

颗粒溶素在原发性胆汁性肝硬化患者外周血中的表达及临床意义

钱 琤¹, 姚定康², 蒋廷旺¹, 吴传勇¹, 王 燕¹, 耿红莲¹, 陈 波¹, 周 晔¹, 邓安梅^{1*}, 仲人前^{1*}

(1. 第二军医大学长征医院实验诊断科, 全军临床免疫中心, 上海 200003; 2. 长征医院消化内科)

[摘要] 目的:探讨颗粒溶素(granulysin, GNL Y)在原发性胆汁性肝硬化(PBC)患者外周血中的表达及其与 PBC 发生发展的关系。方法:实时荧光定量 RT-PCR(FQ-PCR)方法检测 60 例 PBC 患者外周血单个核细胞(PBMC)中 GNL Y mRNA 的表达,并以健康人群($n=60$)和乙型肝炎后肝硬化患者($n=60$)作为对照。ELISA 法检测各组研究对象血清中 GNL Y 蛋白水平,并比较不同疾病分期 PBC 患者的表达差异。应用统计学软件分析 PBC 患者血清 GNL Y 蛋白水平与 GNL Y mRNA 表达、疾病分期及肝功能指标间的相关性。结果:PBC 患者外周血 GNL Y mRNA 的平均拷贝数显著高于健康对照[(2.7 ± 2.5) $\times 10^8$ vs (3.0 ± 1.9) $\times 10^7$, $P < 0.01$]和乙型肝炎后肝硬化患者[(4.7 ± 3.6) $\times 10^5$, $P < 0.001$]。PBC 患者血清中的 GNL Y 蛋白水平(ng/ml)显著高于健康对照(15.48 ± 3.24 vs 4.76 ± 2.32 , $P < 0.01$)和乙型肝炎后肝硬化患者(2.57 ± 1.84 , $P < 0.01$)。血清中 GNL Y 蛋白水平在早期和晚期 PBC 患者之间差异显著($P < 0.01$)。PBC 患者血清中 GNL Y 蛋白水平与 GNL Y mRNA 表达呈正相关,与血清 GGT、ALP 的浓度呈正相关($P < 0.01$)。结论:PBC 患者 PBMC 中 GNL Y mRNA 表达和血清中 GNL Y 蛋白含量显著高于健康人群及乙型肝炎后肝硬化患者;血清 GNL Y 蛋白水平与 PBC 的发生发展存在一定的关联性,对其的检测有助于临床对 PBC 病情的监控。

[关键词] 肝硬化,胆汁性;颗粒溶素;外周血单个核细胞

[中图分类号] R 575.22 [文献标识码] A [文章编号] 0258-879X(2006)11-1214-04

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

QIAN Cheng¹, YAO Ding-kang², JIANG Ting-wang¹, WU Chuan-yong¹, WANG Yan¹, GENG Hong-lian¹, CHEN Bo¹, ZHOU Ye¹, DENG An-mei^{1*}, ZHONG Ren-qian^{1*} (1. Department of Laboratory Diagnostics, Clinical Immunology Center of PLA, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China; 2. Department of Gastroenterology, Changzheng Hospital)

[ABSTRACT] Objective: To investigate the expression of granulysin (GNL Y) in peripheral blood of patients with primary biliary cirrhosis (PBC) and its relationship with the development and progression of PBC. Methods: The real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to determine the expression of GNL Y mRNA in the peripheral blood of 60 PBC patients, 60 healthy controls, and 60 patients with hepatitis-related cirrhosis; the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to determine the expression of GNL Y protein; and the expression differences were compared between patients with different stages of PBC. The correlation between the expression of GNL Y protein with GNL Y mRNA, the staging and hepatic functions of PBC patients was analyzed statistically. Results: The mean GNL Y mRNA copy number in PBC group was significantly higher than those in healthy control group [(2.7 ± 2.5) $\times 10^8$ vs (3.0 ± 1.9) $\times 10^7$; $P < 0.01$] and hepatitis-related cirrhosis group [(2.7 ± 2.5) $\times 10^8$ vs (4.7 ± 3.6) $\times 10^5$, $P < 0.001$]. Meanwhile, the serum level of GNL Y protein in PBC groups was significantly higher than those in the healthy control group [(15.48 ± 3.24) ng/ml vs (4.76 ± 2.32) ng/ml] and hepatitis-related cirrhosis group [(15.48 ± 3.24) ng/ml vs (2.57 ± 1.84) ng/ml, $P < 0.01$]. We also found that the serum levels of GNL Y protein in PBC patients at , stages were significantly higher than those at , stages ($P < 0.001$). The levels of serum GNL Y protein in PBC patients were positively correlated with the levels of gamma-glutamyltransferase and alkaline phosphatase. Conclusion: The GNL Y gene and protein expression levels are both higher in patients with PBC compared with those in normal controls and patients with hepatitis-related cirrhosis. The serum level of GNL Y expression is associated with the development and progression of PBC, which may be helpful for monitoring the condition of PBC patients.

