

[文章编号] 1671-587X(2025)06-1661-09

DOI:10.13481/j.1671-587X.20250622

## miR-125a-5p在结核分枝杆菌潜伏感染患者外周血单个核细胞中的表达及其意义

刘洪千<sup>1</sup>, 刘荣<sup>2</sup>, 陈娟娟<sup>1</sup>, 武玲玲<sup>2</sup>, 王成军<sup>2</sup>, 久太<sup>1</sup>

(1. 青海大学附属医院呼吸与危重症医学科, 青海 西宁 810001; 2. 青海大学附属医院临床医学院, 青海 西宁 810001)

**[摘要]** **目的:** 探讨微小RNA (*miR*)-125a-5p在感染结核分枝杆菌 (MTB) 患者外周血单个核细胞 (PMBCs) 中表达的差异及其对巨噬细胞 CD80 和 CD206 蛋白表达的影响, 并阐明其临床意义。**方法:** 选择 2022 年 7 月—2023 年 6 月就诊、经临床确诊的活动性结核病 (ATB) 感染者 40 例 (ATB 组), 结核分枝杆菌潜伏感染 (LTBI) 患者 35 例 (LTBI 组) 和健康体检者 40 名 (对照组), 禁食 12 h 后次日清晨分别采集 3 组研究对象空腹血样本, 分离血清, 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 法检测各组研究对象血清中炎症因子水平, 同时提取各组 PBMCs, 采用流式细胞术检测各组研究对象 PBMCs 中 CD80 和 CD206 蛋白表达水平, 采用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 法检测各组研究对象 PBMCs 中 *miR*-125a-5p 和白细胞介素 6 (*IL*-6) mRNA 表达水平。**结果:** 3 组研究对象年龄一般资料比较差异均无统计学意义 ( $P>0.05$ )。与对照组比较, ATB 组和 LTBI 组患者血清中血沉 (ESR)、单核细胞 (MONO) 百分比、肿瘤坏死因子 $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 和白细胞介素 10 (IL-10) 水平均明显升高 ( $P<0.05$ ), 淋巴细胞 (LY) 百分比明显降低 ( $P<0.05$ ); 与 ATB 组比较, LTBI 组患者血清中 ESR 和 IL-10 水平均明显降低 ( $P<0.05$ ), LY 百分比明显升高 ( $P<0.05$ ); 白细胞 (WBC) 计数组间比较差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。流式细胞术检测, 与对照组比较, ATB 组和 LTBI 组患者 PBMCs 中 CD80 和 CD206 蛋白表达水平明显升高 ( $P<0.05$ ); 与 ATB 组比较, LTBI 组患者 PBMCs 中 CD206 蛋白表达水平明显升高 ( $P<0.05$ ), CD80 蛋白表达水平明显降低 ( $P<0.05$ )。RT-qPCR 法检测, 与对照组比较, ATB 组和 LTBI 组患者 PBMCs 中 *miR*-125a-5p 和 *IL*-6 mRNA 表达水平均明显升高 ( $P<0.05$ ); 与 ATB 组比较, LTBI 组患者 PBMCs 中 *miR*-125a-5p 和 *IL*-6 mRNA 表达水平均明显升高 ( $P<0.05$ )。相关性分析, *miR*-125a-5p 表达水平与 TNF- $\alpha$  水平和 *IL*-6 mRNA 表达水平呈正相关关系 ( $r=0.406, P<0.05$ ;  $r=0.351, P<0.05$ ), 与 IL-10 水平呈负相关关系 ( $r=-0.368, P<0.05$ )。*miR*-125a-5p 表达水平诊断 LTBI 患者的受试者工作特征 (ROC) 曲线下面积 (AUC) 值为 0.89 ( $P<0.01$ ), 灵敏度为 0.85, 特异度为 0.88。**结论:** *miR*-125a-5p 在 LTBI 组患者 PBMCs 中表达水平明显升高, 其可影响巨噬细胞向 M1 极化, 促进巨噬细胞炎症反应过程, 参与肺结核的发生发展。

**[关键词]** 肺结核; 结核分枝杆菌潜伏感染; 微小 RNA-125a-5p; 巨噬细胞; 炎症反应

**[中图分类号]** R378.91 **[文献标志码]** A

[收稿日期] 2024-11-13 [录用日期] 2025-01-20

[基金项目] 青海省科技厅基础研究计划项目 (2022-ZJ-775)

[作者简介] 刘洪千 (1982—), 男, 辽宁省丹东市人, 副主任医师, 医学硕士, 从事慢性呼吸系统疾病基础和临床方面的研究。

[通信作者] 久太, 主任医师, 硕士研究生导师 (E-mail: 13519759110@139.com)

©《吉林大学学报(医学版)》编辑部, 开放获取遵循 CC BY-NC-ND 协议。

© Editorial Board of Journal of Jilin University (Medicine Edition). Open access under CC BY-NC-ND license.

