

血浆 microRNA 在接触职业性噪声男性工人中的表达

丁璐^{1,2}, 刘静², 潘丽萍², 刘庆东², 丁恩民², 赵秋妮², 王博深², 朱宝立^{2*}

(¹ 苏州市疾病预防控制中心, 江苏 苏州 215000; ² 江苏省疾病预防控制中心职业病防治所, 江苏 南京 210024)

[摘要] 目的:探讨男性工人血浆 miRNA 在非接噪组、接噪组和高频听损组之间的差异表达。方法:30 例男性工人分为非接噪组、接噪组和高频听损组,对其 miRNA 的差异表达进行芯片初筛,再用 qRT-PCR 验证 6 个 miRNA 是否存在差异表达,然后借助 GO 富集分析和 KEGG 信号通路分析预测 miRNA 推定靶基因可能参与调控的生物学过程和功能。结果:与非接噪组比,接噪组血浆 let-7d($P=0.002$)、miR-16($P < 0.001$)、miR-24($P < 0.001$)、miR-185($P < 0.001$) 和 miR-451a($P=0.011$) 表达均显著下调;与接噪组相比,高频听损组血浆 miR-16($P < 0.001$) 表达显著上调,且与芯片结果一致。结论:let-7d、miR-16、miR-24、miR-185 和 miR-451a 可能参与调控机体对噪声刺激的反应过程,并且 miR-16 有前景成为噪声导致高频听力损伤的生物标志。

[关键词] 血浆;microRNA;噪声;差异表达;生物标志;生物信息学预测

[中图分类号] R852.24

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2016)01-090-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20160119

随着国内工业化进程加快,机械化生产加工已成常态,许多操作工人在工作环境中接触职业性有害噪声[8 h 等效声级 ≥ 85 dB(A)]。然而,长期接触有害噪声可能会导致噪声性听力损失,并具有渐进性发展的特点,患者听力首先从高频段(3 000、4 000、6 000 Hz)开始下降,严重时逐步蔓延至语音频段(500、1 000、2 000 Hz)。miRNA 作为一类非编码的小 RNA 分子,对完全发育成熟组织应对生理性和病理性的刺激影响深远^[1]。血浆/血清 miRNA 有前景作为疾病或生理状态的生物标志,已在学术界引起诸多关注^[2-7],但至今未见其在职业性噪声和听力损失研究领域的报道。为此,我们探索男性工人血浆 miRNA 在非接噪组、接噪组和高频听损组中是否存在差异表达,以考察血浆 miRNA 表达和噪声暴露的关联性,并试图寻找高频听力损伤无创性生物标志。

1 对象与方法

1.1 对象

30 例男性工人,包括:10 例不接触有害噪声且听力正常工人(非接噪组,连云港灌云农村商业银行);10 例长期接触职业性有害噪声但听力正常者(接噪组,扬州仪征化纤有限公司);10 例长期接触职业性噪声且有高频听力损失者(高频听损

组,扬州仪征化纤有限公司)。听力正常:双耳听阈所有频率均 ≤ 25 dB;高频听力损失:双耳高频率(3 000、4 000、6 000 Hz)听阈 ≥ 26 dB,语频(500、1 000、2 000 Hz)听阈 ≤ 25 dB。接触职业性有害噪声:噪声强度在 85~130 dB 声压级(SPL),至少连续 3 年从事稳态噪声作业。匹配因素:年龄(± 3 岁)、性别(男性)、吸烟状态、噪声暴露强度和噪声暴露工龄。受试者被划为曾吸烟者指其累计吸烟量超过 100 支香烟。通过面对面的调查问卷和职业卫生监测资料获得信息。血浆样本于 2010 年 4 月—2012 年 5 月采集,并保存在 -80°C 低温冰箱。

1.2 方法

1.2.1 芯片初筛

微阵列芯片实验由美国 LC Sciences 公司完成,在 μ Paraflo[®] 微流体芯片上过夜进行初筛。

1.2.2 qRT-PCR 验证

选择在接触噪声有听力损失的人群和接触噪声但听力正常的人群中差异表达倍数 ≥ 1.5 的 miRNA 进行验证。

采用 miRNeasy Serum/Plasma Kit (cat. no. 217184, QIAGEN 公司,德国) 纯化总 RNA,在每个血浆样本中人为加入秀丽隐杆线虫 RNA 序列 cel-miR-238 (25 fmol;大连 TaKaRa 公司)作为内参。

