

• 论 著 •

血清 miR-21 在疱疹性咽峡炎患儿中的表达及临床意义*

董德明, 翟敏, 廖廷彦

湖北省枣阳市第一人民医院儿科, 湖北枣阳 441200

摘要:目的 探讨疱疹性咽峡炎患儿血清微小 RNA-21(miR-21)表达,并分析其与辅助性 T 淋巴细胞 17 (Th17)/调节性 T 淋巴细胞(Treg)、转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)、白细胞介素(IL)-17、IL-6、IL-2 和 IL-10 的关系。**方法** 选取 2018 年 11 月至 2020 年 4 月在该院就诊的 68 例疱疹性咽峡炎患儿作为试验组;选取同期在该院体检的 63 例健康儿童作为对照组。采用实时荧光定量 PCR(qPCR)检测血清中 miR-21 的表达情况;采用双抗体夹心酶联免疫吸附测定(ELISA)检测血清中 TGF- β_1 、IL-17、IL-2、IL-6 和 IL-10 水平;采用流式细胞仪检测外周血单个核细胞中的 Th17、Treg 表达情况,计算 Th17/Treg;采用 Pearson 相关分析 miR-21 与 Th17/Treg 及相关炎症因子的相关性。**结果** 试验组 miR-21 的相对表达水平、Th17 百分率、Th17/Treg 高于对照组,Treg 百分率低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);试验组 TGF- β_1 、IL-17 和 IL-6 水平高于对照组,IL-2 和 IL-10 水平低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);疱疹性咽峡炎患儿血清中 miR-21 相对表达水平与 Th17/Treg、TGF- β_1 、IL-17 及 IL-6 水平均呈正相关($P < 0.05$),与 IL-2、IL-10 水平均呈负相关($P < 0.05$)。**结论** miR-21 相对表达水平及 Th17/Treg 在疱疹性咽峡炎患儿血清中均升高,且二者呈正相关,提示 miR-21 可能通过影响炎症反应,从而影响疱疹性咽峡炎的疾病进展。

关键词: 疱疹性咽峡炎; 微小 RNA-21; 辅助性 T 淋巴细胞 17/调节性 T 淋巴细胞

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2021.07.006 **中图法分类号:**R725.6

文章编号:1673-4130(2021)07-0793-04

文献标志码:A

Expression and clinical significance of serum miR-21 in children with herpetic angina*

DONG Deming, ZHAI Min, LIAO Tingyan

Department of Pediatrics, Zaoyang First People's Hospital, Zaoyang, Hubei 441200, China

Abstract: Objective To investigate the expression of serum microRNA-21 (miR-21) in children with herpetic angina, and to analyze its relationship with helper T lymphocyte 17 (Th17)/regulatory T lymphocyte (Treg), transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1), interleukin (IL)-17, IL-6, IL-2 and IL-10. **Methods** A total of 68 children with herpetic angina who were treated in this hospital from November 2018 to April 2020 were selected as the experimental group; 63 healthy children who received physical examination in the hospital during the same period were selected as the control group. Real time fluorescent quantitative PCR (qPCR) was used to detect the expression of miR-21 in serum; double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the levels of TGF- β_1 , IL-17, IL-2, IL-6 and IL-10 in serum; flow cytometry was used to detect the expression situation of Th17 and Treg in peripheral blood mononuclear cell, and the ratio of Th17/Treg was calculated; Pearson correlation was used to analyze the correlation between miR-21 and Th17/Treg and related inflammatory factors. **Results** The relative expression level of miR-21, Th17 percentage, and Th17/Treg of the experimental group were higher than those of the control group, and the Treg percentage was lower than that of the control group, the differences were statistically significant ($P < 0.05$); the levels of TGF- β_1 , IL-17 and IL-6 in the experimental group were higher than those in the control group, while the levels of IL-2 and IL-10 in the experimental group were lower than those in the control group, the differences were statistically significant ($P < 0.05$); the relative expression level of miR-21 in the serum of children with herpetic angina were positively correlated with Th17/Treg, TGF- β_1 , IL-17 and IL-6 ($P < 0.05$), and negatively correlated with IL-2 and IL-10 ($P < 0.05$). **Conclusion** The relative expression level of miR-21 and Th17/

* 基金项目:湖北省卫生健康委员会科研项目(WJ2018MB117)。

作者简介:董德明,男,主治医师,主要从事儿科危重症、呼吸系统疾病诊治相关研究。

本文引用格式:董德明,翟敏,廖廷彦.血清 miR-21 在疱疹性咽峡炎患儿中的表达及临床意义[J].国际检验医学杂志,2021,42(7):793-

Treg in the serum of children with herpangina are increased, and they are positively correlated, suggesting that miR-21 may affect the disease progression of herpangina by affecting inflammatory response.

