

Nghiên cứu các microRNA huyết tương với vai trò là dấu ấn sinh học tiềm năng trong chẩn đoán nhiễm khuẩn huyết

The research of plasma microRNAs as potential biomarkers in the diagnosis of sepsis

Trần Thị Liên, Ngô Tất Trung,
Vũ Viết Sáng, Lê Hữu Song

Bệnh viện Trung ương Quân đội 108

Tóm tắt

Mục tiêu: Xác định vai trò của 4 microRNA (microRNA-146-3p, microRNA-147b, microRNA-155 và microRNA-223) trong chẩn đoán nhiễm khuẩn huyết. **Đối tượng và phương pháp:** 71 bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết (NKH) điều trị tại Bệnh viện Việt Tiệp, Hải Phòng và Bệnh viện Trung ương Quân đội 108 trong thời gian 11/2014 đến tháng 7/2017; nhóm chứng gồm 31 bệnh nhân sốt xuất huyết Dengue (DHF) và 32 người khỏe mạnh. Mức độ biểu hiện tương đối trong huyết tương của 4 miRNA so với nội chuẩn microRNA-16 được đánh giá bằng phương pháp khuếch đại chuỗi gen định lượng theo thời gian thực realtime-qPCR. **Kết quả và kết luận:** Mức độ biểu hiện của microRNA-146-3p, microRNA-147b, microRNA-155 và microRNA-223 ở bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm người khỏe mạnh và nhóm bệnh nhân sốt xuất huyết Dengue ($p < 0,05$). MicroRNA-146-3p và microRNA-147b (AUC: 0,899) có khả năng phân biệt tốt giữa nhiễm khuẩn huyết và người khỏe mạnh và sốt xuất huyết Dengue với diện tích dưới đường cong lần lượt là 0,87 & 0,77 ($p < 0,01$) với microRNA-146-3p và 0,90 & 0,78 ($p < 0,01$) với microRNA-147b.

Từ khóa: Nhiễm khuẩn huyết, microRNA 146-3p, microRNA 147b, microRNA-155, microRNA 223.

Summary

Objective: To investigate the value of four circulating microRNAs (microRNA: microRNA-155, microRNA-147b, microRNA-223, microRNA-146-3p) in diagnosis of sepsis. **Subject and method:** 71 sepsis patients treated in Viet-Tiep Hospital, Hai Phong and 108 Military Central Hospital, Ha Noi from November, 2014 to July, 2017 there are 31 Dengue haemorrhagic fever (DHF) patients and 32 healthy control (HC) were included in the control group. The expression of microRNA-146-3p, microRNA-147b, microRNA-155, microRNA-223 were measured by q-RT-PCR. **Result and conclusion:** The expression of 4 microRNAs: MicroRNA-146-3p, microRNA-147b, microRNA-155, microRNA-223 in sepsis group was significantly higher than that in healthy control and DHF group ($p < 0.05$). MicroRNA-146-3p and microRNA-147b were good at discrimination sepsis and healthy people and DHF with AUC 0.87 & 0.77 ($p < 0.01$) and 0.90 & 0.78 ($p < 0.01$). Moreover, microRNA-146-3p (AUC: 0.77) and microRNA-147b (AUC: 0.78) were fair at discrimination sepsis and DHF.

Keywords: Sepsis, microRNA 146-3p, microRNA 147b, microRNA-155, microRNA 223.

Ngày nhận bài: 2/9/2020, ngày chấp nhận đăng: 10/9/2020

Người phản hồi: Trần Thị Liên, Email: ttlien@hpmu.edu.vn - Bệnh viện Trung ương Quân đội 108

