

• 论著 •

白虎人参汤联合复方薤白胶囊对重症肺部感染患者血清特异性微小 RNA 表达谱差异影响的研究

陆益民^{1,2}, 奚肇庆³

(1. 南京中医药大学第一临床医学院, 江苏 南京 210029 ;

2. 江苏大学附属昆山市第一人民医院呼吸科, 江苏 昆山 215300 ;

3. 南京中医药大学第一附属医院, 江苏 南京 210029)

【摘要】目的 观察白虎人参汤联合复方薤白胶囊治疗前后重症肺部感染患者外周血特异性血清微小 RNA (miRNA, miR) 表达谱的差异性。**方法** 选择 2012 年 1 月至 2013 年 12 月江苏大学附属昆山市第一人民医院呼吸科住院的重症肺部感染痰热腑实证患者 136 例, 在基础治疗的同时加用白虎人参汤〔石膏 30 g (打碎, 绵裹, 先下), 西洋参 4 g, 浙贝母 10 g, 柴胡 10 g, 黄芩 10 g, 炒山栀 10 g, 连翘 12 g, 金银花 10 g, 鸭跖草 15 g, 炙甘草 4 g〕联合复方薤白胶囊 (主要由薤白 12 g, 瓜蒌 12 g, 半夏 10 g, 黄连 3 g 组成) 治疗。用 Solexa 平台测序分析比较治疗前后患者外周血 miRNA 表达谱变化, 实时荧光定量-聚合酶链反应 (qRT-PCR) 验证外周血特异性 miRNA。绘制治疗前后重症肺部感染患者的受试者工作特征曲线 (ROC 曲线), 利用 ROC 曲线分析血清 miRNA 对联合治疗疗效的敏感度和特异度, 评估其临床价值。**结果** Solexa 平台测序检测提示, 加用白虎人参汤联合复方薤白胶囊治疗前后共 42 种 miRNA 出现 2 倍以上的差异表达; qRT-PCR 表明 miR-146a、miR-125b 和 miR-155 表达显著下降超过 10 倍, 提示其可能是特异性 miRNA。其中: miR-146a 的 ROC 曲线下面积 (AUC) = 0.81, 95%CI = 0.73 ~ 0.89; miR-125b 的 AUC = 0.77, 95% 可信区间 (95%CI) = 0.71 ~ 0.83; miR-155 的 AUC = 0.89, 95%CI = 0.83 ~ 0.95。通过选定的临床截断 (cut off) 值, 对 3 种血清 miRNA 的敏感度和特异度进行计算, miR-146a 为 63% 和 87%, miR-125b 为 53% 和 73%, miR-155 为 56% 和 83%。**结论** 加用白虎人参汤联合复方薤白胶囊治疗重症肺炎可使患者外周血 miRNA 表达谱发生显著变化, 其中 miR-146a、miR-125b 和 miR-155 可能是其特异性改变 miRNA。

【关键词】 白虎人参汤; 复方薤白胶囊; 重症肺炎; 微小 RNA

Effect of Baihu Renshen decoction combined with Fufang Xiebai capsules on serum micro RNA expression profiles in patients with severe pulmonary infection Lu Yimin*, Xi Zhaoqing. *The First Clinical Medical College of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu, China; Department of Respiratory Medicine, Kunshan First People's Hospital Affiliated to Jiangsu University, Kunshan 215300, Jiangsu, China

Corresponding author: Xi Zhaoqing, the First Affiliated Hospital of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu, China, Email: ksphlym@163.com

