

血浆 miRNA-190 及 miRNA-197 联合检测可辅助诊断肺血栓栓塞症^{*}

周晓婷 吴巧珍 徐瑞 胡晓蕴 董凌云^{*}, 江苏苏州 215200

苏州市第九人民医院呼吸与危重症医学科

摘要 目的:探讨血浆 miRNA-190 和 miRNA-197 在肺血栓栓塞症(PTE)患者中表达水平及辅助诊断价值。方法:选择2017年7月至2019年6月苏州市第九人民医院 PTE 患者30例为 PTE 组,同期匹配心肌梗死患者45例为心肌梗死组,健康体检者45例为正常对照组。采用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测血浆 miRNA-190 和 miRNA-197 在所有受试者外周血中的表达水平,并分析其在3组中的表达量差异。应用受试者工作特征曲线(ROC 曲线)及曲线下面积(AUC)(95% CI)评估两者单独或联合检测作为 PTE 诊断指标的意义。结果:血浆 miRNA-190 在3组中的相对表达量分别为 3.01 ± 2.01 , 1.80 ± 1.02 , 1.18 ± 0.67 ;其在 PTE 组血浆中表达量较心肌梗死组及正常对照组高($t = 3.602$, $t = 5.814$, P 均 < 0.05)。血浆 miRNA-197 在3组中相对表达量分别为 4.82 ± 3.80 , 1.88 ± 1.50 , 1.38 ± 0.83 ;其在 PTE 组血浆中表达量较心肌梗死组及正常对照组高($t = 4.791$, $t = 5.886$, P 均 < 0.05)。作为 PTE 的诊断指标,血浆 miRNA-190 的最佳临界值为 1.598,敏感度为 75.56%,特异度为 80.00%,AUC 为 0.7844,95% CI 为 0.6858 ~ 0.8831;血浆 miRNA-197 最佳临界值为 2.40,敏感度为 75.56%,特异度为 86.67%,AUC 为 0.7931,95% CI 为 0.6870 ~ 0.8991。血浆 miRNA-190 和 miRNA-197 联合检测诊断 PTE 的敏感度为 80.00%,特异度为 93.33%,AUC 为 0.9136,95% CI 为 0.8516 ~ 0.9756;均高于两者单独检测。结论:血浆 miRNA-190 和 miRNA-197 在 PTE 患者外周血血浆中表达量明显升高,两者联合检测敏感度和特异度更高,有助于 PTE 的辅助诊断。

关键词 肺血栓栓塞; 血浆 miRNA-190; 血浆 miRNA-197; 联合诊断

中图分类号 R543.2 文献标识码 A DOI 10.11768/nkjwzzzz20210510

Combined detection of miRNA-190 and miRNA-197 is conducive to the diagnosis of pulmonary thromboembolism

ZHOU Xiao-ting, WU Qiao-zhen, XU Rui, HU Xiao-yun, DONG Ling-yun^{*}. Department of Respiratory Medicine, Suzhou Ninth People's Hospital, Jiangsu Suzhou 215200, China

Corresponding author: DONG Ling-yun, E-mail: cx_shishi@163.com

Abstract Objective: To study the diagnostic value of quantitative detection of plasma miRNA-190 and miRNA-197 in patients with pulmonary thromboembolism (PTE). Methods: Totally, 30 patients diagnosed with PTE admitted to Respiratory Medicine of Suzhou Ninth People's Hospital from July 2017 to June 2019 were enrolled in this study and plasma was collected. A total of 45 patients with myocardial infarction (MCI) and 45 healthy participants were recruited as the control group. qRT-PCR was used to detect the relative expression level of miRNA-190 and miRNA-197. The diagnostic value was evaluated by receiver operating characteristic (ROC) curves and the area under the ROC curve (AUC) (95% CI). Results: The plasma level of miRNA-190 in PTE group, MCI group and healthy group was 3.01 ± 2.01 , 1.80 ± 1.02 and 1.18 ± 0.67 respectively. The plasma level of miRNA-190 in PTE group was significantly higher than in MCI group and healthy group ($t = 3.602$, $t = 5.814$, P all < 0.0001). The plasma level of miRNA-197 in PTE group, MCI group and healthy group was 4.82 ± 3.80 , 1.88 ± 1.50 , 1.38 ± 0.83 respectively, and the relative expression of miRNA-197 in PTE group was significantly higher than that in the other two groups ($t = 4.791$, $t = 5.886$, P all < 0.05). As the diagnostic indicator, the sensitivity and specificity of miRNA-190 were 75.56% and 80% respectively, with the AUC being 0.7844 (95% CI: 0.6858-0.8831). The sensitivity and specificity of miRNA-197 was 75.56% and 86.67% and the AUC was 0.7931 (95% CI: 0.6870-0.8991). However, the combined detection of miRNA-190 and miRNA-197 showed the sensitivity and specificity of 80.00% and 93.33% respectively, and the AUC was 0.9136 (95% CI: 0.8516-0.9756). Conclusion: The relative expressions of miRNA-190 and miRNA-197 in

