

- [3] 万贤凤,王辉玲,刘震寰,等.托槽在数字化牙颌模型上位置与间接粘接转移后实际位置的一致性研究[J].口腔疾病防治, 2017,25(5):311-315.
- [4] GRUNHEID T, LEE MS, LARSON BE. Transfer accuracy of vinyl polysiloxane trays for indirect bonding [J]. Angle Orthod, 2016, 86(3):468-474.
- [5] ATILLA AO, OZTURK T, ERUZ, MM, et al. A comparative assessment of orthodontic treatment outcomes using the quantitative light-induced fluorescence (QLF) method between direct bonding and indirect bonding techniques in adolescents: a single-centre, single-blind randomized controlled trial [J]. Eur J Orthod, 2020, 42(4):441-453.
- [6] 钟雅静,冯刚.不同矫治器与粘接方式对青少年男性固定矫治患者牙周健康影响的临床对照研究[J].重庆医科大学学报, 2018, 43(9):1226-1232.
- [7] POTTIER T, BRIENT A, TURPIN YL, et al. Accuracy evaluation of bracket repositioning by indirect bonding: hard acrylic CAD/CAM versus soft one-layer silicone trays, an in vitro study [J]. Clin Oral Invest, 2020, 24(11):3889-3897.
- [8] SCHMID J, BRENNER D, RECHEIS W, et al. Transfer accuracy of two indirect bonding techniques-an in vitro study with 3D scanned models [J]. Eur J Orthod, 2018, 40(5):549-555.
- [9] ARRUDA AO. Occlusal indexes as judged by subjective opinions [J]. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 2008, 134(5):671-675.
- [10] 宋广瀛,姜若萍,张晓芸,等.正畸疗效主、客观评价方法的有效性[J].北京大学学报(医学版), 2015, 47(1), 90-97.
- [11] YILDIRIM K, SAGLAM-AYDINATAY B. Comparative assessment of treatment efficacy and adverse effects during nonextraction orthodontic treatment of class I malocclusion patients with direct and indirect bonding: a parallel randomized clinical trial [J]. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 2018, 154(1):26-34.
- [12] 郭昱成,李沐嘉,董明,等.改良式间接粘接技术在正畸临床中的应用研究[J].实用口腔医学杂志, 2018, 34(3):373-376.
- [13] BROWN MW, KOROLUK L, KO CC, et al. Effectiveness and efficiency of a CAD/CAM orthodontic bracket system [J]. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 2015, 148(6):1067-1074.
- [14] DEAHL ST, SALOME N, HATCH JP, et al. Practice-based comparison of direct and indirect bonding [J]. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 2007, 132(6):738-742.
- [15] DEMIROVIC K, SLAJ M, SPALJ S, et al. Comparison of shear strength of orthodontic brackets using direct and indirect bonding methods in vitro and vivo [J]. Acta Inform Med, 2018, 26(2):125-129.
- [16] QUEIROZ TAVARES ML, ELIAS CN, NOJIMA LI. Effects of different primers on indirect orthodontic bonding: Shear bond strength, color change, and enamel roughness [J]. Korean J Orthod, 2018, 48(4):245-252.
- [17] JANG JH, LEE MG, SUWOO, et al. Comparative study of the dentin bond strength of a new universal adhesive [J]. Dent Mater J, 2016, 35(4):606-612.
- [18] KHAN S, VERMA SK, MAHESHWARI S. Effect of acid etching on bond strength of nanoionomer as an orthodontic bonding adhesive [J]. J Orthod Sci, 2015, 4(4):113-117.
- [19] 李向东,宋然,白玉兴.三种粘接剂在唇侧间接粘接技术中的临床应用[J].北京口腔医学, 2017, 25(4):226-228.
- [20] PAMUKCU H, OZSOY OP, DAGALP R. In vitro and in vivo comparison of orthodontic indirect bonding resins: A prospective study [J]. Niger J Clin Pract, 2018, 21(5):614-623.

