

·论 著·

## miRNA144-3p 和 miRNA146a-5p 在结核性胸膜炎患者外周血中的表达

张帆,刘守江,魏巍,覃林珍,闫敬,王三清,王健\*

**摘要:**目的 探讨 miRNA144-3p 和 miRNA146a-5p 在结核性胸膜炎患者外周血表达及其临床意义。方法 收集住院初治结核性胸膜炎患者、结核潜伏感染者和健康对照各 30 例。采集外周血提取 RNA,采用荧光定量 PCR 技术检测 miRNA144-3p 和 miRNA146a-5p 在各组患者外周血中的表达差异。结果 结核性胸膜炎患者外周血组 miRNA144-3p 表达显著低于结核潜伏感染者和健康对照外周血组 ( $P < 0.05$ ),而结核潜伏感染者和健康对照外周血组之间差异无统计学意义。miRNA146a-5p 表达在三组之间差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。结论 miRNA144-3p 可能参与结核性胸膜炎的发生、发展,且可能对结核性胸膜炎诊断有一定的临床意义。

**关键词:**结核;胸膜炎;微 RNAs;基因表达

中图分类号:R521.7 文献标识码:A 文章编号:1009-9727(2013)6-664-03

The expression level of miRNA144-3p and miRNA146a-5p in the periphery blood of patients with tuberculosis pleurisy. ZHANG Fan, LIU Shou-jiang, WEI wei, et al. (Nanshan District Chronic Disease Control Center, Shenzhen 518054, Guangdong, P.R.China; Corresponding author:ZHANG Fan, E-mail: zhangfan61@163.com)

**Abstract:**Objective To investigate the expression level of miRNA144-3p and miRNA146a-5p in the periphery blood of patients with tuberculous pleurisy and explore its clinical significance. **Methods** The expression level of miRNA144-3p and miRNA146a-5p were measured by qRT-PCR in 30 patients with tuberculous pleurisy, Latent tuberculosis infection(LITB) and healthy donors respectively. The statistical difference of the miRNA144-3p and miRNA146a-5p level. In each groups were analyzed. **Results** The expression level of miRNA144-3p in patients with tuberculous pleurisy were significantly lower than that of the LITB and healthy donors, respectively ( $P < 0.05$ ) and moreover, no statistic difference was shown between LITB and healthy donors( $P > 0.05$ ).Furthermore, the expression levels of miRNA146a-5p in the three groups showed no statistically significant difference( $P > 0.05$ ). Conclusion The miRNA144-3p may be a new biomarker in diagnosis of tuberculous pleurisy.

**Key words:**Tuberculosis; Pleurisy; MicroRNAs; Gene expression

MicroRNAs(miRNA)是一类长度为 18~25 个核苷酸的单链非编码 RNA 分子,可在转录后水平调控基因表达,参与调控细胞生长、分化和凋亡等各个环节,与疾病的发生、发展相关<sup>[1]</sup>。最近的研究结果表明,miRNA 分子也在微生物引起的感染和免疫应答中起重要作用<sup>[2]</sup>;研究表明 miRNA 分子在肺结核发病中起到重要作用,但在结核性胸膜炎中的情况未见有报道,本研究旨在探讨 miRNA 在结核性胸膜炎患者外周血中的表达情况,初步了解其在结核性胸膜炎患者中的作用。

## 1 对象与方法

**1.1 研究对象** 2012 年 6 月~2012 年 11 月在南山区慢性病防治院就诊的结核性胸腔积液患者 30 例为病例组,其中男 16 例,女 14 例;年龄 17~43 岁,平均 27 岁;诊断根据临床症状结合 X 线表现、CT 诊断以及病原学检查,符合《中华人民共和国卫生行业标准—法定传染病诊断标准》中的肺结核诊断标准(WS288—2008),。无脓胸产生,无慢性肺病,无心、肝、肾等脏器合并症及其它感染,无糖尿病、肿瘤等免疫相关性

或免疫性疾病;均暂未接受过激素及免疫抑制剂、抗生素及抗结核治疗。结核潜伏感染者:选取结核潜伏感染者病例共 30 例,判定标准<sup>[3]</sup>为结核菌特异性酶联免疫斑点试验阳性,而胸片为阴性,其中男 14 例,女 16 例,年龄为 16~47 岁,平均年龄为 30 岁。与病例组年龄、性别匹配的健康对照 30 例。本研究经深圳市南山区慢性病防治院伦理委员会批准,所有患者均签署知情同意书。

