

艾滋病热毒蕴结证的 miRNA 差异表达研究

姜 岑¹, 曹春辉², 李白雪¹, 冯全生^{1△}

(1. 成都中医药大学基础医学院 610075; 2. 重庆市中医院 400011)

[摘要] **目的** 研究艾滋病(AIDS)热毒蕴结证患者与健康对照组间 miRNA 表达差异。**方法** 运用 Agilent miRNA 芯片对 AIDS 期热毒蕴结证患者与健康对照组血液标本进行 miRNA 检测,采用 SAS 等系统对组间差异 miRNA 进行筛选,并对相应的 miRNA 进行靶基因预测和靶基因功能显著性分析。**结果** 热毒蕴结证组与健康对照组比较,共筛选出表达有显著性差异且倍数差异(FC)大于 2 的 miRNA 100 条,其中 64 条上调,36 条下调。差异表达 miRNAs 功能涉及 T 细胞活化中的 IL-21 受体的作用、C 反应蛋白、免疫效应的过程中的正调控等。**结论** AIDS 热毒蕴结证患者与健康对照组间存在差异 miRNA 表达,其证候生物学基础可能与 T 细胞活化中的 IL-21 受体的作用等相关。

[关键词] 获得性免疫缺陷综合征;热毒蕴结证;miRNA;靶基因**[中图分类号]** R512.91**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)17-2365-02

Research of miRNA differential expression of AIDS with the syndrome of heat-toxic accumulation

Jiang Cen¹, Cao Chunhui², Li Baixue¹, Feng Quansheng^{1△}

(1. School of Basic Medicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu, Sichuan 610075, China;

2. Chongqing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Chongqing 400011, China)

[Abstract] **Objective** The Study the difference of miRNA expression of AIDS patients with toxic heat accumulation syndrome with healthy control group. **Methods** This research used Agilent miRNA chip to test the miRNA of blood preparation, and used SAS system to screen the differences between groups, then analyzed the significance function of target gene. **Results** Compare the heat-toxic accumulation group and the healthy control group, 100 cases of obvious expression difference and of which the difference was 2 times and greater were screened out (in which 64 cases showed up-regulation and 36 showed down-regulation). Differentially expressed miRNAs function involves the role of IL-21 receptor in T cell activation, C reactive protein, and the positive regulation of the immune response. **Conclusion** AIDS toxic heat accumulation syndrome patients and healthy control groups exist differences in miRNA expression profiles, the biological basis of syndrome maybe related to T cell activation and IL-21 receptor.

[Key words] AIDS; heat-toxic accumulation; miRNA; target gene

艾滋病(AIDS)是感染人类免疫缺陷病毒(HIV)引起的一种严重威胁人类健康的致死性传染病,目前人类还没有完全治愈此病的方法,我国医学在防治 AIDS 方面具有一定的优势与特色。随着中医药防治 AIDS 临床及科研工作的不断深入,很多亟待解决的问题已逐渐显现出来。提升中医药防治 AIDS 水平,辨证是关键,所以建立客观化、标准化的艾滋病中医证候诊疗体系具有重要意义。miRNA 是非编码小分子 RNA,在基因转录后过程中起重要调节作用^[1]。本文引入基因芯片技术研究 AIDS 中医典型证候,筛选 AIDS 期热毒蕴结证患者差异表达的 miRNA,本文为进一步探讨 AIDS 中医证候的生物学基础,为 AIDS 的中医证候研究提供客观依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本研究的病例来自于临床上符合纳入标准和排除标准的 AIDS 期患者,本研究纳入热毒蕴结证患者 25 例,健康对照受试者 8 例。其中,西医诊断标准参考 2011 版《艾滋病诊疗指南》,中医诊断标准参考 2004 版《中医药治疗艾滋病临床技术方案(试行)》。纳入标准:(1)符合西医诊断标准和中医辨证标准者;(2)年龄大于 18 岁且小于 65 岁;(3)自愿参加本研究,签署知情同意书者。符合以上所有条件者,才能纳入本研究。排除标准:(1)孕妇及哺乳期患者;(2)合并恶性肿瘤患者;(3)神志不清、痴呆、各种精神病患者及家属不愿意合作者;(4)合并乙型、丙型病毒性肝炎等慢性肝病患者;(5)原发性