(收稿日期:2020-09-07,修回日期:2020-10-18)

引用本文:闫书娜,马腾,李国锋,等.微小RNA-194-5p与cullin4A在肺结核病人中的表达及意义[J].安徽医药, 2021, 25(3):489-493. DOI: 10.3969/j.issn.1009-6469.2021.03.014.

◇临床医学◇



微小RNA-194-5p与cullin4A在肺结核病人中的表达及意义

闫书娜^{1a}, 马腾², 李国锋^{1b}, 李金洲^{1c}, 曾俊风³

作者单位:¹中国平煤神马集团职业病防治院,^a内科五区,^b肺灌洗中心,^c内科四区,河南 平顶山467099;

²中国平煤神马医疗集团总医院呼吸科,河南 平顶山467000;

³南阳市中心医院感染肝病科,河南 南阳473000

摘要: **目的** 探讨微小RNA-194-5p(miR-194-5p)与泛素连接酶cullin4A(CUL4A)在肺结核病人中的表达及其意义。**方法** 选取2016年12月至2018年12月中国平煤神马集团职业病防治院结核病人作为研究对象,确诊为肺结核病人50例作为肺结核组,潜伏结核感染病人50例作为潜伏结核感染组,同期该院体检健康者50例作为对照组。实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)检测miR-194-5p、CUL4A mRNA、鸟苷酸结合蛋白5(GBP5)mRNA的表达;酶联免疫吸附测定(ELISA)检测可溶性Tim-3(sTim-3)、可溶性Gal-9(sGal-9)水平;采用Pearson相关性分析检验肺结核病人miR-194-5p、CUL4A表达量与GBP5、sTim-3、sGal-9的相关性。结核分枝杆菌(Mtb)感染人巨噬细胞系U937,ELISA检测白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)水平。蛋白质印迹法(Western blotting)检测Wnt/ β -连环素(Wnt/ β -catenin)信号通路相关蛋白T细胞因子(TCF)、糖原合成酶激酶-3(GSK-3 β)、 β -catenin表达量。**结果** 与对照组相比,潜伏结核感染组与肺结核组病人血清miR-194-5p、GBP5 mRNA的表达水平升高($P < 0.05$),其中miR-194-5p:(1.01 ± 0.23)比(2.32 ± 0.53)比(3.35 ± 0.20),sTim-3、sGal-9水平升高($P < 0.05$),CUL4A mRNA的表达水平显著降低[(1.03 ± 0.11)比(0.73 ± 0.12)比(0.41 ± 0.15), $P < 0.05$],潜伏结核感染组与肺结核组各

指标间相比差异有统计学意义($P < 0.05$); miR-194-5p 与 CUL4A 呈负相关($r = -0.421, P < 0.001$), miR-194-5p 与 GBP5、sTim-3、sGal-9 呈正相关($P < 0.05$); Mtb 感染细胞后, IL-6、TNF- α 的表达水平升高($P < 0.05$), TCF、GSK-3 β 、 β -catenin 表达量升高($P < 0.05$)。结论 miR-194-5p 在肺结核病人中表达上调, CUL4A 表达下调, 二者可能参与肺结核发生及发展过程。

关键词: 结核, 肺; 结核分枝杆菌; 微小 RNA-194-5p; 泛素蛋白连接酶类; cullin4A; 炎症

Expression and significance of miR-194-5p and CUL4A in patients with tuberculosis

YAN Shuna^{1a}, MA Teng², LI Guofeng^{1b}, LI Jinzhou^{1c}, ZENG Junfeng³

Author Affiliations: ^{1a}Five Districts of Internal Medicine, ^{1b}Lung lavage center, ^{1c}Department of Internal Medicine, Shenma Group Occupational Disease Prevention and Control Hospital, Pingdingshan, Henan 467099, China; ²Department of Respiration, General Hospital of China Pingmei Shenma Medical Group, Pingdingshan, Henan 467000, China; ³Department of Liver Diseases, Central Hospital of Nanyang City, Nanyang, Henan 473000, China

