

行政院國家科學委員會補助  
大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

\* \*\*\*\*\*  
\* 計 畫  
\* : MicroRNA-21 之表現與兒童氣喘發生之相關  
\* 名 稱  
\* \*\*\*\*\*

執行計畫學生： 鍾文蕙  
學生計畫編號： NSC 99-2815-C-040-005-B  
研究期間： 99年07月01日至100年02月28日止，計8個月  
指導教授： 翁瑞宏

處理方式： 本計畫可公開查詢

執行單位： 中山醫學大學公共衛生學系（所）

中華民國 100年03月31日

## MicroRNA-21 之表現與兒童氣喘發生之相關

### 摘要：

IL-12 是促進細胞免疫的免疫調節細胞因子，可影響 IL-4 與 IL-5 的表現；而 IL-4 已被證實相關於第二型輔助 T 淋巴球 (Th2 細胞) 的分化，並且可增加循環中 IgE 和嗜伊紅性白血球的量；IL-5 則是相關於嗜伊紅性白血球的分化、活化以及維持。重要的是，IL-12p35 可能是 miRNA-21 的標的基因，miRNA-21 的增加表現可能貢獻於減低的 IL-12；然而，miRNA-21 的表現和氣喘發生之間的關聯並未被探討。我們設計一個以醫院為基礎的病例對照研究來評估 miRNA-21 表現與兒童氣喘發生之相關，總計 31 名氣喘病例以及 31 名健康對照被納入本研究進行分析。研究對象的個人特徵資料，是經由面對面的問卷訪視所收集。血清 IL-12 之測定，是使用酵素連結免疫吸附法 (enzyme-linked immunosorbent assay) 分析；miRNA-21 的表現則是以聚合酶鏈鎖反應 (polymerase chain reaction) 加以測定。我們的結果顯示，miRNA-21 低度表現的兒童相較於 miRNA-21 高度表現的兒童，具有顯著較高之氣喘發生危險 (matched relative risk = 3.29, 95% confidence interval = 1.04-10.38)；並且氣喘兒童的 miRNA-21 表現量是負向相關於其循環中之 IL-12 濃度 ( $r = -0.47$ ,  $P = 0.008$ )。因此，miRNA-21 在兒童氣喘發展中可能扮演調控的角色。

### 前言：

在兒童族群中，氣喘是種常見的慢性疾病；許多流行病學的研究也指出，氣喘的盛行率在已開發及開發中國家中有增加的趨勢 [1-3]。氣喘的特徵為呼吸道阻塞 (airway obstruction)、呼吸道過度反應 (airway hyperresponsiveness) 與發

炎、以及重塑 (remodeling) [4]。而環境因子的改變，包括生活習慣、飲食、空氣污染、過敏原暴露，以及病毒性的呼吸道感染，很可能對於氣喘發展扮演重要的角色 [5-7]。然而，兒童是較成人容易產生氣喘，這是源於基因及環境因素的共同作用 [8, 9]。因此，瞭解氣喘的決定因子，將有助於發展出預防氣喘發生的策略。

Th1 和 Th2 細胞是主要的 CD4<sup>+</sup> T 輔助細胞 (CD4<sup>+</sup> T helper cell) 亞型，各自分泌獨特的細胞激素 (cytokines)，並且相互調節不同種類的免疫反應 [10, 11]。Th1 細胞分泌細胞間白素 (interleukin [IL])-2、干擾素 (interferon [IFN])- $\gamma$ 、以及腫瘤壞死因子 (tumor necrosis factor [TNF])- $\beta$ ；而 Th2 細胞製造 IL-4、IL-5、IL-6、IL-10 及 IL-13。如果免疫反應趨向以 Th2 的表現來對抗環境中無害的抗原，則可能發生如氣喘的過敏性疾病。Th2 細胞激素控制具有發炎性氣喘反應的主要成分，包括免疫球蛋白 E (immunoglobulin [Ig] E) 同質型轉換 (isotype switching)、黏液的製造，以及嗜伊紅性白血球 (eosinophils) 的聚集與活化，在複雜的細胞發育過程中，誘導訊號會促使細胞產生分化 [12, 13]。許多研究亦顯示許多因子可以控制 CD4<sup>+</sup> T 輔助細胞的分化，但是對於 Th1/Th2 細胞分泌的機制仍然尚未被充分地釐清。

IL-12 是促進細胞免疫的免疫調節細胞因子，由 p35 與 p40 兩個次單位組成；經由活化的巨噬細胞 (macrophages)、嗜中性白血球 (neutrophils)、以及樹突細胞 (dendritic cells) 所產生 [14, 15]。先前研究發現 IL-12 可促使及維持 Th1 反應 [16, 17]，剔除 IL-12p40 基因後的小鼠也會產生支氣管纖維化的增加 [18]。IL-12 可抑制 IL-4 與 IL-5 的表現 [19]，而 IL-4 已被證實相關於 Th2 的分化，並且可增加循環中 IgE 和嗜伊紅性白血球的量 [20, 21]；IL-5 則被指出相關於嗜伊紅性白血

