

急性呼吸窘迫综合征患者血清 Cc16 蛋白和 miRNA-122 表达及其临床意义

新汶矿业集团莱芜中心医院 公维梅*, 莱芜 271100

摘要 目的:探讨急性呼吸窘迫综合征(ARDS)患者血清 Cc16 蛋白、miRNA-122 的表达水平及其与预后的关系。方法:回顾性分析 68 例 ARDS 患者的临床资料,其中死亡组 53 例,存活组 15 例,另选取同期健康体检者 45 例为对照组。采用 Kaplan-Meier 法分析患者的生存期,应用 Logistic 分析影响患者预后的因素。结果:ARDS 存活组与死亡组平均肺动脉压、平均气道压、肺损伤评分、C 反应蛋白、降钙素原、丙氨酸转氨酶(ALT)、天门冬氨酸转氨酶(AST)、总胆红素、Cc16 蛋白和 miRNA-122 表达水平显著高于对照组,且死亡组 C 反应蛋白、降钙素原、ALT、AST、总胆红素、Cc16 蛋白及 miRNA 高于存活组(均 $P < 0.05$)。Kaplan-Meier 分析显示 Cc16 蛋白低表达组总体生存率显著高于高表达组(51.85% vs 18.15%, $P < 0.01$),miRNA-122 低表达组生存率显著高于高表达组(60.92% vs 20.13%, $P < 0.05$);Logistic 单因素分析显示 ARDS 预后与 C 反应蛋白、降钙素原、ALT、AST、总胆红素、Cc16、miRNA-122 相关;Logistic 多因素分析显示 ALT、Cc16、miRNA-122 是影响 ARDS 预后的独立危险因素。结论:ARDS 患者血清 Cc16 蛋白和 miRNA-122 表达量异常增高与预后不良密切相关。

关键词 急性呼吸窘迫综合征;血清 Cc16 蛋白;miRNA-122;预后

中图分类号 R563.8 **文献标识码** A **DOI** 10.11768/nkjwzzzz20200109

Expression and clinical significance of serum Cc16 protein and miRNA122 in patients with acute respiratory distress syndrome GONG Wei-mei*, Laiwu Central Hospital of Xinwen Mining Group, Laiwu 271100, China

Abstract Objective: To investigate the expression of serum Cc16 protein and miRNA122 in patients with acute respiratory distress syndrome (ARDS) and their relationship with prognosis. Methods: The clinical data of 68 patients with ARDS were collected, of which 53 were death group and 15 were survival group. Another 45 patients who took part in physical examination at the same time in our hospital were selected as control group. The clinicopathological data of all subjects were collected and the levels of AST, ALT, total bilirubin, serum Cc16 protein, C-Reactive protein and procalcitonin were detected, and the expression of miRNA-122 was detected by RT-q PCR. Kaplan-Meier method was used to analyze the survival time of patients, and Logistic analysis was used to analyze the prognostic factors. Results Mean pulmonary artery pressure, mean airway pressure, lung injury score, C-reactive protein, procalcitonin, ALT, AST, total bilirubin and Cc16 protein in ARDS survival group and death group were significantly higher than those in control group, and C-reactive protein, procalcitonin, ALT, AST, total bilirubin and Cc16 protein in death group were significantly higher than those in survival group ($P < 0.05$). RT-q PCR showed that the expression level of miRNA-122 in ARDS death group and survival group was significantly higher than that in control group, and that in ARDS death group was significantly higher than that in survival group ($P < 0.05$). Kaplan-Meier analysis showed that overall survival (OS) (51.85%) in miRNA-122 low-expression group was significantly higher than that in high-expression group (18.15%) ($P = 0.0085$), OS (60.92%) in miRNA low-expression group was significantly higher than that in high-expression group (20.13%) ($P = 0.0268$). Logistic univariate analysis showed that prognosis of ARDS was correlated with CRP, procalcitonin, ALT, AST, total bilirubin, Cc16 and miRNA-122. Logistic multivariate analysis showed that ALT, Cc16 and miRNA-122 were independent risk factors affecting prognosis of ARDS. Conclusion: The expression levels of Cc16 protein and miRNA-122 in ARDS patients are increased, which is closely related to poor prognosis.