Abstract: Objective To investigate the expression and significance of miR-194-5p and CUL4A in patients with tuberculosis. **Methods** Patients with tuberculosis from the China Pingmei Shenma Group Occupational Disease Prevention and Treatment Hospital from December 2016 to December 2018 were selected as the research object, and the control group (50 cases), latent combined infection group (50 cases), and pulmonary tuberculosis group (50 cases) were set in the experiment. qRT-PCR was used to detect the expression of miR-194-5p, CUL4A mRNA and GBP5 mRNA. The levels of sTim-3 and sGal-9 were detected by ELISA. Correlation of miR-194-5p and CUL4A expression with GBP5, sTim-3, and sGal-9 in patients with tuberculosis was analyzed by Pearson method. Mtb infected human macrophage cell line U937 and detected the levels of IL-6 and TNF- α by ELISA. Western blotting was used to detect the expression of TCF, GSK-3 β and β -catenin. **Results** Compared with the control group, the expression levels of serum miR-194-5p and GBP5 mRNA in the latent tuberculosis infection group and the pulmonary tuberculosis group were increased ($P < 0.05$), and miR-194-5p: (1.01 ± 0.23) vs. (2.32 ± 0.53) vs. (3.35 ± 0.20) , the levels of sTim-3 and sGal-9 were significantly increased ($P < 0.05$), and the expression level of CUL4A mRNA was decreased [(1.03 ± 0.11) vs. (0.73 ± 0.12) vs. (0.41 ± 0.15) , $P < 0.05$], there was a statistically significant difference between the indicators of the latent tuberculosis infection group and the pulmonary tuberculosis group ($P < 0.05$). miR-194-5p was negatively correlated with CUL4A ($r = -0.421, P < 0.001$), miR-194-5p was positively correlated with GBP5, sTim-3, and sGal-9 ($P < 0.05$). After Mtb infected cells, the expression levels of IL-6 and TNF- α were increased ($P < 0.05$), and the expression levels of TCF, GSK-3 β and β -catenin were increased ($P < 0.05$). **Conclusion** miR-194-5p was up-regulated in tuberculosis patients and CUL4A was down-regulated. Both may be involved in the occurrence and development of tuberculosis.

Key words: Tuberculosis, pulmonary; Mycobacterium tuberculosis; MiR-194-5p; Ubiquitin-protein ligases; CUL4A; Inflammation

肺结核是临床常见疾病之一,其主要是由结核分枝杆菌(Mtb)引起的一种慢性传染性疾病,因而早期筛查与诊断肺结核具有重要意义^[1-2]。研究表明 Mtb 感染病人发展为肺结核的风险明显升高,而 Mtb 主要存在于巨噬细胞内,并可通过降低机体抗结核免疫能力而造成结核病难以有效控制^[3]。既往研究显示鸟苷酸结合蛋白 5(Guanylate binding protein 5, GBP5)在肺结核病中表达水平升高,并可能作为早期诊断的有效指标^[4]。但肺结核早期诊断效率并未明显提高,因而寻找有效诊断肺结核的分子标记物具有重要意义。微小 RNA-194-5p(miRNA-194-5p, miR-194-5p)在脂多糖诱导的心肌细胞中表达上调,并可促进心肌细胞炎症损伤^[5]。研究表明 miR-194-5p 可靶向抑制泛素连接酶 cullin4A(CUL4A)表达从而促进炎症反应的发生^[6]。但 miR-194-5p 与 CUL4A 在肺结核中的表达尚未可知。本研究通过检测肺结核病人血清中 miR-194-

