

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2022.03.020

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20211025.1116.010.html\(2021-10-25\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20211025.1116.010.html(2021-10-25))

miR-191 及 miR-886-5p 在肺结核外周血中的表达与临床价值研究*

朱雄林¹, 杨梅², 冯显红³, 李小林⁴, 章革民¹

(1. 武汉市新洲区人民医院感染科 430400; 2. 武汉市新洲区妇幼保健院妇产科 430400;
3. 武汉市新洲区人民医院检验科 430400; 4. 武汉市新洲区人民医院心内科 430400)

[摘要] **目的** 研究 miR-191、miR-886-5p 在肺结核外周血中的表达与临床价值。**方法** 选取 2019 年 1 月至 2020 年 8 月在武汉市新洲区人民医院确诊为肺结核的患者 50 例作为结核组, 潜伏感染结核杆菌的患者 50 例作为潜在感染组, 选取同期在武汉市新洲区人民医院体检的健康者 50 例作为对照组。所有入组受试者于清晨空腹采集 2 mL 静脉血, 采用 RNA 试剂盒提取循环 RNA, 定量计算 miR-191、miR-886-5p 的表达水平。利用 Person 相关性分析肺结核患者 miR-191、miR-886-5p 表达与年龄、性别、肺部病灶个数、空洞个数的相关性, 构建 logistic 回归分析模型分析肺结核发生的危险因素。**结果** 对照组、潜在感染组、肺结核组患者 miR-191 水平依次降低, 而 miR-886-5p 水平依次升高, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。肺结核患者 miR-191、miR-886-5p 表达水平与肺部病灶个数、空洞个数呈正相关 ($P<0.05$), 与年龄、性别不具相关性 ($P>0.05$)。ROC 曲线表明 miR-191、miR-886-5p 在诊断肺结核都有意义, miR-191、miR-886-5p 联合诊断时, 灵敏度为 80.2%, 特异度为 79.8% ($P<0.05$)。Logistic 回归分析表明 miR-191、miR-886-5p 是肺结核发生的影响因素。**结论** 肺结核患者 miR-191 水平显著降低, 而 miR-886-5p 水平显著升高, 与肺部病灶的严重程度密切相关, 可作为判断结核病严重程度的标志物。

[关键词] miR-191; miR-886-5p; 诊断; 肺结核

[中图分类号] R521 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2022)03-0454-05

Study on the expression and clinical value of miR-191 and miR-886-5p in peripheral blood of pulmonary tuberculosis*

ZHU Xionglin¹, YANG Mei², FENG Xianhong³, LI Xiaolin⁴, ZHANG Gemin¹

(1. Department of Infection, Wuhan Xinzhou District People's Hospital, Wuhan, Hubei 430400, China; 2. Department of Obstetrics and Gynecology, Wuhan Xinzhou Maternal and Child Health Hospital, Wuhan, Hubei 430400, China; 3. Department of Laboratory Medicine, Wuhan Xinzhou District People's Hospital, Wuhan, Hubei 430400, China; 4. Department of Cardiology, Wuhan Xinzhou District People's Hospital, Wuhan, Hubei 430400, China)

[Abstract] **Objective** To explore the expression and clinical value of miR-191 and miR-886-5p in peripheral blood of pulmonary tuberculosis (TB). **Methods** A total of fifty patients diagnosed with pulmonary tuberculosis who attended the hospital from January 2019 to August 2020 were selected as the tuberculosis group. In addition, a total of fifty patients with latent infection of mycobacterium tuberculosis were selected as the infection group, and fifty healthy individuals who underwent a physical examination at the hospital during the same period were selected as the healthy control group. Two mL of venous blood of all subjects was collected in the early morning on an empty stomach. Circulating RNA was extracted by RNA Kit and the expression levels of miR-191 and miR-886-5p were quantified. Person correlation analysis was used to examine the correlation between miR-191 and miR-886-5p expression and age, gender, number of lung lesions and number of cavities in patients with pulmonary tuberculosis. **Results** The miR-191 levels were reduced in the control group, the latently infected group and the tuberculosis group in that order. In contrast, the levels of miR-886-5p increased sequentially, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). The expression levels of

