

抵抗素、miRNA-26b 在婴幼儿毛细支气管炎中的表达

许长娣, 周 瑶, 张佳敏, 赵德育, 刘 峰

摘要 目的 探讨婴幼儿毛细支气管炎中 miRNA-26b、抵抗素的变化。方法 收集毛细支气管炎患儿的血液,以正常儿童为对照,通过酶联免疫吸附(ELISA)法测定血清中白介素(IL)-8、抵抗素浓度,并利用实时定量 PCR 技术测定血液淋巴细胞中 miRNA-26b、抵抗素 mRNA 表达,利用 miRNA-26b mimics 干预人肺上皮细胞 A549,通过实时定量 PCR 技术测定 miRNA-26b、抵抗素 mRNA 及细胞上清液中 IL-8 蛋白浓度变化。结果 毛细支气管炎患儿外周血清中 IL-8、抵抗素浓度均升高,血液淋巴细胞中 miRNA-26b、抵抗素 mRNA 表达增加;经过干预的 A549 细胞 miRNA-26b、抵抗素 mRNA 及细胞上清液中 IL-8 蛋白浓度均有增加。结论 miRNA-26b、抵抗素在毛细支气管炎患儿血液淋巴细胞中存在差异表达,而这可能参与了炎症反应的发生。

关键词 抵抗素; microRNA; 人肺上皮细胞; IL-8; 呼吸道合胞病毒

中图分类号 R 562.2+1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)05-0752-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.05.029

2017-01-20 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81200012)

作者单位: 南京医科大学附属儿童医院呼吸科, 南京 210008

作者简介: 许长娣, 女, 硕士研究生;

刘 峰, 男, 副主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: axsliu@163.com

毛细支气管炎是婴幼儿时期以喘息为主要临床表现的下呼吸道感染性疾病,是导致婴幼儿住院的常见原因,可有不同的病原体引起,其中最常见的是呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)。目前毛细支气管炎发生发展机制仍不十分明确,因此有必要进行进一步探究。miRNA 是一类单链小分子 RNA,是在基因的转录翻译中起到转录后调节作用的非编码 RNA。此外,近来研究^[1]显示抵抗素与炎症反应可能存在相关性。在反复的过敏性鼻炎、慢性阻塞性肺病等呼吸道疾病患者血清中浓度都有所上升^[2-3],但在婴幼儿毛细支气管炎病患中的变化报道较少。该研究对比呼吸道合胞病毒感染毛细支气管炎患儿外周血中抵抗素、miRNA-26b 以及炎症因子的表达差异,并通过以 miRNA26b mimics 干预人肺上皮细胞,观察抵抗素、炎症因子的表达差异。

1 材料与方法

1.1 病例资料 选取 2015 年 10 月~2016 年 4 月,在南京医科大学附属儿童医院呼吸科病房住院并确诊的 16 例毛细支气管炎患儿为疾病组,其中男 8 例,女 8 例,年龄 2~15(8.9±2.6)个月,所有病例

normal pregnant women and to investigate the correlation between lipid level and insulin resistance(IR) in GDM patients. **Methods** A 75 g oral glucose tolerance test (OGTT) was performed among 94 pregnant women between 24 to 32 gestational weeks. According to OGTT, the pregnant women were divided into GDM group and normal glucose tolerance (NGT) group. Subsequently, height and body weight were measured and body mass index was calculated. Triglyceride (TG), total cholesterol (TC), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C), high density lipoprotein cholesterol (HDL-C), glucose, fasting insulin, C-peptide were also measured later on. HOMA-insulin resistance index (HOMA-IR) was calculated finally. **Results** ① Glucose level at every OGTT time point (0, 60, 120 min) glucose, fasting insulin(FINS), fasting C-peptide and HOMA-IR were significantly increased in GDM group compared with NGT group. TCH and TG were also significantly elevated in GDM group. However, LDL-C nor HDL-C had significant difference between GDM and NGT group. ② TG was positively correlated with glucose and HOMA-IR, but had no significant correlation with age, BMI before pregnancy and the increased BMI during pregnancy. ③ Stepwise multiple regression analysis showed that TG was the independent risk factor of serum HOMA-IR level. **Conclusion** Lipid metabolism disorders and insulin resistance are more severe in GDM group as compared to normal pregnant women. Furthermore, increased TG contribute to the onset and development of GDM.

