

• 论著-研究报告 •

## 稳定期 COPD 患者血清 miR-181a 与炎性因子的 关系及对急性加重和死亡的预测价值

李翠娟<sup>1</sup> 唐颖<sup>1</sup> 慕丽娜<sup>1</sup> 彭翠兰<sup>1</sup>

**[摘要]** **目的:**研究稳定期慢性阻塞性肺疾病(COPD)患者血清 miR-181a 与炎性因子的关系及对急性加重和死亡的预测价值。**方法:**选择 2016-09—2018-06 期间在我院就诊的 120 例稳定期 COPD 患者作为研究的稳定期 COPD 组,同期体检且一般资料匹配的 80 例健康志愿者作为研究的对照组。检测血清 miR-181a 的表达量及炎性因子(TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8)的含量,随访患者急性加重及死亡情况。采用 ROC 曲线分析 miR-181a 对急性加重及死亡的预测价值,采用 Kaplan-Meier 曲线分析 miR-181a 低表达及高表达患者急性加重及死亡的差异。**结果:**稳定期 COPD 组患者血清 miR-181a 的表达量明显低于对照组,血清 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8 的含量明显高于对照组( $P < 0.05$ );稳定期 COPD 患者血清 miR-181a 表达量与 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8 含量均呈负相关,相关系数分别为-0.726、-0.413、-0.323( $P < 0.05$ );与 miR-181 高表达稳定期 COPD 患者比较,miR-181 低表达稳定期 COPD 患者第一次急性加重的中位时间、生存的中位时间均明显缩短( $P < 0.05$ );miR-181a 预测稳定期 COPD 患者急性加重的最佳截点为 0.575,预测稳定期 COPD 患者死亡的最佳截点为 0.480。**结论:**稳定期 COPD 患者血清 miR-181a 减少与炎性因子释放增多有关且对急性加重和死亡均具有一定的预测价值。

**[关键词]** 稳定期慢性阻塞性肺疾病;miR-181a;炎性因子;急性加重;死亡;预测

**doi:**10.13201/j.issn.1009-5918.2020.07.011

**[中图分类号]** R541.4 **[文献标志码]** A

## Relationship between serum miR-181a and inflammatory cytokines in stable COPD patients and its predictive value for acute exacerbation and death

LI Cuijuan TANG Ying MU Lina PENG Cuilan

(Department of Respiratory Medicine, Longnan Hospital of Daqing, Daqing, Heilongjiang, 163453, China)

Corresponding author: LI Cuijuan, E-mail: juanli085338@163.com

**Abstract Objective:** To study the relationship between serum miR-181a and inflammatory cytokines in stable chronic obstructive pulmonary disease(COPD) patients and its predictive value for acute exacerbation and death.  
**Method:** One hundred and twenty stable COPD patients admitted in our hospital from September 2016 to June 2018 were selected as the stable COPD group, and 80 healthy volunteers with matched general data were selected as the control group. The expression of miR-181a and the contents of inflammatory cytokines(TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8) were measured. ROC curve was used to analyze the predictive value of miR-181a for acute exacerbation and death, and Kaplan-Meier curve was used to analyze the difference of acute exacerbation and death between patients with low and high expression of miR-181a. **Result:** The expression of miR-181a in the stable COPD group was significantly lower than that in the control group, and the contents of TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-8 in the stable COPD

<sup>1</sup>大庆龙南医院(齐齐哈尔医学院第五附属医院)呼吸内科(黑龙江大庆,163453)

通信作者:李翠娟,E-mail:juanli085338@163.com

- [15] 陈凤,李丹,王静,等.2014~2016年大量输血病例回顾性分析[J].临床输血与检验,2018,20(5):489-493.
- [16] Georgoff PE, Nikolian VC, Halaweish I, et al. Resuscitation with Lyophilized Plasma Is Safe and Improves Neurological Recovery in a Long-Term Survival Model of Swine Subjected to Traumatic Brain Injury, Hemorrhagic Shock, and Polytrauma[J]. J Neurotrauma, 2017, 34(13):2167-2175.

- [17] Fox EE, Holcomb JB, Wade CE, et al. Earlier End-points are Required for Hemorrhagic Shock Trials Among Severely Injured Patients[J]. Shock, 2017, 47(5):567-573.
- [18] 于玉芳.血小板与冷沉淀结合输注对大出血患者凝血功能的研究[J].检验医学与临床,2018,15(4):544-546.

