

· 论 著 ·

RSV 下呼吸道感染患儿血清 miR-146a、 miR-155 的表达及意义*

黄佩, 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 探讨呼吸道合胞病毒(RSV)下呼吸道感染患儿血清微小 RNA-146a(miR-146a)、miR-155 的表达及意义。方法 选取该院 97 例 RSV 下呼吸道感染患儿作为试验组,同时随机选取 101 例健康儿童作为对照组。检测 2 组肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素(IL)-6、IL-10、超敏 C-反应蛋白(hs-CRP)、miR-146a、miR-155 水平;分析 miR-146a、miR-155 与炎症因子的相关性及其影响 RSV 下呼吸道感染的因素。**结果** 试验组血清 miR-146a、miR-155、TNF- α 、IL-6、IL-10 和 hs-CRP 水平均高于对照组($P < 0.05$);miR-146a、miR-155 水平均与 TNF- α 、IL-6、IL-10 和 hs-CRP 水平呈正相关($P < 0.05$);高水平的 miR-146a、miR-155 均是影响 RSV 下呼吸道感染的独立危险因素($P < 0.05$)。**结论** RSV 下呼吸道感染患儿血清 miR-146a、miR-155 水平较高,二者均是 RSV 下呼吸道感染的影响因素,有望成为治疗 RSV 下呼吸道感染的潜在靶点。

关键词:呼吸道合胞病毒; 下呼吸道感染; 微小 RNA-146a; 微小 RNA-155

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2021.07.017

中图法分类号:R725.6

文章编号:1673-4130(2021)07-0840-04

文献标志码:A

Detection levels and significance of serum miR-146a and miR-155 in children with RSV lower respiratory tract infection*

HUANG Pei, ZHAI Min, LIAO Tingyan

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

Abstract: Objective To investigate the expression and significance of serum microRNA-146a (miR-146a) and miR-155 in children with respiratory syncytial virus (RSV) infection of the lower respiratory tract. **Methods** A total of 97 children with RSV lower respiratory tract infection in the hospital were selected as the experimental group, and 101 healthy children were randomly selected as the control group. The levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin (IL)-6, IL-10, high sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) and miR-146a, miR-155 in the two groups were detected; the correlation between miR-146a, miR-155 and inflammatory factors and the influencing factors of RSV lower respiratory tract infection were analyzed. **Results** The serum levels of miR-146a, miR-155, TNF- α , IL-6, IL-10 and hs-CRP in the experimental group were higher than those in the control group ($P < 0.05$); miR-146a and miR-155 levels were positively correlated with TNF- α , IL-6, IL-10 and hs-CRP levels ($P < 0.05$); high levels of miR-146a and miR-155 were independent risk factors for RSV lower respiratory tract infection ($P < 0.05$). **Conclusion** The levels of miR-146a and miR-155 in serum of children with RSV lower respiratory tract infection are high. Both of them are influencing factors of RSV lower respiratory tract infection, and they are expected to become potential targets for the treatment of RSV lower respiratory tract infection.

Key words: respiratory syncytial virus; lower respiratory tract infection; microRNA-146a; microRNA-155

呼吸道合胞病毒(RSV)是婴幼儿下呼吸道感染的常见病毒,RSV 感染可导致免疫损伤,患儿出现咳嗽、气促、喘憋等状况^[1-2]。微小 RNA(miRNA)可作

为免疫系统和免疫反应的调节元件参与人体免疫调节^[3-4]。miR-146a 在体内充当炎症调节剂,可影响核转录因子- κ B(NF- κ B)途径及丝裂原活化蛋白激酶途

* 基金项目:湖北省卫生和计划生育委员会科研项目(WJ2018MB153)。

作者简介:黄佩,女,主治医师,主要从事小儿呼吸道疾病诊治相关研究。

本文引用格式:黄佩,翟敏,廖廷彦. RSV 下呼吸道感染患儿血清 miR-146a、miR-155 的表达及意义[J]. 国际检验医学杂志,2021,42(7):