Key words gestational diabetes mellitus; serum lipid; insulin resistance

病程在 5 d 内, 诊断均符合第 7 版实用儿科学有关毛细支气管炎的诊断标准。鼻咽分泌物 RSV 分离阳性, 或 ELISA 方法检测患儿血清 RSV Ig-M 抗体阳性, 具备其中 1 条即可确定为 RSV 感染, 不伴有肺结核、支气管肺发育异常等其他呼吸系统疾病且留取标本前未使用糖皮质激素及免疫调节剂。正常组共 16 例, 男 8 例, 女 8 例, 年龄 4 ~ 15 (7.2 ± 2.2) 个月, 均为外科系统准备择期手术住院的患儿, 近期无感染和慢性疾病史, 排除过敏性和免疫相关性疾病, 鼻咽分泌物 RSV 抗原检测均为阴性。其家长均知情同意并征得医院伦理委员会同意。经检验, 两组间年龄、性别、体重差异均无统计学意义。

1.2 方法

1.2.1 血清留取及淋巴细胞的分离

疾病组患儿入院次日清晨采 2 ml 静脉血, 置于抗凝真空采血管中, 离心分离血清并转存在 EP 管中, 于 -70 °C 保存待测。正常组儿童在体检当天抽血。用 ELISA 法检测血清抗生素水平, 试剂盒购自英国 IDS 公司; 两组病例另外各取新鲜抗凝血 2 ml, 采用人外周血淋巴细胞分离液, 分离收集淋巴细胞, 加 TRIzol 后置于 -80 °C 备用。

1.2.2 细胞培养及 mRNA、细胞上清液收集

人肺上皮 A549 细胞由中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心提供。将细胞培养于含 10% FBS、100 U/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素的 RPMI 1640 完全培养液, 置于 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度的细胞培养箱中培养, 待细胞达到 80% 汇合时, 吹打下细胞传代, 每周传代 2 ~ 3 次, 细胞呈单层贴壁生长, 实验取对数期生长细胞。按每孔 1 × 10⁶ /ml A549 细胞接种于 6 孔板中, 培养 24 h 后加入 miR-26b mimics + 8 μl Lipofectamine 2000 转染试剂 (转染组)。另外设空白组, 培养后留取细胞上清液并提取细胞总 RNA。

1.3 miRNA、mRNA 及炎症指标的测定

各样品的 miRNA-26b 和内参 (U6)、抗生素 mRNA 和内参 GAPDH 分别进行实时荧光定量 PCR, 数据采用 2^{-ΔΔCt} 法进行分析。血清白细胞介素-8 (interleukin-8, IL-8)、抗生素及细胞上清液 IL-8 浓度检测采用 ELISA 法检测, 具体步骤按试剂盒说明书进行。

1.4 统计学处理

应用 SPSS 20.0 软件进行分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两样本均数之间的比较经方差齐性检验后, 采用完全随机化设计 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清 IL-8、抗生素浓度及血液淋巴细胞中抗生素、miRNA-26b 表达

利用 ELISA 技术测定两组儿童血清中 IL-8 以及抗生素浓度, 结果显示疾病组中 IL-8 以及抗生素相对浓度明显高于正常组 [IL-8 蛋白: (5.53 ± 1.62)、(17.95 ± 4.94) ng/ml, *t* = -6.51; 抗生素蛋白: (15.46 ± 3.39)、(36.96 ± 9.47) ng/ml, *t* = -7.41]。接下来通过实时定量 PCR 技术, 证实了疾病组血淋巴细胞中抗生素 mRNA 及 miRNA-26b 相对表达均有升高 [抗生素 mRNA: (7.51 ± 1.49)、(19.46 ± 3.45), *t* = -13.90; miRNA-26b: (10.67 ± 2.83)、(26.53 ± 6.05), *t* = -8.224], 见图 1。

