

川崎病急性期患儿血中外泌体中的 miRNAs 表达有差异性

马旭莹

(无锡市锡山人民医院 江苏无锡 214100)

摘要: 目的: 验证急性期川崎病患儿血清中的外泌体源性微小 RNA 有差异性表达。方法: 选取 12 例于 2019 年 03 月至 08 月在苏州大学附属儿童医院就诊, 并明确诊断为川崎病的患儿为研究对象, 且这些患儿都处于疾病急性期, 且都在大剂量丙球及阿司匹林使用前, 同时选取了同期健康体检儿童 12 例作为对照组。结果 通过芯片技术筛选得到急性期川崎病患儿血中外泌体源性差异表达的 miRNAs, 进一步利用 RTq-PCR 技术验证芯片, 筛选得到 33 个有差异性表达 miRNAs, 其中有 9 个是已被命名的 miRNAs, 6 个表现为下调水平 (hsa-miR-125a-5p、hsa-miR-130b-5p、hsa-miR-146a-5p、hsa-miR-150-5p、hsa-miR-151a-5p、hsa-miR-370-3p), 3 个表现为上调水平 (hsa-miR-122-5p、hsa-miR-21-5p、hsa-miR-4484) (p 值<0.05, fc 值>1.5)。RTqPCR 结果显示 hsa-miR-122a-5p、hsa-miR-21-5p 相对表达量显著性上调, hsa-miR-125a-5p、hsa-miR-150-5p 显著下调。

关键词: 川崎病; 外泌体; miRNAs; 儿童;

川崎病(Kawasaki disease, KD)在儿童, 特别是婴幼儿, 是后天性心脏病发病的最重要起因^[1], 其病理生理是全身性免疫性血管炎, 主要影响中小动脉, 最大的危害是影响冠状动脉, 儿童时期冠状动脉的病变得持续到成年后, 对生活质量会造成一定影响^[2]。川崎病发病原因不明, 目前临床诊断仍高度依赖于症状表现和超声影像学表现【3】。正因川崎病的诊断缺乏特异性诊断标志物, 因此川崎病是否能到早期诊断, 是一个极大的挑战, 近年来, 许多研究致力于探索川崎病早期诊断的生物标志物, 并取得了一定的成果, 目前报道的包括有蛋白质、基因、表观遗传标志物等。但目前已有研究【4】外泌体源的核酸可以作为诊断川崎病的候选标志物, 基于此, 我们展开了对外泌体中 miRNAs 差异性表达的研究, 现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

研究组选取 2019 年 3 月至 2019 年 8 月苏州大学附属儿童医院收治的 12 例川崎病患儿, 其中男 10 例, 女 2 例, 最小年龄为 5 月, 最大年龄 24 月, 平均年龄 18 月。入组的病例均符合川崎病诊断标准 (2017 年美国心脏病协会的《川崎病的 诊断、治疗及远期管理—美国心脏病协会对医疗专业人员的科学指南》), 且都在疾病的急性期, 大剂量丙球及阿司匹林使用前; 对照组选取同期健康体检儿童 12 例, 其中男 6 例, 女 6 例, 最小年龄 12 月, 最大年龄 3 岁 2 月, 平均年龄 22 月。

