

引用本文:梁伊乐,胡新俊,岳峰,等.肺结核病人外周血长链非编码RNA MIR155 宿主基因的表达研究[J].安徽医药, 2021, 25(7): 1359-1362. DOI: 10.3969/j.issn.1009-6469.2021.07.021.

◇临床医学◇



肺结核病人外周血长链非编码RNA MIR155 宿主基因的表达研究

梁伊乐¹, 胡新俊¹, 岳峰¹, 徐芸²

作者单位:¹河南科技大学第一附属医院感染科, 河南 洛阳 471000;

²郑州大学第一附属医院消化内科, 河南 郑州 450000

基金项目: 2018年河南省卫生计生委医学科技攻关技术项目(182102310094)

摘要: **目的** 观察肺结核病人外周血中长链非编码RNA MIR155 宿主基因(LncRNAMIR155HG)的表达, 研究与T细胞的关系, 探讨在疾病发生中的意义。**方法** 收集2018年1月至2019年1月河南科技大学第一附属医院就诊的肺结核(肺结核组)治疗病人126例, 同时取150例体检健康者作为对照组。实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测外周血中LncRNA MIR155HG水平, 酶联免疫吸附(ELISA)法检测外周血中T细胞指标白介素(IL)-2、干扰素(IFN- γ)、IL-4、IL-5、辅助性T细胞17A(Th-17A)水平; Pearson法分析肺结核病人外周血中LncRNA MIR155HG与T细胞指标相关性; logistic分析影响肺结核的因素; 受试者工作特性曲线(ROC)分析外周血中LncRNA MIR155HG对肺结核的诊断价值。**结果** 肺结核组和对照组外周血中LncRNA MIR155HG相对表达量OD值分别为(1.96 $\pm$ 0.62)(1.02 $\pm$ 0.26), 与对照组相比, 肺结核组外周血中LncRNA MIR155HG、IL-4、IL-5、Th-17A水平升高($P < 0.05$), IL-2、IFN- γ 降低($P < 0.05$)。Pearson法分析结果显示, 肺结核病人外周血中LncRNA MIR155HG与IL-2、IFN- γ 呈负相关($P < 0.05$), 与IL-4、Th-17A呈正相关($P < 0.05$)。logistic回归分析显示, LncRNA MIR155HG、IL-4是影响肺结核的危险因素, IFN- γ 是影响肺结核的保护因素。ROC曲线显示, 外周血中LncRNA MIR155HG水平预测肺结核的ROC为0.920(95%CI: 0.880~0.960), 截断值为1.358, 其敏感性为87.3%、特异性为99.2%。**结论** 肺结核病人外周血LncRNA MIR155HG中高表达, 与T细胞指标关系密切, 可在一定程度上诊断肺结核, 可为早期诊断肺结核提供一定的依据。

关键词: 结核, 肺; RNA, 长链非编码; 外周血; MIR155HG; T细胞

Study on the expression of LncRNA MIR155HG in peripheral blood of patients with pulmonary tuberculosis

LIANG Yile¹, HU Xinjun¹, YUE Feng¹, XU Yun²

Author Affiliations: ¹Department of Infection, The First Affiliated Hospital of Henan University of Science and Technology, Luoyang 471000, China; ²Department of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, China

