

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2014.06.014

论著·临床研究

甲基丙二酸血症患儿血浆 microRNA 表达变化的初步研究

李燕飞 彭涛 段冉冉 王笑寒 高慧丽 王景涛 滕军放 贾延劫

(郑州大学第一附属医院神经内科, 河南 郑州 450052)

[摘要] **目的** 筛选甲基丙二酸血症(MMA)患儿血浆中表达差异的 microRNA(miRNA),并检测 miR-9-1 在 MMA 患儿血浆中的表达变化,初步探讨 miR-9-1 作为 MMA 潜在的生物标记物的意义。**方法** 收集 17 例 MMA 患儿血浆样本,其中 MMA 合并高同型半胱氨酸血症 12 例(MMA+HHcy 组)、不伴高同型半胱氨酸血症的 MMA 5 例(MMA 组);另收集 10 例非 MMA 的高同型半胱氨酸血症(HHcy 组)和 10 例健康对照者的血浆样本。采用 miRNA 微阵列基因芯片法筛选具表达差异的 miRNA,选择具有表达差异的 miR-9-1 行 RT-PCR 法检测血浆中 miR-9-1 的表达。选择经维生素 B₁₂ 治疗的 MMA 患儿检测治疗后血浆 miR-9-1 表达的变化。**结果** miRNA 微阵列基因芯片共筛选出 26 个具有表达差异的 miRNA,其中下调 2 倍以上的 miRNA 16 个(包括 miR-9-1),上调 2 倍以上的 10 个。MMA+HHcy 组、MMA 组及 HHcy 组 miR-9-1 的表达量较健康对照组均显著下调($P<0.01$)。维生素 B₁₂ 治疗反应良好的患儿治疗后血浆中 miR-9-1 较治疗前显著上调,与健康对照组比较差异无统计学意义。**结论** miR-9-1 在 MMA 患儿血浆中显著下调,维生素 B₁₂ 治疗后显著上调,可作为监控 MMA 病情变化的指标。
[中国当代儿科杂志, 2014, 16(6): 629-633]

[关键词] miR-9-1; 甲基丙二酸血症; 高同型半胱氨酸血症; 儿童

A preliminary study of plasma microRNA levels in children with methylmalonic acidemia

LI Yan-Fei, PENG Tao, DUAN Ran-Ran, WANG Xiao-Han, GAO Hui-Li, WANG Jing-Tao, TENG Jun-Fang, JIA Yan-Jie. Department of Neurology, First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China (Jia Y-J, Email: jiayanjie1971@yahoo.com.cn)

Abstract: Objective To screen out differentially expressed microRNAs (miRNAs) in the plasma of children with methylmalonic acidemia (MMA), to determine the expression of miR-9-1 in plasma and to preliminarily evaluate the significance of miR-9-1 as a biomarker in MMA. **Methods** Plasma was obtained from 17 MMA children, 10 hyperhomocysteinemia (HHcy) children without MMA (HHcy group), and 10 normal controls. Of 17 MMA children, 12 had HHcy (MMA+HHcy group), and 5 had no HHcy (MMA group). The differentially expressed miRNAs were screened out by miRNA microarray. Differentially expressed miR-9-1 was selected, and plasma miR-9-1 levels were determined by RT-PCR. Urine was collected from MMA patients who received vitamin B₁₂ treatment, and plasma miR-9-1 levels were determined by RT-PCR after treatment. **Results** The miRNA microarray analysis showed that 26 miRNAs were differentially expressed, among which 16 miRNAs (including miR-9-1) were down-regulated over 2 times, while 10 miRNAs were up-regulated over 2 times. The MMA+HHcy, MMA and HHcy groups had significantly down-regulated miR-9-1 compared with the normal control group ($P<0.01$). The patients who showed a good response to vitamin B₁₂ treatment had significantly increased plasma miR-9-1 levels, without significant difference compared with the normal control group. **Conclusions** Plasma miR-9-1 is significantly down-regulated in MMA patients, but it is significantly up-regulated after vitamin B₁₂ treatment, suggesting that miR-9-1 may act as a biomarker in monitoring the progression of MMA.
[Chin J Contemp Pediatr, 2014, 16(6): 629-633]

