

论著·临床研究

## Notch 信号途径在儿童结核病中的作用研究

李奇凤<sup>1</sup> 贺湘焱<sup>2</sup> 辛涛<sup>3</sup>

(新疆维吾尔自治区人民医院 1. 新疆儿科研究所; 2. 科研教育中心, 新疆 乌鲁木齐 830001;  
3. 新疆维吾尔自治区胸科医院儿科, 新疆 乌鲁木齐 830049)

**[摘要]** **目的** 研究 Notch 信号途径相关分子在儿童结核病中的表达情况, 探讨其在儿童结核病发生中的作用。**方法** 选取 2017 年 6 月至 2018 年 12 月确诊的结核病患者 62 例为病例组, 另选取健康儿童 64 例为健康对照组, 采集外周静脉血 2 mL, 应用实时荧光定量 PCR 法检测白细胞中 Notch 信号途径相关分子 (受体 Notch1~4, 配体 Jagged1、2 和 DLL1、3、4, 下游靶基因 Hes1 和 Hey1) mRNA 水平。**结果** 与健康对照组相比, 病例组患儿白细胞中 Notch1、2 和 DLL4 mRNA 水平均显著升高 ( $P<0.05$ ); 病例组患儿白细胞中其他信号分子 Notch3、4, Jagged1、2, DLL1、3, Hes1 和 Hey1 mRNA 水平与健康对照组相比, 差异均无统计学意义 ( $P>0.05$ )。**结论** Notch1、2 和 DLL4 mRNA 水平在结核病患者中表达明显升高, 但下游靶基因表达无明显变化, 提示儿童结核菌感染后 Notch1、2 与其配体 DLL4 相互作用启动 Notch 信号途径, 可能通过作用于其他靶基因在儿童结核病中发挥作用, 需进一步研究探讨。**[中国当代儿科杂志, 2019, 21(10): 1012-1015]**

**[关键词]** 结核病; Notch 信号途径; 儿童

### Role of the Notch signaling pathway in children with tuberculosis

LI Qi-Feng, HE Xiang-Yan, XIN Tao. Xinjiang Institute of Pediatrics, People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830001, China (Email: liqiqi521@sina.com)

**Abstract: Objective** To study the expression of molecules associated with the Notch signaling pathway in children with tuberculosis, as well as the role of this pathway in the pathogenesis of tuberculosis in children. **Methods** A total of 62 children who were diagnosed with tuberculosis from June 2017 to December 2018 were enrolled as the case group, and 64 healthy children were enrolled as the healthy control group. Peripheral venous blood samples with a volume of 2 mL were collected, and quantitative real-time PCR was used to measure the mRNA expression levels of the molecules associated with the Notch signaling pathway (receptors Notch1-4, ligands Jagged1/2 and DLL1/3/4, and downstream target genes Hes1 and Hey1) in leukocytes. **Results** Compared with the healthy control group, the case group had significant increases in the mRNA expression levels of Notch1, Notch2, and DLL4 in leukocytes ( $P<0.05$ ), while there were no significant differences in the mRNA expression levels of Notch3/4, Jagged1/2, DLL1/3, Hes1, and Hey1 between the two groups ( $P>0.05$ ). **Conclusions** There are significant increases in the mRNA expression of Notch1/2 and DLL4 in children with tuberculosis, while there are no significant changes in the expression of downstream target genes, suggesting that the Notch signaling pathway, which is activated by the interaction between Notch1/2 and DLL4 after *Mycobacterium tuberculosis* infection, may play a role in childhood tuberculosis by acting on other target genes, and further studies are needed for clarification. **[Chin J Contemp Pediatr, 2019, 21(10): 1012-1015]**

**Key words:** Tuberculosis; Notch signaling pathway; Child

结核病仍是全球性最关注的公共卫生问题之一, WHO 最新报告显示: 2017 年全球新发结核病患者约 1000 万, 结核病发病率为 133/10 万, 其中小于 15 岁的新发儿童患者约 101 万, 占到新发患