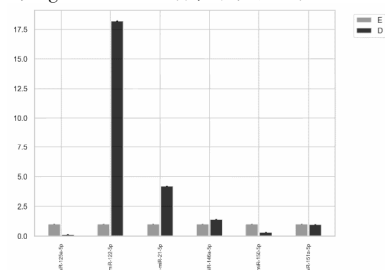
1.2 实验方法

抽取清晨空腹血 (2ml), 通过离心法得到血清中外泌体, 进一

miRNAs_id	FC 值	P 值	组间差异趋势	序列
hsa-miR-125a-5p	0.030358403	0.048349923	Down	ACAGATTCGATTCTAGGGGAAT
hsa-miR-122-5p	3.234858294	0.033767639	Up	TGGAGTGTGACAATGGTGTTTG
hsa-miR-130b-5p	0.00471132	0.005544081	Down	ACTCTTTCCCTGTGCACTAC
hsa-miR-146a-5p	0.619098279	0.011528643	Down	TGAGAACTGAATTCATGGGTT
hsa-miR-150-5p	0.528107453	0.030487106	Down	TCTCCCAACCCTTGTACCAGTG
hsa-miR-151a-5p	0.590556606	0.04361584	Down	TGGAGGAGCTCACAGTCTAGT
hsa-miR-21-5p	452.5285821	0.005761191	Up	TAGCTTATCAGACTGATGTTGA
hsa-miR-370-3p	0.056056216	0.005473367	Down	GCCTGCTGGGGTGAACCTGTT
hsa-miR-4484	Inf	0.020809824	Up	AAAAGGCGGGAGAAGCCCCA

2.3 miRNAs 的验证

RT-qPCR 验证血清中差异表达的外泌体源性 miRNAs 的结果与 Agilent2100 芯片筛得结果一致。



川崎病组 (D) -VS-正常对照组 (E)

3 讨论

步利用 Agilent miRNAs 2100 芯片筛选得到差异表达 miRNAs, 再应用 RT-qPCR 技术验证芯片中筛选出的差异性 miRNAs。

1.3 数据分析软件

利用不同数据库 (TargetScan, miRDB, miRWalk) 得到这些表达差异的 miRNAs 的功能靶基因, 将三个数据库分别获得的靶基因经过 venny 这个分析软件, 分别获得两个 miRNAs 的各自共同的靶基因, DAVID 软件得到 GO 和 KEGG 分析。用统计检验的方法分析 GO 及 KEGG 中靶基因及 pathway 的富集性。P 值越小说明在该条 GO 条目中靶基因存在富集, 在 KEGG 中此条 pathway 中有富集, 进一步结合 GO 和 KEGG 的分析结果, 筛选出下游可能与哪些细胞功能及信号通路相关。

2 实验结果

2.1 外泌体形态

透用电镜观察到血清中分离得到的囊泡样物, 直径约在 0.05 ~ 0.15 μm, 并呈现出典型“茶托盘”的外泌体形态。

2.2 miRNA 初筛

利用 Agilent2100 芯片筛得 KD 患儿急性期血清中有显著表达差异性的外泌体源性 miRNAs。筛选出 33 个有表达差异的 miRNAs, 其中有 9 个已命名 miRNAs, 6 个表现为下调水平 (hsa-miR-125a-5p、hsa-miR-130b-5p、hsa-miR-146a-5p、hsa-miR-150-5p、hsa-miR-151a-5p、hsa-miR-370-3p), 3 个表现为上调水平 (hsa-miR-122-5p、hsa-miR-21-5p、hsa-miR-4484) (p 值<0.05, fc 值>1.5)。

川崎病, 儿童后天性心脏病中最常见的类型, 主要危害是引起全身的血管炎, 特别是冠状动脉的病变。而且无论川崎病有无冠脉损伤, 炎症反应始终贯穿于川崎病血管内皮功能障碍和血管内皮损伤的发生与发展过程中。近年来有学者将聚焦点集中于一些微颗粒的研究上。微颗粒 (microparticles) 来源广泛, 有血小板、内皮细胞、红细胞、白细胞等活化及凋亡的细胞均有分泌, 这些微颗粒不仅可以作为多种疾病的生物学标志物, 而且在细胞间传递着各种生物学物质【5-8】。本文所论述的外泌体正是其中的一种微颗粒。近年的研究发现, 外泌体被看作是一种新型的生物标志物, 在疾病的诊断以及危重程度的评估方面均表现出来巨大的潜在价值。外泌体中内含物非常丰富, 不仅有蛋白质, 还有核酸的存在, miRNAs 是核酸的重要组成部分, 可选择性组装到外泌体中, 然而 miRNAs 会被循环中的 RNA 酶降解, 但有了外泌体的隔离, 可防止其内包的 miRNAs

(下转第 74 页)

(上接第 55 页)

