

活动期肺结核外周血 mir-144 的表达水平及意义

张立营 陈 朴 高 鹏 沈 伟

摘 要 **目的** 探讨活动期肺结核患者外周血 mir-144 表达水平及临床意义。**方法** 选择 2014 年 1 月~2015 年 1 月在笔者医院就诊的 20 例活动期肺结核患者及 20 例健康体检者作为研究对象,收集其静脉血,分别提取两组患者外周血单个核细胞中总 RNA,采用实时荧光定量 PCR 比较其外周血 mir-144 的表达水平情况,采用受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic curve,ROC)评估 mir-144 的诊断效能。同时采用 ELISA 法测定两组研究对象血浆中的 IL-6、TNF- α 、IFN- γ 的水平。进一步进行相关性分析评估外周血 mir-144 表达水平与 IL-6、TNF- α 、IFN- γ 的相关性。**结果** 活动期肺结核患者外周血中 mir-144 表达水平相比较健康对照组高,差异有统计学意义($P>0.05$)。活动期肺结核患者外周血中 IL-6、TNF- α 、IFN- γ 的水平比健康对照组要高,差异有统计学意义($P<0.05$)。ROC 下面积为 0.885,当最佳筛查阳性界值(cut-off 值)为 0.955 时,敏感度和特异性均为 85%。活动期肺结核外周血中 mir-144 的表达水平与其血浆中的 IL-6、TNF- α 、IFN- γ 的水平呈负相关,相关系数分别为 -0.905、-0.910、-0.892。**结论** 外周血单个核细胞中 mir-144 的表达水平可能作为活动期肺结核诊断的一个血清学指标,mir-144 在结核杆菌感染后免疫反应中可能与外周血 IL-6、TNF- α 、IFN- γ 的表达水平有关。

关键词 结核 外周血 Mir-144 细胞因子

中图分类号 R446

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.01.040

Expression Level and Clinical Significance of mir-144 in Peripheral Blood of Active Pulmonary Tuberculosis Patients. Zhang Liying, Chen Pu, Gao Peng, et al. Department of Clinical Laboratory, The First People's Hospital of Yibin, Sichuan 644000, China

Abstract **Objective** To evaluate the diagnostic values of microRNA-144 in peripheral blood of active pulmonary tuberculosis patients. **Methods** Twenty active pulmonary tuberculosis patients were selected between Jan 2014 and Jan 2015, and twenty healthy people, selected in parallel, served as the control group. Real-time PCR was used to detect mir-144 expression in PBMCs. Receiver operating characteristic curve (ROC) was employed to evaluate the diagnostic value of mir-144 in active pulmonary tuberculosis. Serum levels of IL-6, TNF- α and IFN- γ was detected by ELISA. Pearson correlation coefficient was used to evaluate the correlation between mir-144 expression and serum levels of IL-6, TNF- α and IFN- γ . **Results** The expression of mir-144 in active pulmonary tuberculosis patients was significantly higher than that in normal people. Serum levels of IL-6, TNF- α and IFN- γ were significantly higher in pediatric TB patients compared with normal people. The area under the curve (AUC) was 0.855. The cut-off threshold of mir-144 for active pulmonary tuberculosis diagnosis was 0.955 with a sensitivity of 85% and a specificity of 85%. Furthermore, mir-144 expression was negatively correlated with serum levels of IL-6 ($r = -0.905$), TNF- α ($r = -0.910$), and IFN- γ ($r = -0.892$). **Conclusion** mir-144 has the potential to be a diagnostic marker in active pulmonary tuberculosis patients. Moreover, the role of mir-144 in the immune response of mycobacterium tuberculosis infection may be related with serum levels of IL-6, TNF- α , IFN- γ .

