

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.

Wang Q, Fu Y, Wang P. Regulatory effect and mechanism of silencing microRNA-16 on immune function in mice with pulmonary tuberculosis [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(4): 86-91.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2020.04.013

# 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

王 琴,付 宇\*,王 平

(湖北省十堰市人民医院 儿科,湖北 十堰 442000)

**【摘要】** 目的 研究沉默 miR-16 对肺结核模型小鼠免疫功能的调控作用及其机制。方法 选取 CD2F1 雌性小鼠 40 只,分为正常组、模型组、过表达组、沉默组各 10 只,模型组、过表达组、沉默组建立肺结核模型,建模成功后,过表达组、沉默组小鼠肺部无菌注射 10  $\mu$ L miR-16 慢病毒悬液。检测肺组织中 T 淋巴细胞亚群、胸腺指数、肺部炎症因子以及 Toll 样受体 (TLRs) 信号通路因子水平。结果 过表达组小鼠 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>、胸腺指数、IL-10 水平低于模型组,CD8<sup>+</sup>、IL-6、TNF- $\alpha$ 、TLR2、TLR4、NF- $\kappa$ B 水平高于模型组 ( $P < 0.05$ )。沉默组小鼠 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>、胸腺指数、IL-10 水平高于模型组,CD8<sup>+</sup>、IL-6、TNF- $\alpha$ 、TLR2、TLR4、NF- $\kappa$ B 水平低于模型组 ( $P < 0.05$ )。沉默组小鼠 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>、胸腺指数、IL-10 水平高于过表达组,CD8<sup>+</sup>、IL-6、TNF- $\alpha$ 、TLR2、TLR4、NF- $\kappa$ B 水平低于过表达组 ( $P < 0.05$ )。结论 沉默 miR-16 可能通过作用于 TLRs 信号通路,抑制通路因子的异常表达,调节机体免疫反应,改善机体免疫障碍而起到调控肺结核小鼠免疫功能的作用。

**【关键词】** miR-16;肺结核;TLRs 信号通路;免疫功能

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 04-0086-06

## Regulatory effect and mechanism of silencing microRNA-16 on immune function in mice with pulmonary tuberculosis

WANG Qin, FU Yu\*, WANG Ping

(Department of Pediatrics, Renmin Hospital, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, China)

**【Abstract】** **Objective** To study the regulatory effect and mechanism of silencing microRNA-16 on immune function in mice with pulmonary tuberculosis. **Methods** Forty CD2F1 female mice were divided into the control group, model group, overexpression group, and silent group ( $n = 10$  per group). In the model group, overexpression group, and silent group, the pulmonary tuberculosis model was established. After successful modeling, the overexpression group and silent group were aseptically injected with 10  $\mu$ L microRNA-16 lentivirus suspension. T lymphocyte subsets, thymus index, lung inflammatory factors and toll like receptor (TLRs) signaling pathway factors were detected in lung tissues. **Results** The levels of CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, thymus index and IL-10 in the overexpression group were lower than those in the model group, while the levels of CD8<sup>+</sup>, IL-6, TNF- $\alpha$ , TLR2, TLR4 and NF- $\kappa$ B in the overexpression group were

[作者简介]王琴(1981—),女,本科,研究方向:儿童保健与康复。E-mail: 510281239@qq.com

[通信作者]付宇(1985—),女,本科,研究方向:儿童康复医学。E-mail: 452534244@qq.com

higher than those in the model group ( $P < 0.05$ ). The levels of CD3+, CD4+, CD4+/CD8+, thymus index and IL-10 in the silence group were higher than those in the model group, while the levels of CD8+, IL-6, TNF- $\alpha$ , TLR2, TLR4 and NF- $\kappa$ B in the silence group were lower than those in the model group ( $P < 0.05$ ). The levels of CD3+, CD4+, CD4+/CD8+, thymus index and IL-10 in the silence group were higher than those in the over expression group, and the levels of CD8+, IL-6, TNF- $\alpha$ , TLR2, TLR4 and NF- $\kappa$ B were lower than those in the over expression group ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** Silencing microRNA-16 may play a role in regulating the immune function in mice with tuberculosis, by acting on TLR signaling pathways and inhibiting abnormal expression of pathway factors, thus regulating the immune response and improving immune disorders.

