

外周血 miRNA-26b 和 miRNA-216a 表达与 支气管哮喘急性发作儿童肺功能的相关性

周斌¹, 彭淑梅¹, 何敬华², 李丽贤¹, 黄冬平¹

1. 广东省妇幼保健院儿科, 广东 广州 510010; 2. 广东省妇幼保健院药学部, 广东 广州 510010

摘要: **目的** 探讨外周血微小核糖核酸(miRNA)-26b、miRNA-216a 的表达和血清炎症因子水平与支气管哮喘急性发作患儿肺功能的相关性。**方法** 选择广东省妇幼保健院 2017 年 12 月至 2019 年 9 月收治的支气管哮喘急性发作患儿 107 例作为急性发作组、支气管哮喘缓解期患儿 93 例作为缓解组,另选同期健康体检儿童 90 例作为对照组。采用实时荧光定量反转录聚合酶链反应(RT-qPCR)测定三组儿童外周血 miRNA-26b 和 miRNA-216a 表达;采用酶联免疫吸附法测定血清炎症因子[超敏 C 反应蛋白(hs-CRP)、白细胞介素(IL)-6 和肿瘤坏死因子(TNF)- α]水平;采用肺功能仪测定第一秒用力呼气容积(FEV₁)、最大呼气峰值流速(PEF)和用力肺活量(FVC)。比较各组外周血 miRNA-26b 和 miRNA-216a 表达、炎症因子水平和肺功能变化;分析 miRNA-26b、miRNA-216a、炎症因子与肺功能的相关性。**结果** 外周血 miRNA-26b 和 miRNA-216a 表达均呈急性发作组 > 稳定期组 > 对照组($P < 0.05$);炎症因子 hs-CRP、IL-6 和 TNF- α 水平均呈急性发作组 > 稳定期组 > 对照组($P < 0.05$);肺功能 FEV₁、PEF 和 FVC 均呈急性发作组 < 稳定期组 < 对照组($P < 0.05$)。miRNA-26b、miRNA-216a、hs-CRP、IL-6、TNF- α 与 FEV₁、PEF 和 FVC 分别呈线性负相关($P < 0.05$)。**结论** 支气管哮喘急性发作儿童外周血 miRNA-26b 和 miRNA-216a 高表达;miRNA-26b、miRNA-216a 和炎症因子与肺功能水平呈线性负相关。

关键词: 微小核糖核酸-26b; 微小核糖核酸-216a; 炎症因子; 支气管哮喘; 急性发作; 肺功能; 相关性

中图分类号: R725-6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2021)06-0727-04

Correlation between the expression of miRNA-26b and miRNA-216a in peripheral blood and lung function in children with acute attack of bronchial asthma

ZHOU Bin*, PENG Shu-mei, HE Jing-hua, LI Li-xian, HUANG Dong-ping

* Department of Pediatrics, Guangdong Maternal and Child Health Hospital, Guangzhou, Guangdong 510010, China

Corresponding author: HUANG Dong-ping, E-mail: hdpaaa@126.com

Abstract: Objective To investigate the relationship between the expression of miRNA-26b and miRNA-216a in peripheral blood, the level of inflammatory factors in serum and lung function in children with acute attack of bronchial asthma. **Methods** From December 2017 to September 2019, 107 children with acute attack of bronchial asthma were selected as the acute attack group, 93 children with remission of bronchial asthma were selected as the remission group, and 90 healthy children were selected as the control group. The RT-qPCR was used to detect the expression of miRNA-26b and miRNA-216a in peripheral blood of three groups of children. ELISA was used to detect the level of inflammatory factors (hs-CRP, IL-6 and TNF- α) in serum. Pulmonary function analyzer was used to detect the forced expiratory volume in the first second (FEV₁), peak expiratory flow (PEF) and forced vital capacity (FVC). The expressions of miRNA-26b and miRNA-216a in peripheral blood, the levels of inflammatory factors in serum and lung function were compared. The correlation between miRNA-26b, miRNA-216a, inflammatory factors and lung function was analyzed. **Results** The expression of miRNA-26b and miRNA-216a in peripheral blood increased from control group to stable group to acute attack group ($P < 0.05$). The level of inflammatory factors (hs-CRP, IL-6 and TNF- α) increased from control group to stable group to acute attack group ($P < 0.05$). The lung functions (FEV₁, PEF and FVC) decreased from control group to stable

group to acute attack group ($P < 0.05$). miRNA-216a、hs-CRP、IL-6、TNF- α were negatively correlated with FEV₁, PEF and FVC respectively ($P < 0.05$). **Conclusion** The expression of miRNA-26b and miRNA-216a in peripheral blood of children with acute attack of bronchial asthma may be high. miRNA-26b and miRNA-216a and inflammatory factors are negatively correlated with lung function.

