

呼吸机相关肺炎患者病原菌分布及血清 miR-146a、miR-155 的检测分析

王宏伟, 宋晓萍, 裴复阳

(大连大学附属中山医院呼吸科, 辽宁 大连 116001)

摘要:目的 探讨呼吸机相关肺炎(VAP)患者病原菌分布及血清微小RNA-146a(miR-146a)、miR-155表达水平及临床意义。方法 选择2018年12月-2021年4月在大连大学附属中山医院进行机械通气治疗的患者197例作为观察对象,其中符合VAP诊断标准的107例患者作为VAP组,未感染患者90例作为非VAP组,另选择同期健康体检人员100人作为对照组。采用实时荧光定量PCR法(RT-qPCR)检测血清miR-146a、miR-155表达,采用ELISA方法检测血清C-反应蛋白(CRP)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平, Pearson法分析miR-146a、miR-155与CRP、TNF- α 相关性, ROC曲线分析miR-146a、miR-155对VAP的诊断价值。结果 107例VAP患者共分离出170株致病菌,以革兰阴性菌为主共91株占53.53%,其次是革兰阳性菌73株占42.94%,真菌6株(3.53%)。革兰阴性菌以铜绿假单胞菌为主,革兰阳性菌以金黄色葡萄球菌为主。与对照组比较,非VAP组、VAP组患者血清miR-146a、miR-155及CRP、TNF- α 表达水平显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$);与非VAP组比较,VAP组患者血清miR-146a、miR-155及CRP、TNF- α 表达水平显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。相关性分析显示,VAP患者血清miR-146a、miR-155表达水平与CRP、TNF- α 水平呈正相关($P<0.05$)。miR-146a、miR-155联合诊断VAP的灵敏度为87.57%,特异度为92.44%,曲线下面积为0.920。结论 VAP患者以革兰阴性菌为主要致病菌,血清miR-146a、miR-155表达水平升高,二者联合检测对VAP有一定诊断价值。

关键词:微小RNA-146a;微小RNA-155;呼吸机相关肺炎;病原菌

中图分类号:R563.1

文献标识码:A

文章编号:1672-3619(2022)01-0037-04

Distribution of pathogenic bacteria and detection and analysis of serum miR-146a and miR-155 in patients with ventilator-associated pneumonia

WANG Hong-wei, SONG Xiao-ping, PEI Fu-yang

(Department of Respiratory Medicine, Zhongshan Hospital, Dalian University, Dalian, Liaoning 116001, China)

Corresponding author: WANG Hong-wei, E-mail: whw13591172837@163.com

Abstract: Objective To investigate the distribution of pathogenic bacteria and serum miR-146a and miR-155 expression levels and clinical significance in patients with ventilator-associated pneumonia (VAP). **Methods** A total of 197 patients who were treated in Zhongshan Hospital Affiliated to Dalian University from December 2018 to April 2021 were selected as observation objects. Among them, 107 patients meeting the diagnostic criteria of VAP were regarded as the VAP group, and 90 patients without infection were regarded as the non-VAP group. In addition, 100 health examiners during the same period were selected as the control group. Real-time fluorescent quantitative PCR (RT-qPCR) was used to detect the expression of serum miR-146a and miR-155; ELISA method was used to detect the levels of serum C-reaction protein (CRP) and tumor necrosis factor- α (TNF- α). Pearson method was used to analyze the correlation between miR-146a, miR-155 and CRP, TNF- α , and ROC curve was used to analyze the diagnostic value of miR-146a and miR-155 for VAP. **Results** A total of 170 pathogenic bacteria were isolated from 107 patients. Among them, 91 were Gram-negative bacteria, accounting for 53.53%, mainly *Pseudomonas aeruginosa*; 73 were Gram-positive bacteria, accounting for 42.94%, mainly *Staphylococcus aureus*; 6 were fungi, accounting for 3.53%. Compared with the control group, the levels of serum miR-146a, miR-155, CRP and TNF- α in the non-VAP group and VAP group were significantly increased, and the difference was statistically significant ($P<0.05$); compared with the non-VAP group, the levels of serum miR-146a, miR-155, CRP and TNF- α in the VAP group were significantly increased, and the difference was statistically significant ($P<0.05$); correlation analysis showed that the