者的 10%<sup>[1]</sup>。本课题组前期研究发现, 成人肺结核患者外周血中 Th2 细胞比例显著升高, Th1 细胞比例变化不明显, 存在 Th1/Th2 失衡, Notch 信号通路与 Th1/Th2 失衡相关, 阻断 T 细胞 Notch 信号

[收稿日期] 2019-04-03; [接受日期] 2019-09-03

[基金项目] 新疆维吾尔自治区自然科学基金 (2018D01C093)。

[作者简介] 李奇凤, 女, 博士, 副研究员。Email: liqiqi521@sina.com。

途径后会逆转这种失衡<sup>[2-4]</sup>,但在儿童结核病的研究中尚未见文献报道。Notch是高度保守的信号途径,在哺乳动物中有4个受体Notch1~4,5个配体Delta-like(DLL)1、3、4和Jagged(JAG)1、2,以及两类下游靶基因Hes和Hey家族,参与调控细胞分化、增殖和凋亡<sup>[5-6]</sup>。由于儿童的机体免疫系统尚未发育完善,与成人免疫存在一定差异,因此本研究拟采用实时荧光定量PCR法检测结核病患者白细胞中Notch信号途径相关分子的mRNA水平,初步探讨Notch信号途径在儿童结核病中的作用。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究对象

选取2017年6月至2018年12月在新疆维吾尔自治区胸科医院儿科就诊并住院的结核病患者62例为病例组,其中男38例,女24例,平均年龄 $7.8 \pm 4.5$ 岁,结核病诊断标准参见《中华人民共和国卫生行业标准肺结核诊断》(WS 288-2017)<sup>[7]</sup>。另选取同期于新疆维吾尔自治区人民医院进行健康体检的64例儿童为健康对照组,其中男28例,女36例,平均年龄 $8.6 \pm 3.7$ 岁,健康对照组儿童均有卡介苗接种史,无结核病接触史,无结核病相关临床表现及影像学表现,且年龄、性别与病例组患儿匹配,差异无统计学意义。

### 1.2 样本采集及处理

静脉采集病例组及健康对照组儿童外周血2 mL,应用溶血素进行红细胞裂解,留取白细胞,−80℃保存待检。

### 1.3 Notch信号途径相关分子mRNA水平检测

应用实时荧光定量PCR法检测受体Notch1~4,配体DLL1、3、4和JAG1、2,以及下游靶基因Hes1和Hey1的mRNA水平。试剂盒采用QuantiFast SYBR Green PCR Kit(德国Qiagen公司)。GenBank中检索目的基因和内参基因GAPDH cDNA序列,应用DNA MAN软件设计引物(表1),引物由上海生工生物股份有限公司合成。反应体系(20 μL):2×SYBR Green PCR Master Mix 10 μL,cDNA 1 μL,上、下游引物各0.5 μL(5 μmol/L),ddH<sub>2</sub>O 8 μL。反应条件:95℃预变性5 min;95℃ 10 s,60℃ 30 s,40个循环,并绘

制熔解曲线。记录每个反应管中的荧光信号到达所设定的阈值时所经历的循环数即Ct值,结果以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对目的基因进行定量。

表1 引物序列

引物	序列 (5' → 3')	片段长度 (bp)
Notch1-F	CACTGTGGCGGGTCC	85
Notch1-R	GTTGTATTGGTTCCGGACCAT	
Notch2-F	TGCCAAGCTCAGTGGTGTGTA	132
Notch2-R	TGCTAGGCTTTGTGGGATTCAG	
Notch3-F	GGTTCCCACTGACCACCCTTAC	99
Notch3-R	GTGGATTCCGACCAGTCTGAGAG	
Notch4-F	CGGCCTCGGACTCAGTCA	109
Notch4-R	CAACTCCATCCTCATCAACTTCTG	
DLL1-F	TGTGTGACGAACACTACTACGGAG	76
DLL1-R	GTGAAGTGGCCGAAGGCA	
DLL3-F	GAGACACCCAGGTCCTTTGA	152
DLL3-R	CAGTGGCAGATGTAGGCAGA	
DLL4-F	GTTATTGGATGAGCAAACCAGC	162
DLL4-R	AGGCAGGACAAGTTGCCATCTG	
JAG1-F	GCTGGCAAGGCTCTACTG	100
JAG1-R	ACTGCCAGGGCTCATTACAGA	
JAG2-F	AAGGTGGAGACGGTTCTTACGG	144
JAG2-R	GCGCCAGGATCTTTGGTGAAT	
Hes1-F	TCAACACGACACCGGATAAA	111
Hes1-R	TCAGCTGGCTCAGACTTTCA	
Hey1-F	GCGTTATCTGAGCATCATTGAAGG	88
Hey1-R	CTGGGAAGCGTAGTTGTTGAGA	
GAPDH-F	TCCATCACCATCTTCCAGGAGCG	125
GAPDH-R	CCTGCAAATGAGCCCCAGCCTTCTC	