Abstract: **Objective** To observe the expression of long noncoding RNA (LncRNA) MIR 155HG in peripheral blood of patients with pulmonary tuberculosis, to study its relationship with T cells, and to explore its significance in the pathogenesis of pulmonary tuberculosis. **Methods** A total of 126 patients with pulmonary tuberculosis (tuberculosis group) treated in The First Affiliated Hospital of Henan University of Science and Technology from January 2018 to January 2019 were collected, and 150 healthy persons were taken as control group. Real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) was used to detect the level of LncRNA MIR155HG in peripheral blood, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the levels of interleukin (IL) -2, interferon (IFN- γ), IL-4, IL-5 and Th-17A in peripheral blood; Pearson method was used to analyze the correlation between LncRNA MIR155HG and T cell index in peripheral blood of patients with pulmonary tuberculosis; Logistic analysis was used to analyze the factors affecting tuberculosis; and the diagnostic value of LncRNA MIR 155HG in peripheral blood for tuberculosis was analyzed by ROC. **Results** The OD value of the relative expression of LncRNA MIR155HG in the peripheral blood of the tuberculosis group and the control group were 1.96 $\pm$ 0.62, 1.02 $\pm$ 0.26, respectively. Compared with those in the control group, the levels of LncRNA MIR 155HG, IL-4, IL-5 and Th-17A in peripheral blood of pulmonary tuberculosis group increased ($P < 0.05$), while the levels of IL-2 and IFN- γ decreased ($P < 0.05$). Pearson analysis showed that LncRNA MIR155HG in peripheral blood of patients with pulmonary tuberculosis was negatively correlated with IL-2 and IFN- γ ($P < 0.05$), and positively correlated with IL-4 and Th-17A ($P < 0.05$). Logistic regression analysis showed that LncRNA MIR155HG and IL-4 were risk factors for tuberculosis, and IFN- γ was a protective factor for tuberculosis. The ROC curve showed that the area under the ROC curve predicted by the level of LncRNA MIR 155HG in peripheral blood was 0.920 (95% CI:

0.880-0.960), the truncation value was 1.358, and the sensitivity and specificity were 87.3% and 99.2%. **Conclusions** LncRNA MIR155HG is highly expressed in peripheral blood of patients with pulmonary tuberculosis and is closely related to T cell markers, which can diagnose pulmonary tuberculosis to some extent and provide a basis for early diagnosis of pulmonary tuberculosis.

Key words: Tuberculosis, pulmonary; RNA, long noncoding; Peripheral blood; MIR 155HG; T cells

肺结核属临床常见传染病,中国当前逐年呈上升趋势,发病机制复杂,其中多种免疫细胞、因子参与其中^[1]。由于肺部感染类疾病症状类似,肺结核早期临床特征不明显且不出现较高特异性,在诊治时极易出现误诊或漏诊^[2],从而影响肺结核的治疗。因此寻找较高特异性的因子有利于诊断肺结核。长链非编码RNA(long noncoding Ribonucleic Acid, LncRNA)在疾病诊断中有一定应用,长链非编码肺腺癌转移相关转录本1(LncRNAMALAT1)在诊断肺结核中具有一定价值^[3],但MALAT1与免疫之间是否有关尚不明确,长链非编码RNA MIR155宿主基因(LncRNAMIR155HG)在哮喘病人中差异表达,影响哮喘^[4]。但LncRNA MIR155HG在肺结核中的研究尚未发现。因此,本研究拟通过研究肺结核外周血中LncRNA MIR155HG的情况,以及与T细胞相关基因的关系,为肺结核的诊断提供新的靶位点,具体结果如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集2018年1月至2019年1月河南科技大学第一附属医院及洛阳市传染病医院就诊的肺结核(肺结核组)治疗病人126例,其中男85例、女41例;年龄范围18~80岁,年龄(49.56±19.52)岁。同时取150例体检健康者为对照组,其中男100例、女50例;年龄范围19~80岁,年龄(50.62±18.56)岁。两组性别、年龄比较差异无统计学意义($\chi^2=0.020$, $P=0.889$, $t=0.462$, $P=0.645$),具有可比性。

肺结核诊断标准:所有病人均符合《肺结核诊断和治疗指南》中关于肺结核的诊断标准^[5]。纳入标准:①均符合肺结核上述诊断标准;②确诊为肺结核病人;③年龄>18岁。排除标准:①激素使用病人;②合并糖尿病等免疫器官缺陷病人;③其他因素影响免疫功能病人。

