

DOI:10.13350/j.cjpb.220919

• 临床研究 •

miR-451a 调控 TLR4 信号通路参与结核分枝杆菌感染机制的研究

曹建¹, 张媛梅^{1*}, 黄红梅², 阳永珍¹

(1. 内江市第一人民医院呼吸与危重症医学科, 四川内江 641000; 2. 内江市中医院肺病科)

【摘要】 **目的** 探讨结核分枝杆菌(MTB)感染中微小 RNA-451a(miR-451a)调控 Toll 样受体 4(TLR4)的表达参与肺结核发病的机制。**方法** 收集 2020 年 4 月-2021 年 4 月活动性肺结核患者 82 例(活动性肺结核组), MTB 感染但无肺结核症状的患者 40 例(MTB 感染组), 健康体检者 40 例(健康组), 采用 RT-qPCR 检测 miR-451a 和 TLR4 表达水平并进行比较分析; 同时进行体外细胞试验, 通过双荧光素酶报告验证 miR-451a 和 TLR4 的靶向关系, 并将人巨噬细胞 U937 分为 4 组: 对照组、miR-451a 组、TLR4 组和 miR-451a+TLR4 组, 分别转染 NC 质粒、miR-451a mimic 过表达质粒、TLR4 过表达质粒、miR-451a mimic 和 TLR4 过表达质粒, 比较各组 miR-451a、TLR4 的表达水平、细胞活力及凋亡率。**结果** MTB 感染组患者血清 miR-451a 水平显著低于健康组($t=22.706, P<0.01$), TLR4 mRNA 水平显著高于健康组($t=36.914, P<0.01$)。活动性肺结核组的 miR-451a 的水平显著高于 MTB 感染组($t=24.146, P<0.01$), TLR4 mRNA 水平显著低于 MTB 感染组($t=35.844, P<0.01$)。miR-451a 与 TLR4 mRNA 表达水平呈负相关(r 值分别为 0.462 和 0.511, $P<0.05$ 或 $P<0.01$)。miR-451a 组的 miR-451a 水平和凋亡率显著高于对照组(t 值分别为 53.805 和 61.388, 均 $P<0.01$), 细胞活力显著低于对照组($F=4.366, P<0.01$)。TLR4 组的细胞活力、TLR4 mRNA 和蛋白水平显著高于对照组($F_{\text{细胞活力}}=6.328, P<0.01; t_{\text{mRNA}}=63.884, P_{\text{mRNA}}<0.01; t_{\text{蛋白}}=43.571, P_{\text{蛋白}}<0.01$), 凋亡率显著低于对照组($t=33.797, P<0.01$)。miR-451a+TLR4 组的细胞活力、TLR4 mRNA 和蛋白水平显著高于 miR-451a 组而低于 TLR4 组(细胞活力 F 值分别为 4.742 和 5.291, 均 $P<0.01$; t_{mRNA} 值分别为 53.297 和 64.649, 均 $P<0.01$; $t_{\text{蛋白}}$ 值分别为 51.450 和 43.556, 均 $P<0.01$), 凋亡率显著低于 miR-451a 组, 且显著高于 TLR4 组(t 值分别为 36.037 和 46.459, 均 $P<0.01$)。**结论** miR-451a 可能通过靶向抑制 TLR4 信号通路调控 MTB 的感染过程。

【关键词】 结核分枝杆菌; 肺结核; microRNA-451a; Toll 样受体 4

【中图分类号】 R378.911

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)09-1077-05

[Journal of Pathogen Biology. 2022 Sep.; 17(9): 1077-1081.]

