

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2023.16.010

# 肺结核患儿外周血单个核细胞 miRNA-31、miRNA-146a 表达水平检测价值

宋煜<sup>1</sup>, 王雅楠<sup>2</sup>, 徐於<sup>1</sup>, 王聿佳<sup>1</sup>, 熊英<sup>1△</sup>

陕西省康复医院:1. 检验科;2. 儿科, 陕西西安 710065

**摘要:**目的 分析肺结核(PTB)患儿外周血单个核细胞(PBMC)miRNA-31、miRNA-146a 表达水平,以及上述指标与细胞免疫和炎症因子的相关性。**方法** 选取该院 2019 年 2 月至 2022 年 2 月收治的 75 例 PTB 患儿作为观察组,另选取同期健康体检儿童 70 例作为对照组。比较两组 PBMC miRNA-31、miRNA-146a 表达水平,外周血 T 淋巴细胞亚群、血清炎症因子水平。采用 Pearson 相关分析 PBMC miRNA-31、miRNA-146a 表达水平与 T 淋巴细胞亚群、炎症因子的关系。采用受试者工作特征(ROC)曲线分析 miRNA-31、miRNA-146a 联合检测诊断儿童 PTB 的效能。**结果** 观察组 PBMC miRNA-31、miRNA-146a 表达水平高于对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。观察组 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值低于对照组,而 CD8<sup>+</sup> 比例高于对照组,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。观察组白细胞介素(IL)-2、IL-6、IL-8 水平均高于对照组,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。Pearson 相关分析发现,PTB 患儿 PBMC miRNA-31、miRNA-146a 表达水平与 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup> 比例及 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值均呈负相关( $P < 0.05$ ),与 CD8<sup>+</sup> 比例及 IL-2、IL-6、IL-8 水平均呈正相关( $P < 0.05$ )。ROC 曲线分析结果显示,miRNA-31、miRNA-146a 表达水平联合检测诊断儿童 PTB 的曲线下面积均大于单项检测,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。**结论** 儿童 PTB PBMC miRNA-31、miRNA-146a 均存在异常高表达,与细胞免疫、炎症因子均密切相关。

**关键词:**肺结核; miRNA-31; miRNA-146a; 细胞免疫; 炎症因子

中图法分类号:R725.1

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2023)16-2348-04

## Clinical value of expression of miRNA-31 and miRNA-146a in peripheral blood mononuclear cells of children with pulmonary tuberculosis

SONG Yu<sup>1</sup>, WANG Ya'nan<sup>2</sup>, XU Yu<sup>1</sup>, WANG Yujia<sup>1</sup>, XIONG Ying<sup>1△</sup>

1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Pediatrics, Shaanxi Rehabilitation Hospital, Xi'an, Shaanxi 710065, China

**Abstract: Objective** To analyze the expression levels of miRNA-31 and miRNA-146a in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of children with pulmonary tuberculosis (PTB), and the correlations between the above indexes and cellular immunity, inflammatory factors. **Methods** A total of 75 children with PTB admitted to Shaanxi Rehabilitation Hospital from February 2019 to February 2022 were selected as the observation group, and 70 healthy children who underwent physical examination during the same period were selected as the control group. The expression levels of miRNA-31 and miRNA-146a in PBMC, peripheral blood T lymphocyte subsets and serum inflammatory factors were compared between the two groups. Pearson correlation analysis was used to determine the relationships between the expression levels of miRNA-31, miRNA-146a in PBMC and peripheral blood T lymphocyte subsets, inflammatory factors. The receiver operating characteristic (ROC) curve was used to analyze the efficacy of combined detection of miRNA-31 and miRNA-146a in the diagnosis of PTB in children. **Results** The expression levels of PBMC miRNA-31 and miRNA-146a in the observation group were higher than those in the control group, and the differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ). The levels of CD3<sup>+</sup> proportion, CD4<sup>+</sup> proportion, CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> ratio in the observation group were lower than those in the control group, while the proportion of CD8<sup>+</sup> was higher than that in the control group, and the differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ). The levels of interleukin (IL)-2, IL-6 and IL-8 in the observation group were higher than those in the control group, and the differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ). Pearson correlation analysis showed that the expression levels of miRNA-31 and miRNA-146a in PBMC of children with PTB correlated negatively with CD3<sup>+</sup> proportion, CD4<sup>+</sup> proportion and CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> ratio ( $P < 0.05$ ), and correlated positively with CD8<sup>+</sup> proportion, IL-2, IL-6 and IL-8 levels ( $P < 0.05$ ). The results of ROC curve analysis showed that the area under the curve (AUC) of combined detection of

作者简介:宋煜,男,主管技师,主要从事临床医学检验和诊断方面的研究。△ 通信作者, E-mail:350236031@qq.com。

网络首发 [http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1167.R.20230727.1712.004.html\(2023-07-28\)](http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1167.R.20230727.1712.004.html(2023-07-28))

miRNA-31 and miRNA-146a expression levels in PBMC for diagnosis PTB in children was greater than that of single detection, the differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The expressions of miRNA-31 and miRNA-146a in PBMC of children with PTB are abnormally high, which relates closely to cellular immunity and inflammatory factors.

