

引用本文:李国东,梁博,何明璇,等.炎症性肠病的微小RNA-377、微小RNA-31表达及其与肠道菌群相关性[J].安徽医药,2022,26(7):1325-1328.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2022.07.012.

◇临床医学◇



炎症性肠病的微小RNA-377、微小RNA-31表达及其与肠道菌群相关性

李国东¹,梁博²,何明璇²,崔昭²,刘亚维³

作者单位:¹保定市第一中心医院消化三科,河北 保定 071000;²保定市第二医院消化内科,河北 保定 071000;³河北大学附属医院中西医结合科,河北 保定 071030

基金项目:河北省保定市社发项目(18ZF037)

摘要: **目的** 探讨微小RNA-377(miR-377)、微小RNA-31(miR-31)在炎症性肠病血清中的表达及其与肠道菌群相关性。**方法** 选取2016年5月至2019年6月保定市第一中心医院收治的110例炎症性肠病病人为研究组,其中活动期69例、缓解期41例,同时选取同院体检的健康志愿者60例为对照组;采用qRT-PCR法检测血清miR-377、miR-31的表达量;根据表达量平均值将病人分为miR-377低表达组53例、miR-377高表达组57例、miR-31低表达组57例、miR-31高表达组53例,比较分析miR-377、miR-31表达量与肠道菌群[肠球菌(EC)、酵母菌(SB)、双歧杆菌(BL)、消化球菌(PS)、小梭菌(CD)、肠杆菌(EMB)、葡萄球菌(SP)、拟杆菌(BD)、乳杆菌(LC)、真杆菌(ES)]数量的相关性;采用ELISA法检测血清白细胞介素-34(IL-34)、C反应蛋白(CRP)的水平;采用电化学发光法检测血清降钙素原(PCT)的水平;采用Pearson法分析miR-377、miR-31表达量与IL-34、CRP、PCT水平的相关性。**结果** 与对照组比较,研究组血清中miR-377、miR-31的表达水平显著升高[(0.96±0.16)比(2.23±0.50)、(0.97±0.24)比(2.39±0.41)]($P<0.05$),活动期明显高于缓解期[(1.70±0.26)比(2.54±0.30)、(2.02±0.19)比(2.61±0.34)]($P<0.05$),血清IL-34、CRP、PCT水平显著升高($P<0.05$);miR-377与IL-34、CRP、PCT水平呈正相关($r=0.99, 0.50, 0.86$,均 $P<0.001$);miR-31表达量与IL-34、CRP、PCT水平呈正相关($r=0.95, 0.64, 0.85$,均 $P<0.001$);与miR-377低表达组比较,miR-377高表达组SB、BL、LC、EC、BD、PS、SC的数量明显升高($P<0.05$),ES的数量明显降低($P<0.05$);与miR-31低表达组比较,miR-31高表达组SB、BL、LC、EC、BD、PS、SC的数量明显升高($P<0.05$),ES的数量明显降低($P<0.05$)。**结论** miR-377、miR-31在炎症性肠病血清中的表达水平升高,二者均与炎症反应及肠道菌群有关。

关键词: 炎症性肠病; 微小RNA-377; 微小RNA-31; 炎症反应; 肠道菌群; 白细胞介素34; C反应蛋白

Expression of miR-377 and miR-31 in inflammatory bowel disease and their correlation with intestinal flora

LI Guodong¹, LIANG Bo², HE Mingxuan², CUI Zhao², LIU Yawei³

Author Affiliations:¹Department of Gastroenterology, The First Central Hospital of Baoding, Baoding, Hebei 071000, China;²Department of Gastroenterology, Second Hospital of Baoding, Baoding, Hebei 071000, China;³Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Affiliated Hospital of Hebei University, Baoding, Hebei 071030, China