### 1.4 统计学分析

采用SPSS 17.0统计软件对数据进行统计学分析。符合正态分布计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组间比较采用t检验;不符合正态分布计量资料采用中位数(四分位间距)[ $M(P_{25}, P_{75})$ ]表示,两组间比较采用Mann-Whitney U检验。计数资料采用构成比(%)表示,两组间比较采用卡方检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 结核患儿临床资料

62例确诊的结核病患者,均为初治患者且无

其他合并症，均未接受过抗痨治疗。其中原发性肺结核 12 例，继发性肺结核 16 例，气管 / 支气管结核 5 例，血行播散性肺结核 9 例，结核性胸膜炎 13 例，结核性脑膜炎 7 例；结核菌素试验阳性 45 例，阴性 17 例；结核感染 T 细胞检测结果阳性 37 例，阴性 25 例；卡介苗接种 48 例，未接种 9 例，不祥 5 例；与结核病患者接触 51 例，未接触 7 例，不祥 4 例；抗酸染色痰涂片结果阳性 9 例，阴性 40 例，未做 13 例。

## 2.2 两组外周血中 Notch1~4 mRNA 表达水平

与健康对照组比较，病例组患儿 Notch1

mRNA 和 Notch2 mRNA 表达水平明显升高 ( $P < 0.05$ )，两组 Notch3 mRNA 和 Notch4 mRNA 表达水平比较，差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )，见表 2。

## 2.3 两组外周血中 JAG mRNA 和 DLL mRNA 水平

与健康对照组比较，病例组 DLL4 mRNA 表达水平明显升高 ( $P < 0.05$ )，其他 JAG mRNA 和 DLL mRNA 表达水平在两组间比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )，见表 3。

表 2 两组儿童 Notch1~4 mRNA 水平比较 [M (P<sub>25</sub>, P<sub>75</sub>)]

组别	n	Notch1	Notch2	Notch3	Notch4
健康对照组	64	0.93(0.49, 2.26)	1.05(0.50, 1.98)	0.91(0.38, 2.87)	1.09(0.37, 2.37)
病例组	62	1.86(1.19, 4.08)	1.62(1.15, 2.42)	0.79(0.18, 3.81)	0.66(0.17, 3.59)
Z 值		1.660	1.438	0.702	1.104
P 值		0.008	0.032	0.708	0.174

表 3 两组儿童 JAG mRNA 和 DLL mRNA 水平比较 [M (P<sub>25</sub>, P<sub>75</sub>)]

组别	n	JAG1	JAG2	DLL1	DLL3	DLL4
健康对照组	64	0.90(0.53, 1.94)	0.94(0.49, 1.42)	0.90(0.53, 1.94)	0.86(0.35, 3.16)	0.20(0.04, 1.48)
病例组	62	0.21(0.15, 2.92)	0.86(0.43, 1.98)	0.72(0.23, 1.27)	1.29(0.31, 4.78)	1.58(0.45, 3.00)
Z 值		1.222	0.638	0.913	0.839	1.503
P 值		0.101	0.810	0.375	0.481	0.022

## 2.4 两组外周血中靶基因 Hes1 mRNA 和 Hey1 mRNA 水平

与对照组比较，病例组 Hes1 mRNA 和 Hey1 mRNA 表达水平无明显变化，差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )，见表 4。

表 4 两组儿童 Hes1 mRNA 和 Hey1 mRNA 水平比较 [M (P<sub>25</sub>, P<sub>75</sub>)]

