

microRNAs 作为结核分枝杆菌感染标志物的研究进展

张文慧, 杨丹凤, 董浩, 韩鹏, 贾宇, 张林波*

(吉林农业大学, 长春 130118)

[收稿日期] 2015-07-21 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2015) 10-0062-04 [中图分类号] Q939.93

[摘要] 微小 RNA (microRNAs) 是一类长度约为 22 个核苷酸的非编码单链 RNA 分子, 它参与基因转录后的表达调控, 在免疫系统的调控和运行中具有重要作用。结核分枝杆菌是典型的胞内寄生菌, 其感染能够引起人畜共患结核病。从 microRNAs 与结核免疫机制的相关性以及结核分枝杆菌感染过程中巨噬细胞、外周血单核细胞及血清中 microRNAs 表达谱变化等方面, 进行综述 microRNAs 作为结核分枝杆菌感染标志物的研究现状, 以期能为动物结核病检测提供理论参考。

[关键词] 微小 RNA; 结核分枝杆菌; 标志物

Progress in MicroRNAs as Infective Biomarkers of Infection of *Mycobacterium tuberculosis*

ZHANG Wen-hui, YANG Dan-feng, DONG Hao, HAN Peng, JIA Yu, ZHANG Lin-bo*

(Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract: MicroRNA is a kind of non-coding single stranded RNA molecules formed by about 22 nucleotides. It involved in regulation after gene transcription and plays an important role in the regulation and operation of the immune system. *Mycobacterium tuberculosis* is the typical parasitic bacterium in the cell, and its infection can cause zoonosis. It is reviewed in this article that the progress in microRNAs as infective biomarkers of infection of *Mycobacterium tuberculosis* from the correlation of microRNAs with tuberculosis immune mechanism and microRNAs expression changes in macrophages, mononuclear cells and serum in the process of infection of *Mycobacterium tuberculosis*, which may provide the theoretical reference for the detection of animal tuberculosis.

Key words: microRNA; *Mycobacterium tuberculosis*; biomarker; progress

结核分枝杆菌是典型的胞内菌, 其感染可引起人兽共患的慢性传染病—结核病, 严重威胁人类和动物的健康^[1]。人类结核病预防用药以注射卡介苗 (BCG) 为主, BCG 是牛型结核分枝杆菌强毒株经 13 年传代培养获得的减毒株, 但临床应用验证

其免疫效果大约在接种 10 ~ 15 年后逐渐减弱, 而且无法预防潜伏性结核感染^[2]。目前我国牛结核病诊断主要应用 PPD 方法, 但由于结核免疫机制的复杂性和多变性, 以及结核分枝杆菌的人兽交叉感染性, 极大的阻碍了结核病诊断的研究^[3]。因此寻

基金项目: 吉林省科技发展计划资助项目 (20130101105JC, 20140204018YY)

作者简介: 张文慧, 副教授, 从事病原微生物与免疫学研究; 杨丹凤, 硕士, 从事病原微生物研究, 与张文慧为并列第一作者。

通讯作者: 张林波。E-mail: cczlb@126.com

找稳定、有效的结核分枝杆菌感染标志物就显得尤为重要。microRNAs 是由内源基因编码的长度约为 22 个核苷酸左右的小 RNA 分子,它参与基因转录后的表达调控,在免疫系统的调控和运行中具有重要作用^[4]。已有研究表明 microRNAs 与结核分枝杆菌感染的免疫机制密切相关,有望成为结核病早期诊断标志物。本文从 microRNAs 与结核免疫机制的相关性以及结核分枝杆菌感染过程中巨噬细胞、外周血单核细胞及血清中 microRNAs 表达谱变化等方面进行综述,以期对动物结核病检测提供理论参考。

