

## mir-124-3p/SPOCK2 在急性呼吸窘迫综合征早产儿血浆中表达的临床研究

凌 岚,管亚飞,马方方,陆 超,胡毓华\*

(南京医科大学第一附属医院儿科,江苏 南京 210029)

**[摘要]** 目的:探讨测定急性呼吸窘迫综合征早产儿血浆中 mir-124-3p 和 SPOCK2 蛋白的临床意义,为早产儿严重肺损伤寻找新的高危因子和治疗靶标。方法:根据早产儿呼吸窘迫综合征(respiratory distress syndrome, RDS)诊断标准,早产儿分成 RDS 组 17 例及对照组(无 RDS 等并发症的普通早产儿)21 例。采用 ELISA 和 Western blot 法测定外周血浆中和体外培养的人肺成纤维细胞中的 SPOCK2 蛋白。采用 TargetScan 分析与 SPOCK2 基因 3'末端非编码区结合的可能 miRNA,并用荧光实时定量 RT-PCR 扩增候选 miRNA。采用 Pearson 统计方法对血浆中 SPOCK2 蛋白和 miRNA 进行相关分析。构建 mir-124-3p 慢病毒载体,并转染人肺成纤维细胞,研究 mir-124-3p 过表达对 SPOCK2 蛋白表达的影响。结果:对照组早产儿血浆中 SPOCK2 蛋白浓度为  $(7.24 \pm 0.43) \mu\text{g/L}$ ,而 RDS 组升高为  $(16.43 \pm 0.54) \mu\text{g/L}$ ,两组间比较差异有统计学意义( $t=12.81, P < 0.01$ )。SPOCK2 基因 3'末端存在 mir-124-3p、mir-25-3p、mir-122-5p 等候选的 miRNA 结合位点。荧光定量 RT-PCR 证实外周血中不能测到 mir-25-3p、mir-122-5p。mir-124-3p 表达在对照组中较高,在 RDS 组中显著降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。并且 mir-124-3p 的表达量与 SPOCK2 蛋白血浆水平呈负相关( $r=-0.6459, P=0.0126$ )。mir-124-3p 慢病毒载体转染可以显著抑制人肺成纤维细胞中 SPOCK2 蛋白的表达。结论:测定早产儿血浆中 SPOCK2 蛋白,可能对 RDS 等肺疾病的病情评估有一定临床意义。利用 mir-124-3p 调控 SPOCK2 蛋白表达,可能对早产儿 RDS 等严重肺损伤的治疗有潜在应用价值。

**[关键词]** 早产儿;SPOCK2;肺损伤

**[中图分类号]** R722.12

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2016)05-615-05

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20160521

## The clinical values of mir-124-3p and SPOCK2 protein detection in serums of preterm infants with RDS

Ling Lan, Guan Yafei, Ma Fangfang, Lu Chao, Hu Yuhua\*

(Department of Pediatric, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the clinical values of detection for SPOCK2 protein in serums of preterm infants and to determine a novel risk factor and therapeutic target against serious lung injuries of premature neonates. **Methods:** Upon diagnostic criteria of Respiratory Distress Syndrome (RDS), premature infants were divided into Group RDS (17 cases) and control (21 cases without RDS). ELISA and Western blot were performed to investigate the serum levels of SPOCK2 protein in every groups and expressions of SPOCK2 in human lung fibroblasts, respectively. The noncoding region in 3 terminal of SPOCK2 gene was analyzed to scan candidate binding sites of microRNA with software TargetScan online and followed verification was performed by fluorescence real-time quantification PCR. Person method was used to analyze the correlation between SPOCK2 and microRNA. The lentiviral vector of mir-124-3p was constructed and transfected into human lung fibroblasts. The regulatory effect of mir-124-3p on SPOCK2 expression was studied by Western blotting. **Results:** The serum levels of SPOCK2 protein in Group RDS were  $16.43 \pm 0.54 \mu\text{g/L}$ , which was higher than that of control ( $7.24 \pm 0.43 \mu\text{g/L}, t=12.81, P < 0.01$ ). There were several microRNAs located in the 3 terminal of SPOCK2 gene, including mir-124-3p, mir-25-3p, and mir-122-5p. However, mir-25-3p and mir-122-5p failed to be observed in serums of preterm infants. The expression of mir-124-3p was negatively correlative with that of SPOCK2 protein in preterm infants with lung injury ( $r=-0.6459, P=0.0126$ ). Mir-124-3p overexpression markedly suppressed the expression of SPOCK2 protein in human fibroblasts. **Con-**

