

- (5): 8696-8705.
- [16] HUANG C Y, CHIANG S F, CHEN W T L, et al. HMGB1 promotes ERK-mediated mitochondrial Drp1 phosphorylation for chemoresistance through RAGE in colorectal cancer[J]. Cell Death & Disease, 2018, 9(10): 1004.
- [17] LV S, GUAN M. miRNA-1284, a regulator of HMGB1, inhibits cell proliferation and migration in osteosarcoma[J]. Bioscience Reports, 2018, 38(4): BSR20171675. DOI: 10.1042/BSR20171675.
- [18] MENG Q, ZHAO J, LIU H, et al. HMGB1 promotes cellular proliferation and invasion, suppresses cellular apoptosis in osteosarcoma[J]. Tumour Biol, 2014, 35(12): 12265-12274.
- [19] LIU K, HUANG J, NI J, et al. MALAT1 promotes osteosarcoma development by regulation of HMGB1 via miR-142-3p and miR-129-5p[J]. Cell Cycle, 2017, 16(6): 578-587.
- [20] CHEN X, LIU X, HE B, et al. MiR-216b functions as a tumor suppressor by targeting HMGB1-mediated JAK2/STAT3 signaling way in colorectal cancer[J]. Am J Cancer Res, 2017, 7(10): 2051-2069.
- (收稿日期:2019-08-12,修回日期:2019-10-10)

引用本文:贾宗岭,单富强,葛国昌,等.微小RNA361-5p在肺结核病人血清中水平及意义[J].安徽医药,2021,25(8):1609-1612.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2021.08.032.



◇临床医学◇

微小RNA361-5p在肺结核病人血清中水平及意义

贾宗岭¹,单富强¹,葛国昌¹,赵幸娜²

作者单位:¹开封市结核病防治所(开封市肺科医院)呼吸内科,河南 开封 475000;

²郑州大学,河南 郑州 450007

基金项目:河南省科技攻关项目(182102310153)

摘要: **目的** 探究微小RNA361-5p(miR-361-5p)在肺结核病人血清中水平及意义。**方法** 选取2017年3月至2019年1月开封市结核病防治所诊治的肺结核病人136例为肺结核组;并选择同时间段内同一医院142例健康体检者为健康对照组。比较两组一般临床资料;以实时荧光定量PCR(qRT-PCR)法检测两组血清miR-361-5p水平;检测血管内皮生长因子(VEGF)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、 γ -干扰素(IFN- γ)水平;分析肺结核病人血清miR-361-5p水平与VEGF、TNF- α 、IFN- γ 的关系;回归分析肺结核发生的影响因素;分析血清miR-361-5p对肺结核的诊断价值。**结果** 肺结核组血清miR-361-5p[(1.58 $\pm$ 0.45)比(1.06 $\pm$ 0.31)]、VEGF[(389.39 $\pm$ 46.85)pg/mL比(327.62 $\pm$ 41.76)pg/mL]、TNF- α [(22.48 $\pm$ 5.06)ng/L比(11.36 $\pm$ 3.17)ng/L]水平均明显高于健康对照组,IFN- γ 水平[(15.58 $\pm$ 3.36)ng/L比(26.72 $\pm$ 4.78)ng/L]明显低于健康对照组(均 $P < 0.05$);肺结核病人血清miR-361-5p与VEGF、TNF- α 水平呈正相关,与IFN- γ 水平呈负相关(均 $P < 0.05$);miR-361-5p、VEGF、TNF- α 是影响肺结核发生的危险因素,IFN- γ 是影响肺结核发生的保护因素(均 $P < 0.05$);血清miR-361-5p水平对肺结核发生诊断的AUC为0.898,截断值为1.44,其灵敏度为83.8%,特异度为88.0%。**结论** 肺结核病人血清miR-361-5p呈高表达,与炎症相关因子密切相关,miR-361-5p可能与炎症相关因子相互作用,进而共同调节肺结核发生、发展。

