

结核感染患者外周血中性粒细胞自噬水平的研究

杜金艳,王 燕,张 燕,陈 敏,邓少丽,陈 鸣,唱 凯[△]

(陆军军医大学第三附属医院检验科,重庆 400042)

摘要:目的 探讨结核感染患者外周血中性粒细胞自噬水平。方法 根据结核病诊断标准,将患者分为健康对照组(16 例)和活动性结核组(24 例),收集患者外周血,采用流式细胞技术分别检测健康对照组和活动性结核组中性粒细胞和单个核细胞的自噬状态。分离外周血中性粒细胞,采用 Trizol 法提取总 RNA,经逆转录实时荧光定量 PCR,利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算 Beclin1 表达的相对定量。结果 活动性结核组与健康对照组年龄差异无统计学意义($P=0.1655$, $P>0.05$);活动性结核组男性比例(79.2%)明显高于健康对照组(37.5%)。活动性结核组中性粒细胞自噬水平显著低于健康对照组($P=0.0138$, $P<0.05$),而单个核细胞两组差异无统计学意义($P=0.7842$, $P>0.05$);活动性结核组中性粒细胞 Beclin1 $\Delta Ct=-1.254\pm 0.40$ 明显低于健康对照组 $\Delta Ct=-0.105\pm 0.48$,差异有统计学意义($P<0.001$)。结论 结核感染患者外周血中性粒细胞的自噬水平降低,且自噬相关基因 Beclin1 mRNA 的表达下调,中性粒细胞的自噬水平可能与结核病的发生、发展密切相关。

关键词:结核病; 中性粒细胞; 自噬水平; Beclin1; 逆转录-聚合酶链反应

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.03.019

中图法分类号:R446.6

文章编号:1673-4130(2019)03-0334-04

文献标识码:A

Study on the level of neutrophil autophagy in peripheral blood of patients with tuberculosis infection

DU Jinyan, WANG Yan, ZHANG Yan, CHEN Min, DENG Shaoli, CHEN Ming, CHANG Kai[△]

(Department of Clinical Laboratory, the Third Affiliated Hospital of the Army Medical University)

Abstract: **Objective** To investigate the autophagy level of peripheral blood neutrophils in patients with tuberculosis infection. **Methods** According to the standard for tuberculosis diagnosis, the subjects were divided into normal control group(16 cases) and active tuberculosis group(24 cases), and peripheral blood was collected. The autophagy of neutrophils and mononuclear cells of the two groups were detected by flow cytometry. The total RNA of neutrophils was extracted by Trizol and the relative quantification of Beclin1 expression was calculated by using $2^{-\Delta\Delta Ct}$ in real-time quantitative PCR. **Results** There was no significant difference in age between the active tuberculosis and normal control group ($P=0.1655$, $P>0.05$); the proportion of male in active tuberculosis group (79.2%) was significantly higher than that of normal control group (37.5%), and the difference was statistically significant ($P=0.0315$, $P<0.05$). The level of neutrophil autophagy in the active tuberculosis group was significantly lower than that of the normal control group ($P=0.0138$, $P<0.05$), and there was no difference of mononuclear cells between the two groups ($P=0.7842$, $P>0.05$); active tuberculosis group the mRNA expression of Beclin1 $\Delta Ct=-1.254\pm 0.40$ was lower than that of the normal control group $\Delta Ct=-0.10\pm 0.48$, the difference was statistically significant ($P<0.001$). **Conclusion** The incidence of active tuberculosis in male is higher than that of female; the autophagy level of neutrophils in peripheral blood of patients with tuberculosis infection decreased, and the decline of autophagy-related gene Beclin1 mRNA expression may be related to the occurrence and development of tuberculosis.

Key words: tuberculosis; neutrophils autophagy; Beclin1; reverse transcription-polymerase chain reaction

结核病作为当今世界重要的传染病之一,严重威胁人类健康。据统计,全球约 1/3 的人感染过结核分枝杆菌(MTB)^[1]。然而在众多的感染人群中,绝大多数并不表现出任何临床症状,仅有约 10% 的感染者会

在一生中的某个时间段发展成为结核病^[2]。

自噬,是将细胞内功能不全的细胞器和蛋白质运输到溶酶体进行降解的一种方式,同时也在免疫和炎症中起主要作用。当 MTB 入侵免疫细胞后会诱导抗

作者简介:杜金艳,女,检验技师,主要从事检验临床研究。 [△] 通信作者, E-mail: changkai0203@163.com。

本文引用格式:杜金艳,王燕,张燕,等. 结核感染患者外周血中性粒细胞自噬水平的研究[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(3): 334-337.