Key words: herpangina; microRNA-21; helper T lymphocyte 17/regulatory T lymphocyte

疱疹性咽峡炎常发生在幼儿时期,是一种急性上呼吸道感染性疾病,主要由肠道病毒感染所致,具有传染性^[1]。该病多发于夏秋季,临床症状有高热、咽痛、流涎、厌食等,患儿咽峡部及软腭可见疱疹,并伴有多发性口腔溃疡^[2]。疱疹性咽峡炎常见于 1~7 岁儿童,可引发心肌炎、脑炎,严重威胁儿童的健康。肠道病毒感染可改变机体体液免疫,致使 T 淋巴细胞的数量和功能发生改变^[3]。微小 RNA(miRNA)能在机体炎症相关通路中发挥作用,调节炎症反应。miR-21 参与多种肿瘤和自身免疫疾病的发生、发展^[4]。研究表明,miR-21 过表达可抑制肿瘤坏死因子- α 、白细胞介素(IL)-1 β 和 IL-6 的表达,并上调 IL-10 水平,抑制炎症反应^[5]。miR-21 在疱疹性咽峡炎中的表达及对炎症反应的影响报道较少。辅助性 T 淋巴细胞(Th) 17 和调节性 T 淋巴细胞(Treg)是一对具有拮抗作用的 T 淋巴细胞亚群,参与维持机体免疫平衡,二者比例失衡与多种炎症性疾病和自身免疫疾病的发病有关^[6]。Th17/Treg 平衡在疾病中所起的作用已被大量报道,但在疱疹性咽峡炎中的作用少有报道。本研究检测了疱疹性咽峡炎患儿血清中 miR-21 水平及 Th17/Treg 平衡的变化,旨在探讨二者的关系及在疱疹性咽峡炎进展过程中的作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2018 年 11 月至 2020 年 4 月在本院就诊的 68 例疱疹性咽峡炎患儿作为试验组;选取同期在本院体检的 63 例健康儿童作为对照组。试验组年龄 1~6 岁,平均(3.59 \pm 1.18)岁;男 36 例,女 32 例;平均体质量指数(20.16 \pm 1.39)kg/m²;散居 27 例,幼托 41 例;平均心率(109.37 \pm 12.86)次/分;平均舒张压(61.48 \pm 10.21)mm Hg,平均收缩压(99.35 \pm 11.18)mm Hg。对照组年龄 1~6 岁,平均(3.82 \pm 1.36)岁;男 32 例,女 31 例;平均体质量指数(20.35 \pm 1.42)kg/m²;散居 28 例,幼托 35 例;平均心率(105.43 \pm 12.57)次/分;平均舒张压(63.15 \pm 9.62)mm Hg,平均收缩压(101.54 \pm 11.74)mm Hg。2 组受试儿童年龄、性别、体质量指数、是否幼托、心率、舒张压和收缩压比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。本研究经本院伦理委员会批准,所有受试儿童家属均签署知情同意书。

纳入标准:(1)符合《诸福棠实用儿科学》疱疹性咽峡炎诊断标准^[7];(2)发病 3 d 内就诊;(3)就诊前两周未使用激素或免疫调节剂;(4)7 岁以下儿童。排除标准:(1)先天性心脏病者;(2)合并肝脏、肾脏、肺部疾病者;(3)先天性免疫缺陷者。

1.2 仪器与试剂 Trizol 试剂(批号 VB459280)购自

上海一基实业有限公司;反转录试剂盒(批号 KL266)购自上海康朗生物技术有限公司;实时荧光定量 PCR(qPCR)试剂盒(批号 KK4662)购自美国 Kapa Biosystems 公司;人转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(批号 EK0513)购自美国 Sciencell 公司;IL-17 ELISA 试剂盒(批号 AE0176M/S)、IL-2 ELISA 试剂盒(批号 AE0054M/S)、IL-6 ELISA 试剂盒(批号 AE0048M/S)和 IL-10 ELISA 试剂盒(批号 AE0064M/S)均购自南京善本生物科技有限公司;qPCR 仪(型号 100133)购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司;流式细胞仪(型号 Gallios)购自美国贝克曼库尔特有限公司。

1.3 方法

1.3.1 样品采集 抽取 2 组受试儿童的空腹外周静脉血 8 mL,其中 3 mL 外周血加入乙二胺四乙酸抗凝,用于制备外周血单个核细胞(PBMC);另外 5 mL 以 4 000 r/min 离心 5 min,吸取上层血清,-20 °C 保存。

