

儿童呼吸系统疾病实验室检验专题·论著 DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2023.06.002

血清 lncRNA-GAS5 及 miR-451 在重症肺炎患儿中的表达水平及临床意义*

李娜¹, 王维娟¹, 曾静霞^{2△}

1. 西北妇女儿童医院儿科急诊与 PICU, 陕西西安 710061; 2. 南京医科大学附属儿童医院重症医学科, 江苏南京 210008

摘要:目的 探讨 lncRNA-GAS5 及 miR-451 在重症肺炎患儿血清中的表达及临床意义。方法 选取 2017 年 1 月至 2020 年 1 月西北妇女儿童医院收治的 89 例重症肺炎患儿为研究组, 另选取同期健康体检儿童 92 例作为对照组。通过实时荧光定量聚合酶链反应检测血清 lncRNA-GAS5 和 miR-451 水平; 通过免疫比浊法检测血清载脂蛋白 E(ApoE)及 C-反应蛋白(CRP)水平; 通过化学发光法检测血清降钙素原(PCT)水平; 通过 Pearson 相关分析 lncRNA-GAS5、miR-451 表达与 ApoE、CRP、PCT 水平的相关性; 通过受试者工作特征(ROC)曲线分析 lncRNA-GAS5 及 miR-451 对重症肺炎的诊断价值。结果 与对照组相比, 研究组血清 lncRNA-GAS5 水平明显降低, miR-451、ApoE、CRP、PCT 水平明显升高, 差异均有统计学意义($P < 0.05$); 重症肺炎患儿血清中 lncRNA-GAS5 表达与 ApoE、CRP、PCT 水平呈负相关($r = -0.493, -0.526, -0.477, P < 0.05$), miR-451 表达与 ApoE、CRP、PCT 水平呈正相关($r = 0.547, 0.446, 0.454, P < 0.05$); lncRNA-GAS5 与 miR-451 联合检测诊断重症肺炎的曲线下面积(AUC)高于二者单项检测。结论 lncRNA-GAS5 及 miR-451 可作为早期诊断重症肺炎的分子标志物。

关键词: lncRNA-GAS5; miR-451; 重症肺炎

中图分类号: R725.6

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2023)06-0725-04

Expression and clinical significance of serum lncRNA-GAS5 and miR-451 in children patients with severe pneumonia*

LI Na¹, WANG Weijuan¹, ZENG Jingxia^{2△}

1. Department of Pediatric Emergency and PICU, Northwest Women's and Children's Hospital, Xi'an, Shaanxi 710061, China; 2. Department of Critical Medicine, Affiliated Children's Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu 210008, China

Abstract: Objective To investigate the expression and clinical significance of lncRNA-GAS5 and miR-451 in serum of children patients with severe pneumonia. **Methods** Eighty-nine children patients with severe pneumonia in Northwest Women's and Children's Hospital from January 2017 to January 2020 were selected as the study group, and 92 healthy children undergoing physical examination in the same period were selected as the control group. The expression levels of serum lncRNA-GAS5 and miR-451 were detected by the real-time fluorescence polymerase chain reaction. The levels of serum apolipoprotein E (ApoE) and C-reactive protein (CRP) were detected by immunoturbidimetry. Serum procalcitonin (PCT) level was detected by chemiluminescence. The Pearson correlation analysis was used to analyze the correlation between lncRNA-GAS5 and miR-451 expression with the ApoE, CRP, PCT levels. The diagnostic value of lncRNA-GAS5 and miR-451 in severe pneumonia was analyzed by the receiver operating characteristic (ROC) curve. **Results** Compared with the control group, the serum lncRNA-GAS5 level in the study group was significantly decreased, the levels of miR-451, ApoE, CRP and PCT were significantly increased, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). The expression of lncRNA-GAS5 in the children patients with severe pneumonia was negatively correlated with the levels of ApoE, CRP and PCT ($r = -0.493, -0.526, -0.477, P < 0.05$), and the miR-451 expression was positively correlated with the levels of ApoE, CRP and PCT ($r = 0.547, 0.446, 0.454, P < 0.05$). The area under the curve (AUC) of lncRNA-GAS5 combined with miR-451 in the diagnosis of severe

* 基金项目: 西北妇女儿童医院内科科研项目(2018LQ01)。

作者简介: 李娜, 女, 主治医师, 主要从事儿内科方面的研究。△ 通信作者, E-mail: zengjx1114@163.com。

pneumonia was higher than that of the two indicators alone. **Conclusion** lncRNA-GAS5 and miR-451 could be used as the molecular markers for early diagnosis of severe pneumonia.