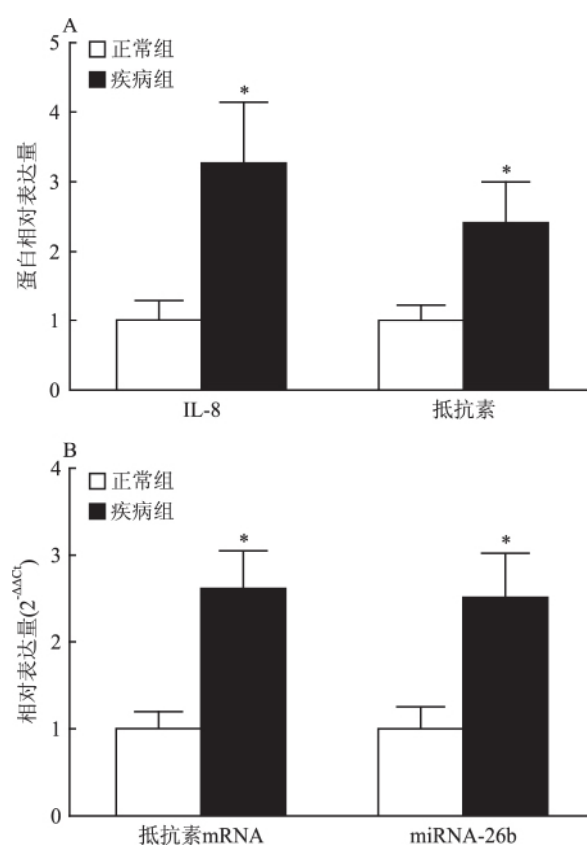


图 1 IL-8、抗生素及 miRNA-26b 的表达差异

A: 疾病组血清 IL-8 以及抗生素相对浓度; B: 疾病组血淋巴细胞中抗生素 mRNA 及 miRNA-26b 相对表达; 与正常组比较: * *P* < 0.05

2.2 两组上皮细胞中抗生素、miRNA26b 表达

与空白组相比, 转染组 A549 细胞经 miRNA-26b mimics 干预后, miRNA-26b 相对表达经 PCR 验证升高 (18.33 ± 3.07、41.13 ± 8.27, *t* = -8.17), 同样, 抗生素 mRNA 相对表达有所上升 (10.53 ± 3.43、

24.57 ± 4.65, t = -7.69); 本研究进一步通过 ELISA 验证干预组细胞外液中 IL-8 浓度增多 [(9.71 ± 2.23)、(31.25 ± 4.65) ng/ml, t = -13.21] 提示 miRNA-26b 可能参与介导肺上皮细胞抵抗素 mRNA 表达及 IL-8 分泌, 见图 2。

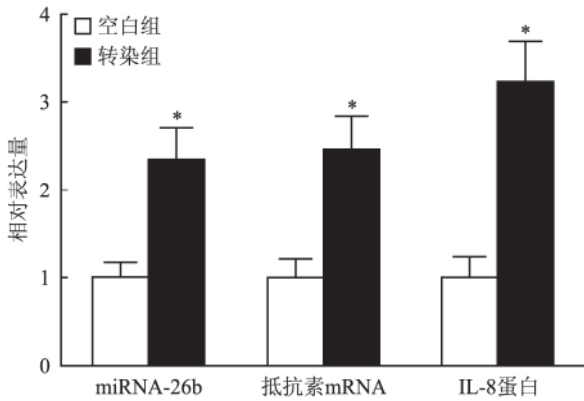


图2 A549 中 miRNA-26b、抵抗素 mRNA、IL-8 蛋白的表达差异与空白组比较: * P < 0.05

3 讨论

研究^[4]证明, 呼吸道合胞病毒所致毛细支气管炎可使外周血白细胞介素-6、IL-8 和肿瘤坏死因子-α 浓度明显升高, 且与病情呈正相关性。血循环中 IL-8 含量的增加, 可以作为毛细支气管炎急性阶段的一个重要指标^[5], 毛细支气管炎时, IL-8 局部合成增多, 可能通过促使激活的中性粒细胞内流、黏附、释放各种酶类和反应性氧化代谢产物、增加黏附分子表达等导致气道损伤、阻塞等发生^[6]。本实验中通过比较显示毛细支气管炎患儿血清 IL-8 浓度升高, 与前面研究^[4, 7]结果一致。在进一步实验中, 选用 IL-8 作为评价炎症的指标。抵抗素是 2001 年在动物实验中发现的源于脂肪组织的分泌型多肽, 而其在人类相较于炎症细胞如巨噬细胞、单核细胞, 脂肪组织中表达则较低^[8], 近年来已有研究^[9]提示抵抗素与促进炎症反应相关, 在人类及小鼠试验中均提示炎症情况下抵抗素表达升高, 而抵抗素也可促进白细胞介素-6、IL-8、肿瘤坏死因子-α 等细胞因子的生成^[10]。有研究^[11]显示在动脉粥样硬化患者中血清抵抗素水平与炎症因子呈正相关性, 而在呼吸道疾病中则有报道指出抵抗素可以促进中性粒细胞炎症因子释放, 加重脂多糖引起的急性肺损伤^[12]。本研究通过 ELISA 显示抵抗素在毛细支气管炎病患血清中浓度、外周血淋巴细胞中抵抗素

