

· 论 著 ·

基质金属蛋白酶 1 体外释放试验对肺结核的诊断价值

鲁芝子¹, 陈创夫*, 曹旭东, 郭飞, 孟仁

摘要:目的 探讨测定基质金属蛋白酶 1(MMP-1)水平对早期结核病的诊断价值。方法 获取肺结核患者(20 名)与健康人(20 名)外周血淋巴细胞。分别用结核杆菌全菌与外周血淋巴细胞共培养 12h,采用酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测培养上清液中 MMP-1 与 IFN- γ 浓度。结果 结核组 MMP-1 与 IFN- γ 浓度明显高于健康对照组($P<0.001$),检测敏感性与特异度分别为(88.9%,100%)和(85.7%,100%)。结论 MMP-1 释放反应对结核病具有临床诊断价值。MMP-1 与 IFN- γ 联合测定对早期结核病诊断具有临床意义,可用于早期结核的鉴别诊断。

关键词: 基质金属蛋白酶; 结核; 诊断

中图分类号: R521 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-9727(2012)5-527-03

Value of detection of matrix metalloproteinases1 *in vitro* in diagnosis of tuberculosis. LU Zhi-zi, CHENG Chuang-fu, CAO Xu-dong et al. (Animal Science & Technology College, Shihezi University, Shihezi 832003, Xinjiang P. R. China; Corresponding author: CHEN Chuang-fu, E-mail: xcf-xb@163.com)

Abstract: Objective To investigate the value of MMP-1 and IFN- γ *in vitro* Release Test in diagnosis of early tuberculosis (TB). Methods The peripheral blood lymphocytes were collected from the patients with tuberculosis (tuberculosis group $n=20$) and healthy controls (healthy control group $n=20$). The lymphocytes were co-cultured for 12h with antigens. The protein levels of MMP-1 and IFN- γ were detected by ELISA. Results The protein levels of MMP-1 and IFN- γ in tuberculosis patients were significantly higher than those in healthy control group ($P<0.001$). Sensitivity of the two indicators in the diagnosis of tuberculosis were 88.9% and 85.7% respectively. Specificity of the two indicators were 100% and 100% respectively. Conclusion Combination of MMP-1 with IFN- γ allow early detection of tuberculosis.

Key words: Matrix metalloproteinase I; Tuberculosis; Diagnosis.

结核感染是引起发展中国家死亡率升高的重要原因之一。近年来发病率及死亡率均呈上升趋势。目前全球每天仍有 5 000 人死于结核病,而每年罹患结核病的人数超过 800 万。我国结核病疫情呈上升趋势,每年至少有 150 万例新病人发生,其中传染性病人超过 65 万例。因此,对该病的防治不容懈怠。

结核感染的早期诊断和治疗是降低结核病死亡率的关键。在结核病防治中,我国面临的重大难题之一是如何快速准确诊断结核病患者。目前针对结核的诊断都具有缺陷性:血象检查一般对诊断无特异性价值,影像学表现不能确诊肺结核,不典型肺结核的表现可以多种多样,与其他肺部疾病难以鉴别。目前临床应用最多的仍是痰抗酸杆菌涂片和结核菌素纯蛋白衍生物(PPD)皮试,前者阳性率低,后者由于与卡介苗(BCG)存在交叉反应而导致特异性较差^[1]。金标准是结核分枝菌培养,特异性虽高但敏感性太低,而且需时较长,给临床及时诊断结核病带来困难。目

前,应用最广泛的是全血干扰素- γ 测定。其敏感度(75%-97%)和特异度(>95%)比较高^[2]。但该方法不适用于自身免疫系统缺陷的结核病患者。

基质金属蛋白酶-1(MMP-1)属于 MMP 家族中的胶原酶,其主要功能为降解细胞外基质(Extracellularmatrix, ECM)的有效成分,与结核活动、肿瘤侵袭转移等密切相关^[3]。Paul Elkington 发现了导致结核病(TB)破坏肺组织的一种关键酶 MMP-1。在 HIV 阴性和 HIV 阳性的结核患者中,都可以检测到 MMP-1 含量显著增加^[4]。本研究通过对结核杆菌刺激健康者外周血淋巴细胞和结核患者外周血淋巴细胞后检测炎症细胞因子 MMP-1 和 IFN- γ 的变化,为今后开发的结核体外诊断试剂盒提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 结核分枝杆菌标准菌株 H37Rv 由本实验室保存。20 份健康者血液及 20 份结核患者血不分析液采