关键词: 结核,肺; 血清; 微小RNA-361-5p; 临床意义

Detection level and clinical significance of serum miR-361-5p in patients with pulmonary tuberculosis

JIA Zongling¹, SHAN Fuqiang¹, GE Guochang¹, ZHAO Xinna²

Author Affiliations:¹Respiratory Medicine, Kaifeng Tuberculosis Prevention and Treatment Center (Kaifeng Pulmonary Hospital), Kaifeng, Henan 475000, China; ²Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450007, China

Abstract: **Objective** To explore the level and significance of microRNA361-5p (miR-361-5p) in serum of patients with pulmonary tuberculosis. **Methods** 136 cases of pulmonary tuberculosis patients treated in Kaifeng Tuberculosis Prevention and Treatment Center from March 2017 to January 2019 were analyzed and studied, and they were called pulmonary tuberculosis group; in the same period, 142 healthy persons in our hospital were selected as the control group. The general clinical data of the two groups were compared and analyzed; the level of serum miR-361-5p was detected by real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR); the levels of vascular endothelial growth factor (VEGF), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interferon- γ (IFN- γ) were measured; the relationships between serum level of miR-361-5p and levels of VEGF, TNF- α and IFN- γ in patients with pulmonary tuberculosis were analyzed; the influencing

factors of pulmonary tuberculosis were analyzed by regression analysis; and the diagnostic value of serum miR-361-5p in pulmonary tuberculosis was analyzed. **Results** The levels of serum miR-361-5p[(1.58±0.45) vs. (1.06±0.31)], VEGF[(389.39±46.85)pg/mL vs. (327.62±41.76)pg/mL] and TNF-α[(22.48±5.06)ng/L vs. (11.36±3.17)ng/L] in tuberculosis group were significantly higher than those in healthy group, and the level of IFN-γ[(15.58±3.36)ng/L vs. (26.72±4.78)ng/L] in tuberculosis group was significantly lower than that in healthy group ($P<0.05$); the serum level of miR-361-5p was positively correlated with levels of VEGF and TNF-α, and negatively correlated with level of IFN-γ in patients with pulmonary tuberculosis ($P<0.05$); miR-361-5p, VEGF and TNF-α were risk factors for tuberculosis, and IFN-γ was protective factor for tuberculosis (all $P<0.05$); the AUC of serum miR-361-5p level for diagnosis of pulmonary tuberculosis was 0.898, the truncation value was 1.44, the sensitivity was 83.8%, and the specificity was 88.0%. **Conclusion** The expression of serum miR-361-5p in patients with pulmonary tuberculosis is high, which is closely related to inflammatory factors, miR-361-5p may interact with inflammatory factors, and then co-regulate the occurrence and development of pulmonary tuberculosis.

Key words: Tuberculosis, pulmonary; Serum; MicroRNA-361-5p; Clinical significance

肺结核是临床常见的由结核分枝杆菌导致的严重传染性疾病,其发病率和病死率极高,给病人心理及生理带来沉重负担^[1]。肺结核发病除与肺部感染结核菌有关外,还与表达异常的微小RNA(miRNA)和炎症因子密切相关^[2]。miR-140在肺结核病人外周血中表达异常,其可能通过调节促炎因子水平参与并影响肺结核发病进展^[3]。miR-361-5p在肺结核病人血浆中呈高表达,可作为肺结核诊断的有效标志物^[4]。此外,结核分枝杆菌入侵人体时,机体会产生大量炎症反应相关因子,其水平可一定程度用于筛查肺结核,炎症反应相关因可能在结核病发生发展过程发挥重要作用^[5]。但微小RNA-361-5p(miRNA-361-5p, miR-361-5p)在肺结核血清中的表达水平及意义鲜有研究。本研究通过初步检测miR-361-5p在肺结核中血清中的水平,分析miR-361-5p与炎症相关因子的关系,以期对诊治肺结核提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取2017年3月至2019年1月开封市结核病防治所诊治的肺结核病人136例进行研究(肺结核组),男76例,女60例;年龄(44.01±10.52)岁,年龄范围为31~57岁;体质量指数(BMI)(20.84±2.87)kg/m², BMI范围为17.01~24.86 kg/m²。并以同期本院体检正常者142例进行对照研究(健康对照组),男78例,女64例;年龄(43.94±10.47)岁,年龄范围为29~56岁;BMI为(21.08±2.93)kg/m², BMI范围为17.25~25.09 kg/m²。两组年龄、性别、BMI比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。

