

论著·临床研究

CREB在反复喘息患儿中的表达及对ORMDL3基因表达的影响

金蕊 张振兴 朱亮华 庄丽丽 陈筱青

(南京医科大学第一附属医院儿科, 江苏 南京 210029)

[摘要] **目的** 探讨环磷腺苷效应元件结合蛋白(CREB)在3岁以下反复喘息患儿中的表达水平及其对血清类黏蛋白1样蛋白3基因(ORMDL3)表达水平的影响。**方法** 选取2017年6月至2019年6月就诊的3岁以下反复喘息儿童36例为病例组,另选取行健康体检的24例儿童为健康对照组,使用荧光定量PCR法检测外周血CREB的表达水平。培养人支气管上皮细胞(BEAS-2B),使用双荧光素酶报告基因和荧光定量PCR法检测过表达和siRNA干扰CREB对BEAS-2B细胞ORMDL3基因启动子活性及mRNA表达水平的影响。**结果** 病例组CREB表达水平高于健康对照组($P<0.001$)。在BEAS-2B细胞中,过表达CREB能上调ORMDL3基因的启动子活性及mRNA表达水平($P<0.05$);siRNA干扰CREB的表达后ORMDL3基因的启动子活性及mRNA表达水平均降低($P<0.05$)。**结论** 反复喘息患儿CREB表达增加,其可能通过调控ORMDL3基因的表达参与了反复喘息的发病。**[中国当代儿科杂志, 2020, 22(9): 980-983]**

[关键词] 环磷腺苷效应元件结合蛋白;ORMDL3;反复喘息;儿童

Expression of CREB in children with recurrent wheezing and its effect on ORMDL3 gene expression

JIN Rui, ZHANG Zhen-Xing, ZHU Liang-Hua, ZHUANG Li-Li, CHEN Xiao-Qing. Department of Pediatrics, First Affiliated Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China (Chen X-Q, Email: chenxq2002@foxmail.com)

Abstract: Objective To study the expression level of cAMP response element-binding protein (CREB) in children with recurrent wheezing under three years of age and its effect on the expression of the serum orosomucoid 1-like protein 3 (ORMDL3) gene. **Methods** Thirty-six children with recurrent wheezing under three years of age who visited the hospital from June 2017 to June 2019 were selected as the recurrent wheezing group. Twenty-four healthy children from physical examination were selected as the control group. The CREB expression level in peripheral blood was measured by quantitative real-time PCR. Human bronchial epithelial cells (BEAS-2B) were cultured, and dual-luciferase reporter assay and quantitative real-time PCR were used to investigate the effects of overexpression and siRNA interference of CREB on the promoter activity and mRNA expression of the ORMDL3 gene in the BEAS-2B cells. **Results** The expression level of CREB in the recurrent wheezing group was significantly higher than that in the control group ($P<0.001$). In BEAS-2B cells, overexpression of CREB significantly up-regulated the promoter activity and mRNA expression of the ORMDL3 gene ($P<0.05$), while siRNA interference of CREB significantly reduced the promoter activity and mRNA expression of the ORMDL3 gene ($P<0.05$). **Conclusions** The expression of CREB is increased in children with recurrent wheezing, and CREB may be involved in the pathogenesis of recurrent wheezing by regulating expression of the ORMDL3 gene. **[Chin J Contemp Pediatr, 2020, 22(9): 980-983]**

Key words: cAMP response element-binding protein; ORMDL3; Recurrent wheezing; Child

喘息是婴幼儿时期常见的呼吸道症状之一, 近年来, 全球范围内喘息性疾病的发病率逐年上升, 尤其是儿童, 已经成为危害公共健康的常见疾病之一^[1]。喘息的发生与特应性体质、病毒