**Key words:** pulmonary tuberculosis; miRNA-31; miRNA-146a; cellular immunity; inflammatory factor

肺结核 (PTB) 是由结核分枝杆菌感染人体肺部引起的一种慢性传染病, 病情严重时可导致人死亡, 是威胁人类生命健康安全的重大公共卫生问题之一<sup>[1]</sup>。相关调查数据显示, 儿童 PTB 在所有 PTB 患者中比例为 10%, 且儿童存在不同于成年人的发病特点, 包括免疫学发病机制、临床症状及预后转归等<sup>[2]</sup>。由于儿童 PTB 临床表现普遍不典型, 且目前诊断技术有限, 难以实现早期准确诊断, 易导致病情延误, 不利于患儿预后<sup>[3]</sup>。因此, 寻找一种新型的标志物进行 PTB 早期诊断成为亟待解决的难题。微小核糖核酸 (miRNA) 是近年来发现的一类非编码单链内源性小分子 RNA, 主要通过与其相关碱基配对来调节靶基因或 (和) 调控蛋白表达, 进一步参与疾病的发生、发展过程<sup>[4]</sup>。目前, 国内外已有不少关于 miRNA 和 PTB 的研究<sup>[5-6]</sup>, 但主要集中在成人 PTB 中, 关于儿童 PTB 和 miRNA 的关系研究鲜见报道。鉴于此, 本研究通过分析 PTB 儿童外周血单个核细胞 (PBMC) miRNA-31、miRNA-146a 表达水平, 以及上述指标与免疫细胞和炎症因子的相关性, 以期儿童 PTB 的诊断和治疗提供新的靶点和思路, 现将结果报道如下。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选取本院 2019 年 2 月至 2022 年 2 月收治的 75 例 PTB 患儿作为观察组, 其中男 45 例, 女 30 例; 年龄 3~12 岁, 平均 (6.12±1.30) 岁。另选取本院同期健康体检的 70 例儿童作为对照组, 其中男 42 例, 女 28 例; 年龄 3~12 岁, 平均 (6.09±1.32) 岁。两组年龄、性别比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。纳入标准: (1) 观察组所有患儿均符合《儿童肺结核的临床诊断标准和治疗方案 (试行)》<sup>[7]</sup> 中的诊断标准, 对照组儿童体检各项指标和检查结果均无异常; (2) 年龄 ≤ 12 岁; (3) 入组前未接受相关治疗; (4) 临床资料完整。排除标准: (1) 神志异常; (2) 合并重要脏器疾病; (3) 伴有重大感染或免疫性疾病。所有研究对象监护人均知情本研究, 并签署知情同意书。本研究经本院医学伦理委员会审核批准。

**1.2 方法** (1) PBMC miRNA-31、miRNA-146a 表达水平检测: 采用无菌肝素抗凝真空采血管采集所有儿童静脉血 3 mL, 以密度梯度离心法分离 PBMC。采用 Trizol 法提取标本总 RNA, 遵循 miRNA 反转录试剂盒 (购自北京 Invitrogen 公司) 获取 cDNA 保存至 -80℃ 冰箱中备用, 采用实时荧光定量聚合酶链反应 (PCR) 检测 PBMC miRNA-31、miRNA-146a 表达水平。miRNA-31 引物序列如下: 上游引物为 5'-GC-CGCAGGCAGATGCTG-3'; 下游引物为 5'-CAGT-

