

• 论 著 •

血清微小 RNA Let-7a 表达水平对儿童哮喘诊断及严重程度评估的价值

李 焱¹, 李 蓉¹, 贾 可², 赵 轲²

(华中科技大学同济医学院附属武汉中心医院:1. 儿科;2. 胸外科, 湖北武汉 430030)

摘 要:目的 研究哮喘儿童循环血清微小 RNA Let-7a 的表达水平,探讨其在哮喘诊断及疾病严重程度评估中的价值。方法 本研究纳入 90 例哮喘儿童(哮喘组)和 90 例健康儿童(健康对照组)作为研究对象,采用酶联免疫吸附试验法检测研究对象血清中白细胞介素(IL)-13 水平,所有研究对象均接受肺功能检测,通过实时荧光定量 PCR 测量血浆 Let-7a 表达水平。采用受试者工作特征曲线(ROC 曲线)分析血清 Let-7a 对儿童哮喘的诊断价值及其区分重度和中轻度哮喘儿童的能力,采用 Pearson 线性相关分析血清 Let-7a 与哮喘儿童肺功能参数和血清 IL-13 的相关性。**结果** 哮喘组儿童血清 Let-7a 表达水平显著低于健康对照组儿童($P=0.000$),哮喘组儿童血清 IL-13 水平显著高于健康对照组儿童($P=0.000$);哮喘组儿童血清 Let-7a 表达水平随着哮喘严重程度显著下降($P=0.000$)。当最佳临界值为 2.09,血清 Let-7a 诊断哮喘儿童的 ROC 曲线下面积为 0.92(95%CI:0.87~0.95, $P=0.001$),灵敏度和特异度分别为 85.0%和 90.0%。当最佳临界值为 1.60,Let-7a 区分重度和中轻度哮喘的 ROC 曲线下面积为 0.80(95%CI:0.68~0.92, $P=0.001$),灵敏度和特异度分别为 75.0%和 93.5%。Let-7a 表达水平与 IL-13 水平呈负相关($r=-0.31$, $P=0.001$),Let-7a 表达水平与第 1 秒用力呼气容积和用力肺活量均呈正相关($r=0.270$, $P=0.004$; $r=0.412$, $P=0.002$)。**结论** Let-7a 可用作血清非侵入性标志物,用于诊断哮喘及其严重程度。

关键词:微小 RNA Let-7a; 儿童哮喘; 白细胞介素 13; 诊断

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2020.09.013 **中图法分类号:**R446.1;R725.6

文章编号:1673-4130(2020)09-1078-04 **文献标识码:**A

The value of serum microRNA Let-7a expression level in the diagnosis and severity assessment of childhood asthma

LI Yi¹, LI Rong¹, JIA Ke², ZHAO Ke²

(1. Department of Paediatrics; 2. Department of Thoracic Surgery, the Central Hospital of Wuhan, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430030, China)

Abstract: Objective To study the expression level of circulating microRNA Let-7a in asthmatic children, and to explore its value in the diagnosis of asthma and the evaluation of disease severity. **Methods** In this study, 90 asthmatic children (asthmatic group) and 90 healthy children (healthy control group) were included as the subjects. The serum level of IL-13 was detected by enzyme-linked immunosorbent assay. All subjects were tested for lung function. The plasma level of Let-7a was measured by real-time fluorescence quantitative PCR. The diagnostic value of serum Let-7a in children with asthma and the ability to distinguish between severe and mild asthma were analyzed by ROC curve. The correlation between serum Let-7a and pulmonary function parameters and serum IL-13 was analyzed by Person linear correlation. **Results** The expression level of Let-7a in asthmatic children was significantly lower than that in healthy children ($P=0.000$). The serum IL-13 level in asthmatic children was significantly higher than that in healthy controls ($P=0.000$). The expression level of serum Let-7a in asthmatic children was significantly decreased with the severity of asthma ($P=0.000$). When the cut-off value was 2.09, the area under ROC curve for diagnosis of asthma was 0.92 (95%CI:0.87—0.95, $P=0.001$). The sensitivity and specificity were 85.0% and 90.0%, respectively. When the cutoff value was 1.60, the area under the ROC curve of Let-7a was 0.80 (95%CI:0.68—0.92, $P=0.001$), the sensitivity and specificity were 75.0% and 93.5%, respectively. The expression level of Let-7a was significantly negatively correlated with the level of IL-13 ($r=-0.31$, $P=0.001$), and the expression level of Let-7a was significantly positively correlated with FEV1 ($r=0.270$, $P=0.004$) and FVC ($r=0.412$, $P=0.002$). **Conclusion** Let-7a can be used as a serum non-invasive marker for the diagnosis of asthma and severity.