[收稿日期] 2020-03-26; [接受日期] 2020-08-04

[基金项目] 江苏省科教强卫工程青年医学人才项目(QNRC2016615); 江苏省妇幼健康重点人才项目(FRC201736)。

[作者简介] 金蕊, 女, 博士, 副主任医师。

[通信作者] 陈筱青, 女, 主任医师。Email: chenxq2002@foxmail.com。

感染及过敏原等多种因素相关。有相当一部分反复喘息患儿日后可发展为儿童哮喘，提示二者密切相关^[2]。在哮喘和喘息的发病中，多种哮喘相关的基因发挥了重要作用。环磷腺苷效应元件结合蛋白(CREB)是CREB/ATF家族成员之一，作为转录因子，它可与含CRE模序的基因特异性结合，激活相应基因的转录。类黏蛋白1样蛋白3基因(*ORMDL3*)是哮喘易感基因，它与儿童哮喘及反复喘息密切相关^[3]。本课题组前期研究发现*ORMDL3*基因的启动子中含CRE模序。本研究首先检测了急性发作期反复喘息患儿体内CREB的表达水平，然后在人支气管上皮细胞(BEAS-2B)中检测过表达和干扰CREB的表达对*ORMDL3*基因启动子和mRNA表达的影响，旨在探讨CREB在儿童反复喘息发病中的作用机制。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取在我院儿科就诊的3岁以下急性发作期反复喘息患儿36例为病例组，其中男27例，女9例；年龄8~34个月，平均年龄 20 ± 8 个月。反复喘息定义为患儿生后至少有3次及以上的喘息发作^[2]，并除外先天性气管及支气管发育畸形、气管异物、先天性心脏病、纵隔肿物等其他引起喘息的疾病，各疾病诊断标准均符合《诸福棠实用儿科学》第8版的诊断标准^[4]。另选取生后没有特异性疾病史，包括药物/食物过敏、变应性鼻炎及湿疹等，以及入组前4周内没有呼吸系统感染疾病史的健康儿童24例为健康对照组，其中男13例，女11例；年龄7~35个月，平均年龄 19 ± 9 个月。本研究获得南京医科大学第一附属医院伦理委员会批准(2008伦审第1102号)，并征得患儿家长同意及签署同意书。

1.2 材料

荧光素酶报告基因质粒pGL3-Basic、内参参照pRL-TK质粒和双荧光素酶报告基因检测试剂盒(美国Promega公司)；*ORMDL3*核心启动子质粒(pGL-84/+58)由本课题组构建，pcDNA-FCREB质粒(美国Salk生物研究院Marc Montminy博士惠赠)，pcDNA3.1(+)对照质粒(美国Emory大学Muxiang Zhou博士惠赠)，BEAS-2B细胞(南京大学医学院王宏伟老师惠赠)；感受

态大肠杆菌DH5 α (德国QIAGEN公司)；DMEM细胞培养基、LipofectamineTM2000和TRIzol试剂(美国Invitrogen公司)；胎牛血清(杭州四季青生物有限公司)；总RNA提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司)；荧光定量PCR试剂盒(大连TaKaRa公司)；抗CREB和GAPDH抗体(美国Sant Cruz公司)；PVDF膜(美国Schleicher & Schuell Bioscience公司)；CREB siRNA: 5'-UACAGCUGGCUAACAAUGG-3'，对照siRNA: 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGU-3'，由上海英骏生物有限公司设计与合成。

1.3 基因表达水平分析

(1) 总RNA的提取及cDNA的合成

取两组儿童血常规剩余静脉血250 μ L(反复喘息患儿入院第1天采集，健康对照组儿童为体检当天采集)或转染后24h的BEAS-2B细胞，提取总RNA后逆转录合成cDNA，按照试剂盒说明书步骤进行，-80 $^{\circ}$ C保存，分别用于检测CREB mRNA和*ORMDL3* mRNA的表达。

(2) 引物设计与合成

根据GenBank中CREB和*ORMDL3*的基因序列，使用Primer Premier 5.0软件设计特异引物。CREB上游引物: 5'-ATCTGCTCCCACCGTAACTCTAGTA-3'，下游引物: 5'-TTCTTCAATCCTTGGCACTCCTGGT-3'。*ORMDL3*上游引物: 5'-GCAAGGCGAGGCTGCTAACCCACT-3'，下游引物: 5'-GGGATAAGCACGCTCATCAGGG-3'。内参GAPDH上游引物: 5'-AGGTCGGAGTCAACGGAT-3'，下游引物: 5'-TCCTGGAAGATGCTGATG-3'。引物由上海英骏生物有限公司合成。

