

• 论 著 •

## miR-126 表达在支气管哮喘患者病情严重程度中的评估价值

吴挺实

(海南省海口市第三人民医院重症医学科 571100)

**摘要:**目的 探讨 miR-126 表达对支气管哮喘病情严重程度中的评估价值。方法 选取 40 例处于急性发作期的支气管哮喘患者作为研究组,40 例非急性发作期支气管哮喘患者作为对照 A 组,40 例慢性支气管炎患者作为对照 B 组,另选 30 例健康志愿者作为对照 C 组,采集 4 组研究对象血清标本,检测外周血单个核细胞的 miR-126 以及血清 IL-13 水平,对比检测结果,并使用受试者工作特征曲线(ROC)对检测结果进行评价。结果 研究组、对照 A 组、对照 B 组的 IL-13 水平均显著高于对照 C 组,差异有统计学意义( $P < 0.0125$ );研究组和对照 A 组的 miR-126 水平均显著高于对照 B 组和对照 C 组,差异有统计学意义( $P < 0.0125$ );研究组的 miR-126 水平显著高于对照 A 组( $P < 0.0125$ ),对照 B 组与对照 C 组的 miR-126 水平比较差异无统计学意义( $P > 0.0125$ );对照 C 组的一秒用力呼气容积(FEV1)占预测值百分比显著高于其他 3 组,对照 A 组与对照 B 组的 FEV1 占预测值百分比均显著高于研究组,差异有统计学意义( $P < 0.0125$ )。支气管哮喘患者外周血单核细胞中的 miR-126 表达水平与 FEV1 占预测值百分比呈负相关( $r = -0.718, P < 0.05$ ),与血清 IL-13 水平呈正相关( $r = 0.699, P < 0.05$ )。miR-126 检测支气管哮喘的 ROC 曲线下面积为 0.945。结论 支气管哮喘患者的外周血单个核细胞中 miR-126 表达增加,并且 miR-126 表达水平与患者的肺功能、炎症因子水平密切相关,其随病情的加重而增多,可作为评估支气管哮喘病情严重程度的指标。

**关键词:**支气管哮喘; miR-126; 外周血单个核细胞; 急性期

**DOI:**10.3969/j.issn.1672-9455.2017.15.024 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2017)15-2233-03

## The value of miR-126 in evaluating the severity of patients with bronchial asthma

WU Tingshi

(Intensive Care Unit, Third People's Hospital of Haikou, Haikou, Hainan 571100, China)

**Abstract: Objective** To discuss value of the expression of miR-126 in evaluating on the severity of bronchial asthma. **Methods**

A total of 40 cases of patients with bronchial asthma in acute attack stage were selected as the study group, 40 cases of patients with bronchial asthma in non-acute stage were selected as the control group A, 40 cases of chronic bronchitis patients were selected as the control group B, 30 healthy volunteers served as control group C. Peripheral blood mononuclear cells and serum samples of four groups were tested, miR-126, IL-13 levels were detected, and the results of detection were compared. **Results** IL-13 levels of the study group, the control group A, the control group B were significantly higher than that of the control C ( $P < 0.0125$ ). MiR-126 levels of the study group and the control group were significantly higher than those of the control group B and control group C ( $P < 0.0125$ ). The level of miR-126 of the study group was significantly higher than that of the control group A ( $P < 0.0125$ ), there was no significant difference in miR-126 level between the control group B and the control group C ( $P > 0.0125$ ). The percentage of forced expiratory volume in one second of control C was significantly higher than that of the other three groups, and the percentage of forced expiratory volume in one second of control group A and control group B were significantly higher than that of the study group ( $P < 0.0125$ ). MiR-126 expression in peripheral blood mononuclear cells of patients with bronchial asthma was negatively correlated with the percentage of forced expiratory volume in one second ( $r = -0.718, P < 0.05$ ) and it was positively correlated with the level of serum IL-13 ( $r = 0.699, P < 0.05$ ). Area under the curve of miR-126 in diagnosis of bronchial asthma was 0.945. **Conclusion** MiR-126 expression increases in peripheral blood mononuclear cells of patients with bronchial asthma, and the level of miR-126 expression is closely related to the level of inflammatory factors in patients with lung function, with the severer of illness increasing, and with the remission of the disease decreasing. It can be used to evaluate the bronchial asthma severity index.

