哮喘患者血清中循环 lncRNA 差异性表达的初步筛查

李博文 高 卓 梁红艳 姜晓峰

摘 要 目的 对哮喘患者血清中差异性表达的 lncRNA 进行初步筛选,找到可以对哮喘诊断提供临床意义的潜在新型分子标志物。**方法** 收集哮喘患者血清 50 例,健康体检者血清 32 例,选择 17 种循环 lncRNA,包括 HULC、PRNCR1、TUSC7、PCGEM1、PCA3、TUC338、MEG3、UCA1、PTENP1、SNHG16、MALAT1、THRIL、NAET1、lnc - IL7R、GAS5、MIR155HG、TUG1。利用实时荧光定量 PCR(RT - qPCR)技术检测 lncRNA 在血清中的差异性表达。**结果** 对 17 种 lncRNA 进行筛查表明,lncRNA PCGEM1 在哮喘患者血清中表达水平显著低于体检者血清($P<0.01$)。另外,GAPDH 作为内参,在筛选 lncRNA 的过程中表达稳定,其不受样本年龄、性别、发病情况的影响。**结论** lncRNA PCGEM1 在哮喘患者血清中显著低表达,可能成为临床诊断哮喘潜在的新型分子标志物。GAPDH 可以作为本实验的循环 lncRNA 筛选的内参。

关键词 哮喘 循环长链非编码 RNA 差异性表达 分子标志物

中图分类号 R4 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.03.009

Preliminary Screening of Differential Expression of Circulating lncRNA in Serum of Asthmatic Patients. *Li Bowen, Gao Zhuo, Liang Hongyan, et al. Department of Clinical Laboratory, The Fourth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Heilongjiang 150001, China*

Abstract Objective LncRNAis selected for the differential expression of serum of asthmatic patients, in order to find a new molecular marker for diagnosis of asthma. **Methods** We collected serum of 50 cases of asthma patients and 32 cases of healthy volunteers. We choose 17 kinds of circulating lncRNA to test, incldingHULC, PRNCR1, TUSC7, PCGEM1, PCA3, TUC338, MEG3, UCA1, PTENP1, SNHG16, MALAT1, THRIL, NAET1, Lnc - IL7R, GAS5, MIR155HG, TUG1. Real - time quantitativepolymerase chain reaction (RT - qPCR) was used to find differential expression of serum. **Results** The 17 kinds of lncRNA screening showed that the expression level of lncRNA PCGEM1 in serum of asthmatic patients was significantly lower than that in normal subjects. Also, GAPDH was used as internal reference, stably expressed in lncRNA screening process. It had no relation to age, gender and disease incidence. **Conclusion** The expression of lncRNA PCGEM1 in serum of asthmatic patients may be a novel molecular marker for clinical diagnosis of asthma. GAPDH can be used as the reference of circulating lncRNA screening.

Key words Asthma; Circulating long non - coding RNA; Differential expression; Molecular marker

支气管哮喘(bronchial asthma,以下简称哮喘),是由多种细胞(如 T 淋巴细胞)和细胞组分(如白细胞介素)参与的气道慢性炎症性疾病。具有气道高反应性,可逆性气流受限等特点。近年来哮喘患病率呈逐年增高的趋势,严重影响患者的生活质量。长链非编码 RNA(long non - coding RNA)是长度在 200 个核苷酸以上的非编码 RNA。尽管绝大多数的 lncRNA 序列缺少编码功能,但某些 lncRNA 可以编码少量核苷酸[1]。lncRNA 作为癌症的早期筛选标志物,从经济效益、社会效益、家庭效益等方面都有非常有意义和有前景。现在人们普遍认为 lncRNA 可以作为癌症的早期筛选标志物,因为其在经济、社会及家庭等多方面的有重要意义。多数的实验是通过对肿瘤组织中 lncRNA 表达的差异性进行证明。对于哮喘这样不使用病理检验进行诊断的疾病,提供一种在体液中即可进行早期筛选的分子标志物将对哮喘疾病的诊断提供重要意义。而血液、尿液等体液样本中的 lncRNA,表达稳定且具有组织特异性,使其成为疾病早期诊断和预后监测最适合的分子标志物。

一直以来,人们认为哮喘的发生主要与 TH2 细胞分泌的细胞因子有关,如 IL - 13、IL - 4、IL - 5

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81171657)