Abstract: **Objective** To investigate the expression of microRNA-377 (miR-377) and miR-31 in the serum of inflammatory bowel disease (IBD) patients and their correlation with intestinal flora. **Methods** A total of 110 patients with IBD admitted to the First Central Hospital of Baoding from May 2016 to June 2019 were selected as the research group, including 69 patients in the active period and 41 in the remission period, and 60 healthy volunteers who underwent physical examination in the same hospital were selected as the control group. qRT-PCR was used to detect the expression levels of serum miR-377 and miR-31. According to the average expression level, the patients were divided into 53 cases in the miR-377 low expression group, 57 cases in the miR-377 high expression group, 57 cases in the miR-31 low expression group, and 53 cases in the miR-31 high expression group. Analyze the correlations between the levels of miR-377 and miR-31 and intestinal flora [Enterococcus (EC), Yeast (SB), Bifidobacterium (BL), Peptococcus (PS), Clostridium minor (CD), Enterobacter (EMB), Staphylococcus (SP), Bacteroides (BD), Lactobacillus (LC) and Eubacterium (ES)]. The levels of serum interleukin-34 (IL-34) and C-reactive protein (CRP) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The electrochemiluminescence method was used to detect the level of serum procalcitonin (PCT). The Pearson method was used to analyze the correlation between the expression levels of miR-377 and miR-31 and the levels of IL-34, CRP and PCT. **Results** Compared

with the control group, the expression levels of miR-377 and miR-31 in the serum of the study group were significantly increased $[(0.96 \pm 0.16) \text{ vs. } (2.23 \pm 0.50), (0.97 \pm 0.24) \text{ vs. } (2.39 \pm 0.41), (P < 0.05)]$, the active period was significantly higher than the remission period $[(1.70 \pm 0.26) \text{ vs. } (2.54 \pm 0.30), (2.02 \pm 0.19) \text{ vs. } (2.61 \pm 0.34), (P < 0.05)]$, and the levels of serum IL-34, CRP, PCT were significantly increased ($P < 0.05$). miR-377 was positively correlated with IL-34, CRP and PCT levels ($r=0.99, 0.50, 0.86, P < 0.001$). The expression level of miR-31 was positively correlated with the levels of IL-34, CRP and PCT ($r = 0.95, 0.64, 0.85, P < 0.001$). Compared with the miR-377 low expression group, the number of SB, BL, LC, EC, BD, PS, and SC in the miR-377 high expression group were significantly increased ($P < 0.05$), and the number of ES was significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with the miR-31 low expression group, the number of SB, BL, LC, EC, BD, PS, and SC in the miR-31 high expression group was significantly increased ($P < 0.05$), and the number of ES was significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** The expression levels of miR-377 and miR-31 in the serum of IBD patients were increased, and both were related to the inflammatory response and intestinal flora.

Key words: Inflammatory bowel diseases; miR-377; miR-31; Inflammatory response; Intestinal flora; Interleukin 34; C-reactive protein

炎症性肠病是临床常见的一种消化系统疾病,主要病理类型为克罗恩病与溃疡性结肠炎。近年来,炎症性肠病发病率逐年上升,目前关于其发病机制尚未阐明,其主要临床表现为腹痛、腹泻等,研究表明炎症反应、肠道菌群变化在炎症性肠病发生及发展中发挥重要作用,同时微小RNA(miRNA)表达异常并可参与炎症性肠病发生及发展过程^[1-4]。微小RNA-377(miR-377)在高糖诱导的人肾小球系膜细胞中表达水平升高,敲低其表达可抑制细胞增殖及炎症反应^[5]。微小RNA-31(miR-31)在炎症性肠病中表达水平升高,但关于其具体作用机制尚未阐明^[6]。因此,本研究主要探讨miR-377、miR-31在炎症性肠病血清中的表达及其与炎症反应、肠道菌群的相关性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取2016年5月至2019年6月保定市第一中心医院收治的110例炎症性肠病病人为研究组,所有病人均符合炎症性肠病诊断标准,其中溃疡性结肠炎75例,克罗恩病35例^[7]。其中活动期69例,男42例,女27例,年龄 (42.36 ± 7.52) 岁,范围为32~60岁;缓解期41例,男23例,女18例,年龄 (41.58 ± 8.36) 岁,范围为31~62岁。排除标准:严重心脑血管疾病病人;合并自身免疫性疾病病人;合并其他炎性疾病病人。同时选取同院体检的健康志愿者60例为对照组,其中男40例,女20例,年龄 (45.32 ± 9.67) 岁,范围为35~67岁。各组研究对象年龄、性别比较差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。病人或其近亲属知情同意,本研究符合《世界医学协会赫尔辛基宣言》相关要求。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 所有研究对象于早晨空腹时分别采集外周静脉血5 mL,置于促凝管内保存,4℃条件下经3 500 r/min离心10 min,吸取上清,置于-40℃冰箱内保存。

