

· 临床研究 ·

传染性单核细胞增多症患儿 B 细胞刺激因子 mRNA 表达水平研究

顾健辉¹, 鞠少卿², 徐美玉¹

(1. 南通大学附属医院儿科; 2. 南通大学附属医院医学检验中心, 江苏 南通 226001)

[摘要] 目的 B 淋巴细胞增殖是传染性单核细胞增多症免疫变化的始发环节, 该实验采用实时荧光定量 PCR(RFQ-PCR) 技术检测儿童传染性单核细胞增多症患儿外周血人 B 细胞刺激因子(BLyS)mRNA 表达水平, 为临床诊断该病提供新的实验依据。**方法** 在 BLyS 基因的高保守区设计相应引物和荧光探针, 实时检测 PCR 产物的荧光强度, 根据标准品建立的标准曲线, 由软件自动计算出待测样本中靶基因中 BLyS 的水平。**结果** RFQ-PCR 检测靶基因 mRNA 含量的线性范围为 10^9 ng/L ~ 10^1 ng/L, 批内和批间重复性测定的变异系数 v 分别为 1.88% ~ 5.89% 和 6.32% ~ 12.34%。18 例传染性单核细胞增多症患儿样本的 BLyS mRNA 水平的表达水平均显著高于正常儿童($P < 0.01$)。**结论** 成功建立 RFQ-PCR 检测 BLyS mRNA 含量的方法, 具有较好的检测灵敏度和重复性; 而且发现 BLyS 在儿童传染性单核细胞增多症发病过程中可能起了重要作用, BLyS 可以作为儿童传染性单核细胞增多症的一个参考指标。

[中国当代儿科杂志, 2007, 9(6):553-556]

[关键词] 传染性单核细胞增多症; 实时荧光定量 PCR; B 细胞刺激因子

[中图分类号] R512.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2007)06-0553-04

Measurement of B-lymphocyte stimulator mRNA expression in children with infectious mononucleosis by real-time fluorescence quantitative method

GU Jian-Hui, JU Shao-Qing, XU Mei-Yu. Department of Pediatrics, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong, Jiangsu 226001, China (Email: ntblood@163.com)

Abstract: Objective B cell multiplication plays a key role in infections mononucleosis. The present study was designed to detect the expression of B-lymphocyte stimulator (BLyS) mRNA in peripheral blood using real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RFQ-PCR) in children with infectious mononucleosis in order to explore the role of BLys in this disorder. **Methods** Specific primers and TaqMan probes of BLyS were designed, and fluorescence of the PCR products were detected continuously during amplification. According to the standard curves created by plasmid DNA, the expression level of target genes in clinical samples were calculated using Stata Software version 8.0, and the results were presented as the ratio of copies of target gene mRNA to β_2 microglobulin (β_2 M) mRNA copies. BLyS mRNA expression in peripheral blood was measured by RFQ-PCR in 18 children with infectious mononucleosis and the results were compared with those measured in 15 healthy controls. **Results** The range of target gene mRNA detected by REQ-PCR was from 10^9 ng/L to 10^1 ng/L. The coefficient of variation for intra-experimental and inter-experimental reproducibility ranged from 1.88% to 5.89% and 6.32% to 12.34%, respectively. BLyS mRNA expression in peripheral blood in children with infectious mononucleosis were significantly higher than that in controls (1.65 ± 0.10 vs 0.56 ± 0.08 ; $P < 0.01$). **Conclusions** RFQ-PCR has a high sensitivity and reproducibility for the measurement of BLyS mRNA expression. BLyS may be involved in the development of infectious mononucleosis.

[Chin J Contemp Pediatr, 2007, 9(6):553-556]

Key words: Infectious mononucleosis; Real-time fluorescence quantitative PCR; B-lymphocyte stimulator

人 B 细胞刺激因子(B-lymphocyte stimulator, BLyS) 是 1999 年 Moore 等^[1]发现的一种与免疫相关的新细胞生长因子, 是肿瘤坏死因子(TNF)超家族的新成员, 属 II 型跨膜蛋白。BLyS 的生物活性主

要通过与 3 种特异性受体—B 细胞成熟抗原(BCMA)、穿膜蛋白活化物(TACI)和 B 细胞活化因子受体(BAFF-R)结合而实现, 促进 B 淋巴细胞增生、分化、成熟和免疫球蛋白的产生。