## Expression of *miR-125a-5p* in peripheral blood mononuclear cells of patients with latent *mycobacterium tuberculosis* infection and its significance

LIU Hongqian<sup>1</sup>, LIU Rong<sup>2</sup>, CHEN Juanjuan<sup>1</sup>, WU Lingling<sup>2</sup>, WANG Chengjun<sup>2</sup>, JIU Tai<sup>1</sup>

(1. Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Affiliated Hospital, Qinghai University, Xining 810001, China; 2. Clinical School of Medicinal Sciences, Affiliated Hospital, Qinghai University, Xining 810001, China)

**ABSTRACT Objective:** To discuss the differential expression of microRNA (*miR*)-125a-5p in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of the patients with *mycobacterium tuberculosis* (MTB) infection and its effect on macrophage polarization, and to clarify its clinical significance. **Methods:** A total of 40 patients with active tuberculosis (ATB) (ATB group), 35 patients with latent tuberculosis infection (LTBI) (LTBI group), and 40 healthy physical examinees (control group) clinically diagnosed from July 2022 to June 2023 were selected. The fasting blood samples of the subjects in three groups were collected next morning after 12 h of fasting, and then serum was separated. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method was used to detect the levels of inflammatory factors in the serum of the subjects in various groups. Simultaneously, the PBMCs were extracted from the subjects in various groups; flow cytometry was used to detect the expression levels of CD80 and CD206 proteins in the PBMCs of the subjects in various groups; real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) method was used to detect the expression levels of microRNA (*miR*)-125a-5p and interleukin-6 (*IL-6*) mRNA in PBMCs of the subjects in various groups. **Results:** There were no statistically significant differences in the general information of the subjects among three groups ( $P>0.05$ ). Compared with control group, the erythrocyte sedimentation rate (ESR), percentages of monocytes (MONO), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) levels, and interleukin-10 (IL-10) levels in serum of the patients in ATB group and LTBI group were significantly increased ( $P<0.05$ ), and the percentages of lymphocytes (LY) were significantly decreased ( $P<0.05$ ); compared with ATB group, the ESR and level of IL-10 in serum of the patients in LTBI group were significantly decreased ( $P<0.05$ ), and the percentage of LY was significantly increased ( $P<0.05$ ); there were statistically significant differences in the counts of white blood cell (WBC) of the subjects among various groups ( $P>0.05$ ). The flow cytometry results showed that compared with control group, the expression levels of CD80 and CD206 proteins in PBMCs of the patients in ATB group and LTBI group were significantly increased ( $P<0.05$ ). Compared with ATB group, the expression level of CD206 protein in the PBMCs of the patients in LTBI group was significantly increased ( $P<0.05$ ), and the expression level of CD80 protein was significantly decreased ( $P<0.05$ ). The RT-qPCR results showed that compared with control group, the expression levels of *miR-125a-5p* and *IL-6* mRNA in the PBMCs of the patients in ATB group and LTBI group were significantly increased ( $P<0.05$ ); compared with ATB group, the expression levels of *miR-125a-5p* and *IL-6* mRNA in PBMCs of the patients in LTBI group were significantly increased ( $P<0.05$ ). The correlation analysis results showed that the *miR-125a-5p* expression level was positively correlated with the TNF- $\alpha$  level and *IL-6* mRNA expression level ( $r=0.406$ ,  $P<0.05$ ;  $r=0.351$ ,  $P<0.05$ ), and negatively correlated with the IL-10 level ( $r=-0.368$ ,  $P<0.05$ ). The area under the receiver operating characteristic (ROC) curve (AUC) value of *miR-125a-5p* expression level for diagnosing LTBI patients was 0.89 ( $P<0.01$ ), with a sensitivity of 0.85 and a specificity of 0.88. **Conclusion:** The expression level of *miR-125a-5p* in PBMCs of the patients in LTBI group is significantly

increased, and it can affect the macrophage polarization to M1, promote the inflammatory response process of macrophages and participate in the occurrence and development of pulmonary tuberculosis.

**KEYWORDS** Pulmonary tuberculosis; Latent tuberculosis infection; MicroRNA-125a-5p; Macrophage; Inflammatory response

感染结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, MTB) 可导致活动性结核病 (active tuberculosis, ATB) 或更常见的结核分枝杆菌潜伏感染 (latent tuberculosis bacillus infection, LTBI)<sup>[1]</sup>, 这与菌株毒力和免疫反应有关。LTBI具有结核病的免疫学证据, 但无疾病的体征和症状, 是一种临床状态<sup>[2-4]</sup>, 但5%~15%的接触MTB的人会患上此疾病<sup>[5]</sup>。免疫抑制剂可能导致再激活, 每年有超过600万人被诊断出患有结核病<sup>[6-7]</sup>。早期诊断和积极治疗患者至关重要。LTBI缺乏统一诊断标准, 即使经典的结核菌素试验 (purified protein derivative test, PPD)、痰涂片抗酸染色和 $\gamma$ 干扰素释放试验 (interferon-Gamma release assays, IGRA) 也难以准确鉴别LTBI与结核病, 存在假阴性和假阳性<sup>[8-10]</sup>。区分感染和患病是棘手的问题, 特别是在结核病流行地区, 发现高敏感性和特异性的诊断性生物标志物, 可尽早诊断LTBI<sup>[11-13]</sup>。微小RNA (microRNA, miRNA) 可从多种生物样本中分离, 具有稳定性和易获取性, 成为有用的生物标志物。其作为内源性非编码RNA, 长度为21~24个核苷酸, 参与基因表达调控<sup>[14-15]</sup>。PENG等<sup>[16]</sup>研究显示: miRNA在调控结核病和相关疾病中起关键作用, 可调控巨噬细胞和LTBI感染。miRNA表达量与免疫功能和细胞变态反应有关, 影响固有和适应性免疫反应, 促进炎症性疾病发展<sup>[17]</sup>。*miR-125a-5p*在Krueppel样因子13 (Krueppel-like factor 13, KLF13) 转录因子的介导下, 成为巨噬细胞极化的关键基因<sup>[18]</sup>。*miR-125a-5p*可能通过调节核因子 $\kappa$ B (nuclear factor-kappa B, NF- $\kappa$ B) 途径促进促炎细胞因子的分泌<sup>[19]</sup>。LTBI入侵巨噬细胞时, *miR-125a-5p*通过与Toll样受体 (Toll-like receptor, TLR) 结合激活NF- $\kappa$ B信号通路, 导致肿瘤坏死因子 $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素 (interleukin, IL)-1、IL-6和IL-8等炎症因子的释放, 调节炎症反应和清除病原体<sup>[20]</sup>。

