网络出版时间:2022 - 11 - 28 19:43 网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20221128.1718.022.html

血浆外泌体 miR - 26a - 5p 和 miR - 151a - 3p 在结核病中的表达及诊断价值

冯 真[1],张 博[1],邓思齐[1],叶国敏[1],张 辉[1],张万江[1],吴江东[1],李卫民[2]

摘要 **目的** 研究 miR-26a-5p 和 miR-151a-3p 在结核病血浆外泌体中的表达差异性及其诊断价值。**方法** 通过生物信息学网站筛选结核病外泌体中具有差异性表达的 miRNAs(miR-26a-5p 和 miR-151a-3p)。再以 70 例结核病患者(结核病组),58 例体检健康者(健康对照组)样本进行临床验证:采用差速离心法提取血浆外泌体,透射电子显微镜,粒径分析,Western blot 对其鉴定,采用 RT-qPCR 检测血浆外泌体中 miR-26a-5p 和 miR-151a-3p 在结核病组和对照组中的表达水平,并通过 ROC 曲线评价二者在结核病中诊断价值。**结果** 透射电镜、粒径分析、Western blot 鉴定到典型的外泌体特性,即成功提取到血浆外泌体。在临床验证中,以内参和外参同时校准,结核组患者血浆外泌体中 miR-26a-5p 表达水平低于对照组($P<0.000\ 1$),结核组患者血浆外泌体中 miR-151a-3p 表达水平高于对照组($P<0.000\ 1$),与生物信息学结果一致。作为诊断标记,以内参为基准,血浆外泌体 miR-26a-5p、miR-151a-3p 鉴别结核病的曲线下面积(AUC)分别为 0.872、0.709,两者联合诊断结核病的 AUC 为 0.915($P<0.000\ 1$);以外参为基准,血浆外泌体 miR-26a-5p、miR-151a-3p 鉴别结核病的 AUC 分别为 0.829、0.854,两者联合诊断结核病的 AUC 为 0.911($P<0.000\ 1$)。**结论** 结核患者血浆外泌体来源 miR-26a-5p 表达水平降低,miR-151a-3p 表达水平升高,且两者临床诊断效能较高,可能是诊断结核病潜在的生物标志物。

关键词 肺结核;外泌体;miR-26a-5p;miR-151a-3p;验证
中图分类号 R 521
文献标志码 A **文章编号** 1000 - 1492(2022)12 - 1979 - 06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2022.12.022

结核病是由结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*,MTB)引起的最常见的传染病之一。目前,诊断结核病常用的方法是痰涂片,MTB 培养及干扰素释放试验(interferon - γ release assay,IGRA),痰涂片检测时效短、其灵敏度仅为 30% ~ 50%,具有假阴性的特点;结核菌的培育时长达 4 ~ 8 周,敏感度仅有 30% ~ 40%;IGRA 的灵敏度和特异度比前两种方法均高,但不能区分结核潜伏性感染和活动性感染。故开发一种新的结核病诊断标志物尤为重要[1]。研究[2]表明,被各种病原体感染的细胞产生的外泌体可以作为疾病的诊断标记物。外泌体是附着在胞外膜上的囊泡,可通过 microRNAs(miRNAs)、信使 RNA(mRNAs)等信号因子参与细胞免疫应答调控。miRNAs 是 22 个核苷酸的单链非编码 RNA,可与靶 mRNA 的 3′端非翻译区互补序列结合,促进或抑制翻译,从而影响信号通路[3-4]。外泌体 miRNAs 在血液中稳定性好、丰度较高,具备成为疾病潜在生物标志物的可能性。该研究利用基因芯片筛选差异表达的外泌体 miRNAs,而后对其进行临床样本验证,评价其作为结核病诊断标志物的可行性。

1 材料与方法

1.1 病例资料 收集 2019—2021 年在石河子大学第一附属医院就诊的结核病患者的全血 70 例(结核病组)和健康体检人员的全血 58 例(健康对照组)。结核病组纳入标准:① 临床诊断为结核病患者;② 年龄 18 ~ 60 岁,其中男 48 例,女 22 例;③ 无糖尿病、高血压、艾滋病及自身免疫性疾病。排除标准:① 诊断为肺不张、肺栓塞、阻塞性肺炎或其他原发性肺部疾病的患者;② 复发的结核病患者。健康对照组标本为体检人员。健康对照组纳入标准:① 年龄 18 ~ 60 岁,其中男 30 例,女 28 例;② 体检正常。本研究经伦理委员会审核(批号:KJ2021-065-01),研究对象均签署知情同意书。

