUC 高于 CK-MB ($Z=4.816$, $P<0.05$), 但与 miRNA-497 和 cTnI 比较差异无统计学意义 (分别 $Z=1.105$ 、 0.912 , $P>0.05$); miRNA-497 和 cTnI 诊断心肌损伤的 AUC 高于 CK-MB (分别 $Z=4.703$ 、 4.519 , $P<0.05$), miRNA-497 与 cTnI 比较差异无统计学意义 ($Z=0.836$, $P>0.05$)。见表 3。miRNA-497、cTnI 及 CK-MB 的最佳阈值分别取 2.05、1.24 ng/mL、25.83 U/L 时, 其对应的敏感度和特异度为 90.4% 和 91.2%, 87.5% 和 96.8%, 61.4% 和 86.3%, 见图 1 和表 3。

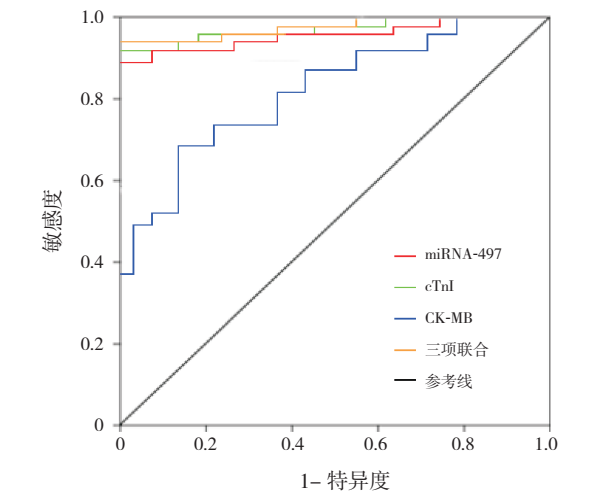


图 1 miRNA-497、cTnI 及 CK-MB 诊断心肌损伤的 ROC 曲线

表 3 miRNA-497、cTnI 及 CK-MB 对心肌损伤的诊断价值

指标	最佳阈值	AUC(95%CI)	敏感度 (%)	特异度 (%)	阳性预测值 (%)	阴性预测值 (%)	阳性似然比	阴性似然比
CK-MB	25.83 U/L	0.775(0.712~0.837)	61.4	86.3	89.4	58.2	4.482	0.447
cTnI	1.24 ng/mL	0.931(0.872~0.991) ^a	87.5	96.8	93.7	90.6	27.344	0.129
miRNA-497	2.05	0.918(0.853~0.982) ^a	90.4	91.2	94.5	88.0	10.273	0.105
三项联合	-	0.940(0.875~0.996) ^a	97.5	88.2	92.6	93.7	8.263	0.028

注: a 示与 CK-MB 比较, $P<0.05$ 。[CK-MB] 肌酸激酶同工酶; [cTnI] 心肌肌钙蛋白 I; [miRNA-497] 微小核糖核酸 -497; [AUC] 曲线下面积。

2.4 miRNA-497 与 cTnI、CK-MB、NT-proBNP、PCT、CRP 及 LVEF 的相关性

Pearson 相关分析显示,脓毒症心肌损伤患儿血浆 miRNA-497 与 cTnI、CK-MB、NT-proBNP、

PCT、CRP 均呈正相关(分别 $r=0.728$ 、 0.483 、 0.663 、 0.508 、 0.437 , 均 $P<0.05$),而血浆 miRNA-497 与 LVEF 呈负相关($r=-0.516$, $P<0.01$),见图 2。

