

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.15.008

Let-7a 在哮喘 T 淋巴细胞失衡中的作用研究 *

段明玥¹ 吴守振¹ 李海龙² 杨玉琮^{3Δ}

(1 西安交通大学医学部 陕西 西安 710061; 2 西安市第九医院 陕西 西安 710048;

3 西安交通大学第一附属医院检验科 陕西 西安 710061)

摘要 目的:探讨 let-7a 在哮喘中的表达水平及调节 T 淋巴细胞亚群失衡的功能作用。**方法:**收集 39 例哮喘患者及 19 例非哮喘对照, Real-time PCR 检测 let-7a 的表达。从哮喘患者外周血单核细胞(Peripheral blood mononuclear cell, PBMC)中分选 Th1, Th2 和 Th17 细胞, 检测 let-7a 在 T 淋巴细胞亚群中的表达。磁珠分选 naive T 细胞, 分别诱导分化成 Th1、Th2 和 Th17 细胞, 分析 let-7a 在 T 淋巴细胞亚群中的表达。Let-7a mimic 分别转染 Th2 和 Th17 细胞, ELISA 检测 IL-13 和 IL-17 的表达。**结果:**与对照组比较, let-7a 在哮喘患者肺组织和血清中低表达, 并随着哮喘病程进展, let-7a 的表达水平也越低。哮喘患者来源的 CD4⁺T 细胞中, let-7a 表达明显低于非哮喘对照组。Let-7a 在哮喘来源和体外刺激分化的哮喘炎性 Th2 和 Th17 细胞中的表达明显下调, 而在 Th1 细胞中的表达没有变化。Let-7a mimic 改变了 Th2 和 Th17 相关细胞因子 IL-13 和 IL-17 的表达。**结论:**Let-7a 在哮喘中低表达, 调节哮喘 T 淋巴细胞亚群失衡, 改变了 Th2 和 Th17 细胞的功能, 是哮喘理想的诊断和治疗靶点。

关键词: Let-7a; 哮喘; 生物标志物

中图分类号: R562.2+5; R446 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2017)15-2829-04

The Function of Let-7a in the Imbalance of T Cell in Asthma*

DUAN Ming-yue¹, WU Shou-zhen¹, LI Hai-long², YANG Yu-cong^{3Δ}

(1 Health Science Center, Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi, 710061, China;

2 The Second Department of Geriatrics, Ninth Hospital of Xi'an, Xi'an, Shaanxi, 710048, China;

3 Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi, 710061, China)

ABSTRACT Objective: To analyze let-7a expression in patients with asthma and explore the bio-function of let-7a on the imbalance of T cell subsets in asthma. **Methods:** 39 patients with asthma and 19 non-asthma control were recruited in this research. The expression of let-7a was analyzed using Real-time PCR. The naive T cells were separated with magnetic beads, and then differentiated into Th1, Th2 and Th17 cells under cytokines stimulation in vitro, respectively. IL-13 and IL-17 were further detected with ELISA after let-7a mimic was transfected into Th2 and Th17 cells. **Results:** Compared with control group, let-7a was down-regulated in lung tissue and serum in patients with asthma. At the same time, the expression of let-7a was decreased with the development of asthma progression. Furthermore, let-7a expression was decreased in CD4⁺T cells in patients with asthma than that in control group. Interestingly, let-7a was significantly down-regulated in Th2 and Th17 cells from either patients with asthma or the differentiation in vitro, whereas let-7a expression had no significant change in Th1 cells. Let-7a inhibited IL-13 secretion in Th2 and IL-17 in Th17 cells, respectively, indicating that let-7a had an important role on the function of Th2 and Th17 cells. **Conclusions:** Down-expressing let-7a in asthma regulated the imbalance of T cell subsets and altered the function of Th2 and Th17 cells. Thus, let-7a may be an ideal bio-marker for asthma diagnosis and therapy.