免疫缺陷,激素化疗等引起的继发性免疫缺陷,血液病,其他原因引起的中枢神经系统疾病;非感染 HIV 所患的脏器严重疾病;(6)研究者认为不适合纳入研究的患者,以上有一项是“是”者,排除观察。

1.2 方法 根据诊断标准、纳入标准、排除标准纳入符合要求的病例。其中 AIDS 热毒蕴结证组 25 例、健康对照组 8 例。采集 AIDS 患者和健康对照组血液标本,−80 °C 低温保存,干冰密封保存,送往生物芯片公司,进行 Agilent 基因芯片的检测,并采用 SAS 差异性分析系统筛选差异表达 miRNA 的筛选,并对差异性 miRNA 进行靶基因功能显著性分析。

1.3 统计学处理 采用 SAS 系统筛选两组间的差异表达 miRNA,用 Targetscan 等数据库进行差异表达 miRNA 靶基因预测,并在 SAS 系统中进行靶基因功能显著性分析(GO 分析)。

2 结果

2.1 热毒蕴结证组与健康对照组差异 miRNA 热毒蕴结证组与健康对照组比较,共筛选出表达有显著性差异($P < 0.05$)且倍数差异(fold chang, FC)大于 2 的 miRNA 100 条,其中 64 条上调,36 条下调,见图 1。

2.2 AIDS 期热毒蕴结证组差异 miRNA 分析 将筛选出有显著性差异 miRNA 进行靶基因预测,再用 SAS 系统对差异表达 miRNA 进行功能显著性分析(GO 分析)。AIDS 期热毒蕴

结证组的差异表达显著性 miRNAs 靶基因预测,共筛选出靶基因 5 536 条,其中上调 miRNA 共筛选出 3 620 条靶基因,下调 miRNA 共筛选出 1 916 条靶基因。然后将筛选出的靶基因进行功能显著性分析($P < 0.05$),结果发现这些基因功能主要涉及:T 细胞活化 IL-21 受体的作用,C 反应蛋白(CRP),免疫效应过程中的正调控,氧化应激,血小板,对病毒的防御反应,干细胞分裂,分解代谢过程,水解酶活性,RNA 聚合酶,补体激活,脂质运输,信号传导,T 细胞介导的细胞毒性等,见图 2。

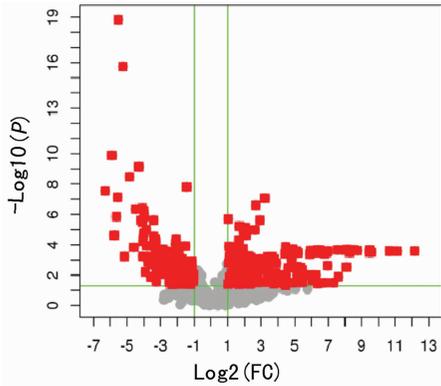


图 1 两组差异表达的 miRNA 火山图

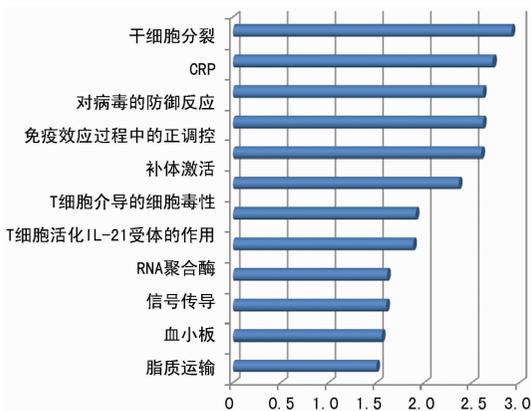


图 2 两组差异 miRNA GO 分析(主要)