球的分化、活化以及維持 [22]。因此，IL-12 可能調節個體呼吸道之過度反應，並且抑制肺部的嗜伊紅性白血球增加與周邊支氣管纖維化 [23, 24]。

MicroRNA (miRNA)-21是體內細胞中高度表現的miRNA，它也已經被報告相關於人類的癌症 [25] 與心肌梗塞 [26] 的發生。有趣的是，miRNA-21被發現高度表現於過敏性呼吸道發炎小鼠 (IL-13基因轉殖) 肺部的單核細胞及巨噬細胞中 [27]；而miRNA-21被IL-13所誘導的表現是相依於IL-13 R $\alpha$ 1路徑，但是過敏原所引發的miRNA-21表現則大大地獨立於IL-13 R $\alpha$ 1路徑外。重要的是，IL-12p35則可能是miRNA-21的標的基因，因為miRNA-21可透過結合於3'-未轉譯區 (untranslated region) 而減少約40%的IL-12p35表現 [27]；這些結果更建議著在氣喘的發展中，miRNA-21的增加表現可能貢獻於減低的IL-12，而IL-12則是由巨噬細胞、嗜中性白血球與樹突細胞所衍生之重要的細胞激素 [14, 15]，並且可促使及維持Th1反應 [16, 17]。除了調控IL-12的表現外，miRNA-21也被顯示可調節基質金屬蛋白酶抑制劑 (matrix metalloprotease inhibitor) RECK的濃度 [28]。然而，miRNA-21的表現與兒童氣喘發生之相關，目前仍是不清楚。

因此，我們設計一個以醫院為基礎的病例對照研究，來評估miRNA-21表現與兒童氣喘發生之相關。

## 材料與方法：

### 病例確認與對照選擇

本研究經由中山醫學大學倫理委員會的認可後執行。年齡介於三至十二歲的研究對象，是從位於中台灣的中山醫學大學附設醫院所選取，此醫院對於來自所有社會經濟階級的病患皆具有可近性。病例是從中山醫學大學附設醫院小兒科門

診選取，經由小兒科醫生確認，並且是符合美國胸腔協會 (American Thoracic Society) 所制定的可逆性呼吸道疾病標準 (如支氣管氣喘) [29]。此外，兒童先前不具氣喘的診斷、沒有如哮喘和咳嗽等氣喘症狀者，在研究中被定義為對照。本研究之病例與對照之配對比例為 1：1，健康對照是以病例之年齡 ( $\pm 5$  歲) 與性別所配對。總計，31 名氣喘病例及 31 名健康對照在此被納入本研究進行分析；所有的對象都必須獲取其個人疾病史與同意書。

### 問卷訪視

研究對象的個人特徵資料，在獲取所有參與者的家長同意書後，經由面對面的問卷訪視所收集。問卷所涵蓋的問題，包括人口學特質、父母親教育程度、生活型態如與兒童共同生活之家戶成員抽菸狀態、室內其它污染狀態如燒香、潮濕度、是否飼養寵物、孩童的臥房是否有蟑螂以及一等親氣喘家族史。研究對象的家戶成員抽菸狀態包括每天抽菸支數及抽菸年數；兒童的室內二手菸暴露量是以每天平均暴露的香菸支數計算，亦即父母親於兒童在家時抽菸支數的總和。住家的潮濕程度在最近一年內符合以下條件之一者即定義為潮濕：可以看見家戶內部表面具有黴菌滋生、家戶內積水、或漏水。氣喘家族病史則是以受測者之一等親家族具有氣喘來加以定義。

### 過敏原、血清 IgE 與嗜伊紅性白血球測試

如同 Lee 等人 [30] 原先所建議，過敏原測試是針對台灣常見的過敏原，包括家中灰塵 (House Dust)、美洲蟑螂 (American Cockroach)、以及家塵蹣 (Mite, *Housedust Dermatophagoides farinae* [D.F.] 與 *Housedust Dermatophagoides pteronyssinus* [D.P.])，進行皮膚測試或多重抗原同時測試 (Multiple Antigen

Simultaneous Test [MAST])。如果最大的紅斑直徑超過 3 mm 時，陽性皮膚測試則被考慮存在。血清 IgE 濃度則是利用是螢光酵素免疫法 (AutoCAP System; Pharmacia Diagnostics AB, Uppsala, Sweden) 測量，周邊血液中嗜伊紅性白血球的計數則是以自動血液細胞計數器測量。

### IL-12之測定

血清 IL-12 之測定，是使用酵素連結免疫吸附分析 (enzyme-linked immunosorbent assay [ELISA]; Metra Biosystem, CA, USA) 方法來偵測。以 20  $\mu$ l 的血清樣本，加入事先黏附抗體的酵素免疫分析盤孔內，然後在 37°C 下培養二小時。清洗掉後，再加入 100  $\mu$ l 的受質於 37°C 下培養 30 分鐘，即可產生顏色。以 450 nm 波長在 ELISA reader 中偵測每個樣本的吸光值，並與標準樣本所得的吸光值作比對後，來決定樣本中 IL-12 的濃度。

