

热适应/热射病大鼠血清中 microRNA let-7b 的变化及意义*

李腾达¹, 谷明莉¹, 邓顺江¹, 孙懿¹, 张薇薇¹, 郭杰¹, 刘云¹, 黄元兰², 钱璋³, 邓安梅¹

(1. 第二军医大学长海医院, 上海 200433;

2. 解放军 455 医院, 上海 200052; 3. 解放军 100 医院, 江苏苏州 215007)

摘要:目的 探究热适应/热射病大鼠模型血清中 microRNA let-7b 表达的变化及其与 HSP70, IL-6, TNF- α , TGF- β 和 IL-12 的相关性, 分析其临床意义。方法 在第二军医大学实验动物中心选取肛温、体重、周龄基本一致的雄鼠 60 只随机均分为对照组、热适应组、热射病组, 于仿真热气候动物舱中建立热适应/热射病大鼠模型后采集心尖血并分离血清。以实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 法检测血清中 microRNA let-7b, 以酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测血清中 HSP70, IL-6, TNF- α , TGF- β 和 IL-12 的蛋白水平。三组间计量资料的比较采用 Kruskal-Wallis H 检验, 以 Spearman 秩相关系数表示热射病组两变量之间的相关性。结果 miRNA let-7b 在对照组、热适应组、热射病组的 M 分别为 0.99, 1.04 和 1.93, Q 分别为 0.30, 0.25 和 0.44, 差异具有统计学意义 ($\chi^2 = 38.95, P < 0.001$), 组间两两比较结果显示 let-7b 在对照组与热适应组表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 在对照组与热射病组、热适应组与热射病组表达差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); Spearman 相关性分析显示热射病组 let-7b 与 HSP70, TNF- α 和 IL-6 呈正相关, 差异具有统计学意义 ($r_s = 0.579, 0.498$ 和 $0.609, P < 0.05$)。结论 miRNA let-7b 可能参与了热射病病理过程, 为临床监测高温湿环境下患者的状态提供了潜在的评价指标。

关键词: microRNA let-7b; 热射病; 热适应; 热休克蛋白; 肿瘤坏死因子- α

中图分类号: R-332 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-7414(2017)02-019-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2017.02.005

Change of MicroRNA let-7b in Serum of Rats with Heat Acclimatization/Heat Stroke and Its Significance

LI Teng-da¹, GU Ming-li¹, DENG Shun-jiang¹, SUN Yi¹,

ZHANG Wei-wei¹, GUO Jie¹, LIU Yun¹, HUANG Yuan-lan², QIAN Cheng³, DENG An-mei¹

(1. Changhai Hospital Affiliated to Second Military Medical University, Shanghai 200433, China;

2. No. 455 Hospital of PLA, Shanghai 200052, China;

3. No. 100 Hospital of PLA, Jiangsu Suzhou 215007, China)

Abstract: Objective To explore the change of microRNA let-7b in heat acclimatization/heat stroke rat models and its relation with HSP70, IL-6, TNF- α , TGF- β and IL-12, and analyze its clinical significance. **Methods** 60 male rats with almost the same anal temperature, weight, and weeks' age were selected from Laboratory Animal Center in the Second Military Medical University. They were randomly divided into control, heat acclimatization, heat stroke groups averagely. Heat acclimatization/heat stroke rat models were built in hot climate simulated animal tank, blood was collected from cordis apex and serum was separated. Real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to test microRNA let-7b in serum, enzyme-linked immunosorbent reaction (ELISA) was to measure the protein level of HSP70, IL-6, TNF- α , TGF- β and IL-12 in serum. Kruskal-Wallis H test was used to analyze quantitative data in the three groups, Spearman rank correlation coefficient was used to reveal relation between two variables in heat stroke group. **Results** M values of miRNA let-7b in control, heat acclimatization, heat stroke groups were 0.99, 1.04 and 1.93 separately, Q values were 0.30, 0.25 and 0.44 ($\chi^2 = 38.95, P < 0.001$), separately, with statistical significance. The results of pairwise comparison showed no statistical difference in control and heat acclimatization ($P > 0.05$), but there were differences in control and heat stroke, heat acclimatization and heat stroke groups statistically ($P < 0.05$). Spearman correlation analysis showed that in heat stroke group, let-7b was positively related with HSP70, TNF- α and IL-6 ($r_s = 0.579, 0.498$ and $0.609, P < 0.05$) with statistical significance. **Conclu-**