* 基金项目: 武汉市卫生和计划生育委员会科研基金项目 (WX17C28)。 作者简介: 朱雄林 (1978—), 主治医师, 本科, 主要从事结核病的

miR-191 and miR-886-5p in TB patients were positively correlated with the number of lung lesions and cavities ($P<0.05$),but not with age and gender ($P>0.05$). ROC curves showed that miR-191 and miR-886-5p were significant in the diagnosis of TB,and the combined diagnosis of miR-191 and miR-886-5p,the sensitivity was 80.2% and the specificity was 79.8% ($P<0.05$). Logistic regression analysis showed that miR-191 and miR-886-5p were the influencing factors in the occurrence of pulmonary tuberculosis. **Conclusion** MiR-191 levels were significantly lower and miR-886-5p levels were significantly higher in patients with pulmonary tuberculosis. It was closely related to the severity of pulmonary lesions. It can be used as an indicator to determine the severity of tuberculosis.

[Key words] miR-191;miR-886-5p;diagnosis;pulmonary tuberculosis

结核分枝杆菌感染后可导致肺结核,该疾病属于慢性传染病,使传染病中导致死亡的首要原因,严重危害身体健康和生存质量。每年因肺结核死亡的人数高达 300 万^[1],而我国更是该疾病高发的国家,发病率居世界前 5 位。因此,寻找与肺结核相关的基因从而快速诊断肺结核,对有效控制肺结核的传染具有重要意义。

miRNAs 是真核生物内源性非编码 RNA,可对基因表达进行调节,从而影响细胞的分化、增殖、凋亡和免疫应答等多方面。例如 miR-20a-5p、miR-181a-5p 等被证明与肺结核的发病具有相关性,但目前关于 miR-191、miR-886-5p 是否与肺结核的发病有关的研究仍较少。因此,本研究探讨肺结核患者 miR-191、miR-886-5p 的表达情况,以及其与肺结核诊断的相关性。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2019 年 1 月至 2020 年 8 月在武汉市新洲区人民医院就诊的传染病科确诊为肺结核的患者 50 例作为结核组,潜伏感染结核杆菌的患者 50 例作为潜在感染组,选取同期在武汉市新洲区人民医院体检的健康者 50 例作为对照组。肺结核诊断标准符合《中华人民共和国卫生行业标准肺结核诊断标准》(WS 288-2017)^[2]。所有患者均知情同意。肺结核诊断标准:(1)至少 1 次痰细菌学检查为阳性(包括痰涂片或痰培养);(2)胸部 X 线片检查有典型的活动性结核病变;(3)肺组织病理学诊断为结核病变;(4)疑似肺结核病患者,随访观察后抗结核药物治疗有效。符合上述项目之一者即可确诊为肺结核。潜伏感染者:是机体对结核分支杆菌抗原刺激产生持续的免疫应答但无明显活动性结核病表现的患者。感染者没有结核病的任何症状和体征,痰等各种标本抗酸染色涂片和培养均为阴性,影像学检查正常。排除标准:(1)合并严重肝脏、肾脏、心脏、血液疾病的患者;(2)肿瘤患者;(3)HIV、高血压、糖尿病等慢性疾病的患者。

1.2 方法

血液样本采集:3 组受试者于入组后次日清晨采集 2 mL 空腹静脉血置于肝素钠处理的抗凝管中,混匀后-80℃保存。血浆 miRNA 提取:采用 RNA 试

剂盒提取循环 RNA,用 Thermo 核酸检测仪测定产物纯度。将提取的各种 miRNA 储存于-80℃以防降解。miRNA 表达水平的检测:采用 miRNA 检测试剂盒按照说明书配置相应反应体系,将反应底物:逆转录引物:酶(1:1:1)混匀后加入 miRNA 模板,离心后收集反应产物。PCR 逆转录合成 cDNA,反应条件设置为 40℃ 62 min,85℃ 8 min。将 cDNA 稀释后采用 qPCR 法检测 Ct 值。将 cDNA 置于-20℃保存。以 cDNA 为模板进行 PCR 芯片检测。将聚合酶、PCR 引物、反应底物、荧光染料置于反应体系中,混匀后移取模板 cDNA,将 96 孔 qPCR 芯片在室温条件下平衡好后,上样。采用 ABI3500 荧光定量 PCR 仪进行检测,反应条件设置为 90℃ 10 min,90℃ 变性 15 s,63℃ 退火 15 s,75℃ 延伸 15 s,40 个循环,并在延伸阶段进行荧光检测,然后定量计算 miR-191、miR-886-5p 的表达水平。