### RNA 之萃取與 miRNA-21 之測定

從血液樣本抽離出的 buffy coat 置於微量離心管中，加入 1 ml TRIzol 試劑後，靜置冰上 20 分鐘；再加入 200  $\mu$ l DZPC-氯仿混合均勻。於 4°C 下離心 12000 rpm 15 分鐘後，將上清液移置新的微量離心管；再加入 500  $\mu$ l 之 99% isopropanol，混合均勻後置於 -20°C 下 10 分鐘。再於 4°C 下離心 12000 rpm 15 分鐘後，移去上清液，並且加入 1 ml 75% 之 RNA-ethanol 混合均勻。於 4°C 下離心 12000 rpm 15 分鐘，移去上清液；待 RNA 沉澱物乾燥後，加入無 RNase 之去離子水將沉澱物溶解。以分光光度計  $A_{260}/A_{280}$  比例判斷 RNA 萃取之品質好壞，一般最佳為 1.8。

TaqMan microRNA Assays (Applied Biosystems, CA, USA) 被應用來定量

miRNA-21；首先進行反轉錄，取5  $\mu$ l待測之miRNA加入0.15  $\mu$ l dNTP、1.0  $\mu$ l RTase、1.5  $\mu$ l 10x RT buffer、0.19  $\mu$ l RNase inhibitor、3  $\mu$ l 5x RT-primer以及4.16  $\mu$ l Nuclease free H<sub>2</sub>O。於以下條件下進行反應：16°C 30分鐘、42°C 30分鐘、85°C 5分鐘；反應完後補上5  $\mu$ l Nuclease free H<sub>2</sub>O，以進行後續聚合酶鏈鎖反應 (polymerase chain reaction [PCR]) 的步驟。取5  $\mu$ l反轉錄後的cDNA，加入1  $\mu$ l 20x primers (並以RNU48為內部對照)、10  $\mu$ l 2x Master Mix及4  $\mu$ l Nuclease free H<sub>2</sub>O置於96孔盤中並進行三重複。PCR循環條件為：95°C 15分鐘、95°C 15秒、60°C 1分鐘，共40回合；所有的即時PCR反應數據將以 $\Delta\Delta$ CT (cycle threshold) 法計算。

### 統計分析

miRNA-21 的表現量數值進行 log 轉換來符合常態分佈，並且依據健康對照之表現量中位數區分為高度與低度表現。miRNA-21 表現、父母親教育程度、二手菸暴露狀況、燒香、室內潮濕程度、是否飼養寵物、孩童的臥房是否有蟑螂、氣喘家族史以及過敏原測試等對於兒童氣喘發生的配對相對危險性 (Matched relative risk [RR<sub>m</sub>]) 與相對應的 95%信賴區間 (95% confidence interval [C.I.]) 是以條件式對數迴歸模式 (conditional logistic regression model) 加以評估。此外，以 Spearman's 序位相關來評估研究對象之 miRNA-21 表現量與其循環中之 IL-12、IgE 和嗜伊紅性白血球濃度之相關性。所有的 P 值皆以雙尾檢定來呈現。

### 結果：

總計，62 名兒童 (31 名病例與 31 名健康對照) 參與本研究，其年齡範圍從三至十二歲 (平均 5.9 歲)。研究對象之基本特徵及各種環境因子對於氣喘發生之

配對後相對危險性，被呈現於表一。反向相關在家中燒香與兒童氣喘發生間被發現 ( $RR_m = 0.04$ ; 95% C.I. = 0.01-0.16)。64.5%之研究對象的父母其教育程度達大學以上，雖然父母的教育程度為高中以下 ( $RR_m = 1.31$ ; 95% C.I. = 0.47-3.67) 之兒童相較於父母的教育程度為大學以上之兒童，具有較高的氣喘發生危險性；但是結果並未達到統計顯著性。兒童具有氣喘家族史相較於無氣喘家族史，也有較高的氣喘發生危險性 ( $RR_m = 2.18$ ; 95% C.I. = 0.51-9.44)；而父母親具有抽菸習慣的兒童相較於父母親沒有抽菸習慣的兒童，也呈現較高的氣喘發生危險 ( $RR_m = 1.55$ ; 95% C.I. = 0.33-7.35)，但是以上皆未達到統計顯著性。相較於過敏原測試為陰性者，兒童過敏原測試陽性有較高的氣喘發生危險性 ( $RR_m = 1.65$ ; 95% C.I. = 0.62-4.45)，但仍未達統計上顯著。此外，二手菸暴露、家中有從事紡織類工作、飼養寵物、家中潮濕程度及寢室有無蟑螂，在病例與對照組間的分佈也並未呈現統計顯著差異。