Key words: miR-9-1; Methylmalonic acidemia; Hyperhomocysteinemia; Child

[收稿日期] 2013-10-12; [接受日期] 2014-01-16

[基金项目] 国家自然科学基金(81071114)。

[作者简介] 李燕飞,女,硕士,住院医师。

[通信作者] 贾延劫,男,教授。

甲基丙二酸血症 (methylmalonic acidemia, MMA) 是由甲基丙二酰辅酶 A 变位酶 (methylmalonyl-CoA mutase, MCM) 或其辅酶腺苷钴胺素 (Ado-Cbl) 缺陷导致的一种常染色体隐性遗传代谢性疾病。其患病率在美国为 1:48 000, 日本为 1:50 000^[1], 国内患病率尚不清楚, 但对临床疑似患儿进行串联质谱检测发现 MMA 患儿并不少见^[2]。正常情况下, 甲基丙二酸在 MCM 和 Ado-Cbl 作用下转变成琥珀酰辅酶 A 参与三羧酸循环, MCM 活性不足或维生素 B₁₂ 代谢障碍可导致甲基丙二酸及其前体丙酸、甲基枸橼酸等代谢物的异常蓄积, 从而引起神经、肾脏、肝脏等多系统损伤^[3-4]。微小 RNA (microRNA, miRNA) 是一类长约 22 个核苷酸的非编码单链 RNA, 它可以通过与靶基因的 3' 端非翻译区 (3'-UTR) 互补配对抑制基因转录后表达, 从而参与细胞增殖、分化、发育、凋亡等多种生物过程。近年来研究表明, miRNA 在疾病状态下可异常表达且具有检测方法灵敏、准确等特点, 这提示 miRNA 可能作为潜在的生物标记物辅助相关疾病的诊断^[5]。生物信息学工具预测发现 miR-9 有众多可预测的下游靶基因, 而研究亦证实 miR-9 在生物发育、细胞增殖、凋亡和神经前体细胞分化过程中起着重要的调控作用。本研究通过检测 MMA 患儿与健康人之间 miRNA 的表达差异, 以寻找合适的生物标志物来辅助 MMA 的诊断。

1 资料与方法

1.1 研究对象

所有 MMA 病例来自 2011 年 8 月至 2013 年 6 月就诊于郑州大学第一附属医院及郑州大学第三附属医院的患儿, 共收集 17 例 MMA 患儿、10 例非 MMA 的高同型半胱氨酸血症 (hyperhomocysteinemia) 患者及 10 例健康对照者的血浆样本。MMA 患儿的诊断标准参照文献^[6]。尿液样本送至北京儿童医院进行气相色谱-质谱 (GC-MS) 定量测定甲基丙二酸含量。结合临床表现、影像学及生化学检查后确诊为 MMA。

17 例 MMA 患儿根据血浆同型半胱氨酸 (Hcy) 水平进行分组: Hcy > 16 μmol/L 者为 MMA 合并 HHcy 组 (MMA+HHcy 组, 12 例); Hcy

≤ 16 μmol/L 者为 MMA 未合并 HHcy 组 (MMA 组, 5 例)。上述病例中经维生素 B₁₂ 治疗并具有一定家庭经济能力的 5 例患儿于治疗 3 周后将其尿液样本送至北京儿童医院复查 GC/MS。

由于单纯 HHcy 在青少年中少见, 故本研究中 HHcy 组年龄较其他各组大 ($P < 0.05$), 余各组间性别, 年龄差异无统计学意义。各组患儿临床基本资料见表 1。

采集患儿资料并建立档案, 留取外周血。本研究经我院医学伦理委员会批准, 患儿家长知情并签署知情同意书。

表 1 各组患儿临床基本资料

组别	例数	男/女 (n)	年龄 (岁, $\bar{x} \pm s$)
对照组	10	4/6	14.6 ± 2.7
MMA+HHcy 组	12	6/6	12.3 ± 2.6
MMA 组	5	3/2	12.4 ± 2.6
HHcy 组	10	6/4	31.9 ± 10.0 ^a
MMA+HHcy 治疗组	5	2/3	12.0 ± 2.6