目前有关*miR-125a-5p*在MTB患者的表达的差异及其对巨噬细胞极化的影响研究较少, 本研究通过测定人外周血中*miR-125a-5p*及炎症因子水平等, 探讨*miR-125a-5p*在MTB患者外周血单个核

细胞 (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) 中表达的差异及其对巨噬细胞极化的影响, 旨在为肺结核 (pulmonary tuberculosis, PTB) 诊断提供新的思路。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究对象

本研究严格按照纳入和排除标准, 选取2022年7月—2023年6月于青海大学附属医院和青海省第四人民医院就诊, 经临床确诊的ATB患者40例 (ATB组) 和LTBI患者35例 (LTBI组), 并选取同时间段内就诊于青海大学附属医院体检中心健康体检者40名作为对照组。本研究已获本院医学伦理委员会审批 (伦理审批编号: P-SL-202167), 所有研究对象均签署书面知情同意书。ATB诊断标准: 依照《肺结核诊断标准 (WS 288-2017)》<sup>[21]</sup>。LTBI诊断标准: 依照《结核病分类 (WS196-2017)》<sup>[22]</sup>。

### 1.2 纳入和排除标准

1.2.1 纳入标准 ATB组: ①符合ATB诊断标准, 临床症状、体征和胸部影像学检查诊断依据痰或肺泡灌洗液中发现MTB; ②既往未诊治过结核病未接受过抗结核治疗; ③年龄18~65岁; LTBI组: ①与PTB或喉结核密切接触人群、免疫功能低下且有结核杆菌 (*Tubercle bacillus*, TB) 高风险人群, 需进行TB测试 (PPD实验及IGRA); ②在结核菌素试验中, 若硬结直径 $\geq 5$  mm, 不论是否接种过卡介苗 (Bacillus Calmette-Guerin, BCG) 均为阳性; ③如任何一项检测试验结果为阳性, 并明确排除活动性ATB则可以诊断潜伏期感染。④TB测试年龄上限为65岁; 健康对照组: ①健康体检者均无TB个人病史、TB患者家族感染史和近6个月无活动性TB患者密切接触史; ②IGRA及PPD试验阴性; ③年龄18~65岁。

1.2.2 排除标准 ①确定诊断为慢性肠炎、免疫缺陷性疾病和糖尿病等慢性疾病患者; ②并发肝炎和获得性免疫缺陷综合征 (acquired immune deficiency syndrome, AIDS) 等传染性疾病者; ③近期曾进行手术或服用激素、免疫抑制剂治疗者;

④不配合或非自愿参与者。

### 1.3 主要试剂和仪器

人 IL-10 和 TNF- $\alpha$  酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒 (北京博奥森生物技术有限公司)、MMR/CD206/甘露糖受体抗体 (上海优宁维生物科技有限公司), Anti-CD80 抗体 [艾博抗 (上海) 贸易有限公司], RNAsimple 总 RNA 提取试剂盒、FastKing 一步法除基因组 cDNA 第一链合成预混试剂和 FastReal 快速荧光定量 PCR 预混试剂 [天根生化科技 (北京) 有限公司], 山羊抗兔 IgG H&L (Alexa Fluor<sup>®</sup>488) (上海钰博科技有限公司产品), 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) (上海申启科技有限公司), 无水乙醇和异丙醇 (天津市致远化学试剂有限公司)。超净台 (型号: SW-CJ-2FD) (苏州安泰空气技术公司)、PCR 扩增仪、离心机 (型号: 5424R)、漩涡混合器和 minispinplus 离心机 (德国 Eppendorf 公司), 实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR) 仪 (型号: Quantstudio5) 和 NanoDrop2000C 核酸检测仪 (美国 Thermo 公司), 分光光度测色仪 (美国 Bio-Rad 公司), BECKMAN FC-500 流式细胞仪 (美国贝克曼库尔特有限公司), 制冰机 (日本 Panasonic 电器公司), 恒温培养箱 (美国 SHELLAB 公司) 等。

### 1.4 血清提取

所有研究对象均在禁食 12 h 后次日清晨采集空腹静脉血 10 mL, 分别置入干燥、无菌促凝管和抗凝管中各 5 mL, 使得血液充分混匀, 并记录各组研究对象的基本信息, 如姓名、性别、组别和收集日期、血沉 (erythrocyte sedimentation rate, ESR)、白细胞 (white blood cell, WBC) 计数、单核细胞 (monocyte, MONO) 百分比、淋巴细胞 (lymphocyte, LY) 百分比等, 促凝管中的血样本用离心机离心出血清置于 EP 管中, 血清和抗凝管中的全血分别于  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存备用。

### 1.5 ELISA 法检测各组研究对象血清中炎症因子 TNF- $\alpha$ 和 IL-10 水平

所有样本室温融化、平衡, 并做复孔 (上样), 准备各工作液。按照 ELISA 试剂盒说明书操作, 采用酶标仪, 于波长 450 nm 处检测吸光度 (A) 值, 绘制标准曲线, 计算各组研究对象血清中炎症因子 TNF- $\alpha$  和 IL-10 水平。

