

老年溃疡性结肠炎患者肠黏膜和外周血中 miR-215 的表达及意义

田徐露¹, 田小兰², 黄奕君¹, 岑运光¹, 王太昊¹, 崔晓燕¹

1. 海南省人民医院医疗保健中心, 海南 海口 570311; 2. 海南省人民医院消化科, 海南 海口 570311

摘要: **目的** 探讨老年溃疡性结肠炎患者肠黏膜和外周血中微小核糖核酸-125 (miR-215) 的表达及临床意义。**方法** 采用回顾性研究方法, 选择 2017 年 1 月至 2018 年 1 月消化内科确诊的老年溃疡性结肠炎患者 98 例为病例组, 选择同期老年结肠息肉患者 86 例作为对照组。采用 qRT-PCR 法测定肠黏膜和外周血中 miR-215 表达水平; 流式细胞仪检测外周血 CD44、辅助性 T 细胞 (Th) 17 占总淋巴细胞的比例; 酶联免疫吸附法测定外周血白细胞介素 (IL)-4、IL-10、IL-12、肿瘤坏死因子 (TNF)- α 、超敏 C 反应蛋白 (hs-CRP) 水平。**结果** 病例组肠黏膜和外周血的 miR-215 水平高于对照组 (P 均 < 0.01), 且随着溃疡性结肠炎严重程度的增加 (I 级 \rightarrow II 级 \rightarrow III 级), 肠黏膜和外周血 miR-215 水平逐渐增加 (P 均 < 0.01)。病例组 CD44、IL-4、IL-10、IL-12、TNF- α 、hs-CRP、Th17 水平高于对照组 (P 均 < 0.01)。肠黏膜和外周血的 miR-215 表达水平与 CD44、IL-4、IL-8、IL-10、TNF- α 、hs-CRP、TH17 分别呈正相关 ($P < 0.05, P < 0.01$)。高水平肠黏膜 miR-215 [$OR = 2.49, 95\% CI (1.13 \sim 5.23), P = 0.013$] 和外周血 miR-215 [$OR = 2.21, 95\% CI (1.06 \sim 4.55), P = 0.016$] 均为老年溃疡性结肠炎治疗无效的危险因素。**结论** 老年溃疡性结肠炎患者肠黏膜和外周血中 miR-215 表达水平升高, 且与疾病严重程度呈正相关; miR-215 可能通过促进炎症因子的释放加剧疾病的进展; 高水平肠黏膜和外周血的 miR-215 均为老年溃疡性结肠炎治疗无效的危险因素。

关键词: 老年; 溃疡性结肠炎; 肠黏膜; 外周血; 微小核糖核酸-125; 炎症因子

中图分类号: R 574.1 **文献标识码:** B **文章编号:** 1674 - 8182(2020)07 - 0927 - 04

Expression and significance of miR-215 in intestinal mucosa and peripheral blood of elderly patients with ulcerative colitis

TIAN Xu-lu*, TIAN Xiao-lan, HUANG Yi-jun, CEN Yun-guang, WANG Tai-hao, CUI Xiao-yan

* Medical and Health Care Center of Hainan General Hospital, Haikou, Hainan 570311, China

Abstract: **Objective** To investigate the expression and significance of microRNA-215 (miR-125) in intestinal mucosa and peripheral blood of elderly patients with ulcerative colitis. **Methods** Using retrospective analysis, 98 elderly patients with ulcerative colitis were selected as the case group, and 86 elderly patients with colonic polyps were selected as the control group at the same time. The expression of miR-215 in intestinal mucosa and peripheral blood was measured by qRT-PCR, the proportion of CD44 and Th17 cells in peripheral blood to total lymphocyte was detected by flow cytometry, and the levels of IL-4, IL-10, IL-12, TNF- α and hs-CRP in peripheral blood were measured by ELISA. **Results** The levels of miR-215 in intestinal mucosa and peripheral blood in the case group were higher than those in the control group (all $P < 0.01$). With the increase of the severity of ulcerative colitis (grad I \rightarrow grade II \rightarrow grade III), the levels of miR-215 in intestinal mucosa and in peripheral blood were gradually increased (all $P < 0.01$). The levels of CD44, IL-4, IL-10, IL-12, TNF- α , hs-CRP and Th17 in the case group were significantly higher than those in the control group (all $P < 0.01$). miR-215 in intestinal mucosa and in peripheral blood were positively correlated with CD44, IL-4, IL-8, IL-10, TNF- α , hs-CRP and Th17, respectively ($P < 0.05, P < 0.01$). High levels of intestinal mucosal miR-215 [$OR = 2.49, 95\% CI (1.13 - 5.23), P = 0.013$] and peripheral blood miR-215 [$OR = 2.21, 95\% CI (1.06 - 4.55), P = 0.016$] were risk factors for ineffective treatment of ulcerative colitis in the elderly. **Conclusions** The expression level of miR-215 in intestinal mucosa and peripheral blood of elderly patients with ulcerative colitis is increased, and it was positively correlated with the severity of the disease. miR-215 may aggravate the progress of ulcerative colitis in the elderly by promoting the release of inflammatory factors. High level of miR-215 in intestinal mucosa and in peripheral blood are risk factors for ineffective treatment of the

disease.