Key words: lncRNA-GAS5; miR-451; severe pneumonia

肺炎是儿童时期最为常见的呼吸道感染性疾病,是儿童死亡的重要原因。据流行病学调查结果显示,每年 5 岁以下发生肺炎的儿童约为 5 亿,其中有将近 10% 会发展成为重症肺炎^[1-2]。在我国,每年患肺炎的儿童人数在 2 000 万以上,占住院总患儿数量的 30%。儿童重症肺炎具有起病急、变化快、并发症多等特点,如果抢救不及时或诊治不当会使病情恶化,甚至造成患儿死亡。因此,对重症肺炎患儿的及时和正确的诊疗一直是儿科的重点关注方向。

长链非编码 RNA(lncRNA)是一类长度达 200 nt 的非编码 RNA,近年来的研究发现,其在细胞生长、代谢及包括肺炎在内的多种人类疾病中起重要作用。lncRNA 生长停滞特异性转录本 5(lncRNA-GAS5)最初是从 NIH3T3 细胞中分离出来的,该基因已被发现可编码一种与淋巴瘤相关的染色体位点。已有研究证明,lncRNA-GAS5 通过 miR-455-5p/SOCS3 途径促进肺炎患儿 M1 型巨噬细胞极化^[3]。miR-451 位于人类第 11 号染色体,是成熟红细胞中表达量最高的 miRNA,其表达量会随红细胞的分化而增加^[4]。已有研究表明,miR-451 缺乏会导致红细胞发育障碍。另有证据显示,miR-451 在肺的炎症性疾病的发生、发展过程中起重要作用,其异常表达可能成为诊断疾病的生物学标志物^[5]。基于此,本研究拟探讨 lncRNA-GAS5 与 miR-451 在重症肺炎患儿中的表达及临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2017 年 1 月至 2020 年 1 月西北妇女儿童医院收治的 89 例重症肺炎患儿为研究组,其中男 42 例、女 47 例,平均年龄(4.13±1.34)岁。另选取同期在该院进行体检的健康儿童 92 例作为对照组,其中男 43 例、女 49 例,平均年龄(4.37±1.46)岁。两组性别、年龄差异均无统计学意义($P > 0.05$)。纳入标准:(1)符合重症肺炎的诊断标准^[6];(2)患儿临床资料完整。排除标准:(1)有先天性心脏病、支气管肺发育不良等先天疾病的患儿;(2)有家族性遗传病的患儿;(3)既往有窒息病史的患儿;(4)合并有败血症等感染性疾病的患儿;(5)有意识障碍的患儿。本研究经西北妇女儿童医院伦理委员会批准,所有患儿家属均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 所有受试者均于清晨空腹采集静脉血 5 mL,以 3 000 r/min 离心 15 min,分离血清进行相关指标检查或置于-80 °C 冰箱中保存待测。

1.2.2 血清 lncRNA-GAS5 及 miR-451 水平的检测

通过 Trizol 试剂(Invitrogen,日本)提取血清中的总 RNA,并用分光光度计(Thermo Fisher Science,美国)测定 RNA 的浓度。根据制造商说明书,用 PrimeScript RT Master Mix 试剂盒(Takara,日本)将总 RNA 反转录成 cDNA。用 Takara SYBR Green PCR 试剂盒(Takara,日本)进行实时荧光定量聚合酶链反应(RT-PCR)。反应体系(20.0 μ L):SYBR Green Master Mix 10.0 μ L,cDNA 模板(20 ng/ μ L)2.0 μ L,上下游引物各 2.0 μ L,ddH₂O 4.0 μ L。反应条件:预变性 95 °C 30 s,变性 95 °C 5 s,退火 60 °C 30 s,延伸 72 °C 20 s,共 40 个循环。引物均由上海生工生物工程股份有限公司合成。本研究以 U6 为对照,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算 lncRNA-GAS5 及 miR-451 的相对表达水平。试验所用引物序列如表 1 所示。