基金项目:国家自然科学基金(81571783)

作者简介:王宏伟(1982-),男,硕士,主治医师,主要从事呼吸内科临床诊治,E-mail:whw13591172837@163.com

expression levels of serum miR-146a and miR-155 in VAP patients were positively correlated with CRP and TNF- α levels ($P<0.05$); the sensitivity of miR-146a combined with miR-155 in the diagnosis of VAP was 87.57%, the specificity was 92.44%, and the area under the curve was 0.920. **Conclusions** Gram-negative bacteria were the main pathogens in VAP patients, and serum miR-146a and miR-155 expression levels were elevated. The combined detection of the two had a certain diagnostic value for VAP.

Keywords: microRNA-146a; microRNA-155; Ventilator-associated pneumonia; Pathogenic bacteria

呼吸机相关肺炎(ventilator-associated pneumonia, VAP)是常见的医院获得性感染疾病,其发生率高,病情进展迅速,可并发呼吸衰竭、感染性休克等,若治疗不及时或抗生素使用不当,严重影响患者身心健康和预后。因此,及早评估VAP患者病情,正确使用抗生素,对其治疗和改善预后具有重要临床意义^[1-2]。病原菌检测可确定病原菌种类与分布,为临床合理选择抗生素提供依据。微小RNA(miRNA)为内源性非编码RNA,通过与靶基因结合调节机体生长发育及多种生理病理过程。研究显示,miRNA可调节机体免疫功能、炎症反应,与哮喘、肺炎等多种肺部疾病发生发展有关^[3]。miR-146a、miR-155均为miRNA,在炎症性疾病中其表达水平升高,在炎症反应中发挥重要作用^[4]。研究表明,肺炎支原体肺炎患儿外周血中miR-146a、miR-155表达水平升高,与T淋巴细胞比例呈负相关,与炎症因子水平呈正相关^[5]。miR-146a与miR-155在VAP患者中表达尚不清楚。因此本研究通过检测VAP患者病原菌分布及血清miR-146a与miR-155表达情况,探讨miR-146a、miR-155与VAP疾病的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择2018年12月-2021年4月在大连大学附属中山医院进行机械通气治疗的197例患者作为观察对象,男109例,女88例,年龄31~79岁,平均年龄(56.20 \pm 11.70)岁。其中符合VAP诊断标准的107例患者作为VAP组,未感染患者90例作为非VAP组,另选择同期健康体检人员100人作为对照组,其中男58人,女42人,年龄30~80岁,平均年龄(55.90 \pm 12.50)岁。纳入标准:①VAP组患者符合VAP诊断标准^[6];②呼吸机治疗时间大于24h;③患者临床资料完整。排除标准:①进行呼吸机辅助通气前已确诊为肺部感染者;②合并肺结核等其他呼吸系统疾病者;③合并心、肝、肾等其他脏器感染者。本研究通过医院伦理委员会批准,患者或其家属签署知情同意书。

1.2 研究方法

1.2.1 样品保存 采集各观察对象清晨空腹静脉血5mL,4℃条件,3000r/min离心20min,离心半径12cm,取上层血清,分装后置于-80℃保存备用。

1.2.2 病原菌检测 无菌拭子采集患者下呼吸道分泌物,培养基分离培养,使用法国梅里埃公司生产的全自动细菌鉴定系统进行鉴定,细菌培养和鉴定按照《全国临床检验操作规程》进行^[7]。

1.2.3 检测血清miR-146a、miR-155水平 采用RT-qPCR检测血清中miR-146a、miR-155相对表达量。Trizol试剂提取血清总RNA,使用逆转录试剂盒逆转录合成cDNA,再进行实时定量PCR反应。以U6为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算miR-146a和miR-155相对表达量。miR-146a、miR-155及内参U6引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,miR-146a上游引物:5'-GAGAACTGAATTCCATGG-3',下游引物:5'-GAACATGTCTGCGTATCTC-3';miR-155上游引物:5'-TGCTAATCCTGATAGGGG-3',下游引物:5'-GAACATGTCTGCGTATCTC-3';U6上游引物:5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3',下游引物:5'-TGGTGAAGACGCCAGTGA-3'。

