

• 论 著 •

长链非编码 RNA NEAT1、IL-6 和 TNF- α 在结核感染中的表达水平及诊断价值研究^{*}

陈 敏¹, 余 韵¹, 张 燕¹, 唱 凯¹, 皮 燕^{2 Δ}

(陆军军医大学大坪医院: 1. 检验科; 2. 神经内科, 重庆 400042)

摘 要: **目的** 探讨长链非编码 RNA NEAT(LncRNA NEAT1)及炎症因子白细胞介素(IL)-6 和肿瘤坏死因子(TNF)- α 在肺结核中的表达水平及诊断价值。 **方法** 根据《WS 288-2017 肺结核诊断》标准, 纳入活动性肺结核患者 15 例(活动性结核组), 健康对照组 22 例, 收集外周血, 分离单个核细胞, 利用实时荧光定量 PCR 检测外周血单个核细胞内 LncRNA NEAT1、TNF- α 、IL-6 的表达水平, 并采用 Graphpad prism 5 进行数据处理和绘制受试者工作特征(ROC)曲线。 **结果** 活动性结核组外周血单个核细胞中 LncRNA NEAT1 表达升高, 且与健康对照组比较, 差异有统计学意义($P < 0.001$)。细胞因子 IL-6 表达水平升高, 与健康对照组比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$); TNF- α 在活动性结核组表达水平上调, 与健康对照组相比差异有统计学意义($P < 0.01$)。ROC 曲线分析表明单项指标评价中, LncRNA NEAT1-1 的特异度和灵敏度均为最高, 分别为 95.45% 和 93.33%, 曲线下面积(AUC)达到 0.969 7。 **结论** 活动性肺结核患者 LncRNA NEAT1、IL-6、TNF- α 表达水平升高, LncRNA NEAT1 可能通过调控炎症因子表达参与结核的发生、发展过程。

关键词: 肺结核; 长链非编码 RNA NEAT; 白细胞介素-6; 肿瘤坏死因子 α

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2020.17.003 **中图法分类号:** R52

文章编号: 1673-4130(2020)17-2061-05 **文献标识码:** A

Study on the expression level and diagnostic value of long-chain non-coding RNA NEAT1, IL-6 and TNF- α in tuberculous infection^{*}

CHEN Min¹, YU Yun¹, ZHANG Yan¹, CHANG Kai¹, PI Yan^{2 Δ}

(1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Neurology, Daping Hospital, Army Medical University, Chongqing, 400042, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expression levels and diagnostic value of long-chain non-coding RNA NEAT (LncRNA NEAT1), inflammatory factors interleukin (IL)-6 and tumor necrosis factor (TNF)- α in tuberculosis. **Methods** According to the "WS 288-2017 Diagnosis of Tuberculosis" criteria, 15 patients with active tuberculosis (active tuberculosis group) and 22 healthy controls (healthy control group) were enrolled. Peripheral blood was collected and mononuclear cells were isolated. Fluorescence quantitative PCR was used to detect the expression levels of LncRNA NEAT1, TNF- α , IL-6 in peripheral blood mononuclear cells, and Graphpad prism 5 was used for data processing and receiver operating characteristic (ROC) curve drawing. **Results** The expression of LncRNA NEAT1 in peripheral blood mononuclear cells of active tuberculosis group was increased when compared with healthy control group, and the difference was statistically significant ($P < 0.001$). The expression level of cytokine IL-6 increased, compared with the healthy control group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The expression level of TNF- α was up-regulated in the active tuberculosis group, and the difference was statistically significant compared with the healthy control group ($P < 0.01$). ROC curve analysis showed that in the evaluation of individual indicators, LncRNA NEAT1-1 had the best specificity and sensitivity, respectively 95.45% and 93.33%, and the area under the curve (AUC) was 0.969 7. **Conclusion** The expression levels of LncRNA NEAT1, IL-6 and TNF- α are ele-

^{*} **基金项目:** 国家自然科学基金项目(81400967); 重庆市基础科学与前沿技术研究项目(cstc2017jcyjAX0286); 重庆市科卫联合项目(2019QNXM039, 2018QNXM049)。

