

DOI:10.13602/j.cnki.jcls.2021.12.09

· “迈瑞杯”临检发展专栏 ·

结核性溃疡患者血浆 CXCL9、CXCL10 水平分析及临床意义*

李鑫^a, 徐卫平^a, 臧莹^a, 钱佳燕^b, 黄子慧^b (南京市中西医结合医院 a. 检验科, b. 瘰癧科, 南京 210014)

摘要:目的 探讨结核性溃疡患者血浆中趋化因子(C-X-C 基序)配体 9(CXCL9)、趋化因子(C-X-C 基序)配体 10(CXCL10)的临床价值。方法 收集南京市中西医结合医院结核性溃疡患者 108 例作为结核性溃疡组,非结核性溃疡患者 27 例及健康人 36 例作为对照组。用定量逆转录 PCR(quantitative reverse transcription PCR, RT-qPCR)法检测各组血浆中 CXCL9、CXCL10 mRNA 的表达水平,绘制 ROC 曲线,分析敏感性、特异性。结果 与对照组相比,结核性溃疡患者的 CXCL9、CXCL10 明显升高($P < 0.01$);CXCL9 诊断结核性溃疡的 ROC 曲线下面积(AUC)值为 0.875, cut off 值为 0.220 时,敏感性为 86.1%,特异性为 84.1%;CXCL10 诊断结核性溃疡的 AUC 值为 0.911, cut off 值为 4.232 时,敏感性为 90.7%,特异性为 87.3%;CXCL9 和 CXCL10 联合检测,敏感性为 92.6%,特异性为 77.8%。结论 CXCL9 和 CXCL10 可为结核性溃疡诊断标志物的选择提供参考。

关键词:结核性溃疡;趋化因子;定量逆转录 PCR

中图分类号:R446.6

文献标志码:A

结核性溃疡是指结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB)、牛分枝杆菌、卡介苗等经各种传播路径侵犯机体局部组织^[1],引起病灶周围软组织、皮下及皮肤的坏死,最终液化破溃所形成的创面,为肺外结核的一种,是临床常见的一种特异性感染性创面^[2]。其在临床上与某些慢性难愈性创面表现极为相似,难以鉴别,目前尚未发现诊断结核性溃疡具有较高特异性、灵敏度及快捷方便的检测指标及检测手段^[3]。

分枝杆菌主要感染机体的免疫防御细胞,在机体内复制与传播,而免疫防御细胞的募集在很大程度上取决于趋化因子的释放。其中趋化因子(C-X-C 基序)配体 9(C-X-C motif chemokine 9, CXCL9)、趋化因子(C-X-C 基序)配体 10(C-X-C motif chemokine 10, CXCL10)主要对单核细胞和淋巴细胞等具有趋向作用。已有研究表明, CXCL9、CXCL10 与结核相关疾病的发生相关,是结核特异性反应介导炎症的重要介质^[4-7],在治疗反应、基因调控和疾病转归中发挥着重要作用^[8]。本研究基于定量逆转录 PCR(quantitative reverse transcription PCR, RT-qPCR)技术快速检测结核性溃疡、非结核性溃疡患者及健康人体内血浆 CXCL9、CXCL10 的表达情况,评价 CXCL9、CXCL10 在结核性溃疡患

者中的诊断效能。

1 材料与方法

1.1 研究对象 收集 2018 年—2020 年南京中医药大学附属南京市中西医结合医院瘰癧科结核性溃疡患者 108 例,男 41 例,女 67 例,年龄(43.45 ± 17.23)岁,纳入结核性溃疡组。结核性溃疡诊断参照《现代结核病学》^[9]和《常见疾病的诊断与疗效判定(标准)》^[10]的有关标准:脓肿破溃后脓液稀薄,夹有败絮样物,疮口潜行,久不愈合;组织病理证实为结核病,或脓液涂片找到抗酸杆菌;可有肺结核病史或接触史;伴有低热、盗汗、神疲、乏力、消瘦等全身症状。另收集同期非结核性溃疡患者 27 例,包括压力性溃疡 5 例,下肢静脉性溃疡 6 例,糖尿病足 6 例,皮肤和软组织感染 6 例和烧伤患者 4 例,男 12 例,女 15 例,年龄(46.31 ± 14.23)岁,纳入疾病对照组,既往无结核病病史及接触史。发病部位均在躯干、四肢,溃疡面积 4~16 cm²,窦道长度 2~4 cm。收集同期健康人 36 例(来自医院体检中心),男 16 例,女 20 例,年龄(41.28 ± 11.47)岁,纳入健康人对照组,既往无结核病病史及接触史,皮肤表面无溃疡创面。以上入组对象皆符合排除标准:(1)合并有造血系统、肝、肾及心脑血管等严重