^{*}基金项目:苏州市第九人民医院科研基金项目(院201726、YK202109)

^{*}通信作者:董凌云,E-mail:cx_shishi@163.com,江苏省苏州市吴江区太湖新城芦荡路2666号

PTE patients were significantly higher than those in MCI group and healthy group. Combined detection of miRNA-190 and miRNA-197 shows higher sensitivity and specificity, which is more conducive to the diagnosis of PTE.

Key words Pulmonary thromboembolism; miRNA-190; miRNA-197; Combined diagnosis

肺血栓栓塞症 (pulmonary thromboembolism, PTE)是由来自静脉系统或右心的血栓阻塞肺动脉主干或分支而引起肺循环障碍的临床和病理生理综合征,其在心血管疾病中是继急性冠脉综合征及脑卒中后的第三大死因^[1]。PTE 的临床表现主要为呼吸困难、胸痛、咯血等,但个体差异较大,与冠心病、主动脉夹层等疾病难以鉴别。目前 PTE 的确诊需要结合患者临床症状及体征,并依靠无创性的放射性核素肺通气/灌注(V/Q)扫描或者有创性的肺动脉造影^[2~4]。

微小 RNA (miRNA)是一类内源性小分子非编码单链 RNA,能够在血循环中稳定表达,近年来在肺栓塞^[5]、急性心肌梗死^[6]、肺癌^[7]、急性呼吸窘迫综合征^[8]等疾病的诊疗中显示出广阔的应用前景。有研究发现,在大耳白兔 PTE 模型中,血浆 miRNA-190、miRNA-197 的表达量较正常组显著升高^[9],这两个 miRNA 与机体缺氧诱导因子(hypoxia inducible factor, HIF)介导的缺氧反应、血小板激活、血管内炎症等相关,目前这两者在 PTE 患者血浆中的表达情况缺乏研究。本研究通过观察 PTE 患者、心肌梗死患者及健康体检者血浆 miRNA-190 及 miRNA-197 的表达差异,分析两者作为 PTE 诊断标志物的效能。

资料与方法

一般资料 收集苏州市第九人民医院 2017 年 7 月至 2019 年 6 月 PTE 患者 30 例,其中男性 17 例,女性 13 例,平均年龄(46.2 ± 8.3)岁。所有患者均符合 2014 年欧洲心脏学会急性肺血栓栓塞症诊断治疗指南^[10]中的诊断标准。同时纳入同期心肌梗死患者 45 例为心肌梗死组,其中男性 23 例,女性 22 例,平均年龄(49.2 ± 5.4)岁;体检中心健康人群 45 例为正常对照组,其中男性 25 例,女性

20 例,平均年龄(46.6 ± 9.2)岁。3 组间年龄、性别、体重指数(body mass index, BMI)等比较,差异无统计学意义(P 均 > 0.05)。本研究获得医院伦理委员会审核,所有受试者知情并签署同意书。

方法

1. 血液标本的采集和血浆总 RNA 的提取:使用 EDTA 抗凝真空采血管收集纳入人群入院第一天空腹静脉全血标本,3 000 转/min,4℃ 离心 20 min 后,吸上层血浆分别装于无酶离心管内, -80℃ 冻存待用。根据购买的 RNA 提取试剂盒的步骤提取上述标本血浆总 RNA,逆转录成 cDNA 后扩增待用。