Key words: Let-7a; Asthma; Biomarker

Chinese Library Classification(CLC): R562.2+5; R446 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)15-2829-04

前言

支气管哮喘是一种异质性疾病, 发病机制复杂多样, 与多种细胞(如嗜酸粒细胞、肥大细胞、T 淋巴细胞等)和细胞组分相关。近年来, 哮喘已成为全球性公共卫生问题。全球约有 3 亿哮喘患者, 每年死于哮喘的人数多达 25 万^[1]。对亚洲包括中国

在内的 12 个国家的研究显示, 仅有 2.9 % 的哮喘控制符合全球哮喘防治倡议(Globla Initiative for Asthma)^[2]。目前, 临床上多根据患者的临床体征和肺功能测定进行哮喘的严重程度分级和指导用药。因此, 寻找灵敏度好、特异性高、可量化测定的生物学标志物在哮喘的诊断、治疗和哮喘管理中显得尤为重要。

微小 RNA(miRNAs)是长度为 19-25 nt 的单链 RNA, 通过

* 基金项目: 陕西省自然科学基金基础研究计划项目(2016JM8096)

作者简介: 段明玥(1984-), 硕士研究生, 助理研究员, 主要研究方向: 免疫学, E-mail: dmy117@163.com

Δ 通讯作者: 杨玉琮, 博士研究生, 硕士生导师, 主任医师, 主要研究方向: 临床免疫学诊断技术及方法学研究,

E-mail: yyc1103@mail.xjtu.edu.cn, 电话: 029-85323502

(收稿日期: 2016-12-09 接受日期: 2016-12-30)

与靶 mRNA 碱基配对调节基因表达。近来的研究表明,多数 miRNAs (如 miR-21、miR-146、let-7a 等)参与了哮喘的发生和进展,在哮喘中异常表达。这些 miRNAs 不但可以作为哮喘的生物标志物,而且是哮喘潜在的治疗靶点^[3]。已有文献报道,let-7a 在哮喘患者^[4]和鸡卵白蛋白(ovalbumin,OVA)诱导的动物模型中表达下调,其模拟物能够在哮喘小鼠中减少炎症细胞的浸润,以及减少黏蛋白的分泌和气道高反应,作用机制是 let-7a 调节 IL-13 的表达,抑制哮喘中 Th2 的功能^[5]。

本研究,我们检测了哮喘患者血清、Th 细胞、肺组织中 let-7a 的表达,测定了体外诱导分化的 Th 细胞中 let-7a 的表达,分析探讨 let-7a 作为哮喘生物标志物的可能性。

1 材料与方法

1.1 材料

人淋巴细胞分离液购于中国灏洋生物科技有限责任公司;Naive CD4⁺T 细胞分选试剂盒和 MACS 分选 LS 柱购自德国 Miltenyi 生物科技有限公司;抗 CD3、CD28、IL-4、IL-12、IFN- γ 单克隆抗体和 IL-2、IL-4、IL-6、IL-12、IL-23、IFN- γ 和 TGF- β 细胞因子购自美国 eBioscience 公司;let-7a 引物和探针、RPMI 1640 培养基和 TRIZOL 均购自美国 Invitrogen 公司;let-7a mimic 购自广东锐博公司;所有转染和实时定量试剂购自 Roche 公司;miRNeasy FFPE 试剂盒购自 Qiagen 公司。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 西安市第九医院老年病科 2012 年 9 月至 2014 年 12 月住院确诊的哮喘患者 39 例,其中男性 21 例,女性 18 例,年龄(53~72)岁,平均(63.37 $\pm$ 8.94)岁。按照哮喘严重程度分级标准,分为中度和重度。诊断检查包括肺功能检测和肺组织活检。所有患者的诊断和分组都符合中华医学会哮喘学组《支气管哮喘防治指南》,排除合并高血压、糖尿病、冠心病、风湿性关节炎等严重疾病,近 3 周内未使用茶碱或糖皮质激素。19 例非哮喘患者(肺组织肉芽肿 11 例,肺癌 8 例)为对照组,年龄(48~69)岁,平均(61.25 $\pm$ 7.88)岁。各组间性别、年龄差异均无统计学意义。实验经医院伦理委员会论证和支持,所有参与者均签订知情同意书。