[KEY WORDS] liver cirrhosis, biliary; granulysin; peripheral blood mononuclear cell

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(11): 1214-1217]

颗粒溶素(granulysin, GNL Y)是由激活的细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxic T lymphocytes, CTL)和自然杀伤(natural killer, NK)细胞产生的一种阳离子蛋白,能够杀伤微生物和肿瘤细胞^[1]。GNL Y 也可作为化学趋化物趋化免疫细胞到达损伤或感染

[基金项目] 国家自然科学基金(30471616);上海市重点基金项目(05JC14052). Supported by National Natural Science Foundation of China (30471616) and Shanghai Key Foundation Programs(05JC14052).

[作者简介] 钱 琤, 博士生. E-mail: qiancheng824@yahoo.com.cn

* Corresponding authors. E-mail: amdeng70@yahoo.com;

E-mail: rqzhong@yahoo.com

部位^[2]。原发性胆汁性肝硬化(primary biliary cirrhosis, PBC)是以肝内胆管进行性破坏并以慢性胆汁淤积为主要特征的自身免疫性肝病,发病机制尚不清楚。近年研究表明,自身反应性 T 细胞参与发病机制并对胆小管破坏起重要作用。研究 PBC 患者中 T 细胞的免疫调节机制有助于寻找有效的治疗途径。在前期研究中,我们发现 GNL Y 表达水平可作为体内细胞免疫激活的标志。因此,本研究通过 GNL Y 实时荧光定量 RT-PCR 和 ELISA 方法检测 PBC 患者外周血单个核细胞(PBMC)中 GNL Y 基因和血清中 GNL Y 蛋白的表达,分别从转录和翻译水平探讨 GNL Y 与 PBC 发生发展的相关性,以期临床提供一些辅助诊断的依据。

1 材料和方法

1.1 研究对象和试剂

1.1.1 研究对象 60 例经临床确诊的 PBC 患者均为第二军医大学长征医院住院患者,其诊断符合美国肝病学会(AASLD)2000 年推荐的 PBC 诊断标准^[3],其中男性 5 例,女性 55 例,男女比例为 1:11,平均发病年龄(45.6 ± 10.2)岁。按照组织学改变分为 4 期,期:胆小管炎期;期:胆小管增生期;期:瘢痕形成期,期:肝硬化期。疾病对照组为 60 例确诊肝炎后肝硬化失代偿患者,女性 18 例,男性 42 例,平均年龄(45.6 ± 15.2)岁。正常对照组为 60 例健康体检者(年龄、性别与 PBC 相匹配)。

1.1.2 主要试剂和仪器 RNeasy Mini Kit(QIA-GEN),Taq Man 2 × PCR Master Mix, Taq Man Reverse Transcription Regents (Applied Biosystem),鼠抗人 GNL Y 单克隆抗体(DH4,由 Stanford University 提供)、兔抗人 GNL Y 多克隆抗体(Stanford University),辣根过氧化物酶(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)。

1.2 实时荧光定量 RT-PCR 测定 GNL Y mRNA 的表达

1.2.1 引物和探针的设计 设计人 18s rRNA 和 GNL Y 上下游引物和探针序列。18s rRNA:上游 5'-ACA TCC AAG GAA GGC AGC AG-3';下游 5'-TTC GTC ACT ACC TCC CCG G-3';FAM-CGCGC AAA TTA CCC ACT CCC GA-TAMRA。GNL Y:上游 5'-ACT GAA GAA GAT GGT GGA TAA GCC-3';下游 5'-GCC CTG GGT AAC TCT