Key words Acute respiratory distress syndrome; Serum Cc16 protein; MiRNA-122; Prognosis

急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)是由非心源性因素引起的急性弥漫性肺部炎症,患者多表现为呼吸窘迫、低氧血症、低顺应性。有报道称,Cc16 蛋白可作为 ARDS 的早期标志物^[1]。miRNAs 是内源基因编码的非编码单链 RNA,可通过诱导或沉默基因的表达进而参与疾

病的发生发展过程^[2]。miRNA-122 是一种肝脏特有 RNA,其参与肝脏的多种生理、病理发展过程,可作为急性肝损伤的早期标志物。研究报道,miRNA-122 可以预测 ARDS 患者的死亡率^[3]。本研究探讨 ARDS 患者 Cc16 蛋白、miRNA-122 表达水平与预后的关系,报道如下。

* 通信作者:公维梅, E-mail:2446255229@qq.com

资料与方法

一般资料 选取 2015 年 6 月~2017 年 8 月新汶矿业集团莱芜中心医院收治的 ARDS 患者 68 例,其中重症肺部感染 46 例,复合外伤 11 例,坏死性肠梗阻 8 例,糖尿病肾病 3 例,分为存活组 15 例(男 8,女 7),年龄 18~68 岁,平均(44.33±14.25)岁,病程 4~18d,平均(9.65±1.12)d;死亡组 53 例(男 29,女 24),年龄 18~70 岁,平均(45.12±13.22)岁,病程 3~19d,平均(9.81±1.06)d;另选取同期参加体检的健康者 45 例(男 25,女 20)为对照组,年龄 18~70 岁,平均(43.56±12.03)岁。纳入标准:符合美国/欧洲共识委员会 ARDS 标准^[4];患者既往无 ARDS 病史;无慢性肝病。排除合并其他严重肺部和肝性疾病及临床资料不全者。患者均知情且签署同意书。

方法 收集受试者性别、年龄、体重指数(body mass index, BMI)、平均肺动脉压、平均气道压、肺损伤评分等临床资料,其中肺损伤采用 Murray 等^[5]提出的肺损伤评分(lung injury score, LIS)体系,0 分为无肺损伤,分值越高,肺损伤越严重。患者入 ICU 后 24 h 内采集血液 5 mL,于室温避光静置 15 min,3 000 r/min 离心 15 min,分离血清于无菌 EP 管中,置于 -20℃ 冰箱中保存待测,避免反复冻融。采用全自动生化分析仪(日式 7020)测定天门冬氨酸转氨酶(AST)、丙氨酸转氨酶(ALT)、总胆红素浓度,试剂盒购自南京建成生物工程研究所;采用酶联免疫吸附法检测血清 Cc16 蛋白、C 反应蛋白、降钙素原水平,试剂盒购自上海沪宇生物科技有限公司,检测步骤按照试剂盒说明书进行。

按照 miRNA 试剂盒说明书提取血清总 RNA,

核酸蛋白检测仪测定 miRNA 的光密度(optical density, OD),计算 miRNA 的纯度和浓度。使用 miRNA 反转录试剂盒(TAKARA 公司)将 miRNA 反转录为 cDNA;逆转录-定量聚合酶链式反应(RT-qPCR)方法检测血清中 miRNA -122 的相对表达量。RT-qPCR 反应体系为 20 L;2 × miRcute miRNA Premix 10 L,上下游引物各 0.5 L, cDNA 模板 2 L, ddH₂O 补足 20 L;反应设置为 94℃ 预变性 2 min, 94℃ 20 s, 60℃ 20 s, 72℃ 延伸 20 s, 共 40 个循环。以 U6 为内参基因。引物由上海生工合成,引物序列,基因:U6, 正向引物 5'-3': ATTGGAACGATACAGAGAAGATT, 反向引物 5'-3': GGAACGCTTCACGAATTTG; 基因:miRNA, 正向引物 5'-3': CAAGCGTTGGAGTGTGACA, 反向引物 5'-3': CGTCCTACCATTCTCCAGC。反应结束后采用 2-ΔΔCt 法计算 miRNA -122 的相对表达量。随访 30 d,统计生存率。

