

· 论 著 ·

转录因子 Blimp1 在结核病患者外周血单个核细胞中的表达研究*

章明徐, 陈婉燕, 谢小红, 张校康, 李发科, 陈 鸣, 邓少丽[△]

(第三军医大学大坪医院野战外科研究所检验科, 重庆 400042)

摘要:目的 检测转录因子 Blimp1 在潜伏期、活动期结核病患者及健康者中的表达差异, 评估其作为新型结核病诊断因子的可能性。方法 选取 60 例活动期结核病患者(活动期组)、50 例潜伏期结核病患者(潜伏期组)和 50 例健康体检者(对照组)作为研究对象, 利用荧光定量 PCR 方法分别测定 3 组研究对象外周血单个核细胞中 Blimp1 mRNA 的表达情况。结果 活动期组 Blimp1 mRNA 的表达量是对照组的 15.35 倍, 是潜伏期组的 2.21 倍, 组间差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 Blimp1 参与抗结核免疫, 有助于区分活动性肺结核和健康人群, 为结核病的发病机制提供新的实验依据, 从而进一步为结核病的早期诊断和治疗提供新的方向。

关键词: 转录因子; 结核, 肺; 基因表达

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.09.002

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2014)09-1029-02

The expression of Blimp1 mRNA in peripheral blood mononuclear cells of tuberculosis patients*

Zhang Mingxu, Chen Wanyan, Xie Xiaohong, Zhang Xiaokang, Li Fake, Chen Ming, Deng Shaoli[△]

(Department of Clinical Laboratory, Daping Hospital, Research Institute of Field Surgery, the Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To analyze Blimp1 expression difference in the latent and active of tuberculosis patients and the healthy, and assess possibility of as the new tuberculosis diagnostics molecules. **Methods** 60 patients with active TB(active tuberculosis group), 50 participants with latent(latent tuberculosis group), and 50 healthy people(control group) were enrolled separately. Using fluorescence quantitative polymerase chain reaction were used to determin Blimp1 mRNA expression in the peripheral blood mononuclear cells. **Results** Blimp1 mRNA expression level of the active tuberculosis group was 15.35 times than the control group, and 2.21 times than the latent tuberculosis group, the difference was statistically significant($P < 0.05$). **Conclusion** Blimp1 gene probably plays a role in the immune response to tuberculosis, it provides new ideas for the laboratory diagnosis of tuberculosis and new clues for further exploring the pathogenesis mechanism of tuberculosis.

Key words: transcription factors; tuberculosis, pulmonary; gene expression

结核病的控制一直以来备受关注, 全世界每年新增结核病 1 000 万左右, 而在我国每年新增病例 100 万左右, 是我国重点控制的重大疾病之一。传统观念认为在结核免疫机制中发挥主要作用的是细胞免疫^[1], 近年来, 体液免疫在结核发病机制中的作用越来越受到关注。目前已发现的调控体液免疫过程的转录因子主要有 BCL6、Blimp1、IRF4、MITF、MTA3、PAX5 和 XBP-1 等, 其中 Blimp1 是 1991 年发现的由 prdm1 基因编码的蛋白, 是浆细胞分化的主调控子^[2-3]。有研究表明, Blimp1 不仅可以调控 B 细胞和浆细胞的分化发育, 还可参与调控免疫系统中髓系细胞、自然杀伤细胞和巨噬细胞的发育与功能。近期研究发现, Blimp1 对 T 细胞的增殖分化和免疫自稳亦发挥着至关重要的作用^[4-6]。那么, 在机体的抗结核免疫反应中, Blimp1 是否会参与其中? 本研究拟通过分析结核病患者与健康体检者外周血单个核细胞中 Blimp1 mRNA 的表达情况, 探讨 Blimp1 是否参与到机体抗结核免疫反应过程中, 为进一步阐明结核发病机制、结核杆菌免疫清除及结核病诊断新分子提供实验依据, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2012 年 2 月至 2013 年 5 月来本院就诊的结核患者 110 例, 根据病史、实验室检查将其分为活动期组

