

溃疡性结肠炎患者肠黏膜组织及血清中 miR-200b 和 miR-655 的表达水平及其临床意义研究

罗文捷, 张启芳, 张海莲, 何思民, 李晓燕, 张 晶, 胡凌佼, 赵 磊

基金项目: 广西自然科学基金项目(编号:2015GXNSFAA139222); 广西医疗卫生适宜技术开发与应用推广项目(编号:S2017073); 广西桂林市科学研究与技术开发项目(编号:20190218-8-2); 广西壮族自治区南溪山医院攻关项目(编号:NY20170002)

作者单位: 541002 桂林,广西壮族自治区南溪山医院消化内科(罗文捷,张启芳,张海莲,何思民,李晓燕,胡凌佼),检验科(张 晶),病理科(赵 磊)

作者简介: 罗文捷,医学硕士,住院医师,研究方向:炎症性肠病的基础与临床研究。E-mail:jasmينو711@163.com

通信作者: 张启芳,医学博士,主任医师,研究方向:炎症性肠病的基础与临床研究。E-mail:zhangqifang-gl@163.com

[摘要] **目的** 分析溃疡性结肠炎(UC)患者血清及肠黏膜组织中 miR-200b 和 miR-655 的表达水平,探讨其与疾病活动度的关系。**方法** 选择 2016 年 10 月至 2019 年 6 月该院消化内科收治的 UC 患者 36 例,根据改良的 Mayo 评分系统将其分为内镜下活动期组(20 例)和内镜下愈合期组(16 例),另选择同期健康志愿者 20 名作为对照组。应用实时荧光定量聚合酶链反应(RT-qPCR)法检测肠黏膜组织及血清样本 miR-200b、miR-655 的表达水平,并进行三组间比较。**结果** 对照组肠黏膜 miR-200b、miR-655 表达水平显著高于内镜下活动期组 and 内镜下愈合期组($P < 0.05$),而内镜下活动期组与内镜下愈合期组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。内镜下活动期组血清中 miR-200b、miR-655 水平高于内镜下愈合期组和对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),但后两组血清 miR-200b、miR-655 水平比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 血清 miR-200b、miR-655 表达水平有可能间接反映 UC 患者的肠黏膜损伤情况。

[关键词] miR-200b; miR-655; 溃疡性结肠炎; 肠黏膜; 内镜; 疾病活动度

[中图分类号] R 574.62 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2022)02-0137-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2022.02.10

A study on the expression levels of miR-200b and miR-655 in intestinal mucosal tissues and serum of patients with ulcerative colitis and their clinical significances LUO Wen-jie, ZHANG Qi-fang, ZHANG Hai-lian, et al. Department of Gastroenterology, Nanxishan Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Guilin 541002, China

[Abstract] **Objective** To analyze the expression levels of micro-ribonucleic acid-200b(miR-200b) and micro-ribonucleic acid-655(miR-655) in the serum and intestinal mucosal tissues of patients with ulcerative colitis(UC), and to explore their relationships with disease activity. **Methods** Thirty-six UC patients admitted to Department of Gastroenterology, Nanxishan Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region from October 2016 to June 2019 were selected. According to the improved Mayo scoring system, they were divided into the endoscopic active group(20 cases) and the endoscopic healing group(16 cases), and other 20 healthy volunteers during the same period were selected as the control group. Real-time quantitative polymerase chain reaction(RT-qPCR) method was used to detect the expression levels of miR-200b and miR-655 in intestinal mucosal tissues and serum samples, and these expression levels were compared among the three groups. **Results** The expression levels of miR-200b and miR-655 in the intestinal mucosa of the control group were significantly higher than those of the endoscopic active group and the endoscopic healing group($P < 0.05$), while there was no statistically significant difference between the endoscopic active group and the endoscopic healing group($P > 0.05$). The serum levels of miR-200b and miR-655 in the endoscopic active group were higher than those in the endoscopic healing group and the control group, and the differences were statistically significant($P < 0.05$). However, there were no significant differences in the serum levels of miR-200b and miR-655 between the latter two groups($P > 0.05$). **Conclusion** The expression levels of serum miR-200b and miR-655 may indirectly reflect the intestinal mucosal injury in UC patients.

