

PBC患者granulysin基因和蛋白的表达及临床意义

邓安梅, 钱琤, 姚定康, 陈燕, 陈波, 周晔, 谷明莉, 吴传勇, 蒋廷旺, 仲人前

邓安梅, 钱琤, 姚定康, 陈燕, 陈波, 周晔, 谷明莉, 吴传勇, 蒋廷旺, 仲人前, 第二军医大学附属长征医院实验诊断科、全军临床免疫中心上海市 200003
上海市重点科研支撑项目, No. 051409012
上海市重点基础研究项目, No. 05JC14052
通讯作者: 仲人前, 200003, 上海市凤阳路415号, 第二军医大学附属长征医院实验诊断科, rqzhong@yahoo.com
电话: 021-63610109-73631 传真: 021-33110236
收稿日期: 2006-05-31 接受日期: 2006-08-10

Expression of granulysin in patients with primary biliary cirrhosis and its clinical significance

An-Mei Deng, Cheng Qian, Ding-Kang Yao, Yan Chen, Bo Chen, Ye Zhou, Ming-Li Gu, Chuan-Yong Wu, Ting-Wang Jiang, Ren-Qian Zhong

An-Mei Deng, Cheng Qian, Ding-Kang Yao, Yan Chen, Bo Chen, Ye Zhou, Ming-Li Gu, Chuan-Yong Wu, Ting-Wang Jiang, Ren-Qian Zhong, Department of Laboratory Diagnosis, Changzheng Hospital Affiliated to the Second Military Medical University; Clinical Immunology Center of Chinese PLA, Shanghai 200003, China

Supported by the Key Sustaining Scientific Research Program of Shanghai Municipality, No. 051409012, and the Key Basic Research Foundation of Shanghai Municipality, No. 05JC14052

Correspondence to: Ren-Qian Zhong, Department of Laboratory Diagnosis, Changzheng Hospital Affiliated to the Second Military Medical University, 415 Fengyang Road, Shanghai 200003, China. rqzhong@yahoo.com
Received: 2006-05-31 Accepted: 2006-08-10

Abstract

AIM: To explore the serum expression of granulysin mRNA and protein in patients with primary biliary cirrhosis (PBC).

METHODS: Patients with PBC ($n = 60$), hepatitis B related cirrhosis ($n = 60$), and healthy controls ($n = 100$) were included in this study. Based on TaqMan fluorescent probe technique, real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed to detect the expression of granulysin mRNA, using 18S rRNA as the internal control. The level of granulysin protein was measured by immunohistochemistry.

RESULTS: The mean copy number of granulysin mRNA was significantly higher in PBC patients than that in healthy controls [(2.7 ± 2.5) × 10⁸ vs (3.0 ± 1.9) × 10⁷, $P < 0.01$] or patients with hepatitis B related cirrhosis [(2.7 ± 2.5) × 10⁸ vs (4.7 ± 3.6) × 10⁵, $P < 0.001$]. Meanwhile, the serum level of granulysin protein was also markedly higher in PBC patients than that in healthy controls (15.48 ± 3.24 μg/L vs 4.76 ± 2.32 μg/L) or patients with hepatitis B related cirrhosis (15.48 ± 3.24 μg/L vs 2.57 ± 1.84 μg/L, $P < 0.01$).

sin mRNA was significantly higher in PBC patients than that in healthy controls [(2.7 ± 2.5) × 10⁸ vs (3.0 ± 1.9) × 10⁷, $P < 0.01$] or patients with hepatitis B related cirrhosis [(2.7 ± 2.5) × 10⁸ vs (4.7 ± 3.6) × 10⁵, $P < 0.001$]. Meanwhile, the serum level of granulysin protein was also markedly higher in PBC patients than that in healthy controls (15.48 ± 3.24 μg/L vs 4.76 ± 2.32 μg/L) or patients with hepatitis B related cirrhosis (15.48 ± 3.24 μg/L vs 2.57 ± 1.84 μg/L, $P < 0.01$).

CONCLUSION: Granulysin expression is associated with the occurrence and progression of PBC, which can help to make diagnosis for PBC.