1.3 统计学处理

采用 SPSS22.0 进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析;计数资料以 % 表示,组间比较采用 χ^2 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。miRNA 水平用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算表达。采用 ROC 曲线分析 miR-191、miR-886-5p 诊断肺结核的意义。利用 Person 相关性分析肺结核患者 miR-191、miR-886-5p 表达与年龄、性别、肺部病灶个数、空洞个数的相关性,构建 logistic 回归分析模型分析肺结核发生的危险因素。

2 结果

2.1 一般资料比较

3 组患者一般资料包括年龄、性别、吸烟、饮酒例数差异无统计学意义($P>0.05$),见表 1。

表 1 3 组患者一般资料比较(n=50)				
组别	年龄 ($\bar{x} \pm s$,岁)	性别 (男/女,n)	吸烟 (是/否,n)	饮酒 (是/否,n)
对照组	58.46±5.32	33/17	23/27	20/30
结核组	59.10±5.33	34/16	24/26	19/31
潜在感染组	58.87±5.87	32/18	22/28	21/29

2.2 患者 miR-191、miR-886-5p 表达水平比较

与对照组相比,潜在感染组、结核组患者 miR-191 水平显著降低,其中结核组患者 miR-191 水平最低,差异有统计学意义($P<0.05$)。与对照组相比,潜在感染组、结核组患者 miR-886-5p 水平显著升高,其中结核组患者 miR-886-5p 水平最高,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 2。

2.3 肺结核患者 miR-191、miR-886-5p 表达与临床病理特征的关系

根据肺结核患者 miR-191、miR-886-5p 表达水平将患者分为低表达、高表达,分析其与临床病理特征

的关系。结果表明,miR-191、miR-886-5p 表达水平与肺部病灶个数、空洞个数均有显著相关性($P<0.05$),与年龄、性别均无相关性($P>0.05$),见表 3。

表 2 3 组患者 miR-191、miR-886-5p 表达水平比较		
组别	miR-191	miR-886-5p
对照组	3.95±0.13	3.42±0.21
潜在感染组	2.42±0.27	4.05±0.23
结核组	1.68±0.20	5.46±0.28
P	<0.05	<0.05

表 3 肺结核患者 miR-191、miR-886-5p 表达量与临床病理特征的关系(n)

临床病理指标	n	miR-191		P	miR-886-5p		P
		低表达(n=22)	高表达(n=28)		低表达(n=24)	高表达(n=26)	
年龄				>0.05			>0.05
<60 岁	13	6	7		5	8	
≥60 岁	37	16	21		19	18	
性别				>0.05			>0.05
男	26	12	14		12	14	
女	24	10	14		12	12	
肺部病灶个数				<0.05			<0.05
<2 个	29	8	21		8	21	
≥2 个	21	14	7		16	5	
肺部空洞				<0.05			<0.05
有	32	5	27		10	22	
无	18	17	1		14	4	

2.4 肺结核患者 miR-191、miR-886-5p 表达与年龄、性别、肺部病灶个数、空洞个数的 Person 相关性分析

经 Person 相关性分析,miR-191、miR-886-5p 表达与年龄($r=0.124,0.153,P>0.05$)、性别($r=0.119,0.174,P>0.05$)无明显相关性;与肺部病灶个数($r=-0.265,0.248,P<0.05$)、空洞个数($r=0.245,0.261,P<0.05$)具有相关性。

2.5 miR-191、miR-886-5p 诊断的 ROC 曲线分析

以结核组、潜伏感染组的 miR-191、miR-886-5p 的表达水平为检验变量,对照组为效应变量。ROC 曲线显示 miR-191 的灵敏度为 60.4%,特异度为 74.0%,曲线下面积为 0.699($P<0.05$)。miR-886-5p 的灵敏度为 77.1%,特异度为 66.7%,曲线下面积为 0.751($P<0.05$)。ROC 曲线表明 miR-191、miR-886-5p 在诊断肺结核都有意义,miR-191、miR-886-5p 联合诊断时,灵敏度为 80.2%,特异度为 79.8%($P<0.05$),见图 1、表 4。

