

DOI:10.13602/j.cnki.jcls.2021.03.09

· 临床研究 ·

# miR-150 在急性呼吸窘迫综合征患者血清中的表达及临床意义\*

蒋萍萍<sup>1</sup>, 叶宁<sup>2</sup>, 徐宝灵<sup>1</sup> (1. 桂林医学院第二附属医院急诊科, 广西桂林 541100; 2. 桂林医学院附属医院急诊科, 广西桂林 541000)

**摘要:**目的 探讨 miR-150 在急性呼吸窘迫综合征 (ARDS) 患者血清中的表达及临床意义。方法 选取 2018 年 1 月至 2019 年 11 月于桂林医学院第二附属医院就诊的 50 例 ARDS 患者为疾病组, 另取体检健康者 50 例作为健康人对照组, 通过 RT-qPCR 检测疾病组和健康人对照组外周血 miR-150 的表达水平, 并分析其与 ARDS 患者临床病理参数的关系; 通过 Pearson 相关分析 miR-150 与 APACHE II 评分的关系; 采用 Kaplan-Meier 法进行生存曲线分析 miR-150 的表达水平与 ARDS 患者预后的关系, 并进行多因素生存分析; ROC 曲线分析 miR-150 对筛查 ARDS 的临床价值。结果 与健康人对照组 (5.44±1.27) 相比, ARDS 患者血清中 miR-150 的表达水平 (2.18±0.87) 显著降低 ( $t=14.972, P<0.05$ ), 且其低表达与 APACHE II 评分有关 ( $\chi^2=4.154, P<0.05$ ); Pearson 分析结果显示, ARDS 患者血清 miR-150 的表达水平与 APACHE II 评分呈负相关 ( $r=-0.826, P<0.05$ )。血清 miR-150 低表达 ARDS 患者的 28 d 生存率显著低于高表达者 (33.33% vs 82.61%,  $\chi^2=12.320, P<0.001$ )。Cox 回归分析结果显示, ARDS 患者生存期与血清 miR-150 的表达水平及 APACHE II 评分相关 ( $P<0.05$ )。miR-150 筛查 ARDS 的 ROC 曲线下面积 (AUC<sup>ROC</sup>) 为 0.988 (95% CI: 0.975~1.000), 敏感性和特异性分别为 96% 和 88%。结论 miR-150 可作为 ARDS 筛查及预后预测因子。

**关键词:** 微小 RNA-150; 急性呼吸窘迫综合征; 预后; 临床诊断

**中图分类号:** R446; R563.8

**文献标志码:** A

急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS) 是急性肺损伤 (ALI) 的最终严重阶段, 病死率高达 40% 以上。因此, 筛选出 ARDS 发病和预后的生物学标志物至关重要。微小 RNA (microRNA, miRNA) 是小的非编码 RNA, 其表达失调可能参与许多疾病的发病机制。有学者证实, miRNAs 在 ARDS 发病机制和进展过程中具有潜在的临床应用价值<sup>[1]</sup>。另有研究表明, miRNA 在 ARDS 炎症反应中发挥着不可忽视的作用<sup>[2-3]</sup>。miR-150 是定位于 19q13.33, 长度为 2 nt 的单链 miRNA, miR-150 通过直接靶向丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 3 (AKT3) 表达, 减轻脂多糖 (LPS) 诱导的急性肺损伤<sup>[4]</sup>。然而, miR-150 在 ARDS 中发病机制中作用的文献报道少见。本研究通过检测 ARDS 患者血清中 miR-150 的表达水平, 分析其表达的临床意义, 评估其筛查或预后预测价值。

## 1 资料与方法

### 1.1 临床资料 收集 2018 年 1 月至 2019 年 11 月

于桂林医学院第二附属医院急诊科就诊的 ARDS 患者 50 例, 男 31 例, 女 19 例; 年龄 (55.08±11.52) 岁; BMI (23.25±2.27) kg/m<sup>2</sup>; APACHE II 评分 (24.18±8.46) 分。纳入标准<sup>[5]</sup>: (1) 符合 ARDS 诊断标准; (2) 入住 ICU 时间 > 72 h。排除标准: (1) 年龄 < 18 岁; (2) 自身免疫病患者; (3) 急性肺疾病或者慢性阻塞性肺疾病患者; (4) 肿瘤或伴有肝、肾等其他脏器功能障碍患者。选取同期体检的 50 例体检健康者作为健康人对照组, 男 32 例, 女 18 例; 年龄 (55.14±12.14) 岁; BMI (23.42±2.12) kg/m<sup>2</sup>。两组研究对象年龄、性别和 BMI 间差异均无统计学意义 ( $P>0.05$ )。本研究经桂林医学院第二附属医院医学伦理委员会批准 (批准文号: 2017GLMU1AYJS083), 患者及家属均知情同意。