表 1 试验所用引物序列

引物	序列(5'-3')
lncRNA-GAS5	F:CAACTTGCCTGGACCAGCTT
	R:TCAAGCCGACTCTCCATACC
miR-451	F:GGAAGATCTTGACAAGGAGGACAGGAGAG
	R:CCCAAGCTTGCCTTGTTTGAGCTGGAGTC
U6	F:CTTCAGCCGGCAGCT
	R:CGCTAAATTTGCGTTCAAACG

1.2.3 血清载脂蛋白 E(ApoE)、C-反应蛋白(CRP)及血清降钙素原(PCT)水平的检测 采用博科 BK-400 及其配套试剂(山东济南博科集团-博科生物有限公司)通过免疫比浊法检测血清 ApoE 及 CRP 的水平;采用免疫分析仪及其配套试剂(法国生物梅里埃公司)通过化学发光法检测血清 PCT 的水平。

1.3 统计学处理 采用 SPSS23.0 软件对数据进行统计分析。呈正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 t 检验;计数资料以 $n(\%)$ 表示,组间比较采用 χ^2 检验;采用 Pearson 相关分析血清 lncRNA-GAS5、miR-451 与 ApoE、CRP、PCT 的相关性;采用受试者工作特征(ROC)曲线评价 lncRNA-GAS5 与 miR-451 诊断重症肺炎的效能。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组受试者血清 lncRNA-GAS5 及 miR-451 的表达水平 与对照组相比,研究组血清 lncRNA-GAS5 的表达水平明显降低,miR-451 的表达水平明显升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

表 2 两组受试者血清 lncRNA-GAS5 及 miR-451 的表达水平($\bar{x} \pm s$)

组别	n	lncRNA-GAS5	miR-451
对照组	92	1.01±0.12	1.24±0.21
研究组	89	0.48±0.06	3.13±0.46
t		24.118	19.874
P		<0.001	<0.001

2.2 两组受试者血清 ApoE、CRP 及 PCT 水平 与对照组相比,研究组血清 ApoE、CRP 及 PCT 的水平均明显升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见表 3。

2.3 研究组患儿血清 lncRNA-GAS5、miR-451 与 ApoE、CRP、PCT 的相关性分析 Pearson 相关分析结果显示,血清 lncRNA-GAS5 表达水平与 ApoE、CRP、PCT 水平呈负相关($r = -0.493$ 、 -0.526 、 -0.477 , $P < 0.05$);血清 miR-451 表达水平与 ApoE、CRP、PCT 水平呈正相关($r = 0.547$ 、 0.446 、

0.454 , $P < 0.05$)。

表 3 两组受试者血清 ApoE、CRP 及 PCT 水平($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ApoE(mg/dL)	CRP(mg/L)	PCT(ng/mL)
对照组	92	2.18±0.39	5.76±1.42	0.11±0.02
研究组	89	6.22±1.03	10.96±2.38	0.48±0.08
t		18.642	13.558	16.731
P		<0.001	<0.001	<0.001

2.4 血清 lncRNA-GAS5 与 miR-451 对重症肺炎的诊断价值 通过 ROC 曲线分析血清 lncRNA-GAS5、miR-451 及二者联合诊断重症肺炎的效能,结果发现,血清 lncRNA-GAS5、miR-451 及二者联合检测诊断重症肺炎的曲线下面积(AUC)分别为 0.869(95% CI:0.813~0.924)、0.966(95% CI:0.943~0.989)及 0.979(95% CI:0.963~0.995),联合检测的 AUC 大于单项检测。见表 4 和图 1。

表 4 血清 lncRNA-GAS5 及 miR-451 对重症肺炎患儿的诊断价值

指标	AUC	AUC 的 95%CI	灵敏度(%)	特异度(%)	P	约登指数
lncRNA-GAS5	0.869	0.813~0.924	84.3	87.9	<0.05	0.722
miR-451	0.966	0.943~0.989	93.3	91.2	<0.05	0.845
lncRNA-GAS5+miR-451	0.979	0.963~0.995	86.1	92.1	<0.05	0.851