2.6 肺结核相关因素的 logistic 回归分析

将肺结核作为因变量,将年龄、性别、BMI、吸烟、饮酒、miR-191、miR-886-5p 作为自变量,构建 logistic

回归分析模型,结果表明,miR-191、miR-886-5p 是肺结核发生的影响因素,见表 5。

表 4 miR-191、miR-886-5p 诊断的 ROC 曲线分析						
项目	Area	Std	灵敏度	特异度	P	95%CI
miR-191	0.699	0.050	0.604	0.740	0.000	0.601~0.798
miR-886-5p	0.751	0.046	0.771	0.667	0.000	0.661~0.840
联合指标	0.782	0.041	0.802	0.798	0.000	0.683~0.868

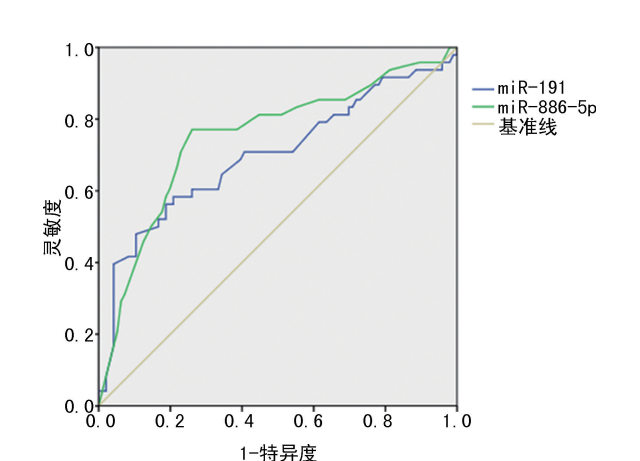


图 1 miR-191、miR-886-5p 诊断的 ROC 曲线

表 5 肺结核相关因素的 logistic 回归分析

项目	<i>B</i>	<i>Std</i>	<i>Wald</i> χ^2	<i>OR</i>	<i>P</i>	95% <i>CI</i>
年龄	-0.037	0.131	0.126	0.042	0.126	0.015~1.651
性别	0.136	0.142	0.851	0.685	0.124	0.125~1.312
BMI	0.121	0.115	0.102	0.068	0.133	0.034~1.046
吸烟	0.024	0.126	0.759	0.147	0.125	0.213~1.461
饮酒	0.091	0.113	0.314	0.246	0.121	0.301~1.123
miR-191	-0.228	0.023	1.128	1.281	0.034	1.171~2.074
miR-886-5p	0.253	0.034	1.142	1.127	0.016	1.023~2.624

3 讨 论

机体感染结核分枝杆菌后,各个器官被结核分枝杆菌侵袭,但主要侵袭患者肺部发展为肺结核,患者可伴有全身乏力、咳嗽、咳血等症状,机体免疫力极度低下,严重者可致死亡^[3]。由于肺结核的传染性较强,且耐药型结核菌大量出现,给肺结核的治疗带来极大困难,但若能够早期诊断肺结核,及时控制肺结核的传播,可大大降低肺结核的感染率。

研究表明,miRNA 可直接或间接调控靶基因,参与细胞周期、增殖、凋亡等过程,在微生物感染、机体免疫应答、炎症反应等过程中发挥重要作用^[4]。例如,miR-150 通过调控 PDCD4 可对结核分枝杆菌 H37Rv 感染 THP-1 巨噬细胞的炎症、细胞增殖及凋亡发挥作用^[5];miR-191 可通过调节炎症因子反应而参与矽暴露患者的肾功能障碍^[6]。研究发现,活动性肺结核患者中 miR-155 的表达量增加了 3.7 倍^[7];miR-155 是结核杆菌介导巨噬细胞凋亡中所必需的成分^[8]。人血清中 miR-361-5p、miR-889、miR-576-3p 的表达量在肺结核患者中显著增高^[9]。