径^[5]。miR-155 在自身免疫和其他慢性炎症性疾病中发挥作用,影响机体炎性反应^[6-7]。miR-146a 和 miR-155 参与调节多种疾病的炎性反应,但二者在 RSV 下呼吸道感染中的作用报道较少。本研究探讨 miR-146a、miR-155 在 RSV 下呼吸道感染中的表达及意义,以期为该病的治疗提供帮助。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2018 年 4 月至 2019 年 12 月本院就诊的 97 例 RSV 下呼吸道感染患儿作为试验组,其中男 53 例,女 44 例;平均年龄(3.49±1.18)岁。选取同期在本院进行常规体检的 101 例健康儿童作为对照组,其中男 59 例,女 42 例;平均年龄(3.67±1.26)岁。2 组年龄、性别比较,差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。记录所有受试儿童的身高、体质量等,计算体质量指数(BMI)。纳入标准:(1)符合《诸福棠实用儿科学(第 8 版)》中下呼吸道感染诊断标准者^[8];(2)RSV 检测呈阳性者;(3)就诊前 2 周未使用激素或药物治疗者;(4)5 岁以下儿童。排除标准:(1)合并其他慢性疾病者;(2)呼吸道畸形者;(3)先天免疫缺陷者。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。

1.2 仪器与试剂 Trizol 试剂盒(批号 DXT-15596018)购自上海科敏生物科技有限公司;RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 反转录试剂盒(批号 K1621)购自杭州主诺生物技术有限公司;SYBR Green PCR Master Mix 实时荧光定量 PCR(qPCR)检测试剂盒(批号 DXT-ST600580)购自密理博(中国)有限公司;肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素(IL)-6、IL-10 及超敏 C-反应蛋白(hs-CRP)检测试剂盒(批号分别为 ARB13479、ARF11752、ARB10557、AKF00479)购自北京百奥莱博科技有限公司;qPCR 仪(型号 100133)购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司;血细胞分析仪(型号 DxH800)购自美国贝克曼库尔特有限公司;希森美康血球仪(型号 XN-2000)购自日本希森美康株式会社。

1.3 方法

1.3.1 标本采集 抽取 2 组儿童的空腹外周静脉血 5 mL,加入乙二胺四乙酸抗凝,4 000 r/min 离心 5 min,吸取上清液于小型离心管中,分装于-20℃冰

箱保存。

1.3.2 血清中炎症因子及相关指标检测 采用双抗体夹心酶联免疫吸附测定(ELISA)检测血清中 TNF- α 、IL-6、IL-10 及 hs-CRP 水平;采用血细胞分析仪测定血清中血红蛋白和清蛋白水平;采用流式细胞术检测白细胞、红细胞、中性粒细胞及淋巴细胞数量。

1.3.3 qPCR 测定血清 miR-146a、miR-155 水平 从-20℃取出标本,按照 Trizol 试剂盒说明书提取总 RNA,并检查纯度和完整性;按照反转录试剂盒说明书操作,所得 cDNA 存于-20℃冰箱保存。qPCR 反应体系(20 μ L):cDNA 模板 1 μ L,2 \times SYBR Green PCR Master Mix 10 μ L,上下游引物各 0.5 μ L,H₂O 8 μ L。根据目的基因设计其上下游引物,以 U6 为内参,引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,序列见表 1。反应条件:95℃ 20 s;95℃ 10 s,58℃ 30 s,35 个循环。根据各标本平均循环阈值(Ct),采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法计算 miR-146a、miR-155 水平。

表 1 miR-146a、miR-155 及内参基因 U6 引物序列

引物	序列(5'-3')
miR-146a	F:ATA GGA TCC ATC ATG CAT GGC TCA TTT TT R:ATA GGA TCC AGC TAC TTG GAA CCC TGC TT
miR-155	F:TTA ATG CTA ATC GTG ATA G R:ACC TGA GAG TAG ACC AGA
U6	F:CTT CGG CAG CAC ATA TAC TAA AAT R:CAG GGG CCA TGC TAA ATC TTC

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-146a、miR-155 水平与炎症因子的相关性;采用 Logistic 回归分析影响 RSV 下呼吸道感染的因素。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2 组一般情况比较 2 组 BMI、白细胞、红细胞比较,差异无统计学意义($P>0.05$);试验组血红蛋白、清蛋白水平,以及中性粒细胞数量均低于对照组($P<0.05$),淋巴细胞数量高于对照组($P<0.05$)。见表 2。

