

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2019.06.008

◇临床医学◇

微小 RNA-144 在活动期肺结核病人外周血中的表达水平及临床意义

周冰,徐岩松,侯丽丽,谢耀萍,付鹏

作者单位:哈尔滨医科大学附属第一医院核医学科,黑龙江 哈尔滨 150001

通信作者:付鹏,男,主任医师,研究方向为核医学,E-mail:gxly915@163.com

摘要:目的 探讨活动期肺结核病人外周血中微小 RNA-144(mir-144)的表达水平及临床意义。方法 选择2016年1月至2017年4月哈尔滨医科大学附属第一医院活动期肺结核病人98例,另外选择同期进行体检的健康志愿者62例作为对照组。检测所有受试者血液中(mir-144)和血浆中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-10(IL-10)及单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)表达水平,分析 mir-144 的临床诊断意义。结果 与活动期肺结核病人相比,对照组血液中 mir-144 的表达水平明显升高[(1.53 $\pm$ 0.35)比(0.78 $\pm$ 0.21)],而血浆中 TNF- α [(5.03 $\pm$ 1.04) pg/mL 比(30.63 $\pm$ 7.23) pg/mL]、IL-10[(3.26 $\pm$ 0.85) pg/mL 比(24.08 $\pm$ 5.17) pg/mL]及 MCP-1[(201.33 $\pm$ 46.87) pg/mL 比(252.12 $\pm$ 58.63) pg/mL]表达水平显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$);活动期肺结核病人血液中 mir-144 的表达水平与血浆中 TNF- α 、IL-10 及 MCP-1 表达水平呈负相关($P<0.05$);绘制血浆 mir-144 诊断活动性肺结核的受试者工作特征曲线,曲线下面积为0.944,用最大约登指数法确定血浆 mir-144 诊断活性期肺结核的截断值为1.47,用其诊断活动性肺结核的灵敏度和特异度分别为96.88%和96.77%。结论 活动期肺结核病人外周血中的 mir-144 的表达水平异常降低,并且与相关指标密切联系,临床诊断意义重大,能够作为临床诊断活动期肺结核的生物指标。

关键词:微小 RNA-144; 活动期; 肺结核; 表达; 临床意义

Expression and clinical significance of mir-144 in peripheral blood of patients with active pulmonary tuberculosis

ZHOU Bing, XU Yansong, HOU Lili, XIE Yaoping, FU Peng

Author Affiliation: Department of Nuclear Medicine, The First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang 150001, China

Abstract: **Objective** To investigate the expression and clinical significance of mir-144 in peripheral blood of patients with active pulmonary tuberculosis. **Methods** Ninety-eight cases of patients with active pulmonary tuberculosis admitted to The First Affiliated Hospital of Harbin Medical University from January 2016 to April 2017 were enrolled in the study. Another 62 healthy volunteers were enrolled as control group over the same period. The expression levels of mir-144 in the blood and tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-10 (IL-10) and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in plasma were detected, and the clinical diagnostic significance of mir-144 was analyzed. **Results** Compared with patients with active pulmonary tuberculosis, the expression of mir-144 of subjects in the control group significantly increased [(1.53 $\pm$ 0.35) vs. (0.78 $\pm$ 0.21)], while the levels of TNF- α [(5.03 $\pm$ 1.04) pg/mL vs. (30.63 $\pm$ 7.23) pg/mL], IL-10 [(3.26 $\pm$ 0.85) pg/mL vs. (24.08 $\pm$ 5.17) pg/mL] and MCP-1 [(201.33 $\pm$ 46.87) pg/mL vs. (252.12 $\pm$ 58.63) pg/mL] significantly decreased, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). The expression level of mir-144 in the blood of patients with active pulmonary tuberculosis was negatively correlated with the expression levels of TNF- α , IL-10 and MCP-1 in plasma ($P<0.05$). ROC curves were drawn of plasma mir-144 in the diagnosis of active pulmonary tuberculosis, and the area under the curve was 0.944. With the maximum Youden index method the truncation value of plasma mir-144 in diagnosis of active pulmonary tuberculosis was determined to be 1.47, and the sensitivity and specificity were 96.88% and 96.77%, respectively. **Conclusion** The expression of mir-144 in the peripheral blood of active pulmonary tuberculosis patients decreases abnormally, and is correlated with the relevant indicators, which has great clinical diagnostic significance, and can be used as a biological indicator for the clinical diagnosis of active pulmonary tuberculosis.

