

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2020.03.016

论著·临床研究

## 血清 miR-21-3p 对脓毒症患儿并发急性肾损伤的预测价值

吴仕燕 张华 吴文 吴依阳

(三亚中心医院 / 海南省第三人民医院儿科, 海南 三亚 572000)

**[摘要]** **目的** 探讨血清 miR-21-3p 及其联合血肌酐 (Scr)、胱抑素 C (Cys-C) 及肾损伤分子-1 (KIM-1) 对脓毒症患儿并发急性肾损伤 (AKI) 的预测价值。**方法** 2016年1月至2019年3月诊断为脓毒症的患儿142例, 根据是否并发 AKI 分为 AKI 组 ( $n=49$ ) 和非 AKI 组 ( $n=93$ )。检测两组血清 miR-21-3p、Scr、Cys-C 及 KIM-1 水平, 绘制受试者工作特征 (ROC) 曲线分析血清 miR-21-3p、Scr、Cys-C 及 KIM-1 水平预测 AKI 的价值, Pearson 相关分析血清 miR-21-3p 表达水平与 Scr、Cys-C 及 KIM-1 表达水平的相关性。**结果** AKI 组血清 miR-21-3p、Scr、Cys-C 及 KIM-1 水平明显高于非 AKI 组 ( $P<0.05$ )。ROC 曲线分析结果显示血清 miR-21-3p、Scr、Cys-C 及 KIM-1 水平四项联合预测脓毒症患儿并发 AKI 的曲线下面积 (0.962, 95%CI: 0.906~0.998) 均分别大于上述各单项指标预测的曲线下面积 ( $P<0.05$ ), 且敏感度 (97.0%) 和特异度 (91.4%) 最高。相关分析显示, AKI 组血清 miR-21-3p 表达水平与 Scr、Cys-C 及 KIM-1 表达水平均呈正相关 ( $r=0.704, 0.812, 0.863, P<0.01$ )。**结论** 血清 miR-21-3p 表达水平在脓毒症并发 AKI 患儿中明显升高, 联合 Scr、Cys-C 及 KIM-1 指标对预测脓毒症并发 AKI 具有较高的价值。  
**[中国当代儿科杂志, 2020, 22(3): 269-273]**

**[关键词]** 脓毒症; 急性肾损伤; miR-21-3p; 儿童

### Value of serum miR-21-3p in predicting acute kidney injury in children with sepsis

WU Shi-Yan, ZHANG Hua, WU Wen, WU Yi-Yang. Department of Pediatrics, Sanya Central Hospital/Third People's Hospital of Hainan Province, Sanya, Hainan 572000, China (Email: 1485516393@qq.com)

**Abstract: Objective** To study the value of serum miR-21-3p combined with serum creatinine (Scr), cystatin C (Cys-C), and kidney injury molecule-1 (KIM-1) in predicting acute kidney injury (AKI) in children with sepsis. **Methods** A total of 142 children who were diagnosed with sepsis from January 2016 to March 2019 were enrolled. According to the presence or absence of AKI, they were divided into AKI group with 49 children and non-AKI group with 93 children. The serum levels of miR-21-3p, Scr, Cys-C, and KIM-1 were measured for the two groups. The receiver operating characteristic (ROC) curve was plotted to analyze the value of serum miR-21-3p, Scr, Cys-C, and KIM-1 in predicting AKI. A Pearson correlation analysis was used to evaluate the correlation of serum miR-21-3p with Scr, Cys-C, and KIM-1. **Results** The AKI group had significantly higher serum levels of miR-21-3p, Scr, Cys-C, and KIM-1 than the non-AKI group ( $P<0.05$ ). The ROC curve analysis showed that the combination of serum miR-21-3p, Scr, Cys-C, and KIM-1 had an area under the ROC curve (AUC) of 0.962 (95%CI: 0.906-0.998), which was significantly larger than the AUC of each index alone ( $P<0.05$ ), with a sensitivity of 97.0% and a specificity of 91.4%. The correlation analysis showed that the serum level of miR-21-3p was positively correlated with Scr, Cys-C, and KIM-1 in the AKI group ( $r=0.704, 0.812, \text{and } 0.863$  respectively,  $P<0.01$ ). **Conclusions** There is a significant increase in the serum level of miR-21-3p in children with sepsis and AKI, and its combination with Scr, Cys-C, and KIM-1 has a high value in predicting AKI.

