

miR-155 在慢性阻塞性肺疾病患者中的表达



扫码阅读电子版

李云霞 李男 加慧 夏书月

沈阳医学院附属中心医院呼吸科 110024

通信作者: 李云霞, Email: 782186096@qq.com

【摘要】 目的 研究 miR-155 在慢性阻塞性肺疾病 (COPD) 患者中的表达水平及其与炎症细胞因子的相关性。**方法** 选取 2017 年 6 月至 2018 年 6 月在沈阳医学院附属中心医院呼吸科门诊就诊的稳定期 COPD 患者 30 例, 住院的 COPD 急性加重期 (AECOPD) 患者 30 例, 重度吸烟组 30 例, 健康对照组 30 例。抽取各组患者外周血, 逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测单个核细胞 (PBMC) 中 miR-155 的表达水平; 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 方法检测肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 6 (IL-6)、IL-1 β 、IL-17 细胞因子水平; 分析各组指标之间的相关性。**结果** AECOPD 组 miR-155 表达量最大, COPD 稳定组表达量次之, 重度吸烟组表达量较少, 健康对照组表达量最少。对 miR-155 与上述炎症因子的表达进行相关分析, 结果显示 miR-155 与上述指标均存在正向相关 ($r = 0.971, 0.949, 0.963, 0.975$), 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。**结论** miR-155 可能参与 COPD 的炎症反应, 促进 COPD 的发生、发展。

【关键词】 miR-155; 肺疾病, 慢性阻塞性; 炎症细胞因子

基金项目: 沈阳医学院博士启动基金 (20174047); 辽宁省自然科学基金面上项目 (20170540865)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-436X.2019.05.005

Expression of miR-155 in patients with chronic obstructive pulmonary disease

Li Yunxia, Li Nan, Jia Hui, Xia Shuyue

Department of Respiratory Medicine, the Affiliated Central Hospital of Shenyang Medical College, Shenyang 110024, China

Corresponding author: Li Yunxia, Email: 782186096@qq.com

【Abstract】 Objective To study the expression level of miR-155 in patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and its correlation with inflammatory cytokines. **Methods** Thirty patients with stable COPD who were admitted to the respiratory department of our hospital from June 2017 to June 2018 were enrolled. 30 patients with acute exacerbations of COPD were hospitalized (AECOPD group), 30 patients with severe smoking, and 30 healthy controls. Peripheral blood of each group was taken out, and the expression level of miR-155 in PBMC of mononuclear cells was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The levels of tumor necrosis factor α (TNF- α), interleukin 6 (IL-6), IL-1 β and IL-17 cytokines were detected by ELISA. Analyze the correlation between the various groups of indicators. **Results** The expression of miR-155 was the highest in the AECOPD group, followed by the COPD stable group. The expression in the severe smoking group was less, and the healthy control group had the least expression. Correlation analysis between miR-155 and the expression of the above inflammatory factors showed that miR-155 was positively correlated with the above indicators ($r = 0.971, 0.949, 0.963, 0.975$), and was statistically significant ($P < 0.01$). **Conclusions** miR-155 may be involved in the inflammatory response of COPD and promote the development of COPD. The specific pathways and mechanisms need further study.

【Key words】 miR-155; Pulmonary disease, chronic obstructive; Inflammatory cytokines

Fund program: Doctoral Start-up Fund of Shenyang Medical College (20174047); Project of

Natural Science Foundation in Liaoning Provincial (20170540865)

DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-436X.2019.05.005

COPD 是一种可以预防和治疗的炎症性疾病,以气流受限为特征,可伴有全身或肺外的表现^[1-2]。GOLD 指南中着重强调了急性加重和并发症对疾病严重程度的影响,为疾病的防治指出了新的方向。目前 COPD 居全球死亡原因第 4 位,疾病的发病率及病死率仍不断升高^[3]。

miR-155 是一种经典的多功能 miRNA,其对应的是非编码 RNA 的一个外显子,转录于 21 号染色体 B 细胞整合簇 (B-cell integration cluster, BIC) 区域。miR-155 与多种生物学过程有关,如肿瘤、炎症和免疫^[4-6]。目前 miR-155 在致癌和参与非恶性疾病发病的机制并未完全阐明,但是可以明确的是参予细胞炎症反应,调控细胞的分化、凋亡及转录的一些基因的表达^[7]。COPD 是与慢性气道炎症、免疫密切相关的疾病,尤其是近年来,研究热点越来越倾向于 COPD 与免疫因素有关。本试验通过研究 miR-155 在 COPD 患者中的表达水平,阐述其在 COPD 中的作用。