1.2 主要试剂 BCA 蛋白定量试剂盒(美国 Sigma 公司);CD63 antibody、TSG101 antibody(英国 Abcam 公司);TRIzol(美国 Invitrogen 公司);RT reagent

2022 - 09 - 28 接收
基金项目:国家自然科学基金(编号:U1903118);兵团重点领域科技攻关计划项目(编号:2018AB019)
作者单位:[1]石河子大学新疆地方病与民族疾病教育部重点实验室,石河子 832002
[2]首都医科大学附属北京胸科医院国家结核病临床研究室,北京 101100
作者简介:冯 真,女,硕士研究生;
吴江东,男,副教授,责任作者,E-mail:1556874645@qq.com;
李卫民,女,教授,责任作者,E-mail:1711362459@qq.com

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Kit、TB GreenqPCR 试剂盒(日本 TaKaRa 公司);Immobilon Western HRP 发光试剂(美国 millipore 公司);三氯甲烷、异丙醇和无水乙醇(上海试一化学试剂有限公司)。

1.3 主要仪器 高速离心机(德国 Eppendorf 公司);纳米颗粒追踪分析仪(德国 Particle Metrix 公司);透射电子显微镜(日本 JEOL 公司);多功能酶标仪(美国 PerkinElmer 公司);蛋白凝胶电泳仪(美国 Thermo Fisher 公司);实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)。

1.4 方法

1.4.1 miRNA 的获取 NCBI-GEO (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo) 是一个微阵列谱数据库,提供两种血样外泌体 miRNA 表达谱(GSE116542、GSE124120)。GSE116542 数据集,基于 GPL19117,包括 11 个结核病血样和 8 个健康血样的外泌体样本。GSE124120 数据集基于 GPL16791,包括 2 个结核病血样和 1 个健康血样的外泌体样本。以 $P<0.05$ 和|log fold change (FC)|≥2 作为截断标准。

1.4.2 临床样本的采集与分离 分别用 EDTA 的抗凝采血管采集结核病组和健康对照组的外周血,标本采集后在 4 h 内进行 4 ℃、3 242 r/min 离心 15 min 获得的上清液即为血浆,1.5 ml RNA 无酶离心管进行分装。室温溶解血浆,加入 PBS 配平(每一次离心前均需加入 PBS 配平),4 ℃、1 450 r/min 离心 10 min,弃沉淀,取上清液,4 ℃、3 730 r/min 离心 20 min,弃沉淀,取上清液,4 ℃、8 350 r/min 离心 30 min,经 0.22 μm 滤膜纯化,移至专用离心管中,4 ℃、253 000 r/min 离心 70 min,弃上清液,取沉淀,用 PBS 重悬后 4 ℃、253 000 r/min 离心 70 min。外泌体微球在 PBS(30 μl)中重悬于 -80 ℃保存。

1.4.3 外泌体的鉴定 外泌体的形态用透射电子显微镜进行观察。将外泌体固定在载样铜网上,置于 50 μl 1% 戊二醛液滴上 5 min,将铜网置于 100 μl ddH_2O 2 min(洗 8 次),置于 50 μl 草酸双氧铀液滴上(pH 7),5 min;将铜网置于甲基纤维素液滴上 10 min,冰上操作。将铜网放到样品台顶端的不锈钢环上,在滤纸上吸去多余液体,室温干燥 10 min,80 kV 下拍摄电镜照片。用纳米颗粒跟踪分析仪检测颗粒大小,去离子水清洁比色皿 1 ~ 2 次;吸取 100 μl 外泌体悬液,并且增加 PBS 稀释至 1 ml,进样检测。试验进行 3 次。采用 BCA 蛋白定量试剂盒检测外泌体蛋白浓度(按说明书操作),取 BCA 定量后的外泌体蛋白样本适量,加入 1/4 体积的 5 × 上样缓冲液,混匀后沸水煮 10 min。SDS-PAGE 凝胶电泳进行蛋白分离,转移到 0.22 mm PVDF 膜上。脱脂乳封闭 1 h 后,加入一抗(CD63、TSG101)过夜孵育。PBST 洗脱 3 次加入二抗,室温孵育 2 h,PBST 再次洗脱 3 次,采用 Immobilon Western HRP 发光试剂进行显色并拍照。