[收稿日期] 2007-05-08; [修回日期] 2007-07-14
[作者简介] 顾健辉, 男, 硕士, 主治医师。主攻方向: 儿童血液肿瘤疾病。

传染性单核细胞增多症(infectious mononucleosis, IM)是由EB病毒(EBV)所致急性感染性疾病。患儿除临床表现为发热、咽峡炎、肝脾大外,还存在外周血变异淋巴细胞增多^[2],B淋巴细胞的增殖是IM的免疫变化的始发环节。考虑到BLyS对B细胞的关键作用,本研究采用实时荧光定量PCR技术(RFQ-PCR)分析IM患儿外周血中BLyS mRNA的表达水平,为进一步探讨它们在传染性单核细胞增多症发生、发展过程中的作用及其分子机制等研究奠定实验基础。

1 对象和方法

1.1 样本来源

18例传染性单核细胞增多症患儿来自本院,标本采集时间为2004年5月至2006年3月,其中男8例,女10例,年龄2~9岁,中位年龄6岁。所有患儿诊断均符合《实用儿科学》的诊断标准:即临床出现发热、咽峡炎、淋巴结及肝脾大,传染性单核细胞增多症确诊依靠:①异常淋巴细胞>10%;②血清嗜异凝集实验反应阳性;③特异血清学检测。确诊后采取外周血4 mL,用淋巴细胞分离液分离单个核细胞后,液氮速冻后置-70℃保存备用。同时经治疗后体温正常,淋巴结缩小,外周血涂片异常淋巴细胞消失后再抽外周血4 mL,用淋巴细胞分离液分离单个核细胞后,液氮速冻后置-70℃保存备用。其中3例失访。对照组为正常体检儿童。

1.2 主要试剂

pGEM-T载体、大肠杆菌DH5α(*E. Coli*, DH5α)、Trizol购自Invitrogen公司,UNG、IPTG、X-gal、dNTPs、pfu DNA聚合酶购自Promega公司,毛细管由Roche公司提供,Onmascript逆转录试剂盒为QIAGEN公司产品,胶回收试剂盒、质粒抽提试剂盒为上海华舜生物工程公司产品。

1.3 引物和探针设计

根据基因库中人BLyS(注册号为AY129225)和内参β₂微球蛋白(β₂M)全序列(注册号为

NM012512),应用Beacon Designer2.1软件,设计相应引物和荧光探针,并由上海生工生物工程公司合成(见表1)。

1.4 RNA提取和逆转录反应

血清0.1 mL加1 mL Trizol,按说明书操作提取细胞总RNA,核酸蛋白紫外分析仪(Eppendorf公司)检测RNA质量和浓度。取总RNA 2 μg进行逆转录反应,体系含1×逆转录缓冲液,0.5 mmol/L dNTPs,1 μmol/L oligo-dT引物,RNase抑制剂10 U,逆转录酶4 U,37℃ 1 h,65℃ 15 min灭活逆转录酶,cDNA分装置-20℃保存。

1.5 BLyS定量质粒的构建

取上述cDNA 2 μL,用引物BLyS-sense和anti-sense,于PE9600进行PCR扩增。经胶回收的PCR电泳产物3 μL(约20 ng)与pGEM-T载体4℃连接12~16 h。连接产物转化感受态大肠杆菌DH5α(*E. Coli*, DH5α),涂布于含X-gal和IPTG并具Amp抗性的1.5%琼脂平皿上,37℃倒置培养12~16 h,经蓝白斑筛选,EcoR I酶切初步鉴定,阳性克隆进行测序分析(由上海博亚公司完成)。将筛选出的阳性菌株进一步扩增,抽提质粒,用核酸蛋白紫外分析仪准确定量,并进行1:10倍比系列稀释,做为标准品-20℃保存。

1.6 BLyS定量质粒的构建

取上述cDNA 2 μL,用相应引物于PE9600进行PCR扩增目的片段。其余步骤同APRIL定量质粒的构建。阳性克隆经测序证实。

1.7 标本BLyS mRNA含量测定

Trizol法提取血清总RNA,经逆转录合成cDNA(同步骤4)。将2 μL cDNA模板加入18 μL PCR反应液(含1×PCR缓冲液,5 mmol/L MgCl₂,0.2 mmol/L dNTPs,靶基因或β₂M上下游引物各0.2 μmol/L,相应荧光探针各0.1 μmol/L,0.5 μg/μL BSA,UNG 0.3 U,pfu DNA聚合酶0.5 U),混匀后加入Roche专用毛细管中,并设空白管对照、阴性对照、无模板对照和相应6个质粒标准品对照(浓度分别为10⁸,10⁷,10⁶,10⁵,10⁴,10³ ng/L)。各反应

