

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.14.010

## miR-101、miR-223 和 miR-424 在肺结核诊断中的价值\*

颜保松<sup>1</sup>,王静<sup>2</sup>,罗杰<sup>1</sup>,陈鸣<sup>1</sup>,邓少丽<sup>1△</sup>

(1. 第三军医大学大坪医院野战外科研究所检验科,重庆 400042;

2. 重庆市公共卫生医疗救治中心检验科 400036)

**[摘要]** 目的 探寻对肺结核有潜在诊断价值的 miRNA 标记物。方法 以健康组、肺炎组和肺癌组作为对照组,以肺结核患者作为肺结核组,采用 qRT-PCR 技术检测并分析 8 种 miRNA(miR-21、miR-29a、miR-101、miR-378、miR-146a、miR-223、miR-361-5p 和 miR-424)在 44 例肺结核组和 98 例对照组外周血单个核细胞中的表达差异。选取合适的 miRNA 采用 Logistic 回归进行筛选并建立回归方程,通过 ROC 曲线评价该方程的诊断效能。结果 Logistic 回归筛选出 3 种对肺结核诊断有意义的 miRNA 分子即 miR-101、miR-223 和 miR-424,ROC 曲线分析显示这 3 种 miRNA 的组合对肺结核具有良好的诊断效能:AUC=0.939,诊断特异性为 81.63%,灵敏性为 90.91%。结论 miR-101、miR-223 和 miR-424 可作为肺结核潜在的有诊断价值的标记物。

**[关键词]** 微 RNAs;结核,肺;诊断;标记物**[中图分类号]** R521**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)14-1902-04**The diagnostic value of miR-101, miR-223 and miR-424 as potential biomarkers on pulmonary tuberculosis\***Yan Baosong<sup>1</sup>, Wang Jing<sup>2</sup>, Luo Jie<sup>1</sup>, Chen Ming<sup>1</sup>, Deng Shaoli<sup>1△</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory, Daping Hospital, Research Institute of Field Surgery, the Third

Military Medical University, Chongqing 400042, China; 2. Department of Clinical

Laboratory, Public Health Treatment Center, Chongqing 400036, China)

**[Abstract]** **Objective** To explore potential miRNA biomarkers for diagnosis of pulmonary tuberculosis. **Methods** Healthy group, pneumonia group and lung cancer group were selected as control group, and the patients with pulmonary tuberculosis were acted as experimental group. The expression levels of 8 miRNAs (miR-21, miR-29a, miR-101, miR-378, miR-146a, miR-223, miR-361-5p and miR-424) in 44 cases of experimental group and 98 cases of control group were detected by qRT-PCR, and their differences were compared between each group. Logistic regression was applied to select diagnostic miRNA markers and set up the regression equation; ROC curve was used to evaluate the diagnostic accuracy of the equation. **Results** We identified a panel of miR-101, miR-223 and miR-424 that yielded high diagnostic accuracy. The AUC for the miRNA panel was 0.939 with 90.91% sensitivity and 81.63% specificity. **Conclusion** miR-101, miR-223 and miR-424 might be used as potential biomarkers for diagnosis of pulmonary tuberculosis.

**[Key words]** MicroRNAs; tuberculosis, pulmonary; diagnosis; biomarker

结核病是一个重大的全球性公共卫生问题,严重威胁着人类健康。肺结核是结核病中最常见的临床类型,相比肺外结核,其能够经飞沫播散的特性注定了其在结核病防控工作中的重要地位。然而肺结核因临床表现多样,影像学表现缺乏足够的特异性,实验室也缺乏理想的生物学指标,致使其诊断至今仍然困扰着临床医务工作者。MicroRNA(miRNA)是一类长度约 22 nt 的非编码单链 RNA,通过抑制或降解特异性 mRNA 分子介导基因转录后调控,参与到细胞的多种生物学进程,与许多疾病的发生、发展密切相关<sup>[1]</sup>。近年来 miRNA 表达及功能的相关研究表明结核病患者体内一些 miRNA 的表达水平发生了改变<sup>[2]</sup>,基因组学的研究结果也间接证实了上述结论<sup>[3-4]</sup>,提示这些异常表达的 miRNA 有可能作为诊断肺结核潜在的生物标记物。本研究选取多种已报道的表达有差异的 miRNA 通过 qRT-PCR 技术进行检测验证,采用 Logistic 回归并结合 ROC 曲线进行分析,旨在筛选出对肺结核有诊断价值的 miRNA 分子。

