

• 临床研究 •

炎症性肠病患者血清中 miR-1246 及 miR-595 的表达及与肠道菌群数的相关性分析

黄璐捷, 宋毓飞

【摘要】目的 探讨炎症性肠病(IBD)患者血清中微小 RNA1246(miR-1246)及微小 RNA595(miR-595)的表达及与肠道菌群数的相关性。**方法** 收集 2019 年 1 月至 2023 年 1 月宁波市医疗中心李惠利医院收治的 IBD 患者 100 例, 设为观察组, 并根据疾病活动性情况分为活动期组(aUC 组)和缓解期组(rUC 组), 各 50 例。同时选取 98 例同时期来本院体检的健康者作为对照组。采用定量逆转录聚合酶链式反应(qRT-PCR)检测 miR-595 及 miR-1246 表达水平, 采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测肿瘤坏死因子(TNF- α)、白介素 22(IL-22)及白介素 6(IL-6)水平。采集入组者新鲜粪便, 使用梯度稀释法对肠道菌群进行培养并检测。分析血清 miR-1246、miR-595, TNF- α 、IL-22、IL-6 与肠道菌群数的相关性。**结果** 相比于对照组, aUC 组血清 miR-1246、miR-595、TNF- α 、IL-22 及 IL-6 水平显著升高(均 $P < 0.05$); 与 rUC 组比较, aUC 组 TNF- α 、IL-22、IL-6、miR-1246 及 miR-595 表达水平显著升高(均 $P < 0.05$)。血清 miR-1246、miR-595、TNF- α 、IL-22 及 IL-6 水平与乳酸杆菌、双歧杆菌菌群数均呈负相关(均 $P < 0.05$), 与肠球菌、大肠杆菌菌群数均呈正相关(均 $P < 0.05$)。**结论** miR-1246 及 miR-595 在 IBD 患者血清中表达明显升高, 且 IBD 发生与肠道菌群数关系密切。

【关键词】 炎症性肠病; 微小 RNA1246; 微小 RNA595; 肠道菌群

doi:10.3969/j.issn.1671-0800.2024.05.005

【中图分类号】 R574 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1671-0800(2024)05-0582-03

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)是一种特发性炎症性肠疾病, 好发于回肠、结肠及直肠, 临床表现多为腹痛腹泻, 甚至血便^[1]。在 IBD 的起病过程中, 肠黏膜免疫系统异常反应引起的炎症起着重要作用, 被认为是多种因素相互作用引起的^[2-3]。有研究表明, 微小 RNA(microRNAs, miRNA)表达与人类 IBD 的发生有密切相关性。IBD 的发生和发展会因其高表达或低表达而产生影响^[4-5]。本研究拟探讨 IBD 患者血清中微小 RNA1246(miR-1246)及微小 RNA595(miR-595)的表达及与肠道菌群数的相关性, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 IBD 患者 100 例(观察组), 为 2019 年 1 月至 2023 年 1 月收治于宁波市医疗中心李惠利医院患者。均符合中华医学会消化病学分会炎症性肠病协作组拟定的 IBD 诊断标准^[6]。剔除标准: (1)

近期有使用抗菌药物治疗或口服肠道益生菌药物治疗者; (2) 有心血管疾病及脑卒中病史者; (3) 发现并正在药物治疗的各类自身免疫性疾病者。本研究获得宁波市医疗中心李惠利医院医学伦理委员会批准(KY2021PJ058)。

根据疾病活动性情况将观察组分为活动期组(aUC 组)及缓解期组(rUC 组), 各 50 例。缓解 rUC 组男 25 例, 女 25 例; 平均年龄(42.6 $\pm$ 2.8)岁。aUC 组男 22 例, 女 18 例; 平均年龄(41.7 $\pm$ 5.6)岁。同时选取 98 例同时期来本院体检的健康者作为对照组, 其中男 48 例, 女 50 例; 平均年龄(48.1 $\pm$ 5.3)岁。