注: a 示与其他各组比较, $P < 0.01$ 。

1.2 主要试剂

miRcute miRNA isolation Kit (DP501) 购自 Tiangen 公司, Reverse Transcription System (A3500)、Gotaq qPCR Master Mix (A6001) 购自 Promega 公司, miR-9-1 引物购自广州锐博生物科技有限公司 (序列 Forward 5'-TCATAAAGCTAGATAACCGAAGAT-3'; Reverse 5'-TCCAGAGGCGACCCAGAGC-3')。

1.3 血浆标本的收集

参照 Kim 等^[7]方法, 抽取患儿外周血 3 mL, 收集于氟化钠 (NaF) 管中, 采用 4℃、3000 r/min 离心 15 min, 取上层血浆置于 -80℃ 冰箱备用。

1.4 血浆 miRNA 的抽提

按照 miRcute miRNA 提取分离试剂盒说明书进行抽提 miRNA。

1.5 微阵列基因芯片

选取 MMA 患儿和健康对照各 5 例进行 miRNA 微阵列基因芯片检测, 其中 MMA 组男 3 例, 女 2 例, 平均年龄 13.4 ± 2.1 岁; 对照组男 2 例, 女 3 例, 平均年龄 13.4 ± 1.7 岁。两组性别、年龄差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

由 LC Sciences 提供技术服务，在 MMA 患儿和健康对照组血浆 miRNA 3' 端加上 poly (A) 尾，并将寡聚核苷酸标记与 poly (A) 尾连接。将标记产物、含有 25% 甲酰胺的 100 μL 6xSSPE 缓冲液混合后在 LC Sciences 微阵列基因芯片上杂交过夜，杂交温度为 34℃。杂交后与标记特异结合的 Cy3 染料进行染色。利用 GenePix 4000B 采集杂交图像并使用 Array-Pro 进行图像数字化转换。所得数值减除背景值后，采用 LOWESS 法进行信号归一化，*t* 检验进行两组差异表达基因分析。

1.6 RT-PCR

MMA+HHcy 组、单纯 MMA 组、单纯 HHcy 组及 MMA+HHcy 治疗组（经维生素 B₁₂ 治疗并复查尿甲基丙二酸含量）进行实时荧光定量 PCR (RT-PCR) 检测。另检测 10 例健康儿童作为对照。

根据 Reverse Transcription System 说明书，将 miRNA 逆转录为 cDNA。按照 Gotaq qPCR Master Mix 说明书进行荧光定量检测，以 5S 为内参。记录相应的 Ct 值，miRNA 相对表达量采用公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算，每例样本重复 3 次，整个实验采用盲法。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计学分析。计量资料采用均数 ± 标准差或中位数（四分位数） $[M(P25, P75)]$ 表示，正态分布连续变量资料采用 *t* 检验，非连续变量资料采用卡方检验，非正态分布连续变量资料采用秩和检验，相关性分析采用 Pearson 相关性分析方法，*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 尿液甲基丙二酸倍率

GC-MS 测定尿液甲基丙二酸倍率（倍率 = 分析值 / 基准值，基准值为 0.001）显示，MMA+HHcy 治疗组甲基丙二酸倍率显著低于 MMA+Hcy 组及 MMA 组 (*P*<0.01)，见表 2。

2.2 miRNA 在 MMA 患儿血浆中的表达变化

miRNA 微阵列基因芯片筛选出具有表达差异的 miRNA 有 26 个，其中上调 2 倍以上的有 miR-144-3p、miR-4687-3p、miR-30c-1 等 10 个，下调的有 miR-9-1、miR-191-5p、miR-30a-5p 等 16 个，见图 1。

MMA + HHcy 组 miR-9-1 相对表达量为 $(1.11 \pm 0.95) \times 10^{-3}$ ，MMA 组为 $(2.46 \pm 2.91) \times 10^{-2}$ ，HHcy 组为 0.161 ± 0.119 ，MMA+HHcy 治疗组为 0.214 ± 0.023 ，健康对照组为 0.250 ± 0.103 ，其中 MMA+Hcy、MMA 及 HHcy 组与健康对照组比较差异均有统计学意义 (*P*<0.01)，MMA+HHcy 治疗组与健康对照组比较差异无统计学意义，见图 2；且在 MMA+HHcy 组及 MMA 组中甲基丙二酸倍率值越高，miR-9-1 相对表达量越低，相关系数分别为 -0.789、-0.867，见图 3A、3C，而在 MMA+HHcy 组及 HHcy 组中 miR-9-1 相对表达量与血 Hcy 值无相关性，见图 3B、3D。