**1 资料与方法**

**1.1 一般资料** 肺结核组 44 例,选自 2015 年 9~11 月就诊于重庆市公共卫生医疗救治中心的住院患者;对照组 98 例,为同期就诊于第三军医大学大坪医院野战外科研究所的住院患者(肺炎组、肺癌组)和健康体检者(健康组)。患者纳入标准:(1)年龄 18~75 岁;(2)无人免疫缺陷病毒(HIV)感染及其他自身免疫性疾病,近期末接受过糖皮质激素类药物或免疫抑制剂类药物的治疗;(3)无心、肝及肾等脏器的功能障碍;(4)健康组为无任何临床症状且常规体检未发现异常者,肺结核组、肺炎组及肺癌组均由 3 位经验丰富的医生根据临床表现、影像学资料、微生物学结果及病理结果等作出诊断;(5)活动性肺结核组及肺炎组未经针对性治疗或治疗时间小于 3 d,且无肿瘤及其他感染性疾病;肺癌组未经手术切除或化疗时间小于 3 d,且无其他肿瘤及感染性疾病。采集的临床资料包括:所有研究对象的年龄、性别、抗酸染色结果、健康组结核 T 细胞斑点实验(T-SPOT.TB)结果,肺癌组研究对象的肺癌病理类型,以及肺炎

\* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81371760);国家传染病重大专项(2013ZX10003006-003-002)。 作者简介:颜保松(1980-),主管技师,在读硕士,主要从事结核病研究。 △ 通讯作者,E-mail:dengshali@tmmu.edu。

表 1 研究对象临床资料

项目	对照组			肺结核组
	健康组	肺炎组	肺癌组	
例数(n)	36	32	30	44
年龄(±s,岁)	39.7±18.2	42.7±20.7	46.7±21.4	37.7±18.5
性别(男/女)	20/16	15/17	16/14	24/20
抗酸染色(+/-)	0/36	0/32	0/30	38/6
T-SPOT. TB(+/-)	11/25	—	—	—
肺癌病理类型(鳞癌/腺癌/其他)	—	—	14/12/4	—
肺炎感染类型(细菌/真菌/其他)	—	28/2/2	—	—

—:无数据。

组研究对象的感染类型等。本研究经第三军医大学大坪医院野战外科研究所及重庆市公共卫生医疗救治中心伦理委员会批准,所有研究对象均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 候选 miRNA 的确定 文献[5-12]报道了多种在肺结核患者血清(血浆)或外周血单个核细胞(PBMCs)或淋巴细胞中存在差异表达的 miRNA 分子,为扩大筛选范围,本研究忽略标本类型及对照组的因素。在经 qRT-PCR 技术验证过的存在差异的 miRNA 分子中进行选择,优先选择经 ROC 评价证实诊断效能优良者,最终选定了 8 种 miRNA。8 种候选 miRNA 为: miR-21<sup>[5]</sup>、miR-29a<sup>[6]</sup>、miR-101<sup>[7]</sup>、miR-378<sup>[7]</sup>、miR-146a<sup>[8]</sup>、miR-223<sup>[9-10]</sup>、miR-361-5p<sup>[11]</sup>、miR-424<sup>[8,10]</sup>。根据上述文献报道,与健康组比较,肺结核患者低表达 miR-101、miR-146a,高表达 miR-29a、miR-361-5p、miR-378、miR-424;与肺炎组(或肺癌组)比较,肺结核患者 miR-21、miR-101 和 miR-223 表达水平较低。

1.2.2 PBMCs 的分离 抽取研究对象外周静脉血 2 mL,乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝,采用人淋巴细胞分离液(天津美德太平洋科技有限公司)以密度梯度离心法分离 PBMCs。具体操作如下:(1)用 2 mL 无菌磷酸盐缓冲液(PBS)等倍稀释抗凝全血,缓慢加入到 2 mL 人淋巴细胞分离液的表面;(2)1 000 g 常温下离心 22 min,用无菌塑料吸管小心吸取中间白细胞层;(3)用注射用生理盐水洗涤细胞 2 次(800 g 离心 10 min);(4)将上述分离的 PBMCs 加入 1 mL TRIzol(Invitrogen 公司)重悬混匀,充分裂解后置-80 °C 冻存备用。