逆转录和扩增采用 TaqMan 检测试剂盒(ABI 公司,美国),血浆样本 miRNA 的表达水平都要扣除 cel-miR-238 的表达量以进行标化。miRNA 相对表达水平用 $2^{-\Delta\text{Ct}}$ 衡量,其中 $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{miRNA}} - \text{Ct}_{\text{cel-miR238}}$;差

[基金项目] 江苏省医学领军人才项目(LJ201130)

*通信作者(Corresponding author),E-mail:zhubl@jscdc.cn

异倍数用 $2^{-\Delta\Delta C_t(\text{目的})}/2^{-\Delta\Delta C_t(\text{对照})}$ 表示。

1.2.3 生物信息学分析

借助 Targetscan (<http://www.targetscan.org>)、Pictar (<http://pictar.mdc-berlin.de>) 和 miRanda (<http://www.microrna.org/microrna/home.do>) 软件平台, 最终收集 3 个软件平台共同命中的靶基因记录, 以提高准确性。同时, 利用 David 6.7 (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>) 软件进行 GO 富集分析和 KEGG 信号通路分析。

1.3 统计学方法

采用 SPSS13.0 统计学分析软件, 年龄、接噪强度和接噪工龄用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 进行描述。3 组间的年龄和性别比较采用单因素方差分析, 吸烟状态用 Pearson 卡方检验; 两个接噪组间的接噪强度、接噪工龄、miRNA 的相对表达水平比较用独立样本 *t* 检验。 $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 受试者特征

为保证 3 组数据均衡可比, 我们对受试者年龄、性别和吸烟状态进行匹配(表 1)。单因素方差分析的结果显示: 3 组受试者的年龄 ($P = 0.982$) 和性别 ($P = 1.000$) 差异均无统计学意义。Pearson 卡方检验的结果显示: 3 组受试者的吸烟状态 ($P = 0.569$) 差异无统计学意义。独立样本 *t* 检验的结果显示: 接触噪声的两组受试者平均接触噪声的强度 ($P = 0.909$) 和平均接触噪声工龄 ($P = 0.605$) 的差异均无统计学意义。

表 1 受试者基本信息

组别	年龄(岁)		吸烟(曾/从未)	性别(男/女)	接噪强度(db)	接噪工龄(年)
	平均值	范围				
非接噪组	40.0 \pm 5.0	34~49	7/3	10/0	-	-
接噪组	39.8 \pm 4.9	34~47	8/2	10/0	92.9 \pm 4.3	16.2 \pm 6.1
高频听损组	39.8 \pm 4.9	34~47	8/2	10/0	92.7 \pm 4.9	15.0 \pm 5.6
<i>P</i> 值	0.982	-	0.569	1.000	0.909	0.605

2.2 芯片分析

根据 Sanger miRBase 发布的 20.0 版本(<http://www.sanger.ac.uk/Software/Rfam/mirna/>), 芯片实验共计检测 2 557 条人 miRNA 序列。将接噪组和高频听损组的各 10 个血浆样本分别混合成总量为 1.2 mL 的两个血浆池, 用于芯片实验。两组表达的聚类分析见图 1, 两组中均检测到的 miRNA 数为 174 条。

2.3 初步验证和接触职业性噪声有关的 miRNA

选择 5 个差异表达倍数 ≥ 1.5 的 miRNA 分子:

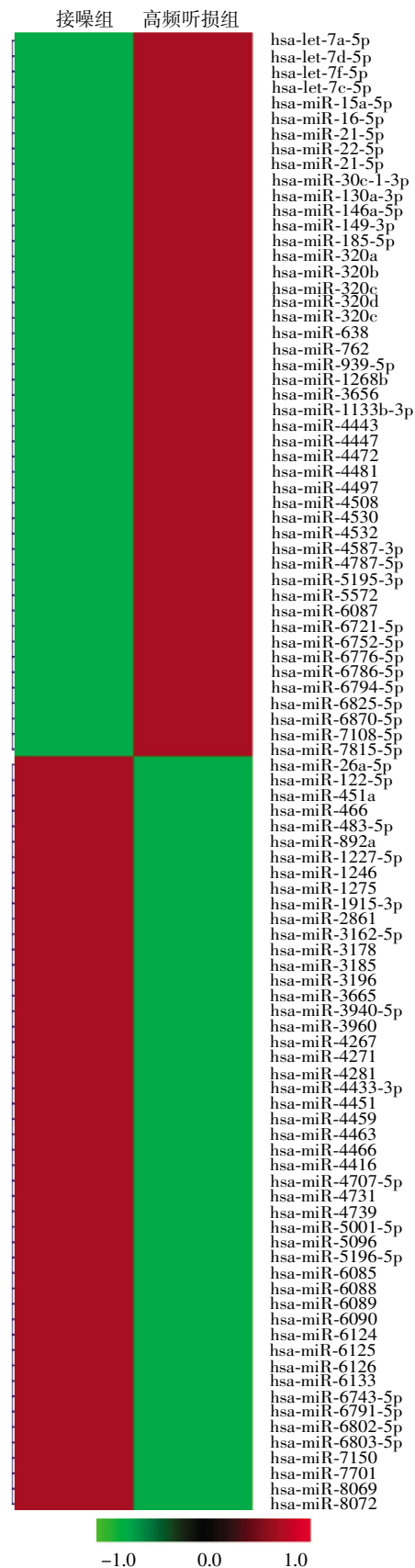


图 1 接触噪声的两组人群芯片结果的聚类分析

hsa-let-7d-5p、hsa-miR-15a-5p、hsa-miR-16-5p、hsa-miR-24-3p、hsa-miR-185-5p 及表达信号值最高的

hsa-miR-451a, 通过 qRT-PCR 技术比较它们在非接噪组和接噪组以及接噪组和高频听损组中的相对表达量(图 2)。结果显示:相较于非接噪组,接噪组的 miRNA 表达量均下降且与芯片趋势一致,其中 let-7d ($P=0.002$)、miR-16 ($P < 0.001$)、miR-24 ($P < 0.001$)、miR-185 ($P < 0.001$)、miR-451a ($P=0.011$) 差异均有统计学意义,miR-15a ($P=0.126$) 差异无统计学意义;相较于接噪组,高频听损组的 miR-16 表达上升且有统计学差异 ($P < 0.001$),miR-185 表达有统计学差异 ($P=0.002$) 但与芯片的趋势相反,其他 4 个

指标差异均无统计学意义。

2.4 对推定靶基因的生物功能分析

为了探索这 5 个可能与职业性噪声接触有关 miRNA 的生物学功能,我们对其进行了靶基因预测。各个有前景的 miRNA 预测到的靶基因数目如下:hsa-let-7d-5p 10 个、hsa-miR-16-5p 37 个、hsa-miR-24-3p 277 个、hsa-miR-185-5p 90 个、hsa-miR-451a 164 个。GO 富集功能分析提示这些靶基因主要涉及 15 个生物学功能,包括:细胞内信号通路、血浆膜成分和镁离子绑定等(表 2)。