3 讨 论

本研究选择外周血浆中的 miRNA,主要原因是 miRNA 和免疫系统关系十分密切,大量研究表明:(1)miRNA 广泛参与免疫细胞的增殖、分化、免疫应答和免疫性疾病调控,同时与病毒感染关系密切^[2-3];(2)AIDS 实质上是免疫系统疾病,其感染人体及致病与免疫系统密切相关;(3)前期研究表明,如 Pegtel 等^[4]发现外周血中的 miRNA 可能是细胞主动合成,而非靶细胞凋亡后被动释放出来;Chen 等^[5]发现哺乳动物外周血清、血浆中存在含量和理化性质稳定的 miRNA,即提取外周血中的 miRNA 操作简便可靠。故本研究选择外周血浆中的 miRNA 具有理论和实践基础。

热毒蕴结证筛选出的差异 miRNA 靶基因功能主要有以下方面:氧化应激,血小板,CRP,T 细胞活化 IL-21 受体的作用,免疫效应的过程中的正调控,信号传导、脂代谢等。

CRP 是肝脏合成的一种急性时相反应蛋白。在创伤、感染、炎症反应等情况下,血浆 CRP 水平迅速升高。余丰等^[6]研究了 CRP 水平与 HIV/AIDS 患者抗病毒治疗及预后的关系,CRP 在 HIV/AIDS 患者中高表达,与疾病进展呈正相关。在 HIV/AIDS 病程中,血小板减少主要与 HIV 对骨髓巨细胞的损害、抗血小板生成抑制、抗体形成等有关^[7],临床上,可出现

迫血妄行,发斑发疹,苔黄脉数等表现,与血小板减少症状相符。众多研究证实,HIV 感染者体内处于慢性氧化应激状态,表现为 HIV 的复制能力增强,免疫细胞的增生减少,甚至丧失免疫功能。同时,HIV 可诱导细胞凋亡与对药物毒性的敏感性增加^[8]。韩晓群等^[9]发现 HIV/AIDS 患者机体氧化还原态越偏向氧化方向,标志着 AIDS 患者病情的进展。IL-21 是近来发现的具有免疫调节作用的细胞因子,研究表明^[10],HIV 感染中,IL-21 可增强 CD8⁺T 细胞上粒溶素和穿孔素表达,增强 NK 细胞的毒性和抗体依赖细胞介导的细胞毒性作用,其可增加它们抗病毒能力,且不会引起免疫细胞的活化。

研究发现,在 AIDS 期热毒蕴结证患者筛选出的差异 miRNA 中,Has-miR-126 通过参与体内脂代谢的调控,影响动脉粥样硬化的发展进程^[11],其通过调控 PI3K/Akt 通路来调节 T 淋巴细胞的免疫活性和功能^[12]。Has-Let-7f 能抑制记忆 T 细胞中 IL-23 的表达,但 Has-Let-7f 在记忆性 T 细胞的内源性表达和幼稚 T 细胞中相比显著偏低^[13]。

综上所述,AIDS 期热毒蕴结证患者与健康人的体内存在着差异表达的 miRNA 谱,其证候生物学基础可能是与 T 细胞活化中的 IL-21 受体的作用,CRP、血小板、氧化应激等相关。

