

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.33.009

幽门螺旋杆菌感染患儿胃黏膜组织中 miR-146a 表达 及与 TLR4/NF- κ B 信号通路的相关性*

孙波,周方,李小芹[△]

(郑州大学附属儿童医院消化内科,郑州 450000)

[摘要] **目的** 探讨幽门螺旋杆菌(Hp)感染患儿胃黏膜组织中微小 RNA(miR)-146a 表达变化及与 Toll 样受体 4(TLR4)/细胞核因子-B(NF- κ B)信号通路的相关性。**方法** 选取 2014 年 2 月至 2016 年 12 月在该院就诊的患儿 107 例,分为 Hp 感染组($n=58$)和非感染组($n=49$),原位杂交试验检测患儿胃黏膜组织中 miR-146a 表达,实时荧光定量 PCR 检测患儿胃黏膜组织中 miR-146a、TLR4 mRNA 和 NF- κ B mRNA 表达,酶联免疫吸附试验(ELISA)检测患儿胃黏膜组织中白细胞介素(IL)-6、IL-8、IL-10 和肿瘤坏死因子(TNF)- α 水平。**结果** Hp 感染组患儿胃黏膜组织中 miR-146a 阳性表达率为 72.4%(42/58),非感染组为 22.4%(11/49),差异有统计学意义($\chi^2=26.526, P=0.000$);Hp 感染组患儿胃黏膜组织中 miR-146a、TLR4 mRNA 和 NF- κ B mRNA 相对表达量均高于非感染组,差异均有统计学意义($P<0.05$);Hp 感染组患儿胃黏膜组织中 IL-6、IL-8、IL-10 和 TNF- α 水平均高于非感染组,差异均有统计学意义($P<0.05$);Pearson 相关分析显示,Hp 感染组患儿胃黏膜组织中 miR-146a 相对表达量与 TLR4 mRNA 相对表达量、NF- κ B mRNA 相对表达量、IL-6、IL-8、IL-10 和 TNF- α 水平均呈正相关($P<0.05$)。**结论** Hp 感染患儿胃黏膜组织中 miR-146a 呈高表达,可能通过调控 TLR4/NF- κ B 信号通路介导的炎症反应参与了 Hp 感染致病过程。

[关键词] 胃黏膜组织;幽门螺旋杆菌;miR-146a**[中图分类号]** R725.7**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2018)33-4234-04

Expression of miR-146a in gastric mucosal tissues in children patients with Helicobacter pylori infection and its correlation with TLR4/NF- κ B signal pathway*

SUN Bo, ZHOU Fang, LI Xiaolin[△]

(Department of Gastroenterology, Children's Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expression change of miR-146a expression in gastric mucosal tissue and its correlation with TLR4/NF- κ B signaling pathway in children patients with Helicobacter pylori (Hp) infection. **Methods** One hundred and seven children patients in the Zhengzhou Children's Hospital from February 2014 to December 2016 were selected and divided into the Hp infection group ($n=58$) and non-Hp infection group ($n=49$). The expression of miR-146a in gastric mucosal tissues was detected by using in situ hybridization assay. Real-time quantitative PCR was used to detect the expressions of miR-146a, TLR4 mRNA and NF- κ B mRNA in gastric mucosal tissues. The levels of IL-6, IL-8, IL-10 and TNF- α in gastric mucosal tissues were detected by ELISA. **Results** The positive expression rate of miR-146a in gastric mucosal tissues in the Hp infection group was 72.4% (42/58), while which in the non-Hp infection group was 22.4% (11/49), and the difference was statistically significant ($\chi^2=26.526, P=0.000$). The relative expression levels of miR-146a, TLR4 mRNA and NF- κ B mRNA in gastric mucosal tissues in the Hp infection group were higher than those in the non-Hp infection group, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). The levels of IL-6, IL-8, IL-10 and TNF- α in the Hp infection group were higher than those in the non-Hp infection group, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). The Pearson correlation analysis showed that the relative expression level of miR-146a in gastric mucosal tissues in the Hp infection group was positively correlated with the relative expression level of TLR4 mRNA, the relative expression level of NF- κ B mRNA and the

* 基金项目:河南省医学科技攻关计划项目(201702324)。 作者简介:孙波(1984-),主治医师,硕士,主要从事儿童消化系统疾病的
研究。 [△] 通信作者, E-mail:lixiaoqinys@126.com。

levels of IL-6, IL-8, IL-10 and TNF- α ($P < 0.05$). **Conclusion** miR-146a shows high expression in gastric mucosal tissues of children patients with Hp infection, which might be involved in the Hp pathogenic process by regulating the inflammatory response mediated by TLR4/NF- κ B signaling pathway.