GCTGGGTCCGAGTGA-3'。miRNA-146a 引物序列如下: 上游引物为 5'-CATGATTGTATGACTG-CACTC-3'; 下游引物为 5'-TCTTGCTAGGACT-GACCA-3'。以 U6 作为 miRNA 内参, 上游引物为 5'-AGCGAGCATCCCCAAAGTT-3'; 下游引物为 5'-GGGCACGAAGGCTCATCATT-3'。所有引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成。采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算 miRNA-31、miRNA-146a 表达水平。(2) 免疫细胞检测: 采用 FCM 型流式细胞仪 (购自常州必达生物科技有限公司) 检测 T 淋巴细胞亚群, 指标包括 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> 比例, 并计算 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值。相关抗体均购自金斯瑞生物科技股份有限公司。(3) 炎症因子检测: 抽取所有受试者空腹静脉血 3 mL, 离心半径 8 cm, 3 500 r/min 离心 10 min 获取血清, 采用酶联免疫吸附试验检测白细胞介素 (IL)-2、IL-6、IL-8 水平。所有操作均按照试剂盒说明书进行, 试剂盒均购自深圳晶美生物科技有限公司。

**1.3 观察指标** 比较两组 PBMC miRNA-31、miRNA-146a 表达水平, 以及 T 淋巴细胞亚群、炎症因子水平; 分析 PBMC miRNA-31、miRNA-146a 表达水平与 T 淋巴细胞亚群、炎症因子的相关性, 评估 PBMC miRNA-31、miRNA-146a 表达水平单独及联合检测诊断儿童 PTB 的效能。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS22.0 统计软件进行数据处理及统计分析。符合正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组间比较采用  $t$  检验; 计数资料以例数或百分率表示, 两组间比较采用  $\chi^2$  检验; 采用 Pearson 相关分析 PBMC miRNA-31、miRNA-146a 表达水平与 T 淋巴细胞亚群、炎症因子的相关关系; 采用受试者工作特征 (ROC) 曲线分析 miRNA-31、miRNA-146a 联合检测诊断儿童 PTB 的效能。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 两组 PBMC miRNA-31、miRNA-146a 表达水平比较** 与对照组比较, 观察组 PBMC miRNA-31、miRNA-146a 表达水平均升高, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

表 1 两组 PBMC miRNA-31、miRNA-146a 表达水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	miRNA-31	miRNA-146a
观察组	75	0.84±0.21	4.94±1.02
对照组	70	0.55±0.17	3.55±0.24
<i>t</i>		9.101	11.116
<i>P</i>		<0.001	<0.001

**2.2 两组 T 淋巴细胞亚群水平比较** 与对照组比较, 观察组 CD3<sup>+</sup> 比例、CD4<sup>+</sup> 比例、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值均降低, 而 CD8<sup>+</sup> 比例升高, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

表 2 两组 T 淋巴细胞亚群水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	CD3 <sup>+</sup> 比例 (%)	CD4 <sup>+</sup> 比例 (%)	CD8 <sup>+</sup> 比例 (%)	CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> 比值
观察组	75	63.20±4.91	37.19±3.56	27.62±2.48	1.35±0.21
对照组	70	68.11±5.26	43.28±4.67	26.56±2.29	1.76±0.37
t		-5.814	-8.866	2.668	-8.275
P		<0.001	<0.001	0.009	<0.001

**2.3 两组炎症因子水平比较** 与对照组比较, 观察组 IL-2、IL-6 及 IL-8 水平均升高, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 3。

**2.4 PTB 患儿 PBMC miRNA-31、miRNA-146a 表达水平与 T 淋巴细胞亚群、炎症因子水平的相关性分析** Pearson 相关分析发现, PTB 患儿 PBMC miRNA-31、miRNA-146a 表达水平与 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup> 比例及 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值均呈负相关 ( $P < 0.05$ ), 与 CD8<sup>+</sup> 比例及 IL-2、IL-6、IL-8 水平均呈正相关 ( $P < 0.05$ )。见表 4。

表 3 两组炎症因子水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ , ng/L)

组别	n	IL-2	IL-6	IL-8
观察组	75	60.48±4.89	67.17±5.58	64.12±5.62
对照组	70	57.21±3.21	45.12±2.56	62.43±3.56
t		4.724	30.221	2.222
P		<0.001	<0.001	0.034

表 4 PTB 患儿 PBMC miRNA-31、miRNA-146a 表达水平与 T 淋巴细胞亚群、炎症因子的相关性分析

指标	miRNA-31		miRNA-146a	
	r	P	r	P
CD3 <sup>+</sup> 比例	-0.592	<0.001	-0.691	<0.001
CD4 <sup>+</sup> 比例	-0.634	<0.001	-0.624	<0.001
CD8 <sup>+</sup> 比例	0.624	<0.001	0.705	<0.001
CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> 比值	-0.682	<0.001	-0.577	0.006
IL-2	0.642	<0.001	0.627	<0.001
IL-6	0.625	<0.001	0.617	<0.001
IL-8	0.679	<0.001	0.613	0.012