1.2.4 血清C-反应蛋白、肿瘤坏死因子- α 检测 采用酶联免疫吸附法测定血清C-反应蛋白(C-reaction protein, CRP)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)水平,试剂盒购自武汉赛培生物科技有限公司,严格按照试剂盒说明书进行操作。

1.3 统计学分析 利用SPSS 23.0软件对数据进行统计分析,呈正态分布计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两组间比较采用LSD- t 检验;计数资料采用例(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验;Pearson法分析miR-146a、miR-155与CRP、TNF- α 指标相关性;ROC曲线分析miR-146a、miR-155对VAP的诊断价值。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 病原菌分布情况 107例VAP患者共分离出

170株致病菌,以革兰阴性菌为主共91株占53.53%,其次是革兰阳性菌73株占42.94%,真菌6株(3.53%)。革兰阴性菌以铜绿假单胞菌为主,革兰阳性菌以金黄色葡萄球菌为主,见表1。

2.2 血清 miR-146a、miR-155 及炎症因子水平比较 与对照组比较,非 VAP 组、VAP 组患者血清 miR-146a、miR-155 及 CRP、TNF- α 表达水平显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$);与非 VAP 组比较,VAP 组患者血清 miR-146a、miR-155 及 CRP、TNF- α 表达水平显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$),见表2。

2.3 VAP 患者血清 miR-146a、miR-155 与 CRP、TNF- α 指标相关性 相关性分析显示,VAP 患者血清 miR-146a 表达水平与 CRP、TNF- α 水平呈正相关($P<0.05$),miR-155 表达水平与 CRP、TNF- α 水平呈正相关($P<0.05$),见表3。

表1 病原菌分布情况
Tab.1 Distribution of pathogens

病原菌	菌株数(n)	比例(%)
革兰阳性菌		
金黄色葡萄球菌	20	11.76
肺炎链球菌	32	18.82
表皮葡萄球菌	12	7.06
粪肠球菌	6	3.53
其他	3	1.76
革兰阴性菌		
大肠埃希菌	15	8.82
铜绿假单胞菌	32	18.82
肺炎克雷伯菌	17	10.00
阴沟肠杆菌	21	12.35
其他	6	3.53
真菌		
白假丝酵母	4	2.35
热带假丝酵母	2	1.18

表2 血清 miR-146a、miR-155 及炎症因子水平比较($\bar{x}\pm s$)

Tab.2 Comparison of serum levels of miR-146a, miR-155 and inflammatory factors ($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	miR-146a	miR-155	CRP (ng/mL)	TNF- α (pg/mL)
对照组	100	1.01 \pm 0.18	1.13 \pm 0.19	6.21 \pm 2.26	0.18 \pm 0.05
非 VAP 组	90	2.13 \pm 0.42 ^a	2.21 \pm 0.33 ^a	24.45 \pm 7.13 ^a	0.39 \pm 0.11 ^a
VAP 组	107	3.24 \pm 0.56 ^{ab}	2.78 \pm 0.47 ^{ab}	47.87 \pm 14.26 ^{ab}	0.56 \pm 0.14 ^{ab}
F 值		724.786	576.931	499.073	323.025
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000

注:与对照组比较,^a $P<0.05$;与非 VAP 组比较,^b $P<0.05$ 。

表3 VAP 患者血清 miR-146a、miR-155 与 CRP、TNF- α 指标相关性

Tab.3 Correlation of serum miR-146a and miR-155 with CRP and TNF- α indicators in VAP patients

指标	miR-146a		miR-155	
	r 值	P 值	r 值	P 值
CRP	0.579	0.000	0.525	0.000
TNF- α	0.624	0.000	0.607	0.000