所有病人或其近亲属知情同意,本研究符合《世界医学协会赫尔辛基宣言》相关要求。

1.2 外周血血样采集 健康对照组于体检时早晨、肺结核病人入院后第二空腹状态下抽取外周静脉血5 mL于肝素抗凝管中。平均分成两管,一管用于LncRNA MIR155HG的检测,−20℃冰箱保存;另一管抽血当天检测相关T细胞水平。

1.3 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测外周血中LncRNA MIR155HG水平 从−20℃冰箱中取出外周血,TRIzol(美国ThermoFisher,货号S0001)法提

取总RNA,cDNA反转录试剂盒(美国Fermentas,货号K1622)反转录cDNA,qRT-PCR仪(美国ABI,型号4376600)对LncRNA MIR155HG、内参 β 肌动蛋白(β -actin)扩增。引物序列:MIR155HG,正向引物5'-TGGAACAAATTGCTGCCGTG-3',反向引物5'-AG-GTTGAACATCCCAGTGACC-3'; β -actin:正向引物5'-AACTCCATCATGAAGTGTGACG-3',反向引物5'-GATCCACATCTGCTGGAAGG-3'。上样体积20 μ L,体系:2×SYBR Premix Ex Taq™ II Probe QPCR Mix 10 μ L, cDNA 1 μ L(50 ng/ μ L), F/R(10 μ M)各0.5 μ L,双蒸水8.0 μ L。反应条件:95℃、60 s, 94℃、30 s, 62℃、45 s, 45个循环。2^{−ΔΔCT}法对LncRNA MIR155HG、内参 β -actin表达水平定量分析。

1.4 酶联免疫吸附(ELISA)法检测外周血中T细胞指标白介素(Interleukin, IL)-2、干扰素(Interferon- γ , IFN- γ)、IL-4、IL-5、辅助性T细胞17A(Th-17A)水平 人ELISA IL-2、IFN- γ 、IL-4、IL-5(美国abcam,货号分别为ab46036、ab46025、ab215089、ab215536)、Th-17A(赛默飞世尔科技有限公司,货号29-8179-65)试剂盒检测外周血中IL-2、IFN- γ 、IL-4、IL-5、Th-17A水平,操作按试剂盒具体步骤进行。

1.5 统计学方法 运用统计学软件SPSS 22.0对数据进行处理,计数资料用例(%)表示,采用 χ^2 检验,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组之间比较采用独立样本 t 检验;Pearson法分析肺结核病人外周血中LncRNA MIR155HG与T细胞指标相关性;以logistic回归分析法分析肺结核发生的影响因素;以受试者工作特性曲线(Receiver Operating Characteristic, ROC)分析外周血中LncRNA MIR155HG对肺结核的诊断价值。 $P<0.05$,差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组外周血中LncRNA MIR155HG水平 肺结核组和对照组外周血中LncRNA MIR155HG相对表达量OD值分别为1.96±0.62、1.02±0.26,与对照组相比,肺结核组外周血中LncRNA MIR155HG水平升高($t=15.882$, $P<0.05$)

2.2 两组外周血中IL-2、IFN- γ 、IL-4、IL-5、Th-17A水平 与对照组相比,肺结核组外周血中IL-2、IFN- γ 降低($P<0.05$),IL-4、IL-5、Th-17A升高($P<0.05$)。见表1。

2.3 肺结核病人外周血中LncRNA MIR155HG与IL-2、IFN- γ 、IL-4、IL-5、Th-17A的关系 Pearson法

表1 肺结核病人126例与体检健康者150例外周血中IL-2、IFN- γ 、IL-4、IL-5、Th-17A水平比较/(pg/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	Th1		Th2		Th-17A
		IL-2	IFN- γ	IL-4	IL-5	
对照组	150	1.85 $\pm$ 0.35	4.15 $\pm$ 0.56	1.53 $\pm$ 0.11	2.31 $\pm$ 0.23	5.79 $\pm$ 0.35
肺结核组	126	0.88 $\pm$ 0.16	1.95 $\pm$ 0.15	2.64 $\pm$ 0.21	8.52 $\pm$ 0.65	18.52 $\pm$ 2.52
<i>t</i> 值		30.381	46.197	53.478	101.988	56.234
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注:Th1为辅助性T细胞1,Th2为辅助性T细胞2,Th-17A为辅助性T细胞17A,IL-2为白介素-2,IFN- γ 为干扰素,IL-4为白介素-4,IL-5为白介素-5。