**Key words:** bronchial asthma; miR-126; peripheral blood mononuclear cells; acute stage

支气管哮喘是临床最为常见的一种慢性呼吸系统疾病,并且随着环境污染的加重、人口老龄化进程的推进,支气管哮喘的临床发病率也呈现出了明显的上升趋势。支气管哮喘是由多种细胞及细胞成分共同参与的气道慢性炎症性疾病,后天环境影响与先天遗传因素是该病的主要病因。MicroRNAs(miRNA)是一类非编码单链 RNA,其具有高度保守的遗传特点,广泛分布在循环体液及组织细胞中,其能与 mRNA 结合,通过降解目标 mRNA、阻断 mRNA 翻译来调节蛋白质合成<sup>[1]</sup>。有研究显示,miRNA-126(以下简称为 miR-126)在多种肿瘤疾病、慢性心力衰竭、肺部炎症疾病、2 型糖尿病等疾病的发病机制中均发挥着重要作用<sup>[2]</sup>。本研究旨在探讨 miR-126

表达在支气管哮喘病情严重程度评估中的应用价值,现将结果报道如下。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选取本院呼吸内科在 2014 年 5 月至 2015 年 5 月收治的 40 例处于急性发作期的支气管哮喘患者作为研究组,所有患者均符合《支气管哮喘防治指南》中的支气管哮喘诊断及分期标准<sup>[3]</sup>,并排除合并全身严重疾病及其他急慢性感染性疾病者、危重发作支气管哮喘患者。研究组中男 22 例、女 18 例,年龄 20~64 岁,平均(41.32±10.65)岁;选取本院同期收治的 40 例处于缓解期或慢性持续期(非急性发作期)的支气管哮喘患者作为对照 A 组,其中男 24 例、女 16 例,年龄 25~

66岁,平均(43.16±12.11)岁;选取40例慢性支气管炎患者作为对照B组,其中男23例、女17例,年龄23~69岁,平均(42.01±11.91)岁;另选取同期在本院进行健康体检的30例健康志愿者作为对照C组,其中男21例、女19例,年龄21~63岁,平均(40.98±9.87)岁。4组研究对象的性别构成比、年龄比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ ),具有可比性。

**1.2 方法** 研究组患者在确诊后,均积极采取吸氧、解痉平喘、祛痰等常规治疗措施,经治疗后,患者的哮喘症状明显缓解,但仍有胸闷、咳嗽、喘息、肺通气功能下降等症状,且这种状态至少能够稳定1个月,处于非急性发作期。对处于急性发作期和非急性发作期的研究组和对照A组分别采集2份外周静脉血,分别以标准抗凝管(2 mL)和标准生化管(5 mL)保存,分别用于分离外周血单核细胞和血清。

**1.2.1 miR-126 检测** 取新鲜抗凝血与生理盐水以1:1的比例混合均匀后,加入2 mL的细胞分离液离心20 min,离心后取收集第二层的乳白色单核细胞,再加入生理盐水混合均匀,离心20 min,将沉淀洗2次后,收集到所需的单核细胞。使用Trizol提取单核细胞的总RNA,然后配置变性琼脂糖凝胶,使用无菌二氧嘧啶甲酰氯对琼脂糖和水进行处理后,加热琼脂糖至溶解,待琼脂糖冷却至60℃时加入溴化乙锭混合均匀,倒胶。取RNA与上样缓冲液预混剂混合,进行恒压电泳,待溴酚蓝前沿移动至凝胶总长的2/3处停止。然后进行RNA反转录,再使用SYBR法测定miR-126浓度。miR-126的相对表达水平为: $2^{-\Delta\Delta Ct} = \Delta Ct$ 平均值-各样品的 $\Delta Ct$ 值( $\Delta Ct$ 为目的 $\Delta Ct$ 与内参 $\Delta Ct$ 的差值)。

**1.2.2 血清IL-13检测** 全血标本离心15 min后取上层清液置于-20℃的冰箱中保存待检。采用ELISA法进行血清IL-13浓度检测,严格按照试剂盒说明进行操作。

**1.2.3 一秒用力呼气容积(FEV1)占预测值百分比的检测** 患者静息20 min,使用肺功能仪连续检测3次肺通气功能,所检测到的结果中,若用力肺活量(FVC)和FEV1的变异度均小于5%,则判定为合格,最终结果取3次结果中的最大值。