作者简介:李焱,女,护师,主要从事儿科常见病研究。

本文引用格式:李焱,李蓉,贾可,等.血清微小 RNA Let-7a 表达水平对儿童哮喘诊断及严重程度评估的价值[J].国际检验医学杂志,2020,41(9):1078-1081.

Key words: microRNA Let-7a; childhood asthma; IL-13; diagnosis

哮喘是一种常见的慢性气道炎症性疾病,其特征是气流可逆性阻塞、支气管反应过度,临床表现为反复发作的喘息、咳嗽和呼吸困难^[1]。哮喘患者的免疫反应改变可归因于遗传和表观遗传改变。微小 RNA (miRNA) 是短链非编码的 RNA 分子,高度保守并通过靶向 mRNA 致 mRNA 降解、切割或抑制蛋白质翻译来控制基因表达过程,参与细胞分化、增殖、凋亡和细胞因子调节^[2]。在过敏性气道疾病中,miRNA 的作用主要通过影响一般炎症和组织反应细胞因子表达而实现^[3]。

miRNA Let-7 属于由 12 个基因组成的高度保守的 miRNA 家族,其编码 9 种不同的 RNA 分别命名为 Let-7a 至 let-7i, let-7 家族在肺脏中表达水平最为丰富^[4]。Let-7a 通过直接靶向白细胞介素(IL)-13 转录物的 3'UTR 来抑制 IL-13 表达,调节 IL-13 分泌并由此调节气道过敏性炎症^[5]。IL-13 主要由 Th2 细胞分泌,是参与过敏性炎症和哮喘的细胞分子^[6]。儿童哮喘状态下血清 IL-13 水平增加,参与支气管高反应性、几丁质酶上调等病理生理过程^[7]。尽管如此,哮喘儿童血浆 Let-7a 表达水平尚无报道,本研究旨在探讨儿童哮喘患者血浆 Let-7a 的表达水平及临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 纳入 2017 年 3 月至 2018 年 3 月于本院收治的过敏性哮喘儿童 90 例为哮喘组,其中男 41 例,女 49 例,年龄 6~10 岁。哮喘的诊断标准和严重程度参照全球哮喘倡议指南(GINA)^[8]。并根据哮喘的严重程度分为轻度(41 例)、中度(28 例)、重度(21 例)3 个亚组。纳入标准:(1)患者出现反复喘息和呼吸困难且诊断为哮喘;(2)吸入 β_2 激动剂治疗,肺功能检测第 1 秒用力呼气容积(FEV1)与吸入前相比增加 12%;(3)皮肤点刺试验阳性。排除标准:(1)患有心、肝和肾脏疾病;(2)患有与胸闷、剧烈呼吸和(或)咳嗽相关的其他肺病。根据肺功能检查结果,采用 FEV1 水平评估哮喘的严重程度:轻度($FEV1 > 80\%$)、中度($FEV1 60\% \sim 80\%$)、重度($FEV1 < 60\%$)哮喘。选择同期年龄和性别相匹配的没有呼吸系统疾病或慢性病史的健康儿童 90 例为健康对照组,其中男 40 例,女 50 例,年龄 6~10 岁。本研究通过本院伦理委员会批准,并获得所有参与研究儿童父母的知情同意。

1.2 肺功能评估 使用便携式儿科肺活量计(Masterlab Jaeger, Wurzburg, Germany)评估哮喘组中儿童的 FEV1 和用力肺活量(FVC)。肺功能测试的结果以预测的百分比表示。