统计学处理 采用 SPSS 20.0 统计软件包,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,2 组间比较采用 t 检验,3 组比较采用方差分析;计数资料以百分数(%)表示,采用 χ^2 检验;采用 Kaplan-Meier 法对患者的生存期进行分析,Logistic 分析影响患者预后的危险因素。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

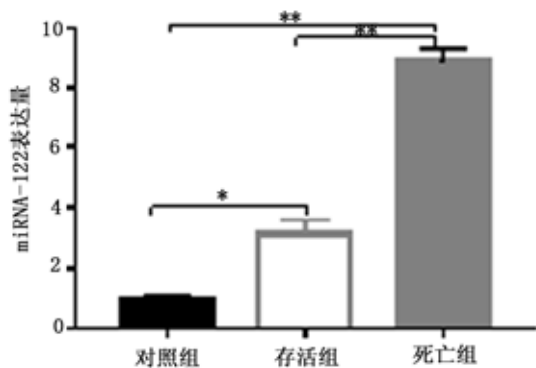
一般资料 各组年龄、性别、BMI 比较,差异无统计学意义(均 $P > 0.05$),ARDS 存活组与死亡组平均肺动脉压、平均气道压、肺损伤评分、C 反应蛋白、降钙素原、ALT、AST、总胆红素、Cc16 蛋白显著高于对照组,且死亡组 C 反应蛋白、降钙素原、ALT、AST、总胆红素、Cc16 蛋白高于存活组(均 $P < 0.05$),见表 1。

表 1 各组一般资料比较

组别	例	性别(例)		年龄(岁)	BMI (kg/m ²)	平均肺动脉压 (mmHg)	平均气道压 (mmHg)	肺损伤评分 (分)
		男	女					
对照组	45	25	20	43.56±12.03	24.53±3.35	35.65±3.22	16.13±3.05	1.00±0.12
ARDS 存活组	15	8	7	44.33±14.25	23.99±4.01	38.46±2.98*	26.49±3.35*	2.26±0.56*
ARDS 死亡组	53	29	24	45.12±13.22	24.12±3.59	39.83±6.03*	27.42±3.46*	2.28±0.61*
组别	例	C 反应蛋白 (mg/dL)		降钙素原 (ng/mL)	ALT (U/L)	AST (U/L)	总胆红素 (mg/dL)	Cc16 蛋白 (μg/mL)
对照组	45	20.37±5.01		1.82±0.55	68.57±23.72	38.59±13.85	0.65±0.13	58.29±15.27
ARDS 存活组	15	23.66±4.27*		6.35±1.88*	84.54±24.51*	50.18±12.93*	1.23±0.36*	118.22±29.56*
ARDS 死亡组	53	26.56±4.43**		8.54±2.01**	95.14±26.22**	59.11±13.26**	1.55±0.41**	138.23±30.26**

注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与 ARDS 存活组比较,** $P < 0.05$

miRNA -122 水平 RT-qPCR 检测显示 ARDS 死亡组与存活组患者 miRNA -122 表达水平显著高于对照组 ($P < 0.05$), 且死亡组高于存活组 ($P < 0.05$), 见图 1、表 2。



注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图 1 miRNA -122 表达水平

表 2 各组 miRNA -122 表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例	miRNA -122
对照组	45	1.01 ± 0.06
ARDS 存活组	15	2.66 ± 0.21 *
ARDS 死亡组	53	8.87 ± 0.41 **

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$; 与存活组比较, # $P < 0.05$

Ce16 蛋白、miRNA -122 与 ARDS 患者预后的关系 Kaplan-Meier 分析结果显示 Ce16 蛋白低表达组生存率显著高于高表达组 (51.85% vs 18.15%, $P < 0.01$), miRNA -122 低表达组生存率显著高于高表达组 (60.92% vs 20.13%, $P < 0.05$)。

影响 ARDS 预后的单因素 Logistic 分析 以预后为因变量, 以可能影响预后的因素为自变量进行 Logistic 单因素分析, 结果显示 ARDS 预后与 C 反应