The study of miR-451a regulating the expression of TLR4 signaling pathway in *Mycobacterium tuberculosis* infection and participating in the pathogenesis of pulmonary tuberculosis

CAO Jian¹, ZHANG Yuan-mei¹, HUANG Hong-mei², YANG Yong-zhen¹ (1. Neijiang City First People's Hospital, Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Neijiang, Sichuan 641000, China; 2. Department of Pulmonary Diseases, Neijiang Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine) *

【Abstract】 **Objective** To explore the mechanism that microRNA-451a(miR-451a) regulates the expression of Toll-like receptor 4 (TLR4) in *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) infection and participates in the pathogenesis of tuberculosis. **Methods** From April 2020 to April 2021, 82 patients with active tuberculosis (active pulmonary tuberculosis group), 40 patients with MTB infection but no onset of tuberculosis symptoms (MTB infection group), and 40 healthy subjects (healthy group) were collected. The expression levels of miR-451a and TLR4 was analyzed by RT-qPCR. *In vitro* cell culture experiments, the target relationship between miR-451a and TLR4 was verified by dual luciferase report. Human macrophages U937 were divided into 4 groups: control group, miR-451a group, TLR4 group and miR-451a+TLR4 group, and NC plasmids, miR-451a mimic overexpression plasmids, TLR4 mimic overexpression plasmids, miR-451a mimic + TLR4 overexpression plasmids were transfected, the expression levels of miR-451a and TLR4, cell viability and apoptosis rate in each group was compared. **Results** The level of miR-451a in the serum of patients with MTB infection was significantly lower than that of the healthy group ($t=22.706, P<0.01$), while the level of TLR4 mRNA was significantly higher than that of the healthy group ($t=36.914, P<0.01$). The level of miR-451a in the active tuberculosis group was significantly higher than that of the MTB infection group ($t=24.146, P<0.01$), while the level of TLR4 mR-

* **【通讯作者】** 张媛梅, E-mail: zhangym_0832@163.com

【作者简介】 曹建(1981-), 男, 四川威远人, 本科, 副主任医师, 主要从事老年疾病及肺肿瘤研究。E-mail: caojianhongmei1234@163.com

NA was significantly lower than that of the MTB infection group ($t=35.844, P<0.01$). The expression levels of miR-451a and TLR4 mRNA were negatively correlated ($r=0.462, P<0.01; r=0.511, P<0.05$). The miR-451a level and apoptosis rate of the miR-451a group were significantly higher than those of the control group ($t=53.805, P<0.01; t=61.388, P<0.01$), and the cell viability was significantly lower than those of the control group ($F=4.366, P<0.01$). The cell viability, TLR4 mRNA and protein levels of the TLR4 group were significantly higher than those of the control group ($F=6.328, P<0.01; t_{\text{mRNA}}=63.884, P_{\text{mRNA}}<0.01; t_{\text{protein}}=43.571, P_{\text{protein}}<0.01$), and the apoptosis rate was significantly lower than that of the control group ($t=33.797, P<0.01$). The cell viability, TLR4 mRNA and protein levels of miR-451a+TLR4 group were significantly higher than miR-451a group and significantly lower than TLR4 group ($F=4.742, P<0.01; F=5.291, P<0.01; t_{\text{mRNA}}=53.297, P_{\text{mRNA}}<0.01; t_{\text{protein}}=51.450, P_{\text{protein}}<0.01; t_{\text{mRNA}}=64.649, P_{\text{mRNA}}<0.01; t_{\text{protein}}=43.556, P_{\text{protein}}<0.01$), and the apoptosis rate was significantly lower than that in the miR-451a group and significantly higher than that in the TLR4 group ($t=36.037, P<0.01; t=46.459, P<0.01$). **Conclusion** miR-451a can promote the onset of tuberculosis by targeting to inhibit TLR4.

【Key words】 *Mycobacterium tuberculosis*; pulmonary tuberculosis; microRNA-451a; Toll-like receptor 4