1.4.4 定量 RT-qPCR 检测 miR-26a-5p 和 miR-151a-3p 的相对表达量 TRIzol 法提取外泌体 RNA,使用逆转录试剂盒,按照操作说明书将提取的 RNA 反转录为 cDNA,-20 ℃保存备用。U6 正向引物序列为 5′-GCTTCGGCAGCACATATACTAA -3′,反向引物序列为 5′-CGAATTTGCGTGTCATCCTT -3′;cel-miR-39 外参引物序列为 5′-AACACGCTCAC-CGGGTGT-AA-3′,hsa-mir-R 反向引物序列为 5′-CAGTGCAGGG-TCCGAGGT -3′,hsa-miR-26a-5p 正向引物序列为 5′-AGCCAGCGTTCAAGTAATCCAG-3′,hsa-miR-151a-3p 正向引物序列为 5′-AAGCGAC-CCTAGACTGAAGCT -3′。反应步骤:95 ℃、30 s,1 个循环;95 ℃、5 s,60 ℃、34 s,40 个循环。miRNA 的表达量用内参 U6 和外参 cel-miR-39 进行标准化,相对表达水平用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 的方法进行计算。

1.5 统计学处理 采用 GraphPad Prism 8 软件和 SPSS 23.0 软件对所有数据进行分析,数据呈非正态分布,用中位数(四分位数间距)来表示,组间比较采用 Mann-Whitney *U* 检验,采用 ROC 曲线确定截断值,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 获取的 miRNA 两个外泌体 miRNA 表达谱数据集显示,两个差异表达的 miRNA 分别为 miR-26a-5p 和 miR-151a-3p,其中 miR-26a-5p 表达水平下调,miR-151a-3p 表达水平上调。见图 1。

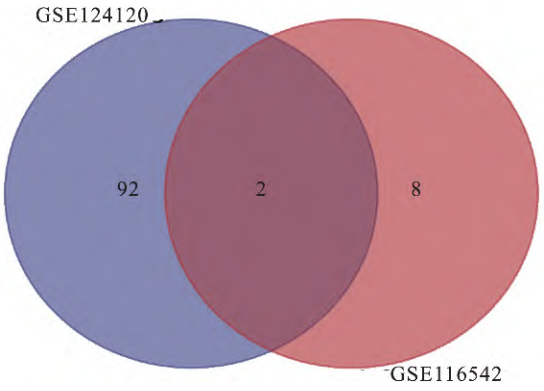

图 1 两种结核血样外泌体 miRNA 表达谱的维恩图

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.2 血浆外泌体的形态鉴定 从实验和对照受试者的血浆中有效分离和纯化外泌体。外泌体由不同大小的球形颗粒组成(30～150 nm),形态完整、球形、大小均一,与透射电子显微镜确定的外泌体结构一致。见图2。粒径分析结果显示,样品中的外泌体浓度集中在10^6～10^{12}颗粒/ml。见图3。Western blot检测标记蛋白CD63和TSG101,CD63蛋白分子大小为26～48 ku,TSG101蛋白分子大小为47 ku,图中条带位置显示大小符合外泌体特性。见图4。

