

## · 临床论著 ·

## 结核病患者外周血单核细胞miR-146a表达

吴晓光 张立群 高孟秋 马丽萍 陈红梅 宋艳华 刘荣梅 黄麦玲 李雪莲 谢莉

**【摘要】目的** 研究miR-146a在结核病患者外周血单个核细胞中的表达水平和临床意义。**方法** 采用Trizol一步法从结核病患者、结核病潜伏感染者和健康对照外周血单个核细胞提取总RNA, 荧光定量PCR测定miR-146a的表达。同时使用荧光定量PCR测定样本中肿瘤坏死因子受体相关因子6、白细胞介素受体相关激酶1和肿瘤坏死因子的表达。**结果** 肺结核患者外周血单核细胞miR-146a表达较结核潜伏感染和健康对照者显著下降, 而潜伏感染者miR-146a表达水平 ( $4.49 \pm 0.61$ ) 与对照组 ( $4.57 \pm 0.25$ ) 没有差异。同时, miR-146a下游靶基因TRAF6、IRAK-1以及TNF- $\alpha$ 表达在活动性肺结核患者中较结核潜伏感染和健康对照者增加。**结论** 与健康对照和潜伏感染者相比, miR-146a在结核病患者外周血单个核细胞中表达显著下降, 推测miR-146a有可能成为鉴别活动性结核和结核潜伏感染新的标记物。

**【关键词】** 结核病; 结核潜伏感染; miR-146a

### Expression of miR-146a in peripheral blood mononuclear cells from patients with tuberculosis

Wu Xiaoguang, Zhang Liqun, Gao Mengqiu, Ma Liping, Chen Hongmei, Song Yanhua, Liu Rongmei, Huang Mailing, Li Xuelian, Xie Li. Tuberculosis Second Ward, Beijing Chest Hospital, Capital Medical University, Beijing 101149, China

Corresponding author: Zhang Liqun, Email: liqunzhang2005@aliyun.com

**【Abstract】Objective** To study the expression of miR-146a in tuberculosis (TB) patients and latent tuberculosis infection (LTBI). **Methods** Total RNA was isolated from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) obtained from patients with TB, and healthy and LTBI individuals, and the expression of miR-146a was analyzed by quantitative real-time PCR. In addition, two targets of miR-146a, namely tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) and IL-1 receptor-associated kinase 1 (IRAK-1) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) were also analyzed by quantitative real-time PCR. **Results** PBMCs of patients with TB exhibited significantly decreased in miR-146a expression, whereas miR-146a expression was not significantly different compared with healthy control individuals ( $4.57 \pm 0.25$ ) and LTBI ( $4.49 \pm 0.61$ ). TRAF6, IRAK-1 and TNF- $\alpha$  were increased expression between patients with TB and LTBI and control individuals, implicating that miR-146a plays a key role in the active tuberculosis. **Conclusions** Compare with health control and LTBI, the miR-146a expression level was down-regulated in TB patients. This indicated that miR-146a may be a potentially useful as a biomarker for diagnosis of TB and LTBI.

**【Key words】** Tuberculosis; Latent tuberculosis infection (LTBI); miR-146a

结核分枝杆菌是一种严重的致病菌, 全球1/3人口感染该菌<sup>[1]</sup>, 每年约有140万人死于结核病<sup>[2]</sup>。目前, 结核分枝杆菌的检测方法包括涂片镜检、培养和分子生物学技术等, 但由于诊断敏感性和特异性等因素尚不能满足临床需要。痰萋尼染色法可以在几分钟内完成, 但其敏感性低(阳性检出率30%~35%)。而目前结核病诊断的金标准是细菌培

养法, 但是需要4~8周的时间才能获得结果, 虽然新的自动液体培养方法, 如BACTEC MGIT 960 (Becton Dickinson) 可以使检测时间缩短到9~16 d, 但仍不能满足结核病快速诊断的需要。同时, 由于需要使用昂贵的设备和操作技术复杂, 该技术并不适合在欠发达地区使用, 而这些地方往往是结核病高发地区, 因此, 需要寻找一种新型分子靶点来诊断及治疗结核病。

MicroRNAs (miRNAs) 是近来发现的一种小RNA, 通过转录后基因表达调控参与多生理及病理反应, 成熟的mRNA特异结合目标miRNA的3'-UTR区, 进而引发目标mRNA降解或抑制翻译过程<sup>[3]</sup>。