纳入标准:(1)符合《肺结核诊断和治疗指南》^[6]

中肺结核诊断标准者;(2)病历资料齐全者;(3)病人本人自愿参该项研究,并签署知情同意书。排除标准:(1)合并糖尿病、心肝肾功能异常、肺癌者;(2)合并过敏体质者或妊娠、哺乳期女性;(3)合并精神类障碍或其他免疫、慢性疾病者;(4)近期使用糖皮质激素、抗感染、免疫等影响炎症反应药物者。本研究符合《世界医学协会赫尔辛基宣言》相关要求。

1.2 方法

1.2.1 样本收集 采集肺结核病人入院第二日及体检正常者清晨空腹肘静脉血约5~6 mL,室温下静置约30 min,以3 500 r/min离心5 min,收集上清,分装于1.5 mL EP管中,密封,储存于-80 ℃冰箱中,备用。

1.2.2 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)法检测血清中miR-361-5p表达水平 取出-80 ℃中适量血清样本,无菌环境下,冰上解冻,按TRIzol法提取总RNA,具体操作按TRIzol试剂(BYX1617P,常州贝源鑫生物科技有限公司)说明书进行。以紫外分光光度计(Nano EX,泽尼萨尔有限公司)检测RNA浓度、纯度,并验其完整性。根据miScript Reverse Transcription Kit(218061,上海北诺生物科技有限公司)说明书将RNA逆录成cDNA。利用TaqMan® Fast Advanced Master Mix(4444557,杭州沃森生物技术有限公司)及PCR仪(Rotor-Gene Q,凯杰企业管理有限公司)将cDNA扩增,qPCR检测。miR-361-5p以U6为内参,其引物序列如表1所示。以2^{-ΔΔCT}法计算miR-361-5p相对表达量。

表1 miR-361-5p及内参U6的引物序列

名称	正向引物5'—3'	反向引物5'—3'
miR-361-5p	ATAAAGTGCTGACACTGCAGATAGTG	TCAAGTACCCACAGTGCAGT
U6	CGCTTCGGCAGCACATATACTAA	TGGAACGCTTCACGAATTTGC

1.2.3 血清血管内皮生长因子(VEGF)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、 γ -干扰素(IFN- γ)水平检测 从-80℃冰箱中取出分装的血清样本,室温下解冻,利用人 VEGF 酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒(货号:KHG0111,上海研卉生物科技有限公司)、TNF- α ELISA 试剂盒(OSD_H0170,长沙达尔锋生物科技有限公司)、IFN- γ ELISA 试剂盒(BS-E3748H1,广州徕智生物科技有限公司)按 ELISA 法测定血清 VEGF、TNF- α 、IFN- γ 水平。

1.3 统计学方法 数据使用 SPSS22.0 软件分析。计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 描述,组间比较行 t 检验;计数数据以“例”表示,行 χ^2 检验;肺结核病人血清 miR-361-5p 水平与 VEGF、TNF- α 、IFN- γ 的关系采用 Pearson 法分析;Logistic 回归分析法分析肺结核发生的影响因素;受试者工作特征(ROC)曲线评估血清 miR-361-5p 水平对肺结核的诊断价值。当 $P < 0.05$ 时,表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组血清 miR-361-5p、VEGF、TNF- α 、IFN- γ 水平比较 与健康对照组相比,肺结核组病人血清 miR-361-5p、VEGF、TNF- α 水平较高(均 $P < 0.05$),IFN- γ 水平明显较低($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 两组血清 miR-361-5p、血管内皮生长因子(VEGF)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、 γ -干扰素(IFN- γ)水平比较/ $\bar{x} \pm s$