(60 例)和潜伏期组(50 例)。活动期组男 34 例, 女 26 例, 年龄 13~65 岁, 平均(34.0±5.6)岁; 潜伏期组男 31 例, 女 19 例, 年龄 13~65 岁, 平均(34.0±6.4)岁。上述患者诊断均符合中华医学会结核病分会制定的肺结核诊断和治疗指南中的诊断标准^[7]。同时排除肝、肾功能障碍患者, 全身免疫性疾病患者, 应用糖皮质激素类药物或免疫抑制剂患者。选择同期到本院的 50 例健康体检者为对照组, 排除吸烟、酗酒者, 结核菌素试验均为阴性, 其中男 23 例, 女 27 例, 年龄 16~78 岁, 平均(35.0±6.8)岁。

1.2 主要试剂与仪器 Ficoll 细胞分离液购自 GE 公司, 磷酸盐缓冲液(PBS)购自北京中衫公司, Trizol 购自 Invitrogen 公司, 焦碳酸乙二酯原液购自 Sigma 试剂公司, 无核酸酶双蒸水购自美国 Promega 公司, 75%乙醇、异丙醇和氯仿购自重庆川东公司。荧光定量 PCR 试剂盒、Taq 聚合酶购自美国 Promega 公司, PCR MIX 混合液购自杭州博日科技有限公司, 引物和探针在上海生工生物工程有限公司合成。美国 CFX-96 Bio-Rad 荧光定量 PCR 仪, 美国 ND-1000 紫外分光光度计。

1.3 方法

1.3.1 分离外周血单个核细胞与提取总 RNA 抽取结核病患者及健康体检者的乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝静脉血 2

mL,取 EDTA 抗凝血 1 mL,加至 1 mL Ficoll 细胞分离液表面,常温下 2 000 r/min 离心 20 min,用毛细吸管将标本中的单个核细胞分离出来,收集并用 1% PBS 洗涤,常温下 2 500 r/min 离心 10 min,去上清液留单个核细胞于管底。然后使用 Trizol 将细胞破裂,利用三氯甲烷、异丙醇和 75% 乙醇萃取、沉淀的原理,提取出细胞中的 RNA。再将 RNA 溶解在无核酸酶水中,利用 ND-1000 紫外分光光度计定量检测 RNA 的质量和水平。

1.3.2 将 RNA 逆转录为 cDNA 根据荧光定量 PCR 试剂盒说明书取 1 mg 的 RNA 进行逆转录,42 °C 孵育 40 min 得到 cDNA,-20 °C 冻存备用。

1.3.3 荧光定量 PCR 检测 对上述逆转录后得到的 cDNA 进行荧光定量 PCR 反应,引物设计如下: Blimp1 上游 5'-TCC AGC ACT GTG AGG TTT CA-3', Blimp1 下游 5'-TCA AAC TCA GCC TCT GTC CA-3'。荧光探针, Blimp1 FAM-5'-ATG GAC ATG GAG GAT GCG GAT ATG-3'。内参: B₂M 上游 5'-TCC ATC CGA CAT TGA AGT TGA C-3', B₂M 下游 5'-ACT ATC TTG GGC TGT GAC AAA G-3', B₂M 探针 FAM-5'-TGG TTC ACA CGG CAG GCA TAC TCA-3'。荧光定量 PCR 反应条件: 95 °C 3 min; 95 °C 10 s, 55 °C 30 s, 40 个循环。根据荧光定量 PCR 仪得出的结果,计算活动期组、潜伏期组和对照组中每例标本的靶基因 Blimp1 和相应内参基因 B₂M 的 ct 值差值 Δct ,并计算活动期组、潜伏期组的 $\overline{\Delta ct}$ 和对照组 $\overline{\Delta ct}$,利用相对定量 $2^{-\Delta\Delta ct}$ 法 ($-\Delta\Delta ct = \text{活动期组}/\text{潜伏期组} \overline{\Delta ct} - \text{对照组} \overline{\Delta ct}$) 计算活动期组、潜伏期组和对照组之间 Blimp1 mRNA 表达的差异。

