

肺结核病患者外周血单个核细胞颗粒溶素基因的表达及临床意义

缪家文 张海燕 王捷婷 王雪梅 苏琴 潘洪秋 李芳秋

【摘要】 目的 建立检测人颗粒溶素(GNLY)mRNA 含量的实时荧光定量 RT-PCR 的方法,并测定肺结核病患者外周血单个核细胞(PBMC)中 GNLY 的基因表达水平,探讨 GNLY 基因在肺结核病患者 PBMC 中的表达及其临床意义。**方法** 应用已构建的质粒 pGEM-T/GNLY 作为定量模板行实时荧光定量 RT-PCR 测定收集自 122 例肺结核患者的标本,其中来自痰结核分枝杆菌阳性者 62 例(菌阳组),痰结核分枝杆菌阴性者 60 例(菌阴组)及 40 例健康对照者(对照组)外周血中 GNLY mRNA 的含量,并分析菌阳组抗结核治疗前后 GNLY 基因表达水平的变化。**结果** 肺结核患者 PBMC GNLY 基因表达水平显著低于对照组($P < 0.01$);治疗前菌阳组 PBMC GNLY 基因表达水平显著低于菌阴组($P < 0.05$);治疗后菌阳组 PBMC GNLY 基因表达水平较治疗前显著升高($P < 0.05$)。**结论** 本研究成功建立了检测人 GNLY 基因表达含量的荧光定量 RT-PCR 方法,GNLY 基因表达水平可作为肺结核治疗的疗效观察及预后判断的一个新的实验室指标。

【关键词】 颗粒溶素;结核,肺;逆转录聚合酶链反应

Expression and clinical significance of granulysin in peripheral blood mononuclear cells of patients with pulmonary tuberculosis MIAO Jia-wen, ZHANG Hai-yan, WANG Jie-ting, WANG Xue-mei, SU Qin, PAN Hong-qiu, LI Fang-qiu. Center of Clinical Laboratory, The Third Hospital of Zhenjiang, Zhenjiang 212005, China

Corresponding author: MIAO Jia-wen, Email: eloveyou@163.com

【Abstract】 Objective To establish a real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) for detecting the expression of granulysin (GNLY) gene in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and explore the relationship between GNLY mRNA expression and pulmonary tuberculosis.

Methods Real-time quantitative detection based on fluorescent TaqMan method was established. In this method, a constructed cloning vector pGEM-T/GNLY was taken as a standard plasmid. The GNLY gene expression levels in 122 patients with tuberculosis, including 62 patients with pulmonary tuberculosis of smear-positive, 60 of smear-negative and 40 healthy controls were detected by real-time RT-PCR. The expression changes of GNLY gene before and after treatment were also analyzed. **Results** The expression of GNLY gene in smear-positive tuberculosis group and smear-negative tuberculosis group were significantly lower than that in control group ($P < 0.01$) and the mean level of GNLY mRNA in pulmonary tuberculosis of smear-positive group was significantly higher than that in smear-negative group ($P < 0.05$), the expression of GNLY gene in smear-positive patients was significantly higher after treatment than before treatment ($P < 0.05$). **Conclusions** It is an easy and reliable test to detect the expression level of GNLY mRNA by real-time fluorescence quantitative RT-PCR and the preliminary experimental result shows that the detection of GNLY gene expression levels is meaningful for treatment guidance and evaluating prognosis of pulmonary tuberculosis.

【Key words】 Granulysin; Tuberculosis pulmonary; Reverse transcriptase polymerase chain reaction

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2012.05.006

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 30670599);镇江市科技支撑-社会发展项目(No. SH2011062)

作者单位:212005 镇江市,江苏省镇江市第三人民医院中心实验室(缪家文、张海燕、王捷婷、王雪梅、苏琴、潘洪秋);南京军区南京总医院解放军临床检验医学研究所(李芳秋)