炎和(或)促炎细胞因子的释放,调节自噬相关蛋白的表达,抑制或诱导细胞自噬对 MTB 的清除。Beclin1 和微管相关蛋白轻链 3(MAPLC3)是编码自噬相关蛋白的重要基因,并且 LC3 是自噬体膜上的标记蛋白,长期稳定存在直至与溶酶体相结合,常作为自噬体的标记分子。研究发现,嗜中性粒细胞通过产生更高水平的活性氧(ROS),增加其吞噬体的 pH 值并引起结核分枝杆菌自噬,进而介导记忆性 CD8⁺ T 细胞的杀菌活性,表明嗜中性粒细胞在结核感染过程中发挥重要作用^[3-4]。目前关于中性粒细胞自噬水平在结核感染中的作用鲜有研究报道,且自噬相关基因 Beclin1 在中性粒细胞中所诱导的自噬是否参与人体对结核分枝杆菌的调控仍不清楚。据此,本研究从自噬这一细胞的自发性防御机制着手,通过分析结核感染患者外周血中中性粒细胞 LC3 及 Beclin1 mRNA 的表达情况,深入探究中性粒细胞在结核病的发病机制过程中的作用,为 MTB 的预防及治疗提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 依据肺结核诊断标准(WS288-2008),选择 2016 年 12 月至 2017 年 6 月在重庆市公共卫生医疗救治中心和陆军军医大学第三附属医院就诊的初治结核病患者,共 24 例,健康对照组选择在该区域中无血源关系的同期入院患者,无肺结核症状或体征,实验室及影像学检测均未提示为肺结核者,共 16 例。排除疾病情况:免疫抑制剂使用者、合并其他感染性疾病、自身免疫性疾病、肿瘤等疾病。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 分别抽取活动性结核组、健康对照组空腹外周血 3~5 mL 于 EDTA 抗凝管,3~6 h 内检测自噬水平后分离目的细胞提取总 RNA。

1.2.2 引物的查找与选择 通过查找 Beclin1 基因数据信息和文献,利用 Primer5.0 软件设计 PCR 扩增引物,如表 1,采用 GAPDH 基因作为内参基因。

表 1 PCR 引物及扩增片段

名称	序列
Human Beclin1 -F	5'>GCC TCC CTC GTT GAC TTT CA<3'
Huamn Beclin1 -R	5'>TCT CCA CAT ATG CCA GGG GA<3'
Huamn GAPDH -F	5'>GGA AGG TGA AGG TCG GAG TCA A<3'
Huamn GAPDH -R	5'>CTC GCT CCT GGA AGA TGG TGA T<3'

1.2.3 采用流式细胞术进行自噬水平检测 Flow CcollectTM Autophagy LC3 Antibody-based Assay Kit,自噬检测试剂盒购 Millipore 公司,仪器为 BEC-MAN,按试剂盒和仪器要求进行操作。

1.2.4 外周血中性粒细胞提取 细胞分离试剂购自 Thermo Fisher Scientific 公司,具体操作步骤如下:(1)取紫头管全血 1:1 加入 1640 培养基稀释,混匀

备用;(2)依次加入 75%Percoll、60%Percoll 各 4 mL 于 15 mL 离心管,加入时不能有任何上层液体冲入下层的情况;(3)将混匀的稀释血液加入最上层;(4)450 g 离心 20~25 min;(5)液体分 3 层,最上一层与中间层之间细胞多为淋巴细胞。最下层与中层细胞为中心粒^[5];(6)用滴管吸出目的细胞,加入新 15 mL 离心管,加 1640 培养基,补充至 14 mL;(7)450 g 离心 10 min,弃上清;(8)用 1 000 μL PBS 重悬;(9)转移至 1.5 mL EP 管,1 000 r/min,离心 5 min(4 ℃低温高速离心机),弃上清(瑞氏染色后显微镜计数,观察有无中性粒细胞,拍照保存);(10)加入 1 000 μL PBS,1 000 r/min,离心 5 min(4 ℃低温高速离心机),弃上清,加入 400 μL,按 1:3 加入 1 mL Trizol 溶液,反复震荡,做好标记,存放于-80 ℃超低温冰箱,待提取 RNA。

