

儿童支气管哮喘患者血浆中 miRNA-125b 及 miRNA-133b 的表达及临床意义*

李 勇¹, 高春彪², 盛伟武¹, 管华玲³ (1. 高邮市中医医院检验科, 江苏高邮 225600;
2. 常州市儿童医院检验科, 江苏常州 213000; 3. 盐城市第一人民医院检验科, 江苏盐城, 224005)

摘要:目的 探讨 miRNA-125b 和 miRNA-133b 在支气管哮喘患儿中表达水平及其辅助诊断价值。方法 纳入 2016 年 1 月~11 月常州市儿童医院、高邮市中医医院 30 例哮喘患儿, 分别收集其急性发作期和稳定期血液标本(AP 组, SP 组)。同期匹配 30 例变应性鼻炎患儿(AR 组)及 30 例健康儿童为对照(NC 组)。应用实时荧光定量 PCR 检测 miRNA 在各组中的表达水平并相互比较。应用 ROC 曲线及 AUC(95%CI)评估其作为哮喘诊断指标的效能。结果 miRNA-125b 在 AP 组及 SP 组中的表达量较 AR 组升高, 差异有统计学意义($t=3.913, 3.120, P$ 值均 <0.01)。miRNA-133b 在 AP 组及 AR 组中的表达量较高, 与 NC 组相比差异有统计学意义($t=4.426, 4.720, P$ 值均 <0.01)。miRNA-125b 在哮喘诊断中最佳临界值为 1.998, 敏感度为 64.52%, 特异度为 92.67%, AUC 为 0.798 9, 95%CI 为 0.711 1~0.886 4; miRNA-133b 在哮喘急性期及变应性鼻炎等气道炎症性疾病发作期中诊断最佳临界值为 1.667, 敏感度为 58.06%, 特异度为 86.67%, AUC 为 0.727 4, 95%CI 为 0.586 5~0.863 0。结论 哮喘患儿中 miRNA-125b 表达量较 NC 组及 AR 组升高, miRNA-125b 可作为哮喘辅助诊断指标, miRNA-133b 可用于气道炎症性疾病发作期的辅助诊断。

关键词: 支气管哮喘; miRNA-125b; miRNA-133b

中图分类号: R725.7; R392.11 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2017)03-059-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2017.03.016

Expression and Its Significance of microRNA-125b and microRNA-133b in Plasma in Children with Asthma

LI Yong¹, GAO Chun-biao², SHENG Wei-wu¹, GUAN Hua-ling³

(1. Department of Clinical Laboratory, Gaoyou Hosiptal of Traditional Chinese Medicine, Jiangsu Gaoyou 225600, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Children's Hospital of Changzhou, Jiangsu Changzhou 213000, China; 3. Department of Clinical Laboratory, the First People's Hospital of Yancheng, Jiangsu Yancheng 224005, China)

Abstract: **Objective** To explore the diagnostic value of the quantitative detection of plasma miRNA-125b and miRNA-133b in children with asthma. **Methods** Thirty asthmatic patients were enrolled in this study and collected the blood specimens during acute phase and stable phase respectively (AP group and SP group). Thirty allergic rhinitis children (AR group) and thirty healthy children were recruited to the control group (NC group). The levels of miRNA in different groups were detected by qRT-PCR. The performance of miRNA-125b and miRNA-133b were evaluated by receiver operating characteristic curves (ROC) and the area under the curve (AUC) (95%CI). **Results** The relative expression of miRNA-125b in AP group and SP group were significantly higher than AR group ($t=3.913, 3.120, P<0.01$), miRNA-133b. In AP group and AR group the expression of miRNA-133b were significantly higher than control group ($t=4.426, 4.720, P<0.01$). The detection of miRNA-125b yielded an area under the curve of ROC of 0.7989, (95%CI: 0.7111~0.8864) in discriminating asthmatic patients from healthy group. And the miRNA-133b was 0.7274 (95%CI: 0.5865~0.8630) in discriminating asthmatic patients during the acute phase from healthy group. **Conclusion** The relative expression of miRNA-125b in children with asthma was significantly higher than that in AR group and NC group, miRNA-125b may prove to be a non-invasive biomarker for the auxiliary diagnosis of asthma especially when the relative expression up to 1.998.