**1.3 仪器与试剂** 仪器包括肺功能仪、台式冷冻离心机、摇床、荧光定量PCR仪、荧光PCR板、恒温水浴箱、电泳仪、漩涡混合器、冰箱、电子天平、酶标洗板机、酶标仪等。试剂包括琼脂糖、逆转录试剂盒、外周血淋巴细胞提取液、乙二胺四乙酸、Taq酶、IL-13试剂盒、dNTP、Trizol、SYB GREEN PCR Mix等。

**1.4 统计学处理** 采用SPSS19.0软件进行处理,符合正态分布的计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析;计数资料组间比较采用 $\chi^2$ 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。采用受试者工作特征曲线(ROC)分析miR-126表达在支气管哮喘患者病情严重程度中的诊断价值,以miR-126 $\geq 15$ 为阳性。

**2 结果**

**2.1 IL-13、miR-126、FEV1占预测值百分比水平的比较** 结果显示,研究组、对照A组、对照B组的IL-13水平均显著高于对照C组,差异有统计学意义( $P<0.0125$ )(4组研究对象两两比较时,检验水准 $\alpha=0.05/4=0.0125$ );对照B组的IL-13水平显著高于对照A组,差异有统计学意义( $P<0.0125$ );研究组和对照A组的miR-126水平均显著高于对照B组和对照C组,差异有统计学意义( $P<0.0125$ );研究组的miR-126水平显著高于对照A组,差异有统计学意义( $P<0.0125$ );对照B组与对照C组的miR-126水平比较差异无统计学意义( $P>0.0125$ )。对照C组的FEV1占预测值百分比显著高于其他3组,对照A组与对照B组的FEV1占预测值百分比均显著高于研究组,差异有统计学意义( $P<0.0125$ );对照A组与对照

B组的FEV1占预测值百分比比较差异无统计学意义( $P>0.0125$ )。见表1。

**表1 4组研究对象的IL-13、miR-126、FEV1占预测值百分比的比较( $\bar{x} \pm s$ )**

组别	n	IL-13 (ng/L)	miR-126	FEV1占预测值百分比(%)
研究组	40	121.28±47.50*	15.10±7.95*	65.21±7.53*
对照A组	40	88.10±25.87*#	8.62±2.85*#	89.54±3.82*#
对照B组	40	100.87±30.41*#△	3.65±1.79#△	90.12±3.71*#
对照C组	30	40.51±18.20	3.41±1.87	99.31±6.07

注:与对照C组比较,\* $P<0.0125$ ;与研究组比较,# $P<0.0125$ ;与对照A组比较,△ $P<0.0125$

**2.2 IL-13、FEV1占预测值百分比与miR-126的相关性** 运用Pearson相关,对支气管哮喘患者外周血单核细胞中的miR-126表达水平与FEV1占预测值百分比、血清IL-13水平的相关性进行分析,结果显示miR-126表达水平与FEV1占预测值百分比呈负相关( $r=-0.718, P<0.05$ ),与血清IL-13水平呈正相关( $r=0.699, P<0.05$ )。

**2.3 ROC曲线分析** 以1-特异度为横坐标,以灵敏度为纵坐标,采用ROC曲线进行分析,结果显示,ROC曲线下面积为0.945,提示miR-126检测对支气管哮喘病情评估具有一定的准确性。

**3 讨论**

目前,临床研究已证实有20余种miRNA与支气管哮喘疾病有着密切联系,国外早期有学者对miR-126与哮喘疾病之间的相关性进行研究,证实其与哮喘的发生有着密切联系。国外有学者对由屋尘螨致敏的小鼠哮喘模型的下气道组织中的miRNAs表达进行了检测,结果发现哮喘小鼠的miR-16、miR-21、miR-126表达明显升高<sup>[4]</sup>。由于屋尘螨主要的致敏成分是脂多糖,其能通过TLR4信号通路激活免疫炎症反应,故上述研究者又对敲除了TLR4的屋尘螨致敏小鼠进行了检验,结果显示这些小鼠气道组织中的miR-126表达并未增加,这提示miR-126可能是通过调节TLR4水平来参与哮喘发病的。文献<sup>[5]</sup>报道,对卵清蛋白致敏小鼠进行miR-126检测,结果发现气道组织中的miR-126水平明显升高,并且这种升高状态在接下来的4周内均未明显下降。从上述研究结果来看,可以推测出miR-126高表达在支气管哮喘气道炎症中发挥着至关重要的作用。本次研究结果显示,不论是处于急性发作期还是非急性发作期的支气管哮喘患者,其外周血单个核细胞检出的miR-126水平均显著高于健康者和慢性支气管炎患者( $P<0.0125$ ),这一结果与前述诸篇文献报道结果均相符,提示miR-126可能参与支气管哮喘气道炎症,并且miR-126对支气管哮喘的诊断有一定的特异性。