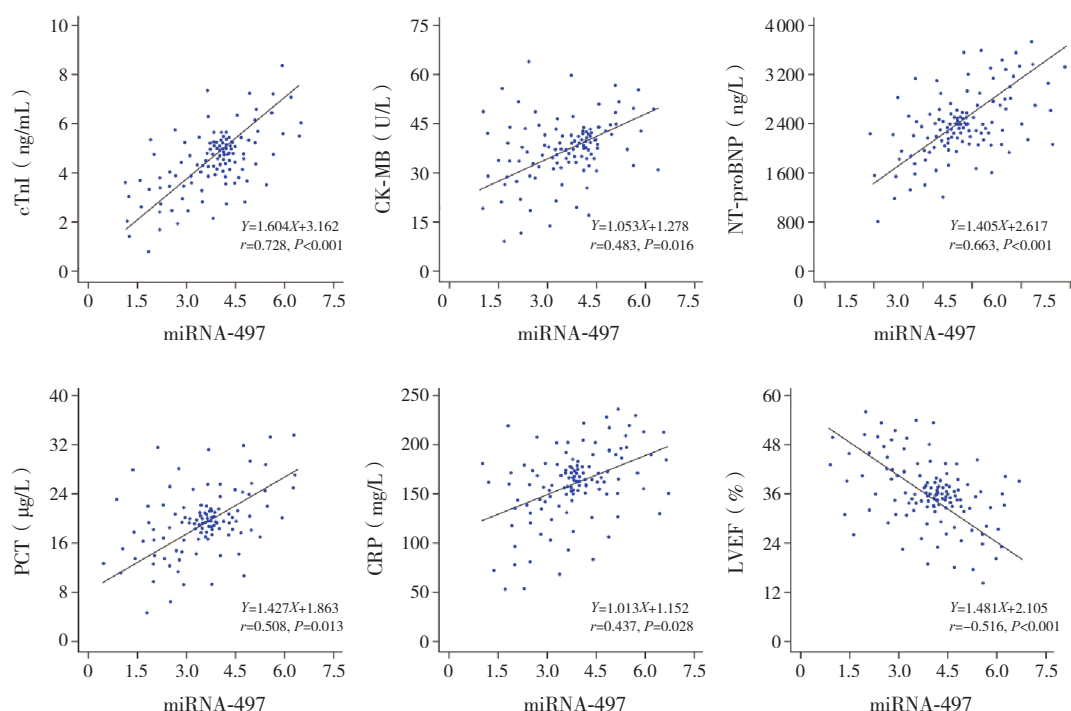


图2 miRNA-497 与 cTnI、CK-MB、NT-proBNP、PCT、CRP 及 LVEF 的相关性 [miRNA-497] 微小核糖核酸-497; [cTnI] 心肌肌钙蛋白 I; [CK-MB] 肌酸激酶同工酶; [NT-proBNP] N 末端 B 型钠尿肽前体; [PCT] 降钙素原; [CRP] C-反应蛋白; [LVEF] 左室射血分数。

3 讨论

miRNA 是近年来新发现的一类非编码 RNA,具有调控细胞增殖、分化和凋亡等生物学功能。已有研究证实,miRNA 参与心肌肥厚、心肌纤维化、心肌梗死、高血压、心律失常等多种心血管疾病的发生发展。Maciejak 等^[7]研究发现,外周血或血浆中的某些 miRNA 表达水平在心肌损伤患者中显著升高,有望成为心肌损伤早期诊断的新型标志物。然而,血浆 miRNA-497 能否作为小儿脓毒症心肌损伤早期诊断的分子标志物,目前尚无定论。本研究显示,心肌损伤组血浆 miRNA-497 水平明显高于非心肌损伤组,提示血浆 miRNA-497 在小儿脓毒症心肌损伤中异常高表达,可能参与心肌损伤的发生发展。Boon 等^[8]研究表明,miRNA 由损伤心肌细胞产生并释放入血,在心肌梗死患者中明显升高,且与心肌损伤程度相关。杨永丽

等^[9]研究发现,脓毒症合并心肌损伤患者血浆 miRNA-499 水平显著升高,且和心肌损伤程度呈正相关,可作为脓毒症心肌损伤病情变化的生物学标志物。本研究进一步进行 ROC 曲线分析,结果显示,血浆 miRNA-497 诊断小儿脓毒症心肌损伤的效能与 cTnI 相当,且优于 CK-MB。Li 等^[10]利用 6 种 miRNA (miR-1、miR-134、miR-186、miR-208、miR-223 和 miR-499) 组成一个联合分析系统,发现其对胸痛患者心肌梗死诊断的 AUC 为 0.830 (95%CI: 0.751~0.910),显著高于肌钙蛋白 T [0.768 (95%CI: 0.672~0.864)] 和 CK-MB [0.709 (95%CI: 0.606~0.812)]。D'Alessandra 等^[11]研究显示,血浆 miRNA 表达水平在心肌梗死发生后 156 min 达到峰值,早于传统生物标记物 (cTnI 和 CK-MB),从而提示 miRNA 的诊断优势可能在心肌损伤后的早期释放。另有研究表明,miRNA 鉴别心肌梗死和非心脏疾病的敏感度和特异度明显