Keywords: asthma; miRNA-125b; miRNA-133b

支气管哮喘是以气道持续慢性炎症及气道高反应性为其特征的一种异质性疾病。根据 2013 年我国进行的城市儿童哮喘流行病学调查, 目前国内儿童哮喘患病率已高达 3.02%^[1]。儿童哮喘如不

及时治疗, 可能导致患儿肺功能下降, 活动耐量降低, 严重影响生活质量^[2]。目前除了不断完善支气管哮喘患儿的规范化治疗, 寻找能早期诊断支气管哮喘的指标也成了研究热点, 被认为是有效控制儿

* 作者简介: 李 勇(1973—), 男, 大学本科, 学士, 副主任技师, 主要从事临床检验与研究, E-mail: 59979133@qq.com。

高春彪(1971—), 男, 大学本科, 学士, 副主任技师, 主要从事临床免疫学检验与研究, E-mail: gcb2007@sina.com, 共同第一作者。

通讯作者: 盛伟武(1962—), 男, 大学本科, 副主任检验师, 主要从事临床检验与研究, E-mail: gysww@163.com。

管华玲(1974—), 女, 学士, 副主任检验师, 主要从事临床生化检验与研究, E-mail: Guanhualinggy@126.com, 共同通讯作者。

童哮喘症状,减少发作次数,维持患儿正常生活的关键。近年来 MicroRNA (miRNA)在呼吸系统疾病诊断、治疗中的作用已日益受到关注^[3]。大量研究表明,miRNA 在调节机体免疫功能、介导炎症信号转导通路及重塑哮喘患儿气道等过程中起着重要的作用^[4,5]。本研究通过检测支气管哮喘患儿急性发作期及稳定期血浆中 miRNA-125b,miRNA-133b 表达量,并与变应性鼻炎患儿及正常儿童血浆 miRNA 的表达量相比较,探讨这两种 miRNA 作为支气管哮喘诊断标志物的潜在价值。

1 材料和方法

1.1 研究对象

1.1.1 实验组:纳入了常州市儿童医院、高邮市中医医院 2016 年 1 月~11 月支气管哮喘患儿 30 例,男性 17 例,女性 13 例,平均年龄 4 个月~7 岁,收集其急性发作期(AP 组)及稳定期(SP 组)血浆标本,同时收集变应性鼻炎(AR 组)患儿 30 例,男性 15 例,女性 15 例,平均年龄 8 个月~6 岁,三组患儿年龄及性别差异无统计学意义。哮喘患儿纳入标准:符合我国 2016 年修订的“儿童支气管哮喘诊断与防治指南”中的诊断标准^[6]。本研究在获得医院伦理委员会审核批准后进行。研究前所有患儿家长均签署知情同意书。

1.1.2 正常对照组(NC 组):选择常州市儿童医院、高邮市中医医院 2016 年 1 月~11 月健康儿童血浆 30 例,男女比例大约 1.5:1,平均年龄 3 个

月~7 岁。

1.2 试剂和仪器 核酸蛋白紫外测定仪(德国 Implen 公司);紫外分光光度计(美国 Beckman-Coulter 公司);荧光定量 PCR 仪(瑞士 Roche 公司 Cobas z480);Trizol(中国百奥迈科生物技术有限公司);Primer Premier 5 软件设计、吉凯基因合成的 U6,miRNA 的 PCR 引物;逆转录试剂盒(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 标本的收集及血浆总 RNA 的提取:真空 EDTA 抗凝管收集所有纳入儿童静脉全血标本,收集后 10 min 内 3 000 r/min,4℃ 离心 20 min,吸上层血浆装于无酶的离心管中,-40℃ 冻存待用。根据 RNA 提取试剂盒说明按规定步骤提取血浆总 RNA,即刻逆转录成 cDNA 用于扩增。

1.3.2 血浆中 miRNA-125b,miRNA-133b 表达量的检测:本研究中内参选用了 U6,所需引物序列均使用 Primer Premier 6.0 设计,并由博德基因合成,见表 1。根据逆转录试剂盒说明书步骤将血浆总 mRNA 逆转录成 cDNA,随后经过 35 个循环扩增根据 Ct 值分析出 miRNA 相对表达量,绘制熔解曲线,根据熔解曲线判断 PCR 产物的特异性。使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各组 miRNA-125b,miRNA-133b 的相对表达量。

1.4 统计学分析 本研究应用 SPSS 22.0 统计软

表 1

qRT-PCR 引物序列

引物	Upper primers(5'-3')	Down primers(5'-3')
U6	CTCGCTTCGGCAGCACA	APCGCTTCACGAPTTTTCGT
miRNA-125b	UCCUGAGACCCUAPCUUGUGA	ACAPGUUAGGGUCUCAGGGAU
miRNA-133b	UUUGGUCCCUUCAPCCAGCUA	GCUGGUUGAPGGGGACCAU