**[Chin J Contemp Pediatr, 2020, 22(3): 269-273]**

**Key words:** Sepsis; Acute kidney injury; miR-21-3p; Child

**[收稿日期]** 2019-09-09; **[接受日期]** 2020-02-12

**[基金项目]** 海南省医学科研基金 (17A300618)。

**[作者简介]** 吴仕燕, 女, 本科, 主治医师。Email: 1485516393@qq.com。

急性肾损伤 (acute kidney injury, AKI) 是脓毒症患儿发展过程中最常见、最严重的并发症之一, 可导致患儿住院时间延长, 住院费用和病死率增加, 已成为儿童急危重症的难题<sup>[1]</sup>。早期发现 AKI, 并进行及时、有效的临床干预, 对改善脓毒症患儿的预后至关重要。目前, 国内仍使用血肌酐 (serum creatinine, Scr)、胱抑素 C (cystatin C, Cys-C) 及肾损伤分子-1 (kidney injury molecule-1, KIM-1) 评价早期肾损伤, 但其敏感性不高, 无法满足临床的需求。微小核糖核酸 (microRNA, miRNA) 作为一类新型的基因调控分子, 广泛参与细胞增生、凋亡、免疫炎症反应等多种机体生物学过程的调控, 在肾脏疾病的发生、发展及预后中发挥着重要的作用<sup>[2-3]</sup>。近期的研究发现, miR-21-3p 是 AKI 发病的重要调控因子, 通过多种机制参与 AKI 的发生发展, 为理解 AKI 的发病机制提供了新的角度<sup>[4]</sup>。目前大多数研究是基于 miR-21-3p 在 AKI 发病中的作用机制, 关于 miR-21-3p 预测脓毒症患儿并发 AKI 的价值尚未明确。本研究通过观察脓毒症患儿血清 miR-21-3p、Scr、Cys-C 及 KIM-1 水平, 分析其预测 AKI 的价值, 旨在为脓毒症患儿并发 AKI 的诊疗提供参考依据。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究对象

选取 2016 年 1 月至 2019 年 3 月海南省第三人民医院收治的脓毒症患儿 142 例为研究对象, 其中男 89 例, 女 53 例, 年龄 7 个月至 12 岁, 平均年龄  $5.8 \pm 1.5$  岁。纳入标准: (1) 符合脓毒症的诊断标准<sup>[5]</sup>; (2) 在本院接受治疗且能配合本次研究者。排除标准: (1) 长期应用激素、免疫抑制剂者; (2) 既往有慢性肾脏病史, 接受过肾脏手术, 近期接受造影剂检查及使用过肾毒性药物者; (3) 有恶性肿瘤、血液系统疾病、慢性肝病及自身免疫性疾病者。本研究经我院伦理委员会批准 (HSYJ-20160113), 并与患儿家属签署知情同意书。

### 1.2 分组及资料收集

参考文献<sup>[6]</sup>的 AKI 诊断标准, 根据是否并发 AKI 将脓毒症患儿分为 AKI 组 ( $n=49$ ) 和非 AKI 组 ( $n=93$ )。记录所有患儿入院时的年龄、性别、

体重指数、基础疾病、感染部位、心率、呼吸、体温、尿量、急性生理学与慢性健康状况评分系统 II (Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II, APACHE II) 及序贯器官衰竭评分 (Sequential Organ Failure Assessment, SOFA) 等基本情况。

### 1.3 miR-21-3p 检测

所有患儿均于入院次日采集空腹静脉血 5 mL 置于未加抗凝剂的离心管中, 离心分离血清,  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存待测。按照 RNA 快速提取试剂盒说明书提取样本总 RNA, 逆转录为 cDNA。以 U6 为内参照, 引物的设计与合成由北京天根生物技术有限公司完成。miR-21-3p 上游引物: 5'-ACTCCTACGACTTAGACATG-3', 下游引物: 5'-GACTGTATGCTGCTCGTAG-3', 片段长度 542 bp; U6 上游引物: 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3', 下游引物: 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3', 片段长度 386 bp。在 ABI 7500 型荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司) 上进行实时荧光定量聚合酶链反应 (RT-PCR)。反应体系为 20  $\mu\text{L}$ : TaqMan MicroRNA Assay 1.0  $\mu\text{L}$ , cDNA 1.3  $\mu\text{L}$ , 上下游引物各 2.0  $\mu\text{L}$ , TaqMan 2  $\times$  Universal PCR Master Mix 10.0  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 3.7  $\mu\text{L}$ , 混合后离心放入定量 PCR 仪。扩增条件为:  $95^{\circ}\text{C}$  预变性 10 min;  $95^{\circ}\text{C}$  变性 15 s,  $60^{\circ}\text{C}$  退火 60 s, 45 个循环。采用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法计算 miR-21-3p 的相对表达水平。