表1 寡核苷酸探针和引物

Targets	Sequence(5'to3')	Position
BLyS- sense	5'- TTGAACCACCAGCTCCAGGA-3'	nt 344 ~ nt 363
BLyS- antisense	5'-ACTTGCAAGCAGTCTTGAGTGA-3'	nt 446 ~ nt 425
BLyS- probe	5'- FAM-TCTTCTGACCGCTGAACGGCACGCT-TAMRA- 3	nt 419 ~ nt 395
β ₂ M-sense	GTCTTTCTACATCCTGGCTCACA	nt 247 ~ nt 269
β ₂ M-antisense	GACGGTTTTGGGCTCCTTCA	nt 346 ~ nt 327
β ₂ M- probe	FAM-CACCCACCGAGACCGATGTATATGCTTGC-TAMRA	nt 279 ~ nt 307

管于 Roche 荧光定量检测仪 (Lightcycler) 进行 PCR 扩增: 50℃ 1 min 激活 UNG, 94℃ 预变性 3 min, 然后 94℃ 10 s, 62℃ 35 s, 共 40 个循环。根据各自标准品建立的标准曲线, 由软件自动计算出待测样本中靶基因或 β_2 M mRNA 的准确含量。为了消除样本、逆转录和 PCR 反应的差异, 以靶基因 BLYS mRNA 和 β_2 M mRNA 含量的比值作为评价 APRIL 及其受体表达水平的指标。

1.8 统计学处理

应用 STATA8.0 统计分析软件对样本数据进行 t 检验, 所得结果表示为均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$), 显著性差异的概率设为 $P < 0.01$ 。

2 结果

2.1 总 RNA 的质量和纯度

Trizol 法提取组织总 RNA, 经 1% 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳, 显示清晰的 28 S, 18 S 条带, 28 S/18 S ≥ 1.5 , 提示总 RNA 完整性良好。核酸蛋白紫外分析仪检测 RNA A260/A280 ≥ 1.8 , 提示总 RNA 质量较好。

2.2 电泳检测 PCR 扩增产物

以 cDNA 为模板, 用相应引物进行 PCR 扩增, 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳, 结果显示扩增出的目的片段大小与预期值相符合 (图 1)。

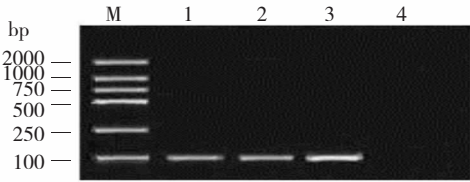


图 1 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物 M: DL2000 分子量标准 (TaKaRa); 泳道 1、2: BLYS 扩增片段; 泳道 3: β_2 M 扩增片段; 泳道 4: 阴性对照。

2.3 阳性克隆的鉴定

经胶回收的 PCR 电泳产物与 pGEM-T 载体连接后, 转化 E. Coli, DH5 α , 获得重组质粒, EcoR I 酶切初步鉴定, 并经测序证实与 NCBI 基因序列的同源性为 100%。

2.4 RFQ-PCR 检测的线性范围

将 10 倍系列稀释质粒标准品, 用建立的荧光定量 PCR 测定, 结果显示本法具有较好的检测灵敏度 (10^1 pg/mL)。将 Ct (threshold cycle) 值与不同浓度标准品的对数值拟合作图, 得出一条标准曲线, 图 3

显示 Ct 值和模板起始浓度的 log 值之间具有较好的线性关系 ($r = 1.00$)。

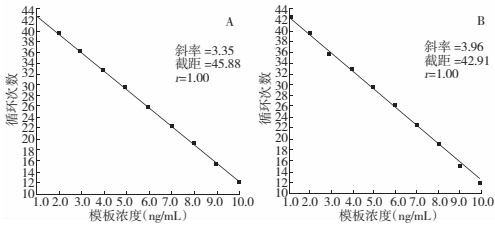


图 2 BLYS 标准品的荧光定量标准曲线 A: BLYS 定量标准曲线 ($r = 1.00$); B: β_2 M 定量标准曲线 ($r = 1.00$)