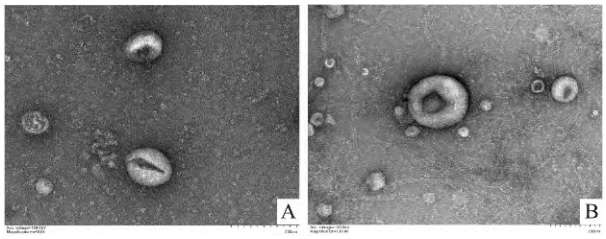

图2 透射电子显微镜下观察血浆外泌体形态 ×40 000
A:健康对照组;B:结核病组

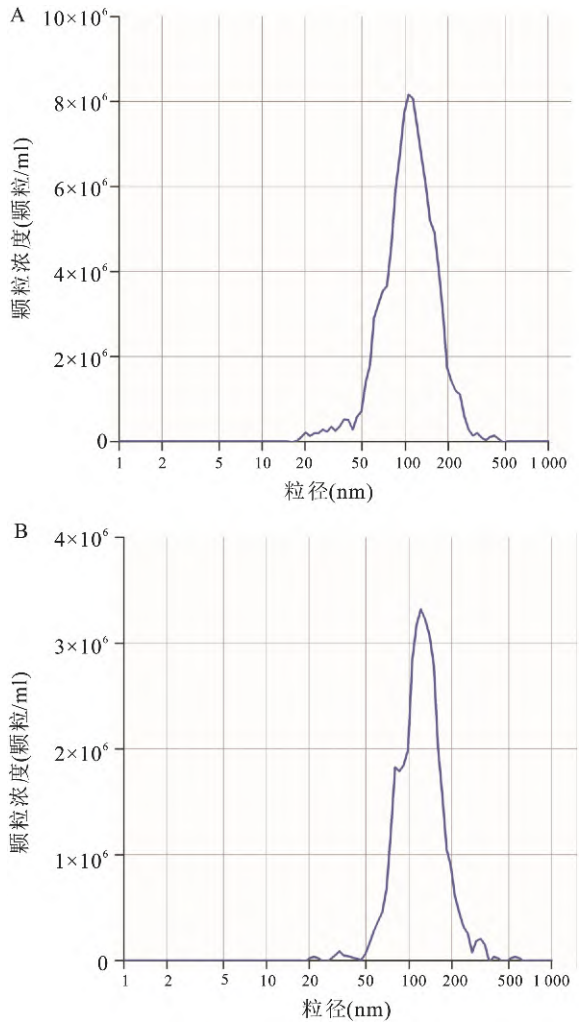

图3 纳米颗粒跟踪分析仪检测所提取的外泌体的浓度和所获取的粒子分布
A:健康对照组;B:结核病组

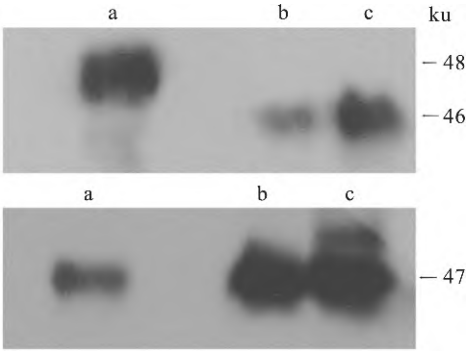

图4 Western blot检测阳性外泌体相关蛋白TSG101和CD63结果
a:血清外泌体阳性对照组;b:健康对照组;c:结核病组

2.3 血浆外泌体miR-26a-5p和miR-151a-3p表达分析 RT-qPCR检测结果显示,以U6内参为基准,与对照组相比,病例组miR-26a-5p的表达水平下降,差异有统计学意义($W=518$,$P<0.000\ 1$)(图5A);与对照组相比,病例组miR-151a-3p的表达水平上升,差异有统计学意义($W=1\ 181$,$P<0.000\ 1$)(图5B)。以cel-miR-39为外参,与对照组相比,病例组miR-26a-5p的表达水平下降,差异有统计学意义($W=696$,$P<0.000\ 1$)(图5C);与对照组相比,病例组miR-151a-3p的表达水平上升,差异有统计学意义($W=591$,$P<0.000\ 1$)(图5D)。

2.4 血浆外泌体miR-26a-5p和miR-151a-3p对结核病的诊断效能 ROC曲线结果表明,以U6为基准,血浆外泌体miR-26a-5p鉴别结核患者和健康者的AUC=0.872,95% *CI*:0.805～0.939($P<0.000\ 1$),敏感度为87.1%,特异度为87.9%,截断值为0.749;外泌体miR-151a-3p鉴别结核患者和健康者的AUC=0.709,95% *CI*:0.615～0.803($P<0.000\ 1$),敏感度为62.9%,特异度为86.2%,截断值为1.177;miR-26a-5p和miR-151a-3p联合鉴别结核患者和健康者的AUC=0.915,95% *CI*:0.856～0.974($P<0.000\ 1$),敏感度为87.1%,特异度为98.3%,截断值为0.006(图6)。