Key words: mir-144; Active stage; Tuberculosis; Expression; Clinical significance

肺结核又称为痨病,是由结核分枝杆菌感染导致的慢性炎性疾病,全球病人数量每年以数百万的

速度增加,由于结核杆菌感染而导致死亡的人数在感染性疾病中居第二位^[1-2]。同时有些病人感染结

核杆菌后并不会立即发病,当机体的免疫力下降或变态反应增强时,才表现出肺结核症状,全世界范围内有 1/3 的人的结核分枝杆菌处于潜伏感染期^[2-3]。中国有近 50% 的人感染结核杆菌,结核杆菌已成为肺结核新发病例的主要病原菌,因此对肺结核病人进行早期的诊断和治疗具有重要意义^[4]。目前临床上诊断方法主要包括细菌学检测、细胞因子检测、抗原检测等,但是这些方法具有耗时长,可能出现假阴性,对样品要求高等缺点,会干扰肺结核的及时诊断和治疗^[1,5]。近年来的研究发现,微小 RNA(micro RNA, miRNA)在结核病人外周血中稳定存在,其表达水平会升高或者降低,参与肺部疾病的发生及发展,能够调控基因表达,作为新的生物标志物成为研究热点^[6],随着对 miRNA 的研究不断深入,有研究^[4]证实微小 RNA-144(mir-144)的表达水平与宿主的免疫功能联系密切,但其临床意义并未深入研究。本研究通过检测活动期肺结核病人外周血中 mir-144 的表达水平及临床意义,旨在为临床诊断活动期肺结核提供新的方案。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2016 年 1 月至 2017 年 4 月哈尔滨医科大学附属第一医院核医学科收治的活动期肺结核病人 98 例,所有病人胸部 X 线扫描发现病灶,并经细菌学诊断均呈阳性。纳入标准:①年龄 >18 岁;②临床资料完整,且依从性高;③经病人及其近亲属同意,并签署知情同意书。排除标准:①合并心、肝、肾脏器病变;②患有糖尿病、甲状腺功能亢进、类风湿关节炎等全身免疫性疾病;③入组前曾使用影响免疫功能的药物;④中途退出的病人。活动期肺结核组中男 69 例,女 29 例;年龄(50.23 ± 6.02)岁,年龄范围为 26~75 岁;体质指数(22.08 ± 1.25) kg/m²,体质指数范围为 19.87~24.62 kg/m²;病程为(3.02 ± 1.17)个月,病程范围为 1~6 个月。另外选择同期进行体检的健康志愿者 62 例作为对照组,其中男 40 例,女 22 例;年龄为(50.09 ± 5.65)岁,年龄范围为 25~73 岁;体质指数为(21.97 ± 1.13) kg/m²,体质指数范围为 19.43~24.67 kg/m²。两组一般资料比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。本研究符合《世界医学协会赫尔辛基宣言》相关要求,研究过程均符合相关规定。

1.2 方法

1.2.1 样品收集及 RNA 提取 受试者均空腹抽取外肘静脉血 2 mL,置于涂有肝素钠的采血管中,30 min 内将 200 μ L 全血装入含有 Trizol 和研磨珠的冻

存管中,充分振荡均匀后,置于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中备用待测。参照 Trizol Reagent 试剂盒(美国 Invitrogen 公司)说明书提取血液中总 RNA,使用适量核糖核酸酶(Ribonuclease, RNase)水充分溶解 RNA,应用核酸测定仪检测浓度和纯度,RNA 的完整性检测使用琼脂糖凝胶电泳分析,调整其浓度后,置于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中保存。

1.2.2 荧光定量 PCR 应用反转录试剂盒(德国 QIAGEN 有限公司)将 RNA 反转录为 cDNA,取 20 μ L 待测样品,包括 1 μ L 总 RNA,分别取 5 份反转录缓冲液 4 μ L、1 份反转录酶 1 μ L 和 4 份 RNase 水 14 μ L,在 37 $^{\circ}$ C 下反应 1 h,然后在 95 $^{\circ}$ C 下反应 5 min。mir-144 引物序列为 5'-ATCCAGTCCGT-GTCGTCGTG-3'(由上海生工生物工程有限公司设计合成),具体的条件:在 95 $^{\circ}$ C 下预变性 5 min;变形和延伸的温度为 95 $^{\circ}$ C,时间为 5 s;60 $^{\circ}$ C 反应 20 s;72 $^{\circ}$ C 反应 20 s,共计 40 个循环;78 $^{\circ}$ C 下反应 20 s 进行荧光收集。内参管家基因 U6,采用相对定量法计算外周血中 mir-144 的相对表达水平。