### 1.4 观察指标

所有患儿均于入院次日采集空腹静脉血 5 mL 置于未加抗凝剂的离心管中, 置  $37^{\circ}\text{C}$  水浴箱中水浴 30 min 后, 以 3 500 r/min 离心 10 min, 分离血清保存于  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱中待检。采用微粒子酶免疫分析法检测 Scr 及 Cys-C 水平, 采用酶联免疫法检测 KIM-1 水平, 试剂盒由德国西门子公司提供。

### 1.5 统计学分析

采用 SPSS 20.0 统计软件对数据进行统计学分析, 计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 两组间比较采用两样本  $t$  检验。计数资料用率 (%) 表示, 两组间的比较采用  $\chi^2$  检验。绘制受试者工作特征 (receiver operating characteristic, ROC) 曲线分析血清 miR-21-3p、Scr、Cys-C 及 KIM-1 水平预测 AKI 的价值, 曲线下面积 (area under curve, AUC) 比较采用  $Z$  检验。相关性分析采用 Pearson 相关分析。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 两组临床一般资料

两组的性别、年龄、体重指数、感染部位分布、心率、呼吸及体温比较,差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。非AKI组的尿量多于AKI组,APACHE II评分及SOFA评分低于AKI组( $P<0.05$ )。见表1。

表1 两组临床一般资料比较

一般资料	非AKI组 (n=93)	AKI组 (n=49)	$\chi^2/t$ 值	P值
男/女(例)	57/36	32/17	0.221	0.638
年龄( $\bar{x}\pm s$ ,岁)	5.9 $\pm$ 1.6	5.6 $\pm$ 1.4	0.893	0.410
体重指数( $\bar{x}\pm s$ ,kg/m <sup>2</sup> )	17.6 $\pm$ 2.3	17.2 $\pm$ 2.2	0.827	0.492
感染部位[n(%)]				
肺部感染	38(41)	23(47)	0.351	0.540
腹腔感染	24(26)	14(29)		
皮肤软组织感染	9(10)	3(6)		
泌尿系统感染	3(3)	1(2)		
颅内感染	5(5)	3(6)		
血源性感染	14(15)	5(10)		
心率( $\bar{x}\pm s$ ,次/mim)	115 $\pm$ 6	118 $\pm$ 7	0.671	0.563
呼吸( $\bar{x}\pm s$ ,次/mim)	25 $\pm$ 3	27 $\pm$ 4	0.982	0.337
体温( $\bar{x}\pm s$ ,℃)	37.4 $\pm$ 1.0	37.6 $\pm$ 1.2	0.704	0.542
尿量( $\bar{x}\pm s$ ,mL/(kg·h))	1.87 $\pm$ 0.35	1.40 $\pm$ 0.22	4.108	0.043
APACHE II评分( $\bar{x}\pm s$ )	14 $\pm$ 4	17 $\pm$ 5	4.813	0.020
SOFA评分( $\bar{x}\pm s$ )	4.2 $\pm$ 2.4	5.6 $\pm$ 2.7	4.294	0.037

注:[APACHE II]急性生理学与慢性健康状况评分系统II;[SOFA]序贯器官衰竭评分。

### 2.2 两组血清miR-21-3p、Scr、Cys-C及KIM-1水平变化

AKI组血清miR-21-3p、Scr、Cys-C及KIM-1水平明显高于非AKI组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ ),见表2。