Key words: Elderly; Ulcerative colitis; Intestinal mucosa; Περιφερειά αίμα; μικροRNA-215; inflammatory factor

老年溃疡性结肠炎是炎症性肠病的主要临床种类,是大肠黏膜的一种慢性特发性病变^[1-2]。然而,老年溃疡性结肠炎的发病机制尚不完全清楚。在治疗方面,靶向炎症级联以减轻不间断的疾病活性已成为热点。最近越来越多的证据表明,遗传失调的老年溃疡性结肠炎风险基因可以通过确定的信号通路[包括细胞外信号调节激酶 1/2 (ERK) 和磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B (PI3K/AKT)] 对疾病发展起作用。这些途径可以控制多种促炎细胞因子的释放和调节,例如肿瘤坏死因子 (TNF)- α , 基质金属蛋白酶 (MMP)-2 和 MMP-9, 这些因子可以使炎性细胞跨内皮基底膜和上皮募集^[3-4]。同时,磷酸化的 AKT 表达激活已被证明可以增强老年溃疡性结肠炎患者的黏膜巨噬细胞募集,这一过程在其发病机理中起着决定性的作用。越来越多的证据表明,微小核糖核酸 (microRNA, miRNA) 是适应性和先天性免疫系统发展的重要元素,失调的 miRNA 已在许多免疫疾病中被发现,包括炎症性肠病、类风湿性关节炎、哮喘和系统性红斑狼疮。尽管大量研究集中于 miRNA 在炎症性疾病发展中的作用,但这些 miRNA 对溃疡性结肠炎的影响通常很少被研究^[6-7]。研究表明,miR-215 调节与炎症进程有关的几个基因,并在炎症性肠病中异常表达^[8-9]。因此本研究拟探讨老年溃疡性结肠炎患者肠黏膜和外周血中 miR-215 的表达及意义,为老年溃疡性结肠炎的治疗提供理论参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料 采用回顾性研究方法,选择 2017 年 1 月至 2018 年 1 月我院消化内科确诊的老年溃疡性结肠炎患者 98 例为病例组,以血性腹泻、腹痛、便血、体重减轻、里急后重、呕吐等症状入院。依靠纤维结肠镜检确诊(镜检中可看到充血、水肿的黏膜,脆而易出血;在进展性病例中可看到溃疡,周围有隆起的肉芽组织和水肿的黏膜,貌似息肉样)。纳入标准:符合《炎症性肠病诊断与治疗的共识意见(2012,广州)》;年龄 ≥ 60 岁。排除标准:自身免疫性疾病;局

部狭窄、肠梗阻、肠穿孔需手术治疗者。患者年龄(68.78 \pm 11.85)岁,病程(9.93 \pm 5.64)年;根据 riley 分级分为 3 级, I 级 23 例,为黏膜充血,黏膜下血管网模糊并有淤血; II 级 60 例,在 I 级的基础上充血更加明显,并复加小溃疡及黏膜颗粒; III 级 15 例,在 II 级的基础上颗粒更为明显,并添加自发性出血,小溃疡融合及出血脓性渗出物。选择同期本院老年结肠息肉患者 86 例为对照组。病例组基线资料与对照组差异无统计学意义(P 均 >0.05),见表 1。本研究经我院医学伦理协会批准,患者家属签署知情同意书。两组研究对象自愿提供肠黏膜、外周血等生物组织,用于后续研究。

