

• 论著-研究报告 •

间质性膀胱炎/膀胱疼痛综合征膀胱组织中 miR-214 的表达及意义^{*}

王春辉¹ 李春生¹ 高志明¹ 郭俊生¹ 张俊毅² 蒋莹³ 包国昌¹

[摘要] 目的:探讨 miR-214 在间质性膀胱炎/膀胱疼痛综合征(IC/BPS)患者膀胱组织中的表达及意义。方法:30 例 IC/BPS 患者,根据膀胱镜下表现,分为 Hunner 溃疡组($n=12$)和点状出血组($n=18$)。分别取病变组织和病变周围组织行实时定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)。分别比较两组中病变组织与其周围组织中 miR-214 的表达情况,以及两组间病变组织中 miR-214 的表达情况。结果:Hunner 溃疡病变处组织 miR-214 表达水平 $0.49 \sim 1.23$, 平均 (0.89 ± 0.20) , Hunner 溃疡病变周围组织 miR-214 表达水平 $2.78 \sim 4.81$, 平均 (3.78 ± 0.63) 。点状出血处病变组织 miR-214 表达水平 $0.94 \sim 1.84$, 平均 (1.47 ± 1.33) , 点状出血病变周围组织 miR-214 表达水平 $2.76 \sim 3.95$, 平均 (3.60 ± 0.42) 。Hunner 溃疡病变组织 miR-214 表达明显低于其周围组织。差异有统计学意义($t=18.76, P<0.0001$)。点状出血处病变组织 miR-214 表达明显低于其周围组织,差异有统计学意义($t=17.30, P<0.0001$)。Hunner 溃疡病变组织 miR-214 表达明显低于点状出血处病变组织,差异有统计学意义($t=5.554, P<0.0001$)。结论:IC/BPS 患者膀胱病变组织处较其周围组织 miR-214 表达明显降低, Hunner 溃疡病变组织 miR-214 表达明显低于点状出血处病变组织。这可能与疾病的发生、发展有关。

[关键词] 间质性膀胱炎;膀胱疼痛综合征;microRNAs;miR-214;上皮间质化;组织纤维化

DOI:10.13201/j.issn.1001-1420.2021.12.009

[中图分类号] R694 **[文献标志码]** A

Expression and significance of miR-214 in the bladder tissues of interstitial cystitis/bladder pain syndrome

WANG Chunhui¹ LI Chunsheng¹ GAO Zhiming¹ GUO Junsheng¹
ZHANG Junyi² JIANG Ying³ BAO Guochang¹

(¹Department of Urology, Affiliated Hospital of Chifeng University, Urology Research Center, Chifeng, Inner Mongolia, 024000, China; ²Department of Pathology, Affiliated Hospital of Chifeng University; ³Department of Reproduction, Affiliated Hospital of Chifeng University)
Corresponding author: Bao Guochang, E-mail: baoguochang1968@163.com

Abstract Objective: To investigate the expression and significance of miR-214 in the bladder tissues of patients with interstitial cystitis/bladder pain syndrome (IC/BPS). **Methods:** Thirty IC/BPS patients were divided into Hunner's ulcer group ($n=12$) and punctate hemorrhage group ($n=18$) according to cystoscopy. Real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) was performed on the diseased tissues and the surrounding tissues respectively. The expression of miR-214 in the diseased tissues and surrounding tissues of the two groups was compared, and the expression of miR-214 in the diseased tissues between the two groups was also compared. **Results:** The expression level of miR-214 in the tissue of Hunner's ulcer was 0.89 ± 0.20 ($0.49 - 1.23$), and the expression level of miR-214 in the surrounding tissue of Hunner's ulcer was 3.78 ± 0.63 ($2.78 - 4.81$). The expression level of miR-214 was 1.47 ± 1.33 ($0.94 - 1.84$) in the lesions with punctate hemorrhage, and 3.60 ± 0.42 ($2.76 - 3.95$) in the surrounding tissues with punctate hemorrhage. The expression of miR-214 in the Hunner's ulcer was significantly lower than that in the surrounding tissues. The difference was statistically significant ($t=18.76, P<0.0001$). The expression of miR-214 in the tissues at the punctate hemorrhage was significantly lower than that in the peripheral tissues, and the difference was statistically significant ($t=17.30, P<0.0001$). The expression of miR-214 in the tissue of Hunner's ulcer was significantly lower than that in the lesion of punctate hemorrhage, and the difference was statistically significant ($t=5.554, P<0.0001$). **Conclusion:** The expression of miR-214 in the diseased tissues of IC/BPS patients was significantly lower than that in the sur-