分析结果显示,肺结核病人外周血中LncRNA MIR155HG与IL-5相关性不明显($P>0.05$),与IL-2、IFN- γ 呈负相关($P<0.05$),与IL-4、Th-17A呈正相关($P<0.05$)。见表2。

表2 肺结核病人外周血中LncRNA MIR155HG与IL-2、IFN- γ 、IL-4、IL-5、Th-17A的关系

基因		Th1		Th2		Th-17A
		IL-2	IFN- γ	IL-4	IL-5	
LncRNA	<i>r</i> 值	0.342	0.471	0.512	0.276	0.414
MIR155HG	<i>P</i> 值	-0.023	0.000	0.000	0.517	0.002

注:LncRNA为长链非编码RNA,MIR155HG为MIR155宿主基因,Th1为辅助性T细胞1,Th2为辅助性T细胞2,Th-17A为辅助性T细胞17A,IL-2为白介素-2,IFN- γ 为干扰素,IL-4为白介素-4,IL-5为白介素-5。

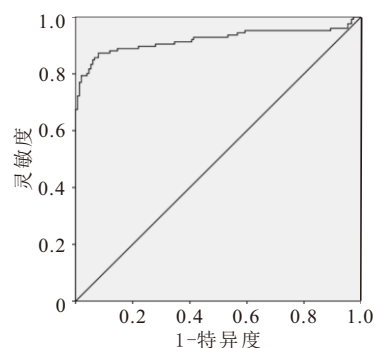
2.4 影响肺结核的多因素分析 将肺结核是否发生为因变量,以LncRNA MIR155HG、IL-2、IFN- γ 、IL-4、IL-5、Th-17A为水平自变量进行多因素logistic回归分析,结果显示LncRNA MIR155HG、IL-4是影响肺结核的危险因素,IFN- γ 是影响肺结核的保护因素,见表3。

表3 影响肺结核的多因素分析

影响因素	<i>B</i> 值	<i>SE</i> 值	<i>Wald</i> 值	<i>P</i> 值	<i>OR</i> 值	95% <i>CI</i>
LncRNA						
MIR155HG	0.46	0.12	14.69	0.000	1.59	1.36~1.85
IL-2	0.13	0.25	0.27	0.523	1.13	0.78~1.65
IFN- γ	-0.59	0.21	7.89	0.015	0.55	0.36~0.85
IL-4	0.59	0.35	2.84	0.000	1.81	1.52~2.15
IL-5	-0.31	0.88	0.12	0.086	0.73	0.25~1.12
Th-17A	0.42	0.81	0.27	0.123	1.52	0.92~2.52

注:LncRNA为长链非编码RNA,MIR155HG为MIR155宿主基因,IL-2为辅助性T细胞2,IFN- γ 为干扰素,白介素-4,IL-5为白介素-5,Th-17A为辅助性T细胞17A。

2.5 外周血中LncRNA MIR155HG诊断肺结核的效能 ROC曲线显示,外周血中LncRNA MIR155HG水平预测肺结核的ROC曲线下面积为0.920(95% *CI*: 0.880~0.960),截断值为1.358,其敏感性为87.3%、特异性为99.2%。见图1。

**图1** 外周血中LncRNA MIR155HG预测肺结核ROC曲线图

3 讨论

肺结核在中国发病率逐年上升,感染人群广、且男性多于女性。临床以咳嗽、咳痰、发热、咯血、胸闷、胸痛等为首发症状,与肺炎、肺肉瘤样癌等其他呼吸疾病症状类似,缺乏特异性^[6-7],病人多因出现临床症状而就诊,及早判定病情对于疾病治疗安全有效。肺结核是结核分支杆菌感染肺部所致,且会引起多种并发症和合并症,使病人免疫功能下降^[8],而免疫功能可反映机体对疾病的抵抗力水平,免疫功能降低使病人自身对疾病的调节能力减弱,结核分支杆菌感染肺部加重,从而导致肺结核加重。