5p 与 CUL4A 的表达,分析其与肺结核发生发展的相关性,同时通过构建 Mtb 感染人单核巨噬细胞 U937 模型,在体外水平探究 miR-194-5p 与 CUL4A 在 Mtb 感染中的作用机制,探讨其在肺结核发病过程中的可能作用机制。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2016 年 12 月至 2018 年 12 月中国平煤神马集团职业病防治院呼吸内科收治的结核病病人为研究对象,将确诊为肺结核病人 50 例作为肺结核组,入选标准:经痰涂片验证显示存在抗酸杆菌;所有病人均符合肺结核诊断的相关标准^[7],其中男 25 例,女 25 例,年龄 (43.25 ± 16.32) 岁。潜伏结核感染病人 50 例作为潜伏结核感染组,入选标准:经 γ -干扰素释放试验(IGRAs)筛选,IGRAs 呈阳性但没有结核病症、体征、影像学等依据的病人,男 26 例,女 24 例,年龄 (44.16 ± 15.21) 岁。选取同期该院体检中心健康体检者 50 例作为对照组,入

选标准:IGRAs呈阴性且无任何结核病临床症状,男30例,女20例,年龄(45.18 ± 13.24)岁。三组受试者年龄、性别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,所有病人知情且签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂与仪器 人单核细胞系U937购自中国科学院上海细胞研究所;Mtb购自美国ATCC公司;Trizol、逆转录试剂盒与荧光定量试剂盒购自大连宝生物工程有限公司;人外周血淋巴细胞分离液购自北京索莱宝科技有限公司;磷酸缓冲液(PBS)购自美国赛默飞世尔科技公司;乙醇、氯仿、异丙醇购自国药集团化学试剂有限公司;蛋白质印迹法(Western blotting)所需试剂均购自武汉华美生物工程有限公司;可溶性Tim-3(sTim-3)与可溶性Gal-9(sGal-9)酶联免疫吸附测定(ELISA)检测试剂盒购自美国RD公司;白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)ELISA检测试剂盒购自美国eBioscience公司;杜氏改良培养基(DMEM)与Opti-MEM减血清培养基购自美国Gibco公司;兔抗人T细胞因子(TCF)、糖原合成酶激酶-3(GSK-3 β)、 β -连环素(β -catenin)抗体购自美国CST公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔二抗购自美国Abcam公司。实时荧光定量PCR仪购自美国ABI公司;普通PCR仪购自美国赛默飞世尔科技公司;全波长酶标仪购自美国赛默飞世尔科技公司。

1.2.2 感染模型的建立^[8] U937细胞培养于含有血清的DMEM培养基,调整细胞密度 1×10^5 个/毫升,接种于12孔板(200微升/孔),加入佛波酯(PMA)孵育48 h,待细胞贴壁生长且聚集成串即细分为成熟单核-巨噬细胞。将成熟的U937细胞接种于24孔板,采用Mtb感染复数方法感染细胞,孵育4 h, PBS洗涤,置于37℃恒温培养箱培养12 h,分别记作NC组(未经处理的U937细胞)、Mtb组(Mtb感染的U937细胞),收集细胞进行后续研究。

1.2.3 实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)检测 miR-194-5p、CUL4A mRNA、GBP5 mRNA 的表达水平 采用Trizol法提取血清与各组U937细胞中的RNA,应用Nanodrop2000c超微量分光光度计检测RNA浓度。参照逆转录试剂盒说明书操作将总RNA逆转录合成互补DNA(cDNA)。miR-194-5p正向引物5'-ATGTGGACTGTGCTCGGATT-3',反向引物5'-ACTCGATCAGCT AGCTTACGA-3';CUL4A正向引物5'-CTACTGGCCAACATACACGC-3',反向引物5'-AAG CCATCTCCCTCGTTGAA-3';GBP5正向引物5'-GATCCACATGTCAGACCCCA-3',反向引物5'-GCACCGTAGATGCAACAGAG-3';U6正向引物