1.4 统计学处理 利用 Graphpad Prism 软件将对照组、活动期组及潜伏期组的 ct 值和 Δct 值绘图分析。采用 SPSS17.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验进行两组间差异比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。*t* 检验以 Δct 均值计算 $\Delta\Delta ct$,并利用相对定量 $2^{-\Delta\Delta ct}$ 法计算 Blimp1 基因表达差异倍数。

2 结 果

2.1 外周血单个核细胞 RNA 质量及扩增特异性 所有样本提取总 RNA 水平均不小于 300 ng/ μ L,吸光度 260/280 均在 1.75~1.95,提示总 RNA 质量较好。靶基因 Blimp1 和内参基因 B₂M mRNA 扩增曲线见图 1,溶解曲线见图 2。

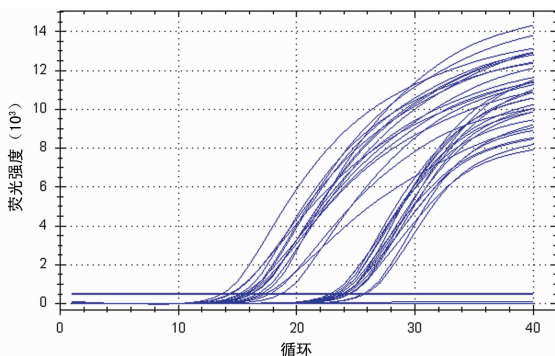
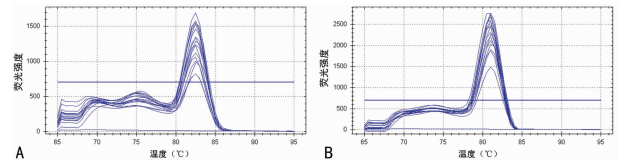


图 1 荧光定量 PCR 扩增曲线

2.2 Blimp1 mRNA 在 3 组中表达的差异 活动期组、潜伏期组和对照组 Blimp1 和 B₂M 基因的 Δct 值均呈正态分布。活动期组 Blimp1 相对于 B₂M 的平均 Δct 值为 5.36 ± 2.45 ,潜伏期组相对于 B₂M 的平均 Δct 值为 2.40 ± 1.86 ,对照组 Blimp1 相对于 B₂M 的平均 Δct 值为 1.44 ± 0.80 ,活动期组、潜伏期

组与对照组之间平均 Δct 值的差异有统计学意义 ($P = 0.000$),见表 1。通过相对定量 $2^{-\Delta\Delta ct}$ 法计算,活动期组的 Blimp1 mRNA 水平是对照组的 15.35 倍,潜伏期组的 Blimp1 mRNA 水平是对照组的 2.21 倍,且组间 Blimp1 mRNA 表达比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。



A: 靶基因 Blimp1 荧光定量 PCR 溶解曲线; B: 内参基因 B₂M 溶解曲线。

图 2 溶解曲线

表 1 各组间 Blimp1 mRNA 相对定量表达差异

组别	<i>n</i>	$\Delta ct(\bar{x} \pm s)$	$\Delta\Delta ct$	$2^{-\Delta\Delta ct}$
活动期组	60	5.38 ± 2.45	3.94	15.35 ^{ab}
潜伏期组	50	2.40 ± 1.86	0.96	2.21 ^a
对照组	19	1.44 ± 0.80	—	—

^a: $P < 0.05$,与对照组比较; ^b: $P < 0.05$,与潜伏期组比较; —: 此项无数据。

3 讨 论

机体对结核杆菌的免疫反应相当复杂,大体上可分为固有免疫和适应性免疫。固有免疫主要包括被激活的巨噬细胞和致敏的 T 淋巴细胞;适应性免疫主要依赖于特异性的细胞免疫,包括抗原递呈与 T 细胞的识别、活化、应答几个阶段。虽然细胞免疫在结核免疫反应中发挥着重要作用,但近年来体液免疫在结核病发病机制中的作用也引起了一定关注,研究提示细胞免疫与体液免疫在结核病发展过程中的作用是相辅相成、缺一不可的^[1-2]。

