

DOI:10.13350/j.cjpb.241204

• 论著 •

# 1,25-二羟维生素 D(1,25-(OH)<sub>2</sub>D)和 CYP27A1 mRNA 表达与肺结核的相关性研究\*

田中秋<sup>1</sup>,李慧<sup>2</sup>,欧阳青<sup>1\*</sup>\*

(1.长沙市第一医院结核科,湖南长沙 410000;2.长沙市第一医院呼吸与危重症医学科)

**【摘要】** 目的 探讨肺结核(PTB)患者中1,25-二羟维生素 D(1,25-(OH)<sub>2</sub>D)水平和 CYP27A1 mRNA 表达水平的变化,并分析其与炎症指标、免疫细胞亚群及细菌负荷的相关性。方法 本研究纳入90名确诊的PTB患者和45名健康对照者,进行了全面的临床评估和样本收集。采用高效液相色谱-串联质谱法(HPLC-MS/MS)测定1,25-(OH)<sub>2</sub>D水平,定量实时反转录聚合酶链反应(qRT-PCR)技术测定 CYP27A1 mRNA 表达水平。酶联免疫吸附试验(ELISA)用于测定血清中的炎症指标,包括C-反应蛋白(CRP)、红细胞沉降率(ESR)和白细胞介素-6(IL-6)。流式细胞仪用于分析免疫细胞亚群,包括CD4<sup>+</sup>T细胞、CD8<sup>+</sup>T细胞、自然杀伤(NK)细胞和调节性T细胞(Treg)。细菌负荷通过痰液中的结核分枝杆菌(Mtb)计数来评估。结果 研究发现,与健康对照组相比,PTB患者组的1,25-(OH)<sub>2</sub>D水平显著降低( $P < 0.01$ ),而 CYP27A1 mRNA 表达水平则显著升高( $P < 0.01$ )。1,25-(OH)<sub>2</sub>D水平与CRP、ESR和IL-6水平呈负相关(分别为 $r = -0.701, P < 0.01; r = -0.465, P < 0.01; r = -0.715, P < 0.01$ ),与CD4<sup>+</sup>T、CD8<sup>+</sup>T、NK、Treg细胞计数呈正相关(分别为 $r = 0.356, P < 0.01; r = 0.213, P < 0.05; r = 0.313, P < 0.05; r = 0.430, P < 0.01$ )。CYP27A1 mRNA水平与炎症指标呈正相关(分别为 $r = 0.774, P < 0.01; r = 0.619, P < 0.01; r = 0.799, P < 0.01$ ),与CD8<sup>+</sup>T细胞计数呈负相关( $r = -0.230, P < 0.05$ )。此外,1,25-(OH)<sub>2</sub>D水平与细菌负荷呈负相关( $r = -0.327, P < 0.01$ ),而 CYP27A1 mRNA水平与细菌负荷呈正相关( $r = 0.430, P < 0.01$ )。结论 1,25-(OH)<sub>2</sub>D和 CYP27A1 mRNA在PTB患者中的表现与健康对照组存在显著差异,并与炎症、免疫和细菌负荷具有密切的相关性。这些生物标志物可能在肺结核的发病机制和治疗反应评估中发挥作用,为未来的研究和临床应用提供了新的视角。

**【关键词】** 1,25-二羟维生素 D;CYP27A1;肺结核;炎症;免疫细胞;细菌负荷

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1673-5234(2024)12-1408-05

[Journal of Pathogen Biology. 2024 Dec.;19(12):1408-1412,1419.]

## The Correlation Between 1,25-Dihydroxyvitamin D (1,25-(OH)<sub>2</sub>D) and CYP27A1 mRNA Expression with Pulmonary Tuberculosis

TIAN Zhongqiu<sup>1</sup>, LI Hui<sup>2</sup>, OUYANG Qing<sup>1</sup> (1. Department of Tuberculosis, Changsha First Hospital, Changsha 410000, China; 2. Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Changsha First Hospital) \*\*\*

**【Abstract】** **Objective** To investigate the levels of 1,25-dihydroxyvitamin D (1,25-(OH)<sub>2</sub>D) and the expression of CYP27A1 mRNA in patients with pulmonary tuberculosis (PTB) and to analyze their correlations with inflammatory markers, immune cell subsets, and bacterial load. **Methods** This study included 90 diagnosed PTB patients and 45 healthy controls, all of whom underwent comprehensive clinical evaluation and sample collection. The levels of 1,25-(OH)<sub>2</sub>D were determined using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS), and the expression levels of CYP27A1 mRNA were measured by quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to measure serum inflammatory markers, including C-reactive protein (CRP), erythrocyte sedimentation rate (ESR), and interleukin-6 (IL-6). Flow cytometry was utilized to analyze immune cell subsets, including CD4<sup>+</sup>T cells, CD8<sup>+</sup>T cells, natural killer (NK) cells, and regulatory T cells (Treg). Bacterial load was assessed by counting Mycobacterium tuberculosis (Mtb) in sputum. **Results** The study found that compared to the healthy control group, the levels of 1,25-(OH)<sub>2</sub>D in the PTB patient group were significantly reduced ( $P < 0.01$ ), while the expression levels of CYP27A1 mRNA were significantly increased ( $P < 0.01$ ). The levels of 1,25-(OH)<sub>2</sub>D were negatively correlated with CRP, ESR, and IL-6 levels ( $r = -0.701, P < 0.01; r = -0.465, P < 0.01; r = -0.715, P < 0.01$ , respectively) and positively correlated with the counts of CD4<sup>+</sup>T, CD8<sup>+</sup>