1.2.5 RNA 的提取及质量检测 取出保存样本室温解冻,提取总 RNA。在 ThermoND-1000 上进行 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 检测,选择 RNA 在 1.8~2.0 范围内的样品用于荧光定量 PCR 反应,剩余的 RNA 溶液于-80 ℃保存备用。

1.2.6 逆转录合成 cDNA 及荧光定量 PCR 试剂盒购自 Roche 公司,将模板 RNA 及相应试剂解冻,逆转录 PCR 仪为 ABI,程序为:(1)逆转录延伸:37 ℃,60 min;(2)灭活逆转录酶:85 ℃,5 min。取出产物,迅速置冰浴 5 min;2~8 ℃保存 1~2 h 或在 BIO-RAD (CFX-96)上立即进行荧光定量,扩增程序为:95 ℃,10 min;95 ℃(20 s)→60 ℃(20 s)→72 ℃(20 s)→40 个循环。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 进行数据处理;计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两两比较采用 *t* 检验;采用 GraphPad Prism 统计软件进行图像处理;计算 Beclin1 基因表达的相对倍数,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般临床资料 本次临床标本收集健康对照组样本 16 例,其中成年男性 6 例,平均年龄为(42.96±3.52)岁;成年女性 10 例,平均年龄为(49.40±5.33)岁;活动性结核组样本 24 例,其中成年男性 19 例,平均年龄为(42.96±3.52)岁;成年女性 5 例,平均年龄为(49.40±5.33)岁。活动性结核组与健康对照组相比,年龄差异无统计学意义(*P*=0.165 5,*P*>0.05);活动性结核组男性(79.2%)比例明显高于健康对照组(37.5%)。

2.2 自噬水平比较 采用流式细胞术对活动性结核组和健康对照组外周血中性粒细胞和单个核细胞的自噬水平进行检测,分析在单个核细胞、中性粒细胞中 LC3 的表达情况。活动性结核组单个核细胞自噬

水平与健康对照组相比,差异无统计学意义($P = 0.784\ 2, P > 0.05$);中性粒细胞自噬水平明显低于健康对照组,差异有统计学意义($P = 0.013\ 8, P < 0.05$),见图 1~6。