关于支气管哮喘miR-126表达水平与病情严重程度相关性的研究,国外有动物模型实验显示小鼠在吸入卵清蛋白7 d后,下呼吸道组织中的miR-126水平明显升高,并在第14天达到最高,与此同时,小鼠的炎症指标、气道高反应也达到最高峰,在小鼠哮喘症状逐渐缓解后,miR-126水平也随之下降,但是最终未能达到基线水平<sup>[6]</sup>。另外,还有动物实验研究显示<sup>[7]</sup>,二异氰酸甲苯酯(TDI)致敏急性哮喘小鼠在吸入TDI后,miR-126水平就开始升高,吸入TDI后2 h,小鼠的miR-126水平显著高于基线值,并且在6 h左右达到最高峰,之后miR-126水平逐渐下降,但2周后仍未降至基线水平,总体来看,小鼠的miR-126水平变化趋势与其他细胞因子、炎症指标保持一致。本次研究结果显示,研究组的miR-126水平显著高于对照B组( $P<0.0125$ )。这一结果与前述研究结果基本相

符,推测 miR-126 表达水平与支气管哮喘病情严重程度可能有正相关关系。在支气管哮喘的发病机制中,IL-13 占据着重要地位,是最重要的 Th2 效应细胞因子,可造成气道炎症反复发作,气道炎症反复会引起可逆性气道受限、气道重建、气道高反应等病理生理改变,进而引发哮喘<sup>[8]</sup>。本次研究结果显示,研究组、对照 A 组的 IL-13 水平均显著高于对照 C 组,并且研究组的 IL-13 水平明显比对照 A 组更高( $P < 0.0125$ ),并且支气管哮喘患者的血清 IL-13 表达变化趋势与 miR-126 保持一致,这一结果与前述文献报道相符。

目前,还有不少研究对 miRNA 与支气管哮喘患者肺功能的相关性进行了研究,结果发现支气管哮喘患者 miR-155 表达水平显著低于健康对照组,而支气管哮喘患者的肺功能指标 FEV1 占预测值百分比与外周血 miR-155 水平呈正相关关系,说明 miRNAs 表达水平与哮喘疾病严重程度密切相关<sup>[9-10]</sup>。本次研究中,支气管哮喘急性发作期患者的 miR-126 水平显著高于健康者,而 FEV1 占预测值百分比则显著低于健康者,并且急性发作期的 FEV1 占预测值百分比水平显著低于非急性发作期( $P < 0.0125$ )。相关性分析显示,支气管哮喘患者外周血单核细胞中的 miR-126 表达水平与 FEV1 占预测值百分比呈负相关( $r = -0.718, P < 0.05$ ),与血清 IL-13 水平呈正相关( $r = 0.699, P < 0.05$ )。这一结果与前述文献报道完全相符。这提示支气管哮喘患者的肺功能、炎症水平与 miR-126 表达有着密切联系。

综上所述,支气管哮喘患者的外周血单核细胞中存在 miR-126 表达增加,并且 miR-126 表达水平与患者的肺功能、炎症因子水平密切相关。miR-126 表达随病情的加重而增多,随病情的缓解而下降,其可作为评估支气管哮喘病情严重程度的指标,具有重要的临床价值。

参考文献

[1] 刘峰,秦厚兵,周瑶,等. ADAM-33 相关 miR 在支气管哮

喘小鼠中的表达[J]. 临床与实验病理学杂志,2012,28(12):1368-1371.

[2] 朱继文,张道纪,阎红,等. 外周血检测 miR-21 方法的建立及在支气管哮喘中的应用[J]. 检验医学,2012,27(12):1043-1046.

[3] 中华医学会呼吸病学分会哮喘学组. 支气管哮喘防治指南(支气管哮喘的定义、诊断、治疗和管理方案)[J]. 中华结核和呼吸杂志,2008,31(3):177-185.