2.3 miR-9-1 对 MMA 的诊断效能

ROC 曲线分析结果显示，利用 miR-9-1 的相对表达量对 MMA 进行诊断时，ROC 曲线下面积为 0.974。若以 0.027 为诊断临界值，即 miR-9-1 相对表达量低于 0.027 时诊断为 MMA，约登指数最大，为 0.832，灵敏度和特异度分别为 0.95、0.882，见图 4。

表 2 患儿尿液甲基丙二酸倍率的比较

组别	例数	倍率
MMA+HHcy 组	12	652.2(137.3, 927.6)
MMA 组	5	500.6(229.7, 944.2)
MMA+HHcy 治疗组	5	99.9(95.6, 123.4) ^a
Z 值		-2.214
P 值		0.007

注：a 为与 MMA 组及 MMA+HHcy 组比较，*P*<0.01。

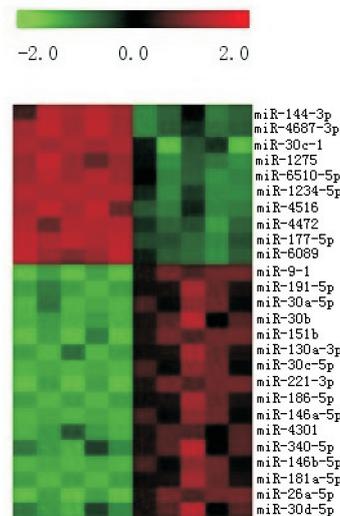


图 1 微阵列芯片聚类图 上调 2 倍以上的有 miR-144-3p、miR-4687-3p、miR-30c-1 等 10 个，下调的有 miR-9-1、miR-191-5p、miR-30a-5p 等 16 个。

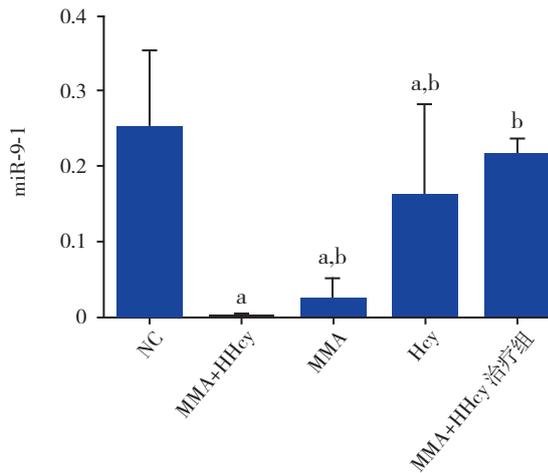


图2 各组 miR-9-1 的相对表达量 a 为与 NC 组 (健康对照) 比较, $P < 0.01$; b 为与 MMA+Hcy 组比较, $P < 0.01$ 。

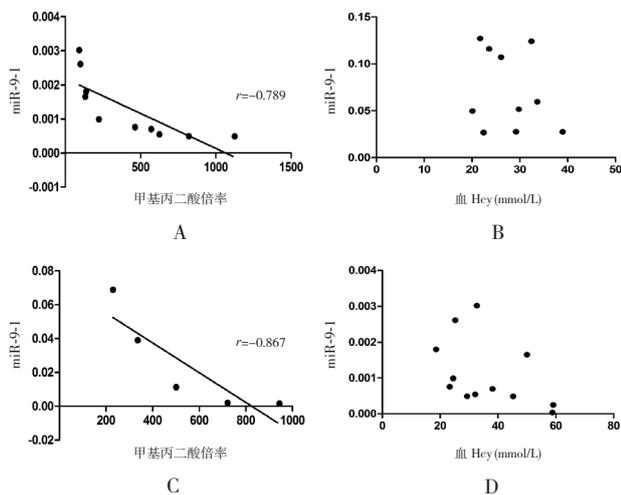


图3 miR-9-1 表达与尿甲基丙二酸倍率、血 Hcy 值的相关性 A: MMA+HHcy 组, 尿甲基丙二酸倍率与 miR-9-1 表达呈负相关 ($r = -0.789$, $P = 0.007$); B: HHcy 组, miR-9-1 表达与血 Hcy 值无相关性; C: MMA 组, 尿甲基丙二酸倍率与 miR-9-1 表达呈负相关 ($r = -0.867$, $P = 0.04$); D: MMA+HHcy 组, miR-9-1 表达与血 Hcy 值无相关性。

