

• 论 著 •

不同类型肠易激综合征患者血清 miRNA-144、miRNA-29a 和 miRNA-200a 水平的临床意义^{*}

杨立顺, 康建华[△], 沈兴娅, 李德来, 冯绍华, 李 娜

(天津市北辰中医医院检验科, 天津 300400)

摘 要:**目的** 探讨不同类型肠易激综合征(IBS)患者血清微小 RNA(miRNA)-144、miRNA-29a 和 miRNA-200a 表达水平的相关性及临床意义,为 IBS 的病因学研究提供理论依据。**方法** 采用病例抽样的方法选取 2015 年 10 月至 2018 年 6 月该院 IBS 患者 110 例,选取同期 110 例体检健康者为健康对照组。受试者采样前 12 h 低蛋白饮食,每位受试者取 10 mL 静脉血样本,静脉血 3 000 r/min 离心后取上清。采用实时荧光定量反转录 PCR 测定受试者 miRNA-144、miRNA-29a 和 miRNA-200a 表达水平。**结果** 混合型 IBS 的 miRNA-144、miRNA-29a 和 miRNA-200a 表达水平均显著高于其他 3 种亚型($P<0.05$),不确定型 IBS 的 miRNA-144、miRNA-29a 和 miRNA-200a 表达水平均显著高于便秘型 IBS 及腹泻型 IBS($P<0.05$)。混合型、不确定型 IBS 患者的 miRNA-144、miRNA-29a、miRNA-200a 的表达水平两两之间均存在相关性且有统计学意义($P<0.05$),但对于单纯腹泻或者便秘型 IBS 患者来说,仅 miRNA-29a 与 miRNA-200a 的表达水平存在统计学相关性($P<0.05$)。**结论** 混合型、不确定型 IBS 患者血清 miRNA-144、miRNA-29a 和 miRNA-200a 表达水平较其他 2 种亚型高,且血清 miRNA-144、miRNA-29a 和 miRNA-200a 表达两两之间具有显著相关性。

关键词: 肠易激综合征; miRNA-144; miRNA-29a; miRNA-200a

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2020.09.002

中图法分类号:R446.1;R574

文章编号:1673-4130(2020)09-1030-04

文献标识码:A

Clinical significance of serum miRNA-144, miRNA-29a, miRNA-200a levels in patients with different types of irritable bowel syndrome^{*}

YANG Lishun, KANG Jianhua[△], SHEN Xingya, LI Delai, FENG Shaohua, LI Na

(Department of Clinical Laboratory, Tianjin Beichen District Chinese Medicine Hospital, Tianjin 300400, China)

Abstract:**Objective** To explore the correlation and clinical significance of serum microRNA (miRNA)-144, miRNA-29a, miRNA-200a expression in different types of irritable bowel syndrome (IBS) patients, and provide a theoretical basis for the etiology of IBS. **Methods** Totally 110 IBS patients From October 2015 to June 2018 were selected by case sampling method, and 110 healthy people were selected as control group. The subjects were fed a low protein diet 12 hours before sampling, 10 mL of venous blood samples were taken from each subject, and the supernatant was taken after centrifugation of the venous blood at 3 000 r/min. The expression levels of miRNA-144, miRNA-29a and miRNA-200a were measured by real-time fluorescence quantitative PCR. **Results** The expression levels of miRNA-144, miRNA-29a and miRNA-200a in mixed IBS were significantly higher than those in the other three subtypes ($P<0.05$). The expression of miRNA-144, miRNA-29a and miRNA-200a in uncertain IBS was significantly higher than that in constipation IBS and diarrhea IBS ($P<0.05$). The expression levels of miRNA-144, miRNA-29a and miRNA-200a in patients with mixed and uncertain IBS were statistically correlated ($P<0.05$), but only miRNA-29a and miRNA-200a were statistically correlated in patients with simple diarrhea or constipation IBS ($P<0.05$). **Conclusion** The expression levels of miRNA-144, miRNA-29a and miRNA-200a in mixed and uncertain IBS patients were higher than those in other two subtypes, and there was significant correlation between miRNA-144, miRNA-29a and miRNA-200a in serum.

