

## GBP1 在肺结核中的表达及临床意义

叶国敏<sup>1</sup> 沈世杰<sup>1</sup> 张博<sup>1</sup> 邓思齐<sup>1</sup> 冯真<sup>1</sup> 李卫民<sup>2</sup> 张万江<sup>1</sup> 陈创夫<sup>1</sup> 吴江东<sup>1</sup>

**摘要** 目的 探讨鸟苷酸结合蛋白 1 (GBP1) 在肺结核中的表达模式、潜在功能及临床意义。方法 收集石河子大学医学院第一附属医院存档的 88 例肺结核样本及 36 例对照组样本(肺癌旁组织) 运用免疫组织化学染色检测 GBP1 在肺结核、对照组样本中的表达情况,并结合美国基因表达数据库(GEO)数据集: GSE83456 和 GSE34608 进行表达分析,绘制接收者操作特征(ROC)曲线评价 GBP1 在肺结核中的诊断价值;再通过蛋白质-蛋白质互作网络,对 GBP1 及相关调控因子进行相关性分析;最后,通过基因集富集分析(GSEA)探索 GBP1 在肺结核发生发展中潜在的信号机制。结果 与对照组相比,GBP1 在人肺结核样本(包括肺组织和血液)中高表达;GBP1 蛋白在肺结核中的阳性率达 73.9%。ROC 曲线分析表明,GBP1 可能在肺结核早期诊断中具有重要价值。GSEA 分析表明,GBP1 的高表达与宿主的炎症反应、干扰素- $\gamma/\alpha$ (IFN- $\gamma/\alpha$ )信号通路以及肿瘤坏死因子- $\alpha$ /白细胞介素 6(TNF- $\alpha$ /IL-6)信号转导等密切相关。结论 GBP1 在肺结核组织中中高表达,参与炎症反应和宿主抗结核感染的过程;GBP1 可能作为肺结核的早期诊断标志物或治疗靶点。

**关键词** GBP1; 肺结核; 诊断标志物; 治疗靶点; 生物信息学分析

中图分类号 R 521; R 446

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)02-0214-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.02.007

结核病(tuberculosis, TB)是一种主要由结核分枝杆菌感染引起的传染性疾病。近几十年来,它已成为全球传染病死亡的主要原因之一<sup>[1-3]</sup>。但随着耐药菌的出现使得结核病的治愈又进入了瓶颈期,全球平均治愈率仅维持在 55% 左右<sup>[4]</sup>。因此,寻找特异性的早期诊断生物标志物对于肺结核的诊断和

治疗非常重要。鸟苷酸结合蛋白 1 (guanylate binding protein 1, GBP1) 属于鸟苷酸结合蛋白家族,是一种干扰素诱导蛋白<sup>[5]</sup>,对细菌的增殖起到抑制作用,有助于预防某些病毒感染促进炎症反应形成,在抗病原微生物反应中发挥重要作用<sup>[6]</sup>。但 GBP1 在肺结核感染过程中的作用未见报道。该研究基于临床样本及公共数据库,探讨 GBP1 在肺结核患者的肺组织及血液样本中的表达情况及潜在的信号通路,为 GBP1 在肺结核的早期诊断及临床治疗提供理论依据。

### 1 材料与方法

**1.1 肺结核标本** 收集石河子大学医学院第一附属医院病理科存档的样本,本研究总共包括 88 例肺结核样本,36 例对照组样本(肺癌旁组织)。患者基本信息如下:肺结核组样本患者年龄中位值为 58 岁,男 49 例,女 39 例;对照组肺结核组样本患者年龄中位值为 54 岁,男 26 例,女 10 例。本研究的样本纳入标准为:经胸片、胸部 CT、胸腔 B 超、痰或胸水、涂片、痰或胸水培养、结核菌素试验、胸水常规生化检查,临床诊断为肺结核,且结核分枝杆菌抗体阳性抗酸染色、结核荧光 PCR 均为阳性的样本纳入为肺结核样本。所有样本均经患者或家属知情同意并获得,本研究得到石河子大学医学院第一附属医院伦理委员会的批准(伦理批准号: KJ2019-149-01)。

