

支气管哮喘患者急性发作期外周血 LncRNA NEAT1 表达及与 Th1/Th2 平衡的关系

苏州大学附属张家港医院 钱慧 钱文霞*, 张家港 215600

摘要 目的:探讨支气管哮喘(BA)患者急性发作期外周血长链非编码 RNA(LncRNA)核富集转录本 1(NEAT1)表达水平及其与辅助性 T 细胞 1(Th1)/辅助性 T 细胞 2(Th2)平衡的关系。方法:选取 BA 缓解期患者 36 例(缓解期组)、急性发作期患者 44 例(急性发作期组),另选取同期体检健康者 50 例作为对照组。利用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)测定外周血 LncRNA NEAT1 表达,应用流式细胞仪测定外周血单个核细胞(PBMC)中 Th1、Th2 细胞比例,应用 ELISA 法测定外周血干扰素- γ (IFN- γ)、白细胞介素-4(IL-4)水平;采用 Pearson 检验分析 BA 急性发作期患者外周血 LncRNA NEAT1 表达与 Th1/Th2、IFN- γ /IL-4 比值的关系,并绘制 ROC 曲线分析 LncRNA NEAT1 表达水平对 BA 患者急性发作的预测价值。结果:急性发作期组患者外周血 LncRNA NEAT1 表达水平最高,其次为缓解期组,对照组最低,组间比较差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。PBMC 中 Th1 细胞比例及 Th1/Th2 比值高低依次为对照组、缓解期组、急性发作期组,Th2 细胞比例高低依次为急性发作期组、缓解期组、对照组,组间比较差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。外周血 IFN- γ 水平及 IFN- γ /IL-4 比值高低依次为对照组、缓解期组、急性发作期组,IL-4 水平高低依次为急性发作期组、缓解期组、对照组,组间比较差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。BA 急性发作期患者外周血 LncRNA NEAT1 表达与 Th1/Th2、IFN- γ /IL-4 比值呈负相关(均 $P < 0.05$)。外周血 LncRNA NEAT1 表达水平预测 BA 患者急性发作的曲线下面积为 0.903,最佳截断值为 1.73,敏感性为 81.80%,特异性为 88.90%。结论:BA 患者急性发作期外周血 LncRNA NEAT1 高表达,可能与 Th1/Th2 平衡紊乱有关。

关键词 支气管哮喘;长链非编码 RNA;核富集转录本 1;辅助性 T 细胞;平衡

中图分类号 R562.2⁺5 文献标识码 A DOI 10.11768/nkjwzzzz20200508

Expression of LncRNA NEAT1 in peripheral blood of patients with bronchial asthma during acute attack and its relationship with Th1/Th2 balance QIAN Hui, QIAN Wen-xia*. The Affiliated Zhangjiagang Hospital of Soochow University, Zhangjiagang 215600, China

Abstract Objective: To investigate the expression level of long non-coding RNA (LncRNA) nuclear enrichment transcript 1 (NEAT1) in peripheral blood plasma of patients with bronchial asthma (BA) during acute attack and its relationship with the balance of helper T cell 1 (Th1)/helper T cell 2 (Th2). Methods: A total of 36 patients in remission period (remission period group) and 44 patients in acute attack period (acute attack period group) were selected. Fifty healthy volunteers served as control group during the same period. The expression of LncRNA NEAT1 in peripheral blood plasma was detected by real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR), the proportion of Th1 and Th2 cells in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) was determined by flow cytometry, and the levels of interferon- γ (IFN- γ) and interleukin-4 (IL-4) in peripheral blood plasma were determined by ELISA. Pearson test was used to analyze the relationships between the expression of LncRNA NEAT1 and the ratios of Th1/Th2, IFN- γ /IL-4 in peripheral blood plasma of patients with acute BA attack, and the ROC curve was drawn to analyze the predictive value of LncRNA NEAT1 expression level for acute BA attack. Results: The expression level of LncRNA NEAT1 in peripheral blood plasma of acute attack group was the highest, followed by remission group and control group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). The proportion of Th1 cells and the ratio of Th1/Th2 in PBMC were in turn control group, remission group and acute attack group, the proportion of Th2 cells in PBMC was in turn acute attack group, remission group and control group, and there was significant difference between any two groups ($P < 0.05$). The level of IFN- γ and the ratio of IFN- γ to IL-4 in peripheral blood plasma were in the order of control group, remission group and acute attack group, and the level of IL-4 was in the order of acute attack group, remission group and control group, and there was significant difference between any two groups ($P < 0.05$). The expression of LncRNA NEAT1 in peripheral blood plasma of patients with acute attack of BA was negatively correlated with the ratios of Th1/Th2 and IFN- γ /IL-4 ($P < 0.05$). The area under the ROC curve of expression level of LncRNA NEAT1 in peripheral blood plasma predicting the acute attack in BA patients was 0.903, the optimal truncation value was 1.73, the sensitivity was 81.80%, and the specificity was 88.90%. Conclusions: LncRNA NEAT1 is highly expressed in plasma of BA patients during acute attack, which may be related to the disturbance of Th1/Th2 balance.