1.2.3 总 RNA 的提取及 miRNA 的 qRT-PCR 检测 使用 TRIzol 试剂严格按照说明书操作进行总 RNA(含 miRNA)的提取,采用 NanoDrop ND-1000 分光光度计(Thermo Scientific)检测所提取的 RNA 的质量和浓度,留取符合实验要求的 RNA 样本(浓度大于或等于 50 ng/μL,吸光度比值 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>≥1.7)进行后续的 qRT-PCR 检测。使用 All-in-One™ miRNA 实时定量 PCR(qRT-PCR) Detection Kit 试剂(GeneCopoeia 公司)按照说明书操作进行 miRNA 的加尾、逆转录及 qPCR 检测,实验所需的内参及特异性上游引物均购自 GeneCopoeia 公司。qPCR 反应在 BIO-RAD C1000 PCR 扩增仪上按以下程序进行:93 °C 预变性 10 min;93 °C 变性 10 s,60 °C 退火 20 s,72 °C 延伸 20 s,循环 40 次。

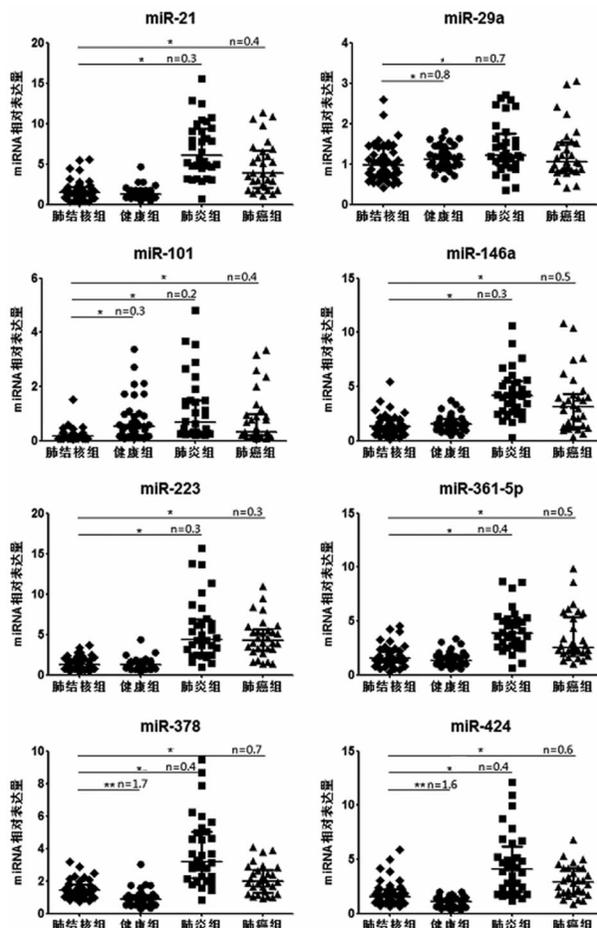
1.2.4 数据处理 以 U6 snRNA 作为内参对数据进行归一化处理,设定健康组某个研究对象 miRNA 的表达量为 1,通过 2<sup>-ΔΔCT</sup> 法计算肺结核组相对对照组 miRNA 的表达变化倍数。考虑到影响 qRT-PCR 实验结果的因素相对较多,对表达差异存在统计学意义的 miRNA,本研究设定其相对表达变化倍数

需大于或等于 1.5 或小于或等于 0.5 才适合作为诊断指标进入回归方程进行分析。

1.3 统计学处理 采用 Graphpad Prism 5.0 统计软件,根据方差是否齐性以 Mann-Whitney 检验或 t 检验比较两组间差异,以 P<0.05 为差异有统计学意义。采用 SPSS 19.0 统计软件以 Logistic 逐步向前法建立多元回归方程,并以 ROC 曲线分析评价该方程的诊断效能。

2 结果

2.1 临床资料 本研究共纳入研究对象 142 例,其中肺结核组 44 例,对照组 98 例(健康组 36 例,肺炎组 32 例,肺癌组 30 例)。其中,年龄及性别在肺结核组和对照组之间的差异均无统计学意义(P>0.05),见表 1。



n: 肺结核组相对对照组 mRNA 表达的变化倍数。\* P<0.01, 与肺结核组比较。

图 1 8 种 miRNA 在肺结核组和 3 组对照组中的表达情况

2.2 PBMCs 中候选 miRNA 的表达情况

**2.2.1 候选 miRNA 表达水平的差异** 肺结核组与健康组比较,miR-29a、miR-101、miR-378 和 miR-424 的表达差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),肺结核组低表达 miR-29a 和 miR-101,高表达 miR-378 和 miR-424;肺结核组与肺炎组比较,8 种 miRNA 的表达差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),肺结核组的表达水平均低于肺炎组;肺结核组与肺癌组比较,除 miR-29a 外另外 7 种 miRNA 的表达差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),肺结核组的表达水平均低于肺癌组,见图 1。