1 microRNAs 与结核免疫机制的相关性

在感染过程中,结核杆菌首先要克服先天免疫系统的屏障,才能成功感染宿主生物体^[5],吞噬细胞中的巨噬细胞为先天免疫防御入侵的病原体提供第一道防线。巨噬细胞和结核杆菌对抗产生细胞因子,细胞因子继而使肺部巨噬细胞超活化,结核病的炎症反应恰是由巨噬细胞吞噬结核杆菌并召集其他免疫细胞参与战斗而导致的^[6]。microRNAs 是哺乳动物免疫系统中关键的调节器,参与调节结核免疫反应相关基因的表达及控制巨噬细胞内的炎症反应,在结核宿主病原反应中起重要作用^[7-8]。Spinelli 等^[9] 2013 年发现结核病经过专业治疗后 microRNAs 与结核宿主反应相关细胞因子 IL-6 的表达水平呈现相关性。Ma 等^[10] 2014 年发现在巨噬细胞中 miR-124 可以作为一种有效的免疫调节器,当用卡介苗感染 RAW264.7 巨噬细胞和鼠巨噬细胞后,miR-124 能够调节巨噬细胞中 Toll 样受体的信号活性,通过靶向调节 Toll 样受体信号家族的多种组分来调节结核杆菌触发的炎症反应。Liu 等^[11] 2013 年发现 miR-582-5p 通过下调转录因子 FOXO1 的表达来抑制单核细胞的凋亡,并在抗结核分枝杆菌的免疫应答中发挥重要的调节作用。Singh 等^[12] 2013 年发现了结核杆菌的新型宿主免疫逃避机制,在结核分枝杆菌菌株 H37Rv 感染树突细胞和巨噬细胞后,miR-99b 的表达量高度上调;用 RNA 拮抗剂抑制 miR-99b 的表达导致树突细胞内细菌显著减少;敲除树突细胞中 miR-99b 后促炎性细胞因子如 IL-6、IL-12 和 IL-1 β 显著上调;抑制 miR-99b 能增强 TNF- α 和 TNFRSF-4 的产生。以上研究表明, microRNAs 与结核免疫调节机制具有高度相关性,一些 microRNAs 可能通过调控免疫相关基因而参

与结核的发病机制。

2 microRNAs 与结核病诊断的相关性

疾病早期诊断是现代医学的主要挑战之一,其最大优势为,能通过对疾病进行早期干预减少病原体侵入而提高疾病的治愈率。选择专业性强的标志物作为诊断依据在早期疾病诊断中至关重要。结核病的早期诊断对于结核的有效控制和治疗都非常重要,因此可以利用某些生物标志物提高结核诊断质量^[13]。已有研究表明, microRNAs 由于免受内源性核糖核酸酶作用而在组织、血清和血浆中稳定存在,这些循环的 microRNAs 有潜力成为疾病诊断标志物及疾病治疗的靶标^[14]。

2.1 巨噬细胞内 microRNAs 表达谱变化 人类感染结核杆菌后会引发巨噬细胞内 microRNAs 表达谱的变化,与潜伏性结核病发病机理密切相关,能提高对潜伏性结核病的诊断和预测^[15]。Liu 等^[16] 2014 年采用微阵列法分析卡介苗感染后巨噬细胞内 microRNAs 的表达谱变化,发现有 10 种表达量下调和 8 种表达量上调。2013 年 Furci 等^[17] 采用 TaqMan 低密度序列分析法,确定毒力结核分枝杆菌 H37Rv 和化学灭活后无毒力的牛分枝杆菌卡介苗菌株 (BCG),感染人类原代单核巨噬细胞后 microRNAs 表达谱变化,发现感染杀伤性毒力菌时 miR-155 和 miR-146a 会出现标志性变化。2013 年 Das 等^[18] 用微阵列分析法分析有毒的 H37Rv 和无毒的 H37Ra 结核分枝杆菌感染 THP-1 巨噬细胞后 microRNAs 表达谱变化,发现 H37Rv 和 H37Ra 感染后巨噬细胞中 9 种 microRNAs (miR-30a, miR-30e, miR-155, miR-1275, miR-3665, miR-3178, miR-4484, miR-4668-5p 和 miR-4497) 的表达谱发生改变。