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81170487);江苏省妇幼保健重点学科项目(FXK201212)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: wqm403-19h@163.com

**clusion:** The detection of SPOCK2 protein in serum benefitted evaluating severity of preterm infants with RDS. Mir-124-3p down-regulated the expression of SPOCK2 protein, which might be helpful to build a novel therapeutic strategy against lung injury of premature neonates.

**[Key words]** preterm infants; SPOCK2; lung injury

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(05): 615-619]

早产儿胎龄越小、出生体重越轻,预后越差。部分早产儿发生呼吸窘迫综合征(respiratory distress syndrome, RDS)。临床表现为早期呼吸窘迫,包括发绀、呻吟、吸气性三凹征和呼吸急促,如不及时治疗,可因进行性缺氧和呼吸衰竭而死亡。部分存活的患儿由于长时间吸入高体积分数氧、高压力的机械通气或感染及其他不良因素而导致支气管肺发育不良(bronchopulmonary dysplasia, BPD),严重影响早产儿存活率及生活质量,并给家庭和社会带来沉重的负担<sup>[1-3]</sup>。

最新研究发现,SPOCK2 (SPARC/osteonectin, CWCV, and Kazal-like domains proteoglycan 2) 基因与早产儿肺损伤及支气管肺发育不良的发生密切相关。本研究探讨了早产儿 RDS 患者测定 SPOCK2 的临床意义,现汇报如下。

## 1 对象和方法

### 1.1 对象

收集本院新生儿病区 2012 年 1 月—2015 年 8 月的早产儿。胎龄 28.0~34.9 周,出生体重 1.008~1.500 kg。分成 RDS 组 17 例及对照组(无 RDS 等并发症的普通早产儿)21 例。RDS 组与对照组患儿的胎龄、出生体重无差异。

早产儿 RDS 入选标准<sup>[4-5]</sup>:①胎龄<35 周;②在出生 12 h 内出现呼吸窘迫(包括发绀、呻吟、吸气三凹征和呼吸急促),且进行性加重;③吸室内空气时经皮血氧饱和度低于 85%~87%,或动脉血气分析血氧分压(PaO<sub>2</sub>)<50 mmHg、出现中央性发绀、需吸氧才能维持 PaO<sub>2</sub>>50 mmHg;④胸部 X 线表现为磨玻璃样改变和支气管充气征;⑤或尚无典型 RDS 改变,但排除其他肺部疾病。检测征得家长知情同意,并通过伦理委员会批准。

### 1.2 方法

所有入选患儿均按照早产儿 RDS 管理的欧洲共识指南处理<sup>[6]</sup>,包括气管插管给予肺磷脂注射液、机械通气及各种相关治疗与护理。

#### 1.2.1 SPOCK2 蛋白的测定

各组病例入院后取外周血 2 mL,分离血浆,采用 ELISA 方法测定血浆中 SPOCK2 蛋白水平,按 ELISA 试剂盒说明书进行。超出 ELISA 试剂盒检测范围的采用 Western blot 法测定。对体外培养的人肺成纤维细胞中 SPOCK2 蛋白按照 Western blot 测定试剂盒说明书进行。抽提蛋白质,定量。进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜后,加抗 SPOCK2 蛋白抗体孵育,缓冲液漂洗后,加二抗孵育。化学发光法曝光。条带吸光度与内参照  $\beta$ -actin 比较后,统计分析。