参考文献

- [1] Bartel DP. MicroRNAs:genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell,2004,116(2):281-297.
- [2] 朱清源,戈宝学. microRNA 与免疫调控[J]. 现代免疫学,2011,31(2):89-92.
- [3] 董丽,钟翔,张莉莉,等. microRNA 对免疫细胞的调节作用[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2014,30(1):93-96.
- [4] Pegtel DM, Van de garde MD, middeldorp JM. viral miRNAs exploiting the endosomal-exosomal pathway for intercellular cross-talk and immune evasion [J]. Biochim Biophys Acta,2011,1809(11/12):715-721.
- [5] Chen X, Ba Y, Ma L, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases[J]. Cell Res,2008,18(10):997-1006.
- [6] 余丰,梁飞立,何艳英,等. C-反应蛋白水平与 HIV/AIDS 患者抗病毒治疗预后关系的研究[J]. 中华医院感染学杂志,2013,23(19):4616-4618.
- [7] Rheingold SR, Burnham JM, Rutstein R, et al. HIV infection presenting as severe autoimmune hemolytic anemia with disseminated intravascular coagulation in an infant [J]. J Pediatr Hematol Oncol,2004,26(1):9-12.
- [8] 田晓华. 氧化应激与 HIV 疾病[J]. 解放军预防医学杂志,1997,15(3):74-77.
- [9] 韩晓群,吴建红,伍仕敏,等. HIV/AIDS 患者机体氧化还原态与 CD4 细胞计数相关性分析[J]. 武汉大学学报(医学版),2012,33(3):401-403,448.
- [10] Iannello A, Boulassel MR, Samarani S, et al. IL-21 enhances NK cell functions and survival in healthy and HIV-infected patients with minimal stimulation of viral replication[J]. J Leukoc Biol,2010,87(5):857-867.
- [11] Sun C, Alkhoury K, Wang YI, et al. IRF-1 and miRNA126 modulate VCAM-1 expression(下转第 2669 页)

3 讨 论

由于传统开放手术中椎旁肌肉广泛的剥离和术中长时间的牵拉,会引起局部肌肉坏死及纤维瘢痕化,从而导致长期的腰背部慢性疼痛及僵硬等不适感^[11-13];且具有手术创伤大、出血量多、恢复较慢等缺点^[14]。因而微创手术得到了患者和医生的欢迎。采用 Mast Quadrant 微创通道行后路椎弓根钉棒固定,经钝性分离多裂肌束并插入扩张通道管,由椎旁肌的肌间隙进入并显露上关节突及横突根部,可在直视下置入椎弓根钉内固定,无需大范围剥离椎旁肌,大大降低了对肌肉的损伤,有效保留椎旁软组织的生理功能,并降低术后腰痛的发生率。

本研究结果显示,微创患者可进行早期下床活动,有效减少了长期卧床可能导致的多种并发症的发生^[15]。与传统开放手术相比,微创具有以下优点:(1)手术时间更短;(2)手术切口小;(3)术中出血量和术后引流量更少;(4)术后患者伤口疼痛 VAS 评分明显降低;(5)对脊柱后柱软组织及骨性结构的副韧带损伤小,术后早期恢复时间短;(6)患者住院时间缩短。微创的适应证有:(1)单纯的椎体压缩性骨折;(2)爆裂性不稳定型骨折,椎管内无占位或轻度占位且无神经系统损伤的患者;(3)部分可以保守治疗,但不愿长时间卧床的患者。但适应证与禁忌证是相对的,随着微创技术的发展,现在已有部分学者报道在微创通道下行胸腰椎骨折需椎管减压的手术治疗。术中操作要点及注意事项:(1)注意体位的摆放,使胸腰段保持过伸位,利用体位使骨折部分复位,但要防止过伸角度过大,避免加重骨折;(2)注意体表准确的定位,反复在 C 臂透视下定位并作标记,避免手术部位发生错误;(3)选择理想的椎弓根螺钉的进针点,反复准确使用 C 臂透视,按照“宁上勿下、宁外勿内”的原则,避免损伤脊髓及神经根,造成严重的并发症;(4)术中使用撑开复位器利用后纵韧带及椎间盘的轴向撑开力使椎管内小骨块闭合复位,纠正后凸成角,恢复脊柱的生理弯曲。

综上所述,在严格掌握手术适应证的前提下,经 Mast Quadrant 微创通道行椎弓根内固定术,不需剥离椎旁肌,对腰背肌功能影响极小,与传统开放手术方式相比具有操作简单、术中出血少、术后疼痛轻、恢复快等优势,具有临床推广使用价值。

参考文献

- [1] Defino HL, Canto FR. Low thoracic and lumbar burst fractures: radiographic and functional outcomes[J]. Eur Spine J, 2007, 16(11): 1934-1943.
- [2] 翟树超, 鲁世保. 胸腰椎骨折的分类系统及手术治疗研究进展[J]. 实用骨科杂志, 2014, 20(10): 914-917.
- [3] Gelb D, Ludwig S, Karp JE, et al. Successful treatment of thoracolumbar fractures with short-segment pedicle instrumentation[J]. J Spinal Disord Tech, 2010, 23(5): 293-

301.

