

DOI: 10.16781/j.0258-879x.2018.07.0740

· 专题报道 ·

## 不同严重程度哮喘患者血清外泌体中微 RNA-21 的表达水平及其诊断价值

王湘云<sup>1△</sup>, 陈乾<sup>2△</sup>, 孙亚红<sup>3</sup>, 白冲<sup>1</sup>, 商艳<sup>1,3\*</sup>

1. 海军军医大学(第二军医大学)长海医院呼吸及危重症医学科, 上海 200433

2. 海军军医大学(第二军医大学)基础医学院组织胚胎学教研室, 上海 200433

3. 浙江省海宁市人民医院呼吸科, 海宁 314400

**[摘要]** **目的** 研究血清外泌体中微 RNA-21 (miR-21) 表达水平及其对哮喘严重程度的诊断效能。**方法** 以 82 例未经治疗的哮喘患者和 80 名健康人作为研究对象。将哮喘患者根据病情严重程度分为 4 组: 间歇状态 20 例、轻度持续 22 例、中度持续 22 例、重度持续 18 例。用 qPCR 检测各组血清外泌体中 miR-21 的表达水平, 并进行比较。用 Spearman 相关分析研究血清外泌体中 miR-21 表达水平与哮喘严重程度的相关性。通过受试者工作特征 (ROC) 曲线评价外泌体中 miR-21 表达水平对哮喘严重程度的诊断效能。**结果** 间歇状态、轻度持续、中度持续和重度持续的哮喘患者血清外泌体中 miR-21 表达水平均高于健康对照组, 差异均有统计学意义 ( $P$  均  $< 0.01$ ), 且哮喘患者各组间 miR-21 表达水平差异也有统计学意义 ( $P$  均  $< 0.01$ )。Spearman 相关分析结果显示, 血清外泌体中 miR-21 的相对表达量与哮喘严重程度呈正相关 ( $r=0.974$ ,  $P=0.0167$ )。血清外泌体中 miR-21 对间歇状态、轻度持续、中度持续、重度持续哮喘患者诊断效能的 ROC 曲线下面积分别为 0.657、0.769、0.847、0.916 ( $P$  均  $< 0.01$ )。**结论** 血清外泌体中 miR-21 表达水平对治疗前哮喘严重程度有较高的诊断效能, 有望成为判断哮喘严重程度的一种无创性诊断标志物。

**[关键词]** 外泌体; 哮喘; 微 RNA-21; 诊断标志物; 血清**[中图分类号]** R 562.25**[文献标志码]** A**[文章编号]** 0258-879X(2018)07-0740-05

### Expression of microRNA-21 in serum exosomes of patients with different severities of asthma and its diagnostic value

WANG Xiang-yun<sup>1△</sup>, CHEN Qian<sup>2△</sup>, SUN Ya-hong<sup>3</sup>, BAI Chong<sup>1</sup>, SHANG Yan<sup>1,3\*</sup>

1. Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Changhai Hospital, Navy Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

2. Department of Histology and Embryology, College of Basic Medical Sciences, Navy Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

3. Department of Respiratory Medicine, People's Hospital of Haining, Haining 314400, Zhejiang, China

**[Abstract]** **Objective** To determine the expression level of microRNA-21 (miR-21) in serum exosomes of patients with different severities of asthma, and to explore the diagnostic value. **Methods** A total of 82 patients with asthma who did not received any treatment and 80 healthy control volunteers were enrolled in this study. The asthma cases were divided into four groups according to the severity of asthma, including intermittent group ( $n=20$ ), mild sustained group ( $n=22$ ), moderate sustained group ( $n=22$ ), and severe sustained group ( $n=18$ ). Expression levels of miR-21 were determined using qPCR and the differences were compared among the five groups. Spearman correlation analysis was used to analyze the correlation between miR-21 expression level and severity of asthma. The receiver operating characteristic (ROC) curve was used to evaluate the diagnosis performance of miR-21 expression level in serum exosomes for different severities of asthma. **Results** The expression levels of miR-21 were significantly higher in the intermittent, mild sustained, moderate sustained and severe sustained groups than that in the healthy control group (all  $P < 0.01$ ). The difference of miR-21 expression level was statistically significant between the intermittent, mild sustained, moderate sustained and severe sustained groups