作者简介: 陈敏, 女, 检验技师, 主要从事生物化学与分子生物学方面的研究。 ^{Δ} **通信作者,** E-mail: piyan861105@sina.com。

本文引用格式: 陈敏, 余韵, 张燕, 等. 长链非编码 RNA NEAT1、IL-6 和 TNF- α 在结核感染中的表达水平及诊断价值研究[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(17): 2061-2065.

vated in patients with active pulmonary tuberculosis. LncRNA NEAT1 may be involved in the occurrence and development of tuberculosis by regulating the expression of inflammatory factors.

Key words: tuberculosis; long-chain non-coding RNA NEAT; interleukin-6; tumor necrosis factor- α

结核病作为当今世界致病性较强的传染病之一,严重威胁人类健康。据统计,全球约 1/3 的人接触过结核分枝杆菌(MTB),每年新发感染人数约 800 万,每年因结核病死亡的人数高达 200 万^[1]。长链非编码 RNA(LncRNA)是长度大于 200 个核苷酸的非编码 RNA,作为一种重要的转录后调节机制,参与调节包括细胞分化、生长、增殖和凋亡等几乎所有的细胞活动过程,并在不同宿主的免疫效应中发挥着重要作用。作为细胞核小体旁斑(PS)结构的重要组成部分^[2-3],LncRNA NEAT1 参与细胞周期的相关调控,但其在结核发病机制中的作用不清。有研究表明,LncRNA NEAT1 可通过激活 S 期检查点,稳定 PS 结构,避免 DNA 损失累积导致的细胞死亡^[4-7]。本文聚焦于 LncRNA NEAT1 在结核病进程中可能的调控作用,拟开展以下研究:收集活动性结核与健康体检者外周血,提取单个核细胞,利用实时荧光定量 PCR 的方法检测 LncRNA NEAT1 及相关细胞因子的表达水平,并分析 LncRNA NEAT1、白细胞介素(IL)-6 及肿瘤坏死因子(TNF)- α 在活动性结核中的诊断效能。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集时间为 2017 年 1—3 月,研究对象分为健康对照组和活动性结核组。健康对照组为来自中国人民解放军陆军特色医学中心的健康体检者,共 22 例,入组研究对象无咳嗽、咳痰及发热等其他全身症状,影像学检查无异常,结核病相关实验室检查无任何异常,且血常规、红细胞沉降率、肝、肾功能基本指标均正常。活动性结核组来自重庆市结核病治疗中心根据《WS 288-2017 肺结核诊断》标准收治的患者,共 15 例,其结核分枝杆菌培养阳性,涂片显微镜检查阳性, γ -干扰素释放试验阳性,且有结核病相关临床表现如咳嗽、咳痰、发热、乏力等,影像学检查发现病灶,临床诊断为肺结核病。入组研究对象均采集外周血,乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝,离心后 30 min 内分离单个核细胞保存备用。排除标准:免疫抑制剂使用者;患者合并其他感染性疾病;自身免疫性疾病、肿瘤、精神性疾病、严重外伤、贫血、肾脏或肝脏疾病、活动性肺结核合并人类免疫缺陷病毒(HIV)感染、活动性肺结核合并 II 型糖尿病患者。

1.2 仪器与试剂 RPMI-1640 培养基购自天津灏洋华科生物有限公司;人淋巴细胞分离液购自美德太平洋生物科技有限公司;磷酸盐缓冲溶液(PBS)、DMEM 培养基购自 GE Healthcare Life Science, tr-

izol 试剂购自美国 Life Technologies 公司;氯仿、异丙醇、75%乙醇溶液购自重庆茂业化学试剂有限公司;DNase/RNase-free deionized water 购自北京天根生化科技有限公司;Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Ki、FastStart Essential DNA Green Master 购自上海罗氏诊断产品有限公司;引物购自英潍捷基(上海)贸易有限公司;胎牛血清购自浙江天杭生物科技有限公司;ESAT-6 抗原购自杭州启泰公司;二甲基亚砜(DMSO)购自美国 Sigma 公司;二氧化碳恒温培养箱、NanoDrop2000 超微量分光光度计购自美国 Thermo 公司;液氮罐购自河南恒达仪器设备有限公司;流式细胞仪、小型低温冷冻高速离心机购自美国 BECKMAN 公司;细胞培养瓶、六孔板、细胞冻存管购自美国康宁公司;荧光定量 PCR 仪购自美国 Bio-Rad 公司。