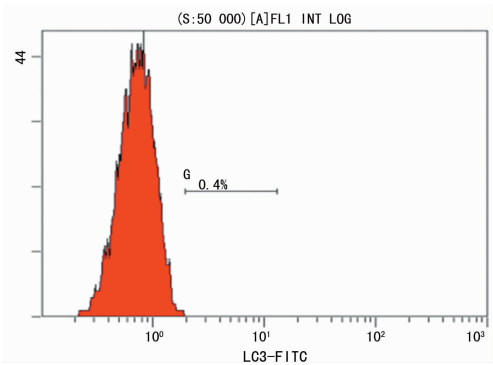


图 1 健康对照组单个核细胞自噬水平

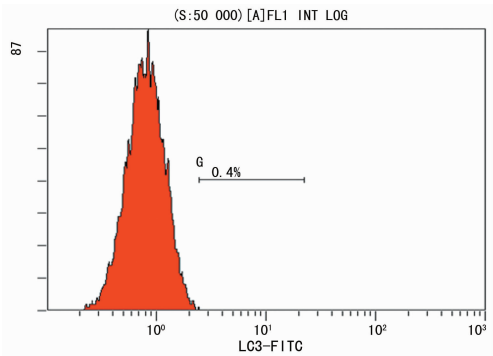


图 2 活动性结核组单个核细胞自噬水平

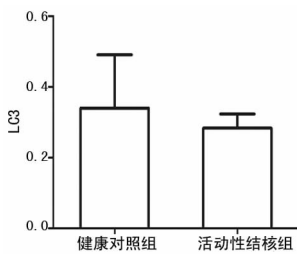


图 3 两组单个核细胞自噬水平比较

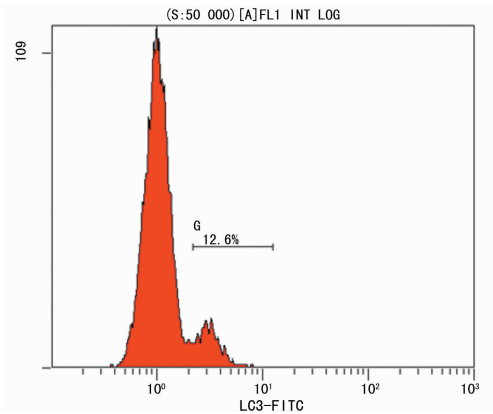


图 4 健康对照组中性粒细胞自噬水平

2.4 中性粒细胞 Beclin1 mRNA 的表达水平 采用实时荧光定量 PCR 对活动性结核组和健康对照组外周血中性粒细胞 Beclin1 mRNA 进行检测。以活动

性结核组结果为 1,发现活动性结核组中性粒细胞 Beclin1 mRNA 相对内参基因表达低于健康对照组(如图 7),差异有统计学意义($P < 0.001$)。

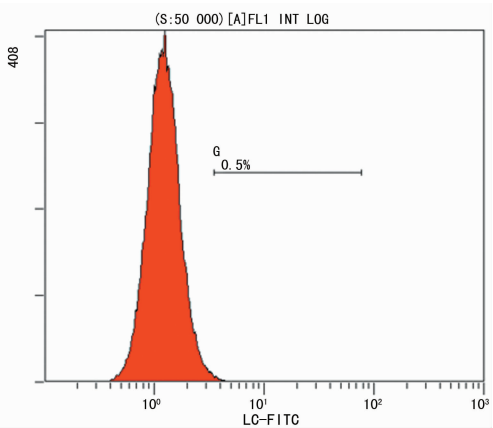


图 5 活动性结核组中性粒细胞自噬水平

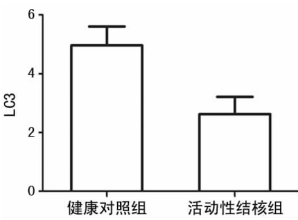


图 6 两组中性粒细胞自噬水平比较

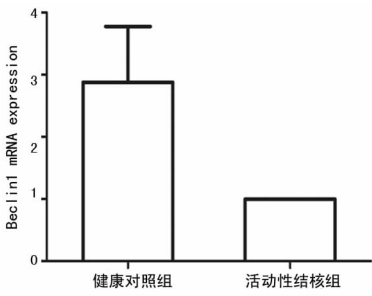


图 7 Beclin1 mRNA 相对表达情况

3 讨 论

自噬,在维持细胞内稳态以及物质的循环利用上具有重要作用。双层膜结构包被细胞质形成自噬小体,与溶酶体融合形成自噬溶酶体,将内容物进行降解,对细胞内外的细微变化能迅速做出反应,有利于细胞快速适应环境变化^[6-7],按照方式不同可分为大自噬、小自噬和分子伴侣介导的自噬。自噬是机体免疫非常重要的环节,它既可以直接杀灭 MTB,又可以为抗原提呈启动细胞免疫作准备^[8]。中性粒细胞,作为机体主要的免疫细胞之一,MTB 感染后,迅速从外周血迁移到感染灶,活化并吞噬 MTB,并通过 NADPH 氧化酶介导产生大量 ROS,对吞噬的 MTB 起到快速有效的杀灭作用,但同时也会促进中性粒细胞自身的坏死,造成 MTB 的免疫逃逸^[9]。