^{*}基金项目:内蒙古自治区高等学校科学技术研究项目(No:NJZY20197)

¹赤峰学院附属医院泌尿外科 赤峰学院泌尿外科研究所(内蒙古赤峰,024000)

²赤峰学院附属医院病理科

³赤峰学院附属医院生殖医学科

通信作者:包国昌, E-mail: baoguochang1968@163.com

rounding tissues, and the expression of miR-214 in the diseased tissues of Hunner's ulcer was significantly lower than that in the diseased tissues of punctate hemorrhage. This may be related to the occurrence and development of the disease.

Key words interstitial cystitis; bladder pain syndrome; microRNAs; miR-214; epithelial mesenchymal transition; tissue fibrosis

近年来间质性膀胱炎/膀胱疼痛综合征(Interstitial cystitis/ bladder pain syndrome, IC/BPS)在临床工作中逐渐受到广泛关注,亦成为泌尿外科领域的研究热点之一。由于 IC/BPS 的病因与发病机制至今仍未清楚,因此目前临床上针对 IC/BPS 的诊断主要为经验性诊断,主要以临床症状为诊断依据。缺乏指示性检测指标^[1]。其病因和病理尚不清楚,需要通过排除其他病变后诊断,目前该病的治疗尚无满意的疗法^[2]。

由于其症状的复杂性,也被称为膀胱易激综合征、膀胱渗漏综合征等,此病在绝经后的妇女中很常见^[3-5]。在全球一般人群中,IC 的发病率从 10 万分之一到 5 万分之一不等^[6-8]。因此,研究 IC/BPS 的细胞和分子机制对其诊疗具有重要意义。Jhang 等^[9]认为,与间质性肺炎类似,IC/BPS 膀胱黏膜也存在上皮间质化(epithelial mesenchymal transition, EMT)。其机制与自身免疫有关。Jiang 等^[10]认为,miR-214 在调节自身免疫过程中起到了重要作用。Wu 等^[11]研究表明 miR-214 能够靶向调节线粒体融合蛋白 2(Mitofusin 2, Mfn2)介导纤维化过程。

miR-214 是一种 22 个核苷酸保守的小非编码 RNA,通过与靶基因的 3'非编码区(3'untranslation location, 3'-UTR)上的补体序列碱基配对,抑制 mRNA 裂解或翻译,对基因表达进行负调控,并参与细胞生长、代谢和发育等不同的生物学过程。最近,越来越多的证据表明 miR-214 可能参与了 IC/BPS 的发生和发展^[9, 12-13]。

1 资料与方法

1.1 纳入标准

2015 年 9 月—2020 年 9 月于我院就诊,根据美国糖尿病、消化及肾病协会制定的 IC/BPS 诊断标准^[14],入组 IC/BPS 患者 30 例。膀胱镜下取得膀胱黏膜组织,根据有无镜下表现分为 Hunner 溃疡组($n=12$),点状出血组($n=18$)。膀胱镜下有典型 Hunner 溃疡形成,伴或不伴有点状出血,所取组织入 Hunner 溃疡组;镜下无典型 Hunner 溃疡,有散在点状出血,所取组织入点状出血组。

1.2 方法

对所有患者采集信息,包括详细的用药史、应用视觉模拟评分法评估耻骨上区疼痛程度、体格检查、尿液分析、尿培养,血细胞分析、血液化学、男性前列腺特异性抗原(prostate-specific antigen,

PSA)测定、超声测定残余尿量和尿动力学检查,部分患者行尿脱落细胞学检查。所有患者均未应用过三环类抗抑郁药物及阿片类药物。

膀胱镜检查最好在硬膜外麻醉或全麻下进行,若仅行表皮麻醉,会加剧患者的痛苦及恐惧感,不配合检查,使检查结果受到质疑。麻醉后,常规检查膀胱黏膜,发现有可疑,尤其高度怀疑膀胱肿瘤时,即行多处活检,排除肿瘤、炎症及其他明确病因的病变。取 Hunner 溃疡处或点状出血处组织与其周围 2 cm 正常膀胱黏膜组织做对比。