作者单位:150001 哈尔滨医科大学附属第四医院检验科

通讯作者:姜晓峰,教授,主任医师,博士生导师,电子信箱:jiangxiaofeng12359@163.com

等[2]。另有报道称 IL－33 也通过与 TH2 细胞的作用参与哮喘的发病[3]。哮喘发病与 lncRNA 的相关性目前还尚未有任何报道。本实验首次对哮喘患者血清进行初步筛查，找到有差异性表达的循环 lncRNA，为临床诊断哮喘提供潜在的分子标志物。

对象与方法

1. 对象：选择 2014 年 1～12 月在哈尔滨医科大学附属第四医院呼吸科住院的哮喘患者为研究对象。哮喘患者入选标准符合文献标准[4]。本实验共选择实验对象 82 例，包括：(1)哮喘急性发作期组：患者 35 例，其中男性 18 例，女性 17 例，患者年龄 1～83 岁。入院后均给予糖皮质激素、支气管扩张剂解痉、平喘治疗。其中，有肺部相关疾病病史 12 例，无相关病史 38 例。(2)缓解组：患者 15 例，其中男性 8 例，女性 7 例，患者年龄 3～70 岁，近 1 个月没有哮喘急性发作。(3)正常体检组：32 例患者，其中男性 14 例，女性 18 例，患者年龄 21～73 岁。无变态反应性疾病史，近 2 个月未患过感染性疾病。

2. 仪器和试剂：Tizol 购自天根生化科技公司，引物购自上海生工生物公司，Premix Ex Taq™ 试剂购自大连宝生物工程公司，罗氏实时荧光定量 PCR 仪 Lightcycler480®(Software 1.5)。

3. 方法：(1)血标本收集：采集实验对象静脉血 4ml，于无抗凝剂的标本采集管中。在室温(20～25℃)放置 60min 后，3000r/min 离心 10min 后，分离血清 1ml 至 EP 管中，12000r/min 离心 10min 后，留取上清 800μl 于－80℃冰箱冻存。(2)提取 RNA：利用 Trizol 试剂快速提取法，提取哮喘患者和体检者血清中 RNA。经 DNA 酶处理后，反转录为 cDNA，合成的 cDNA 存于－20℃ 冰箱备用。(3)RT－qPCR 反应条件：95℃ 30s 预变性，95℃ 5s，63℃ 30s，95℃ 10s 40 个循环。96 孔板进行样本筛选，每个样本进行 3 次重复实验。17 种 lncRNA 以及 GAPDH 引物序列见表 1。

4. 统计学方法：使用 GraphPad Prism 6.0 软件进行数据分析，计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示，哮喘组和体检组组间差异性通过 t 检验比较，敏感度和特异性分析使用 ROC 曲线分析，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结　　果

1. 内参 GAPDH 稳定性分析：在比较不同年龄、不同性别和不同发病期 GAPDH 表达情况时发现：GAPDH 不随上述情况的变化而变化，各组间差异无统计学意义(P均 >0.05)，表明GAPDH可以在本实验中作为血清中循环 lncRNA 检测的稳定内参(表 2)。

表 1　lncRNA 以及 GAPDH 引物序列

目的基因		引物序列(5′→3′)
GAPDH	上游	ATTTGGCTACAGCAACAGGGTG
	下游	TGGTTGAGCACAGGGTACTTTATTG
PCGEM1	上游	ACCTTTTTGCCCTATGCCGT
	下游	ACGTTGAGTCCCAGTGCATC
HULC	上游	ACTCTGAAGTAAAGGCCGGAAT
	下游	TTGCCAGGAAACTTCTTGCTT
MIR155HG	上游	TGGAACAAATTGCTGCCGTG
	下游	AGGTTGAACATCCCAGTGACC
PRNCR1	上游	TGGACTGCCCATCTCCTGAT
	下游	TCTGAAGTTGTTGCGGTCAGT
TUSC7	上游	CAGCAGCCTGGACAGCTAAT
	下游	ACATAAGGCGAACACTGGCA
UCA1	上游	CTTCTCCATTCAGACCGCCA
	下游	ACAAGGTGCCAGTTAGCGTA
PCA3	上游	AGCTGGGGAGGAGATAACCA
	下游	ATGTTGGGCCCAGAAGGAAC
TUC338	上游	TAGCCCAATTGTGCAGTGTGA
	下游	CTCAGACACAATTTGAAACGAGC
MEG3	上游	CCATCACCTGGATGCCTACG
	下游	CCTGTCCCGTGGGAATAGGT
PTENP1	上游	TGCATTCTTGCATGTATTTGGGT
	下游	AGCAGCCAATTCCTCGAATGT
SNHG16	上游	AATGTGAGTTAGCTCCCAGCG
	下游	CAATCCTTGCAGTCCCATCG
THRIL	上游	CTCCAGGAGAGTTTGGGTCC
	下游	AGATAACCCCTGCCAGACCT
MATAT1	上游	AGCAGACACACGTATGCGAA
	下游	GTGGTTCCCAATCCCCACAT
GAS5	上游	TGCAGTGTGGCTCTGGATAG
	下游	ATGGCTTGAGTTAGGCTTGCT
TUG1	上游	CCCGAAAGAGCTTGTCACGA
	下游	GGTGGTAGTGCTTGCTCAGT
NAET1	上游	AGTTAAGGCGCCATCCTCAC
	下游	AGCACTGCCACCTGGAAAAT
lnc－IL7R	上游	ATCGGGAAGGAGCCAATGAC
	下游	CGATAGGCTTAATCCGTCCAT