蛋白、降钙素原、ALT、AST、总胆红素、Ce16、miRNA-122 相关 (均 $P < 0.05$), 见表 3。

影响 ARDS 预后的多因素 Logistic 分析 将单因素分析中与 ARDS 预后相关的指标纳入 Logistic 回归模型, 分析结果显示 ALT、Ce16、miRNA-122 是影响 ARDS 预后的独立危险因素, 见表 4。

讨论

肺顺应性与远端细支气管弹性密切相关, 顺应性越高, 扩张程度越大^[6]。本研究中 ARDS 存活组与死亡组平均肺动脉压、平均气道压、肺损伤评分、C 反应蛋白、降钙素原、ALT、AST、总胆红素、Ce16 蛋白显著高于对照组, 表明 ARDS 患者肺顺应性差、出现严重的呼吸窘迫现象, 并存在严重肺部炎症, 部分患者肝脏疾病也处于极其严重状态。

Ce16 细胞通过分泌特异性蛋白 Ce16, 参与细支气管修复和毒素清除, Ce16 蛋白可作为肺-血屏障、肺泡原毛细血管通透性完整的敏感标志物^[7,8]。初期 ARDS 患者因抗氧化应激增强, Ce16 细胞分泌 Ce16 蛋白增多, 血清 Ce16 水平升高^[9]。随着病情加重, Ce16 细胞受损, 分泌能力减弱, Ce16 蛋白水平下降。但 ARDS 恶化造成屏障完整性受损, 通透性增强, 血清 Ce16 蛋白水平仍然增加^[10]。本研究中 ARDS 死亡组与存活组患者 Ce16 蛋白水平显著高于对照组, 且死亡组高于存活组, 表明随着病情恶化, Ce16 蛋白显著升高。Kaplan-Meier 分析显示 Ce16 蛋白低表达组生存率显著高于高表达组, 且 Ce16 蛋白是影响患者预后的危险因素。

miRNA 广泛表达于多种动植物中, 其通过抑制

表 3 ARDS 预后的单因素 Logistic 比较

影响因素	β	SE	Wald	P	OR	95% CI
年龄	0.196	0.659	0.088	0.071	1.216	0.842 ~ 1.756
性别	0.329	0.512	0.413	0.065	1.390	0.913 ~ 2.115
BMI	0.337	0.558	0.365	0.067	1.401	0.925 ~ 2.123
平均肺动脉压	0.251	0.647	0.151	0.054	1.286	0.820 ~ 2.016
平均气道压	0.392	0.403	0.946	0.059	0.676	0.205 ~ 2.228
肺损伤评分	0.384	0.351	1.197	0.052	0.681	0.230 ~ 2.016
C 反应蛋白	0.589	0.406	2.105	0.041	1.803	1.235 ~ 2.631
降钙素原	0.538	0.366	2.161	0.038	1.712	1.215 ~ 2.412
ALT	0.589	0.326	3.264	0.023	1.801	1.342 ~ 2.418
AST	0.679	0.412	2.716	0.029	1.972	1.468 ~ 2.649
总胆红素	0.489	0.315	2.410	0.036	1.630	1.135 ~ 2.341
Ce16	0.549	0.319	2.961	0.027	1.731	1.223 ~ 2.451
miRNA -122	0.462	0.305	2.294	0.034	1.587	1.058 ~ 2.381

表 4 ARDS 预后的多因素 Logistic 分析

影响因素	β	SE	Wald	P	OR	95% CI
C 反应蛋白	0.250	0.306	0.668	0.083	1.284	0.812 ~ 2.031
降钙素原	0.367	0.417	0.776	0.098	1.444	0.951 ~ 2.192
ALT	0.585	0.319	3.359	0.037	1.794	1.311 ~ 2.456
AST	0.282	0.423	0.444	0.064	1.326	0.816 ~ 2.154
总胆红素	0.400	0.451	0.785	0.052	1.491	0.960 ~ 2.316
Ccl6 蛋白	0.569	0.343	2.751	0.010	1.766	1.223 ~ 2.551
miRNA -122	0.682	0.319	4.572	0.006	1.978	1.358 ~ 2.881