Key Words: Primary biliary cirrhosis; Granulysin; Reverse transcription-polymerase chain reaction; Enzyme-linked immunosorbent assay

Deng AM, Qian C, Yao DK, Chen Y, Chen B, Zhou Y, Gu ML, Wu CY, Jiang TW, Zhong RQ. Expression of granulysin in patients with primary biliary cirrhosis and its clinical significance. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(36):3513-3516

摘要

目的: 探讨颗粒溶素(granulysin, GNLY)在原发性胆汁性肝硬化和患者(PBC)中的表达及其意义。

方法: 采用TaqMan探针技术, 以18S rRNA为内参照, 测定60例PBC患者外周血中GNLY mRNA的含量, 同时应用酶联免疫吸附法(ELISA), 检测PBC患者血清中GNLY蛋白的水平, 并以健康体检组($n = 100$)和乙型肝炎肝硬化组($n = 60$)为对照。

结果: PBC组GNLY mRNA的平均拷贝数显著高于健康对照组[(2.7 ± 2.5) × 10⁸ vs (3.0 ± 1.9) × 10⁷, $P < 0.01$]和乙型肝炎后肝硬化组[(2.7 ± 2.5) × 10⁸ vs (4.7 ± 3.6) × 10⁵, $P < 0.001$]。PBC患者血清中的GNLY蛋白表达显著高于健康对照组(15.48 ± 3.24 μg/L vs 4.76 ± 2.32 μg/L, $P < 0.01$)和乙型肝炎后肝硬化组(15.48 ± 3.24 μg/L vs 2.57 ± 1.84 μg/L, $P < 0.01$)。

结论: GNLY的表达与PBC的发生、发展存在

■背景资料

原发性胆汁性肝硬化(PBC)是一种原因不明的自身免疫性肝病, 病理表现为非化脓性肝内胆管慢性炎症和汇管区淋巴细胞浸润, 典型的症状为黄疸、慢性瘙痒和皮肤黄色瘤。CD₈⁺T细胞介导的免疫反应参与PBC中胆管上皮细胞和肝细胞破坏的发病过程。CTL介导的免疫反应参与PBC中胆管上皮细胞和肝细胞破坏的发病过程。颗粒溶素(GNLY)是由激活的细胞毒性T淋巴细胞(CTL)和自然杀伤细胞(NK)产生的一种阳离子蛋白质, 能够杀伤广谱的微生物。GNLY还能够激活单核细胞产生细胞因子, 对免疫细胞产生趋化作用。外周血GNLY水平可能作为体内细胞毒活性的标志之一。

■应用要点

本文研究结果提示,GNLY表达水平可能作为PBC病程监测及判断预后的指标,为临床治疗提供一定的依据.

一定的相关性,可用于PBC临床诊断.

关键词: 原发性胆汁性肝硬化; 颗粒溶素; 逆转录-聚合酶链反应; 酶联免疫吸附测定法

邓安梅, 钱静, 姚定康, 陈燕, 陈波, 周晔, 谷明莉, 吴传勇, 蒋廷旺, 仲人前. PBC患者granulysin的基因和蛋白的表达及临床意义. 世界华人消化杂志 2006;14(36):3513-3516
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3513.asp

0 引言

颗粒溶素(granulysin, GNLY)是由激活的细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic T lymphocytes, CTL)和自然杀伤细胞(natural killer, NK)产生的一种阳离子蛋白质,能够杀伤微生物和肿瘤细胞^[1]. GNLY同时还是一种化学诱导剂,能够激活单核细胞产生细胞因子或化学增殖素^[2]. CTL是特异性细胞免疫应答的主要效应细胞,在CTL中起主要作用的是CD8⁺CTL. 原发性胆汁性肝硬化(primary biliary cirrhosis, PBC)是一种原因不明的自身免疫性肝病,病理表现为非化脓性肝内胆管慢性炎症和汇管区淋巴细胞浸润,典型的症状为黄疸、慢性瘙痒和皮肤黄色瘤. CD8⁺T细胞介导的免疫反应参与PBC中胆管上皮细胞和肝细胞破坏的发病过程^[3]. 近几年,我国PBC的发病率逐年增加. 我们通过本实验室成功建立的GNLY FQ-PCR和ELISA方法检测外周血中GNLY基因mRNA和蛋白的表达,分别从转录和翻译水平探讨GNLY与PBC发生、发展的相关性,为辅助临床诊断提供一定的依据.