1.3 方法

1.3.1 外周血单个核细胞分离 按人外周血淋巴细胞分离液说明进行操作,收集单个核细胞沉淀,再加入 1 mL trizol 试剂,于 -80°C 冻存备用。

1.3.2 外周血单个核细胞 RNA 提取 将冻存的外周血单个核细胞取出解冻并静置 5 min 后,采用 Trizol 法提取 RNA。使用 NanoDrop2000 超微量分光光度计测定 RNA 水平及纯度并记录,置于 -80°C 保存。

1.3.3 标本相关基因及细胞因子表达水平检测 采用实时荧光定量 PCR,利用 Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Ki 试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA,再以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。反应体系为 20 μL :FastStart Essential DNA Green Master(2 $\times$) 10 μL ,上下游引物各 1 μL ,cDNA 1 μL ,FastStart Essential DNA Green Master water,PCR Grade 7 μL 。PCR 扩增条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 20 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 20 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 20 s 共 40 个循环,于每次循环末收集绿色荧光。读取溶解曲线确定扩增特异性,65 $^{\circ}\text{C}$ 起,每升温 0.5 $^{\circ}\text{C}$ 读取一次荧光强度。根据实时荧光定量 PCR 结果,计算活动性结核组和健康对照组中每例标本的管家基因和目标基因 LncRNA NEAT1、TNF- α 、IL-6 溶解曲线上的特征峰循环数,并计算 ΔCt 以及活动性结核组相对于健康对照组的 $\Delta\Delta\text{Ct}$,根据相对定量 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算 LncRNA NEAT1、TNF- α 、IL-6 基因表达差异倍数。

LncRNA NEAT1 的转录本有 2 个亚型,即短片段 NEAT1-1(约 3.7 kb)和长片段 NEAT1-2(约 22

kb), 它们共享 5' 端转录起始点。人源 LncRNA NEAT1 引物见表 1 和图 1。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物 (人源)

基因	正向引物 (5'-3')	反向引物 (5'-3')
NEAT1-1	AGCTGCGTCTATTGAATTGGTAAAGTAA	GACAGAAAGATCCCAACGATAAAAAATAA
NEAT1-2	GTCTTTCCATCCACTCACGTCTATTT	GTACTCTGTGATGGGGTAGTCAGTCAG
IL-6	AGCCACTCACCTCTTCAGAAC	GCCTCTTTGCTGCTTTCACAC
TNF-α	TCCCCAGGGACCTCTCTCTA	AGGGTTTGCTACAACATGGGC
GAPDH	CTCAAGACCTTGGGCTGGG	TCGAACAGGAGGAGCAGAGA