^{*} 基金项目:国家高技术研究发展计划(863 计划)项目(2014AA022301);天津市北辰区科技发展计划项目(2016-SHGY-13)。

作者简介:杨立顺,男,主任技师,主要从事免疫学与临床检验研究。 [△] 通信作者, E-mail: kangjianh_love@126.com。

本文引用格式:杨立顺,康建华,沈兴娅,等. 不同类型肠易激综合征患者血清 miRNA-144、miRNA-29a 和 miRNA-200a 水平的临床意义

Key words: irritable bowel syndrome; miRNA-144; miRNA-29a; miRNA-200a

流行病学资料表明,我国肠易激综合征(IBS) 的患病率略低于西方国家。该病以腹痛或腹部不适为主要症状,是一种常见的功能性肠病^[1],患者常伴有排便习惯改变,上述症状在排便后可有所改善。临床上可依据粪便的性状将其分为便秘型 IBS、腹泻型 IBS、混合型 IBS 及不确定型 IBS。已有研究表明,各亚型 IBS 长期反复发作对患者生活质量的影响程度与一些慢性疾病,如糖尿病、充血性心力衰竭、肾衰竭等大体相同^[2]。虽然,目前多种治疗 IBS 药物已应用于临床,但尚存在争议,如 5-羟色胺受体拮抗剂虽然能够抑制腹泻型 IBS 患者小肠的运输活力,降低结肠积气,以缓解患者腹泻症状,但在患者停药后 1 周内易复发,不能取得满意的疗效^[3]。近年学者也指出,IBS 各亚型的发病机制均不是单一性的,但对于各亚型具体的发病机制仍缺乏了解^[2]。

微小 RNA(miRNA)是一种非编码单链 RNA 分子,目前在生物界被实验证实存在数目超过 2 万,其参与转录后基因表达调控,并对肿瘤的发生和发展起到不同层面的作用。目前,多项研究报道指出,miRNA 参与 IBS 的发生、发展。HOU 等^[4]研究发现,miRNA-144 的上调可通过直接靶向作用于紧密连接蛋白和胞质紧密粘连蛋白 1 促进肠道通透性增高并损害上皮屏障的保护作用,并认为 miRNA-144 可能是肠道通透性过高的关键调节因子,可能是腹泻型 IBS 的潜在治疗靶点。CHAO 等^[5]研究显示,miRNA-29a 通过降低 IBS 大鼠中水通道蛋白表达来增加结肠上皮细胞的肠膜通透性。HOU 等^[6]研究发现,miRNA-200a 可通过靶向作用下调大麻素受体 1 和羟色胺转运体来诱导内脏痛觉过敏,加重或促进 IBS 的进展。然而,上述 3 种 miRNA 在不同类型 IBS 患者中的表达情况尚未见报道。本研究拟针对不同类型 IBS 患者血清 miRNA-144、miRNA-29a 和 miRNA-200a 表达水平的相关性及临床意义进行分析,以期 IBS 的病因学研究提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本研究主要通过病例抽样法,选取 IBS 患者 110 例为研究对象,选取同期 110 例体检健康者为健康对照。研究对象均抽样于本院检验科,所有患者均为首次确诊,收集时间为 2015 年 10 月至 2018 年 6 月。纳入标准:(1)自愿参与,即了解本课题组的研究目后自愿接受研究的患者;(2)符合研究标准,即由本研究署名的医院确诊且全程在该医院进行治疗的患者。排除标准:(1)1 年内参与过同类型研究的患者;(2)存在精神卫生问题与心理障碍的患者;(3)中途失访的患者。

1.2 方法 IBS 不同类型的判定依据如下。(1)腹泻型 IBS:硬便或块状便排便比例<25%,稀便(糊状便)或水样便排便比例≥25%;(2)混合型 IBS:稀便(糊状便)或水样便排便比例≥25%,硬便或块状便排便比例>25%;(3)便秘型 IBS:稀便(糊状便)或水样便排便比例<25%,硬便或块状便排便比例≥25%;(4)不确定型 IBS:粪便的性状不符合上述三者之中的任一标准。

征得受试者同意的前提下对受试者进行生物采样。受试者采样前 12 h 低蛋白饮食,每位受试者取 10 mL 静脉血样本,静脉血 3 000 r/min 离心后取上清并保存于一80 ℃冰箱备用。采用实时荧光定量反转录 PCR(RT-PCR)测定受试者 miRNA-144、miRNA-29a 和 miRNA-200a 表达水平。提取血清总 RNA,并采用茎环法反转录为 cDNA,进行 RT-PCR 检测。检测条件:95 ℃ 5 min;95 ℃ 30 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,42 个循环。采用 2^{-ΔΔCt} 法计算相对表达量。使用引物序列见表 1。