所取组织行 Trizol 法提取总 RNA。相关引物见表 1。使用 PrimeScript RT kit 将总 RNA 逆转录为 cDNA。反应条件为 37℃ 15 min,重复 3 次,85℃ 灭活 5 s,总体积为 10 μL。

qRT-PCR 反应采用 SYBR Premix Ex Taq II 试剂盒(Takara Bio),甘油醛-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, GAPDH)为内参。由 SYBR 预混 Ex Taq II 25 μL, PCR 上游引物 2 μL, PCR 下游引物 2 μL, ROX 参照染料(50×) 1 μL, DNA 模板 4 μL, 双蒸水 16 μL 组成,总体积为 50 μL。采用 ABI Prism 7300 体系进行 qRT-PCR。反应条件为 95℃ 预变性 15 min, 95℃ 变性 15 s, 60℃ 退火 60 s, 72℃ 延伸 60 s, 共 40 个循环, 72℃ 总延伸 5 min。最后对 FAM 490 荧光强度进行评价。mRNA 的相对表达水平以 GAPDH 为内参。

表 1 qRT-PCR 相关引物

基因	碱基序列
miR-214	
上游引物	5'-AGCATAATACAGCAGGCACAGAC-3'
下游引物	5'-AAAGGTTGTTCTCCACTCTCTCAC-3'
GAPDH	
上游引物	5'-GGTCACCAGGGCTGCTTTTA-3'
下游引物	5'-GAGGGATCTCGCTCCTGGA-3'

1.3 统计学方法

数据分析采用 prism 8。配对样本比较采用配对 t 检验,两组间比较采用独立样本 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

Hunner 溃疡组 12 例,其中男 2 例,女 10 例。年龄 45~68 岁,平均(55.2±8.1)岁。疼痛评分 5~9 分,平均(6.6±1.2)分。Hunner 溃疡病变处组织 miR-214 表达水平 0.49~1.23(0.89±

0.20), Hunner 溃疡病变周围组织 miR-214 表达水平 $2.78 \sim 4.81$, 平均 (3.78 ± 0.63) 。见表 2。

点状出血组 18 例, 其中男 4 例, 女 14 例。年龄 $36 \sim 67$ 岁, 平均 (48.3 ± 8.5) 岁。疼痛评分 $2 \sim 5$ 分, 平均 (4.1 ± 1.2) 分。点状出血处病变组织 miR-214 表达水平 $0.94 \sim 1.84$, 平均 (1.47 ± 1.33) , 点状出血病变周围组织 miR-214 表达水平 $2.76 \sim 3.95$, 平均 (3.60 ± 0.42) , 见图 1。

Hunner 溃疡病变组织 miR-214 表达明显低于其周边组织。差异有统计学意义 ($t = 18.76, P < 0.0001$)。点状出血处病变组织 miR-214 表达明显低于其周边组织, 差异有统计学意义 ($t = 17.30, P < 0.0001$)。且 Hunner 溃疡病变组织 miR-214 表达明显低于点状出血处病变组织, 差异有统计学意义 ($t = 5.554, P < 0.0001$)。

表 2 2 组患者人口统计资料、临床资料及尿流动力学参数比较

项目	Hunner 溃疡组 ($n=12$)	点状出血组 ($n=18$)	P
性别	12	18	0.854
男	2(16.7)	4(22.2)	
女	10(83.3)	14(77.8)	
平均年龄/岁	55.2 ± 8.1	48.3 ± 8.5	0.034
体重指数/($\text{kg} \cdot \text{m}^{-2}$)	26.6 ± 4.7	27.5 ± 5.4	0.253
症状时间/年	5.7 ± 3.2	4.3 ± 4.0	0.876
排尿频度/(次 $\cdot \text{d}^{-1}$)	16.4 ± 6.5	13.5 ± 5.7	0.657
耻骨上疼痛	12(100.0)	16(88.9)	0.879
视觉模拟评分法/分	6.6 ± 1.2	4.1 ± 1.2	<0.001
尿急	11(91.7)	18(100.0)	0.376
初始排尿时膀胱容量/mL	89.7 ± 25.4	109.4 ± 34.2	0.023
膀胱最大容量/mL	189.5 ± 54.3	276.4 ± 63.2	<0.001
残余尿量/mL	35.5 ± 26.9	27.3 ± 15.4	0.834
麻醉后膀胱容量/mL	378.2 ± 43.6	398.4 ± 54.6	0.754