注: GAPDH 为内参基因。

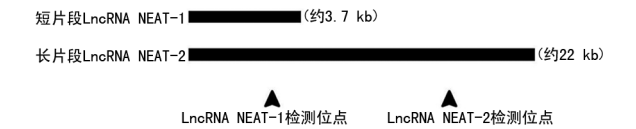


图 1 人源 LncRNA NEAT1 引物示意图

1.4 统计学处理 使用 GraphPad Prism 6.0 软件 (美国 GraphPad Software 公司) 对数据进行统计分析。根据数据的分布特征, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较采用独立样本 *t* 检验。非正态分布的计量资料使用 Mann-Whitney *U* 检验进行比较。通过计算受试者工作特征 (ROC) 曲线曲线下面积 (AUC) 来评估每种指标的诊断性能。根据约登指数选择最佳截断值 (cut-off 值), 即 ROC 曲线上所有点的灵敏度与特异度之和最大时所取数值。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 LncRNA NEAT1-1 及 NEAT1-2 在健康对照组和活性性结核组的表达情况 由于引物设计的原因, 检测短片段 LncRNA NEAT1-1 时, 长片段 LncRNA NEAT1-2 也会被同时检测到, 故 NEAT1-2 检测位点可表示 2 个片段的检测情况, LncRNA NEAT1-2 检测位点则表示长片段的检测情况, 两组 LncRNA 表达情况结果见表 1。活性性结核组中短片段 LncRNA NEAT1-1 的表达明显增高, 且与健康对照组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$); LncRNA NEAT1-2 表达与 NEAT1-1 表达情况类似。见图 2。

表 1 LncRNA NEAT1 及 NEAT1-2 检测结果

项目	管家基因 Ct 值均值	目标基因 Ct 值均值	平均 ΔCt	ΔΔCt	表达水平 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)
NEAT1-1 检测位点					
健康对照组	30.94	27.94	-3.00	0.00	1.00
活性性结核组	33.32	26.72	-6.60	-3.61	12.20
NEAT1-2 检测位点					
健康对照组	30.94	29.92	-1.02	0.00	1.00
活性性结核组	33.32	28.54	-4.78	-3.77	13.65

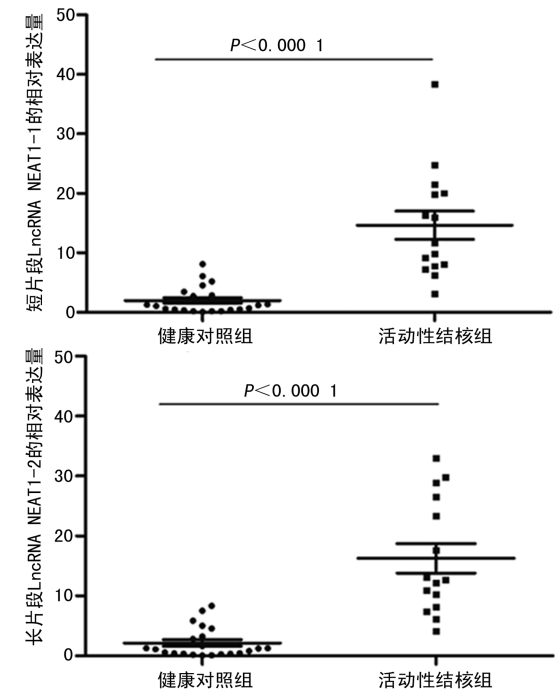


图 2 外周血单个核细胞中 LncRNA NEAT1 的表达

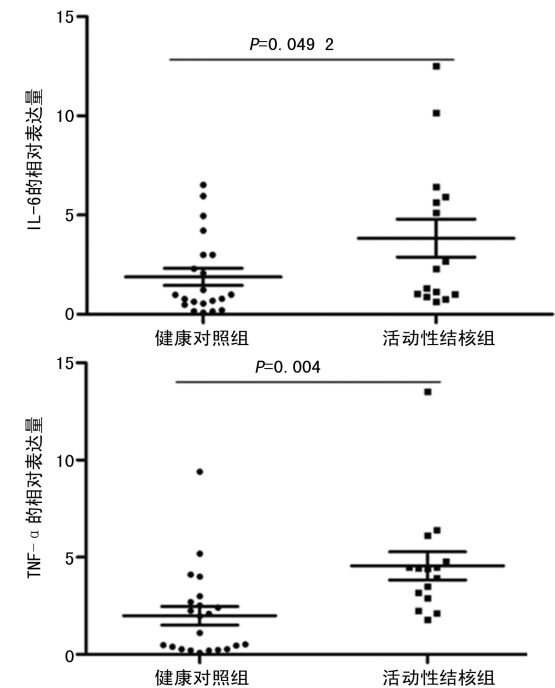


图 3 外周血单个核细胞中相关炎症因子的表达

2.2 细胞因子 IL-6 及 TNF-α 在健康对照组和活动性结核组的表达情况 细胞因子 IL-6 及 TNF-α 在健康对照组和活动性结核组的表达结果见表 2。结果显示细胞因子 IL-6 表达水平升高,与健康对照组比较,差异有统计学意义($P<0.05$);TNF-α 在活动性结核组患者中表达上调,与健康对照组相比差异有统计学意义($P<0.01$)。见图 3。