表 1 miRNA-144、miRNA-29a、miRNA-200a 和 U6 引物序列		
引物	位置	序列(5'-3')
miRNA-144	上游	ACG CAT TCG ACA GGT TAG A
	下游	CGT CGT ACA CGA CTG CCA CG
miRNA-29a	上游	GGT ACG ACT TCA GGT
	下游	AGC CGA AGG TCT ACA A
miRNA-200a	上游	CGG TCG GTA CCG CCC CTA
	下游	CGC ATA TGA CAA GTA CCA GT
U6	上游	ACG CGA ATG AAC GGT TTG
	下游	GCC CAC AGT GAG TGC CTG AT

1.3 统计学处理 采用 SPSS20.0 统计软件进行数据分析。计算得到的 miRNA 的相对表达量均经取负对数(-log)处理,得到的数据呈正态分布以 $\bar{x} \pm s$ 表示;采用方差分析检验对不同类型 IBS 患者的 miRNA-144、miRNA-29a 和 miRNA-200a 表达水平进行比较,两两比较则采用 SNK-*q* 法;采用 Pearson 相关法计算不同类型 IBS 患者 miRNA-144、miRNA-29a 和 miRNA-200a 之间的相关系数(*r*)。检验水准 $\alpha = 0.05$,采用双侧概率,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 不同类型 IBS 患者的 miRNA-144、miRNA-29a 和 miRNA-200a 表达水平比较 与健康对照(miRNA-144 6.16±1.44,miRNA-29a 0.21±0.05,miRNA-200a 0.14±0.03)相比,IBS 患者(miRNA-144 15.92±

4.86, miRNA-29a 1.40±0.27, miRNA-200a 1.33±0.20)表达水平均显著增高($P<0.05$)。不同类型 IBS 患者的 miRNA-144、miRNA-29a 和 miRNA-200a 表达水平对比结果显示,混合型 IBS 患者的 miRNA-144、miRNA-29a 和 miRNA-200a 表达水平均显著高于其他 3 种亚型($P<0.05$),不确定型 IBS 患者的 miRNA-144、miRNA-29a 和 miRNA-200a 表达水平均显著高于便秘型 IBS 及腹泻型 IBS($P<0.05$)。见表 2。

表 2 不同类型 IBS 患者的 miRNA-144、miRNA-29a 和 miRNA-200a 表达水平对比($\bar{x}\pm s$)				
组别	<i>n</i>	miRNA-144	miRNA-29a	miRNA-200a
便秘型 IBS	15	13.22±4.34 ^{ab}	0.72±0.34 ^{ab}	0.35±0.14 ^{ab}
腹泻型 IBS	11	13.28±3.26 ^{ab}	0.78±0.23 ^{ab}	0.28±0.15 ^{ab}
混合型 IBS	50	17.42±4.34 ^b	1.72±0.55 ^b	1.86±0.54 ^b
不确定型 IBS	34	15.73±3.93 ^a	1.43±0.53 ^a	1.32±0.56 ^a
<i>F</i>		14.742	11.192	24.143
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001

注:^a表示方差分析有统计意义的基础上与混合型 IBS 结果差异有统计学意义;^b表示方差分析有统计意义的基础上与不确定型 IBS 结果差异有统计学意义。

表 3 便秘型 IBS 患者的 miRNA-144、miRNA-29a 和 miRNA-200a 表达水平的相关性(<i>r</i>)			
指标	miRNA-144	miRNA-29a	miRNA-200a
miRNA-144	1.000	0.143	0.073
miRNA-29a	0.143	1.000	0.428 ^a
miRNA-200a	0.073	0.428 ^a	1.000

注:^a表示 $P<0.05$ 。

表 4 腹泻型 IBS 患者的 miRNA-144、miRNA-29a 和 miRNA-200a 表达水平的相关性(<i>r</i>)			
指标	miRNA-144	miRNA-29a	miRNA-200a
miRNA-144	1.000	0.117	0.086
miRNA-29a	0.117	1.000	0.350 ^a
miRNA-200a	0.086	0.350 ^a	1.000

注:^a表示 $P<0.05$ 。

2.2 不同类型 IBS 患者的 miRNA-144、miRNA-29a 和 miRNA-200a 表达水平的相关性 便秘型 IBS 患者的 miRNA-144、miRNA-29a 和 miRNA-200a 表达水平的相关性分析结果显示,miRNA-29a 和 miRNA-200a 的表达水平存在统计学相关性($P<0.05$),而 miRNA-144 与 miRNA-29a、miRNA-200a 的表达水平不存在统计学相关性($P>0.05$),见表 3。腹泻型 IBS 患者的 miRNA-144、miRNA-29a 和 miRNA-200a 表达水平的相关性分析结果显示,miRNA-29a 和 miRNA-200a 的表达水平存在统计学相关性($P<$