5'-GCTTCGGC AGCACATA TACT-3',反向引物5'-GTGCAGGCTCCGAGGTATTC-3';甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)正向引物5'-AACG GATTTGGTCG-TATTG-3',反向引物5'-GGAAGATGGTGAT-GGGATT-3',引物由上海生工生物工程股份有限公司设计合成。qRT-PCR反应体系:SYBR Premix Ex Taq II (2 $\times$) 10 μ L, cDNA 2 μ L, 正反向引物各0.8 μ L, ROX Reference Dye (50 $\times$) 0.4 μ L, 双蒸水(ddH₂O) 6 μ L;反应条件:95℃预变性2 min, 95℃变性15 s, 60℃退火30 s, 72℃延伸30 s, 共40次循环。miR-194-5p以U6为内参, CUL4A、GBP5以GAPDH为内参,采用2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法计算miR-194-5p、CUL4A mRNA、GBP5 mRNA的相对表达量。

1.2.4 ELISA检测血清中细胞因子水平 采用ELISA检测各组受试者血清中sTim-3、sGal-9的水平,严格按照试剂盒说明书进行操作。

1.2.5 ELISA实验检测U937细胞中炎症因子水平 收集各组细胞培养上清液,采用ELISA检测各组U937细胞中炎症因子IL-6、TNF- α 水平,严格按照试剂盒说明书进行操作。

1.2.6 Western blotting检测 TCF、GSK-3 β 、 β -catenin蛋白表达 收集各组U937细胞,加入适量RIPA裂解液,冰上孵育30 min,离心后提取细胞蛋白,采用BCA法测定蛋白浓度。取蛋白样品进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),转膜,封闭2 h,加入一抗稀释液(1:1 000),4℃孵育过夜,TBST洗涤,加入二抗稀释液(1:2 000),室温条件下孵育1 h,滴加ECL显影,应用凝胶成像分析系统及ImageJ软件分析各条带灰度值。

1.3 统计学方法 采用统计学软件SPSS 21.0进行分析。符合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,多组间比较采用单因素方差分析+两两多重比较HSD检验法。计数资料以例数及率表示,比较采用 χ^2 检验。此外,采用Pearson相关性分析检验肺结核病人miR-194-5p、CUL4A表达量与GBP5、sTim-3、sGal-9的相关性。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组病人血清中miR-194-5p、CUL4A mRNA的表达水平比较 与对照组相比,潜伏结核感染组与肺结核组病人血清miR-194-5p的表达水平升高($P < 0.05$),CUL4A mRNA的表达水平降低($P < 0.05$);与潜伏结核感染组相比,肺结核组病人血清miR-194-5p的表达水平升高($P < 0.05$),CUL4A mRNA的表达水平降低($P < 0.05$),详见表1。

2.2 各组病人血清中GBP5与细胞因子水平比较 与对照组相比,潜伏结核感染组与肺结核组病人血

表1 健康体检对照与肺结核血清中 miR-194-5p、CUL4A mRNA 的表达水平比较/ $\bar{x} \pm s$

组别	例数	miR-194-5p	CUL4A mRNA
对照组	50	1.01±0.23	1.03±0.11
潜伏结核感染组	50	2.32±0.53 ^①	0.73±0.12 ^①
肺结核组	50	3.35±0.20 ^{①②}	0.41±0.15 ^{①②}
F值		542746	278.047
P值		<0.001	<0.001

注: CUL4A 为泛素连接酶 cullin4A。

①与对照组相比, $P < 0.05$ 。②与潜伏结核感染组相比, $P < 0.05$ 。

清中 GBP5 mRNA 的表达水平升高 ($P < 0.05$), sTim-3、sGal-9 水平升高 ($P < 0.05$); 与潜伏结核感染组相比, 肺结核组病人血清中 GBP5 mRNA 的表达水平升高 ($P < 0.05$), sTim-3、sGal-9 水平升高 ($P < 0.05$), 详见表2。

表2 健康体检对照与肺结核血清中 GBP5 与细胞因子水平比较/ $\bar{x} \pm s$

组别	例数	GBP5 mRNA	sTim-3/ ($\mu\text{g/L}$)	sGal-9/ ($\mu\text{g/L}$)
对照组	50	1.02±0.13	2.61±0.52	1.35±0.20
潜伏结核感染组	50	2.13±0.31 ^①	5.12±1.20 ^①	3.95±1.12 ^①
肺结核组	50	2.94±0.23 ^{①②}	9.35±1.71 ^{①②}	6.52±2.03 ^{①②}
F值		782.957	414.062	198.126
P值		<0.001	<0.001	<0.001