**[收稿日期]** 2018-06-06 **[接受日期]** 2018-07-18**[基金项目]** 国家自然科学基金(81570020), 浦东新区科技发展基金(PKJ2016-Y49), 浙江省公益技术应用研究计划项目(2016C33216), 教育部留学回国人员科研启动基金。Supported by National Natural Science Foundation of China (81570020), Science and Technology Development Fund of Pudong New District (PKJ2016-Y49), Public Welfare Technology Application Research Project of Zhejiang Province (2016C33216), and Scientific Research Foundation of Ministry of Education for the Returned Overseas Chinese Scholars.**[作者简介]** 王湘云, 硕士, 主治医师。E-mail: wangxiangyun1981@sina.com; 陈乾, 博士生。E-mail: 15821636195@163.com

△共同第一作者(Co-frist authors).

\*通信作者(Corresponding author). Tel: 021-31161319, E-mail: shangyan751200@163.com

(all  $P < 0.01$ ). Spearman correlation analysis showed that the relative expression level of miR-21 in serum exosomes was positively correlated with the severity of asthma ( $r = 0.974$ ,  $P = 0.0167$ ). The areas under ROC curve of exosome miR-21 for diagnosing intermittent, mild sustained, moderate sustained and severe sustained asthma were 0.657, 0.769, 0.847 and 0.916, respectively (all  $P < 0.01$ ). **Conclusion** The expression level of miR-21 in serum exosomes is effective in diagnosing different severities of asthma, and miR-21 in serum exosomes may be a new non-invasive biomarkers.

**[Key words]** exosomes; asthma; microRNA-21; diagnostic biomarker; serum

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2018, 39(7): 740-744]

哮喘是一种以气道高反应性为特征, 由多种细胞因子介导的慢性气道炎症性疾病, 其控制率较低。有学者对 4 805 例来自亚洲 (包括中国在内的 12 个国家和地区) 多个城市哮喘患者的哮喘控制状态进行评估, 结果显示控制率仅为 3%<sup>[1]</sup>。2008 年中国哮喘联盟调查中国哮喘患者的控制率为 28.7%<sup>[2]</sup>。为了合理用药, 全球哮喘防治倡议 (Global Initiative for Asthma, GINA) 和哮喘研究人员根据患者的临床症状, 以及第 1 秒用力呼气容积 (forced expiratory volume in one second, FEV<sub>1</sub>) 或最大呼气流量 (peak expiratory flow, PEF) 将患者治疗前的病情严重程度分为 4 个等级: 间歇状态 (第 1 级)、轻度持续 (第 2 级)、中度持续 (第 3 级) 和重度持续 (第 4 级)<sup>[3]</sup>。临床上根据哮喘严重程度确定药物的使用剂量和频率, 因此准确判断哮喘等级是临床治疗该病的关键。但是有文献报道, 仅根据临床症状和 FEV<sub>1</sub> 对哮喘患者进行分级, 有 35% 以上患者的病情被低估, 因而延误了治疗<sup>[4]</sup>。如何避免临床诊治过程中低估患者病情的情况, 正确使用升降级治疗, 以及更准确地评估哮喘病情的严重程度, 是需要研究的重要课题。

外泌体是一种由细胞分泌的直径为 30~200 nm 的含多种生物活性蛋白质与核酸成分的囊泡<sup>[5]</sup>。近年来, 研究发现外泌体能够反映其来源细胞的病理状态, 是一种极具潜力的新型诊断标志物<sup>[6]</sup>。有研究显示, 外泌体能够参与机体免疫应答, 参与包括哮喘在内的各种疾病过程<sup>[7]</sup>。随着研究的逐步深入, 微 RNA (microRNA, miRNA) 被证明参与了气道变应性炎症的发病过程<sup>[8-9]</sup>。研究表明, 从哮喘患者支气管肺泡灌洗液中分离得到的外泌体中包含的 miRNA 表型和功能与健康人有显著差异<sup>[10]</sup>。微 RNA-21 (microRNA-21, miR-21) 在哮喘患者的支气管上皮细胞中表达增加<sup>[11]</sup>, 在难治性哮喘患者血浆中的表达显著高于完