mRNA 表达均有升高, 故而推测抵抗素可能参与了其中的炎症反应。

miRNA 是一类单链小分子 RNA, 是在基因的转录翻译中起到转录后调节作用的非编码 RNA。miRNA 基因在 RNA 转录酶的作用下, 首先合成为 pri-miRNA。pri-miRNA 在 Drosha RNase 作用下剪切为茎环结构的 pre-miRNA。转运至胞质后由 Dicer 酶再次剪切, 最终形成成熟的 miRNA。目前转染 miRNA 常用的主要为化学合成 miRNA、慢病毒介导的 miRNA、质粒介导的 miRNA。本实验中采用化学合成的方法合成 miR-26b mimics, 通过脂质体转染进入细胞, 可以增强内源 miR-26b 的基因增强效应, 进行功能获得性研究。采用化学合成 mimics 的方法可以用来筛选 miRNA 靶位点, 筛选调控某一基因表达的 miRNA, 筛选影响细胞发育过程的 miRNA, 特异性较强、可重复性高, 容易获得较高水平的转染、表达增强效果。miRNA 在呼吸道疾病发生发展过程中起到的作用越来越受到重视。而本文中研究的 miRNA-26b, 已被证实能够抑制上皮细胞的增殖及迁移^[13-14]。在呼吸道疾病中, 有报道^[15]显示在 RSV 感染的毛细支气管炎病患外周血单核细胞中 miR-26b 表达上升。本实验中同样显示毛细支气管炎病患外周血淋巴细胞中 miRNA-26b 表达升高。以上结果提示在毛细支气管炎中, 淋巴细胞 miRNA-26b、抵抗素 mRNA 表达量以及血清中抵抗素浓度均有上升, miRNA-26b 及抵抗素可能参与调控炎症因子 IL-8 的生成。

毛细支气管炎常由呼吸道合胞病毒感染引起, 已知呼吸道上皮细胞是 RSV 入侵的主要靶细胞, 它不仅作为基础屏障, 更可以启动机体的非特异性免疫。而研究^[15]报道抵抗素可以促进内皮细胞的活化, 与此同时, 根据此前研究^[16]报道, 毛细支气管炎中 miRNA-26b 表达可升高, 那么提出假设, 是否 miRNA 及抵抗素均参与呼吸道上皮细胞炎症反应。本研究通过以 miRNA mimics 干预肺上皮细胞 A549, 结果表明抵抗素 mRNA 表达量有上升, 与此同时细胞上清液中 IL-8 浓度也有所升高, 因而在肺上皮细胞中 miRNA-26b 可能通过促进抵抗素 mRNA 表达, 进而增加炎症因子分泌, 参与炎症反应。

综上所述, miRNA-26b 及抵抗素均有可能参与 RSV 所致的毛细支气管炎的炎症反应过程, 在肺上皮细胞中 miRNA-26b 可能促进抵抗素表达进而促进炎症介质释放。但抵抗素在毛细支气管炎中更确切的机制值得进一步研究。