1.2.2 外周血单核细胞(PBMC)分离 取新鲜的白膜 50 mL,1:1 与无血清无双抗 RPMI 1640 培养基混合,充分混匀;取 50 mL 无菌离心管 4 只,每管加入淋巴细胞分离液 25 mL,等比例沿管壁缓慢加入混匀的白膜,保持分层界面清晰;将加好白膜的离心管 2000 rpm 离心 20 min,吸取中间乳白色分离云雾状细胞层,加入 PBS 补至 50 mL,室温离心 1500 rpm,8 min;小心弃去上清,用少量 PBS 充分重悬细胞后,加入 PBS 至 50 mL,离心洗涤细胞 2 次;弃上清,细胞计数,即得到人外周血单核细胞 PBMC。

1.2.3 Naive T 淋巴细胞分选 将所获得的 PBMC 按照每 10⁷ 个细胞加入 40 μ L 磁珠洗液,充分重悬细胞,并加入 10 μ L Naive CD4⁺T 细胞生物素抗体每 10⁷ 个细胞,混合均匀,避光 4 $^{\circ}$ C 孵 10 min;每 10⁷ 个细胞加 2 mL 磁珠洗液,重悬后 1500 rpm 离心 5 min,弃上清;每 10⁷ 细胞加入 80 μ L 磁珠洗液重悬后加入 20 μ L 抗生物素磁珠,避光 4 $^{\circ}$ C 孵育 15 min;重复一次;每 10⁸ 个细胞加入 500 μ L 磁珠洗液重悬细胞;安装好磁珠分选架

后,取 LS 柱固定在架子上,并用 3 mL 洗液平衡柱子两次;将细胞悬液缓慢加入 LS 柱,尽量避免气泡,收集穿过 LS 柱的细胞悬液,加入 2 mL 洗液洗涤柱子两次,收集流过柱子的洗涤液,将洗涤液与之前的细胞悬液混合;离心并进行细胞计数,所得细胞为 naive T 淋巴细胞。

1.2.4 T 淋巴细胞亚群体外诱导 以细胞板包被的抗 CD3 和可溶性抗 CD28 刺激 T 细胞,以 PBS 稀释抗 CD3(3 μ g/mL)和抗 CD28(2 μ g/mL)包被平底细胞培养板,将 naive CD4⁺T 细胞以 2 $\times$ 10⁵/孔接种于包被好的 48 孔板中,进行细胞培养。Th1 细胞分化条件为:IL-12(5 ng/mL),IFN- γ (100 ng/mL)和抗 IL-4(5 ng/mL),以 IL-2(1 ng/mL)刺激生长;Th2 细胞分化条件为:IL-4(10 ng/mL),抗 IL-12(5 μ g/mL)和 IFN- γ (5 ng/mL),以 IL-2(1 ng/mL)刺激生长;Th17 细胞分化条件:IL-6(30 ng/mL),TGF- β (3 ng/mL),抗 IFN- γ (5 μ g/mL),抗 IL-4(5 ng/mL),以 IL-23(10 ng/mL)刺激生长。

1.2.5 real-time PCR Trizol 处理各 T 淋巴细胞亚群细胞,常规方法提取总 RNA;以 let-7a Tagman 探针进行荧光定量 PCR,检测 let-7a 在 T 淋巴细胞亚群中的表达。