**1.2 免疫组织化学染色** 用苏木精-伊红染色试剂盒(E607318-0200,上海生工)对组织切片进行 EnVision 二步法免疫组织化学技术染色。所有切片用二甲苯脱蜡,用无水乙醇水化,使用 3% 过氧化氢处理 10min,阻断内源过氧化物酶活性,抗原在 pH 值为 9 的 EDTA 高压锅中进行抗原修复,持续 4 min, PBS 洗 3 次,每次 3 min,在 37℃ 与 GBP1 一抗(1:400 ab131255,美国 Abcam 公司)孵育 1 h,与辣根过氧化物酶标记的二抗 37℃ 下孵育 30 min,37℃ 苏木精染色 30 s。GBP1 阳性判读:随机选取 5 个高倍视野( $\times 200$ )计数 GBP1 阳性细胞并计算阳性细胞占比。阳性率 >5% 的样本记为 GBP1 阳性,≤5% 的样本记为 GBP1 阴性。

2022-12-19 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:U1903118)

作者单位:<sup>1</sup>石河子大学医学院新疆地方病与民族疾病教育部重点实验室,石河子 832002

<sup>2</sup>首都医科大学附属北京胸科医院国家结核病临床研究室,北 101100

作者简介:叶国敏,女,硕士研究生;

吴江东,男,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: 1556874645@qq.com

**1.3 数据来源和数据处理** 经过筛选得到美国基因表达数据库(Gene Expression Omnibus, GEO)数据库中样本量大于等于8以上的数据集共两个,即GSE83456和GSE34608;对GBP1的表达做了进一步的验证。肺结核相关数据集的微阵列信息见表1;运用蛋白质-蛋白质互作网络分析了与GBP1相关的蛋白<sup>[7]</sup>,用Cytoscape软件(Version: 3.8.2)进行可视化,并对相关蛋白对应基因之间的相关性做了进一步的分析。

表1 GEO数据集中肺结核相关的平台信息

GEO数据集	年份	组织来源	样本来源		平台	国家
			正常	肺结核		
GSE83456	2016	血液	61	45	GPL10558 Illumina Human HT-42 V4.0 expression bead-chip	英国
GSE34608	2012	血液	17	8	GPL6480 Human Genome Microarray 4x44K G4112F	德国

**1.4 肺结核样本的基因集富集分析(gene set enrichment analysis, GSEA)** 为研究GBP1潜在的信号通路在肺结核患者中的作用,基于GEO数据集,根据GBP1的表达量中位值,将肺结核样本分为GBP1高表达组和GBP1低表达组;应用GSEA软件(version 4.0.3)对数据集进行了GSEA分析,运用分子特征数据库的三个预定义基因集,包括KEGG富集分析、GO富集分析和Hallmark富集分析,揭示其潜在的分子机制。反应某基因在信号通路中的富集程度用标准化富集分数(normalized enrichment score, NES)表示;统计显著性阈值设置为 $P < 0.05$ 。

**1.5 统计学处理** 用GraphPad Prism 8.0软件进行统计分析,对于GBP1在结核样本中的表达,用平均值 $\pm$ 标准差表示,通过Student's *t*-test检验比较基因表达差异的显著性;根据GBP1在对照组及结核组中的表达值,建立回归模型,进行受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic curve, ROC曲线)分析。ROC曲线下的面积(area under curve, AUC)越接近于1,说明诊断效果越好。AUC在0.5~0.7时有较低准确性,AUC在0.7~0.9时有一定准确性,AUC $\geq 0.9$ 有较高准确性。GBP1与其他基因之间表达的相关性采用皮尔逊相关系数及其显著性检验(Pearson correlation coefficient),相关系数 $r$ 阈值为0.8; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 GBP1在肺结核样本中高表达 与对照组相