2. qRT-PCR 检测 3 组血浆中 miRNA-190 及 miRNA-197 的表达:内参基因和 miRNA-190 及 miRNA-197 的 PCR 引物均由吉凯基因设计和合成。本实验选取了三磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)作为内参基因,实验中设计的引物序列见表 1。利用设计的引物将标本总 miRNA 逆转录为 cDNA 后扩增收集荧光信号,绘制溶解曲线验证产物的特异度。每个样本做三个复孔,结果取其均值。使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算出 3 组标本中 miRNA-190 及 miRNA-197 的相对表达量。

统计学分析 采用 SPSS 20.0 统计学软件进行分析,计量资料采用($\bar{x} \pm s$)表示。同一标本检测三个复孔,Ct 值标准差需 < 0.5。组间比较采用独立样本 t 检验。应用受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线及曲线下面积(area under curve AUC)(95% CI)评估其作为诊断指标的效能。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

一般资料 PTE 组患者临床表现以呼吸困难(73%)及胸痛(47%)多见,约 40% 的患者合并有下肢深静脉血栓,见表 2。

表 1 qRT-PCR 引物序列

	上游引物(5'3')	下游引物(5'3')
GAPDH	GGTGAAGGTCGGAGTCAACG	CAAAAGTTGTCATGGATGACC
miRNA-197	GGTTCACCACCTTCTC	CAGTGCCTGTCGTGGAG
miRNA-190	GGGTGATATGTTGATATATTAGG	CAGTGCCTGTCGTGGAGT

表2 PTE组患者一般资料

项目	例(%)
男性	17(57)
肺动脉造影	30(100)
危险分层	
高危	3(10)
中危	18(60)
低危	9(30)
临床症状	
呼吸困难	22(73)
胸痛	14(47)
咳嗽	5(17)
咯血	4(13)
晕厥	2(7)
合并下肢深静脉血栓	12(40)
危险因素	
恶性肿瘤	3(10)
1个月内手术史	4(13)
活动受限	5(17)
慢性阻塞性肺疾病	2(7)
既往有深静脉血栓病史	6(20)

血浆 miRNA-190 表达量的变化 PTE组、心肌梗死组及正常对照组中的血浆 miRNA-190 相对表达量分别为 $3.01 \pm 2.01, 1.80 \pm 1.02, 1.18 \pm 0.67$; PTE组血浆 miRNA-190 表达量较心肌梗死组及正常对照组高($t=3.602, 5.814, P$ 均 < 0.05), 见图1。

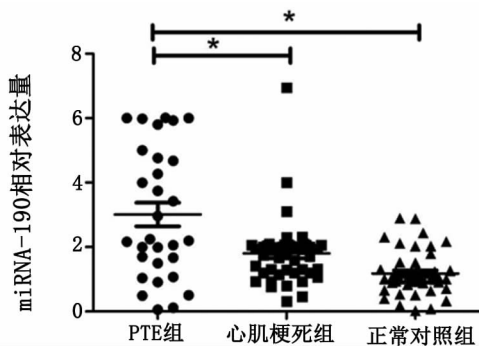


图1 3组血浆 miRNA-190 表达量 (* $P < 0.05$)

血浆 miRNA-197 表达量的变化 PTE组、心肌梗死组及正常对照组中的血浆 miRNA-197 相对表达量分别为 $4.82 \pm 3.80, 1.88 \pm 1.50, 1.38 \pm 0.83$; PTE组血浆 miRNA-197 表达量较心肌梗死组及正常对照组高, ($t=4.791, 5.886, P$ 均 < 0.05), 见图2。