基金项目:十一五国家重大疫病防控专项(No.2008ZX10003-003)

作者单位:1.石河子大学动物科技学院/新疆地方与民族高发病教育部重点实验室,新疆 石河子 832003

作者简介:鲁芝子(1984~),女,汉,硕士研究生,研究方向为疾病病理学。

* 通讯作者: E-mail: xcf-xb@163.com

自石河子某医院。

1.1.2 试剂 人淋巴细胞分离提取液(北京索莱宝科技有限公司),人 MMP-1ELISA 试剂盒与人 IFN- γ ELISA 试剂盒均购自(美国 RD 公司),RPMI 1640 培养基(美国英杰生命技术有限公司),7H9 液体培养基与 7H10 固体培养基(美国 BD 公司),金胺 O 染色液(青岛高科园海博生物技术公司)、生理盐水、链霉素。

1.1.3 主要仪器 酶标仪(TECAN),高速冷冻离心机(Sigma 2-16K),恒温培养箱(DNP-9162),恒温摇床(HZQ-X100),水浴锅(DKB-501A),旋涡混合器,全自动高压蒸汽灭菌罐,倒置显微镜(日本 OLYMPUS 公司),超净工作台。

1.2 方法

1.2.1 单菌悬液制备与细菌计数 取 10ml OD600nm 为 0.4~0.6 的结核菌液 5 000r/min 4℃,离心 10min,弃上清。加 PBS 补至原体积,进行洗涤 5 000r/min 4℃离心 10min,弃上清。沉淀加 PBS 补足到 5ml,把两颗高压过的玻璃珠放进管中,盖紧盖子,用封口膜封口,旋涡振荡器(最大速度)震荡。然后将菌液瞬时离心,弃多余液体备用。

取 0.5ml 制备好的单菌悬液,7 000r/min 4℃离心 1min,弃上清。用金胺 O 染色液进行染色:在沉淀中加 0.5ml A 液,悬浮后,水浴 80℃ 10min,7000r/min,4℃离心 1min,弃上清;在沉淀中加 0.5ml B 液,悬浮后,7 000r/min 4℃离心 1min,弃上清;在沉淀中加 0.5ml C 液,悬浮后,7 000r/min 4℃离心 1min,弃上清;在沉淀中加 0.5ml PBS,悬浮后进行细菌计数。

1.2.2 淋巴细胞的分离提取与侵染 将采集的 2ml/人新鲜抗凝静脉血充分混匀后缓慢加入到等体积的生理盐水中,轻柔上下颠倒混匀。另取新离心管,加入淋巴细胞分离液 4ml,把上述混合物用枪缓缓匀速打入该离心管,800xg 21℃,离心 30min,然后将分离液中间的白色细胞吸出,加生理盐水至 5ml 洗涤 400xg,21℃ 离心 8min 弃去上清。细胞沉淀用 2ml 的 RPMI1640 培养液重悬 2 000r/min,离心 5min,弃上清备用。

细胞计数后,以 100:1(细菌个数:细胞个数)的比例,分别进行侵染。同时设 PBS 对照组,每组进行 3 个重复,并在侵染 12h 收集细胞培养上清液。(分组情况:第一组:健康者外周血淋巴细胞 PBS 对照组;第二组:结核杆菌刺激健康者外周血淋巴细胞;第三组:结核阳性外周血淋巴细胞 PBS 对照组;第四组:结核杆菌刺激结核阳性外周血淋巴细胞)。

1.2.3 MMP-1 和 IFN- γ 的测定 收集细胞培养上清液后,经链霉素处理,用人细胞因子 ELISA 检测试

剂盒测定细胞培养上清液中干扰素- γ 、MMP-1 细胞因子的水平,测定 OD450nm 值。将所得 OD 值,代入曲线方程中计算细胞上清液中 MMP-1 和 IFN- γ 的含量(稀释标本应乘以相应的稀释倍数)。严格按试剂盒说明书操作。

1.3 统计学分析 采用 SPSS13.0 软件对实验结果进行统计分析,对指标变量采用均数($\bar{x} \pm s$)表示平均水平,两组数据之间的比较应用 t 检验。应用受试者工作特征曲线(Receiver operating characteristic curve,ROC),以总体诊断符合率最大为标准,确定诊断临界值,计算敏感度和特异度。

