

结核性胸膜炎患者外周血 miR-365a-3p、miR-29a-3p 的表达及意义

张帆¹, 刘守江¹, 魏巍¹, 张国良², 陈心春², 周伯平², 王健¹

(1. 深圳市南山区慢性病防治中心结核病防治科, 广东 深圳 518054;

2. 深圳市第三人民医院, 广东 深圳 518112)

【摘要】 目的 探讨外周血微小 RNA (miRNA) 在结核性胸膜炎患者和健康对照者之间的差异表达。方法 选取 30 例结核性胸膜炎患者为实验组, 30 例健康者为对照组, 采集外周血, Trizol 法抽提外周血总 mRNA, RT-PCR 合成 cDNA, 荧光定量 PCR 检测外周血 miR-365a-3p、miR-29a-3p 的表达。结果 结核性胸膜炎组患者外周血 miR-365a-3p 表达(0.66±0.60)明显高于健康对照组(0.33±0.29), 差异有统计学意义($P<0.05$), 而结核性胸膜炎组患者外周血 miR-29a-3p 表达(0.74±0.65)与健康对照组(0.75±0.31)相似, 差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 外周血 miR-365a-3p 可能与结核性胸膜炎发生密切相关, 并可能成为诊断结核性胸膜积液的靶点之一。

【关键词】 结核; 胸膜炎; 微小 RNA

【中图分类号】 R52 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2013)21-3182-03

Expression and significance of miR-365a-3p and miR-29a-3p in the periphery blood of patients with tuberculous pleurisy. ZHANG Fan¹, LIU Shou-jiang¹, WEI Wei¹, ZHANG Guo-liang², CHEN Xin-chun², ZHOU Bo-ping², WANG Jian¹. 1. Department of Tuberculosis Prevention and Control, Shenzhen Nanshan Chronic Disease Control Center, Shenzhen 518054, Guangdong, CHINA; 2. The Third People's Hospital of Shenzhen, Shenzhen 518112, Guangdong, CHINA

【Abstract】 Objective To investigate the expression of peripheral blood miRNA in patients with tuberculous pleurisy and explore its clinical significance. **Methods** The expression of miR-365a-3p, miR-29a-3p were measured by RT-PCR and fluorescence quantitative PCR in 30 patients with tuberculous pleurisy (the study group) and 30 healthy donors (the control group). **Results** The expression of miR-365a-3p in the study group [(0.66±0.60)] were significantly higher than the control group [(0.33±0.29)], $P<0.05$. There was no statistically significant difference in miR-29a-3p expression between the two groups ($P>0.05$). **Conclusion** miR-365a-3p may be closely correlated to tuberculous pleurisy, which can be a new biomarker in the diagnosis of tuberculous pleurisy.

【Key words】 Tuberculosis; Pleurisy; miRNA

结核性胸膜炎是由结核菌及其代谢产物进入高度过敏状态的机体胸膜腔而引起的胸膜炎症, 占结核性疾病的 4%, 我国胸腔积液患者中超过一半是有结核性胸膜炎引起。结核性胸膜积液如果未能及时诊断与治疗, 会造成胸膜肥厚粘连, 限制性肺功能下降。结核性胸膜炎的诊断仍是目前临床难题之一, 缺乏有效、客观、可靠的方法。近年来的研究表明, 微小 RNA (microRNA, miRNA) 在人体内发挥重要的生物学作用, 其是一类高度保守的非编码单链小 RNA, 近 1/3 的人类基因表达受 miRNA 调控, 涉及细胞增殖、分化、凋亡等多个过程, miRNA 表达异常可导致一些疾病的发生^[1-2]。研究显示, miRNA 可能参与肺结核