[Key words] gastric mucosa tissue; Helicobacter pylori; miR-146a

幽门螺旋杆菌(Helicobacter pylori, Hp)作为目前已知的消化性溃疡、萎缩性胃炎主要致病因素,在胃癌发生及进展中发挥重要作用^[1]。随着诊疗手段的进步,小儿胃炎、胃溃疡发病率不断升高,且 Hp 感染阳性率较高^[2]。研究表明,儿童时期是 Hp 感染的高发阶段,且一旦感染可能终身受累^[3]。微小 RNA (micro RNA, miRNA)作为广泛存在于机体内的短小 RNA,在与特异性靶位结合后可通过影响其转录而在多种生理病理过程中发挥重要作用^[4]。miR-146a 是 miRNA 的重要类型,与机体固有免疫应答、炎症反应、病毒感染等密切相关^[5];尤其在消化道肿瘤的相关研究较多,也说明了其在消化道疾病中的重要性^[6]。Toll 样受体 4 (toll-like receptor4, TLR4)/细胞核因子- κ B (nuclear factor kappa B, NF- κ B) 信号通路是调控机体炎性反应的重要通路,在促进炎性反应及多种炎症因子释放中发挥重要作用^[7]。有研究指出,机体免疫炎性反应与 Hp 感染所致疾病密切相关^[8]。故本研究通过分析 Hp 感染患儿胃黏膜组织中 miR-146a 表达变化,探讨其与 TLR4/NF- κ B 信号通路的相关性,以期对 Hp 感染致病机制的研究提供基础资料。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2014 年 2 月至 2016 年 12 月在本院就诊的患儿 107 例。纳入标准:(1)以恶心、呕吐、反酸、腹痛腹胀、呕血或黑便为主要症状;(2)近 2 个月无抗生素、质子泵抑制剂、离子泵阻滞剂、激素使用史。排除标准:心肝肾等重要脏器严重功能障碍者,免疫系统功能障碍者,急慢性感染者,营养不良者,内分泌系统疾病者,恶性肿瘤者。其中,男 61 例,女 46 例,年龄 4~14 岁,平均年龄(9.32 \pm 3.11)岁。所有患儿均接受¹³C 尿素呼气试验和组织病理 Hp 染色,根据二者检查结果将患儿分为 Hp 感染组和非感染组,其中, Hp 感染组 58 例,男 35 例,女 23 例,平均年龄(9.36 \pm 3.17)岁;非感染组 49 例,男 26 例,女 23 例,平均年龄(9.27 \pm 3.05)岁,病因分类:饮食因素 39 例,药物刺激 8 例,胆汁反流 2 例。两组患儿性别、年龄差异无统计学意义($P > 0.05$),均衡可比。本研究通过医院伦理委员会批准,所有患儿家长均知情同意。

1.2 主要试剂和设备 miRCURY™原位杂交探针购自丹麦 Exiqon 公司,寡核苷酸探针稀释液购自上海鲁汶生物科技有限公司,地高辛标记探针购自德国

Boehringer 公司,生物素化鼠抗地高辛抗体和过氧化物酶标记的链霉素卵白素工作液购自武汉博士德生物工程公司,总 RNA 提取试剂盒(Trizol 法)购自美国 Mobio 公司,反转录试剂盒和 PCR 扩增试剂盒购自宝日医生物技术(北京)公司,miR-146a 和 U6 引物由上海生工生物公司设计合成,实时荧光定量 PCR 仪购自美国 Bio-Rad 公司。

1.3 方法

1.3.1 标本收集 所有患儿在行胃镜检查时,留取胃窦部胃黏膜组织 4 块,2 块用 4% 甲醛固定石蜡包埋,分别用于检测 Hp 感染和原位杂交试验;另 2 块置于液氮保存于-70℃ 冰箱,分别用于 PCR 和酶联免疫吸附试验(ELISA)。

