

DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.201701004

· 鼻 - 鼻窦疾病 ·

变应性鼻炎继发哮喘患者血浆 microRNA 表达谱的改变

吴昆旻¹, 李泽卿¹, 马莉¹, 陈伟², 安静娟¹, 沈洁¹, 杨祁¹, 朱春晖¹, 胡陟³

(1. 南京中医药大学第二附属医院 江苏省第二中医院 耳鼻咽喉科, 江苏 南京 210017; 2. 南京军区南京总医院耳鼻咽喉头颈外科, 江苏 南京 210002; 3. 江苏省中医院 耳鼻咽喉科, 江苏 南京 210029)

摘要: **目的** 应用 microRNA 表达谱芯片技术, 选取临床明确诊断的变应性鼻炎 (allergic rhinitis, AR) 及变应性鼻炎罹患哮喘 (asthma, AS) 患者相应血浆, 分析变应性鼻炎患者罹患哮喘后血浆 microRNA 的差异性表达。**方法** 选取 AR 及 AR + AS 各 3 例, 使用 miRCURY LNATM 芯片, 筛选出两组患者血浆中差异表达的 microRNA 并进行聚类分析; 最后通过生物信息学分析预测其靶基因。**结果** 与 AR 组相比较, AR + AS 组差异表达的 microRNA 共有 9 个, 其中表达下调的有 4 个, 表达上调的有 5 个。靶基因预测显示, 以黏附连接、Wnt 和 MAPK 信号传导通路靶基因的差异表达最为显著。**结论** 通过 microRNA 芯片发现的相关差异性表达的 microRNA, 有可能成为 AR 患者罹患 AS 的易感性生物标志物及临床可能的治疗靶点, 但是尚需要进一步靶基因验证及功能学分析。

关键词: 变应性鼻炎; 哮喘; microRNA; 血浆

中图分类号: R765.21

文献标识码: A

[中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2017, 23(1): 16-19]

Changes of plasma microRNAs expression profiles in allergic rhinitis patients with secondary asthma

WU Kun-min¹, LI Ze-qing¹, MA Li¹, CHEN Wei², AN Jing-juan¹, SHEN Jie¹, YANG Qi¹, ZHU Chun-hui¹, HU Zhi³
(1. Department of Otolaryngology, the Second Hospital Affiliated to Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210017, China; 2. Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Region, PLA, Nanjing 210002, China; 3. Department of Otolaryngology, Jiangsu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

Abstract: **Objective** To detect the differential expressions of plasma microRNAs in allergic rhinitis (AR) patients with secondary asthma (AS) via microRNA expression profile chip technology. **Methods** Plasma samples were collected from patients suffering from AR (AR group) and AR patients with secondary AS (AR + AS group) respectively, and each group had 3 cases. The plasma microRNAs differentially expressed in AR + AS group were screened out by miRCURY LNATM chip and analyzed with cluster analysis. Finally, target genes were predicted by biological informatics technology. **Results** Compared with AR group, 9 microRNAs were differentially expressed in AR + AS group. Of them, the expression was up-regulated in 4 and down-regulated in 5. Target gene prediction showed that target genes of adherens junction, Wnt and mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathways were differentially expressed most predominately. **Conclusion** The differentially expressed plasma microRNAs screened out by microRNA chip technology may be biomarkers of susceptibility in AR patients to AS and therapeutic targets for this disease.

Key words: Rhinitis, allergic; Asthma; MicroRNA; Plasma

[Chinese Journal of Otorhinolaryngology-Skull Base Surgery, 2017, 23(1): 16-19]

21 世纪以来, 全球约四分之一的人群患有变应性疾病, 其中变应性鼻炎 (allergic rhinitis, AR) 就影响到了全世界的 10% ~ 25% 人口^[1]。AR 被认为是

哮喘 (asthma, AS) 发生的独立危险因素、发展的重要中间环节。因此, 就 AS 的防治管理而言, AR 与 AS 间的关联研究具有重要意义。研究发现 Th2 关联的特异性 microRNA (miR-21) 能够调节 Th0 细胞向 Th2 细胞转化^[2], 而 AR 和 AS 均为局部组织 Th2 类趋化因子及其受体为主的应答。因此 microRNA 在变应性呼吸道炎症性疾病中的作用引起了人们的

基金项目: 江苏省自然科学基金 (BK20161388)。

作者简介: 吴昆旻, 男, 博士, 副主任医师; 李泽卿, 男, 博士, 主任医师。吴昆旻与李泽卿对本文有同等贡献, 为并列第一作者。通信作者: 胡陟, Email: jhew001@163.com

