

• 论 著 •

脓毒症患儿外周血单个核细胞中微小 RNA-466 和 GPR18 mRNA 的表达及诊断价值

赵 杰^{1,2}, 董国庆^{3△}

(1. 广州医科大学 2015 级儿科, 广东广州 511436; 2. 中山大学附属第八医院儿科, 广东深圳 518033; 3. 广东省深圳市妇幼保健院儿科, 广东深圳 518028)

摘 要:目的 探讨微小 RNA-466(miRNA-466)和 G 蛋白偶联受体 18(GPR18)mRNA 在脓毒症患儿外周血单个核细胞中的表达及诊断价值。**方法** 选取中山大学附属第八医院儿科 2017 年 10 月至 2019 年 6 月收治的脓毒症患儿 90 例为病例组, 选取体检健康儿童 60 例为对照组, 检测两组外周血白细胞计数(WBC)和 C 反应蛋白(CRP)水平, 采用实时荧光定量聚合酶链反应(RT-PCR)检测外周血单个核细胞中 miRNA-466 和 GPR18 mRNA 相对表达量。采用受试者工作特征(ROC)曲线比较 WBC、CRP 及外周血单个核细胞中 miRNA-466 和 GPR18 mRNA 相对表达量对患儿脓毒症的诊断价值。**结果** 病例组 WBC、CRP 水平, 外周血单个核细胞中 miRNA-466 和 GPR18 mRNA 相对表达量均高于对照组($P<0.05$)。病例组 CRP 水平($r=0.472$, $P<0.01$), 外周血单个核细胞中 miRNA-466 相对表达量($r=0.489$, $P<0.001$)和 GPR18 mRNA 相对表达量($r=0.507$, $P<0.001$)均与序贯器官衰竭评分(SOFA 评分)呈正相关。外周血单个核细胞中 miRNA-466 和 GPR18 mRNA 表达水平呈正相关($r=0.618$, $P<0.001$)。ROC 曲线分析结果显示, CRP 水平、miRNA-466 和 GPR18 mRNA 相对表达量诊断脓毒症的曲线下面积分别为 0.758(95%CI: 0.669~0.817)、0.901(95%CI: 0.813~0.969)和 0.858(95%CI: 0.761~0.917)。联合检测 miRNA-466 和 GPR18 mRNA 时诊断脓毒症的曲线下面积为 0.947(95%CI: 0.898~0.981), 灵敏度为 90.9%, 特异度为 93.9%。**结论** 脓毒症患儿外周血单个核细胞中 miRNA-466 和 GPR18 mRNA 表达升高, 联合检测可提高脓毒症诊断效能。

关键词:微小 RNA-466; G 蛋白偶联受体 18 mRNA; 脓毒症; 外周血单个核细胞; 诊断价值

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2020.20.018

中图法分类号:R725.9

文章编号:1673-4130(2020)20-2506-04

文献标识码:A

Expression and diagnostic value of miRNA-466 and GPR18 mRNA in peripheral blood mononuclear cells in children with sepsis

ZHAO Jie^{1,2}, DONG Guoqing^{3△}

(1. Pediatrics of Grade 2015, Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 511436, China; 2. Department of Pediatrics, The Eighth Affiliated Hospital of Zhongshan University, Shenzhen, Guangdong 518033, China; 3. Department of Pediatrics, Shenzhen Maternal and Child Health Hospital, Shenzhen, Guangdong 518028, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of microRNA-466 (miRNA-466) and G protein coupled receptor 18 (GPR18) mRNA in peripheral blood mononuclear cells and diagnosis value in children with sepsis. **Methods** A total of 90 children with sepsis admitted to our hospital from October 2017 to June 2019 were enrolled as case group and 60 healthy children were enrolled as control group. The levels of white blood cell (WBC) and C reactive protein (CRP) in peripheral blood of the two groups were measured. The expression of miRNA-466 and GPR18 mRNA in peripheral blood mononuclear cells was detected by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RT-PCR). The receiver operating characteristic (ROC) curve was used to compare the expression of WBC, CRP, miRNA-466 and GPR18 mRNA in diagnosing sepsis. **Results** The level of WBC, CRP, and miRNA-466 and GPR18 mRNA in peripheral blood mononuclear cells in case group were significantly higher than those in control group ($P<0.05$). In case group, CRP ($r=0.472$, $P<0.01$), the relative expression levels of miRNA-466 in monocytes ($r=0.489$, $P<0.001$) and relative expres-