1.3 患者血液样本收集 在完全无菌条件下从参与的健康儿童收集外周血样品(4 mL)并分成两部分:将 2 mL 收集至乙二胺四乙酸管中,然后将管离心 10 min ($1\ 900 \times g, 4\ ^\circ C$),并将血浆小心地转移到不含 RNase

的管中,然后再次离心 10 min ($12\ 000 \times g, 4\ ^\circ C$)。将另一部分(2 mL)在室温下凝结 30~60 min,然后离心 10 min ($1\ 000 \times g$)以制备血清。将血浆和血清样品储存在 $-80\ ^\circ C$ 直至进一步分析。

1.4 测量血清 IL-13 水平 使用酶联免疫吸附试验测定商业试剂盒(Bender MedSystems, Heidelberg, Germany)按照制造商的说明测定人血清中的 IL-13 水平,评估灵敏度为 1.50 pg/mL。

1.5 实时荧光定量 PCR 检测血清 Let-7a 表达水平 使用 miRNeasy 血清/血浆试剂盒(Qiagen, Hilden, Germany)从血浆样品中提取总 RNA。分光光度计通过测量 260 和 280 nm 处的吸光度来确认提取的 RNA 纯度和质量。根据制造商的说明书,使用 miScript II RT 试剂盒(Qiagen, Germany)通过反转录反应合成 cDNA,并将 cDNA 储存在 $-80\ ^\circ C$ 直至使用。使用 SYBR Green 测定试剂盒(mi-ScriptSYBR[®] GreenPCR Kit 和 miScript Primer assay(Qiagen, Valencia, CA)在 Stratagene Mx3000p 系统(实时 PCR 系统, Agilent Technologies, Germany)中进行实时荧光定量 PCR。反应混合物以 20 μL 的总体积进行,含有 4 μL cDNA (100 ng/mL)、300 nmol/L 引物和 10 μL SYBR Green Master Mix,并用无核酸酶水完成至 20 μL 。热循环条件如下:在 95 $^\circ C$ 下初始变性 5 min,然后在 94 $^\circ C$ 变性 40 s,退火 15 s,并在 72 $^\circ C$ 延伸 10 s。选择管家 miRNA SNORD68 (miScript PCR control, Qiagen, Germany)作为内部对照并采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算 Let-7a 的表达水平。Let-7a 的实时荧光定量 PCR 的特异度引物:正向 5'-GCA GTG AGG TAG TAG GTT G-3';反向 5'-GGT CCA GTT TTT TTT TTT TTT TAA CTA TAC-3'。管家小 RNA (SNORD-68)用作内部对照,其引物序列为:正向 5'-CTC GCT TCG GCA GCA CA-3';反向 5'-AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT-3'。每个病例样本独立重复测量 3 次,取平均值作为该样本最终 Let-7a 表达水平。

1.6 统计学处理 使用 SPSS21.0 统计软件(IBM, NY, USA)进行数据分析,定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。2 组比较采用独立样本 t 检验,多组比较采用单因素方差分析(ANOVA),两组之间进一步两两比较采用 LSD- t 检验,分别用于两组或多组之间的比较,Spearmen 线性相关分析用于研究参数之间的相关性,受试者工作特征曲线(ROC 曲线)分析所研究的 miRNA 的诊断值,其中曲线下面积(AUC)作为评估指数。当 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2 组一般临床资料比较 哮喘组与健康对照组在年龄和性别上差异无统计学意义($P > 0.05$)。2 组研究对象哮喘家族史、肺功能检测(FEV1 和 FVC)之

间差异有统计学意义($P<0.05$);哮喘组儿童血清 IL-13 水平显著高于健康对照组($P=0.000$),哮喘组儿童 Let-7a 表达水平显著低于健康对照组($P=0.000$)。见表 1。