2.3 短片段 LncRNA NEAT1、IL-6 及 TNF-α 用于活动性结核检测的诊断效能 笔者对 LncRNA NEAT1 的 2 个亚型(长片段 LncRNA NEAT1-1、短片段 LncRNA NEAT1-2)以及 IL-6 和 TNF-α 进行 ROC 曲线分析。结果表明 LncRNA NEAT1-1 诊断活动性结核的特异度和灵敏度均为最高,AUC 为

0.969 7(95%CI 0.924 6~1.015),灵敏度为 93.33%,特异度为 95.45%,见表 3 及图 4。

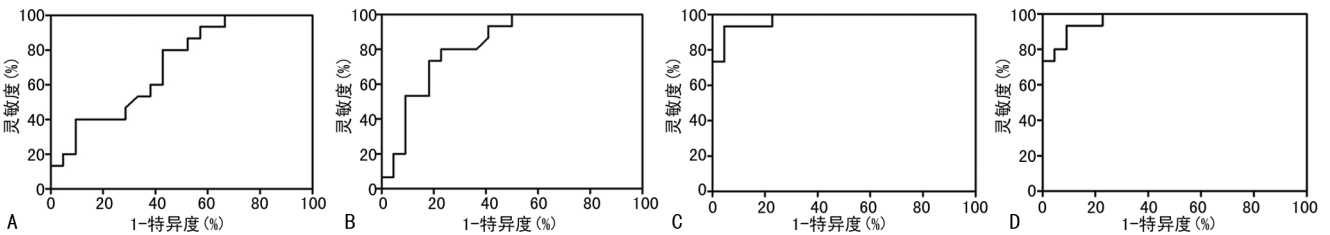
表 2 IL-6 及 TNF-α 检测结果

项目	管家基因 Ct 值均值	目标基因 Ct 值均值	平均 ΔCt	ΔΔCt	表达水平 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)
IL-6					
健康对照组	30.94	31.41	0.47	0.00	1.00
活动性结核组	33.32	32.73	-0.59	-1.06	2.10
TNF-α					
健康对照组	30.86	28.67	-2.19	0.00	1.00
活动性结核组	33.32	29.13	-4.19	-2.00	4.00

表 3 ROC 曲线分析

指标	AUC	标准误	P	95%CI	特异度(%)	灵敏度(%)
IL-6	0.709 5	0.085 69	0.034 2 *	0.541 5~0.877 5	57.14	80.00
TNF-α	0.825 8	0.068 17	0.000 8 *	0.692 1~0.959 4	77.27	80.00
NEAT1-1	0.969 7	0.023 01	<0.000 1 *	0.924 6~1.015 0	95.45	93.33
NEAT1-2	0.978 5	0.020 64	<0.000 1 *	0.935 3~1.016 0	90.91	93.33

注:为与参考线(AUC=0.5)比较,* $P<0.05$ 。



注:A为 IL-6 的 ROC 曲线图;B为 TNF-α 的 ROC 曲线图;C为 LncRNA NEAT1-1 的 ROC 曲线图;D为 LncRNA NEAT1-2 的 ROC 曲线图。

图 4 ROC 曲线结果

3 讨 论

在结核分枝杆菌引起的机体免疫中,细胞免疫占主导作用,以 $\alpha\beta$ TCRC $D4^{+}$ T 细胞为主的 T 淋巴细胞和巨噬细胞在其中发挥重要作用。T 细胞在接受巨噬细胞提呈的已处理抗原后,通过分泌多种细胞因子如干扰素(IFN)、IL、TNF 等来放大免疫效应,并以细胞毒作用介导靶细胞的溶解。