全控制性哮喘患者 ( $P < 0.001$ )<sup>[12]</sup>, 说明 miR-21 的表达水平可能与哮喘的严重程度有关, 并且可能参与了哮喘发生过程。因此, 本研究通过对治疗前不同严重程度 (4 个等级) 哮喘患者的血清外泌体中 miR-21 水平进行检测, 以评价其对哮喘的诊断效能, 并探寻血清外泌体中 miR-21 水平与哮喘严重程度的关系。

## 1 资料和方法

1.1 一般资料 选取 2016 年 4 月至 2017 年 4 月海军军医大学 (第二军医大学) 长海医院收治的治疗前哮喘患者 82 例, 根据支气管哮喘防治指南<sup>[3]</sup>、GINA (2011)<sup>[4]</sup> 制定的病情严重程度分级标准将所有患者分成 4 组: 间歇状态 20 例, FEV<sub>1</sub> 占预计值百分比 (forced expiratory volume in one second as percentage of predicted, FEV<sub>1</sub>%Pred)  $\geq 80\%$ , PEF 变异率  $< 20\%$ ; 轻度持续 22 例, FEV<sub>1</sub>%Pred  $\geq 80\%$ , PEF 变异率为 20%~30%; 中度持续 22 例, FEV<sub>1</sub>%Pred 为 60%~79%, PEF 变异率  $> 30\%$ ; 重度持续 18 例, FEV<sub>1</sub>%Pred  $< 60\%$ , PEF 变异率  $> 30\%$ 。选取同期海军军医大学 (第二军医大学) 长海医院 80 名健康体检的健康人作为健康对照 (FEV<sub>1</sub>%Pred  $\geq 83\%$ , PEF 变异率  $< 20\%$ )。本研究通过海军军医大学 (第二军医大学) 长海医院伦理委员会批准, 所有研究对象均知情同意并签署知情同意书。

1.2 标本采集 用无添加剂真空采血管采集各组患者外周静脉血 2 mL, 静置 15 min, 4 °C 1 500 × g 离心 10 min 后吸取上清液, 将上清过 0.22 μm 一次性滤膜, 收集血清标本于 -80 °C 保存备用。

1.3 外泌体的提取及鉴定 应用血清/血浆外泌体 RNA 分离试剂盒 (exoRNeasy Serum/Plasma Maxi Kit; 货号: 77064, 德国 Qiagen 公司) 提取外泌体, 严格依照试剂盒使用说明进行操作。采用

qNano ATS 粒度分析仪(加拿大 ATS 公司)检测外泌体的粒径、分布和浓度,根据仪器说明书的标准流程进行检测。

1.4 外泌体中 miR-21 水平的检测 应用血清/血浆外泌体 RNA 分离试剂盒(exoRNeasy Serum/Plasma Maxi Kit; 货号: 77064, 德国 Qiagen 公司)并严格依照使用说明提取外泌体中的 RNA。应用去基因组高效率反转录试剂盒(ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover; 货号: FSQ-301, 日本 Toyobo 公司)对提取的外泌体 RNA 进行反转录,获得 cDNA。采用 SYBR 法,以  $\beta$ -actin 为内参进行 qPCR。引物序列: miR-21 正义 5' -AAC CCG UAG AUC UUG GAU CCU G-3', 反义 5' -CAA GAU CAU CUA CGG UUU GGG U-3';  $\beta$ -actin 正义 5' -CTC CAT CCT GGC CTC GCT GT-3', 反义 5' -GCT GTC ACC TTC ACC GTT CC-3'。应用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算 miR-21 的相对表达量。

1.5 肺功能检测 采用 MS-PFT 型肺功能测试仪(德国耶格公司)测定并记录所有研究对象的肺功能,所得主要参数为 FEV<sub>1</sub>%Pred。

1.6 统计学处理 应用 SPSS 22.0 软件对数据进行分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。血清外泌体中 miR-21 表达水平与哮喘严重程度相关性分析采用 Spearman 相关分析。通过受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线评价外泌体中 miR-21 表达水平对哮喘严重程度的诊断效能。检验水准( $\alpha$ )为 0.05。