1.2 方法

1.2.1 采集样本 抽取 aUC 组、rUC 组及对照组患者静脉血 5 ml, 吸取上清, -80℃ 保存备用。选取新鲜粪便 10 g, 来自于入组者自然排出, 无菌条件下立即放置于厌氧罐中, 实验室送检。

1.2.2 定量逆转录聚合酶链式反应(qRT-PCR)检测 miR-1246 及 miR-595 表达水平 采用 qRT-PCR 检测 aUC 组、rUC 组及对照组 miR-1246 及 miR-595 表达水平。(1) 血清中总 RNA 用 Trizol 法提取, 将

基金项目: 浙江省基础公益研究计划项目(LGF19H030008)

作者单位: 315040 宁波, 宁波市医疗中心李惠利医院

通信作者: 宋毓飞, Email: 517582445@qq.com

总 RNA 合成 cDNA(赛默飞逆转录试剂盒)。(2)采用 sigma-Aaldrich-定量 PCR 试剂盒检测(RT-qPCR)。反应条件: 95 °C 预变性 5 min, 循环 1 次, 95 °C 变性 30 s, 循环 40 次, 60 °C 退火 30 s, 循环 40 次, 72 °C 延伸 30 s, 循环 40 次。miR-1246 上游引物 5'-ACA-CTCCAGCTGGGAATGGATTTTGG-3', 下游引物 5'-ACTGACTGATGCAATCTCAACTGGTGT-CGTGGA-3'; U6 上游引物 5'-ATTGGAACGATACAGAGAAGATT-3', 下游引物 5'-GGA AC-GCTTCACGAATTTG-3'; miR-595 上游引物 5'-GCGAAGTGTGCCGTGGT-3', 下游引物 5'-CATGTGCGTGTCTGGAGT-3'。(3)相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算。

1.2.3 肠道菌群数检测 按梯度稀释法稀释 3 组新鲜粪便 0.5 g, 需氧培养基培养粪肠球菌和大肠杆菌共计 48 h, 厌氧培养基培养双歧杆菌和乳酸杆菌共计 72 h。以每克粪便湿重中菌落形成单位的对数值表示菌群数结果(log CFU/g)。

1.2.4 血清炎症因子水平检测 采用由武汉吉立德生物科技有限公司生产的试剂盒, 选用酶联免疫吸附法(ELISA)检测 3 组肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白介素 22(IL-22)及白介素 6(IL-6)水平。

1.3 统计方法 数据采用 SPSS 22.0 软件分析, 计量资料均呈正态分布, 以均数 $\pm$ 标准差表示, 采用 F 检验或 LSD- t 检验; 相关性分析采用 Pearson 法。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组血清 miR-1246 及 miR-595 表达水平比较

与对照组比较, aUC 组血清 miR-1246、miR-595 表达水平显著上调($t \geq 5.26$, 均 $P < 0.05$); 与 rUC 组比较, aUC 组患者血清 miR-1246、miR-595 表达水平显著升高($t \geq 4.53$, 均 $P < 0.05$), 见表 1。

2.2 3 组血清炎症因子水平比较 与对照组比较, aUC 组 TNF- α 、IL-22 及 IL-6 水平显著上调($t \geq 9.61$, 均 $P < 0.05$); 与 rUC 组比较, aUC 组 TNF- α 、IL-22 及 IL-6 水平显著升高($t \geq 7.12$, 均 $P < 0.05$), 见表 2。

2.3 3 组肠道细菌数量比较 aUC 组大肠杆菌、肠球菌菌群数量比 rUC 组多, 双歧杆菌、乳酸杆菌菌群数量比 rUC 组少($t \geq 2.29$, 均 $P < 0.05$); aUC 组大