(3) 荧光定量PCR反应

反应体系: SYBR Green 1染料5 μ L、上游引物0.2 μ L、下游引物0.2 μ L、cDNA样品1 μ L、RNase Free ddH₂O 3.6 μ L。反应条件为: 95 $^{\circ}$ C预变性5 min; 90 $^{\circ}$ C变性15 s, 60 $^{\circ}$ C退火15 s, 72 $^{\circ}$ C延伸1 min, 40个循环。以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 分析计算目的基因mRNA相对表达量。

1.4 细胞培养和转染

BEAS-2B细胞中加入含10%胎牛血清的DMEM高糖培养液，置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂的细胞培养箱中培养。转染前24 h，将生长良好的BEAS-2B细胞接种于96孔细胞培养板(2.5 \times 10⁴个细胞/孔)。用LipofectamineTM2000进行瞬时转染，对于

siRNA 干扰实验, 将 CREB siRNA (15 pmol/ 2.5×10^4 个细胞) 或对照 siRNA, 以及 100 ng 启动子报告质粒 (pGL-84/+58) 和 4 ng pRL-TK 质粒共转染到 BEAS-2B 细胞中。对于过表达实验, 将 pcDNA-FCREB 质粒或对照质粒, 以及 100 ng 启动子报告质粒 (pGL-84/+58) 和 4 ng pRL-TK 质粒共转染到 BEAS-2B 细胞中, 每组平行设 3 个复孔, 并在 24 h 后收获细胞。每个实验独立重复 3 次。

1.5 启动子活性分析

弃去转染后细胞的培养基, 用 PBS 洗涤 2 次后加入 30 μ L 裂解液, 摇床上震荡 15 min 后, 离心取上清液 20 μ L, 按试剂盒说明书使用 Dual Reporter 分析系统进行荧光素酶活性检测。

1.6 Western blot 检测 CREB 表达

将转染 siRNA 或过表达质粒 24 h 的 BEAS-2B 细胞提取总蛋白; 行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 100 V 电转移 60 min, 加入 5% 阻断剂在室温下、摇床中孵育 1 h; 滴加 1:200 稀释的 CREB 一抗在摇床中 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 再滴加 1:2500 稀释的 HRP 标记的二抗在摇床中 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 最后行化学发光检测。

1.7 统计学分析

应用 SPSS 22.0 统计软件对数据进行统计学分析。符合正态分布的计量资料采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间比较采用两样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床一般资料

病例组中男孩的比例明显高于女孩 (男:女为 3:1)。病例组中, 喘息发生在 1~3 月 4 例 (11%), 4~6 月份 12 例 (33%), 7~9 月份 7 例 (19%), 10~12 月份 13 例 (36%), 可见喘息的急性发作存在季节上的差异 ($\chi^2=8.001, P=0.046$)。

2.2 两组儿童 CREB mRNA 的表达水平比较

病例组 CREB mRNA 的表达水平 (7.3 ± 1.7) 明显高于健康对照组 (4.1 ± 1.2), 差异有统计学意义 ($t=9.76, P < 0.001$)。

2.3 siRNA 干扰 CREB 的表达对 ORMDL3 启动子活性及 mRNA 表达的影响

在 BEAS-2B 细胞中, Western blot 检测结果显

示 siRNA 干扰 CREB 的表达后, CREB 蛋白表达量 (0.0523 ± 0.0001) 较对照组 (0.1823 ± 0.0021) 显著下降 ($t=5.608, P < 0.05$, 图 1); 双荧光素酶报告基因结果显示 siRNA 干扰 CREB 的表达后, ORMDL3 基因的启动子活性 (62 ± 9) 较对照组 (128 ± 14) 明显降低 ($t=11.82, P < 0.001$); 荧光定量 PCR 结果显示 siRNA 干扰 CREB 的表达后 ORMDL3 mRNA 表达水平 (2.2 ± 0.4) 亦较对照组 (3.6 ± 0.8) 明显降低 ($t=4.56, P < 0.001$)。