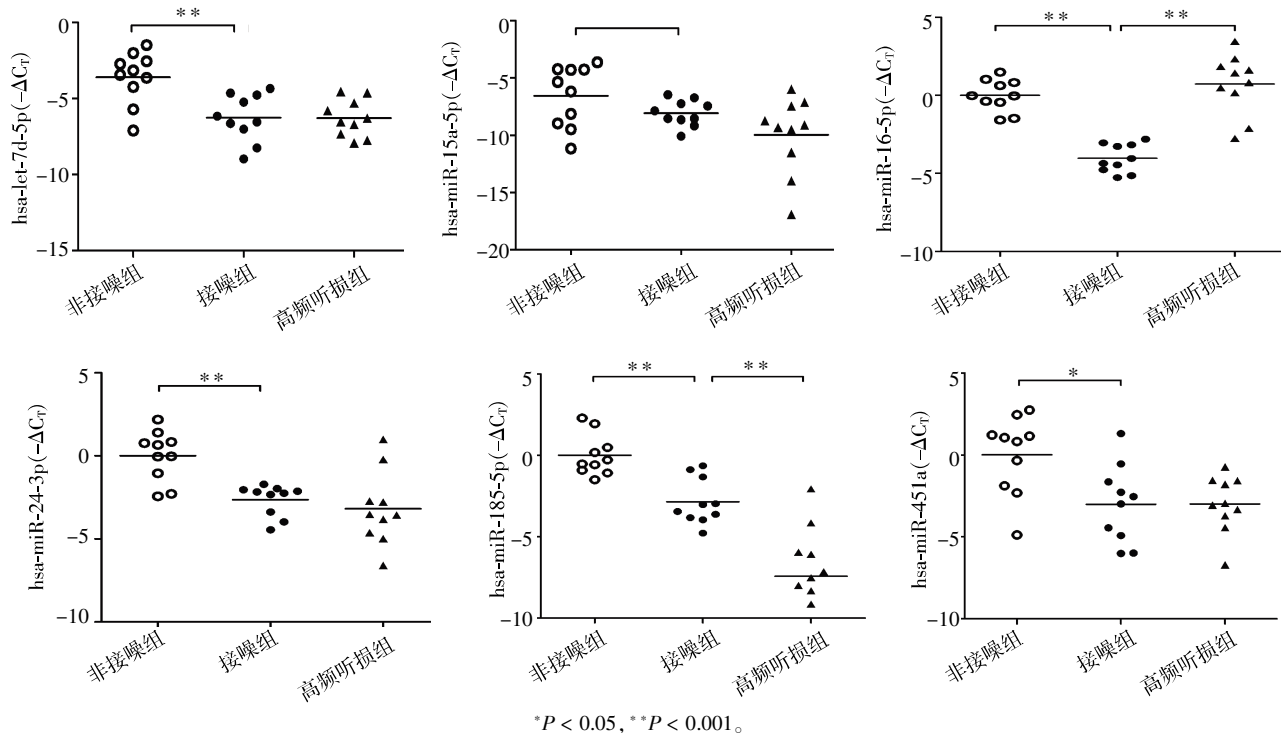


图 2 6 个 miRNA 的差异表达

3 讨论

单次或反复暴露于创伤性的噪声水平 (> 130 dB SPL) 可能会彻底破坏耳蜗结构,导致直接的机械损伤。然而职业性噪声聋一般由长期暴露于较高强度的噪声引起(并非是创伤性水平),这很可能导致耳蜗的代谢损伤^[8]。为了探讨接触职业噪声引起损伤的一般机制,我们限定了职业噪声暴露的条件,即噪声暴露强度 80~130 dB SPL、连续职业性噪声暴露的工龄 > 3 年,这是职业性噪声聋发生的常见模式。本研究中仅纳入男性工人,因为女性在所有可利用的血浆样本中比例很低,不超过 10%,即缺少代表性。因此,本研究数据仅阐述在男性工人中发现的成果。许多研究的结果指出:吸烟可能会加剧职业性噪声对机体损害的效应^[9-11],因此,我们将吸烟状态也

列入匹配条件。各组受试者年龄、性别和吸烟状态,接触噪声的两组劳动者噪声接触强度和接触工龄间差异均无统计学意义,具有可比性。

本研究旨在为职业性噪声接触早期损伤的机制提供新思路,也为接触性生物标志研究提供一定理论基础。目前许多研究的结果提示:环境因素的刺激可能会导致 miRNA 表达的改变^[12-13]。据我们所知,尽管文献中已有对这几个有前景的 miRNA 功能的探讨,但这是第一个在职业人群中探索职业性噪声暴露和血浆 miRNA 表达的关联性研究。文献报道提示:let-7 家族调节的靶标可能参与毛细胞再生^[14]。miR-24-3p 和 miR-16-5p 可能均参与调控 DNA 损伤反应的信号通路^[15-16]。miR-185-5p 可能和细胞内对 DNA 损伤的反应有关^[17]。miR-451a 可能参与对氧化性损伤易感性的调节^[18]。值得一提的是,在

表 2 可能编码 miRNA 靶基因的生物功能富集分析

ID	描述	P 值
GO:0007242	细胞内信号级联反应	0.009 9
GO:0051270	细胞运动调节	0.000 0
GO:0030334	细胞迁移调节	0.000 0
GO:0040012	移动调节	0.000 1
GO:0016192	囊泡介导的运输	0.001 5
GO:0045596	负调控细胞分化	0.001 9
GO:0008284	正调控细胞增殖	0.003 5
GO:0007264	小 GTP 酶介导的信号转导	0.007 5
GO:0044421	细胞外区域部分	0.002 9
GO:0044459	血浆膜部分	0.003 5
GO:0070161	锚定接合	0.006 2
GO:0005912	粘着接合	0.008 3
GO:0005783	内质网	0.008 3
GO:0019838	生长因子绑定	0.000 4
GO:0000287	镁离子绑定	0.008 2