表 2　内参 GAPDH 稳定性比较分析 ($\bar{x} \pm s$)

类别	n	CT 值	P
年龄(岁)			
<50	47	22.36 ± 2.48	0.170
≥50	35	21.6 ± 2.35	
性别			
男性	40	21.56 ± 2.39	0.990
女性	42	21.58 ± 2.54	
发病情况			
急性发作期	35	21.83 ± 2.31	0.600
缓解期	15	22.99 ± 4.10	

2. ROC 曲线分析：lnc PCGEM1 可以在哮喘血清

和体检血清中区分出来。lnc PCGEM1 的 ROC 曲线下面积(AUC)为 0.9525(95% CI:0.9075 ~ 0.9977),最佳截点是 0.02297,在截点处的敏感度为 98.00%,特异性 96.88%(图 1)。

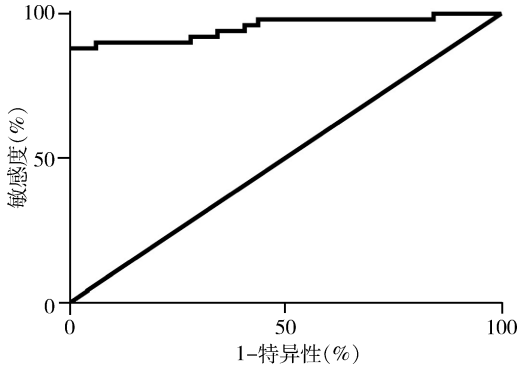

图 1 lncRNAPCGEM1 ROC 曲线

3. 对哮喘组和体检组血清中 lncRNAPCGEM1 表达差异性:图 2A 结果表明,lncRNAPCGEM1 在哮喘组血清中表达明显低于体检组($P = 0.001$)。图 2B 和图 2C 结果表明,lncRNAPCGEM1 在哮喘急性发作组和缓解组血清中均较体检组呈显著低表达($P = 0.001$)。

讨 论

哮喘是威胁公共健康的最常见的慢性肺部疾病。哮喘的病因复杂,病理机制未完全阐明,现普遍认为哮喘是由一些环境因素和遗传因素相互作用而形成的多基因遗传病[4,5]。lncRNA 在胚胎细胞的发育增殖过程中有多种作用[6~9]。lncRNA 可以调节分子信号,作为分子诱饵,调节特殊位点的基因表达,也可以连结蛋白或分子。研究表明lncRNA在免疫应答中