2.4 miR-146a、miR-155 对 VAP 的诊断价值 miR-146a 诊断 VAP 的灵敏度为 79.44%,特异度为 80.00%,截断值为 2.55,曲线下面积为 0.859。miR-155 诊断 VAP 的灵敏度为 85.05%,特异度为 77.78%,曲线下面积为 0.857,截断值为 2.52。miR-146a、miR-155 联合诊断 VAP 的灵敏度为 87.57%,特异度为 92.44%,曲线下面积为 0.920。联合诊断的灵敏度与特异度高于单独指标,见表4和图1。

表4 miR-146a、miR-155 对 VAP 的诊断效能

Tab.4 The diagnostic efficacy of miR-146a and miR-155 on VAP

指标	曲线下面积	95%CI	截断值	灵敏度(%)	特异度(%)	约登指数
miR-146a	0.859	0.808-0.910	2.55	79.44	80.00	0.594
miR-155	0.857	0.803-0.911	2.52	85.05	77.78	0.628
联合诊断	0.920	0.882-0.958		87.57	92.44	0.754

3 讨论

机械性通气为侵入性操作,可引起呼吸道病原菌感染,导致 VAP,是重症监护病房内的常见并发

症,也是导致住院患者死亡的主要原因^[8]。研究显示,VAP 病原菌类型多样,其种类和数量不断变化,给临床治疗造成困扰,因此检测病原菌种类和分布,为临床合理用药提供依据,从而有针对性地治

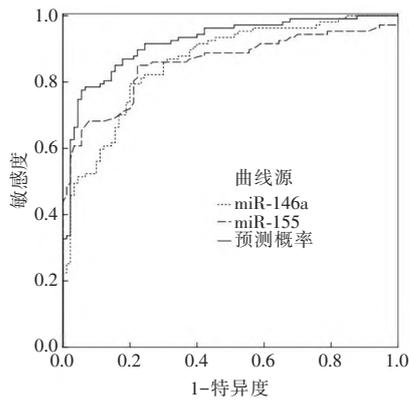


图1 miR-146a、miR-155对VAP的诊断价值

Fig.1 The diagnostic value of miR-146a and miR-155 for VAP

疗,对于降低患者死亡率具有重要意义^[9]。本研究从107例VAP患者共分离出170株致病菌,以革兰阴性菌为主,其次是革兰阳性菌。其中革兰阴性菌91株,占53.53%,以铜绿假单胞菌为主;革兰阳性菌73株,占42.94%,以金黄色葡萄球菌为主;真菌6株,占3.53%,与以往报道相符^[10],提示VAP患者主要的病原菌类型为革兰阴性菌,可合理选用具有针对性的抗生素,有效缓解患者临床症状,降低患者死亡率。

miRNA可参与调节炎症细胞和介质的表达,在肺炎等相关肺部疾病的免疫调节过程中发挥重要作用^[11]。miR-146a在单核细胞、巨噬细胞等多种免疫细胞中表达水平升高从而参与免疫与炎症反应^[12]。miR-155在巨噬细胞、T细胞、B细胞等多种免疫细胞中表达,可与多种抗炎因子靶基因结合,介导炎症反应、抗原呈递、调控细胞因子分泌,在免疫应答中发挥重要作用^[13]。研究表明,miR-146a、miR-155在社区获得性肺炎患者外周血中表达水平升高,且与患者预后相关^[14-15]。王宽锋等^[16]研究表明,呼吸道合胞病毒肺炎婴幼儿外周血单个核细胞中miR-146a和miR-155表达水平升高,且重症患儿miR-146a、miR-155水平显著高于轻症患儿和健康儿童,与炎症因子TNF- α 、IL-1 β 、IL-4呈正相关,对呼吸道合胞病毒肺炎的早期诊断具有一定价值。另有研究显示,miR-146a、miR-155水平与慢性阻塞性肺疾病的炎症表型有关,与粒细胞缺乏型相比,嗜酸性粒细胞型与混合型粒细胞患者血清miR-146a水平显著升高,嗜中性粒细胞型与混合粒细胞型miR-155水平显著升高^[17]。本研究结果显示,非VAP组、VAP组患者血清miR-146a、miR-155表达水平较对照组显著升高,且与非VAP组比较,VAP组患者血清miR-146a、miR-155表达水平显著升高,提