由结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, MTB) 引起的结核病 (tuberculosis, TB) 是单一传染性微生物导致死亡的最重要原因^[1]。每年约有 1 000 万人感染 MTB, 其中肺结核是最常见的结核病^[2]。巨噬细胞对于 MTB 引起的免疫反应至关重要, 被激活的巨噬细胞能够清除细胞内负载的 MTB, 当受感染的巨噬细胞死亡时, MTB 可以存活并继续传播^[3], 但关于 MTB 感染及发病的分子机制仍不清楚。微小 RNA (microRNA, miR) 是一种长度约为 22 个核苷酸的单链 RNA, 可在转录后负调控基因表达^[4]。miR-451a 位于染色体 17q11.2, 邻近原癌基因人类表皮生长因子受体 2 (HER2) 的 17q11.2-21 区域, 被指出在细胞增殖和死亡、癌症发生发展和疾病转归等具有重要作用。近年来, 有学者发现多种 miRNA 参与了结核病的发生和发展, 其可能通过对巨噬细胞抗结核分枝杆菌的免疫应答中相关免疫相关基因进行调控来发挥重要作用, 这其中就包括了 miR-451a^[5]。miR-451a 在肺结核患者中显著降低, 然而其调控 MTB 感染的机制仍不明确^[6]。在 MTB 感染期间, 巨噬细胞表面的 Toll 样受体 4 (toll-like receptor, TLR4) 会识别病原体, 进而调控细胞凋亡, 发挥杀灭 MTB 的活性^[7]。有研究显示, TLR4 受到 miRNA 的靶向调控, 抑制巨噬细胞的凋亡, 从而抑制肺结核的发生^[8]。本研究通过分析 miR-451a 调控 TLR4 信号通路作用, 了解其参与 MTB 感染的机制。

对象与方法

1 受试对象

2020 年 4 月-2021 年 4 月本院收治的活动性肺结核患者 82 例作为活动性肺结核组, 其中男 50 例, 女 32 例; 年龄 40~64 岁, 平均 (50.85±3.67) 岁。体检筛查出的 MTB 感染但无肺结核症状的患者 40 例作为 MTB 感染组, 其中男 27 例, 女 13 例; 年龄 40~62

岁, 平均 (49.28±3.92) 岁。选择健康体检者 40 例作为健康组, 其中男 22 例, 女 18 例; 年龄 40~65 岁, 平均 (49.76±3.89) 岁。本研究经过院伦理委员会批准。

纳入标准: (1) 活动期 TB 患者符合《肺结核诊断标准》^[9]; (2) MTB 感染但无肺结核症状的患者符合结核菌 IFN- γ 释放试验阳性, 无结核症状, 胸部 X 光正常; (3) 入组者知情同意。

排除标准: (1) 3 月内接受过抗结核的相关治疗者; (2) 合并癌症、血液学疾病、感染或其他炎症者; (3) 合并其他呼吸道系统疾病者。

2 主要试剂、材料及仪器

人巨噬细胞 U937 购于美国 ATCC 公司; 96 孔、24 孔组织培养板购于美国康宁公司; RPMI 1640 培养基和抗体购于 Gibco 美国公司; miR-451a 的类似物 (mimic)、TLR4 过表达质粒以及相应阴性对照 (negative control, NC) 购于中国吉玛公司; Lipofectamine[®] 2000 购于美国 Invitrogen 公司; 突变试剂盒和 Renilla 荧光素酶购于 Beyotime 中国公司; 荧光素酶试剂盒购于美国 Promega 公司; Trizol 试剂购于中国 Aidlab 公司; Trizol 和 mirNeasy/RNeasy Mini 试剂盒购于德国 QIAGEN GmbH 公司; SYBR Premix Ex Taq[™] 试剂盒购于日本 TaKaRa 公司; ELISA 试剂盒购于中国碧云天公司; 抗体、一抗和山羊抗免疫球蛋白 G 二抗 (1:1 000 稀释, #ab6721) 购于美国 Abcam 公司; 硝酸纤维素膜购于美国 EMD Millipore; ECL 显色试剂盒购于美国 Thermo Fisher 公司; 凋亡试剂盒 (Annexin V-FITC 和 PI) 购于中国耶森公司。流式细胞仪购于 Becton 美国公司。

3 方法

3.1 标本采集 采集患者外周血 5 ml, -80 °C 保存待测。

3.2 RT-qPCR 使用 TRizol 试剂从外周血中提取总 RNA, 使用 Nanodrop 2000 进行定量。使用 mir-

Neasy/RNeasy Mini 试剂盒分离 miR/mRNA。使用 SYBR Premix Ex TaqTM 进行 RT-qPCR 反应:95 °C 2 min,58 °C 20 s,72 °C 20 s,共 40 个循环。以 U6 或者 GAPDH 为内参,采用 2^{-ΔΔCt} 法计算 miR-451a 及 TLR4 mRNA 的相对表达量。