Keywords Bronchial asthma; Long non-coding RNA; Nuclear enrichment transcript 1; Helper T cells; Balance

* 通信作者:钱文霞, E-mail: qwx1208.happy@163.com

支气管哮喘(bronchial asthma,BA)是由多种细胞及细胞组分参与的异质性炎症性疾病,其发病与变应原等多种因素有关,患者可在接触变应原时急性发作,症状严重者可能会因急性发作而死亡。淋巴细胞中的辅助性 T 细胞 1(T helper cell 1,Th1)、辅助性 T 细胞 2(T helper cell 2,Th2)在 BA 发病中起关键作用,Th1/Th2 平衡失调参与 BA 病情进展^[1,2]。而长链非编码 RNA(long non-coding RNA,LncRNA)核富集转录本 1(nuclear enriched abundant transcript 1,NEAT1)在机体免疫反应中起重要作用^[3]。本研究通过检测 LncRNA NEAT1 表达,分析其与 Th1/Th2 平衡的关系。

资料与方法

一般资料 选取 2017 年 4 月~2019 年 4 月苏州大学附属张家港医院呼吸科收治的 BA 患者 80 例进行前瞻性研究,其中缓解期 36 例(缓解期组)、急性发作期 44 例(急性发作期组)。纳入标准:①均符合 BA 相关诊断标准^[4];②近 1 个月内未使用免疫抑制剂,且 72 h 内未应用其他平喘药物。排除标准:①有 BA 家族史;②发生过敏性鼻炎、荨麻疹等;③伴有严重肝、肾功能障碍者;④合并严重肺部感染者;⑤近 3 个月内接受过外科手术者。本研究经医院伦理委员会批准,患者或家属知情并签署知情同意书。

缓解期组 36 例(男 20,女 16),年龄 20~55 岁,平均(39.16±9.28)岁;急性发作期组 44 例(男 25,女 19),年龄 20~55 岁,平均(38.75±9.40)岁,其中轻度 12 例、中度 17 例、重度 15 例。另选取同期本院体检健康者 50 例(男 27,女 23)作为对照组,年龄 20~55 岁,平均(38.91±9.07)岁。上述 3 组受试者基本资料比较,差异无统计学意义(均 $P > 0.05$)。

方法

1. 标本收集。收集受试者(对照组于体检当天,缓解期组和急性发作期组于入院次日清晨)空腹肘静脉血 5 mL,取 3 mL 置入肝素预处理的抗凝管中,以 3 000 r/min 离心 5 min,取上清血浆用于检测 LncRNA NEAT1 及干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ)、白细胞介素-4(interleukin-4, IL-4)表达水平。另

2 mL 肝素抗凝后,使用 Ficoll-Hypaque 分离液(购自武汉安特捷生物技术有限公司)分离提取外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC),用于测定 Th1、Th2 细胞比例。

2. LncRNA NEAT1 表达水平检测。利用实时荧光定量 PCR(real time fluorescence quantitative PCR, qRT-PCR)测定外周血 LncRNA NEAT1 表达水平。采用 Trizol 试剂盒(购自美国 Invitrogen 公司)提取血浆中总 RNA,参照 AMV 逆转录酶(购自上海雅吉生物科技有限公司)说明书将总 RNA 逆转录为 cDNA,并以其为模板进行扩增反应。引物合成由广州伯信生物科技有限公司完成,见表 1。反应程序为 95℃、1 min,95℃、5 s,60℃、30 s,共 40 个循环。重复 3 次,反应完成后通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算血浆中 LncRNA NEAT1 相对表达水平。