作者简介:赵杰,女,主治医师,主要从事儿童危重症方面的研究。△ **通信作者,** E-mail: szdonggq@yeah.net。

本文引用格式:赵杰,董国庆. 脓毒症患儿外周血单个核细胞中微小 RNA-466 和 GPR18 mRNA 的表达及诊断价值[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(20): 2506-2509.

sion levels of GPR18 mRNA ($r=0.507, P<0.001$) were positively correlated with SOFA scores. There was a positive correlation between miRNA-466 and GPR18 mRNA expression ($r=0.618, P<0.001$). ROC curve analysis showed that AUC of CRP, miRNA-466 and GPR18 mRNA expression in diagnosis of children with sepsis were 0.758 (95% CI: 0.669—0.817), 0.901 (95% CI: 0.813—0.969) and 0.858 (95% CI: 0.761—0.917), respectively. The AUC of combined detection of miRNA-466 and GPR18 mRNA in diagnosis of children with sepsis were 0.947 (95% CI: 0.898—0.981) with a sensitivity of 90.9% and a specificity of 93.9%.

Conclusion The expression of miRNA-466 and GPR18 mRNA in peripheral blood mononuclear cells of children with sepsis has increased. Combined detection could improve the diagnosis efficiency of sepsis.

Key words: microRNA-466; G protein coupled receptor 18 mRNA; sepsis; peripheral blood mononuclear cells; diagnostic value

脓毒症是引起患儿死亡的常见疾病,其发展迅速,可引起休克等并发症^[1-4],脓毒症的诊断常依赖患儿临床表现和白细胞(WBC)计数等检查,但其诊断效能较低,不具有特异性,探索新的诊断标志物对提高脓毒症诊治水平具有重要意义。微小 RNA(miRNA)广泛存在于人体组织内,可调控细胞生长及肿瘤进展等过程,被认为是炎症和癌症潜在的诊断分子标志物和治疗靶标^[5]。有研究显示,在脂多糖诱导小鼠的支气管肺泡中发现巨噬细胞的 miRNA-466 表达增加^[6]。G 蛋白偶联受体 18(GPR18)由位于 13q32.3 上 GPR 基因编码,是相对分子质量约为 36×10^3 的蛋白,在大肠杆菌诱导的小鼠炎症模型循环中单核细胞和巨噬细胞中 GPR18 表达增加,且参与控制炎症信号通路激活^[7]。本研究检测脓毒症患者外周血单个核细胞中 miRNA-466 和 GPR18 mRNA 相对表达量,并探讨其对脓毒症患儿的诊断价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2017 年 10 月至 2019 年 6 月在中山大学附属第八医院(以下简称“本院”)儿科诊断和接受治疗的脓毒症患者 90 例为病例组,其中男 55 例、女 35 例,年龄 4 个月至 5 岁、平均(2.19 ± 0.71)岁。患儿入院时符合儿童脓毒症诊断标准^[8],符合以下 2 项或 2 项以上指标时确诊:(1)体温 $>38^\circ\text{C}$ 或 $<36^\circ\text{C}$;(2)心率 >90 次/分钟;(3)呼吸频率 >20 次/分钟或 CO_2 分压 [$\text{Pa}(\text{CO}_2)$] <32 mm Hg;(4)外周血 WBC 计数 $>12.0 \times 10^9/\text{L}$ 或 $<4.0 \times 10^9/\text{L}$,或未成熟粒细胞 $>10\%$ 。排除标准:(1)具有严重药物过敏史者;(2)先天性免疫功能缺陷者;(3)治疗配合不佳者。选取同期在本院儿科保健中心体检的健康儿童 60 例为对照组,其中男 35 例、女 25 例,年龄 3 个月至 5 岁、平均(2.18 ± 0.73)岁。两组性别构成、年龄等一般资料比较,差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。本研究获得本院伦理委员会批准同意实施。