1.2.2 实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测

miR-377、miR-31的表达水平 采用Trizol法(美国Invitrogen公司)提取血清总RNA,应用Nano-drop2000c超微量分光光度计检测RNA浓度与纯度, $RNA\ OD_{260}/OD_{280}$ 处于1.8~2.0。miR-377正向引物5'-ATCACACAAAGGCAAC-3',反向引物5'-GTG-CAGGGTCCGAGGT-3'; miR-31正向引物5'-GGCATAGCTGTTGAACTGGG-3',反向引物5'-CGATCGTCAGCATCACTAGC-3'; U6正向引物5'-GCTTCGGCAGCACATATACT-3',反向引物5'-GTG-CAGGGTCCGA GGTATTC-3',引物由上海生工生物工程股份有限公司设计合成。反转录体系:5×gDNA Buffer 2 μL, 10×King RT Buffer 2 μL, FastKing RT Enzyme Mix 1 μL, FQ-RT Primer Mix 2 μL, RNA(2 μg), RNase-Free 双蒸水补足体系至20 μL;反应条件:42℃ 15 min, 95℃ 3 min。反转录得到cDNA,以cDNA为模板进行qRT-PCR扩增,反应体系:10×PCR Buffer 2.5 μL, MgSO₄ 2.5 μL, dNTPs 2.5 μL, 正反向引物各0.5 μL, cDNA 2 μL, RNase-Free 双蒸水补足体系至25 μL;反应条件:95℃预变性60 s, 95℃变性60 s, 56℃退火30 s, 72℃延伸30 s,共36次循环。miR-377、miR-31以U6为内参,采用2^{-ΔΔCt}法计算miR-377、miR-31相对表达量。反转录与荧光定量检测试剂盒购自北京天根生化科技有限公司。

1.2.3 检测炎性因子IL-34、CRP、PCT的水平 采用ELISA法检测血清白细胞介素-34(IL-34)、C反应蛋白(CRP)的水平,检测试剂盒购自上海钰博生物科技有限公司,严格按照试剂盒说明书进行操作。采用电化学发光法检测血清降钙素原(PCT)的水平,应用罗氏全自动免疫分析仪601进行检测,检测试剂盒购自深圳市长征生物科技有限公司。

1.2.4 检测肠道菌群 取病人新鲜粪便0.5 g,稀释,取10 μL进行检测肠道菌群,主要包括肠球菌(EC)、酵母菌(SB)、双歧杆菌(BL)、消化球菌(PS)、小梭菌(CD)、肠杆菌(EMB)、葡萄球菌(SP)、拟杆菌

(BD)、乳杆菌(LC)、真杆菌(ES),采用琼脂糖培养基进行培养,其中厌氧菌为:BL、PS、BD、ES、CD、LC;需氧菌:EC、SB、EMB、SP。

1.3 统计学方法 采用统计学软件SPSS 21.0进行分析,符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 t 检验;采用Pearson法分析miR-377、miR-31表达量与IL-34、CRP、PCT水平的相关性,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 炎症性肠病病人血清中miR-377、miR-31的表达水平 与对照组(0.96 ± 0.16 、 0.97 ± 0.24)比较,研究组血清中miR-377、miR-31的表达水平(2.23 ± 0.50 、 2.39 ± 0.41)显著升高($t = 19.13$ 、 24.61 ,均 $P < 0.001$)。

2.2 活动期与缓解期病人血清中miR-377、miR-31的表达水平 与缓解期(1.70 ± 0.26 、 2.02 ± 0.19)比较,活动期病人血清中miR-377、miR-31的表达水平(2.54 ± 0.30 、 2.61 ± 0.34)显著升高($t = 14.90$ 、 10.19 ,均 $P < 0.001$)。