培养的人肺成纤维细胞予转染处理 24 h 后按上述步骤抽提蛋白和测定。

#### 1.2.2 实时定量 RT-PCR 测定早产儿外周血 mir-124-3p、mir-25-3p、mir-122-5p 等 miRNA 的表达量

收集患者外周血 2 mL 置于含乙二胺四乙酸(EDTA)的试管中,离心取上清液。按照 RNA 提取试剂盒 TRIzol Reagent (Invitrogen 公司,美国)的操作说明提取总 RNA。应用 iScript cDNA synthesis kit 反转录试剂盒(Bio-Rad 公司,美国),按照说明书将 1  $\mu$ g 总 RNA 反转录为 cDNA,用 iQTM SYBR<sup>®</sup> Green Supermix 试剂盒(Bio-Rad 公司,美国),按照说明书进行实时荧光定量 PCR。以管家基因 GAPDH 作为内参照。运用 Premier 软件设计特异性引物并合成。实时荧光定量 PCR 检测在 Bio-Rad iQ5 定量 PCR 仪器上进行反应。PCR 反应循环条件:第 1 步,95 $^{\circ}$ C 预热 2 min;第 2 步,95 $^{\circ}$ C 30 s、58 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 30 s,共 40 个循环。每个 miRNA 的相对表达量用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  表示, $\Delta Ct = Ct_{\text{miRNA}} - Ct_{\text{GAPDH}}$ 。每个样本重复 3 次试验。

#### 1.2.3 mir-124-3p 慢病毒载体的构建与转染人肺成纤维细胞

以人脑组织基因组 DNA 为模板进行 PCR 反应扩增 pre-mir-124-3p,上游引物 5'-GAATTCT-GAGGGCCCCTCTGCGT-3'(下划线限制性内切酶 *EcoR* I);下游引物 5'-GGATCCGAGGCCGCTCTCTTGGCA-3'(下划线为限制性内切酶 *Bam*H I)。产物约为 99 bp,PCR 产物和 pLVTHM 载体经双酶切、纯化、连接转化后挑取单克隆菌落培养过

夜,菌液 PCR 鉴定。小量提取质粒后经测序鉴定,双酶切连入质粒 pHAGE-CMV-MCS-IzGreen。培养 293T 细胞,待细胞生长至 70%左右,转染混合质粒。用 Lipofectamine 2000 将 pHAGE-mir-124-3p、psPAX2 和 pMD2.G 共转染 293T 细胞。培养 12 h 后换用 100 g/L 血清的完全培养基,继续培养 72 h。转染 72 h 收集病毒上清液,450 nm 的微孔过滤器过滤病毒液,取浓缩后的病毒液逐孔稀释滴度测定法在 293T 细胞中测定病毒滴度,转染人肺成纤维细胞。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析。符合正态分布的计量数据用均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。两组间比较采用 *t* 检验。相关分析采用 Pearson 相关分析,以  $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 早产儿外周血中 SPOCK2 蛋白的测定结果

ELISA 检测显示,对照组早产儿血浆中 SPOCK2 蛋白浓度为  $(7.24 \pm 0.43) \mu\text{g/L}$ ,而 RDS 组升高为  $(16.43 \pm 0.54) \mu\text{g/L}$ 。组间比较差异有统计学意义( $t=12.81, P < 0.01$ ,图 1)。RDS 组中在后期并