Keywords: miRNA-26b; miRNA-216a; Inflammatory factor; Bronchial asthma; Acute attack; Lung function; Relevance

Fund program: Guangdong Science and Technology Innovation Strategy Special Fund Project (Science and Technology Aid Xinjiang Project) (2018YJ032)

支气管哮喘是常见的儿童呼吸系统疾病,主要是由多种细胞及细胞因子参与的一种气道慢性炎症疾病^[1]。临床调查显示,儿童支气管哮喘发病率不断上升,严重影响儿童身心健康^[2]。目前,关于儿童支气管哮喘具体发病机制尚未完全明确,从而使临床诊治的难度增加^[3-4]。近年来,除了炎症因子与儿童支气管哮喘发病密切相关外^[5-6],微小核糖核酸(miRNA)在呼吸道疾病发生、发展中作用受到越来越多的关注^[7]。本研究探讨外周血 miRNA-26b、miRNA-216a 表达和炎症因子水平与支气管哮喘急性发作儿童肺功能水平的相关性,以期为临床诊断和治疗患儿支气管哮喘急性发作提供参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择广东省妇幼保健院 2017 年 12 月至 2019 年 9 月收治的支气管哮喘急性发作患儿 107 例作为急性发作组,其中男性 67 例,女性 40 例;年龄 3~12(7.83 ± 2.14)岁。选择同期收治的支气管哮喘缓解期患儿 93 例作为缓解组,其中男性 56 例,女性 37 例;年龄 3~11(7.56 ± 1.75)岁。另选同期健康体检儿童 90 例作为对照组,其中男性 52 例,女性 38 例;年龄 3~12(7.62 ± 1.90)岁。三组性别、年龄比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。本研究获得医院伦理委员会批准。

1.2 纳入和排除标准 支气管哮喘患儿的选取和排除遵循以下标准。纳入标准:(1)符合《儿童支气管哮喘诊断与防治指南(2016年版)》^[8]关于支气管哮喘诊断标准;(2)年龄 3~12 岁;(3)近 1 个月内未使用激素或支气管扩张药;(4)获得家属知情同意,自愿参与本研究。排除标准:(1)合并慢性阻塞性肺疾病(COPD)等其他呼吸系统疾病;(2)合并重要脏器严重异常;(3)急性感染;(4)患有精神疾病。

1.3 研究方法 检测各组外周血 miRNA-26b 和 miRNA-216a 表达、血清炎症因子水平和肺功能水平;分析 miRNA-26b、miRNA-216a、炎症因子与肺功能的相关性。

1.3.1 主要试剂和仪器 主要试剂:逆转录试剂盒(美国 GeneCopoeia 公司);总 RNA 提取试剂盒(上海朝瑞生物科技);超敏 C 反应蛋白(hs-CRP)ELISA 试剂盒(北京科瑞美科技);白细胞介素(IL)-6 ELISA 试剂盒(北京科瑞美科技);肿瘤坏死因子(TNF)- α ELISA 试剂盒(北京科瑞美科技)。主要仪器:美国伯乐 Bio-rad Beckman 酶标仪;美国 Applied Biosystems 公司 7900HTPCR ABIprism 仪;日本捷斯特 HI-101 肺功能仪。

1.3.2 外周血 miRNA-26b 和 miRNA-216a 表达检测

采集三组儿童清晨空腹外周静脉血 5 ml,采用实时荧光定量反转录聚合酶链反应(RT-qPCR)测定外周血 miRNA-26b 和 miRNA-216a 的表达。采用 Trizol 试剂盒提取总 RNA,将 RNA 逆转录为 cDNA,使用 SYBR Green 实时 PCR 分析,利用 ABI7500 系统 RT-PCR 反应,以 U6 作为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算 miRNA-26b 和 miRNA-216a 相对表达量。RT-qPCR 反应条件:95 °C 10 min,95 °C 15 s,72 °C 15 s,共 35 个循环。

1.3.3 血清炎症因子测定 三组儿童均于入院 24 h 内采集 6 ml 外周静脉血,以离心速率 3 000 r/min,离心 10 min,离心半径 15 cm,取上清液血清标本,采用 ELISA 法测定 hs-CRP、IL-6 和 TNF- α 水平,依据试剂盒说明书标准测定。