**【Keywords】** microRNA-16; tuberculosis; TLR signaling pathway; immune function

肺结核是一种由结核分枝杆菌所引发的传染性疾病,有研究表明,结核病为一种传染性死亡的病因,肺结核的死亡率仅低于免疫缺陷病毒性疾病的死亡率,严重威胁着全球人类的身体健康,我国肺结核的发病率处于世界第二位,且随着医疗费用的不断增长,研究肺结核的发病机制迫在眉睫<sup>[1]</sup>。目前研究发现<sup>[2]</sup> miRNA 与艾滋病、乙型肝炎、非典型肺炎、肺结核等多种感染性疾病的发生有关。Abdalla 等<sup>[3]</sup>在其研究中发现,结核分枝杆菌可对 miRNA 产生改变作用,一方面可对巨噬细胞的死亡通路进行调控,另一方面 miRNA 可促进结核分枝杆菌在人体细胞内生存,对炎症介质的发生产生阻断作用。Wagh 等<sup>[4]</sup>研究结果显示 miR-16 在肺结核患者中的水平显著高于健康人,且 Miotto 等<sup>[5]</sup>在其研究证实 miR-16 水平的增加是在肺结核导致的溶血过程中所体现的。但目前对于 miR-16 作用于肺结核的机制临床上尚未有研究,因此在本文研究中为研究 miR-16 在肺结核中的作用机制,建立肺结核模型小鼠,沉默 miR-16 的表达,以明确 miR-16 的作用机制,为临床上肺结核的研究提供新方向。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 实验动物

SPF 级 CD2F1 雌性小鼠 40 只,体重 18~29 g, 8 周龄,均购于中国科学院过程工程研究所[SCXK(京)2019-0004],无菌手术在中国科学院过程工程研究所动物实验中心屏障动物实验设施进行[SYXK(京)2019-0011]。所有小鼠均养殖在干净笼子里,室温在(22.1±1.8)℃,相对湿度 35%~40%,每天光照 12 h,喂饮纯净水,饲养时间为一周。本文研究实验获得我院伦理委员会批准(IACUC20190603),并符合实验动物使用的 3R

原则。

#### 1.1.2 菌株

标准人型结核菌株 H37Rv(购自加拿大 GE Healthcare)。

### 1.2 主要试剂

PE 标记的小鼠抗人 CD11b/Mac-1 抗体、APC 标记的小鼠抗人 CD33 抗体、FITC 标记的小鼠抗人 HLA-DR 抗体、PE 标记的小鼠抗人 CD3 抗体、FITC 标记的小鼠抗人 PD-1 抗体(均购于美国艾美捷 SouthernBiotec,货号:9546-09、9590-11、9568-16、9558-12、9550-08);PBS 缓冲液、Ficoll 液(上海恒斐生物科技有限公司,货号:P1010、CS0024);D-Hank's 液(北京华迈科生物技术有限责任公司,货号:HMK0011);小鼠抗大鼠 IL-2 抗体、小鼠抗大鼠 IFN- $\gamma$  抗体(武汉菲恩生物科技有限公司,货号:FNab09820、BA3383-2);小鼠抗大鼠 IL-15 抗体(艾美捷科技有限公司,货号:5172-100)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 慢病毒载体构建

miR-16 表达抑制的慢病毒载体构建及测定大鼠 miR-16 的序列查找和设计由广州易锦公司完成。重组的 LV-miR-16 和 LV-sponge(抑制载体)慢病毒表达载体由广州易锦公司合成,并经测序并测定慢病毒滴度,重组慢病毒,置于-80℃冰箱备用。