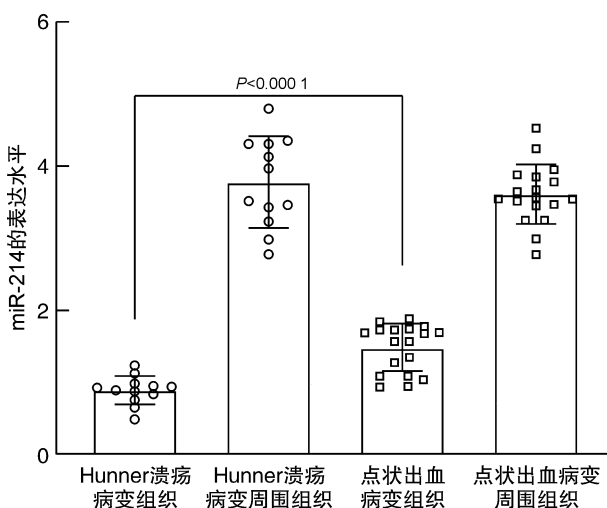


图 1 miR-214 表达水平

3 讨论

IC/BPS 是一种以尿频、尿急、夜尿明显增多并伴有盆腔疼痛为主要临床表现的下尿路慢性疾病, 多见于女性。其发病机制至今未明, 临床诊断主要依赖于病史和膀胱镜检查并排除其他疾病, 如肿瘤、泌尿系感染等^[1]。IC 是一个基于尿频、尿急以及膀胱和盆腔疼痛症状的临床诊断。国际尿控协会(International Continence Society, ICS)更倾向于用 BPS 这个表达方式, 定义为: 与膀胱充盈相关的耻骨上区的疼痛, 伴随着其他症状, 例如白天和(或)晚上加重的尿频症状, 但没有尿路感染或其他明确的病变证据。因此, ICS 保留了 IC 这个诊断, 并将该诊断应用于有典型膀胱镜表现及病史特征的患者。目前的国际会议已经将 IC 的命名更改为 IC/BPS, 这个决定强调了因为症状而促使患者进行的治疗。同时, IC 是否是 BPS 的一个亚群目前尚未明确^[15]。

两组患者人口统计资料无明显差异。Hunner 溃疡组视觉模拟评分法疼痛评分 (6.6 ± 1.2) 分高于点状出血组 (4.1 ± 1.2) 分, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。Hunner 溃疡组膀胱最大容量 (189.5 ± 54.3) mL 低于点状出血组 (276.4 ± 63.2) mL, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。这可能与疾病严重程度有关, 提示 Hunner 溃疡形成重于膀胱散在出血点, 也可能是疾病演进的两个阶段, 明确此事需进一步研究证明。

MicroRNAs(miRNAs) 是一种能够负调控基因表达的非编码小 RNA, 包含 22 个保守的核苷酸序列。其与目标基因 3'-UTR 的互补序列结合, 通过 mRNA 的转录抑制, 高度参与各种生物过程, 包括细胞生长、代谢和增殖。有研究指出^[10,16], miR-214 低表达引起上皮 EMT 发生, 进而促进肿瘤形成^[17]。

Hunner 溃疡病变组织和点状出血处病变组织 miR-214 表达明显低于其周边组织。说明 miR-214 低表达可能与 IC/BPS 的发生有关。且 Hunner 溃疡病变组织 miR-214 表达明显低于点状出血处病变组织。该发现与疼痛评分及膀胱最大容量趋势相同。在 Hunner 溃疡组, 疼痛评分高于点状出血组, 膀胱最大容量小于点状出血组。说明 Hunner 溃疡可能是点状出血的发展结果, miR-214 的低表达可能与疾病进展有关。

有研究称^[18], IC/BPS 患者尿液中神经生长因子(nerve growth factor, NGF)水平升高, 慢性炎症形成。进而膀胱壁纤维化程度增加。miR-214 能够靶向调节 Mfn2 介导纤维化过程^[19]。由此我们推想, 可能的机制是, miR-214 在膀胱壁中参与了对 Mfn2 对调控, 进而引发膀胱壁纤维化。