1.2 方法

1.2.1 序贯器官衰竭评分(SOFA 评分) 脓毒症患者于确诊后行全身性感染相关性 SOFA 评分^[9],包括

呼吸系统、血液系统、肝脏、心血管系统、中枢神经系统及肾脏共 6 个系统评估,每项评分为 0~4 分,总分为 0~24 分。分数越高,预后越差。

1.2.2 WBC 和 C 反应蛋白(CRP)的检测 采用乙二胺四乙酸二钾抗凝管采集病例组于确诊后 12 h 内及对照组静脉血各 5 mL,储存待测,送本院检验科行全血分析和 CRP 水平检测。

1.2.3 两组外周血单个核细胞 miRNA-466 和 GPR18 mRNA 相对表达量的检测 取待测抗凝血,采用密度梯度法分离单个核细胞,采用 Trizol 总 RNA 提取试剂盒(美国 Invitrogen 公司)提取两组血液标本总 RNA,然后采用逆转录试剂盒(日本 TaKaRa 公司)逆转录,以 U6 小核或 β -actin 为内参,按荧光定量 PCR 试剂盒说明书在 LightCycler 480 荧光定量聚合酶链反应(PCR)仪上行 PCR。引物序列如下,miRNA-466 引物:上游,5'-GCC CGT AAC AGT CTA CAG CCA T-3';下游,5'-GCA GGG TCC GAG GTA TTC-3'。U6 引物:上游,5'-CTC GCT TCG GCA GCA CA-3';下游,5'-AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT-3'。GPR18 引物:上游,5'-ACA TCC AAA ATC TTG ATC AGT TA-3';下游,5'-AGG ACA GAC TTT CAA AAT G-TTT-3'。 β -actin 引物:上游,5'-AGC GAG CAT CC-CCC AAA GTT-3';下游,5'-GGG CAC GAA G-GCT CAT CAT T-3'。PCR 反应条件:95 $^\circ\text{C}$ 1 min,94 $^\circ\text{C}$ 30 s,56 $^\circ\text{C}$ 30 s,74 $^\circ\text{C}$ 30 s,连续循环 38 次。算法采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法,计算单个核细胞中 miRNA-466 和 GPR18 mRNA 相对表达量。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 对数据进行分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验;相关性分析采用 Pearson 相关。采用受试者工作特征(ROC)曲线分析各指标对脓毒症的诊断价值。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组 WBC、CRP、miRNA-466 和 GPR18 mRNA 相对表达量的比较 病例组 WBC 和 CRP 水平

均显著高于对照组($P<0.05$);病例组外周血单个核细胞中 miRNA-466 和 GPR18 mRNA 相对表达量均

高于对照组($P<0.05$)。见表 1。

表 1 两组 WBC、CRP、miRNA-466 和 GPR18 mRNA 相对表达量的比较($\bar{x}\pm s$)					
组别	<i>n</i>	WBC($\times 10^9/L$)	CRP($\mu g/mL$)	miRNA-466	GPR18 mRNA
病例组	90	14.53 $\pm$ 1.44	140.5 $\pm$ 14.89	1.70 $\pm$ 0.21	2.09 $\pm$ 0.17
对照组	60	8.53 $\pm$ 1.04	70.5 $\pm$ 14.07	1.27 $\pm$ 0.14	1.32 $\pm$ 0.28
<i>t</i>		9.43	10.23	13.89	15.89
<i>P</i>		0.021	0.002	<0.001	<0.001

2.2 WBC 计数和 CRP 水平与 SOFA 评分的相关性 病例组 WBC 计数和 SOFA 评分无相关性($r=0.238, P=0.543$);脓毒症患者 CRP 水平和 SOFA 评分呈正相关($r=0.472, P<0.01$)。

2.3 miRNA-466 和 GPR18 mRNA 相对表达量与 SOFA 评分的关系 脓毒症患者单个核细胞中 miRNA-466 相对表达量和 SOFA 评分呈正相关($r=0.489, P<0.001$);脓毒症患者外周血单个核细胞中 GPR18 mRNA 相对表达量和 SOFA 评分呈正相关($r=0.507, P<0.001$)。

2.4 miRNA-466 和 GPR18 mRNA 相对表达量的关系 病例组单个核细胞中 miRNA-466 和 GPR18 mRNA 相对表达量呈正相关($r=0.618, P<0.001$)。

2.5 相关指标对患儿脓毒症的诊断价值 ROC 曲线分析结果显示,当 CRP 截断值为 131.52 $\mu g/mL$ 时,其诊断脓毒症的曲线下面积(AUC)为 0.758(95%CI:0.669~0.817),灵敏度为 68.0%,特异度为 71.3%;当 miRNA-466 相对表达量截断值为 1.67 时,其诊断脓毒症的 AUC 为 0.901(95%CI:0.813~0.969),灵敏度为 84.5%,特异度为 87.9%;外周血单个核细胞中 GPR18 mRNA 相对表达量截断值为 1.89 时,其诊断脓毒症的 AUC 为 0.858(95%CI:0.761~0.917),灵敏度为 71.0%,特异度为 92.3%;当 miRNA-466 和 GPR18mRNA 联合检测时,其诊断脓毒症的 AUC 为 0.947(95%CI:0.898~0.981),灵敏度为 90.9%,特异度为 93.9%。