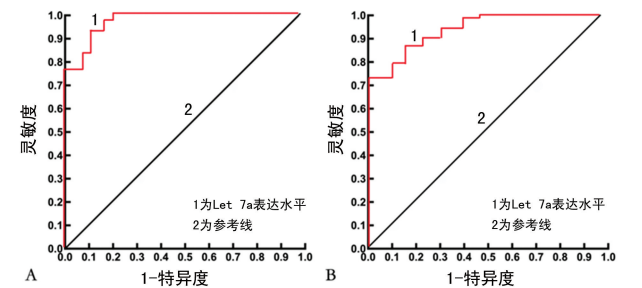
表 1 哮喘组与健康对照组一般临床资料比较($\bar{x}\pm s$)				
参数	哮喘组	健康对照组	t/χ^2	P
年龄(岁)	8.2±3.4	7.4±2.9	1.70	0.070
性别(n)			3.68	0.320
男	41	40		
女	49	50		
哮喘家族史(n)			32.10	0.000
阳性	70	18		
阴性	20	72		
FEV1(%)	88.8±20.7	99.3±14.1	4.10	0.000
FVC(%)	90.2±12.8	120.1±10.7	17.90	0.000
IL-13(pg/mL)	10.48±3.54	4.38±1.48	15.80	0.000
Let-7a 表达水平	1.90±0.77	3.20±0.69	12.50	0.000

2.2 不同严重程度的哮喘患儿血清 IL-13 和 Let-7a 表达水平比较 外周血中 IL-13 水平随哮喘严重程度显著增加($P=0.000$),血清 Let-7a 表达水平随哮喘严重程度显著下降($P=0.000$)。见表 2。

2.3 血清 Let-7a 表达水平的诊断价值 当最佳临界值为 2.09 时,血清 Let-7a 诊断哮喘儿童的 AUC 为 0.92(95%CI:0.87~0.95, $P=0.001$),灵敏度和特异度分别为 85.0%和 90.0%;当最佳临界值为 1.60 时,Let-7a 区分重度和中轻度哮喘的 AUC 为 0.80

(95%CI:0.68~0.92, $P=0.001$),灵敏度和特异度分别为 75.0%和 93.5%。见图 1。

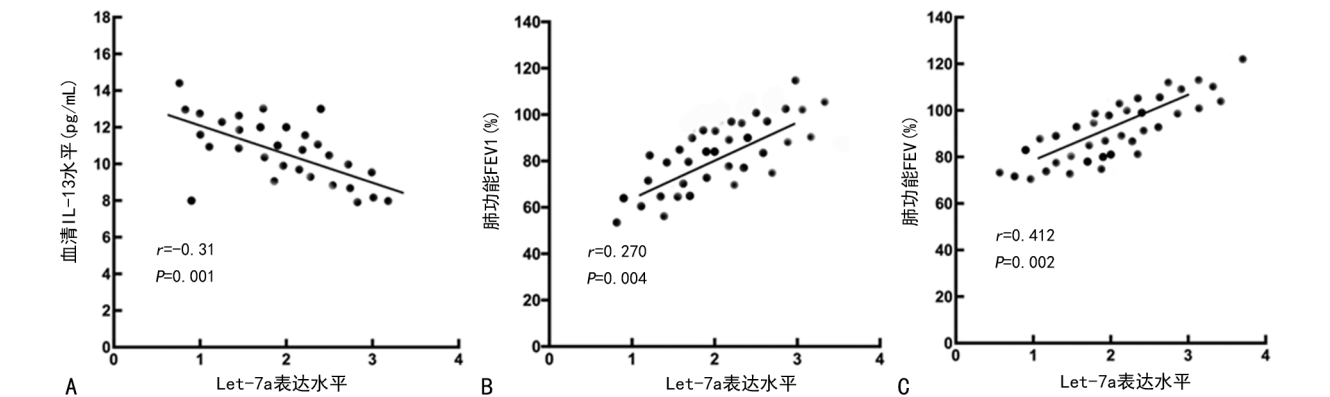
表 2 血清 IL-13 和 Let-7a 表达水平与哮喘严重程度关系($\bar{x}\pm s$)					
参数	轻度($n=41$)	中度($n=28$)	重度($n=21$)	χ^2	P
IL-13 (pg/mL)	2.42±0.59	5.08±0.67	6.05±1.03	21.04	0.000
Let-7a 表达水平	2.04±0.61	1.85±0.40	1.41±0.51	17.09	0.000