AGA CTG A-3';FAM-CGG AAC CTC CAG TCA GAA GAC CAG A-TAMRA。

1.2.2 总 RNA 抽提及 cDNA 的制备 无菌分离抗凝血 5 ml 抽提单个核细胞(PBMC)。按 RNeasy Mini Kit 试剂说明提取细胞总 RNA,计算 RNA 的含量。逆转录按试剂说明书操作。

1.2.3 定量 PCR 检测 GNL Y 的表达 构建重组质粒 pMD18T-GNL Y、pMD18T-18s rRNA,建立标准品。将质粒按 1:10 梯度稀释为 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^8$ 拷贝/μl,然后进行定量 PCR 扩增,建立标准曲线。将患者组和对照组的 cDNA 进行扩增,由仪器计算出各样本目的基因的拷贝数。

1.3 ELISA 检测血清中 GNL Y 通过本室已建立的 ELISA 方法^[4]检测样本,将抗人 GNL Y 单抗包被于 96 孔板 4 过夜,加入 PBS(pH 7.4)4 过夜,洗板后分别加标准品(100 ng/ml)、正常人和患者血清 100 μl 至相应孔,置 37 孵育 1 h 后洗板,分别加 GNL Y 多克隆抗体和 HRP-羊抗兔 IgG,置 37 孵育 1 h,加 DAB/H₂O₂后在酶标仪上 450 nm 处比色。

1.4 PBC 患者 GNL Y mRNA 与血清中 GNL Y 蛋白的相关性分析 将定量 PCR 法所测得的 GNL Y mRNA 含量与 ELISA 法所测得的血清中 GNL Y 蛋白含量进行相关性分析,探讨 GNL Y 转录与翻译水平变化是否一致。

1.5 PBC 患者血清 GNL Y 含量与疾病分期及肝功能的相关性分析 按照 PBC 分期,将患者分为 4 期,观察 GNL Y 表达变化有无统计学差异。采用 Beckman CX4 全自动生化分析仪,测定 PBC 患者 GGT、ALP、ALT、AST 水平。并将 GNL Y 表达水平与肝功能指标进行相关性分析。

1.6 统计学处理 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 、相对标准差(RSD)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,相关指标间的相关性采用直线相关分析, $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

2 结果

2.1 PBC 患者 PBMC 中 GNL Y mRNA 的表达

2.1.1 质粒标准品的构建 将 PCR 扩增产物连接至 pMD18-T 载体上后,转化大肠杆菌得到重组质粒 pMD18T-GNL Y 和 pMD18T-18s rRNA。经双酶切和测序鉴定,序列完全正确。

2.1.2 绘制标准曲线和设定内参照 将不同稀释度的阳性标准模板同时进行定量 PCR 检测,GNL Y 标准曲线相关系数达到 0.996(图 1)。标准曲线方程为 $y = -3.357 193 2 x + 42.360 783$ 。内对照为 18s rRNA。

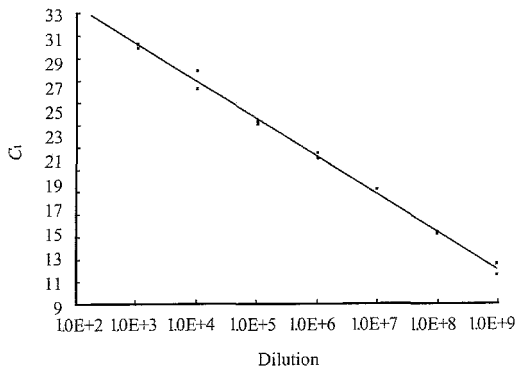


图1 GNLY的标准曲线
Fig 1 Standard curves of GNLY

2.1.3 GNLY mRNA在PBC患者、肝炎后肝硬化患者和健康对照者中的表达 PBC组GNLY mRNA的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],而疾病对照肝炎后肝硬化组与正常对照比较GNLY mRNA拷贝数明显降低[(4.7 ± 3.6) × 10⁵ vs (3.0 ± 1.9) × 10⁷, P < 0.001]。

2.2 ELISA检测血清GNLY水平 所有样本均作复孔。60例健康人的血清GNLY平均浓度为(4.76 ± 2.32) ng/ml,60例肝炎后肝硬化组患者血清中GNLY平均水平为(2.57 ± 1.84) ng/ml,60例PBC患者的血清平均水平为(15.48 ± 3.24) ng/ml。与健康及疾病对照组相比,PBC患者血清GNLY水平有显著性升高(P < 0.01)。