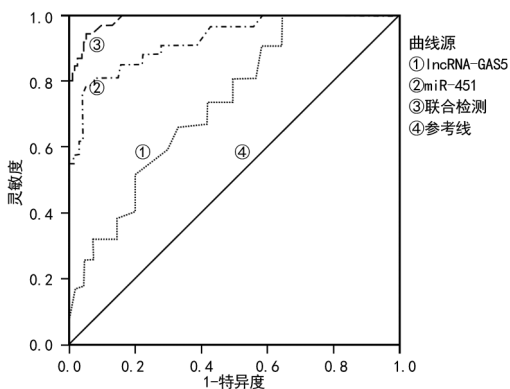


图 1 血清 lncRNA-GAS5 及 miR-451 诊断重症肺炎的 ROC 曲线

3 讨论

肺炎虽然是一种在临床上较为常见的疾病,但其却具有潜在的危险性,若不能及时干预,有发展成重症肺炎的风险,严重时会引起全身炎症反应、多器官功能障碍、脓毒性休克,甚至威胁患者的生命安全。据统计,重症肺炎患者病死率高于 30%,若抗感染治疗不及时,病死率将增加至 60%^[7]。因此,如何及时确诊并降低该病的病死率,是目前研究的重点。

已有研究证明,lncRNA 在生物体生长、发育过程中扮演重要角色,其可通过转录水平、转录后水平及

表观遗传学水平对靶基因的表达进行调控,参与多种疾病的发生、发展。近年来,lncRNA 已成为多种疾病的重要诊断标志物。在肺炎方面,已有多项研究证明 lncRNA 可能是其关键的调控因子。CUI 等^[8]发现,lncRNA NEAT1 可通过吸附 miR-146b 调节婴儿肺炎。CHEN 等^[9]则证明,lncRNA NNT-AS1、CRP 和 PCT 在肺炎患者中均高表达,且 lncRNA NNT-AS1 与 CRP、PCT 的表达呈正相关,共同促进肺炎的发生。lncRNA-GAS5 已被证明在多发性骨髓瘤、宫颈癌等癌症组织或血清中表达下调,并与患者预后相关^[10-11]。WANG 等^[12]的研究证明,与健康人群相比,lncRNA-GAS5 在肺炎患者血清中表达下调,其通过下调 miR-155 抑制脂多糖(LPS)诱导的人支气管上皮细胞凋亡。在本研究中,与健康儿童相比,重症肺炎患儿血清中 lncRNA-GAS5 表达明显降低,这与 WANG 等^[12]的研究结果一致。另外,本研究通过相关性分析还发现 lncRNA-GAS5 与 ApoE、CRP、PCT 的表达呈负相关。

miRNA 作为长度约为 22 个核苷酸的单链非编码 RNA,也在生物体中参与转录后基因表达调控。FEI 等^[13]的研究发现,在肺炎患儿中,miR-3941 表达下调,其可通过靶向 IGF2 调节 PI3K/AKT 通路的激

活,促进 LPS 诱导的 A549 细胞损伤。孙旦等^[14]研究显示,miR-492 在支原体肺炎患儿血清中的水平较健康儿童明显升高,这说明其可能参与支原体肺炎的炎症反应。近年来的研究发现,miR-451 可参与肿瘤、神经系统疾病及呼吸系统疾病的发生、发展^[15-17]。有研究证明,miR-451 可能通过抑制 Toll 样受体 4 (TLR4)/核因子- κ B 通路减缓哮喘气道炎症^[18-19]。本研究发现,与健康儿童相比,重症肺炎患儿血清中 miR-451 的表达明显上调,且其与 ApoE、PCT、CRP 的表达呈正相关。

另外,本研究通过 ROC 曲线分析发现,lncRNA-GAS5 诊断重症肺炎的灵敏度、特异度分别为 84.3%、87.9%,AUC 为 0.869;miR-451 诊断重症肺炎的灵敏度、特异度分别为 93.3%、91.2%,AUC 为 0.966。这一结果说明单项检测时 miR-451 对于重症肺炎的诊断效能高于 lncRNA-GAS5。对 lncRNA-GAS5 和 miR-451 进行联合检测,其灵敏度、特异度分别为 86.1%、92.1%,AUC 为 0.979。这一结果说明二者联合检测诊断重症肺炎时的诊断效能高于 lncRNA-GAS5、miR-451 单项检测。

综上所述,lncRNA-GAS5 和 miR-451 均有可能成为重症肺炎的早期诊断标志物,且二者联合检测的诊断效能高于单项检测。但本研究是单中心、小样本量研究,结果具有一定的局限性,因此还需要更大样本量的研究来验证上述结果。