**1.2 标本的收集和 RNA 提取** 标本采集后 30min 内,吸取 200μl 全血于冻存管中(已预装有 Trizol 和研磨珠),振荡混匀后于-80℃保存;参考 Trizol Reagent 试剂盒说明书(Invitrogen)抽提血液中提取总 RNA,适量无 RNase 水充分溶解 RNA。用核酸测定仪测定浓度和纯度,琼脂糖凝胶电泳分析 RNA 的完整性;调整 RNA 浓度,于-80℃保存。

**1.3 逆转录 miRNA** 取总 RNA 1μl,2×反转录缓冲混合物 10μl, RNase Free 水 5μl,反转录酶 2μl,0.1% BSA 2μl。37℃ 60 min,85℃5 min,4℃ 5 min。逆转录成 cDNA 放置-20℃保存备用。

**基金项目:**深圳市科技计划项目资助(No.201203232)

**作者单位:**深圳市南山区慢性病防治中心 结核病防治科,广东 深圳 518054

**作者简介:**张帆(1982~),女,博士,主治医师,研究方向:结核病防治。

\*通讯作者: E-mail: nsjfk@163.com

1.4 荧光定量PCR 分别取SYBR Green 12.5 $\mu$ l,待测样品cDNA 2 $\mu$ l,上游引物1 $\mu$ l,下游引物1 $\mu$ l,水8.5 $\mu$ l,总体积25 $\mu$ l(引物序列见表1,另一条为通用引物)。预变性95 $^{\circ}$ C 10s;变性和延伸95 $^{\circ}$ C 5s;60 $^{\circ}$ C 20s,共40个循环。以U6作为内参,各样本中miR144-3p RNA的ct值,与同样本中的U6 RNA Ct值相减,获得各样本中miR144-3p的 $\Delta$ ct值。采用荧光定量PCR

中的相对定量法,以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 公式计算各样本中的miR-144-3p表达量。miRNA146a-5p表达量计算方法与此相同。

1.5 统计学分析 采用SPSS 13.0统计软件进行分析,计量资料采用mean $\pm$ SD表示,单因素方差分析比较miRNA在多组间差异,t检验比较两组间差异, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

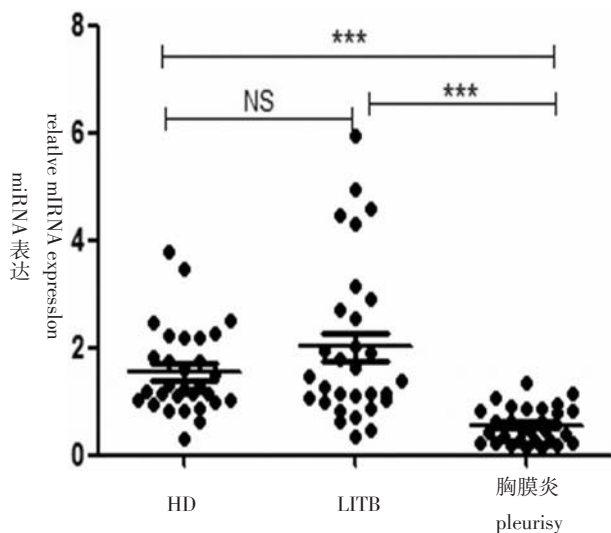
表1 荧光定量PCR引物

Table 1 quantitative real-time PCR primers

基因 Gene	引物 Primer	扩增长度 Amplified Length
U6	TAKARA Code: D356-03 Lot: B101B	
miRNA144-3p	5'-GCGCTACAGTATAGATGTGTAC-3'	$\approx 100$ bp
miRNA146a-5p	5'-GCGCTGAGAACTGAATCCATG-3'	$\approx 100$ bp

## 2 结果

2.1 实时荧光定量检测 miRNA144-3p 在结核性胸膜炎患者外周血中的表达 结核性胸膜炎患者的全血 miRNA144-3p 水平( $0.556 \pm 0.338$ )显著低于结核潜伏期感染者( $2.014 \pm 1.481$ )和正常对照组( $1.552 \pm 0.803$ )( $P < 0.0001$ , 图1)。结核潜伏期感染者 miRNA miRNA144-3p 水平与正常对照组相似,差异无统计学意义。