3. Th1、Th2 细胞比例及相关细胞因子 IFN- γ 、IL-4 水平测定。应用 BD FACSCalibur 型流式细胞仪(购自北京艾格斯生物科技有限公司)测定 PBMC 中 Th1、Th2 细胞比例,用 Th1、Th2 分泌的特异细胞因子 IFN- γ 、IL-4 进行区分,并采用 CD3、CD8 反设 CD4 细胞,以防止 PMA 诱发细胞表面 CD4 分子被内吞,具体检测方法参照说明书及文献^[5]进行。应用酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)测定外周血 IFN- γ 、IL-4 水平,试剂盒均由南京卡米洛生物工程有限公司提供。

统计学处理 采用 SPSS19.0 统计学软件,计数资料采用百分数(%)表示,行 χ^2 检验;计量资料均符合正态分布且方差齐,以($\bar{x} \pm s$)表示,2 组间比较行 t 检验,3 组间比较使用单因素方差分析,总体有差异时使用 t 检验进行两两比较。采用 Pearson 检验分析 BA 急性发作期患者外周血 LncRNA NEAT1 表达与 Th1/Th2、IFN- γ /IL-4 比值的相关性,并采用 ROC 曲线分析外周血 LncRNA NEAT1 表达水平对 BA 患者急性发作的预测价值。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

外周血 LncRNA NEAT1 表达水平 对照组、缓解期组、急性发作期组外周血 LncRNA NEAT1 表达水平分别为(0.99±0.28)、(1.47±0.39)、(2.25±

表 1 引物序列

项目	正向引物 5'→3'	反向引物 5'→3'
LncRNA NEAT1	CTTCCTCCCTTTAATTATCCATTAC	CTCTTCCTCCACCATTAACCAACAATAC
β -actin	CACGAAACTACCTTCAACTCC	CATACTCCTGCTTGCTGATCT

0.60), 3 组间比较差异有统计学意义 ($F = 96.545$, $P = 0.000$)。进一步两两比较发现, 急性发作期组、缓解期组显著高于对照组 ($t = 13.301$, $P = 0.000$; $t = 6.648$, $P = 0.000$), 且急性发作期组高于缓解期组 ($t = 6.721$, $P = 0.000$)。

PBMC 中 Th1、Th2 细胞比例及 Th1/Th2 比值 急性发作期组、缓解期组 PBMC 中 Th1 细胞比例及 Th1/Th2 比值明显低于对照组, 且急性发作期组低于缓解期组 ($P < 0.05$); 急性发作期组、缓解期组 Th2 细胞比例显著高于对照组, 且急性发作期组高于缓解期组 ($P < 0.05$), 见图 1、表 2。