\* **【基金项目】** 湖南省自然科学基金青年基金项目(No. 2023JJ40065)。

\*\* **【通讯作者】** 欧阳青, E-mail: 13874972562@163.com

**【作者简介】** 田中秋(1979-),女,湖南常德人,硕士,主治医师,主要从事呼吸内科疾病诊疗工作。E-mail: 13548698736@163.com

T, NK, and Treg cells ( $r=0.356, P<0.01; r=0.213, P<0.05; r=0.313, P<0.05; r=0.430, P<0.01$ , respectively). CYP27A1 mRNA levels were positively correlated with inflammatory markers ( $r=0.774, P<0.01; r=0.619, P<0.01; r=0.799, P<0.01$ , respectively) and negatively correlated with the count of CD8<sup>+</sup> T cells ( $r=-0.230, P<0.05$ ). Moreover, the levels of 1,25-(OH)<sub>2</sub>D were negatively correlated with bacterial load ( $r=-0.327, P<0.01$ ), while CYP27A1 mRNA levels were positively correlated with bacterial load ( $r=0.430, P<0.01$ ). **Conclusion** The study reveals significant differences in the expression of 1,25-(OH)<sub>2</sub>D and CYP27A1 mRNA in PTB patients compared to healthy controls and demonstrates a close correlation with inflammation, immunity, and bacterial load. These biomarkers may play a role in the pathogenesis of pulmonary tuberculosis and in the evaluation of treatment response, offering new perspectives for future research and clinical applications.

**【Keywords】** 1,25-Dihydroxyvitamin D; CYP27A1; pulmonary tuberculosis; inflammation; immune cells; bacterial load

结核病 (Tuberculosis, TB) 是一种由结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, Mtb) 引起的全球性传染病<sup>[1]</sup>, 对人类健康构成重大威胁<sup>[2]</sup>。肺结核 (Pulmonary Tuberculosis, PTB) 是结核病中最常见的形式, 其特征是形成肉芽肿和潜在的进行性、破坏性肺部病变<sup>[3]</sup>。维生素 D, 尤其是其活性形式 1,25-二羟维生素 D (1,25-(OH)<sub>2</sub>D), 已被发现在宿主应对呼吸道病毒时调节免疫系统中发挥重要作用<sup>[4-5]</sup>, 在 PTB 的患者中也有发现 1,25-(OH)<sub>2</sub>D 含量的减少<sup>[6-7]</sup>。基础研究表明, 在沙门氏菌感染<sup>[8]</sup>、类风湿性关节炎<sup>[9]</sup>、以及 COVID-19<sup>[10]</sup> 中, 1,25-(OH)<sub>2</sub>D 通过与其核受体维生素 D 受体 (Vitamin D Receptor, VDR) 结合, 影响多种免疫细胞的活性, 进而影响细胞因子的产生和免疫应答的调节。1,25-(OH)<sub>2</sub>D 的合成受到多种因素的调控, 其中包括由 CYP27A1 酶催化的第一步限速反应<sup>[11]</sup>。CYP27A1 基因的表达和活性在维生素 D 的生物合成中起着至关重要的作用<sup>[12]</sup>。在肺结核患者中, 目前已经发现 CYP27B1 与可能影响 1,25-(OH)<sub>2</sub>D 的生成, 进而影响 PTB 的进程<sup>[13]</sup>。然而, 目前关于 CYP27A1 mRNA 在 PTB 中的作用和其与 1,25-(OH)<sub>2</sub>D 水平的相关性研究较少。

本研究旨在探讨 1,25-(OH)<sub>2</sub>D 和 CYP27A1 mRNA 在 PTB 患者中的表达水平, 并分析与炎症指标、免疫细胞亚群、细菌负荷和治疗反应的相关性, 以期为 PTB 的免疫调节机制提供新的见解, 并探索潜在的生物标志物。

## 材料与方 法

### 1 研究对象

本研究纳入 2023 年 1 月-2024 年 4 月在长沙市第一医院接诊的 PTB 患者。经过所有参与者均在接受全面的临床评估, 包括病史收集、体格检查、胸部 X 光和实验室检测。本研究的纳排标准如下, 最终有 PTB 患者 90 人参与此次研究。

纳入标准: ①年龄在 18 至 65 岁之间; ②根据临床症状、影像学特征、痰涂片检查和(或)培养结果确诊为

PTB 的患者; ③愿意参与研究并签署知情同意书。

排除标准: ①有其他重大心肺疾病、肝脏疾病、肾脏疾病或自身免疫疾病的患者; ②孕妇或哺乳期妇女; ③近 3 个月内参加过其他药物或干预研究的患者; ④对研究中使用的任何药物或试剂有过敏史的患者; ⑤研究者判断不适合参与研究的其他情况。

另外从本院体检中心招募健康人群 45 人作为健康对照组。所有患者在入院治疗前基线资料均保持一致, PTB 患者组年龄 38.13±5.28 岁, 其中男性患者 48 人 (53.33%), 女性患者 42 人 (46.67%), 健康对照组 36.22±4.31 岁, 其中男性 22 人 (48.89%), 女性 23 人 (51.11%), 研究结果可比性。