1.3.2 原位杂交试验检测患儿胃黏膜组织中 miR-146a、TLR4 和 NF- κ B 表达 取石蜡包埋组织,切片(厚度约 2 mm),脱蜡、水化,PBS 冲洗 2 次,用 0.3% 枸橼酸稀释的蛋白酶消化 10 min,PBS 冲洗 3 次,室温下 4% 多聚甲醛固定,焦碳酸二乙酯水洗,湿盒中 42℃ 预杂交 2 h。取地高辛标记探针 miR-146a、U6 阳性对照和无义对照(稀释比例分别为 1:500、1:1000 和 1:1500),miR-146a 探针序列:AAC CCA TGG AAT TCA GTT CTC A;U6 阳性对照探针序列:CAC GAA TTT GCG TGT CAT CCT T;无义对照探针序列:GTGTAACACGTCTATACGCCCA。用杂交溶液进行稀释,80℃ 变性 3 min,冰上置 2 min,过夜杂交。用枸橼酸氯化钠缓冲液洗涤,37℃ 封闭液封闭 60 min,滴加生物素化鼠抗地高辛抗体,室温下孵育 120 min,PBS 洗涤 3 次,滴加过氧化物酶标记的链霉素卵白素工作液,室温下反应 25 min,PBS 洗涤 3 次,滴加二氨基联苯胺(DAB)显色,苏木精复染,封片观察。结果判定:高倍镜下随机取 5 个视野计数细胞,阴性:阳性细胞比例<10%,阳性:阳性细胞比例 \geq 10%。所有切片均由两位病理科副主任医师单独完成阅片。

1.3.3 实时荧光定量 PCR 术检测患儿胃黏膜组织中 miR-146a、TLR4 和 NF- κ B 表达 取胃黏膜组织,研磨后加入细胞裂解液,用总 RNA 提取试剂盒提取总 RNA,用紫外分光光度计检测总 RNA 纯度。将总 RNA 反转录为 cDNA,以 cDNA 为模板,用 PCR 试剂盒进行扩增,引物序列见表 1。PCR 反应条件:98℃ 30 s,98℃ 10 s,56℃ 30 s,74℃ 50 s,连续进行 38 次循环,72℃ 延伸 10 min。用 2^{- $\Delta\Delta$ C_t}法计算胃

黏膜组织中 miR-146a 相对表达量。

表 1 引物序列

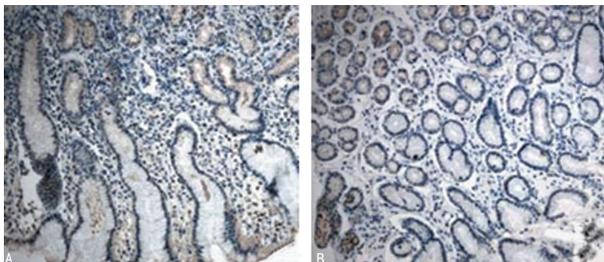
基因	序列(5'-3')
miR-146a	上游: CACGGACCTGAAGAACACTGG
	下游: AGAAATGAAATTAGAACACACATCAATCC
U6	上游: CGCAAATTCGTGAAGCGTTC
	下游: GTGCAGGGTCCGAGGTATTC
TLR4	上游: GGCAGCAGGTCGAATTGTAT
	下游: TCAAGGCTTTTCCATCCAAC
NF- κ B	上游: CGGAATGTGCAGATGCAT
	下游: ACCCCACTACTCTTGCGGCA
GAPDH	上游: TGTGTCCGTCGTGGATCTGA
	下游: TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG

1.3.4 ELISA 检测患儿胃黏膜组织中炎症因子水平 取胃黏膜组织, 研磨后匀浆, 于 3 500 r/min 离心 10 min, 取上清液, 利用 ELISA 检测黏膜组织中白细胞介素(IL)-6、IL-8、IL-10 和肿瘤坏死因子(TNF)- α 水平, 所有操作均在标准条件下按试剂盒说明完成。

1.4 统计学处理 利用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 t 检验, 变量间相关性分析采用 Pearson 相关分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 患儿胃黏膜组织中 miR-146a 表达 原位杂交实验结果显示, miR-146a 主要表达于细胞质中, 被染成黄色或棕黄色颗粒状。Hp 感染组患儿胃黏膜组织中 miR-146a 阳性表达率为 72.4% (42/58), 非感染组则为 22.4% (11/49), 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 26.526, P = 0.000$), 见图 1。



A: miR-146a 在 Hp 感染组中呈高表达; B: miR-146a 在非感染组中呈低表达

图 1 原位杂交实验检测患儿胃黏膜组织中 miR-146a 表达 (DAB 染色 $\times 200$)

2.2 两组患儿胃黏膜组织中 miR-146a、TLR4 和 NF- κ B 表达 Hp 感染组患儿胃黏膜组织中 miR-146a、TLR4 mRNA 和 NF- κ B mRNA 相对表达量均高于非感染组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 2。

2.3 两组患儿胃黏膜组织中 IL-6、IL-8、IL-10 和

TNF- α 水平 Hp 感染组患儿胃黏膜组织中 IL-6、IL-8、IL-10 和 TNF- α 水平均高于非感染组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 3。