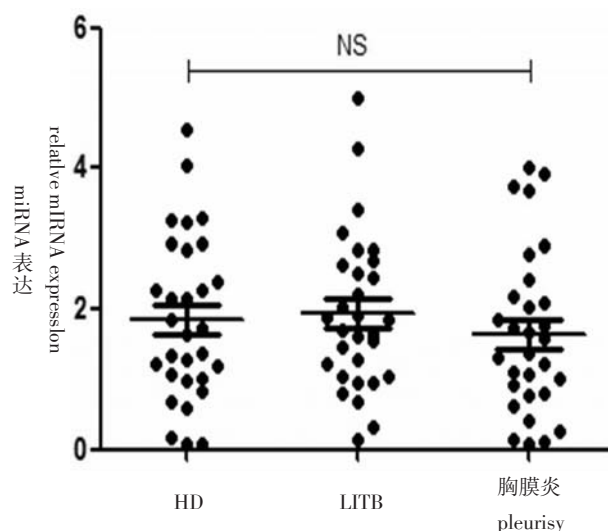
\*\*\*:  $P < 0.001$ ; NS: 差异不显著; HD: 健康者; LTBI: 结核潜伏期感染者。\*\*\*:  $P < 0.001$ ; NS: not significant; HD: healthy donor; LTBI: Latent Tuberculosis Infection.

图1 miRNA144-3p在结核性胸膜炎患者中的表达。

Figure 1 Expression level of miRNA144-3p in the periphery blood of patients with tuberculosis pleurisy.

2.2 实时荧光定量检测 miRNA146a-5p 在结核性胸膜炎患者外周血中的表达 结核性胸膜炎患者的全血 miRNA146a-5p 水平( $1.650 \pm 1.149$ )与结核潜伏期感染者( $1.937 \pm 1.109$ )及正常对照组( $1.845 \pm 1.162$ )之

间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )(图2)。



NS: 差异不显著; HD: 健康者; LTBI: 结核潜伏期感染者。NS: not significant; HD: healthy donor; LTBI: Latent Tuberculosis Infection.

图2 miRNA146a-5p在结核性胸膜炎患者中的表达。

Figure 2 Expression level of miRNA146a-5p in the periphery blood of patients with tuberculosis pleurisy.

## 3 讨论

miRNA 可通过调节免疫细胞分化、免疫细胞信号传导、固有免疫应答和适应性免疫应答等多个层面对免疫反应各个水平执行较为柔和精细的微调。结核性胸膜炎是由结核分枝杆菌抗原引起的T淋巴细胞介导的发生在胸膜的变态反应性疾病,结核性胸腔积液微环境中存在大量的T细胞免疫相关细胞因子,因此与T淋巴细胞相关miRNA可能对结核性胸膜炎的发生发展起到重要作用。

miR-144 主要表达在T细胞,调节T细胞免疫。Liu 等研究发现miR-144在活动性肺结核患者PBMC中较正常人明显升高,其可抑制T细胞分泌TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ ,而TNF- $\alpha$ 和IFN- $\gamma$ 对于肺结核的保护性免疫

具有重要作用,miR-144也可通过抑制T细胞增殖调节抗结核免疫反应<sup>[4]</sup>。miR-146a在Th1型细胞中的表达较高,而Th2型细胞的表达则较低,而且miR-146a是调节性T细胞中高度表达的一种miRNA,其对于维持正常的Treg细胞的免疫调节功能发挥着至关重要的作用,Treg细胞中的miR-146a缺失可导致CD4T和CD8T细胞释放的IFN- $\gamma$ 明显增加,发生类似于Th1介导的免疫损伤<sup>[5]</sup>。多项研究表明肺结核患者外周血单个核细胞(PBMC)中miR-146a较正常人显著低表达<sup>[6]</sup>。Li等研究还发现miR-146a基因多态性通过调节TLR信号通路强度进而调节对结核菌感染的易感性<sup>[7]</sup>,因此,miR-144与miRNA-146a表达水平在结核诱导的疾病中发挥着重要作用。