本研究符合世卫组织赫尔辛基宣言伦理准则且通过单位伦理委员会审批同意。

### 2 样本收集与处理

外周血样本在清晨空腹状态下采集, 以减少饮食对检测结果的潜在影响。所有样本均使用含有抗凝剂的采血管收集, 并在 2 h 内进行处理。血样首先进行离心分离血浆和细胞成分, 血浆部分用于 1,25-(OH)<sub>2</sub>D, 而细胞成分则用于 PBMCs 的分离。PBMCs 的分离采用密度梯度离心法, 使用 Ficoll 试剂, 根据其密度差异实现单核细胞和淋巴细胞的分离。分离后的 PBMCs 被重新悬浮在适当的细胞培养基中, 用于 RNA 的提取和细胞因子的分析。

### 3 1,25-(OH)<sub>2</sub>D 和 CYP27A1 mRNA 表达水平测定

1,25-(OH)<sub>2</sub>D 水平的测定采用高效液相色谱-串联质谱法 (HPLC-MS/MS), 该方法具有高灵敏度和高特异性。样本中的 1,25-(OH)<sub>2</sub>D 首先经过固相萃取 (SPE) 进行纯化和富集, 然后通过 HPLC 进行分离, 最后由 MS/MS 进行检测。CYP27A1 mRNA 的表达水平通过定量实时反转录聚合酶链反应 (qRT-PCR) 技术测定。首先从 PBMCs 中提取总 RNA, 使用纳米光度计测定 RNA 的纯度和浓度。随后进行 cDNA 的合成, 选择特异性引物进行 qRT-PCR 扩增, 使用  $\beta$ -actin 作为内参基因进行数据标准化。引物序列如下: CYP27A1 Forward Primer: CGGCAACGGA

GCTTAGAGG; CYP27A1 Reverse Primer: GGCAT AGCCTTGAACGAACAG;  $\beta$ -actin Forward Primer: CATGTACGTTGCTATCCAGGC;  $\beta$ -actin Reverse Primer: CTCCTTAATGTCACGCACGAT.

#### 4 炎症指标和免疫细胞亚群的测定

炎症指标的测定采用酶联免疫吸附试验(ELISA),根据制造商提供的试剂盒说明书进行操作。每种指标的测定均包括标准品、样本和对对照组的测定,以确保结果的准确性。免疫细胞亚群的分析采用流式细胞仪,首先对 PBMCs 进行表面标志物的染色,然后通过流式细胞仪进行细胞类型的识别和定量分析。每种细胞亚群的标记抗体均选择经过验证的商业试剂。

#### 5 细菌负荷的评估

细菌负荷的评估通过痰液中的 Mtb 计数来实现。首先进行抗酸染色,以识别抗酸杆菌,然后进行微生物培养,以确定 Mtb 的数量。所有样本均在生物安全柜中操作,以确保操作者的安全和样本的稳定性。

#### 6 治疗反应的评估

记录 PTB 患者在开始标准抗结核治疗后的临床症状、炎症指标和 Mtb 计数的变化,评估 1,25-(OH)<sub>2</sub>D 和 CYP27A1 mRNA 水平的变化。

#### 7 统计分析

使用 SPSS 软件进行数据分析。组间比较采用独立样本 *t* 检验或 Mann-Whitney U 检验,相关性分析采用 Pearson 相关性分析。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

### 结果

#### 1 1,25-(OH)<sub>2</sub>D 和 CYP27A1 mRNA 表达水平比较

PTB 患者组与健康对照组的患者 PBMCs 中的 1,25-(OH)<sub>2</sub>D 含量及 CYP27A1 mRNA 表达水平见表 1。PTB 患者组的 1,25-(OH)<sub>2</sub>D 水平显著低于健康对照组 (*P* < 0.01)。CYP27A1 mRNA 表达水平在 PTB 患者中显著高于健康对照组 (*P* < 0.01)。

表 1 PTB 患者组与健康对照组的患者 PBMC 中 1,25-(OH)<sub>2</sub>D 和 CYP27A1 mRNA 表达水平

分组	人数	1,25-(OH) <sub>2</sub> D (pg/mL)	CYP27A1 (相对 $\beta$ -actin)
PTB 患者组	90	24.26 ± 3.88	1.73 ± 0.42
健康对照组	45	36.60 ± 5.31	1.18 ± 0.37
<i>t</i>		15.350	7.368
<i>P</i>		<0.01	<0.01

#### 2 炎症指标表达情况及与 1,25-(OH)<sub>2</sub>D 和 CYP27A1 mRNA 表达水平的相关性

采用酶联免疫吸附试验(ELISA)测定 PTB 患者

组与健康对照组的患者血清中血清中的 CRP、ESR 和 IL-6 水平,结果见表 2。PTB 患者组的 CRP 水平较健康对照组明显升高 (*P* < 0.01)。与健康对照组相比,PTB 患者的 ESR 明显加快 (*P* < 0.01)。与健康对照组相比,PTB 患者的 IL-6 水平也较健康对照组明显升高 (*P* < 0.01)。根据上述结果利用 Pearson 计算各炎症指标与 1,25-(OH)<sub>2</sub>D 和 CYP27A1 mRNA 表达水平的相关性见图 1。1,25-(OH)<sub>2</sub>D 水平与 CRP、ESR 和 IL-6 均呈负相关(分别为 *r* = -0.701, *P* < 0.01; *r* = -0.465, *P* < 0.01; *r* = -0.715, *P* < 0.01)。CYP27A1 mRNA 水平与这些炎症指标呈正相关(分别为 *r* = 0.774, *P* < 0.01; *r* = 0.619, *P* < 0.01; *r* = 0.799, *P* < 0.01)。