* 基金项目: 973 计划(2013CB531606), 国家自然科学基金(81471605, 81401358, 81501397, 31500721, 81501398, 81302579, 81273282, 81202353), 上海申康基金(SHDC22014014), 上海教育科学基金(D14017), 军队科研基金(BWS14J023, 12MA056, 15ZD009, 15XD007), 美捷登基金(MJR20150019)。

作者简介: 李腾达(1990—), 女, 在读硕士研究生, 主要从事感染免疫研究, Tel: 18302192042, E-mail: tengdali@smmu.edu.cn。

谷明莉(1983—), 女, 检验技师, 主要从事临床检验诊断工作, E-mail: mingligu@126.com, 共同第一作者。

通讯作者: 邓安梅, 女, 教授, E-mail: amdeng70@163.com。

钱璋, 女, 主治医师, E-mail: qiancheng824@126.com, 共同通讯作者。

Conclusion miR let-7b might involve in the pathology of heat stroke, it provided a potential biomarker for monitoring patients in high temperature and humidity clinically.

Keywords: microRNA let-7b; heat stroke; heat acclimatization; HSP70; TNF- α

热适应(heat acclimatization, HA)是机体对热环境的一种适应性反应,表现为热调节能力的增强^[1]。热射病(heat stroke, HS)即重症中暑、热损伤,是一种由于体内热量过度积蓄导致体温调节功能受损的一种疾病,常发生于高温高湿环境中,病死率高,分为劳力性与非劳力性热射病,前者由内源性产热过多引起,后者由体温调节功能障碍引起^[2]。在热压力条件下,机体内 DNA 转录、蛋白表达状况发生一系列变化^[3]。近来随着对热射病的深入研究, microRNAs 在该病中的作用亦备受关注^[4]。

microRNAs(miR)是一种长 18~25 nts 的非编码 RNA,可结合于 mRNA 的 3'端非编码区,致 mRNA 降解或蛋白转录的抑制,是损伤修复、组织再生的调解者^[4]。Let-7b 坐落于 9q22.3,与肺动脉高压、肿瘤等病理过程相关^[5]。研究表明在乳腺癌中,升高的 let-7b 能促进血管生成^[6];慢性阻塞性肺动脉高压(CTEPH)中,let-7b 能通过 TGF- β 1 和 ET-1 影响肺动脉上皮细胞的分子表达和平滑肌细胞的迁移^[7]。最近研究发现,皮肤组织热损伤后 let-7b 的表达趋势与 COL1 α 1, COL1 α 2 相反,可能参与了损伤的病理过程^[4]。但值得注意的是,let-7b 在热适应/热射病血清中的变化及意义尚未明确,本实验通过分析大鼠模型血清中 let-7b 的变化及其与相关分子的关系,为进一步研究与临床监测奠定基础。

1 材料和方法

1.1 研究对象 实验大鼠为第二军医大学实验动物中心提供的 8~10 周龄的 SPF 级健康 SD 大鼠,个体间体温基本一致,两次肛温波动 $<3^{\circ}\text{C}$,体重 80~100 g,雄性,共 60 只。所有大鼠在适宜的温度湿度下饲养 1 周后,接受 power lab 系统无创血压测试与肛温、体重测量以确定生理状态的稳定。所有大鼠随机均分为 3 组,即对照组、HA 组、HS 组,分笼饲养。