1. Đặt vấn đề

Nhiễm khuẩn huyết (NKH) là nguyên nhân gây tử vong hàng đầu ở các đơn vị điều trị tích cực. Tỷ lệ tử vong tăng lên 7,9% với mỗi giờ điều trị muộn hoặc không phù hợp. Do vậy, chẩn đoán sớm nhiễm khuẩn huyết là vô cùng quan trọng trong công tác điều trị bệnh nhân. Hiện nay, cấy máu vẫn được coi là "tiêu chuẩn vàng" để chẩn đoán nhiễm khuẩn huyết, tuy nhiên, cấy máu cần thời gian từ 24 giờ đến 5 ngày và hay gặp kết quả âm tính giả [1], [2]. Để bổ sung cho cấy máu, các thông số khác như C-Reaction Protein (CRP) và Procalcitonin (PCT) được chỉ định cùng với cấy máu khi nghi ngờ bệnh nhân bị nhiễm khuẩn huyết, tuy nhiên, tính đặc hiệu và độ nhạy của các dấu ấn sinh học này vẫn còn nhiều hạn chế [2]. Các nghiên cứu gần đây đã gợi ý sử dụng các dấu ấn sinh học mới để bổ sung giá trị chẩn đoán và tiên lượng nhiễm khuẩn huyết, trong đó có micro ribonucleic acid (microRNA). MicroRNA là các ribonucleic acid (RNA) nhỏ, không mã hóa, có chiều dài từ 20 - 23 nucleotid có mặt trong huyết thanh hoặc huyết tương với nồng độ ổn định, có chức năng điều hòa mức độ biểu hiện gen và kiểm soát chức năng tế bào nội mô và các đường truyền tín hiệu viêm. Sự thay đổi mức độ biểu hiện của một số microRNA có thể được sử dụng làm chất đánh dấu sinh học cho các bệnh khác nhau, trong đó có nhiễm khuẩn huyết [3].

Nghiên cứu này được tiến hành nhằm mục tiêu: *Đánh giá sự thay đổi của mức độ biểu hiện tương đối của 4 microRNA: MicroRNA-146-3p, microRNA-147b, microRNA-155 và microRNA-223 so với microRNA-16 trong huyết tương bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết với vai trò như một dấu ấn sinh học tiềm năng trong chẩn đoán nhiễm khuẩn huyết.*

2. Đối tượng và phương pháp

2.1. Đối tượng

Nhóm bệnh gồm 71 bệnh nhân trên 18 tuổi, đủ tiêu chuẩn chẩn đoán nhiễm khuẩn huyết theo hướng dẫn của Sepsis-3 [4] điều trị tại Bệnh viện Việt Tiệp, Hải Phòng và Bệnh viện Trung ương Quân đội 108 từ tháng 11/2014 đến tháng 12/2017.

Tiêu chuẩn loại trừ: Bệnh nhân có số lượng bạch cầu đa nhân trung tính nhỏ hơn 0,5G/L, hoặc những bệnh nhân được truyền máu hoặc bù dịch với thể tích lớn trước khi lấy máu.

Nhóm chứng gồm: 32 người khỏe mạnh được sàng lọc từ những người hiến máu tình nguyện, không có tiền sử mắc bệnh mạn tính và không mắc bệnh nhiễm trùng cấp tính tại thời điểm lấy máu; và 31 bệnh nhân sốt xuất huyết Dengue (DHF) theo tiêu chuẩn chẩn đoán của Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) 2011.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu mô tả cắt ngang, tiến cứu theo dõi dọc trong thời gian bệnh nhân nằm viện, có đối chứng.

2.2.2. Nội dung nghiên cứu

Thu thập các thông tin về lâm sàng, cận lâm sàng theo mẫu bệnh án nghiên cứu.

Thu thập mẫu và định lượng 4 microRNA theo quy trình tại Khoa Sinh học phân tử, Bệnh viện Trung ương Quân đội 108. Mỗi bệnh nhân được lấy 2ml máu trong vòng 24 giờ kể từ khi được chẩn đoán NKH hoặc sốt xuất huyết Dengue, lưu trữ trong ống chứa chất chống đông EDTAK2, sau đó tách huyết tương, tách RNA tổng số, tổng hợp cDNA theo quy trình và định lượng 4 microRNA (microRNA-146-3p, microRNA-147b, microRNA-155 và microRNA-223) bằng phương pháp khuếch đại chuỗi gen định lượng theo thời gian thực (qRT-PCR) trên hệ thống máy Agilent, sử dụng Sybergreen làm chất đánh dấu, nội chuẩn là microRNA-16.

Phân tích kết quả: Mức độ biểu hiện tương đối của các microRNA so với nội chuẩn microRNA-16 được tính theo công thức:

$$\text{microRNA} = 2^{-\Delta\text{Ct}} (\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{microRNA thứ } i} - \text{Ct}_{\text{microRNA-16}})$$

2.3. Thống kê và xử lý số liệu

Số liệu được nhập và quản lý bằng phần mềm Microsoft office Excel 2007. Phần mềm SPSS 21.0 được sử dụng để xử lý số liệu và phân tích thống kê. Phân tích được chấp nhận có ý nghĩa thống kê khi giá trị $p < 0,05$.