组别	例数	miR-361-5p	VEGF/(pg/mL)	TNF- α /(ng/L)	IFN- γ /(ng/L)
健康对照组	142	1.06 $\pm$ 0.31	327.62 $\pm$ 41.76	11.36 $\pm$ 3.17	26.72 $\pm$ 4.78
肺结核组	136	1.58 $\pm$ 0.45	389.39 $\pm$ 46.85	22.48 $\pm$ 5.06	15.58 $\pm$ 3.36
t 值		11.260	11.616	22.056	22.391
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000

2.2 肺结核病人血清 miR-361-5p 水平与 VEGF、TNF- α 、IFN- γ 关系 Pearson 法相关性分析显示,肺结核病人血清 miR-361-5p 与 VEGF、TNF- α 水平呈正相关($r=0.585, 0.539, P$ 均 < 0.05),与 IFN- γ 水平呈负相关($r=0.485, P < 0.05$)。

2.3 影响肺结核的 Logistic 回归分析 以 miR-361-5p、VEGF、TNF- α 、IFN- γ 水平为自变量,以肺结核是否发生为因变量,行 Logistic 回归分析,结果显示 miR-361-5p、VEGF、TNF- α 是影响肺结核发生的危险因素(均 $P < 0.05$),IFN- γ 是影响肺结核发生的保护因素($P < 0.05$)。见表 3。

2.4 血清 miR-361-5p 对肺结核的诊断价值 ROC 曲线显示,血清 miR-361-5p 水平对肺结核发生诊断的曲线下面积(Area Under Curve, AUC)为 0.898

表 3 Logistic 回归分析肺结核发生的影响因素

指标	B 值	SE 值	wald χ^2 值	P 值	OR 值	95%CI
miR-361-5p	0.617	0.277	4.961	0.000	1.854	1.409~2.439
VEGF	0.551	0.221	6.216	0.000	1.734	1.326~2.268
TNF- α	0.622	0.287	4.697	0.000	1.862	1.544~2.245
IFN- γ	-0.568	0.106	28.713	0.000	0.567	0.343~0.936

注:VEGF 为血管内皮生长因子,TNF- α 为肿瘤坏死因子- α , IFN- γ 为 γ -干扰素。

(95%CI:0.860~0.936),截断值为 1.44,其灵敏度、特异度分别为 83.82%、88.03%。见图 1。

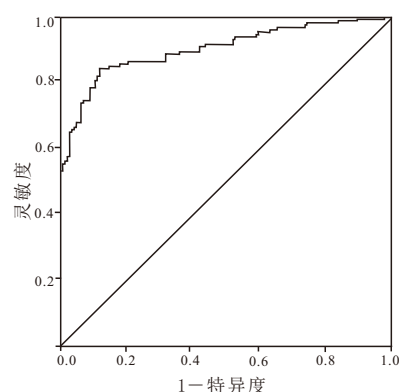


图 1 血清 miR-361-5p 表达水平预测肺结核发生的 ROC 曲线

3 讨论

肺结核是一种传染性较强的肺部感染疾病,以乏力、午后低热、盗汗、咯血为主要临床症状,可导致肺癌^[7]。因此,寻找可高效诊治肺结核的指标,对提高肺结核病人生活和生存质量极具重要意义。