#### 1.3.2 分组及建模

选取 40 只 CD2F1 雌性小鼠中 10 只作为正常组,其余小鼠均参照王青乐等<sup>[6]</sup>研究实验中肺结核小鼠模型的建立方法建立肺结核小鼠模型,使用标准人型结核菌株 H37Rv 在 ABSL-3 级实验室采用滴鼻法对进行感染处理,菌液浓度为 $1 \times 10^7$  CFU/mL,所有小鼠每只均滴鼻 20  $\mu$ L,建立肺结核小鼠模型。在建模成功后,将肺结核小鼠随机分为模型组、过表达组、沉默组各 10 只,沉默组小鼠肺部注射含 10  $\mu$ L miR-16 抑制载体的慢病毒悬液,过表达组小鼠

肺部注射含 10  $\mu\text{L}$  miR-16 表达载体的慢病毒悬液,正常组、模型组小鼠不做任何处理。

### 1.3.3 切片及染色

随机各选取四组小鼠中任意 1 只,行全麻处理后,处死,在无菌、低温条件下取小鼠肺组织,将小鼠肺组织在 4% 多聚甲醛中浸泡、固定,在温度为 4 $^{\circ}\text{C}$  的环境下进行保存。之后行 HE 染色处理,观察病理组织变化。

### 1.3.4 T 淋巴细胞亚群、胸腺指数检测

取小鼠尾静脉血 2 mL,使用肝素钠行抗凝处理,使用流式细胞仪检测小鼠 T 淋巴细胞亚群 CD3 $^{+}$ 、CD4 $^{+}$ 、CD8 $^{+}$ 、CD4 $^{+}$ /CD8 $^{+}$  水平。胸腺指数测定:将小鼠的胸腺完全剥离,立即使用电子天平测定重量,计算胸腺指数,胸腺指数 = 胸腺质量/体质量。

### 1.3.5 肺炎症指标检测

采用 ELISA 法检测炎症指标,具体方法如下:将肺组织研磨成浆,取适量包被液 (pH = 9.5, 0.05 mol/L) 稀释,分别将 0.1 mL 抗 IL-6、IL-10 及 TNF- $\alpha$  置于聚苯乙烯反应板孔内,并置于 4 $^{\circ}\text{C}$  放置过夜,应用洗涤剂洗涤,向各孔分别加入 Tris-HCl 缓冲液 (pH = 7.4, 0.02 mol/L) 稀释待测标本至 0.1 mL,同法制作阴性与阳性对照,在 43 $^{\circ}\text{C}$  水浴恒温保持 1.0 h,移除液体并甩干。向各孔分别加入 0.1 mL IL-6、IL-10 及 TNF- $\alpha$  的酶标抗体,继续在 43 $^{\circ}\text{C}$  水浴恒温保持 1.0 h,移除液体并甩干。向各孔中加入 0.1 mL 底物液 (0.1 mol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  35.8 g/L) + 4.86 mL 枸橼酸 (0.05 mol/L) + 4 mg 邻苯二胺),遮光放置 30 min,再在各孔中加入终止液 2 mol/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.05 mL,终止反应。在酶标仪上读取波长为 405 nm 处的吸收值,参照标准曲线计算肺组织的 IL-6、IL-10 及 TNF- $\alpha$  水平。

### 1.3.6 TLRs 信号通路因子检测

采用荧光定量 RT-PCR 技术进行检测,25  $\mu\text{L}$  的反应体系:2.5  $\mu\text{L}$  PCR 缓冲液、1.5  $\mu\text{L}$   $\text{MgCl}_2$ 、0.5  $\mu\text{L}$  上下游引物,加水至 25  $\mu\text{L}$ 。反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$  60 s,55 $^{\circ}\text{C}$  60 s,72 $^{\circ}\text{C}$  60 s,35 个循环,72 $^{\circ}\text{C}$  延长 5 min,采用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法计算待测的 TLR2、TLR4、NF- $\kappa\text{B}$  相对表达,每个样品重复 3 次取均值, $\beta$ -actin 为内参。TLR2:上游引物:5'-CTGAGCCTCGTCCATGCCACTC-3';下游引物:5'-GGCCAGCAAATTACCTGTGTG-3'。TLR4:上游引物:5'-TGGATACGTTTC