1.3.4 肺功能测定 采用肺功能仪测定第一秒用力呼气容积(FEV₁)、最大呼气峰值流速(PEF)和用力肺活量(FVC)。

1.4 统计学方法 运用 SPSS 22.0 软件处理。计量资料(包括 miRNA-26b 和 miRNA-216a、炎症因子和肺功能检测结果)采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,行单因素方差分析及两两比较的 LSD- t 检验;采用 Pearson 线性相关分析 miRNA-26b、miRNA-216a、炎症因子与肺功能相关性。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组外周血 miRNA-26b 和 miRNA-216a 表达比

较 外周血 miRNA-26b 和 miRNA-216a 表达均呈急性发作组 > 稳定期组 > 对照组 ($P < 0.01$)。见表 1。

2.2 各组炎症因子水平比较 炎症因子 hs-CRP、IL-6 和 TNF- α 水平均呈急性发作组 > 稳定期组 > 对照组 ($P < 0.01$)。见表 2。

2.3 各组肺功能水平比较 肺功能 FEV₁、PEF 和 FVC 水平均呈急性发作组 < 稳定期组 < 对照组 ($P < 0.01$)。见表 3。

2.4 miRNA-26b、miRNA-216a、炎症因子与肺功能相关性 Pearson 线性相关分析结果显示, miRNA-26b、miRNA-216a、hs-CRP、IL-6 和 TNF- α 与 FEV₁、PEF 和 FVC 分别呈线性负相关 ($P < 0.05$)。见表 4。

表 1 各组外周血 miRNA-26b 和 miRNA-216a 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	miRNA-26b	miRNA-216a
急性发作组	107	2.59 ± 0.56 ^{ab}	2.43 ± 0.54 ^{ab}
稳定期组	93	1.62 ± 0.42 ^a	1.78 ± 0.35 ^a
对照组	90	0.96 ± 0.25	1.49 ± 0.28
F 值		347.025	135.061
P 值		<0.01	<0.01

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与稳定期组比较,^b $P < 0.05$ 。

表 2 各组炎症因子水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	hs-CRP(mg/L)	IL-6(pg/L)	TNF- α (ng/L)
急性发作组	107	24.35 ± 4.13 ^{ab}	27.89 ± 4.34 ^{ab}	2.85 ± 0.73 ^{ab}
稳定期组	93	6.52 ± 1.38 ^a	22.14 ± 2.93 ^a	1.43 ± 0.48 ^a
对照组	90	1.65 ± 0.39	16.56 ± 3.28	0.68 ± 0.25
F 值		2 062.889	241.317	416.801
P 值		<0.01	<0.01	<0.01

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与稳定期组比较,^b $P < 0.05$ 。

表 3 各组肺功能水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	FEV ₁ (L)	PEF(L/min)	FVC(L)
急性发作组	107	1.48 ± 0.29 ^{ab}	145.38 ± 48.97 ^{ab}	2.45 ± 0.36 ^{ab}
稳定期组	93	1.83 ± 0.34 ^a	389.94 ± 43.52 ^a	2.98 ± 0.27 ^a
对照组	90	2.06 ± 0.23	576.81 ± 32.10	3.41 ± 0.28
F 值		99.980	2549.443	238.515
P 值		<0.01	<0.01	<0.01

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与稳定期组比较,^b $P < 0.05$ 。

表 4 miRNA-26b、miRNA-216a、炎症因子与肺功能的相关性

指标	FEV ₁		PEF		FVC	
	r 值	P 值	r 值	P 值	r 值	P 值
miRNA-26b	-0.718	<0.05	-0.764	<0.05	-0.679	<0.05
miRNA-216a	-0.763	<0.05	-0.621	<0.05	-0.692	<0.05
hs-CRP	-0.892	<0.05	-0.792	<0.05	-0.835	<0.05
IL-6	-0.821	<0.05	-0.706	<0.05	-0.781	<0.05
TNF- α	-0.786	<0.05	-0.753	<0.05	-0.803	<0.05