1 对象与方法

1.1 病例选择 随机选取 2017 年 6 月至 2018 年 6 月在沈阳医学院附属中心医院呼吸内科门诊就诊的稳定期 COPD 患者 30 例,住院的 COPD 急性加重期 (acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease, AECOPD) 患者 30 例,健康对照组 30 例,重度吸烟组 30 例。年龄 (66.0 ± 5.8) 岁,年龄范围 40~80 岁,男 58 例,女 62 例。

1.2 入选标准 健康对照组:无吸烟史,无慢性呼吸系统疾病,无高血压、冠状动脉粥样硬化性心脏病、糖尿病、神经系统疾病、肝肾疾病等病史,年龄、性别与 COPD 稳定组匹配。COPD 稳定组:COPD 诊断符合 2011 年由 ATS 和 ERS 联合制定的诊治指南,且近 3 个月无 COPD 急性加重。重度吸烟组:来自健康管理中心的吸烟的健康者,年龄范围 40~80 岁,每天吸 20 支及以上卷烟,吸烟指数 (somking index, SI) ≥ 400 (SI=每日吸烟支数×吸烟年数)。AECOPD 组:符合以下条件:(1)曾诊断过 COPD;(2)急性加重指标:发热,

咳嗽加剧,痰量增多或出现黄痰;(3)呼吸困难指标:安静状态下,呼吸频率 > 20 次/min;(4)肺功能受损指标:活动后气短加重或出现啰音;(5)经常使用 COPD 药物;(6)年龄 > 65 岁。

1.3 排除标准 合并其他慢性呼吸系统疾病如哮喘、支气管扩张、肺结核、肺癌、肺间质疾病等,合并其他系统慢性未控制疾病如高血压、糖尿病、冠状动脉粥样硬化性心脏病、严重肝肾功能损害、神经系统疾病等。

1.4 检测指标

1.4.1 外周血单个核细胞中 miR-155 的表达水平 抽取试验对象全血 5 ml,用 percoll 分离液法分离单个核细胞,采用逆转录聚合酶链反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 技术检测单个核细胞中 miR-155 的表达水平;RT-PCR 试剂盒购自美国 RD 公司。具体实验步骤:(1)单个核细胞的分离;(2)单个核细胞中总 RNA 的抽提及 RNA 浓度的测定;(3)Real-Time qPCR;(4)引物的稀释及分装;(5)miR-155 的 RT 反应;(6)miR-155 的 qPCR 反应。见表 1。

1.4.2 外周血炎症因子肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α, TNF-α)、IL-6、IL-1β、IL-17 的表达 抽取 2 ml 全血分离出血清,采用酶联免疫吸附测定 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 方法检测血清炎症因子 TNF-α、IL-6、IL-1β、IL-17 的水平。ELISA 方法按照试剂盒说明书操作。

1.5 统计学分析 采用 SPSS 22.0 统计软件包。定量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,计数资料数据以百分率或百分比表示。组间比较采用卡方检验,两组定量资料的比较采用 *t* 检验,多组计量资料间比较采用 one-way ANOVA 分析,两组间比较采用 LSD-*t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组血清中 miR-155 的表达 健康对照组中 miR-155 表达量 (0.24 ± 0.06) 最低, AECOPD

表 1 miR-155 逆转录荧光定量 PCR 序列

引物名称	RT 引物序列 (5'-3')	PCR 引物序列 (5'-3')
miR-155	CTC AAC TGG TGT CGT GGA GTC GGC AAT TCA GTT GAG ACC CCT AT	上游: ACA CTC CAG CTG GGT TAA TGC TAA TTG TGA T 下游: TGG TGT CGT GGA GTC G

组 miR-155 表达量 (2.24 ± 0.25) 最大, COPD 稳定组表达 (1.13 ± 0.15) 较 AECOPD 组表达量少, 但较重度吸烟组 (0.56 ± 0.05) 表达量增多, 各组间比较, 差异有统计学意义 ($F = 25.21, P < 0.01$), 见表 2。

表 2 各组 miR-155-5p 的表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	miR-155-5p
健康对照组	30	0.24 ± 0.06
重度吸烟组	30	0.56 ± 0.05 ^a
COPD 稳定组	30	1.13 ± 0.15 ^a
AECOPD 组	30	2.24 ± 0.25 ^a
F 值		25.21
P 值		0.00

注: AECOPD 为慢性阻塞性肺疾病急性加重期; 与健康对照组比较, ^a $P < 0.01$

2.2 各组血清中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、IL-17 的表达 各组血清中炎症因子 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、IL-17 的表达结果见表 3, 可以看到重度吸烟组血清中各炎症因子较健康对照组明显升高, COPD 稳