**2.2.2 候选 miRNA 表达水平的变化倍数** 除 miR-29a 外,其余 7 种 miRNA 均适合进入回归方程。miR-29a 的表达虽然差异有统计学意义,但其改变倍数为 0.84(肺结核组与健康组比较)和 0.74(肺结核组与肺炎组比较),不满足实验要求,见图 1。

**2.3 回归方程的建立及 ROC 曲线评价回归方程的诊断效能** 排除 miR-29a,对剩余 7 种 miRNA 采用 Logistic 回归进行分析,建立的回归方程为:  $\text{Logit}(\text{患肺结核概率 } P) = 1.698 - 4.791 \times (\text{miR-101}) - 3.428 \times (\text{miR-223}) + 2.968 \times (\text{miR-424})$ 。ROC 曲线分析证实了该模型对肺结核具有良好的诊断效能,曲线下面积(AUC) = 0.939,95%CI: 0.900~0.977;诊断灵敏性为 90.91%,特异性为 81.63%,见图 2。

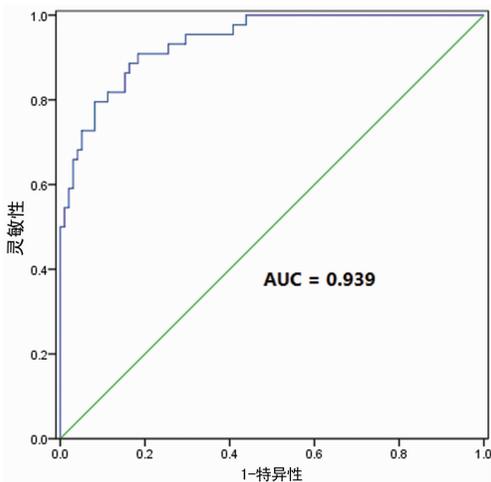


图 2 ROC 曲线

### 3 讨论

对肺结核进行及时准确的诊断,不仅能够使患者尽早得到针对性治疗进而改善预后,更重要的是能够使传染源得到及时有效的控制,避免结核病的传播,然而近期的研究表明肺结核的诊断经常被延误<sup>[13-14]</sup>。目前肺结核的实验室诊断主要依赖于对结核杆菌自身或其成分的检测,如痰涂片抗酸染色法、培养法,以及 PCR 扩增法等。这些检测方法一方面对下呼吸道标本不易获得的病例如小儿肺结核的诊断存在着局限性;另一方面本身也存在着诸如灵敏度较低、仪器设备要求高、检测周期长等缺陷<sup>[15]</sup>。近年来发展起来的基于宿主免疫反应的诊断方法如  $\gamma$  干扰素释放试验(IGRA)虽可在一定程度上弥补上述不足,但是却不能区分活动性肺结核和潜伏性结核感染<sup>[16-17]</sup>。

miRNA 的相关研究为肺结核诊断提供了新的思路和方向。尽管目前已有多项关于 miRNA 作为肺结核诊断指标的研究报道<sup>[18]</sup>,但是这些研究在对照组的选择上不够全面,临床上肺结核经常要与另外两种常见的肺部疾病-肺炎与肺癌进行鉴别,而这些研究仅仅选择健康人及(或)潜伏性结核感染者作

为对照,缺乏足够的说服力。本研究以健康组、肺炎组和肺癌组共同作为对照组,通过对 8 种候选 miRNA 进行检测和筛选,最终确定了 3 种符合要求的 miRNA 分子即 miR-101、miR-223 和 miR-424,ROC 曲线分析结果显示了这 3 种 miRNA 的组合对肺结核具有良好的诊断价值,其研究前景值得期待。