## 2 结果

2.1 研究对象一般资料 健康对照组年龄(41.00±3.25)岁,男 48 例、女 32 例。间歇状态、轻度持续、中度持续、重度持续哮喘患者的年龄分别为(42.15±2.86)、(42.31±2.13)、(41.92±3.67)、(42.23±2.91)岁,男女患者分别为 14 例和 6 例、14 例和 8 例、15 和 7 例、10 例和 8 例。各组年龄、性别、吸烟史、家族史及过敏性鼻炎病史的差异均无统计学意义( $P$ 均>0.05)。见表 1。

表 1 各组研究对象一般资料

Tab 1 Characteristics of subjects in each group

Characteristic	Healthy control N=80	Intermittent N=20	Mild sustained N=22	Moderate sustained N=22	Severe sustained N=18
Age (year), $\bar{x} \pm s$	41.00±3.25	42.15±2.86	42.31±2.13	41.92±3.67	42.23±2.91
Gender <i>n</i> (%)					
Male	48 (60.00)	14 (70.00)	14 (63.64)	15 (68.18)	10 (55.56)
Female	32 (40.00)	6 (30.00)	8 (36.36)	7 (31.82)	8 (44.44)
Body mass index (kg·m <sup>-2</sup> ), $\bar{x} \pm s$	24.82±2.73	25.22±2.78	24.32±2.62	25.02±2.80	24.92±2.59
Smoke history <i>n</i> (%)	45 (56.25)	12 (60.00)	13 (59.09)	12 (54.54)	11 (61.11)
Family medical history <i>n</i> (%)	23 (28.75)	6 (30.00)	7 (31.82)	7 (31.82)	6 (33.33)
Allergic rhinitis <i>n</i> (%)	31 (38.75)	8 (40.00)	10 (45.45)	9 (40.91)	8 (44.44)

2.2 外泌体鉴定 采用 qNano ATS 粒度分析仪对单一粒子的粒径、分布和浓度进行分析并计数,发现抽提获得的囊泡粒径主要分布在 70~110 nm,符合外泌体粒径范围(30~200 nm<sup>[5]</sup>),见图 1A。电子显微镜下可见抽提获得的囊泡大小较均匀,多数粒径略小于 100 nm,与粒度分析仪测量结果相似,并呈现外泌体典型的茶托形特征,见图 1B。

2.3 各组血清外泌体中 miR-21 水平比较 治疗前不同严重程度(间歇状态、轻度持续、中度持续和重度持续)哮喘患者的血清外泌体中 miR-21 表达水平均高于健康对照组,且差异均有统计学意

义( $P$ 均<0.01),哮喘患者各组间血清外泌体中 miR-21 水平差异也有统计学意义( $P$ 均<0.01),见图 2。Spearman 相关分析结果显示,血清外泌体中 miR-21 的相对表达量与哮喘严重程度呈正相关( $r=0.974, P=0.0167$ )。

2.4 血清外泌体中 miR-21 诊断效能的评估 血清外泌体中 miR-21 对间歇状态、轻度持续、中度持续、重度持续哮喘患者诊断效能的 ROC 曲线下面积分别为 0.657、0.769、0.847、0.916 ( $P$ 均<0.01,图 3)。说明哮喘患者的病情越严重,血清外泌体中 miR-21 水平对其诊断的特异度越高。