本研究结果表明,与对照组相比,结核组患者 miR-191 表达水平最低($P<0.05$)。结核组患者 miR-886-5p 水平显著高于潜在感染组及对照组($P<0.05$)。对临床病理特征进行分析发现,肺结核患者 miR-191、miR-886-5p 表达水平与肺部病灶个数、空洞个数呈明显相关性($P<0.05$),与年龄、性别无相关性($P>0.05$)。当机体感染结核分枝杆菌时,患者免疫力下降,结核菌大量繁殖后超出宿主细胞的免疫控制能力,导致肺部组织坏死,临床表现为肺部空洞,当结核分枝杆菌快速生长时,感染越严重时,可加速对细胞外基质的降解,利于肺部空洞的形成,而分子水平则表现为 miR-191 降低、miR-886-5p 高于对照组。Logistic 回归分析表明 miR-191、miR-886-5p 是肺结核发生的影响因素。根据相关研究,miR-191 位于染色体 3p21.31,其异常表达与糖尿病、肺动脉高压、炎症反应等的发生具有相关性^[10-11]。miR-191 通过靶向抑制 TIMP3 激活基质金属蛋白酶 2(MMP2)、c-Jun 氨基末端激酶(JNK)等癌基因导致肺癌细胞恶

化^[12]。因此,本研究推测 miR-191、miR-886-5p 可能通过抑制相关翻译基因的表达,如 MMP2、JNK 等,而导致肺结核的发生与发展。研究表明,部分 miRNA 可通过调节热休克蛋白的表达水平而使结核分枝杆菌滞留于巨噬细胞内,进而逃逸机体对其的免疫杀伤作用^[13]。例如,miRNA-130b 通过与 miRNA-3-UTR 结合而抑制过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ)的基因转录,从而明显降低其蛋白表达水平,同时还可抑制 M2 型巨噬细胞成熟,明显降低炎症细胞因子的分泌^[14]。因此,miR-191、miR-886-5p 也可能通过调节热休克蛋白的表达而使结核杆菌滞留于巨噬细胞内进而引发肺结核的发生。

相关研究发现,大部分 miRNA 可介导慢性炎症反应,包括结核病。如 miR-223 通过调控肺部髓样细胞分泌的趋化因子 CXC 酶体 2(CXCL2)、白细胞介素(IL)-6 等水平而调控慢性炎症,如结核病等^[15-16]。注射卡介苗后,核因子(NF)- κ B 信号通路被激活,进而诱导 miR-21 的表达,miR-21 作用于 IL-12p35 抑制 IL-12 的产生进而损伤 T 细胞的免疫反应。miR-886-5p 在肺结核患者表达上调,推测 miR-886-5p 可能与炎症反应有关,通过靶作用于程序性细胞死亡而调节免疫反应^[17]。本研究 ROC 曲线表明 miR-191、miR-886-5p 在诊断肺结核都有意义,miR-191、miR-886-5p 联合诊断时灵敏度和特异度均高于二者单独诊断,二者联合诊断的灵敏度为 80.2%,特异度为 79.8% ($P<0.05$)。

由此可见,肺结核患者 miR-191、miR-886-5p 分子的差异性表达,可较好地反映机体感染结核杆菌后机体发生的免疫应答,可作为判断肺结核严重程度的生物标志物。

参考文献

[1] FLOYD K, GLAZIOU P, ZUMLA A, et al. The global tuberculosis epidemic and progress in care, prevention, and research: an overview in year 3 of the End TB era[J]. Lancet Respir Med, 2018, 6(4): 299-314.

[2] 周林, 刘二勇, 孟庆琳, 等.《WS 288-2017 肺结核诊断》标准实施后肺结核诊断质量评估分析[J]. 中国防痨杂志, 2020, 42(9): 910-915.

[3] 宋群, 王新霞, 童照威. 结核病患者耐多药的影响因素分析[J]. 中国药物与临床, 2019, 19(11): 1792-1794.

[4] LIU G, LI B Q. Role of miRNA in transformation from normal tissue to colorectal adenoma and cancer[J]. J Cancer Res Ther, 2019, 15(2): 278-285.