【Abstract】Objective To study the differences in expression profiles of peripheral blood specific serum micro RNA (miRNA) in the comparison between those before and after Baihu Renshen decoction combined with Fufang Xiebai capsules for treatment of patients with severe pneumonia. **Methods** 136 patients with severe pulmonary infection accompanied by heat-phlegm and sthenic-fu syndrome admitted in the Department of Respiratory Medicine of Kunshan First People's Hospital Affiliated to Jiangsu University from January 2012 to December 2013 were enrolled in the study. They were treated with basic treatment and Baihu Renshen decoction [gypsum 30 g (broken, wrapped in cotton cloth, firstly put in water to be boiled), American ginseng 4 g, fritillaria 10 g, bupleurum chinense 10 g, skullcap 10 g, fried gardenia (pittosperm root) 10 g, forsythia 12 g, honeysuckle 10 g, spiderwort grass (dayflower) 15 g, prepared licorice root 4 g] combined with Fufang Xiebai capsules [mainly composed of longstamen onion bulb (macrostem onion) 12 g, melon wilt (fructus trichosanthis) 12 g, pinellia 10 g, coptis chinensis 3 g]. The changes of serum miRNA expression profiles before and after treatment were analyzed by Solexa sequencing. The peripheral blood serum specific miRNAs were confirmed by real-time fluorescent quantitation-polymerase chain reaction (qRT-PCR). Before and after treatment, the receiver operating characteristic curve (ROC curve) of patients with severe pulmonary infection was drawn, and the ROC curve was used to analyze the sensitivity and specificity of serum miRNA to the efficacy of the combination therapy and evaluate its clinical value. **Results** Solexa sequencing suggested that 42 kinds of miRNA appear to have over 2-fold in difference in the comparison between profiles before and after Baihu Renshen decoction combined with Fufang Xiebai capsules treatment. Real-time qRT-PCR confirmed miR-146a, miR-125b and miR-155 expressions were significantly decreased over 10 fold, suggesting that they should be specific miRNAs. The area under the ROC curve (AUC) of miR-146a was 0.81,

95% confidence interval (95%CI) = 0.73 - 0.89, miR-125b AUC = 0.77, 95%CI = 0.71 - 0.83 and miR-155 AUC = 0.89, 95%CI = 0.83 - 0.95. Then, through selected clinical truncated (cut off) value, the sensitivity and specificity of three kinds of serum miRNA were calculated: 63% and 87% of miR-146a, 53% and 73% of miR-125b and 56% and 83% of miR-155. **Conclusion** Addition of Baihu Renshen decoction combined with Fufang Xiebai capsules on the basic treatment can induce significant changes of peripheral blood serum miRNA expression profiles in patients with severe pneumonia, and miR-146a, miR-125b and miR-155 among miRNAs could be their specific changes.

【Key words】 Baihu Renshen decoction; Fufang Xiebai capsule; Severe pneumonia; micro RNA

重症肺炎是老年住院患者常见的感染,也是重症监护病房(ICU)治疗的难点,有很高的发病率和病死率^[1]。本课题组前期的研究发现,白虎人参汤合用复方薤白胶囊可有效控制重症肺炎患者高热,改善临床症状,缩短住院时间。近年来研究表明,中药可调节外周血微小RNA(miRNA)的变化^[2]。miRNA是长约22个核苷酸的单链小分子RNA,具有表观遗传作用,可以调控20%~30%的基因表达,从而调节人体生理和病理等过程^[3]。对外周血miRNA表达谱的分析被认为可用于多种疾病的早期诊断和监测^[4]。而白虎人参汤联合复方薤白胶囊治疗对重症肺炎患者外周血miRNA表达谱变化的影响至今尚未见报道。本研究探讨重要复合制剂对外周血miRNA的影响及其作为疗效监测指标的可能性。

1 资料及方法

1.1 病例选择

1.1.1 诊断标准:重症肺炎的诊断参照1999年中华医学会呼吸病学分会制定的标准^[5]。

1.1.2 纳入标准:年龄19~75岁;符合西医重症肺炎诊断标准和痰热腑实证辨证标准者;签署知情同意书者。

1.1.3 排除标准:①年龄<18岁或>75岁者;②已知对本复方中各种重要成分有过敏者;③有严重脑、心、肾、肝、内分泌系统和造血系统等原发性疾病者;④有酗酒、药物滥用史者;⑤正在参与其他临床药物试验研究的受试者;⑥不符合西医重症肺炎诊断标准或痰热腑实证辨证标准者。

1.1.4 一般资料:选择2012年1月至2013年12月江苏大学附属昆山市第一医院呼吸科收治的符合纳入标准的136例重症肺炎患者,其中男性74例,女性62例;年龄(53.60±3.17)岁。两组患者性别、年龄比较差异均无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。