1.2.6 Let-7a mimic 转染 从外周血中分选 Naive T 细胞,体外诱导分化成不同的 T 淋巴细胞亚群,方法同前。分别在诱导前或诱导后以 let-7a mimic 转染 T 细胞,操作按转染试剂说明书中进行。

1.2.7 ELISA 检测细胞因子 收集各 T 淋巴细胞培养上清,4 $^{\circ}$ C 离心 20 min,取上清;实验分别设置标准孔、空白孔以及待测样品孔,每组均做 3 个复孔,每孔体积为 100 μ L,空白孔为样品稀释液。加样时直接加入孔底,避免气泡,加覆膜后置于 37 $^{\circ}$ C 反应 120 min;弃去孔内液体并甩干,不用洗涤直接加入生物素标记抗体工作液(1:1000 临用前配置)100 μ L,盖上覆膜 37 $^{\circ}$ C 反应 60 min;弃去液体,甩干后,洗板 3 次,每次浸泡 2 min,甩干;加入 100 μ L 辣根过氧化物酶标记的亲合素工作液(1:1000 临用前配置),37 $^{\circ}$ C 孵育 60 min;弃去液体甩干后,洗板 5 次每次浸泡 2 min,甩干;加入 TMB 底物工作液,每孔 90 μ L,避光 37 $^{\circ}$ C 显示 15 至 30 min。按加入底物工作液的顺序依次加入终止液 50 μ L,终止反应;在终止反应后 15 min 中内,在 450 nm 波长处检测每孔的光密度值。

1.3 统计学分析

采用 SPSS13.0 统计软件进行统计学处理,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用方差分析。以 P<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 哮喘患者血清和组织中 let-7a 的表达分析

为了研究 let-7a 在哮喘患者中的表达水平,我们检测了 18 例中度和 21 例重度哮喘患者肺组织和外周血中 let-7a 的表达,Real-time PCR 结果表明:let-7a 在哮喘患者肺组织(图 1A)和血清(图 1B)中表达水平明显降低,且随着哮喘病程进展,let-7a 的表达水平越低,提示 let-7a 可能是哮喘严重程度的生物标志物。

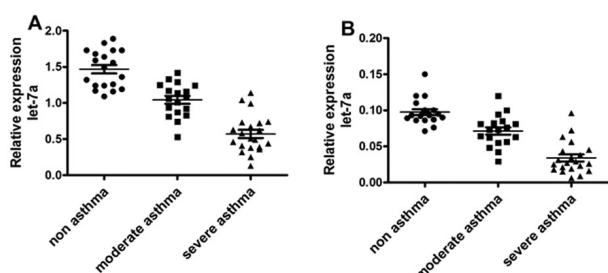


图1 Let-7a在哮喘患者中的表达结果

Fig.1 Expression of let-7a in asthma patients

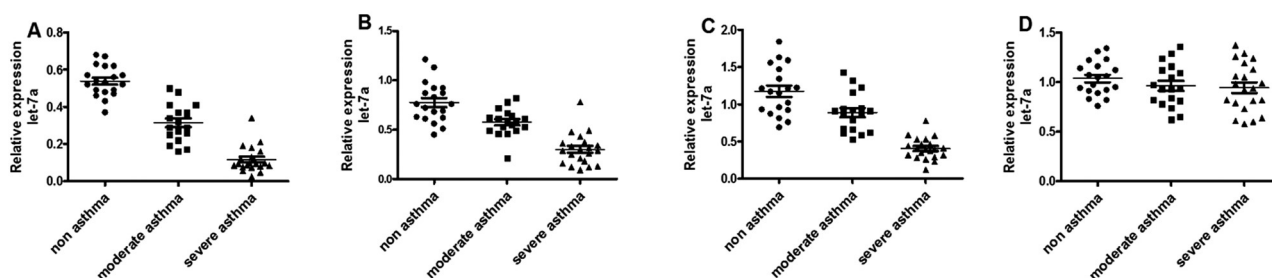


图2 Let-7a在哮喘患者Th细胞中的表达结果

Fig.2 Expression of let-7a in Th cells of asthma patients

2.3 体外诱导刺激的哮喘炎症Th中let-7a的表达分析

为进一步研究let-7a在哮喘炎症Th细胞中的表达,我们从正常人外周血中分选了Naive T淋巴细胞,体外诱导刺激成哮喘炎症的T淋巴细胞亚群。如图3所示,与对照组相比,let-7a在哮喘炎症的Th1细胞中的表达没有差异,而在哮喘炎症的Th2和Th17细胞中表达明显降低,具有统计学差异, $P < 0.05$ 。

