

趋化因子在重症继发性肺结核患者表达研究

苏瑾文¹, 刘艳华², 杨秉芬², 程小星^{2*}

1.解放军309医院结核病研究所重症医学科,北京 100091;2.解放军309医院结核病研究室,北京 100091

摘要:目的 对基因表达谱芯片筛选出的重症比对轻症继发性肺结核患者基因CCL3、CCL4、CXCL2进行验证,探索其表达下调与重症继发性肺结核免疫病理机制的关系。方法 用Affymetrix基因表达谱芯片检测重症和轻症继发性肺结核患者以及与健康对照相比的差异表达基因;用real-time PCR法测定重症、轻症患者和健康对照CCL3、CCL4、CXCL2的相对表达量;用方差分析和非参数检验统计方法判断组间比较的统计学意义。结果 表达谱芯片筛选出重症继发性肺结核患者有大量差异表达基因,一些免疫基因表现为下调,可能与病变严重程度有相关性。real-time PCR结果显示CCL3在重症vs轻症表达下调($P<0.05$),重症vs健康有下调趋势;CCL4在组间比较虽无统计学差异但重症vs轻症、重症vs健康有下调表达趋势;CXCL2在重症vs轻症有下调趋势,相对于健康人有轻度上调($P<0.05$)。结论 基因表达谱芯片检测CCL3、CCL4、CXCL2在重症vs轻症继发性肺结核患者表达下调,验证结果与芯片基本相符,趋化因子下调可能在重症继发性肺结核免疫病理机制中有重要作用。

关键词:肺;结核;趋化因子;聚合酶链反应**中图分类号:**R521.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1009-9727(2015)04-415-05

Expression of chemokine in severe secondary pulmonary tuberculosis patients

SU Jin-wen¹, LIU Yan-hua, YANG Bing-fen, CHENG Xiao-Xing

1. Tuberculosis ICU of PLA 309 Hospital, Beijing, 100091, P.R.China

Corresponding author: CHENG Xiao-xing. E-mail:xc36cn@163.com

Abstract: **Objective** To verify the expression levels of chemokines (CCL3, CCL4, CXCL2) which were down-regulated in severe vs mild secondary tuberculosis (TB) patients according to gene expression profiling analysis and to investigate the correlation between down-regulated expression of chemokines and immunopathology mechanism in severe secondary TB. **Methods** The differently expressed gene was detected by Affymetrix expression profile gene chip. The relative transcript levels of chemokines (CCL3, CCL4, CXCL2) were assayed by real time-PCR in severe, mild secondary TB cases and healthy controls. ANOVA and non-parametric tests were used for statistic analysis among the groups. **Results** A mount of differential genes were selected by gene expression profile chip. Some immune genes were down-regulated and it might be related to the severity of disease. The results of RT-PCR verified that the expression of CCL3 was down-regulated in severe vs mild secondary TB patients ($P<0.05$) and the trends was down-regulated in severe secondary TB vs healthy controls. There were no statistic significant difference among groups for CCL4, but the trends was down-regulated in severe vs mild secondary TB and in severe secondary TB vs healthy controls. The trends of CXCL2 expression showed down-regulated in severe vs mild secondary TB while it was up-regulated gently in severe secondary TB vs healthy controls ($P<0.05$). **Conclusion** Expression of CCL3, CCL4 and CXCL2 were down-regulated in severe vs mild secondary TB by gene expression profile analysis. Further verification results confirmed with the gene analysis results. The down-regulation of chemokines may involve in immunopathology of severe secondary TB.

Key words: Lung; Tuberculosis; Chemokine; RT-PCR

肺部结核菌感染的主要特征是免疫病理损伤。临床中可见到重症继发性肺结核患者肺部病灶范围大,肺结构损害严重,易并发肺部感染、呼吸衰竭,预后往往不良,其免疫病理机制尚不明确。本研究前期用基因表达谱芯片筛选出重症继发性肺结核患者与轻症、健康人相比的差异表达基因,以下调表达为主,其中很多是免疫相关基因,这些差异表达基因主要参与了炎症和免疫反应通路,因此重症继发性肺结核病变的发生发展有其分子基础。趋化因子在肺结核免

疫反应中起重要的防御作用,而CCL3、CCL4、CXCL2在重症继发性肺结核患者表达下调,可能参与了免疫病理过程,本研究进一步用分子生物学技术对其表达进行了验证,旨在为深入研究重症继发性肺结核免疫病理机制做初步探索。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 对象 肺结核的诊断按照中华医学会《临床诊疗指南》(结核病分册)^[1]。重症肺结核的定义包括各