CTTATAAGG-3';下游引物:5'-GAAATGGAGGCACCCCTTC-3'。NF- $\kappa\text{B}$ :上游引物:5'-CAAGATCTTCGGAGTAAACC-3';下游引物:5'-TCGGAACACAATGGCCACTT-3'。

## 1.4 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计软件包统计分析本文的数据,其中计量资料,如 IL-6、IL-10 及 TNF- $\alpha$ ,采用“平均数 $\pm$ 标准差”( $\bar{x}\pm s$ ) 方式进行描述,多组间的计量资料比较采用单因素方差分析,组内比较采用 SNK 检验, $P < 0.05$  具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 小鼠一般形态变化

正常组小鼠皮毛光滑有亮泽,精神状态较好,饮食正常,无死亡。模型组小鼠皮毛无光泽、稀疏,反应迟钝,精神不佳,饮食减少,大便稀溏,其中 2 只小鼠因胸腔淤血死亡,另外 8 只小鼠肺部出现粟粒样结节。过表达组小鼠皮毛较为稀疏,无光泽,精神萎靡,饮食明显减少,其中 3 只小鼠因胸腔淤血死亡,另外 7 只小鼠肺部出现粟粒样结节,并布满整个肺部。沉默组小鼠,毛色恢复光泽,喜好活动,精神状态较好,饮食正常,偶尔出现大便干结,其中 2 只小鼠因胸腔淤血死亡,1 只小鼠肺部出现粟粒样结节。

### 2.2 四组小鼠肺组织病理变化观察

如图 1 所示,正常组小鼠肺组织支气管、肺泡清晰可见,无增生、渗出、坏死的出现;模型组小鼠肺组织形态发生病理改变,出现渗出、坏死现象;过表达组小鼠肺组织出现明显的病理变化,有较为严重的渗出、坏死的发生;沉默组小鼠存在肺组织病理改变,可见有少量的增生和渗出现象,无坏死的发生。

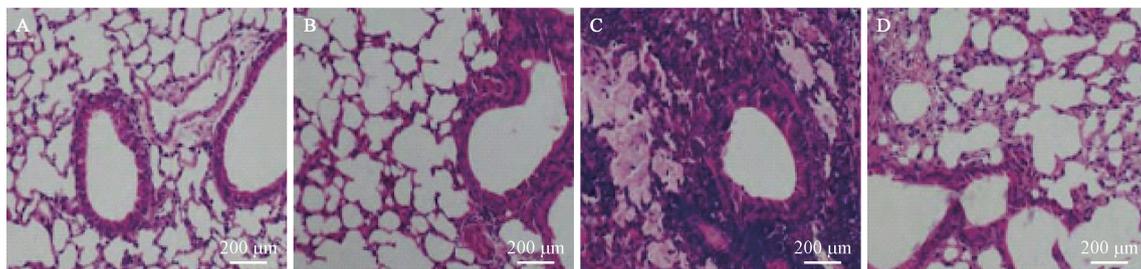
### 2.3 四组小鼠 T 淋巴细胞亚群、胸腺指数变化比较

如表 1 所示,模型组、过表达组、沉默组小鼠 CD3 $^{+}$ 、CD4 $^{+}$ 、CD4 $^{+}$ /CD8 $^{+}$ 、胸腺指数低于正常组,CD8 $^{+}$  高于正常组,具有统计学差异 ( $P < 0.05$ );过表达组小鼠 CD3 $^{+}$ 、CD4 $^{+}$ 、CD4 $^{+}$ /CD8 $^{+}$ 、胸腺指数低于模型组,CD8 $^{+}$  高于模型组,沉默组小鼠 CD3 $^{+}$ 、CD4 $^{+}$ 、CD4 $^{+}$ /CD8 $^{+}$ 、胸腺指数高于模型组,CD8 $^{+}$  低于模型组,具有统计学差异 ( $P < 0.05$ );沉默组小鼠 CD3 $^{+}$ 、CD4 $^{+}$ 、CD4 $^{+}$ /CD8 $^{+}$ 、胸腺指数高于过表达组,CD8 $^{+}$  低于过表达组,具有统计学差异 ( $P < 0.05$ )。