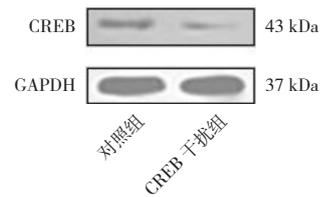


图 1 Western blot 检测 siRNA 干扰对 CREB 蛋白表达的影响

2.4 过表达 CREB 对 ORMDL3 启动子活性及 mRNA 表达的影响

在 BEAS-2B 细胞中, Western blot 检测结果显示过表达 CREB 后, CREB 蛋白表达量 (0.563 ± 0.013) 较对照组 (0.171 ± 0.003) 显著增高 ($t=11.37, P < 0.01$, 图 2); 双荧光素酶报告基因结果显示过表达 CREB 后, ORMDL3 基因的启动子活性 (15.7 ± 2.1) 较对照组 (11.3 ± 2.3) 明显增高 ($t=4.29, P < 0.001$); 荧光定量 PCR 结果显示过表达 CREB 后 ORMDL3 mRNA 表达水平 (5.6 ± 0.6) 亦较对照组 (4.5 ± 0.9) 明显增高 ($t=3.02, P < 0.01$)。

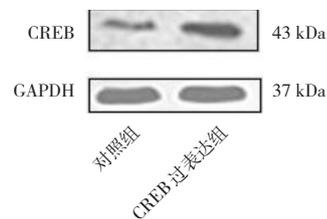


图 2 Western blot 检测过表达 CREB 后 CREB 蛋白的表达变化

3 讨论

哮喘和反复喘息的发病机制非常复杂, 各种

哮喘相关的易感基因在其中发挥了重要作用^[5]。在本研究中,我们收集了急性发作期住院的反复喘息患儿和健康对照组儿童的外周血,检测了外周血中 CREB 的表达水平。发现在急性发作期反复喘息患儿外周血中, CREB 的表达水平较健康对照组明显增高。本课题组前期的研究发现,与儿童哮喘发病关联性最密切的易感基因 *ORMDL3* 的核心启动子区存在 CRE 模序^[6]。为了解 CREB 是否通过调控 *ORMDL3* 的表达来参与哮喘及反复喘息的发病,我们进行了 CREB 的过表达和干扰实验,以了解 CREB 对 *ORMDL3* 启动子及 mRNA 表达的影响。实验结果显示,在 BEAS-2B 细胞中, siRNA 干扰 CREB 的表达后, *ORMDL3* 启动子活性及 mRNA 表达水平均明显降低,过表达 CREB 后, *ORMDL3* 启动子活性及 mRNA 表达水平均增高。

CREB 属于包含亮氨酸拉链的转录因子家族成员之一,位于细胞核内,可以作为细胞内第三信使。CREB 一般以二聚体的形式与基因转录起始位点附近启动子区域的“TGACGTAG”或相似的序列结合,从而调控许多相关基因的转录过程^[7]。在免疫和炎症反应相关的基因中,许多基因都受到 CREB 的调控,包括白细胞介素 (IL) -13、IL-2、IL-10、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、环氧合酶-2 等^[8-11]。有研究发现,在人肺成纤维细胞中, CREB 能够调节 TNF- α 诱导的 GM-CSF 的分泌^[12]。目前哮喘的治疗方案中, β_2 受体激动剂仍是急性发作期必需的药物之一。有研究发现 β_2 受体激动剂能够激活 CREB,长期使用 β_2 受体激动剂时, CREB 与 β_2 受体的功能下调密切相关,说明 CREB 与哮喘的治疗也相关^[13]。从启动子水平来讲,干扰 CREB 的表达降低 *ORMDL3* 启动子活性程度大于 *ORMDL3* mRNA 水平的降低,过表达 CREB 后,升高 *ORMDL3* 启动子活性程度也是大于 *ORMDL3* mRNA 水平的升高。这种启动子活性改变和转录水平改变的不一致,一些可能的原因包括:存在基因转录后的调控,比如一些 microRNA 可以结合于相关基因 3'-非翻译区引起该基因 mRNA 的降解等^[14]。