**2.5 PTB 患儿 PBMC miRNA-31、miRNA-146a 表达水平检测诊断儿童 PTB 的效能** ROC 曲线分析结果显示, PBMC miRNA-31、miRNA-146a 表达水平联合检测诊断儿童 PTB 的曲线下面积 (AUC) 均大于单项检测, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 5、图 1。

表 5 PBMC miRNA-31、miRNA-146a 表达水平检测诊断儿童 PTB 的效能

指标	AUC	灵敏度 (%)	特异度 (%)	Youden 指数	cut-off 值	95%CI
miRNA-31	0.701	74.91	66.23	0.411	0.74	0.645~0.762
miRNA-146a	0.718	72.48	70.16	0.426	4.03	0.651~0.779
联合检测	0.862	90.45	68.73	0.732	—	0.786~0.943

注: —表示无数据。

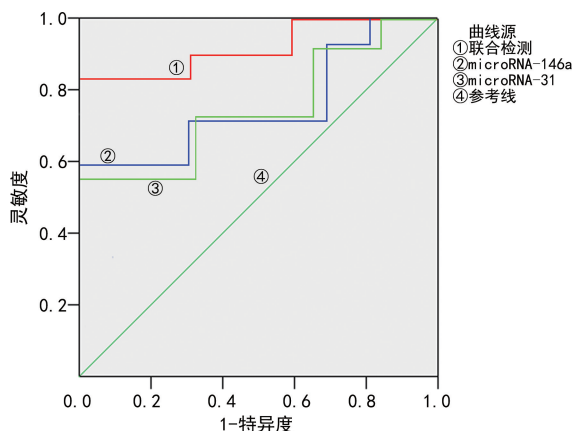


图 1 PBMC miRNA-31、miRNA-146a 表达水平检测诊断儿童 PTB 的 ROC 曲线

### 3 讨论

结核病为常见的慢性传染病之一, 伴随着病情的日益进展, 可累及多个器官, 且以 PTB 最多见, 患者往往存在严重的肺组织损伤, 进而导致肺功能降低, 严重威胁健康及生命<sup>[8-10]</sup>。因此, 早期实现有效诊断

与及时治疗 PTB 是国内外研究的热点。miRNA 不但扮演细胞内基因调控网络关键分子的角色, 亦是多种病理状态下的重要生物标志物。近年来, 已有不少研究报道证实, 血液循环中的多种 miRNA 均可作为肺癌及肺炎等疾病的生物标志物<sup>[11-13]</sup>。血清中 PBMC 或 PBMC 中的 miRNA 检测为疾病诊断、疗效评估及个性化治疗均提供了操作简便的无创性检测手段。因此, 本研究通过分析儿童 PTB PBMC miRNA-31、miRNA-146a 表达水平, 以及上述指标与 T 淋巴细胞亚群和炎症因子的相关性, 对儿童 PTB 的诊断价值, 旨在为上述两项指标作为儿童 PTB 的临床诊断标志物提供理论依据。

本研究结果表明, 观察组 PBMC miRNA-31、miRNA-146a 表达水平明显高于对照组, 这提示儿童 PTB PBMC miRNA-31、miRNA-146a 均存在异常高表达。可能是由于 miRNA-31 主要介导 Janus 激酶/信号与转录激活子 (JAK/STAT) 及丝裂原激活的蛋白激酶 (MAPK) 等多种结核感染有关信号通路, 并通

过对上述相关信号通路活性的调控,进一步抑制机体的免疫应答,最终引发结核分枝杆菌的感染<sup>[14]</sup>。miRNA-146a 高表达会提升巨噬细胞对细胞内结核分枝杆菌的灭杀能力,进而抑制该致病菌的生长、繁殖,是机体应对结核分枝杆菌感染时的自然应答<sup>[15]</sup>。ROC 曲线分析结果显示, PBMC miRNA-31、miRNA-146a 表达水平联合检测诊断儿童 PTB 的 AUC 均高于单项检测,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),提示临床工作中可通过对上述两项指标表达水平进行联合检测实现对儿童 PTB 的辅助诊断。此外,与对照组比较,观察组 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup> 比例及 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值均降低,而 CD8<sup>+</sup> 比例升高,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),提示结核免疫属于细胞免疫,主要是由单核巨噬细胞介导的复杂免疫应答过程,而 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> 比例及 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值均是细胞免疫的重要指标。而 PTB 的发生会对患儿肺组织产生一定的损伤,进而影响免疫应答,最终导致上述指标的异常表达<sup>[16]</sup>。另外,与对照组比较,观察组 IL-2、IL-6 及 IL-8 水平均升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),提示 IL-2、IL-6 及 IL-8 均是临床上应用较为广泛的炎症因子,在机体出现创伤、感染等状况时,其在血清中水平急剧升高,可能对儿童 PTB 具有一定的辅助诊断作用。PTB 患儿因肺组织遭受不同程度的损伤,进而导致上述指标出现应激性升高,并参与疾病的进展过程<sup>[17]</sup>。此外, Pearson 相关分析发现, PTB 患儿 PBMC miRNA-31、miRNA-146a 表达水平与 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup> 比例及 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值水平均呈负相关( $P < 0.05$ ),与 CD8<sup>+</sup>、IL-2、IL-6、IL-8 水平均呈正相关( $P < 0.05$ )。说明 miRNA-31、miRNA-146a 可能是通过靶向调控 MAPK 及 JAK/STAT 等信号通路,从而发挥炎症免疫调控作用,进而参与 PTB 的发生、发展。