病的发生和发展。本研究着重进一步探讨 miRNA 在结核性胸膜炎患者中的表达及临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2012 年 6~11 月在我院就诊的结核性胸膜炎患者 30 例, 年龄 17~43 岁, 平均 27 岁, 其中男性 16 例, 女性 14 例; 所有患者根据病史、体征、X 线、超声和胸腔积液检查^[3]诊断。无脓胸产生, 无慢性肺病, 无心、肝、肾等脏器合并症及其他感染, 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。同时选取与病例组年龄、性别匹配的 30 例健康者为对照组。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 实验方法

1.2.1 样本采集 采集两组研究对象的外周血 5 ml,肝素锂抗凝,标本采集后 30 min 内,分装 200 μ l 全血于已预装有 Trizol 和研磨珠的冻存管中,振荡器振荡混匀,-80 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.2 miRNA 提取 采用 Invitrogen 公司 Trizol Reagent 试剂盒抽提全血中总 RNA,适量无 RNase 水充分溶解总 RNA。采用核酸测定仪测定浓度和纯度,琼脂糖凝胶电泳分析 RNA 完整性良好;调整 RNA 浓度,于-80 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.3 逆转录 miRNA 取总 RNA 1 μ l,2 \times 反转录缓冲混合物 10 μ l,RNase Free 水 5 μ l,反转录酶 2 μ l,0.1%BSA 2 μ l。37 $^{\circ}$ C 60 min,85 $^{\circ}$ C 5 min,4 $^{\circ}$ C 5 min。逆转录成 cDNA 放置-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.4 荧光定量 PCR 扩增方法参照荧光定量 PCR 试剂盒(Takara 公司),分别取 SYBR Green 12.5 μ l,待测样品 cDNA 2 μ l,上游引物 1 μ l,下游引物 1 μ l,水 8.5 μ l,总体积 25 μ l。引物由 invitrogen 公司合成,引物序列:miR-365a-3p:5'-GCGCTAATGCCCTA-AAAATCCTT-3';miR-29aL-3p:5'-CGTAGCACCCTGAAATCGGTT-3';下游引物为通用引物;U6: TAKARA 公司产品,Code:D356-03, Lot:B101B。扩增条件:预变性 95 $^{\circ}$ C 10 s;变性和延伸 95 $^{\circ}$ C 5 s;60 $^{\circ}$ C 20 s,共 40 个循环。采用荧光定量 PCR 中的相对定量法,以管家基因 U6 作为内参,以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示 miRNA 相对表达量,具体计算方法如下,待测 miRNA 的 Ct 值减去 U6 的 Ct 值,获得各样本中待测 miRNA 的 ΔCt 值,然后采用实验组 miRNA 的 ΔCt 值减去健康对照组的 ΔCt ,获得 $\Delta\Delta Ct$,最后计算 miRNA 相对表达量 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。

1.3 统计学方法 采用 SPSS13.0 统计软件进行数据分析,两组间外周血 miR-365a-3p 和 miR-29a-3p 的表达差异比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组外周血 miR-365a-3p 的表达 结核性胸膜炎组患者外周血 miR-365a-3p 表达(0.66 \pm 0.60)明显高于健康对照组(0.33 \pm 0.29),差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 1。

2.2 两组外周血 miR-29a-3p 的表达 结核性胸膜炎组患者外周血 miR-29a-3p 表达(0.74 \pm 0.65)与健康对照组(0.75 \pm 0.31)相似,差异无统计学意义($P > 0.05$),见图 2。