2.2 外周血单核细胞 microRNAs 表达谱变化 结核病人 microRNAs 的表达量,大多数和炎症反应相关,为了研究 microRNAs 在结核病中的作用,2011 年 Liu 等^[19] 采用微阵列法分析了肺结核患者和健康人外周血单核细胞中 microRNAs 表达谱变化,并通过荧光定量 PCR (qRT-PCR) 验证,发现活动性肺结核患者与健康对照组相比有 30 种 microRNAs 的表达量改变,其中 28 种表达量上调和 2 种表达量下调;在活动性肺结核患者中 miR-144* 过表达,通过 miR-144* 转染 T 细胞实验发现其能通过调节细胞因子 TNF- α 、IFN- γ 的产生和 T 细胞的增殖来调节抗结核的免疫应答反应。Wu

等^[20] 2012 年采用微阵列法检测了结核菌素纯蛋白衍生物(PPD)诱导后,人外周血单核细胞中 microRNAs 表达谱变化。然后通过 qRT-PCR 实验对显著活性的 microRNAs 进行验证,发现 PPD 诱导后 microRNA-155 在健康对照组变化 1.4 倍,而在活动性结核组变化 3.7 倍;microRNA-155* 在健康对照组变化 1.9 倍,而在活动性结核组变化 4.6 倍。2011 年 Wang 等^[21] 采用微阵列法分析结核病人和健康对照组外周血单核细胞中 microRNAs 表达谱变化,发现与健康对照组相比,结核病人外周血单核细胞中 miR-365 和 miR-424 的表达量显著变化;潜伏性结核患者的 miR-130a*、miR-493*、miR-520d-3p 和 miR-661 表达量升高,miR-296-5p 表达量下降;活动性结核患者的 miR-21*、miR-223、miR-302a、miR-424、miR-451 和 miR-486-5p 表达量升高,miR-130b* 表达量下降。

2.3 血清中 microRNAs 表达谱变化 自从 Lawrie 等^[22] 首次提出 microRNAs 在血清中能被可靠的检测出来,其在疾病诊断中的作用越来越得到研究者的重视,因此血清 microRNAs 有望成为结核病诊断的潜在标志物^[23-24]。2011 年 Yi 等^[25] 用微阵列分析法检测活动性结核病人及健康人血清中 microRNAs 的表达量,并用 qRT-PCR 进行验证,在检测的 1223 种 microRNAs 中有 92 种的表达量发生改变,其中有 59 种表达量下调,33 种表达量上调;其中表达量上调的 miR-29a 能够敏感特异的区分结核病人与健康对照组。Qi 等^[26] 2012 年采用 TaqMan 低密度序列分析法(TLDA)对 30 例活动性结核病人、60 例百日咳杆菌(BP),水痘-带状疱疹病毒(VZV)和肠道病毒(EV)病人血清中 microRNAs 的表达谱进行了分析,发现肺结核病人与健康对照组相比有 97 种 microRNAs 的表达量发生改变,其中有 90 种表达量上调,7 种表达量下调;用 qRT-PCR 方法验证发现 miR-361-5p,miR-889 和 miR-576-3p 三种 microRNAs 因具有稳定的敏感性和特异性能够用来区分肺结核病人、健康人和其他微生物传染病。Zhang 等^[27] 2013 年采用 Solexa 序列分析法发现肺结核病人与健康对照组相比血清中有 91 种 microRNAs 的表达量发生变化,用 qRT-PCR 验证发现在肺结核病人、健康对照组及不同诊断组(肺炎、肺癌和慢性阻塞性肺炎)血清中六种 microRNAs(hsa-miR-378、hsa-miR-