示miR-146a、miR-155异常表达与VAP发病有关,可能共同参与调控VAP发病。可能VAP患者由于发生细菌感染,刺激机体参与免疫应答,引起体内miR-146a和miR-155表达水平升高。本研究发现VAP患者主要的病原菌类型为革兰阴性菌,其次是革兰阳性菌,可能不同类型的细菌对机体产生的免疫应答不同,也会引起机体miR-146a、miR-155表达水平不同,但由于本研究纳入患者单独感染革兰阴性菌或革兰阳性菌的患者较少,存在多个重复感染患者,无法推测哪种细菌感染对miR-146a、miR-155表达水平有影响,后续将扩大样本量,纳入单独革兰阴性菌或革兰阳性菌的患者,比较二者之间差异,从而为临床用药提供指导。

CRP是一种常见的急性时相性反应蛋白,在感染性疾病中水平升高;TNF- α 是参与炎症反应的促炎因子,可反映机体感染。研究表明,VAP患者血清CRP、TNF- α 表达水平升高^[18]。本研究结果显示,与对照组比较,非VAP组、VAP组患者血清CRP、TNF- α 表达水平显著升高,且VAP组患者血清CRP、TNF- α 表达水平显著高于非VAP组,与赵千文等^[18]研究结果一致。进一步相关性分析结果显示,VAP患者血清miR-146a、miR-155表达水平均与CRP、TNF- α 水平呈正相关,进一步表明miR-146a、miR-155与患者病情相关。另外,本研究还显示,miR-146a、miR-155联合诊断VAP的灵敏度为87.57%,特异度为92.44%,曲线下面积为0.920,表明miR-146a、miR-155联合检测对VAP具有一定诊断价值。

综上所述,VAP患者以革兰阴性菌感染为主,其次是革兰阳性菌,且血清miR-146a、miR-155表达水平升高,二者可反映VAP病情,对VAP有一定诊断价值。

参考文献

[1] METERSKY M L, KALIL A C. Management of ventilator-associated pneumonia: Guidelines [J]. Clin Chest Med, 2018, 39(4): 797-808.

[2] ROUZÉ A, MARTIN-LOECHES I, NSEIR S. Airway devices in ventilator-associated pneumonia pathogenesis and prevention [J]. Clin Chest Med, 2018, 39(4): 775-783.

[3] ZHOU Z, ZHU Y, GAO G, et al. Long noncoding RNA SNHG16 targets miR-146a-5p/CCL5 to regulate LPS-induced WI-38 cell apoptosis and inflammation in acute pneumonia [J]. Life Sci, 2019, 228: 189-197.

[4] YANG Y, WU B Q, WANG Y H, et al. Regulatory effects of miR-155 and miR-146a on repolarization and inflammatory cytokine secretion in human alveolar macrophages in (下转第51页)

- [14] LIANG R, TANG Y. LINC00467 knockdown repressed cell proliferation but stimulated cell apoptosis in glioblastoma via miR-339-3p/IP6K2 axis [J]. *Cancer Biomark*, 2020, 28(2): 169-180.
- [15] SAHU A, SINGHAL U, CHINNAIYAN A M. Long noncoding RNAs in cancer: from function to translation [J]. *Trends Cancer*, 2015, 1(2):93-109.
- [16] 唐杰庆, 秦龙梅, 李洁. lncRNA THAP9-AS1 靶向 miR-577 调控结直肠癌细胞的增殖、迁移和侵袭[J]. *热带医学杂志*, 2021, 21(1): 26-30, 39.
- [17] 蔡国强, 陈雪军, 王峰. lncRNA GAS5 通过 AKT/mTOR 通路对结肠癌 SW480 细胞增殖和凋亡的影响[J]. *热带医学杂志*, 2020, 20(2): 185-190.
- [18] 何婧怡, 胡春宏. 替莫唑胺治疗胶质母细胞瘤耐药机制的研究进展[J]. *中国现代应用药学*, 2019, 36(23): 125-131.
- [19] HE X, LI S, YU B, et al. Up - regulation of LINC00467 promotes the tumorigenesis in colorectal cancer [J]. *J Cancer*, 2019, 10(25): 6405-6413.
- [20] CHANG Y, YANG L. LINC00467 promotes cell proliferation and stemness in lung adenocarcinoma by sponging miR-4779 and miR-7978 [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 3(1): 45-51.
- [21] HUANG H, CHEN J, DING C M, et al. lncRNA NR2F1-AS1 regulates hepatocellular carcinoma oxaliplatin resistance by targeting ABCC1 via miR-363 [J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22(6): 3238-3245.
- [22] 徐峰, 章蔚, 田景琦. miR-363 通过靶向于 MCL-1 增强顺铂对乳腺癌细胞的杀伤活性[J]. *中国卫生检验杂志*, 2015, 25(19): 3236-3239.