(收稿日期:2020-02-29)

group were significantly higher than that in the control group ( $P < 0.05$ ); the expression of miR-181a in the stable COPD group was negatively correlated with the contents of TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-8, and the correlation coefficients were -0.726, -0.413 and -0.323, respectively ( $P < 0.05$ ); compared with patients with high expression of miR-181 in the stable COPD group, the median time of the first acute exacerbation and the median time of survival of patients with low expression of miR-181 were significantly shorter ( $P < 0.05$ ); the best cut-off point of miR-181a for predicting the acute exacerbation of stable COPD patients was 0.575, and the best cut-off point for predicting the death was 0.480. **Conclusion:** The decrease of serum miR-181a in stable COPD patients is related to the increase of the release of inflammatory factors, and has a certain predictive value for acute exacerbation and death.

**Key words** stable chronic obstructive pulmonary disease; miR-181a; inflammatory factors; acute exacerbation; death; prediction

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 是以持续性气流受限为特征的呼吸系统非特异性炎症性疾病, 是中老年人群的常见疾病, 且在感染等诱发因素的作用下容易出现病情急性加重, 进而引起呼吸道症状加重、严重者可出现全身症状甚至危及生命。目前, 临床上治疗稳定期 COPD 的目标是延缓肺功能的减退、预防急性加重的发生, 早期预测稳定期 COPD 患者远期发生急性加重及死亡的风险对治疗方案的制定具有一定的指导价值。因此, 近年来越来越多的学者也开始关注能够早期预测稳定期 COPD 患者急性加重及死亡的标志物。

微小 RNA (microRNA, miR) 是一类在转录后水平调控基因表达的非编码小分子 RNA, 多种 miR 均被证实参与肺部炎症的调控<sup>[1-3]</sup>。梁珍珍等<sup>[4]</sup>的基础实验研究显示, miR-181a 对香烟提取物诱导的大鼠肺泡巨噬细胞 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8 分泌具有抑制作用, 提示 miR-181a 具有抑炎功能; 在一项关于 COPD 患者 miR-21 与 miR-181a 比值的研究中, Xie 等<sup>[5]</sup>证实了 COPD 患者血清中 miR-181a 的表达明显减少, 但减少的 miR-181a 是否影响炎症反应及病情转归均未明确。为此, 本研究以稳定期 COPD 患者为研究对象, 具体分析了血清 miR-181a 与炎性因子的关系及对急性加重和死亡的预测价值, 旨在阐明 miR-181a 在稳定期 COPD 发生及病情发展变化中的作用, 为临床上筛选稳定期 COPD 患者病情转归的预测指标提供参考。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究对象

选择 2016-09—2018-06 期间在我院就诊的 120 例稳定期 COPD 患者作为研究对象 (稳定期 COPD 组), 男 84 例 (70%), 女 36 例 (30%); 年龄 ( $62.93 \pm 11.37$ ) 岁; BMI ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ) 为  $22.94 \pm 5.84$ 。另取健康对照组 80 例, 男 60 例 (75%), 女 20 例 (25%); 年龄 ( $59.96 \pm 12.41$ ) 岁; BMI ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ) 为  $22.41 \pm 8.67$ 。2 组年龄、性别、BMI 的比较, 均差

异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

纳入标准: ①符合《慢性阻塞性肺疾病诊治指南 (2013 年修订版)》<sup>[6]</sup> 中稳定期 COPD 的诊断标准; ②近 8 周咳嗽、咳痰、喘息、呼吸困难等症状稳定; ③临床资料及随访资料完整。排除标准: ①近 8 周有呼吸道感染病史; ②近 8 周接受过抗生素或全身性使用糖皮质激素; ③合并肺癌、肺结核等其他呼吸系统疾病; ④合并自身免疫性疾病、恶性肿瘤等。另取同期体检且一般资料匹配的 80 例健康志愿者作为研究的对照组。本研究经医院伦理委员会批准。

### 1.2 研究方法

**1.2.1 血清标本收集** 稳定期 COPD 患者入组当天或次日采集空腹肘静脉血 6~8 mL, 静置 15~20 min 后 3000r/min 离心 20 min, 分离上层血清并分装至 1.5 mL EP 管内,  $-80^\circ\text{C}$  保存。