极大兴趣。作为前期的探讨性研究,我们小样本检测了血浆 microRNA 表达谱在 AR 患者罹患 AS 的改变,为进一步大样本量观察研究提供证据。

1 材料与方法

1.1 临床资料

研究对象包括患有 AR 的对照组(AR 组)和新发 AS 的 AR 患者组成的实验组(AR + AS 组),每组各 3 例患者。6 例患者中,男、女各 3 例。AR 组男 2 例,女 1 例;年龄 22 ~ 48 岁。AR + AS 组,男 1 例,女 2 例;年龄 20 ~ 40 岁。AR 的诊断遵循 ARIA (2008 年)^[3],应包括典型的过敏症状病史(鼻漏、喷嚏、鼻塞、鼻痒)并皮肤点刺试验阳性。AS 的诊断参照 ARIA (2008 年),符合 2008 年中华医学会呼吸病学学会制定的支气管哮喘防治指南诊断标准^[4]: ①反复发作咳嗽、喘息、胸闷、气急;②发作时双肺有弥漫性或散在的哮鸣音,呼气相延长;③支气管运动试验或激发试验阳性,支气管舒张试验阳性;④经治疗上述症状可缓解或自行缓解。

两组研究对象除了目标疾患外,应排除伴 COPD、间质性肺炎等明确的其他类型慢性呼吸系统疾病病史;合并其他系统(如心血管、代谢、免疫、神经、泌尿及血液等)严重疾患并影响本研究正常进行;有鼻肿瘤、鼻外伤史、鼻中隔明显偏曲、已经确诊的鼻窦窦炎;有慢性上或下呼吸道感染者;体温超过 37.5℃ 或血象异常(白细胞计数 $> 10 \times 10^9/L$ 或 $< 4 \times 10^9/L$)。

1.2 样本采集

静脉血 5 ml, EDTA 抗凝, 2 ~ 7℃ 静置 10 ~ 30 min, 2 000 ~ 4 000 rpm 低温离心 3 ~ 10 min, 血浆取出, -70℃ 冷冻保存备用。

1.3 血浆 miRNA 表达谱分析

采用第 7 代 Exiqon miRCURY LNATM 芯片(V11.0),该芯片包含有 3 100 个 microRNA 探针,涵盖了 miRBase18.0 中所有的人类、小鼠和大鼠的 microRNAs 及所有相关的病毒 microRNAs,并且包含有 miRBase 没有的 25 个 miRPlus™ 人类 microRNAs 探针。

1.3.1 RNA 的提取 200 μ l 血浆 Trizol 法提取总 RNA,紫外吸收测定法检测总 RNA,以 A260/A280 在 1.8 ~ 2.1 的标本进行逆转录。

1.3.2 microRNA 标记与芯片杂交 采用 miRCURY™ Array Power 标记试剂盒(Exiqon),按说明将盒内试剂与样本 RNA 混合均匀、孵育,反应充分后加入标记缓冲液、标记酶和荧光标记物(Hy3™),再

行孵育后,加入杂交缓冲液及核酸酶释放缓冲液。将载玻片和芯片按说明组合后放入热压缩袋,使加热收缩后注入备好的杂交液,旋转孵育过夜。次日以配套缓冲液冲洗后进行芯片扫描。

1.3.3 microRNA 芯片扫描与分析 采用 Axon GenePix 4000B 芯片扫描仪获取芯片的荧光强度,使用 GenePix pro V6.0 生物芯片扫描分析仪进行数据分析及统计处理,数据差异显著性分析采用 Volcano Plot filtering 和 PAM(Prediction Analysis of Microarrays)结合完成;再采用 MEV(V4.6, Tiger)对筛选出的 microRNA 进行聚类分析。根据表达水平定义高表达和低表达的 microRNA,筛选出在 AR 组和 AR + AS 组血浆中差异表达的 microRNA($P < 0.05$)。

1.3.4 靶基因预测及基因功能分析 采用 mirbase, miranda 和 targetscan 3 个数据库的预测信息,取 3 个数据库重叠部分作为预测的靶基因,进行通路分析和初步基因功能分类(基因功能分析网站: <http://www.geneontology.org>)。