3.3 双荧光素酶报告检测 miR-451a 与 TLR4 的靶向关系 miR-451a 与 TLR4 的碱基结合位点通过 Starbase 得到。根据其原始序列,将 TLR4 mRNA 3' 端的非翻译区域(3'-untranslated region,3'-UTR)负载于 pGL4 荧光素酶载体作为野生型(wt-)TLR4,利用突变试剂盒生成突变型(mut-)TLR4。根据上述转染方法,分别将 1 μg 的 wt-/mut-TLR4 和 50 nmol/L 的 miR-451a mimic/NC 质粒转染 1×10⁴ 个 U937 细胞。36 h 后根据 Renilla 计算每组细胞中荧光素酶活性。

3.4 细胞分组和转染 U937 细胞培养在 RPMI 1640 培养基中,培养基含有 10%胎牛血清、0.1 mg/ml 链霉素和 100 U/ml 青霉素。将细胞在 5%CO₂ 培养箱中于 37 °C 和 95%湿度下培养。U937 细胞分为 4 组:对照组、miR-451a 组、TLR4 组和 miR-451a + TLR4 组。分别转染 miR-451a mimic 和/或 TLR4 过表达质粒来提高 miR-451a 和/或 TLR4 水平。对照组转染等量的 NC 质粒。将细胞在 6 孔板中培养,当细胞达到 60%汇合度后添加 Opti(100 μl)和 LipofectamineTM 2000(5 μl)并孵育 5min 作为试剂 A。加入 Opti(100 μl)和质粒(20 ng/μl)并孵育 5 min 作为试剂 B。将 A 与 B 混合并孵育 20 min,16 h 后更换培养基并收获细胞。

3.5 Western blot 检测 TLR4 蛋白的相对表达水平 用 PBS 洗去细胞培养液,细胞裂解后 4 °C、12 000 r/min(离心半径 3 cm)离心 5 min,收集总蛋白进行 8% SDS-PAGE 电泳分离,并将其转移到硝酸纤维素膜上,室温下将膜浸入 5%脱脂牛奶中封闭 2 h;加入 TLR4 抗体 4 °C 下孵育过夜,洗涤;加入二抗室温下孵育 1 h,洗膜后使用化学发光试剂显色,使用 Quantum One 软件分析灰度计算蛋白相对于 GAPDH 的表达量,并计算 TLR4 蛋白的相对表达水平。

3.6 CCK-8 检测细胞活力 取 100 μl 细胞悬浮液添加到 96 孔板中,孵育 48 h 和 72 h 后将体积为 10 μl 的 CCK-8 溶液添加到每个孔中并孵育 2 h。用酶标仪检测各孔的吸光度(A₄₅₀)值。

3.7 流式细胞术检测细胞凋亡 将细胞用 1×PBS 洗涤并悬浮在 100 μl 结合缓冲液中;加入 5 μl Annexin V-FITC 和 10 μl PI,室温下于黑暗中孵育 10~15 min;加入 400 μl 结合缓冲液,在 1 h 内通过流式细胞仪检测细胞凋亡率。

3.8 统计学处理 使用 SPSS 19.0 进行统计学分析。计量资料以平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用 *F* 检验,组间多时间点比较采用重复测量方差分析;通过 *Pearson* 相关性检验分析 miR-451a mRNA 和 TLR4 mRNA 的相关性。*P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

结 果

1 miR-451a 和 TLR4 在肺结核和 MTB 感染中的表达特点

MTB 感染组患者血清中 miR-451a 水平显著低于健康组($t = 22.706, P < 0.01$),TLR4 mRNA 水平显著高于健康组($t = 36.914, P < 0.01$)。活动性肺结核组的 miR-451a 水平显著高于 MTB 感染组($t = 24.146, P < 0.01$),TLR4 mRNA 水平显著低于 MTB 感染组($t = 35.844, P < 0.01$)(表 1)。在 MTB 感染组和活动性肺结核组,miR-451a 和 TLR4 mRNA 表达水平均呈负相关(*r* 值分别为 0.462 和 0.511,*P* < 0.05 或 *P* < 0.01)。