1.2 治疗方法:在基础治疗的同时,每日服用白虎人参汤加减,同时服用复方薤白胶囊。

1.2.1 白虎人参汤加减:白虎汤根据伤寒论原方剂

量及比例配制。根据柯雪帆等^[6]的考证及剂量换算,东汉1两为15.625 g,1斤为250 g,1合为20 mL。所以本研究中所用方剂为:石膏30 g(打碎,绵裹,先下),西洋参4 g,浙贝母10 g,柴胡10 g,黄芩10 g,炒山栀10 g,连翘12 g,金银花10 g,鸭跖草15 g,炙甘草4 g;水煎服,每日1剂,早晚饭后0.5 h服用,重症患者每日2剂,7 d为1个疗程。腹胀便秘加大黄、枳实;意识烦躁加郁金、胆南星。

1.2.2 复方薤白胶囊:复方薤白胶囊由南京中医药大学第一附属医院药剂科制剂部生产(批号:101025)。组方:薤白12 g,瓜蒌12 g,半夏10 g,黄连3 g等,经水蒸气蒸馏及醇提,药液经真空干燥后的浸膏细粉和挥发油加适当辅料制成胶囊,每粒350 mg。每日3次,每次4粒,7 d为1个疗程。

所有中药购自北京同仁堂沈阳分店。药物按照原文所述方法煎煮,待米熟汤成。

1.3 观察指标及方法:在治疗前和治疗后3 d空腹采集外周血,室温下1 500 g离心5 min,将收集的血清4℃下再离心5 min(12 000 g),离心后收集上清液保存于-70℃冰箱。

1.3.1 血清总RNA的提取:取10 mL血清,将其中250 μL血清放入1.5 mL已除酶的小离心管(EP管)中,加入250 μL焦碳酸二乙酯(DEPC)稀释,先后加入250 μL水饱和酚、250 μL三氯甲烷,震荡混匀,静置,离心收集上清液,加入上清液体积1/10的醋酸钠溶液和2倍体积的异丙醇,震荡,离心去除上清液,留取RNA沉淀物,加入75%乙醇1 mL,涡旋混匀离心后,留取沉淀,加入DEPC水20 mL,溶解RNA沉淀。待RNA完全溶解之后放入-70℃低温冰箱留存待用。

1.3.2 Solexa测序及生物信息学分析:总RNA加入经15%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,将长度在17~24 nt的RNA切胶回收,纯化后的小分子RNA分别经3'接头和5'接头连接后经实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)扩增,形成cDNA文库用于测序。通过Solexa测序获得35 nt序列,通过去低质量、去接头、统计序列长度分布、去污染等过程完

成初级分析。将初级分析得到的序列进行进一步分类注释,剩余的小分子 RNA 序列与 miRNA 数据库中基因序列进行对比,得到样品中已知 miRNA 的信息,利用 Sanger microRNA 序列数据库 (miRNABase) 确定 miRNA 特征^[7]。

1.3.3 qRT-PCR 检测 miRNA: 使用华安平康生物公司提供的反转录引物、以及 PCR 正向引物和负向引物,取 1 μL 反转录引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 加 9 μL RNase Free H_2O 配制成 1 $\mu\text{mol/L}$ 的工作液。反转录条件: 30 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 42 $^{\circ}\text{C}$ 20 min (反转录反应), 85 $^{\circ}\text{C}$ 5 min (酶的失活反应), 4 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。取 1 μL 反应产物加入到下一步的 RT-PCR 反应体系,反应条件如下: 预变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 再执行 (95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s) 共 40 个循环。PCR 实验结束后,利用 ABI 7300 系统软件分析,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法计算 miRNA 的相对表达量。

1.4 统计学方法: 采用 SPSS 15.0 统计软件分析数据,计量数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用方差分析,绘制治疗前后重症肺部感染患者的受试者工作特征曲线 (ROC 曲线),利用 ROC 曲线分析血清 miRNA 对联合治疗疗效的敏感度和特异度,评估其临床价值, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 高通量测序检测联合治疗前后外周血 miRNA 变化 (图 1): 采用通用引物逆转录总 miRNA 构建患者治疗前后 cDNA 文库,然后进行 PCR 扩增。扩增产物的长度约为 100 bp,将扩增的产物经 Solexa 平台测序,通过与最新的 Sanger miRNA 数据库人成熟的 miRNA 2578 条已知序列进行比对,选取匹配长度 ≥ 16 nt, 碱基错配数不大于 1, 并且重复测得