组别	n	Hes1	Hey1
健康对照组	64	0.99(0.63, 1.81)	0.92(0.43, 3.05)
病例组	62	0.63(0.32, 2.70)	1.46(0.18, 5.18)
Z 值		1.305	1.072
P 值		0.066	0.201

## 3 讨论

Notch 信号途径参与急性淋巴细胞白血病<sup>[8]</sup>，

成骨、破骨细胞和血管生成<sup>[9]</sup>，细胞命运与器官形态发生<sup>[10]</sup>等。但是不同的疾病中，Notch 信号途径相关受体、配体和靶基因表达有差异，国外有学者报道，牛分枝杆菌感染的小鼠模型中，Notch1、Notch3、JAG1、DLL-1、DLL-3 和 Hes1 表达上调<sup>[11]</sup>，本课题组前期研究发现，成人肺结核病外周血中 Notch1~4、JAG2 和 Hes1 表达上调<sup>[12]</sup>，尤其 Notch1 表达上调与 Th2 细胞比例升高密切相关<sup>[13-14]</sup>。小鼠模型中，小肠切除 (SBR) 导致隐窝上皮细胞增殖，JAG-1、Hes-1 mRNA 和蛋白的表达及 NICD1 增加<sup>[15]</sup>。本研究结果发现 Notch1、2 和 DLL4 在儿童结核病中表达明显升高，而其他受体、配体和下游靶基因表达无明显变化，与前期研究<sup>[11-12,15]</sup>结果不一致，可能与结核病患儿机体免疫系统发育不完善有关，此研究结果提示儿童感染结核菌后 Notch1、2 活化与其配体 DLL4 相互作用启动 Notch 信号途径，但如何发挥作用呢？有

研究表明, Notch 信号途径活化后不止作用其相关通路上的靶基因 Hey 和 Hes 家族, 还可以作用于其他基因 (如: GATA3) 协同调控 CD4<sup>+</sup> T 向 Th1/Th2 类型分化或 2 型固有淋巴细胞 (ILC2) 发育, Notch 信号的强弱决定了人类祖细胞的分化方向, 弱的 Notch 信号促使 T 细胞发育, 强的 Notch 信号促使 ILC2 发育<sup>[16-17]</sup>。ILC2 均可以通过多种效应细胞因子调控不同信号通路, 在多种疾病的发生中发挥重要作用<sup>[18]</sup>。所以, 推测 Notch 信号途径可能通过作用于其他靶基因调控免疫细胞的分化和发育在儿童结核病中发挥作用, 为进一步深入儿童结核病发病机制的研究奠定了基础。

Notch 信号途径的每一受体或者配体所发挥的作用不同, 促使机体产生的免疫应答不一样, 对疾病免疫平衡的影响也不一样<sup>[19-20]</sup>。研究发现, T 细胞上 Notch1 或 Notch2 的表达, 小鼠体内产生 Th2 细胞免疫反应<sup>[19]</sup>。本课题组前期研究发现, 结核患儿体内 IL-9 mRNA 水平升高, IL-9 为 Th2 型细胞因子<sup>[21]</sup>, 是否本研究结核患儿中 Notch1 和 Notch2 表达增高与 IL-9 有关, 有待进一步深入研究。

综上所述, 由于儿童与成人机体免疫存在一定的差距, 导致其与成人结核病发病机制不同, 虽本课题组前期研究发现了 Notch 信号途径参与成人结核病 Th1/Th2 失衡, 但从本研究结果可以看出, 在儿童与成人结核病外周血中 Notch 信号途径各分子 mRNA 水平存在差异, 提示 Notch 信号途径可能在儿童与成人结核病中发挥作用机制有所不同, 不能单纯的将 Notch 信号途径在成人结核病中的作用套用在儿童结核病中, 本课题组将进一步应用动物模型深入研究 Notch 信号途径在儿童结核病中的作用。