[Key words] Micro-ribonucleic acid-200b(miR-200b); Micro-ribonucleic acid-655(miR-655); Ulcerative colitis(UC); Intestinal mucosa; Endoscopy; Disease activity

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)是一类由多种原因引起的以慢性肠道炎症为主要表现的自身免疫性疾病,常反复发作,病理分型主要有溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)和克罗恩病(Crohn's disease, CD)。黏膜愈合是 UC 治疗好转的目标。微小 RNA(microRNA, miRNA)可通过与靶基因序列特异性的相互作用,在转录和翻译水平调节相关基因表达,从而参与细胞发育、增殖、分化、凋亡等过程;还能通过影响下游炎症因子的分泌或参与免疫系统的发育、分化过程,调控慢性炎症的发生、发展^[1-2],甚至对结直肠癌的发生、发展产生直接影响^[3-4]。有研究显示,miR-200b 可维持 IBD 患者肠上皮完整性^[3],且血清 miR-200b 的表达水平可反映 UC 患者疾病的严重程度^[4]。另外也有研究显示,miR-655 可通过靶向调节 E 盒结合锌指蛋白 1(zinc finger E-box-binding protein 1, ZEB1)等因子抑制上皮间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)来保持上皮的完整性^[5],但其与 UC 内镜下活动度的关系尚未阐明。本研究通过比较 UC 患者与健康体检者血清及肠黏膜组织 miR-200b、miR-655 的相对表达量,探讨 miR-200b、miR-655 表达水平与 UC 疾病活动的关系。

表 1 改良的 Mayo 评分系统

项 目	0 分	1 分	2 分	3 分
排便次数	正常	比正常增加 1~2 次/d	比正常增加 3~4 次/d	比正常增加 5 次/d
便血	未见出血	不到一半时间内出现便中混血	大部分时间内为便中混血	一直存在便血
内镜检查	正常或无活动性病变	轻度病变(红斑、血管纹理减少、轻度易脆)	中度病变(明显红斑、血管纹理缺乏、易脆、糜烂)	重度病变(自发性出血,溃疡形成)
意识总体评价	正常	轻度病情	中度病情	重度病情

1.3 标本采集

1.3.1 组织标本采集 UC 患者及对照组均在行内镜检查时应用活检钳取直肠或乙状结肠黏膜组织 3 块。活动期患者活检部位为直肠或乙状结肠黏膜糜烂或溃疡处;内镜下愈合期患者活检部位为直肠或乙状结肠愈合黏膜处;对照组活检部位为正常的直肠黏膜组织。将其中 2 块标本经液氮速冻后置 -80 ℃ 保存备用,另 1 块标本置于福尔马林液中行病理切片检查。

1.3.2 血清标本提取 取研究对象肘静脉血 5 ml,分离血清,以 5 000 r/min 条件离心 15 min,提取上清液备检。

1.4 RNA 提取 取活检组织 2 块,清洗去除血污后置入洁净 EP 管中,加入 Trizol (Life 生物技术有限公司),利用高速组织研磨器对组织进行匀浆,至匀浆液均匀无颗粒。对于血清样本则直接取冻融血清

1 对象与方法

1.1 研究对象 选择 2016 年 10 月至 2019 年 6 月我院消化内科收治的 UC 患者 36 例,均经内镜检查结合临床症状进行确诊。其中内镜下活动期 20 例(内镜下活动期组),内镜下愈合期 16 例(内镜下愈合期组)。纳入标准:(1)年龄 20~70 岁;(2)符合《炎症性肠病诊断与治疗的共识意见(2012 年,广州)》^[6]中关于 UC 的诊断标准;(3)检查资料完整。排除标准:(1)过去 3 个月内使用过水杨酸制剂、糖皮质激素、免疫抑制剂及生物制剂等;(2)合并心血管疾病和肝肾疾病;(3)合并恶性肿瘤;(4)孕期妇女;(5)合并其他自身免疫系统疾病。另选择同期健康志愿者 20 名作为对照组。所有研究对象签署知情同意书。内镜下活动期组男 13 例,女 7 例,年龄(49.60±13.93)岁。内镜下愈合期组男 10 例,女 6 例,年龄(52.69±9.69)岁。对照组男 11 名,女 9 名,年龄(51.19±11.69)岁。三组年龄、性别比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