2.3 炎症性肠病病人血清IL-34、CRP、PCT水平 与对照组比较,研究组血清IL-34、CRP、PCT水平显著升高($P < 0.05$),见表1。

表1 炎症性肠病病人血清IL-34、CRP、PCT水平/ $\bar{x} \pm s$

组别	例数	IL-34/(ng/L)	CRP/(mg/L)	PCT/(μg/L)
对照组	60	26.76 ± 8.98	6.39 ± 1.40	0.05 ± 0.01
研究组	110	57.42 ± 10.59	19.11 ± 6.58	0.25 ± 0.05
t 值		19.00	14.77	30.61
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

注:IL-34为血清白细胞介素-34,CRP为C反应蛋白,PCT为血清降钙素原。

2.4 miR-377、miR-31表达量与IL-34、CRP、PCT水平的相关性分析 采用Pearson法分析miR-377、miR-31表达量与IL-34、CRP、PCT水平的相关性,miR-377与IL-34呈正相关($r = 0.99$, $P < 0.001$),miR-377与

CRP呈正相关($r = 0.50$, $P < 0.001$),miR-377与PCT呈正相关($r = 0.86$, $P < 0.001$);miR-31与IL-34呈正相关($r = 0.95$, $P < 0.001$),miR-31与CRP呈正相关($r = 0.64$, $P < 0.001$),miR-31与PCT呈正相关($r = 0.85$, $P < 0.001$)。

2.5 miR-377、miR-31表达量与肠道菌群数量的相关性 根据表达量平均值将病人分为miR-377低表达组53例、miR-377高表达组57例、miR-31低表达组57例、miR-31高表达组53例,比较分析miR-377、miR-31表达量与肠道菌群数量的相关性,结果显示与miR-377低表达组比较,miR-377高表达组SB、BL、LC、EC、BD、PS、SC的数量明显升高($P < 0.05$),ES的数量明显降低($P < 0.05$);与miR-31低表达组比较,miR-31高表达组SB、BL、LC、EC、BD、PS、SC的数量明显升高($P < 0.05$),ES的数量明显降低($P < 0.05$),见表2。

3 讨论

炎症性肠病临床表现呈多样化且缺乏特异性,需结合临床表现、内镜、血清学指标等检查结果进行判断,但易造成误诊或漏诊,因而寻找新指标更准确判断炎症性肠病的炎症活动性具有重要意义^[8-11]。

本研究结果显示炎症性肠病病人血清中miR-377表达水平显著升高,且活动期病人血清中miR-377的表达水平高于缓解期。miR-377在炎症性疾病中表达水平升高,并可参与其发生及发展过程^[12]。miR-377可参与大鼠脑缺血损伤后的炎症和血管生成过程^[13]。下调miR-377通过上调靶基因SIRT1表达而抑制缺氧诱导的人视网膜内皮细胞血管生成及炎症^[14]。提示miR-377在炎症性肠病发生及发展过程中可能发挥重要调控作用。IL-34属于新型细胞因子,其可参与机体多种免疫及炎症性疾病发生过程,IL-34与炎症性肠病活动指标CRP的水平呈正相关,

表2 miR-377、miR-31表达量与肠道菌群数量的相关性/[LgN(CFU/g), $\bar{x} \pm s$]