表 2 PTB 患者组与健康对照组的患者血清 CRP、ESR 和 IL-6 表达水平

分组	人数	CRP(mg/L)	ESR(mm/h)	IL-6(pg/mL)
PTB 患者组	90	15.43 ± 3.46	34.78 ± 7.64	13.21 ± 2.84
健康对照组	45	1.73 ± 0.44	5.71 ± 1.56	2.12 ± 0.67
<i>t</i>		26.400	25.200	25.810
<i>P</i>		<0.01	<0.01	<0.01

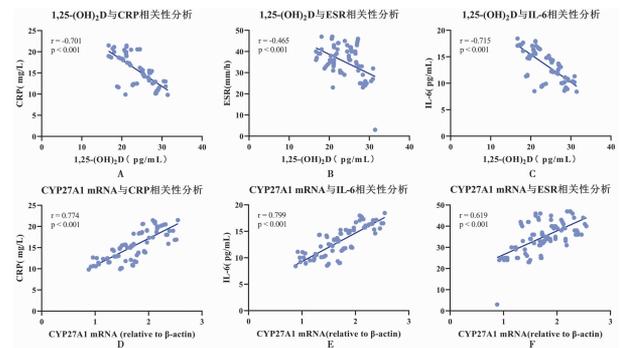


图 1 1,25-(OH)<sub>2</sub>D 和 CYP27A1 mRNA 表达水平与炎症指标的相关性分析

Fig. 1 Correlation analysis of 1,25-(OH)<sub>2</sub>D and CYP27A1 mRNA expression levels with inflammatory markers

#### 3 免疫细胞亚群数量及与 1,25-(OH)<sub>2</sub>D 和 CYP27A1 mRNA 表达水平的相关性

使用流式细胞仪分析 PBMCs 中 CD4<sup>+</sup>T 细胞、CD8<sup>+</sup>T 细胞、NK 细胞和 Treg 细胞的数量和活化状态,结果见表 3。PTB 患者组的 CD4<sup>+</sup>T 细胞、CD8<sup>+</sup>T 细胞、NK 细胞和 Treg 细胞计数均较健康对照组明显升高 (*P* < 0.01)。根据上述结果利用 Pearson 计算各免疫细胞亚群与 1,25-(OH)<sub>2</sub>D 和 CYP27A1 mRNA 表达水平的相关性见图 2。1,25-(OH)<sub>2</sub>D 含量与

CD4<sup>+</sup>T、CD8<sup>+</sup>T、NK、Treg 细胞计数呈正相关(分别为  $r = 0.356, P < 0.01; r = 0.213, P < 0.05; r = 0.313, P < 0.05; r = 0.430, P < 0.01$ )。CYP27A1 mRNA 水平与 CD8<sup>+</sup>T 细胞计数呈负相关( $r = -0.23, P < 0.05$ )，但是与 CD4<sup>+</sup>T、NK、Treg 细胞计数均无明显相关性。

表 3 PTB 患者组与健康对照组的患者 PBMCs 中免疫细胞亚群数量水平  
Table 3 Immune Cell Subset Quantities in PBMCs of PTB patients and healthy controls

分组	人数	CD4 <sup>+</sup> T (cells/ $\mu$ L)	CD8 <sup>+</sup> T (cells/ $\mu$ L)	NK (cells/ $\mu$ L)	Treg (cells/ $\mu$ L)
PTB 患者组	90	526.61 $\pm$ 63.58	425.56 $\pm$ 53.53	181.30 $\pm$ 28.35	74.48 $\pm$ 16.36
健康对照组	45	419.22 $\pm$ 43.23	233.24 $\pm$ 34.82	124.76 $\pm$ 17.51	49.42 $\pm$ 8.80
<i>t</i>		10.20	21.87	12.25	9.59
<i>P</i>		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

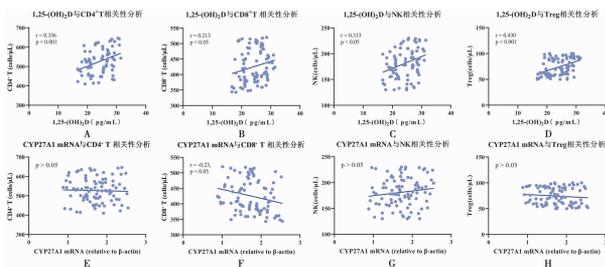


图 2 1,25-(OH)<sub>2</sub>D 和 CYP27A1 mRNA 表达水平与免疫细胞亚群数量的相关性分析  
A 1,25-(OH)<sub>2</sub>D 与 CD4<sup>+</sup>T 细胞数相关性分析 B 1,25-(OH)<sub>2</sub>D 与 CD8<sup>+</sup>T 细胞数相关性分析 C 1,25-(OH)<sub>2</sub>D 与 NK 细胞数相关性分析 D 1,25-(OH)<sub>2</sub>D 与 Treg 细胞数相关性分析 E CYP27A1 mRNA 与 CD4<sup>+</sup>T 细胞数相关性分析 F CYP27A1 mRNA 与 CD8<sup>+</sup>T 细胞数相关性分析 G CYP27A1 mRNA 与 NK 细胞数相关性分析 H CYP27A1 mRNA 与 Treg 细胞数相关性分析