3 讨论

支气管哮喘主要指气道的一种慢性炎症反应,主

要由 T 淋巴细胞、肥大细胞及嗜酸性粒细胞等多种细胞参与所致,其主要特征为气道高反应性^[9]。支气管哮喘具体发病机制较为复杂,尚未完全明确,一般认为其发病与遗传机制、气道重构、气道慢性炎症反应、气道神经调节失常、气道高反应性、变态反应及神经信号转导机制等有关^[10-12]。目前,对儿童支气管哮喘诊断主要依据肺功能检查和临床表现,治疗主要采用 β_2 受体激动药、激素等,使症状缓解、支气管痉挛解除,但长期应用可引起不同程度的不良反应,影响疗效^[13]。因此,新的诊断和治疗支气管哮喘的方法一直在研究探索中。

hs-CRP 是全身性炎症反应急性期的一种非特异性标志物,在坏死、外伤及严重感染等情况下水平迅速上升^[14-15]。IL-6 主要是由支气管上皮细胞及气道巨噬细胞产生的一种多效应的细胞因子,是导致 COPD 气道炎症的重要炎症因子^[16]。IL-6 可诱导抗原刺激 B 淋巴细胞成熟和 T 淋巴细胞增殖,上调局部免疫反应,从而诱导全身性急性期反应物释放^[17]。血清中 TNF- α 在支气管哮喘发病时可促进炎症细胞黏附、游走和浸润,导致肺损伤^[18]。本研究表明,急性发作组血清 hs-CRP、IL-6 和 TNF- α 水平高于稳定期组和对照组,稳定期组高于对照组,提示支气管哮喘患儿血清 hs-CRP、IL-6 和 TNF- α 水平升高,且随着病情进展递升。与既往研究结果相近^[19]。

miRNA 主要是长度 20 ~ 25 nt 的一种非编码单链 RNA,具有广泛调控各种病理生理学改变作用,其 miRNA 表达水平能够在一定程度上反映诸多疾病发生^[20]。miRNA 广泛参与了整合细胞的生物学调节途径,目前认为 miRNA 参与了哮喘等人类重要疾病的发生发展过程;miRNA 作为哮喘的生物学标志物的研究及应用尚处于探索阶段^[21-22]。已经证实,miRNA-26b 可抑制上皮细胞的增殖及迁移。miRNA-216a 具有胰腺特异性,还具有表观遗传学干预、介导药物等治疗作用,对心血管和心脏具有保护作用。但临床上尚未见有关 miRNA-26b、miRNA-216a 与支气管哮喘方面的研究。本研究结果表明,急性发作组外周血 miRNA-26b 和 miRNA-216a 表达高于稳定期组和对照组,稳定期组高于对照组,提示支气管哮喘患儿外周血 miRNA-26b 和 miRNA-216a 高表达,且随着病情进展递增,推测其或许具有预测支气管哮喘病情的潜能。已有研究探索 miRNA 相关治疗,包括 miRNA 抑制剂和 miRNA 模拟物,如 Mattes 等^[23]用 miRNA 抑制剂 antagomir 在小鼠哮喘模型中特异性沉默 miR-126,抑制了肺内 Th2 细胞的活化,从而降低

了小鼠整体的炎症水平;有研究应用 miR-146a 模拟物则显著降低了哮喘 ASMC 和 Th2 细胞的炎症水平^[24]。

综上所述,支气管哮喘急性发作儿童外周血 miRNA-26b 和 miRNA-216a 异常高表达,miRNA-26b、miRNA-216a 和炎症因子与肺功能呈线性负相关关系。本研究仅作了以上初步探讨,对 miRNA-26b、miRNA-216a 在儿童哮喘诊断治疗中的作用,尚需要深入的研究去探讨。