综上所述, 我们的实验为 IC/BPS 的发生发展

机制提供了证据。我们的数据表明 IC/BPS 膀胱中 miR-214 被抑制。这对 IC/BPS 的诊疗的提供了新见解。

参考文献

- [1] 王春辉,王海波,杨进益.超声检测评估下尿路症状的应用进展[J].中华泌尿外科杂志,2014,35(5):388-390.
- [2] Jhang JF, Hsu YH, Jiang YH, et al. Clinical Relevance of Bladder Histopathological Findings and Their Impact on Treatment Outcomes among Patients with Interstitial Cystitis/Bladder Pain Syndrome: An Investigation of the European Society for the Study of Interstitial Cystitis Histopathological Classification [J]. J Urol, 2021, 205(1): 226-235.
- [3] Watanabe D, Akiyama Y, Niimi A, et al. Clinical characterization of interstitial cystitis/bladder pain syndrome in women based on the presence or absence of Hunner lesions and glomerulations [J]. Low Urin Tract Symptoms, 2021, 13(1): 139-143.
- [4] Thompson A, Siegel AE, Thompson Z, et al. Interstitial Cystitis or Painful Bladder Syndrome in a Premenopausal Female Precipitated by Oral Combined Contraceptives [J]. Cureus, 2020, 12(5): e8348.
- [5] Tailor V, Torella M, Manriquez V, et al. Understanding bladder pain syndrome/interstitial cystitis [J]. Int Urogynecol J, 2020, 31(8): 1495-1496.
- [6] Sawada N. Editorial Comment to Clinical guidelines for interstitial cystitis/bladder pain syndrome [J]. Int J Urol, 2020, 27(7): 589-590.
- [7] Rahnama'i MS, Javan A, Vyas N, et al. Bladder Pain Syndrome and Interstitial Cystitis Beyond Horizon: Reports from the Global Interstitial Cystitis/Bladder Pain Society (GIBS) Meeting 2019 Mumbai-India [J]. Anesth Pain Med, 2020, 10(3): e101848.
- [8] Morlacco A, Mancini M, Soligo M, et al. Relevance of the Endoscopic Evaluation in the Diagnosis of Bladder Pain Syndrome/Interstitial Cystitis [J]. Urology, 2020, 144: 106-110.
- [9] Jhang JF, Hsu YH, Peng CW, et al. Epstein-Barr Virus as a Potential Etiology of Persistent Bladder Inflammation in Human Interstitial Cystitis/Bladder Pain Syndrome [J]. J Urol, 2018, 200(3): 590-596.
- [10] Jiang Z, Yao L, Ma H, et al. miRNA-214 Inhibits Cellular Proliferation and Migration in Glioma Cells Targeting Caspase 1 Involved in Pyroptosis [J]. Oncol Res, 2017, 25(6): 1009-1019.
- [11] Wu J, Li J, Chen WK, et al. MicroRNA-214 Affects Fibroblast Differentiation of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells by Targeting Mitofusin-2 during Pelvic Floor Dysfunction in SD Rats with Birth Trauma [J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 42(5): 1870-1887.
- [12] Lv JW, Wen W, Jiang C, et al. Inhibition of microRNA-214 promotes epithelial-mesenchymal transition process and induces interstitial cystitis in postmenopausal women by upregulating Mfn2 [J]. Exp Mol Med, 2017, 49(7): e357.
- [13] Nickel JC, Doiron RC. Hunner Lesion Interstitial Cystitis: The Bad, The Good, and The Unknown [J]. Eur Urol, 2020, 78(3): e122-e124.
- [14] Lee MH, Wu HC, Tseng CM, et al. Health Education and Symptom Flare Management Using a Video-based m-Health System for Caring Women With IC/BPS [J]. Urology, 2018, 119: 62-69.
- [15] 王春辉,魏伟,杨进益. IC/BPS 患者行膀胱水扩张治疗时监测血压和心率的意义 [J]. 临床泌尿外科杂志, 2016, 31(11): 1024-1027.
- [16] Wang R, Sun Y, Yu W, et al. Downregulation of miRNA-214 in cancer-associated fibroblasts contributes to migration and invasion of gastric cancer cells through targeting FGF9 and inducing EMT [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2019, 38(1): 20.
- [17] Parsons CL, Argade S, Evans RJ, et al. Role of urinary cations in the etiology of interstitial cystitis: A multi-site study [J]. Int J Urol, 2020, 27(9): 731-735.
- [18] Bosch PC. A Randomized, Double-blind, Placebo-controlled Trial of Certolizumab Pegol in Women with Refractory Interstitial Cystitis/Bladder Pain Syndrome [J]. Eur Urol, 2018, 74(5): 623-630.
- [19] Liu T, Wang B, Li G, et al. Disruption of microRNA-214 during general anaesthesia prevents brain injury and maintains mitochondrial fusion by promoting Mfn2 interaction with Pkm2 [J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(23): 13589-13599.

(收稿日期:2021-07-11)