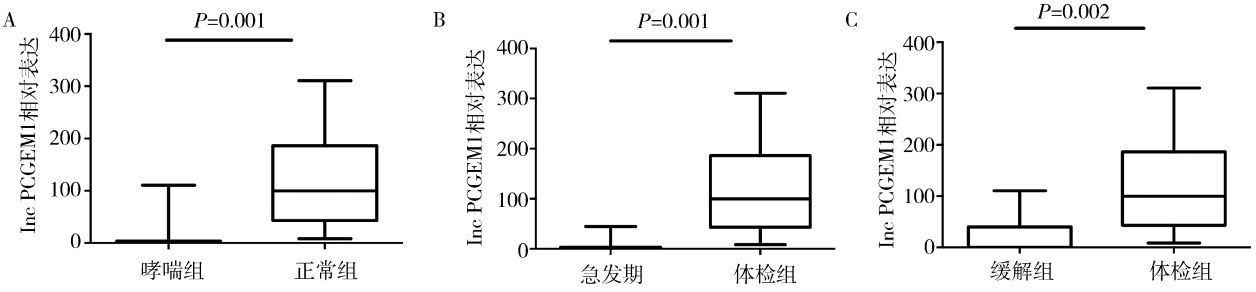

图 2 血清中 lncRNA PCGEM1 表达情况

也有重要作用[10]。据文献报道 lncRNA 参与炎性介质的调节或细胞因子的表达[11]。实验选择的 17 种 lncRNA 在炎性作用或免疫应答方面都有相关的文献记载。循环 lncRNA 研究是目前的一个研究热点,使用 RT-qPCR 进行实验过程中,内参的选择十分重要,但国际上没有统一的定论。在本研究选择 GAPDH 作为内参,并对其稳定性进行了分析,结果可靠。

目前,没有文献报道 lncRNA 与哮喘之间的关系,本实验首次对二者之间的关系进行了研究。在数百种 lncRNA 中选择了可能与哮喘发病相关的 17 种 lncRNA 进行小样本量的筛查。比中如与非小细胞肺癌存在潜在相关性的 GAS5,与免疫应答相关的 Lnc-IL7R。幸运的是笔者找到了在哮喘血清总低表达的循环 lncRNAPCGEM1($P < 0.05$),结果显示 lncRNAPCGEM1 在对哮喘进行诊断的过程中具有较高的敏感度,lncRNAPCGEM1 是前列腺癌的潜在基因表达标志物。PCGEM1 作为前列腺特异表达的基因,也是在前列腺癌中第 1 个被发现的致癌 lncRNA[12]。另外,PCGEM1 在减弱凋亡反应和促进细胞增殖的过程中也有过度表达[13]。据文献报道,PCGEM1 是受雄激素受体(AR)调节的一种基因[14]。

本实验存在一定的局限性。首先在实验方法的选择上 RT-qPCR 通量较低,并不是目前进行相关实验的最好方法。同时样本数量不足以更好的证实 lncRNAPCGEM1 在哮喘中低表达的稳定性。其次实验中仅对单一哮喘疾病进行了研究,今后应对其他相关疾病进行对比研究,使实验结果更加完整可靠。最后由于对 lncRNA PCGEM1 在哮喘发病中作用机制的文献资料较少,致使实验结果尚存一些未解决的困惑。比如结果表明 lncRNA PCGEM1 在哮喘患者血清中低表达,而且急性发作期和缓解期均表达出一致的差异性,这就对 lncRNA PCGEM1 跟哮喘二者之间是伴发关系还是因果关系提出了质疑。如果是因果关系,具体作用机制等问题将成为笔者今后研究的方向。

参考文献

1 Qiu MT, Hu JW, Yin R, *et al*. Long noncoding RNA: an emerging paradigm of cancer research[J]. Tumour Biol, 2013, 34(2): 613-620

2 Ingram JL, Kraft M. IL-13 in asthma and allergic disease: Asthma phenotypesand targeted therapies[J]. J Allergy Clin Immunol, 2012,

130(4):829 - 842
3 Makrinioti H, Toussaint M, Jackson DJ, *et al*. Role of interleukin 33 in respiratory allergy and asthma[J]. Lancet Respir Med, 2014, 2(3):226 - 237
4 中华医学会呼吸病学分会. 支气管哮喘防治指南[J]. 中华结核病和呼吸杂志, 1997, 20(5):261 - 267
5 Song GG, Lee YH. Pathway analysis of genome - wide association study on asthma[J]. Human Immunol, 2013, 74(2):256 - 260
6 Guttman M, Rinn JL. Modular regulatory principles of large non - coding RNAs[J]. Nature, 2012, 482(7385):339 - 346
7 Guttman M, Russell P, Ingolia NT, *et al*. Ribosome profiling provides evidence that large noncoding RNAs do not encode proteins[J]. Cell, 2013, 154(1):240 - 251
8 Gibb EA, Vucic EA, Enfield KS, *et al*. Human cancer long non - coding RNA transcriptomes[J]. PLoS One, 2011, 6(10):259 - 265
9 Hung T, Chang HY. Long noncoding RNA in genome regulation: prospects and mechanisms[J]. RNA Biol, 2010, 7(5):582 - 285
10 Yang L, Lin C, Jin C, *et al*. lncRNA - dependent mechanisms of androgen - receptor - regulated gene activation programs[J]. Nature, 2013, 500(7464): 598 - 602
11 Katsutoshi I, Nobuyoshi A. Long non - coding RNAs involved in immune responses[J]. Front Immunol, 2014, 11(5):573 - 576
12 Srikantan V, Zou Z, Petrovics G, *et al*. PCGEM1, a prostate - specific gene, is overexpressed in prostatecancer[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(22):12216 - 12221
13 Fu X, Ravindranath L, Tran N, *et al*. Regulation ofapoptosis by a prostate - specific and prostate cancer - associated noncodinggene, PCGEM1[J]. DNA Cell Biol, 2006, 25(3):135 - 141
14 Petrovics G, Zhang W, Makarem M, *et al*. Elevated expression of PCGEM1, a prostate - specific gene with cellgrowth - promoting function, is associated with high - risk prostate cancerpatients[J]. Oncogene, 2004, 23(2):605 - 611