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2015.04.014

基金资助: “十二五”重大专项子课题(No. 2013ZX10003003); 首都医科大学基础临床合作研究项目(No. 2014-1-156)

作者单位: 101149 北京, 首都医科大学附属北京胸科医院结核二科

通讯作者: 张立群, Email: liqunzhang2005@aliyun.com

最近研究发现miRNA在免疫系统成熟中发挥重要作用,其参与免疫细胞的发育和分化,产生抗体,调节先天免疫。研究表明,miRNA与多种疾病(如癌症、炎症和自身免疫性疾病)的发生和发展密切相关<sup>[4-5]</sup>,且已尝试应用于疾病的诊断及靶向治疗<sup>[6-7]</sup>。

前期研究中,本课题组利用高通量miRNA微阵列技术研究结核患者和结核潜伏感染者中miRNA的表达,结果获得了28个差异表达的两组miRNA,9个表达上调miRNAs和19个表达下调miRNAs,其中miRNA 146a在活动性结核病患者中表达下调,而miRNA 146a已被证实在内源性细胞免疫中发挥重要的作用<sup>[8]</sup>。但目前,miRNA 146a在结核病患者和潜伏感染者中的表达水平及其临床意义仍不清楚。为此,本研究测定了结核病患者、结核潜伏感染和健康志愿者外周血单核细胞中的miRNA 146a表达水平,同时观察了miRNA 146a的已知靶基因:肿瘤坏死因子受体相关因子6 (namely tumor necrosis factor receptor-associated factor 6, TRAF6)、白细胞介素受体相关激酶1 (IL-1 receptor-associated kinase 1, IRAK-1)和肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )的表达。

## 资料与方法

### 一、临床标本

选择初治痰菌阳性肺结核患者20例,年龄18~60岁,排除其他基础疾病包括肿瘤、自身免疫性疾病和糖尿病等。本研究经首都医科大学附属北京胸科医院伦理委员会批准,所有纳入研究者均签署知情同意书。于治疗前,治疗3个月及疗程结束分别抽取患者外周EDTA抗凝静脉血5 ml;结核潜伏感染者及健康对照者各20例,分别抽取患者外周静脉血5 ml。结核潜伏感染者为结核病专科医院的医护人员,血TB-SPOT阳性,但胸部CT未见病灶,亦无自觉症状者。健康对照者为某大学新生,PPD阴

性,胸片无异常。同样抽取LTBI及健康对照者外周抗凝血4 ml,用SYBR Green Real-time PCR方法检测miR-146a及下游靶基因IRAK1和TRAF6及TNF- $\alpha$  mRNA的表达水平。

### 二、实时荧光定量PCR检测

1. 总RNA提取根据Trizol reagent (Invitrogen公司)的操作步骤提取总RNA,应用毛细管电泳(Agilent 2100 Bioanalyzer,安捷伦科技公司)检测其完整性,紫外分光光度计测定其浓度及纯度。

2. 逆转录反应:提取的总RNA中一部分按试剂盒(SuperScript II reverse transcriptase, Invitrogen公司)说明,采用Oligo(dT)逆转录合成cDNA。另一部分做miRNA特异性引物逆转录,加样体系为dNTP 0.03  $\mu$ l, MMLV 0.2  $\mu$ l, 10  $\times$  Buffer 0.3  $\mu$ l, RNase抑制剂0.02  $\mu$ l, 去离子水(不含RNA酶)0.45  $\mu$ l, 引物1  $\mu$ l和RNA 1  $\mu$ l, ABI 9700型PCR仪上37  $^{\circ}$ C保温60 min,使逆转录反应完全后,95  $^{\circ}$ C、5 min终止反应。加入80  $\mu$ l无RNase水稀释至100  $\mu$ l储存在-20  $^{\circ}$ C冰箱,用于后续实验。