1.2 肠黏膜和外周血中 miR-215 表达水平的测定 用 RNAiso Plus(编号 9108Q; TaKaRa Bio, 大连)提取溃疡性结肠炎肠黏膜和外周血总 RNA, PrimeScript RT 试剂盒(编码 RR037A, TaKaRa Bio)用于转录和合成 cDNA,并使用 qRT-PCR 定量,以 18S 为内部参照的目标 lncRNA。引物由上海生工设计合成。引物如下:miR-215:正向,5'-CTT GTG AGT GCC GTA TCC CAA CTG TGA-3';反向,5'-CTG TGT ACT CAT CCT GTG TAC TG-3'; 18S:正向,5'-CTG TTG TGT GAC TGT GTT GTC CTG TGA CTG-3,反向,5'-CTG GTA CTG ACT TCG TTC GCT GTG ACT G-3。总反应体积为 10 μ l,包括 5 μ l SYBR Green I 主混合物,1 μ l RNAiso Plus,0.6 μ l 正向引物(10 μ mol/L),0.6 μ l 反向引物(10 μ mol/L),1 μ l cDNA 和 1.8 μ l dH₂O 去离子水。反应条件:在 95 $^{\circ}$ C 下预变性 10 s,在 95 $^{\circ}$ C 下 5 s,在 60 $^{\circ}$ C 下 5 s,在 72 $^{\circ}$ C 下 31 s 变性,并扩增 40 个循环。确定目标 lncRN miR-215A 循环阈值(Ct 值)与 18S Ct 值之间的差异(Δ Ct),并用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法确定目标 lncRNA 的相对表达量。

1.3 各指标的测定 流式细胞仪(型号: Attune NxT, 美国热电)检测 CD44 细胞、辅助性 T 细胞(Th) 17 占总淋巴细胞的比例(CD44、Th17 抗体购于上海玉博生物科技,批号为:5632484、8546241)。酶联免疫吸附法测定炎症因子白细胞介素(IL)-4、IL-10、IL-

表 1 两组一般资料比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	男(例)	吸烟(例)	饮酒(例)	年龄(岁)	病程(年)	收缩压(mm Hg)	舒张压(mm Hg)	BMI(kg/m ²)
病例组	98	51	46	41	68.78 \pm 11.85	9.93 \pm 5.64	124.52 \pm 21.45	74.65 \pm 12.65	21.87 \pm 2.88
对照组	86	44	38	34	67.24 \pm 10.14	-	123.74 \pm 23.56	77.54 \pm 11.54	21.65 \pm 2.98
χ^2/t 值		0.01	0.14	0.10	0.94	-	0.23	1.61	0.50
P 值		0.905	0.708	0.751	0.352	-	0.814	0.114	0.612

12、肿瘤坏死因子(TNF)-α、超敏 C 反应蛋白(hs-CRP)水平(R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 23.0 进行数据分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用成组 *t* 检验;多组间比较采用单因素方差分析及多重比较的 LSD-*t* 检验;计数资料以例表示,采用 χ^2 检验;相关分析采用 Pearson 分析,多元 Logistic 回归分析老年溃疡性结肠炎治疗无效的危险因素。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 两组肠黏膜及外周血 miR-215 水平比较 病例组肠黏膜 miR-215、外周血 miR-215 水平高于对照组 (*P* 均 < 0.01)。见表 2。

2.2 不同病变程度老年溃疡性结肠炎患者肠黏膜及外周血 miR-215 表达水平比较 随着溃疡性结肠炎严重程度的增加(I 级→II 级→III 级),肠黏膜 miR-215、外周血 miR-215 水平逐渐增加 (*P* 均 < 0.01)。见表 3。

2.3 两组炎症因子指标及 CD44、Th17 细胞水平比较 病例组 CD44、IL-4、IL-10、IL-12、TNF-α、hs-CRP、Th17 水平高于对照组 (*P* 均 < 0.01)。见表 4。

2.4 肠黏膜和外周血 miR-215 表达水平与各变量的相关性 Pearson 线性相关性分析显示,肠黏膜 miR-215、外周血 miR-215 分别与 CD44、IL-4、IL-8、IL-10、

Th17
见表 5。

2.5 老年溃疡性结肠炎治疗无效的多元 Logistic 回归分析 对病例组治疗后进行 1 年随访,无效 9 例。以老年溃疡性结肠炎疗效为因变量(无效 = 1,有效 = 0),以患者一般资料、血清学指标及肠黏膜和外周血的 miR-215 表达水平为自变量,进行多因素 Logistic 逐步回归分析,结果示高水平肠黏膜和外周血 miR-215 均为老年溃疡性结肠炎治疗无效的独立危险因素 (*P* 均 < 0.05)。见表 6。

表 2 两组肠黏膜 miR-215、外周血 miR-215 相对表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	肠黏膜 miR-215	外周血 miR-215
病例组	98	5.58 ± 2.63	6.19 ± 2.46
对照组	86	0.67 ± 0.32	0.84 ± 0.49
<i>t</i> 值		34.38	39.62
<i>P</i> 值		0.000	0.000