1.2 UC 内镜下活动期及愈合期的判断方法^[6] 根据改良的 Mayo 评分系统进行诊断分级。见表 1。由于 Mayo 评分对于黏膜愈合无明确定义,本研究以 Mayo 评分为 0~1 分定义为愈合期,2~3 分定义为活动期。

200 μl 置于洁净 EP 管中,加入 1 ml Trizol,充分混匀。随后两者均按 1/5 体积的比例加入 4 ℃ 的氯仿,剧烈振荡,充分混匀后冰上放置 15 min,12 000 r/min、4 ℃ 离心 15 min。小心吸取上层无色液相后加入等体积的异丙醇,轻柔混匀,常温静置 15 min,12 000 r/min、4 ℃ 离心 15 min。取上清液,加入 -20 ℃ 冻存 75% 乙醇 1 ml,轻柔颠倒数次,8 000 r/min、4 ℃ 离心 5 min,弃上清液,所得沉淀为总 RNA。室温下静置 10~15 min,使沉淀自然晾干。随后加入 30 μl ddH₂O(血清标本则用 20 μl ddH₂O),室温静置 10 min,使 RNA 充分溶解,混匀后取 2 μl 进行 RNA 纯度检测,其余 -80 ℃ 冻存备检。

1.5 RNA 完整性分析 取洁净电泳槽,配制 1% 的琼脂糖凝胶,用移液器吸取总 RNA 样品 4.5 μl 于薄膜上,再加入 0.5 μl 的 10× loading buffer,混匀,将

其小心加入点样孔。电压设置为 100 V,电泳 30 min。琼脂糖凝胶电泳实验结果可见 28 s、18 s 及 5 s 小分子 RNA 条带,则说明完整性好;28 s 和 18 s RNA 比值约为 2:1,表明 RNA 无降解。见图 1。

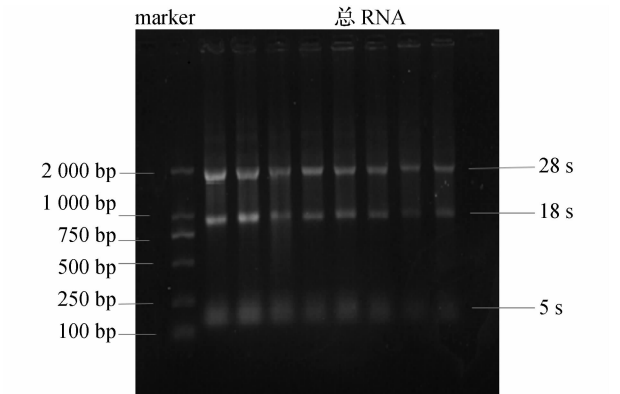


图 1 琼脂糖凝胶电泳图

1.6 实时荧光定量聚合酶链反应 (real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR) 法检测组织及血清样本 miR-200b、miR-655 的表达 应用 miRcute 增强型 miRNA cDNA 第一链合成试剂盒 (天根生化) 进行 RNA 逆转录,获得 cDNA。应用 miRcute 增强型 miRNA 荧光定量试剂盒 (天根生化) 进行扩增检测。实验操作严格按照试剂盒说明书进行。U6 (内参)、miR-200b、miR-655 引物均由 GeneCopia 公司合成。以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算相对表达量。

1.7 统计学方法 应用 SPSS22.0 统计软件进行数据分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,三组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。计数资料以例数 (*n*) 表示,组间比较采用 χ^2 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 三组肠黏膜组织 miR-200b、miR-655 表达水平比较 对照组肠黏膜组织 miR-200b、miR-655 表达水平显著高于内镜下活动期组和内镜下愈合期组 (*P* < 0.05),而内镜下活动期组与内镜下愈合期组比较差异无统计学意义 (*P* > 0.05)。见表 2。

表 2 三组肠黏膜组织 miR-200b、miR-655 表达水平比较 [$(\bar{x} \pm s)$, 相对表达量]

组 别	例数	miR-200b	miR-655
内镜下活动期组	20	0.87 $\pm$ 0.16	1.05 $\pm$ 0.21
内镜下愈合期组	16	1.19 $\pm$ 0.25	0.66 $\pm$ 0.10
对照组	20	35.01 $\pm$ 6.82 ^{ab}	7.45 $\pm$ 1.61 ^{ab}
<i>F</i>	—	444.935	293.756
<i>P</i>	—	0.000	0.000

注:与内镜下活动期组比较,^a*P* < 0.05;与内镜下愈合期组比较,^b*P* < 0.05

2.2 三组血清 miR-200b、miR-655 表达水平比较 内镜下活动期组血清 miR-200b、miR-655 水平高于内镜下愈合期组和对照组,差异有统计学意义 (*P* < 0.05)。但后两组血清 miR-200b、miR-655 水平比较差异无统计学意义 (*P* > 0.05)。见表 3。