肠杆菌、肠球菌数量比对照组多, 双歧杆菌、乳酸杆菌菌群数量比对照组少($t \geq 3.01$, 均 $P < 0.05$), 见表 3。

2.4 血清 miR-1246 及 miR-595 表达水平与肠道菌群的相关性分析 血清 miR-1246、miR-595 表达水平与乳酸杆菌及双歧杆菌菌群数呈负相关(均 $P < 0.05$), 与肠球菌及大肠杆菌菌群数呈正相关(均 $P < 0.05$), 见表 4。

2.5 血清炎症因子水平与肠道菌群的相关性 血清 TNF- α 、IL-22 及 IL-6 水平与肠球菌及大肠杆菌菌群数呈正相关(均 $P < 0.05$), 与双歧杆菌及乳酸杆菌菌群数呈负相关(均 $P < 0.05$), 见表 5。

3 讨论

有研究表明, 在 IBD 患者中 miR-595 的表达水平与健康对照组相比显著增高^[7]。本研究 aUC 组患者血清中 miR-1246、miR-595 表达水平较 rUC 组及对照组显著升高(均 $P < 0.05$), aUC 组患者中 TNF- α 、

表 1 3 组血清 miR-1246 及 miR-595 表达水平比较

组别	例数	miR-1246	miR-595
对照组	98	0.63 $\pm$ 0.11	0.62 $\pm$ 0.09
rUC 组	50	0.70 $\pm$ 0.12	0.70 $\pm$ 0.10
aUC 组	50	1.61 $\pm$ 0.46	1.31 $\pm$ 0.25
F 值		36.26	42.11
P 值		< 0.05	< 0.05

表 2 3 组血清 TNF- α 、IL-22 及 IL-6 水平比较

组别	例数	TNF- α	IL-22	IL-6
对照组	98	77.28 $\pm$ 9.33	184.91 $\pm$ 33.21	71.57 $\pm$ 4.90
rUC 组	50	92.68 $\pm$ 8.76	230.01 $\pm$ 43.69	81.91 $\pm$ 7.57
aUC 组	50	159.80 $\pm$ 18.18	515.39 $\pm$ 55.42	84.25 $\pm$ 12.72
F 值		245.73	225.09	180.69
P 值		< 0.05	< 0.05	< 0.05

注: TNF- α 为肿瘤坏死因子、IL-22 为白介素 22、IL-6 为白介素 6

表 3 3 组肠道菌群数量比较

组别	例数	乳酸杆菌	双歧杆菌	肠球菌	大肠杆菌
对照组	98	5.16 $\pm$ 0.68	5.34 $\pm$ 0.51	3.96 $\pm$ 0.74	4.48 $\pm$ 0.84
rUC 组	50	5.01 $\pm$ 0.62	4.55 $\pm$ 0.53	4.07 $\pm$ 0.82	4.60 $\pm$ 0.93
aUC 组	50	3.95 $\pm$ 0.51	3.31 $\pm$ 0.42	5.43 $\pm$ 0.98	6.01 $\pm$ 1.14
F 值		24.33	18.51	22.26	21.06
P 值		< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05

表 4 血清 miR-1246 及 miR-595 表达水平与肠道菌群的相关性分析指标

指标	miR-1246		miR-595	
	r 值	P 值	r 值	P 值
乳酸杆菌	-0.205	< 0.05	-0.263	< 0.05
双歧杆菌	-0.224	< 0.05	-0.241	< 0.05
肠球菌	0.239	< 0.05	0.226	< 0.05
大肠杆菌	0.227	< 0.05	0.186	< 0.05

表5 血清 TNF-α、IL-22 及 IL-6 水平与肠道菌群的相关性

指标	TNF-α		IL-22		IL-6	
	r 值	P 值	r 值	P 值	r 值	P 值
乳酸杆菌	- 0.219	< 0.05	- 0.241	< 0.05	- 0.240	< 0.05
双歧杆菌	- 0.194	< 0.05	- 0.251	< 0.05	- 0.226	< 0.05
肠球菌	0.178	< 0.05	0.245	< 0.05	0.237	< 0.05
大肠杆菌	0.224	< 0.05	0.261	< 0.05	0.204	< 0.05