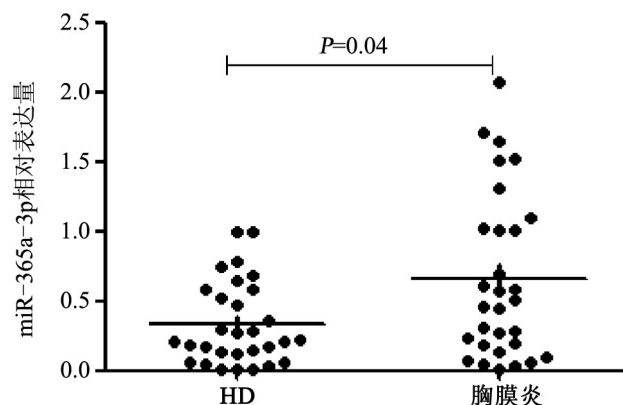


图1 外周血 miR-365a-3p 在结核性胸膜炎患者和健康对照组中的表达

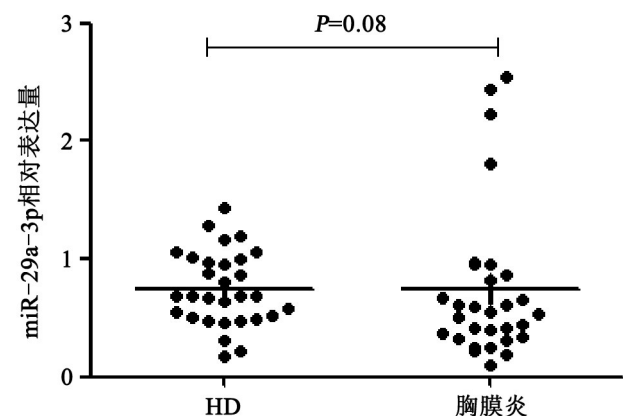


图2 外周血 miR-29a-3p 在结核性胸膜炎患者和健康对照组中的表达

3 讨论

结核性胸膜炎发病率高,在肺外结核中仅次于淋巴结核,其确诊主要依赖于痰、胸腔积液、胸膜活检检出结核杆菌或发现结核性肉芽肿,临床上结核性胸膜炎常规检查方法效率低,及时准确地诊断结核性胸腔积液仍存在较多困难。随着新研究新技术的迅速发展,生物学指标在结核性胸膜炎的辅助诊断中起到重要作用,特别是近年来研究发现 miRNA 分子与一些疾病的发生、发展息息相关。而在我们的研究中发现结核性胸膜炎患者外周血 miR-365a-3p 表达明显高于健康对照组,miR-29a-3p 表达在两组之间差异无统计学意义。

Xu 等^[4]研究发现 miR-365a 可能在机体炎症反应中起到重要作用,miR-365a 与细胞炎症因子 IL-6 表达相关,miR-365a 可通过直接与 IL-6 基因的调控区域结合,负性调节 IL-6 mRNA 表达,从而抑制 IL-6 蛋白生成,miR-365a 还可能通过非直接途径抑制 IL-6 表达,而且其调控 IL-6 的能力超过 let-7a。在我们的研究中也发现结核性胸膜炎患者外周血 miR-365a-3p 表达明显升高,其可能参与了结核性胸膜炎炎症反应的发生。

外周血 CD₃⁺T 细胞中 CD₁₆₆ 的表达在初诊结直肠癌诊断中的应用

谭冬梅¹, 邓慧兰¹, 胡淑芬¹, 郭秀仪¹, 黄福喜²

(广州市番禺区中心医院检验科¹, 肿瘤科², 广东 广州 511400)

【摘要】 目的 探讨初诊结直肠癌患者血液中 CD₃⁺T 细胞中 CD₁₆₆ 的表达情况及其临床意义。方法 分为 167 例初诊结直肠癌患者和 134 例健康体检者, 运用流式细胞术直接免疫荧光法检测外周血 CD₃⁺T 细胞中 CD₁₆₆ 的平均荧光强度, 比较两组 CD₃⁺T 细胞上 CD₁₆₆ 平均荧光强度的差异。结果 对照组 CD₃⁺T 细胞上 CD₁₆₆ 的平均荧光强度为 (125.69±21) 道数, 观察组外周血中 CD₃⁺T 细胞上 CD₁₆₆ 的平均荧光强度为 (171.31±42) 道数, 两组差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。结论 外周血中 CD₃⁺T 细胞上 CD₁₆₆ 的水平在筛查结直肠癌有一定的临床意义。