高于 cTnI, 推测 miRNA 可能成为将来诊断心肌损伤程度及预后的重要临床标记物^[12]。由此可见, 血浆 miRNA-497 在小儿脓毒症患者合并心肌损伤的早期诊断中具有较好的应用前景。

cTnI 被认为是心肌梗死诊断的金指标, 在多种非心脏性疾病中亦可升高, 联合 CK-MB 和 NT-proBNP 等指标可提高诊断心肌损伤的特异度和灵敏度^[13]。PCT 及 CRP 在严重感染及全身炎症反应患者中显著升高, 是反映脓毒症患者病情严重程度的可靠指标^[14]。LVEF 水平可反映左心室功能, 其数值与左心功能呈正相关。本研究显示, 心肌损伤组 cTnI、CK-MB、NT-proBNP、PCT 及 CRP 均升高, LVEF 值下降。相关分析显示, 心肌损伤患儿血浆 miRNA-497 与 cTnI 的相关性最好 ($r=0.728$, $P<0.01$)。由此, 我们推测血浆 miRNA-497 联合 cTnI 检测有望提高心肌损伤诊断的准确性。Yang 等^[15]研究发现, 血浆 miRNA-1、miRNA-208a 及 miRNA-499 可作为诊断心肌损伤的生物学标志物, 能够提供 cTnI 以外的诊断信息, 与 cTnI 联合应用有助于提高心肌损伤的诊断准确性。另有研究表明, miRNA 和心肌损伤其他标志物联合应用检测, 其诊断脓毒症患者合并心肌损伤的价值会更高^[16]。

综上所述, 本研究表明, 血浆 miRNA-497 诊断脓毒症患者合并心肌损伤的敏感度和特异度与 cTnI 相当, 有望作为早期诊断小儿脓毒症心肌损伤的潜在标志物。但本研究为单中心的临床研究, 其结果尚需大规模、多中心的临床研究证实, 从而进一步完善和丰富脓毒症患者合并心肌损伤的诊疗评估体系。

[参 考 文 献]

- [1] de Souza DC, Shieh HH, Barreira ER, et al. Epidemiology of sepsis in children admitted to PICUs in South America[J]. *Pediatr Crit Care Med*, 2016, 17(8): 727-734.
- [2] Jayaprakash N, Gajic O, Frank RD, et al. Elevated modified shock index in early sepsis is associated with myocardial dysfunction and mortality[J]. *J Crit Care*, 2017, 43: 30-35.
- [3] Kingsley SMK, Bhat BV. Role of microRNAs in sepsis[J]. *Inflamm Res*, 2017, 66(7): 553-569.
- [4] Li Z, Lu J, Luo Y, et al. High association between human circulating microRNA-497 and acute myocardial infarction[J]. *Sci World J*, 2014: 931845.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] Maciejak A, Kiliszek M, Opolski G, et al. miR-22-5p revealed as a potential biomarker involved in the acute phase of myocardial infarction via profiling of circulating microRNAs[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(3): 2867-2875.
- [8] Boon RA, Dimmeler S. MicroRNAs in myocardial infarction[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2015, 12(3): 135-142.
- [9] 杨永丽, 何静, 肖志英. 血浆 miR-499 在脓毒症合并心肌损伤的诊断价值 [J]. *中山大学学报 (医学科学版)*, 2015, 36(2): 279-283.
- [10] 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.
- [11] D'Alessandra Y, Devanna P, Limana F, et al. Circulating microRNAs are new and sensitive biomarkers of myocardial infarction[J]. *Eur Heart J*, 2010, 31(22): 2765-2773.
- [12] Deddens JC, Colijn JM, Oerlemans MI, et al. Circulating microRNAs as novel biomarkers for the early diagnosis of acute coronary syndrome[J]. *J Cardiovasc Transl Res*, 2013, 6(6): 884-898.
- [13] Fan J, Ma J, Xia N, et al. Clinical value of combined detection of CK-MB, MYO, cTnI and plasma NT-proBNP in diagnosis of acute myocardial infarction[J]. *Clin Lab*, 2017, 63(3): 427-433.
- [14] Li HX, Liu ZM, Zhao SJ, et al. Measuring both procalcitonin and C-reactive protein for a diagnosis of sepsis in critically ill patients[J]. *J Int Med Res*, 2014, 42(4): 1050-1059.
- [15] Yang W, Shao J, Bai X, et al. Expression of plasma microRNA-1/21/208a/499 in myocardial ischemic reperfusion injury[J]. *Cardiology*, 2015, 130(4): 237-241.
- [16] 石苗茜, 苏菲菲, 李俊峡, 等. 小儿脓毒症心肌损伤标志物检测的临床应用价值 [J]. *中国急救医学*, 2016, 36(6): 486-490.

(本文编辑: 邓芳明)