Key words Tuberculosis; Peripheral blood; Mir-144; Cytokines

肺结核是由于结核分枝杆菌感染所引起的炎性疾病,据世界卫生组织最新的调查显示,全世界每年都会有数百万的新增结核杆菌感染病例,结核杆菌感染引起的死亡人数在所有感染性疾病中占第 2 位。目前,临床工作中关于活动期肺结核诊断的金标准仍然是痰涂片和痰培养出结核分枝杆菌,但是由于检查所需要的时间长且容易出现假阴性,在实际工作中多

依靠病史、查体及辅助检查的结果作出的试验性诊断。近年来,有部分研究证实 microRNAs (miRNAs) 可以作为许多疾病的一个敏感的诊断指标,其中也包括活动期肺结核。

笔者通过比较活动期肺结核患者和健康志愿者外周血 mir-144 的表达水平差异,并分析 ROC 下面积,以评价 mir-144 对活动期肺结核患者的诊断价值。进一步通过分析 mir-144 的表达水平与血浆中 IL-6、TNF- α 、IFN- γ 浓度的相关系数,为理解活动期肺结核的免疫反应机制提供帮助。

资料与方法

1. 研究对象:本实验共纳入 20 例活动期肺结核患者,其中男性 11 例,女性 9 例,患者年龄 21 ~ 46 岁,患者平均年龄 27.36 ± 7.62 岁。影像学表现空洞者 6 例,未表现为空洞者 14 例。对照组共 20 例,其中男性 10 例,女性 10 例,年龄 25 ~ 48 岁,平均年龄 25.72 ± 8.96 岁。经过分析两组研究对象的年龄、性别构成差异无统计学意义($P > 0.05$)。纳入标准:根据病史、查体、胸部正位片、痰抗酸染色及培养等检查符合活动期肺结核表现;同意参加本次研究,能够遵从研究安排,并签署知情同意书;同时选择同时期在笔者医院体检的 20 例健康志愿者作为对照组研究对象。所有研究对象均排除有心脏、肝脏及肾脏等脏器合并症,风湿、糖尿病、肿瘤、甲状腺功能亢进等免疫相关性疾病,所有研究对象均未使用糖皮质激素及免疫抑制剂。

2. 样本的收集及处理及全血 RNA 的提取:收集研究对象晨起空腹的外周静脉血 2ml,肝素抗凝,30min 内分装 200 μ l 全血于装有 Trizol 和研磨珠的冻存管内充分震荡后保存于 -80°C 冰箱中待用;按照 RNA 提取试剂盒说明书抽取总 RNA,采用紫外线分光光度计测定其浓度和纯度,电泳检测其完整性; -80°C 保存。

3. 反转录-荧光定量 PCR 检测:采用反转录试剂盒(Qiagen)将 RNA 反转录为 cDNA,反应体系为 20 μ l,其中总 RNA 1 μ l,反转录缓冲液($5 \times$) 4 μ l、反转录酶 1 μ l、RNase Free 水 14 μ l。反应条件为 37°C 1h, 95°C 5min。采用 miScript SYBR Green PCR kit(Qiagen)进行实时荧光定量 PCR,按照说明书配制反应体系,反应条件为预变性 95°C 5min;变性和延伸 95°C 10s, 60°C 20s, 72°C 20s 共 40 个循环;荧光收集 78°C 20s。以管家基因 U6 作为内参,采用相对定量法计算 mir-144 的相对表达量。mir-144 的引物为 5'-ATCCAGTCCGTGTCGTCGTG-3'。

4. 血浆中 IL-6、TNF- α 、IFN- γ 表达水平检测:收集两组研究对象空腹的静脉血 1ml,经 3000r/min 高速离心 10min,收集血清并存放在 -70°C 的冰箱中待检。应用双抗体夹心 ELISA 测定标本中 IL-6、TNF- α 、IFN- γ 的水平。