一项研究多环芳烃暴露和工人血浆 miRNA 表达差异的研究中显示:miRNA 表达水平和多环芳烃暴露表现出副关联,即在暴露工人的血浆 miRNA 呈下调趋势^[19],这也与本研究得出的结论相符。另一方面,与接噪组相比,miR-16 的表达在高频听损工人中显著上升,提示 miR-16 有前景作为噪声导致听力早期损伤的生物标志。然而,由于这 5 个 miRNA 仅在较小的样本量中进行验证,其与接触职业性噪声的关联性仍需扩大人群验证和进一步的功能学探讨。

[参考文献]

[1] Leung AK,Sharp PA. MicroRNA functions in stress responses[J]. *Mol Cell*,2010,40(2):205-215

[2] 赵康辰,崔仑标,史智扬. 血清/血浆 microRNA 及其应用[J]. *医学分子生物学杂志*,2010,7(2):180-183

[3] Creemers EE,Tijssen AJ,Pinto YM. Circulating MicroRNAs novel biomarkers and extracellular communicators in cardiovascular disease? [J]. *Circ Res*,2012,110(3):483-495

[4] Chen X,Ba Y,Ma L,et al.Characterization of microRNAs in serum;a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases[J]. *Cell Res*,2008,18(10):997-1006

[5] Mitchell PS,Parkin RK,Kroh EM,et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2008,105(30):10513-10518

[6] Lawrie CH,Gal S,Dunlop HM,et al. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma[J]. *Br J Haematol*,2008,141(5):672-675

[7] Etheridge A,Lee I,Hood L,et al. Extracellular microR-

NA;a new source of biomarkers[J]. *Mutat Res*,2011,717(1/2):85-90

[8] Konings A, Van Laer L, Van Camp G. Genetic studies on Noise-Induced hearing loss;a review [J]. *Ear Hear*,2009,30(2):151-159

[9] Tao LY,Davis R,Heyer N,et al. Effect of cigarette smoking on noise-induced hearing loss in workers exposed to occupational noise in China [J]. *Noise Health*,2013,15(62):67-72

[10] Shen HX,Cao JL,Hong ZQ,et al. A functional Ser326Cys polymorphism in hOGG1 is associated with Noise-Induced hearing loss in a Chinese population [J]. *PLoS One*,2014,9(3):e89662

[11] Palmer KT,Griffin MJ,Syddall HE,et al. Cigarette smoking,occupational exposure to noise,and self reported hearing difficulties [J]. *Occup Environ Med*,2004,61(4):340-344

[12] Jardim MJ,Fry RC,Jaspers I,et al. Disruption of MicroRNA expression in human airway cells by diesel exhaust particles is linked to tumorigenesis-associated pathways [J]. *Environ Health Perspect*,2009,117(11):1745-1751

[13] Bollati V,Marinelli B,Apostoli PA,et al. Exposure to Metal-Rich particulate matter modifies the expression of candidate microRNAs in peripheral blood leukocytes [J]. *Environ Health Perspect*,2010,118(6):763-768

[14] Tsonis PA,Call MK,Grogg MW,et al. MicroRNAs and regeneration:Let-7 members as potential regulators of dedifferentiation in lens and inner ear hair cell regeneration of the adult newt [J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2007,362(4):940-945

[15] Oda Y,Nakajima M,Mohri T,et al. Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator in human liver is regulated by miR-24 [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*,2012,260(3):222-231

[16] Wang YM,Taniguchi T. MicroRNAs and DNA damage response implications for cancer therapy [J]. *Cell Cycle*,2013,12(1):32-42

[17] Qu F,Cui X,Hong Y,et al. MicroRNA-185 suppresses proliferation,invasion,migration,and tumorigenicity of human prostate cancer cells through targeting androgen receptor [J]. *Mol Cell Biochem*,2013,377(1/2):121-130

[18] Yu DN,Dos Santos CO,Zhao GW,et al. miR-451 protects against erythroid oxidant stress by repressing 14-3-3 zeta [J]. *Genes Dev*,2010,24(15):1620-1633

[19] Deng QF,Huang SL,Zhang X,et al. Plasma microRNA expression and micronuclei frequency in workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons [J]. *Environ Health Perspect*,2014,122(7):719-725