0.05),而 miRNA-144 与 miRNA-29a、miRNA-200a 的表达水平不存在统计学相关性($P>0.05$),见表 4。混合型 IBS 患者的 miRNA-144、miRNA-29a 和 miRNA-200a 表达水平的相关性分析结果显示,miRNA-144、miRNA-29a 和 miRNA-200a 的表达水平均存在两两之间的统计学相关性($P<0.05$),见表 5。不确定型 IBS 患者的 miRNA-144、miRNA-29a 和 miRNA-200a 表达水平的相关性分析结果显示,miRNA-144、miRNA-29a 和 miRNA-200a 的表达水平均存在两两之间的统计学相关性($P<0.05$),见表 6。

表 5 混合型 IBS 患者的 miRNA-144、miRNA-29a 和 miRNA-200a 表达水平的相关性(<i>r</i>)			
指标	miRNA-144	miRNA-29a	miRNA-200a
miRNA-144	1.000	0.274 ^a	0.261 ^a
miRNA-29a	0.274 ^a	1.000	0.386 ^a
miRNA-200a	0.261 ^a	0.386 ^a	1.000

注:^a表示 $P<0.05$ 。

表 6 不确定型 IBS 患者的 miRNA-144、miRNA-29a 和 miRNA-200a 表达水平的相关性(<i>r</i>)			
指标	miRNA-144	miRNA-29a	miRNA-200a
miRNA-144	1.000	0.248 ^a	0.319 ^a
miRNA-29a	0.248 ^a	1.000	0.443 ^a
miRNA-200a	0.319 ^a	0.443 ^a	1.000

注:^a表示 $P<0.05$ 。

3 讨 论

本研究结果显示,混合型、不确定型 IBS 患者 miRNA-144、miRNA-29a 和 miRNA-200a 三者的表达水平均存在两两之间的统计学相关性,但对于单纯腹泻或便秘型的 IBS 患者来说,仅 miRNA-29a 和 miRNA-200a 的表达水平存在统计学相关性,而 miRNA-144 与 miRNA-29a 和 miRNA-200a 的表达水平不存在统计学相关性。上述研究结果提示,miRNA-29a 和 miRNA-200a 的表达可能同时参与了 4 型 IBS 的发病,且二者之间存在相互协同的正相关关系。此外,miRNA-144 可能参与混合型与不确定型 IBS 的发病。根据相关的文献可知,miRNA 介导 IBS 相关激惹性物质蓄积的信号通路是 miRNA 参与 IBS 发病的可能机制,且该基因对于多个细胞信号通路下游是关键靶基因^[7-9],所以,从细胞生物学理论上讲,可以假设 miRNA 是一种 IBS 发生的上游信使物质,但 IBS 的发生具体被这种上游物质通过什么样的作用模式调控,以及这种发生的概率及意义是否具有生物学和统计学方面的意义仍有待考证。

本研究还发现,混合型 IBS 患者的 miRNA-144、miRNA-29a 和 miRNA-200a 表达水平均显著高于其

他 3 种亚型, 而不确定型 IBS 患者的 miRNA-144、miRNA-29a 和 miRNA-200a 表达水平均显著高于便秘型 IBS 及腹泻型 IBS。有研究发现, miRNA-144、miRNA-29a 和 miRNA-200a 可下调紧密连接蛋白、胞质紧密粘连蛋白 1、水通道蛋白、大麻素受体 1 和羟色胺转运体等靶蛋白的表达活性, 而这些靶蛋白的活性降低需要细胞外钙离子的支持, 这种现象称为脱敏^[4-6]。其生理学基础是钙的流入和细胞内钙的相应增加, 而 IBS 患者大多伴有不明原因的肠道部位钝痛, 且容易在不明的诱发因素下发生进一步激惹, 因此, 在一定程度上介导了这种效应^[9]。各种信号传导途径(如钙调神经磷酸酶、钙调蛋白、磷脂酰肌醇二磷酸的减少)均与脱敏有关。有研究曾发现, IBS 患者在经过较为长期的病程后会出现钙通道调控蛋白部分结构域被激活的现象, 并推测其原因可能为大量钙离子的流入在一定程度上提高了痛觉触发点位的阈值^[7-9]。上述均提示, miRNA-144、miRNA-29a 和 miRNA-200a 的表达是 IBS 发病的重要基础。