作者简介:苏瑾文(1971~),女,在读博士,主治医师,研究方向:结核危重病人感染与免疫。

*通讯作者:程小星, E-mail:xc36cn@163.com

型血型播散性肺结核及3个肺野以上的继发性肺结核^[2],血型播散性肺结核虽然病情重但对肺结构破坏小,本研究只选择重症继发性肺结核患者。病例来自解放军309医院结核病研究所2012年4月至2013年10月确诊继发性肺结核的患者80例,其中重症40例,男性22例,女性18例,平均(35.9±14.2)岁;轻症40例,男性21例,女性19例,平均(35.5±13.8)岁,既往无基础疾病。同时健康对照28例,来自解放军309医院健康查体中健康者。其中男性16例,女性12例,平均(34.6±12.5)岁。比较重症、轻症和健康对照组间的性别、年龄均衡(性别 $\chi^2=0.146$, $P>0.05$;年龄 $F=2.280$, $P>0.05$)。分组标准参照文献^[3-4],根据影像学检查确定结核病灶范围并分组:轻症,在两个肺野以下,病灶点状或索条状,且无空洞形成者。重症,病灶范围在三个肺野以上,病灶斑片状并伴有坏死、空洞、实变等病变。排除标准:①使用免疫调节剂者(含免疫抑制剂和免疫增强剂);②有合并症;③合并结核性胸膜炎和肺外结核;④病变范围两个肺野以下有空洞者及三个肺野以上无空洞、坏死、实变者。

1.1.2 仪器与试剂 实时荧光定量PCR仪(BIO-RAD IQ5);金属恒温振荡器(MS-100);PCR仪(TC3000 FTC3/02,TECHNE);CO₂温箱(MCO-15AC,日本三洋)。淋巴细胞分离液Ficoll(17-1440-02,GE);1640培养基(22400-089, Gibco);Trizol(15596018, Invitrogen);DEPC水(AM9937, ambin);试剂盒:TaKaRa PrimeScript™ RT reagent kit[RR037A, 宝生物工程(大连)有限公司];Kapa Sybr Fast qPCR kit (KM4105, Kapa Biosystems)

1.2 方法

1.2.1 基因表达谱芯片检测 前期实验另收集重症4例,轻症3例,健康人5例外周血4mL,用Ficoll淋巴细胞分离液在离心速度1 000g、25℃、20min条件下,提取外周血单个核细胞,再用1640完全培养基350g、7min和300g、5min洗涤细胞,然后加Trizol裂解,细胞裂解产物送北京博奥生物有限公司做RNA质检,样本合格后用Affymetrix基因表达谱芯片做全基因组检测,芯片主要步骤包括靶标制备,芯片杂交,芯片染色、清洗和扫描。对检测结果进行分组比较筛选差异表达基因,并对差异表达基因进一步做GO分析和Pathway分析。

1.2.2 实时荧光定量PCR(RT-PCR)引物 芯片中筛选出重症与轻症继发性肺结核相比CCL3下调6.53倍(fold change 0.1531),CCL4下调8.15倍(fold change 0.1227),CXCL2下调3.27倍(fold change 0.3058),用RT-PCR进行验证。通过在线引物设计软

件Primer-BLAST设计引物:

CCL3-F,5'-ATCATGCAGGTCTCCACTGC-3';

CCL3-R,5'-CTGGCTGCTCGTCTCAAAGT-3';

CCL4-F,5'-CCGCCTGCTGCTTTTCTTAC-3';

CCL4-R,5'-CACTGGGATCAGCACAGACT-3';

CXCL2-F,5'-CTGCTGCTCCTGCTCCTG-3';