3. Kết quả

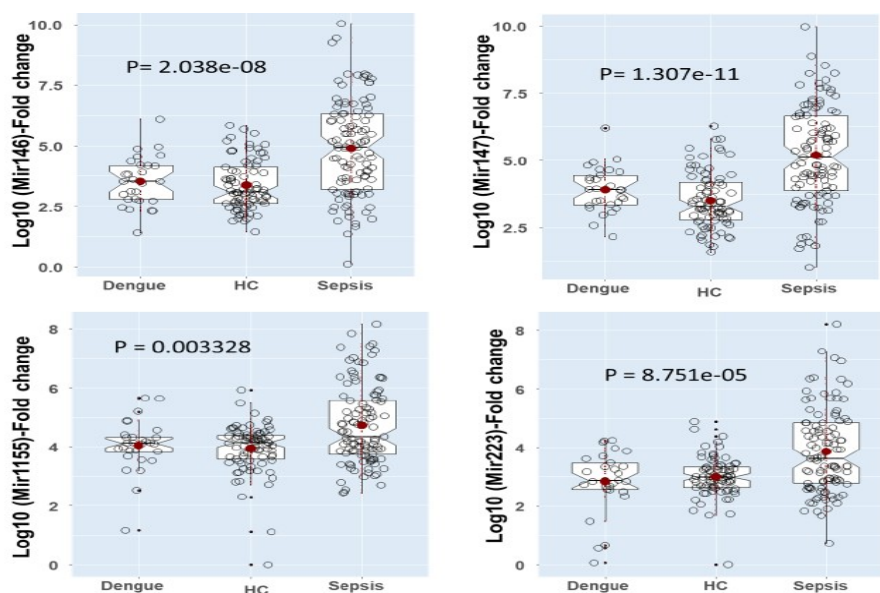
3.1. Đặc điểm chung của nhóm bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết

Bảng 1. Đặc điểm chung của bệnh nhân NKH

Đặc điểm	Số lượng (n)	Tỷ lệ %
Giới (nam)	55	77,50
Có bệnh mạn tính	59	83,10
Có đường vào của nhiễm khuẩn huyết	55	80,3
Có suy tạng	60	84,5
Sốc nhiễm khuẩn	33	46,5
Tử vong	31	43,6
Tuổi (trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn) (năm)	56,00 $\pm$ 17,63	
SOFA (điểm) (trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn)	5,81 $\pm$ 4,55	
Bạch cầu (4 - 10G/l) (trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn)	15,23 $\pm$ 9,79	
PCT (ng/ml) (trung vị, khoảng tứ phân vị)	11,5 (2,56 - 46,39)	
Lactate (mmol/l) (trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn)	4,69 $\pm$ 3,73	

Nhận xét: Tuổi trung bình của bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết là 56,00 $\pm$ 17,63 năm, giới nam chiếm 77,5%, có 83% bệnh nhân có mắc ít nhất một bệnh mạn tính, tỷ lệ có suy tạng ở nhóm nghiên cứu là 84,5% và 46,5% bệnh nhân có sốc nhiễm khuẩn. Tỷ lệ tử vong của bệnh nhân nghiên cứu là 43,6%. Các chỉ số xét nghiệm như bạch cầu, PCT, lactate đều tăng cao so với giá trị chuẩn.

3.2. Mức độ biểu hiện tương đối của 4 microRNA ở bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết và nhóm chứng



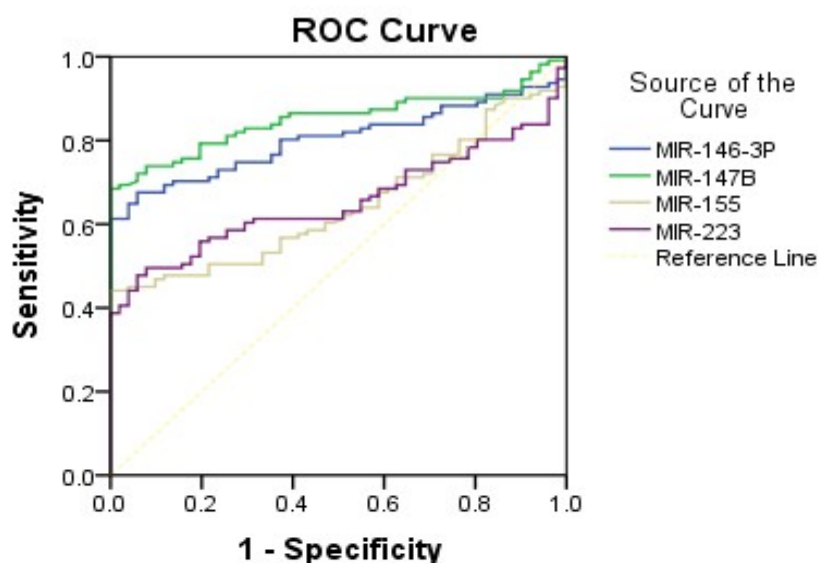
Biểu đồ 1. Mức độ biểu hiện tương đối của 4 microRNA ở bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết và nhóm chứng