### 2.4 四组小鼠肺组织中炎症因子表达水平比较

如表 2 所示,模型组、过表达组、沉默组小鼠 IL-6、TNF- $\alpha$  水平高于正常组,IL-10 水平低于正常组,具有统计学差异 ( $P < 0.05$ );过表达组小鼠 IL-6、TNF- $\alpha$  水平高于模型组,IL-10 水平低于模

型组,沉默组小鼠 IL-6、TNF- $\alpha$  水平低于模型组,IL-10 水平高于模型组,具有统计学差异 ( $P < 0.05$ );沉默组小鼠 IL-6、TNF- $\alpha$  水平低于过表达组,IL-10 水平高于过表达组,具有统计学差异 ( $P < 0.05$ )。



注:A:正常组;B:模型组;C:过表达组;D:沉默组。

图 1 四组小鼠肺组织病理变化 HE 染色图

Note. A, Control group. B, Model group. C, Overexpression group. D, Silence group.

Figure 1 HE staining of lung histopathological changes in four groups of mice

表 1 四组小鼠 T 淋巴细胞亚群、胸腺指数变化比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Changes of T lymphocyte subsets and thymus index in four groups of mice

| 组别<br>Groups                 | 例数<br>Number of cases | CD3+(%)               | CD4+(%)               | CD8+(%)               | CD4+/CD8+(%)         | 胸腺指数(mg/g)<br>Thymus index |
|------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|----------------------------|
| 正常组<br>Control group         | 10                    | 68.59±6.48            | 39.25±2.46            | 25.98±2.49            | 1.79±0.62            | 3.89±1.12                  |
| 模型组<br>Model group           | 8                     | 52.13±1.68*           | 23.25±1.01*           | 42.36±6.28*           | 0.61±0.26*           | 2.30±0.15*                 |
| 过表达组<br>Overexpression group | 7                     | 43.58±0.67**          | 19.58±0.27**          | 46.59±9.58**          | 0.54±0.15**          | 2.04±0.04**                |
| 沉默组<br>Silent group          | 8                     | 60.39±2.33** $\Delta$ | 31.45±3.58** $\Delta$ | 29.67±1.72** $\Delta$ | 1.15±0.23** $\Delta$ | 2.98±0.09** $\Delta$       |
| F                            |                       | 5.086                 | 8.217                 | 5.336                 | 4.137                | 3.417                      |
| P                            |                       | 0.001                 | 0.001                 | 0.001                 | 0.001                | 0.001                      |

注:与正常组比较,\* $P < 0.05$ ;与模型组相比,# $P < 0.05$ ;与过表达组相比, $\Delta P < 0.05$ 。

Note. Compared with the control group,\* $P < 0.05$ . Compared with the model group,# $P < 0.05$ . Compared with the overexpression group, $\Delta P < 0.05$ .

表 2 四组小鼠肺组织中炎症因子表达水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Comparison of expression levels of inflammatory factors in lung tissues of four groups of mice

| 组别<br>Groups                  | 例数<br>Number of cases | IL-6(pg/mL)           | IL-10(pg/mL)          | TNF- $\alpha$ (ng/L)  |
|-------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| 正常对照组<br>Normal control group | 10                    | 30.23±1.12            | 76.59±9.56            | 6.45±0.57             |
| 模型组<br>Model group            | 8                     | 58.69±3.45*           | 40.12±5.69*           | 23.59±2.16*           |
| 过表达组<br>Overexpression group  | 7                     | 66.89±6.17**          | 32.59±6.48**          | 26.59±3.96**          |
| 沉默组<br>Silent group           | 8                     | 42.58±2.96** $\Delta$ | 63.89±2.47** $\Delta$ | 13.24±1.12** $\Delta$ |
| F                             |                       | 18.331                | 5.461                 | 25.104                |
| P                             |                       | 0.001                 | 0.001                 | 0.001                 |

注:与正常组比,\* $P < 0.05$ ;与模型组比,# $P < 0.05$ ;与过表达组比, $\Delta P < 0.05$ 。

Note. Compared with the control group,\* $P < 0.05$ . Compared with the model group,# $P < 0.05$ . Compared with the overexpression group, $\Delta P < 0.05$ .