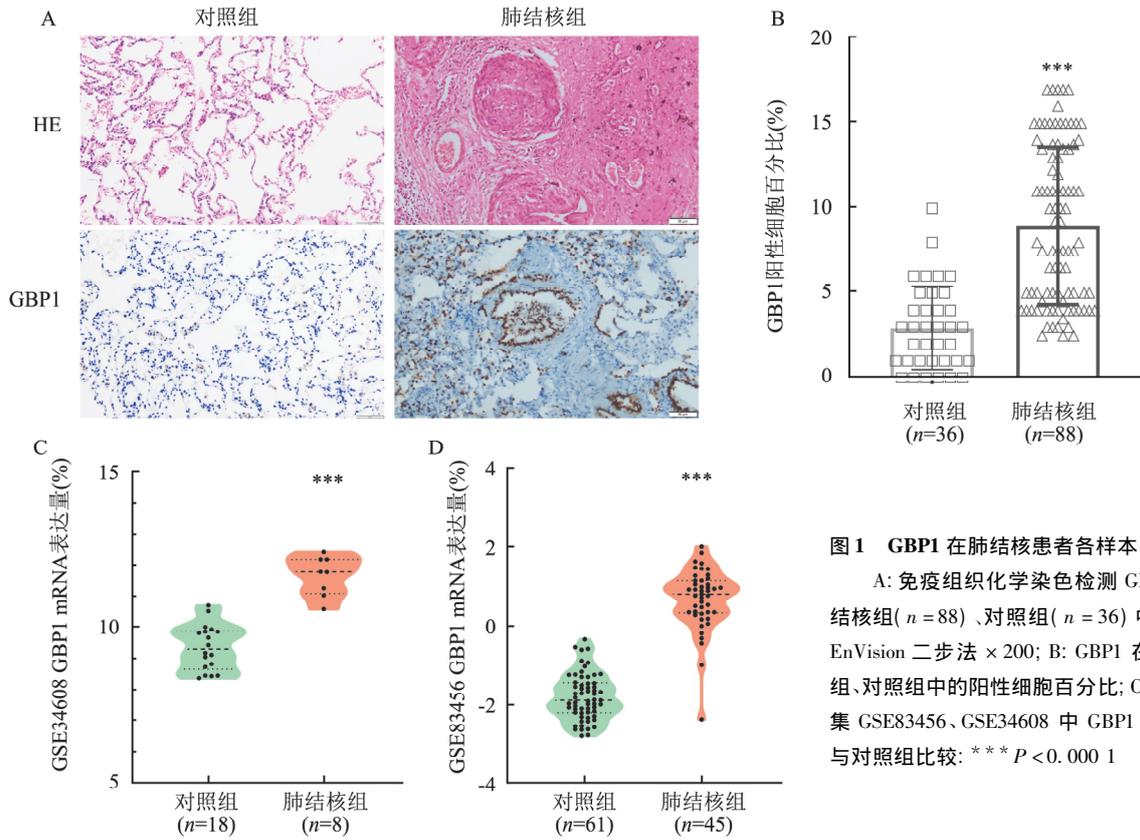
比,GBP1在肺结核标本中的表达存在差异。免疫组织化学染色结果显示,GBP1蛋白在肺结核样本中高表达,且定位于细胞质(图1A),而在对照组中低表达或不表达( $P < 0.0001$ ),见图1B。在对照组中,GBP1蛋白阳性率为16.7%(6/36);在肺结核样本中,GBP1蛋白阳性率为73.8%(65/88),二者差异有统计学意义( $P = 0.012$ ),见表2。基于数据集GSE83456和GSE34608的表达矩阵,显示GBP1 mRNA在肺结核的血液样本中高表达( $P < 0.0001$ ),见图1C、1D。表明GBP1基因在肺结核患者的血液与肺组织中均呈高表达,且具有良好的一致性。

