

· 临床研究 ·

miRNA-142-5p 在特应性皮炎中的表达及其靶基因预测*

肖能鑫, 史丙俊[△], 刁庆春[▲], 王修勇, 蒋有让, 闫国富
(重庆市第一人民医院皮肤病与性病科, 重庆 400011)

摘要:目的 检测特应性皮炎(AD)患者外周血单个核细胞(PBMC)中 miRNA-142-5p 的表达情况, 并对其潜在靶基因预测。**方法** 选择 2011 年 10 月至 2012 年 2 月该院门诊皮肤科 AD 患者 8 例为观察组, 与观察组年龄和性别相匹配的健康体检者 6 例为对照组。提取分离所有受试者 PBMC 中的 miRNA, 采用实时荧光定量 PCR 法, 检测 miRNA-142-5p 的表达水平, 运用 miRanda、PicTar 和 TargetScan 等靶基因预测分析软件等生物信息学方法, 筛选其潜在靶基因。**结果** 与对照组比较, miRNA-142-5p 在观察组患者 PBMC 中的表达水平上调($P < 0.05$), 预测到交集靶基因有 39 个, 涉及到信号转导、细胞凋亡、细胞分化等。**结论** miRNA-142-5p 在 AD 患者 PBMC 中高表达, 可能通过调控其下游靶基因在 AD 发病中起着重要作用。

关键词: 微 RNAs; 皮炎, 特应性; 聚合酶链反应; 靶基因修复; 预测

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2013.15.007

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)15-1701-02

Expression of miRNA-142-5P in atopic dermatitis and its target gene prediction*

Xiao Nengxin, Shi Bingjun[△], Diao Qingchun[▲], Wang Xiuyong, Jiang Yourang, Yan Guofu

(Department of Dermatology and Venereology, First People's Hospital of Chongqing City, Chongqing 400011, China)

Abstract: **Objective** To detect the expression levels of miRNA-142-5p in peripheral blood mononuclear cell (PBMC) from the patients with atopic dermatitis (AD) and to predict its latent target genes. **Methods** 8 cases of AD treated in the dermatological outpatient department of this hospital from October 2011 to February 2012 were selected as the observation group and 6 age-matched and sex-matched individuals with physical examination as the control group. PBMC were isolated, miRNAs in PBMC were extracted and separated by miRNA extraction and separation kit. The expression levels of miRNA-142-5p in PBMC were detected by using real-time quantitative PCR. Six databases including miRanda, PicTar and Targetscan were adopted for predicting the targets of selected miRNAs. **Results** Compared with the control group, the relative expression levels of miRNA-142-5p in PBMC of AD patients were up-regulated ($P < 0.05$). A total of 39 target genes for miRNA-142-5p were shared between these five databases, which might be involved in signal transduction, apoptotic process and cell differentiation. **Conclusion** miRNA-142-5p is up-regulated in the PBMC of AD patients, which may play an important role in the pathogenesis of AD by regulating the downstream target gene.

Key words: microRNAs; dermatitis, atopic; polymerase chain reaction; targeted gene repair; forecasting

特应性皮炎(atopic dermatitis, AD)是一种慢性复发性、瘙痒性、炎症性皮肤病。多自婴儿期起病,病情迁延反复。其病因及发病机制还未完全清楚,目前考虑为一种多基因病,涉及环境、基因及免疫之间的相互作用。近年来,一类新型微RNAs (microRNAs, miRNAs) 分子在医学学科的研究中备受关注,其为一类长度大约为 20~25 个核苷酸小分子 RNA,分布广泛。据推测,miRNAs 可负反馈调节人类约 1/3 基因编码的 mRNA^[1]。miRNA 可通过两种机制致使特定基因的沉默,对机体生长、发育及各种疾病尤其是肿瘤的发生和发展具有重要的调节功能。研究 miRNA 及其生物学功能,特别研究其对肿瘤的负反馈调节的作用,是生命医学研究的最新方向之一。近年来,运用基因芯片与高通量测序技术,已筛选出多种与疾病相关 miRNA,证实了 miRNA 与人类重大疾病(如肿瘤、神经系统疾病、免疫性疾病等)的发生、发展存在相关性^[2]。目前尚少有相关的文献资料关于 AD 患者外周血单个核细胞