注: TNF-α为肿瘤坏死因子、IL-22 为白介素 22、IL-6 为白介素 6

IL-22 及 IL-6 水平较对照组及 rUC 组显著升高 (均 $P < 0.05$)。类似研究表明, TNF-α和 IL-6 在 IBD 中的水平显著上调^[8]; IBD 患者血清 TNF-α和 IL-35 水平变化显著增加, 且具有重要的临床意义^[9]。本研究结果显示, 与对照组及 rUC 组相比, aUC 组的大肠杆菌、肠球菌菌群数明显升高, 双歧杆菌、乳酸杆菌菌群数明显降低, 这与文献[10]报道结果一致。

有研究显示, IBD 患者的肠道菌群数分布跟患者的血清 TNF-α及 IL-6 水平有紧密的联系^[11]。张艳丽等^[12]研究显示, 炎症因子在 IBD 患者肠道菌群变化中起着关联性作用。结合本研究的结果提示, IBD 患者的大肠杆菌及肠球菌菌群数与乳酸杆菌、双歧杆菌菌群数均呈负相关, 与血清 miR-1246、miR-595、TNF-α、IL-22 及 IL-6 水平均呈正相关。

综上所述, miR-1246 及 miR-595 在 IBD 患者血清中表达明显升高, 且 IBD 发生与肠道菌群数关系密切。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明 黄璐捷: 实验操作、论文撰写、数据整理、统计学分析; 宋毓飞: 研究指导、论文修改、经费支持

参 考 文 献

[1] 杨文宏, 王维维. 肠道菌群及炎症因子联合检测在炎症性肠病患

者中的诊断价值研究[J]. 中国实验诊断学, 2020, 24(1): 31-34.
[2] 兰平, 吴锦杰, 何真. 肠道微生态与炎症性肠病[J]. 中华炎症肠病杂志(中英文), 2020, 4(1): 2-6.
[3] 王灿, 王俊, 张心怡, 等. 粪菌移植在炎症性肠病中的价值及其存在的问题[J]. 临床与病理杂志, 2020, 40(5): 1315-1319.
[4] 王玥梅, 吴巧凤. MicroRNA 与炎症性肠病[J]. 实用医学杂志, 2020, 36(1): 38-43.
[5] 张丽, 陈洪, 王玉连. 人类炎症性肠病的 microRNA 表达分析研究的 meta 分析[J]. 现代医学, 2016, 44(3): 306-315.
[6] 中华医学会消化病学分会炎症性肠病协作组. 对我国炎症性肠病诊断治疗规范的共识意见[J]. 胃肠病学, 2007, 12(8): 488-495.
[7] 康颖, 路又可, 王震凯, 等. MicroRNA-595 在炎症性肠病中的表达及其意义[J]. 胃肠病学, 2016, 21(8): 465-469.
[8] 唐齐林, 周国华, 王为. TNF-α、IL-6 在炎症性肠病发病机制中的研究进展[J]. 医学综述, 2014, 20(7): 1174-1176.
[9] 张欣, 李泓, 杨嫣华, 等. 炎症性肠病患者血清 TNF-α、IL-35 水平变化及其临床意义[J]. 内科急危重症杂志, 2017, 23(5): 400-402.
[10] 叶雅丽, 闫李侠. 肠道菌群分析及粪便炎症标志物检测在炎症性肠病活动度评估中的作用[J]. 中国微生态学杂志, 2018, 30(3): 312-316, 326.
[11] 蔚晓霞, 刘占举, 胡艺, 等. 炎症性肠病患者的肠道菌群分布与血清 TNF-α与 IL-6 水平的相关性[J]. 现代生物医学进展, 2017, 17(16): 3076-3078, 3102.
[12] 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.

收稿日期: 2024-01-12
(本文编辑: 钟美春)