5. 统计学方法:采用 SPSS 19.0 对所得的数据进行统计学处理。计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)的形式表示,计数资料以频数表示。两样本均数比较采用 t 检验,采用受试者工作特征曲线(receiver operat-

ing characteristic curve,ROC)评估 mir-144 的诊断效能,采用皮尔森相关系数评估活动期肺结核患者外周血 mir-144 水平与 IL-6、TNF- α 、IFN- γ 浓度的相关性。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 外周血 mir-144 表达:活动期肺结核患者外周血中 mir-144 相对表达水平(1.34 ± 0.39)明显高于健康对照组(0.83 ± 0.14 , $P = 0.000$,图 1)。活动期肺结核中 6 例影像学表现为空洞,14 例未表现为空洞,前者外周血 mir-144 相对表达水平(1.69 ± 0.28)高于后者(1.19 ± 0.34 , $P < 0.05$,图 2)。

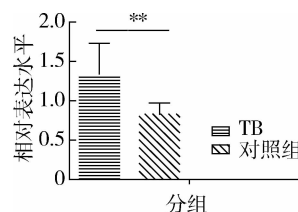


图 1 活动期肺结核患者及健康对照组外周血 mir-144 的相对表达水平比较

** $P < 0.01$

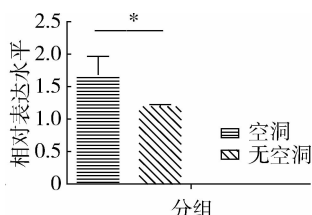


图 2 活动期肺结核患者中影像学有空洞者与无空洞者外周血 mir-144 相对表达水平比较

* $P < 0.05$

2. 外周血 mir-144 对活动期肺结核的诊断价值:通过分析活动期肺结核患者及健康对照组外周血 mir-144 水平 ROC 后发现曲线下面积为 0.885 (95% 可信区间为 0.775 ~ 0.995, $P = 0.000$),当最佳筛查阳性界值(cut-off 值)为 0.955 时,敏感度和特异性均为 85% (图 3)。

3. 活动期肺结核患者及健康对照组外周血 IL-6、TNF- α 、IFN- γ 的表达:活动期肺结核患者外周血 IL-6 表达水平(32.46 ± 12.76 pg/ml)明显高于正常对照组(2.37 ± 1.01 pg/ml),差异有统计学意义($P < 0.05$)。活动期肺结核患者外周血 TNF- α 表达水平(31.28 ± 11.90 pg/ml)高于正常对照组(4.27 ± 0.96 pg/ml),差异有统计学意义($P < 0.05$)。活动期肺结核患者外周血 IFN- γ 表达水平