## 2.5 沉默 miR-16 对肺结核模型小鼠 TLRs 信号通路因子的影响

如表 3 所示,模型组、过表达组、沉默组小鼠 TLR2、TLR4、NF- $\kappa$ B 水平高于正常组,具有统计学差异( $P < 0.05$ );过表达组小鼠 TLR2、TLR4、NF- $\kappa$ B 水平高于模型组,沉默组小鼠 TLR2、TLR4、NF- $\kappa$ B 水平低于模型组,具有统计学差异( $P < 0.05$ );沉默组小鼠 TLR2、TLR4、NF- $\kappa$ B 水平低于过表达组,具有统计学差异( $P < 0.05$ )。

## 3 讨论

结核病是由结核分枝杆菌感染所导致的疾病,主要通过呼吸道感染,可引发全身多器官病变,其中以肺结核最为常见,属于一种临床上较为常见的慢性传染病,具有高患病率、高感染率、高耐药率、高死亡率等特点。且近年来随着 HIV 感染率的增加、多重耐药因素的影响以及空气污染的加重,导致肺结核的发病率逐渐升高<sup>[7]</sup>。目前随着对肺结核的深入研究发现肺结核属于一种免疫相关性疾病,当机体免疫功能下降后导致感染加重,而免疫治疗可通过改善患者机体免疫功能抵抗感染,效果显著<sup>[8]</sup>。因此临床上将肺结核的研究方向转移至结合的免疫反应中。结核免疫的重要组成部分为细胞,通过调节免疫细胞的生长、分化,一方面杀灭结合分枝杆菌,另一方面启动负反馈调节限制过度的炎症反应给机体所带来的损伤<sup>[9]</sup>。而有研究发现<sup>[10]</sup>,miR-16 参与尘肺合并肺结核患者的免疫应答反应,因而在血清呈高表达。

自 1993 年 miRNA 被发现以来,大量新的 miRNA 不断被发现,目前已经发现的人源性成熟的

miRNA 已有 2500 条以上。miRNA 在真核生物中广泛存在,其长度一般为 18 个核苷酸-25 个核苷酸,属于一种高度保守、非编码的小分子单链 RNA<sup>[11-12]</sup>。目前有较多的研究<sup>[13-14]</sup>已发现 miRNA 通过干扰、降解、抑制其靶基因的表达而参与细胞的增殖、分化、凋亡等多种生理和病理过程,因而在免疫应答中占据重要作用。颜保松等<sup>[15]</sup>在其研究中发现 miR-101、miR-223、miR-424 在肺结核患者外周血中的表达与健康人外周血单个核细胞中的表达具有差异。杨绍俊等<sup>[16]</sup>在其研究中认为肺结核患者血清中 miR-155 表达升高。另外贺晨艳等<sup>[17]</sup>在其研究中发现 miR-146、miR-147 参与肺结核的发展。基于上述研究发现,血清中 miRNA 的表达与肺结核的发生发展密切相关,miR-16 家族包括 miR-15b/16-1、miR-15b/16-2,其分别位于人 12q14、3 号染色体上,miR-16 参与多种疾病的发生<sup>[18]</sup>。

Toll 样受体其定位于细胞膜中,当其与细胞膜的受体产生结合作用后,胞内下游的 NF- $\kappa$ B 会被活化,进而刺激过量的炎症因子的分泌,导致机体炎症损伤。有研究认为<sup>[19]</sup>,Toll 样受体属于和天然免疫有密切关系的膜蛋白,且认为 TLR2、TLR4 和免疫活化有关,并参与多种免疫系统疾病的发生发展,如系统性红斑狼疮、强直性脊柱炎等。目前已经证实,TLRs 信号通路和多种免疫疾病的发生、发展、预后相关。有研究表明<sup>[20]</sup>,肺结核患者细胞膜上的 TLRs 信号通路因子的异常表达可促进疾病的进展。TLRs 属于一种分枝杆菌感染的关键感受器,具有启动、协调抗分枝杆菌先天性免疫反应过程的作用,在组织中为特异性的表达,TLRs 在细胞类型、组织间的表达具有一定的差异性,在肺组织结构中肺上