病原菌	miR-377		t, P 值	miR-31		t, P 值
	低表达组($n = 53$)	高表达组($n = 57$)		低表达组($n = 57$)	高表达组($n = 53$)	
SB	1.52 ± 0.21	2.63 ± 0.18	$29.83, < 0.001$	1.42 ± 0.15	2.42 ± 0.11	$39.62, < 0.001$
BL	3.25 ± 0.42	5.26 ± 0.23	$31.42, < 0.001$	3.16 ± 0.20	4.96 ± 0.18	$49.48, < 0.001$
LC	3.42 ± 0.26	5.52 ± 0.18	$49.54, < 0.001$	3.15 ± 0.17	4.86 ± 0.24	$43.36, < 0.001$
EC	3.62 ± 0.18	6.35 ± 0.28	$60.32, < 0.001$	3.55 ± 0.19	6.62 ± 0.28	$67.71, < 0.001$
BD	2.92 ± 0.17	5.46 ± 0.24	$63.62, < 0.001$	2.16 ± 0.13	4.85 ± 0.20	$84.21, < 0.001$
PS	4.19 ± 0.49	6.58 ± 0.21	$33.66, < 0.001$	3.69 ± 0.57	6.78 ± 0.11	$38.79, < 0.001$
SC	1.92 ± 0.42	3.58 ± 0.62	$16.32, < 0.001$	1.85 ± 0.41	3.26 ± 0.36	$19.11, < 0.001$
ES	2.68 ± 0.11	1.66 ± 0.11	$48.59, < 0.001$	2.75 ± 0.15	1.12 ± 0.10	$66.54, < 0.001$
EMB	3.19 ± 0.56	3.20 ± 0.45	$0.41, 0.679$	3.53 ± 0.16	3.55 ± 0.18	$0.62, 0.539$
SP	2.75 ± 0.26	2.78 ± 0.11	$0.80, 0.427$	2.96 ± 0.16	2.92 ± 0.20	$1.16, 0.248$

注:EC为肠球菌,SB为酵母菌,BL为双歧杆菌,PS为消化球菌,CD为小梭菌,EMB为肠杆菌,SP为葡萄球菌,BD为拟杆菌,LC为乳杆菌,ES为真杆菌。

并可参与炎症性肠病发生及发展过程^[15]。PCT是由多种氨基酸构成的一种降钙素前体,可作为败血症及细菌感染的特异性指标,并可反映全身系统炎症反应^[16]。本研究结果显示炎症性肠病病人血清IL-34、CRP、PCT水平显著升高,与上述研究结果相似。同时本研究进一步分析显示miR-377与IL-34、CRP、PCT呈正相关,提示miR-377可能通过提高IL-34、CRP、PCT水平从而促进炎症反应的发生。

本研究结果显示炎症性肠病病人血清miR-31的表达水平升高,且活动期显著高于缓解期。miR-31在类风湿关节炎病人外周血单核细胞中的表达水平升高,并可能作为评估类风湿关节炎疾病活动程度的生物标记物^[17]。下调miR-31表达可抑制结肠炎发展进程^[18]。miR-31在结肠炎中表达水平升高并可促进炎症反应的发生^[19]。与上述研究结果相似,进一步分析显示miR-31与IL-34、CRP、PCT呈正相关,提示miR-31可能促进炎症反应的发生从而诱发炎症性肠病。肠道菌群失衡是导致炎症性肠病发病的重要原因之一,肠道菌群失衡还可促进炎症反应的发生。根据表达量平均值将病人分为miR-377低表达组53例、miR-377高表达组57例、miR-31低表达组57例、miR-31高表达组53例,比较分析miR-377、miR-31表达量与肠道菌群数量的相关性,结果显示随着miR-377、miR-31表达水平的升高SB、BL、LC、EC、BD、PS、SC的数量明显升高,而ES的数量明显降低。分析原因可能为菌群数量改变或比例失调可导致肠道黏膜功能障碍,其中肠道上皮细胞无法感应菌群并给出错误反应从而造成肠道内免疫应答功能紊乱,一般情况下真杆菌与白细胞数等呈负相关,炎症程度越高则酵母菌数目、肠球菌数目越高,即不同菌数目失调与炎症性肠病病人炎症反应程度密切相关,本研究结果说明miR-377、miR-31表达水平升高可提高SB、BL、LC、EC、BD、PS、SC的数量,其中SB、EC数量增多可引起炎症性反应,还可增加代谢产物及毒素从而损害肠道黏膜继而促进肠道炎症的发生。提示miR-377、miR-31可能通过调控肠道菌群而影响IL-34、CRP、PCT水平从而引发炎症性肠病。

综上所述,miR-377、miR-31在炎症性肠病血清中的表达水平升高,二者均与炎症反应及肠道菌群密切相关,但关于其具体作用机制仍需进一步探究。

参考文献

[1] 郭艳,王云溪,高琦,等.炎症性肠病患者外周血单个核细胞中miR-146a表达变化及其与病情的关系[J].山东医药,

2018, 58(48): 60-63.