-483-5p、hsa-miR-22、hsa-miR-29c、hsa-miR-1 和 hsa-miR-320b) 显著改变。Zhang 等^[28] 2014 年利用 solexa 测序法分析活动性结核病人、卡介苗免疫过的健康人和未注射过卡介苗的潜伏性结核感染者血清中 microRNAs 的表达谱变化,通过 microRNA-基因网对表达谱变化的 microRNAs 进行目标预测,并分析感染路径发现, microRNAs 调节的宿主免疫反应可能是结核发病机理的一个主要因素,通过 qRT-PCR 验证发现 hsa-miR-196b 和 hsa-miR-376c 可能是活动性结核病潜在的生物标记物。

3 小结

结核分枝杆菌的感染可引起人-兽共患结核病,结核病的快速诊断及治疗是世界性的公共卫生问题。microRNAs 是近年来发现的一类进化上相对比较保守,由内源基因编码的长度约为 22 个核苷酸左右的小 RNA 分子。上述大量研究表明, microRNAs 与结核病感染的免疫机制密切相关,某些 microRNAs 能够通过调节巨噬细胞活化信号通路中的组分,进而调节结核分枝杆菌感染所触发的炎症反应,在结核病的诊断中表现出很大的应用潜力。同时,巨噬细胞、外周血单核细胞、血清中 microRNAs 表达谱变化的研究表明, microRNAs 调节的宿主免疫应答反应可能是结核发病的一个主要因素。这些研究为 microRNAs 作为结核分枝杆菌感染标志物的研究奠定了良好的基础,通过研究期望能够找到一种或几种特定的 microRNAs 分子,通过其表达量的上调或下调预测结核分枝杆菌的感染状况,进而为以早期诊断为核心理念的动物疾病分子诊断技术提供新思路,为动物结核病的早期检测提供参考。

参考文献:

- [1] Bermudez L E, Goodman J. *Mycobacterium tuberculosis* invades and replicates within type II alveolar cells. *Infect Immun*, 1996, 64: 1400-1406.
- [2] 刘珊珊,韩文瑜,雷连成,等. 结核疫苗研究进展[J]. 中国兽药杂志, 2013, 47(3): 52-57.
- [3] 王曲直,刘佩红,沈素芳,等. 牛结核病诊断方法研究进展[J]. 中国兽医杂志, 2015, 51(2): 56-59.
- [4] Belver L, de Yébenes V G, Ramiro A R. MicroRNAs prevent the generation of autoreactive antibodies[J]. *Immunity*, 2010, 33(5): 713-722.
- [5] Katalinic' - Jankovic' V, Furci L, Cirillo D M. Microbiology of