(PBMC)中 miRNA 的研究。本研究初步探索 AD 患者 PBMC 中 miRNA 的变化,并进行生物信息学分析预测其靶基因,旨在为研究 AD 的分子调控机制提供实验依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2011 年 10 月至 2012 年 2 月本院皮肤科门诊 AD 患者 8 例(观察组),其中男 2 例,女 6 例;年龄 3~16 岁,平均(8.0±3.8)岁。入选标准:(1)符合 Hanifin & Rajka AD 诊断标准;(2)3~16 岁患者;(3)病程 1 年以上,每年缓解期小于 3 个月者。排除标准:血液常规及肝、肾功能检查有严重异常的患者;患有传染病、精神疾病、血液疾病、肿瘤、结缔组织病、糖尿病、心脏病等系统疾病者;近 1 个月内系统使用糖皮质激素药物或免疫抑制剂者。选择同期年龄、性别与观察组相匹配的健康体检儿童 6 例为对照组。

1.2 方法

1.2.1 主要实验试剂 miRcute miRNA 提取分离试剂盒(离

* 基金项目:重庆市自然科学基金资助项目(cstc2012jjA10141)。作者简介:肖能鑫(1978~),医师,硕士研究生,主要从事免疫性皮肤病研究;现在重庆三峡医药高等专科学校附属医院皮肤科工作(邮编,404000)。△ 通讯作者, Tel: 15111882212; E-mail: wa_zgkm@yahoo.com.cn。▲ 通讯作者, Tel: 13983735555; E-mail: qchdiao@vip.sina.com。

心柱型)、miRNA cDNA 第一链合成试剂盒、miRNA 荧光定量检测试剂盒、miRNA-142-5P 和 has-U6 检测引物均购天根生化科技有限公司。

1.2.2 PBMC 分离及 miRNA 的提取分离 Ficoll 密度梯度离心法分离 PBMC;miRNA 的提取分离,按试剂盒操作说明书提取分离 miRNA,而后进行纯度和浓度的检测。

1.2.3 逆转录合成 miRNA cDNA 第一链 首先进行 miRNA 3'末端加尾处理,所得的 Poly(A)反应液,取 2 μ L 配制 cDNA 反应体系进行下一步 cDNA 第一链合成,所得的 cDNA 第一链置 -20 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.4 实时荧光定量 PCR(real-time PCR) 采用 SYBR Green I 嵌合法,以 U6 为内参照进行实时荧光定量。本实验采用逆转录产物 10 倍稀释法建立标准曲线^[3],每种浓度设 2 个平行复孔。按照上述 real-time PCR 条件,对前期制备的各样本的逆转录产物进行 miRNA-142-5p 检测。每个 miRNA 做 1 次 PCR,每个样本均做 3 个平行复孔,取其平均值分析。

1.2.5 数据处理 首先计算所有标本 miRNA-142-5p 和 U6 的 3 个重复孔的平均 CT 值,将其作为每个样本的实际 CT 值,将同一样本 miRNA-142-5p CT 值减去其相应 U6 的 CT 值,获得 Δ CT 值,在所有 PBMC 样本的 Δ CT 值中选择最大值 Δ CT (max) 作为衡量的标准,用其它样本的 Δ CT 值减去 Δ CT (max),得到每一个样本的 $\Delta\Delta$ CT 值,最后求得每一个样本的相对表达量 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 。

1.2.6 miRNA-142-5p 靶基因预测 应用 miRanda、miRDB、PicTar、miRWalk、RNA22、Targetscan 数据库预测,选取至少 5 种计算方法均能预测到的基因作为其潜在靶基因。