3 讨 论

脓毒症是各种因素引起的全身炎症反应,为儿科最常见的危重症^[10]。近年来,我国儿童脓毒症发病率呈逐年升高趋势,且临床治愈率逐年提高^[11]。尽管如此,鉴于儿童脓毒症临床表现多样、病情发展迅速、病死率高的特点,急切需要对儿童脓毒症进行早期、及时地诊断^[12-13]。

尽管脓毒症具体发病机制尚未完全清楚,但脓毒症病情进展迅速,常导致全身多个器官功能障碍,甚至死亡,与机体炎症反应及免疫功能紊乱密切相关^[14]。因此,外周血中与炎症和免疫反应相关的非特

异标志物,如 WBC 计数和 CRP 水平,常用于临床诊断和评估脓毒症患者的预后^[15-16],但其缺乏特异性,诊断效能不佳。miRNA 是多种疾病诊断的标志物和潜在治疗靶标^[17-18]。有研究发现,多种 miRNA 及其长链非编码 RNA 参与调控炎症反应及免疫过程,对脓毒症诊断及预后具有重要价值^[19-20]。

GPR18 在人类白细胞中广泛表达,尤其在单核细胞、中性粒细胞和巨噬细胞中表达水平较高,是参与巨噬细胞吞噬和自噬过程的重要分子标志物^[7,21]。本研究发现,病例组患儿外周血中 WBC 和 CRP 水平显著高于对照组($P<0.05$)。脓毒症患者机体处于炎症激活状态,导致与炎症相关的非特异性蛋白 CRP 水平增加^[22]。同时,本研究结果显示,脓毒症患者外周血单个核细胞中 miRNA-466 和 GPR18 mRNA 相对表达量均显著高于对照组($P<0.05$)。ZHANG 等^[21]研究显示,RT-PCR 和流式细胞仪检测菌血症且在 ICU 接受治疗的患儿 WBC 中 GPR18 mRNA 和蛋白表达均增加。尽管感染期间 miRNA-466 和 GPR18 mRNA 增加的机制尚不清楚,但是其可能与机体在感染和应激状态下免疫系统激活、炎症级联反应,以及巨噬细胞吞噬和自噬密切相关^[23]。

Pearson 相关分析显示,WBC 计数与 SOFA 评分无相关性,提示 WBC 计数可能受到多种因素影响,与脓毒症患者病情严重程度缺乏关联性,其原因可能为 WBC 计数虽为炎症指标,但并不能反映脓毒症的严重程度^[24]。本研究发现,CRP 水平、外周血单个核细胞中 miRNA-466 和 GPR18 mRNA 相对表达量均与患儿 SOFA 评分呈正相关($P<0.05$),同时 miRNA-466 和 GPR18 mRNA 相对表达量呈正相关($P<0.05$),说明 CRP 水平、外周血单个核细胞中 miRNA-466 和 GPR18 mRNA 相对表达量可用于评估脓毒症病情严重程度。

ROC 曲线分析结果显示,CRP 诊断脓毒症患儿的 AUC 为 0.758,外周血单个核细胞中 miRNA-466 相对表达量诊断脓毒症的 AUC 为 0.901,外周血单个核细胞中 GPR18 mRNA 相对表达量诊断脓毒症的 AUC 为 0.858,miRNA-466 和 GPR18 mRNA 联

合检测时, AUC 为 0. 947, 说明外周血中性粒细胞 miRNA-466 的诊断效能优于 GPR18 mRNA 和 CRP 水平, 并且联合检测 miRNA-466 及 GPR18 mRNA 时, AUC 为 0. 947, 其灵敏度和特异度可提高至 90. 9% 和 93. 9%, 因此, 临床上联合检测 miRNA-466 及 GPR18 mRNA 对脓毒症诊断价值更高。

本研究为单中心研究, 纳入的病例数较少, 尚需要大样本多中心前瞻性研究来进一步证实; 其次, 本研究未探讨在脓毒症患者治疗过程中 CRP、miRNA-466 和 GPR18mRNA 表达变化情况; 最后, 脓毒症患者治疗过程中不同的用药和治疗方法是否影响中性粒细胞 miRNA-466 和 GPR18 mRNA 表达尚需要进一步研究。

4 结 论

综上所述, 脓毒症患者外周血单个核细胞中 miRNA-466 和 GPR18 mRNA 表达水平增加, 且与患儿 SOFA 评分相关, 联合检测 miRNA-466 及 GPR18 mRNA 对患儿脓毒症具有较高的诊断价值。