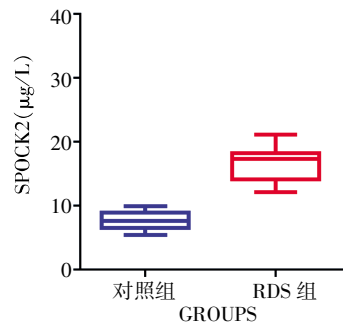


图 1 早产儿外周血中 SPOCK2 蛋白的测定结果

Figure 1 The expression of SPOCK2 in blood of preterm infants

发 BPD 的病例 SPOCK2 血浆浓度升高尤为明显,最高达  $26.94 \mu\text{g/L}$ 。这些结果提示,SPOCK2 蛋白可能参与了肺损伤的发病,并可能与肺损伤的严重程度相关。SPOCK2 血浆浓度严重升高者对应的 BPD 患儿 CT 扫描结果如图 2。

### 2.2 SPOCK2 基因 3'末端 microRNA 结合位点生物信息学分析结果

利用在线的生物信息学分析软件 TargetScan 进行分析。图 3 显示 SPOCK2 基因 3'末端存在 mir-124-3p、mir-25-3p、mir-122-5p 等 microRNA 结合位点。

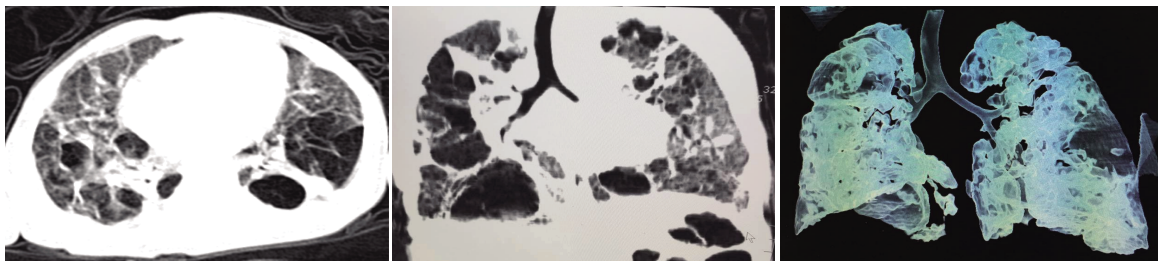


图 2 SPOCK2 血浆浓度严重升高者对应的急性 RDS 并发 BPD 患儿 CT 扫描图

Figure 2 CT scanning of infant with ARDS complicated by BPD who had a high serum level of SPOCK2

	Predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)	Site type	Context++ score	Context++ score percentile
Position 2925-2931 of SPOCK2 3' UTR	5' ...GCAGAGAAAUAUAAUGUGCCUUG...         3' CCGUAAGUGGCGCACGGAAU	7mer-m8	-0.24	92
Position 3361-3368 of SPOCK2 3' UTR	5' ...CUUAAACUGUGUGAUGUGCAAUA...         3' AGUCUGGCUCUGUUCACGUUAC	8mer	-0.31	96
Position 3653-3660 of SPOCK2 3' UTR	5' ...CCUAAGGAACAAGUACACUCCA...         3' GUUUGUGGUAACAGUGUGAGGU	8mer	-0.30	97

图 3 预测的 SPOCK2 基因 3'末端 microRNA 结合位点候选序列代表

Figure 3 Predicted candidate sequences of 3 terminal in SPOCK2 gene for binding microRNA

### 2.3 早产儿血浆中 microRNA 的测定结果及与 SPOCK2 蛋白血浆水平的相关分析结果

图 4 显示荧光定量 RT-PCR 测定结果,外周血中不能测到 mir-25-3p 和 mir-122-5p。mir-124-3p 表

达在对照组中最高,在 RDS 组中显著降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。并且图 5 显示 mir-124-3p 的表达量与 SPOCK2 蛋白血浆水平呈负相关( $r=-0.6459, P=0.0126$ )。