**1.2.2 血清 miR-181a 表达的检测** 取血清样本, 采用北京天根公司 miRNA 相关试剂盒进行实验, 首先采用 miRNA 提取分离试剂盒分离血清中的 miRNA, 而后采用 miRNA cDNA 第一链合成试剂盒将血清中提取得到的 miRNA 反转录为 cDNA, 最后采用 miRNA 荧光定量检测试剂盒配置 PCR 体系: cDNA 2  $\mu\text{L}$ 、PreMix 10  $\mu\text{L}$ 、10  $\mu\text{mol}/\text{L}$  上游引物 0.4  $\mu\text{L}$ 、试剂盒中通用下游引物 0.4  $\mu\text{L}$ 、去离子水 7.2  $\mu\text{L}$ , 按照下列程序在 Bio-rad 公司的荧光定量 PCR 仪上进行反应:  $95^\circ\text{C}$  15 min 后  $94^\circ\text{C}$  20s、 $60^\circ\text{C}$  34s、重复 40 个循环。PCR 仪上自动生成循环曲线后得到循环阈值, 以 U6 为内参, 计算 miR-181a 的表达量。

计算稳定期 COPD 组患者 miR-181a 表达量的中位数, 根据中位数分为表达量  $>$  中位数的 miR-181a 高表达患者 60 例、表达量  $\leq$  中位数的 miR-181a 低表达患者 60 例。

**1.2.3 血清炎性因子含量的检测** 取血清样本, 采用上海西唐公司生产的酶联免疫吸附试剂盒检测 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8 的含量, 均按试剂盒说明书进

行操作。

**1.2.4 病情随访** 每个月进行门诊复查或电话回访,随访截止日期为 2019 年 7 月 31 日,入组患者随访 17~33 个月、中位随访时间 24 个月。随访内容为入组到第一次发生急性加重的时间、病死的时间。

**1.3 统计学方法**

采用 SPSS 21.0 软件及 GraphPad Prism5.0 软件进行数据分析,2 组间计量资料的比较采用 *t* 检验,第 1 次急性加重的中位时间、生存的中位时间采用 Kaplan-Meier 曲线分析,miR-181a 对急性加重及死亡的预测价值采用 ROC 曲线分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 稳定期 COPD 患者血清 miR-181a、炎症因子的变化**

与对照组比较,稳定期 COPD 组患者血清 miR-181a 的表达量明显减少,血清 TNF- $\alpha$ 、IL-6、

IL-8 的含量明显增加,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

**2.2 稳定期 COPD 患者血清 miR-181a 与炎症因子的相关性**

稳定期 COPD 患者血清 miR-181a 表达量与 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8 含量均呈负相关关系,相关系数分别为  $-0.726$ 、 $-0.413$ 、 $-0.323$  ( $P < 0.05$ )。见图 1。

**2.3 miR-181a 低表达与高表达稳定期 COPD 患者急性加重情况的比较**

miR-181a 低表达与高表达稳定期 COPD 患者第一次急性加重的中位时间分别为 16 个月和 21 个月,绘制 Kaplan-Meier 曲线并分析,与 miR-181 高表达稳定期 COPD 患者比较,miR-181 低表达稳定期 COPD 患者第一次急性加重的中位时间明显缩短,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见图 2。

表 1 稳定期 COPD 患者血清 miR-181a、炎症因子的比较

$\bar{x} \pm s$

组别	n	miR-181a	TNF- $\alpha$ (ng/mL)	IL-6(ng/mL)	IL-8(pg/mL)
稳定期 COPD 组	120	0.56 $\pm$ 0.18	26.27 $\pm$ 5.59	92.50 $\pm$ 19.14	10.20 $\pm$ 2.61
对照组	80	0.98 $\pm$ 0.26	17.39 $\pm$ 4.48	65.47 $\pm$ 11.84	8.12 $\pm$ 1.84
<i>t</i>		13.502	11.887	11.270	6.176
<i>P</i>		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

