

miR-21 在早产儿呼吸窘迫综合征患儿血清中表达水平的研究

许云仙, 金蕊, 陈筱青, 何思思, 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:探讨早产儿呼吸窘迫综合征(respiratory distress syndrome, RDS)患儿外周血清中 miR-21 的表达水平及其临床意义。方法:选取2015年6—12月入住南京医科大学第一附属医院新生儿监护病房的 RDS 患儿30例;对照组为非 RDS 早产儿共21例,使用逆转录 PCR 法检测外周血清中 miR-21 的表达水平,并分析各组病例的临床特点。结果:RDS 患儿血清中 miR-21 表达水平明显高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。中重度 RDS 组 miR-21 表达水平有明显增加趋势,但目前尚未发现差异有统计学意义。RDS 患儿中使用肺表面活性物质(pulmonary surfactant, PS)组 miR-21 表达水平明显增加($P < 0.05$)。结论:血清 miR-21 表达水平与 RDS 密切相关,提示 miR-21 在 RDS 发病机制中起一定作用。

[关键词] miR-21;呼吸窘迫综合征;早产儿

[中图分类号] R722.6

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2018)10-1409-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20181016

Serum miR-21 expression level in infant respiratory distress syndrome

Xu Yunxian, Jin Rui, Chen Xiaqing, He Sisi, Hu Yuhua*

Department of Pediatrics, the First Affiliated Hospital of NMU, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objective:** To determine the pathological significance of serum miR-21 expression level in premature respiratory distress syndrome(RDS)infants. **Methods:** Randomized blood samples were collected from RDS and non-RDS infants in the Neonatal Intensive Care Unit (NICU) of Jiangsu Province Hospital from June to December 2015. Total RNA was extracted from each blood sample and reverse transcribed into complementary DNA (cDNA). We used real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) technique to determine the serum miR-21 expression levels in the RDS and the non-RDS groups ($n=30$ and $n=21$, respectively). Unpaired student t-test was used to compare the significance between groups. **Results:** The serum miR-21 expression level in the RDS group was significantly higher than that in the control group ($P < 0.05$). The miR-21 expression levels in the moderate to severe RDS groups appeared to be higher than that in the mild groups, however, statistic significance was not reached in our study. In addition, the RDS group that received pulmonary surfactant therapy had significant increase in miR-21 expression levels ($P < 0.05$). **Conclusion:** Serum miR-21 expression level is closely related to the development of infant RDS, suggesting that miR-21 is involved in the pathogenesis of infant RDS.

[Key words] miR-21; infant respiratory distress syndrome; premature infant

[Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(10): 1409-1412]

新生儿呼吸窘迫综合征(respiratory distress syndrome, RDS)是一种肺功能不全的疾病,多在出生后不久发病,生后2 d内进行性加重。RDS临床表现

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金(81300023, 81300521);江苏省自然科学基金青年基金(BK20131020);江苏高校优势学科建设工程(JX10231081);江苏省妇幼保健重点学科(FXK 201730)

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

为早期呼吸窘迫,根据胸部X线片呈典型的磨玻璃样表现和支气管充气征可以确诊,如不及时治疗,可因顽固性低氧血症和呼吸衰竭而死亡。RDS是由于肺表面活性物质缺乏及肺组织结构不成熟所致,主要见于早产儿,但足月儿也可发生,胎龄越小, RDS发生率越高。

微小RNA是一类高度保守、由18~24个核苷酸组成的内源性非编码RNA,它通过与目标mRNA互

补配对,导致 mRNA 降解或抑制其翻译来调控基因的表达,进而参与细胞的生长发育、代谢、凋亡等过程,参与多种疾病的发生、发展。miR-21 的编码基因定位于 17q23.2,即液泡膜蛋白基因(vacuole membrane protein-1, VMP1)的第 10 内含子区^[1]。目前研究发现 miR-21 在许多生物学功能和疾病中有重要作用,如免疫功能的调控、癌症、心血管疾病、炎症。miR-21 的高水平与多种肺部疾病相关,例如特发性肺纤维化、慢性阻塞性肺病(COPD)^[2]以及支气管哮喘^[3]。在免疫缺陷或不足的疾病中,抑制 miR-21 表达可促进炎症反应进程。与之相对的是,miR-21 也可促进炎症反应发展。新生儿 RDS 是一种以缺乏肺表面活性物质为病理特征性疾病。在缺乏肺表面活性物质的基础上,继发感染所致的炎症反应可加速疾病进展。目前,miRNA 在新生儿 RDS 中的作用尚不明确,本研究通过检测早产儿 RDS 患儿外周血 miR-21 的表达改变,探讨其在早产儿 RDS 中的作用。