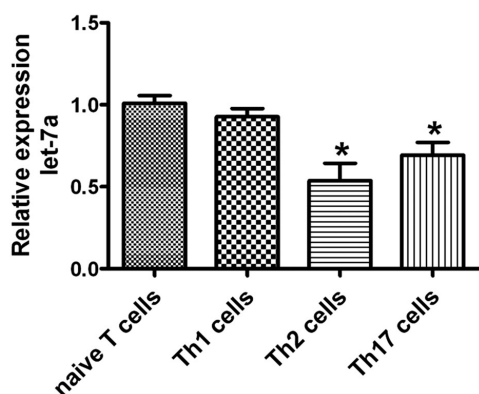
图3 Let-7a在体外诱导哮喘炎症的Th细胞中的表达结果(* $P < 0.05$)

Fig.3 Expression of let-7a in induced Th cell associated with asthma

2.4 哮喘中let-7a对Th2和Th17功能的影响

为研究哮喘中let-7a是否影响Th细胞的功能,我们以let-7a mimic分别转染Th2和Th17细胞,检测细胞因子分泌变化。结果表明,let-7a明显降低了Th2细胞中IL-13的表达, $P < 0.05$ (图4A),抑制了Th17细胞IL-17的分泌, $P < 0.05$ (图4B),这些结果提示let-7a通过改变Th2和Th17细胞的功能促进哮喘的发展。

3 讨论

哮喘是全球性的公共卫生问题,严重威胁人类健康。随着我国经济的快速发展和空气质量日益恶化,哮喘已成为威胁我

2.2 Let-7a在哮喘患者Th中的表达

Th细胞在哮喘中发挥重要的作用,因此,我们进一步分析了let-7a在哮喘Th细胞中的表达。结果表明,与非哮喘对照比较,let-7a在哮喘患者CD4⁺T淋巴细胞中表达下调(图2A)。进一步,我们分选了Th细胞亚群,结果显示,与非哮喘比较,Let-7a在Th2(图2B)和Th17(图2C)细胞中的表达明显降低,而在Th1细胞(图2D)中表达没有差异,提示let-7a可能参与了哮喘Th细胞的分化。

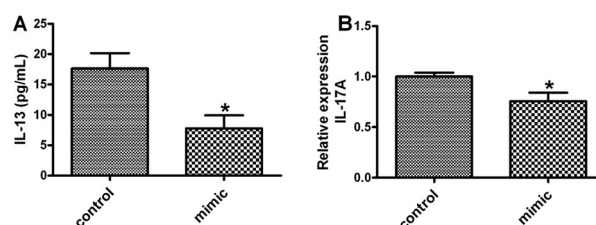
图4 Let-7a mimic对Th2和Th17细胞功能的影响(* $P < 0.05$)

Fig.4 Effect of let-7a on the cell function of Th2 and Th17

国居民健康的一种常见疾病。血清中的生物标志物可为哮喘的诊断和临床用药治疗提供有力支持。寻求有效、理想的生物标志物不但为哮喘的治疗提供新的靶点,也为哮喘的诊断提供物质基础。miRNAs进化上具有高度保守性,通过转录后调控基因的表达,参与疾病的发生发展,如免疫性疾病、肿瘤、神经系统疾病等^[6-8]。疾病中异常表达的miRNAs,不但是疾病发病机制的关键分子,也是疾病诊断、治疗的潜在靶点。研究发现,miRNAs(如miR-21、miR-146、let-7a等)在哮喘中异常表达^[9-11],参与了哮喘的发生和进展,可以作为哮喘的生物标志物。本研究中,我们检测了let-7a在哮喘患者中的表达水平,结果表明let-7a在哮喘患者肺组织和血清中呈现低表达,而且随着病程的进展,let-7a的表达随之降低,提示let-7a可能是哮喘诊断的有效生物标志物,这一结果与以前的报道一致^[4]。