3. 实时荧光定量PCR检测:miRNA逆转录引物和Real-time PCR反应探针直接购买获得(Human Panel-Early Access Kit, Applied Biosystems公司)。IRAK1和TRAF6及GAPDH基因引物如下: IRAK1: 3'-CATGATTGTATGACTGCACTC, 5'-TCTTGCTAGGACTGAACCA; TRAF6: 3'-GCACATCTTCCACCACTC, 5'-CAGCAATTCAGTTGTATTGACC; TNF- $\alpha$ : 3'-AGCGCTGAGATCAATCG, 5'-GGAAGGTTGGATGTTTCGT; GAPDH: 3'-TGTTGCCATCAATGACCCCTT, 5'-CTCCACGACGTACTCAGCG。

miRNA Taqman荧光定量PCR反应体系: Taqman 2  $\times$  PCR Master Mix 2  $\mu$ l, 探针1  $\mu$ l, 模板1  $\mu$ l, 总反应体系4  $\mu$ l。循环温度设置: 50  $^{\circ}$ C、2 min, 95  $^{\circ}$ C、10 min, 95  $^{\circ}$ C、15 s, 60  $^{\circ}$ C、1 min, 共40个循环。

表1 miRNA146a在肺结核患者、LTBI及健康对照组外周血PBMC中的表达

组别	例数	miRNA146a 表达量	F	P
TB组	20	5.84 $\pm$ 1.03	7.861 <sup>a</sup>	0.008 <sup>a</sup>
LTBI组	20	4.49 $\pm$ 0.61	15.524 <sup>b</sup>	0.001 <sup>b</sup>
对照组	10	4.57 $\pm$ 0.25	4.048 <sup>c</sup>	0.054 <sup>c</sup>

注: <sup>a</sup>TB组与LTBI组比较; <sup>b</sup>TB组与NC组比较; <sup>c</sup>LTBI组与NC组比较

表2 IRAK1在肺结核患者、LTBI及健康对照组外周血PBMC中的表达

组别	例数	IRAK1 表达量	F	P
TB	20	6.34 $\pm$ 0.76	4.035 <sup>a</sup>	0.042 <sup>a</sup>
LTBI	20	4.61 $\pm$ 0.78	5.453 <sup>b</sup>	0.040 <sup>b</sup>
对照组	10	4.90 $\pm$ 0.61	0.771 <sup>c</sup>	0.687 <sup>c</sup>

注: <sup>a</sup>TB组与LTBI组比较; <sup>b</sup>TB组与NC组比较; <sup>c</sup>LTBI组与NC组比较

SYBR Green荧光定量PCR反应体系: Super Real Pre Mix (SYBR Green) 2 × 2.5 μl, ROX Reference Dye 0.1 μl, 上下游引物各0.1 μl, 去离子水1.2 μl, 模板cDNA 1 μl, 总反应体系5 μl。循环温度设置: 95 °C、15 s, 95 °C、5 s, 60 °C、30 s, 共40个循环。加样时每个样本做两复孔, 每块板上均设置有板间对照。在7900测序仪 (Applied Biosystems公司) 上进行实时荧光定量PCR操作。

4. 表达量的计算: 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法 $\Delta Ct = Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{内参基因}}$  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{实验组样品}} - \Delta Ct_{\text{对照组样品}}$ 相对表达量 =  $2^{-\Delta\Delta Ct}$

### 三、统计学处理

应用SPSS 17.0软件进行组间比较, 结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组独立样本数据比较应用非参数Mann-Whitney检验。方差不齐者采用Student-Newman-Keuls检验,  $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 结 果

### 一、肺结核患者、LTBI及正常对照组miR146a表达水平的比较

肺结核患者中miR146a表达水平显著低于LTBI和健康对照组 ( $P$ 分别为0.008和0.001), 而后两组间差异无统计学意义 ( $P = 0.054$ ), 见表1。

### 二、肺结核患者与潜伏感染者及健康对照组miR146a靶基因表达水平比较

本研究发现, 在肺结核患者和潜伏感染者及健康对照组外周血单核细胞中miR146a的两个靶基因表达水平存在差异, 肺结核患者组中IRAK1 mRNA表达水平高于LTBI组和健康对照组 ( $P = 0.042$ 、0.040), 肺结核患者组中TRAF6 mRNA表达水平高于LTBI组和健康对照组 ( $P = 0.024$ 、0.018), 而LTBI及健康对照组间两个靶基因的表达差异无统

计学意义 ( $P = 0.687$ 、0.624), 见表2~3。

### 三、肺结核患者与潜伏感染者TNF- $\alpha$ 表达水平的比较

本研究结果提示, 肺结核患者和潜伏感染者外周血单核细胞中TNF- $\alpha$ 表达水平存在差异, 肺结核患者组中TNF- $\alpha$  mRNA表达水平高于LTBI组和及健康对照组 ( $P = 0.02$ 、0.015), 而LTBI及健康对照组间两个靶基因的表达差异无统计学意义 ( $P = 0.63$ ), 见表4。