LncRNA是一类长度大于200 nt的非编码RNA,与肺结核疾病关系密切,欧青叶等^[9]已经通过LncRNA芯片技术高通量检测筛选出潜伏性结核感染者血浆中多种LncRNA,但具体发挥的功能却尚不明确。Wang X等^[10]发现LncRNA H19靶向调控miR-22可抑制细胞的衰老、促进细胞增殖从而促进疾病发展;黄自坤等^[11]都对LncRNA MALAT1在结核感染病人中进行研究,发现LncRNA MALAT1可在肺结核中具有一定的诊断价值。LncRNA MIR155HG是一段长1 500 bp的LncRNA,因是miR-155的宿主基因而得名^[12-13]。LncRNA MIR155HG在慢性心力衰竭中与心衰有一定关系,可反映病人心力衰竭程度^[14];在系统性红斑狼疮中高表达,与疾病的活动度有关,可能诱发炎症,可作为系统性红斑狼疮活动度评估和预后判断指标^[15]。LncRNA MIR155HG在肺结核病人中尚无发现相关研究。本研究通过qRT-PCR检验肺结核病

人外周血中的 LncRNA MIR155HG 水平,发现 LncRNA MIR155HG 在肺结核病人外周血中水平升高,是否可作为诊断指标需进一步验证。

T 细胞是人体免疫系统的关键组成部分。Th1、Th2 在肺结核免疫反应中研究广泛,可对结核分枝杆菌感染的肺结核起保护作用^[16-17]。Th1 主要对抗细胞内细菌和原虫的免疫反应和迟发性超敏反应,主要分泌 IL-2、IFN- γ 等,其中 IFN- γ 是特征因子;Th2 细胞可辅助 B 细胞分化参与体液免疫,主要分泌 IL-4、IL-5 等,其中 IL-4 是特征因子,当机体受到异己抗原攻击时 Th1 细胞功能减弱、Th2 细胞功能增强即可引起异常免疫应答。Th17 主要分泌 Th17A,在肺结核中水平升高导致感染细菌数量减少。本研究显示肺结核组外周血中 IL-2、IFN- γ 降低,IL-4、IL-5、Th-17A 升高,肺结核病人外周血中 Th1 水平降低、Th2 水平升高机体发生异常免疫应答,Th17 水平升高可能降低结核分枝杆菌感染肺结核的数量从而缓解疾病。

肺结核中影响 LncRNA 影响 T 细胞从而疾病已有报道^[18],但具体关系尚不清楚。本研究发现肺结核病人外周血中 LncRNA MIR155HG 与 IL-2、IFN- γ 呈负相关,与 IL-4、Th-17A 呈正相关。提示肺结核病人外周血中 LncRNA MIR155HG 与 Th1、Th2、Th17 免疫功能关系密切,可能影响这些免疫功能细胞从而影响疾病。同时发现 LncRNA MIR155HG、IL-4 是影响肺结核的危险因素,IFN- γ 是影响肺结核的保护因素。LncRNA MIR155HG、IL-4 水平升高,IFN- γ 水平降低均有可能发生肺结核。进一步研究 ROC 曲线显示,外周血中 LncRNA MIR155HG 水平预测肺结核的 ROC 曲线下面积为 0.920,截断值为 1.358,其敏感性为 87.3%、特异性为 99.2%。当 ROC 曲线下面积大于 0.900 时,具有较高的诊断价值。LncRNA MIR155HG 对于诊断肺结核诊断价值较高,当外周血中 LncRNA MIR155HG 水平高于 1.358 时发生肺结核的概率较高。

综上所述,肺结核病人外周血中 LncRNA MIR155HG 水平升高,与 T 细胞关系密切,是肺结核的危险因素,同时对肺结核具有较高的诊断价值,有望成为肺结核诊断及预后预测的潜在标志物。本研究中发现 LncRNA MIR155HG 与 T 细胞有关,具体机制尚不明确,有待下一步深入探究。

参考文献

[1] Dunn RN, Ben MH. Spinal tuberculosis [J]. Spine, 2018, 36 (6):469-473.