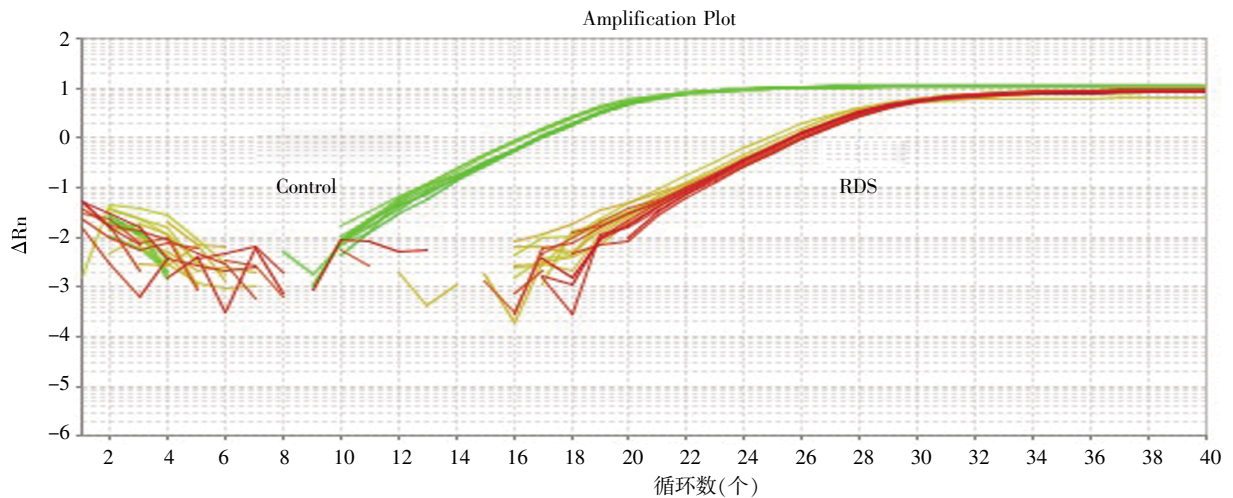


图 4 荧光定量 RT-PCR 测定早产儿血浆 mir-124-3p 表达水平

Figure 4 The expression of mir-124-3p in plasma of preterm infants showed by fluorescent quantitation RT-PCR

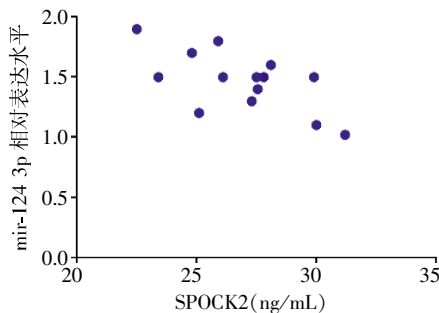


图 5 mir-124-3p 的表达量与 SPOCK2 蛋白血浆水平相关分析

Figure 5 Correlation analysis between mir-124-3p and SPOCK2 protein expression

2.4 mir-124-3p 慢病毒载体转染对人肺成纤维细胞中 SPOCK2 蛋白表达的影响。

图 6 显示 mir-124-3p 慢病毒载体成功包装, pHAGE-mir-124-3p、psPAX2 和 pMD2.G 共转染的 293T 细胞显示绿色荧光。Western blot 分析显示 mir-124-3p 过表达可以显著抑制人肺成纤维细胞中 SPOCK2 蛋白的表达(图 7)。

### 3 讨论

早产儿 RDS 是常见的危重症,也是急性肺损伤的严重表现。其病因主要为肺表面活性物质缺乏、肺泡发育不完善、继发感染等,导致进行性呼吸困难、低氧血症和呼吸衰竭,病死率高。机械通气和表面活性剂的使用,降低了新生儿围产期病死率,但一部分患儿发生了 BPD 等并发症,仍然严重危害了患儿的生活质量<sup>[7-10]</sup>。因此探讨其发病机制,并寻找和确定高危因素分析指标有重要的临床应用价值。