- Mycobacterium tuberculosis* and a new diagnostic test for TB[J]. European Respiratory Monograph, 2012, 58: 8 - 13.
- [6] Sompayrac L. How the immune system works[M]. John Wiley & Sons, 2012.
- [7] Furci L, Schena E, Miotto P, *et al.* Alteration of human macrophages microRNA expression profile upon infection with *Mycobacterium tuberculosis*[J]. International journal of mycobacteriology, 2013, 2: 128 - 134.
- [8] Furci L, Schena E, Miotto P, *et al.* MicroRNA induction in human macrophages associated with infection with ancient and modern TB strains[J]. International Journal of Mycobacteriology, 2015, 70: 1 - 10.
- [9] Spinelli S V, Diaz A, D'Attilio L, *et al.* Altered microRNA expression levels in mononuclear cells of patients with pulmonary and pleural tuberculosis and their relation with components of the immune response[J]. Molecular immunology, 2013, 53(3): 265 - 269.
- [10] Chunyan Ma, Yong L, Min Li, *et al.* microRNA - 124 negatively regulates TLR signaling in alveolar macrophages in response to mycobacterial infection[J]. Molecular immunology, 2014, 62: 150 - 158.
- [11] Yanhua L, Jing J, Xinjing w, *et al.* miR - 582 - 5p is upregulated in patients with active tuberculosis and inhibits apoptosis of monocytes by targeting FOXO1. PLoS one, 2013, 8(10): e78381.
- [12] Singh Y, Kaul V, Mehra A, *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* controls microRNA - 99b (miR - 99b) expression in infected murine dendritic cells to modulate host immunity[J]. Journal of Biological Chemistry, 2013, 288(7): 5056 - 5061.
- [13] Wallis R S, Pai M, Menzies D, *et al.* Biomarkers and diagnostics for tuberculosis: progress, needs, and translation into practice[J]. The Lancet, 2010, 375(9729): 1920 - 1937.
- [14] Singh P K, Singh A V, Chauhan D S. Current understanding on microRNAs and its regulation in response to *Mycobacterial* infections[J]. J Biomed Sci, 2013, 20(14): 1 - 9.
- [15] Meng Q L, Liu F, Yang X Y, *et al.* Identification of latent tuberculosis infection - related microRNAs in human U937 macrophages expressing *Mycobacterium tuberculosis* Hsp16.3[J]. BMC microbiology, 2014, 14(37): 1 - 9.
- [16] Zhen Liu, Guoyong Zhou, Xiangdong Deng, *et al.* Analysis of miRNA expression profiling in human macrophages responding to *Mycobacterium* infection; Induction of the immune regulator miR - 146a[J]. Journal of Infection, 2014, 68: 553 - 561.
- [17] Furci L, Schena E, Miotto P, *et al.* Alteration of human macrophages microRNA expression profile upon infection with *Mycobacterium tuberculosis*[J]. International Journal of Mycobacteriology, 2013, 2(3): 128 - 134.
- [18] Das K, Saikolappan S, Dhandayuthapani S. Differential expression of miRNAs by macrophages infected with virulent and avirulent *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Tuberculosis, 2013, 93: S47 - S50.
- [19] Liu Yanhua, Wang Xingjing, Jiang Jing, *et al.* Modulation of T cell cytokine production by miR - 144 * with elevated expression in patients with pulmonary tuberculosis[J]. Molecular immunology, 2011, 48(9): 1084 - 1090.
- [20] Wu Jing, Lu Chanyi, Diao Ni, *et al.* Analysis of microRNA expression profiling identifies miR - 155 and miR - 155 * as potential diagnostic markers for active tuberculosis: a preliminary study[J]. Human immunology, 2012, 73(1): 31 - 37.
- [21] Wang Chuan, Yang Shun Yao, Sun Gang, *et al.* Comparative miRNA expression profiles in individuals with latent and active tuberculosis[J]. PLoS One, 2011, 6(10): e25832.
- [22] Lawrie C H. MicroRNAs and haematology: small molecules, big function[J]. British journal of haematology, 2007, 137(6): 503 - 512.
- [23] Cortez M A, Bueso - Ramos C, Ferdin J, *et al.* MicroRNAs in body fluids the mix of hormones and biomarkers[J]. Nature reviews. Clinical oncology, 2011, 8(8): 467 - 477.
- [24] Xu Z, Zhou A, Ni J, *et al.* Differential expression of miRNAs and their relation to active tuberculosis[J]. Tuberculosis, 2015, 3(10): 1 - 9.
- [25] Fu Yurong, Yi Zhengjun, Wu Xiaoyan, *et al.* Circulating microRNAs in patients with active pulmonary tuberculosis[J]. Journal of clinical microbiology, 2011, 49(12): 4246 - 4251.
- [26] Qi Y, Cui L, Ge Y, *et al.* Altered serum microRNAs as biomarkers for the early diagnosis of pulmonary tuberculosis infection[J]. BMC infectious diseases, 2012, 12(384): 1 - 9.
- [27] Zhang X, Guo J, Fan S, *et al.* Screening and identification of six serum microRNAs as novel potential combination biomarkers for pulmonary tuberculosis diagnosis[J]. PLoS one, 2013, 8(12): e81076.
- [28] Zhang H, Sun Z, Wei W, *et al.* Identification of serum microRNA biomarkers for tuberculosis using RNA - seq[J]. PLoS one, 2014, 9(2): e88909.

(编辑:陈希)