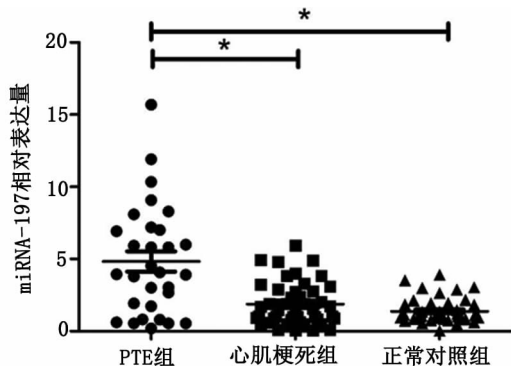


图2 3组血浆 miRNA-197 表达量 (* $P < 0.05$)

ROC 曲线分析 将 PTE组与正常对照组的血浆 miRNA-190 及 miRNA-197 相对表达量分别作 ROC 曲线。血浆 miRNA-190 诊断肺血栓栓塞症的最佳临界值为 1.598, 敏感度为 75.56%, 特异度为 80.00%, AUC 为 0.7844, 95% CI 为 0.6858 ~ 0.8831; 血浆 miRNA-197 的最佳临界值为 2.40, 其

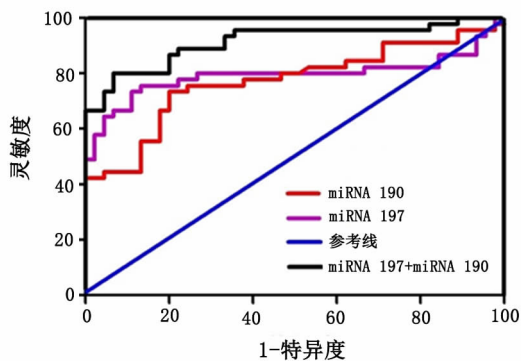


图3 血浆 miRNA-190 及 miRNA-197 在 PTE组与正常对照组中的 ROC 曲线分析

讨论

目前, PTE 的临床诊断主要依靠临床症状及体征、D-二聚体、B超、心电图、心脏超声等综合评估, 对于高度怀疑 PTE 的患者进行放射性核素肺通气/血流灌注扫描(V/Q 灌注扫描)或者肺血管造影检查。在临床工作中 PTE 常常依靠临床经验综合判断, 有研究显示, 接近 30% 的 PTE 患者在急诊室被漏诊^[7]。急性心肌梗死和 PTE 患者均可表现为胸痛和呼吸困难, 但 D-二聚体检测两者均可升高, 此时需要联合其他检查来进行鉴别。

miRNA-190 是来源于人类 5 号染色体的一种内源性非编码 RNA。研究显示, 缺氧条件下 miRNA-190 表达上调, 降低了脯氨酰-4-羟化酶的活性导致 HIF 的累计和 HIF 相关靶基因的表达, 从而介导了细胞和机体对于低氧的耐受反应^[11]。Blissenbach

敏感度为 75.56%, 特异度为 86.67%, AUC 为 0.7931, 95% CI 为 0.6870 ~ 0.8991; 血浆 miRNA-190 及 miRNA-197 联合检测诊断肺血栓栓塞症的敏感度为 80.00%, 特异度为 93.33%, AUC 为 0.9136, 95% CI 为 0.8516 ~ 0.9756, 与单项 miRNA 检测相比较, 敏感度和特异度均有升高, 见图 3。

等^[12]研究显示,miRNA-190参与了低氧诱导的肺动脉高压表观遗传调控,导致肺动脉平滑肌细胞收缩,从而引起通气/血流比例失调,加重组织缺氧^[13]。而心肌梗死患者缺氧是由心输出量下降导致的,肺动脉缺氧程度较PTE组显著下降,因此表现为miRNA-190表达量低于PTE组。Nagalla等^[14]在构建的心血管疾病模型中发现,在血小板激活过程中内皮细胞miRNA-197的表达明显升高,提示其可作为机体心血管疾病的观察指标。研究显示,血小板活化可导致多种miRNA的表达量变化,其中miRNA-197是高凝状态的标志物,且与PTE显著相关,是不良预后的预测因子^[15]。这一机制也解释了PTE患者尤其是高危患者存在血小板大量消耗的现象。

本研究通过AUC曲线评估血浆miRNA-190和miRNA-197水平单独及联合检测诊断PTE的效能,结果显示两者均可用于PTE的辅助诊断。将两项指标联合检测,敏感性和特异性更高,提示联合检测可提高PTE的检出率,且本研究中结合ROC曲线分析结果得到了两种miRNA诊断的最佳临界值,为设定诊断范围提供了参考。