**1.2 标本采集** 采集 ARDS 患者入院第 1 天 (体检健康者于体检当日) 的空腹静脉血 10 mL, 置于生化采血管中, 4 °C、3 000 r/min 离心 10 min, 分离并收集血清, 置于 -80 °C 保存。

### 1.3 主要仪器及试剂 MR-96A 酶联免疫检测仪

\* 基金项目: 桂林科学研究与技术开发计划课题 (桂林市科技局 20170109-13)。

作者简介: 蒋萍萍, 1985 年生, 女, 主治医师, 硕士, 主要从事急诊医学方向的工作及研究。

通信作者: 叶宁, 副主任医师, 硕士, E-mail: 19884070@qq.com。

(武汉科尔达医疗科技公司),CFX96 实时荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司),Microfuge 20R 高速冷冻离心机(美国贝克曼公司)。miRNeasy Serum/Plasma Kit(德国 Qiagen 公司),Prime Script RT 试剂盒、Perfect Real time 染料法实时荧光定量试剂盒(日本 TaKaRa 公司),miR-150 和 U6 扩增引物(上海生工公司)。

**1.4 RNA 提取、逆转录反应** 按照 miRNeasy Serum/Plasma Kit 说明书提取总 RNA,采用紫外分光光度计检测 RNA 的浓度和纯度,取吸光度( $A_{260/280\text{ nm}}$ )值为 1.8~2.0 的样本。按 Prime Script RT 试剂盒说明书将 miRNA 逆转录为 cDNA,样本置于-20℃保存。

表 1 引物序列信息

基因名称	引物序列(5'→3')	退火温度(℃)	产物片段大小(bp)
miR-150	F:TCTCCCAACCCTTGACAGTG	60	182
	R:CTCAACTGGTGTCTGGA		
U6	F:CTCGCTTCGGCAGCACA	60	94
	R:AACGCCTCACGAATTTGCGT		

**1.6 统计学分析** 数据均使用 SPSS 24.0 软件包进行统计学分析。采用卡方检验分析血清中 miR-150 的表达水平与 ARDS 患者临床病理参数的关联。采用 Pearson 分析 miR-150 的表达与 APACHE II 评分的相关性。Kaplan-Meier 生存曲线进行生存分析。生存资料的多因素分析应用 Cox 回归模型。根据 ARDS 组与健康人对照组血清 miR-150 的表达水平绘制 ROC 曲线,以评价血清 miR-150 用于评估 ARDS 的筛查价值。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**1.5 RT-qPCR 检测** 根据 NCBI 中 GenBank 提供的 miR-150(序列号:NC\_000019.10),U6(序列号:NC\_000898.1)的基因序列,由上海生工公司设计并合成引物,引物信息见表 1。将获得的 cDNA 采用 Perfect Real time 染料法,按照实时荧光定量试剂盒说明书进行扩增,反应体系为 20 μL,包括:2×SYBR Green PCR Master Mix 5 μL,10 μmol/L 上、下游引物各 0.5 μL,cDNA 2 μL,ddH<sub>2</sub>O 12 μL。循环参数:95℃变性 30 s;95℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 15 s,共 40 个循环,在 60℃ 时采集荧光信号,并用实时荧光定量 PCR 仪自带的 CFX96 Real-Time PCR Detection System 软件进行熔解曲线分析。以 U6 为内参照,并采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法进行相对定量分析。

**2.1 ARDS 患者血清中 miR-150 的表达水平比较** 与健康人对照组(5.44±1.27)相比,ARDS 患者血清中 miR-150 的表达水平(2.18±0.87)显著降低( $t = 14.972, P < 0.05$ )。

**2.2 ARDS 患者临床病理资料分析** 以 miR-150 表达水平的平均数(2.18)为界值,将 ARDS 患者分为低表达组( $n = 27$ )和高表达组( $n = 23$ ),结果发现,miR-150 低表达和 APACHE II 评分有关( $\chi^2 = 4.154, P = 0.042$ ),而与患者年龄、性别、BMI 以及吸烟史均无关( $P > 0.05$ )。见表 2。