【关键词】 结直肠癌; CD₃⁺T 细胞; CD₁₆₆

【中图分类号】 R735 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2013)21-3184-03

Expression of CD₁₆₆ in the CD₃⁺ T cells in peripheral blood and it's application in newly diagnosed colorectal cancer. TAN Dong-mei¹, DENG Hui-lan¹, HU Shu-fen¹, GUO Xiu-yi¹, HUANG Fu-xi². Department of Clinical Laboratory¹, Department of Oncology², Guangzhou Panyu Central Hospital, Guangzhou 511400, Guangdong, CHINA

【Abstract】 Objective To discuss the expression of CD₁₆₆ in the CD₃⁺ T cells and its clinical significance in newly diagnosed colorectal cancer. **Methods** The fluorescence intensity of CD166 in the CD₃⁺ T cells was detected by flow cytometry in 167 patients of newly diagnosed colorectal cancer (the study group) and 134 healthy subjects (the control group). Then the fluorescence intensity was compared between the two groups. **Results** The mean fluorescence intensity of CD₁₆₆ in the control group was (125.69±21), and that in the study group was (171.31±42), with statistical significant difference between the two groups ($P < 0.01$). **Conclusion** The expression of CD₁₆₆ in the CD₃⁺ T cells in peripheral blood has certain significance in the screening of colorectal cancer.

【Key words】 Colorectal cancer; CD₃⁺ T cells; CD₁₆₆

结直肠癌(CRC)是我国常见恶性肿瘤之一。大多数有临床症状的CRC患者确诊时已是疾病的中晚期,这是治愈率低、致死率高的一个主要原因。所以疾病的早期诊断显得尤为重要。近年,国内外众多研

究团队都在寻找一种简单而有效的早期诊断方法。而运用分子生物学研究肿瘤已成为当今潮流,寻找有价值的分子标志物,可早期发现某些肿瘤。本实验研究 CD₁₆₆ 在结直肠癌患者外周血 CD₃⁺T 细胞中的表达

基金项目:广州市番禺区科技局立项(编号:2011-Z-03-25)

通讯作者:谭冬梅。E-mail:tuutuu7868@163.com

miR-29a 除在抗纤维化中起到重要作用外,在机体免疫应答反应中也起到重要作用,miR-29a 可通过靶向降解 IFN- γ 降低机体对胞内病原体的免疫应答,伊正君等^[6]研究发现活动性肺结核患者痰液中 miR-29a 的表达相对于正常人明显升高,可能在抗结核杆菌感染的过程中发挥着重要作用。但在我们的研究中并未发现结核性胸膜炎患者外周血 miR-29a 的表达与正常人之间的差异,其可能与样本量相对较少有关,具体还需进一步分析。

综上所述,我们的研究发现结核性胸膜炎患者外周血 miR-365a-3p 表达明显升高,其可能参与了结核性胸膜炎炎症反应的发生,具体作用仍待进一步研究。同时,检测外周血 miR-365a-3p 水平结合其他诊

断方法,可能提高结核性胸膜炎的诊断率。

参考文献

- [1] Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, et al. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia [J]. N Engl J Med, 2005, 353(17): 1793-801.
- [2] 孙华麟. miRNA 在类风湿关节炎中的研究进展[J]. 海南医学, 2012, 23(8): 126-128.
- [3] 业秀林, 郝青林. 结核性胸膜炎诊断和治疗进展[J]. 实用心脑血管病杂志, 2009, 17(1): 75-77.
- [4] Xu Z, Xiao SB, Xu P, et al. miR-365, a novel negative regulator of interleukin-6 gene expression, is cooperatively regulated by Sp1 and NF-kappaB [J]. J Biol Chem, 2011, 286(24): 21401-21412.
- [5] 伊正君, 付玉荣, 李瑞芳, 等. 活动性肺结核患者痰液中 miR-29a 的表达[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2012, 32(4): 333-334.

(收稿日期:2013-06-05)