氣喘兒童與配對之健康對照其 miRNA-21 與 IL-12 的相對表現量，被呈現於圖一。氣喘兒童相較於健康對照，有較低的 miRNA-21 相對表現量，但未達到統計上的顯著差異 ( $P = 0.56$ )；此外，我們觀察到氣喘兒童相較於健康對照具有顯著較高之 IL-12 表現量 ( $P < 0.0001$ )。隨後，我們分別在氣喘兒童與配對健康對照分組中分析 miRNA-21 與循環中 IL-12、IgE 以及嗜伊紅性白血球濃度之相關。氣喘兒童之 miRNA-21 與循環中 IgE ( $r = 0.14$ ,  $P = 0.48$ ；未呈現於圖中) 與嗜伊紅性白血球 ( $r = 0.04$ ,  $P = 0.85$ ；未呈現於圖中) 濃度，但未呈現統計顯著相關；而健康對照之 miRNA-21 與 IL-12 之表現量也未呈現統計顯著相關 ( $r = -0.041$ ， $P = 0.86$ ；未呈現於圖中)。有趣的是，氣喘兒童其 mir-21 與 IL-12 表現則呈現統計顯著的負相關 ( $r = -0.47$ ， $P = 0.008$ ；圖二)。



進一步地，我們以多變項條件式對數迴歸分析 mir-21 相對表現與兒童氣喘發生危險之配對相對危險性，結果呈現於表二。以健康對照其 mir-21 相對表現量之中位數來區分 mir-21 高度與低度表現，在調整家中燒香之效應後，mir-21 低度表現之兒童相較於 mir-21 高度表現之兒童，具有顯著較高的氣喘發生之危險 ( $RR_m = 3.29$ ；95% C.I. = 1.04-10.38)。

### 討論：

在個體的適應性免疫系統中，當遇到抗原時，T 輔助細胞經由 T 細胞接受器 (T-cell receptor) 的辨識 [31]，而產生一個平衡的免疫反應；未分化 (naive) 的  $CD4^+$  T 輔助細胞受到不同細胞激素影響，會分化成 Th1 和 Th2 兩種亞型 [32]。特別的是，在一些過敏性氣喘病患的支氣管切片 (bronchial biopsies) 或是支氣管肺泡沖洗液中，可觀察到 Th2 細胞和其細胞激素具有增加的趨勢，並且與氣喘的嚴重度成正比 [33, 34]。

MiRNA 是一段長約 20-22 個核苷酸，可由生物體內自行合成的核糖核酸 RNA 序列，並不轉碼任何蛋白，結構上是一段長髮夾型的單股 RNA 分子，在演化上相當穩定 [35]。MiRNA 可經由類似 RNA 干擾 (RNA interference [RNAi]) 的機制將 RNA 降解，也可以透過阻擋蛋白質轉譯而抑制基因表現。miRNA 可以由 RNA 聚合酶 II (RNA polymerase II) 或 RNA 聚合酶 III 所合成，而這些 miRNA 經轉錄會生成 pre miRNA precursor，隨後經 RNase III Drosha 及雙股結合蛋白 Pasha 處理後形成 70 個核苷酸的 pre miRNA；離開細胞核後，再被 RNase III Dicer 處理形成 miRNA。此時，miRNA 可與 miRISC 形成複合物，以影響基因作用。人體內，超過三分之一的基因表現受到 miRNA 所調控 [36]；miRNA 會

鍵結在目標 mRNA 的 3'端非編碼區，導致傳訊核糖核酸 (messenger RNA [mRNA]) 降解與抑制 mRNA 的轉譯功能 [37]。因此，研究已經建議 miRNA 與調節細胞的分化、細胞週期、凋亡、和免疫功能具有有關 [35]。

MiRNA-21 是體內細胞中高度表現的 miRNA，它也已經被報告相關於人類的癌症 [25] 與心肌梗塞 [26] 的發生。進一步地，miRNA-21 也被發現高度表現於過敏性呼吸道發炎小鼠 (IL-13 基因轉殖) 肺部的單核細胞及巨噬細胞中，透過結合於 3'-未轉譯區而減少 IL-12p35 表現 [27]。IL-12 是促進細胞免疫的免疫調節細胞因子，可經由抑制 IL-4 與 IL-5 的表現而促使及維持 Th1 反應 [16, 17, 19]。重要的是，IL-12p35 可能是 miRNA-21 的標的基因；因此在氣喘的發展中，miRNA-21 的增加表現可能貢獻於減低的 IL-12；有趣的是，我們的結果也顯示氣喘兒童其 miRNA-21 表現與 IL-12 濃度呈現顯著負向相關。這項結果也暗示著 miRNA-21 可能經由結合 3'-未轉譯區而減少 IL-12 表現；因此，miRNA-21 在氣喘發展中可能扮演著一個調控的角色。此外，Th1 與 Th2 的細胞激素相互調控具有發炎性氣喘反應的主要成分，如 IgE 以及嗜伊紅性白血球等 [20, 21]。然而，本研究並未觀察到研究對象其 miRNA-21 表現相關於循環中 IgE 以及嗜伊紅性白血球濃度。這可能是由於本研究納入之氣喘兒童無法細分正處於發病期或穩定期，並且樣本數過少而減低我們於統計上偵測 miRNA-21 表現與循環中 IgE 以及嗜伊紅性白血球濃度的相關之檢定力。