调控体液免疫过程的转录因子 Blimp1 可以靶向结合多种基因,通过招募包括组蛋白去乙酰化酶和甲基转移酶在内的染色体修饰酶到特定核酸序列如启动子序列,来抑制靶基因的表达,起着转录抑制因子的作用^[7-8]。Blimp1 蛋白是促进成熟 B 淋巴细胞向浆细胞终末分化的主调控因子^[9],它可抑制与 B 淋巴细胞增殖有关的一系列基因的表达,如 BCL6、PAX5、C-MYC、C/TA、Id 等,促进 B 淋巴细胞向浆细胞分化。Blimp1 蛋白还可以诱导成熟浆细胞分泌抗体,是维持骨髓中长寿浆细胞所必需的转录因子。Blimp1 功能不仅局限于 B 细胞和浆细胞,还可参与调控免疫系统中髓系细胞、自然杀伤细胞和巨噬细胞的发育与功能。此外, Blimp1 对 T 细胞的增殖分化和免疫自稳亦发挥着至关重要的作用, Blimp1 在 Th2 细胞中表达高于 Th1 细胞,而且缺乏 Blimp1 的 CD4⁺ T 细胞将表现出受损的 Th2 体液反应效应,说明 Blimp1 对 Th2 细胞的分化及功能的必要性。而且,在 Blimp1 缺失的两个动物模型中,也发现受抗原刺激后 CD4⁺ T 细胞和 Th1 细胞均表现出更强的抗凋亡能力^[10-11],说明 Blimp1 的正常功能之一就是促进效应 T 细胞的凋亡。

那么,在结核发病及机体抗结核免疫反应过程中, Blimp1 是否会参与其中? 本研究发现在活动期组血液中 Blimp1 mRNA 的表达水平为对照组的 15.35 倍,是潜伏期组结核患者的 2.21 倍,初步说明 Blimp1 参与到机体抗结核的免疫反应中。Blimp1 有可能作为诊断结核的新指标,(下转第 1033 页)

参考文献:

- [1] Emilia G, Luppi M, Zucchini P, et al. Helicobacter pylori infection and chronic immune thrombocytopenic purpura: long-term results of bacterium eradication and association with bacterium virulence profiles [J]. *Blood*, 2007, 110(12):3833-3841.
- [2] 李晓丽, 林锐, 张江安. 幽门螺杆菌感染与慢性荨麻疹间关系的临床观察[J]. *中国皮肤性病学杂志*, 2011, 25(4): 280-281.
- [3] 杨杰, 周力. 根除幽门螺杆菌与非口源性口臭的关系[J]. *贵阳医学院学报*, 2009, 34(5): 578-579.
- [4] 李彩丽, 左学兰. 幽门螺杆菌感染与缺铁性贫血的临床分析[J]. *临床血液学杂志*, 2006, 19(3): 150-152.
- [5] Cohen D, Shoham O, Orr N, et al. An inverse and Independent association between Helicobacter pylori infection and the incidence of shigellosis and other diarrheal diseases[J]. *Clin Infect Dis*, 2012, 54(4): e35-e42.
- [6] Luther J, Dave M, Higgins PD, et al. Association between Helicobacter pylori infection and inflammatory bowel disease: a meta-analysis and systematic review of the literature[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2010, 16(6): 1077-1084.
- [7] Su YC, Wang WM, Wang SY, et al. The association between Helicobacter pylori infection and functional dyspepsia in patients with irritable bowel syndrome[J]. *Am J Gastroenterol*, 2000, 95(8): 1900-1905.
- [8] 何慧敏, 陈光榆, 张敏红, 等. 肠易激综合征与幽门螺杆菌感染的关系[J]. *上海交通大学学报: 医学版*, 2009, 29(4): 389-390.
- [9] 于大海, 李奎栋, 高乃复. 腹泻型肠易激综合征与幽门螺杆菌感染的相关性研究[J]. *实用医技杂志*, 2006, 13(4): 653-655.
- [10] Kawamura A, Adachi K, Takashima T, et al. Prevalence of irritable bowel syndrome and its relationship with Helicobacter pylori infection in a Japanese population [J]. *Am J Gastroenterol*, 2001, 96(6): 1946.
- [11] 袁正平. 根除幽门螺杆菌治疗在肠易激综合征中的临床效果观察[J]. *中外医学研究*, 2011, 9(31): 104-105.
- [12] 吴波, 郑长青. 幽门螺杆菌、胃肠激素与糖尿病胃轻瘫的关系[J]. *世界华人消化杂志*, 2010, 18(15): 1616-1619.
- [13] 崔振芹. Hp 感染对肠易激综合征患者胃肠激素的影响—附 76 例报告[J]. *新医学*, 2009, 40(4): 239-240.
- [14] Bercik P, De Giorgio R, Blennerhassett P, et al. Immune-mediated neural dysfunction in a murine model of chronic Helicobacter pylori infection[J]. *Gastroenterology*, 2002, 123(4): 1205-1215.
- [15] Dahlqvist G, Piessevaux H. Irritable bowel syndrome; the role of the intestinal microbiota, pathogenesis and therapeutic targets[J]. *Acta Gastroenterol Belg*, 2011, 74(3): 375-380.
- [16] Pimentel M, Morales W, Chua K, et al. Effects of rifaximin treatment and retreatment in nonconstipated IBS subjects[J]. *Dig Dis Sci*, 2011, 56(7): 2067-2072.
- [17] Fan YJ, Chen SJ, Yu YC, et al. A probiotic treatment containing Lactobacillus, Bifidobacterium and Enterococcus improves IBS symptoms in an open label trial[J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2006, 7(12): 987-991.
- [18] Ghoshal UC, Shukla R, Ghoshal U, et al. The gut microbiota and irritable bowel syndrome: friend or foe? [J]. *Int J Inflamm*, 2012, 2012: 151085.
- [19] Chassard C, Dapoigny M, Scott KP, et al. Functional dysbiosis within the gut microbiota of patients with constipated-irritable bowel syndrome[J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2012, 35(7): 828-838.