### 1.6 流式细胞术检测各组研究对象 PBMCs 中 CD80 和 CD206 蛋白表达水平

所有样本室温融化、平衡, 准备各工作液。向装有细胞沉淀 EP 管中加入 PBS 缓冲液, 将管底的沉淀吹打备用, 制备细胞悬液。将装有 PBMCs 悬液的 EP 管离心,  $800\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ , 离心 5 min, 沉淀物即为细胞。采用预冷 PBS 缓冲液洗涤 2 次, 再次离心  $500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ , 离心 5 min。弃上清, 加入  $50\text{ }\mu\text{L}$  底物, 充分振摇混匀。再用预冷 PBS 缓冲液洗涤 2 次, 再次  $600\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 5 min。加入二抗, 于  $37^{\circ}\text{C}$  水浴锅孵育 30 min。采用流式细胞仪计算各组研究对象 PBMCs 中 CD80 和 CD206 蛋白表达水平, 以百分率 (%) 表示。

### 1.7 RT-qPCR 法检测各组研究对象 PBMCs 中 miR-125a-5p 和 IL-6 mRNA 表达水平

按照试剂盒说明书方法提取总 RNA, Nandrop200 检测 RNA 的浓度和纯度, 采用逆转录试剂盒合成 cDNA, 以  $\beta$ -actin 为内参基因, 进行 RT-qPCR 法检测。反应体系:  $5\times\text{SYBR Super mix plus } 10\text{ }\mu\text{L}$ , 模板 cDNA  $200\text{ }\mu\text{g}$ , 上下游引物各  $1\text{ }\mu\text{L}$ , 加入水补齐至  $20\text{ }\mu\text{L}$ 。反应条件: 反应温度梯度预变性  $95^{\circ}\text{C}$ 、15 min, RT-PCR 反应条件  $95^{\circ}\text{C}$ 、10 s,  $55^{\circ}\text{C}$ 、20 s,  $72^{\circ}\text{C}$ 、32 s, 共 40 个循环。引物序列: miR-125a-5p F TGCCAGTCTCTAGGTCCCTGAG, miR-125a-5p R CAGACGCCAGGCTCCCAAG; IL-6 F GGTGTTGCCTGCTGCCTTCC, IL-6 R GTTCTGAAGAGGTGAGTGGCTGTC;  $\beta$ -actin F CATCTGCTGGAA-GGTGGACA,  $\beta$ -actin R CGACAGGATGCAGAGGAGA。采用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法计算各组 PBMCs 中目的基因表达水平。

### 1.8 统计学分析

采用 SPSS 28.0 和 GraphPad Prism 9.0 统计软件进行统计学分析。各组研究对象年龄、血清 ESR、WBC 计数、MONO 百分比和 LY 百分比均符合正态分布, 以  $\bar{x}\pm s$  表示, 正态分布资料多组间样本均数比较采用单因素方差分析, 组间样本均数两两比较采用 LSD- $t$  检验; PBMCs 中 miR-125a-5p 和 IL-6 mRNA 表达水平及 TNF- $\alpha$  和 IL-10 水平符合偏态分布, 以  $M(P25, P75)$  表示, 偏态分布的组间及两两比较采用 Kruskal-Wallis  $H$  秩和检验, 分类数据比较采用卡方检验; 相关性分析采用 Spearman 相关分析, 以  $P<0.05$  为差异有统计

学意义。绘制受试者工作特征 (receiver operating characteristic, ROC) 曲线, 计算曲线下面积 (area under curve, AUC) 和 95% 置信区间 (confidence interval, CI), 以确定 *miR-125a-5p* 对 LTBI 患者诊断的灵敏度和特异度。

## 2 结果

### 2.1 一般资料

各组研究对象中, ATB 组患者男性 21 例, 女性 19 例; 平均年龄 (39.50±12.39) 岁。LTBI 组患者男性 18 例, 女性 17 例, 平均年龄 (43.23±12.70) 岁。对照组研究对象男性 17 人, 女性 23 人, 平均年龄 (46.25±11.74) 岁。3 组研究对象一般资料比较差异均无统计学意义 ( $P>0.05$ ), 提示 3 组具有可比性。见表 1。

### 2.2 各组研究对象血清中 ESR、WBC 计数、LY 百分比、MONO 百分比、TNF- $\alpha$ 水平和 IL-10 水平

与对照组比较, ATB 组和 LTBI 组患者血清中 ESR、MONO 百分比、TNF- $\alpha$  和 IL-10 水平均明显升高 ( $P<0.05$ ), LY 百分比明显降低 ( $P<0.05$ )。与 ATB 组比较, LTBI 组患者血清中 ESR 和

表 1 各组研究对象一般资料

Tab. 1 General informations of subjects in various groups

Group	<i>n</i>	Gender [ <i>n</i> ( $\eta/\%$ )]		Age ( $\bar{x}\pm s$ )
		Male	Female	
Control	40	17(42.50)	23(57.50)	46.25±11.74
ATB	40	21(52.50)	19(47.50)	39.50±12.39
LTBI	35	18(51.40)	17(48.60)	43.23±12.70
$\chi^2/F$			0.943	3.041
<i>P</i>			0.624	0.052

IL-10 水平均明显降低 ( $P<0.05$ ), LY 百分比明显升高 ( $P<0.05$ )。WBC 计数组间比较差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。见表 2。

### 2.3 各组研究对象 PBMCs 中 CD80 和 CD206 蛋白表达水平

与对照组比较, ATB 组和 LTBI 组患者 PBMCs 中 CD80 和 CD206 蛋白表达水平明显升高 ( $P<0.05$ )。与 ATB 组比较, LTBI 组患者 PBMCs 中 CD206 蛋白表达水平明显升高 ( $P<0.05$ ), CD80 蛋白表达水平明显降低 ( $P<0.05$ )。见图 1 和 2。