miRNA 是广泛分布于人体外周血的非编码小 RNA,可参与调控新陈代谢、氧化应激、炎症反应等过程,与肺炎、肺结核、肺纤维化、肺癌等肺部损伤类疾病^[8-9]。miR-133a 在肺纤维化中表达失调,其可能参与并影响肺纤维化发展进程,miR-133a 有望成为治疗肺纤维化的靶标^[10]。miR-423-5p 在肺结核病人血清中表达上调,其可通过调节自噬小体-溶酶体融合,进而在肺结核中起关键调节作用,可作为肺结核诊断的有效指标^[11]。miR-130b 在肺癌中呈高表达,其可能参与肺癌发生发展,miR-130b 具有诊断肺癌的潜在价值^[12]。此外,Ndzi 等^[4]研究发现 miR-361-5p 在肺结核中表达异常,其有望成为诊断肺结核的生物指标。miR-361-5p 在肺癌中异常表达,其可能在非小细胞肺癌进展中起一定调控作用,且可作为非小细胞肺癌预后评估指标^[13]。本研究中肺结核组病人血清 miR-361-5p 水平明显高于健康对照组,提示 miR-361-5p 可能在肺结核发生发展进程中起一定作用。

肺结核发展过程与免疫细胞分泌的多种炎症

相关因子有关。其中, VEGF 是机体内促血管生长的重要因子, 可由肺单核细胞、巨噬细胞分泌, 影响结核结节、干酪样坏死, 与多种炎症疾病紧密相关^[14]。TNF- α 是多功能细胞因子, 可与巨噬细胞一起抵抗结核杆菌的感染, 对机体释放其他抵抗结核细胞因子具有关键作用^[15]。此外, IFN- γ 可激活免疫细胞, 在抗结核过程发挥重要作用, 肺结核病人血清中 TNF- α 、VEGF 水平升高, IFN- γ 水平降低; 经结核药联合利福喷丁治疗后, TNF- α 、VEGF 水平降低, IFN- γ 水平升高, TNF- α 、VEGF、IFN- γ 均可能参与且影响肺结核发病进展^[16]。本研究中肺结核病人血清 VEGF、TNF- α 水平明显高于健康对照组, IFN- γ 水平明显低于健康对照组, 提示炎症相关因子 TNF- α 、VEGF、IFN- γ 可能在肺结核发病过程中起一定作用。

miR-361-5p 在冠心病中可调节 VEGF 表达, 这种调节方式适用于血管新生、缺血性相关疾病^[17]。本研究中肺结核病人血清 miR-361-5p 与 VEGF、TNF- α 水平呈正相关, 与 IFN- γ 水平呈负相关, 提示 miR-361-5p 可能与 VEGF、TNF- α 、IFN- γ 等炎症相关因子相互作用, 共同影响肺结核发生与发展。本研究显示, miR-361-5p、VEGF、TNF- α 是影响肺结核发生的危险因素, IFN- γ 是影响肺结核发生的保护因素, 提示 miR-361-5p、VEGF、TNF- α 水平升高、IFN- γ 水平降低, 均可能使肺结核患病风险升高, 及时监测 miR-361-5p、VEGF、TNF- α 、IFN- γ 水平有利于及早诊治肺结核。进一步研究发现, 血清 miR-361-5p 水平对肺结核发生诊断的 AUC 为 0.898, 当血清 miR-361-5p 相对表达量高于 1.44 时, 肺结核发病几率增加, 提示血清 miR-361-5p 对肺结核有较高诊断价值。

综上所述, 肺结核病人血清 miR-361-5p 表达上调, miR-361-5p 与炎症相关因子具有一定相关性, 其可能与炎症因子共同影响肺结核疾病病变过程。本研究存在样本较少, 可能引起实验出现误差, 此外, 本研究未比较 miR-361-5p 与 VEGF、TNF- α 、IFN- γ 及各项联合诊断肺结核的价值, 后续将扩大样本比较上述各指标诊断肺结核的价值及其与肺结核类型的关系。