1.2.3 血浆中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-10(IL-10)及单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)表达水平检测 受试者均空腹抽取外肘静脉血 3 mL,置涂有肝素钠的采血管中,以 3 500 r/min 的速度离心 10 min,离心半径为 3 cm,分离上清液,即得血浆。采用酶联免疫吸附测定法检测血浆中 TNF- α 、IL-10 及 MCP-1 水平,试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司,严格按照说明书进行操作。

1.3 观察指标 比较血液中 mir-144 和血浆中 TNF- α 、IL-10 及 MCP-1 表达水平,另外分析活动期肺结核病人血液中 mir-144 的表达水平和血浆中 TNF- α 、IL-10 及 MCP-1 表达水平的相关性。根据研究数据绘制血浆 mir-144 诊断活动性肺结核的受试者工作特征曲线(ROC),计算曲线下面积,用最大约登指数法确定血浆 mir-144 诊断活性期肺结核的截断值,计算用此截断值诊断活动性肺结核的灵敏度和特异度。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 19.0 软件处理。血液中 mir-144 和血浆中 TNF- α 、IL-10 及 MCP-1 表达水平用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用两独立样本 t 检验;血液中 mir-144 和血浆中 TNF- α 、IL-10 及 MCP-1 表达水平的相关关系采用 Pearson 相关检验。血浆 mir-144 对活动性肺结核的诊断价值分析采用 ROC 分析。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 血液中 mir-144 和血浆中 TNF- α 、IL-10 及 MCP-1 表达水平的比较 活动期肺结核病人血液

中 mir-144 的表达水平明显低于对照组,而血浆中 TNF- α 、IL-10 及 MCP-1 表达水平显著高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

表 1 两组 mir-144、TNF- α 、IL-10 及 MCP-1 表达水平的比较/ $\bar{x} \pm s$

组别	例数	mir-144	TNF- α /(pg/mL)	IL-10/(pg/mL)	MCP-1/(pg/mL)
对照组	62	1.53 $\pm$ 0.35	5.03 $\pm$ 1.04	3.26 $\pm$ 0.85	201.33 $\pm$ 46.87
活动期肺结核组	98	0.78 $\pm$ 0.21	30.63 $\pm$ 7.23	24.08 $\pm$ 5.17	252.12 $\pm$ 58.63
<i>t</i> 值		15.228	34.493	39.041	5.754
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000	0.000

2.2 血液中 mir-144 和血浆中 TNF- α 、IL-10 及 MCP-1 表达水平的相关性 活动期肺结核病人血液中 mir-144 的表达水平与血浆中 TNF- α 、IL-10 及 MCP-1 表达水平呈负相关($r = -0.718$ 、 -0.709 、 -0.723 , $P = 0.019$ 、 0.022 、 0.018)。数据散点图见图 1。

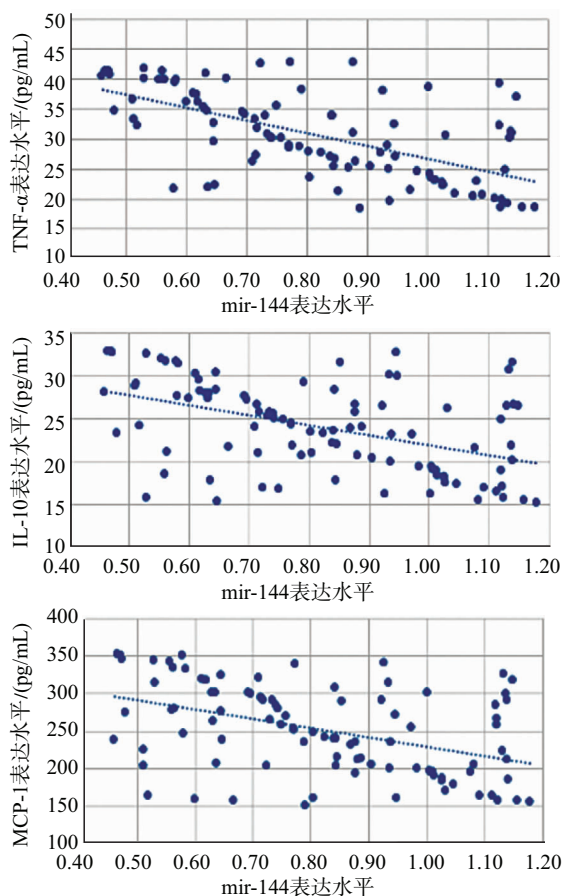


图 1 血液中 mir-144 和血浆中 TNF- α 、IL-10 及 MCP-1 表达水平的相关散点图

2.3 mir-144 的诊断意义 根据本研究数据绘制血浆 mir-144 诊断活动性肺结核的 ROC 曲线(图 2),曲线下面积为 0.944,用最大约登指数法确定血