参考文献

- [1] MUSZYNSKI J A, NOFZIGER R, MOORE-CLINGEN-PEEL M, et al. Early immune function and duration of organ dysfunction in critically ill children with sepsis[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2018, 198(3): 361-369.
- [2] EMR B M, ALCAMO A M, CARCILLO J A, et al. Pediatric Sepsis Update: How are Children Different? [J]. *Surg Infect*, 2018, 19(2): 176-183.
- [3] 乔书华, 陆婉秋. 儿童重症肺炎合并脓毒症的诊治进展[J]. *海南医学*, 2019, 30(1): 106-111.
- [4] 张静, 杨湘峰, 孟宪梅, 等. 血清降钙素原, 白蛋白, 可溶性髓样细胞触发受体-1 对脓毒症患儿的临床诊断价值[J]. *中国医药导报*, 2018, 15(24): 107-110.
- [5] BENZ F, ROY S, TRAUTWEIN C, et al. Circulating microRNAs as biomarkers for sepsis[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(1): 78.
- [6] SHIKANO S, GON Y, MARUOKA S, et al. Increased extracellular vesicle miRNA-466 family in the bronchoalveolar lavage fluid as a precipitating factor of ARDS[J]. *BMC Pulm Med*, 2019, 19(1): 110.
- [7] CHIANG N, DALLI J, COLAS R A, et al. Identification of resolvin D2 receptor mediating resolution of infections and organ protection[J]. *J Exp Med*, 2015, 212(8): 1203-1217.
- [8] 杨虎, 李运璧. 儿童脓毒症发病机制及诊治进展[J]. *国际儿科学杂志*, 2014, 41(2): 138-141.
- [9] RAITH E P, UDY A A, BAILEY M, et al. Prognostic accuracy of the SOFA score, SIRS criteria, and qSOFA score for in-hospital mortality among adults with suspected infection admitted to the intensive care unit[J]. *JA-*

- MA*, 2017, 317(3): 290-300.
- [10] 李娟珍, 王莹. PICU 中儿童脓毒症临床特点和预后相关因素分析[J]. *临床儿科杂志*, 2017, 35(10): 762-768.
- [11] KISSOON N, UYEKI T M. Sepsis and the global burden of disease in children[J]. *JAMA Pediatr*, 2016, 170(2): 107-108.
- [12] TIMMERMANS S, LIBERT C. Learning lessons in sepsis from the children[J]. *Mol Syst Biol*, 2018, 14(5): e8335.
- [13] THOMPSON G C, MACIAS C G. Recognition and management of sepsis in children: practice patterns in the emergency department[J]. *J Emerg Med*, 2015, 49(4): 391-399.
- [14] CHANG J C. Sepsis and septic shock: endothelial molecular pathogenesis associated with vascular microthrombotic disease[J]. *Thromb J*, 2019, 17(1): 10.
- [15] XIE X, LI M, XIONG T T, et al. Nested case-control study of multiple serological indexes and Brighton pediatric early warning score in predicting death of children with sepsis[J]. *World J Clin Cases*, 2019, 7(4): 431.
- [16] BRANCO R G, GARCIA P C. Ferritin and C-reactive protein as markers of systemic inflammation in sepsis[J]. *Pediatr Crit Care*, 2017, 18(2): 194-196.
- [17] ZHANG W, JIA J, LIU Z, et al. Circulating microRNAs as biomarkers for Sepsis secondary to pneumonia diagnosed via Sepsis 3. 0[J]. *BMC Pulm Med*, 2019, 19(1): 93.
- [18] SUN Z, SHI K, YANG S, et al. Effect of exosomal miRNA on cancer biology and clinical applications[J]. *Mol Cancer*, 2018, 17(1): 147.
- [19] CHENG Q, TANG L, WANG Y. Regulatory role of miRNA 26a in neonatal sepsis[J]. *ETM*, 2018, 16(6): 4836-4842.
- [20] 张芳, 王莹, 宁铂涛. 长链非编码 RNA 在儿童脓毒症中表达的初步研究[J]. *中国小儿急救医学*, 2018, 41(2): 123-125.
- [21] ZHANG L, QIU C, YANG L, et al. GPR18 expression on PMNs as biomarker for outcome in patient with sepsis[J]. *Life Sci*, 2019, 217: 49-56.
- [22] KUMAR N, DAYAL R, SINGH P, et al. A comparative evaluation of presepsin with procalcitonin and CRP in diagnosing neonatal sepsis[J]. *Indian J Pediatr*, 2019, 86(2): 177-179.
- [23] ALEXANDER S P. So what do we call GPR18 now? [J]. *Br J Pharmacol*, 2012, 165(8): 2411-2413.
- [24] 张肖难, 张泓. SOFA、qSOFA 评分及 SIRS 标准对急诊疑似感染患者预测价值研究[J]. *中华急诊医学杂志*, 2018, 27(3): 259-264.