**2 结果**

表 2 ARDS 患者临床病理参数的比较

参数	分类	总例数	低表达( $n = 27$ )	高表达( $n = 23$ )	$\chi^2$ 值	P 值
性别	男	31	16	15	0.187	0.665
	女	19	11	8		
年龄(岁)	>60	24	13	11	0.001	0.982
	≤60	26	14	12		
BMI(kg/m <sup>2</sup> )	>23	23	12	11	0.057	0.811
	≤23	27	15	12		
吸烟	吸烟	20	11	9	0.013	0.908
	不吸烟	30	16	14		
APACHE II 评分	≤24.18 分	27	11	16	4.154	0.042
	>24.18 分	23	16	7		

**2.3 ARDS 患者血清 miR-150 表达水平与 APACHE II 评分的相关性** Pearson 分析结果显示,ARDS 患者血清 miR-150 的表达水平与

APACHE II 评分呈负相关( $r = -0.826, P < 0.05$ )。进一步分析 miR-150 低表达组和高表达组与 APACHE II 评分相关性,结果显示,血清 miR-150

低表达组与 APACHE II 评分呈负相关( $r=-0.436$ ,  $P<0.05$ ), 而血清 miR-150 高表达组与 APACHE II 评分无相关性( $r=-0.299$ ,  $P>0.05$ )。

**2.4 血清 miR-150 水平与 ARDS 患者生存期的关系** Kaplan-Meier 生存曲线显示, 血清 miR-150 低表达 ARDS 患者的 28 d 生存率显著低于高表达者(33.33% vs 82.61%,  $\chi^2 = 12.320$ ,  $P<0.001$ )。见图 1。Cox 回归分析显示, ARDS 患者生存期与血清 miR-150 表达水平和 APACHE II 评分均有关。见

表 3。

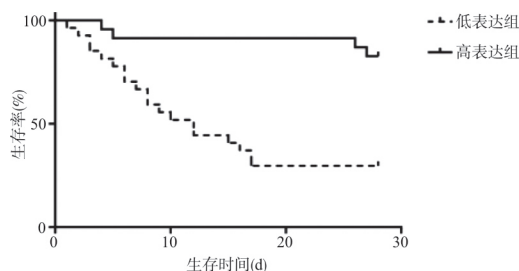


图 1 miR-150 表达水平与 ARDS 患者生存期的关系

表 3 多因素 Cox 回归分析患者生存期的影响因素

因素	B	SE	Wald $\chi^2$	P 值	RR	95% CI
BMI	1.286	2.457	0.274	0.601	3.619	0.029~446.344
年龄	-1.532	2.446	0.392	0.531	0.216	0.002~26.098
性别	0.163	0.476	0.117	0.732	1.177	0.463~2.990
吸烟	0.018	0.512	0.001	0.973	1.018	0.373~2.775
APACHE II	2.011	0.659	9.324	0.002	7.472	2.055~27.170
miR-150	-1.595	0.793	4.050	0.044	0.203	0.043~0.959

**2.5 血清 miR-150 用于筛查 ARDS 的价值** 根据 ARDS 组与健康人对照组血清 miR-150 的表达水平绘制 ROC 曲线。miR-150 筛查 ARDS 的 ROC 曲线下面积( $AUC^{ROC}$ )为 0.988(95% CI: 0.975~1.000), 当 cut-off 值为 3.36 时, 其敏感性和特异性分别为 96% 和 88%。见图 2。

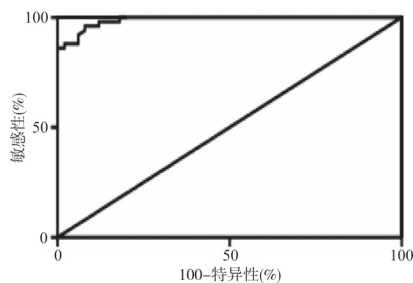


图 2 miR-150 筛查 ARDS 的 ROC 曲线

### 3 讨论

ARDS 病因复杂, 发病机制尚不明确, miRNA 作为调控因子在 ARDS 的发病和预后中发挥重要作用<sup>[6]</sup>。近年来研究发现, miR-150 在恶性肿瘤、系统性硬化病、肺动脉高压以及组织纤维化等多种疾病中呈异常表达<sup>[7]</sup>。本研究检测 ARDS 患者血清中 miR-150 的表达, 结果发现 miR-150 在 ARDS 患者血清中低表达, 且与 APACHE II 评分相关呈负相关。本研究与 Wei 等<sup>[8]</sup>研究结果相似, 其结果亦证实, 血液循环中的 miR-150 呈异常表达。APACHE II 评分系统由急性生理学评分(APS)、年龄评分、慢性健康状况评分 3 个部分组成, 可作为评估 ICU 患者病情和预后的指标<sup>[9]</sup>。笔者进一步