表 2 各组研究对象对象血清中 ESR、WBC 计数、LY 百分比、MONO 百分比、TNF- $\alpha$  水平和 IL-10 水平

Tab. 2 Levels of ESR, WBC counts, percentages of LY, percentages of MONO, TNF- $\alpha$  levels and IL-10 levels in serum of subjects in various groups

Group	<i>n</i>	ESR	WBC	Percentages of	Percentages of	TNF- $\alpha$	IL-10
		(mm·h <sup>-1</sup> )	( $\times 10^9$ L <sup>-1</sup> )	MONO ( $\eta/\%$ )	LY ( $\eta/\%$ )	[ $\rho_B/(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$ ]	[ $\rho_B/(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$ ]
Control	40	5.63±3.13	6.13±1.47	6.31±1.92	28.58±6.13	11.87 (10.71, 15.62)	53.02 (47.34, 60.26)
ATB	40	23.40±15.51*	6.69±2.16	7.92±2.14*	17.35±6.10*	18.20 (15.50, 26.33)*	100.39 (61.10, 123.05)*
LTBI	35	17.23±10.93 <sup>△</sup>	6.66±2.50	7.37±2.03*	22.18±6.81 <sup>△</sup>	21.31 (18.49, 32.55)*	78.19 (65.99, 87.73) <sup>△</sup>
H/F		26.31	0.93	6.46	31.61	54.72	31.81
<i>P</i>		<0.01	0.40	0.02	<0.01	<0.01	<0.01

\* $P<0.05$  vs control group; <sup>△</sup> $P<0.05$  vs ATB group.

### 2.4 各组研究对象 PBMCs 中 *miR-125a-5p* 和 *IL-6* mRNA 表达水平

与对照组比较, ATB 组和 LTBI 组患者 PBMCs 中 *miR-125a-5p* 和 *IL-6* mRNA 表达水平均明显升高 ( $P<0.05$ )。与 ATB 组比较, LTBI 组患者 PBMCs 中 *miR-125a-5p* 和 *IL-6* mRNA 表达水平均明显升高 ( $P<0.05$ )。见表 3。

### 2.5 LTBI 组患者 *miR-125a-5p* 表达水平与 TNF- $\alpha$ 和 IL-10 水平及 *IL-6* mRNA 表达水平的相关性

*miR-125a-5p* 表达水平与 TNF- $\alpha$  水平和 *IL-6* mRNA 表达水平呈正相关关系 ( $r=0.406$ ,

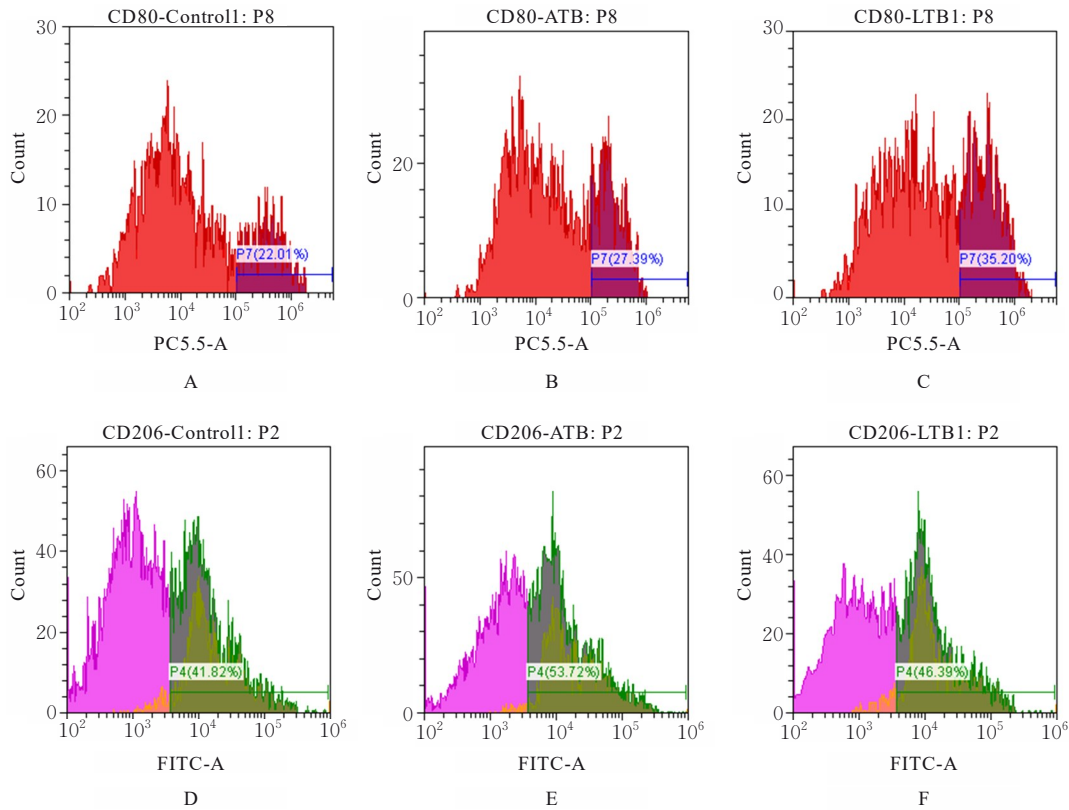
$P<0.05$ ;  $r=0.351$ ,  $P<0.05$ ), 与 IL-10 水平呈负相关关系 ( $r=-0.368$ ,  $P<0.05$ )。见图 3。