虽然本研究 and Spinelli 等<sup>[8]</sup>的研究结果都显示肺结核组 PBMCs 中 miR-223 的表达水平与健康组相比差异没有统计学意义,但是在肺组织<sup>[18]</sup>或单核/巨噬细胞<sup>[19-20]</sup>中 miR-223 的表达上调。上调表达的 miR-223 对肺结核患者具有双重作用,(1)其可通过转录后调控机制抑制中性粒细胞趋化因子如 CXCL2 趋化因子配体 2(CXCL2),CC 趋化因子配体 3(CCL3)和白细胞介素 6(IL-6)的表达,避免了大量中性粒细胞趋化至肺组织而导致的病理损伤,发挥对机体的保护作用<sup>[12]</sup>;(2)miR-223 可以通过抑制巨噬细胞内核因子  $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)的活性,降低促炎症因子的表达<sup>[19]</sup>,以及抑制巨噬细胞凋亡等作用来削弱机体的抗结核免疫<sup>[20]</sup>。本研究结果显示,与健康组相比,肺结核组 PBMCs 中 miR-101 表达下调及 miR-424 表达上调,与预期结果一致,但这两种 miRNA 异常表达的原因及其在肺结核发病机制中的作用尚不清楚,有待进一步研究。

本研究观察到 8 种候选 miRNA 中,miR-29a、miR-146a、miR-361-5p 的检测结果显示与预期结果不一致,推测可能以下方面的原因。(1)可能与标本类型选择的不同有关,如 miR-29a 和 miR-361-5p,其在血清中表达的变化趋势可能并不能代表其在 PBMCs 中的变化趋势。(2)可能与研究样本量较小有关,如 miR-146a,虽然本研究的结果显示结核组和健康组 miR-146a 的表达差异无统计学意义,但是观察两组数据,结核组 miR-146a 表达量有低于健康组的趋势,若扩大样本量则可能会显现这种差异。(3)可能与所选研究人群的遗传背景不同有关。

需要指出的是该项研究尚存在着一定的缺陷和不足。(1)该研究在实验设计方面还不完善,如研究样本量较小且研究对象来源比较单一,以及没有采用独立样本或临床前瞻性实验设计进行效能验证等,可能会影响到研究结论的可信性;(2)该研究最初可供筛选的候选 miRNA 数量仅仅只有 8 种,故最终确定的 3 种 miRNA 可能不是最佳的组合方案。尽管如此,本研究仍然认为该项研究具有一定的科学性和实用性,对肺结核生物标记物的深入研究具有借鉴意义和重要的参考价值。

综上所述,本研究从 8 种 miRNA 中筛选得到了 3 种对肺结核有潜在诊断意义的 miRNA 标记物(miR-101、miR-223 和 miR-424),这 3 种 miRNA 的组合对肺结核具有良好的诊断价值,该研究结果为进一步深入研究肺结核的实验室诊断方法提供了科学的参考资料。

### 参考文献

- [1] Felekis K, Touvana E, Stefanou C, et al. microRNAs: a newly described class of encoded molecules that play a role in health and disease[J]. Hippokratia, 2010, 14(4): 236-240.
- [2] Ueberberg B, Kohns M, Mayatepek E, et al. Are microRNAs suitable biomarkers of immunity to tuberculosis? [J]. Mol Cell Pediatr, 2014, 1(1): 8.
- [3] Huang HH, Liu XY, Liang Y, et al. Identification of 13 blood-based gene expression signatures to accurately distinguish tuberculosis from other pulmonary diseases and