表2 GBP1蛋白在肺结核组和对照组中的阳性表达情况比较

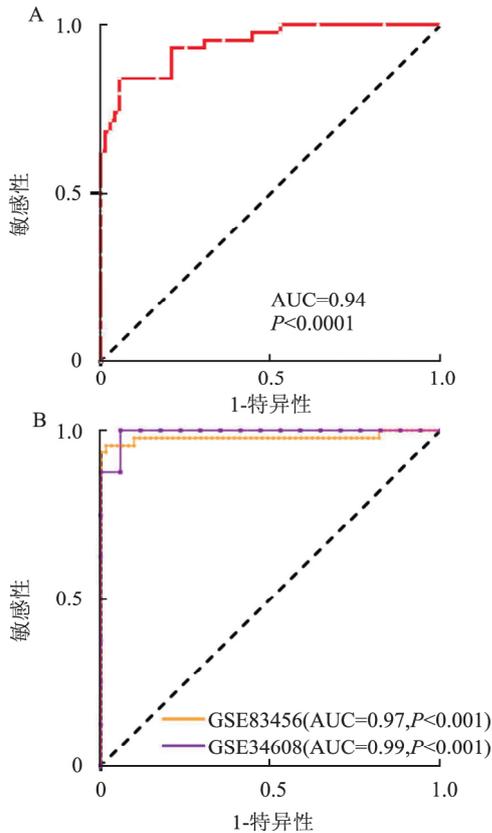
样本类别	<i>n</i>	GBP1表达		GBP1表达阳性率(%)	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
		阴性	阳性			
对照	36	30	6	16.7	7.382	0.012
肺结核	88	23	65	73.9		

**2.2 数据集中对照组和肺结核患者之间的ROC曲线** ROC曲线是反映敏感性和特异性连续变化的综合指标。为了进一步分析评估GBP1诊断肺结核的价值,基于肺结核患者样本及GEO数据库,选择对照组和肺结核患者的表达矩阵绘制ROC曲线。肺结核患者样本的阳性百分比数据显示,肺结核患者肺组织样本的AUC为0.94( $P < 0.0001$ ),见图2A,数据集GSE83456和GSE34608中肺结核患者血液样本的AUC分别为0.97和0.99( $P < 0.0001$ ),见图2B。图2表明,对于肺组织样本和血液样本,GBP1对肺结核患者的诊断均具有良好的预测价值。

**2.3 与GBP1表达密切相关的基因分析** 通过STRING平台构建蛋白质-蛋白质互作网络分析,与GBP1密切相关的Top10蛋白包括CXCL10、IFIT2、IFI44L、IFIH1、SQSTM1、GBP2、STAT1、SAMD9L、IFIT3和IFI44(图3)。然后,基于GEO数据集的表达矩阵分析了GBP1与这些蛋白对应基因的相关性。如表3所示,在两个数据集中,GBP1的表达与STAT1、SAMD9L、IFI44的表达均密切相关( $P < 0.05$ ),其中在数据集GSE83456中,GBP1与STAT1、SAMD9L和IFI44的相关系数 $r$ 分别为0.90、0.80、0.63, $P$ 值均小于0.0001,在数据集GSE34608中,GBP1与STAT1、SAMD9L、IFI44的相关系数 $r$ 分别为0.75、0.85、0.69, $P$ 值分别为0.040、0.006、0.040。

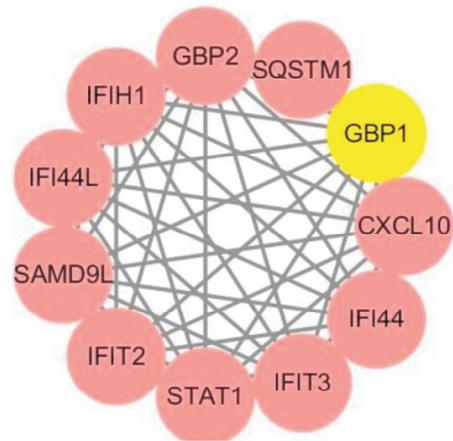


**图1 GBP1 在肺结核患者各样本中高表达**  
 A: 免疫组织化学染色检测 GBP1 在肺结核组 ( $n = 88$ )、对照组 ( $n = 36$ ) 中的表达 EnVision 二步法  $\times 200$ ; B: GBP1 在肺结核组、对照组中的阳性细胞百分比; C、D: 数据集 GSE83456、GSE34608 中 GBP1 的表达; 与对照组比较: \*\*\*  $P < 0.0001$