浆 mir-144 诊断活动性肺结核的截断值为 1.47,用其诊断活动性肺结核的灵敏度和特异度分别为 96.88% (155/160) 和 96.77% (60/62)。

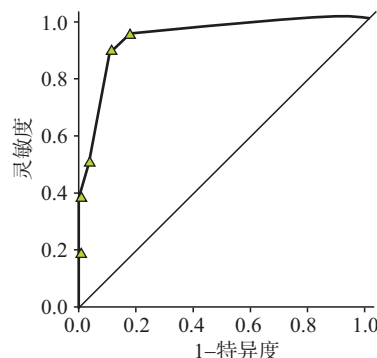


图 2 血浆中 mir-144 诊断活动性肺结核的 ROC 曲线

3 讨论

结核分枝杆菌作为细胞内致病菌,其宿主一旦被感染,激活信号传导通路,抑制机体的免疫应答反应,结核分枝杆菌与 Toll 样受体作用,通过激活多种信号通路而发挥抗炎及抑菌效应^[7]。结核分枝杆菌通过激活丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)通路而上调 TNF- α 、IL-10 及 MCP-1 的合成量,前炎性因子激活巨噬细胞,加强其吞噬作用,杀死病菌,提高抗结核的活性,结核的免疫类型主要为巨噬细胞参与的细胞免疫过程,结合感染的过程中巨噬细胞产生特异性 miRNA,并且在肺结核病人血液中检测到 miRNA^[8-9]。miRNAs 由 21~25 个核苷酸组成,主要在哺乳动物的细胞内表达,转录后调节基因表达,虽然在人类基因总数中占比不足 5%,但是却可以调控超过 30% 的基因。

miRNAs 参与胚胎发育、细胞增殖分化和细胞凋亡和死亡等过程,同时 miRNA 对免疫细胞分化、信号传导及免疫应答等免疫反应的多层面能够进行精细调节^[6,10]。血液中 miRNAs 能够作为多种疾病如胃癌等的生物学早期诊断指标,目前对于 mir-144 的研究主要集中在血液系统疾病上,对于炎症性疾病,尤其是结核病的研究并不多见^[6,11]。另外潜伏期肺结核的细菌实验呈阳性,但是影像学检查结果与正常人差异无统计学意义,有超过 85% 的活动期肺结核病人是由潜伏期肺结核演变来的,因此准确判断潜伏期的肺结核对于预防和控制活动期肺结核具有重要意义^[5]。

在哺乳动物体内的非编码 RNA 主要包括短小 RNA、miRNA 及小分子 RNA 等^[12-13],miRNA 在临床样本中的稳定性高,并且可以快速准确定量,有望成为非创伤性生物学指标来反映疾病的发生及

发展过程,miRNA 目前已经被广泛应用于心脏病、糖尿病及感染性疾病中^[3,13-14]。miRNA 来源于内源性染色体,由长度为 70~80 核苷酸的单链 RNA 组成的短序列,其存在形式分为单拷贝、多拷贝或基因簇,并且多存在于基因间隔区,独立性较强,不能翻译成蛋白质,主要是通过降解对应 mRNA 影响蛋白质的表达水平,调控机体的代谢过程^[5]。结核分枝杆菌通过影响 miRNA 的表达水平影响细胞因子和免疫应答反应,检测结核病人血清中 1 223 种 miRNA 的表达水平,其中 59 种 miRNA 表达水平升高,而 33 种 miRNA 表达水平降低,提示 miRNA 对于评价结核病的诊断及治疗效果具有重要作用^[3]。

研究结果中发现,活动期肺结核病人血液中 mir-144 的表达水平明显低于对照组($P < 0.05$),说明 mir-144 能够用于反映肺结核的发生和发展,另外血浆 mir-144 诊断活动性肺结核的 ROC 曲线下面积为 0.944,截断值为 1.47,同时诊断活动性肺结核的灵敏度和特异度分别为 96.88% 和 96.77%,提示使用 mir-144 诊断活动期肺结核意义重大。机体感染结核杆菌后,机体产生相应的免疫反应,导致细胞因子等物质的释放,主要包括 TNF- α 、IL-10 及 MCP-1,对于结核病的发生及发展具有重要作用, TNF- α 、IL-10 及 MCP-1 是体内促炎因子,影响活动性肺结核,从而清除结核分枝杆菌的病原体^[7,16]。结果表明活动期肺结核病人血浆中 TNF- α 、IL-10 及 MCP-1 表达水平明显高于对照组病人,说明结核杆菌激活机体的免疫防御机制,上调细胞因子的释放量。相关性研究结果表明血液中 mir-144 的表达水平与血浆中 TNF- α 、IL-10 及 MCP-1 表达水平呈负相关($P < 0.05$)。mir-144 主要在 T 淋巴细胞中表达,调节细胞免疫过程^[10],有研究证实^[17],mir-144 在活动性肺结核病人的外周血单个核细胞的表达水平高于健康志愿者,可能是通过抑制淋巴 T 细胞增殖调节抗结核免疫反应。另外 miRNA 主要影响 MAPK 和 NF- κ B 等信号通路,结核杆菌可能通过 miRNA 调控的信号通路,抑制机体的免疫应答,感染性疾病的机体内的病毒通过基因沉默机制“逃脱”免疫系统的监控,依赖 miRNA 抵抗机体的免疫反应^[5,7]。