采用 Kaplan-Meier 生存曲线分析, 结果显示, 血清 miR-150 低表达的 ARDS 患者 28 d 生存率显著低于血清 miR-150 高表达者。Cox 回归模型结果表明, ARDS 患者生存期与血清 miR-150 表达水平以及 APACHE II 评分相关, 这与 Li 等<sup>[4]</sup>研究相一致, 其结果表明, miR-150 表达水平在 ARDS 患者的血清中显著降低, 并且与疾病严重程度和 ARDS 28 d 生存率呈负相关。提示 miR-150 水平与 ARDS 患者病情严重程度和预后具有一定的相关性, 可作为患者预后的重要生物学标志物。

miRNA 有望成为 ARDS 潜在的诊断指标和治疗靶点。研究表明, miR-122 高表达与 ARDS 患者病情严重程度及预后相关, 且 miR-122 联合 APACHE II 评分对 ARDS 患者预后具有较高的评估价值<sup>[10]</sup>。本研究采用 ROC 曲线对血清 miR-150 筛查 ARDS 的价值进行分析, 结果表明, miR-150 筛查 ARDS 的  $AUC^{ROC}$  为 0.988(95% CI: 0.975~1.000), 敏感性和特异性分别为 96% 和 88%。这与 Gan 等<sup>[11]</sup>研究结果一致, 其研究表明髌部骨折后急性肺损伤(ALI)患者血清 miR-150 的表达明显降低, 进一步进行线性回归分析结果显示, 血清 miR-150 与肺组织学得分显著相关, 且在髌部骨折后 ALI 患者的辅助诊断具有一定的价值。以上研究提示血液循环中的 miR-150 可能成为 ARDS 早期筛查及预后的生物学标志物。

综上所述, miR-150 在 ARDS 患者血清中低表达, 并与 APACHE II 评分以及预后相关, 有望成为

ARDS 发病和预后预测的生物学标志物。但是本研究尚存一些不足:(1)样本量较少,预后及筛查相关结果需通过扩大样本量进行验证并补充;(2)未进行连续动态监测 miR-150 的变化水平及疗效评价;(3)本文缺乏相关作用机制研究,后期需通过体内动物实验进行完善与补充。

#### 4 参考文献

- [1] You QH, Wang JM, Jia D, *et al.* MiR-802 alleviates lipopolysaccharide-induced acute lung injury by targeting Peli2[J]. *Inflamm Res*, 2020, 69(1):75-85.
- [2] Xu F, Yuan JH, Tian SJ, *et al.* MicroRNA-92a serves as a risk factor in Sepsis-induced ARDS and regulates apoptosis and cell migration in lipopolysaccharide-induced HPMEC and A549 cell injury [J]. *Life Sci*, 2020, 256:117957.
- [3] Liang YF, Xie JJ, Che D, *et al.* MiR-124-3p helps to protect against acute respiratory distress syndrome by targeting p65[J]. *Biosci Rep*, 2020, 40(5):BSR20192132.
- [4] Li PB, Yao YF, Ma YZ, *et al.* MiR-150 attenuates LPS-induced acute lung injury via targeting AKT3 [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 75:105794.
- [5] ARDS DTF, Ranieri VM, Rubenfeld GD, *et al.* Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition [J]. *JAMA*, 2012, 307(23):2526-2533.
- [6] Liang JQ, Gu SY, Mao XL, *et al.* Endothelial cell morphology regulates inflammatory cells through MicroRNA transferred by extracellular vesicles[J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2020, 8:369.
- [7] Sur D, Burz C, Sabarimurugan S, *et al.* Diagnostic and prognostic significance of MiR-150 in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis[J]. *J Pers Med*, 2020, 10(3):99.
- [8] Wei SB, Liu QY. Long noncoding RNA MALAT1 modulates Sepsis-induced cardiac inflammation through the miR-150-5p/NF- $\kappa$ B axis [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2019, 12(9):3311-3319.
- [9] Regunath H, Moulton N, Woolery D, *et al.* Ultra-protective mechanical ventilation without extra-corporeal carbon dioxide removal for acute respiratory distress syndrome [J]. *J Intensive Care Soc*, 2019, 20(1):40-45.
- [10] 郝金香, 许俊旭, 梁勇, 等. miR-122 联合 APACHE II 评分对 ARDS 患者预后的评估价值[J]. *中华危重病急救医学*, 2019, 31(6):694-698.
- [11] Gan L, Sun TS, Li B, *et al.* Serum miR-146a and miR-150 as potential new biomarkers for hip fracture-induced acute lung injury [J]. *Mediators Inflamm*, 2018, 2018:8101359.

(收稿日期:2020-09-04)

(本文编辑:许晓蒙)