通讯作者:缪家文,Email:eloveyou@163.com

结核病与免疫,尤其是细胞免疫密切相关,宿主的保护性免疫反应对控制结核分枝杆菌感染具有重要意义。颗粒溶素(granulysin, GNLY)是近年来发现的一种小分子蛋白,主要表达于激活的细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic lymphocyte, CTL)和自然杀伤细胞(natural killer cell, NK)的细胞毒颗粒中,是发挥细胞毒作用的主要免疫效应分子之一^[1-2]。其全长分子由145个氨基酸组成,约15 kD,经加工去除先导序列后的9 kD片段活性更强。GNLY显示出很强的细胞毒活性,呈剂量依赖性抗许多种病原体,包括革兰阳性和阴性细菌、真菌和寄生虫,如新型隐球菌、白色念珠菌和结核分枝杆菌等,是迄今鉴定的细胞毒颗粒中惟一具有抗微生物活性的裂解分子^[3]。健康人外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC)中GNLY的表达水平与机体的细胞免疫状态直接相关,细胞免疫功能低下时体内GNLY表达缺乏^[4]。研究表明,GNLY表达水平的检测可作为评价机体细胞免疫功能状态的新指标^[5-6]。本研究应用荧光定量PCR方法检测肺结核患者PBMC中GNLY的含量,探讨肺结核病患者外周血颗粒溶素的表达及其临床意义。

资料与方法

一、标本来源

收集本院2008年6月~2010年12月住院122例肺结核患者的临床资料,所有患者诊断均符合中华医学会结核病学分会制定的《肺结核诊断和治疗指南》标准。其中,痰结核分枝杆菌阳性者62例(菌阳性组),痰结核分枝杆菌阴性者60例(菌阴性组),均为初治患者。年龄16~76岁,平均年龄(46.32 ± 5.36)岁。菌阳组与菌阴组年龄无显著差异,具有可比性。结核病初治涂阳者化疗方案采用2HRZE/4HR;涂阴者化疗方案采用2HRZ/4HR(H:异烟肼,R:利福平,E:乙胺丁醇,Z:吡嗪酰胺)。

二、试剂和仪器

淋巴细胞分离液(上海华精公司),细胞总RNA抽提试剂盒(德国Qiagen公司),RT-PCR试剂盒(Invitrogen公司),GNLY特异性引物探针(上海克隆生物公司),荧光定量试剂盒(美国ABI公司)。采用美国Roter Gene 3000型荧光定量PCR仪。pGEM-T/GNLY和pMD18-18S rRNA质粒由本实验室保存^[7]。

三、引物、探针的设计与合成

根据GenBank中GNLY mRNA的序列,应用Primer Premier 5.0软件设计基因专一性的引物和探针,在探针5'-端标记荧光发光基团FAM,3'-端标

记上荧光淬灭基团TAMRA,由上海生工生物技术公司合成。引物F:5'-CAACTTTGATCCAGCAGAATG-3',引物R:5'-ATCTGAGACTCTTCTTGTAGG-3',探针:5'-TTCTCAGGTGTTCTTGCTCCTCG-3'。内参采用人18S rRNA扩增片段长为73 bp,其上游引物:5'-ACATCCAAGGAAGGCAGCAG-3';下游引物:5'-TTCGTCACTACCTCCCCGG-3';探针:5'-FAMCGCGCAAATTACCCACTCCCGATAMRA-3'。正反向引物、Taqman探针(FAM TAMRA标记)均为大连宝生物公司产品。

四、细胞分离和总RNA抽提

取静脉血4 ml,枸橼酸钠1 ml(109 mmol/L)抗凝,生理盐水稀释2~3倍,采用淋巴细胞分离液分离PBMC, Qiagen试剂盒提取细胞总RNA后取少量于紫外分光光度仪260 nm和280 nm波长处测得浓度和纯度。

五、cDNA的合成

使用Invitrogen公司RT-PCR试剂盒合成cDNA:在反应管内依次加入随机引物1 μl, 10 mmol/L dNTP 1 μl, RNA 8 μl, 加双蒸水10 μl, 反应体系共20 μl, 65℃ 5 min, 0℃ 2 min。再加入10 × RT buffer 2 μl, 25 mmol/L MgCl₂ 24 μl, 0.1 mmol/L DTT 2 μl, RNase OUT(RNA酶)1 μl, Superscript III RT 1 μl, 反应体系40 μl。25℃ 10 min, 50℃ 50 min, 85℃ 5 min, 0℃ 2 min。最后加入1 μl RNase H(RNA酶), 反应体系为41 μl, 37℃ 20 min。

六、实时荧光定量PCR

实时荧光定量检测GNLY含量时,在反应管内依次加入:PCR Mix 10 μl, 20 × Mix(内含探针、引物)1 μl, cDNA 2 μl, 双蒸水7 μl, 共20 μl。18S RNA内参反应体系:在反应管内依次加入PCR Mix 10 μl, 上下游引物各0.1 μl, Vic探针0.1 μl, cDNA 1 μl, 双蒸水8.7 μl, 共20 μl。扩增条件为50℃ 2 min, 95℃ 10 min, 1个循环;95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 40个循环。