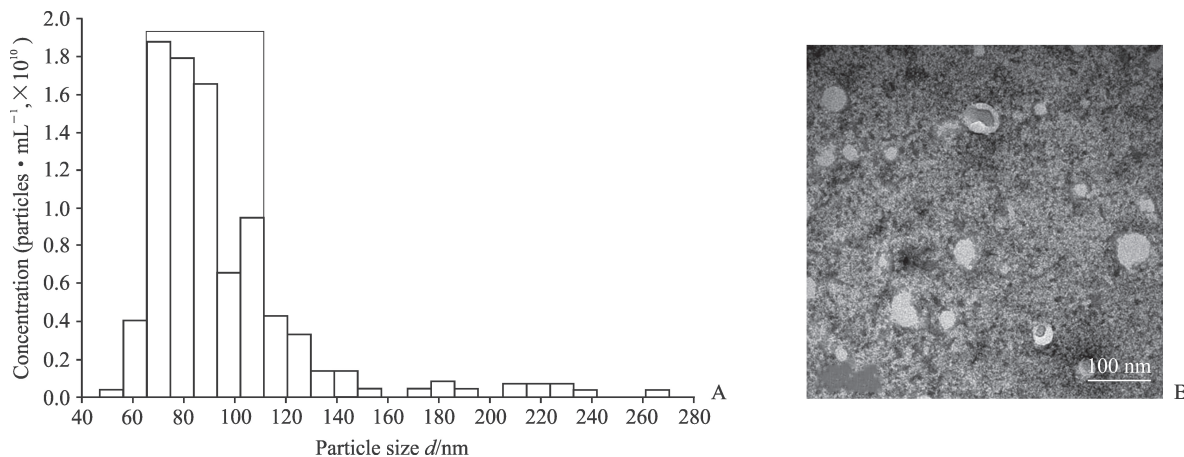


图 1 外泌体鉴定结果

Fig 1 Characterization of isolated exosomes

A: Particle size distribution of exosomes (the diameter was ranged in the rectangular box); B: Exosomes under electron microscope

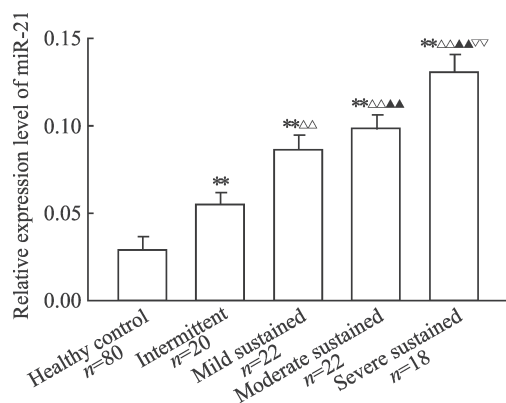


图 2 各组血清外泌体中 miR-21 表达水平

Fig 2 Expression levels of miR-21 of serum exosomes in each group

\*\* $P < 0.01$  vs healthy control group;  $\triangle\triangle P < 0.01$  vs intermittent group;  $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$  vs mild sustained group;  $\nabla\nabla P < 0.01$  vs moderate sustained group.  $\bar{x} \pm s$

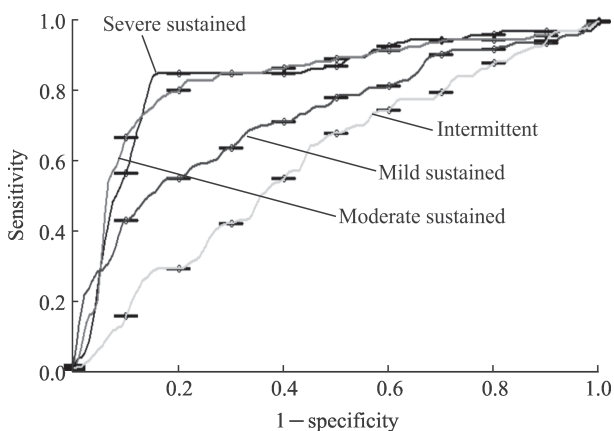


图 3 血清外泌体中 miR-21 诊断不同严重程度哮喘的 ROC 曲线

Fig 3 ROC curve of miR-21 in serum exosomes for diagnosing different severities of asthma

ROC: Receiver operating characteristic

### 3 讨论

近年来, 我国哮喘的发病率逐年上升, 已经成为一种严重威胁公众健康的常见多发呼吸系统疾病。外泌体由免疫细胞和非免疫细胞分泌, 可运输和传递大量的蛋白质、脂质和核酸, 参与细胞间通讯, 还能修饰细胞和器官功能。其组成因细胞起源和细胞的生理状态而不同, 通过测定外泌体中核酸种类和数量可反映该外泌体来源器官、组织、细胞的病变情况。因此, 外泌体越来越被认同为有望成为疾病新的生物标志物。外泌体在哮喘发病过程中的作用也日益引起重视。最近有学者研究显示, 在过敏原刺激之前和之后, 可以在过敏性哮喘患者的诱导痰中检测到含 RNA 的外泌体<sup>[13]</sup>, 因此, 生物体液中的外泌体特异性 RNA 和免疫相关蛋白可能可以作为哮喘的生物标志物, 并可以由此发展新型的无创性诊断模式。作为一种非编码单链小分子 RNA, miR-21 可通过抑制 *IL12p35* 基因表达, 使 IL-12 水平下降进而诱发哮喘发作, 这可能是哮喘的发生机制之一<sup>[14]</sup>, 因而血清外泌体中 miR-21 可能具有一定的临床诊断价值。