Nhận xét: Mức độ biểu hiện của 4 microRNA ở nhóm nhiễm khuẩn huyết đều cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng là bệnh nhân sốt xuất huyết Dengue và người khỏe mạnh ($p < 0,001$).

3.3. Giá trị chẩn đoán phân biệt nhiễm khuẩn huyết với người khỏe mạnh

Bảng 3. Độ nhạy, độ đặc hiệu của 4 microRNA trong chẩn đoán nhiễm khuẩn huyết phân biệt từ người khỏe mạnh

MicroRNA	AUC	p	Điểm cắt	Độ nhạy	Độ đặc hiệu
MicroRNA-146-3p	0,870	0,001	0,002	0,732	1,000
MicroRNA-147b	0,899	0,001	0,1004	0,789	1,000
MicroRNA-155	0,696	0,001	0,0222	0,549	1,000
MicroRNA-223	0,733	0,001	0,0039	0,577	1,000



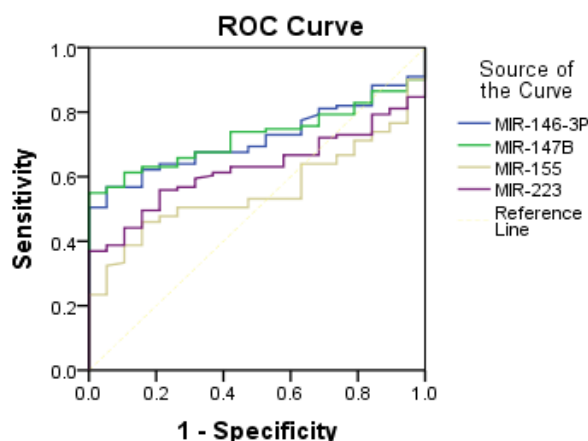
Biểu đồ 2. Mô hình chẩn đoán phân biệt NKH với người khỏe mạnh

Nhận xét: Tại điểm cắt 0,002 microRNA-146-3p có khả năng phân biệt nhiễm khuẩn huyết với người khỏe mạnh tốt nhất với diện tích dưới đường cong AUC 0,870, độ nhạy, độ đặc hiệu lần lượt là 73,2% và 100% ($p < 0,05$).

Tại điểm cắt 0,1, microRNA-147b có diện tích dưới đường cong AUC là 0,899 độ nhạy, độ đặc hiệu lần lượt là 78,9% và 100% ($p < 0,05$).

Bảng 4. Độ nhạy, độ đặc hiệu của 4 microRNA trong chẩn đoán phân biệt nhiễm khuẩn huyết với sốt xuất huyết Dengue

MicroRNA	AUC	p	Điểm cắt	Độ nhạy	Độ đặc hiệu
MicroRNA-146-3p	0,769	0,001	0,016	0,620	0,935
MicroRNA-147b	0,781	0,001	1,372	0,592	0,968
MicroRNA-155	0,704	0,001	0,0168	0,563	0,839
MicroRNA-223	0,733	0,001	0,012	0,521	0,903



Biểu đồ 3. Mô hình chẩn đoán phân biệt nhiễm khuẩn huyết với nhóm chứng là bệnh nhân sốt xuất huyết Dengue

Nhận xét: Cả 4 microRNA đều có khả năng phân biệt khá tốt nhiễm khuẩn huyết với sốt xuất huyết Dengue, trong đó tốt nhất là microRNA-147b (AUC: 0,781, Sp = 96,8%, Se = 59,2%), và microRNA-146-3p (AUC: 0,769, Sp = 62%, Se = 93,5%).