1.2 试剂与仪器 ELISA 试剂盒(美国 eBioscience 公司); Trizol LS, 酶标仪(美国 Thermo Scientific 公司); Taqman MicroRNA Assays, ABI 7700(美国 Applied Biosystems 公司)。

1.3 方法

1.3.1 热适应(HA)、热射病(HS)大鼠模型的建立:HA 组大鼠置于温度($34.5 \pm 0.4^{\circ}\text{C}$)、相对湿度($60 \pm 5\%$)的仿真热气候动物舱中培养 30 天,每日照明时间为 7:00~19:00,每隔 8 h 进行体重、肛

温测量。HS 组大鼠置于温度($43.2 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$)、相对湿度($60 \pm 2\%$)的仿真热气候动物舱中加热 120 min,肛温 42.5°C 认为达到 HS,结束应激,检测体重,记录持续进出舱时间。对照组大鼠置于正常环境,普通喂养。三组大鼠在热暴露下的反应符合相应组别的行为特征。

1.3.2 采血及血清的分离:大鼠称重后,以 300 mg/kg 为单位腹腔注射 10 ml/dl 水合氯醛,采集心尖血 8~10 ml 后分离血清(4°C , 3 500 r/min, 10 min),取 1~2 ml 血清用于细胞因子、蛋白测定,其余用 Trizol LS 提取 RNA 后置 -80°C 冰箱保存。

1.3.3 反转录与 qRT-PCR:按 Taqman MicroRNA Assays 说明书检测 microRNA 的表达水平。用 Taqman MicroRNA 反转录试剂盒将 microRNA 反转录为 cDNA,以 cDNA 为模板,以 U6 RNA 为内参照,设立平行对照组 2 组,重复组 3 组,于 ABI 7700 上进行 PCR。

1.3.4 相关蛋白及细胞因子的检测:用 ELISA 试剂盒检测血清中的热休克蛋白 70(HSP70),白介素-6(IL-6),肿瘤坏死因子- α (TNF- α),转化生长因子- β (TGF- β), IL-12 的表达水平。

1.4 统计学分析 以中位数(M)描述数据的集中趋势,以四分位数间距(Q)描述数据的离散趋势。三组间的比较采用非参数 Kruskal-Wallis H 检验,以 Spearman 秩相关系数(r_s)表示两变量之间的相关性,检验水准为 0.05。统计软件为 IBM SPSS Statistics 21.0 和 GraphPad Prism 6.0。

2 结果

2.1 microRNA let-7b 的表达水平 Let-7b 在对照、HA 组、HS 组的 M 值分别为 0.99, 1.04, 1.93, Q 值分别为 0.30, 0.25, 0.44, 差异具有统计学意义($\chi^2 = 38.95, P < 0.001$)。组间两两比较显示,对照组与 HA 组差异不具有统计学意义($P = 1.000$),对照组与 HS 组、HA 组与 HS 组比较差异具有统计学意义($P < 0.001$)。

2.2 HSP70 及细胞因子的表达水平 见表 1。对 HSP70, IL-6, TNF- α , TGF- β 和 IL-12 在三组间的表达水平进行 Kruskal-Wallis H 检验显示差异具有统计学意义($P < 0.05$);组间两两比较显示,各分子在对照组与 HA 组表达水平相近,差异不具有统计学意义($P > 0.05$),而在对照组与 HS 组、HA 组与 HS 组的表达差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 HS 组 miR let-7b 与 HSP70, 细胞因子的相

关性分析 见表 2。Spearman 相关性分析显示, HS 组 let-7b 与 HSP70, TNF- α , IL-6 呈正相关, 差

异具有统计学意义($P < 0.05$), 与 IL-12, TGF- β 不具有相关性, 差异不具有统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 HSP70 及细胞因子的表达情况