在調整干擾變項的效應後，我們也觀察到 miRNA-21 低度表現之兒童相較於高度表現之兒童具有顯著較高的氣喘發生之危險，這是與 Lu 等人 [27] 的研究一致。但是 miRNA-21 在人體中可能有不同的調控表現，並且本次研究受限於較少的樣本數，可能有選樣偏差的情形；進一步地要證實 miRNA-21 表現與

IL-12 在氣喘發展中之效應，還需日後增加更多的樣本數來釐清。

氣喘為多因子 (multifactorial) 影響的疾病，許多危險因子會導致氣喘發生或惡化，包括暴露於過敏原 [38, 39]。過敏原試驗已常被用來檢驗是否個體具有異位性疾病 [30, 31]，在我們的研究中，台灣常見的過敏原 [30]，包括家中的灰塵、家塵蟎與美洲蟑螂則被用來加以評估。過敏原是氣喘發生的重要危險因子之一 [38-40]，在我們的研究中，54.8%的氣喘兒童呈現具有至少一種過敏原的致敏反應；過敏性呼吸道的發炎反應可能是藉由第二型 T 輔助細胞 (Th2) 產生的細胞激素所造成，並形成氣喘 [41]；然而，過敏原暴露在我們的研究中並未呈現出對於兒童氣喘發生的明顯作用，可能是樣本數較少所導致。其他被認為與氣喘相關之環境危險因子，如家中燒香行為等變項，發現有較低的氣喘發生相對危險性。在本研究中，這些指標是倚賴自我報告，因此是主觀的，可能造成暴露的錯誤分組並且減弱被觀察的相關。最後，也必須考量到在我們研究中較少的樣本數，限制了統計檢定力而造成危險的低估。

目前並未有研究評估個體中 miRNA-21 表現與氣喘發展之相關，而我們的結果建議著 miRNA-21 的高度表現對於氣喘發展具有負向的作用。未來的研究可針對 miRNA-21 基因與其標的相關基因在氣喘發展的機制路徑上的角色，進一步地加以探討。

致謝：

本研究感謝行政院國家科學委員會的補助 (NSC 99-2815-C-040-005-B) 以及呂克桓醫師、王銘輔醫師的協助。

參考文獻：

1. Leung R. Wong G. Lau J. Ho A. Chan JK. Choy D. Douglass C. Lai CK. Prevalence of asthma and allergy in Hong Kong schoolchildren: an ISAAC study. *European Respiratory Journal*. 10(2):354-60, 1997.
2. Downs SH. Marks GB. Sporik R. Belosouva EG. Car NG. Peat JK. Continued increase in the prevalence of asthma and atopy. *Archives of Disease in Childhood*. 84(1):20-23, 2001.
3. Burney P. The changing prevalence of asthma?. *Thorax*. 57 Suppl 2:II36-II39, 2002.
4. Braunwald E. Fauci AS. Kasper DL. et al. *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 15th ed. New York: McGraw-Hill Medical Publishing; p.1456-63, 2001.
5. Strachan DP. Lifestyle and atopy. *Lancet*. 353(9163):1457-8, 1999.
6. Strachan DP. The epidemiology of childhood asthma. *Allergy*. 54 Suppl 49:7-11, 1999.
7. Hopkin JM. Mechanisms of enhanced prevalence of asthma and atopy in developed countries. *Current Opinion in Immunology*. 9(6):788-92, 1997.
8. Johnson SR. TIMP-1 in asthma: guilty by association. *Thorax*. 60(8):617-8, 2005.
9. Chen CF. Wu KG. Hsu MC. Tang RB. Prevalence and relationship between allergic diseases and infectious diseases. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 34(1):57-62, 2001
10. Rengarajan J. Szabo SJ. Glimcher LH. Transcriptional regulation of Th1/Th2 polarization. *Immunology Today*. 21(10):479-83, 2000.
11. Murphy KM. Ouyang W. Farrar JD. Yang J. Ranganath S. Asnagli H. Afkarian