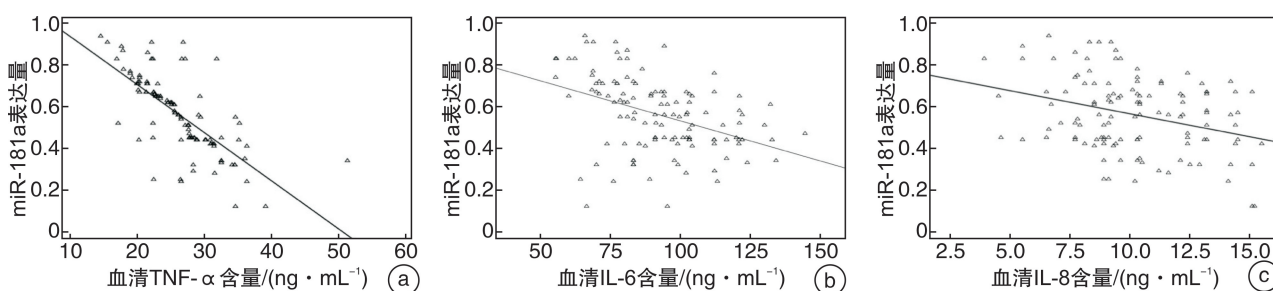


图 1 稳定期 COPD 患者血清 miR-181a 与 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8 的相关性

**2.4 miR-181a 对稳定期 COPD 患者急性加重的预测价值**

miR-181a 预测稳定期 COPD 患者急性加重的 ROC 曲线下面积为 0.718 4 (95% CI: 0.624 6 ~ 0.812 3,  $P < 0.05$ ),根据约登指数最大值选择最佳截点为 0.575,该截点预测稳定期 COPD 患者急性加重的敏感度为 66.13%、特异度为 75.85%。见图 3。

**2.5 miR-181a 低表达与高表达稳定期 COPD 患者死亡情况的比较**

miR-181a 低表达与高表达稳定期 COPD 患者中位生存时间分别为 22 个月和 28 个月,绘制 Ka-

plan-Meier 曲线并分析,与 miR-181 高表达稳定期 COPD 患者比较,miR-181 低表达稳定期 COPD 患者中位生存时间明显缩短,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见图 4。

**2.6 miR-181a 对稳定期 COPD 患者死亡的预测价值**

miR-181a 预测稳定期 COPD 患者死亡的 ROC 曲线下面积为 0.7527 (95% CI: 0.5950 ~ 0.9104,  $P < 0.05$ ),根据约登指数最大值选择最佳截点为 0.48,该截点预测稳定期 COPD 患者急性加重的敏感度为 66.67%、特异度为 75.00%。见图 5。

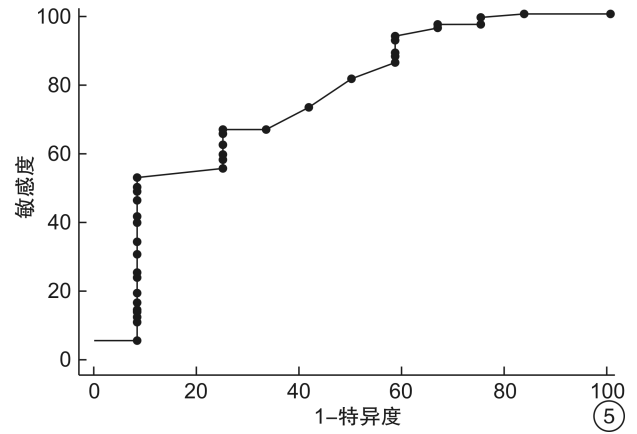
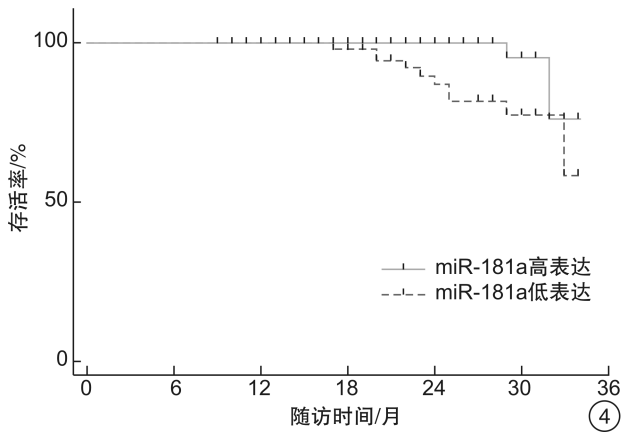
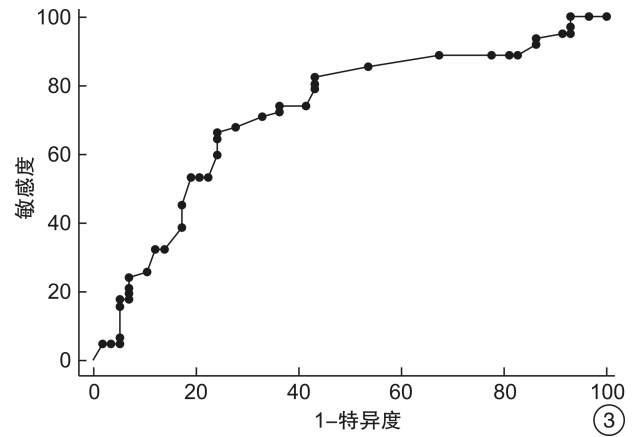
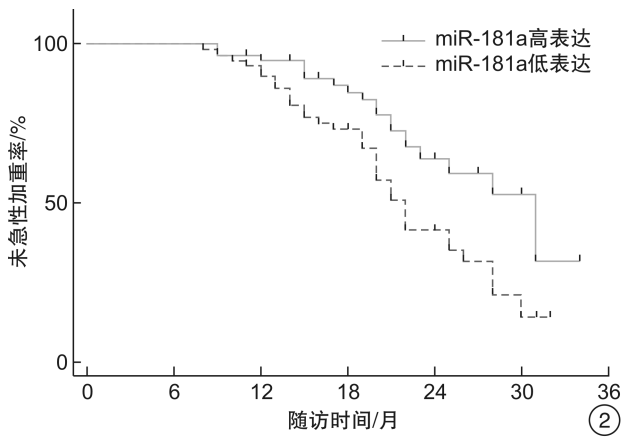