件进行统计学分析。实验中所有计量资料均使用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)来表示。qRT-PCR 过程中所有样本统一重复三个复孔,Ct 值标准差均需<0.5。不同组间比较采用独立样本 t 检验。应用 ROC 曲线及曲线下面积(AUC)(95%CI)评估其

作为诊断指标的效能, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miRNA-125b,miRNA-133b 在 NC 组,AP 组,SP 组及 AR 组中的表达水平 见表 2。

表 2

miRNA-125b,miRNA-133b 在四组中的表达水平($\bar{x} \pm s$)

组别	miRNA-125b	t	P	miRNA-133b	t	P
NC 组	1.167 9±0.058 4			1.123 2±0.056 2		
AP 组	3.157 2±0.157 9*	5.473	<0.01	2.333 9±0.116 6*	4.426	<0.01
SP 组	2.667 9±0.133 4*	5.888	<0.01	1.133 5±0.056 7		
AR 组	2.132 2±0.106 6*	4.913	<0.01	2.059 8±0.109 9*	4.720	<0.01

注:*与对照组比较。

AP 组,SP 组及 AR 组中 miRNA-125b 的表

达量均较 NC 组升高,差异有统计学意义($t=$

5.473, $P < 0.01$; $t = 5.888$, $P < 0.01$; $t = 4.913$, $P < 0.01$ 。AP组, SP组患者血浆中 miRNA-125b 的相对表达量较 AR组患儿升高, 差异有统计学意义 ($t = 3.913$, $P < 0.01$; $t = 3.120$, $P < 0.01$)。AP组及 AR组中 miRNA-133b 的表达量较 NC组升高, 差异有统计学意义 ($t = 4.426$, $P < 0.01$; $t = 4.720$, $P < 0.01$)。

2.2 ROC 曲线分析 将哮喘组与对照组患儿血浆 miRNA-125b 相对表达量; AP组, AR组患儿与对照组患儿血浆 miRNA-133b 相对表达量分别作 ROC 曲线, miRNA-125b 的最佳临界值为 1.998, 其敏感度为 64.52%, 特异度为 92.67%, 其 AUC 为 0.798 9, 95%CI 为 0.711 1~0.886 4; miRNA-133b 的最佳临界值为 1.667, 其敏感度为 58.06%, 特异度为 86.67%, 其 AUC 为 0.727 4, 95%CI 为 0.586 5~0.863 0。见图 1。

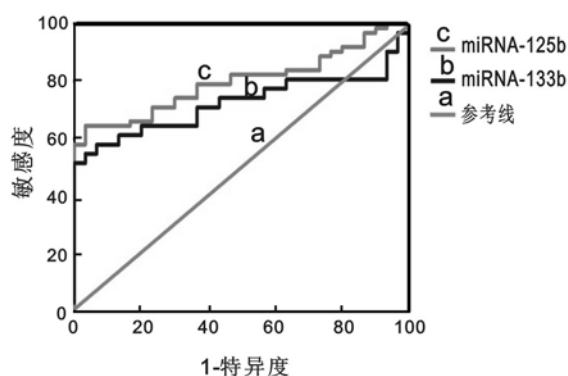


图1 miRNA-125b, miRNA-133b 在哮喘患儿中 ROC 曲线分析

3 讨论 儿童哮喘是以多种炎症介质或细胞因子参与的气道高反应性慢性炎症性疾病, 是儿童时期反复发作性喘息、呼吸困难、咳嗽的主要原因之一。根据最近一次全国儿童哮喘流行病学统计分析, 我国儿童哮喘患病率正以每 10 年增加 50% 的幅度不断上升^[1]。目前国内常用的儿童哮喘诊断方法由于技术和设备要求较高或者患儿配合度较差, 不能广泛应用。由于诊断技术的限制, 大多数患儿哮喘并未得到规范的治疗, 哮喘反复急性发作是儿童哮喘控制不佳的主要表现, 也是导致气道重构、肺功能下降的最主要原因^[7], 为哮喘患儿家庭及社会带来了沉重的负担。因此寻找出可以广泛适用于儿童哮喘诊断的标准是目前急需解决的难题, 也是目前国内外研究的热点问题之一。

Micro RNA (miRNA) 是一类长度约为 21~25 个核苷酸的内源性小分子非编码单链 RNA, 它通过与特定的 mRNA 结合或者通过靶向调节 mRNA 蛋白翻译过程来调控基因的表达, 具有细胞、组织特异性, 参与了各个系统疾病的发生、发展