1 对象和方法

1.1 对象

选取 2015 年 6—12 月入住南京医科大学第一附

属医院新生儿监护病房的早产儿,28 周≤胎龄<37 周,以 RDS 患儿 30 例为试验组,非 RDS 早产儿 21 例为对照组。收集 RDS 患儿和非 RDS 早产儿的外周血。实验组纳入标准:根据欧洲早产儿呼吸窘迫综合征防治共识指南(2013 版)^[4]中的 Vermont Oxford 新生儿协作网对新生儿 RDS 的定义:吸室内空气时患儿血氧分压(PaO₂)<50 mmHg(6.6 kPa)(1 mmHg=0.133 kPa),存在中央性紫绀,需吸氧才能维持 PaO₂>50 mmHg(6.6 kPa),并伴有典型胸部 X 线表现,除外先天性肺发育畸形、终末期肺、肝、肾等脏器功能衰竭患儿。对照组纳入标准:28 周≤胎龄<37 周,排除 RDS 和其他先天畸形者。

1.2 方法

1.2.1 RNA 提取

收集病例组和对照组外周血 4 mL,按照血清 RNA 提取试剂盒(Life Technologies 公司,美国)说明书步骤提取总 RNA,保存待用。

1.2.2 引物设计与合成

根据 miRBase 数据库中 miR-21 基因序列,设计 miR-21 引物。选取 U6 为内参。引物由上海生工生物公司合成(表 1)。

表 1 PCR 引物序列
Table 1 Sequences of PCR primers

基因名称	引物名称	引物序列(5'→3')
miR-21	茎环引物	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACTCAACA
	上游引物	TCGGCGGTAGCTTATCAGACTGA
	下游引物	ATCCAGTGCAGGGTCCGAGG
U6	茎环引物	AACGCTTCACGAATTTGCGT
	上游引物	CTCGCTTCGGCAGCACACA
	下游引物	AACGCTTCACGAATTTGCGT

1.2.3 miRNA 逆转录

提取总 RNA 为模板,设计相应的茎环引物进行逆转录反应,反应条件:16 °C 30 min,42 °C 30 min,80 °C 5 min。

1.2.4 实时定量 PCR 反应

采用 RT-PCR 试剂盒(TaKaRa 公司,日本),在 Real-time PCR 仪上进行扩增反应。反应条件为:95 °C 5 min 预变性;然后按 90 °C 15 s,60 °C 15 s,72 °C 1 min,共 40 个循环。

1.3 统计学方法

实验结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用 SPSS 12.0 统计分析软件对实验数据进行统计学处理,两组间比较采用独立样本 *t* 检验, $P \leq 0.05$ 为差

异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组病例临床资料分析

两组中,男女比例存在差异,男孩人数明显高于女孩(分别为 24:6 和 15:6);均以剖宫产患儿多见。在对照组中,产前使用激素的比例更高(是/否,15/6),而 RDS 组较低(是/否,16/14,表 2)。

2.2 两组患儿 miR-21 表达水平比较

与对照组相比,RDS 组 miR-21 表达水平明显增加,差异有统计学意义($P < 0.05$,表 3)。

2.3 RDS 组临床资料分析

根据发病初次影像学表现(生后 6 h)将 RDS 组患

儿分为两组:轻度RDS(I~II级)14例、中重度RDS(III~IV级)16例,中重度RDS组miR-21表达水平有明显增加趋势,但未发现统计学差异(表4)。

RDS患儿发病后根据病情严重程度是否使用肺表面活性物质(pulmonary surfactant, PS)(是/否, 21/9),分为未使用PS组和使用PS组,使用PS组miR-21表达水平明显增加($P < 0.05$,表5),考虑miR-21与肺损伤的严重程度相关。

表2 RDS组和对照组临床资料

临床资料	RDS组(n=30)	对照组(n=21)
性别		
男	24	15
女	6	6
生产方式		
顺产	6	7
剖腹产	24	14
产前使用激素		
是	16	15
否	14	6
胎龄(周)	31.05 ± 3.42	32.87 ± 5.06
出生体重(g)	1 694.01 ± 395.24	1 754.21 ± 436.58