CXCL2-R,5'-GGGGGACTTCACCTTCACAC-3'。

各引物碱基数除CXCL2-F为18个,其余均为20个。内参基因GAPDH。引物和内参基因由上海生工生物公司合成,采用PAGE纯化。

1.2.3 RT-PCR RT-PCR过程:①提取重症、轻症病例各40例和健康人28例外周血单个核细胞(方法同前),用Trizol裂解后,依次加入氯仿、异丙醇、乙醇从细胞裂解产物中提取RNA。②反转录。在冰上配制反转录体系(参照试剂盒说明书):5×buffer 2μL; Enzyme 0.5μL; Oligo dT 0.5μL; Random6 0.5μL; Total RNA;加ddH₂O补充到10μL。PCR仪设定反应条件:37℃,15min;85℃,5sec,RNA反转录成cDNA。产物放置-20℃保存。③以cDNA为模板,使用BIO-RAD IQ5荧光定量PCR仪进行扩增。在冰上配制扩增体系(参照SYBR Green Realtime PCR master mix说明书):SuperReal Premix(SYBR Green) 10μL; Forward Primer 0.4 μL; Reverse primer 0.4 μL; cDNA(template) 2 μL; RNase ddH₂O 7.2 μL,总量为20 μL。设定反应条件:第一步95℃3min;第二步95℃3sec,60℃20sec,进行基因扩增。通过RT-PCR测定基因的相对表达量。先测定溶解曲线验证引物扩增的特异性,单一峰即认为有特异扩增。其次绘制标准曲线,计算扩增效率。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算相对表达量,以内参基因作为标准,当目标基因和参照基因有相同扩增效率时, $\Delta Ct_{\text{目标基因}} = Ct_{\text{目标基因}} - Ct_{\text{内参基因}}$,相对表达量 $= 2^{-\Delta\Delta Ct}$

1.3 统计学分析 采用GraphPad prism5统计软件对数据做统计分析,组间比较用方差分析方法和非参数检验判断各目的基因在重症、轻症继发性肺结核患者与健康组之间表达差异的统计学显著性。

2 结果

2.1 基因表达谱芯片检测结果 Affymetrix表达谱芯片共检测38 500个基因/47 000个转录本,按照轻症vs健康,重症vs健康,重症vs轻症分组比较筛选的差异基因数分别为12、668、406条。用散点图表示两组样品比较分析结果,可较直观地看出在两组间基因表达的差异情况。散点图显示,轻症患者对比健康人(图1)差异表达基因数量明显少于重症继发性肺结核患者对比健康人(图2)及轻症患者(图3),轻症对比健康组因差异基因数量过少而在散点图上未能显

示出。对重症继发性肺结核患者差异表达基因进一步做GO分析和pathway分析,差异基因参与的pathway数在各组分别为11、414、217,在KEGG中查询到的信号通路主要有炎症反应和免疫反应相关通路。基因表达谱的检测和分析结果与重症继发性肺结核患者临床表现和病情严重程度相符合。其中趋化因

子CCL3、CCL4、CXCL2在重症vs轻症组表达下调,提示这些因子可能参与了重症病例病变的发展。

2.2 提取RNA电泳结果 28S和18S rRNA条带清晰,无明显降解,显示RNA提取质量良好。见图4。图4中1、2、3电泳道分别代表CCL3、CCL4、CXCL2的RNA电泳。

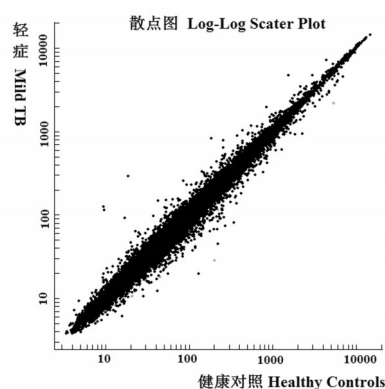


图1 轻症组与健康组比较

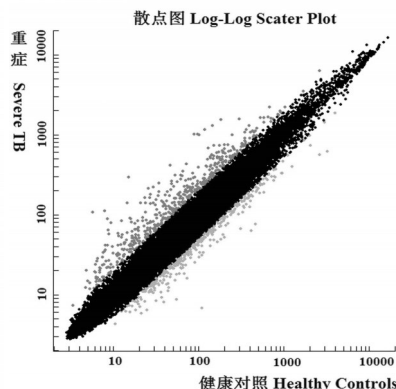


图2 重症组与健康组比较

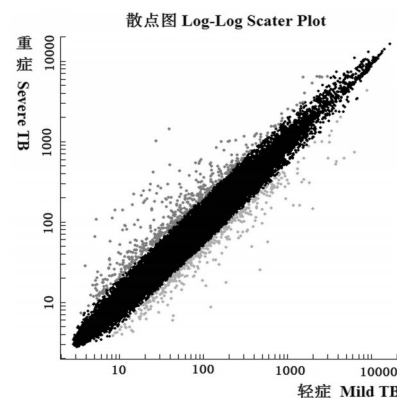


图3 重症组与轻症组比较

Fig.1 Mild TB group vs healthy control group Fig.2 Severe TB group vs healthy control group Fig.3 Severe TB group vs mild TB group

注:散点图X轴和Y轴分别以两个样品的荧光强度信号值为坐标,图中每一个数据点代表芯片上一个基因点的杂交信号,红色和绿色标记的数据点分别表示B/A的Ratio值 ≥ 2 和 ≤ 0.5 ,属于表达有差异的基因,黑色标记表示B/A的Ratio值在0.5和2之间,表达基本无差异。

Note :The X axis and Y axis represent the fluorescence intensity signal values. Every data point in the diagram denote one gene signal of hybridization. The red and green data point denote that the ratio of B/A ≥ 2 or ≤ 0.5 respectively. It means the gene was differently expressed. While black data point denote that the ratio of B/A was from 0.5 to 2. It means there were no expression differences between groups.