以cel-miR-39为基准,血浆外泌体miR-26a-5p鉴别结核患者和健康者的AUC=0.829,95% *CI*:0.754～0.903($P<0.000\ 1$),敏感度为72.9%,特异度为94.8%,截断值为0.765;血浆外泌体miR-151a-3p鉴别结核患者和健康者的AUC=0.854,

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

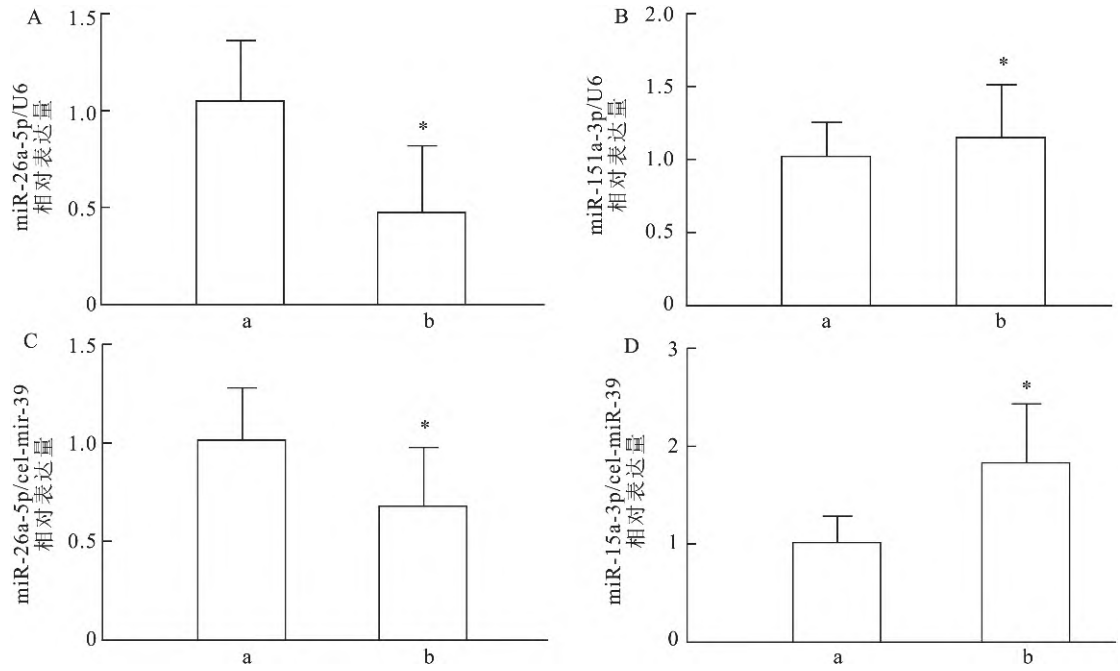

图5 qRT-PCR 检测 miR-26a-5p 和 miR-151a-3p 在健康对照组、结核病患者血浆外泌体中的表达水平

A: miR-26a-5p 相对表达量; B: miR-151a-3p 相对表达量; C: miR-26a-5p 相对表达量; D: miR-151a-3p 相对表达量; a: 健康对照组; b: 结核病组; 与健康对照组比较: * $P<0.05$