本研究结果显示, 血清外泌体中 miR-21 对哮喘的严重程度有较高的诊断效能, 哮喘病情越严重, miR-21 的表达水平越高。因此, 血清外泌体中 miR-21 水平作为一种无创性检测指标, 有望成为哮喘诊断的新型分子标志物以及对哮喘病情严重程度进行准确分级的更为合理的评估标准, 并有望用于指导临床治疗哮喘时药物使用的剂量和频率。

[参考文献]

[1] LAI C K, KO F W, BHOME A, DE GUIA T S, WONG G W, ZAINUDIN B M, et al. Relationship between asthma control status, the Asthma Control Test™ and urgent health-care utilization in Asia[J]. *Respirology*, 2011, 16: 688-697.

[2] 苏楠,吴昌归,林江涛,袁雅冬,周新,殷凯生,等. 全国城区哮喘患者控制现状和疾病认知程度的调查[C]//中华医学会第六届全国哮喘学术会议暨中国哮喘联盟第二次大会论文集, 2008.

[3] 中华医学会呼吸病学分会哮喘学组. 支气管哮喘防治指南[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2008, 31: 177-185.

[4] LIARD R, LEYNAERT B, ZUREIK M, BEGUIN F X, NEUKIRCH F. Using Global Initiative for Asthma guidelines to assess asthma severity in populations[J]. *Eur Respir J*, 2000, 16: 615-620.

[5] DOLDÁN X, FAGÚNDEZ I, CAYOTA A, LAÍZ J, TOSAR J P. Electrochemical sandwich immunosensor for determination of exosomes based on surface marker-mediated signal amplification[J]. *Anal Chem*, 2016, 88: 10466-10473.

[6] HARRIS D A, PATEL S H, GUCEK M, HENDRIX A, WESTBROEK W, TARASKA J W. Exosomes released from breast cancer carcinomas stimulate cell movement[J/OL]. *PLoS One*, 2015, 10: e117495. doi: 10.1371/journal.pone.0117495.

[7] 白丰玺,潘珏. 外泌体与肺疾病的研究现状[J]. *国际呼吸杂志*, 2015, 5: 629-632.

[8] MUNITZ A, KARO-ATAR D, FOSTER P S. Asthma diagnosis: microRNAs to the rescue[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2016, 137: 1447-1448.

[9] ROŻAŁSKI M, RUDNICKA L, SAMOCHOCKI Z. MiRNA in atopic dermatitis[J]. *Postepy Dermatol Alergol*, 2016, 33: 157-162.

[10] LEVÄNEN B, BHAKTA N R, TORREGROSA PAREDES P, BARBEAU R, HILTBRUNNER S, POLLACK J L, et al. Altered microRNA profiles in bronchoalveolar lavage fluid exosomes in asthmatic patients [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2013, 131: 894-903.

[11] WU X B, WANG M Y, ZHU H Y, TANG S Q, YOU Y D, XIE Y Q. Overexpression of microRNA-21 and microRNA-126 in the patients of bronchial asthma[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2014, 7: 1307-1312.

[12] 邬超,陈丽萍,王慧琴,王文艺,杨晓红. 难治性哮喘患者血浆中 miR-21 和 miR-126 的表达及意义[J]. *国际呼吸杂志*, 2017, 37: 886-889.

[13] SÁNCHEZ-VIDAURRE S, ELDH M, LARSEN P, DAHAM K, MARTINEZ-BRAVO M J, DAHLÉN S E, et al. RNA-containing exosomes in induced sputum of asthmatic patients[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2017, 140: 1459-1461.

[14] LU T X, MUNITZ A, ROTHENBERG M E. MicroRNA-21 is up-regulated in allergic airway inflammation and regulates IL-12p35 expression[J]. *J Immunol*, 2009, 182: 4994-5002.

[本文编辑] 杨亚红