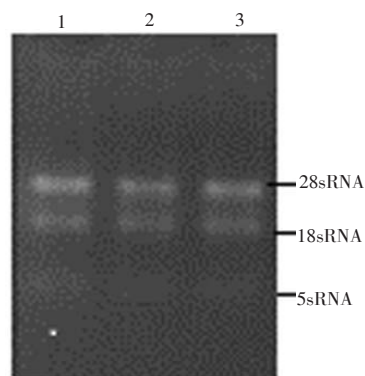


图4 验证基因的RNA电泳

Fig.4 RNA electrophoresis for the gene of verification

2.3 RT-PCR结果 对验证基因用RT-PCR扩增,三个基因的熔解曲线为单一峰,熔解温度分别为CCL3 55.8 $^{\circ}$ C, CCL4 58.9 $^{\circ}$ C, CXCL2 55 $^{\circ}$ C,说明各引物都得到特异性扩增。图5~7显示重症、轻症病例和健康人各基因经RT-PCR扩增后相对表达量的比较。

本实验先用内参基因和代表基因绘制标准曲线,内参基因曲线方程: $Y = -3.584X + 30.492$, $R^2 = 0.9971$; 代表基因曲线方程: $Y = -3.581 + 37.693$, $R^2 = 0.9918$ 。反应效率E与标准曲线斜率的关系为 $E = 10^{-1/\text{斜率}}$, RT-PCR每个指数扩增循环中,PCR产物2倍增加,反应效率为 $2 = 10^{-1/\text{斜率}}$ 。扩增效率用百分率表示:扩增效率

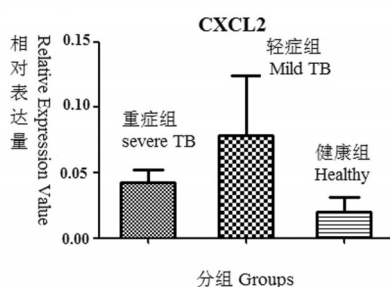


图5 CXCL2在各组表达水平

Fig.5 The expression level of CXCL2 by RT-PCR among three groups

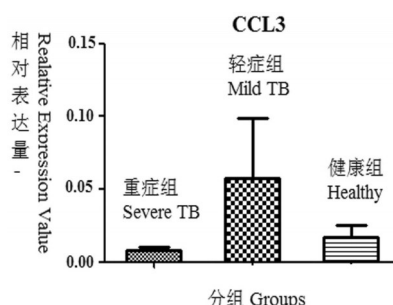


图6 CCL3在各组表达水平

Fig.6 The expression level of CCL3 by RT-PCR among three groups

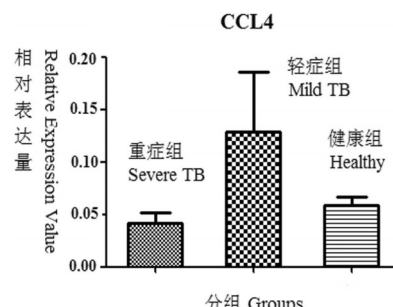


图7 CCL4在各组表达水平

Fig.7 The expression level of CCL4 by RT-PCR among three groups

= $(E-1) \times 100\%$ 。通过曲线斜率计算扩增效率二者均为90%,达到扩增效率在90%~105%的要求,说明反应条件的优化、重复性好。在本实验扩增体系中每一次循环,产物1.90倍扩增,因此相对表达量为 $1.90^{-\Delta ct}$ 。

各基因扩增后计算相对表达量比较显示CCL3在重症与轻症表达下调($P<0.05$),重症与健康有下调趋势,轻症与健康表达上调($P<0.05$);CCL4在组间比较虽无统计学差异但重症与轻症、重症与健康有下调表达趋势,CXCL2在重症与轻症有下调趋势,相对于健康人有轻度上调($P<0.05$)。验证结果显示各基因在重症与轻症下调与芯片结果相符,见表1。

表1 RT-PCR表达水平在组间比较的P值
Table 1 Comparison of the P value among three groups for gene expression level by RT-PCR