综上所述,活动期肺结核病人外周血中 mir-144 的表达水平异常降低,并且与 TNF- α 、IL-10 及 MCP-1 呈负相关,临床诊断价值高,为今后研究活动期肺

结核的预防和诊断提供新的思路和方法。

参考文献

- [1] 张立营,陈朴,高鹏,等. 活动期肺结核外周血 mir-144 的表达水平及意义[J]. 医学研究杂志,2017,46(1):151-154.
- [2] 魏巍,覃林珍,黄垚,等. 结核潜伏感染患者全血 miR618、miR-146a-5p 的表达[J]. 医药论坛杂志,2014,35(8):105-106.
- [3] 张文玲,周学东,郝玉庆,等. microRNA:一种潜在新型诊断结核病的生物标志物[J]. 四川大学学报(自然科学版),2015,52(6):1399-1403.
- [4] 刘守江,张帆,魏巍,等. 结核潜伏感染者全血 miR-144-3p、miR-146a-5p 的表达[J]. 临床肺科杂志,2013,18(7):1270-1271.
- [5] 鄢霜,张庆波,冯晓燕. microRNA 与结核病诊断的研究进展[J]. 生物技术通讯,2014,25(3):433-435.
- [6] 张文慧,杨丹凤,董浩,等. microRNAs 作为结核分枝杆菌感染标志物的研究进展[J]. 中国兽药杂志,2015,49(10):62-65.
- [7] 杨先涛,张祯祯,詹学,等. 肺结核患儿外周血单个核细胞中 microRNA 表达的初步研究[J]. 第三军医大学学报,2013,35(19):2051-2055.
- [8] 王杰,刘春法,崔永勇,等. 结核分枝杆菌感染相关 microRNA 的研究进展[J]. 畜牧与兽医,2016,48(10):130-133.
- [9] 央拉,李长山. 肺结核相关 microRNA 研究进展[J]. 中国防痨杂志,2015,37(2):194-198.
- [10] 张帆,刘守江,魏巍,等. miRNA144-3p 和 miRNA146a-5p 在结核性胸膜炎患者外周血中的表达[J]. 中国热带医学,2013,13(6):664-666.
- [11] 曹帅丽,袁俐. 结核病相关 microRNA 研究进展[J]. 中国人兽共患病学报,2014,30(7):757-760,771.
- [12] 沈圣,屈彦纯,张军. 下一代测序技术在表观遗传学研究中的重要应用及进展[J]. 遗传,2014,36(3):256-275.
- [13] 刘冰,张智晓,刘钢,等. 微小 RNA 作为感染性疾病标志物的研究进展[J]. 中国感染与化疗杂志,2015,15(4):391-394.
- [14] KLEINSTEUBER K, HEESCH K, SCHATTLING S, et al. Decreased expression of miR-21, miR-26a, miR-29a, and miR-142-3p in CD4⁺ T cells and peripheral blood from tuberculosis patients [J]. PLoS One, 2013, 8(4): e61609. DOI: 10.1371/journal.pone.0061609.
- [15] 张玉芝,伊正君,付玉荣. MicroRNA 与肺部感染的研究进展[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2012,28(11):1223-1225.
- [16] JOSHI L, PONNANA M, SIVANGALA R, et al. Evaluation of TNF- α , IL-10 and IL-6 cytokine production and their correlation with genotype variants amongst tuberculosis patients and their household contacts [J]. PLoS One, 2015, 10(9): e0137727. DOI: 10.1371/journal.pone.0137727.
- [17] LIU YH, WANG XJ, JIANG J, et al. Modulation of T cell cytokine production by miR-144 * with elevated expression in patients with pulmonary tuberculosis [J]. Mol Immunol, 2011, 48(9/10): 1084-1090.

(收稿日期:2017-10-24,修回日期:2017-12-15)