表 1 miR-451a 和 TLR4 在肺结核和 MTB 感染中的表达特点($\bar{x} \pm s$)
Table 1 The expression characteristics of miR-451a and TLR4 in tuberculosis and MTB infection

组别 Group	<i>n</i>	miR-451a	TLR4 mRNA
健康组	40	1.00±0.15	1.00±0.13
MTB 感染组	40	0.42±0.06	3.79±0.46
活动性肺结核组	82	0.87±0.11	1.62±0.21

2 双荧光素酶报告验证 miR-451a 与 TLR4 的靶向关系

miR-451a 与 TLR4 的靶向结合位点如图 1 所示。对照组的巨噬细胞中荧光素酶活性为(1.00±0.07),TLR4 组为(0.99±0.11),当共同转染 Mut-TLR4 和 miR-451a mimic 后,巨噬细胞中的相对荧光素酶活性(0.34±0.03)显著降低($t_{NC} = 54.810, t_{Mut-TLR4} = 36.056$,均 *P* < 0.01),miR-451a 与 TLR4 靶向结合。

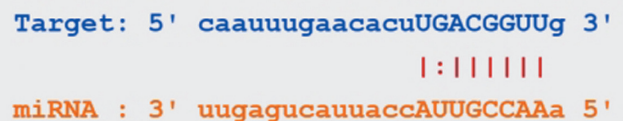


图 1 miR-451a 与 TLR4 mRNA 的 3' 端的非翻译区域的结合位点
Fig.1 The binding site of miR-451a and the 3'untranslated region of TLR4 mRNA

3 转染细胞 miR-451a 和 TLR4 的表达水平

转染细胞 miR-451a 和 TLR4 的表达见图 2 和表 2。4 组细胞中 miR-451a 和 TLR4 的表达水平比较差异有统计学意义(均 *P* < 0.01)。miR-451a 组的 miR-451a 水平显著高于对照组($t = 53.805, P < 0.01$),

TLR4 组的 TLR4 mRNA 和蛋白水平显著高于对照组 ($t_{mRNA} = 63.884, t_{蛋白} = 43.571$, 均 $P < 0.01$)。miR-451a+TLR4 组的 TLR4 mRNA 和蛋白水平显著高于 miR-451a 组, 且显著低于 TLR4 组 (t_{mRNA} 值分别为 53.297 和 64.649, $t_{蛋白}$ 值分别为 51.450 和 43.556, 均 $P < 0.01$)。

表 2 转染后细胞中 miR-451a 和 TLR4 的表达水平 ($\bar{x} \pm s$)
Table 2 The expression levels of miR-451a and TLR4 in each group of cells after transfection

组别 Group	miR-451a	TLR4 mRNA	TLR4 蛋白
对照组	1.00 ± 0.07	1.00 ± 0.09	1.00 ± 0.08
miR-451a 组	4.12 ± 0.36 ^a	0.25 ± 0.03 ^a	0.23 ± 0.02 ^a
TLR4 组	0.84 ± 0.09 ^a	5.24 ± 0.41 ^a	2.94 ± 0.27 ^a
miR-451a+TLR4 组	3.97 ± 0.29 ^{a,b,c}	0.97 ± 0.08 ^{b,c}	0.98 ± 0.09 ^{b,c}

注:^a 与对照组比较, $P < 0.05$; ^b 与 miR-451a 组比较, $P < 0.05$; ^c 与 TLR4 组比较, $P < 0.05$ 。

Note: ^a Compared with the control group, $P < 0.05$; ^b Compared with miR-451a group, $P < 0.05$; ^c Compared with TLR4 group, $P < 0.05$.