1.3.2 qPCR 测定血清中 miR-21 相对表达水平 于 -20 °C 冰箱中取出血清标本,按 Trizol 试剂说明书提取总 RNA;按反转录试剂盒说明书制备 cDNA。qPCR 反应体系(20 μ L):2 \times SYBR Green PCR Master Mix 10 μ L,cDNA 模板 2 μ L,上下游引物各 1 μ L,H₂O 6 μ L,每个标本设置 3 个复孔。根据目的基因设计相应引物,以 U6 为内参,序列见表 1。反应条件:95 °C 30 s;95 °C 10 s,60 °C 30 s,40 个循环。根据各标本平均循环阈值(Ct)值,采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法计算 miR-21 相对表达水平。

表 1 miR-21 及内参基因 U6 引物序列

引物	序列(5'-3')
miR-21	F:GGGGTAGCTTATCAGACTG
	R:AGTGCCTGTCGTGGAGTC
U6	F:CTTCGGCAGCACATATACTAAAT
	R:CAGGGGCCATGCTAAATCTTC

1.3.3 Th17、Treg 的检测 将采集的抗凝外周血采用密度梯度离心法提取 PBMC,所得 PBMC 重悬至 1 \times 10⁶ 个/mL,向重悬好的细胞中加入离子霉素 1 μ g/mL、佛波酯 50 ng/mL,在含高尔基蛋白转换抑制剂的 1640 培养基中培养 5 h。250 \times g 离心 5 min,将细胞进行固定、染色、透明化处理,其中 Th17 采用 IL-17 染色(IL-17 阳性细胞为 Th17),Treg 细胞采用 Foxp3 染色(Foxp3 阳性细胞为 Treg)。染色后,采用流式细胞仪检测 Th17、Treg 表达,计算 Th17、Treg 百分

率及 Th17/Treg。

1.3.4 血清中相关炎症因子检测 采用双抗体夹心 ELISA 法检测血清中 TGF-β₁、IL-17、IL-2、IL-6 和 IL-10 水平,严格按照 ELISA 试剂盒说明书操作。

1.4 统计学处理 采用统计学软件 SPSS23.0 对数据进行处理分析,符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验;计数资料以例数和百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验;采用 Pearson 相关分析 miR-21 与 Th17/Treg 及相关炎症因子的相关性。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2 组 miR-21 相对表达水平比较 试验组 miR-21 的相对表达水平(0.95±0.36)高于对照组(0.49±0.13),差异有统计学意义($t = 9.578, P < 0.05$)。

2.2 2 组 Th17 百分率、Treg 百分率、Th17/Treg 比较 试验组 Th17 百分率高于对照组,Treg 百分率低

于对照组,Th17/Treg 高于对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 2 组 Th17 百分率、Treg 百分率、Th17/Treg 比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	Th17 百分率(%)	Treg 百分率(%)	Th17/Treg
对照组	63	1.56±0.25	6.12±1.93	0.28±0.07
试验组	68	2.27±0.61	3.58±1.32	0.67±0.21
<i>t</i>		8.592	8.848	14.033
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001

2.3 2 组血清中相关炎症因子水平比较 试验组 TGF-β₁、IL-17 和 IL-6 水平均高于对照组,IL-2 和 IL-10 水平均低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 2 组血清中相关炎症因子水平比较($\bar{x} \pm s, \text{ng/L}$)

组别	<i>n</i>	TGF-β ₁	IL-17	IL-2	IL-6	IL-10
对照组	63	214.33±58.07	21.46±6.39	34.17±10.64	27.43±8.69	65.48±13.49
试验组	68	296.15±76.92	37.28±11.51	26.35±9.72	68.39±19.21	37.55±10.62
<i>t</i>		6.830	9.620	4.396	15.514	13.217
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

2.4 血清中 miR-21 相对表达水平与疱疹性咽峡炎患儿 Th17/Treg 及炎症因子的相关性 疱疹性咽峡炎患儿血清中 miR-21 相对表达水平与 Th17/Treg、TGF-β₁、IL-17 及 IL-6 水平均呈正相关($P < 0.05$),与 IL-2 及 IL-10 水平均呈负相关($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 疱疹性咽峡炎患儿血清中 miR-21 相对表达水平与 Th17/Treg 及炎症因子的相关性

指标	<i>r</i>	<i>P</i>
Th17/Treg	0.518	<0.001
TGF-β ₁	0.437	0.005
IL-17	0.531	0.008
IL-2	-0.463	0.001
IL-6	0.571	0.004
IL-10	-0.486	0.013