本研究显示血浆miRNA-190联合miRNA-197作为PTE辅助诊断标志物具有较高的灵敏度和特异性,有望成为急诊室鉴别PTE和急性心肌梗死的辅助指标。结合患者的临床表现、体征及D-二聚体检测,有助于减少PTE患者的漏诊、误诊率,提高诊断效率。本研究中纳入研究病例数较少,且未将慢性阻塞性肺病、静脉血栓症等疾病纳入对照组,可能存在一定的偏倚,后续研究中需扩大研究范围及样本量,提高实验精确性。

参考文献

- 1 Monreal M. Fatal pulmonary embolism or bleeding in patients with venous thromboembolism: implications of real-life data [J]. *Thromb Res*, 2019, 181 Suppl 1: S6-S9.
- 2 Freesmeyer M, Drescher R, Roth J, et al. Bilateral pulmonary thromboembolism detected by PET angiography in a patient with contraindications

- for contrast agent imaging [J]. *Heart Lung Circ*, 2019, 28(4): e96-e98.
- 3 Ozer Gokaslan C, Onrat E, Gokaslan S. Evaluation of the CT imaging findings in the diagnosis of pulmonary hypertension due to chronic thromboembolism [J]. *Clin Respir J*, 2020, 14(3): 228-234.
- 4 郝淑玲, 于忠和, 丰玉荣. 30例肺血栓栓塞症的临床特征分析 [J]. *内科急危重症杂志*, 2010, 16(5): 240-241.
- 5 Deng HY, Li G, Luo J, et al. MicroRNAs are novel non-invasive diagnostic biomarkers for pulmonary embolism: a meta-analysis [J]. *J Thorac Dis*, 2016, 8(12): 3580-3587.
- 6 杨捍卫, 唐忠志, 郝谦. 急性非ST段抬高型心肌梗死早期血浆microRNA-21水平检测的临床意义 [J]. *内科急危重症杂志*, 2020, 26(1): 44-46.
- 7 Yu H, Guan Z, Cuk K, et al. Circulating microRNA biomarkers for lung cancer detection in Western populations [J]. *Cancer Med*, 2018, 7(10): 4849-4862.
- 8 公维梅. 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 [J]. *内科急危重症杂志*, 2020, 26(1): 34-37.
- 9 Tang Z, Wang X, Huang J, et al. Gene expression profiling of pulmonary artery in a rabbit model of pulmonary thromboembolism [J]. *PLoS One*, 2016, 11(10): e0164530.
- 10 Melissopoulou M, Ancion A, Lancellotti P, et al. European society of cardiology guidelines on the management of pulmonary embolism [J]. *Rev Med Liege*, 2014, 69(11): 594-599.
- 11 De Lella Ezcurra AL, Bertolin AP, Kim K, et al. miR-190 enhances HIF-Dependent responses to hypoxia in drosophila by inhibiting the prolyl-4-hydroxylase fatiga [J]. *PLoS Genet*, 2016, 12(5): e1006073.
- 12 Blissenbach B, Nakas CT, Krönke M, et al. Hypoxia-induced changes in plasma micro-RNAs correlate with pulmonary artery pressure at high altitude [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2018, 314(1): L157-L164.
- 13 Li SS, Ran YJ, Zhang DD, et al. MicroRNA-190 regulates hypoxic pulmonary vasoconstriction by targeting a voltage-gated K(+) channel in arterial smooth muscle cells [J]. *J Cell Biochem*, 2014, 115(6): 1196-1205.
- 14 Nagalla S, Shaw C, Kong X, et al. Platelet microRNA-mRNA coexpression profiles correlate with platelet reactivity [J]. *Blood*, 2011, 117(19): 5189-5197.
- 15 Wang X, Sundquist K, Svensson PJ, et al. Association of recurrent venous thromboembolism and circulating microRNAs [J]. *Clin Epigenetics*, 2019, 11(1): 28.

(2020-02-16 收稿 2020-09-17 修回)