定组炎症因子的表达水平较重度吸烟组升高, 随着病情的加重, 炎性因子的表达量逐渐增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

2.3 miR-155 与 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、IL-17 表达水平的相关性分析 通过 Pearson 相关分析结果显示, miR-155 与血清中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、IL-17 的表达水平均呈正相关 ($r = 0.971$ 、0.949、0.963、0.975; $P < 0.01$)。见图 1。

3 讨论

COPD 的发病机制尚未完全明确, 目前认为慢性气道炎症、氧化/抗氧化失衡、蛋白酶/抗蛋白酶失衡是 COPD 发病机制的关键环节^[8-9]。深入研究其发病机制及其基因表达, 是目前迫在眉睫的任务。

miRNAs 是一类长度为 19~25 个核苷酸的非编码 RNA, 参与多种重要生物学过程^[10], 也参与多种肺部疾病的发病过程, 如肺癌、COPD、哮喘、特发性肺间质纤维化等^[11], 在一些 COPD 患

表 3 各组血清炎症因子的表达水平 (ng/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	血清中炎症因子			
		IL-6	TNF- α	IL-1 β	IL-17
健康对照组	30	226 ± 56	188 ± 60	174 ± 65	236 ± 55
重度吸烟组	30	424 ± 167 ^a	350 ± 60 ^a	588 ± 67 ^a	698 ± 35 ^a
COPD 稳定组	30	811 ± 131 ^a	588 ± 67 ^a	788 ± 78 ^a	978 ± 87 ^a
AECOPD 组	30	1 154 ± 217 ^a	931 ± 76 ^a	1 224 ± 131 ^a	1 451 ± 98 ^a
F 值		20.12	19.25	25.21	19.11
P 值		0.00	0.00	0.00	0.00