1 材料和方法

1.1 材料 临床确诊的PBC患者60例均为长征医院住院患者,诊断符合美国肝病学会(AASLD)2000年推荐的PBC诊断标准^[4],男5例,女55例,男女比例为1:11,发病年龄45.6±10.2岁. 疾病对照组为确诊乙型肝炎肝硬化失代偿60例,男42例,女18例,年龄45.6±15.2岁. 正常对照组为健康体检者100例,年龄、性别与PBC相匹配. RNeasy Mini Kit(QIAGEN), TaqMan 2×PCR Master Mix, Taqman Reverse Transcription Regents(Applied Biosystem), 鼠抗人GNLY mAb(DH4α, 由斯坦福大学提供), 兔抗人GNLY多克隆抗体(本实验室保存), 辣根过氧化酶(HRP)标记的羊抗兔IgG(Serotec公司), GeneAmp 7900 Sequence Detection Systems(美国PE Biosystems公司), 550型酶

联免疫检测仪(Model 550 Microplate Reader, Bio-Rad公司). 依据GenBank人18S rRNA和GNLY的基因序列设计引物和探针用于荧光定量PCR检测. 内参18S rRNA上游引物: 5'ACATCCAAGGAAGGCAGCAG3'; 下游引物: 5'TTCGTCACTACCTCCCCGG3'; 探针: FAM CGCGCAAATTACCCACTCCCGA TAMRA. GNLY上游引物: 5'ACTGAAGAAGATGGTGGATAAGCC3'; 下游引物: 5'GCCCTGGGTAAGCTC TAGACTGA3'; 探针: FAM CGGAACCTCCAGT CAGAAGACCAGA TAMRA.

1.2 方法

1.2.1 FQ-PCR测GNLY的表达 枸橼酸钠(1:9)抗凝血5 mL, 无菌分离外周血单个核细胞(PBMC). 按试剂盒说明提取细胞总RNA, 反转录按试剂说明书操作, 反转录条件为42℃ 45 min, 94℃ 3 min终止反应. 体系如下: RNA 2.85 μL, 10×Taqman RT Buffer 1.0 μL, 40 mmol/L Magnesium Chloride 2.2 μL, deoxyNTPS Mixture 2.0 μL, Random Hexamers 0.5 μL, RNAase Inhibitor 0.2 μL, MultiScribe Reverse 0.25 μL, 无RNA酶水1.0 μL, 共10 μL的反转录体系. 产物cDNA保存于-20℃备用. 扩增后, PCR产物纯化后与pMD18-T载体连接并鉴定, 转化感受态细胞DH5α, 经蓝白斑筛选, 对阳性克隆进行双酶切鉴定并测序, 得到重组质粒pMD18T-GNLY, pMD18T-18S rRNA. 将提取质粒测定A值, 按公式换算出拷贝数, 用TE缓冲液以1:10比例稀释成1×10³-1×10⁸拷贝. 标准品质粒模板分别进行荧光定量PCR扩增, 建立标准曲线. 扩增条件为50℃ 2 min, 95℃ 10 min, 95℃ 15 s, 60℃ 1 min 40个循环, 最后由扩增仪计算出各样本基因的拷贝数.

1.2.2 ELISA检测血清中GNLY 将抗人GNLY mAb包被于96孔微孔板中4℃过夜, 加入含10 mL/L牛血清白蛋白(BSA)的10 mmol/L PBS(pH 7.4), 4℃过夜. 用含0.2 mL/L Tween20的PBS洗涤, 分别加入标准品、正常人和患者血清, 置37℃孵育1 h后洗涤, 再分别加入GNLY多克隆抗体和HRP标记的羊抗兔IgG, 置37℃恒温孵育1 h, DAB/H₂O₂显色20 min后加入H₂SO₄终止反应, 最后在酶标仪上450 nm处比色.

统计学处理 计量资料用mean±SD、变异系数(CV)来表示, 多组资料之间比较用方差分析, 两组之间比较采用t检验, P<0.05认为有统计学意义.

表 1 各实验组GNLY mRNA含量的定量检测结果(mean ± SD, n = 60, 拷贝/μg RNA)

分组	表达量	均值
PBC	$5.35 \times 10^7 - 4.61 \times 10^9$	$(2.7 \pm 2.5) \times 10^{8b}$
乙型肝炎肝硬化	$6.74 \times 10^4 - 3.80 \times 10^6$	$(4.7 \pm 3.6) \times 10^{5d}$
正常对照	$9.28 \times 10^5 - 7.32 \times 10^7$	$(3.0 \pm 1.9) \times 10^7$

^bP<0.01 vs 正常对照; ^dP<0.001 vs 正常对照.

2 结果

2.1 绘制标准曲线和设定内参照 将各稀释度的阳性标准模板同时进行定量PCR检测, 产物进入指数增长期的起始点即阈循环(cycle threshold, CT)值作为检测的临界点. 在这一区间内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(log10), 纵轴代表对应的CT值, GNLY标准曲线相关系数达到0.996(图1). 以18S rRNA为内对照, 18S rRNA基因的CT值在14-18之间的认为是有效标本, 确保RNA反转录效率的一致性.