2 次以上的 miRNA。通过聚类分析,结果提示治疗前后差异 2 倍以上的 miRNA 共 42 种 (红色代表表达量高,绿色代表表达量低)。

2.2 qRT-PCR 检验联合治疗前后外周血 miRNA 变化 (图 2): 运用 qRT-PCR 技术对高通量 RT-PCR 初筛的 36 种 miRNA 进行复筛。结果显示,42 种 miRNA 中只有 miR-146a, miR-125b 和 miR-155 在高热患者治疗后血清中表达存在显著下降超过 10 倍,提示 miR-146a, miR-125b 和 miR-155 可能是联合治疗组疗效的特异性 miRNA。

2.3 ROC 曲线分析疗效的特异度和敏感度 (图 3): 分别绘制 3 种 miRNA 和联合治疗组疗效的 ROC 曲线,结果显示,miR-146a ROC 曲线下面积 (AUC) = 0.81, 95% 可信区间 (95%CI) = 0.73 ~ 0.89, miR-125b 的 AUC = 0.77, 95%CI = 0.71 ~ 0.83, miR-155 的 AUC = 0.89, 95%CI = 0.83 ~ 0.95。随后,选定临床截断值 (cut off 值), 得出 3 种 miRNA 的敏感度和特异度, miR-146a 为 63% 和 87%, miR-125b 为 53% 和 73%, miR-155 为 56% 和 83%。

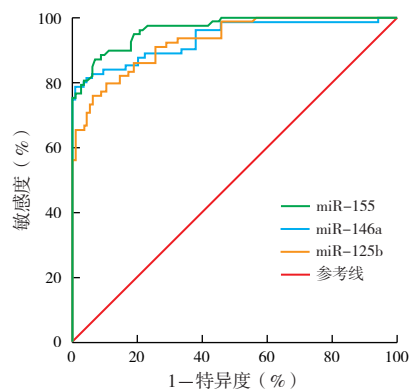
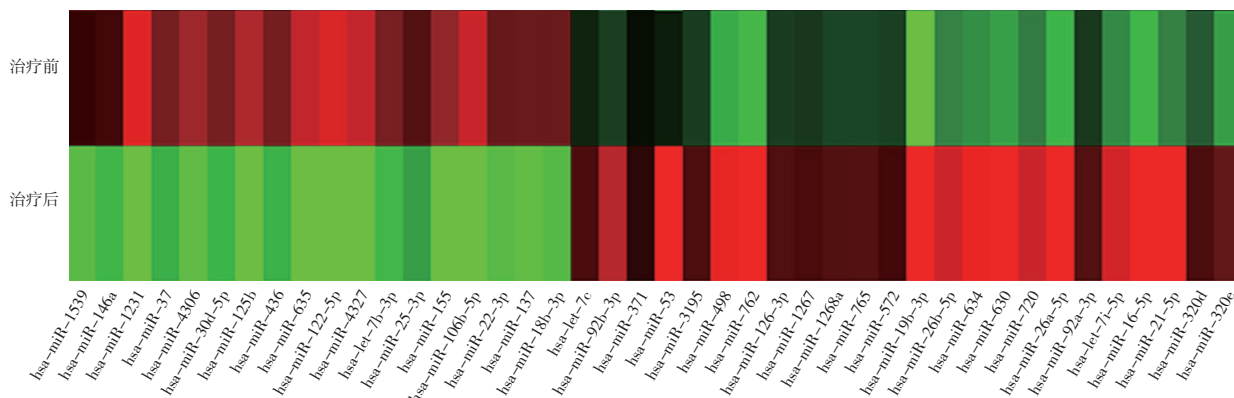