### 2.6 *miR-125a-5p* 表达水平对于 LTBI 的预测价值

绘制 LTBI 和 ATB 患者 PBMCs 中 *miR-125a-5p* 表达水平的 ROC 曲线, AUC 值为 0.89 ( $P<0.01$ ), 灵敏度为 0.85, 特异度为 0.88, 提示 *miR-125a-5p* 表达水平对 LTBI 和 ATB 的诊断有意义, 且诊断效能较大。见图 4。

## 3 讨论

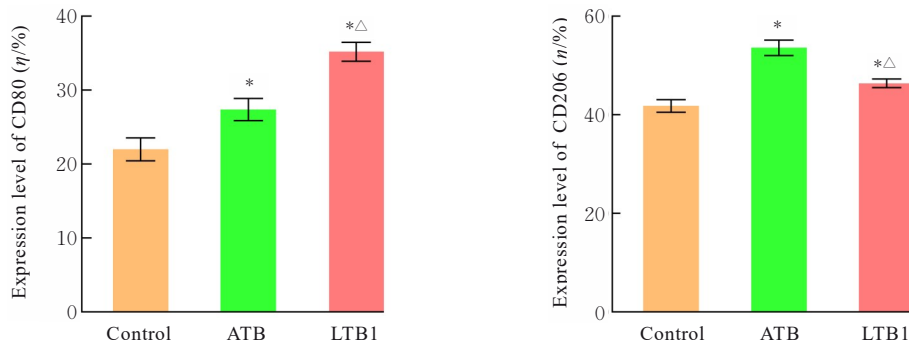
PTB 是由 MTB 引起的慢性传染病, 主要



A—C: CD80; D—F: CD206; A, D: Control group; B, E: ATB group; C, F: LTBI group.

图1 流式细胞术检测各组研究对象PBMCs中CD80和CD206蛋白表达水平

Fig. 1 Expression levels of CD80 and CD206 proteins in serum of subjects in various groups



\* $P < 0.05$  vs control group;  $\Delta P < 0.05$  vs ATB group.

图2 各组研究对象PBMCs中CD80和CD206蛋白表达水平

Fig. 2 Expression levels of CD80 and CD206 proteins in serum of subjects in various groups

影响肺部, 全球发病率和死亡率高。中国2022年新增病例74.8万(发病率52/10万), 在30个高负担国家中排名第三<sup>[23]</sup>。在西北地区, PTB发病率更高<sup>[24]</sup>。LTBI的检测和预防是预防PTB的重要挑战。研究<sup>[25]</sup>比较健康个体与ATB及LTBI的基因表达, 揭示了关键生物过程的调控标志, 涉及炎症反应、免疫防御、细胞活化及增殖等。ATB的

PBMCs和血清中miRNA表达水平存在差异, 且miR-21、miR-31、miR-146a和miR-155相关miRNA参与结核病的免疫和炎症反应<sup>[26-27]</sup>。久太等<sup>[28]</sup>研究发现: ATB中有1个基因表达水平升高, 而在LTBI中, 6个基因表达增加。miRNA参与LTBI到ATB的疾病进展过程<sup>[29]</sup>。

miRNA在调控LTBI的巨噬细胞极化中起关

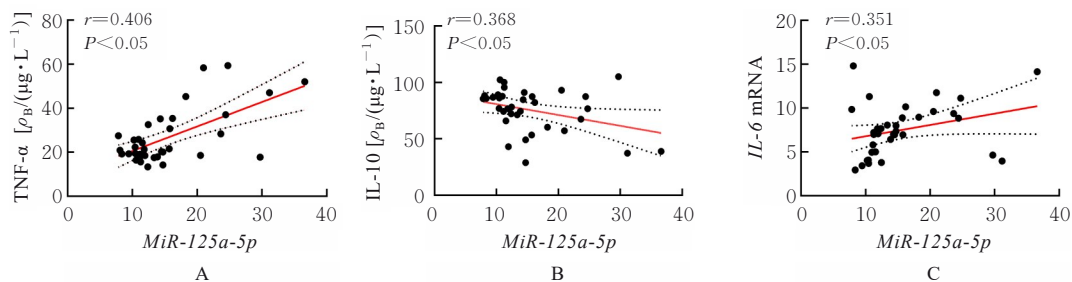
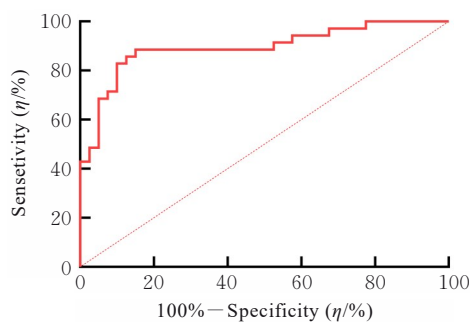
表3 各组研究对象 PBMCs 中 *miR-125a-5p* 和 *IL-6* mRNA 表达水平Tab. 3 Expression levels of *miR-125a-5p*, *IL-6* mRNA in PBMCs of subjects in three groups [M(P25, P75)]

Group	<i>miR-125a-5p</i>	<i>IL-6</i> mRNA
Control	1.00	1.00
ATB	5.04(3.93, 7.23)*	3.19(2.97, 3.82)*
LTBI	13.36(10.96, 18.26)* <sup>△</sup>	7.89(7.03, 8.96)* <sup>△</sup>
H	101.86	103.71
P	<0.01	<0.01

\* $P < 0.05$  vs control group; <sup>△</sup> $P < 0.05$  vs ATB group.