* 基金项目:江苏省中医药科技项目(YB2017042)。

作者简介:李鑫,1976 年生,男,副主任技师,大学本科,研究方向为分子生物学。

通信作者:黄子慧,主任中医师,硕士, E-mail:664731747@qq.com。

原发性疾病及继发疾病者；(2) 妊娠或哺乳期妇女；(3) 精神病患者；(4) 免疫功能受损者(有症状的 HIV 感染、已确诊或疑似的 HIV 感染、白血病、淋巴瘤或全身性恶性疾病等)；(5) 活动性肺结核患者。3 组间年龄、性别分布差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。本研究通过南京市中西医结合医院伦理委员会伦理审查(文件批号:201901001),所有纳入患者均为自愿参与并签署书面知情同意书。

1.2 样本采集 采集 2 mL 全血样本放入 EDTA 抗凝管中,在 2 h 内 4 °C、2 500 r/min 离心 5 min,取上层血浆样本放入 1.5 mL EP 管中并置于 4 °C 保存。

1.3 主要仪器与试剂 LightCycler 480 实时荧光定量 PCR 仪(罗氏公司);2720 thermal cycler 普通 PCR 仪(Life technologies 公司)。TRIzol™ LS 试剂(Thermo Fisher Scientific 公司,批号 10296010);PrimeScript™ PT Master Mix(Perfect Real Time)试剂盒(TaKaRa 公司,批号 RR036A);ChamQ™ SYBR® qPCR Master Mix (Without ROX) 试剂盒(南京诺唯赞公司,批号 Q321-02)。

1.4 方法

1.4.1 RNA 提取及逆转录反应 血浆总 RNA 的提取采用 TRIzol™ LS 试剂,按试剂说明书进行。使用核酸测定仪检测各样本 RNA 浓度,配制逆转录反应液 10 μL,包括 5×PrimeScript RT Master Mix (Perfect Real Time) 2 μL, RNA 样本 < 500 ng, 加 RNase Free dH₂O 至 10 μL,轻柔混匀后在普通 PCR 仪进行逆转录反应,反应条件:37 °C 15 min,85 °C 5 s,4 °C。

1.4.2 PCR 引物设计与合成 根据 GenBank 公布的人 CXCL9 基因(登录号:BC063122.1,基因序列如 SEQ ID NO.1 所示)和人 CXCL10 基因(登录号:BC010954.1,基因序列如 SEQ ID NO.2 所示)的编码序列,用 Primer Premier 软件设计 RT-qPCR 扩增引物,以 U6 为内参基因,由上海生工生物工程公司合成。引物序列见表 1。

表 1 定量 PCR 检测引物

基因名称	引物序列(5'→3')
U6	F:CGCTTCGGCAGCACATATACTA R:CGCTTCACGAATTTCCGTGTCA
CXCL9	F:CAGTAGTGAGAAAGGGTGC R:CATCTGCTGAATCTGGGTT
CXCL10	F:AGAACTGTACGCTGTACCTG R:GTAGCAATGATCTCAACACG

1.4.3 定量 PCR 检测 反应体系:2×ChamQ SYBR

qPCR Master Mix (Without ROX) 5 μL,上、下游引物(10 μmol/L)各 0.4 μL,模板 cDNA 0.1 μL, dd H₂O 4.1 μL。以 CXCL9 为引物时,反应条件为:95 °C 1 min;95 °C 5 s,56 °C 24 s,72 °C 15 s,35 个循环;50 °C 延伸 30 s 获得荧光。以 CXCL10 为引物时,反应条件为:95 °C 1 min;95 °C 5 s,55 °C 24 s,72 °C 15 s,35 个循环;50 °C 延伸 30 s 获得荧光。每个样品一式 2 份进行测试。由于内参 U6 很稳定,在以上 2 个条件下无区别,故根据同孔板研究对象设置。通过 2^{-ΔCt} 法分析各组中 CXCL9、CXCL10 的相对表达水平。实验组 ΔCt = 实验组的 Ct 值 - 内参基因 U6 的 Ct 值。

1.5 统计学分析 用 SPSS 23.0 软件进行。计量资料进行组间比较时,先进行正态性检验,若服从正态分布,用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用成组设计资料的 t 检验;若不服从正态分布,用中位数和四分位数表示,采用 Wilcoxon 秩和检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。为评估 CXCL9、CXCL10 在结核病检测中的诊断价值,通过 R 语言(R Studio)绘制 ROC 曲线,分别计算 CXCL9、CXCL10 的曲线下面积(AUC),确定最佳诊断临界值(cut off 值)及血浆 CXCL9、CXCL10 诊断结核性溃疡的特异性及敏感性。

2 结果

2.1 血浆中 CXCL9 和 CXCL10 mRNA 的相对表达水平 与对照组(0.40±0.01,1.18±0.29)相比,疾病组患者的 CXCL9、CXCL10 mRNA 表达水平明显升高(1.43±0.36,12.53±6.18),差异有统计学意义(t 分别为 5.954、5.421, P 均 < 0.000 1)。