图 2 1,25-(OH)<sub>2</sub>D 和 CYP27A1 mRNA 表达水平与免疫细胞亚群数量的相关性分析  
Fig. 2 Correlation analysis of 1,25-(OH)<sub>2</sub>D and CYP27A1 mRNA expression levels with immune cell subset quantities

#### 4 细菌负荷情况及与 1,25-(OH)<sub>2</sub>D 及 CYP27A1 mRNA 水平相关性

通过痰液或支气管肺泡灌液(BALF)中的 Mtb 计数来评估细菌负荷,实验结果见图 3。PTB 患者组的 Mtb 计数为 44150 $\pm$ 6447 CFU/mL,而健康对照组未检测到 Mtb。经过 6 个月的标准抗结核治疗后,PTB 患者 Mtb 计数平均降至 2330 $\pm$ 1770 CFU/mL( $t = 59.34, P < 0.01$ )。并且发现 PTB 患者在开始标准抗结核治疗后,1,25-(OH)<sub>2</sub>D 水平显著升高( $P < 0.01, t = 10.790$ ),而 CYP27A1 mRNA 水平显著降低( $P < 0.01, t = 4.894$ )。而利用治疗前 1,25-(OH)<sub>2</sub>D 及 CYP27A1 mRNA 水平与细菌负荷进行相关性分析结果可见,1,25-(OH)<sub>2</sub>D 水平与细菌负荷呈负相关( $r = -0.327, P < 0.01$ ),而 CYP27A1 mRNA 水平与细菌负荷呈正相关( $r = 0.43, P < 0.01$ )。

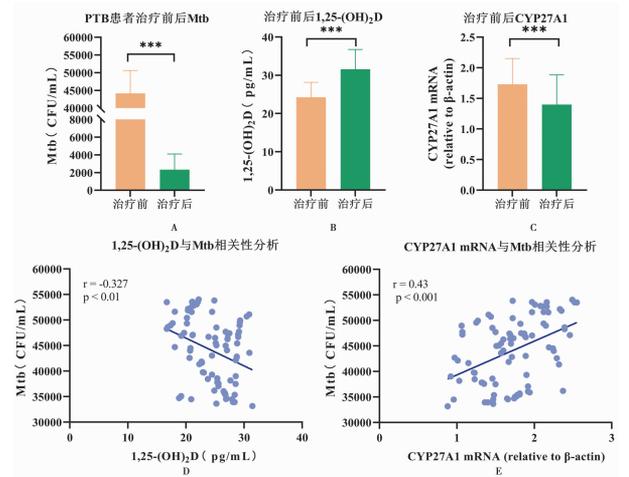


图 3 细菌负荷情况及与 1,25-(OH)<sub>2</sub>D 及 CYP27A1 mRNA 水平相关性分析  
A 患者治疗前后 Mtb 比较 B 患者治疗前后 1,25-(OH)<sub>2</sub>D 比较 C 患者治疗前后 CYP27A1 mRNA 比较 D 1,25-(OH)<sub>2</sub>D 与 Mtb 相关性分析 E CYP27A1 mRNA 与 Mtb 相关性分析

图 3 细菌负荷情况及与 1,25-(OH)<sub>2</sub>D 及 CYP27A1 mRNA 水平相关性分析  
Fig. 3 Analysis of bacterial burden and correlation with 1,25-(OH)<sub>2</sub>D and CYP27A1 mRNA levels

#### 讨论

1,25(OH)<sub>2</sub>D 是维生素 D 在体内的最活跃形式,它通过与维生素 D 受体(VDR)结合,调节多个免疫基因的表达<sup>[14-15]</sup>。mRNA 它的分子较长,通常为几百到几千个核苷酸不等,在基因表达过程中起着重要作用,负责将基因信息传递给蛋白质合成机制。1,25-二羟维生素 D 通过增强免疫系统的抗菌能力,对抗结核病具有重要作用<sup>[16-17]</sup>。CYP27A1 作为维生素 D 代谢的关键酶,其 mRNA 表达水平可能影响 1,25(OH)<sub>2</sub>D 的生成,进而影响肺结核患者的免疫反应<sup>[18-20]</sup>。

本次研究探究了在 PTB 患者中 1,25-(OH)<sub>2</sub>D 及 CYP27A1 mRNA 水平的与炎症反应、免疫细胞亚群以及细菌负荷的关系,为维生素 D 在肺结核中的机制作用提供了新的视角。研究结果表明,PTB 患者出现 1,25-(OH)<sub>2</sub>D 的降低,可能与维生素 D 受体的表达降低有关,这与近年来国内外慢性感染和炎症性疾病相关研究结果一致<sup>[21-22]</sup>。1,25-(OH)<sub>2</sub>D 是维生素 D 的活性形式,是钙和磷酸盐代谢的重要调节剂,并有研究发现,自身免疫疾病、慢性炎症以及一些感染性疾病都与 1,25-(OH)<sub>2</sub>D 缺乏有关<sup>[23]</sup>。已在多项研究中显示其在调节免疫系统中的关键作用。例如,1,25-(OH)<sub>2</sub>D 能够促进抗微生物肽的合成,如人  $\beta$ -防御素(hBD-2)和 IL-37,这些肽具有直接的抗菌作用,能够增强宿主对病原体的防御能力<sup>[24]</sup>。此外,1,25-(OH)<sub>2</sub>D 还通过抑制 Toll 样受体(TLRs)的激活,减少炎症因子的释放,从而在控制炎症反应中发挥作用<sup>[25]</sup>。同样在本研究中也发现 PTB 患者炎症指标 CRP、ESR 和 IL-6 的显著升高,并发现这些指标与 1,