靶基因转录、促进其降解。研究报道 miRNA -122 是急性肝损伤的早期标志物^[11]。miRNA -122 在 ARDS 引起的微血管损伤、微血管血流、细胞氧合中也具有重要作用^[12]。Wang 等^[13]研究表明 miRNA -122 可作为 ARDS 的标志物且与患者 28 d 生存率相关。本研究中 ARDS 组 miRNA -122 蛋白水平显著高于对照组,死亡组显著高于存活组,表明 miRNA -122 参与疾病的进展。Kaplan-Meier 分析结果显示 miRNA -122 表达与 ARDS 患者生存率显著相关,miRNA -122 低表达组生存率显著高于高表达组。Logistic 单因素、多因素分析显示 miRNA -122 是影响患者预后的危险因素。

参考文献

- 林锦乐,傅莹,曾世永,等.急性呼吸窘迫综合征患者血清 Clara 细胞蛋白 16 表达及与肺顺应性关系[J].中华实用诊断与治疗杂志,2018,32(3):265-268.
- 周巧.微 RNAs 调控 p38MAPK 信号通路及与疾病关系的研究进展[J].重庆医学,2018,47(16):104-106.
- 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.
- 中华医学会重症医学分会.急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征诊断和治疗指南(2006)[J].中国实用外科杂志,2007,28(1):19-28.
- Murray JF, Matthay MA, Luce JM, et al. An expanded definition of the

adult respiratory distress syndrome[J]. Am Rev Respir Dis, 1988, 138(3):720-723.

- Lin J, Zhang W, Wang L, et al. Diagnostic and prognostic values of Club cell protein 16 (CC16) in critical care patients with acute respiratory distress syndrome[J]. J Clin Lab Anal, 2017, 32(2):32-40.
- 钟萍,范贤明,蒋雪莲,等. COPD 稳定期患者血清 IL-6、IL-18、CC16 水平与肺功能及 CAT 评分的关系[J].实用医学杂志,2016,32(21):3547-3551.
- 张学城,陈东.围急性呼吸窘迫综合征血清 CC16 蛋白水平的预警意义[J].罕少疾病杂志,2016,23(5):11-12.
- 侯昌权,陈文凯.连续性静脉-静脉血液滤过治疗急性呼吸窘迫综合征患者炎症因子水平及动脉血气的影响[J].内科急危重症杂志,2017,23(1):37-39.
- 秦衡,王导新.中青年和老年中、重度急性呼吸窘迫综合征患者的预后相关危险因素分析[J].现代医药卫生,2017,33(14):2087-2090.
- Rahmel T, Rump K, Adamzik M, et al. Increased circulating microRNA-122 is associated with mortality and acute liver injury in the acute respiratory distress syndrome [J]. BMC Anesthesiol, 2018, 18(1):75-87.
- 陈军,谭德敏,陈绵军.急性呼吸窘迫综合征患者氧合指数、血管外肺水指数的动态变化及其临床意义[J].内科急危重症杂志,2018,24(2):150-152.
- Wang C Y, Calfee C S, Paul D W, et al. One-year mortality and predictors of death among hospital survivors of acute respiratory distress syndrome[J]. Intensive Care Med, 2014, 40(3):388-396.

(2018-11-26 收稿 2019-07-03 修回)

(上接第 21 页)

- Kawai T, Takagi Y, Fukuzawa M, et al. The role of trefoil factor family in apparently healthy subjects administered gastroprotective agents for the primary prevention of gastrointestinal injuries from low-dose acetylsalicylic acid: a preliminary study [J]. J Clin Biochem Nutr, 2011, 49(2):136-140.
- Su G, Fu Z, Hu L, et al. 16S Ribosomal ribonucleic acid gene poly-

merase chain reaction in the diagnosis of bloodstream infections: a systematic review and meta-analysis [J]. PLoS One, 2015, 10(5):e127195.

- Su W, Ding X. Methods of endotoxin detection [J]. J Lab Autom, 2015, 20(4):354-364.

(2019-03-11 收稿 2020-01-17 修回)