图 2 miR-181a 低表达与 miR-181a 高表达稳定期 COPD 患者急性加重的 Kaplan-Meier 曲线;图 3 miR-181a 预测稳定期 COPD 患者急性加重的 ROC 曲线;图 4 miR-181a 低表达与 miR-181a 高表达稳定期 COPD 患者存活的 Kaplan-Meier 曲线;图 5 miR-181a 预测稳定期 COPD 患者死亡的 ROC 曲线

### 3 讨论

COPD 急性加重是影响 COPD 患者病情转归的重要因素,反复发生的急性加重会造成气道重塑加剧、不可逆气流受限加重,严重者可引起慢性呼吸衰竭、肺源性心脏病、甚至死亡。在临床工作中,准确评价稳定期 COPD 患者的病情、预测远期发生急性加重及死亡的风险对制定诊疗方案具有指导意义,但目前临床上常用的 COPD 病情评价方法主要包括肺功能测定、慢性阻塞性肺病评分(CAT)等,在病情评估中具有一定的价值,但影响因素较多、准确性较低,同时也缺乏预测远期病情发展变化的价值。因此,近年来越来越多的学者开始寻找能够评价稳定期 COPD 病情并预测远期病情发展的标志物。

miR 是具有广泛生物学功能的小分子 RNA,已有研究报道多种 miRs 在 COPD 患者的血清中发生改变且对 COPD 的病情及预后具有一定的评估价值<sup>[7-9]</sup>,其中 miR-181a 在 COPD 患者血清中的表达减少;在梁珍珍等<sup>[4]</sup>的细胞实验中,miR-181a 具有抑炎活性,对香烟提取物诱导的大鼠肺

泡巨噬细胞中 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8 分泌具有抑制作用。在 COPD 的病情发展过程中,气道炎症反应激活是基本的病理改变,已有多项研究报道 COPD 患者血清中促炎因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8 的含量明显增多<sup>[10-12]</sup>,但 miR-181a 在 COPD 发生发展过程中是否影响炎症反应的激活尚不明确。本研究的分析证实:稳定期 COPD 患者血清中 miR-181a 的表达减少,TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8 的含量增多,与既往其他学者的研究结果吻合;进一步分析相关性可知:miR-181a 与 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8 呈负相关,推测稳定期 COPD 患者血清中 miR-181a 的减少会造成其抑炎活性减弱,进而引起 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8 分泌增多并激活炎症反应。

目前评价 COPD 病情的手段较多,但是缺乏能够预测 COPD 病情转归的指标。本研究已经证明稳定期 COPD 患者血清中 miR-181a 的低表达与疾病的发生及炎症反应的激活有关,在此基础上将通过随访急性加重及死亡的情况来反应病情转归。经 miR-181a 的中位数将稳定期 COPD 患者分为低表达及高表达患者,与 miR-181a 高表达的