表 3 沉默 miR-16 对肺结核模型小鼠 TLRs 信号通路因子的影响( $\bar{x} \pm s$ , mg/L)

Table 3 Effect of silencing microRNA-16 on TLRs signaling pathway factors in mice with pulmonary tuberculosis

| 组别<br>Groups                 | 例数<br>Number of cases | TLR2                       | TLR4                       | NF- $\kappa$ B             |
|------------------------------|-----------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 正常组<br>Control group         | 10                    | 2.35 $\pm$ 0.24            | 2.36 $\pm$ 0.16            | 2.39 $\pm$ 0.42            |
| 模型组<br>Model group           | 8                     | 4.89 $\pm$ 1.23*           | 5.46 $\pm$ 1.35*           | 4.98 $\pm$ 1.72*           |
| 过表达组<br>Overexpression group | 7                     | 5.88 $\pm$ 2.49*#          | 7.12 $\pm$ 2.15*#          | 6.15 $\pm$ 2.45*#          |
| 沉默组<br>Silent group          | 8                     | 3.63 $\pm$ 1.04*# $\Delta$ | 3.56 $\pm$ 0.89*# $\Delta$ | 3.45 $\pm$ 0.98*# $\Delta$ |
| F                            |                       | 5.693                      | 6.316                      | 4.651                      |
| P                            |                       | 0.001                      | 0.001                      | 0.001                      |

注:与正常组比,\* $P < 0.05$ ;与模型组比,# $P < 0.05$ ;与过表达组比, $\Delta P < 0.05$ 。

Note. Compared with the control group, \* $P < 0.05$ . Compared with the model group, # $P < 0.05$ . Compared with the overexpression group,  $\Delta P < 0.05$ .

皮细胞、肉芽中组织中的淋巴细胞中 TLR2 表达,在人外周血单核细胞中有 TLR1、TLR2、TLR3 表达等<sup>[21-22]</sup>。

TLRs 信号通路是目前临床上认为调节免疫、炎症反应的重要通路,而时广利等<sup>[23]</sup>在其研究中发现肺结核患者血清中 miRNA-16 表达升高,其研究推测 miRNA-16 可能参与肺结核的免疫应答反应。因此基于上述研究本文拟认为,miRNA-16 参与肺结核的应答反应的作用机制可能为 TLRs 信号通路。在本文研究中,研究沉默 miRNA-16 对肺结核模型小鼠 TLRs 信号通路因子进行检测,结果显示,沉默 miRNA-16 后 TLRs 信号通路因子 TLR2、TLR4、NF- $\kappa$ B 水平显著降低,且肺组织中炎症因子和免疫细胞因子水平均得到显著改善,此结果说明,沉默 miRNA-16 改善肺结核小鼠免疫功能可能通过作用于 TLRs 信号通路,改善 TLRs 信号通路因子的表达,进而促进免疫产生一系列的抗结核的保护免疫反应,最终抑制结核的发展。

综上所述,沉默 miRNA-16 可能通过作用于 TLRs 信号通路,抑制通路因子的异常表达,调节机体免疫反应,改善机体免疫障碍而起到调控肺结核小鼠免疫功能的作用。

#### 参考文献:

[ 1 ] 宋言峥. 重视肺结核的外科治疗 [J]. 中国肺癌杂志, 2018, 21(4): 323-326.

[ 2 ] 惠越, 张鑫, 刘国跃, 等. MicroRNA-21 相关靶基因的研究进展 [J]. 重庆医学, 2016, 45(8): 1121-1124.

[ 3 ] Abdalla AE, Duan X, Deng W, et al. MicroRNAs play big roles in modulating macrophages response toward mycobacteria infection [J]. Infect Genet Evol, 2016, 45(1): 378-382

[ 4 ] Wagh V, Urhekar A, Modi D. Levels of microRNA miR-16 and miR-155 are altered in serum of patients with tuberculosis and associate with responses to therapy [J]. Tuberculosis (Edinb), 2017, 102(1): 24-30

[ 5 ] Miotto P, Mwangoka G, Valente IC, et al. MiRNA signatures in sera of patients with active pulmonary tuberculosis [J]. PLoS One, 2013, 8(11): e80149

[ 6 ] 王青乐, 张志勇, 施裕新, 等. Micro-CT 对急性肺结核小鼠模型动态演变的监测价值 [J]. 中国临床医学, 2017, 24(4): 531-535.