注:A 表示哮喘;B 表示重度哮喘。

图 1 Let-7a 表达水平的 ROC 曲线

2.4 Let-7a 与 IL-13、FEV1、FVC 相关性分析 Pearson 相关分析显示,Let-7a 的表达水平与 IL-13 水平呈负相关($r=-0.31$, $P=0.001$),见图 2A; Let-7a 的表达水平与 FEV1 呈正相关($r=0.270$, $P=0.004$),与 FVC 呈正相关($r=0.412$, $P=0.002$),见图 2B、C。



注:A 表示 Let-7a 和 IL-13 水平相关性;B 表示 Let-7a 和 FEV1 之间相关性;C 表示 Let-7a 和 FVC 之间相关性。

图 2 Let-7a 与 IL-13、FEV1、FVC 相关性分析

3 讨 论

哮喘是严重影响小儿身心健康的常见呼吸道疾病,儿童哮喘的患病率及死亡率均有上升趋势,我国存在 1 000 多万哮喘患儿^[9]。探讨儿童哮喘相关血清非侵入性标志物对哮喘诊断和疾病严重程度的评估具有重要意义^[10]。

miRNA 是一大类小的调节分子,在各种细胞生命活动中发挥重要作用^[11]。在哮喘发病过程中,miRNA 通过调节 Th2 的存活、激活、增殖、分化和发育来控制过敏性免疫应答的强度^[12]。本研究发现哮喘儿童 Let-7a 表达水平显著性低于健康对照儿童,提示在儿童哮喘患者中,Let-7a 表达受到抑制。随着哮

喘严重程度增加,血清 Let-7a 表达水平呈下降趋势。ROC 曲线分析表明,Let-7a 表达水平可区分哮喘和健康儿童,研究结果提示血清 Let-7a 表达水平可作为哮喘患者诊断的生物标志物。ROC 曲线分析显示,血清 Let-7a 表达水平可以预测哮喘严重程度。本研究报道与文献结果一致,哮喘患者血清中 Let-7a 表达水平降低^[13],同时在哮喘患者支气管肺泡灌洗液中分离出来的气道上皮细胞中 Let-7a 表达水平也下降^[14]。有文献报道,与患有慢性阻塞性肺疾病的患者和健康对照组患者相比,哮喘患者呼出气冷凝物中 Let-7a miRNA 表达较低^[15]。通过 miRNA 微阵列分析检查哮喘个体的支气管肺泡灌洗液,发现 Let-7a 表

达下调^[16]。与轻度哮喘患者和健康对照组相比,严重哮喘患者的支气管活检发现气道上皮细胞内 Let-7a 表达水平降低^[17]。

本研究通过酶联免疫吸附试验法分析儿童哮喘患者血清 IL-13 水平,发现儿童哮喘患者血清 IL-13 水平显著高于健康对照儿童,且随着疾病严重程度增加而增加。嗜酸性粒细胞增多和 Th2 细胞因子(IL-13、IL-4 和 IL-5)分泌增加是哮喘患者气道高反应性特征^[18]。本研究发现,Let-7a 表达水平与 IL-13 水平呈负相关,与 FEV1 和 FVC 呈正相关。有文献报道,miRNA Let-7a 可通过靶向性结合 IL-13 的信使 RNA 3'UTR 端,靶向抑制信使 RNA 翻译过程,进而抑制 IL-13 的表达,降低 IL-13 在气道上皮中的水平,减少气道炎症和气道高反应性,具有阻止肺纤维化功能,其研究还发现哮喘小鼠模型中 Let-7a 表达在哮喘中的抗炎作用,可降低哮喘小鼠外周血 T 细胞诱导 IL-13 分泌^[5]。在癌症患者和特发性肺纤维化患者中也提出了 Let-7a 的抗炎作用^[19]。本研究发现,儿童哮喘患者血清 Let-7a 表达水平与 IL-13 水平呈负相关,提示 Let-7a 表达可能通过抑制 IL-13 产生而发挥抗炎和降低高反应性作用。Let-7a 表达水平与肺功能参数(FEV1 和 FEV)呈正相关,确切原因尚不清楚,猜测可能与 Let-7a 表达水平降低气道高反应性相关,需要进一步研究。

4 结 论

本研究结果显示,哮喘儿童外周血中 Let-7a 表达水平显著下降,其水平与疾病严重程度、IL-13 水平和肺功能参数呈相关性。Let-7a 可用作哮喘诊断和严重程度的非侵入性血清学生物标志物。