七、标准曲线的制备

将pGEM-T/GNLY和pMD18-18S rRNA两种质粒,用TE缓冲液以1:10比例稀释成不同拷贝数浓度,作为内参模板。两种标准模板1 μl, 2 × buffer 5 μl, GNLY或18S rRNA上、下游引物各0.2 μl, MGB探针0.2 μl, 双蒸水3.4 μl, 共10 μl的反应体系。扩增条件同实时荧光PCR操作,反应结束后计算出GNLY和内参18S rRNA的拷贝数。

八、统计学处理

采用SPSS 10.0统计软件进行数据处理,数据资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用t检验,以 $P <$

0.05 为差异具有统计学意义。

结 果

一、绘制标准曲线和设定内参照

各稀释度的阳性标准模板同时进行荧光定量 RT-PCR 检测,产物进入指数增长期的起始点即阈循环值作为检测的临界点。这一区间内 CT 值与起始模板量的对数呈反比关系。横轴代表起始拷贝数的对数(\log_{10}),纵轴代表对应的 CT 值,GNLY 标准曲线相关系数达到 0.993。以 18S rRNA 为内对照,18S rRNA 基因的 CT 值为 14~18 认为是有效标本,确保 RNA 反转录效率的一致性。

二、各实验组 GNLY mRNA 的定量检测

肺结核患者 PBMC GNLY 基因表达水平显著低于健康对照组($P < 0.01$);治疗前菌阳组 PBMC GNLY 基因表达水平显著低于菌阴组($P < 0.05$),差异具有统计学意义,见表 1。

表 1 各组患者 GNLY mRNA 含量的定量检测结果

组别	例数	GNLY mRNA (拷贝/ μg)	平均拷贝数 (拷贝/ μg , $\bar{x} \pm s$)
菌阳组	62	$5.32 \times 10^3 \sim 3.61 \times 10^5$	$(8.25 \pm 5.52) \times 10^4 \text{ ab}$
菌阴组	60	$2.33 \times 10^4 \sim 1.46 \times 10^6$	$(4.86 \pm 4.23) \times 10^5 \text{ a}$
对照组	40	$8.63 \times 10^4 \sim 5.36 \times 10^7$	$(2.18 \pm 3.23) \times 10^6$

注:与对照组相比,^a $P < 0.01$, $t = 3.390$;与菌阴组相比,^b $P < 0.05$, $t = 2.345$

三、菌阳组治疗前后 GNLY 基因表达水平

菌阳组治疗后 PBMC GNLY 基因表达水平显著高于治疗前,差异具有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

表 2 菌阳组治疗前后 GNLY 基因表达水平

组别	例数	GNLY mRNA (拷贝/ μg)	平均拷贝数 (拷贝/ μg , $\bar{x} \pm s$)
治疗前	62	$5.32 \times 10^3 \sim 3.61 \times 10^5$	$(8.25 \pm 5.52) \times 10^4$
治疗后	62	$7.24 \times 10^3 \sim 5.92 \times 10^6$	$(3.55 \pm 4.62) \times 10^5 \text{ a}$

注:与治疗前比较,^a $P < 0.01$, $t = 2.592$

讨 论

CD8⁺ T 细胞溶解结核分枝杆菌细胞的能力与穿孔素和颗粒溶素(GNLY)的高表达有关。Andersson 等^[8]筛选 19 例接受外科手术的慢性肺结核患者的肺组织进行病理学组织检查,病变肺组织来自切除的纤维肉芽组织,远端肺实质来自病变部位边缘未受累的肺组织,该研究显示慢性肺结核患者病变部位穿孔素和 GNLY 表达低于病变远端肺组

织及正常肺组织,尤其表现在蛋白质和 mRNA 水平。以上研究表明,具有临床症状的慢性肺结核与结核病变部位共表达于 CD8⁺ T 细胞中的穿孔素和 GNLY 表达不足有关。穿孔素和 GNLY 表达不足导致病变部位 CTL 活性受损,人体抗结核分枝杆菌感染的能力减弱。

Sample 等^[9]分析接种卡介苗(BCG)的 10 周龄新生儿的脐带血和外周血中 GNLY 和穿孔素的细胞表达水平发现,脐带血中仅 CD56⁺ NK 细胞固有性表达 GNLY 和穿孔素,在经 BCG 体外刺激后,GNLY 和穿孔素的表达上调。而新生儿在接种 BCG 后,由 CD4⁺ T 和 CD8⁺ T 淋巴细胞分泌的 GNLY 和穿孔素表达上调。因而其认为由 NK 细胞表达的 GNLY 和穿孔素能够提供先天性免疫作用,而由卡介苗诱导的细胞毒淋巴细胞表达的 GNLY 和穿孔素能为新生儿抵抗结核分枝杆菌提供免疫保护作用。