2.3 PBC患者PBMC中GNLY mRNA表达与血清中GNLY水平的相关性 将PBC患者PBMC中GNLY mRNA与血清中GNLY蛋白水平进行直线相关分析(图2),两者之间存在一定的正向线性相关关系(r = 0.223 6, P = 0.000 3)。

2.4 血清GNLY蛋白水平与PBC疾病分期的关系 60例PBC患者按疾病程度不同分为4期,、、、期患者血清GNLY蛋白水平(ng/ml)分别为(8.72 ± 3.59)、(9.55 ± 3.62)、(15.85 ± 3.14)、(17.19 ± 2.82)。PBC患者血清中GNLY蛋白的表达量在、期之间差异无统计学意义(P > 0.05),、期之间差异也无统计学意义(P > 0.05),但早期(、)期和晚期(、)期之间差异显著(9.10 ± 3.06 vs 16.43 ± 3.02, P < 0.001)。

2.5 GNLY血清水平与PBC患者肝功能的相关性研究 分别检测了60例PBC患者ALP、-GT、ALT和AST,并与血清中GNLY蛋白浓度进行直线相关分析(图3和图4)。血清中GNLY浓度与血清GGT的浓度呈正相关(r = 0.355 3, P = 0.005 3),与血清

ALP的浓度呈正相关(r = 0.347 4, P = 0.006 5),而与转氨酶ALT、AST无相关性。

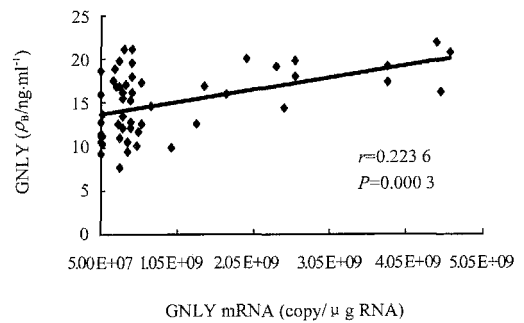


图2 PBMC中GNLY mRNA与血清中GNLY蛋白水平相关性分析
Fig 2 Correlation of serum granulysin protein expression with its mRNA expression in PBMC

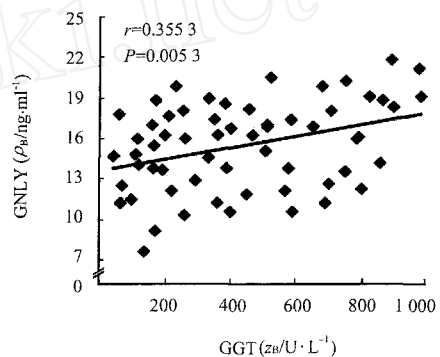


图3 血清GNLY蛋白水平与血清GGT浓度的相关性
Fig 3 Relationship between serum levels of granulysin and GGT

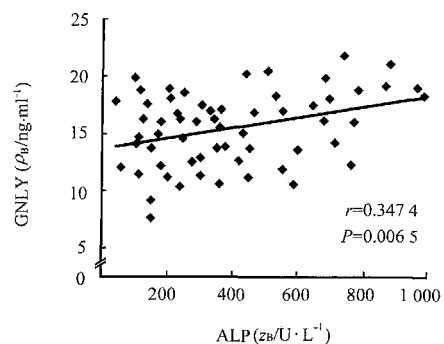


图4 血清GNLY蛋白水平与血清ALP浓度的相关性
Fig 4 Relationship between serum levels of granulysin and ALP

3 讨 论

PBC 是一种慢性胆汁淤积性自身免疫性肝病, 主要特征为肝内中小胆管的非化脓性进行性炎性损伤, T 细胞介导的免疫反应参与了 PBC 中胆管上皮细胞和肝细胞破坏的发病过程^[5]。Sakai 等^[6]报道妊娠子痫患者与正常妊娠妇女相比, 血清中 GNL Y 明显升高, 且与血压及 Th1/Th2 的比例相关, 尤其与 Th1 型反应密切相关。在急性移植物抗宿主疾病 (GVHD) 中, 血清 GNL Y 增加且与 GVHD 的严重程度相关^[7]。Takemoto 等^[8]报道 GNL Y 在亚急性硬化全脑炎 (SSPE) 外周血中表达显著下降, 说明 GNL Y 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 GNL Y 表达增高^[9], 表明 GNL Y 在宿主免疫防御中起重要作用。然而其在 PBC 患者中的相关研究国内外尚未见报道。