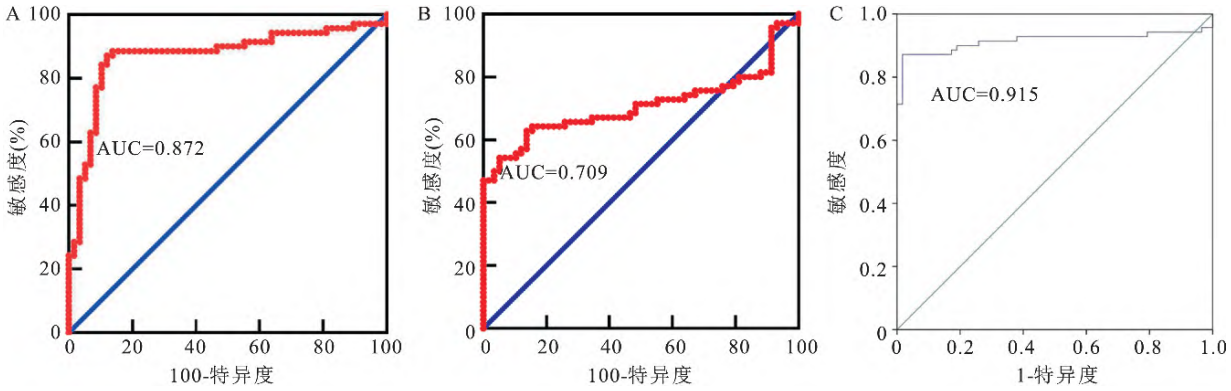

图6 ROC 曲线分析血浆外泌体 miR-26a-5p 和 miR-151a-3p 对结核病的诊断或鉴别潜能

A: miR-26a-5p 的 ROC 曲线下面积; B: miR-151a-3p 的 ROC 曲线下面积; C: miR-26a-5p 和 miR-151a-3p 二者联合的 ROC 曲线下面积

95% *CI*: 0.780 ~ 0.929 ($P<0.000\ 1$), 敏感度为 82.9%, 特异度为 94.8%, 截断值为 1.238; 血浆外泌体 miR-26a-5p 和 miR-151a-3p 联合鉴别结核患者和健康者的 AUC = 0.915, 95% *CI*: 0.853 ~ 0.968 ($P<0.000\ 1$), 敏感度为 87.1%, 特异度为 98.3%, 截断值为 -0.136 (图 7) 。

3 讨论

研究[5]表明, MTB 感染细胞后, 巨噬细胞分泌细胞因子以创造对抗病原体的促炎环境, 抗原呈递细胞 (DC) 释放带有 MHC-I/多肽复合物的外泌体间接激活 T 淋巴细胞, 以启动适应性免疫系统更有效地清除病原体; MTB 可以诱导感染的巨噬细胞分泌具有病原体相关分子模式 (PAMPs) 的外泌体, 激活 toll 样受体 (TLR) 途径以启动宿主免疫应答。故外泌体在结核病感染过程中发挥重要作用。一些关于外泌体 miRNA 与结核病的研究[6]已有报道。MTB 感染巨噬细胞后可产生外泌体 miRNAs, 其中包含了与免疫应答相关的转录组, 故外泌体中 miRNA 表达谱的变化可能影响受体细胞的固有免疫应答。

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

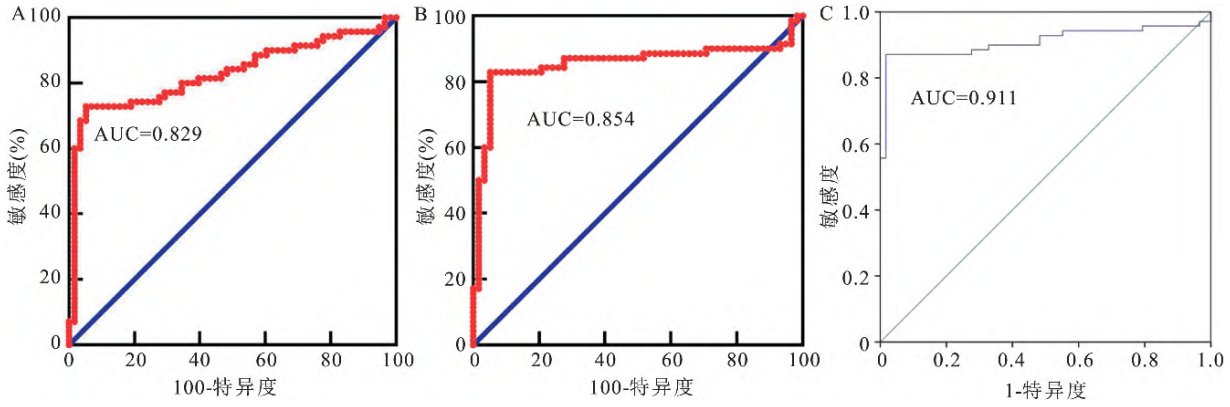

图7 ROC 曲线分析血浆外泌体 miR-26a-5p 和 miR-151a-3p 对结核病的诊断或鉴别潜能

A: miR-26a-5p 的 ROC 曲线下面积; B: miR-151a-3p 的 ROC 曲线下面积; C: miR-26a-5p 和 miR-151a-3p 二者联合的 ROC 曲线下面积