2.2 GNLY mRNA的表达 所有标本均重复检测2次取均值, 根据软件所得基因拷贝数和各样本RNA浓度, 将结果换算为拷贝数/μg RNA. 各组GNLY mRNA含量的定量检测结果如表1所示, PBC组GNLY mRNA的表达量显著高于正常对照组(P<0.01), 而乙型肝炎肝硬化组显著低于正常对照组(P<0.001).

2.3 ELISA检测血清中GNLY 所有标本和标准品均作2孔, 取2孔平均A₄₅₀为测定值. 60例正常健康人的血清GNLY平均浓度为4.76 ± 2.32 μg/L, 60例乙型肝炎肝硬化组患者血清中GNLY平均水平为2.57 ± 1.84 μg/L, 60例PBC患者的血清平均水平为15.48 ± 3.24 μg/L. PBC患者血清中GNLY的含量显著高于正常对照和乙型肝炎肝硬化组(P<0.01).

3 讨论

PBC是一种与自身免疫有关的慢性炎症性肝脏疾病, 主要特征为肝内中小胆管的非化脓性进行性炎症损伤. 90%以上的PBC患者血清中出现抗线粒体抗体(AMA)-M2亚型, 50%患者出现抗核抗体(ANA)^[4]. 有报道称, PBC患者外周血树突状细胞亚群CD11c⁺和CD123⁺比例与肝功能损伤和血清抗AMA-M2抗体产生有密切关系^[5]. 本实验室先前的研究表明, 中国PBC患者与HLA-DRB1*0701基因相关, 与南美、北美、北欧、

■名词解释

FQ-PCR技术即荧光定量多聚酶反应, 是通过PCR在指数扩增期荧光信号强弱不同来分析目的基因的表达, 实现了PCR从定性到定量的飞跃. FQ-PCR与传统的终点法PCR比较, 操作简便、特异性强、重复性好、定量准确.

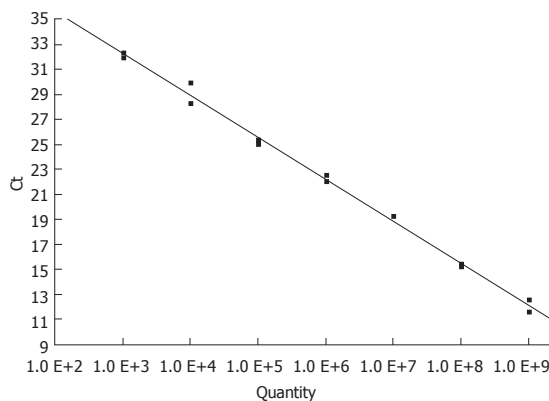


图 1 GNLY的标准曲线.

日本等其他国家PBC患者的易感基因明显不同, HLA-DRβ1第78位上的缬氨酸残基可能与PBC发病相关^[6]. PBC患者肝脏门管区有自身反应性CD₈⁺T和CD₄⁺T细胞的富集^[7], 说明PBC胆管损坏是由自身反应性CD₈⁺T和CD₄⁺T细胞介导的. 由CTL和NK分泌的GNLY属于II类抗微生物肽, 具有广谱抗菌作用. Takemoto *et al*^[8]报道GNLY在亚急性硬化全脑炎(SSPE)外周血中表达显著下降, 说明GNLY很可能涉及到SSPE的病理生理过程和发病机制. 国外有学者在麻风、移植排斥等疾病中发现GNLY表达增高^[9-10], 表明GNLY在宿主免疫防御中起重要作用, 然而在PBC中国国内外未见相关报道.

本实验室通过自行建立的FQ-PCR^[11]和ELISA^[12]方法检测了PBC、乙型肝炎肝硬化患者和健康对照者PBMCs上GNLY mRNA及血清中GNLY的表达. FQ-PCR技术是通过PCR在指数扩增期荧光信号强弱不同来分析目的基因的表达, 实现了PCR从定性到定量的飞跃. FQ-PCR与传统的终点法PCR比较, 操作简便、特异性强、重复性好、定量准确. 结果表明, PBC组外周血GNLY mRNA和血清中GNLY表达与正常健康组及肝炎肝硬化组比较有显著性增高(P<0.01). 提示PBC疾病进展过程中CTL, NK细胞均被激活, 其中CTL的T细胞受体(TCR)免疫

■同行评价

本研究表明,GNLY表达与PBC存在一定的关联性,有助于临床PBC的辅助诊断.方法可靠,具有一定的临床价值.