参与细胞主要为巨噬细胞与 Th1 型淋巴细胞,在巨噬细胞吞噬结核杆菌后,经过抗原处理提呈作用与 Th1 型淋巴细胞识别,激活 Th1 淋巴细胞后分泌 IFN-γ 刺激巨噬细胞进一步激活,分泌大量 TNF-α 等细胞因子募集中性粒细胞参与炎症反应,制约结核分枝杆菌的扩散。同时 TNF-α 在参与凋亡途径中死亡配体(TNFR)引起的细胞凋亡中发挥重要作用。短片段 LncRNA NEAT1 在病毒感染中的表达水平与病毒复制能力相关^[8-11],且由 Toll 样受体家族成员(TLR2)介导的在经脂多糖刺激后细胞因子 IL-6、TNF-α 表达升高的细胞信号通路中,NEAT1 作为通

路之一发挥作用^[12-14]。本研究中,活动性结核组细胞因子 IL-6 表达水平升高,较健康对照组差异有统计学意义($P<0.05$);TNF-α 表达水平上调,与健康正常组相比差异有统计学意义($P<0.01$);NEAT1 表达升高,与健康正常组相比差异有统计学意义($P<0.000 1$)。进一步证明在活动性结核发展中,细胞因子的表达的确与其发展紧密相关,也提示了 NEAT1 可作为研究对象来帮助认识机体感染结核病毒后发生细胞免疫的可能调控分子与信号通路。

机体感染结核分枝杆菌后,巨噬细胞被激活用以清除结核分枝杆菌,促进细胞因子 IL-6、TNF-α 等释放,增强机体对结核分枝杆菌的杀伤能力,阻止其在体内播散。有研究发现,NEAT1 与结核感染过程、结核的发展与转归有关,通过一系列信号途径可影响巨噬细胞内炎症因子 IL-6、TNF-α 的表达,从而使机体对抗疾病的能力减低,有助于疾病发展^[15]。本研究显示,在临床上用于活动性结核的诊断时,对 LncRNA NEAT1-1、LncRNA NEAT1-2、IL-6、TNF-α 单项指

标进行检测时, LncRNA NEAT1-1 的特异度(95.45%)和灵敏度(93.33%)最高。

4 结 论

综上所述, 本研究发现活动性肺结核患者细胞因子 IL-6 和 TNF- α 表达水平升高, LncRNA NEAT1 表达水平升高最明显。LncRNA NEAT1 在诊断活动性结核时特异度和灵敏度较高, 有望作为评估疾病发展和预后的检测指标。

参考文献

- [1] WAPINSKI O, CHANG H Y. Long noncoding RNAs and human disease[J]. Trends Cell Biol, 2011, 21(6): 354-361.
- [2] ADRIAENS C, STANDAERT L, BARRA J, et al. p53 induces formation of NEAT1 lncRNA-containing paraspeckles that modulate replication stress response and chemosensitivity[J]. Nat Med, 2016, 22(8): 861-868.
- [3] JOHN N H, ALEXANDER W E, CHRISTINE M C, et al. A screen for nuclear transcripts identifies two linked noncoding RNAs associated with SC35 splicing domains [J]. BMC Genomics, 2007, 8(1): 39-45.
- [4] CLEMSON, C M. An architectural role for a nuclear non-coding RNA: NEAT1 RNA is essential for the structure of paraspeckles[J]. Mol Cell, 2009, 33(6): 717-726.
- [5] CHEN L L, Carmichael, altered nuclear retention of mRNAs containing inverted repeats in human embryonic stem cells; functional role of a nuclear noncoding RNA [J]. Mol Cell, 2009, 35(4): 467-478.
- [6] GONG W. Knockdown of NEAT1 restrained the malignant progression of glioma stem cells by activating microRNA let-7e[J]. Oncotarget, 2014, 6(38): 62208-62223.
- [7] STANDAERT L. The long noncoding RNA Neat1 is required for mammary gland development and lactation[J].

RNA, 2014, 20(12): 1844-1849.