组别	HSP(pg/ml)		TNF- α (pg/ml)		IL-6(pg/ml)		IL-12(pg/ml)		TGF- β (pg/ml)	
	M	Q	M	Q	M	Q	M	Q	M	Q
CT	331.16	131.01	216.50	78.01	188.50	69.03	9.00	2.20	86.05	34.20
HA	335.50	112.30	278.00	133.20	208.50	56.04	9.90	4.70	88.10	36.01
HS	863.05	197.43	561.05	186.04	561.00	199.05	20.00	4.01	134.20	34.05
χ^2	39.36		39.60		40.59		40.57		27.19	
P	<0.001		<0.001		<0.001		<0.001		<0.001	
两组比较(P)										
CT与HA	1.000		1.000		0.808		0.831		1.000	
CT与HS	<0.001		<0.001		<0.001		<0.001		<0.001	
HA与HS	<0.001		<0.001		<0.001		<0.001		<0.001	

注: CT: 对照组, HA: 热适应组, HS: 热射病组, M: 中位数, Q: 四分位数间距。两组间比较的 P 值为经矫正后 P 值。

表 2 热射病组 let-7b 与 HSP70, 细胞因子的相关性分析

相关系数	HSP70	TNF- α	IL-6	IL-12	TGF- β
r_s	0.579	0.498	0.609	0.346	0.437
P	<0.01	<0.05	<0.01	>0.10	>0.05

注: $r_{0.05/2, 20} = 0.447$ 。

3 讨论 热射病是一种由于高温、高湿、无风等因素造成的以体温升高、神经系统调节障碍为特点的疾病, 死亡率介于 5%~50%, 早期受累器官包括脑、肝、肾、心脏, 患者多在高温下剧烈活动数小时后发病^[2]。热休克蛋白(heat-shock protein, HSP)是最早发现的与热损伤有关的蛋白, 以 HSP70 较为重要。HSP70 存在于胞浆、胞核、线粒体内, 与抗原提呈、热耐受、免疫抑制等过程相关^[6]。研究表明, 细胞外 HSP70 能被巨噬细胞和自然杀伤细胞识别, 在自身免疫、肿瘤形成方面发挥了重要作用, 此外, HSP70 能通过 TLR 信号通路调节炎症因子如 TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12 的表达, 并能激活 NF-kappa β 通路参与免疫调节反应^[8]。

microRNA let-7 最初是在杆状线虫中发现的, 目前已定义的 14 种 let-7 家族在不同疾病中有不同的表达水平和生物调节功能^[5]。研究表明, 在原发性胆汁性肝硬化中, let-7b 与 IL-18, ALP 呈负相关, 可能参与了该病的致病过程^[9]; 在肾癌中, 下调的 let-7b 能通过激肽释放酶影响细胞增殖和色氨酸类蛋白家族的表达^[10]。在慢性阻塞性肺动脉高压中, 变化的 let-7b 能影响 ET-1, TGFBR1 在肺动脉上皮细胞的表达和肺动脉平滑肌的迁移, 且与疾病的发生发展密切相关^[7]。由于 ET-1 是 let-7b 的直接作用靶点, 而 TGF- β 能通过 TGFBR1/Smad3 途径上调 ET-1 表达, 考虑到 let-7b 与 ET-1, TGFBR1 的相关性, 有研究表明 let-7b 激动剂

与 TGF- β 的联合能诱导 TGF-BR1 的表达^[7], TGF- β 可能协同 let-7b 参与了相关的致病机制。此外, 有研究显示 let-7b 亦可通过 TLR 等信号途径调节 IL-6, IL-12 的表达进而参与免疫调控过程^[6]。随着对 let-7b 相关调控机制的逐渐认识, 其在热损伤性疾病中的作用亦被关注, 研究发现 let-7b 在皮肤组织热损伤后的表达趋势与 COL1 α 1, COL1 α 2 表达趋势相反, 通过调节 I 型胶原蛋白参与了热损伤的病理调节过程^[4]。但值得注意的是, let-7b 在热射病/热适应中的作用机制尚不明确。本研究发现在热射病大鼠血清中 let-7b 高于对照组与热适应组, 且与 HSP70, TNF- α , IL-6 呈正相关, 证明其可能参与了热射病致病过程, 为临床监测高温、高湿环境下患者的状况提供了潜在评价指标, 但本实验动物模型较少, 尚需在临床病人进行进一步验证与疾病机制的深入研究。