参考文献

- [1] 戚丽雄. 儿童肺炎死亡危险因素的研究进展[J]. 国际儿科学杂志,2020,47(8):565-568.
- [2] RUDAN I, O'BRIEN K L, NAIR H, et al. Epidemiology and etiology of childhood pneumonia in 2010: estimates of incidence, severe morbidity, mortality, underlying risk factors and causative pathogens for 192 countries[J]. J Glob Health,2018,3(1):10401.
- [3] CHI X, DING B, ZHANG L, et al. lncRNA GAS5 promotes M1 macrophage polarization via miR-455-5p/SOCS3 pathway in childhood pneumonia[J]. J Cell Physiol,2018,234(8):13242-13251.
- [4] HUANG H, ZHU J, FAN L, et al. microRNA profiling of exosomes derived from red blood cell units: implications in transfusion-related immunomodulation [J]. Bio Med Res Int,2019,2019:2045915.
- [5] 颜月,李桃,方蕾. miR-144/451 在呼吸系统疾病中的研究进展[J]. 医学综述,2020,26(11):211721-211724.
- [6] PEDERSEN J H, RZYMAN W, VERONESI G, et al. Recommendations from the European Society of Thoracic Surgeons (ESTS) regarding computed tomography screening for lung cancer in Europe[J]. Eur J Cardiothorac Surg,2017,51(3):411-420.
- [7] WANG L, FAN Y, XU J, et al. The efficacy and safety of Tanreqing injection combined with western medicine for severe pneumonia: a protocol for systematic review and meta-analysis[J]. Medicine,2020,99(35):e22010.
- [8] CUI J, WANG J, LV Y, et al. lncRNA NEAT1 Regulates Infantile Pneumonia by Sponging miR-146b[J]. Mol Biotechnol,2021,63(8):694-701.
- [9] CHEN P, HUANG Z, CHEN L, et al. The relationships between lncRNA NNT-AS1, CRP, PCT and their interactions and the refractory mycoplasma pneumoniae pneumonia in children[J]. Sci Rep,2021,11(1):2059.
- [10] 高君碧. lncRNA GAS5 通过 miR-106b 调控宫颈癌放疗敏感性的研究[D]. 郑州:郑州大学,2019.
- [11] 高鹏,肖中平,付堃,等. lncRNA MEG3 和 lncRNA GAS5 在多发骨髓瘤血清中的表达及其临床意义[J]. 中国癌症防治杂志,2019,11(4):313-318.
- [12] WANG X P, GUO P, TIAN J, et al. lncRNA GAS5 participates in pneumonia by inhibiting cells apoptosis through the downregulation of miR-155[J]. BMC Pulm Med,2021,21(1):362.
- [13] FEI S, CAO L, PAN L. microRNA-3941 targets IGF2 to control LPS-induced acute pneumonia in A549 cells[J]. Mol Med Rep,2017,17(3):4019-4026.
- [14] 孙旦,李玉琴,丁莹,等. 儿童肺炎支原体肺炎外周血 miRNA-492 的表达[J]. 右江医学,2019,47(6):427-431.
- [15] YU N, YONG S, HONG K K, et al. Identification of tumor suppressor microRNAs by integrative microRNA and mRNA sequencing of matched tumor-normal pairs in lung adenocarcinoma[J]. Mol Oncol,2019,13(6):1356-1368.
- [16] FARAHANI D B, AKRAMI H, MORADI B, et al. The effect of hsa-miR-451b knockdown on biological functions of gastric cancer stem-like cells[J]. Biochem Genet,2021,59(5):1203-1224.
- [17] HEWEL C, KAISER J, WIERCZEIKO A, et al. Common miRNA patterns of Alzheimer's disease and Parkinson's disease and their putative impact on commensal gut microbiota[J]. Front Neurosci,2019,13:113.
- [18] SUN X, ZHANG H. miR-451 elevation relieves inflammatory pain by suppressing microglial activation-evoked inflammatory response via targeting TLR4[J]. Cell Tissue Res,2018,374(3):487-495.
- [19] LIU J S, DU J, CHENG X, et al. Exosomal miR-451 from human umbilical cord mesenchymal stem cells attenuates burn-induced acute lung injury[J]. J Chin Med Assoc,2019,82(12):895-901.