表2 两组血清miR-21-3p、Scr、Cys-C及KIM-1水平比较 ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	miR-21-3p	Scr ( $\mu$ mol/L)	Cys-C (mg/L)	KIM-1 ( $\mu$ g/L)
非AKI组	93	0.86 $\pm$ 0.24	93 $\pm$ 11	0.61 $\pm$ 0.17	4.8 $\pm$ 0.6
AKI组	49	2.37 $\pm$ 0.92	459 $\pm$ 83	1.90 $\pm$ 0.64	23.2 $\pm$ 6.4
t值		16.204	8.472	10.418	12.603
P值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:[Scr]血肌酐;[Cys-C]胱抑素C;[KIM-1]肾损伤分子-1。

### 2.3 血清miR-21-3p、Scr、Cys-C及KIM-1水平预测AKI的价值

血清miR-21-3p、Scr、Cys-C及KIM-1水平预测脓毒症患儿并发AKI的最佳截断值分别为1.75、330.70 $\mu$ mol/L、1.28 mg/L、17.20 $\mu$ g/L,其中血清miR-21-3p表达水平预测脓毒症患儿并发AKI的敏感度(87.5%)和特异度(81.6%)最高。四项指标联合预测脓毒症患儿并发AKI的AUC均分别高于单项miR-21-3p、Scr、Cys-C及KIM-1预测脓毒症患儿并发AKI的AUC( $Z=4.794$ 、 $7.405$ 、 $6.502$ 、 $6.273$ , $P<0.05$ ),其敏感度和特异度分别为97.0%和91.4%。见表3和图1。

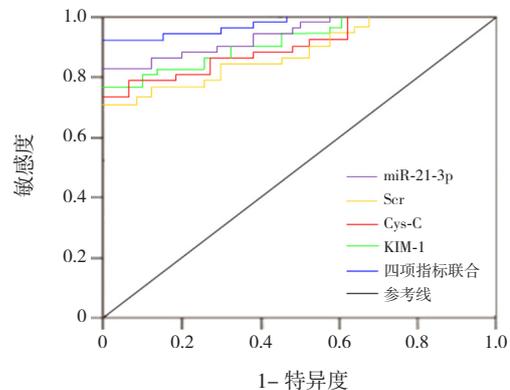


图1 血清miR-21-3p、Scr、Cys-C及KIM-1水平预测AKI的ROC曲线

表3 血清miR-21-3p、Scr、Cys-C及KIM-1水平预测AKI的价值

指标	最佳截断值	AUC(95%CI)	敏感度 (%)	特异度 (%)	阳性预测值 (%)	阴性预测值 (%)
miR-21-3p	1.75	0.863(0.804~0.920)	87.5	81.6	83.5	86.0
Scr	330.70 $\mu$ mol/L	0.738(0.680~0.802)	72.4	71.8	74.5	70.0
Cys-C	1.28 mg/L	0.802(0.745~0.857)	81.2	74.0	71.6	85.3
KIM-1	17.20 $\mu$ g/L	0.820(0.765~0.886)	83.0	75.4	78.5	80.6
四项联合	-	0.962(0.906~0.998)	97.0	91.4	94.2	95.3

注:[Scr]血肌酐;[Cys-C]胱抑素C;[KIM-1]肾损伤分子-1。

## 2.4 血清 miR-21-3p 表达水平与 Scr、Cys-C 及 KIM-1 表达水平的相关性分析

Pearson 相关分析显示, AKI 组血清 miR-21-

3p 表达水平与血清 Scr、Cys-C、KIM-1 均呈正相关(分别  $r=0.704$ 、 $0.812$ 、 $0.863$ ,  $P<0.01$ ), 见图 2。