- [8] YANG S. Early Secreted Antigen ESAT-6 of Mycobacterium Tuberculosis Promotes Apoptosis of Macrophages via Targeting the MicroRNA155-SOCS1 Interaction[J]. Cell Physiol Biochem, 2015, 35(4): 1276-1288.
- [9] CAO J. NEAT1 regulates pancreatic cancer cell growth, invasion and migration through microRNA-335-5p/c-met axis[J]. Am J Cancer Res, 2016, (10): 2361-2374.
- [10] LI Y. NEAT expression is associated with tumor recurrence and unfavorable prognosis in colorectal cancer[J]. Oncotarget, 2015, 6(29): 27641-27650.
- [11] ZHANG Q. NEAT1 long noncoding RNA and paraspeckle bodies modulate HIV-1 posttranscriptional expression [J]. MBio, 2013, 4(1): 596-612.
- [12] JIN C, PENG X, XIE T, et al. Detection of the long non-coding RNAs nuclear-enriched autosomal transcript 1 (NEAT1) and metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 in the peripheral blood of HIV-1-infected patients[J]. Hiv Med, 2016, 17(1): 68-72.
- [13] ZHANG F. Identification of the long noncoding RNA NEAT1 as a novel inflammatory regulator acting through MAPK pathway in human lupus[J]. J Autoimmun, 2016, 75: 96-104.
- [14] ULITSKY I, SHKUMATAVA A, JAN C H. Conserved function of lincRNAs in vertebrate embryonic development despite rapid sequence evolution[J]. Cell, 2011, 7(7): 1537-1550.
- [15] RAMANJANEYA M, TAN B K, RUCINSKI M, et al. Nesfatin-1 inhibits proliferation and enhances apoptosis of human adrenocortical H295R cells [J]. J Endocrinol, 2015, 226(1): 1-11.

(收稿日期: 2020-01-15 修回日期: 2020-04-22)

(上接第 2060 页)

- [11] GURUNG A B, BHATTACHARJEE A. Impact of a non-synonymous Q281R polymorphism on structure of human Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 (Lp-PLA2) [J]. J Cell Biochem, 2018, 119(8): 7009-7021.
- [12] WEI L, KE Z, ZHAO Y, et al. The elevated lipoprotein-associated phospholipase A2 activity is associated with the occurrence and recurrence of acute cerebral infarction [J]. Neuroreport, 2017, 28(6): 325-330.
- [13] MIN K, KWON S, CHO S Y, et al. Atrial Fibrillation is Strongly Associated With the Neutrophil to Lymphocyte Ratio in Acute Ischemic Stroke Patients; A Retrospective Study[J]. J Clin Lab Anal, 2017, 31(2): e22041-e22047.
- [14] ÖZSOY M, MOSCHINI M, FAJKOVIC H, et al. Elevated preoperative neutrophil-lymphocyte ratio predicts up-grading at radical prostatectomy [J]. Prostate Cancer Prostatic Dis, 2018, 21(1): 100-105.
- [15] HYUN S, KWON S, CHO S, et al. Can the Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio Appropriately Predict Carotid Ar-

tery Stenosis in Patients with Ischemic Stroke? -A Retrospective Study[J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2015, 24(11): 2646-2651.

- [16] ZOU X L, LIN X J, NI X, et al. Baseline red blood cell distribution width correlates with disease activity and therapeutic outcomes in patients with systemic lupus erythematosus, irrespective of anemia status[J]. Clin Lab, 2016, 62(10): 1841-1850.
- [17] LI N, ZHOU H, TANG Q. Red blood cell distribution width: a novel predictive indicator for cardiovascular and cerebrovascular diseases[J]. Dis Markers, 2017(11): 1-23.
- [18] SONG S Y, HUA C, DORNBORS D R, et al. Baseline Red Blood Cell Distribution Width as a Predictor of Stroke Occurrence and Outcome: A Comprehensive Meta-Analysis of 31 Studies [J]. Front Neurol, 2019, 10(10): 1237-1251.

(收稿日期: 2020-02-01 修回日期: 2020-05-15)