2 结果

2.1 MMP-1 和干扰素- γ 含量的测定 结核组与健康对照组 MMP-1 和 IFN- γ 水平见表 1。从表 1 可见结核组 MMP-1 与 IFN- γ 浓度较健康对照组显著增高($P < 0.001$)。

表 1 肺结核患者和健康者外周血淋巴细胞上清液中 MMP-1、IFN- γ 水平($\bar{x} \pm s$)

Table 1 levels of MMP-1、IFN- γ in lymphocytes of TB cases and healthy controls

组别 Group	MMP-1-(Pg/l)		IFN- γ (ng/l)	
	$\bar{x} \pm s$	F 值 P 值	$\bar{x} \pm s$	F 值 P 值
健康对照组 Control	427.41 \pm 61.48	27.43 <0.001	214.27 \pm 39.60	26.97 <0.001
结核组 TB cases	9579.05 \pm 1312.70		6701.70 \pm 910.56	

2.2 实验参数 MMP-1 标准曲线相关系数 0.99, IFN- γ 标准曲线相关系数 0.98。

2.3 诊断界值的确定 采用 ROC 曲线确定 MMP-1 和 IFN- γ 两种检验方法对肺结核的诊断界点分别为 420pg/l 和 200ng/l。

2.4 诊断效果评价指标比较 比较 MMP-1 和 IFN- γ 诊断效果评价指标,前者与后者敏感度相近,特异度一致。见表 2。

表 2 检测 MMP-1 与 IFN- γ 对结核性胸腔积液诊断的评价指标比较

Table 2 Sensitivity and specificity in detection of MMP-1 and IFN- γ in TB cases

指标	ROC 曲线下面积	敏感度(%)	特异度(%)	指数
Indicator	Area under ROC curve	Sensitivity	Specificity	Youden
MMP-1	0.975	88.9	100	0.889
IFN- γ	0.963	85.7	100	0.857

3 讨论

IFN- γ 测定是近年来较常用的结核病的诊断指标。因为它是诱导并激活巨噬细胞产生杀伤力机制中最重要的细胞因子。结核分枝杆菌在潜伏感染期间为带菌免疫,体内存在大量免疫记忆细胞,并以 Th1 型

细胞为主。干扰素- γ (Interferon- γ , IFN- γ) 是 Th1 细胞免疫应答主要表征,并在结核感染早期分泌水平显著升高。若以结核分枝杆菌作为抗原刺激潜伏感染期间的免疫记忆细胞,也会产生高水平的 IFN- γ 。因此 IFN- γ 水平可以作为结核分枝杆菌感染的早期诊断的检测指标,对于结核病的防治具有重要意义。但是 γ -干扰素释放试验的结果在一定程度上受到 T 细胞水平的影响,对于免疫缺陷者或者免疫抑制结果会不准确,此外对于某些血液病、恶性肿瘤、矽肺以及慢性肾衰者,也缺少足够的数据库。虽然有资料表明,干扰素释放试验对于 HIV 患者感染结核菌也有诊断价值^[5],但是没有足够的临床研究证实。对于某些血液病、恶性肿瘤、矽肺以及慢性肾衰者,缺少足够的数据库。 γ -干扰素释放试验的结果在一定程度上还受到 T 细胞水平的影响,对于免疫抑制或者免疫缺陷者会结果不准确,也有资料表明,干扰素释放试验对于 HIV 患者感染结核菌也有诊断价值,但是缺乏足够的临床研究证实。

目前,国内在检测结核技术方面对基质金属蛋白酶的研究尚少。基质金属蛋白酶 (Matrix metalloproteinases, MMPs) 家族包含了超过 20 类的细胞分泌因子和细胞表面酶,它们可以降解细胞外基质蛋白、凝血因子、脂蛋白、生长因子,并具有趋化细胞等作用^[6]。肺损伤发生后,如能检测出 MMP-1/MMP-3,疾病的预后将比只检测出 MMP-2/MMP-8/MMP-9 的患者要差。在 HIV 阴性和 HIV 阳性的结核病患者中,都可以检测到 MMP-1 含量显著增加。