表 2 2 组一般情况比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	BMI (kg/m ²)	白细胞 ($\times 10^9$ /L)	红细胞 ($\times 10^9$ /L)	血红蛋白 (g/L)	清蛋白 (g/L)	中性粒细胞 ($\times 10^9$ /L)	淋巴细胞 ($\times 10^9$ /L)
对照组	101	20.82±1.63	5.35±1.82	3.86±0.87	109.41±16.33	42.71±4.53	4.15±0.75	3.68±0.74
试验组	97	20.46±1.39	5.67±1.91	3.67±0.76	103.53±17.51	37.45±3.85	2.96±0.58	3.92±0.83
<i>t</i>		1.669	1.207	1.634	2.445	8.787	12.454	2.150
<i>P</i>		0.097	0.229	0.104	0.015	<0.001	<0.001	0.033

2.2 2 组血清 miR-146a、miR-155 水平比较 试验组血清 miR-146a、miR-155 水平均高于对照组 ($P < 0.05$)。见表 3。

2.3 2 组血清炎症因子水平比较 试验组血清 TNF- α 、IL-6、IL-10 和 hs-CRP 水平均高于对照组 ($P < 0.05$)。见表 4。

2.4 RSV 下呼吸道感染患儿血清 miR-146a、miR-155 水平与炎症因子的相关性 RSV 下呼吸道感染患儿血清 miR-146a、miR-155 水平均与 TNF- α 、IL-6、

IL-10 和 hs-CRP 水平均呈正相关 ($P < 0.05$)。见表 5。

表 3 2 组血清 miR-146a、miR-155 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	miR-146a	miR-155
对照组	101	3.62 ± 1.54	0.85 ± 0.31
试验组	97	4.53 ± 1.76	1.48 ± 0.65
t		3.876	8.759
P		<0.001	<0.001

表 4 2 组血清炎症因子水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TNF- α (ng/L)	IL-6(ng/L)	IL-10(ng/L)	hs-CRP(mg/L)
对照组	101	4.07 ± 1.13	118.33 ± 32.17	109.73 ± 26.44	124.38 ± 35.14
试验组	97	5.41 ± 1.32	204.62 ± 51.45	183.29 ± 37.62	213.29 ± 65.76
t		7.684	14.210	15.969	11.930
P		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

表 5 RSV 下呼吸道感染患儿血清 miR-146a、miR-155 水平与炎症因子的相关性

炎症因子	miR-146a		miR-155	
	r	P	r	P
TNF- α	0.514	0.005	0.481	0.001
IL-6	0.463	0.001	0.508	<0.001
IL-10	0.549	0.012	0.511	0.007
hs-CRP	0.485	0.001	0.469	<0.001

2.5 影响 RSV 下呼吸道感染的多因素分析 将 RSV 下呼吸道感染是否发生作为因变量,以 miR-146a、miR-155、TNF- α 、IL-6、IL-10、hs-CRP、血红蛋白、清蛋白、中性粒细胞和淋巴细胞作为自变量进行 Logistic 回归分析,结果显示高水平的 miR-146a、miR-155、TNF- α 和 IL-10 均是影响 RSV 下呼吸道感染的独立危险因素 ($P < 0.05$)。见表 6。

表 6 影响 RSV 下呼吸道感染的多因素分析

影响因素	β	SE	Wald/ χ^2	P	OR	95%CI
miR-146a	0.86	0.28	9.48	<0.001	2.37	1.45~3.87
miR-155	0.84	0.27	9.68	<0.001	2.32	1.28~4.19
TNF- α	1.02	0.34	9.05	<0.001	2.78	1.62~4.78
IL-6	0.52	0.39	1.76	0.093	1.68	0.72~3.91
IL-10	0.67	0.24	7.93	0.006	1.96	1.59~2.43
hs-CRP	0.37	0.27	1.89	0.082	1.45	0.64~3.28
血红蛋白	0.68	0.53	1.63	0.105	1.97	0.83~4.67
清蛋白	0.50	0.42	1.43	0.185	1.65	0.76~3.59
中性粒细胞	0.82	0.63	1.71	0.086	2.28	0.91~5.72
淋巴细胞	0.48	0.38	1.60	0.113	1.62	0.65~4.02