- [4] Verlaan JJ, Diekerhof CH, Buskens E, et al. Surgical treatment fractures of the thoracic and lumbar spine: a systemic review of the literature on techniques, complications, and outcome[J]. Spine, 2004(29): 803-814.
- [5] 吴增志, 赖茂松, 熊浩, 等. 微创通道与传统内固定治疗胸腰椎骨折的疗效比较[J]. 实用骨科杂志, 2014, 20(10): 925-927.
- [6] 汪学军, 吴亚鹏, 李开南, 等. 微创椎弓根钉内固定治疗胸腰椎骨折中期椎体运动节段高度维持的研究[J]. 四川医学, 2010, 31(1): 30-32.
- [7] 刘宪义, 李淳德, 邑晓东, 等. 球囊扩张椎体成形与椎弓根钉置入内固定治疗胸腰椎爆裂性骨折的效果对比[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(22): 4131-4134.
- [8] 吴亚鹏, 王达义, 常巍, 等. 微创内镜下椎弓根钉固定治疗无神经损伤胸腰椎骨折[J]. 实用骨科杂志, 2010, 16(7): 520-521.
- [9] 常跃文, 匡勇, 张磊, 等. 椎弓根钉棒内固定结合开放后凸成形术治疗胸腰段椎体新鲜爆裂性骨折[J]. 脊柱外科杂志, 2010, 8(4): 233-235.
- [10] 李广宇. 疼痛程度评估: 视觉模拟评分法[N]. 医药经济报, 2011-8-22.
- [11] Kim DY, Lee SH, Chung SK, et al. Comparison of multifidus muscle atrophy and trunk extension muscle strength: percutaneous versus open pedicle screw fixation [J]. Spine, 2005(30): 123-129.
- [12] Wild MH, Cless M, Plieschnegger C, et al. Five-year follow-up examination after purely minimally invasive posterior stabilization of thoracolumbar fractures: a comparison of minimally invasive percutaneously and conventionally open treated patients [J]. Arch Orthop Trauma Surg, 2007, 127(5): 335-343.
- [13] Stevens KJ, Spenciner DB, Griffiths KL, et al. Comparison of minimally invasive and conventional open posterolateral lumbar fusion using magnetic resonance imaging and retraction pressure studies [J]. J Spine Disord Tech, 2006, 19(2): 77-86.
- [14] 王洪伟, 李长青, 周跃, 等. 微创与传统开放附加伤椎经椎弓根螺钉内固定手术治疗胸腰椎骨折的疗效比较[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2010, 20(2): 112-116.
- [15] 杜顺杰. 微创与传统切开椎弓根螺钉固定治疗胸腰椎骨折的比较[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2012.

(收稿日期: 2015-12-08 修回日期: 2016-01-11)

(上接第 2366 页)

- in response to a high-fat meal[J]. Circ Res, 2012, 111(8): 1054-1064.
- [12] Qin A, Wen Z, Zhou Y, et al. MicroRNA-126 regulates the induction and function of CD4(+) Foxp3(+) regulatory T cells through PI3K/AKT pathway[J]. J Cell

Mol Med, 2013, 17(2): 252-264.

- [13] Li Z, Wu F, Brant SR, et al. IL-23 receptor regulation by Let-7f in human CD4⁺ memory T cells[J]. J Immunol, 2011, 186(11): 6182-6190.

(收稿日期: 2015-12-18 修回日期: 2016-03-11)