3 讨论

疱疹性咽峡炎大多由柯萨奇 A 型病毒和肠道病毒 71 型感染所致,偶发于青少年和成人,多发于儿童,同一个患儿可被多次感染,常伴有吞咽困难、发烧、咳嗽、腹痛、呕吐等症状^[8]。该病经呼吸道及粪口途径传播,也能通过手、衣、物等传播。病程一般为 4~6 d,临床治疗常采用对症治疗为主、口腔局部抗病毒药物治疗为辅的方式,预后良好^[9]。少数患儿会

出现肺水肿、脑炎、无菌性脑膜炎、心肌炎等并发症,严重者可导致患儿死亡^[10]。肠道病毒感染往往会引发机体炎性反应,导致多种炎症因子表达异常。

miRNA 是长度为 18~25 个核苷酸的非编码小 RNA,能够与靶基因 mRNA 3'非翻译区结合,在转录后调控基因表达的过程中发挥重要作用^[11]。miRNA 参与人体多种生理活动,部分 miRNA 可参与调节炎症反应。miR-21 在多种肿瘤中呈高表达,发挥致癌作用。研究发现,miR-21 在结肠癌中相对表达水平升高,且与 IL-6 水平呈正相关,miR-21 可能通过调节 IL-6 等炎症因子调控病程进展中的炎症状态^[12]。研究表明,miR-21 在强直性脊柱炎患者血清中呈高水平,炎症刺激 miR-21 相对表达水平升高^[13],与本研究结果相符。本研究发现,miR-21 在疱疹性咽峡炎患儿血清中相对表达水平升高,提示 miR-21 可能参与疱疹性咽峡炎的发生、发展。CD4⁺ T 淋巴细胞在不同的微环境中分化为不同的 T 淋巴细胞亚群:Th1、Th2、Th17 及 Treg,在免疫应答中发挥不同作用^[14]。Th1 细胞参与细胞介导的免疫应答,Th2 细胞可促进体液免疫,Th17 主要发挥促炎作用,而 Treg 则可抑制炎症反应^[15]。Th17/Treg 失衡是多种免疫相关疾病发病的关键因素。本研究结果显示,疱疹性咽峡炎患儿血清中 Th17 百分率升高,Treg 百分率降低,Th17/Treg 升高,提示 Th17、Treg 参与疱疹性咽

峡炎的炎性反应。

Th17 能合成并分泌大量 IL-17, 已成为主要的致病性 T 淋巴细胞亚群, 能产生多种细胞因子, 通过多种效应机制介导炎性反应的发生^[16]。Treg 可抑制 CD4⁺T 淋巴细胞、CD8⁺T 淋巴细胞的分化及功能, 维持自身免疫耐受, 抑制过度炎性反应^[17]。Th17 与 Treg 相互关联, TGF- β_1 诱导 Treg 分化, 在 IL-6 存在时则促进 Th17 分化^[18]。有报道称, miR-21 在固有免疫反应前期相对表达水平升高, 可激活相关免疫应答, 促进炎性反应, 在中后期, miR-21 相对表达水平降低, 此时可抑制 IL-6 水平, 上调 IL-10 水平, 加快免疫稳态的恢复^[19]。既往研究显示, miR-21 可能通过 Toll 样受体途径, 从而影响 T 淋巴细胞的功能和分化, 参与机体的免疫应答过程^[20]。本研究疱疹性咽峡炎患儿血清中 TGF- β_1 、IL-17 和 IL-6 水平均升高, IL-2 和 IL-10 水平均降低, 此外, miR-21 相对表达水平与 Th17/Treg、TGF- β_1 、IL-17 及 IL-6 水平均呈正相关, 与 IL-2 及 IL-10 水平均呈负相关, 提示 miR-21 可能通过影响 T 淋巴细胞的分化及功能, 从而影响 IL-6、IL-10、IL-17 等炎症因子, 参与炎性反应。

综上所述, miR-21 相对表达水平及 Th17/Treg 在疱疹性咽峡炎患儿血清中均升高, 且二者呈正相关, 提示 miR-21 可能通过影响患儿的炎性反应, 从而影响疱疹性咽峡炎的疾病进展。但本研究样本量少, 结果可能有局限性, 尚需扩大样本量, 对相关机制进行深入探讨。

参考文献

[1] YU H, LI X W, LIU Q B, et al. Diagnosis and treatment of herpangina: chinese expert consensus[J]. World J Pediatr, 2020, 16(2): 129-134.