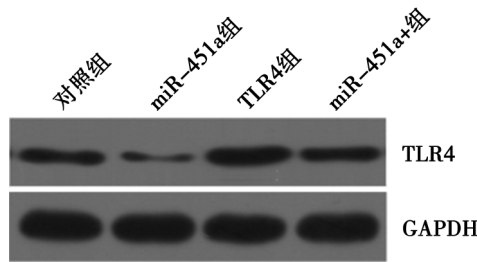


图 2 Western blot 检测转染后细胞中 TLR4 蛋白的表达
Fig. 2 Western blot detection of the expression level of TLR4 protein in each group of cells after transfection

4 miR-451a 和 TLR4 对巨噬细胞活力的影响

表 3 显示, 4 组细胞增殖能力比较差异有统计学意义 ($F = 7.273, P < 0.01$)。miR-451a 组的增殖能力显著低于对照组 ($F = 4.366, P < 0.01$); TLR4 组的增殖能力显著高于对照组 ($F = 6.328, P < 0.01$); miR-451a+TLR4 组的增殖能力显著高于 miR-451a 组且显著低于 TLR4 组 (F 值分别为 4.742 和 5.291, 均 $P < 0.01$)。

表 3 miR-451a 和 TLR4 对巨噬细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s$), A_{450} 值
Table 3 The effect of miR-451a and TLR4 on the viability of macrophages (A_{450} value)

组别 Group	48 h	72 h
对照组	0.64 ± 0.05	1.13 ± 0.09
miR-451a 组	0.52 ± 0.05 ^a	0.90 ± 0.08 ^a
TLR4 组	0.78 ± 0.07 ^a	1.36 ± 0.12 ^a
miR-451a+TLR4 组	0.62 ± 0.06 ^{a,b}	1.09 ± 0.10 ^{a,b,c}

注:^a 与对照组比较, $P < 0.05$; ^b 与 miR-451a 组比较, $P < 0.05$; ^c 与 TLR4 组比较, $P < 0.05$ 。

Note: ^a Compared with the control group, $P < 0.05$; ^b Compared with miR-451a group, $P < 0.05$; ^c Compared with TLR4 group, $P < 0.05$.

5 miR-451a 和 TLR4 对巨噬细胞凋亡的影响

图 3 和表 4 显示, 4 组细胞凋亡率比较差异有统计学意义 ($F = 6.683, P < 0.01$)。miR-451a 组的凋亡率显著高于对照组 ($t = 61.388, P < 0.01$); TLR4 组的凋亡率显著低于对照组 ($t = 33.797, P < 0.01$); miR-451a+TLR4 组的凋亡率显著低于 miR-451a 组且显著高于 TLR4 组 (t 值分别为 36.037 和 46.459, 均 $P < 0.01$)。

表 4 miR-451a 和 TLR4 对巨噬细胞凋亡的影响
Table 4 Effects of miR-451a and TLR4 on macrophage apoptosis

组别 Group	凋亡率 (%) Apoptosis rate
对照组	6.95 ± 0.52
miR-451a 组	18.41 ± 1.06 ^a
TLR4 组	3.63 ± 0.34 ^a
miR-451a+TLR4 组	10.56 ± 0.88 ^{a,b,c}

注:^a 与对照组比较, $P < 0.05$; ^b 与 miR-451a 组比较, $P < 0.05$; ^c 与 TLR4 组比较, $P < 0.05$ 。

Note: ^a Compared with the control group, $P < 0.05$; ^b compared with miR-451a group, $P < 0.05$; ^c Compared with TLR4 group, $P < 0.05$.

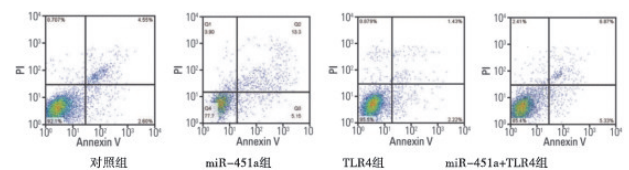


图 3 流式细胞术检测 miR-451a 和 TLR4 对巨噬细胞凋亡的影响
Fig. 3 Flow cytometry to detect the effects of miR-451a and TLR4 on the apoptosis of macrophages

讨论

MTB 常通过呼吸道侵入机体并导致肺部病变, 大多数情况下宿主免疫系统会识别并清除侵袭性 MTB, 以防止感染进一步传播。但 MTB 可逃避宿主免疫系统的监视, 目前关于 MTB 感染的机制仍不清楚^[10]。