参考文献

- [1] 乔智慧,唐兰芬,抵抗素与炎症相关性疾病研究进展[J]. 医学综述,2010,16(11):1632-4.
- [2] Zicari A M, Occasi F, Cesoni Marcelli A, et al. Assessing the relationship between serum resistin and nasal obstruction in children with allergic rhinitis [J]. *Am J Rhinol Allergy*, 2013, 27(5): e127-30.
- [3] Kumor-Kisielewska A, Kierszniewska-Stepień D, Pietras T, et al. Assessment of leptin and resistin levels in patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Pol Arch Med Wewn*, 2013, 123(5): 215-20.
- [4] Verleden G M, Vanaudenaerde B M, Dupont L J, et al. Azithromycin reduces airway neutrophilia and interleukin-8 in patients with bronchiolitis obliterans syndrome [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2006, 174(5): 566-70.
- [5] 周仁江. 毛细支气管炎患儿血清 IL-6、IL-8、INF- γ 和 TNF- α 水平动态变化与病情关系的研究 [J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(12): 1261-2.
- [6] Puthothu B, Krueger M, Heinze J, et al. Impact of IL8 and IL8-receptor alpha polymorphisms on the genetics of bronchial asthma and severe RSV infections [J]. *Clin Mol Allergy*, 2006, 4: 2.
- [7] 李加新, 钟舒文. 血清 IL-6、IL-8 和 TNF- α 水平在毛细支气管炎患儿表达的研究 [J]. 中国医药指南, 2011, 9(31): 92-3.
- [8] Patel L, Buckels A C, Kinghorn I J, et al. Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPAR gamma activators [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 300(2): 472-6.
- [9] Lee J H, Ort T, Ma K, et al. Resistin is elevated following traumatic joint injury and causes matrix degradation and release of inflammatory cytokines from articular cartilage *in vitro* [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2009, 17(5): 613-20.
- [10] Tarkowski A, Bjersing J, Shestakov A, et al. Resistin competes with lipopolysaccharide for binding to toll-like receptor 4 [J]. *J Cell Mol Med*, 2010, 14(6B): 1419-31.
- [11] Axelsson J, Bergsten A, Qureshi A R, et al. Elevated resistin levels in chronic kidney disease are associated with decreased glomerular filtration rate and inflammation, but not with insulin resistance [J]. *Kidney Int*, 2006, 69(3): 596-604.
- [12] Jiang S, Park D W, Tadie J M, et al. Human resistin promotes neutrophil proinflammatory activation and neutrophil extracellular trap formation and increases severity of acute lung injury [J]. *J Immunol*, 2014, 192(10): 4795-803.
- [13] Dong N, Xu B, Benya S R, et al. MiRNA-26b inhibits the proliferation, migration, and epithelial-mesenchymal transition of lens epithelial cells [J]. *Mol Cell Biochem*, 2014, 396(1-2): 229-38.
- [14] Li J, Li X, Kong X, et al. MiRNA-26b inhibits cellular proliferation by targeting CDK8 in breast cancer [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2014, 7(3): 558-65.
- [15] Verma S, Li S H, Wang C H, et al. Resistin promotes endothelial cell activation: further evidence of adipokine-endothelial interaction [J]. *Circulation*, 2003, 108(6): 736-40.
- [16] Liu S, Gao L, Wang X, et al. Respiratory syncytial virus infection inhibits TLR4 signaling *via* up-regulation of miR-26b [J]. *Cell Biol Int*, 2015, 39(12): 1376-83.

Expressions of resistin and miRNA-26b in bronchiolitis in infants

Xu Changdi, Zhou Yao, Zhang Jiamin, et al

(Dept of Respiration, Children's Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210008)

Abstract Objective To study the expression and clinical significance of miRNA-26b, resistin and inflammatory mediator in bronchiolitis. **Methods** Serum IL-8, resistin concentration (by enzyme linked immunosorbent assay, ELISA), microRNA (miRNA) -26b with resistin mRNA expression in blood lymphocytes (by real-time quantitative PCR assay) were analyzed in children with bronchiolitis and healthy age-match control. After miRNA-26b mimics treating human lung epithelial cells A549, IL-8 concentrations in cell supernatants, miRNA-26b and resistin in cells were analyzed. **Results** In children with bronchiolitis, serum IL-8, resistin protein concentrations were increased, as well as miRNA-26b and resistin mRNA in blood lymphocytes. After the intervention of A549 cells miRNA-26b, resistin mRNA and IL-8 protein concentrations in supernatants were increased. **Conclusion** miRNA-26b and resistin expression change in blood lymphocytes in children with bronchiolitis, which may be involved in the inflammatory response.

Key words resistin; microRNA; human lung epithelial cell; IL-8; respiratory syncytial virus