参考文献

- [1] Shivani D, Khyati S, Anas P. Assessment of inhalational techniques and their common errors in bronchial asthma patients coming to tertiary hospital of South Gujarat [J]. *Indian Journal of Respiratory Care*, 2020, 9(2): 204-208.
- [2] 白颖, 王峰. 四川省成都地区 200 例支气管哮喘儿童过敏原调查分析[J]. *湖南师范大学学报(医学版)*, 2020, 17(4): 87-89.
- [3] Youness ER, Shady M, Nassar MS, et al. The role of serum nuclear factor erythroid 2-related factor 2 in childhood bronchial asthma[J]. *J Asthma*, 2020, 57(4): 347-352.
- [4] Moeller A, Carlsen KH, Sly PD, et al. Monitoring asthma in childhood; lung function, bronchial responsiveness and inflammation[J]. *Eur Respir Rev*, 2015, 24(136): 204-215.
- [5] 孙剑玥, 解玉, 徐亚娜. 孟鲁司特治疗儿童支气管哮喘急性发作期的疗效及对循环 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞表达的影响[J]. *广东医学*, 2020, 41(12): 1254-1258.
- [6] 齐宏, 陈广, 祁永梅, 等. 加味小青龙汤联合多索茶碱对支气管哮喘急性发作期患者血清白细胞介素-8、C 反应蛋白和嗜酸性粒细胞趋化因子的影响[J]. *陕西中医*, 2020, 41(9): 1231-1233.
- [7] 李竹英, 王婷, 李寒梅. 外泌体在支气管哮喘发病机制中的作用[J]. *中华全科医学*, 2020, 18(2): 291-294.
- [8] 中华医学会儿科学分会呼吸学组, 《中华儿科杂志》编辑委员会. 儿童支气管哮喘诊断与防治指南(2016年版)[J]. *中华儿科杂志*, 2016, 54(3): 167-181.
- [9] Zastrzeżyńska W, Przybyszowski M, Bazan-Socha S, et al. Omalizumab may decrease the thickness of the reticular basement membrane and fibronectin deposit in the bronchial mucosa of severe allergic asthmatics[J]. *J Asthma*, 2020, 57(5): 468-477.
- [10] 蔡春琼, 经廷森. 儿童支气管哮喘治疗的研究进展[J]. *医学综述*, 2020, 26(5): 970-974.
- [11] 李竹英, 王婷, 李寒梅. 外泌体在支气管哮喘发病机制中的作用[J]. *中华全科医学*, 2020, 18(2): 132-135.
- [12] 王开梅, 林志雄, 胡祥英, 等. 呼吸道病毒感染对支气管哮喘患儿 Th1/Th2 细胞因子平衡的影响[J]. *中国医药导报*, 2019, 16(5): 82-85.
- [13] 胡玉菲, 刘峰, 柳俊芳. 孟鲁司特联合布地奈德治疗支气管哮喘急性发作期患儿的效果及对免疫和肺功能的影响[J]. *解放军医药杂志*, 2020, 32(6): 51-55.
- [14] 汪二刚, 赵成岭, 邵传利, 等. 慢性阻塞性肺疾病炎症和过敏指标的分析和应用[J]. *中国临床研究*, 2019, 32(11): 57-60.
- [15] 吴小利, 干园园, 阮家阅, 等. 血小板指标和血清肿瘤坏死因子- α 、C-反应蛋白、降钙素原检测在支气管哮喘合并肺部感染患儿诊治中的价值分析[J]. *中国妇幼保健*, 2020, 35(14): 2626-2629.
- [16] 付潇潇, 韩校鹏, 刘剑波. 气道黏液高分泌对慢性阻塞性肺疾病急性加重期患者预后及炎症因子的影响[J]. *中国临床研究*, 2019, 32(3): 39-41, 47.
- [17] 冯利鹤, 张学菊, 冯德利. 支气管哮喘患儿外周血白细胞介素-6、白细胞介素-12 水平与疾病进展的相关性分析[J]. *中国临床医生杂志*, 2019, 47(11): 1355-1358.
- [18] 赵宏芳, 刘娟. 支气管哮喘患儿外周血单核细胞培养上清液中肿瘤坏死因子- α 、白细胞介素-17 和免疫球蛋白 E 水平与 Toll 样受体 4 表达的相关性[J]. *新乡医学院学报*, 2020, 37(7): 687-690.
- [19] 杨捷. 宣肺通络止咳颗粒联合孟鲁司特钠治疗小儿变异性哮喘的疗效观察及其对 hs-CRP、IgE、TNF- α 、IL-6 的影响[J]. *中国中医药科技*, 2019, 26(4): 499-502.
- [20] 胡彩莉, 彭彩霞, 胡彩虹. 微小 RNA-26a 高表达调控 PTEN 并促进哮喘大鼠气道平滑肌细胞的增殖[J]. *兰州大学学报(医学版)*, 2020, 46(3): 43-49.
- [21] 许志松, 刘金辉, 傅瑛, 等. 血清 microRNA 差异表达与儿童哮喘诊断的临床研究[J]. *热带医学杂志*, 2016, 16(6): 718-721.
- [22] 何旗, 王凌伟, 邱晨. microRNA 与支气管哮喘的研究进展[J]. *广东医学*, 2016, 37(14): 2196-2199.
- [23] Mattes J, Collison A, Plank M, et al. Antagonism of microRNA-126 suppresses the effector function of TH2 cells and the development of allergic airways disease[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(44): 18704-18709.
- [24] Comer BS, Camoretti-Mercado B, Kogut PC, et al. MicroRNA-146a and microRNA-146b expression and anti-inflammatory function in human airway smooth muscle[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2014, 307(9): L727-L734.

收稿日期: 2020-09-25 修回日期: 2020-10-13 编辑: 石嘉莹