巨噬细胞是一种关键的宿主防御细胞, 通过病原体相关的模式识别受体识别入侵的病原体, 以启动抗感染先天免疫反应^[11]。然而, MTB 也可能引起巨噬细胞的死亡, 从而导致 MTB 的大量繁殖和肺结核的发生^[12]。但是在肺结核中调控巨噬细胞的机制仍不清楚。miR 是近年来的研究热点, 其可通过碱基配对识别并结合 mRNA, 进而诱导 mRNA 的降解或者抑制翻译^[13]。miR-451a 是一种新发现的肺结核和免疫相关的 miR, 研究显示肺结核患者的肺泡灌洗液中 miR-451a 的水平降低^[14]。Liu 等^[15] 的研究显示, miR-451a 表达水平降低能抑制巨噬细胞吞噬结核分歧杆菌的免疫反应, 从而加剧感染。为了解 miR-451a 在肺结核中的感染机制, 本研究收集了健康者、活动期肺结核患者、MTB 感染但未有临床症状患者的血清样

品进行检测,结果显示 MTB 感染但未发病患者外周血中的 miR-451a 水平显著低于健康者,但是活动期肺结核患者的 miR-451a 则显著高于 MTB 感染但未发病患者。为进一步分析 miR-451a 在肺结核发病中的作用,本研究构建了 miR-451a 过表达的巨噬细胞模型,结果显示过表达 miR-451a 能显著抑制巨噬细胞的增殖促进其凋亡。miR-451a 能够减弱巨噬细胞和树突状细胞对流感病毒的免疫反应^[16],且具有促进细胞凋亡的作用^[17]。本研究结果表明,MTB 感染后机体的免疫系统启动,miR-451a 水平的降低会抑制巨噬细胞凋亡并提高巨噬细胞活性;而在活动期肺结核患者,miR-451a 水平的升高会抑制巨噬细胞活力并引起巨噬细胞凋亡,从而导致机体清除 MTB 的能力降低,引起肺结核病。

为进一步分析肺结核患者 miR-451a 调控巨噬细胞功能和引起肺结核发病的机制,本研究检测了 TLR4 蛋白的表达水平。TLR4 蛋白是感染性免疫的受体蛋白,可识别包括 MTB 在内的多种病原体,并激活下游的 Myd88/NF- κ B 等信号通路,促进巨噬细胞的激活,启动机体的免疫反应^[18]。此外,TLR4 的过表达和激活也会促进巨噬细胞的活力并抑制其凋亡,从而促进对病原体的清除^[19]。而促进 TLR4 的表达可通过调控巨噬细胞的机制限制 MTB 的存活^[20]。本研究结果显示,MTB 感染但未发病患者外周血中的 TLR4 mRNA 表达水平显著高于健康者,但是活动期肺结核患者的 TLR4 mRNA 水平则显著低于 MTB 感染但无临床症状的患者。此外,miR-451a 与 TLR4 mRNA 的水平显著负相关。提示 miR-451a 与 TLR4 mRNA 靶向结合过表达 TLR4 不但会促进巨噬细胞活力抑制巨噬细胞凋亡,还会缓解 miR-451a 对 TLR4 蛋白的抑制作用,并阻断 miR-451a 对巨噬细胞的抑制作用。表明 miR-451a 的降低会促进巨噬细胞中 TLR4 蛋白的表达,从而提高巨噬细胞活力,激活机体免疫系统。而当 miR-451a 升高后,TLR4 的表达受到限制,机体的免疫能力也被抑制,从而影响 MTB 的清除,导致肺结核病的发生。