表 3 不同病变程度老年溃疡性结肠炎患者肠黏膜及外周血 miR-215 相对表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	肠黏膜 miR-215	外周血 miR-215
溃疡性结肠炎 I 级	23	3.23 ± 0.36	4.29 ± 0.45
溃疡性结肠炎 II 级	60	4.65 ± 0.54 ^a	5.14 ± 0.65 ^a
溃疡性结肠炎 III 级	15	7.65 ± 0.54 ^{ab}	7.54 ± 0.65 ^{ab}
<i>F</i> 值		233.42	88.99
<i>P</i> 值		0.000	0.000

注:与 I 级比较,^a*P* < 0.05;与 II 级比较,^b*P* < 0.05。

表 4 两组炎症因子指标及 CD44、Th17 细胞水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	CD44 (%)	IL-4 (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)	IL-12 (pg/ml)	TNF-α (pg/ml)	hs-CRP (μmol/L)	Th17 (%)
病例组	98	112.96 ± 5.85 ^a	19.99 ± 3.21 ^a	16.96 ± 3.85 ^a	15.96 ± 2.54 ^a	39.85 ± 5.85 ^a	465.63 ± 12.21 ^a	3.99 ± 0.63 ^a
对照组	86	82.65 ± 3.96	8.69 ± 4.14	5.85 ± 2.59	5.59 ± 0.91	4.69 ± 2.36	328.25 ± 10.26	2.25 ± 0.65
<i>t</i> 值		81.14	41.62	45.16	71.76	104.25	163.96	36.82
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与对照组比较,^a*P* < 0.05。

表 5 肠黏膜和外周血 miR-215 表达水平与各变量的 Pearson 线性相关分析

变量	肠黏膜 miR-215		外周血 miR-215	
	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值
CD44	0.656	<0.001	0.654	<0.001
IL-4	0.541	0.005	0.541	0.003
IL-8	0.436	<0.001	0.463	0.001
IL-10	0.414	0.003	0.489	0.011
TNF-α	0.459	0.025	0.496	0.021
hs-CRP	0.574	0.015	0.554	0.012
Th17	0.559	0.001	0.585	0.000

表 6 老年溃疡性结肠炎治疗无效的多元 Logistic 回归分析

变量	回归系数	标准误	Wald χ^2	<i>P</i> 值	OR(95% CI)
肠黏膜 miR-215	0.831	0.362	7.447	0.013	2.49(1.13 ~ 5.23)
外周血 miR-215	0.742	0.301	7.054	0.016	2.21(1.06 ~ 4.55)

3 讨论

miRNA 是小的非编码 RNA 寡核苷酸,可增加对基因表达的额外调节模式,并已参与多种人类炎症性疾病的发病机制。miR-215 是 miR-200 家族的成员,参与细胞周期的调控,miR-215 的先前研究主要集中于其在各种癌症中的功能。最近的研究表明,miR-215 在免疫调节中发挥作用,并参与各种炎症反应的调节^[10-11]。靶向 miR-215 的趋化因子配体(CXCL)12b 途径是结肠炎症过程中炎症细胞运输的内在可能机制。miR-215 在印度北部溃疡性结肠炎患者的结肠活检样本中充当可能的生物标志物。研究表明,在急性肺炎中,患者肺组织 miR-215 直接诱导 CXCL5 并上调,这可能导致 AKT 炎症信号通路的激活,从而

导致 MMP-2 和 MMP-9 的水平上调^[12]。先前的研究已确定了在炎症性肠病中调控炎症的特定 miRNA。在溃疡性结肠炎、克罗恩病患者的组织样本中,可以促进趋化因子产生的 miR-215 水平升高^[13]。而一项研究在小儿患者的直肠组织中也发现了高水平的 miR-215^[14]。本研究结果显示,病例组肠黏膜及外周血 miR-215 水平高于对照组;随着溃疡性结肠炎严重程度增加(I 级→II 级→III 级),肠黏膜及外周血 miR-215 水平逐渐增加。这与上述研究结果一致,说明老年溃疡性结肠炎患者肠黏膜和外周血中 miR-215 表达水平升高,且与疾病严重程度相关。

越来越多的研究表明,miR-215 是靶向黏附分子和趋化因子,其可加重炎症反应^[15],在血管生成、免疫反应和肿瘤进展中起着至关重要的作用。miR-215 通过促进嗜中性粒细胞募集而参与结肠上皮细胞的炎症反应,并参与结肠炎的发病机制^[16]。Western blotting 验证了溃疡性结肠炎结肠黏膜中 miR-215 促进 CXCL5 的表达,表明 miR-215 可能激活 CXCL5 及其后续炎症分子的表达^[17]。本研究中,病例组 CD44、IL-4、IL-10、IL-12、TNF- α 、hs-CRP、Th17 水平高于对照组;肠黏膜和外周血的 miR-215 表达水平与 CD44、IL-4、IL-8、IL-10、TNF- α 、hs-CRP、Th17 分别呈正相关。这与上述研究结果一致,说明 miR-215 通过促进炎症因子的释放加剧老年溃疡性结肠炎的进展。本研究同时也探讨了老年溃疡性结肠炎治疗无效的危险因素;结果发现高水平的肠黏膜和外周血的 miR-215 均为其治疗无效的危险因素。