- M. Murphy TL. Signaling and transcription in T helper development. *Annual Review of Immunology*. 18:451-94, 2000.
12. Glimcher LH. Murphy KM. Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up. *Genes and Development*. 14(14):1693-711, 2000.
  13. Lohning M. Richter A. Radbruch A. Cytokine memory of T helper lymphocytes. *Advances in Immunology*. 80:115-81, 2002.
  14. Gately MK. Renzetti LM. Magram J. Stern AS. Adorini L. Gubler U. Presky DH. The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses. *Annual Review of Immunology*. 16:495-521, 1998.
  15. Trinchieri G. Interleukin-12: a cytokine at the interface of inflammation and immunity. *Advances in Immunology*. 70:83-243, 1998.
  16. Park AY. Hondowicz BD. Scott P. IL-12 is required to maintain a Th1 response during *Leishmania major* infection. *Journal of Immunology*. 165(2):896-902, 2000.
  17. Yap G. Pesin M. Sher A. Cutting edge: IL-12 is required for the maintenance of IFN $\gamma$  production in T cells mediating chronic resistance to the intracellular pathogen, *Toxoplasma gondii*. *Journal of Immunology*. 165(2):628-31, 2000.
  18. Onari Y. Yokoyama A. Haruta Y. Nakashima T. Iwamoto H. Hattori N. Kohno N. IL-12p40 is essential for the down-regulation of airway hyperresponsiveness in a mouse model of bronchial asthma with prolonged antigen exposure. *Clinical and Experimental Allergy*. 39(2):290-8, 2009.
  19. Gavett SH. O'Hearn DJ. Li X. Huang SK. Finkelman FD. Wills-Karp M. Interleukin 12 inhibits antigen-induced airway hyperresponsiveness, inflammation, and Th2 cytokine expression in mice. *Journal of Experimental Medicine*. 182(5):1527-36, 1995.

20. Le Gros G. Ben-Sasson SZ. Seder R. Finkelman FD. Paul WE. Generation of interleukin-4 (IL-4)-producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4-producing cells. *Journal of Immunology*. 181(5):2943-51, 2008.
21. Finkelman FD. Katona IM. Urban JF Jr. Holmes J. Ohara J. Tung AS. Sample JV. Paul WE. IL-4 is required to generate and sustain in vivo IgE responses. *Journal of Immunology*. 141(7):2335-41, 1988.
22. Lopez AF. Sanderson CJ. Gamble JR. Campbell HD. Young IG. Vadas MA. Recombinant human interleukin-5 is a selective activator of human eosinophil function. *Journal of Experimental Medicine*. 167(1):219-24, 1988.
23. Kips JC. Brusselle GJ. Joos GF. Peleman RA. Tavernier JH. Devos RR. Pauwels RA. Interleukin-12 inhibits antigen-induced airway hyperresponsiveness in mice. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 153(2):535-9, 1996.
24. Kuribayashi K. Kodama T. Okamura H. Sugita M. Matsuyama T. Effects of post-inhalation treatment with interleukin-12 on airway hyper-reactivity, eosinophilia and interleukin-18 receptor expression in a mouse model of asthma. *Clinical and Experimental Allergy*. 32(4):641-9, 2002.
25. Catto JW. Miah S. Owen HC. Bryant H. Myers K. Dudzic E. Larre S. Milo M. Rehman I. Rosario DJ. Di Martino E. Knowles MA. Meuth M. Harris AL. Hamdy FC. Distinct microRNA alterations characterize high- and low-grade bladder cancer. *Cancer Research*. 69(21):8472-81, 2009.
26. Dong S. Cheng Y. Yang J. Li J. Liu X. Wang X. Wang D. Krall TJ. Delphin ES. Zhang C. MicroRNA expression signature and the role of microRNA-21 in the early phase of acute myocardial infarction. *Journal of Biological Chemistry*.

- 284(43):29514-25, 2009.
27. Lu TX. Munitz A. Rothenberg ME. MicroRNA-21 is up-regulated in allergic airway inflammation and regulates IL-12p35 expression. *Journal of Immunology*. 182(8):4994-5002, 2009.
  28. Zhang Z. Li Z. Gao C. Chen P. Chen J. Liu W. Xiao S. Lu H. miR-21 plays a pivotal role in gastric cancer pathogenesis and progression. *Laboratory Investigation*. 88(12):1358-66, 2008.
  29. Anonymous. Global strategy for asthma management and prevention NHLBI/WHO workshop report. Global initiative for asthma. Washington, DC: NHLBI, 1994.
  30. Lee CS. Tang RB. Chung RL. The evaluation of allergens and allergic diseases in children. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. *J Microbiol Immunol Infect*. 33:227-32, 2000.
  31. Ho IC. Glimcher LH. Transcription: tantalizing times for T cells. *Cell*. 109 Suppl:S109-20, 2002.
  32. Afkarian M. Sedy JR. Yang J. Jacobson NG. Cereb N. Yang SY. Murphy TL. Murphy KM. T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4+ T cells. *Nature Immunology*. 3(6):549-57, 2002.
  33. Hamelmann E. Cieslewicz G. Schwarze J. Ishizuka T. Joetham A. Heusser C. Gelfand EW. Anti-interleukin 5 but not anti-IgE prevents airway inflammation and airway hyperresponsiveness. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 160(3):934-41, 1999.
  34. Robinson D. Hamid Q. Bentley A. Ying S. Kay AB. Durham SR. Activation of CD4+ T cells, increased TH2-type cytokine mRNA expression, and eosinophil recruitment in bronchoalveolar lavage after allergen inhalation challenge in