2 结果

2.1 MicroRNA 在 AR 与 AR + AS 中的差异表达

荧光强度数据标准化后,将 AR 组和 AR + AS 组数据相比,计算出各 microRNA 的差异倍数,筛选出上调与下调的 microRNA。差异倍数 > 2 视为明显上调,差异倍数 < 0.5 为明显下调,结果见图 1 和表 1。AR + AS 组较 AR 组,经 t 检验($P < 0.05$)后,结果显示 4 个 microRNA 下调,5 个 microRNA 上调。

2.2 靶基因预测

分析在不同预测网站上均出现的靶基因,缩小靶基因范围。经分析,hsa-let-7c 的靶基因有 101 个,hsa-miR-200b-3p 有 194 个,其他 microRNAs 均不能同时出现在所有 3 个预测网站。

经富集后获得有显著意义的信号传导通路分别见图 2。其中可以看出,黏合连接、Wnt 和 MAPK 信号传导通路与 microRNAs 明显相关,提示黏合连接、Wnt 和 MAPK 信号传导通路在 AR 发展到 AS 过程中起到了重要的作用。

3 讨论

变应性鼻炎(AR)是耳鼻咽喉常见的变应性疾病,其发病受遗传和环境的双重影响^[5-6],是一种复杂的多基因遗传性疾病,且发病率呈逐年上升的趋

表 1 AR + AS 组较 AR 组差异表达的 microRNA

microRNA	Fold	P
hsa-miR-200b-3p	0.48	0.006
hsa-miR-4782-3p	0.25	0.030
hsa-let-7c	0.41	0.004
hsa-miR-3612	0.33	0.007
hsa-miR-335-3p	2.15	0.027
hsa-miR-302a-3p	4.13	0.013
hsa-miR-3673	3.56	0.048
hsa-miR-548an	2.11	0.050
hsa-miR-205-3p	2.09	0.008

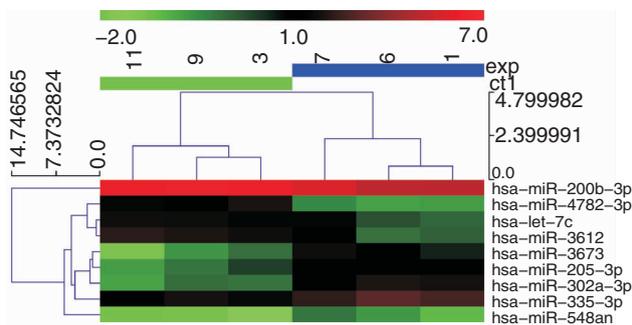


图 1 AR + AS 组较 AR 组差异表达的 microRNA 聚类分析

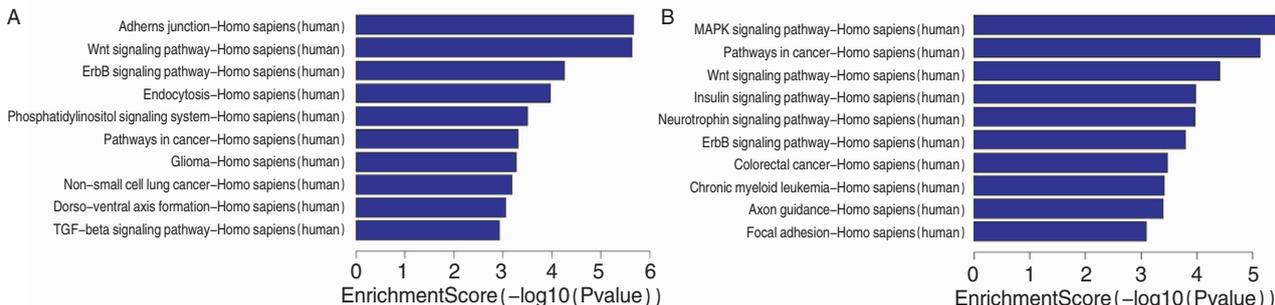


图 2 信号传导通路预测 A:上调 microRNA 靶基因的可能信号传导通路;B:下调 microRNA 靶基因的可能信号传导通路

势,已成为严重危害全球健康的问题之一。国内学者采用 ARIA 指南推荐的 AR 诊断标准在全国 11 个城市进行调查,发现我国各城市的 AR 患病率在 10% ~ 24% [7]。AR 虽不危及生命,但显著影响患者的生活质量。同时,AR 与 AS 一起构成了世界上影响儿童的两大疾病。调查显示,40% 的 AR 患者能够发展成为 AS,同时,80% 的 AS 患者同时患有 AR [3]。“One airway, one disease” [8],AR 被认为是 AS 的发病独立危险因素、发展的重要环节。