免受 RNA 酶的降解【9-10】。miRNAs 芯片技术是一种快速而且有效的能够分析 miRNAs 表达谱的方法,在细胞内外的研究中应用广泛,其结果具有良好重复性。本研究利用该技术筛选得到 KD 急性期患儿血清中差异表达的外泌体源性 miRNAs 共 33 种。已命名的有 9 个,其中差异表达有 1.5 倍下调的有 6 个 miRNAs: hsa-miR-125a-5p、hsa-miR-130b-5p、hsa-miR-146a-5p、hsa-miR-150-5p、hsa-miR-151a-5p、hsa-miR-370-3p,有 3 个 1.5 倍显著上调的 miRNAs: hsa-miR-122-5p、hsa-miR-21-5p、hsa-miR-4484。

进一步利用 qPCR 技术验证基因芯片技术的所得的实验结果,评估结果的可信性。由于实验经费和查阅文献结果综合考虑,最终选取了芯片结果中呈上调的 hsa-miR-21-5p、hsa-miR-122-5p,以及下调的 hsa-miR-125a-5p、hsa-miR-146a-5p、hsa-miR-150-5p、hsa-miR-151a-5p 进行 RTqPCR 验证。我们采用相对表达量 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法比较各 miRNAs 的表达差异,实验结果显示 KD 急性期组 hsa-miR-122-5p、hsa-miR-21-5p 的表达水平均明显高于正常对照组,而 hsa-miR-125a-5p、hsa-miR-150-5p 表达量明显下降,与芯片结果一致。定位到差异性表达 miRNAs 后我们可以进一步利用 Targetsan、micorRNAorg、PITA 等数据库预测其下游的靶基因,定共同靶基因,并使用生物信息分析系统进行靶基因功能及通路分析预测,这对今后疾病的研究提供了更好的途径。

参考文献:

[1]NewburgerJW, Takahashi M, Bums JC. Kawasaki disease[J]. *Am Coil Cardiol*, 2016, 67(14): 1738—1749. DOI: 10. 1016 / j. jacc. 2015. 12. 073.

[2]Ohmoto-Sekine Y, Ishihara M, Hsieh SD, et al. Giant coronary artery aneurysms associated with Kawasaki disease detected on whole—heart magnetic resonance coronary angiographic screening[J]. *Intern Med*, 2013, 52(9):977-980. DoI:10. 2169 internalmedicine. 52. 9463.

[3]Kuo, H. C., Yang, K. D., Chang, W. C., Ger, L. P., and Hsieh, K. S. (2012) Kawasaki disease: an update on diagnosis and treatment. *Pediatr. Neonatol.* 53, 4 - 11.

[4]Jia Hong-Ling,Liu Chao-Wu,Zhang Li,Xu Wei-Jun,Gao Xue-Juan,Bai Jun,Xu Yu-Fen,Xu Ming-Guo,Zhang Gong. Sets of serum exosomal microRNAs as candidate diagnostic biomarkers for Kawasaki disease.[J]. *Scientific reports*,2017,7.

[5]陈文生, 赵颖海, 等. 外泌体提取方法及其在人类疾病中的研究进展.海南医学 2019 年 11 月第 30 卷第 22 期: 2977-2980.

[6]WAN Z, GAO X, DONG Y, et al. Exosomes-mediated cell-cell communication in tumor progression [J]. *Am J Cancer Res*, 2018, 8(9): 1661-1673.

[7]RECORD M, CARAYON K, POIROT M, et al. Exosomes as new vesicular lipid transporters involved in cell-cell communication and various pathophysiological [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1841(1): 108-120.

[8]RUIVO CF, ADEM B, SILVA M, et al . The biology of cancer exosomes: insights and new perspectives [J]. *Cancer Res*, 2017, 77(23): 6480-6488.

[9]Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al. Circulating microRNAs as stable bloodbased markers for cancer detection [J]. *Proc Natl Acad SciUSA*. 2008;105:10513 - 10518.

[10]Gilad S, Meiri E, Yogev Y, et al. Serum microRNAs are promising novel biomarkers. [J]. *PLoS ONE*. 2008;3:e3148.

[11]陈文生, 赵颖海, 等. 外泌体提取方法及其在人类疾病中的研究进展.海南医学 2019 年 11 月第 30 卷第 22 期: 2977-2980.

[12]罗雪挺,周用,蒋满红,罗保平.血管内皮细胞源外泌体对动脉粥样硬化大鼠免疫因子的影响 [J]. *中国医药导报*.2019,16(33):7-12+39.