[ 7 ] 翁绳凤, 邢俊蓬, 郭威. 结核感染血清学诊断技术的应用评价 [J]. 中国实验诊断学, 2019, 23(5): 815-818.

[ 8 ] 苏瑾文, 程小星. 重症肺结核的免疫病理研究进展 [J], 中

华临床医师杂志(电子版), 2013, 7(24): 11783-11787.

[ 9 ] 刘婷, 向延根, 范任华, 等. 肺结核病人细胞因子的研究进展 [J], 实用预防医学, 2016, 23(7): 894-896.

[ 10 ] 刘义涛, 曾强, 李树新, 等. 尘肺并发肺结核患者血清 miRNAs 表达 [J], 中华劳动卫生职业病杂志, 2016, 34(7): 525-527.

[ 11 ] Wang Y, Xu YM, Zou YQ, et al. Identification of differential expressed PE exosomal miRNA in lung adenocarcinoma, tuberculosis, and other benign lesions [J]. Medicine (Baltimore), 2017, 96(44): e8361.

[ 12 ] Zheng ML, Zhou NK, Luo CH. MiRNA-155 and miRNA-132 as potential diagnostic biomarkers for pulmonary tuberculosis: A preliminary study [J], Microb Pathog, 2016, 100(1): 78-83.

[ 13 ] 杨庚, 李昱, 贺亚峰. miRNA-19a 对结肠癌细胞增殖活性的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2018, 38(23): 5804-5807.

[ 14 ] 杜晨阳, 宋虎, 王星星, 等. miRNA-30A-3p 通过调控 Caspase1 介导的焦亡抑制肝癌细胞增殖和转移 [J]. 中华普通外科杂志, 2018, 33(11): 920-923.

[ 15 ] 颜保松, 王静, 罗杰, 等. miR-101、miR-223 和 miR-424 在肺结核诊断中的价值 [J]. 重庆医学, 2016, 45(14): 1902-1905.

[ 16 ] 杨绍俊, 李发科, 邓少丽, 等. TLR2、miR-155 及 SOCS1 基因检测在肺结核诊断中的意义 [J]. 免疫学杂志, 2016, 32(11): 972-976.

[ 17 ] 贺晨艳, 龚军侠, 卢新兰, 等. miR-146、miR-147 在肺结核患者中的表达及相关性分析 [J]. 实用临床医药杂志, 2018, 22(21): 27-29.

[ 18 ] 李武, 贺庆芝, 孙诗博, 等. has-miR-16 靶基因预测及生物信息学分析 [J]. 中华疾病控制杂志, 2016, 20(2): 193-197.

[ 19 ] 李雨泽, 侯绍英, 陈向丽, 等. Toll 样受体 4 基因多态性与 2 型糖尿病并发肺结核患者发生糖尿病性下肢血管病变的关系研究 [J]. 中国防痨杂志, 2017, 39(12): 1291-1296.

[ 20 ] 简玲, 曹玲, 陈莲. 肺结核患者血清中 TLRs 信号通路表达水平与患者治疗效果及病情预后的关系 [J]. 标记免疫分析与临床, 2018, 25(1): 102-104, 108.

[ 21 ] Varzari A, Deyneko IV, Vladei I, et al. Genetic variation in TLR pathway and the risk of pulmonary tuberculosis in a Moldavian population [J]. Infect Genet Evol, 2019, 68(1): 84-90.

[ 22 ] Nancy Hilda J, Das S. Neutrophil CD64, TLR2 and TLR4 expression increases but phagocytic potential decreases during tuberculosis [J]. Tuberculosis (Edinb), 2018, 111(1): 135-142.

[ 23 ] 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.