AR 和 AS 属 I 型变态反应性疾病。当特应型个体吸入变应原后,抗原递呈细胞对变应原摄取及加工处理递呈给初始 CD4⁺ T 细胞,初始 CD4⁺ T 细胞在 IL-4 等的刺激下分化为 Th2 细胞,Th2 细胞分泌细胞因子(如 IL-4、IL-10、IL-13 等)、刺激 B 淋巴细胞活化,合成特异性 IgE 并释放,与肥大细胞和嗜碱性粒细胞等表面的 IgE 受体结合,使气道黏膜处于致敏状态。当相同的变应原再次进入体内时,与 IgE 结合,使细胞释放以组胺为主的多种活性介质,导致包括 Th2 细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞等炎症细胞的浸润,加重局部病变。细胞释放的生物胺、前列腺素和白三烯等物质,刺激感觉神经末梢,同时兴奋胆碱能神经使腺体分泌增加,并可引起毛细血管扩张、通透性增加、血浆渗出,继而引起 AR 和 AS 的临床症状。总之,AR 和 AS 是大量炎症细胞、细胞因子及酶类等协同作用于鼻和气

管黏膜产生的。当前研究主要集中在 Th1/Th2 免疫失衡、Treg 细胞、Th13 细胞等炎症细胞及细胞因子上,对于基因表达调控方面的研究少有涉及,难以从遗传学角度阐述 AR 继发 AS 复杂的发病机制,需要用新的视角来探讨气道炎症性疾病的发生及发展。

RNA 测序技术的快速发展使我们对于包括非编码 RNA 在内的转录组有了快速广泛的认识。MicroRNA 作为一类由约 19 ~ 25 个核苷酸组成单链非编码 RNA 分子,通过结合靶 mRNA 3'-UTR 阻止蛋白质翻译或引起 mRNA 降解,从而能影响诸如细胞增殖、分化、凋亡、应激和免疫应答等生命进程多个环节 [9-10]。异常 microRNA 表达已被证明与多种疾病的发生发展相关联 [11-12],是具有潜在价值的诊断和预后的标志物 [13-15]。鉴于 microRNA 是一类非常特殊的能够调节转录组的分子,单一的 microRNA 能够同时作用于上百个基因,能够介导基因-环境相互作用下的表观遗传学机制,microRNA 很有可能 AR 患者罹患 AS 中发挥着关键的但是目前尚未探讨的作用 [16]。更为重要的是,研究发现 Th2 关联的特异性 microRNA (miR-21) 能够调节 Th0 细胞向 Th2 转化 [2],而 AR 和 AS 均为局部组织 Th2 类趋化因子及其受体为主的应答,因此 microRNA 在变应性呼吸道炎症性疾病中的作用引起了人们的极大兴趣。我们对 AR 和 AR + AS 患者血浆 microRNA 表达谱的初步筛查发现了 AR + AS 组患者共有 9 个

microRNA 差异表达,其中 5 个表达上调、4 个表达下调。所有这些差异表达的 microRNA 均未在 AR 或 AS 关联文献中被报道。对这些 microRNA 进行通路分析发现,以黏附连接、Wnt 和 丝裂原激活的蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号传导通路靶基因的差异表达最为显著。

黏附连接作为血管内皮细胞间重要的连接之一,与内皮细胞共同构成屏障,阻止血浆大分子蛋白从血液进入组织。最近的研究表明,构成黏附连接结构的钙粘蛋白 EC1 在血管内皮过滤大分子物质过程中起到关键作用^[17]。但是黏附连接与 AR 或 AS 的关联报道则很少。有报道利用 DNA 芯片对 AS 患者外周血基因表达检测表明,Wnt5a 表达上调,提示了 Wnt 与 AS 间的潜在的关联^[14]。促分裂原活化蛋白激酶(MAPK)(包括 ERK、p38、JNK) 信号传导通路在细胞的生长和分化的调节及细胞对细胞因子和应激的控制中扮演了重要角色^[18]。最近的研究显示哮喘小鼠肺内 ERK 活性显著高于一般正常小鼠^[19];在 OVA 诱导的小鼠和豚鼠肺内嗜酸性粒细胞性炎症能够被 p38 MAPK 抑制剂有效抑制^[20];JNK 也显示了与 IgE 转换的关联^[21]。因此,MAPK 信号传导通路是变应性疾病中重要的通道。

虽然我们的结果得到部分文献的支持,但由于受经费、研究周期等因素制约,未能进行相应靶基因验证及相关的功能学分析。需在后续的研究中进一步扩大样本量、验证相关靶基因并予以功能学分析。

参考文献:

[1] Pawankar R, Bunnag C, Chen Y, et al. Allergic rhinitis and its impact on asthma update (ARIA 2008)--western and Asian-Pacific perspective[J]. *Asian Pac J Allergy Immunol*, 2009, 27(4): 237-243.