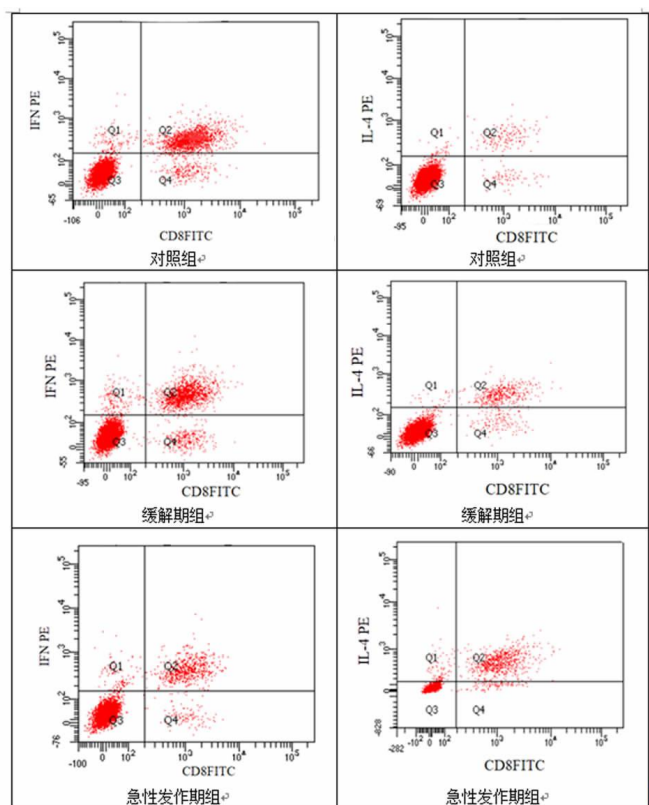


图 1 3 组 PBMC 中 Th1、Th2 细胞表达情况

表 2 3 组 PBMC 中 Th1、Th2 细胞比例及 Th1/Th2 比值比较

($\bar{x} \pm s$)

组别	例	Th1 细胞 (%)	Th2 细胞 (%)	Th1/Th2
对照组	50	19.7 ± 4.9	2.5 ± 0.6	8.0 ± 2.1
缓解期组	36	14.9 ± 3.8 [#]	4.0 ± 1.1 [#]	3.7 ± 0.9 [#]
急性发作期组	44	11.0 ± 2.8 ^{#*}	5.8 ± 1.5 ^{#*}	1.9 ± 0.5 ^{#*}

注: 与对照组比较, [#] $P < 0.05$; 与缓解期组比较, ^{*} $P < 0.05$

外周血 IFN- γ 、IL-4 水平及 IFN- γ /IL-4 比值 急性发作期组、缓解期组外周血 IFN- γ 水平及 IFN- γ /IL-4 比值显著低于对照组, 且急性发作期组低于缓解期组 (均 $P < 0.05$); 急性发作期组、缓解期组 IL-4 水平明显高于对照组, 且急性发作期组高于缓

解期组 (均 $P < 0.05$), 见表 3。

表 3 3 组外周血 IFN- γ 、IL-4 水平及 IFN- γ /IL-4 比值比较

($\bar{x} \pm s$)

组别	例	IFN- γ (pg/mL)	IL-4 (pg/mL)	IFN- γ /IL-4
对照组	50	71.3 ± 18.1	13.6 ± 3.4	5.2 ± 1.4
缓解期组	36	59.5 ± 15.1 [#]	20.9 ± 5.3 [#]	2.9 ± 0.7 [#]
急性发作期组	44	44.0 ± 12.0 ^{#*}	29.3 ± 8.0 ^{#*}	1.5 ± 0.4 ^{#*}

注: 与对照组比较, [#] $P < 0.05$; 与缓解期组比较, ^{*} $P < 0.05$

BA 急性发作期患者外周血 LncRNA NEAT1 表达与 Th1/Th2、IFN- γ /IL-4 比值的相关性 BA 急性发作期患者外周血 LncRNA NEAT1 表达与 Th1/Th2、IFN- γ /IL-4 比值呈负相关 ($r = -0.590$, $r = -0.627$, 均 $P < 0.05$), 见图 2。