许多研究[7]表明外泌体源性 miRNA 与多种疾病的发生和发展密切相关，如 miR-1183 与结直肠癌肿瘤的形成。血浆外泌体源性 miRNA-188-5p 与 miRNA-4741 可作为子宫内膜异位症潜在的诊断标志物[8]。虽然外泌体中 miRNA 在肿瘤方面取得相当多的成果，但国内外对于结核病中外泌体和外泌体源性 miRNA 的研究报道甚少。本研究是国内首次以内参和外参为基准，通过 RT-qPCR 对外泌体 miR-26a-5p 和 miR-151a-3p 的表达水平进行检测，结果显示，与健康对照组相比，结核病组血浆外泌体 miR-26a-5p 的表达下调，结核病组血浆外泌体 miR-151a-3p 的表达上调，差异有统计学意义，其结果与生物信息学筛选的结果一致，验证了芯片结果的真实性和可靠性。且二者 ROC 曲线面积均大于 0.7，联合 ROC 曲线面积均大于 0.9，故外泌体 miR-26a-5p 和 miR-151a-3p 有一定的诊断价值，且二者联合诊断具有较高的诊断效能。有研究[9]表明 miR-26a 在结核菌感染的细胞中表达上调，而在本研究中其表达下调，这可能因为本研究对象是外泌体中的 miRNAs，其表达可能与游离 miRNAs 有所不同。上述研究表明，外泌体 miR-26a-5p 和 miR-151a-3p 有潜力作为结核病的生物诊断标志物。

miRNA-26 家族可通过其靶基因调控结核病的发生发展。Sahu et al[10]首次报道了 miR-26a 靶向转录因子 KLF4。在 MTB 感染过程中，miR-26a 的下调促进 KLF4 的上调，miR-26a 过表达减弱 MTB 在巨噬细胞中的生存。虽然到目前为止结核病的发病机制尚不清楚，但很多研究[11-12]表明结核病患者中 miRNA 靶基因的变化能够抑制免疫应答，促进 MTB 的复制和基因表达。因此，推测该研究中结核病患者 miR-26a-5p 表达水平降低，可能通过调控靶基因，减少细胞凋亡，从而在结核病的发生中发挥了一定的作用，此为后续结核病发病机制及发展研究提供了新的思路。

综上所述，外泌体异常调节的 miR-26a-5p 和 miR-151a-3p 有可能作为活动性疾病检测和结核病治疗控制的生物诊断标志物，但还需要扩大临床样本验证，以期作为结核病诊断标志物提供实验依据。

参考文献

[1] Hu X, Liao S, Bai H, et al. Integrating exosomal microRNAs and electronic health data improved tuberculosis diagnosis [J]. EBioMedicine, 2019, 40: 564-73.

[2] Purghè B, Manfredi M, Ragnoli B, et al. Exosomes in chronic respiratory diseases [J]. Biomed Pharmacother, 2021, 144: 112270.

[3] Zhang Y, Bi J, Huang J, et al. Exosome: areview of its classification, isolation techniques, storage, diagnostic and targeted therapy applications [J]. Int J Nanomedicine, 2020, 15: 6917-34.

[4] Alipoor S D, Tabarsi P, Varahram M, et al. Serum exosomal miRNAs are associated with active pulmonary tuberculosis [J]. Dis Markers, 2019, 2019: 1907426.

[5] Sun Y F, Pi J, Xu J F. Emerging role of exosomes in tuberculosis: from immunity regulations to vaccine and immunotherapy [J]. Front Immunol, 2021, 12: 628973.

[6] Alipoor S D, Mortaz E, Tabarsi P, et al. Bovis bacillus calmette-guerin(BCG) infection induces exosomal miRNA release by human macrophages [J]. J Transl Med, 2017, 15(1): 105.

[7] 张士龙，吴文涌. 血浆外泌体 miR-1183 在结直肠肿瘤中的表达及诊断价值研究 [J]. 安徽医科大学学报，2020，55(12)：1877-81.