图 3 重症肺部感染患者血清特异性 miRNA 的 ROC 曲线



出现 2 倍以上差异表达的 miRNA

图 1 高通量测序检测加用白虎人参汤联合复方薤白胶囊治疗前后患者外周血 miRNA 变化

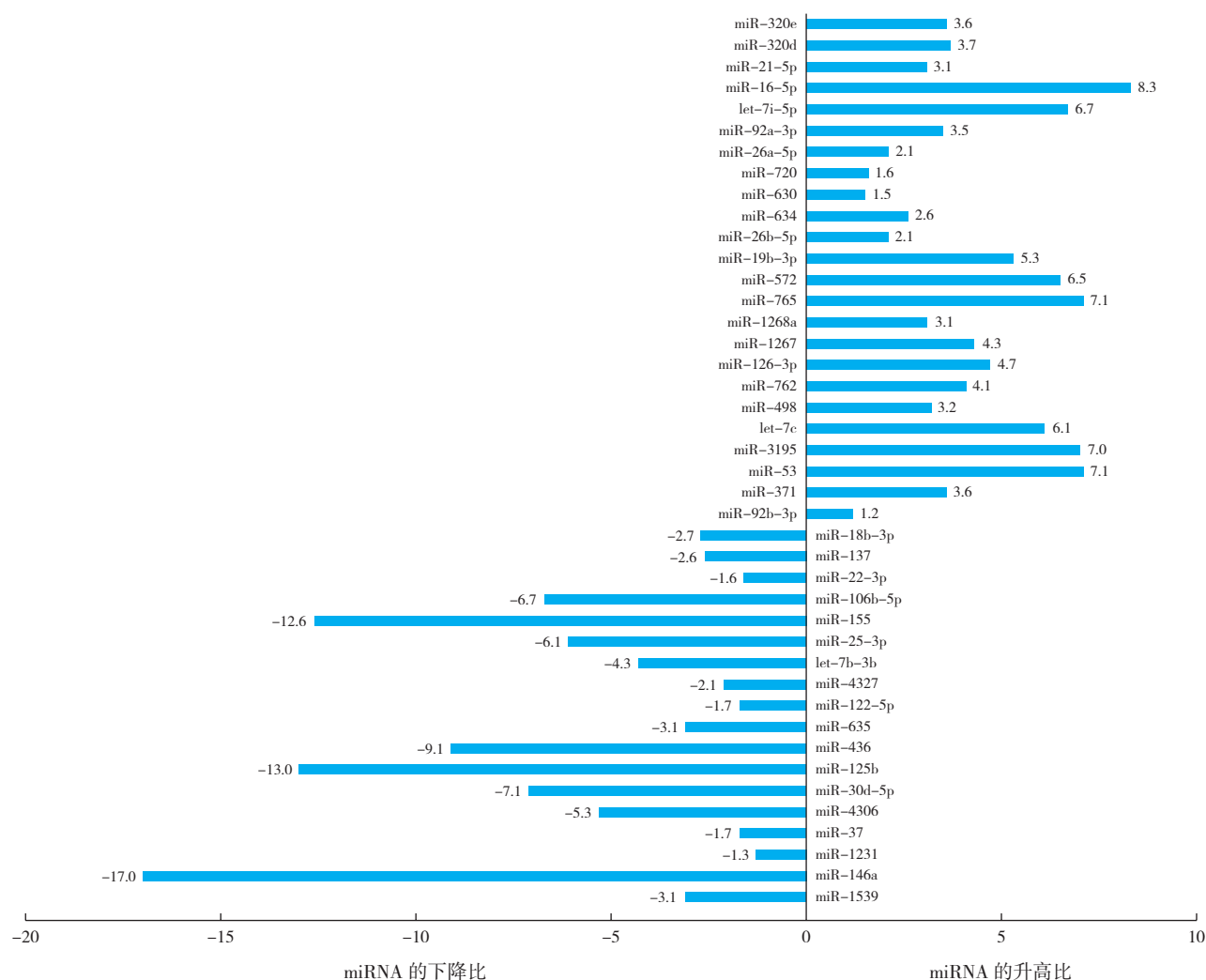


图 2 qRT-PCR 检测重症肺炎患者联合治疗前后外周血 miRNA 的变化

3 讨论

重症肺部感染是指伴严重中毒症状或有并发症的肺部感染^[1,7-8],是呼吸科最常见的难治疾病之一,根据致病菌获得环境的不同将其分为重症医院获得性肺炎和重症社区获得性肺炎^[9],常伴持续性高热,可累及多个器官,病情危重、进展快、病死率高,是具有流行性和潜在生命危险的感染性疾病,其发病率和病死率随着年龄的增加而上升,成为重要的致死原因之一,其中重症社区获得性肺炎病死率可高达 50%^[10],而重症医院获得性肺炎病死率可达 70%^[11]。近年来应用中医学理论治疗重症肺炎成为研究热点,并取得一定的成果^[12]。本研究结果表明,基础治疗加用白虎加人参汤联合复方薤白胶囊可有效缓解重症肺炎患者的持续高热,控制肺部感染症状,较基础治疗组疗效显著。