表3 miR-21在RDS组和对照组中的表达水平差异

组别	miR-21表达水平
RDS组	1.65 ± 0.71
对照组	0.64 ± 0.38
t值	2.312
P值	0.028

表4 miR-21在不同RDS组中的表达水平差异

组别	miR-21表达水平
轻度RDS组	1.43 ± 0.60
中重度RDS组	1.85 ± 0.78
t值	1.641
P值	0.112

3 讨论

RDS是严重危害新生儿生命的危重疾病,研究发现RDS主要是由于肺表面活性物质缺乏和肺发育不成熟所致^[14]。miRNA是一类广泛存在于真核生物中的内源性短片非编码RNA分子,参与了人类至少30%基因的表达调控。目前已有许多动物和临床研究证明,miRNAs参与肺发育的过程并参与

表5 使用PS对miR-21表达水平的影响

组别	miR-21表达水平
未使用PS组	1.23 ± 0.66
使用PS组	1.83 ± 0.68
t值	2.239
P值	0.033

许多肺部疾病的发病^[5]。miRNAs表达水平的改变可诱导或促进多种肺部疾病的发生和发展,如支气管肺发育不良、慢性阻塞性肺病、哮喘等^[6-8]。

单个miRNA与疾病相关性更是目前研究的重点,例如miRNA-133在心肌细胞内的高表达可减少心肌缺血再灌注后心肌细胞的凋亡,对心肌产生保护作用;miRNA-101在肾脏上皮细胞中的表达提示其与肾脏纤维化的进程反向相关,可作为提示肾脏纤维化的指标;miRNA-21因为其在甲状腺乳头癌与癌旁组织中表达存在明显差异,有作为病理诊断指标的可能^[9]。与组织样本相比,血浆中miRNA因为取样方便,且具有无创性,更加受到关注,例如miRNA-155在乳腺癌患者血浆中的表达较非乳腺癌患者对照组明显增加;miRNA-595在慢性乙肝所致肝衰竭早期患者血浆中的表达较对照组明显升高;miRNA-16在系统性红斑狼疮(SLE)患者活动期的表达与临床SLE活动指标呈正相关。这些基础研究都为将来应用外周血miRNA作为临床疾病诊断或预后的参考标准打下了坚实的基础。

本研究中的miR-21是近年来备受关注的miRNA之一,它在肿瘤的发生和发展、心血管系统疾病、神经系统疾病、内分泌系统疾病、呼吸系统疾病等多种疾病中发挥重要作用^[10-14]。本研究发现在RDS患儿外周血清中miR-21表达水平较对照组明显增高,说明miR-21可能与RDS的发病相关。分析不同RDS分级(I~IV级)患儿血浆中miR-21的表达量,轻度RDS与中重度RDS血浆中miR-21表达无显著统计学差异,仅可见差异表达趋势,可能与RDS分组后样本量偏少,组间差异小有关系,在接下来的研究中可扩充样本量,收集不同时期的RDS标本完善。另外,研究还发现,miR-21与肺损伤的严重程度有关。诚然,miR-21在血清的高表达并不代表其参与了RDS疾病的病程,或对RDS病程存在影响,但有望作为RDS早产儿的血清学生物标志物,为早期发现、早期诊断及治疗早产儿RDS,降低病死率提供帮助。

目前尚不清楚RDS患者血浆中的高miR-21水平是否促进疾病进展,亦或是对RDS产生保护作用。miR-21通过与PTEN的mRNA结合,对其表达产生抑制作用^[15]。据报道,PTEN的基因敲除可以增强中性粒细胞的功能,并且增强机体免疫力,从而减少肺部细菌感染^[16]。在RDS中,增加的miR-21水平可降低PTEN表达,从而对肺部感染起保护作用。与此同时,miR-21可逆向调控TNF- α 表达,而TNF- α 显著减少肺表面活性物质表达。综上所述,miR-21可通过增加肺表面活性物质的生成,以及中性粒细胞功能从而在RDS中起保护作用。进一步研究需要从分子生物学角度探讨miR-21以及其调控对象的信号通路在RDS中的作用。这些研究可为miR-21是否参与疾病病理过程,或者是否可作为疾病病程变化的血清参照物提供有价值的信息。在分析血浆中miR-21表达量的同时,也可在未来应用基因敲除技术如Crispr Cas9敲除小鼠的miR-21基因,并分析其对LPS所诱导的新生小鼠RDS的敏感性和病程的关系。本研究也存在一定局限性:如肺泡灌洗液中的miR-21水平相较于血浆中miRNA可能更加敏感,并更加准确地预测其与RDS的相关性。但由于在临床工作中,新生儿支气管较成人偏细,且患儿病情变化快,纤支镜在新生儿中几乎从不使用,这使得获得肺泡灌洗液几乎不可能。在未来研究当中,分析血清miRNA-21与临床新生儿RDS分期和病程的关系应成为重点。