表 2 两组患儿胃黏膜组织中 miR-146a、TLR4 和 NF- κ B 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	miR-146a	TLR4 mRNA	NF- κ B mRNA
Hp 感染组	58	1.95 \pm 0.14	1.84 \pm 0.06	2.19 \pm 0.07
非感染组	49	1.20 \pm 0.13	1.43 \pm 0.09	1.64 \pm 0.10
t		28.644	28.562	31.964
P		0.000	0.000	0.000

表 3 两组患儿胃黏膜组织中 IL-6、IL-8、IL-10 和 TNF- α 水平比较 ($\bar{x} \pm s, \mu\text{g/L}$)

组别	n	IL-6	IL-8	IL-10	TNF- α
Hp 感染组	58	24.81 \pm 5.01	17.50 \pm 3.33	65.56 \pm 6.13	11.11 \pm 2.60
非感染组	49	10.69 \pm 3.00	7.87 \pm 1.97	28.67 \pm 5.84	4.68 \pm 2.02
t		57.202	58.761	31.690	43.391
P		0.000	0.000	0.000	0.000

2.4 Hp 感染组患儿胃黏膜组织中 miR-146a 表达与其他指标的相关性 Pearson 相关分析显示, Hp 感染组患儿胃黏膜组织中 miR-146a 相对表达量与 TLR4 mRNA 相对表达量、NF- κ B mRNA 相对表达量、IL-6、IL-8、IL-10 和 TNF- α 水平均呈正相关 ($r = 0.307, 0.384, 0.265, 0.271, 0.292, 0.345, P = 0.002, 0.000, 0.044, 0.040, 0.013, 0.008$)。

3 讨论

慢性胃炎、消化性溃疡作为小儿消化系统常见疾病, 近年来发病率不断升高, 不仅给患儿身体带来痛苦, 而且可对患儿生长发育产生影响^[9]。Hp 作为一种在胃黏膜中寄生的需氧细菌, 与慢性胃炎、消化性溃疡等胃部疾病的发病密切相关^[10]。研究发现, 儿童期是 Hp 感染的高发期, 感染率高达 50% 左右。但 Hp 致病的具体机制尚未完全清楚^[11]。有研究指出, 免疫炎症反应与 Hp 感染致病有关^[12]。动物实验表明, Hp 感染小鼠胃黏膜组织中细胞因子改变^[13]。本研究结果显示, Hp 感染组患儿胃黏膜组织中 IL-6、IL-8、IL-10 和 TNF- α 水平均高于非感染组, 说明 Hp 感染患儿胃黏膜组织中炎症因子水平升高, 可能参与了 Hp 所致胃病发病过程, 与 MICHALKIEWICZ 等^[14] 研究结果相同。

miRNA 作为机体内重要的非编码 RNA, 在多种生理病理过程中发挥重要作用。有研究指出, miR-146a 作为一种 miRNA, 是重要的固有免疫信号调节分子, 在固有免疫应答中发挥重要作用^[15]。miR-146a 在强直性脊柱炎^[16]、脓毒血症患儿^[17] 外周血中表达

上调。本研究原位杂交试验结果显示,miR-146a 表达于细胞质中,Hp 感染组患儿胃黏膜组织中 miR-146a 阳性表达率高于非感染组,说明 miR-146a 在 Hp 感染患儿胃黏膜组织中呈高表达,可能参与了 Hp 感染致病过程。实时荧光定量 PCR 检测结果显示,Hp 感染组患儿胃黏膜组织中 miR-146a 相对表达量高于非感染组,进一步说明 miR-146a 可能参与了 Hp 感染致病过程。研究表明,miR-146a 主要调控 Toll 样受体(TLR)2 和 TLR4 通路,进而可诱导 NF- κ B 信号通路活化而促进炎症因子及促炎信号通路的激活^[18]。赵娜等^[19]指出,miR-146a 可能是通过调控 TLR4 信号通路中相关分子表达而参与细菌脂多糖诱导神经胶质细胞 BV2 炎症反应。本研究结果显示,Hp 感染组患儿胃黏膜组织中 TLR4 mRNA 和 NF- κ B mRNA 相对表达量均高于非感染组,说明 TLR4/NF- κ B 信号通路可能参与了 Hp 感染致病过程。相关分析结果显示,Hp 感染组患儿胃黏膜组织中 miR-146a 相对表达量与 TLR4 mRNA 和 NF- κ B mRNA 相对表达量、IL-6、IL-8、IL-10 和 TNF- α 水平均呈正相关,进一步说明 miR-146a 可能通过调控 TLR4/NF- κ B 信号通路介导的炎症反应而在 Hp 感染致病过程中发挥重要作用。