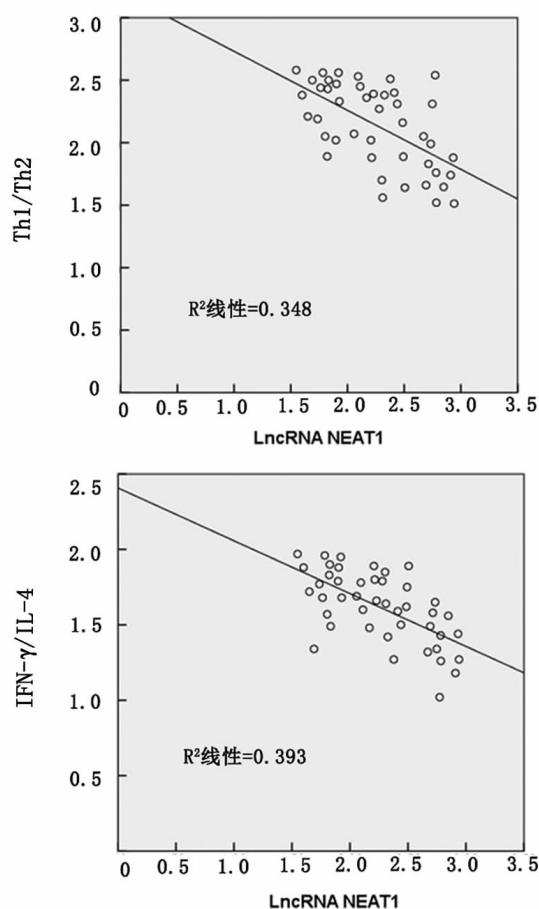


图 2 BA 急性发作期患者外周血 LncRNA NEAT1 表达与 Th1/Th2、IFN- γ /IL-4 比值的相关性

外周血 LncRNA NEAT1 表达水平对 BA 患者急性发作的预测价值 外周血 LncRNA NEAT1 表达水平预测 BA 患者急性发作的曲线下面积为 0.903 (95% CI 为: 0.834 ~ 0.972), 最佳截断值为 1.73, 敏感性为 81.80%, 特异性为 88.90%, 见图 3。

讨论

BA 是临床常见的慢性呼吸系统疾病, 以气道慢

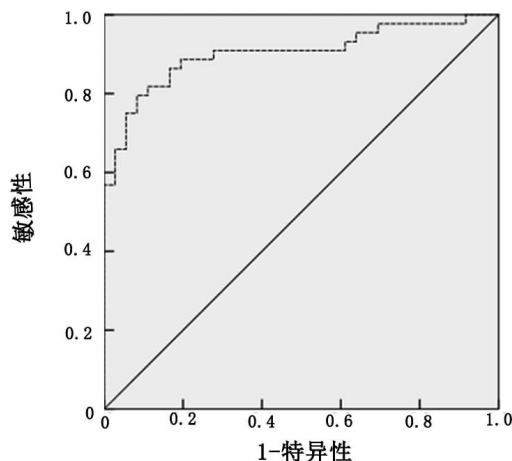


图3 外周血 lncRNA NEAT1 表达水平对 BA 急性发作的预测价值

性炎症及气道高反应性为特征,若诊治不及时,随病情进展可引起气道不可逆性缩窄或重塑,且急性发作时极易出现呼吸衰竭等情况。因此,寻找可靠有效的生物标记物用于判断 BA 病情,对延缓疾病进展及预防急性发作具有重要作用。

LncRNA 是由 RNA 聚合酶 II 转录生成,在基因转录和转录后调节等多种生理、病理过程中发挥重要作用^[6]。近年研究证实,LncRNA 参与调节多种固有免疫相关基因的表达,如 NEAT1 等^[7]。研究发现,处于细胞发育阶段特异性表达的 LncRNA 可随着淋巴细胞的分化而动态变化,参与调节 T 细胞生长、分化及机体免疫反应^[8,9]。NEAT1 位于染色体 11q13.1 上,广泛表达于 T 淋巴细胞、树突状细胞等免疫细胞中,并与其发育、分化等密切相关^[10]。Zhong 等^[11]研究报道,LncRNA NEAT1 是小鼠创伤性脑损伤治疗的一种重要介质,在固有免疫系统中起关键作用。T 淋巴细胞是机体免疫系统的重要组成部分,参与 BA 等炎症性疾病病情进展。而 Th1、Th2 是 CD4⁺ T 细胞的 2 个亚群,Th1/Th2 平衡对维持机体免疫环境稳态至关重要,失调则可导致异常免疫反应^[12]。Th1 细胞分泌的 IFN- γ 和 Th2 细胞分泌的 IL-4 等相关细胞因子,可参与机体一系列促炎与抗炎反应^[13]。王彩云等^[14]研究发现,重症支气管哮喘患者 PBMC 中 Th1 细胞比例及外周血中 IFN- γ 水平均远低于健康人群,Th2 细胞比例及 IL-4 水平均远高于健康人群。

本研究中,急性发作期和缓解期 BA 患者外周血 lncRNA NEAT1 表达水平均远高于对照组,且急性发作期明显高于缓解期,提示 lncRNA NEAT1 高表达可能与 BA 发生、发展有关。研究发现,与对照组比较,BA 患者 PBMC 中 Th1 细胞比例、Th1/Th2 比值、外周血 IFN- γ 水平及 IFN- γ /IL-4 比值明显降