近期研究证实,部分中药及中药活性成分对 miRNA 具有广泛调节作用,是其发挥治疗作用的新

机制^[13]。目前中药及其活性成分对 miRNA 的调节作用主要集中在肿瘤相关 miRNA 的调节,如姜黄素可以通过 miR-15a 和 miR-16 介导对 Bcl-2 的调节来抑制抗乳腺癌细胞生长,促进肿瘤细胞凋亡^[14]。表没食子儿茶素没食子酸酯可通过上调的 miR-16 抑制靶基因 Bcl-2 表达,诱导肝细胞癌 HepG2 细胞凋亡^[15]。大豆异黄酮能够通过上调 miR-200 抑制胰腺癌细胞生长^[16]。Bae 等^[17]研究发现,用白藜芦醇干预肺腺癌细胞 A549 后,有 71 种 miRNA 发生显著变化。Dhar 等^[18]研究表明,用白藜芦醇作用前列腺癌细胞后 miRNA-17-92, miRNA-106ab 等癌基因型的 miRNA 明显下调。曾振国等^[19]研究发现中药参附注射液可以呈剂量依赖性地上调肺泡巨噬细胞 miRNA-146a 的表达水平,推测 miRNA-146a 参与了参附注射液的抗炎过程。但至今关于加用白虎加人参汤联合复方薤白胶囊可导致重症肺炎患者外周血 miRNA 表达谱变化的研究尚未见报道。我

们抽取重症肺部感染患者加用白虎加人参汤联合复方薤白胶囊治疗前后外周血,提取总 RNA 后利用 Solexa 平台进行测序,通过与最新的 Sanger miRNA 数据库对比分析,发现共有 42 种 miRNA 表达谱出现 2 倍以上的差异,进一步用 qRT-PCR 验证表明,仅 miR-146a, miR-125b 和 miR-155 的 miRNA 在治疗前后发生 10 倍以上显著差异性改变,提示其可能是白虎加人参汤联合复方薤白胶囊治疗后外周血特异性改变的 miRNA。

最早研究认为血清 miRNA 可作为肿瘤的诊断指标。诊断方法准确性的评价指标一般可利用 AUC 计算,通过比较分析这些指标,可协助临床一线医生筛选出最佳诊断方案。利用 ROC 曲线分析血清 miRNA 对联合治疗组疗效的特异度和敏感度,可以评估其临床价值。Song 等^[20]研究发现,miR-221、miR-376c 和 miR-744 诊断胃癌的敏感性为 82.4%,特异性为 58.8%。Gilad 等^[21]研究表明,外周血 miR-16 及 miR-125b 诊断结直肠癌的敏感性高达 91%,特异性达 72%。Mitchell 等^[22]发现,miR-141 对前列腺癌诊断的敏感性为 60%,特异性为 100%。我们进一步利用 AUC 来分析 miR-146a, miR-125b 和 miR-155 作为加用白虎加人参汤联合复方薤白胶囊治疗的观察指标的敏感性及其特异性发现,miR-146a 的敏感性为 63%,特异性为 87%;miR-125b 的敏感性为 53%,特异性为 73%;miR-155 的敏感性为 56%,特异性为 83%。

综上,通过本研究发现,加用白虎加人参汤联合复方薤白胶囊辅助治疗重症肺炎可导致患者外周血 miRNA 表达谱发生显著变化,其中 miR-146a, miR-125b 和 miR-155 可能是其特异性改变 miRNA。