**图2 基于肺结核患者样本及 GEO 数据库的 ROC 曲线**

A: 临床肺结核样本的 ROC 曲线; B: 数据集 GSE83456 及 GSE34608 的 ROC 曲线



**图3 GBP1 及相关基因的相互作用网络**

**表3 肺结核中 GBP1 与其他交互基因的相关性分析**

靶基因	相关基因	GSE83456		GSE34608	
		r 值	P 值	r 值	P 值
GBP1	STAT1	0.90	<0.0001	0.75	0.040
GBP1	GBP2	0.82	<0.0001	0.56	0.150
GBP1	SAMD9L	0.80	<0.0001	0.85	0.006
GBP1	IFIH1	0.76	<0.0001	0.69	0.060
GBP1	IFI44L	0.65	<0.0001	0.63	0.090
GBP1	IFI44	0.65	<0.0001	0.61	0.110
GBP1	IFIT3	0.63	<0.0001	0.69	0.040
GBP1	CXCL10	0.62	<0.0001	0.55	0.150
GBP1	IFIT2	0.58	<0.0001	0.69	0.060
GBP1	SQSTM1	0.41	0.0060	0.11	0.900

**2.4 GSEA 分析 GBP1 高表达的肺结核患者中潜在信号通路** 运用 GSEA 富集分析,探索 GBP1 高表达的肺结核患者参与的一些信号通路。对于数据集 GSE83456 根据 Hallmark 富集分析和 GO 富集分析的 GSEA 分析发现,GBP1 高表达的结核样本主要与干扰素- $\gamma/\alpha$  (interferon- $\gamma/\alpha$ , IFN- $\gamma/\alpha$ ) 信号通路、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 信号通路、白细胞介素 6 (interleukin 6, IL-6) 信号通路等密切相关(图 4A)。对于数据集 GSE34608 根据 Hallmark 富集分析和 KEGG 富集分析的结果显示,GBP1 高表达时,肺结核组织明显参与炎症反应、IFN- $\gamma/\alpha$  反应、通过核因子  $\kappa$ B (nuclear factor kappa-B, NF- $\kappa$ B) 信号通路传导的 TNF- $\alpha$  信号传导等(图 4B)。

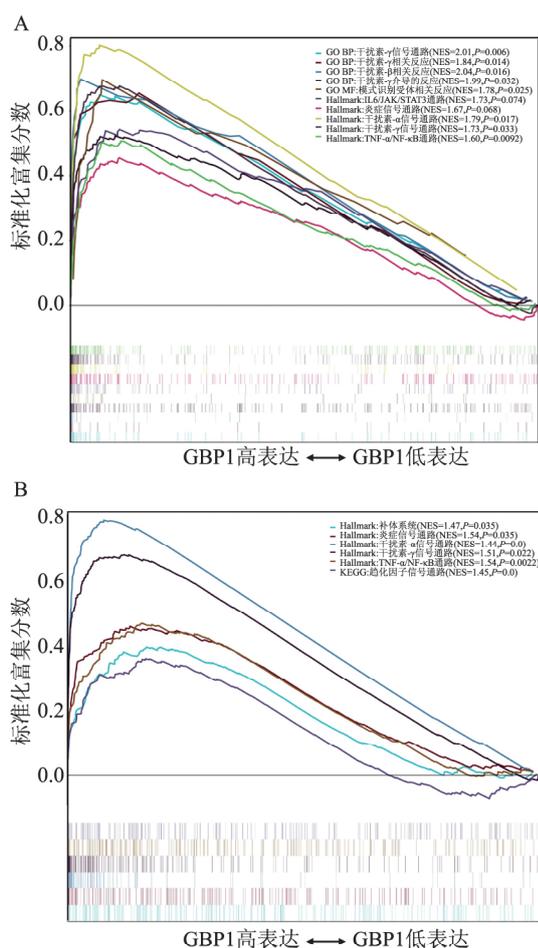


图 4 在肺结核患者中 GBP1 基因的 GSEA 富集分析

A: GBP1 在 GSE83456 数据集集中的 GSEA 富集分析; B: GBP1 在 GSE34608 数据集集中的 GSEA 富集分析

### 3 讨论

结核病是一种致死率较高的慢性传染病,致死

总人数高于艾滋病和疟疾,成为全球重大公共卫生问题。从 2000 年到 2015 年,结核病死亡数下降了 22%;但伴随耐药菌的出现,结核感染仍然是全球重要死因之一。另外,肺结核合并肺癌也是肺结核患者死亡的最常见原因,而早期肺癌与肺结核之间很难准确鉴别。所以,寻找早期准确的诊断、预后标志物或有效的药物靶点是必要和紧迫的<sup>[8]</sup>。