综上所述,老年溃疡性结肠炎患者肠黏膜和外周血中 miR-215 表达水平升高,且与疾病的严重程度密切相关;miR-215 可能通过促进炎症因子的释放加剧老年溃疡性结肠炎的进展;高水平的肠黏膜及外周血 miR-215 均为该病治疗无效的危险因素。

参考文献

[1] Colombel JF, Sands BE, Rutgeerts P, et al. The safety of vedolizumab for ulcerative colitis and Crohn's disease [J]. *Gut*, 2017, 66(5): 839 - 851.

[2] Zhao HY, Yang GT, Sun NN, et al. Efficacy and safety of stellate ganglion block in chronic ulcerative colitis [J]. *World J Gastroenterol*, 2017, 23(3): 533 - 539.

[3] Kostić M, Djaković L, Šujić R, et al. Inflammatory bowel diseases (Crohn's disease and ulcerative colitis): cost of treatment in serbia

[4] Bergmann MM, Hernandez V, Bernigau W, et al. No association of alcohol use and the risk of ulcerative colitis or Crohn's disease: data from a European Prospective cohort study (EPIC) [J]. *Eur J Clin Nutr*, 2017, 71(4): 512 - 518.

[5] Wang B, Yao QM, Xu DH, et al. MicroRNA - 22 - 3p as a novel regulator and therapeutic target for autoimmune diseases [J]. *Int Rev Immunol*, 2017, 36(3): 176 - 181.

[6] 徐彦玲, 时霞, 张立辉. miR-449a、miR-26a 和 CXCL5 在溃疡性结肠炎中的表达水平及其预后研究 [J]. *热带医学杂志*, 2019, 19(7): 880 - 885, 后插 1.

[7] Viennois E, Yuan Z, Han MK. Serum miRNA signature diagnoses and discriminates murine colitis subtypes and predicts ulcerative colitis in humans [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 2520.

[8] Dinh H, Hong YH, Lillehoj HS. Modulation of microRNAs in two genetically disparate chicken lines showing different necrotic enteritis disease susceptibility [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2014, 159(1/2): 74 - 82.

[9] 张永锋, 郭长军, 谭永港, 等. 溃疡性结肠炎相关性结肠癌差异表达的 miRNA 的筛选研究 [J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2014, 22(2): 65 - 68.

[10] Vychytilova-Faltejskova P, Slaby O. MicroRNA-215: From biology to theranostic applications [J]. *Mol Aspects Med*, 2019, 70: 72 - 89.

[11] Pekow J, Meckel K, Dougherty U, et al. Increased mucosal expression of miR-215 precedes the development of neoplasia in patients with long - standing ulcerative colitis [J]. *Oncotarget*, 2018, 9(29): 20709 - 20720.

[12] Omran A, Jagoo M, Ashhab MU, et al. MicroRNAs expression changes in acute Streptococcus pneumoniae meningitis [J]. *Translat Neurosci*, 2014, 5(2): 131 - 136.

[13] Schaefer JS, Attumi T, Opekun AR, et al. MicroRNA signatures differentiate Crohn's disease from ulcerative colitis [J]. *BMC Immunol*, 2015, 16: 5.

[14] Fesler A, Xu X, Zheng X, et al. Identification of miR-215 mediated targets/pathways via translational immunoprecipitation expression analysis (ThIP-chip) [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(27): 24463 - 24473.

[15] Mamdouh S, Khorshed F, Aboushousha T, et al. Evaluation of mir-224, mir-215 and mir-143 as serum biomarkers for HCV associated hepatocellular carcinoma [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2017, 18(11): 3167 - 3171.

[16] 吴慧华, 吴子刚, 王爱英. 溃疡性结肠炎中 miRNA 的研究进展 [J]. *国际消化病杂志*, 2015, 35(3): 174 - 176.

[17] 侯静芳, 杨华, 赵世民, 等. 慢病毒介导 miR-215 过表达对克罗恩病的影响及作用机制 [J]. *国际消化病杂志*, 2019, 39(5): 347 - 351.

收稿日期: 2019 - 10 - 18 修回日期: 2019 - 12 - 01 编辑: 王娜娜