[参考文献]

- [1] Ribas J, Ni X, Castanares M, et al. A novel source for miR-21 expression through the alternative polyadenylation of VMP1 gene transcripts [J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40 (14):6821-6833
- [2] Xie L, Wu M, Lin H, et al. An increased ratio of serum miR-21 to miR-181a levels is associated with the early pathogenic process of chronic obstructive pulmonary disease in asymptomatic heavy smokers [J]. *Mol Biosyst*, 2014, 10(5):1072-1081
- [3] Kim RY, Horvat JC, Pinkerton JW, et al. MicroRNA-21 drives severe, steroid-insensitive experimental asthma by amplifying phosphoinositide 3-kinase-mediated suppression of histone deacetylase 2 [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2017, 139(2):519-532
- [4] Sweet DG, Carnielli V, Greisen G, et al. European consensus guidelines on the management of respiratory distress syndrome- 2016 update [J]. *Neonatology*, 2017, 111 (2): 107-125
- [5] Sessa R, Hata A. Role of microRNAs in lung development and pulmonary diseases [J]. *Pulm Circ*, 2013, 3(2): 315-328
- [6] Wu YT, Chen WJ, Hsieh WS, et al. MicroRNA expression aberration associated with bronchopulmonary dysplasia in preterm infants: a preliminary study [J]. *Respir Care*, 2013, 58(9):1527-1535
- [7] Maltby S, Plank M, Tay HL, et al. Targeting microRNA function in respiratory diseases: mini-review [J]. *Front Physiol*, 2016, 7:21
- [8] Elbehidy RM, Youssef DM, El-Shal AS, et al. MicroRNA-21 as a novel biomarker in diagnosis and response to therapy in asthmatic children [J]. *Mol Immunol*, 2016, 71: 107-114
- [9] 卢秀波,徐红伟,刘洋,等. miRNA-21在甲状腺乳头状癌组织中的表达及其意义 [J]. *中华实验外科杂志*, 2011, 28(11):1873-1876
- [10] Goldschmidt I, Thum T, Baumann U. Circulating miR-21 and miR-29a as markers of disease severity and etiology in cholestatic pediatric liver disease [J]. *J Clin Med*, 2016, 5(3):28
- [11] Han Z, Ge X, Tan J, et al. Establishment of lipofection protocol for efficient miR-21 transfection into cortical neurons *in vitro* [J]. *DNA Cell Biol*, 2015, 34(12):703-709
- [12] Cengiz M, Yavuzer S, Kilickiran Avci B, et al. Circulating miR-21 and eNOS in subclinical atherosclerosis in patients with hypertension [J]. *Clin Exp Hypertens*, 2015, 37 (8):643-649
- [13] Melnik BC. MiR-21: an environmental driver of malignant melanoma? [J]. *J Translat Med*, 2015, 13(1):202
- [14] Cheng Y, Zhang C. MicroRNA-21 in cardiovascular disease [J]. *J Cardiovasc Transl Res*, 2010, 3(3):251-255
- [15] Zhang JG, Wang JJ, Zhao F, et al. MicroRNA-21(miR-21) represses tumor suppressor PTEN and promotes growth and invasion in non-small cell lung cancer(NSCLC) [J]. *Clin Chim Acta*, 2010, 411(11-12):846-852
- [16] Li Y, Jia Y, Pichavant M, et al. Targeted deletion of tumor suppressor PTEN augments neutrophil function and enhances host defense in neutropenia-associated pneumonia [J]. *Blood*, 2009, 113(20):4930-4941

[收稿日期] 2018-02-28