1.3 统计学处理 数据采用 SPSS17.0 统计软件包进行统计分析,所有数据均进行正态性检验。正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,相对表达量比较采用 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miRNA-142-5p real-time PCR 扩增曲线及融解曲线 采用 SYBR Green I 嵌合法检测 miRNA-142-5p 的表达,在所有的样本中均能得到良好的扩增。miRNA-142-5p 和内参 U6 扩增效率基本一致(S 值差绝对值小于 0.1),可以用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算相对表达量。各样本融解曲线呈单峰,说明扩增无二聚体形成,扩增产物单一,见图 1、2。

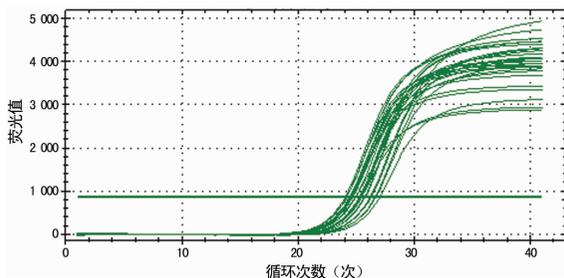


图 1 miRNA-142-5p 扩增曲线

2.2 两组 PBMCs 中 miRNA-142-5p 表达水平比较 miRNA-142-5p 在观察组患者 PBMC 中的相对表达量为 (72.16 ± 20.94) ,在对照组 PBMC 中的相对表达量为 (18.79 ± 13.19) ,AD 患者的 PBMCs 中 miRNA-142-5p 表达均上调,其表达水平与对照组比较,差异有统计学意义($P = 0.02$)。

2.3 miRNA-142-5p 靶基因预测 5 或 6 个数据库同时预测出靶基因数目为 39 个,其中包括: MAGI2、MARCH6、IGF2BP3、DCBLD2、CPEB2、ADPRH、ZNF569、SH3D19、HIPK1、CENTB2、SGMS1、SACS、HNRPH3、LRP2、MYCN、OTX2、PCDH9、PCTK2、LRP1B、ATG16L1、BTBD7、CXCR7 等。结合 GenBank 数据库得到相关靶基因的信息,它们参与细胞周期、信号转导、细胞凋亡、细胞分化等各个方面的调控。

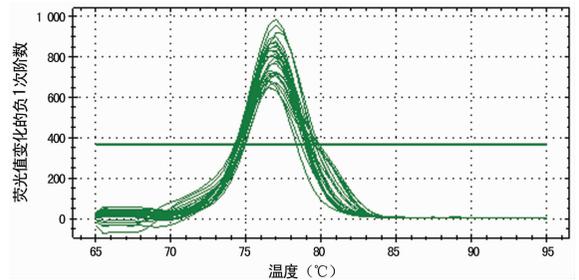


图 2 miRNA-142-5p 融解曲线

3 讨论

miRNA 已成为细胞生物学、基因遗传学以及临床学科等领域的研究热点。其通过 mRNA 的降解或序列特异性抑制来调控基因表达,参与细胞发育、增殖、分化与凋亡等一系列的重要生物学进程^[4]。miRNA 参与正常免疫系统发育的调控^[5]和慢性炎症性疾病的发病过程^[6],机体细胞在接收到内源性或外源性信号后,miRNA 可出现相应表达,其作为机体对内外环境变化后一种早期反应,参与了固有免疫应答过程。