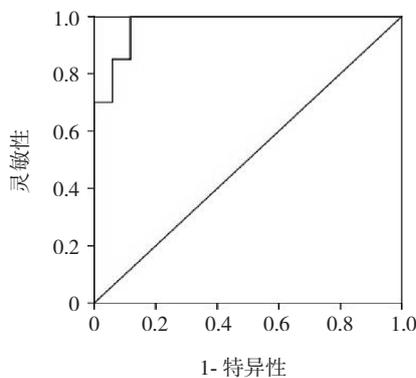


图4 通过血浆 miR-9-1 相对表达量诊断 MMA 的曲线下面积 (AUC)

3 讨论

本研究发现 MMA+HHcy 组及 MMA 组中甲基丙二酸倍率越高, miR-9-1 相对表达量越低, 而在 MMA+HHcy 组及 HHcy 组中血 Hcy 值与 miR-9-1 相对表达量无相关性。这提示 MMA 患儿甲基丙二酸蓄积量可能在 miR-9-1 的下调中起主导作用, 而 MMA+HHcy 组 miR-9-1 相对表达量明显低于 MMA 组及 HHcy 组, 则可能是由甲基丙二酸及 Hcy 的共同作用引起。MMA+HHcy 治疗组复查尿甲基丙二酸倍率较治疗前显著下调, 提示患儿治疗后病情控制较好, 此时检测 miR-9-1 相对表达量明显上调, 基本恢复正常人水平, 推测 miR-9-1 可能是反映治疗效果及病情状况的一个指标。

MMA 造成脑损伤的机制尚不十分明确, 有研究表明其可能通过抑制三羧酸循环途径以及氧化磷酸化, 导致线粒体功能障碍, 诱发氧化应激以及兴奋性毒性, 从而诱导神经元细胞发生凋亡^[8-9]。最新研究发现将甲基丙二酸经皮下注射至 Wistar 大鼠体内可引起大鼠血液中多形核白细胞的减少及皮质组织中 IL-1 β 、TNF α 、iNOS 表达水平的增高, 由此推测神经炎症机制可能参与了 MMA 患儿脑损伤的过程^[10]。

关于 miR-9-1 在 MMA 中的作用机制, 目前国内尚无相关报道。研究表明 miR-9-1 可能对炎症因子起到一定的抑制作用。如 Jones 等^[11]报道在人骨关节炎软骨细胞过表达 miR-9 可使 IL-1 β 诱导产生的 TNF α 减少 40%, 提示 miR-9 可能对骨关节炎疾病起到保护作用。Kaneko 等^[12]在交感性眼炎患儿的眼球样本中发现 miR-9 下调, 并证实 miR-9 可负调控靶基因 TNF α 及 NF- κ B1, 而后者与线粒体氧化应激介导的光感受器凋亡有关。Bazzoni 等^[13]研究发现 TLR-4 激活的 NF- κ B1 可诱导多形核中性白细胞与单核细胞中的 miR-9 上调, 而 miR-9 形成的负反馈通路可对 NF- κ B 家族成员的表达进行调控。本研究发现 miR-9-1 在 MMA 患儿血浆中下调, 为国内首次报道, 推测可能是由于 MMA 引起的炎症反应超过了 miR-9-1 的抑制作用, 这为 miR-9-1 是否可作为 MMA 治疗靶点提供了新思路。但亦有一些报道不能解释本研究发现, 如 Liu 等^[14]报道在由 LPS 介导的炎症反应中 miR-9 上调, 提示其与炎症反应有关; 还有研

究发现 miR-9 可在转录后水平抑制 NF- κ B1 表达, 而后者已被证实具有抗凋亡作用^[15-16], 故 miR-9-1 在 MMA 中下调的原因和机制尚需进一步研究。而 miR-9-1 表达水平与 MMA 进展过程的深层关系仍需进一步扩大样本量进行验证, miR-9-1 在 MMA 中的可能作用机制亦需进一步研究。