参考文献:

- [1] Racinais S, Periard JD, Karlsen A, et al. Effect of heat and heat acclimatization on cycling time trial performance and pacing [J]. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 2015, 47(3): 601-606.
- [2] Leon LR, Bouchama A. Heat stroke [J]. *Comprehensive Physiology*, 2015, 5(2): 611-647.
- [3] Renaudeau D, Collin A, Yahav S, et al. Adaptation to hot climate and strategies to alleviate heat stress in livestock production [J]. *Animal*, 2012, 6(5): 707-728.
- [4] Liu JY, Luo CQ, Yin ZQ, et al. Downregulation of let-7b promotes COL1A1 and COL1A2 expression in dermis and skin fibroblasts during heat wound repair [J]. *Molecular Medicine Reports*, 2016, 13(3): 2683-2688.
- [5] Han X, Chen Y, Yao N, et al. MicroRNA let-7b suppresses human gastric cancer malignancy by targeting ING1 [J]. *Cancer Gene Therapy*, 2015, 22(3): 122-129.

- [6] Li D, Jia H, Zhang H, et al. TLR4 signaling induces the release of microparticles by tumor cells that regulate inflammatory cytokine IL-6 of macrophages via microRNA let-7b[J]. *Oncoimmunology*, 2012, 1(5): 687-693.
- [7] Guo LJ, Yang YH, Liu J, et al. Differentially expressed plasma microRNAs and the potential regulatory function of Let-7b in chronic thromboembolic pulmonary hypertension [J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e101055.
- [8] Zhang AY, Guo YF, Zhang SG, et al. Cytokine effects and cellular signaling pathways of grass carp HSP70 in head kidney leukocytes[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 46(2): 550-556.

- [9] 钱 铮, 陈孙孝, 任传路, 等. 原发性胆汁性肝硬化患者 miR-let-7b 的异常表达及其意义[J]. *中华肝脏病杂志*, 2013, 21(7): 533-536.
- Qian C, Chen SX, Ren CL, et al. Abnormal expression of miR-let-7b in primary biliary cirrhosis and its clinical significance[J]. *Chin J Hepatol*, 2013, 21(7): 533-536.
- [10] McLean MH, El-Omar EM. Genetics of gastric cancer[J]. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2014, 11(11): 664-674.

收稿日期: 2016-08-14

修回日期: 2016-12-28

(上接 18 页)列表达异常、且发挥促癌或抑癌功能的 miRNA, 能够参与肿瘤发生和发展过程, 在染色体异常、基因突变、基因多态性和表观遗传学改变等过程中发挥重要作用, 有望用于临床监测肿瘤的发生发展, 为治疗提供新的靶标。

miR-181 家族包括 miR-181a, miR-181b, miR-181c 和 miR-181d 四个分子, 它们在细胞免疫调节、发育、分化和肿瘤发生发展中发挥重要的调控作用。在免疫调节方面, miR-181 家族在 NKT 细胞早期发育和 TCR 信号阈值调定中发挥重要作用^[8]; 丙肝病毒能够诱导 miR-181a 表达下调, 从而抑制 CD4 阳性 T 细胞的细胞免疫反应^[9]。在多种肿瘤中, miR-181 家族表达降低, 且与不良预后密切相关。如在胶质母细胞瘤中, 过表达 miR-181b 能够逆转上皮间质转化, 抑制肿瘤生长^[5]; 在乳腺癌中, miR-181a 能够通过靶向乳腺癌耐药蛋白 (BCRP) 分子, 从而部分逆转米托蒽醌介导的细胞耐药; miR-181a 还能够通过抑制 MMP14, 抑制肿瘤细胞迁移和血管生成^[10]。