综上所述,儿童 PTB PBMC miRNA-31、miRNA-146a 均存在明显高表达,且与细胞免疫、炎症因子均密切相关,可作为辅助诊断 PTB 的潜在生物学标志物,值得临床重点关注。

## 参考文献

- [1] 江佳艳,肖筱,李志鹏,等.早期炎症细胞因子对肺结核患者预后的预测作用[J].复旦学报(医学版),2022,49(2):189-193.
- [2] 杨丽燕,黄延风,余雅,等.920例儿童肺结核临床流行病学特征分析[J].临床儿科杂志,2019,37(6):413-417.
- [3] 冯佳怡,王有俊,张鹏,等.不同剂量多排螺旋CT扫描对

儿童肺结核的诊断价值比较研究[J].现代生物医学进展,2019,19(11):2096-2099.

- [4] 王琴,付宇,王平.沉默 miRNA-16 对肺结核模型小鼠免疫功能的调控作用及其机制研究[J].中国比较医学杂志,2020,30(4):86-91.
- [5] 肖敏,杨松,陈杨,等.结核病患者中靶向调控维生素 D 受体的 microRNA 的初步筛选[J/CD].中华肺部疾病杂志(电子版),2020,13(6):731-736.
- [6] 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.
- [7] 中华医学会儿科学分会呼吸学组,《中华儿科杂志》编辑委员会.儿童肺结核的临床诊断标准和治疗方案(试行)[J].中华儿科杂志,2006,44(4):249-251.
- [8] 包训迪,王庆,王舒,等.不同检测方法在结核利福平耐药快速诊断中的临床应用研究[J].检验医学与临床,2021,18(18):2651-2654.
- [9] 李观强,张娟娟,梁娟,等.miR-20a-5p 在肺结核外周血单核细胞中的表达及临床价值[J].中国免疫学杂志,2019,35(14):1739-1742.
- [10] 尚晓倩,王亮,田凤鸣,等.miRNA-192 调控 NOD2 在结核分枝杆菌感染中的作用研究[J].中国病原生物学杂志,2020,15(4):392-395.
- [11] 久太,颜然然,冯喜英,等.差异表达的 miR-181a-5p、miR-141-3p 在青海藏族肺结核诊断中作用[J/CD].中华肺部疾病杂志(电子版),2019,12(6):702-707.
- [12] 时广利,马尚,尹颜军,等.肺结核患者血清中 miRNA-16 和 miRNA-155 检测的临床意义[J].临床肺科杂志,2019,24(8):1450-1454.
- [13] 王欣,高瑜,张权武.微小 RNA-132 在肺结核患者外周血中的表达及其临床意义[J].医学临床研究,2021,38(2):246-248.
- [14] ZHANG Z, MAI Q, YANG L, et al. microRNA-31 mediated by interferon regulatory factor 7 signaling facilitates control of Mycobacterium tuberculosis infection[J]. Int J Med Microbiol, 2022, 312(7): 151569.
- [15] IANNACCONE M, COSENZA G, PAUCIULLO A, et al. Milk microRNA-146a as a potential biomarker in bovine tuberculosis[J]. J Dairy Res, 2018, 85(2): 178-180.
- [16] 谢锦慧,喻容,石国民,等.初治肺结核肠道菌群改变与免疫指标的相关性研究[J].中华预防医学杂志,2021,55(12):1486-1490.
- [17] 李华,许婉华,龚兰,等.血清中相关细胞因子表达水平变化对肺结核治疗效果的评估[J].实用医学杂志,2022,38(17):2203-2208.

(收稿日期:2022-10-16 修回日期:2023-04-10)