有研究<sup>[9]</sup>证实,在人体中 GBP1 可传达针对细胞内细菌和寄生虫的宿主防御能力信号,并激活炎症体途径,过表达 GBP1 可抑制流感病毒的复制,最终达到抗病毒的目的。本研究的免疫组织化学染色显示,与对照组相比,GBP1 蛋白在肺结核的肺组织中高表达,阳性率占比达 73.9%。此外,在 GEO 数据库的肺结核患者血液样本中,GBP1 mRNA 也高表达。所以,GBP1 的表达情况在患者病灶肺组织及血液中可能有良好的一致性。提示对感染早期、疑似或不宜手术的肺结核患者,GBP1 的血液诊断是一个潜在的筛查选择。基于 GEO 数据集,本研究分析了与 GBP1 蛋白表达密切相关的调控因子,包括 STAT1、SAMD9L 及 IFI44。有研究<sup>[10]</sup>报道,在 STAT1 基因突变的结核分枝杆菌感染合并噬血细胞综合征患儿中,其病情危重,容易发生严重、持续性或条件致病菌感染。SAMD9L 在多种癌症中作为抑癌基因调控细胞增殖,可能是胃癌家系的易感基因<sup>[11]</sup>。IFI44 是 I 型干扰素(IFN)家族中的一员,在抗病毒应答过程中发挥重要作用,并且在各种病毒感染过程中所起的作用因病毒种类不同而有所差异<sup>[12]</sup>。在糖代谢过程中,GBP1 在炎症因子 IFN- $\gamma$  诱导下产生,可发挥一定抗炎作用<sup>[13]</sup>。通过 GSEA 分析研究了肺结核患者 GBP1 的潜在信号通路,提示肺结核患者中 GBP1 的高表达与 IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  或 IL-6 介导的免疫反应密切相关。相关研究<sup>[14]</sup>也表明 IFN- $\gamma$ 、IL-10 等参与机体炎症反应,与肺结核的发生发展密切相关。故 GBP1 及相关调控因子可能在宿主抗结核感染过程中发挥着重要作用。

综上所述,GBP1 可能作为肺结核的早期诊断的标志物或治疗靶点,为肺结核的早期筛查或治疗策略提供进一步的线索或启示。但本研究存在一定的局限性,如相对于庞大的结核病患者群体,本研究涉及的患者样本总量偏少;GBP1 表达与抗肺结核感染的相关性、诊断价值及潜在生物学功能等皆以生物信息学分析为基础,这些结论仍需要更多的体内、体外实验或临床实践来进一步证实。