[2] Lu TX, Munitz A, Rothenberg ME. MicroRNA-21 is up-regulated in allergic airway inflammation and regulates IL-12p35 expression [J]. *J Immunol*, 2009, 182(8): 4994-5002.

[3] Bousquet J, Khaltaev N, Cruz AA, et al. Allergic rhinitis and its impact on asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the World Health Organization, GA(2)LEN and AllerGen)[J]. *Allergy*, 2008, 63(suppl 86): 8-160.

[4] 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.

[5] 吴昆旻,李泽卿,薛飞,等. 变应性鼻炎母代与子代变应性疾病发病的相关性研究[J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2010, 16(4): 261-265.

[6] Wang QP, Wu KM, Li ZQ, et al. Association between maternal allergic rhinitis and asthma on the prevalence of atopic disease in offspring[J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2012, 157(4): 379-386.

[7] 韩德民,张罗,黄丹,等. 我国 11 个城市变应性鼻炎自报患病率调查[J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2007, 4(5): 378-384.

[8] Serrano C, Valero A, Picado C, et al. Rhinitis and asthma; one airway, one disease[J]. *Arch Bronconeumol*, 2005, 41(10): 569-578.

[9] Sayed D, Abdellatif M. MicroRNAs in development and disease. *Physiol Rev*, 2011, 91(3): 827-887.

[10] Smith CM, Watson DI, Michael MZ, et al. MicroRNAs, development of Barrett's esophagus, and progression to esophageal adenocarcinoma[J]. *World J Gastroenterol*, 2010, 16(5): 531-537.

[11] Medina PP, Nolde M, Slack FJ. OncomiR addiction in an in vivo model of microRNA-21-induced pre-B-cell lymphoma [J]. *Nature*, 2010, 467(7311): 86-90.

[12] Kota J, Chivukula RR, O'Donnell KA, et al. Therapeutic microRNA delivery suppresses tumorigenesis in a murine liver cancer model[J]. *Cell*, 2009, 137(6): 1005-1017.

[13] Kubiczkoa L, Kryukov F, Slaby O, et al. Circulating serum microRNAs as novel diagnostic and prognostic biomarkers for multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance [J]. *Haematologica*, 2014, 99(3): 511-518.

[14] Syed F, Huang CC, Li K, et al. Identification of interleukin-13 related biomarkers using peripheral blood mononuclear cells [J]. *Biomarkers*, 2007, 12(4): 414-423.

[15] Prior C, Perez-Gracia JL, Garcia-Donas J, et al. Identification of tissue microRNAs predictive of sunitinib activity in patients with metastatic renal cell carcinoma[J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e86263.

[16] Sato F, Tsuchiya S, Meltzer SJ, et al. MicroRNAs and epigenetics [J]. *FEBS J*, 2011, 278(10): 1598-1609.

[17] Nakagawa H, Hikiba Y, Hirata Y, et al. Loss of liver E-cadherin induces sclerosing cholangitis and promotes carcinogenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(3): 1090-1095.

[18] Vanden Berghe W, Plaisance S, Boone E, et al. p38 and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways are required for nuclear factor-kappaB p65 transactivation mediated by tumor necrosis factor[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(6): 3285-3290.

[19] Kumar A, Lnu S, Malya R, et al. Mechanical stretch activates nuclear factor-kappaB, activator protein-1, and mitogen-activated protein kinases in lung parenchyma: implications in asthma[J]. *FASEB J*, 2003, 17(13): 1800-1811.

[20] Underwood DC, Osborn RR, Kotzer CJ, et al. SB 239063, a potent p38 MAP kinase inhibitor, reduces inflammatory cytokine production, airways eosinophil infiltration, and persistence [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2000, 293(1): 281-288.

[21] Jabara HH, Geha RS. Jun N-terminal kinase is essential for CD40-mediated IgE class switching in B cells[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2005, 115(4): 856-863.

(收稿日期:2017-01-07)