(收稿日期:2015 - 07 - 30)
(修回日期:2015 - 08 - 20)

(上接第 30 页)

drug delivery system[J]. Arch Pharm Res, 2014, 37(1):4 - 15
3 Kuo MT. Redox Regulation of multidrug resistance in cancer chemotherapy: molecular mechanisms and therapeutic opportunities[J]. Antioxid Redox Signal, 2009, 11(1): 99 - 133
4 Aramugam T, Ramachandran V, Fournier KF, *et al*. Epithelial to mesenchymal transition contributes to drug resistance in pancreatic cancer[J]. Cancer Res, 2009, 69(14):5820 - 5828
5 Felicity M, Davis, Teneale A, *et al*. Targeting EMT in cancer: opportunities for pharmacological intervention[J]. Trends Pharmacol Sci, 2014, 35(9):479 - 488
6 Peng Z, Wang CX, Fang EH, *et al*. Role of epithelial mesenchymal transition in gastric cancer initiation and progression[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(18):5403 - 5410
7 Jiang JH, Liu C, Cheng H, *et al*. Epithelial mesenchymal transition in pancreatic cancer: is it a clinically significant factor? [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2015, 1855(1):43 - 49
8 Shinichi Y, Shweta GP, Nathaniel R, *et al*. Notch signaling pathway targeted therapy suppresses tumor progression and metastatic spread in pancreatic cancer[J]. Cancer Lett, 2013, 335(1): 41 - 51
9 Du X, Cheng Z, Wang YH, et al. Role of Notch signaling pathway in gastric cancer: a Meta - analysis of the literature[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(27):9191 - 9199
10 Fuxe J, Vincent T, Garcia de Herreros A. Transcriptional crosstalk between TGF - β and stem cell pathways in tumor cell invasion: role of EMT promoting Smad complexes[J]. Cell Cycle, 2010, 9(12): 2363 - 2374
11 Saad S, Stanners SR, Yong R, *et al*. Notch mediated epithelial to mesenchymal transformation is associated with increased expression of the Snail transcription factor[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2010, 42(7): 1115 - 1122
12 Wang Z, Li Y, Kong D, *et al*. Acquisition of epithelial - mesenchymal transition phenotype of gemcitabine resistant pancreatic cancer cells is linked with activation of the notch signaling pathway[J]. Cancer Res, 2009, 69(6): 2400 - 2407
13 Nickel A, Stadler SC. Role of epigenetic mechanisms in epithelial - to - mesenchymal transition of breast cancer cells[J]. Transl Res, 2015, 165(1):126 - 142
14 Tania M, Khan MA, Fu J. Epithelial to mesenchymal transition inducing transcription factors and metastatic cancer[J]. Tumour Biol, 2014, 35(8):7335 - 7342
15 Asakura T, Yamaguchi N, Ohkawa K, *et al*. Proteasome inhibitor - resistant cells cause EMT induction via suppression of E - cadherin by miR - 200 and ZEB1[J]. Int J Oncol, 2015, 46(5):2251 - 2260
16 Bao B, Wang ZW, Ali SD, *et al*. Notch - 1 induces Epithelial - mesenchymal transition consistent with cancer stem cell phenotype in pancreatic cancer cells[J]. Cancer Lett, 2011, 307(1): 26 - 36

(收稿日期:2015 - 07 - 20)
(修回日期:2015 - 08 - 27)