本文在前期研究^[10,11]的基础上, 进一步检测了 PBC、肝炎后肝硬化和健康对照者 PBMC 中 GNL Y mRNA 的表达及血清中 GNL Y 的水平。结果表明 PBC 患者 GNL Y mRNA 表达与血清中 GNL Y 蛋白水平呈正相关, 且与正常健康组比较, GNL Y mRNA 及蛋白表达均显著增高 ($P < 0.01$), 提示在 PBC 疾病进展过程中 CTL、NK 细胞均被激活, T 细胞受体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 GNL Y。高浓度的 GNL Y 发挥细胞毒效应, 致使胆管上皮细胞凋亡; 低浓度的 GNL Y 趋化免疫细胞到达胆管上皮细胞损伤部位, 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, 造成中小胆管炎性损伤。疾病对照肝炎后肝硬化组 GNL Y 蛋白表达低于正常健康组 ($P < 0.01$), 说明肝炎后肝硬化患者机体免疫功能下降, 尤其是细胞免疫功能, CTL 和 NK 细胞释放的 GNL Y 水平下降。PBC 患者血清中 GNL Y 蛋白的表达在早期和晚期之间差异有统计学意义 ($P < 0.001$), 提示 GNL Y 表达与 PBC 疾病的病程及严重程度相关。同时本实验也证实了 PBC 患者血清 GNL Y 水平与 GGT、ALP 之间存在一定的正向线性相关性, 提示 PBC 患者中细胞免疫功能发生变化, 自身反应

性 T 细胞释放的 GNL Y 发挥细胞毒作用, 损伤胆管上皮细胞, 导致胆汁淤积。

本实验分别从转录和翻译水平证实了 PBC 患者 PBMC 中 GNL Y mRNA 表达和血清中 GNL Y 蛋白水平上调, 说明 GNL Y 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, 对其表达水平的测定有助于临床对 PBC 患者进行病程监控及预后判断。

[参 考 文 献]

- [1] Stenger S, Hanson DA, Teitelbaum R, et al. An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin[J]. Science, 1998, 282:121-125.
- [2] Deng A, Chen S, Li Q, et al. Granulysin, a cytolytic molecule, is also a chemoattractant and proinflammatory activator [J]. J Immunol, 2005, 174:5243-5248.
- [3] Heathcote EJ. Management of primary biliary cirrhosis. The American Association for the Study of Liver Diseases Practice Guidelines[J]. Hepatology, 2000, 31:1005-1013.
- [4] 钱 瑛, 陈孙孝, 吴传勇, 等. 颗粒溶素酶免疫吸附测定法的建立及临床初步应用 [J]. 中华检验医学杂志, 2006, 29: 1018-1019.
- [5] Kita H, Matsumura S, He XS, et al. Quantitative and functional analysis of PDC-E2-specific autoreactive cytotoxic T lymphocytes in primary biliary cirrhosis[J]. J Clin Invest, 2002, 109:1231-1240.
- [6] Sakai M, Ogawa K, Shiozaki A, et al. Serum granulysin is a marker for Th1 type immunity in pre-eclampsia[J]. Clin Exp Immunol, 2004, 136:114-119.
- [7] Nagasawa M, Isoda T, Itoh S, et al. Analysis of serum granulysin in patients with hematopoietic stem-cell transplantation: its usefulness as a marker of graft-versus-host reaction[J]. Am J Hematol, 2006, 81:340-348.
- [8] Takemoto M, Kira R, Kusuhara K, et al. Gene expression profiles in peripheral blood mononuclear cells from patients with subacute sclerosing panencephalitis using oligonucleotide microarrays[J]. J Neurovirol, 2005, 11: 299-305.
- [9] Krensky AM, Clayberger C. Granulysin: a novel host defense molecule[J]. Am J Transplant, 2005, 5: 1789-1792.
- [10] 钱 瑛, 邓安梅, 陈孙孝, 等. 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 [J]. 中华临床医学卫生杂志, 2006, 4: 1-4.
- [11] 钱 瑛, 陈孙孝, 周 晔, 等. 颗粒溶素的表达纯化及生物学活性分析 [J]. 第二军医大学学报, 2006, 27: 829-833.

[收稿日期] 2006-06-26

[修回日期] 2006-10-30

[本文编辑] 贾泽军