稳定期 COPD 患者比较,miR-181a 低表达的稳定期 COPD 患者第一次急性加重的中位时间及生存的中位时间均明显缩短,说明 miR-181a 的低表达与稳定期 COPD 患者远期急性加重及死亡均有关系,也提示 miR-181a 表达的变化可能可以预测稳定期 COPD 患者的急性加重及死亡。进一步通过 ROC 曲线来验证 miR-181a 的这一预测价值可知:miR-181a 预测稳定期 COPD 患者急性加重及死亡的最佳截点分别为 0.575 和 0.480,该截点预测的敏感度分别为 66.13% 和 66.67%、特异度分别为 75.85% 和 75.00%,由此说明血清 miR-181a 表达对稳定期 COPD 患者的急性加重及死亡具有预测价值。

本研究的不足之处主要在于纳入的稳定期 COPD 患者较少、属于小样本、单中心研究,通过研究结果说明稳定期 COPD 患者血清 miR-181a 减少与炎症因子释放增多有关且对急性加重和死亡均具有一定的预测价值,但仍需在今后的研究中扩大样本量、增加多个中心来确认这一研究结论。

#### 参考文献

- [1] Salimi S, Noorbakhsh F, Faghihzadeh S, et al. Expression of miR-15b-5p, miR-21-5p, and SMAD7 in Lung Tissue of Sulfur Mustard-exposed Individuals with Long-term Pulmonary Complications[J]. *Iran J Allergy Asthma Immunol*, 2019, 18(3):332-339.
- [2] Zhang D, Lee H, Wang X, et al. A potential role of microvesicle-containing miR-223/142 in lung inflammation[J]. *Thorax*, 2019, 74(9):865-874.
- [3] Du X, Wei J, Tian D, et al. miR-182-5p contributes to intestinal injury in a murine model of *Staphylococcus aureus* pneumonia-induced sepsis via targeting surfactant protein D[J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(1):563-572.
- [4] 梁珍珍, 吕燕平, 张艳莉, 等. miR-181a 参与调控香烟提取物诱导的 NR8383 肺泡巨噬细胞自噬紊乱与促炎因子的生成[J]. *中国病理生理杂志*, 2019, 35(4):710-717.
- [5] Xie L, Wu M, Lin H, et al. An increased ratio of serum miR-21 to miR-181a levels is associated with the early pathogenic process of chronic obstructive pulmonary disease in asymptomatic heavy smokers[J]. *Mol Biosyst*, 2014, 10(5):1072-1081.
- [6] 中华医学会呼吸病学分会慢性阻塞性肺疾病学组. 慢性阻塞性肺疾病诊治指南(2013年修订版)[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2013, 36(4):255-264.
- [7] Keller A, Ludwig N, Fehlmann T, et al. Low miR-150-5p and miR-320b Expression Predicts Reduced Survival of COPD Patients[J]. *Cells*, 2019, 8(10):E1162.
- [8] Chen BB, Li ZH, Gao S. Circulating miR-146a/b correlates with inflammatory cytokines in COPD and could predict the risk of acute exacerbation COPD[J]. *Medicine(Baltimore)*, 2018, 97(7):e9820.
- [9] He H, Wang H, Pei F, et al. MiR-543 Regulates the Development of Chronic Obstructive Pulmonary Disease by Targeting Interleukin-33[J]. *Clin Lab*, 2018, 64(7):1199-1205.
- [10] Majd AMM, Faghihzadeh S, Pourfarzam S, et al. Serum and sputum levels of IL-17, IL-21, TNF $\alpha$  and mRNA expression of IL-17 in sulfur mustard lung tissue with long term pulmonary complications(28 years after sulfur mustard exposure)[J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 76():105828.
- [11] Zeng YY, Hu WP, Zuo YH, et al. Altered serum levels of type I collagen turnover indicators accompanied by IL-6 and IL-8 release in stable COPD[J]. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2019, 3(14):163-168.
- [12] Fermont JM, Masconi KL, Jensen MT, et al. Biomarkers and clinical outcomes in COPD: a systematic review and meta-analysis[J]. *Thorax*, 2019, 74(5):439-446.

(收稿日期:2020-03-14)