[4] 徐庆雷,朱宝林,马小波,等. 哮喘患儿外周血单个核细胞 microRNA-206 表达及意义[J]. 临床儿科杂志,2015,33(2):105-108.

[5] 张莺莺,钟民,张梦莹,等. 过敏性哮喘患者外周血 CD4<sup>+</sup> T 细胞中 miR-155 的表达及临床意义[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2012,28(5):540-543.

[6] 陈培芬,邱智辉,黄国华,等. Anti-miR-145 促进人气道平滑肌细胞增殖及骨桥蛋白合成[J]. 南方医科大学学报,2015,35(7):1073-1075.

[7] 李海燕,郭琦,陈如冲,等. JunB 在实验性支气管哮喘中的作用[J]. 海南医学,2013,24(6):781-784.

[8] 梁景强,梁燕芳. 支气管哮喘患者外周血 IL-18mRNA 及 IgE 的表达及其意义[J]. 海南医学,2010,21(4):100-102.

[9] 刘金石,李琦,李敏,等. 黏附分子和细胞因子在支气管哮喘中的变化及意义[J]. 检验医学与临床,2012,9(12):1457-1458.

[10] 甘明,易运林,李小玲,等. 支气管哮喘患者诱导痰 EOS ECP 及血清 IL-13 水平检测及其意义[J]. 检验医学与临床,2012,9(5):578-580.

(收稿日期:2017-03-01 修回日期:2017-05-09)

(上接第 2232 页)

and Neck Cancer[J]. Jacobs J Radiat Oncol,2014,1(1):006.

[2] Meng XC, Jiang T, Yi SH, et al. Renal aspergillosis after liver transplantation: Clinical and imaging manifestations in two cases [J]. World J Gastroenterol, 2014, 20 (48): 18495-18502.

[3] 张伟,李玉军,刘燕,等. 肾嗜酸细胞腺瘤 10 例临床病理分析[J]. 诊断病理学杂志,2011,18(1):5-8.

[4] Zhuang B, Lv DK, Gao SJ, et al. Differential Diagnosis of CT Images in Children with Neuroblastomas and Gangli- oneuroblastomas [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014, 15 (23):10509-10512.

[5] Wu Y, Du L, Li F, et al. Renal oncocytoma: Contrast- enhanced sonographic features [J]. J Ultrasound Med, 2013, 32(3):441-448.

[6] Haifler M, Copel L, Sandbank J, et al. Renal oncocytoma are there sufficient grounds to consider surveillance following pre-nephrectomy histologic diagnosis [J]. Urol Oncol, 2012, 30(4):362-368.

[7] Kruck S, Hennenlotter J, Vogel U, et al. Exposed proliferation antigen 210 (XPA-210) in renal cell carcinoma (RCC) and oncocytoma: Clinical utility and biological im-

plications [J]. BJU Int, 2012, 109(4):634-638.

[8] Sari A, Calli A, Altinboga AA, et al. Nucleophosmin expression in renal cell carcinoma and oncocytoma [J]. AP- MIS, 2012, 120(3):187-194.

[9] Ehsani L, Seth R, Bacopulos S, et al. BCA2 is differentially expressed in renal oncocytoma: an analysis of 158 renal neoplasms [J]. Tumour Biol, 2013, 34(2):787-791.

[10] Childs MA, Breau RH, Umbreit EC, et al. Metachronous renal tumours after surgical management of oncocytoma. [J]. BJU Int, 2011, 108(6):816-819.

[11] 宣蓓蕾,陈以明,刘强,等. CK7 和 S100A1 在嫌色细胞肾细胞癌和肾嗜酸细胞腺瘤中的表达及鉴别意义 [J]. 上海交通大学学报(医学版), 2013, 33(1):118-120.

[12] 强军,高万勤,关文华,等. 肾嗜酸细胞腺瘤的 CT 诊断 [J]. 实用放射学杂志, 2011, 27(1):90-91.

[13] 何为,刘剑羽. 肾嗜酸细胞腺瘤与透明细胞癌的多期螺旋 CT 增强特征对比研究 [J]. 中华放射学杂志, 2011, 45 (12):1203-1206.

[14] 潘平,赵力. 肾嗜酸细胞腺瘤的动态增强 CT 征象分析 [J]. 大连医科大学学报, 2011, 33(2):134-138.

(收稿日期:2017-03-03 修回日期:2017-05-11)