本研究发现,活动性结核组男性比例明显高于健康对照组,差异有统计学意义。在男性中,吸烟、饮酒

以及重体力劳动比例高于女性,以上危险因素可能降低机体免疫功能,显著增加男性结核病的发病风险^[10-11]。活动性结核组中性粒细胞自噬水平(LC3)及 Beclin1 基因表达明显低于健康对照组。LC3 是目前对自噬具有高度特异性的标志物,参与自噬体隔离膜的形成。MTB 感染免疫细胞后,LC3-1 型(胞质型)转变为 LC3-2 型(胞膜型),通过对其定位可反映细胞的自噬水平。Beclin1 基因是第一个被鉴定的自噬基因,是酵母自噬基因 ATG6 的同源物,是参与自噬调控的重要基因^[12]。结核病的发生是由 T 淋巴细胞介导的细胞免疫反应,体液免疫产生的抗体对其作用局限,故推测活动性结核组自噬水平的降低及 Beclin1 基因表达的下调与 MTB 感染及破坏机体免疫系统有关。但也有研究发现,Beclin1 蛋白可以激活 mTOR 蛋白,从而抑制细胞的自噬^[13]。

中性粒细胞具有吞噬并杀灭细胞内结核分支杆菌的作用,而且这种杀菌机制与 MTB 感染同 LC3 蛋白减少有关,从而推断中性粒细胞也直接参与抗结核分枝杆菌免疫。目前,关于 Beclin1 基因对中性粒细胞所诱导的自噬与 MTB 感染调控的研究较少,机制并不清楚,随着对自噬进一步的研究,可深入了解中性粒细胞自噬情况在结核病发生发展的具体过程,为结核病的治疗提供新的靶向治疗方案。

4 结 论

目前关于结核感染患者外周血中性粒细胞自噬水平在结核感染中报道较少,本研究从细胞自发性防御机制着手,分析中性粒细胞中自噬标志性蛋白 LC3 水平及相关基因 Becline 表达,发现结核感染患者外周血中性粒细胞自噬水平 LC3 降低,且 Becline 基因表达的下调,可能与结核病的发生发展有密切关系。

参考文献

[1] SUBBIAN S, O'BRIAN P, KUSHNER N L, et al. Molecular immunologic correlates of spontaneous latency in a rabbit model of pulmonary tuberculosis[J]. Ceil Commun Signal, 2013, 11(1): 1-16.

[2] 侯江厚, 李琦. 自噬在结核病免疫应答中的作用[J]. 结核病与胸部肿瘤, 2012(2): 137-140.

[3] DINESH K P, SUJATHA N. Cell death paradigms in the pathogenesis of Mycobacterium tuberculosis infection[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2014, 4(31): 1-7.

[4] XU G, WANG J, GAO G F, et al. Insights into battles between Mycobacterium tuberculosis and macrophages[J]. Protein Cell, 2014, 5(10): 728-736.

[5] 李金凤, 刘文礼, 史小娟, 等. 四种常用的人中性粒细胞分离方法的比较[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2008, 28(4): 277-281.

[6] WASAKI A, MEDZHITOV R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses[J]. Nature Immunol, 2004, 5(10): 987-995.

[7] NARNI-MANCINELLI E, SOUDJA S M, CROZAT K, et al. Inflammatory monocytes and neutrophils are licensed to kill during memory responses in vivo [J]. PLoS Pathog, 2011, 7(12): e1002457.

[8] GUTIERREZ M G, MASTER S S, SINGH S B, et al. Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and Mycobacterium tuberculosis survival in infected macrophages[J]. Cell, 2004, 119(6): 753-766.

[9] KINHIKAR A G, VERMA I, CHANDRA D, et al. Potential role for ESAT6 in dissemination of M. tuberculosis via human lung epithelial cells[J]. Mol Microbiol, 2010, 75(1): 92-106.

[10] 李蓓蕾, 纪云西. 自噬参与非酒精性脂肪肝的病理生理进展[J]. 广西中医药大学学报, 2016, 19(2): 98-100.

[11] MAGNUSON B, EKIM B, FINGAR D C. Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase(S6K) within II TOR signaling networks[J]. Biochem, 2012, 441(1): 1-21.

[12] WANG R C, WEI Y, AN Z, et al. Akt-mediated regulation of autophagy and tumorigenesis through Beclin 1 phosphorylation[J]. Science, 2012, 338(619): 956-959.

[13] DE SOUZA P S, DA CUNHA VASCONCELOS F, SILVA L F, et al. Cyclosporine enables vincristine-induced apoptosis during reversal of multidrug resistance phenotype in chronic myeloid leukemia cells[J]. Tumor, 2012, 33(4): 943-956.

(收稿日期: 2018-08-11 修回日期: 2018-10-22)