## 参考文献

- [1] 李 晔, 刘晓宁, 章鑫丽, 等. 结核性胸膜炎患者伴发胸膜结核瘤的影响因素分析[J]. 安徽医科大学学报, 2022, 57(3): 461-3.
- [2] Suárez I, Fünfer S M, Kröger S, et al. The diagnosis and treatment of tuberculosis [J]. *Dtsch Arztebl Int*, 2019, 116(43): 729-35.
- [3] 沙玉霞, 张 雪, 周浩泉, 等. 维生素 D 受体基因多态性与青少年结核易感性的研究 [J]. 安徽医科大学学报, 2020, 55(10): 1588-92.
- [4] 范 琳. 结核病新药研发的进展和耐药结核病的治疗挑战 [J]. 中华传染病杂志, 2020, 38(7): 396-9.
- [5] Lipnik K, Naschberger E, Gonin-Laurent N, et al. Interferon gamma-induced human guanylate binding protein 1 inhibits mammary tumor growth in mice [J]. *Mol Med*, 2010, 16(5-6): 177-87.
- [6] Santos J C, Boucher D, Schneider L K, et al. Human GBP1 binds LPS to initiate assembly of a caspase-4 activating platform on cytosolic bacteria [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 3276.
- [7] Szklarczyk D, Gable A L, Lyon D, et al. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(D1): D607-13.
- [8] 李小燕, 吴 丹, 姚梅宏, 等. 抗酸染色与即时荧光定量 PCR 法检测结核分枝杆菌在辅助诊断结核病中的作用比较 [J]. 中华病理学杂志, 2018, 47(2): 132-4.
- [9] Itsui Y, Sakamoto N, Kakinuma S, et al. Antiviral effects of the interferon-induced protein guanylate binding protein 1 and its interaction with the hepatitis C virus NS5B protein [J]. *Hepatology*, 2009, 50(6): 1727-37.
- [10] 费 玲, 章 毅, 杨 挺, 等. STAT1 基因突变致结核分枝杆菌感染合并噬血细胞综合征患儿的护理 [J]. 护理与康复, 2021, 20(7): 59-61.
- [11] 张 强. SAMD9L 在家族性胃癌中作用的研究 [D]. 西安: 西北大学, 2020.
- [12] Hallen L C, Burki Y, Ebeling M, et al. Antiproliferative activity of the human IFN-alpha-inducible protein IFI44 [J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2007, 27(8): 675-80.
- [13] Vöpel T, Syguda A, Britzen-Laurent N, et al. Mechanism of GTPase-activity-induced self-assembly of human guanylate binding protein 1 [J]. *J Mol Biol*, 2010, 400(1): 63-70.
- [14] Reichler M R, Hirsch C, Yuan Y, et al. Predictive value of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , and IL-10 for tuberculosis among recently exposed contacts in the United States and Canada [J]. *BMC Infect Dis*, 2020, 20(1): 553-67.

## Expression and clinical significance of GBP1 in pulmonary tuberculosis

Ye Guomin<sup>1</sup>, Shen Shijie<sup>1</sup>, Zhang Bo<sup>1</sup>, Deng Siqi<sup>1</sup>, Feng Zhen<sup>1</sup>, Li Weimin<sup>2</sup>, Zhang Wanjiang<sup>1</sup>,  
Chen Chuangfu<sup>1</sup>, Wu Jiandong<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Key Laboratory of Xinjiang Endemic and Ethnic Diseases Cooperated by Education Ministry with  
Xinjiang Province School of Medicine, Shihezi University, Shihezi 832002;

<sup>2</sup>National Tuberculosis Clinical Laboratory Beijing Chest Hospital, Capital Medical University, Beijing 101100)

**Abstract Objective** To investigate the expression pattern, underlying function and clinical significance of Guanylate-binding protein 1 (GBP1) in pulmonary tuberculosis (pTB). **Methods** Immunohistochemical staining was applied to detect the expression of GBP1 in pTB specimens and control samples. Combined with Gene Expression Omnibus (GEO) datasets, including GSE83456 and GSE34608, receiver operating characteristic (ROC) curve was depicted to assess the diagnostic value of GBP1 in pTB. Then, the correlation between GBP1 and related regulatory factors was analyzed by protein-protein interaction network (PPI); Finally, the potential molecular mechanism of GBP1 in pTB was probed by Gene Set Enrichment Analysis (GSEA). **Results** Compared with the control group, GBP1 was significantly overexpressed in human pTB samples, including lung tissue and blood. The positive rate of GBP1 protein in pTB was 73.9%. ROC curve analysis revealed that GBP1 might have important value in early diagnosis of pTB. GSEA analysis suggested that the hyper-expression of GBP1 was closely related to the host inflammatory response, IFN- $\gamma$ / $\alpha$  signaling pathway and TNF- $\alpha$ /IL-6 signal transduction. **Conclusion** GBP1 is highly expressed in pTB tissues and is involved in the process of inflammatory response and host anti-tuberculosis infection; GBP1 may be used as an early diagnostic marker or therapeutic target for pTB.

**Key words** GBP1; pulmonary tuberculosis; diagnostic biomarkers; therapeutic target; bioinformatics analysis