3 讨论

RSV 感染是世界范围内 5 岁以下儿童死亡的主要原因之一,婴幼儿易受到 RSV 病毒感染,其中约 2/3 为上呼吸道感染,1/3 为下呼吸道感染^[9]。RSV 可导致毛细支气管炎,可能会造成儿童哮喘。RSV 感染会导致肺部损伤,并在儿童生长阶段长期削弱肺功能,致使持续的气道高反应^[10]。研究表明,在严重 RSV 感染的婴儿中 TNF- α 水平较健康婴儿高^[11]。在 RSV 感染患儿的洗鼻液中发现可溶性细胞间黏附分子-1、IL-10 及 IL-6 水平与疾病严重程度相关^[12]。RSV 下呼吸道感染已被证实与反复性喘息有关,并可能在患儿成年后对其呼吸系统产生一定的影响^[13]。本研究检测 RSV 下呼吸道感染患儿血清中炎症因子水平,结果显示,RSV 下呼吸道感染患儿血清 TNF- α 、IL-6、IL-10 和 hs-CRP 水平均高于健康儿童,与上述结果一致,提示 RSV 下呼吸道感染可导致炎症反应。临床上对于 RSV 下呼吸道感染暂无有效干预措施,缺乏特异性治疗,因此探寻 RSV 下呼吸道感染的治疗靶点是当前的研究热点。

miRNA 可参与人体多种生理反应,部分 miRNA 对炎症反应具有调节作用。miR-146a 是 miR-146 家族成员,位于人 5 号染色体上,可抑制 NF- κ B 通路活化,抑制炎症反应或维持免疫稳态^[14]。miR-146a 在几种自身免疫性疾病的发病过程中起重要作用,如类风湿关节炎、系统性红斑狼疮、溃疡性结肠炎和银屑病等^[15]。GUAN 等^[16]发现,在 miR-146a 转染的人软骨细胞中,IL-6、IL-8 和 TNF- α 水平降低,miR-146a 可抑制软骨细胞中的重要炎症因子。王盼等^[17]研究表明,哮喘儿童血清中 miR-146a 水平升高,提示 miR-146a 水平可能与哮喘发病有关。miR-155 被认

为促炎因子,可调节细胞因子的产生,从而在先天性免疫反应中发挥作用^[18]。miR-155 表达受 Toll 样受体/NF- κ B 通路调控,其靶基因多为抗炎因子,miR-155 通过抑制其靶基因发挥促炎作用^[19]。SINGH 等^[20]发现,风湿性关节炎患者血清 miR-146a、miR-155 水平均高于健康人群,并对风湿性关节炎有一定诊断价值。本研究发现,RSV 下呼吸道感染患儿血清 miR-146a、miR-155 水平均高于健康儿童,提示 miR-146a、miR-155 可能参与 RSV 下呼吸道感染的发病进程。通过 Pearson 相关分析 miR-146a、miR-155 水平与炎症因子的相关性,发现 RSV 下呼吸道感染患儿血清 miR-146a、miR-155 水平均与 TNF- α 、IL-6、IL-10 和 hs-CRP 水平呈正相关,提示二者水平能够反映出 RSV 下呼吸道感染患儿的炎症状况;Logistic 回归分析发现,高水平的 miR-146a、miR-155、TNF- α 和 IL-10 均是影响 RSV 下呼吸道感染的危险因素,提示降低 miR-146a、miR-155 水平可能会抑制 RSV 下呼吸道感染的发生发展。

综上所述,RSV 下呼吸道感染患儿血清 miR-146a、miR-155 水平较高,二者均是 RSV 下呼吸道感染的影响因素。提示 miR-146a、miR-155 可作为评估 RSV 下呼吸道感染患儿炎症状态的参考指标,有望成为干预或治疗 RSV 下呼吸道感染的潜在靶点。