综上所述,Hp 感染患儿胃黏膜组织中 miR-146a 呈高表达,可能通过调控 TLR4/NF- κ B 信号通路介导的炎症反应参与了 Hp 感染致病过程,但具体作用机制尚待进一步研究明确,有望为 Hp 感染综合防治提供新的靶位。

参考文献

- [1] PETRA C V, RUS A, DUMITRASCU D L. Gastric microbiota: tracing the culprit[J]. Clujul Med, 2017, 90(4): 369-376.
- [2] ABADI A T, KUSTERS J G. Management of Helicobacter pylori infections[J]. BMC Gastroenterol, 2016, 16(1): 94-98.
- [3] ORTIZ-PRINCZ D, DAOUD G, SALGADO-SABEL A, et al. Helicobacter pylori infection in children: should it be carefully assessed? [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2016, 20(9): 1798-1813.
- [4] PLOTKIN L I, PACHECO-COSTA R, DAVIS H M. microRNAs and connexins in bone: interaction and mechanisms of delivery[J]. Curr Mol Biol Rep, 2017, 3(2): 63-70.
- [5] WANG X P, LUORENG Z M, ZAN L S, et al. Bovine miR-146a regulates inflammatory cytokines of bovine mammary epithelial cells via targeting the TRAF6 gene [J]. J Dairy Sci, 2017, 100(9): 7648-7658.
- [6] HOU Z, XIE L, YU L, et al. Micro RNA-146a is down-regulated in gastric cancer and regulates cell proliferation and apoptosis[J]. Med Oncol, 2012, 29(2): 886-892.
- [7] 郎志斌, 邱林, 赵亮, 等. 盐酸戊乙奎醚对体外循环下法洛四联症根治术患儿心肌 TLR4/NF- κ B 信号通路的影响[J]. 中华麻醉学杂志, 2017, 37(4): 411-416.
- [8] VELIN D, STRAUBINGER K, GERHARD M. Inflammation, immunity, and vaccines for Helicobacter pylori infection[J]. Helicobacter, 2016, 21(Suppl 1): 26-29.
- [9] 赵红梅, 唐硕, 唐娟, 等. 营养不良评估筛查工具与营养风险及发育不良筛查工具在儿童消化系统疾病中的应用比较[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2016, 31(19): 1460-1463.
- [10] CHOI W T, LAUWERS G Y. Patterns of gastric injury: beyond Helicobacter pylori[J]. Surg Pathol Clin, 2017, 10(4): 801-822.
- [11] BLANCHARD T G, CZINN S J. Identification of Helicobacter pylori and the evolution of an efficacious childhood vaccine to protect against gastritis and peptic ulcer disease[J]. Pediatr Res, 2017, 81(1/2): 170-176.
- [12] BAGHERI N, AZADEGAN-DEHKORDI F, RAHIMIAN G, et al. Role of regulatory T-cells in different clinical expressions of Helicobacter pylori infection[J]. Arch Med Res, 2016, 47(4): 245-254.
- [13] 韩岩智, 刘浩, 阮开学. 幽门螺杆菌感染小鼠胃黏膜组织细胞因子变化的实验研究[J]. 重庆医学, 2015, 44(3): 293-294, 298.
- [14] MICHALKIEWICZ J, HELMIN-BASA A, GRZYWA R, et al. Innate immunity components and cytokines in gastric mucosa in children with Helicobacter pylori infection [J]. Mediators Inflamm, 2015, 15(3): 1-7.
- [15] 杨佳, 刘星星, 范恒. miR-146a 与固有免疫应答的研究进展[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2017, 33(2): 256-260.
- [16] WEI C, ZHANG H, WEI C, et al. Correlation of the expression of miR-146a in peripheral blood mononuclear cells of patients with ankylosing spondylitis and inflammatory factors[J]. Exp Ther Med, 2017, 14(5): 5027-5031.
- [17] 武宇辉, 李成荣, 何颜霞, 等. 脓毒症患儿血浆微 RNA 表达及其与炎症细胞因子的相关性[J]. 中华儿科杂志, 2014, 52(1): 28-33.
- [18] ZOU L, FENG Y, XU G, et al. Splenic RNA and microRNA mimics promote complement factor B production and alternative pathway activation via innate immune signaling[J]. J Immunol, 2016, 196(6): 2788-2798.
- [19] 赵娜, 申乐, 姜浩武, 等. MiR-146a 高表达对神经胶质细胞 BV2 炎症反应的影响[J]. 中国医学科学院学报, 2016, 38(1): 27-32.