2.5 RFQ-PCR 检测的重复性

将系列稀释的质粒标准品, 用荧光定量 PCR 重复测定 10 次, 每次每个稀释度重复 5 管, 结果显示本法的批内和批间重复性均较好, CV 分别为 1.88% ~ 5.89% 和 6.32% ~ 12.34%。

2.6 标本 BLYS mRNA 表达水平检测结果

15 例正常儿童外周血中 BLYS mRNA 为 0.56 ± 0.08 , 18 例 IM 患儿治疗前为 1.65 ± 0.10 , 其中 15 例经治疗恢复期为 0.89 ± 0.12 。治疗前正常儿童相比 $t = 34.0706$, $P < 0.01$, 治疗后与正常儿童相比 $t = 19.8555$, $P < 0.01$, 治疗前与治疗后的相比 $t = 8.8619$, $P < 0.01$ (表 2)。

表 2 儿童传染性单核细胞增多症外周血中 BLYS mRNA 定量检测结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	BLYS
正常儿童	15	0.56 ± 0.08
治疗前	18	$1.65 \pm 0.10^{a,c}$
治疗后	15	0.89 ± 0.12^b

a 治疗前与正常儿童相比, $P < 0.01$; b 治疗后与正常儿童相比, $P < 0.01$; c 治疗前与治疗后相比, $P < 0.01$

3 讨论

传染性单核细胞增多症发病机制目前认为病毒尤其是 EBV 侵入易感者口咽部, 与 B 淋巴细胞受体结合, 刺激 B 淋巴细胞在局部增殖, 带有 EBV 基因组的 B 细胞常有 T 淋巴细胞识别的膜抗原, 可被 T 淋巴细胞识别的膜抗原, 可被 T 淋巴细胞识别, 并激活 T 淋巴细胞大量增殖, 形成以激活的 T 细胞为主的异形淋巴细胞, 浸润全身内脏器官及淋巴结, 引起急性咽喉炎及淋巴结肿大、脾大。同时亦可产生 EBV 血症, 播散到机体其他部位的淋巴系统的 B 淋

巴细胞,甚至导致中枢神经系统及全身脏器发生严重的病变^[3,4]。B淋巴细胞的增殖是该病的免疫变化的始发环节。

国外学者 Vereke 等^[5]用原位杂交加免疫组化的方法研究了 14 例 IM 患者的扁桃体活检标本,发现 EBV 早期 RNA(EBER)阳性细胞 50%~70% 为 B 细胞,其余的为非 T 非 B 细胞,未发现有 EBER 与 T 细胞抗原共同表达,可见 T 细胞凋亡率明显增高,表明 IM 的病变主要在 B 细胞,而 T 细胞的改变仅仅为继发的细胞免疫反应。

BLyS 通过细胞表面的 3 个受体调节 B 细胞的活化存活、增生和分泌,还能促进免疫球蛋白产生、调节免疫反应。近年来国内外的研究显示^[6~18],系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、干燥综合征、多发性硬化、重症肌无力、多发性骨髓瘤、非霍奇金病、获得性免疫缺陷综合征等疾病患者 BLyS 及其受体蛋白和(或)mRNA 表达水平有异常改变。IM 发病与 B 细胞有关,至今为止尚未见 BLyS 与 IM 关系研究报道。

本实验研究发现 IM 患儿 BLyS mRNA 表达水平在治疗前明显升高,同时经治疗临床症状消失后 BLyS mRNA 的表达水平虽较治疗前有所下降,但较正常对照组仍升高,其差异有统计学意义。说明 BLyS 在 IM 的发病过程中起重要作用,BLyS 可以作为诊断儿童传染性单核细胞增多症一个参考指标。同时 IM 患儿的免疫异常不会随着临床症状的消失而恢复正常,其可能还要持续一段时间。

BLyS 及其受体作为体内重要的免疫调控因子,对于机体免疫应答,特别是体液免疫起着重要的平衡作用,其缺陷或过量表达均能引起机体的免疫失衡,从而诱发多种疾病。BLyS 究竟通过三个受体的哪一受体参与 IM 的发病,有待于进一步研究。总之,本研究为今后进行 BLyS 及其受体表达水平与 IM 发病机制之间的关系探讨提供一个可靠的实验基础。

[参 考 文 献]

[1] Moore PA, Belvedere O, Orr A, Pieri K, LaFleur DW, Feng P, et al. BLys; member of the tumor necrosis factor family and B lymphocyte stimulator[J]. Science, 1999, 285(5425): 260-263.
[2] Taga K, Taga H, Tosato G. Diagnosis of atypical cases of infectious mononucleosis [J]. Clin Infect Dis, 2001, 33(1): 83-88.
[3] 黄绍良,陈述枚,何政贤. 小儿内科学[M]. 北京:人民卫生出版社,2004,490-495.