全世界约 1/3 人口感染结核分枝杆菌,每年约 200 万人死于结核病。目前惟一可用的预防结核病的疫苗来自于牛分枝杆菌减毒株的卡介苗,其预防成人结核病的有效性仍然存在争议。近年来,耐多药结核分枝杆菌已成为一个世界性的难题。所以,迫切需要研制新的结核病治疗性疫苗和预防性疫苗。近年来,一种新的 DNA 疫苗的研究已取得初步进展^[10],此种 DNA 疫苗能够诱导产生 CD8⁺ T 淋巴细胞和免疫效应分子如 GNLY,可以杀伤耐多药(MDR-TB)和广泛耐药(XDR-TB)结核分枝杆菌。

淋巴细胞中 GNLY 水平可反映生理、病理状态下 CTL 和 NK 细胞的活性,可作为宿主细胞免疫状态的新指标,然而 GNLY mRNA 在疾病中的研究尚不充分,因而,检测人外周血 PBMC 中 GNLY mRNA 的表达水平对进一步在分子水平研究肺结核患者 GNLY 基因的表达,探讨其表达水平与肺结核免疫保护作用机制之间的关联性至关重要。

本研究建立了 GNLY 基因表达的实时荧光定量 RT-PCR 检测方法,为一种准确检测 GNLY mRNA 含量的新方法,并初步分析了 122 例肺结核患者外周血单个核细胞中 GNLY mRNA 的含量,从分子水平证实了 GNLY mRNA 在肺结核患者表达下调,菌阳组治疗前 PBMC GNLY 基因表达水平显著低于菌阴组,菌阳组治疗后 PBMC 颗粒溶素表达水平显著高于治疗前,提示 GNLY 及其介导的细胞免疫应答与肺结核患者的免疫保护作用相关。外周血单个核细胞中 GNLY 基因表达水平的检测为肺结核的疗效观察及预后判断提供了新的实验室指标。

参 考 文 献

- 1 Stenger S, Hanson DA, Teitelbaum R, et al. An antimicrobial

- activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science*, 1998, 282(5386):1212-1215.
- 2 Lieberman J. The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol*, 2003, 3(5):361-370.
 - 3 Clark R, Griffiths GM. Lytic granules, secretory lysosomes and disease. *Curr Opin Immunol*, 2003, 15(5):516-521.
 - 4 Di Liberto D, Buccheri S, Caccamo N, et al. Decreased serum granulysin levels in childhood tuberculosis which reverse after therapy. *Tuberculosis*, 2007, 87(4):322-328.
 - 5 Saigusa S, Ichikura T, Tsujimoto H, et al. Serum granulysin level as a novel prognostic marker in patients with gastric carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol*, 2007, 22(8):1322-1327.
 - 6 Sarwal MM, Jani A, Chang S, et al. Granulysin expression is a mark for acute rejection and steroid resistance in human renal transplantation. *Hum Immunol*, 2001, 62(1):21-31.
 - 7 缪家文, 李芳秋, 杨爱龙, 等. 人颗粒溶素基因真核表达载体的构建及在肝癌细胞中表达的实验研究. *医学研究生学报*, 2005, 18(12):1073-1077.
 - 8 Andersson J, Samarina A, Fink J, et al. Impaired expression of perforin and granulysin in CD8⁺ T cells at the site of infection in human chronic pulmonary tuberculosis. *Infect Immun*, 2007, 75(11):5210-5222.
 - 9 Semple PL, Watkins M, Davids V, et al. Induction of granulysin and perforin cytolytic mediator expression in 10-week-old infants vaccinated with BCG at birth. *Clin Dev Immunol*, 2011, 2011:438463.
 - 10 Okada M, Kita Y. Tuberculosis vaccine development: the development of novel (preclinical) DNA vaccine. *Hum vaccine*, 2010, 6(4):297-308.
- (收稿日期:2011-10-09)
(本文编辑:孙荣华)

缪家文, 张海燕, 王捷婷, 等. 肺结核病患者外周血单个核细胞颗粒溶素基因的表达及临床意义[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志:电子版*, 2012, 6(5):400-403.