#### [参 考 文 献]

- [1] World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2018[EB/OL]. (2018-9-18). [https://www.who.int/tb/publication/global\\_report/en/](https://www.who.int/tb/publication/global_report/en/)
- [2] Li Q, Zhang H, Yu L, et al. Down-regulation of Notch signaling pathway reverses the Th1/Th2 imbalance in tuberculosis patients[J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 54: 24-32.
- [3] 李奇凤, 张慧, 余亮, 等. 结核病患者 T 细胞 Notch1 基因表达对 IFN- $\gamma$  和 IL-4 调控作用[J]. *国际呼吸杂志*, 2018, 38(13): 972-977.
- [4] 李奇凤, 赵晶, 余亮, 等. Notch1 表达水平与肺结核患者外周血 Th1/Th2 比例的相关性[J]. *热带医学杂志*, 2018, 18(6): 729-732.
- [5] Haseeb M, Anwar MA, Choi S. Molecular interactions between innate and adaptive immune cells in chronic lymphocytic leukemia and their therapeutic implications[J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 2720.
- [6] Bazzoni R, Bentivegna A. Role of notch signaling pathway in glioblastoma pathogenesis[J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(3): pii: E292.
- [7] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. WS 288-2017 中华人民共和国卫生行业标准肺结核诊断[S]. (2017-11-09). <http://www.nhc.gov.cn/ewebeditor/uploadfile/2017/11/20171128164254246>.
- [8] Tsaouli G, Ferretti E, Bellavia D, et al. Notch/CXCR4 partnership in acute lymphoblastic leukemia progression[J]. *J Immunol Res*, 2019, 2019: 5601396.
- [9] Luo Z, Shang X, Zhang H, et al. Notch signaling in osteogenesis, osteoclastogenesis, and angiogenesis[J]. *Am J Pathol*, 2019, 189(8): 1495-1500.
- [10] Lloyd-Lewis B, Mourikis P, Fre S. Notch signalling: sensor and instructor of the microenvironment to coordinate cell fate and organ morphogenesis[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2019, 61: 16-23.
- [11] Narayana Y, Balaji KN. NOTCH1 up-regulation and signaling involved in Mycobacterium bovis BCG-induced SOCS3 expression in macrophages[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(18): 12501-12511.
- [12] 李奇凤. Notch 信号通路调控 Th1/Th2 平衡在结核菌感染中的作用研究[D]. 乌鲁木齐, 新疆医科大学: 2017.
- [13] 李奇凤, 赵晶, 余亮, 等. Notch1 表达水平与肺结核患者外周血 Th1/Th2 比例的相关性[J]. *热带医学杂志*, 2018, 18(6): 729-732.
- [14] 李奇凤, 张慧, 余亮, 等. 结核病患者 T 细胞 Notch1 基因表达对 IFN- $\gamma$  和 IL-4 调控作用[J]. *国际呼吸杂志*, 2018, 38(13): 972-977.
- [15] Chen G, Sun L, Yu M, et al. The Jagged-1/Notch-1/Hes-1 pathway is involved in intestinal adaptation in a massive small bowel resection rat mode[J]. *Dig Dis Sci*, 2013, 58(9): 2478-2486.
- [16] Chiplunkar SV, Gogoi D. The multifaceted role of Notch signal in regulating T cell fate[J]. *Immunol Lett*, 2019, 206: 59-64.
- [17] van der Ploeg EK, Carreras Mascaró A, Huylebroeck D, et al. Group 2 innate lymphoid cells in human respiratory disorders[J]. *J Innate Immun*, 2019, 6: 1-16.
- [18] Mindt BC, Fritz JH, Duerr CU. Group 2 innate lymphoid cells in pulmonary immunity and tissue homeostasis[J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 840.
- [19] Viecelli Dalla Sega F, Fortini F, Aquila G, et al. Notch signaling regulates immune responses in atherosclerosis[J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 1130.
- [20] Auderset F, Schuster S, Coutaz M, et al. Redundant Notch1 and Notch2 signaling is necessary for IFN $\gamma$  secretion by T helper 1 cells during infection with *Leishmania major*[J]. *PLoS Pathog*, 2012, 8(3): e1002560.
- [21] Li Q, Yu L, Xin T, et al. Increased IL-9 mRNA expression as a biomarker to diagnose childhood tuberculosis in a high burden settings[J]. *J Infect*, 2015, 71(2): 273-276.

( 本文编辑: 万静 )