[4] 张国元,黄榕,杨于嘉. 更昔洛韦治疗小儿传染性单核细胞增多症临床疗效分析[J]. 中国当代儿科杂志,2001,3(6):691-692.
[5] Verbeke CS, Wenthe U, Bergler WF, Zentgraf H. Characterization of the expanded T cell population in infectious mononucleosis: apoptosis, expression of apoptosis-related genes, and Epstein-Barr virus (EBV) status [J]. Clin Exp Immunol, 2002, 120(2): 294-300.
[6] Gross JA, Johnston J, Mudri S, Enselman R, Dillon SR, Madden K, et al. TACI and BCMA are receptors for a TNF homologue implicated in B-cell autoimmune disease [J]. Nature, 2000, 404(6781): 995-999.
[7] Yu G, Boone T, Delaney J, Hawkins N, Kelley M, Ramakrishnan M, et al. APRIL and TALL-1 and receptors BCMA and TACI: system for regulating humoral immunity [J]. Nat Immunol, 2000, 1(3): 252-256.
[8] Stohl W. Systemic lupus erythematosus: a blissless disease of too much BLyS(B lymphocyte stimulator) protein [J]. Curr Opin Rheumatol, 2002, 14(5): 522-528.
[9] Mariette X, Roux S, Zhang J, Bengoufa D, Lavie F, Zhou T, et al. The level of BLyS (BAFF) correlates with the titre of autoantibodies in human Sjogren's syndrome [J]. Ann Rheum Dis, 2003, 62(2): 168-171.
[10] Novak AJ, Darce JR, Arendt BK, Harder B, Henderson K, Kindsvogel W, et al. Expression of BCMA, TACI, and BAFF-R in multiple myeloma: a mechanism for growth and survival [J]. Blood, 2004, 103(2): 689-694.
[11] Krumbholz M, Theil D, Derfuss T, Rosenwald A, Schrader F, Monoranu CM, et al. BAFF is produced by astrocytes and up-regulated in multiple sclerosis lesions and primary central nervous system lymphoma [J]. J Exp Med, 2005, 201(2): 195-200.
[12] Rodriguez B, Valdez H, Freimuth W, William B, Butler TB, Asaad RA, et al. Plasma levels of B-lymphocyte stimulator increase with HIV disease progression [J]. AIDS, 2003, 17(13): 1983-1985.
[13] Novak AJ, Grote DM, Stenson M, Ziesmer SC, Witzig TE, Habermann TM, et al. Expression of BLyS and its receptors in B-cell non-Hodgkin lymphoma: correlation with disease activity and patient outcome [J]. Blood, 2004, 104(8): 2247-2253.
[14] Do Rk, Hatada E, Lee H, Tourigny MR, Hilbert D, Chen-Kiang S, et al. Attenuation of apoptosis underlies B lymphocyte stimulator enhancement of humoral immune responses [J]. J Exp Med, 2000, 192(7): 953-964.
[15] Mackay F, Mackay CR. The role of BAFF in B-cell maturation, T-cell activation and autoimmunity [J]. Trends Immunol, 2002, 23(3): 113-115.
[16] Cheema GS, Roschke V, Hilbert DM, Stohl W. Elevated serum B lymphocyte stimulator levels in patients with systemic immune-based rheumatic disease [J]. Arthritis Rheum, 2001, 44(8): 1313-1319.
[17] Stohl W, Metyas S, Tan SM, Cheema GS, Oamar B, Roschke V, et al. B lymphocyte stimulator overexpression in patients with systemic lupus erythematosus [J]. Arthritis Rheum, 2003, 48(12): 3475-3486.
[18] Briones J, Timmerman JM, Hilbert DM, Levy R. BlyS and BLyS receptor expression in non-Hodgkin's lymphoma [J]. Exp Hematol, 2002, 30(2): 135-141.

(本文编辑:吉耕中)