注: AECOPD 为慢性阻塞性肺疾病急性加重期; TNF- α 为肿瘤坏死因子 α ; 与健康对照组比较, ^a $P < 0.01$

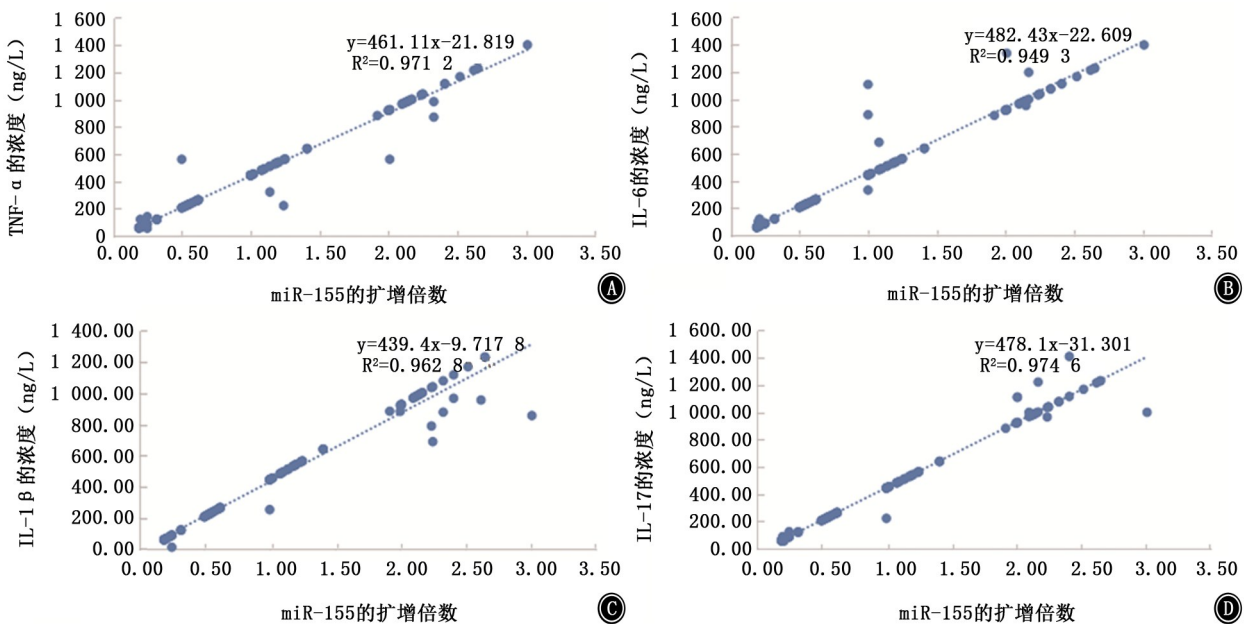


图 1 miR-155 与 TNF- α (A)、IL-6 (B)、IL-1 β (C)、IL-17 (D) 表达水平相关性分析

者诱导痰及肺组织中也发现了异常表达的 miRNAs^[12-13], 但 miRNAs 究竟在 COPD 发病机制中扮演何种角色, 目前尚不知晓。据研究显示, miRNAs 靶向控制哺乳动物 30% 的基因组表达, 且在细胞生长、分化、凋亡、代谢及病毒感染、肿瘤发生等病理生理过程中发挥至关重要的作用^[14-15]。近年来众多研究探讨了某些 miRNAs 在 COPD 发病机制中的作用, 并阐明其作为 COPD 早期诊断的生物标志物的可能性, 是 COPD 疾病诊断、治疗以及预后评估方面的一个新突破。

miR-155, 是一种经典的多功能 miRNA, 其对应的是非编码 RNA 的一个外显子, 转录于 21 号染色体 BIC 区域。研究发现 miR-155 参与 T 细胞、B 细胞和巨噬细胞的发育、分化、活化、增殖和稳态的维持等生物学过程。而自身免疫性疾病均存在着抗原提呈细胞活化和抗原提呈, 以及 T 和 B 细胞的活化、增殖、分化等过程^[16]。迄今为止, 综合全球文献发现在已知的 miRNAs 中, miR-155 是与肿瘤性疾病和炎症性疾病最相关的 miRNAs 之一。有实验证实, miR-155 通过作用靶基因 IKK 激酶家族、SMAD2、FAS 相关死亡域蛋白降低核因子 κ B 活性, 以次级效应方式抑制炎症因子的释放, 减少对机体的损伤^[17]。miR-155 在 COPD 中发挥何种作用, 及其与 COPD 患者中炎症因子 TNF- α 、IL-17、IL-6 等细胞因子的相关性, 目前无相关文献报道, 是本课题的研究目的。

通过检测各组血清中 miR-155 的表达水平, 发现 AECOPD 组 miR-155 表达量最大, COPD 稳定组表达量次之, 重度吸烟组表达量较少, 健康对照组表达量最少; 组间比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。对 miR-155 与 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、IL-17 的表达进行 Pearson 相关性分析, 结果显示 miR-155 与 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、IL-17 均存在正向相关性 ($r = 0.971$ 、 0.949 、 0.963 、 0.975), 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。因此, miR-155 可能参与 COPD 的炎症反应, 且促进 COPD 的发生、发展, 但其具体通路及机制尚不清晰, 有待于进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

[1] Viegli G, Pistelli F, Sherrill DL, et al. Definition, epidemiology and natural history of COPD[J]. Eur Respir J, 2007, 30(5): 993-1013. DOI:10.1183/09031936.00082507.

[2] Laden F, Neas LM, Dockery DW, et al. Association of fine

particulate matter from different sources with daily mortality in six US cities[J]. Environ Health Perspect, 2000, 108(10): 941-947. DOI:10.1289/ehp.00108941.

[3] Zuur-Telgen M, Vandervalk P, Van Der Palen JA, et al. Stable state proadrenomedullin level in COPD patients: a validation study[J]. Chronic Obstruct Pulm Dis, 2017, 14(2): 219-227. DOI:10.1080/15412555.2016.1250254.

[4] Faraoni I, Antonetti FR, Cardone J, et al. miR-155 gene: a typical multifunctional microRNA[J]. Biochim Biophys Acta, 2009, 1792(6): 497-505. DOI: 10.1016/j.bbdis.2009.02.013.

[5] O'connell RM, Kahn D, Gibson WS, et al. MicroRNA-155 promotes autoimmune inflammation by enhancing inflammatory T cell development[J]. Immunity, 2010, 33(4): 607-619. DOI:10.1016/j.immuni.2010.09.009.

[6] Cremer TJ, Fatehchand K, Shah P, et al. MiR-155 induction by microbes/microbial ligands requires NF- κ B-Dependent de novo protein synthesis[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2012, 73(2): 1-13. DOI:10.3389/fcimb.2012.00073.

[7] Wang W, Liu Z, Su J, et al. Macrophage micro-RNA-155 promotes lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice and rats[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2016, 311(2): L494-L506. DOI:10.1152/ajplung.00001.2016.

[8] Zinellu E, Zinellu A, Fois AG, et al. Circulating biomarkers of oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review[J]. Respir Res, 2016, 17(1): 150. DOI:10.1186/s12931-016-0471-z.