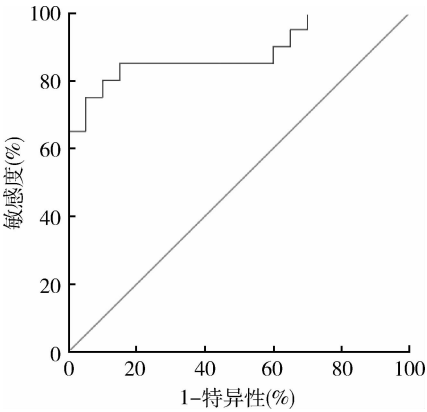


图 3 外周血 mir-144 对活动期肺结核的诊断价值的 ROC

(122.68 ± 34.02pg/ml) 高于正常对照组 (87.90 ± 24.13pg/ml) ($P < 0.05$, 图 4)。

4. 活动期肺结核患者外周血 mir-144 表达水平与外周血 IL-6、TNF- α 、IFN- γ 的相关性：通过计

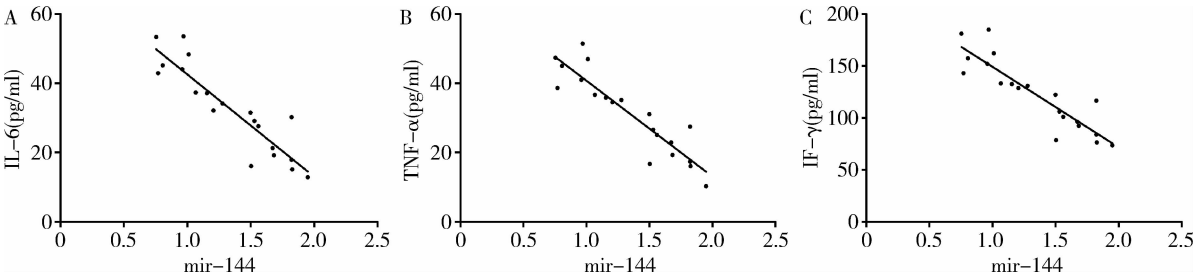


图 5 活动期肺结核患者外周血 mir-144 相对表达水平与 IL-6(A)、TNF- α (B)、IFN- γ (C) 浓度呈负相关

讨 论

miRNAs 是一类由 21 ~ 25 个核苷酸构成的非编码小 RNA,其存在于哺乳动物的细胞内,是在转录后水平影响基因表达的重要调节因子。尽管其仅占人类基因总数的 2%,但却调节控制着人类基因组中 30% 以上基因的表达^[1]。研究发现 miRNAs 在早期的胚胎发育、细胞分化、发育、凋亡、细胞死亡等发生、发展中均起到重要作用^[2]。最新研究表明,血中 miRNAs 可以作为胃癌、结肠癌以及其他疾病早期诊断的生物学标志物^[3,4]。王铮等^[5]通过构建 mir-144 的真核表达质粒证实 mir-144 能影响人肝癌细胞株 HepG₂ 的生物学行为,抑制肝癌细胞增殖。杨锐^[6]研究发现 mir-144 可以抑制裸鼠胆管癌移植瘤的生长和转移。目前关于 mir-144 的研究多集中在肿瘤以及血液系统疾病等方面,关于其在炎性疾病,特别是结核病的研究较少,只有为数不多的研究测定了活动期肺结核患者外周血中 mir-144 的变化情

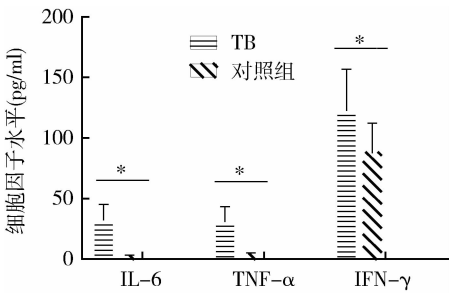


图 4 活动期肺结核患者及健康对照组外周血 IL-6、TNF- α 、IFN- γ 的浓度比较
* $P < 0.05$

算皮尔森相关系数 r ,笔者发现 mir-144 的相对表达水平与 IL-6、TNF- α 、IFN- γ 的浓度呈负相关,相关性较好 (IL-6: $r = -0.905$, $P = 0.000$; TNF- α : $r = -0.910$, $P = 0.000$; IFN- γ : $r = -0.892$, $P = 0.000$,图 5)。

况,但由于样本量以及测量方法的不同,结果也不尽相同。

本研究比较了活动期肺结核患者和健康志愿者外周血 mir-144 的表达水平后发现,活动期肺结核患者 mir-144 的水平明显高于健康对照组,差异有统计学意义,这与 Spinelli 等^[7]及 Liu 等^[2]研究基本一致。基于此,笔者进一步分析了 mir-144 对活动期肺结核的诊断价值,通过分析计算 ROC 后发现 mir-14 的表达水平 >0.995 时,其诊断活动期肺结核具有很好的敏感度和特异性。在本研究中活动期肺结核患者中影像学表现有空洞 6 例,未表现为空洞 14 例,通过比较两者的外周血平均 mir-144 表达水平,笔者发现影像学有空洞患者高于影像学没有空洞患者,提示 mir-144 还可能作为评估患者病情严重性的生物学指标。