注: GBP5 为鸟苷酸结合蛋白5, sTim-3 为可溶性 Tim-3, sGal-9 为可溶性 Gal-9。

①与对照组相比, $P < 0.05$ 。②与潜伏结核感染组相比, $P < 0.05$ 。

2.3 肺结核病人 miR-194-5p、CUL4A 表达量与 GBP5、sTim-3、sGal-9 的相关性分析 miR-194-5p 与 GBP5、sTim-3、sGal-9 呈正相关, CUL4A 与 GBP5、sTim-3、sGal-9 呈负相关, miR-194-5p 与 CUL4A 呈负相关, 均有 $P < 0.001$ 。相关结果见表3。

2.4 巨噬细胞感染 Mtb 后 miR-194-5p、CUL4A 表达量与炎症因子 IL-6、TNF- α 水平比较 与 NC 组相比, Mtb 组细胞中 miR-194-5p 的表达水平升高 ($P < 0.05$), CUL4A mRNA 的表达水平降低 ($P < 0.05$), IL-6、TNF- α 的表达水平升高 ($P < 0.05$), 见表4。

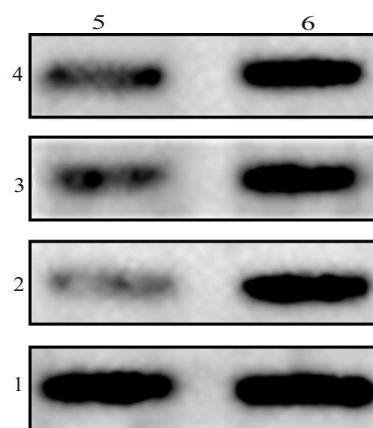
2.5 巨噬细胞感染 Mtb 后 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白表达量比较 与 NC 组相比, Mtb 组细胞中 TCF、GSK-3 β 、 β -catenin 蛋白相对表达量升高 ($P <$

表4 巨噬细胞感染结核分枝杆菌(Mtb)后 miR-194-5p、CUL4A 表达量与炎症因子 IL-6、TNF- α 水平比较/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	miR-194-5p	CUL4A mRNA	IL-6/ (ng/L)	TNF- α / (ng/L)
NC 组	9	1.01±0.13	1.02±0.16	171.32±36.21	101.32±13.25
Mtb 组	9	2.11±0.26	0.45±0.11	378.41±41.59	213.54±43.21
t值		11.352	8.807	11.266	7.449
P值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: CUL4A 为泛素连接酶 cullin4A, IL-6 为白细胞介素6, TNF- α 为肿瘤坏死因子- α 。

0.05), 见图1、表5。



注: 1—甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH); 2— β -连环素(β -catenin); 3—糖原合成酶激酶-3(GSK-3 β); 4—T细胞因子(TCF); 5—NC组; 6—Mtb组。

图1 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白免疫印迹图**表5** 巨噬细胞感染 Mtb 后 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白表达量比较/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	TCF 蛋白	GSK-3 β 蛋白	β -catenin 蛋白
NC 组	9	0.43±0.05	0.44±0.06	0.32±0.03
Mtb 组	9	0.98±0.21	0.96±0.20	0.97±0.18
t值		7.643	7.471	10.686
P值		<0.001	<0.001	<0.001

注: Mtb 为结核分枝杆菌, β -catenin 为 β -连环素, TCF 为 T 细胞因子, GSK-3 β 为糖原合成酶激酶-3。

3 讨论

目前肺结核诊断准确率较低, 误诊率较高, 不同病人对抗结核药物的敏感性不同, 因而寻找用于肺结核诊断的生物学标记物具有重要意义^[9]。研究表明肺结核病人外周血中非编码 RNA 表达异常并可能参与疾病发生及发展过程^[10]。因而本研究积极探寻新型 miRNA 分子并分析其在肺结核发生发展过程中的作用。