低,PBMC 中 Th2 细胞比例及外周血 IL-4 水平明显升高,尤其是急性发作期患者,与王彩云等^[14]研究相似,提示 Th1/Th2 细胞平衡失调可能参与 BA 病情进展,且 IFN- γ 、IL-4 水平变化可能进一步加剧 Th1/Th2 细胞失衡状态。Pearson 检验分析发现,BA 急性发作期患者外周血 lncRNA NEAT1 表达与 Th1/Th2、IFN- γ /IL-4 比值均呈负相关,推测 lncRNA NEAT1 参与 BA 急性发作可能与 Th1/Th2 细胞失调有关。此外,ROC 曲线分析显示,外周血 lncRNA NEAT1 表达水平预测 BA 患者急性发作的曲线下面积为 0.903,提示 lncRNA NEAT1 表达对 BA 患者急性发作具有较高的诊断价值,可作为评估 BA 患者急性发作的有效指标之一。

参考文献

- Ding F, Fu Z, Liu B. Lipopolysaccharide exposure alleviates asthma in mice by regulating Th1/Th2 and Treg/Th17 balance [J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24(1): 3220-3229.
- Diao M, Min J, Guo F, et al. Effects of salbutamol aerosol combined with magnesium sulfate on T-lymphocyte subgroup and Th1/Th2 cytokines of pediatric asthma [J]. *Exp Ther Med*, 2017, 13(1): 117-120.
- Shui X, Chen S, Lin J, et al. Knockdown of lncRNA NEAT1 inhibits Th17/CD4⁺ T cell differentiation through reducing the STAT3 protein level [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(12): 22477-22484.
- 中华医学会呼吸病学分会哮喘学组. 支气管哮喘防治指南(2016 年版) [J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2016, 39(9): 675-697.
- 王丽华, 王亮亮, 张兢, 等. 卵巢癌患者外周血 Th1/Th2 及 Treg/Th17 细胞平衡关系 [J]. *南方医科大学学报*, 2017, 37(8): 1066-1070.
- Lin L, Wang L, Li H, et al. Characterization of lncRNA expression profile and identification of novel lncRNA biomarkers to diagnose coronary artery disease [J]. *Atherosclerosis*, 2018, 275(1): 359-367.
- 郭晓平, 向颖, 袁帅, 等. 非小细胞肺癌患者外周血中 lncRNA NEAT1 的表达及诊断意义 [J]. *第三军医大学学报*, 2019, 41(5): 56-61.
- Wang SY, Fan XL, Yu QN, et al. The lncRNAs involved in mouse airway allergic inflammation following induced pluripotent stem cell-mesenchymal stem cell treatment [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2017, 8(1): 2-10.
- 任舒婷, 彭辉勇, 王胜军. 长链非编码 RNA (lncRNA) 与类风湿性关节炎关系的研究进展 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2018, 34(3): 278-281.
- Zhang F, Wu L, Qian J, et al. Identification of the long noncoding RNA NEAT1 as a novel inflammatory regulator acting through MAPK pathway in human lupus [J]. *J Autoimmun*, 2016, 75(1): 96-104.
- Zhong J, Jiang L, Huang Z, et al. The long non-coding RNA Neat1 is an important mediator of the therapeutic effect of bexarotene on traumatic brain injury in mice [J]. *Brain Behav Immun*, 2017, 65(1): 183-194.
- Silva FMC, Oliveira EE, Gouveia ACC, et al. Obesity promotes prolonged ovalbumin-induced airway inflammation modulating T helper type 1 (Th1), Th2 and Th17 immune responses in BALB/c mice [J]. *Clin Exp Immunol*, 2017, 189(1): 47-59.
- Qian LJ, Kang SM, Xie JL, et al. Early-life gut microbial colonization shapes Th1/Th2 balance in asthma model in BALB/c mice [J]. *BMC Microbiol*, 2017, 17(1): 135-141.
- 王彩云, 连宁芳, 王碧瑛, 等. 重症支气管哮喘患者 CD4⁺ T 淋巴细胞免疫功能分析 [J]. *免疫学杂志*, 2019, 35(2): 157-162.

(2019-07-19 收稿 2019-12-13 修回)