综上所述,miR-451a 可通过靶向抑制 TLR4 促进肺结核的发病,这为 miR-451a 可能成为治疗肺结核的新靶点提供了理论依据。

【参考文献】

[1] Colangeli R, Gupta A, Vinhas SA, et al. *Mycobacterium tuberculosis* progresses through two phases of latent infection in humans [J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 4870-4875.
[2] Osei SJ, Maningi NE, Fourie PB. *Mycobacterium tuberculosis*, antimicrobials, immunity, and lung-gut microbiota crosstalk: current

updates and emerging advances [J]. Ann N Y Acad Sci, 2020, 1467(1): 21-47.
[3] Shi L, Jiang Q, Bushkin Y, et al. Biphasic dynamics of macrophage immunometabolism during *Mycobacterium tuberculosis* infection [J]. mBio, 2019, 10(2): 2550-2568.
[4] Zhao S, Mi Y, Guan B, et al. Tumor-derived exosomal miR-934 induces macrophage M2 polarization to promote liver metastasis of colorectal cancer [J]. J Hematol Oncol, 2020, 13(1): 156-171.
[5] 尚晓倩,赵慧,马秀敏,等. microRNA 与结核分枝杆菌感染的致病机制研究进展 [J]. 中华医院感染学杂志, 2019, 29(3): 477-480.
[6] 刘浩然. miRNA-451a 及靶基因在结核病发病机制中的作用及诊断价值的研究 [D]. 北京:北京市结核病胸部肿瘤研究所, 2019.
[7] Pahari S, Negi S, Aqdas M, et al. Induction of autophagy through CLEC4E in combination with TLR4: an innovative strategy to restrict the survival of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Autophagy, 2020, 16(6): 1021-1043.
[8] 王玲,孟伟民. miR-451a 靶向 TLR4 通路对巨噬细胞抗结核分枝杆菌感染作用的影响 [J]. 山西医科大学学报, 2021, 52(3): 289-295.
[9] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 肺结核诊断 [J]. 传染病信息, 2017, 30(6): 10001-10012.
[9] 伍玉琪,谭彩霞,吴安华,等. 《2020 NTCA/CDC 建议:潜伏性结核感染治疗指南》摘译 [J]. 中国感染控制杂志, 2020, 19(10): 3.
[10] Khader SA, Divangahi M, Hanekom W, et al. Targeting innate immunity for tuberculosis vaccination [J]. J Clin Invest, 2019, 129(9): 3482-3491.
[11] Liang S, Wang F, Bao C, et al. BAG2 ameliorates endoplasmic reticulum stress-induced cell apoptosis in *Mycobacterium tuberculosis*-infected macrophages through selective autophagy [J]. Autophagy, 2020, 16(8): 1453-1467.
[12] Castro GJ, Lu vano MML, Villarreal TL, et al. *Mycobacterium tuberculosis* promotes genomic instability in macrophages [J]. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2018, 113(3): 161-166.
[13] Su Q, Lv X. Revealing new landscape of cardiovascular disease through circular RNA-miRNA-mRNA axis [J]. Genomics, 2020, 112(2): 1680-1685.
[14] Armstrong DA, Nymon AB, Ringelberg CS, et al. Pulmonary microRNA profiling: implications in upper lobe predominant lung disease [J]. Clin Epigenetics, 2017, 9(1): 56-59.
[15] Liu X, Zhang D, Wang H, et al. MiR-451a enhances the phagocytosis and affects both M1 and M2 polarization in macrophages [J]. Cell Immunol, 2021, 365(1): 104377-104381.
[16] Okamoto M, Fukushima Y, Kouwaki T, et al. MicroRNA-451a in extracellular, blood-resident vesicles attenuates macrophage and dendritic cell responses to influenza whole-virus vaccine [J]. J Biol Chem, 2018, 293(48): 18585-18600.
[17] Jiang T, Chen J, Huang XB, et al. miR-451a induced apoptosis of philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia cells by targeting IL-6R [J]. Neoplasma, 2018, 65(6): 907-914.
[18] Zeng MY, Tong QY. Anti-inflammation effects of sinomenine on macrophages through suppressing activated TLR4/NF- κ B signaling pathway [J]. Curr Med Sci, 2020, 40(1): 130-137.
[19] Swanson L, Katkar GD, Tam J, et al. TLR4 signaling and macrophage inflammatory responses are dampened by GIV/Girdin [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2020, 117(43): 26895-26906.
[20] Pahari S, Negi S, Aqdas M, et al. Induction of autophagy through CLEC4E in combination with TLR4: an innovative strategy to restrict the survival of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Autophagy, 2020, 16(6): 1021-1043.

【收稿日期】 2022-05-14 【修回日期】 2022-07-21