- [5] 杨盛娅,孙亚萍,刘立宾,等. miR-150 调控 PD-CD4 对结核分枝杆菌 H37Rv 感染 THP-1 巨噬细胞的影响[J]. 中国免疫学杂志,2021,37(5):547-552,563.
- [6] XU Y,ZOU Z,LIU Y,et al. miR-191 is involved in renal dysfunction in arsenic-exposed populations by regulating inflammatory response caused by Arsenic from burning arsenic-contaminated coal[J]. Hum Exp Toxicol,2020,39(1):37-46.
- [7] LI M,CUI J,NIU W,et al. Long non-coding PCED1B-AS1 regulates macrophage apoptosis and autophagy by sponging miR-155 in active tuberculosis[J]. Biochem Biophys Res Commun,2019,509(3):803-809.
- [8] YANG C Z,SHI Z Y,HU J Z,et al. miRNA-155 expression and role in pathogenesis in spinal tuberculosis-induced intervertebral disc destruction[J]. Exp Ther Med,2019,17(4):3239-3246.
- [9] CHEN D Y,CHEN Y M,LIN C F,et al. MicroRNA-889 inhibits autophagy to maintain mycobacterial survival in patients with latent tuberculosis infection by targeting TWEAK[J]. mBio,2020,11(1):e03019-e03045.
- [10] PARKER W,SCHULTE C,BARWARI T,et al. Aspirin, clopidogrel and prasugrel monotherapy in patients with type 2 diabetes mellitus: a double-blind randomised controlled trial of the effects on thrombotic markers and microRNA levels[J]. Cardiovasc Diabetol,2020,19(1):3.
- [11] 张丹. MiR-191 靶向调控 TIMP3 促进肺癌细胞恶性转化进程的研究[J]. 解放军预防医学杂志,2018,36(10):1318-1322.
- [12] DEB R,SENGAR G S. Expression pattern of bta-mir-2898 miRNA and their correlation with heatshock proteins during summer heat stress among native vs crossbred cattle [J]. J Therm Biol,2020,94:102771.
- [13] 张倩,冯喜英,久太. 肺结核病相关 miRNA 的研究现状[J/CD]. 中华肺部疾病杂志:电子版,2018,11(6):747-749.
- [14] JEFFRIES J,ZHOU W,HSU A Y,et al. miRNA-223 at the crossroads of inflammation and cancer [J]. Cancer Lett,2019,451:136-141.
- [15] KIM G D,NG H P,PATEL N,et al. Kruppel-like factor 6 and miR-223 signaling axis regulates macrophage-mediated inflammation [J]. FASEB J,2019,33(10):10902-10915.
- [16] WEI Q,TU Y,ZUO L,et al. MiR-345-3p attenuates apoptosis and inflammation caused by oxidized low-density lipoprotein by targeting TRAF6 via TAK1/p38/NF-kB signaling in endothelial cells[J]. Life Sci,2020,241:117142.
- [17] YU G,SONG Y,XIE C,et al. MiR-142a-3p and miR-155-5p reduce methamphetamine-induced inflammation: role of the target protein Pelil [J]. Toxicol Appl Pharmacol,2019,370:145-153.

(收稿日期:2021-04-15 修回日期:2021-11-10)

(上接第 453 页)

- with excessive gestational weight gain[J]. J Matern Fetal Neonatal Med,2016,29(13):2182-2185.
- [13] CHEN Y,LIU Y,ZHANG Y,et al. Gestational weight gain per Pre-Pregnancy body mass index and birth weight in twin pregnancies: a cohort study in wuhan,China[J]. Sci Rep,2018,8(1):12496.
- [14] LIN D,FAN D,WU S,et al. The effect of gestational weight gain on perinatal outcomes among Chinese twin gestations based on Institute of Medicine guidelines[J]. BMC Pregnancy Childbirth,2019,19(1):262.
- [15] HINKLE S N,HEDIGER M L,KIM S,et al. Maternal weight gain and associations with longitudinal fetal growth in dichorionic twin pregnancies: a prospective cohort study[J]. Am J Clin Nutr,2017,106(6):1449-1455.
- [16] RETNAKARAN R,WEN S W,TAN H,et al. Association of timing of weight gain in pregnancy with infant birth weight[J]. JAMA Pediatr,2018,172(2):136-142.

(收稿日期:2021-04-22 修回日期:2021-10-20)