表3 肺结核 50 例 miR-194-5p、CUL4A 表达量与 GBP5、sTim-3、sGal-9 的相关性分析结果(r 值, P 值)

指标	GBP5	sTim-3	sGal-9	CUL4A
miR-194-5p	0.527, <0.001	0.451, <0.001	0.589, <0.001	-0.421, <0.001
CUL4A	-0.497, <0.001	-0.553, <0.001	-0.519, <0.001	

注: CUL4A 为泛素连接酶 cullin4A, GBP5 为鸟苷酸结合蛋白5, sTim-3 为可溶性 Tim-3, sGal-9 为可溶性 Gal-9。

既往研究显示 miR-194-5p 可通过调控 Wnt/ β -连环素(Wnt/ β -catenin)信号通路从而参与乳腺癌等多种肿瘤发生及发展过程^[11]。CUL4A 在慢性阻塞性肺疾病病人中表达异常并可参与该疾病发生及发展过程^[12]。本研究结果显示 miR-194-5p 在肺结核病人中表达上调,其表达量高于潜伏结核病人,而 CUL4A 的表达量明显降低,说明 miR-194-5p 表达量升高与 CUL4A 表达量降低可能促进肺结核的发生及发展。GBP5 在炎症反应中表达上调并可参与肺结核发生过程,研究表明 sTim-3、sGal-9 属于免疫负调控基因,并可促进炎症因子分泌^[13-14]。与上述研究相似,本研究结果显示肺结核病人血清中 GBP5 mRNA 的表达水平升高, sTim-3、sGal-9 水平升高,提示肺结核病人体内存在炎症反应。本研究分析肺结核病人 miR-194-5p、CUL4A 表达量与 GBP5、sTim-3、sGal-9 的相关性,结果显示 miR-194-5p 与 CUL4A 呈负相关,miR-194-5p 与 GBP5、sTim-3、sGal-9 呈正相关,CUL4A 与 GBP5、sTim-3、sGal-9 呈负相关,说明 miR-194-5p 与 CUL4A 可反映肺结核的炎症严重程度。提示 miR-194-5p 表达量升高可能通过抑制 CUL4A 表达从而促进肺结核发生及发展。

Wnt/ β -catenin 信号通路激活后可促进巨噬细胞中炎症因子 IL-6、TNF- α 的表达^[15]。研究表明肺结核病人中 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白 TCF、GSK-3 β 、 β -catenin 表达上调,并可促进疾病发展进程,Wnt/ β -catenin 信号通路激活与多种疾病发生发展密切相关^[16-19]。本研究结果显示 Mtb 感染细胞中 miR-194-5p 的表达水平升高,CUL4A 的表达水平显著降低,IL-6、TNF- α 的表达水平显著升高。本研究结果显示 Mtb 感染细胞中 TCF、GSK-3 β 、 β -catenin 蛋白相对表达量升高,说明 Wnt/ β -catenin 信号通路激活可加重巨噬细胞炎症损伤。提示 miR-194-5p 表达量升高可能通过下调 CUL4A 表达而抑制 Mtb 感染引起的炎症反应,其作用机制可能是通过抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路激活而发挥作用。

综上所述,肺结核病人血清中 miR-194-5p 表达升高,CUL4A 表达降低,二者表达量与结核病严重程度密切相关,并可能作为早期诊断肺结核的有效指标,结核菌感染可上调 miR-194-5p 表达及下调 CUL4A 表达,并可激活 Wnt/ β -catenin 信号通路。

参考文献

- [1] 宋磊,宋梅梅,苏旭,等.ROC 曲线评价多指标对肺结核的诊断价值[J].中华生物医学工程杂志,2017,23(5):414-418.
- [2] 翁绳风,李宁,邢俊蓬,等.Xpert MTB/RIF 检测结核分枝杆菌及利福平耐药性的应用价值研究[J].分子诊断与治疗杂志,2019,11(3):229-232.
- [3] HUANG Z, LUO Q, GUO Y, et al. Mycobacterium tuberculosis-In-

duced polarization of human macrophage orchestrates the formation and development of tuberculous granulomas in vitro[J/OL]. PLoS One, 2015, 10 (6): e0129744. DOI: 10.1371/journal.pone.0129744.