结核杆菌感染机体后,机体相应的会产生相应的免疫反应,合成和分泌一些细胞因子等物质,其中包

括 IL-6、TNF- α 、IFN- γ , 这些物质在疾病的发生和疾病发展中具有十分重要的作用。IL-6、TNF- α 、IFN- γ 是机体产生的促炎性因子, 与活动期肺结核的关系也较为密切。有研究证实结核感染后激活了机体的免疫防御机制, 使得上述细胞因子的表达增加, 以清除结核分枝杆菌病原体^[8]。本研究同时测定了活动期肺结核患者及健康志愿者血浆中的 IL-6、TNF- α 、IFN- γ 的浓度, 通过比较后发现活动期肺结核患者血浆中上述细胞因子的浓度均高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 这与以往的研究结果相似, 提示结核分枝杆菌病原体能够刺激机体上调上述细胞因子的表达水平。

通过查阅文献后发现在结核分枝杆菌感染后机体 miRNAs 的表达水平会发生改变。关于外周血 mir-144 表达水平与血浆中的 IL-6、TNF- α 、IFN- γ 的浓度相关性的研究较少。本研究进一步分析验证了活动期肺结核患者外周血 mir-144 的表达水平与血浆中的 IL-6、TNF- α 、IFN- γ 浓度相关性, 通过计算上述指标之间的 Pearson 相关系数 r , 笔者发现, 外周血 mir-144 的表达水平与 IL-6、TNF- α 、IFN- γ 的浓度呈负相关, 且相关性很好。mir-144 表达水平越高, 相应的 IL-6、TNF- α 、IFN- γ 则较低, 这一研究结果与 Liu 等^[2] 的研究结果相符合, 进一步说明 mir-144 在结核分枝杆菌的发生和发展中起到负性的调节作用。

综上所述, 活动期肺结核患者外周血中 mir-144 的表达水平明显上调。外周血 mir-144 的表达水平可能作为活动性肺结核诊断和病情严重性评估的潜

在生物学指标。此外, mir-144 表达水平与血清中 IL-6、TNF- α 、IFN- γ 等细胞因子呈负相关, 提示 mir-144 在机体结核杆菌感染后免疫反应中发挥着一定的作用。

参考文献

- Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets[J]. Cell, 2005, 120 (1): 15-20
- Liu Y, Wang X, 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
- Hur K, Toiyama Y, Takahashi M, et al. MicroRNA-200c modulates epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in human colorectal cancer metastasis[J]. Gut, 2013, 62 (9): 1315-1326
- Song J, Bai Z, Han W, et al. Identification of suitable reference genes for qPCR analysis of serum microRNA in gastric cancer patients[J]. Digest Dis Sci, 2012, 57 (4): 897-904
- 王铮, 张明鑫, 张灵敏, 等. miR-144 表达质粒的构建及其对肝癌细胞生物学行为的影响[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2011, 10: 17-22+27
- 杨锐. microRNA-144 在胆管癌中的表达及功能机制研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2014
- Spinelli SV, Diaz A, D'Attilio L, et al. Altered microRNA expression levels in mononuclear cells of patients with pulmonary and pleural tuberculosis and their relation with components of the immune response[J]. Mol Immunol, 2013, 53 (3): 265-269
- 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

(收稿日期: 2016-02-06)

(修回日期: 2016-03-21)

慢性阻塞性肺疾病急性加重患者血清 sTREM-1 水平及其临床诊断价值研究

陈玺卿 杨玉波 庄志雄 付言杰 吕丽辉

摘要 **目的** 探讨慢性阻塞性肺疾病急性加重 (acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease, AECOPD) 患者的血清可溶性髓细胞触发受体-1 (soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1, sTREM-1) 水平及其诊断 AECOPD 的临床价值。**方法** 纳入 2012 年 2 月~2015 年 10 月就诊的 AECOPD 患者 70 例, 同时纳入稳定 COPD 患者 44 例 (稳定 COPD 组) 及健康人 33 例 (健康对照组) 作为对照。首次就诊时记录患者一般情况并检测呼吸功能, 同时检测外周血 sTREM-1 水平、C 反应

作者单位: 315040 宁波, 中国人民解放军第 113 医院呼吸与重症医学科

通讯作者: 吕丽辉, 电子信箱: lvlihui1979@sina.com