[2] 郭颖,何花贞,孙征.肺结核合并肺部真菌感染的临床特点及危险因素[J].中国老年学杂志,2019,39(2):294-297.

[3] 罗清,姚芳苒,彭亦平,等.血清长链非编码 RNA 肺腺癌转移相关转录本 1 在肺结核中的诊断价值[J].中华传染病杂志,2017,35(11):684-687.

[4] 李博文,高卓,梁红艳,等.哮喘患者血清中循环 lncRNA 差异性表达的初步筛查[J].医学研究杂志,2016,45(3):31-34.

[5] 中华医学会结核病学分会.肺结核诊断和治疗指南[J].中华结核和呼吸杂志,2001,24(2):70-74.

[6] 李庆玲,周向辉,周辛灿,等.以咯血、发热为主要表现的过敏性肺炎一例[J].中国呼吸与危重监护杂志,2017,16(5):513-515.

[7] 毛玉焕,冀瑛瑛,商映雪,等.79 例肺肉瘤样癌的临床特征及预后分析[J].肿瘤防治研究,2018,45(5):295-299.

[8] TORRELLES JB, SCHLESINGER LS. Integrating lung physiology, immunology, and tuberculosis [J]. Trends Microbiol, 2017, 25(8):688-697.

[9] 欧青叶,顾大勇,周俭中,等.潜伏性结核菌感染者血浆长链非编码 RNA 表达谱差异分析[J].中华检验医学杂志,2016,39(11):857-863.

[10] WANG X, ZOU M, LI J, et al. LncRNA H19 targets miR-22 to modulate H₂O₂-induced deregulation in nucleus pulposus cell senescence, proliferation, and ECM synthesis through Wnt signaling[J]. J Cell Biochem, 2018, 119(6):4990-5002.

[11] 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.

[12] BAYTAK E, GONG Q, AKMAN B, et al. Whole transcriptome analysis reveals dysregulated oncogenic lncRNAs in natural killer/T-cell lymphoma and establishes MIR155HG as a target of PRDM1 [J]. Tumour Biol, 2017, 39 (5) : 1010428317701648. DOI: 10.1177/1010428317701648.

[13] WU X, WANG Y, YU T, et al. Blocking MIR155HG/miR-155 axis inhibits mesenchymal transition in glioma [J]. Neuro Oncol, 2017, 19(9):1195-1205.

[14] 韩虎魁,李刚,李其勇,等.血清 LncRNA MIR155HG 在慢性心力衰竭患者中的表达及临床意义[J].四川医学,2019,40(4):325-329.

[15] 唐敏,张玉高.系统性红斑狼疮患者血清 LncRNA MIR155HG 的表达及临床意义[J].实用医学杂志,2019,35(2):213-216.

[16] CHÁVEZ-GALÁN L, ILLESCAS-EUGENIO J, ALVAREZ-SEKELY M, et al. Tuberculosis patients display a high proportion of CD8+ T cells with a high cytotoxic potential [J]. Microbiol Immunol, 2019,63(8):316-327.

[17] MURRAY L W, SATTI I, MEYEROWITZ J, et al. Human immunodeficiency virus infection impairs th1 and Th17 mycobacterium tuberculosis-specific T-cell responses [J]. J Infect Dis, 2018, 217(11):1782-1792.

[18] FU Y, GAO K, TAO E, et al. Aberrantly expressed long non-coding RNAs in CD8+ T cells response to active tuberculosis [J]. J Cell Biochem, 2017, 118(12):4275-4284.

(收稿日期:2019-10-16,修回日期:2010-12-09)