参考文献

- [1] FAJT M L, WENZEL S E. Asthma phenotypes and the use of biologic medications in asthma and allergic disease: the next steps toward personalized care[J]. J Allergy Clin Immunol, 2015, 135(2): 299-310.
- [2] MAES T, COBOS F A, SCHLEICH F, et al. Asthma inflammatory phenotypes show differential microRNA expression in sputum[J]. J Allergy Clin Immunol, 2016, 137(5): 1433-1446.
- [3] REBANE A, AKDIS C A. microRNAs in allergy and asthma[J]. Curr Allergy Asthma Rep, 2014, 14(4): 424.
- [4] GILLES M E, SLACK F J. Let-7 microRNA as a potential therapeutic target with implications for immunotherapy[J]. Expert Opin Ther Target, 2018, 22(11): 929-939.
- [5] KUMAR M, AHMAD T, SHARMA A, et al. Let-7 microRNA-mediated regulation of IL-13 and allergic airway inflammation[J]. J Allergy Clin Immunol, 2011, 128(5): 1077-1085.
- [6] GOUR N, WILLS-KARP M. IL-4 and IL-13 signaling in allergic airway disease[J]. Cytokine, 2015, 75(1): 68-78.

- [7] NICODEMUS-JOHNSON J, NAUGHTON K A, SUDI J, et al. Genome-wide methylation study identifies an IL-13 induced epigenetic signature in asthmatic airways[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2016, 193(4): 376-385.
- [8] BATEMAN E D, HURD S S, BARNES P J, et al. Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary[J]. Eur Respir J, 2008, 31(1): 143-178.
- [9] WANG J, ZHAO Z, ZHANG Y, et al. Asthma, allergic rhinitis and eczema among parents of preschool children in relation to climate, and dampness and mold in dwellings in China[J]. Environ Int, 2019, 130: 104910.
- [10] PIKE K C, LEVY M L, MOREIRAS J, et al. Managing problematic severe asthma: beyond the guidelines [J]. Arch Dis Child, 2018, 103(4): 392-397.
- [11] WILCZYNSKA A, BUSHELL M. The complexity of miRNA-mediated repression[J]. Cell Death Differ, 2015, 22(1): 22.
- [12] DESHPANDE D A, DILEEPAN M, WALSETH T F, et al. MicroRNA regulation of airway inflammation and airway smooth muscle function: relevance to asthma [J]. Drug Dev Res, 2015, 76(6): 286-295.
- [13] PANGANIBAN R P, PINKERTON M H, MARU S Y, et al. Differential microRNA expression in asthma and the role of miR-1248 in regulation of IL-5[J]. Am J Clin Exp Immunol, 2012, 1(2): 154-165.
- [14] SOLBERG O D, OSTRIN E J, LOVE M I, et al. Airway epithelial miRNA expression is altered in asthma[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2012, 186(10): 965-974.
- [15] PINKERTON M, CHINCHILLI V, BANTA E, et al. Differential expression of microRNAs in exhaled breath condensates of patients with asthma, patients with chronic obstructive pulmonary disease, and healthy adults[J]. J Allergy Clin Immunol, 2013, 132(1): 217-219.
- [16] LEVÄNEN B, BHAKTA N R, PAREDES P T, et al. Altered microRNA profiles in bronchoalveolar lavage fluid exosomes in asthmatic patients[J]. J Allergy Clin Immunol, 2013, 131(3): 894-903.
- [17] RIJAVEC M, KOROŠEC P, ŽAVBI M, et al. Let-7a is differentially expressed in bronchial biopsies of patients with severe asthma[J]. Sci Rep, 2014, 4: 6103.
- [18] CHEN H, XU X, CHENG S, et al. Small interfering RNA directed against microRNA 155 delivered by a lentiviral vector attenuates asthmatic features in a mouse model of allergic asthma[J]. Exp Ther Med, 2017, 14(5): 4391-4396.
- [19] QI L, LIU F, ZHANG F, et al. lncRNA NEAT1 competes against Let-7a to contribute to non-small cell lung cancer proliferation and metastasis [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 103: 1507-1515.