然而, miR-181 家族在结肠癌中的表达和其功能鲜有报道。仅有一篇文献报道, miR-181a 表达水平能够预测病人抗表皮生长因子受体 (EGFR) 治疗的疗效^[11]。本研究发现, miR-181d 在结肠癌细胞系中较正常肠粘膜上皮细胞 HIEC 表达显著降低。体外上下调和功能实验证实, miR-181d 能够显著抑制结肠癌细胞的增殖, 使细胞周期 G0/G1 阻滞, 并促进其凋亡。miR-181d 在结肠癌中普遍下调并发挥抑癌作用, 提示其有望作为诊断和治疗结肠癌的新的候选分子标志物和分子靶标。进一步深入研究 miR-181d 的作用靶分子及相关分子信号通路, 有望阐明 miR-181d 在结肠癌中发挥抑癌作用的分子机制, 为其进一步在临床实践中作为分子标志物应用和进行靶向治疗奠定理论和实践基础。

参考文献:

- [1] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in

China, 2015[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-132.

- [2] 李道娟, 李 倩, 贺宇彤. 结直肠癌流行病学趋势[J]. *肿瘤防治研究*, 2015, 42(3): 305-310.
- Li DJ, Li Q, He YT. Epidemiological trends of colorectal cancer [J]. *Cancer Research on Prevention and Treatment*, 2015, 42(3): 305-310.
- [3] 王钦君, 张红春, 申娟娟, 等. microRNAs 作为结直肠癌潜在标记物的研究进展[J]. *现代检验医学杂志*, 2015, 30(4): 107-110, 114.
- Wang QJ, Zhang HC, Shen XJ, et al. microRNA as a potential marker in the progress of colorectal cancer [J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2015, 30(4): 107-110, 114.
- [4] Kastrati I, Canestrari E, Frasor J. PHLDA1 expression is controlled by an estrogen receptor-NFkappaB-miR-181 regulatory loop and is essential for formation of ER+ mammospheres[J]. *Oncogene*, 2015, 34(18): 2309-2316.
- [5] Wang H, Tao T, Yan W, et al. Upregulation of miR-181s reverses mesenchymal transition by targeting KPNA4 in glioblastoma[J]. *Sci Rep*, 2015(5): 13072.
- [6] Huang P, Ye B, Yang Y, et al. MicroRNA-181 functions as a tumor suppressor in non-small cell lung cancer (NSCLC) by targeting Bcl-2[J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(5): 3381-3387.
- [7] Dalmay T, Edwards DR. MicroRNAs and the hallmarks of cancer[J]. *Oncogene*, 2006, 25(46): 6170-6175.
- [8] Henaoui-Mejia J, Williams A, Goff LA, et al. The microRNA miR-181 is a critical cellular metabolic rheostat essential for NKT cell ontogenesis and lymphocyte development and homeostasis [J]. *Immunity*, 2013, 38(5): 984-997.
- [9] Li GY, Zhou Y, Ying RS, et al. Hepatitis C virus-induced reduction in miR-181a impairs CD4(+) T-cell responses through overexpression of DUSP6 [J]. *Hepatology*, 2015, 61(4): 1163-1173.
- [10] Li Y, Kuscu C, Banach A, et al. miR-181a-5p inhibits cancer cell migration and angiogenesis via downregulation of matrix metalloproteinase-14 [J]. *Cancer Res*, 2015, 75(13): 2674-2685.
- [11] Pichler M, Winter E, Ress AL, et al. miR-181a is associated with poor clinical outcome in patients with colorectal cancer treated with EGFR inhibitor[J]. *J Clin Pathol*, 2014, 67(3): 198-203.

收稿日期: 2017-01-10

修回日期: 2017-02-12