4. Bàn luận

Nhiễm khuẩn huyết là một bệnh lý nhiễm trùng đang ngày càng trở nên phổ biến, có tỷ lệ tử vong và để lại di chứng cao. Các nghiên cứu đều chứng minh rằng việc chẩn đoán và điều trị sớm sẽ giúp làm giảm đáng kể tỷ lệ tử vong cũng như làm giảm bớt chi phí điều trị cho bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết. Cùng với sự hiểu biết ngày càng rõ ràng về cơ chế bệnh sinh của nhiễm khuẩn huyết, các dấu ấn sinh học hỗ trợ chẩn đoán đã đang có nhiều bước tiến rõ rệt, đặc biệt là các dấu ấn ở cấp độ phân tử.

MicroRNA là các phân đoạn nhỏ, không mã hóa của RNA điều hòa sự biểu hiện gen và được biết là điều chỉnh chức năng tế bào nội mô và các đường truyền tín hiệu viêm. Mục tiêu phân tích dấu ấn sinh học trong suốt quá trình NKH là xác định nhiễm khuẩn, sự khác biệt giữa NKH và đáp ứng viêm hệ thống, và tiên lượng bệnh nhân NKH.

Trong nghiên cứu của chúng tôi mức độ biểu hiện tương đối của cả 4 microRNAs: MicroRNAs-146-3p, microRNA-147b, microRNA-155 và microRNA-223 ở nhóm bệnh nhân NKH cao hơn có ý nghĩa so với người khỏe mạnh và bệnh nhân sốt xuất huyết Dengue. Mức độ biểu hiện của cả 4 miR: MicroRNA-

146a, microRNA-147b, microRNA-155, microRNA-223 huyết tương khác nhau đáng kể giữa bệnh nhân sốt xuất huyết Dengue, bệnh nhân NKH với người khỏe mạnh. Điều này cho thấy cả 4 microRNA này microRNA-146 có thể phân biệt NKH với sốt xuất huyết Dengue. Mức độ biểu hiện của 4 microRNA ở nhóm người khỏe mạnh và sốt xuất huyết Dengue không có sự khác biệt nhưng lại tăng cao rõ rệt ở bệnh nhân NKH, điều này gợi ý rằng các microRNA này có thể là dấu ấn sinh học giúp chẩn đoán NKH, bởi vì mức độ biểu hiện của nó chỉ tăng ở những bệnh nhân NKH nhưng không tăng ở bệnh nhân sốt xuất huyết Dengue. Kết quả này tương tự với nghiên cứu của Hui-juan Wang, Peng-Jun Zhang, nồng độ miR-223 ở bệnh nhân nhiễm trùng huyết tăng so với nhóm chứng là người bình thường và bệnh nhân có hội chứng đáp ứng viêm hệ thống [5].

Phân tích đường cong ROC cho thấy microRNA-147b có diện tích dưới đường cong lớn nhất, tiếp theo là microRNA-146-3p, microRNA-155 và microRNA-223. Điểm cắt của microRNA cũng đã được nghiên cứu. Tại điểm cắt được xác định (Hình 1), microRNA-147b, microRNA-146-3p có cả giá trị độ đặc hiệu và độ nhạy cao hơn so với 2 microRNA còn lại. Do đó, microRNA-147b và microRNA-146-3p có thể là dấu ấn sinh học có giá trị tốt trong chẩn đoán NKH, bởi vì nó có thể phân biệt NKH với hội chứng đáp ứng viêm hệ thống rõ ràng hơn. Nhiễm khuẩn huyết là một tình trạng bệnh lý có bản chất là mất cân bằng đáp ứng miễn dịch của cơ thể vật chủ đối với vi khuẩn gây bệnh. Các nghiên cứu đã chứng