本研究发现,发生 RDS 的早产儿外周血中

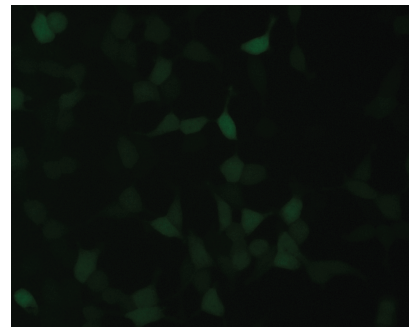


图 6 mir-124-3p 慢病毒载体在 293T 细胞中表达

Figure 6 Expression of mir-124-3p lentiviral vector

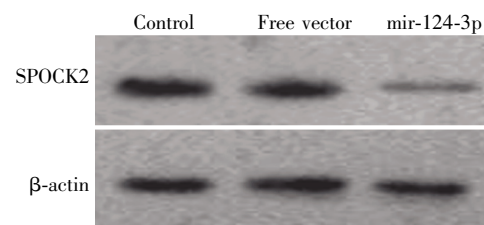


图 7 Western blot 显示 mir-124-3p 慢病毒载体转染对人肺成纤维细胞中 SPOCK2 蛋白的表达的影响

Figure 7 Effect of mir-124-3p lentiviral vector transfection on the expression of SPOCK2 protein in human lung fibroblasts

SPOCK2 蛋白浓度显著升高。这些结果提示 SPOCK2 蛋白可能参与了肺损伤的发病,并可能与肺损伤的严重程度相关。资料表明<sup>[11-12]</sup>,SPOCK2 也称为骨粘连蛋白(osteonectin)或睾丸蛋白聚糖(testican),是细胞外软骨素(extracellular chondroitin)和肝素硫化蛋白聚糖(heparin sulfate proteoglycans)家族成员。SPOCK2 最初是从人脑组织的 cDNA 文库中成功克隆,后逐渐从肺、肾、前列腺、视网膜及卵巢组织中检测到 EST,并发现与人乳腺癌、结肠癌、前列腺癌的发

病密切相关,表明了 SPOCK2 具备广泛的生物学功能。新的发现显示 SPOCK2 蛋白表达于发育中的肺组织<sup>[13]</sup>,并且 SPOCK2 mRNA 水平在肺组织的不同阶段显著变化,表明 SPOCK2 可能参与了新生儿肺的发育过程。本研究提示早产儿的肺损伤程度和 SPOCK2 的表达变化密切相关,可能对 RDS 的发生有一定评估或预测价值。

本文进一步研究了 SPOCK2 表达变化的可能机制。发现 SPOCK2 蛋白血浆水平与 mir-124-3p 的表达量呈负相关。与文献报道一致,生物信息学分析资料显示在 SPOCK2 的 3'末端非编码区有 mir-124-3p、mir-25-3p、mir-122-5p 等 microRNA 结合位点<sup>[13]</sup>。但荧光定量 Rt-PCR 在早产儿外周血中不能测到 mir-25-3p 和 mir-122-5p。mir-124-3p 表达在对照组中最高,在 RDS 组中有显著降低。并且,mir-124-3p 的表达量与 SPOCK2 蛋白血浆水平呈负相关。这提示 mir-124-3p 可能参与了 SPOCK2 蛋白表达的调控。资料显示 SPOCK2 基因 rs1049269 位点的多态性,可能影响了微小 RNA 与 SPOCK2 基因 3'末端调控位点的结合<sup>[13]</sup>。

利用体外培养的人肺成纤维细胞探讨了 mir-124-3p 对 SPOCK2 蛋白表达的调控作用。将 mir-124-3p 慢病毒载体转染人肺成纤维细胞。Western blot 分析显示 mir-124-3p 过表达可以显著抑制人肺成纤维细胞中 SPOCK2 蛋白的表达。肺成纤维细胞在早产儿 BPD 的发生发展中起重要作用。新的研究证实 SPOCK2 是支气管肺发育不良的重要易感候选基因<sup>[12-13]</sup>。mir-124-3p 调控细胞增殖<sup>[14-15]</sup>。根据实验结果,推测 mir-124-3p 可能不能与 SPOCK2 基因 3'末端非编码区位点正常结合,抑制基因转录的功能被破坏,最终 SPOCK2 蛋白表达失控。这需要进一步实验证实。