采用受试者运算特性 (ROC) 曲线确定 MMP-1 与 IFN- γ 的诊断界值,是一种科学的统计学方法。当 MMP-1 的临界值为 420pg/l 时,诊断早期结核病的敏感性为 88.9%,特异性为 100%;IFN- γ 的临界值为 200ng/l 时,其敏感性为 85.7%,特异性为 100%。本实验表明结核患者 MMP-1 分泌水平和 IFN- γ 分泌水平显著高于健康者。而且通过 MMP-1 与 IFN- γ 诊断效果评价指标的比较,可以发现前者与后者敏感度相近,特异性一致,是具有较高价值的标志物,同时, MMP-1 释放反应可以作为结核病辅助诊断指标。本实验建立的 MMP-1 检测方法与 IFN- γ 检测方法联合使用,为研发新型的结核体外诊断试剂盒提供技术基础。

参考文献:

- [1] Huebner RE, MF Schein JB, Bass . The tuberculin skin test. Clin Infect Dis ,1993 ,17 :968-975.
- [2] Diel R ,Nienhaus A ,Lange C ,et al. Tuberculosis contact investigation with a new specific blood test in a low -incidence population containing a high proportion of BCG-vaccinated person . Respir Res , 2006 ,7(1) :77-84.
- [3] Pai M ,Kalantri S ,Dheeda K. New tools and emerging technologies for the diagnosis of tuberculosis :part I. Latent tuberculosis . Expert Rev Mol Diagn ,2006 ,6(3) :413-422.
- [4] Kumar M ,Meenakshi N ,Sundaramurthi JC ,et al . Immune response to Mycobacterium tuberculosis specific antigen ESAT-6 among south Indians. Tuberculosis (Edinb) ,2010 ,90(1) :60-69.
- [5] Iguchi M ,Maruyama K ,Tsutsumi Y ,et al . QuantiFERON :an early diagnostic tool for cerebral tuberculosis. Rinsho Shinkeigaku , 2008 ,48(4) :259-262.
- [6] Aiken AM ,Hill PC ,Fox A ,et al . Reversion of the ELISPOT test after treatment in Gambian tuberculosis cases . BMC Infect Dis , 2006 ,6 :66-71.
- [7] Chen YY ,Zheng GT ,Zhan ZH . Establishment of IFN- γ in vitro Release Test and its application in diagnosis of TB cases [J]. J Bioengineering , 2008 ,9 ,25 :24(9) :1653-1657. (In Chinese)
(陈颖钰,邓钰涛,詹枝华. 人 IFN- γ 体外释放检测法的建立及其在结核病诊断中的应用 [J]. 生物工程学报, 2008 ,9 ,25 :24(9) :1653-1657.)
- [8] Beamer GL ,Flaherty DK ,Vesosky B ,et al . Peripheral blood interferon-gamma release assays predict lung responses and Mycobacterium tuberculosis disease outcome in mice . Clin Vaccine Immunol , 2008 ,1 :474-483.
- [9] Karam F ,Mbow F ,Fletcher H ,et al . Sensitivity of IFN- γ release assay to detect latent tuberculosis infection is retained in HIV-infected patients but dependent on HIV/AIDS . Progression , 2008 ,3 :1441.
- [10] Ariga H ,Kawabe Y ,Nagai H ,et al . Diagnosis of active tuberculous serositis by antigen-specific interferon-gamma response of cavity fluid cells. Clin Infect Dis ,2007 ,45 :1559-1567.
- [11] Brodie D ,Lederer DJ ,Gallardo JS ,et al . Use of an interferon-gamma release assay to diagnose latent tuberculosis infection in the foreign-born. Chest ,2008 ,1 :869-874.
- [12] Yu T ,Lu SY ,Shi JD . Value of MMP-1 and its tissue inhibitor 1 in differentiating diagnosis of pleural effusion in TB cases [J]. Chin Clin Med , 2010 ,10 ,17(5) :645-647. (In Chinese)
(俞彤,鲁沈源,施劲东. 基质金属蛋白酶 1 及其组织抑制物 1 在结核性和肿瘤性胸腔积液鉴别诊断中的价值 [J]. 中国临床医学, 2010 ,10 ,17(5) :645-647.)
- [13] Paul Elkington ,Takayuki Shiomi ,Ronan Breen . MMP-1 drives immunopathology in human tuberculosis and transgenic mice [J] . J Clin Exam ,2011 ,121(5) :1827-1833.
- [14] Ye S. Influence of matrix metalloproteinase genotype on cardiovascular disease susceptibility and outcome [J] . Cardiovasc Res ,2006 ,69 (3) :636-645.

收稿日期 2012-02-21 编辑 崔宜庆