(收稿日期: 2013-10-08 修回日期: 2013-12-29)

(上接第 1030 页)

作为诊疗结核的新靶点。Blimp1 在机体抗结核免疫反应的具体机制还有待于进一步深入研究。

参考文献:

- [1] Philips JA, Ernst JD. Tuberculosis pathogenesis and immunity[J]. *Annu Rev Pathol*, 2012, 7: 353-384.
- [2] Cooper AM. Cell-mediated immune responses in tuberculosis[J]. *Annu Rev Immunol*, 2009, 27: 393-422.
- [3] Ordway D, Palanisamy G, Henao-Tamayo M, et al. The cellular immune response to Mycobacterium tuberculosis infection in the guinea pig[J]. *J Immunol*, 2007, 179(4): 2532-2541.
- [4] Martins G, Calame K. Regulation and functions of Blimp-1 in T and B lymphocytes[J]. *Annu Rev Immunol*, 2008, 26: 133-169.
- [5] Nutt SL, Kallies A, Belz GT. Blimp-1 connects the intrinsic and extrinsic regulation of T cell homeostasis[J]. *J Clin Immunol*, 2008, 28(2): 97-106.
- [6] Kallies A, Hawkins ED, Belz GT. Transcriptional repressor Blimp-1 is essential for T cell homeostasis and self-tolerance[J]. *Nat Immunol*, 2006, 7(5): 466-474.
- [7] 中华医学会结核病学分会. 肺结核诊断和治疗指南[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2001, 24(2): 70-74.
- [8] John SA, Garrett-Sinha LA. Blimp1: a conserved transcriptional repressor critical for differentiation of many tissues[J]. *Exp Cell Res*, 2009, 315(7): 1077-1084.
- [9] Shaffer AL, Lin KI, Kuo TC. Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program[J]. *Immunity*, 2002, 17(1): 51-62.
- [10] Martins GA, Cimmino L, Shapiro-Shelef M, et al. Transcriptional repressor Blimp-1 regulates T cell homeostasis and function[J]. *Nat Immunol*, 2006, 7(5): 457-465.
- [11] Cimmino L, Martins GA, Liao J, et al. Blimp-1 attenuates Th1 differentiation by repression of ifng, tbx21, and bcl6 gene expression[J]. *Immunol*, 2008, 181(4): 2338-2347.

(收稿日期: 2013-10-08 修回日期: 2013-12-10)