- [4] 巩伟伟,李金凤,隋爱华,等.鸟苷酸结合蛋白 5 和二磷酸腺苷核糖化因子鸟苷酸激酶 1 基因在肺结核患者和潜伏结核感染人群中的表达研究[J].中国医师进修杂志,2018,41(6):485-489.
- [5] 王少霞.长链非编码 RNA H19 靶向 miR-194-5p 抑制 LPS 诱导心肌细胞炎症反应[J].中国老年学杂志,2019,39(19):4839-4842.
- [6] CHEN Z, HAN Y, DENG C, et al. Inflammation-dependent down-regulation of miR-194-5p contributes to human intervertebral disc degeneration by targeting CUL4A and CUL4B[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(11): 19977-19989.
- [7] 房磊.肺结核合并糖尿病 36 例临床治疗分析[J].养生保健指南,2016(23):62-62.
- [8] 黄自坤,姚芳苒,罗清,等.长链非编码 RNA 肺腺癌转移相关转录本 1 在结核感染中的表达及意义[J].中华微生物学和免疫学杂志,2016,36(11):824-830.
- [9] RAJAGOPALAN S. Tuberculosis in older adults[J]. Clin Geriatr Med, 2016, 32(3): 479-491.
- [10] YI Z, LI J, GAO K, et al. Identification of differentially expressed long non-coding RNAs in CD4+ T cells response to latent tuberculosis infection[J]. J Infect, 2014, 69(6): 558-568.
- [11] YANG F, XIAO Z, ZHANG S. Knockdown of miR-194-5p inhibits cell proliferation, migration and invasion in breast cancer by regulating the Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. Int J Mol Med, 2018, 42(6): 3355-3363.
- [12] REN Y, ZHANG Y, FAN L, et al. The cullin4A is up-regulated in chronic obstructive pulmonary disease patient and contributes to epithelial-mesenchymal transition in small airway epithelium[J]. Respir Res, 2019, 20(1): 84-94.
- [13] 曹杨荣,郭阳.鸟苷酸结合蛋白 5 基因在老年肺结核患者外周血单个核细胞中的表达[J].中国老年学杂志,2019,39(7): 1606-1608.
- [14] 代娇,宋秋玲,段慧英,等.活动性肺结核患者 Tim-3/Galectin-9 的表达变化及其与巨噬细胞相关细胞因子的相关性[J].实用医学杂志,2019,35(7):1101-1105.
- [15] ZHAO G, SU Z, SONG D, et al. The long noncoding RNA MALAT1 regulates the lipopolysaccharide-induced inflammatory response through its interaction with NF- κ B[J]. FEBS Lett, 2016, 590(17): 2884-2895.
- [16] 宋红焕,李国莉,刘巧,等.Wnt/ β -catenin 信号通路相关长链非编码 RNA 在肺结核患者外周血中的表达及其意义[J].江苏预防医学,2018,29(6):611-615.
- [17] 周冰,徐岩松,侯丽丽,等.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[J].安徽医药,2019,23(6): 1091-1094.
- [18] FAN L, SHEN H, HUANG H, et al. Impairment of Wnt/ β -catenin signaling in blood cells of patients with severe cavitary pulmonary tuberculosis [J/OL]. PLoS One, 2017, 12 (3): e0172549. DOI: 10.1371/journal.pone.0172549.
- [19] 刘兴宇,王乾兴,路健,等.氯化锂激活的 Wnt/ β -catenin 信号通路对激素型骨质疏松的防护作用[J].第二军医大学学报,2017,38(2):201-205.

(收稿日期:2019-12-18,修回日期:2020-03-09)