表 3 三组血清 miR-200b、miR-655 表达水平比较 [$(\bar{x} \pm s)$, 相对表达量]

组 别	例数	miR-200b	miR-655
内镜下活动期组	20	6.65 $\pm$ 2.36	29.93 $\pm$ 16.52
内镜下愈合期组	16	1.98 $\pm$ 0.26 ^a	20.58 $\pm$ 10.39 ^a
对照组	20	1.95 $\pm$ 0.50 ^a	15.05 $\pm$ 7.96 ^a
<i>F</i>	—	67.069	7.465
<i>P</i>	—	0.000	0.001

注:与内镜下活动期组比较,^a*P* < 0.05

3 讨论

3.1 IBD 可引起肠道通透性和抗原渗透增加,导致肠道上皮屏障损伤 [7]。黏膜愈合是 UC 的一个治疗目标,目前已有大量研究证据表明,黏膜愈合可以维持临床缓解时间,降低患者住院率及手术风险,从而改善 UC 的疾病进程。而内镜检查是目前评估 UC 黏膜愈合情况的金标准 [8]。

3.2 Chen 等 [3] 的研究显示,活动期 IBD 患者肠黏膜组织中 miR-200b 的表达水平显著低于对照组,miR-200b 可通过抑制 EMT 促进肠上皮细胞的增殖以维持 IBD 患者肠道上皮的完整性。另外,Yang 等 [9] 的研究也显示,miR-200 家族成员可通过直接靶向下调 ZEB1 和 E 盒结合锌指蛋白 2 (zinc finger E-box-binding protein 2, ZEB2) 来抑制肠上皮 EMT,促进肠黏膜上皮增生。也有研究发现,miR-200b 可通过抑制肿瘤坏死因子 α 、白介素-8 的表达,改善肠上皮紧密连接损伤,从而发挥保护肠上皮屏障的功能 [10-11]。本研究结果显示,UC 患者肠黏膜组织 miR-200b 表达水平显著低于对照组,这与上述研究结论相符。

3.3 有研究证据表明,活动期 UC 患者血清中血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 水平显著高于非活动期 UC 患者及健康者 [12],而 miR-200b 可直接靶向抑制 VEGF 的表达 [13]。在 UC 患者的结肠中,炎性新生血管可激活并募集免疫细胞,促进炎性调节因子分泌,导致疾病迁延不愈,抗 VEGF 抗体可抑制炎性血管生成,缓解 IBD 疾病进程 [14]。本研究发现内镜下活动期组血清 miR-200b 的表达水平显著高于对照组和内镜下愈合期组,提示 UC 活动期肠黏膜损伤严重,VEGF 释放增多,血清 miR-200b 可

能为代偿性增多以抑制 VEGF 的表达,提示 miR-200b 参与了 UC 的发生、发展。

3.4 miR-655 在一些肿瘤细胞中呈低表达,并具有抑制肿瘤的作用,参与了肿瘤细胞的多种生物学过程^[15-17],但其在 UC 中的表达趋势及作用尚未阐明。有研究显示,miR-655 可通过靶向调节 ZEB1 等因子抑制 EMT,抑制肿瘤细胞的增殖与转移,这与 miR-200b 维持肠黏膜完整性的机制类似^[18-19]。也有研究指出 miR-655 可通过直接靶向作用 VEGF 抑制卵巢癌细胞的增殖和侵袭^[20],与 miR-200b 对 VEGF 的抑制作用相似,但该研究未进行血清中相关指标的检测,故其在血清中表达的相互作用尚未可知。本研究结果显示,miR-655 在 UC 患者肠黏膜组织中的表达水平显著低于对照组,但在内镜下活动期组患者血清中的表达却明显高于对照组,与 miR-200b 在 UC 患者肠黏膜组织及血清中的表达趋势相似,提示 miR-655 也可能参与维持肠道上皮的完整性,并通过与 VEGF 作用,反映肠黏膜的损伤愈合情况,但此推论仍需进一步研究证实。

综上所述,miR-200b、miR-655 在 UC 患者血清中呈高表达,而在肠黏膜组织中呈低表达,可反映疾病的发展。但是,本研究样本量较小,且为单中心研究,对于 miR-200b、miR-655 作用的具体机制也尚未能够进行证实,故结论仍需进一步研究加以验证。