- healthy controls[J]. *Biomed Mater Eng*, 2015, 26 Suppl 1: S1837-1843.
- [4] van Rensburg IC, Loxton AG. Transcriptomics; the key to biomarker discovery during tuberculosis? [J]. *Biomark Med*, 2015, 9(5): 483-495.
- [5] Abd-El-Fattah AA, Sadik NA, Shaker OG, et al. Differential microRNAs expression in serum of patients with lung cancer, pulmonary tuberculosis, and pneumonia [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2013, 67(3): 875-884.
- [6] Fu Y, Yi Z, Wu X, et al. Circulating microRNAs in patients with active pulmonary tuberculosis [J]. *J Clin Microbiol*, 2011, 49(12): 4246-4251.
- [7] Zhang X, Guo J, Fan S, et al. Screening and identification of six serum microRNAs as novel potential combination biomarkers for pulmonary tuberculosis diagnosis [J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e81076.
- [8] 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.
- [9] Geng Q, Fan T, Zhang B, et al. Five microRNAs in plasma as novel biomarkers for screening of early-stage non-small cell lung cancer [J]. *Respir Res*, 2014, 15(1): 149.
- [10] Wang C, Yang S, Sun G, et al. Comparative miRNA expression profiles in individuals with latent and active tuberculosis [J]. *PLoS One*, 2011, 6(10): e25832.
- [11] Qi Y, Cui L, Ge Y, et al. Altered serum microRNAs as biomarkers for the early diagnosis of pulmonary tuberculosis infection [J]. *BMC Infect Dis*, 2012, 12(1): 384.
- [12] Dorhoi A, Iannaccone M, Farinacci M, et al. MicroRNA-223 controls susceptibility to tuberculosis by regulating lung neutrophil recruitment [J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(11): 4836-4848.
- [13] Sreeramareddy CT, Qin ZZ, Satyanarayana S, et al. Delays in diagnosis and treatment of pulmonary tuberculosis in India; a systematic review [J]. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2014, 18(3): 255-266.
- [14] Li Y, Ehiri J, Tang S, et al. Factors associated with patient, and diagnostic delays in Chinese TB patients: a systematic review and meta-analysis [J]. *BMC Med*, 2013, 11(1): 156.
- [15] Ryu YJ. Diagnosis of pulmonary tuberculosis: recent advances and diagnostic algorithms [J]. *Tuberc Respir Dis (Seoul)*, 2015, 78(2): 64-71.
- [16] Metcalfe JZ, Everett CK, Steingart KR, et al. Interferon-gamma release assays for active pulmonary tuberculosis diagnosis in adults in low-and middle-income countries: systematic review and meta-analysis [J]. *J Infect Dis*, 2011, 204 Suppl 4: S1120-1129.
- [17] Xia H, Wang X, Li F, et al. Diagnostic values of the QuantiFERON-TB Gold In-tube assay carried out in China for diagnosing pulmonary tuberculosis [J]. *PLoS One*, 2015, 10(4): e121021.
- [18] Harapan H, Fitra F, Ichsan I, et al. The roles of microRNAs on tuberculosis infection; meaning or myth? [J]. *Tuberculosis (Edinb)*, 2013, 93(6): 596-605.
- [19] Liu Y, Wang R, Jiang J, et al. miR-223 is upregulated in monocytes from patients with tuberculosis and regulates function of monocyte-derived macrophages [J]. *Mol Immunol*, 2015, 67(2 Pt B): 475-481.
- [20] Xi X, Zhang C, Han W, et al. MicroRNA-223 Is Upregulated in Active Tuberculosis Patients and Inhibits Apoptosis of Macrophages by Targeting FOXO3 [J]. *Genet Test Mol Biomarkers*, 2015, 19(12): 650-656.

(收稿日期: 2015-11-08 修回日期: 2016-02-18)

(上接第 1901 页)

- Cardiovasc Surg*, 1997, 5(5): 504-509.
- [7] Kundu S. Central venous disease in hemodialysis patients: prevalence, etiology and treatment [J]. *J Vasc Access*, 2010, 11(1): 1-7.
- [8] NKF-K/DOQI clinical practice guidelines for vascular access; update 2000 [J]. *Am J Kidney Dis*, 2001, 37(1 Suppl 1): S137-181.
- [9] Vascular Access Work Group. Clinical practice guidelines for vascular access [J]. *Am J Kidney Dis*, 2006, 48(Suppl 1): S248-273.
- [10] 高堃, 王剑锋, 李惠, 等. 血液透析患者中心静脉狭窄的介入治疗 [J]. *介入放射学杂志*, 2012, 21(7): 582-586.
- [11] 王玉柱, 张丽红. 血液透析长期中心静脉导管并发症诊断及防治策略 [J]. *中国实用内科杂志*, 2012(9): 684-686.
- [12] Bhat R, McBride K, Chakraverty S, et al. Primary cutting balloon angioplasty for treatment of venous stenoses in native hemodialysis fistulas: long-term results from three centers [J]. *Cardiovasc Intervent Radiol*, 2007, 30(6): 1166-1170.
- [13] 李惠, 翟仁友. 血液透析病人中心静脉狭窄的介入治疗 [J]. *国际医学放射学杂志*, 2012, 35(5): 458-461.
- [14] 张丽红, 王自强, 段青青, 等. 血液透析患者中心静脉阻塞性疾病的介入治疗 [J]. *中华肾脏病杂志*, 2011, 27(10): 781-782.

(收稿日期: 2015-11-16 修回日期: 2016-01-26)