哮喘是由多种细胞及细胞组分参与的慢性气道炎症,主要表现为气道高反应性、支气管狭窄和黏蛋白分泌增加^[1]。哮喘患者伴有高IgE血症以及T淋巴细胞浸润,提示免疫反应在哮喘发病中具有重要的作用。成熟的T淋巴细胞发挥着细胞免疫及免疫调节等功能,是高度不均一的细胞群体,主要包括Th1、Th2、Th17和Treg等不同亚群,在免疫应答和过敏性反应中发挥着不同的生物学作用。在哮喘中,T淋巴细胞亚群(Th1/Th2/Th17/Treg)为失衡状态,是哮喘发生的主要驱动因素^[12-14]。本研究分析了let-7a在哮喘患者CD4⁺T淋巴细胞中的表达,发现其

与肺组织和血清中的表达结果一致,提示 let-7a 可能参与了哮喘中的 T 淋巴细胞亚群失衡。为证实该假设,我们分选了哮喘患者外周血中的 Th1、Th2 和 Th17 细胞,并检测了 let-7a 的表达水平。结果表明,let-7a 在哮喘患者的 Th2 和 Th17 细胞中表达明显下调,而在 Th1 细胞中的表达没有变化,提示 let-7a 是哮喘中 T 淋巴细胞亚群失衡的主要关键分子。进一步,我们从正常人外周血中分选了 Naive T 淋巴细胞,体外诱导刺激分化成哮喘炎性的 Th1、Th2 和 Th17 细胞,Real-time PCR 检测 let-7a 的表达,结果表明 let-7a 与哮喘患者体内表达一致,这些结果从体内证实了 Let-7a 在哮喘相关的 Th2 和 Th17 细胞中的作用,提示 let-7a 可能通过调节 T 淋巴细胞分化促进了哮喘的发生与进展。

T 淋巴细胞亚群(Th1/Th2/Th17/Treg)失衡及其产生的细胞因子 " 风暴 " 是哮喘发生的主要原因。IL-13 是由 Th2 产生的经典的促气道黏液细胞因子,是调控气道黏液分泌的关键和强效介质^[15]。Th17 细胞分泌的 IL-17 是与哮喘发病相关的细胞因子网络的主要成员之一,在哮喘发病中起着重要作用^[16,17]。IL-17 可诱导气道嗜酸性粒细胞浸润,参与气道高反应性的发生;同时促进气道中性粒细胞的募集、激活,参与哮喘气道慢性炎症反应。本研究中,我们进一步揭示了哮喘中 let-7a 对 Th2 和 Th17 细胞功能的影响,发现 let-7a mimic 降低了 Th2 细胞中 IL-13 的分泌表达和 Th17 细胞中 IL-17 的分泌表达,改变了 Th2 和 Th17 细胞的功能。这些结果提示哮喘中低表达的 let-7a 与 Th2 和 Th17 相关的细胞因子 IL-13 和 IL-17 的高表达密切相关,促进哮喘的发生,是哮喘发病的关键分子,有望成为哮喘治疗的潜在靶点。已有文献报道^[9],let-7a 能够与 IL-13 的 mRNA 结合从而抑制 Th2 细胞中 IL-13 的表达,但是 let-7a 如何调控 IL-17 的机制仍不清楚,有待进一步研究。

参考文献(References)