综上所述, CREB 可能通过调节儿童哮喘相关基因 *ORMDL3* 的表达参与反复喘息的发病。后续我们可进一步研究 CREB 是否能够调节 *ORMDL3* 的功能,进而改变其在哮喘和反复喘息中的作用,以及与诊断、治疗和反复喘息预后的关系等。

[参 考 文 献]

- [1] Akinbami LJ, Simon AE, Schoendorf KC. Trends in allergy prevalence among children aged 0-17 years by asthma status, United States, 2001-2013[J]. J Asthma, 2016, 53(4): 356-362.
- [2] 杨燕珍,蔡梦云,张宝忠,等.尘螨阳性婴幼儿首次喘息后反复喘息发作的危险因素[J].中国当代儿科杂志,2016,18(12): 1259-1263.
- [3] Zhang Y, Willis-Owen SAG, Spiegel S, et al. The *ORMDL3* asthma gene regulates ICAM1 and has multiple effects on cellular inflammation[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2019, 199(4): 478-488.
- [4] 江载芳,申昆玲,沈颖.诸福棠实用儿科学[M].第8版.北京:人民卫生出版社,2015:706-2556.
- [5] Schedel M, Michel S, Gaertner VD, et al. Polymorphisms related to *ORMDL3* are associated with asthma susceptibility, alterations in transcriptional regulation of *ORMDL3*, and changes in TH2 cytokine levels[J]. J Allergy Clin Immunol, 2015, 136(4): 893-903.e14.
- [6] 金蕊.人 *ORMDL3* 基因的转录调控研究[D].南京:南京医科大学,2012.
- [7] Andrews CS, Miyata M, Susuki-Miyata S, et al. Nontypeable haemophilus influenzae-induced MyD88 short expression is regulated by positive IKK β and CREB pathways and negative ERK1/2 pathway[J]. PLoS One, 2015, 10(12): e0144840.
- [8] Wang Y, Ma H, Tao X, et al. SCF promotes the production of IL-13 via the MEK-ERK-CREB signaling pathway in mast cells[J]. Exp Ther Med, 2019, 18(4): 2491-2496.
- [9] Liao YP, Du WM, Hu Y, et al. CREB/Wnt10b mediates the effect of COX-2 on promoting BMP9-induced osteogenic differentiation via reducing adipogenic differentiation in mesenchymal stem cells[J]. J Cell Biochem, 2019, 120(6): 9572-9587.
- [10] Barátki BL, Huber K, Sármay G, et al. Inflammatory signal induced IL-10 production of marginal zone B-cells depends on CREB[J]. Immunol Lett, 2019, 212: 14-21.
- [11] Bostik P, Noble ES, Stephenson ST, et al. CD4⁺ T cells from simian immunodeficiency virus disease-resistant sooty mangabeys produce more IL-2 than cells from disease-susceptible species: involvement of p300 and CREB at the proximal IL-2 promoter in IL-2 up-regulation[J]. J Immunol, 2007, 178(12): 7720-7729.
- [12] Koga Y, Hisada T, Ishizuka T, et al. CREB regulates TNF- α -induced GM-CSF secretion via p38 MAPK in human lung fibroblasts[J]. Allergol Int, 2016, 65(4): 406-413.
- [13] Kim D, Cho S, Woo JA, et al. A CREB-mediated increase in miRNA let-7f during prolonged β -agonist exposure: a novel mechanism of β_2 -adrenergic receptor down-regulation in airway smooth muscle[J]. FASEB J, 2018, 32(7): 3680-3688.
- [14] Avsar B, Zhao Y, Li W, et al. Atropa belladonna expresses a microRNA (aba-miRNA-9497) highly homologous to homo sapiens miRNA-378 (hsa-miRNA-378); both miRNAs target the 3'-untranslated region (3'-UTR) of the mRNA encoding the neurologically relevant, zinc-finger transcription factor ZNF-691[J]. Cell Mol Neurobiol, 2020, 40(1): 179-188.

(本文编辑: 万静)