收稿日期: 2021-06-23

(上接第 40 页)

- vitro* [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2016, 38(6): 502-509.
- [5] 张薇, 孙浩森, 王洁. 肺炎患儿外周血 miR-146a、miR-155 表达水平及其与 T 淋巴细胞亚群和炎症因子的关系[J]. *热带医学杂志*, 2019, 19(11): 1401-1407.
- [6] 中华医学会呼吸病学分会感染学组. 中国成人医院获得性肺炎与 VAP 诊断和治疗指南(2018 年版)[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2018, 41(4): 255-280.
- [7] 尚红, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2015.
- [8] MARTIN-LOECHES I, RODRIGUEZ A H, TORRES A. New guidelines for hospital-acquired pneumonia/ventilator-associated pneumonia: USA vs. Europe [J]. *Curr Opin Crit Care*, 2018, 24(5): 347-352.
- [9] 艳军, 李茂琴, 史载祥, 等. 肺泡灌洗联合抗感染治疗呼吸机相关肺炎的研究[J]. *热带医学杂志*, 2016, 16(2): 206-209.
- [10] 黄洪婕, 李宁秀. VAP 患者病原菌分布及血清 sTREM-1 和 HMGB1 的变化[J]. *中国微生态学杂志*, 2020, 32(4): 435-438.
- [11] 刘春艳, 柯文玲, 柴林, 等. 血清中 microRNA 20a 与小儿肺炎炎症反应进展的相关性研究[J]. *中国儿童保健杂志*, 2019, 206(8): 75-78.
- [12] 杨佳, 刘星星, 范恒. miR-146a 与固有免疫应答的研究进展 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2017, 33(2): 256-260.
- [13] DE SMET E G, VAN EECKHOUTTE H P, AVILA COBOS F, et al. The role of miR-155 in cigarette smoke-induced pulmonary inflammation and COPD [J]. *Mucosal Immunol*, 2020, 13(3): 423-436.
- [14] WU X, WU C, GU W, et al. Serum exosomal MicroRNAs predict acute respiratory distress syndrome events in patients with severe community-acquired pneumonia [J]. *Biomed Res Int*, 2019, 2019: 3612020.
- [15] GALVÁN-ROMÁN J M, LANCHO-SÁNCHEZ Á, LUQUERO-BUENO S, et al. Usefulness of circulating microRNAs miR-146a and miR-16-5p as prognostic biomarkers in community-acquired pneumonia [J]. *PLoS One*, 2020, 15(10): e0240926.
- [16] 王宽锋, 钟红平, 王翠翠, 等. 婴幼儿呼吸道合胞病毒肺炎外周血单核细胞 miR-146 a 和 miR-155 的表达变化[J]. *河北医药*, 2019, 41(22): 3380-3384.
- [17] 席卓娜, 乔亚红, 程方圆. miR-146a 和 miR-155 与慢性阻塞性肺疾病炎症表型的相关性分析[J]. *临床肺科杂志*, 2020, 25(1): 78-81, 87.
- [18] 赵千文, 麦伟政, 黄燕灵, 等. VAP 病原菌与炎症反应监测的价值[J]. *中华医院感染学杂志*, 2019, 29(4): 512-515.

收稿日期: 2021-06-22