25-(OH)<sub>2</sub>D 的呈现负相关。这种负相关性可能表明在 PTB 患者体内炎症过程中维生素 D 的代谢受到抑制,反映了维生素 D 在抑制过度炎症反应中的潜在作用。对免疫细胞亚群的结果表明,PTB 患者的 CD4<sup>+</sup> T 细胞、CD8<sup>+</sup> T 细胞、NK 细胞和 Treg 细胞均较健康人群显著升高,而这些免疫细胞亚群数量均与 1,25-(OH)<sub>2</sub>D 呈现正相关性,说明 1,25-(OH)<sub>2</sub>D 在 PTB 中发挥免疫调节作用。目前有研究表明,较高的 1,25-(OH)<sub>2</sub>D 水平在细胞毒作用及吞噬过程中发挥有益作用<sup>[26]</sup>,并能够促进活化的树突状细胞对 Treg 细胞的诱导<sup>[27]</sup>,在针对 Graves 病的研究中,也发现活性维生素 D 的补充有利于患者的恢复<sup>[28]</sup>。与细菌负荷的负相关性也与以往的研究结果一致<sup>[7]</sup>,提示了维生素 D 代谢途径在肺结核发病机制中的复杂作用以及 1,25-(OH)<sub>2</sub>D 可能的治疗作用。

CYP27A1 是维生素 D 代谢途径中的关键酶,其在 PTB 患者中的上调可能指示了机体对感染的代谢适应。CYP27A1 能够将 25-羟基维生素 D(25-OH-D) 转化为 1,25-(OH)<sub>2</sub>D,但在某些情况下,CYP27A1 的过度表达可能会导致 1,25-(OH)<sub>2</sub>D 的代谢失衡,进而影响免疫细胞的功能<sup>[29-30]</sup>。针对 CYP27A1 mRNA 与炎症指标的正相关性可能揭示了其在促进炎症过程中的潜在角色。这些发现与之前的研究一致,表明维生素 D 能够通过影响免疫细胞的活性和细胞因子的产生来调节炎症过程。在针对 CYP27A1 mRNA 与各种免疫细胞亚群数量的研究中仅发现 CYP27A1 mRNA 与 CD8<sup>+</sup> T 细胞计数的负相关性,但是目前尚无相关研究对其原因进行探究。而 CYP27A1 mRNA 水平与细菌负荷的正相关性,提示了维生素 D 代谢途径在肺结核发病机制中的复杂作用。

本次研究的发现强调了维生素 D 和 CYP27A1 在肺结核中的潜在作用,并提示了作为治疗靶点的可能性。但是目前仍有许多问题尚未明确,比如维生素 D 和 CYP27A1 在肺结核病程中的具体作用机制;CYP27A1 的调节对肺结核免疫反应和疾病进程的影响;个体遗传差异如何影响维生素 D 和 CYP27A1 在肺结核中的作用。1,25-(OH)<sub>2</sub>D 和 CYP27A1 mRNA 的表达水平与 PTB 的多个临床特征相关联,强调了它们在疾病发病机制中的潜在作用。针对此方向的研究可能有助于更好地理解结核病的免疫调节机制,并为诊断、治疗和预后评估提供新的策略。