基因名称 Gene symbol	P值 P value		
	重症与轻症 Severe vs mild TB	重症与健康对照 Severe TB vs healthy controls	轻症与健康对照 Mild TB vs healthy controls
CCL3	0.0443	0.3494	0.0445
CCL4	0.0867	0.1367	1.0000
CXCL2	0.3020	0.0109	0.4295

3 讨论

继发性肺结核包括浸润性、纤维空洞及干酪性肺炎等,重症病例可对肺结构的完整性造成严重破坏,甚至毁损肺,预后不良^[5]。而轻症病例肺结构无严重破坏,预后相对较好。重症与轻症病变严重程度不同与很多因素有关,如病程长短、基础疾病、营养状况、治疗依从性、耐药菌株感染、社会经济因素等,但也有研究显示与遗传因素有重要相关性^[6]。本研究通过表达谱芯片做重症和轻症病例、健康人差异基因筛选,以期发现重症继发性肺结核患者病变严重性在基因水平的可能机制。结果显示重症病例有大量差异基因表达,其中一些为免疫相关基因,信号通路分析显示差异基因主要涉及炎症反应和免疫反应通路,说明重症病例存在异常的炎症反应和免疫反应,可能是其病变进展严重的分子机制。

CCL3、CCL4、CXCL2等趋化因子基因在表达谱中显示重症比对轻症表达下调,进一步验证其表达对本研究的深入有一定指导意义。各组验证样本入选40例,入选标准与芯片检测时一致,有一定代表性。RT-PCR方法验证各因子在重症、轻症病例与健康人的表达丰度结果显示其表达量在组间比较有统计学差异或有下调趋势,有下调趋势的基因可能随样本量增加会显示出统计学差异来,因此上述基因均表现为

重症相对于轻症病例表达下调。

CCL3、CCL4、CXCL2分别属于趋化因子CC和CXC家族,趋化因子在抗结核免疫中有重要作用,尤其是参与了募集免疫细胞迁移到结核菌感染部位形成结核肉芽肿的过程^[7],从而可以限制结核分枝杆菌生长和扩散^[8]。CCL3、CCL4分别被称为巨噬细胞炎症蛋白MIP-1 α 和MIP-1 β ,可趋化单核细胞、T细胞、树突状细胞和NK细胞。CXCL2也称为巨噬细胞炎症蛋白2- α (MIP2- α),可趋化激活中性粒细胞,刺激血管生成^[9]。在感染性疾病中趋化因子会分泌增加,是病原体和宿主免疫细胞相互作用的结果^[10]。同样在结核菌感染后中性粒细胞^[11]、巨噬细胞表达CCL3和CCL4增加^[12]。但Shibali Das^[12]的研究中发现CCL3和CCL4的受体CCR5也表达上调却激活下游信号通路,使抑制性因子IL-10产生增加,反而有助于结核菌逃逸,因此CCL3和CCL4上调表达对机体有利同时,也促进了疾病的发展^[13]。另外CXCL2表达上调,和CCL3、CCL4等因子的高表达共同反应了结核病情的进展^[14],并且CXCL2也募集炎症细胞参与了肉芽肿的形成和肺纤维化的发展^[15]。

研究结果显示重症患者CCL3、CCL4、CXCL2表达降低,提示这些趋化因子参与的抗结核反应能力下降,肉芽肿不能很好形成,而干酪样坏死、空洞形成发展更为严重。动物实验^[16]显示在结核肉芽肿干酪样坏死中心新生血管明显减少,周围细胞有严重低氧迹象,与趋化因子如CXCL2、CCL3、CCL4低表达有关,提示肉芽肿内新血管生成受损是肉芽肿中心干酪样坏死的可能原因。该研究中CXCL2是作为血管生成因子在结核肉芽肿中发挥了作用。本研究CCL3、CCL4、CXCL2等表达下调,与文献报道相符,进一步说明其低表达可能与肺结核病变的进展和加重有关。因此认为重症病例发展至病变严重阶段出现了免疫功能抑制,使得趋化因子表达下调,不能使感染和炎症局限,导致其免疫病理更为严重。

综上所述,本研究发现并验证了趋化因子CCL3、CCL4、CXCL2在重症比轻症患者表达下调,分析其与重症肺结核病理损伤严重程度有一定关系,但在免疫病理过程中这些趋化因子参与的分子机制尚不十分明确,有待深入研究。

参考文献

[1] 中华医学会. 临床诊疗手册(结核病分册)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 7-10.
[2] 刘同伦. 实用结核病学[M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 1987: 284-289.
[3] Dlugocitzky D, Bay ML, Ratani L, et al. Influence of disease severity on