- patients with atopic asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 92(2):313-24, 1993.
35. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 116(2):281-97, 2004.
  36. Lewis BP. Shih IH. Jones-Rhoades MW. Bartel DP. Burge CB. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*. 115(7):787-98, 2003.
  37. Filipowicz W. Bhattacharyya SN. Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nature Reviews Genetics*. 9(2):102-14, 2008.
  38. Custovic A. Taggart SC. Francis HC. Chapman MD. Woodcock A. Exposure to house dust mite allergens and the clinical activity of asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 98(1):64-72, 1996.
  39. Leaderer BP. Belanger K. Triche E. Holford T. Gold DR. Kim Y. Jankun T. Ren P. McSharry Je JE. Platts-Mills TA. Chapman MD. Bracken MB. Dust mite, cockroach, cat, and dog allergen concentrations in homes of asthmatic children in the northeastern United States: impact of socioeconomic factors and population density. *Environmental Health Perspectives*. 110(4):419-25, 2002.
  40. Salo PM. Arbes SJ Jr. Crockett PW. Thorne PS. Cohn RD. Zeldin DC. Exposure to multiple indoor allergens in US homes and its relationship to asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 121(3):678-684.e2, 2008.
  41. Nakajima H. Takatsu K. Role of cytokines in allergic airway inflammation. *International Archives of Allergy and Immunology*. 142(4):265-73, 2007.



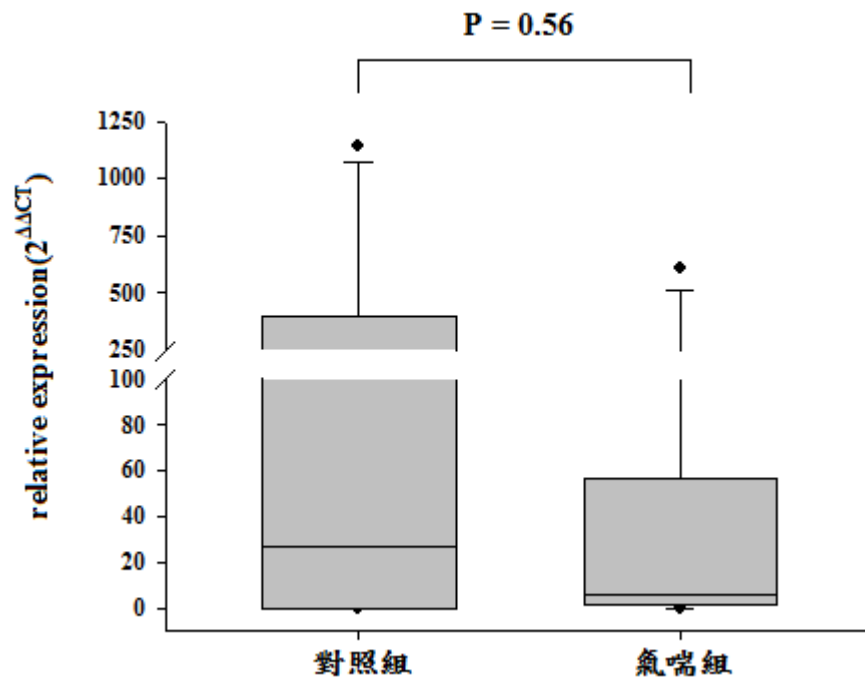
表一：兒童氣喘病例及配對對照之基本特徵與環境因子的配對相對危險性

變項	病例	對照 <sup>a</sup>	配對之相對危險性	
	n = 31	n = 31	RR <sub>m</sub>	95% C.I.
性別				
男生	13 (41.9%)	13 (41.9%)	1.23	0.38-3.98
女生	18 (58.1%)	18 (58.1%)	1.00	
父母教育程度				
高中以下	12 (38.7%)	10 (32.3%)	1.31	0.47-3.67
大學以上	19 (61.3%)	21 (67.7%)	1.00	
氣喘家族史				
有	6 (19.4%)	3 (9.7%)	2.18	0.51-9.44
無	25 (80.6%)	28 (90.3%)	1.00	
父母親抽菸狀況				
有	5 (16.1%)	3 (9.7%)	1.55	0.33-7.35
不在家中抽菸	8 (25.8%)	11 (35.5%)	0.70	0.23-2.11
無	18 (58.1%)	17 (54.8%)	1.00	
二手菸暴露狀況				
有	5 (16.1%)	3 (9.7%)	1.77	0.39-7.96
無	26 (83.9%)	28 (90.3%)	1.00	
家中燒香				
有	4 (12.9%)	25 (80.6%)	0.04	0.01-0.16*
無	27 (87.1%)	6 (19.4%)	1.00	
在家中從事紡織類工作				
有	2 (6.5%)	4 (12.9%)	0.48	0.08-2.74
無	29 (93.5%)	27 (87.1%)	1.00	
飼養寵物				
有	2 (6.5%)	5 (16.1%)	0.35	0.06-1.93
無	29 (93.5%)	26 (83.9%)	1.00	
家中潮溼狀況				
有	7 (22.6%)	8 (25.8%)	0.84	0.27-2.67
無	24 (77.4%)	23 (74.2%)	1.00	
寢室有無蟑螂				
有	19 (61.3%)	14 (45.2%)	1.89	0.70-5.10
無	12 (38.7%)	17 (54.8%)	1.00	
過敏原測試				
陽性	17 (54.8%)	13 (41.9%)	1.65	0.62-4.45
陰性	14 (45.2%)	18 (58.1%)	1.00	