[9] Bodas M, Patel N, Silverberg D, et al. Master autophagy regulator transcription Factor-Eb (tfEB) regulates cigarette smoke induced Autophagy-Impairment and COPD-Emphysema pathogenesis[J]. Antioxid Redox Signal, 2017, 27(3): 150-167. DOI:10.1089/ars.2016.6842.

[10] Ambros V. The functions of animal microRNAs[J]. Nature, 2004, 431(76): 350-355. DOI:10.1038/nature02871.

[11] Angulo M, Lecuona E, Iasha Sznajder J. Role of MicroRNAs in lung disease[J]. Arch Bronconeumol, 2012, 48(9): 325-330. DOI:10.1016/j.arbres.2012.04.011.

[12] Van Pottelberge GR, Mestdagh P, Bracke KR, et al. MicroRNA expression in induced sputum of smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2011, 183(7): 898-906. DOI:10.1164/rccm.201002-0304OC.

[13] Ezzie ME, Crawford M, Cho JH, et al. Gene expression networks in COPD: microRNA and mRNA regulation[J]. Thorax, 2012, 67(2): 122-131. DOI:10.1136/thoraxjnl-2011-200089.

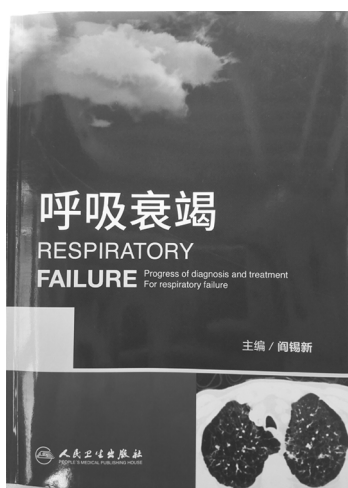
[14] Kurowska-Stolarska M, Hasoo MK, Welsh DJ, et al. The role of microRNA-155/LXR pathway in experimental and Idiopathic Pulmonary Fibrosis[J]. J Allergy Clin Immunol, 2016, (16): 31130-31132. DOI:10.1016/j.jaci.

- [15] Simpson LJ, Ansel KM. MicroRNA regulation of lymphocyte tolerance and autoimmunity[J]. J Clin Invest, 2015, 125(6): 2242-2249. DOI:10.1172/JCI78090.
- [16] Xu S, Xu Z, Liu B, et al. LIFR α -CT3 induces differentiation of a human acute myelogenous leukemia cell line HL-60 by suppressing miR-155 expression through the JAK/STAT pathway[J]. Leuk Res, 2014, 38(10): 1237-1244. DOI: 10.1016/j.leukres.2014.07.004.
- [17] Xu HF, Fang XY, Zhu SH, et al. Glucocorticoid treatment inhibits intracerebral hemorrhage-induced inflammation by targeting the microRNA-155/SOCS-1 signaling pathway[J]. Mol Med Rep, 2016, 14(4): 3798-3804. DOI: 10.3892/mmr.2016.5716.

(收稿日期:2018-08-01)

· 简讯 ·

《呼吸衰竭》已出版



河北医科大学第二医院阎锡新教授主编的《呼吸衰竭》一书已由人民卫生出版社出版。本书邀请到中国工程院院士、中华医学会呼吸病学分会主任委员王辰院士作序。

阎锡新教授 30 年呼吸临床的从业经历,受益于呼吸内科与危重症医学捆绑式发展带来的机遇与挑战,同时也充分认识到两者不可分割却又各有特色、各有侧重的现实。王辰院士等学界带头人始终倡导呼吸同道必须熟练掌握呼吸衰竭救治技能与理论,这为我国既往 20 年学科发展指明了方向。为此,5 年前,阎锡新教授组织临床一线呼吸与危重症医学同道,共同策划出版了《呼吸衰竭》一书。受到读者好评。

本书特点:本书分为基础篇、临床诊疗策略篇、临床疾病各论篇和护理篇四大部分。紧紧围绕呼吸衰竭作为核心;分析不同病因、诱因呼吸衰竭临床特点与救治;介绍呼吸介入新技术在呼吸衰竭中应用;不同疾病呼吸衰竭机械通气救治策略;慢阻肺、哮喘、间质肺病、肺功能检测等最新国际、国内指南及部分专家共识;并介绍了雾霾对呼吸疾病可能的影响等。

本书作为工具书,适于呼吸与危重症医学科,急诊与重症医学医师参考;可以作为呼吸与危重症研究生、住院医师培训参考书籍。热切期待各位读者、前辈给予批评指导。

如有意订购本书,请致电李静 15133133762。