## 讨 论

miRNAs不仅是细胞内基因调节网络的关键分子, 而且也是各种病理状态下的生物标记物<sup>[9]</sup>, 近年研究显示, 血清中的miRNAs可作为肺癌、结肠癌和前列腺癌的生物标记物<sup>[10-11]</sup>; 同时有研究表明, 血清miRNAs也是药物性肝损伤, 心肌损伤的潜在生物标记物<sup>[12-13]</sup>, 除此之外, 对miRNAs在疾病发生过程中的病理生理作用的研究显示, 血清或外周血单核细胞中miRNAs检测为疾病的诊断、疗效监测和个体化治疗提供了便捷的无创性检测手段<sup>[14]</sup>。研究报道PBMCs中 miR-146a的表达与风湿活动相关<sup>[15]</sup>。这些研究结果提示miR-146a有可能成为疾病诊断的潜在生物标记物。

Qing等<sup>[16]</sup>在对LTBI产生机理的研究中发现miRNA的差异表达在热休克蛋白作用的结核分枝杆菌滞留于巨噬细胞内的过程中起到很重要的作用。在早期研究中<sup>[8]</sup>, 本课题组应用高通量miRNA芯片对肺结核和LTBI者PBMC中miRNAs的差异表达进行研究, 研究结果显示, 调节内源性免疫应答的miR-146a在肺结核患者较LTBI者表达降低。因此, 进一步探讨miR-146a能否作为区别结核活动和LTBI的生物标记物。

表3 TRAF6在肺结核患者、LTBI及健康对照组外周血PBMC中的表达

组别	例数	TRAF6 表达量	F	P
TB	20	6.17 ± 0.92	5.533 <sup>a</sup>	0.024 <sup>a</sup>
LTBI	20	3.97 ± 0.62	6.368 <sup>b</sup>	0.018 <sup>b</sup>
对照组	10	5.14 ± 0.47	0.246 <sup>c</sup>	0.624 <sup>c</sup>

注: <sup>a</sup>TB组与LTBI组比较; <sup>b</sup>TB组与NC组比较; <sup>c</sup>LTBI组与NC组比较

表4 TNF- $\alpha$ 在肺结核患者、LTBI及健康对照组外周血PBMC中的表达

组别	例数	TNF- $\alpha$ 表达量	F	P
TB	20	4.79 ± 0.56	1.404 <sup>a</sup>	0.020 <sup>a</sup>
LTBI	20	2.68 ± 0.83	6.719 <sup>b</sup>	0.015 <sup>b</sup>
对照组	10	3.71 ± 0.25	6.067 <sup>c</sup>	0.630 <sup>c</sup>

注: <sup>a</sup>TB组与LTBI组比较; <sup>b</sup>TB组与NC组比较; <sup>c</sup>LTBI组与NC组比较



Liu等<sup>[17]</sup>研究发现miR-146a高表达能增强THP-1细胞对于细胞内结核分枝杆菌的杀菌能力,而miR-146a表达与临床痰标本中MTB的阴转呈负相关。本研究发现,miR-146a在肺结核患者中比结核潜伏感染者中表达显著降低。因此,推测当人体感染了低剂量结核分枝杆菌时会诱导miR-146a高表达,这将增强巨噬细胞对细胞内结核分枝杆菌的杀菌能力,从而限制结核分枝杆菌的生长而致潜伏感染。相反,当人体感染了高剂量结核分枝杆菌后,如严重的结核病患者,将使miR-146a表达显著下降,抑制了巨噬细胞的杀菌能力,使感染进展。因此,本研究结果支持miR-146a可能成为诊断活动性结核和结核潜伏感染的生物标记物。同时,提示抗结核药物联合miR-146a有望成为一种新的潜在的结核病化疗方法,但仍需进一步研究证实。