参考文献

- [1] 王平,王玺,张丽涓,等.低分子肝素对老年重症肺炎患者预后的影响[J].中华危重病急救医学,2013,25(12):734-737.
- [2] 李沧海,姜廷良.微小核糖核酸在中药研究中的应用[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(6):279-281.
- [3] 陈洁,林海建,潘光堂,等.利用深度测序技术检测玉米根系和叶片中已知的 microRNAs [J].遗传,2010,32(11):1175-1186.
- [4] 金儿,马胜利.诊断肿瘤新型标志物血清 miRNA [J].国际肿瘤学杂志,2012,39(9):678-679.
- [5] 中华医学会呼吸病学分会.医院获得性肺炎诊断和治疗指南(草案)[J].中华结核和呼吸杂志,1999,22(4):201.
- [6] 柯雪帆,赵章忠,张玉萍,等.《伤寒论》和《金匮要略》中的药物剂量问题[J].上海中医药杂志,1983,17(12):36-38.
- [7] 周明华.痰热清注射液加抗菌药物治疗老年性肺炎 50 例疗效观察[J].中国中西医结合急救杂志,2013,20(4):200.
- [8] 刘琪,王建国,马彦平,等.疏风宣肺和解表清里方药对流感病毒性肺炎小鼠 Toll 样受体通路影响的研究[J].中华危重病急救医学,2014,26(5):321-324.
- [9] 何彦琪.30 例重症肺炎的临床特点及死亡危险因素分析[J/CD].中华肺部疾病杂志(电子版),2011,4(6):479-481.
- [10] Niederman MS, Mandell LA, Anzueto A, et al. Guidelines for the management of adults with community-acquired pneumonia. Diagnosis, assessment of severity, antimicrobial therapy, and prevention [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2001, 163(7): 1730-1754.
- [11] American Thoracic Society, Infectious Diseases Society of America. Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2005, 171(4): 388-416.
- [12] 陈华尧,吴同启,王克俭,等.通腑法治疗重症肺炎实热证的临床研究[J].中国中西医结合急救杂志,2013,20(5):279-282.
- [13] 郑思道,吴红金,刘宇娜. microRNA 在现代中医药研究中的作用和意义[J].中西医结合心脑血管病杂志,2012,10(7):857-860.
- [14] Yang J, Cao Y, Sun J, et al. Curcumin reduces the expression of Bcl-2 by upregulating miR-15a and miR-16 in MCF-7 cells [J]. Med Oncol, 2010, 27(4): 1114-1148.
- [15] Tsang WP, Kwok TT. Epigallocatechin gallate up-regulation of miR-16 and induction of apoptosis in human cancer cells [J]. J Nutr Biochem, 2010, 21(2): 140-146.
- [16] Li Y, VandenBoom TG 2nd, Kong D, et al. Up-regulation of miR-200 and let-7 by natural agents leads to the reversal of epithelial-to-mesenchymal transition in gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells [J]. Cancer Res, 2009, 69(16): 6704-6712.
- [17] Bae S, Lee EM, Cha HJ, et al. Resveratrol alters microRNA expression profiles in A549 human non-small cell lung cancer cells [J]. Mol Cells, 2011, 32(3): 243-249.
- [18] Dhar S, Hicks C, Levenson AS. Resveratrol and prostate cancer: promising role for microRNAs [J]. Mol Nutr Food Res, 2011, 55(8): 1219-1229.
- [19] 曾振国,龚洪翰,李勇,等.参附注射液对脂多糖诱导的肺泡巨噬细胞微小 RNA-146a 表达的影响[J].中国危重病急救医学,2012,24(3):166-169.
- [20] Song MY, Pan KF, Su HJ, et al. Identification of serum microRNAs as novel non-invasive biomarkers for early detection of gastric cancer [J]. PLoS One, 2012, 7(3): e33608.
- [21] Gilad S, Meiri E, Yogev Y, et al. Serum microRNAs are promising novel biomarkers [J]. PLoS One, 2008, 3(9): e3148.
- [22] Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(30): 10513-10518.

(收稿日期:2014-05-26)

(本文编辑:李银平)

• 读者 • 作者 • 编者 •

本刊对标注染色方法及放大倍数的有关要求

本刊从 2012 年 1 期起,凡文章内及图片说明中标注的染色方法及放大倍数,均使用“低倍放大”、“中倍放大”或“高倍放大”表示。图片放大倍数低于 200 倍为低倍,等于 200 倍为中倍,大于 200 倍为高倍,例如“HE ×40”将标注为“HE 低倍放大”,不再标注具体放大倍数。