[8] 王礼贤，胡月阳. 血浆外泌体源性 miRNA-188-5p 与 miRNA-4741 在子宫内膜异位症中诊断价值 [J]. 安徽医科大学学报，2020，55(7)：1126-9.

[9] Ni B, Rajaram M V, Lafuse W P, et al. Mycobacterium tubercu-

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

losis decreases human macrophage IFN-gamma responsiveness through miR-132 and miR-26a [J]. J Immunol, 2014,193(9): 4537 - 47.

[10] Sahu S K, Kumar M, Chakraborty S, et al. MicroRNA 26a(miR-26a)/KLF4 and CREB-C/EBPbeta regulate innate immune signaling, the polarization of macrophages and the trafficking of Mycobacterium tuberculosis to lysosomes during infection [J]. PLoS Pathog, 2017, 13(5): e1006410.

[11] Li H, Wang Y, Song Y. MicroRNA-26b inhibits the immune response to Mycobacterium tuberculosis (M. tb) infection in THP-1 cells *via* targeting TGFbeta-activated kinase-1(TAK1), a promoter of the NF-kappaB pathway [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2018, 11(3): 1218 - 27.

[12] Pan L, Liu F, Zhang J, et al. Genome-wide miRNA analysis identifies potential biomarkers in distinguishing tuberculous and viral meningitis [J]. Front Cell Infect Microbiol,2019,9:323.

Expression and diagnostic value of plasma exosomes miR - 26a - 5p and miR - 151a - 3p in tuberculosis

Feng Zhen[1], Zhang Bo[1], Deng Siqi[1], Ye Guomin[1], Zhang Hui[1], Zhang Wanjiang[1], Wu Jiangdong[1], Li Weimin[2]

([1]*Key Laboratory of Xinjiang Endemic and Ethnic Diseases Cooperated by Education Ministry with Xinjiang Province, Shihezi University, Shihezi* 832002; [2]*National Tuberculosis Clinical Laboratory, Beijing Chest Hospital, Capital Medical University, Beijing* 101100)

Abstract ***Objective*** To study the differential expression and diagnostic value of miR-26a-5p and miR-151a-3p in plasma exosomes of tuberculosis. ***Methods*** Differentially expressed miRNAs (miR-26a-5p and miR-151a-3p) in tuberculosis exosomes were identified through bioinformatics website. Furthermore, 70 tuberculosis patients (tuberculosis group) and 58 healthy subjects (healthy control group) were selected for clinical validation: Plasma exosomes, extracted by differential centrifugation, were identified by Western blot, transmission electron microscopy, nanoparticle tracking analysis. The expression levels of miR-26a-5p and miR-151a-3p in plasma exosome were detected by RT-qPCR in the tuberculosis group and the control group. The diagnostic value of miR-26a-5p and miR-151a-3p in tuberculosis was evaluated by ROC curve. ***Results*** The characteristics of exosomes were identified by transmission electron microscopy, nanoparticle tracking analysis and Western blot, which showed that plasma exosomes were extracted successfully. In clinical validation, the internal and external parameters were calibrated simultaneously, the expression level of miR-26a-5p in plasma exosome of patients with tuberculosis was lower than that in control group ($P < 0.000\ 1$), and the expression level of miR-151a-3p in plasma exosome of patients with tuberculosis was higher than that in control group ($P < 0.000\ 1$), which were consistent with the bioinformatics results. As a diagnostic marker, taking internal reference as the benchmark, the AUC of plasma exosome miR-26a-5p and miR-151a-3p for tuberculosis differentiation was 0.872 and 0.709, the AUC of the combined miR-26a-5p and miR-151a-3p was 0.915($P < 0.000\ 1$). Taking external reference as the benchmark, the AUC of plasma exosomes miR-26a-5p and miR-151a-3p were 0.829 and 0.854 respectively, the AUC of the combined miR-26a-5p and miR-151a-3p was 0.911 ($P < 0.000\ 1$). ***Conclusion*** The expression level of plasma exosome-derived miR-26a-5p decreases in tuberculosis patients and the expression levelof miR-151a-3p increases, and the clinical diagnostic efficiency of bothis high, which may be a potential biomarker for the diagnosis of tuberculosis.

Key words tuberculosis; exosome; miR-26a-5p; miR-151a-3p; verification

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net