参考文献

- [1] 王珊珊,沈磊,罗和生. 微 RNA 在炎症性肠病中的研究和应用进展[J]. 中华消化杂志,2020,40(12):895-898.
- [2] 赖浩,张杰,左红群,等. microRNA 与结直肠癌转移的相关性研究进展[J]. 中国临床新医学,2019,12(11):1168-1171.
- [3] Chen Y, Xiao Y, Ge W, et al. miR-200b inhibits TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition and promotes growth of intestinal epithelial cells[J]. Cell Death Dis, 2013,4(3):e541.
- [4] 潘骅,张弘,黄东风. miR-200b-3p 在溃疡性结肠炎患者血清中的表达及意义[J]. 国际消化病杂志,2019,39(4):299-302.
- [5] Harazono Y, Muramatsu T, Endo H, et al. miR-655 is an EMT-suppressive microRNA targeting ZEB1 and TGFBR2[J]. PLoS One, 2013,8(5):e62757.
- [6] 中华医学会消化病学分会炎症性肠病学组. 炎症性肠病诊断与治疗的共识意见(2012年,广州)[J]. 中华消化杂志,2012,32(12):796-813.
- [7] 张金玲,杜光,李娟. 炎症性肠病免疫发病机制的研究进展[J]. 胃肠病学和肝病学杂志,2019,28(9):1051-1055.
- [8] Vuitton L, Peyrin-Biroulet L, Colombel JF, et al. Defining endoscopic

response and remission in ulcerative colitis clinical trials: an international consensus[J]. Aliment Pharmacol Ther, 2017,45(6):801-813.

- [9] Yang J, Zhou CZ, Zhu R, et al. miR-200b-containing microvesicles attenuate experimental colitis associated intestinal fibrosis by inhibiting epithelial-mesenchymal transition[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2017,32(12):1966-1974.
- [10] Shen Y, Zhou M, Yan J, et al. miR-200b inhibits TNF- α -induced IL-8 secretion and tight junction disruption of intestinal epithelial cells in vitro[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2017,312(2):G123-G132.
- [11] 沈玉洁. miR-200b 对炎症性肠病肠上皮屏障的影响及调控机制[D]. 上海:上海交通大学,2016.
- [12] Aksoy EK, Çetinkaya H, Savaş B, et al. Vascular endothelial growth factor, endostatin levels and clinical features among patients with ulcerative colitis and irritable bowel syndrome and among healthy controls: a cross-sectional analytical study[J]. Sao Paulo Med J, 2018,136(6):543-550.
- [13] Yang MC, You FL, Wang Z, et al. Salvianolic acid B improves the disruption of high glucose-mediated brain microvascular endothelial cells via the ROS/HIF-1 α /VEGF and miR-200b/VEGF signaling pathways[J]. Neurosci Lett, 2016,630:233-240.
- [14] 赵静,王晓蕾. 血管内皮生长因子与炎症性肠病发病机制的关系[J]. 国际消化病杂志,2015,35(5):301-303.
- [15] Zha JF, Chen DX. MiR-655-3p inhibited proliferation and migration of ovarian cancer cells by targeting RAB1A[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019,23(9):3627-3634.
- [16] Wang W, Cao R, Su W, et al. miR-655-3p inhibits cell migration and invasion by targeting pituitary tumor-transforming 1 in non-small cell lung cancer[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2019,83(9):1703-1708.
- [17] Li H, Zhang J, Yang Y, et al. miR-655: a promising regulator with therapeutic potential[J]. Gene, 2020,757:144932.
- [18] Xiong Y, Zu X, Wang L, et al. The VIM-AS1/miR-655/ZEB1 axis modulates bladder cancer cell metastasis by regulating epithelial-mesenchymal transition[J]. Cancer Cell Int, 2021,21(1):233.
- [19] 赵雷,肖二彬,梁景卫,等. miR-655-3p 通过靶向抑制 ZEB1 对头颈鳞状细胞癌细胞增殖及侵袭能力的影响[J]. 河北医学,2020,26(6):921-925.
- [20] Zhao Z, Yang S, Cheng Y, et al. MicroRNA-655 inhibits cell proliferation and invasion in epithelial ovarian cancer by directly targeting vascular endothelial growth factor[J]. Mol Med Rep, 2018,18(2):1878-1884.

[收稿日期 2021-05-14][本文编辑 余军]

本文引用格式

罗文捷,张启芳,张海莲,等. 溃疡性结肠炎患者肠黏膜组织及血清中 miR-200b 和 miR-655 的表达水平及其临床意义研究[J]. 中国临床新医学,2022,15(2):137-140.