总之,本研究发现发生 RDS 的早产儿外周血血浆 SPOCK2 蛋白表达升高,SPOCK2 蛋白可能参与了肺损伤的发病,并可能与肺损伤的严重程度相关。mir-124-3p 可能参与了人肺成纤维细胞中 SPOCK2 蛋白的表达。测定血浆 SPOCK2 蛋白表达水平,可能有助于早产儿 RDS 发生的临床评估与预测。SPOCK2 也可能是早产儿 RDS 治疗的潜在靶点。

#### [参考文献]

[1] Jo HS. Genetic risk factors associated with respiratory distress syndrome[J]. Korean J Pediatr,2014,57(4):157-163

- [2] Wang L,Chen L,Li R,et al. Efficacy of surfactant at different gestational ages for infants with respiratory distress syndrome [J]. Int J Clin Exp Med,2015,8(8):13783-13789
- [3] Mamopoulos A,Petousis S,Tsimpanakos J,et al. Birth weight independently affects morbidity and mortality of extremely preterm neonates[J]. J Clin Med Res,2015,7(7):511-516
- [4] 肖梅,叶鸿瑁,邱小汕. 实用新生儿学[M]. 4版. 北京:人民卫生出版社,2011:384-387
- [5] Jobe AH,Bancalari E. Bronchopulmonary dysplasia [J]. Am J Respir Crit Care Med,2001,163(7):1723-1729
- [6] Sweet DG,Carnielli V,Greisen G,et al. European consensus guidelines on the management of neonatal respiratory distress syndrome in preterm infants--2013 update [J]. Neonatology,2013,103(4):353-368
- [7] Delorme P,Goffinet F,Ancel PY,et al. Cause of preterm birth as a prognostic factor for mortality[J]. Obstet Gynecol,2016,127(1):40-48
- [8] Sakonidou S,Dhaliwal J. The management of neonatal respiratory distress syndrome in preterm infants (European Consensus Guidelines-2013 update) [J]. Arch Dis Child Educ Pract Ed,2015,100(5):257-259
- [9] Cristea AI,Ackerman VL,Swigonski NL,et al. Physiologic findings in children previously ventilator dependent at home due to bronchopulmonary dysplasia [J]. Pediatr Pulmonol,2015,50(11):1113-1118
- [10] Baker CD,Abman SH,Mourani PM. Pulmonary hypertension in preterm infants with bronchopulmonary dysplasia [J]. Pediatr Allergy Immunol Pulmonol,2014,27(1):8-16
- [11] Lal CV,Ambalavanan N. Genetic predisposition to bronchopulmonary dysplasia[J]. Semin Perinatol, 2015,39(8):584-591
- [12] Piersigilli F,Bhandari V. Biomarkers in neonatology:the new "omics" of bronchopulmonary dysplasia[J]. J Matern Fetal Neonatal Med,2015,10(1):1-7
- [13] Hadchouel A,Durrmeyer X,Bouzigon E,et al. Identification of SPOCK2 as a susceptibility gene for bronchopulmonary dysplasia[J]. Am J Respir Crit Care Med,2011,184(10):1164-1170
- [14] Suzhi Z,Liang T,Yuexia P,et al. Gap junctions enhance the antiproliferative effect of microRNA-124-3p in glioblastoma cells [J]. J Cell Physiol,2015,230(10):2476-2488
- [15] Li H,Xie S,Liu M,et al. The clinical significance of downregulation of mir-124-3p,mir-146a-5p,mir-155-5p and mir-335-5p in gastric cancer tumorigenesis[J]. Int J Oncol,2014,45(1):197-208

[收稿日期] 2016-01-07