参考文献

- [1] THWAITES R, BUCHAN S, FULLARTON J, et al. Clinical burden of severe respiratory syncytial virus infection during the first 2 years of life in children born between 2000 and 2011 in Scotland[J]. *Eur J Pediatr*, 2020, 179(5): 791-799.
- [2] 庄士豪, 曾玫. 呼吸道合胞病毒感染的防治进展[J]. *中华传染病杂志*, 2019, 37(3): 185-188.
- [3] BASTET L, TURCOTTE P, WADE J T, et al. Maestro of regulation: riboswitches orchestrate gene expression at the levels of translation, transcription and mRNA decay [J]. *RNA Biol*, 2018, 15(6): 679-682.
- [4] YANG Q, CAO W, WANG Z, et al. Regulation of cancer immune escape: the roles of miRNAs in immune checkpoint proteins[J]. *Cancer Lett*, 2018, 431(1): 73-84.
- [5] WANG J P, DONG L N, WANG M, et al. MiR-146a regulates the development of ulcerative colitis via mediating the TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(5): 2151-2157.
- [6] LIAO W W, ZHANG C, LIU F R, et al. Effects of miR-155 on proliferation and apoptosis by regulating FoxO3a/BIM in liver cancer cell line HCCLM3[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(5): 1277-1285.
- [7] CHAO G, LI X L, JI Y H, et al. MiR-155 controls follicular Treg cell-mediated humoral autoimmune intestinal injury by inhibiting CTLA-4 expression[J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 71(1): 267-276.
- [8] 胡亚美, 江载芳. 诸福棠实用儿科学[M]. 8 版. 北京: 人民卫生出版社, 2015: 321-323.
- [9] JACOBIS I, VONA R, STRAFACE E, et al. Sex differences in blood pro-oxidant status and platelet activation in children admitted with respiratory syncytial virus bronchiolitis: a pilot study[J]. *Ital J Pediatr*, 2020, 46(11): 217-225.
- [10] ELENA P, MARIA E C, EUGENIO B, et al. The RSV infection and respiratory sequelae[J]. *Minerva Pediatr*, 2018, 70(6): 623-633.
- [11] 李天萍, 黄霞飞, 杨蕉, 等. 呼吸道合胞病毒感染性肺炎患儿的 TNF- α 和 IL-1 β 水平及 TLR4 信号通路作用初步探究[J]. *中华医院感染学杂志*, 2020, 30(6): 919-922.
- [12] 孙海斌, 李雅雯, 胡彩莲, 等. 呼吸道合胞病毒与甲型流感病毒混合感染患儿血清炎症因子表达水平及临床意义[J]. *儿科药学杂志*, 2019, 25(10): 1-4.
- [13] PANAGIOTA K, LAVANYA N. Effects of respiratory syncytial virus infection in infancy on asthma and respiratory allergy in 6-year-old children[J]. *South Med J*, 2018, 111(11): 698-702.
- [14] ASSUNTA V, MARIA M P, ROSAMARIA P, et al. HSV-1/EGFP stimulates miR-146a expression in a NF- κ B-dependent manner in monocytic THP-1 cells[J]. *Sci Rep*, 2019, 26(9): 5157-5170.
- [15] SANG-CHEOL B, YOUNG H L. MiR-146a levels in rheumatoid arthritis and their correlation with disease activity: a meta-analysis[J]. *Int J Rheum Dis*, 2018, 21(7): 1335-1342.
- [16] GUAN Y J, LI J, YANG X, et al. Evidence that miR-146a attenuates aging- and trauma-induced osteoarthritis by inhibiting Notch1, IL-6, and IL-1 mediated catabolism[J]. *Aging Cell*, 2018, 17(3): 367-379.
- [17] 王盼, 任立红. MiR-146a 基因多态性与儿童哮喘的相关性研究进展[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2018, 26(3): 4-5.
- [18] 朱凤, 范恒, 刘星星. miR-155 在炎症性肠病中的免疫作用机制研究进展[J]. *世界华人消化杂志*, 2019, 27(17): 1070-1075.
- [19] WAN J H, YANG X Y, REN Y P, et al. Inhibition of miR-155 reduces impaired autophagy and improves prognosis in an experimental pancreatitis mouse model[J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(4): 303-313.
- [20] SINGH A, PATRO P S, AGGARWAL A. MicroRNA-132, miR-146a, and miR-155 as potential biomarkers of methotrexate response in patients with rheumatoid arthritis[J]. *Clin Rheumatol*, 2019, 38(3): 877-884.