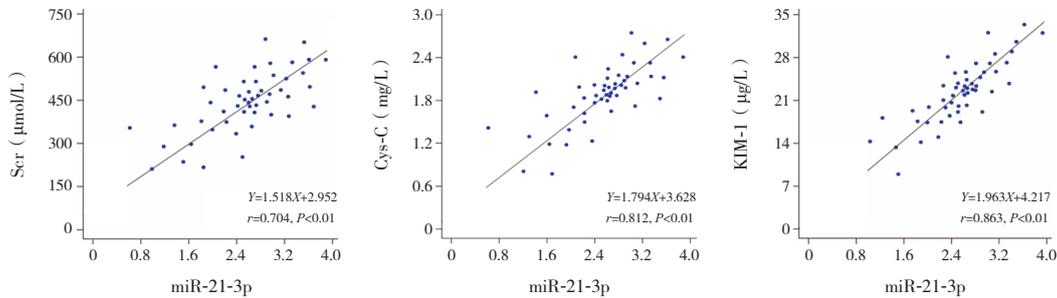


图2 血清 miR-21-3p 水平与 Scr、Cys-C 及 KIM-1 水平的相关分析图

## 3 讨论

儿童 AKI 是由脓毒症引发的一种常见急危重症, 其病情进展迅速, 病死率较高, 已成为儿童重症监护室发生死亡的主要原因之一。目前, 由于缺乏对 AKI 早期预测的敏感特异指标, 在临床实践中往往错过了对 AKI 的早期诊断及干预的最佳时机。因此, 探索预测脓毒症患儿 AKI 的生物标志物来协助诊断显得尤为重要。miRNA 是一类长度为 18~25 个核苷酸组成的内源性单链非编码 RNA 分子, 通过影响细胞缺血缺氧、细胞的分化、增殖、代谢和凋亡等多种病理过程或信号通路, 产生细胞损伤作用, 从而参与 AKI 的调控<sup>[7]</sup>。有研究表明, miRNA 通过多种机制参与不同病因所导致的 AKI 发病, 是 AKI 发病的重要调控因子, 且是 AKI 早期诊断和预后预测的生物标志物<sup>[8]</sup>。Pu 等<sup>[9]</sup>动物实验研究发现, miR-21-3p 在大鼠 AKI 中明显上调, 且其升高先于血尿素氮和肌酐, 可能成为早期诊断 AKI 的一个新的潜在生物标志物。Gaede 等<sup>[10]</sup>研究显示, 在心脏手术后 AKI 患者中血清 miR-21 水平显著升高, miR-21 水平对 AKI 的发生具有较好的预测价值, 有助于术前风险评估和围手术期的诊断和治疗。

本研究显示, AKI 组血清 miR-21-3p、Scr、Cys-C 及 KIM-1 水平明显高于非 AKI 组, 提示血清 miR-21-3p 表达水平可能参与 AKI 的发生发展。Zhang 等<sup>[11]</sup>研究表明, miRNA 在脓毒症继发 AKI 的患者中显著升高, 能反映疾病的严重程度, 其水平越高脓症患者病死率越高, 可能成为 AKI

新的诊断标志物及治疗靶点。Xie 等<sup>[12]</sup>研究认为, KIM-1 能迅速反映近曲小管的损伤, 对肾脏功能损害具有较高的特异度和敏感度, 可用于 AKI 的早期预测。魏薇等<sup>[13]</sup>研究显示, miR-21 水平升高是脓毒症合并 AKI 患者发生死亡的独立危险因素, 在评估脓毒症合并 AKI 患者死亡中具有良好的预测价值, 为 AKI 的发病及其早期诊断治疗提供依据。王军宇等<sup>[14]</sup>研究发现, Cys-C 及 KIM-1 水平升高是发生 AKI 的独立危险因素, 且与 AKI 的严重程度有关, 可作为预测急诊危重症患者 7 d 内 AKI 发生的敏感指标。本研究进一步应用 ROC 曲线分析显示, 血清 miR-21-3p、Scr、Cys-C 及 KIM-1 水平预测脓毒症患儿并发 AKI 的最佳截断值分别为 1.75、330.70 μmol/L、1.28 mg/L、17.20 μg/L, 与各单项指标相比, 四项指标联合预测脓毒症患儿并发 AKI 的 AUC 最大, 敏感度和特异度最高。相关分析也显示, AKI 组血清 miR-21-3p 表达水平与 Scr、Cys-C 及 KIM-1 表达水平均呈正相关, 进一步说明 miR-21-3p 与 Scr、Cys-C 及 KIM-1 联合检测有助于提高 AKI 早期诊断的准确性。钟开义等<sup>[15]</sup>研究发现, 血清 miR-21 表达水平在 AKI 患者中明显升高, 且与患者的病情严重程度相关, 有望作为 AKI 诊断及预后评估的新型生物标志物。另有研究表明, miR-21 在肾缺血再灌注损伤中发挥重要作用, 可作为 AKI 早期诊断及病情进展的生物标志物, 并可用于预测心脏术后 AKI 的预后情况<sup>[16]</sup>。