#### 【参考文献】

- [1] 乃非沙·买买提,尚晓倩,范佳惠,等. TREM2 通过调控巨噬细胞极化在肺结核病中的作用及分子机制研究[J]. 中国病原生物学杂志,2024,19(4):405-410.
- [2] Snow KJ, Cruz AT, Seddon JA, et al. Adolescent tuberculosis[J]. Lancet Child Adolesc Health, 2020, 4(1): 68-79.
- [3] Luies L, du Preez I. The echo of pulmonary tuberculosis: mechanisms of clinical symptoms and other disease-induced systemic complications[J]. Clin Microbiol Rev, 2020, 33(4): e00036-20.
- [4] Taha R, Abureesh S, Alghamdi S, et al. The relationship between Vitamin D and infections including COVID-19: Any hopes[J]? Int J Gen Med, 2021, 14: 3849-3870.
- [5] Middelkoop K, Stewart J, Walker N, et al. Vitamin D supplementation to prevent tuberculosis infection in South African schoolchildren: multicenter phase 3 double-blind randomized placebo-controlled trial (ViDiKids)[J]. Int J Infect Dis, 2023, 134: 63-70.
- [6] Serre J, Tanjeko AT, Mathysen C, et al. Effects of repeated infections with non-typeable Haemophilus influenzae on lung in vitamin D deficient and smoking mice[J]. Respir Res, 2022, 23(1): 40.
- [7] Afsal K, Selvaraj P, Harishankar M. 1,25-dihydroxyvitamin D3 downregulates cytotoxic effector response in pulmonary tuberculosis[J]. Int Immunopharmacol, 2018, 62: 251-260.
- [8] Huang FC, Huang SC. Active vitamin D3 attenuates the severity of Salmonella colitis in mice by orchestrating innate immunity[J]. Immun Inflamm Dis, 2021, 9(2): 481-491.
- [9] Sakyi SA, Owusu-Yeboah M, Obirikorang C, et al. Profiling vitamin D, its mediators and proinflammatory cytokines in rheumatoid arthritis: A case-control study[J]. Immun Inflamm Dis, 2022, 10(8): e676.
- [10] Renieris G, Foutadakis S, Andriopoulou T, et al. Association of vitamin D with severity and outcome of COVID-19: Clinical and experimental evidence[J]. J Innate Immun, 2024, 16(1): 1-11.
- [11] Thiel A, Hermanns C, Lauer AA, et al. Vitamin D and its analogues: from differences in molecular mechanisms to potential benefits of adapted use in the treatment of alzheimer's disease[J]. Nutrients, 2023, 15(7): 1684.
- [12] Bonnet L, Karkeni E, Couturier C, et al. Gene expression pattern in response to cholecalciferol supplementation highlights cubilin as a major protein of 25(OH)D uptake in adipocytes and male mice white adipose tissue[J]. Endocrinology, 2018, 159(2): 957-966.
- [13] Murugesan H, Sampath P, A VK, et al. Association of CYP27B1 gene polymorphisms with pulmonary tuberculosis and vitamin D levels[J]. Gene, 2024, 927: 148679.
- [14] 乔萌. 自身免疫性甲状腺疾病与血清 25 羟维生素 D 的关系研究[D]. 华北理工大学, 2022.
- [15] Panda S, Tiwari A, Luthra K, et al. Association of FokI VDR polymorphism with Vitamin D and its associated molecules in pulmonary tuberculosis patients and their household contacts[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 15251.
- [16] 吴桂辉, 黄涛, 罗霖, 等. 活动性肺结核患者病情严重程度与维生素 D 及 T 细胞亚群的相关性分析[J]. 中华肺部疾病杂志(电子版), 2020, 13(4): 510-512.
- [17] Eletreby R, Elsharkawy A, Mohamed R, et al. Prevalence of vitamin D deficiency and the effect of vitamin D3 supplementation on response to anti-tuberculosis therapy in patients with extrapulmonary tuberculosis[J]. BMC Infect Dis, 2024, 24(1): 681.
- [18] 黄秋丽, 曹雪平, 王玉清, 等. CYP2R1 基因多态性与维生素 D 水平和肺结核病易感性的相关性研究[J]. 中国感染控制杂志, 2023, 22(4): 391-397.
- [19] 尚耀民, 周晓蕾, 薛运玲, 等. 微卡与维生素 D 联合应用对初治涂阳肺结核 CD4<sup>+</sup> T 细胞亚群平衡的影响[J]. 中国防痨杂志, 2023, 45(6): 575-582.
- [20] Li HM, Li Y, Zhang GY, Shi SJ, Zhang TP. Association of vitamin D receptor and CYP2R1 mRNA expression with pulmonary tuberculosis[J]. Arch Med Sci, 2020, 16(6): 1408-1416.

可能性提供了信息<sup>[21-22]</sup>。

综上,本研究构建了 *Em13/pET28a* 原核表达载体,生物信息学预测 EM13 蛋白具有较多的抗原结合位点,可为泡性棘球蚴病的特异性诊断抗原或疫苗候选抗原的鉴定提供理论基础。

#### 【参考文献】

[1] 孟庆杨,彭婕,马淑梅,等. 超声在肝多房棘球蚴病诊疗中的应用进展[J]. 中国血吸虫病防治杂志,2020,32(6):657-660.

[2] Hillenbrand A, Gruener B, Kratzer W, et al. Impact of safe distance on long-term outcome after surgical therapy of alveolar echinococcosis[J]. World J Surg,2016,41(4):1012-1018.

[3] Valot B, Rognon B, Prenel A, et al. Screening of antigenic vesicular fluid proteins of *Echinococcus multilocularis* as potential viability biomarkers to monitor drug response in alveolar echinococcosis patients[J]. Proteomics Clin Appl, 2017, 11: 11-12.

[4] Brehm K, Koziol U. On the importance of targeting parasite stem cells in anti-echinococcosis drug development[J]. Parasite, 2014, 21:72.

[5] Lundström-Stadelmann B, Rufener R, Hemphill A. Drug repurposing applied; activity of the anti-malarial mefloquine against *Echinococcus multilocularis* [J]. Int J Parasitol Drugs Drug Resist, 2020, 13: 121-129.

[6] Carmena D, Benito A, Eraso E. The immunodiagnosis of *Echinococcus multilocularis* infection[J]. Clin Microbiol Infect, 2007, 13(5):460-475.

[7] Frosch PM, Geier C, Kaup F J, et al. Molecular cloning of an echinococcal microtrichal antigen immunoreactive in *Echinococcus multilocularis* disease[J]. Mol Biochem Parasitol, 1993, 58(2): 301-310.

[8] 车纾慧,付玉荣,伊正君. 结核分枝杆菌 AccD5 蛋白的生物信息学分析[J]. 中国病原生物学杂志,2017,12(9):844-847.

[9] 葛晓丽,王芬,殷国荣. 乳腺癌相关基因环氧化酶 2(COX-2) 编码蛋白的主要特性与抗原表位生物信息学分析[J]. 现代肿瘤医学, 2012, 20(9):1794-1798.