[2] YANG T O, ARTHUR H K, CHEN M H, et al. Comparison of nonpolio enteroviruses in children with herpangina and hand, foot and mouth disease in Taiwan[J]. Pediatr Infect Dis J, 2019, 38(9): 887-893.

[3] 潘家华, 杨泽玉, 潘家严, 等. 重组人干扰素 $\alpha 2b$ 口咽部喷雾治疗疱疹性咽峡炎的有效性和安全性多中心随机对照研究[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2020, 35(4): 279-284.

[4] LI H, ZHAO J, JIA X, et al. MiR-21 promotes growth, invasion and migration of lung cancer cells by AKT/P-AKT/cleaved-caspase 3/MMP-2/MMP-9 signaling pathway[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2020, 13(4): 692-700.

[5] XU K, ZHENG K, ZHANG J, et al. MiR-21/STAT3 signal is involved in odontoblast differentiation of human dental pulp stem cells mediated by[J]. Cell Reprogram, 2018, 20(2): 107-116.

[6] LIU Y J, WANG F C. Parthenolide ameliorates colon inflammation through regulating Treg/Th17 balance in a gut microbiota-dependent manner[J]. Theranostics, 2020, 10(12): 5225-5241.

[7] 胡亚美, 江载芳. 诸福棠实用儿科学[M]. 7 版. 北京: 人民

卫生出版社, 2002: 223-225.

[8] 李奉国, 董贵勇, 谭昶, 等. 疱疹性咽峡炎患儿血清生长分化因子-15 和肽素水平及其与心肌损伤的相关性[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版), 2020, 14(2): 117-122.

[9] 中华医学会儿科学分会感染学组, 国家感染性疾病医疗质量控制中心. 疱疹性咽峡炎诊断及治疗专家共识(2019 年版)[J]. 中华儿科杂志, 2019, 57(3): 177-180.

[10] TAKECHI M, FUKUSHIMA W, NAKANO T, et al. Nationwide survey of pediatric inpatients with hand, foot, and mouth disease, herpangina, and associated complications during an epidemic period in Japan: estimated number of hospitalized patients and factors associated with severe cases[J]. J Epidemiol, 2019, 29(9): 354-362.

[11] 林叶昕, 安方梅, 占强. MicroRNAs 调控脂代谢相关蛋白影响肝细胞癌发病机制的研究进展[J]. 中华肝脏病杂志, 2019, 27(3): 219-222.

[12] HUANG B, GUO X, LI Y. LncRNA MALAT1 regulates the expression level of miR-21 and interferes with the biological behavior of colon cancer cells[J]. J BUON, 2020, 25(2): 907-913.

[13] YC Z, GAO Y P, LIU G. Serum miR-21 expression correlates with radiographic progression but also low bone mineral density in patients with ankylosing spondylitis: a cross-sectional study[J]. Innate Immun, 2019, 25(5): 314-321.

[14] SOLEIMANI R, MOHAMMADI M, SAGHEBI S A, et al. Comparison of Th1/Th2 and Treg/Th17 ratios between wet and dry cupping therapies in Persian medicine [J]. Avicenna J Phytomed, 2020, 10(1): 24-34.

[15] 徐振宇, 赵贺堂, 张艳梅, 等. 急性期川崎病患儿外周血 Treg/Th17、血清 MCP-1、单个核细胞 MCP-1 mRNA 表达观察[J]. 山东医药, 2018, 58(3): 73-75.

[16] LATELLA G. Controversial contribution of Th17/IL-17 toward the immune response in intestinal fibrosis[J]. Dig Dis Sci, 2020, 65(5): 1299-1306.

[17] YESILLIK S. Phenotypic analysis of CD4⁺ Treg, CD8⁺ Treg, and Breg cells in adult common variable immunodeficiency patients[J]. Int Arch Allergy Immunol, 2019, 180(2): 150-158.

[18] ZHU L. Protective effect of baicalin on the regulation of Treg/Th17 balance, gut microbiota and short-chain fatty acids in rats with ulcerative colitis[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2020, 104(12): 5449-5460.

[19] SAHRAEI M, KAPLAN A, GARCÍA-MILIAN R, et al. Suppressing miR-21 activity in tumor-associated macrophages promotes an antitumor immune response [J]. J Clin Invest, 2019, 129(12): 5518-5536.

[20] 聂萃, 刘莉莎, 周燕. 系统性红斑狼疮患者 CD4⁺T 细胞 HDAC2, HDAC7 和 miR-21 的表达及意义[J]. 中国免疫学杂志, 2019, 35(14): 1749-1754.