综上所述, 血清 miR-21-3p 表达水平在脓毒症并发 AKI 患儿中明显升高, 有望作为 AKI 早期预测的新型生物标志物, 联合 Scr、Cys-C 及

KIM-1 对预测 AKI 具有较高的价值, 同时也为研究 AKI 的发病机制及治疗靶点提供了新的角度。但本研究仍存在很多局限性, 如病例来源较单一, 临床试验较少、检测的 miRNA 数量少等, 未来仍需更多系统的基础性研究来进一步验证 miR-21-3p 在 AKI 中的临床应用价值。

[参 考 文 献]

- [1] Anigilaje EA, Adebayo AI, Ocheni SA. Acute kidney injury in children: a study of etiology, clinical profile, and short-term outcomes at the University of Abuja Teaching Hospital, Gwagwalada, Abuja, Nigeria[J]. Saudi J Kidney Dis Transpl, 2019, 30(2): 421-439.
- [2] Baker MA, Davis SJ, Liu P, et al. Tissue-specific microRNA expression patterns in four types of kidney disease[J]. J Am Soc Nephrol, 2017, 28(10): 2985-2992.
- [3] Ma J, Wang Y, Xu HT, et al. MicroRNA: a novel biomarker and therapeutic target to combat autophagy in diabetic nephropathy[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(14): 6257-6263.
- [4] Lin Z, Liu Z, Wang X, et al. MiR-21-3p plays a crucial role in metabolism alteration of renal tubular epithelial cells during sepsis associated acute kidney injury via AKT/CDK2-FOXO1 pathway[J]. Biomed Res Int, 2019, 16: 2821731.
- [5] 中华医学会儿科学分会急救学组, 中华医学会急诊医学分会儿科学组, 中国医师协会儿童重症医师分会. 儿童脓毒性休克(感染性休克)诊治专家共识(2015版)[J]. 中华儿科杂志, 2015, 53(8): 576-580.
- [6] Khwaja A. KDIGO clinical practice guidelines for acute kidney injury[J]. Nephron Clin Pract, 2012, 120(4): c179-c184.
- [7] Jones TF, Bekele S, O'Dwyer MJ, et al. MicroRNAs in acute kidney injury[J]. Nephron, 2018, 140(2): 124-128.
- [8] Malhotra R, Siew ED. Biomarkers for the early detection and prognosis of acute kidney injury[J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2017, 12(1): 149-173.
- [9] Pu XY, Shen JY, Deng ZP, et al. Plasma-specific microRNA response induced by acute exposure to aristolochic acid I in rats[J]. Arch Toxicol, 2017, 91(3): 1473-1483.
- [10] Gaede L, Liebetrau C, Blumenstein J, et al. Plasma microRNA-21 for the early prediction of acute kidney injury in patients undergoing major cardiac surgery[J]. Nephrol Dial Transplant, 2016, 31(5): 760-766.
- [11] Zhang J, Wang CJ, Tang XM, et al. Urinary miR-26b as a potential biomarker for patients with sepsis-associated acute kidney injury: a Chinese population-based study[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(14): 4604-4610.
- [12] Xie Y, Wang Q, Wang C, et al. Association between the levels of urine kidney injury molecule-1 and the progression of acute kidney injury in the elderly[J]. PLoS One, 2017, 12(2): e0171076.
- [13] 魏薇, 翟哲, 毕宏远, 等. miR-21 和 miR-107-5p 对脓毒症所致急性肾损伤患者 28 天生存率影响[J]. 国际遗传学杂志, 2018, 41(4): 266-272.
- [14] 王军宇, 张达, 梅雪. 尿肾损伤分子-1 及血清半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 对急诊危重症患者急性肾损伤的预测价值[J]. 中国急救医学, 2018, 38(2): 118-122.
- [15] 钟开义, 黎宝仁, 张祖文, 等. 血清 miR-21 及 miR-155 对急性肾损伤的诊断及预后评估价值[J]. 中国免疫学杂志, 2018, 34(12): 1861-1865.
- [16] Arvin P, Samimaghham HR, Montazerghaem H, et al. Early detection of cardiac surgery-associated acute kidney injury by microRNA-21[J]. Bratisl Lek Listy, 2017, 118(10): 626-631.

(本文编辑: 万静)