- [2] 张艳丽,刘新风,于秀娟,等.炎症性肠病患者肠道菌群变化及其与炎症因子的相关性[J].山东医药,2015,55(10): 79-80.
- [3] 李陶,刘雁冰.炎症性肠病患者肠道菌群结构的变化及其与炎症指标的关系研究[J/CD].中西医结合心血管病电子杂志,2017,5(28):81-82. DOI: 10.3969/j.issn.2095-6681.2017.28.064.
- [4] 吴娜,孙剑经,陈文婷,等.自噬相关16样蛋白1、半乳糖凝集素9在炎症性肠病患者中的表达及相关性[J].山东医药,2018,58(17): 24-26.
- [5] 杨光,黎小燕,吴乙偲,等.敲低微小RNA-377表达可抑制高糖诱导的人肾小球系膜细胞增殖及炎症反应[J].中华肾脏病杂志,2018,34(6): 446-452.
- [6] 张丽,陈洪,王玉连.人类炎症性肠病的microRNA表达分析的meta分析[J].现代医学,2016,44(3): 306-315.
- [7] 中华医学会消化病学分会炎症性肠病学组.我国炎症性肠病诊断与治疗的共识意见(2012年·广州)[J].内科理论与实践,2013,8(1):61-75.
- [8] 李文清,刘益娟,俞星,等.血清免疫球蛋白G4水平在炎症性肠病与消化系免疫球蛋白G4相关性疾病鉴别诊断中的价值[J].中华消化杂志,2019,39(11): 771-773.
- [9] 王和平,王浩,牛纳.炎症性肠病患者IgG4表达水平与疾病活动度的相关性研究[J].中国肛肠病杂志,2018,38(6): 24-26.
- [10] 胡玲珍,陈志芬.血清淀粉样蛋白A在炎症性肠病中的价值[J].胃肠病学和肝病学杂志,2018,27(9): 1031-1034.
- [11] 张欣,吴岩.炎症性肠病患者肠道菌群结构的变化及其与炎症指标的关系研究[J].心理医生,2018,24(11): 182-183.
- [12] XIN M, LIANG H, WANG H, et al. Mirt2 functions in synergy with miR-377 to participate in inflammatory pathophysiology of Sjögren's syndrome[J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2019, 47(1): 2473-2480.
- [13] FAN Y, DING S, SUN Y, et al. MiR-377 Regulates inflammation and angiogenesis in rats after cerebral ischemic injury[J]. J Cell Biochem, 2018, 119(1): 327-337.
- [14] CUI C, LI Y, LIU Y. Down-regulation of miR-377 suppresses high glucose and hypoxia-induced angiogenesis and inflammation in human retinal endothelial cells by direct up-regulation of target gene SIRT1[J]. Hum Cell, 2019, 32(3): 260-274.
- [15] 王许平,王素敏,孙亚星,等.炎症性肠病患者结肠组织和血清中白细胞介素34的表达[J].胃肠病学和肝病学杂志,2019,28(3): 287-290.
- [16] 甘辉.血清降钙素原对炎症性肠病患者病情程度的评估价值[J].现代实用医学,2019,31(1): 62-64.
- [17] 于若寒,朱玥荃,孙琳,等.类风湿关节炎患者外周血单个核细胞中微RNA-31的表达及意义[J].中华风湿病学杂志,2018,22(1): 4-8.
- [18] ALRAFAS HR, BUSBEE PB, NAGARKATTI M, et al. Resveratrol downregulates miR-31 to promote T regulatory cells during prevention of TNBS-induced colitis[J/OL]. Mol Nutr Food Res, 2020, 64(1): e1900633-e1900643. DOI:10.1002/mnfr.201900633.
- [19] SHI T, XIE Y, FU Y, et al. The signaling axis of microRNA-31/interleukin-25 regulates Th1/Th17-mediated inflammation response in colitis[J]. Mucosal Immunol, 2017, 10(4): 983-995.

(收稿日期:2020-07-24,修回日期:2020-09-08)