[10] Liu SX, Xiong XY, Zhao XX, et al. F-BAR family proteins, emerging regulators for cell membrane dynamic changes—from structure to human diseases[J]. J Hematol Oncol, 2015, 8:47.

[11] Takenawa T. Phosphoinositide-binding interface proteins

involved in shaping cell membranes[J]. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci, 2010, 86: 509-523.

[12] Jacot D, Soldati-Favre D. Does protein phosphorylation govern host cell entry and egress by the Apicomplexa? [J]. Int J Med Microbiol, 2012, 302(4-5):195-202.

[13] Ripp J, Smyrnakou X, Neuhoff MT, et al. Phosphorylation of myosin A regulates gliding? motility and is essential for *Plasmodium transmission* [J]. EMBO reports, 2022, 23(7): e54857.

[14] Ardito F, Giuliani M, Perrone D, et al. The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy (Review)[J]. Int J Mol Med, 2017, 40(2):271-280.

[15] Wheeler-Alm E, Shapiro SZ. Evidence of tyrosine kinase activity in the protozoan parasite *Trypanosoma brucei* [J]. J. Protozool, 1992, 39(3):413-416.

[16] Ding H, Liu F, Zhu L, et al. Tyrosine kinase 4 is involved in the reproduction of the platyhelminth parasite *Schistosoma japonicum*[J]. Parasit Vect, 2017, 10(1):498.

[17] Price HP, Gther ML, Ferguson MA, et al. Myristoyl-CoA: protein N-myristoyltransferase depletion in trypanosomes causes avirulence and endocytic defects [J]. MolBiochem Parasitol, 2010, 169(1):55-58.

[18] Wright MH, Paape D, Storck EM, et al. Global analysis of protein N-myristoylation and exploration of N-myristoyltransferase as a drug target in the neglected human pathogen *Leishmania donovani* [J]. ChemBiol, 2015, 22(3): 342-354.

[19] Gavrillov Y, Shental-Bechor D, Greenblatt HM, et al. Glycosylation may reduce protein thermodynamic stability by inducing a conformational distortion[J]. J Phys Chem Lett, 2016, 6:3572-3577.

[20] Zhu J, Liu H, Zhang J, et al. Effects of Asn-33 glycosylation on the thermostability of *Thermomyces lanuginosus* lipase [J] JAppl Microbiol, 2014, 117:151-159.

[21] Azazi A, Haron FN, Chua KH, et al. Bioinformatics characterization of *Plasmodium knowlesi* apical membrane antigen 1 (PkAMA1) for multi-epitope vaccine design[J]. Trop Biomed, 2021, 38(3):265-275.

[22] Li XW, Zhang N, Li ZL, et al. Epitope vaccine design for *Toxoplasma gondii* based on a genome-wide database of membrane proteins[J]. Parasit Vectors, 2022, 15(1):364.

【收稿日期】 2024-05-08 【修回日期】 2024-08-02

(上接 1412 页)

[21] Ahor HS, Vivekanandan M, Harelimana JD, et al. Immunopathology in human pulmonary tuberculosis: Inflammatory changes in the plasma milieu and impaired host immune cell functions[J]. Immunology, 2024, 172(2):198-209.

[22] Lopez-Gonzalez JA, Martinez-Soto JM, Avila-Cervantes C, et al. Evaluation of systemic inflammation before and after standard anti-tuberculosis treatment in patients with active pulmonary tuberculosis and diabetes mellitus[J]. Cureus, 2024, 2;16(3):e55391.

[23] Bernicke B, Engelbogen N, Klein K, et al. Analysis of the seasonal fluctuation of  $\gamma\delta$  T cells and its potential relation with vitamin D3[J]. Cells, 2022, 11(9):1460.

[24] Zhuravel E, Shestakova T, Efanova O, et al. Pogrebnoy, human beta-defensin-2 controls cell cycle in malignant epithelial cells, in vitro study[J]. Exp Oncol, 2011, 33(3):114-120.

[25] 刘轩妙,徐俊驰,岳晓冬,等. IFN- $\gamma$  联合 IL-6 在菌阴性肺结核诊断中的应用分析[J]. 标记免疫分析与临床, 2024, 31(3):

450-455, 475.

[26] Herwig R, Erlbacher K, Ibrahimagic A, et al. Vitamin D-Dimer: A possible biomolecule modulator in cytotoxic and phagocytosis processes[J]? Biomedicines, 2022, 10(8):1785.

[27] Shaikh NA, Zhang XB, Abdalla MI, et al. Enhancing human treg cell induction through engineered dendritic cells and zinc supplementation[J]. Crit Rev Immunol, 2024, 44(3):37-52.

[28] Gallo D, Bruno A, Gallazzi M, et al. Immunomodulatory role of vitamin D and selenium supplementation in newly diagnosed Graves' disease patients during methimazole treatment[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2023, 14(14):1145811.

[29] 王敏. 维生素 D 代谢通路异常甲基化与结核病发病风险和预后的分子流行病学研究[D]. 江苏:南京医科大学, 2017.

[30] Zhang C, Liu K, Hou J. Extending the vitamin D pathway to vitamin D3 and CYP27A1 in periodontal ligament cells[J]. J Periodontol, 2021, 92(7):44-53.

【收稿日期】 2024-07-26 【修回日期】 2024-10-13