键作用, 而 MTB 感染的免疫反应主要通过巨噬细胞发挥作用<sup>[16]</sup>。巨噬细胞可极化为两种类型 M1 型和 M2 型, 脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 和 IL-4 刺激的人巨噬细胞分别表现出 M1 型和 M2 型特征, CD80 和 CD86 在两者中发挥重要作用, 影响 T 辅助细胞 1 (T helper 1 cells, Th1) 和 T 辅助细胞 2 (T helper 2 cells, Th2) 的平衡。M1 型巨

噬细胞释放大促炎因子, 而 M2 型则增加免疫抑制因子如转化生长因子  $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ ) 抑制炎症, LTBI 与 ATB 在巨噬细胞极化方向的差异<sup>[30]</sup>。研究<sup>[30]</sup>显示: *miR-125a-5p* 通过抑制肿瘤坏死因子  $\alpha$  诱导蛋白 3 (tumor necrosis factor  $\alpha$ -induced protein 3, TNFAIP3) 表达, 促进 M1 标志物上调, 从而调控巨噬细胞向 M1 极化。TLR 和  $\gamma$  干扰素刺激信号转导与转录激活因子 (signal transducer and activator of transcription, STAT) 1 激活干扰素调节因子 (interferon regulatory factor, IRF) 和 STAT, 促进 M1 应答, 而 IL-10 则通过 STAT6 诱导 IRF/STAT, 促进 M2 应答<sup>[31]</sup>。ALTB 中,  $\gamma$  干扰素通路中的免疫抑制细胞信号转导抑制因子 3 (suppressor of cytokine signaling-3, SOCS-3) 上调, 进而抑制了 IL-6 的活化, 但不抑制 IL-10<sup>[32]</sup>。也有研究<sup>[33]</sup>证实在 ATB 中 IL-10 表达水平明显高于 LTBI, 这与本研究结果一致。

A: TNF- $\alpha$ ; B: IL-10; C: *IL-6* mRNA.图3 LTBI组患者 *miR-125a-5p* 表达水平与 TNF- $\alpha$  和 IL-10 水平及 *IL-6* 表达水平的相关性Fig. 3 Correlations between expression level of *miR-125a-5p* and levels TNF- $\alpha$ , and IL-10 and expression level of *IL-6* mRNA of subjects in LTBI group图4 *MiR-125a-5p* 鉴别诊断 ATB 与 LTBI 患者的 ROC 曲线Fig. 4 ROC curves of *miR-125a-5p* for diagnosis of ATB and LTBI patients

本研究结果显示: 在 LTBI 患者 PBMCs 中 CD80 蛋白表达水平升高, CD206 蛋白表达水平降低, 提示其 M1 极化能力增强, *miR-125a-5p* 呈显著高表达, *IL-6* mRNA 表达水平和 TNF- $\alpha$  水平明显升高, IL-10 水平明显降低, 提示 *miR-125a-5p* 与巨噬细胞向 M1 型极化相关, 从而促进 IL-6 和 TNF- $\alpha$  的表达, 增强免疫功能, 减少 M2 型极化和 IL-10 的分泌, 促进组织修复, 进而避免 ATB 发生, *miR-125a-5p* 对 LTBI 诱导巨噬细胞的炎症反应起正调节作用; 而 ATB 患者 PBMCs 中 CD80 蛋白表达水平降低, CD206 蛋白表达水平升高, 显示 M2 极化能力增强, IL-6 表达水平低于 LTBI 患者, 但 IL-10 高表达, 这与 LI 等<sup>[32]</sup> 研究结论一致。

本研究结果显示:与对照组比较,ATB组患者PBMCs中 *miR-125a-5p* 表达水平和TNF- $\alpha$ 水平较高,提示其依然调控M1型极化,但可能调节M1极化的能力较LTBI组弱,导致ATB的发生。本研究结果显示:*miR-125a-5p*的ROC曲线表现出中等区分效率,灵敏度和特异度较高,表明*miR-125a-5p*对LTBI具有良好的诊断价值。

综上所述,*miR-125a-5p*在LTBI中显著高表达,可影响巨噬细胞向M1极化。*miR-125a-5p*有望作为LTBI的分子诊断标志物,为LTBI提供新的诊断方向。