过程。此外 miRNA 具有较高的保守性, 因此能在血浆中稳定表达并被检测到, 与 mRNA 相比其更加稳定、准确, 是当前多种疾病诊断的热点研究方向。近年来 miRNA 在哮喘发病、治疗及诊断过程中的作用也日益受到关注, 比如通过检测哮喘患者血液中 miRNA 后发现, miRNA-1260a, miRNA-486, miRNA-125b, miRNA-16, miRNA-299-5p, miRNA-126, miRNA-206 和 miRNA-133b 在哮喘患者中的表达量较正常对照组明显升高, 差异有统计学意义^[8,9], 这预示着 miRNA 可能与哮喘发病过程有着密切联系。在上述筛选出的 miRNA 中, 我们选取了 miRNA-125b 及 miRNA-133b 作为研究指标, 进一步评估其在哮喘诊断中的效能。我们发现 miRNA-125b 无论是在哮喘患儿急性发作期还是稳定期表达均高于健康对照组 ($P < 0.05$), 并且其与变应性鼻炎患儿血浆 miRNA-125b 的差异有统计学意义; miRNA-133b 可用于气道炎症性疾病急性发作时期的辅助诊断。本研究中通过 ROC 曲线分析得出两种 miRNA 诊断的最佳临界值, 为设定这两个 miRNA 的参考范围提供了参考。

儿童支气管哮喘的本质是多种炎症细胞参与调节的气道炎症反应, 其中以嗜酸性粒细胞 (Eos) 为主^[10]。Eos 能分泌多种具有组织损伤性的蛋白颗粒, 引起炎症反应, 其在气道的聚集和浸润是导致气道结构改变的主要因素之一, 也是反映全身免疫状态的重要监测指标^[11]。近年关于 Eos 凋亡对哮喘影响的探索越来越多, 孟鲁司特、糖皮质激素等均证实可以有效增加 Eos 的凋亡从而缓解气道炎症反应, 控制哮喘症状^[12]。人体抑癌基因 p53 参与了 Eos 的凋亡过程, 研究表明 miRNA-125b 可以通过与 p53 3' 端非编码区特异性结合, 抑制 p53 mRNA 的表达从而负向调控 p53, 抑制凋亡发生^[13]。因此, 我们认为在哮喘急性发作期 miRNA-125b 表达的升高可以抑制 p53 基因的表达, 从而减少 Eos 的凋亡, 促进了哮喘患儿的气道炎症反应。本研究中证实的 miRNA-125b 在哮喘患儿血浆中表达升高与上述理论一致。

miRNA-133b 是 miRNA-133 家族中的一种。多项研究表明, miRNA-133b 可以通过抑制 BCL-W 基因的表达诱导细胞的凋亡^[14]。BCL-W 是 Bcl-2 蛋白家族成员之一, 是一种抗凋亡基因。在支气管哮喘患者外周血中 Bcl-2 基因表达较对照组明显增多, 揭示其可能在哮喘发生、发展中起着重要的作用^[15]。本研究发现 miRNA-133b 在哮喘急性期及变应性鼻炎中表达明显上升, 而在哮喘稳定期, 其表达与对照组并无明显差异, 因此我们猜测 miRNA-133b 在气道炎症性疾病的急性发作期

可以通过抑制 BCL-W 基因的表达促进炎症细胞的凋亡、缓解哮喘发作,在哮喘发病过程中起着重要的保护作用。

随着研究的不断深入 miRNA 在儿童支气管哮喘中的诊断价值会不断提高,与其他检测方法相比较,miRNA 的检测简单、快捷,且成本较低,其在血液中稳定表达更有利于提高检测的敏感度。因此 miRNA 在儿童支气管哮喘诊断中具有广阔的应用前景,其有望成为哮喘的重要辅助诊断指标。

参考文献:

- [1] 全国儿科哮喘协作组,中国环境与健康相关产品安全所,中国疾病预防控制中心.第三次中国城市儿童哮喘流行病学调查[J].中华儿科杂志,2013,51(10):729-736.
The National Cooperative Group on Childhood Asthma, Institute of Environmental Health and Related Product, safety, Chinese Center for Disease Control and Prevention. Third nationwide survey of childhood asthma in urban areas of China[J]. Chinese Journal of Pediatrics, 2013, 51(10): 729-736.
- [2] 赵秋剑,王登峰.支气管哮喘患者变应原检测及免疫分子研究[J].现代检验医学杂志,2014,29(6):96-98.
Zhao QJ, Wang DF. Study on allergen detection and immune molecules in the patients with bronchial asthma[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2014, 29(6): 96-98.
- [3] 姜波,王玉明,段勇. MicroRNA 的研究进展及其与肺癌的关系[J].现代检验医学杂志,2012,27(1):5-9.
Jiang B, Wang YM, Duan Y. Research progress of microRNA and its relationship with lung cancer[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2012, 27(1): 5-9.
- [4] Dissanayake E, Inoue Y. MicroRNAs in allergic disease[J]. Curr Allergy Asthma Rep, 2016, 16(9): 67.
- [5] Rutledge H, Baran-Gale J, de Villena FP, et al. Identification of microRNAs associated with allergic airway disease using a genetically diverse mouse population[J]. BMC Genomics, 2015, 16(1): 633.
- [6] 中华医学会儿科学分会呼吸学组,中华儿科杂志编委会.儿童支气管哮喘诊断与防治指南(2016年版)[J].中华儿科杂志,2016,54(3):167-181.
The Subspecialty Group of Pediatrics Respiratory Diseases, Chinese Journal of Pediatrics Editorial Committee. Guidelines on the diagnosis and management of Bronchial asthma in children[J]. Chinese Journal of Pediatrics, 2016, 54(3): 167-181.
- [7] Shani Z, Scott RG, Schofield LS, et al. Effect of a home intervention program on pediatric asthma in an environmental justice community[J]. Health Promotion Practice, 2015, 16(2): 291-298.
- [8] Wang Y, Yang L, Li P, et al. Circulating microRNA signatures associated with childhood asthma[J]. Clinical Laboratory, 2015, 61(5/6): 467-474.
- [9] Panganiban RP, Wang Y, Howrylak J, et al. Circulating microRNAs as biomarkers in patients with allergic rhinitis and asthma[J]. J Allergy Clin Immunol, 2016, 137(5): 1423-1432.
- [10] 尹静波,黄永富.炎症细胞因子在支气管哮喘发病机制中的作用[J].国际检验医学杂志,2011,26(4):1087-1089.
Yi JB, Huang YF. The role of inflammatory cytokines in the pathogenesis of bronchial asthma[J]. International Journal of Laboratory Medicine, 2011, 26(4): 1087-1089.
- [11] 黄永富,杭杲.免疫细胞在支气管哮喘发病机制中的作用[J].现代检验医学杂志,2011,26(4):154-159.
Huang YF, Huang G. Role of immunocells in the pathogenesis of bronchial asthma[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2011, 26(4): 154-159.
- [12] 郝敏,林江涛.糖皮质激素抵抗性支气管哮喘诊治进展[J].中华结核和呼吸杂志,2014,37(4):296-298.
Hao M, Lin JT. The progress of diagnosis and treatment of glucocorticoid resistance in bronchial asthma[J]. Chinese Journal of Tuberculosis and Respiratory Diseases, 2014, 37(4): 296-298.
- [13] Chen JJ, Liu SX, Chen MZ, et al. Has miR 125a and 125b are induced by treatment with cisplatin in nasopharyngeal carcinoma and inhibit apoptosis in a p53 dependent manner by targeting p53 mRNA[J]. Molecular Medicine Reports, 2015, 12(3): 3569-3674.
- [14] 姚云峰,王俊,王宝成. miR-133b 与肿瘤的关系及其作用机制[J].中国肿瘤生物治疗杂志,2015,22(6):811-814.
Yao YF, Wang J, Wang BC. The relationship between miR-133b and the progression of tumors and its mechanism[J]. Chin J Cancer Biother, 2015, 22(6): 811-814.
- [15] Xu W, Guo G, Li J, et al. Activation of Bcl-2-Caspase-9 apoptosis pathway in the testis of asthmatic mice[J]. PLoS One, 2016, 11(3): e0149353.
收稿日期:2017-01-18
修回日期:2017-03-08

(上接 58 页)

- [9] Kolostova K, Pinkas M, Jakabova A, et al. Molecular characterization of circulating tumor cells in ovarian cancer[J]. Am J Cancer Res, 2016, 6(5): 973-980.
- [10] Pearl ML, Zhao Q, Yang J, et al. Prognostic analysis of invasive circulating tumor cells (iCTCs) in epithelial ovarian cancer[J]. Gynecol Oncol, 2014, 134(3): 581-590.
- [11] Mego M, Gao H, Cohen EN, et al. Circulating tumor cells (CTC) are associated with defects in adaptive immunity in patients with inflammatory breast cancer[J]. J Cancer, 2016, 7(9): 1095-1104.
收稿日期:2016-07-26
修回日期:2017-03-20