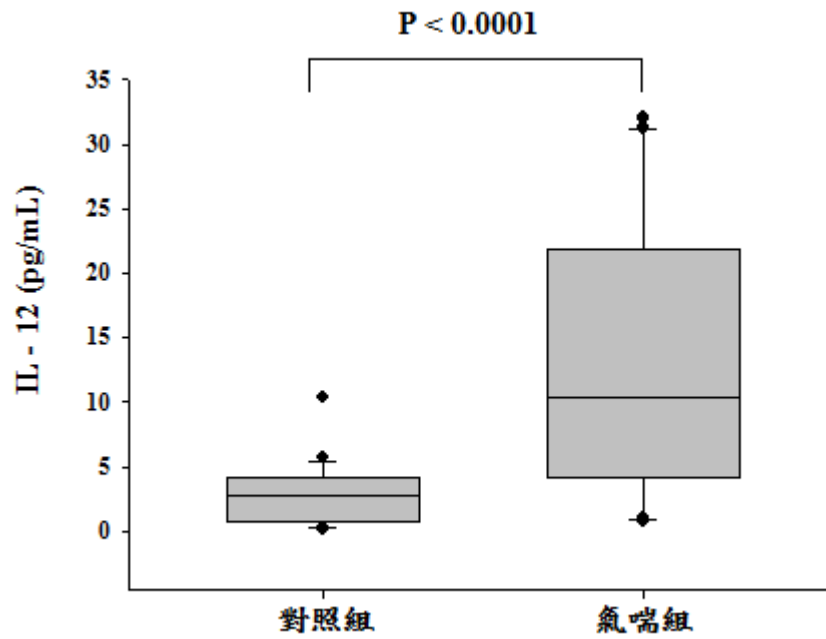
<sup>a</sup>健康對照是以病例之性別及年齡所配對。

\* $P < 0.01$ 。

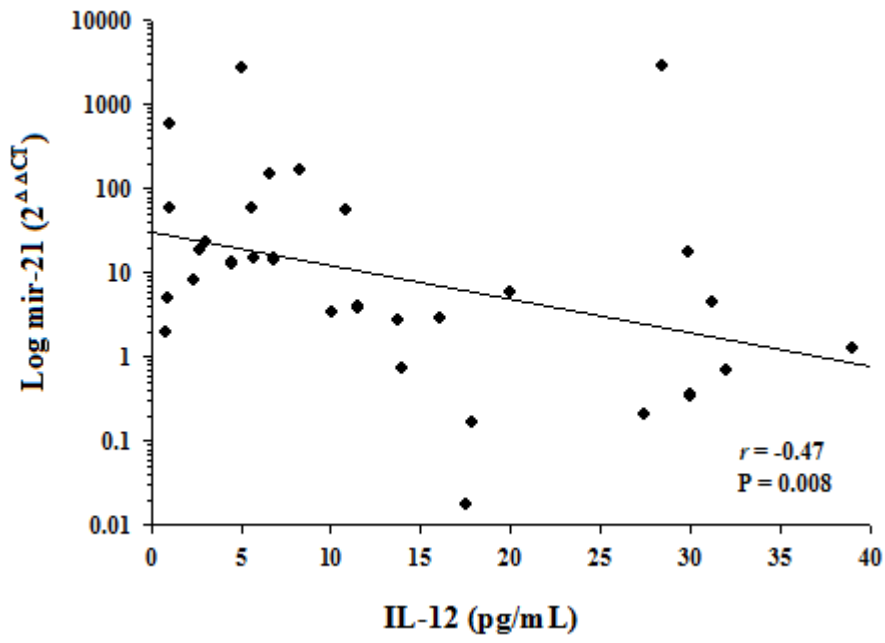
(A)



(B)



圖一(A) 氣喘組與對照組之 mir-21 相對表現量；(B) 氣喘組與對照組之 IL-12 相對表現量



圖二 兒童氣喘病例組中 mir-21 與 IL-12 表現之相關

表二：mir-21 相對表現與兒童氣喘發生危險之配對相對危險性

變項	病例	對照 <sup>a</sup>	配對之相對危險性		調整後之	
	n = 31	n = 31	RR <sub>m</sub>	95% C.I.	RR <sub>m</sub>	95% C.I.
Mir-21 相對表現 <sup>c</sup>						
高	8 (25.8%)	16 (51.6%)	1.00		1.00	
低	23 (74.2%)	15 (48.4%)	1.81	(0.70-4.75)	3.29	(1.04-10.38) <sup>*</sup>

<sup>a</sup>健康對照是以病例之性別及年齡所配對。

<sup>b</sup>資料以多變項條件式對數迴歸模式計算，並且調整家中燒香的效應。

<sup>c</sup>以對照組兒童其 mir-21 相對表現的中位數區分為高與低度表現。

<sup>\*</sup> $P = 0.04$ 。