总之, miR-9-1 在 MMA 患儿血浆中显著下调, 维生素 B₁₂ 治疗后显著上调, 且在尿中甲基丙二酸值越高, miR-9-1 下调越明显, 可作为潜在的生物标记物辅助 MMA 的诊断, 从而监测病情的变化。

[参 考 文 献]

- [1] Deodato F, Boenzi S, Santorelli FM, et al. Methylmalonic and propionic aciduria [J]. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 2006, 142C (2): 104-112.
- [2] Tu WJ. Methylmalonic acidemia in mainland China [J]. *Ann Nutr Metab*, 2011, 58(4): 281.
- [3] Wajner M, Coelho JC. Neurological dysfunction in methylmalonic acidemia is probably related to the inhibitory effect of methylmalonate on brain energy production [J]. *J Inher Metab Dis*, 1997, 20(6): 761-768.
- [4] Richard E, Alvarez-Barrientos A, Desviat LR, et al. Methylmalonic acidemia leads to increased production of reactive oxygen species and induction of apoptosis through the mitochondrial/caspase pathway [J]. *J Pathol*, 2007, 213(4): 453-461.
- [5] Jin XF, Wu N, Wang L, et al. Circulating microRNAs: a novel class of potential biomarkers for diagnosing and prognosing central nervous system diseases[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2013, 33(5): 601-613.
- [6] Han LS, Ye J, Qiu WJ, et al. Selective screening for inborn errors of metabolism on clinical patients using tandem mass spectrometry in China: a four-year report[J]. *J Inher Metab Dis*, 2007, 30(4): 507-514.
- [7] Kim DJ, Linnstaedt S, Palma J, et al. Plasma components affect accuracy of circulating cancer-related microRNA quantitation [J]. *J Mol Diagn*, 2011, 14(1): 71-80.
- [8] Melo DR, Kowaltowski AJ, Wajner M, et al. Mitochondrial energy metabolism in neurodegeneration associated with methylmalonic acidemia[J]. *J Bioenerg Biomembr*, 2011, 43(1): 39-46.
- [9] Fernandes CG, Borges CG, Seminotti B, et al. Experimental evidence that methylmalonic acid provokes oxidative damage and compromises antioxidant defenses in nerve terminal and striatum of young rats[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2011, 31(5): 775-785.
- [10] Ribeiro LR, Della-Pace ID, de Oliveira Ferreira AP, et al. Chronic administration of methylmalonate on young rats alters neuroinflammatory markers and spatial memory[J]. *Immunobiology*, 2013, 218(9): 1175-1183.
- [11] Jones SW, Watkins G, Le Good N, et al. The identification of differentially expressed microRNA in osteoarthritic tissue that modulate the production of TNF- α and MMP13 [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2009, 17(4): 464-472.
- [12] Kaneko Y, Wu GS, Saraswathy S, et al. Immunopathologic processes in sympathetic ophthalmia as signified by microRNA profiling [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012, 53(7): 4197-4204.
- [13] Bazzoni F, Rossato M, Fabbri M, et al. Induction and regulatory function of miR-9 in human monocytes and neutrophils exposed to proinflammatory signals[J]. *Proc Natl Acad U S A*, 2009, 106(13): 5282-5287.
- [14] Liu GD, Zhang H, Wang L, et al. Molecular hydrogen regulates the expression of miR-9, miR-21 and miR-199 in LPS-activated retinal microglia cells [J]. *Int J Ophthalmol*, 2013, 6(3): 280-285.
- [15] Wan HY, Guo LM, Liu T, et al. Regulation of the transcription factor NF- κ B1 by microRNA-9 in human gastric adenocarcinoma[J]. *Mol Cancer*, 2010, 9: 16.
- [16] Okada Y, Kato M, Minakami H, et al. Reduced expression of flc-inhibitory protein (FLIP) and NF κ B is associated with death receptor-induced cell death in human aortic endothelial cells (HAECs)[J]. *Cytokine*, 2001, 15(2): 66-74.

(本文编辑: 王晓莉)