#### 利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

#### 作者贡献声明:

刘洪千参与研究设计和论文撰写,刘荣参与实验操作和论文撰写,陈娟娟参与实验操作,武玲玲和王成军参与数据收集、整理和分析,久太参与论文审校。

#### [参考文献]

- [1] BAGCCHI S. WHO's global tuberculosis report 2022[J]. *Lancet Microbe*, 2023, 4(1): e20.
- [2] SCHRAUFNAGEL D E. "Latent tuberculosis infection" is a term that should go dormant, and the significance of latent tuberculosis should be rethought[J]. *Annals ATS*, 2016, 13(5): 593-594.
- [3] GANESAN V, JANAGOND A, VIJAY KUMAR G S, et al. Screening of health-care workers for latent tuberculosis infection in a Tertiary Care Hospital[J]. *Int J Mycobacteriol*, 2017, 6(3): 253.
- [4] MAES R. Evaluation of the therapeutic, diagnostic, and prognostic means currently applied to counter the surge of tuberculosis[J]. *Biomed Biotechnol Res J*, 2019, 3(3): 140.
- [5] AI J W, RUAN Q L, LIU Q H, et al. Updates on the risk factors for latent tuberculosis reactivation and their managements[J]. *Emerg Microbes Infect*, 2016, 5(1): 1-8.
- [6] GETAHUN H, MATTEELLI A, CHAISSON R E, et al. Latent *Mycobacterium tuberculosis* infection[J]. *N Engl J Med*, 2015, 372(22): 2127-2135.
- [7] 朱鹏,张伟.肺结核合并诺卡菌病1例报告[J]. *中国实用内科杂志*, 2024, 44(3): 261-264.
- [8] DHEDA K, DAVIDS M. Latent tuberculosis infection-associated immunodiagnostic test responses as biomarkers of incipient tuberculosis: fruitful or futile? [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2020, 201(8): 895-898.
- [9] EZEONU C T, IKEAGWULONU R C, ASIEGBU U V, et al. Tuberculin skin tests following Bacille Calmette Guerin vaccination in Africa: a protocol for systematic review and meta-analysis [J]. *Pan Afr Med J*, 2022, 41: 12.
- [10] QIU X, TANG Y, ZOU R, et al. Diagnostic accuracy of interferon-gamma-induced protein 10 for differentiating active tuberculosis from latent tuberculosis: a meta-analysis[J]. *Sci Rep*, 2019, 9: 11408.
- [11] HWANG H, HWANG B Y, BUENO J. Biomarkers in infectious diseases [J]. *Dis Markers*, 2018, 2018: 8509127.
- [12] LEE S H. Tuberculosis infection and latent tuberculosis[J]. *Tuberc Respir Dis*, 2016, 79(4): 201.
- [13] GÜNER A E, KIZILTAS S, BABALIK A, et al. Outcomes of latent tuberculosis infection treatment in Istanbul[J]. *Int J Mycobacteriol*, 2022, 11(4): 442-447.
- [14] SABIR N, HUSSAIN T, SHAH S ZALI, et al. miRNAs in tuberculosis: new avenues for diagnosis and host-directed therapy[J]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 602.
- [15] 冯真,张博,邓思齐,等.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[J]. *安徽医科大学学报*, 2022, 57(12): 1979-1984.
- [16] PENG Z L, CHEN L, ZHANG H. Serum proteomic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* antigens for discriminating active tuberculosis from latent infection[J]. *J Int Med Res*, 2020, 48(3): 0300060520910042.
- [17] 刘守江,张帆,魏巍,等.结核潜伏感染者全血miR-144-3p、miR-146a-5p的表达[J]. *临床肺科杂志*, 2013, 18(7): 1270-1271.
- [18] GINHOUX F, GUILLIAMS M. Tissue-resident macrophage ontogeny and homeostasis [J]. *Immunity*, 2016, 44(3): 439-449.
- [19] KIM S W, RAMASAMY K, BOUAMAR H, et al. microRNAs miR-125a and miR-125b constitutively activate the NF- $\kappa$ B pathway by targeting the tumor necrosis factor alpha-induced protein 3 (*TNFAIP3*, *A20*) [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(20): 7865-7870.
- [20] JAYARAMAN J, JESUDOSS V A S, MENON V P, et al. Anti-inflammatory role of naringenin in rats with ethanol induced liver injury [J]. *Toxicol Mech Meth*, 2012, 22(7): 568-576.
- [21] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会.肺结核诊断标准(WS 288-2017) [J]. *新发传染病电子杂志*, 2018, 3(1): 59-61.
- [22] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会.结核病

- 分类(WS196-2017)[J]. 新发传染病电子杂志, 2018, 3(3): 191-192.
- [23] 舒薇, 刘宇红. 世界卫生组织《2023年全球结核病报告》解读[J]. 结核与肺部疾病杂志, 2024, 5(1): 15-19.
- [24] 艾克旦, 商越, 王兆芬, 等. 青海省南部2009—2019年肺结核时空分布特征演变研究[J]. 中国预防医学杂志, 2021, 22(8): 582-586.
- [25] SELF-FORDHAM J B, NAQVI A R, UTTAMANI J R, et al. microRNA: dynamic regulators of macrophage polarization and plasticity[J]. *Front Immunol*, 2017, 8: 1062.
- [26] LIANG S F, MA J C, GONG H L, et al. Immune regulation and emerging roles of noncoding RNAs in *Mycobacterium tuberculosis* infection [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 987018.
- [27] ALIJANI E, RIAZI RAD F, KATEBI A, et al. Differential expression of miR-146 and miR-155 in active and latent tuberculosis infection[J]. *Ijph*, 2023: 1749-1757.
- [28] 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]. 中华肺部疾病杂志(电子版), 2019, 12(6): 702-707.
- [29] 余海茹, 闫晔鑫, 杨娇, 等. 2004至2021年中国肺结核发病趋势及空间分布特征[J]. 郑州大学学报(医学版), 2024, 59(2): 274-279.
- [30] GRAFF J W, DICKSON A M, CLAY G, et al. Identifying functional microRNAs in macrophages with polarized phenotypes[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(26): 21816-21825.
- [31] WANG N, LIANG H W, ZEN K. Molecular mechanisms that influence the macrophage M1â€“M2 polarization balance[J]. *Front Immunol*, 2014, 5: 614.
- [32] LI Q, WANG C, GOU J Z, et al. Deciphering lung granulomas in HIV & TB co-infection: unveiling macrophages aggregation with IL6R/STAT3 activation [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2024, 13: 2366359.
- [33] IZUMIDA M, JOBE H, COKER E G, et al. HBHA induces IL-10 from CD4<sup>+</sup> T cells in patients with active tuberculosis but IFN- $\gamma$  and IL-17 from individuals with *Mycobacterium tuberculosis* infection [J]. *Front Immunol*, 2024, 15: 1422700.