另外, 水通道蛋白、大麻素受体 1 和羟色胺转运体均具有 2 个特殊的末端结构(C-末端和 N-末端)。C-末端主要负责参与痛觉的传递, N-末端则有一定的镇痛作用, 且该作用能被纳洛酮翻转。在相关的动物模型中, 实验人员模拟出受试动物形成肠道易激惹的生理环境, 并通过不同的刺激模式观察 miRNA-29a 和 miRNA-200a 水平与肠道易激惹程度是否存在线性变化的关系, 结果显示 miRNA-29a 和 miRNA-200a 能直接或间接诱导 C-末端和 N-末端的结构域发生变性, 也可通过促进脑啡肽的释放进一步促进谷氨酸等的释放参与痛觉传递^[5-6]。miRNA-29a 和 miRNA-200a 可引起相应支配部位的神经区域出现血管扩张, 继而导致血浆蛋白外渗等炎症反应, 而这也可能是 IBS 患者出现不明原因钝痛且通过常规的镇痛途径效果并不明显的一个主要因素^[5-6]。有研究发现, IBS 出现组织损伤和随后的炎症时, 各种前列腺素和缓激肽的释放也可在一定程度上诱导 miRNA-29a 和 miRNA-200a 的高表达^[5-6]。同时, miRNA-29a 和 miRNA-200a 的高表达对有害刺激(如高温)的敏感性不是静态的, 某些情况下可因患者自身的生理状况发生变化出现伤害感受器对有害刺激的敏感性增加^[10-11]。鉴于 miRNA-29a 和 miRNA-200a 间有紧密的作用机制, 可以解释本次研究中 miRNA-29a 和 miRNA-200a 的表达水平在 4 种 IBS 亚型患者中均具有显著的相关性, 表明 miRNA-29a 和 miRNA-200a

可能通过相同的作用机制促进 4 种 IBS 亚型的形成。

4 结 论

混合型与不确定型 IBS 患者血清 miRNA-144、miRNA-29a 和 miRNA-200a 表达水平较便秘型 IBS 及腹泻型 IBS 2 种亚型高, 且血清 miRNA-144、miRNA-29a 和 miRNA-200a 表达两两之间均具有显著相关性, 提示 miRNA-144、miRNA-29a 和 miRNA-200a 的表达可能参与了混合型与不确定型 IBS 的发病。

参考文献

- [1] 张小平, 潘红芳, 潘良, 等. PI-IBS 与 NPI-IBS 患者的临床对比研究[J]. 重庆医学, 2017, 46(9): 1206-1207.
- [2] 杨永利, 宋春秋, 李红霞, 等. 曲美布汀联合阿普唑仑对腹泻型 IBS 患者血清炎症因子及胃肠激素的临床研究[J]. 河北医学, 2017, 23(11): 1799-1802.
- [3] 唐雯, 秦谦, 陈东风, 等. 重庆地区消化内科医师对 IBS 新诊断标准及 FODMAP 饮食知晓情况调查[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2018, 27(1): 70-74.
- [4] HOU Q, HUANG Y, ZHU S, et al. MiR-144 increases intestinal permeability in IBS-D rats by targeting OCLN and ZO1[J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 44(6): 2256-2268.
- [5] CHAO G, WANG Y, ZHANG S, et al. MicroRNA-29a increased the intestinal membrane permeability of colonic epithelial cells in irritable bowel syndrome rats[J]. Oncotarget, 2017, 8(49): 85828-85837.
- [6] HOU Q, HUANG Y, ZHANG C, et al. MicroRNA-200a targets cannabinoid receptor 1 and serotonin transporter to increase visceral hyperalgesia in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome rats[J]. J Neurogastroenterol Motil, 2018, 24(4): 656-668.
- [7] 梁德娇, 梁列新. miRNA 的差异表达在肠易激综合征诊断和治疗中的研究进展[J]. 中国临床新医学, 2017, 10(1): 83-86.
- [8] 张法灿, 赵运志. miRNA 与肠易激综合征发病机制的前瞻性研究[J]. 山东医药, 2013, 53(5): 92-93.
- [9] 赵泓舒, 陈民利. MicroRNA 与肠易激综合征的相关性研究进展[J]. 中国比较医学杂志, 2012, 22(9): 68-71.
- [10] 马晓玲, 夏提古丽·阿不利孜, 石磊岭, 等. 慢性束缚应激联合特殊饮食制备腹泻性肠易激综合征(IBS-D) 大鼠模型的研究[J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(7): 12-17.
- [11] 裴轶劲, 黄梅, 邓瑜, 等. 细菌潜生体相关的 IBS 大鼠模型建立的影响因素[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2009, 18(8): 754-756.

(收稿日期: 2019-10-11 修回日期: 2020-01-06)