识别表达在胆管上皮细胞上的MHC-抗原肽复合物后,向靶细胞释放GNLY,高浓度的GNLY发挥细胞毒效应,致使胆管上皮细胞凋亡.离释放部位较远的GNLY浓度较低,诱导免疫细胞到达胆管上皮细胞损伤部位,引起免疫效应分子的释放且使效应分子有效地聚集到肝内胆管和汇管区,促成淋巴细胞浸润,造成中小胆管的进行性炎性损伤.

我们首次从转录和翻译水平证实了PBC患者GNLY基因和蛋白水平表达上调,提示GNLY及其介导的细胞免疫应答与PBC的发生、发展存在一定相关性,给临床辅助诊断提供一定依据.GNLY能否作为PBC早期诊断、病程监测及判断预后的指标,仍需要进一步研究探索.

4 参考文献

- 1 Stenger S, Hanson DA, Teitelbaum R, Dewan P, Niazi KR, Froelich CJ, Ganz T, Thoma-Uszynski S, Melian A, Bogdan C, Porcelli SA, Bloom BR, Krensky AM, Modlin RL. An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science* 1998; 282: 121-125
- 2 Deng A, Chen S, Li Q, Lyu SC, Clayberger C, Krensky AM. Granulysin, a cytolytic molecule, is also a chemoattractant and proinflammatory activator. *J Immunol* 2005; 174: 5243-5248
- 3 Talwalkar JA, Lindor KD. Primary biliary cirrhosis. *Lancet* 2003; 362: 53-61
- 4 王雪松, 李永哲. 原发性胆汁性肝硬化自身抗体谱研究进展. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 245-249
- 5 李永哲, 胡朝军, 佟大伟, 张蜀澜, 刘定华. 原发性胆汁性肝硬化患者CD11c+和CD123+树突状细胞与肝功能损伤的关系. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 341-345
- 6 刘海英, 邓安梅, 张建, 周晔, 姚定康, 沈芳, 屠小卿, 范列英, 仲人前. 原发性胆汁性肝硬化患者人类白细胞抗原等位基因多态性分析. *中华肝脏病杂志* 2005; 13: 410-413
- 7 Kita H, Matsumura S, He XS, Ansari AA, Lian ZX, Van de Water J, Coppel RL, Kaplan MM, Gershwin ME. Quantitative and functional analysis of PDC-E2-specific autoreactive cytotoxic T lymphocytes in primary biliary cirrhosis. *J Clin Invest* 2002; 109: 1231-1240
- 8 Takemoto M, Kira R, Kusuhara K, Torisu H, Sakai Y, Hara T. Gene expression profiles in peripheral blood mononuclear cells from patients with subacute sclerosing panencephalitis using oligonucleotide microarrays. *J Neurovirol* 2005; 11: 299-305
- 9 Krensky AM, Clayberger C. Granulysin: a novel host defense molecule. *Am J Transplant* 2005; 5: 1789-1792
- 10 Kotsch K, Mashregi MF, Bold G, Tretow P, Beyer J, Matz M, Hoerstrup J, Pratschke J, Ding R, Suthanthiran M, Volk HD, Reinke P. Enhanced granulysin mRNA expression in urinary sediment in early and delayed acute renal allograft rejection. *Transplantation* 2004; 77: 1866-1875
- 11 钱铮, 邓安梅, 陈孙孝, 朱晔, 陈燕, 谷明莉, 王皓, 谭龙益, 孔宪涛, 仲人前. 建立人颗粒溶素基因表达含量荧光定量PCR检测方法的研究. *中华临床医学卫生杂志* 2006; 4: 1-4
- 12 钱铮, 陈孙孝, 吴传勇, 蒋廷旺, 王燕, 周晔, 陈燕, 陈波, 邓安梅, 仲人前. 颗粒溶素酶联免疫吸附测定法的建立及临床初步应用. *中华检验医学杂志* 2006; 29: 1018-1019

电编 张敏 编辑 张焕兰

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

世界华人消化杂志的同行评议

本刊讯 《世界华人消化杂志》对所有文章进行在线同行评议,采用匿名方式.通常每篇文章邀请2-3位专家审阅,至少2人通过方可录用,否则退稿.每期最后一页致谢本期所有审稿人(含退稿).文章等级评定:○A级 ○B级 ○C级 ○D级 ○E级 ○不清楚.其中A和B属于很好,C和D不算太好,E是很差,还有一部分是不清楚.