2.2 ROC 曲线分析 CXCL9、CXCL10 诊断结核性溃疡的 AUC 为 0.938 和 0.915,见图 1。当 CXCL9、CXCL10 的 cut off 值分别为 0.220、4.232 时,2 个趋化因子组合对结核性溃疡的敏感性、特异性分别为 92.6%、77.8%。见表 2。

3 讨论

本次研究非结核性溃疡患者包括压力性溃疡、下肢静脉性溃疡、糖尿病足、皮肤和软组织感染和烧伤患者。在临床上,可根据患者的病史和临床表现予以鉴别诊断。但是,在疾病晚期、机体免疫低下、伤口暴露情况下,易感结核杆菌,往往临床诊断困难,延误治疗。故本次研究将非结核性溃疡患者作为对照组之一。经数据分析后发现,与对照组相比,结核性溃疡患者血浆中 CXCL9、CXCL10 呈高

表达状态,说明机体内 CXCL9 与 CXCL10 的表达受 MTB 影响。ROC 曲线分析发现,两组基因的 AUC 值均大于 0.9,表明辅助诊断结核性溃疡效果佳。以 cut off 值为临界值,单独使用 CXCL9 检测或 CXCL10检测均可诊断结核性溃疡疾病,但采用

CXCL9 和 CXCL10 联合检测的灵敏度更高,判断检测效果更好。由于实验条件的限制,此次研究样本量较少,未深入验证相关趋化因子在治疗反应、基因调控和疾病转归等方面的表现及作用,有待进一步补充病例研究。

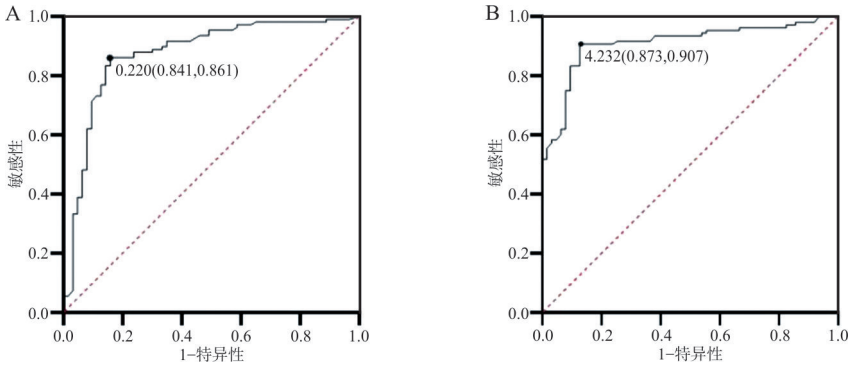


图 1 CXCL9(A)和 CXCL10(B)的 ROC 曲线分析

表 2 CXCL9 和 CXCL10 诊断结核性溃疡的效能

检测指标	对照组	疾病组	敏感性 (%)	特异性 (%)	
CXCL9	阴性	53	15	86.1	84.1
	阳性	10	93		
CXCL10	阴性	55	10	90.7	87.3
	阳性	8	98		
CXCL9+CXCL10 联合诊断	阴性	49	8	92.6	77.8
	阳性	14	100		

4 参考文献

[1] Yang TT, Su YC. A rare case of tuberculosis Verrucosa cutis on the buttocks[J]. Kaohsiung J Med Sci, 2020, 36(3): 222-223.

[2] 孙佳玥, 黄子慧, 钱佳燕, 等. 泄毒生新法外治结核性溃疡经验[J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(7): 4037-4040.

[3] Bellet JS, Prose NS. Skin complications of Bacillus Calmette-Guérin immunization[J]. Curr Opin Infect Dis, 2005, 18(2): 97-100.

[4] Yang Q, Cai Y, Zhao W, et al. IP-10 and MIG are compartmentalized at the site of disease during pleural and meningeal tuberculosis and are decreased after antituberculosis treatment[J]. Clin Vaccine Immunol, 2014, 21(12): 1635-1644.

[5] Ravindran R, Krishnan VV, Khanum A, et al. Exploratory study on plasma immunomodulator and antibody profiles in tuberculosis patients[J]. Clin Vaccine Immunol, 2013, 20(8): 1283-1290.

[6] Ali ZA, Mankhi AA, Ad'hiah AH. Significance of the chemokine CXCL10 and human beta-defensin-3 as biomarkers of pulmonary tuberculosis[J]. Tuberculosis (Edinb), 2021, 128: 102078.

[7] Bhattacharyya C, Majumder PP, Pandit B. CXCL10 is overexpressed in active tuberculosis patients compared to *M. tuberculosis*-exposed household contacts[J]. Tuberculosis, 2018, 109: 8-16.

[8] Latorre I, Díaz J, Mialdea I, et al. IP-10 is an accurate biomarker for the diagnosis of tuberculosis in children[J]. J Infect, 2014, 69(6): 590-599.

[9] 谢惠安. 现代结核病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 380-389.

[10] 中华医学会. 临床诊疗指南: 结核病分册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006.

(收稿日期:2021-04-06)

(本文编辑:刘群)