- [1] Olin JT, Wechsler ME. Asthma: pathogenesis and novel drugs for treatment[J]. BMJ, 2014, 349: g5517
- [2] Lai CK, Ko FW, Bhome A, et al. Relationship between asthma control status, the Asthma Control Test™ and urgent health-care utilization in Asia[J]. Respirology, 2011, 16(4): 688-697
- [3] Lu TX, Rothenberg ME. Diagnostic, functional, and therapeutic roles of microRNA in allergic diseases [J]. J Allergy Clin Immunol, 2013, 132(1): 3-13
- [4] 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): 6103-6108
- [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] Frixa T, Donzelli S, Blandino G. Oncogenic MicroRNAs: Key Players in Malignant Transformation [J]. Cancers (Basel), 2015, 7 (4): 2466-2485
- [7] Cogoni C, Ruberti F, Barbato C. MicroRNA landscape in Alzheimer's disease[J]. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2015, 14(2): 168-175
- [8] Azizian A, Gruber J, Ghadimi BM, et al. MicroRNA in rectal cancer [J]. World J Gastrointest Oncol. 2016, 8(5): 416-426
- [9] Yang L, Boldin MP, Yu Y, et al. miR-146a controls the resolution of T cell responses in mice[J]. J Exp Med, 2012, 209(9): 1655-1670
- [10] Panganiban RP, Wang Y, Howrylak J, et al. Circulating microRNAs as biomarkers in patients with allergic rhinitis and asthma[J]. J Allergy Clin Immunol, 2016, 137(5): 1423-1432
- [11] Munitz A, Karo-Atar D, Foster PS. Asthma diagnosis: MicroRNAs to the rescue[J]. J Allergy Clin Immunol, 2016, 137(5): 1447-1448
- [12] Fahy JV. Type 2 inflammation in asthma--present in most, absent in many[J]. Nat Rev Immunol, 2015, 15(1): 57-65
- [13] Arima M, Fukuda T. Prostaglandin D2 and T (H)2 inflammation in the pathogenesis of bronchial asthma [J]. Korean J Intern Med, 2011, 26(1): 8-18
- [14] Strickland DH, Holt PG. T regulatory cells in childhood asthma[J]. Trends Immunol, 2011, 32(9): 420-427
- [15] Kuperman DA, Huang X, Koth LL, et al. Direct effects of interleukin-13 on epithelial cells cause airway hyperreactivity and mucus overproduction in asthma[J]. Nat Med, 2002, 8(8): 885-889
- [16] Shalaby KH, Martin JG. Overview of asthma; the place of the T cell [J]. Curr Opin Pharmacol, 2010, 10(3): 218-225
- [17] Chen H, Xu X, Teng J, et al. CXCR4 inhibitor attenuates ovalbumin-induced airway inflammation and hyperresponsiveness by inhibiting Th17 and Tc17 cell immune response[J]. Exp Ther Med, 2016, 11(5): 1865-1870
- [24] Song L, Liu M, Ono N, et al. Loss of wnt/β-catenin signaling causes cell fate shift of preosteoblasts from osteoblasts to adipocytes [J]. Journal of Bone & Mineral Research, 2012, 27(11): 2344-2358
- [25] Kawai M, Rosen C J. PPARγ: a circadian transcription factor in adipogenesis and osteogenesis[J]. Nature Reviews Endocrinology, 2010, 6(11): 629
- [26] Wei W, Wang X, Yang M, et al. PGC1β mediates PPARγ activation of osteoclastogenesis and rosiglitazone-induced bone loss [J]. Cell Metabolism, 2010, 11(6): 503-516
- [27] Ullah M, Stich S, Notter M, et al. Transdifferentiation of mesenchymal stem cells-derived adipogenic-differentiated cells into osteogenic- or chondrogenic-differentiated cells proceeds via dedifferentiation and have a correlation with cell cycle arresting and driving genes [J]. Differentiation, 2013, 85(3): 78-90

(上接第 2816 页)