minh sự có mặt của microRNA trong các giai đoạn của phản ứng viêm cũng như trong rối loạn chức năng các cơ quan. MicroRNA-146-3p có vai trò ức chế các thành phần tín hiệu của TLR (TRAF-6, IRAK-1) trong hoạt hóa đáp ứng viêm sớm, dẫn đến mất cân bằng phản ứng viêm- một cơ chế quan trọng trong nhiễm khuẩn huyết. MicroRNA-147b và microRNA-155 đều tham gia vào quá trình đáp ứng viêm muộn theo hai cơ chế khác nhau: MicroRNA-147b thông qua ức chế sản phẩm của các cytokine còn microRNA-155 lại ức chế PDCD4 và hoạt hóa Interleukine-10. MicroRNA-223 cho thấy vai trò quan trọng trong điều hòa phản ứng miễn dịch thông qua điều chỉnh toàn bộ sự thay đổi của các gen có vai trò tốt trong việc điều hòa phản ứng miễn dịch, theo đó, chuột đột biến tăng biểu hiện microRNA-223 làm tăng đáp ứng miễn dịch đối với lipopolysaccharid của các tác nhân gây bệnh như *Candida albicans* làm tăng hủy hoại mô [6]. Nghiên cứu trên 166 bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết cho thấy mức độ biểu hiện của microRNA-223 trong huyết thanh những bệnh nhân này cao hơn ở nhóm chứng là người khỏe mạnh và đáng chú ý là, cũng trong nghiên cứu này, mức độ microRNA-223 tăng cao liên quan đến mức độ nghiêm trọng của nhiễm khuẩn huyết [7]. Một nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng microRNA-223 có thể được sử dụng để phân biệt bệnh nhân NKH với bệnh nhân có hội chứng đáp ứng viêm toàn thân [8]. Kết quả này cũng tương đối phù hợp với nghiên cứu của chúng tôi, mức độ biểu hiện của microRNA-223 ở bệnh nhân NKH cao hơn so với nhóm chứng người khỏe mạnh và bệnh nhân có hội chứng đáp ứng viêm toàn thân. MicroRNA-147b, được tạo ra trong các đại thực bào hoạt hóa nhiều TLR và đóng vai trò kiểm soát phản hồi âm tính của các tín hiệu liên quan đến TLR. MicroRNA-147b có thể hoạt động như một chất kiểm soát phản ứng chống viêm làm giảm phản ứng viêm của các đại thực bào thông qua kích hoạt TLR-2, TLR-3 hoặc TLR-4. Do đó, sự thay đổi mức độ biểu hiện của microRNA-146-3p và microRNA-147b ở hệ tuần hoàn đóng vai trò như một dấu ấn sinh học có giá trị trong chẩn đoán nhiễm khuẩn huyết.

5. Kết luận

Mức độ biểu hiện tương đối của 4 microRNA (microRNA 146-3p, microRNA 147b, microRNA-155 và microRNA 223) so với nội chuẩn microRNA-16

trong huyết tương bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết cao hơn có ý nghĩa so nhóm chứng gồm người khỏe mạnh và bệnh nhân sốt xuất huyết Dengue. Cả 4 microRNA này có thể là những dấu ấn sinh học tiềm năng trong chẩn đoán nhiễm khuẩn huyết, đặc biệt là microRNA-147b với độ đặc hiệu và độ nhạy lần lượt là 100% và 78,95% (khi phân biệt với người khỏe mạnh) và 96,8% và 59,2% (khi phân biệt với bệnh nhân sốt xuất huyết Dengue).

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 108.06-2017.21 (Chủ nhiệm đề tài PGS. TS. Lê Hữu Song).

Tài liệu tham khảo

1. Vincent JL, Schmit DK (2011) *Biomarkers in the critically ill patient: C-reactive protein*. Crit Care Clin 27(2): 10.
2. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A et al (2013) *Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012*. Crit Care Med 41(2): 580-637.
3. Kingsley SMK and Bhat BV (2017) *Role of microRNAs in sepsis*. Inflamm Res 66(7): 553-569.
4. Singer M et al (2016) *The Third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3)*. Jama 315(8): 801-10.
5. Wang HJ et al (2012) *Four serum microRNAs identified as diagnostic biomarkers of sepsis*. J Trauma Acute Care Surg 73(4): 850-854.
6. Schwarzenbach H et al (2014) *Clinical relevance of circulating cell-free microRNAs in cancer*. Nat Rev Clin Oncol 11(3): 145-156.
7. Wang JF (2010) *Serum miR-146a and miR-223 as potential new biomarkers for sepsis*. Biochemical and Biophysical Research Communications: 394.
8. Quinn EM et al (2013) *MicroRNA-146a is upregulated by and negatively regulates TLR2 signaling*. PLoS One 8(4): 62232.
9. Liu G et al (2009) *miR-147, a microRNA that is induced upon Toll-like receptor stimulation, regulates murine macrophage inflammatory*

responses. Proc Natl Acad Sci USA 106(37): 15819-15824.