miRNA-142 位于人类 17 号染色体上,有 2 个亚单位: miRNA-142-3p 和 miRNA-142-5p。成熟 miRNA-142-5p 单链序列为: 5'-CAUAAAGUAGAAAGCACUAC-3'。miRNA-142 在造血干细胞的分化中具有重要作用。miRNA-142-5p 在 T 细胞中有明显的表达,Wu 等^[7]用基因芯片技术检测了初始 T 细胞、效应性 T 细胞和记忆性 T 细胞中 miRNAs 的表达,发现并证实了 miRNA-142-5p 等在效应性 T 细胞中表达下调,而在初始 T 细胞和记忆性 T 细胞中表达上调。Landgraf 等^[8]研究亦表明,miRNA-142 在外周血 CD8+T 细胞中表达上升。Annoni 等^[9]研究发现,miRNA-142 可能通过调控抗原在抗原提呈细胞中的表达,诱导抗原特异性调节性 T 细胞的产生,从而使机体产生免疫耐受。Nakamachi 等^[10]研究发现,相对于骨性关节炎患者,miRNA-142 在类风湿性关节炎患者的胶原纤维中表达上调。2010 年,Sonkoly 等^[6]研究了 AD 患者皮损中 miRNA 的表达,发现与健康对照组相比,AD 患者皮损中共有 44 个 miRNA 差异性表达,其中 10 个 miRNA 上调表达,包括 miRNA-142-5p,miRNA-142-3p。本研究表明,与健康人相比,miRNA-142-5p 在 AD 患者 PBMC 中表达上调,与 Sonkoly 等^[6]关于 miRNA-142-5p 在 AD 患者皮损的研究结果相一致。

目前关于 miRNA-142-5p 的相关报道较少,其在 AD 的发病过程的作用还不清楚。本研究通过生物信息学技术查找到 miRNA-142-5p 可与多个基因 3'UTR 相结合,下一步需要对其可能的靶基因进行实验验证,从而为 AD 的靶基因治疗等提供新的依据。

参考文献:

- [1] Xi Y, Shalgi R, Fodstad O, et al. Differentially regulated micro-RNAs and actively translated messenger(下转第 1705 页)

细胞、巨噬细胞和纤维细胞产生多种促炎介质 TNF- α 、IL-1、IL-6、IL-8、单核细胞趋化蛋白-1、一氧化氮合酶 2、金属蛋白酶、生长调节因子 α 和化学增殖素以诱导炎症。当前的研究显示,IL-17 广泛参与免疫应答及机体的炎症,在靶组织和血清中的高表达与移植排斥反应、自身免疫病、感染及肿瘤等疾病的发生、发展密切相关^[12-15]。在肠道菌群紊乱的影响下,抵抗致病原的能力逐步下降,IL-6、IL-17 介导肠道炎症及免疫,IL-6、IL-17 水平逐渐升高。本文观察组 IL-6、IL-17 表达水平低于对照组,可见应用双歧杆菌四联活菌片有效改善了肠道内的菌群失调,使肠道内微生态平衡恢复正常。

综上所述,双歧杆菌四联活菌片联合药物治疗小儿非感染性腹泻疗效显著,有效提高了治愈率,缩短了止泻时间和痊愈时间,其血清中 IL-6、IL-17 表达水平恢复正常相对更快,而且服用方便,无明显不良反应,适宜应用于临床。

参考文献:

- [1] 华琦. 培菲康联合思密达治疗非感染性腹泻的疗效[J]. 实用临床医学, 2011, 12(5): 29, 32.
- [2] 方鹤松, 魏承毓, 段怒诚, 等. 中国有关腹泻病诊断治疗方案[J]. 中国实用儿科杂志, 1998, 13(6): 381-384.
- [3] 周芳. 双歧杆菌四联活菌片辅助治疗小儿腹泻的临床观察[J]. 中国医药指南, 2010, 8(33): 30-31.
- [4] 廖洁廉. 双歧杆菌四联活菌片治疗小儿腹泻临床观察[J]. 中国医药导报, 2009, 6(34): 64, 66.
- [5] 卓燕舞, 吴美水, 林瑞凤. 小儿腹泻的相关因素及护理对策[J]. 医学理论与实践, 2009, 22(11): 1384-1385.
- [6] 石省军, 杨四喜. 健脾固脱方治疗小儿非感染性腹泻 90 例[J]. 山东中医杂志, 2010, 29(10): 676-677.