参考文献

- [1] JAMIL SM, OREN E, GARRISON GW, et al. Diagnosis of tuberculosis in adults and children[J]. Ann Am Thorac Soc, 2017, 14(2):275-278.
- [2] TAMGUE O, GCANGA L, OZTURK M, et al. Differential targeting of c-Maf, Bach-1, and Elmo-1 by microRNA-143 and microRNA-365 Promotes the intracellular growth of mycobacterium tuberculo-

- sis in alternatively IL-4/IL-13 activated macrophages[J]. Front Immunol, 2019, 10(3):421-430.
- [3] LI X, HUANG S, YU T, et al. MiR-140 modulates the inflammatory responses of Mycobacterium tuberculosis-infected macrophages by targeting TRAF6[J]. J Cell Mol Med, 2019, 23(8):5642-5653.
- [4] NDZI EN, NKENFOU CN, MEKUE LM, et al. MicroRNA hsa-miR-29a-3p is a plasma biomarker for the differential diagnosis and monitoring of tuberculosis[J]. Tuberculosis, 2019, 114(1):69-76.
- [5] DALVI SM, RAMRAJE NN, PATIL VW, et al. Study of IL-6 and vitamin D3 in patients of pulmonary tuberculosis[J]. Indian J Tuberc, 2019, 66(3):337-345.
- [6] 中华医学会结核病学分会. 肺结核诊断和治疗指南[J]. 中国实用乡村医生杂志, 2013, 20(2):7-11.
- [7] BORKOW G, BENTWICH Z. Eradication of helminthic infections may be essential for successful vaccination against HIV and tuberculosis[J]. Bull World Health Organ, 2000, 78(11):1368-1369.
- [8] PANGANIBAN R P, 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.
- [9] 周祉好, 聂宏光. miRNA 对肺部疾病的研究进展[J]. 生理科学进展, 2018, 49(1):57-60.
- [10] WEI P, XIE Y, ABEL PW, et al. Transforming growth factor (TGF)- β 1-induced miR-133a inhibits myofibroblast differentiation and pulmonary fibrosis[J]. Cell Death Dis, 2019, 10(9):670-683.
- [11] TU H, YANG S, JIANG T, et al. Elevated pulmonary tuberculosis biomarker miR-423-5p plays critical role in the occurrence of active TB by inhibiting autophagosome-lysosome fusion [J]. Emerg Microbes Infect, 2019, 8(1):448-460.
- [12] WANG J, YU XF, OUYANG N, et al. Role of DNA methylation regulation of miR-130b expression in human lung cancer using bioinformatics analysis[J]. J Toxicol Environ Health A, 2019, 82(17):935-943.
- [13] ZHUANG Z L, TIAN F M, SUN C L. Downregulation of miR-361-5p associates with aggressive clinicopathological features and unfavorable prognosis in non-small cell lung cancer[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2016, 20(24):5132-5136.
- [14] 蔡飞, 王鹤, 秦崇涛, 等. 血府逐瘀胶囊与血管内皮生长因子促血管新生差异研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2018, 38(4):441-446.
- [15] 周安, 徐巧玲, 李明强, 等. 结核患者血清 TNF- α 、IL-1、IL-10 和 HMGB-1 动态变化及临床意义[J]. 实用医学杂志, 2017, 33(2):285-288.
- [16] 洪旭华, 陈凯. 结核药联合利福喷丁对肺结核患者免疫功能、炎症因子、VEGF 及 MMP-9 的影响[J]. 昆明医科大学学报, 2016, 37(2):111-114.
- [17] WANG HW, LO HH, CHIU YL, et al. Dysregulated miR-361-5p/VEGF axis in the plasma and endothelial progenitor cells of patients with coronary artery disease [J/OL]. PLoS One, 2014, 9(5):e98070. DOI: 10.1371/journal.pone.0098070.

(收稿日期:2019-10-11, 修回日期:2019-11-23)