IL-1受体相关激酶1 (IRAK1) 和TNF受体相关因子6 (TRAF6) 是Toll样受体和IL-1受体信号通路上关键的两个分子。研究证明,miR-146a能抑制IRAK1和TRAF6的表达,抑制NF- $\kappa$ B活性及抑制NF- $\kappa$ B靶基因IL-6、IL-8、IL-1b和TNF- $\alpha$ 的表达<sup>[18]</sup>;除此之外,miR-146a也能抑制人肺上皮细胞,支气管上皮细胞中前炎性细胞因子IL-8的表达<sup>[19]</sup>。因此,miR-146a通过负反馈途径调节炎症应答。本研究也发现,在活动性结核患者中miR-146a表达降低导致IRAK1、TRAF6和TNF- $\alpha$ 表达上调,与痰菌阴转和临床症状严重程度呈负相关关系。

总之,本研究结果显示,肺结核患者外周血单核细胞中miR-146a表达降低而其靶基因 (TRAF6和IRAK-1) 表达增高,提示miR-146a有可能成为潜在的诊断结核活动和潜伏感染的生物标记物。但需要大样本量的病例对照研究加以证实。

### 参 考 文 献

- World Health Organization. Global tuberculosis control: epidemiology, strategy and financing[S]. Geneva, Switzerland: WHO Press. 2009:411-412.
- World Health Organization. Global tuberculosis report 2012[S].
- Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell,2004,116(2):281-297.
- Jeker LT, Bluestone JA. MicroRNA regulation of T-cell differentiation and function[J]. Immunol Rev,2013,253(1):65-81.
- Cohen A, Combes V, Grau GE. MicroRNAs and Malaria--a dynamic interaction still incompletely understood[J]. J Neuroinfect Dis,2015,6(1):165-177.
- Castro NP, Fedorova-Abrams ND, Merchant AS. Cripto-1 as a novel therapeutic target for triple negative breast cancer[J]. Oncotarget,2015,6(14):11910-11929.
- Jeker LT, Marone R. Targeting microRNAs for immunomodulation[J]. Curr Opin Pharmacol,2015,25(23):25-31.
- 张立群, 孙照刚, 高孟秋, 等. 肺结核患者外周血单核细胞中差异表达miRNA的筛选[J]. 中国防痨杂志,2011,33(11):729-733.
- Van den Hoogen P, Van den Akker F, Deddens JC, et al. Heart failure in chronic myocarditis: a role for microRNAs?[J]. Curr Genomics,2015,16(2):88-94.
- Li J, Mansmann UR. A microRNA molecular modeling extension for prediction of colorectal cancer treatment[J]. BMC Cancer,2015,18(15):472-484.
- Kaladhar BR. MicroRNA (miRNA) in cancer[J]. Cancer Cell Inter,2015,15(1):38-42.
- Roy S, Benz F, Luedde T, et al. The role of miRNAs in the regulation of inflammatory processes during hepatofibrogenesis[J]. Hepatobiliary Surg Nutr,2015,4(1):24-33.
- Li C, Pei F, Zhu X, et al. Circulating microRNAs as novel and sensitive biomarkers of acute myocardial infarction[J]. Clin Biochem,2012,45(10):727-732.
- Jin XF, Wu N, Wang L, et al. Circulating microRNAs: a novel class of potential biomarkers for diagnosing and prognosing central nervous system diseases[J]. Cell Mol Neurobiol,2013,33(5):601-613.
- Salehi E, Eftekhari R, Oraei M, et al. MicroRNAs in rheumatoid arthritis[J]. Clin Rheumatol,2015,34(4):615-628.
- Qing LM, Fei Liu, Xing YY. Identification of latent tuberculosis infection related microRNAs in human U937 macrophages expressing Mycobacterium tuberculosis Hsp16.3[J]. BMC Microbiology,2014,14(21):37-45.
- Liu Z, Guo YZ, Deng XD, et al. Analysis of miRNA expression profiling in human macrophages responding to Mycobacterium infection: Induction of the immune regulator miR-146a[J]. J Infection,2014,68(6):553-561.
- Cheng HS, Sivachandran N, Lau A, et al. MicroRNA-146 represses endothelial activation by inhibiting pro-inflammatory pathways[J]. EMBO Mol Med,2013,5(7):949-966.
- Lederhuber H, Baer K, Altiok I, et al. MicroRNA-146: tiny player in neonatal innate immunity?[J]. Neonatology,2011,99(1):51-56.

(收稿日期: 2015-06-27)

(本文编辑: 孙荣华)

吴晓光, 张立群, 高孟秋, 等. 结核病患者外周血单核细胞miR-146a表达[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2015, 9(4): 494-497.