- [7] 董丽, 何涓, 任俐. 消旋卡多曲治疗婴幼儿非感染性腹泻疗效分析[J]. 中国社区医师: 医学专业半月刊, 2009, 11(19): 100.
- [8] 郭菊珍, 秦亚茹. 山药为主治疗婴幼儿非感染性腹泻 64 例[J]. 陕西中医, 2011, 32(7): 803.
- [9] 熊燕, 余中方, 凌婷. 温脾散脐贴治疗小儿非感染性腹泻 76 例[J]. 湖南中医杂志, 2011, 27(5): 72-73.
- [10] 江米足. 小儿腹泻病的发病机制[J]. 中国临床医生, 2009, 37(2): 15-17.
- [11] 张玉侠. 效应分子 IL-17 的抗感染作用[J]. 国际免疫学杂志, 2009, 32(3): 241-244.
- [12] 牛文元, 张镁晒, 赵青, 等. 感染性腹泻病和溃疡性结肠炎患儿血清 IL-17 的水平变化及意义[J]. 中国现代医生, 2010, 48(5): 58-59.
- [13] Kontorinis G, Psarommatis I, Karabinos C, et al. Incidence of non-infectious 'acute mastoiditis' in children[J]. J Laryngol Otol, 2012, 126(3): 244-248.
- [14] Michos A, Terzidis A, Kanariou M, et al. Association of allergic sensitization with infectious diseases burden in Roma and non-Roma children[J]. Pediatr Allergy Immunol, 2011, 22(2): 243-248.
- [15] Ferrara F, Quaglia S, Caputo I, et al. Anti-transglutaminase antibodies in non-coeliac children suffering from infectious diseases[J]. Clin Exp Immunol, 2010, 159(2): 217-223.

(收稿日期: 2012-11-18 修回日期: 2013-02-16)

(上接第 1702 页)

- [1] RNA transcripts by tumor suppressor p53 in colon Cancer[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(7 Pt 1): 2014-2024.
- [2] 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.
- [3] 李莉, 林晓丹, 温旺荣. 茎环引物的 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测 miR-155 表达及其临床初步应用[J]. 检验医学, 2010, 25(4): 296-300.
- [4] Hwang HW, Mendell JT. MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis[J]. Br J Cancer, 2006, 94(6): 776-780.
- [5] Sonkoly E, Stahle M, Pivarcsi A. MicroRNAs and immunity: novel players in the regulation of normal immune function and inflammation[J]. Semin Cancer Biol, 2008, 18(2): 131-140.
- [6] Sonkoly E, Janson P, Majuri ML, et al. MiR-155 is over-expressed in patients with atopic dermatitis and modulates T-cell proliferative responses by targeting cytotoxic T

lymphocyte-associated antigen 4[J]. J Allergy Clin Immunol, 2010, 126(3): 581-589.

- [7] Wu H, Neilson JR, Kumar P, et al. miRNA profiling of naive, effect and memory CD8 T cells[J]. PLoS One, 2007, 2(10): e1020.
- [8] Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, et al. A mammalian microRNA expression Atlas based on small RNA library sequencing[J]. Cell, 2007, 129(7): 1401-1414.
- [9] Annoni A, Brown BD, Cantore A, et al. In vivo delivery of a microRNA-regulated transgene induces antigen-specific regulatory T cells and promotes immunologic tolerance[J]. Cell, 2009, 114(25): 5152-5161.
- [10] Nakamachi Y, Kawano S, Takenokuchi M, et al. MicroRNA-124a is a key regulator of proliferation and monocyte chemoattractant protein 1 secretion in fibroblast-like synovocytes from patients with rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Rheum, 2009, 60(5): 1294-1304.

(收稿日期: 2012-11-26 修回日期: 2013-02-17)