我们研究结果发现结核性胸膜炎患者的全血miRNA144-3p水平显著低于结核潜伏期感染者和健康对照,而结核潜伏期感染者和健康对照之间差异均无统计学意义;miRNA-146a-5p在这三组间均无明显差异。因此miRNA144-3p可能在结核性胸膜炎发病中起到重要作用,具体机制需要进一步研究,miRNA-146a-5p在这三组间未见明显差异,可能与样本量相对较少有关,可进一步加大样本量研究。结核性胸膜炎的诊断目前还无确切的方法,miRNA分子有可能为结核性胸膜炎的诊断方法提供一定的思路。

#### 参考文献:

- [1] Almeida MI, Reis RM, Calin GA. MicroRNA history: discovery, recent applications, and next frontiers[J]. Mutat Res, 2011, 717 (1-2): 1-8
- [2] Jiao ZJ. MicroRNA: the latent biology diagnosis markers for disease[J]. J Clin Lab Sci, 2012, 30(10): 850-6 (In Chinese)  
(焦志军. 循环microRNA: 潜在的疾病诊断生物标志物[J]. 临床检验杂志, 2012, 30(10): 850-6.)
- [3] Chen X, Yang Q, Zhang M, et al. Diagnosis of active tuberculosis in China using an in-house gamma interferon enzyme-linked immunosorbent assay[J]. Clin Vaccine Immunol, 2009, 16(6): 879-84.
- [4] 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): 1084-90
- [5] Lu LF, Boldin MP, Chaudhry A, et al. Function of miR-146a in controlling Treg cell-mediated regulation of Th1 responses[J]. Cell, 2010, 142 (6): 914-929. (In Chinese)
- [6] Zhang LY, Sun ZG, Gao MQ, et al. Investigation of differentially expressed miRNA in peripheral blood mononuclear cell from the patients with pulmonary tuberculosis[J]. Chin J Antituberc, 2011, 33(11): 729-33. (In Chinese)  
(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): 729-33.)
- [7] Li D, Wang T, Song X, et al. Genetic study of two single nucleotide polymorphisms within corresponding microRNAs and susceptibility to tuberculosis in a Chinese Tibetan and Han population[J]. Hum Immunol, 2011, 72(7): 598-602. (In Chinese)

收稿日期: 2013-02-18 编辑: 崔宜庆

(上接第663页)

杀伤T细胞<sup>[3,4]</sup>。同时本实验采取的受体菌乳酸球菌为益生菌,本实验采用此菌作为疫苗表达系统有着不可比拟的优越性<sup>[5]</sup>。本实验的检测结果显示,该重组乳酸菌口服免疫小鼠后,能诱发其产生抗HCV NS3的高水平抗体。T细胞亚型流式细胞仪检测结果证实该疫苗能诱使T0细胞向Th1细胞转换。特异性CTL杀伤实验结果提示该疫苗能够诱发小鼠产生强的细胞免疫反应,可能对HCV感染有一定的防治作用。

#### 参考文献:

- [1] Cohen J. The scientific challenge of hepatitis C[J]. Science, 1999, 285: 26-30.
- [2] Popescu C, Gliga S and Arama V. Trends in hepatitis C virus infection

therapy: protease inhibitors a step forward in the era of direct acting antivirals [J]. Rom J Intern Med, 2013, 50(2): 117-127.

- [3] Wu LH, Zhang C, Shan BE, et al. CD40L-expressing mouse colon cancer colon26 vaccine enhances DC activities[J]. Chin J Cancer Biother, 2010, (5): 514-520. (In Chinese)  
(武立华, 张超, 单保恩, 等. 表达CD40L的小鼠结肠癌colon26瘤苗增强DC活性[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2010, (5): 514-520.)
- [4] Zhang LX, Tang YC, Akbulut H, et al. An adenoviral vector cancer vaccine that delivers a tumor-associated antigen-CD40-ligand fusion protein to dendritic cells [J]. PNAS, 2003, 100(25): 15101-15106.
- [5] Berlec A, Ravnikar M, Strukelj B. Lactic acid bacteria as oral delivery systems for biomolecules[J]. Pharmazie, 2012, 67(11): 891-898.

收稿日期: 2013-04-17 编辑: 吴中非