

· 临床论著 ·

外周血单个核细胞 TLR4 的表达在慢性乙型重型肝炎患者中的意义

杜文军 王慧 邢直直 刘靛雯 陈士俊

【摘要】 目的 检测慢性重型肝炎患者外周血单个核细胞(PBMC)中 TLR4 蛋白及其 mRNA 的表达情况,探讨其在慢性重型肝炎发病机制中的作用。**方法** 采用流式细胞学技术及 RT-PCR 分别检测慢性重型肝炎患者、慢性乙型肝炎患者及健康对照者 PBMC TLR4 蛋白及其 mRNA 的表达,同时检测患者肝功能、血常规及 HBV DNA 水平。**结果** 重型肝炎患者外周血 PBMC 中 TLR4 蛋白及其 mRNA 的表达均明显高于慢性乙型肝炎组及健康对照组。TLR4 表达水平与患者 ALT、AST、TBil 及中性粒细胞百分比之间呈正相关性。**结论** 慢性重型肝炎患者外周血 TLR4 表达与患者的肝脏损害程度密切相关,监测 TLR4 值的动态变化有助于指导治疗及预后判断。

【关键词】 重型肝炎;Toll 样受体;流式细胞学技术;逆转录聚合酶链反应

Study on the TLR4 expression of peripheral blood mononuclear cells in patients with severe hepatitis B DU Wen-jun, WANG Hui, XING Zhi-zhi, LIU Liang-wen, CHEN Shi-jun. Jinan Infectious Diseases Hospital, Jinan 250021, China

Corresponding author: CHEN Shi-jun, Email: crbdwj@126. com

【Abstract】 Objective To detect the expression of Toll-like receptor 4 (TLR4) protein and mRNA of the peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in patients with severe hepatitis B, and to explore the relationship of TLR4 and chronic severe hepatitis B. **Methods** TLR4 protein and mRNA levels were measured by flow cytometry and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) in patients with severe hepatitis, chronic hepatitis B patient and normal controls, respectively. The levels of liver function, blood routine and HBV DNA were also examined. **Results** The positive rate of TLR4 and the mean TLR4 mRNA copy number in severe hepatitis B group were both significantly higher than those in controls. And the level of TLR4 protein was positively relative with the level of ALT, AST, TBil and the percent of neutrophil. **Conclusions** The increasing level of TLR4 in patients with severe hepatitis B were significantly related with the degree of damage on liver cell and development

基金项目:济南市科技局立项课题(056018)

作者单位:250021 济南,济南市传染病医院

通讯作者:陈士俊 Email: crbdwj@126. com

of disease, so the detecting of TLR4 is associated with the prognosis and treatment of disease.

【Key words】 Severe hepatitis; Toll-like receptor; Flow cytometry; Reverse transcription polymerase chain reaction

Toll 样受体 (Toll-like receptor, TLR) 属于模式识别受体^[1], 在宿主对微生物的防御中起重要作用。其中 TLR4 是细胞壁脂多糖 (LPS) 的特异性受体, 可通过特定的细胞信号转导途径介导细胞免疫, 以造成机体的损伤^[2]。本研究通过检测慢性重型肝炎患者外周血单核细胞 (淋巴细胞、单核细胞) 表面的 TLR4 表达水平, 探讨其在慢性重型肝炎发病中的意义及作用机制。

资料和方法

一、研究对象

选取 2005 年 4 月至 2006 年 2 月于本院就诊的慢性重型乙型肝炎患者 31 例, 男 27 例, 女 4 例; 慢性乙型肝炎患者 37 例, 男 32 例, 女 5 例; 健康对照者 28 例, 男 24 例, 女 4 例。各组间性别、年龄比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。所有患者均符合 2000 年全国传染病和寄生虫病学会会议讨论的诊断标准^[3], 并签订知情同意书。

二、试剂与仪器

PE 抗人 TLR4 单抗为 eBioscience 公司产品, 流式细胞仪为 BD Bioscience 公司产品, 所有引物有上海博亚生物技术有限公司合成, 全自动生化仪 Ci8200 为美国雅培公司产品, 荧光定量 PCR 仪 Gene Amp 7300 为美国应用生物系统公司产品。

三、方法

1. 流式细胞仪检测外周血单个核细胞 TLR4 蛋白: 取 EDTA 抗凝血细胞悬液 100 μ l, 加 10 μ l PE 抗人 TLR4 单抗, 室温放置 30 min, 加入红细胞裂解液 2 ml, 避光静置 15 min, 离心, 1000 μ l PBS 液震荡洗涤 2 次, 不加抗体设置阴性对照。离心弃去保存液, 所得细胞以 PBS 液调整浓度至 2×10^9 /L, 将标本置于流式细胞仪上, 选定淋巴细胞门、单核细胞门进行检测。

2. RT-PCR 检测外周血单核细胞 TLR4 mRNA: 按 RNA 提取试剂盒说明书提取细胞总 RNA, MMLV 逆转录合成 cDNA 行 PCR 扩增。TLR4 引物序列, 上游: 5'-GAGT TTCACCCACTTTTTCACA-3'; 下游: 5'-GCCTGAGTGATATGACCCTTC-3'; β -肌动蛋白引物序列: 上游 5'-AGATCAAGATCATTGCTCCTCCTG-3'; 下游: 5'-CATTTGCGGTGGACGATGGA-3'。RT-PCR 反应条件: 50℃ 2 min 逆转录, 95℃ 2 min 逆转录酶灭活及预变性, 95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 72℃ 1 min 循环 40 次, 72℃ 延伸 5 min。取扩增产物行琼脂糖凝胶电泳, 紫外透射仪观察电泳结果, 并行凝胶扫描和图像分析。

3. 其他检测:全自动生化仪 Ci8200 分析丙氨酸转氨酶(ALT)、天门冬氨酸转氨酶(AST)、总胆红素(TBil)等生化指标及血常规,荧光定量 PCR 仪检测患者血清 HBV DNA 水平。

4. 统计学处理:采用 SPSS 11.0 软件对数据进行 *t* 检验、方差分析及 pearson 相关分析,所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、各组外周血单核细胞 TLR4 蛋白的表达

外周血淋巴及单核细胞 TLR4 蛋白表达阳性率为:正常对照组 < 慢性乙型肝炎组 < 重型乙型肝炎组,对各组淋巴及单核细胞 TLR4 蛋白表达进行两两比较(LSD 法),差异有显著性;而重症肝炎组与各组比较均有统计学差异($P < 0.01$) (表 1,图 1、2)。

二、各组外周血单核细胞 TLR4 mRNA 的表达

对照组外周血单核细胞 TLR4 mRNA 的表达量为(0.1557 ± 0.0333),慢性乙型肝炎组的表达量为(0.4829 ± 0.0806),重型肝炎组的表达量为(0.7270 ± 0.0746),各组之间的表达量差异有显著性(图 3)。

表 1 淋巴细胞、单核细胞表面 TLR4 受体的表达

组别	例数(n)	Toll 样受体阳性率(%)	
		淋巴细胞	单核细胞
健康对照组	28	2.625 ± 1.031	0.939 ± 0.527
慢性乙型肝炎组*	37	10.793 ± 2.544	7.516 ± 2.566
重型乙型肝炎组**	31	40.370 ± 11.120	29.060 ± 9.133

注:与对照组比较* $P < 0.01$;与慢性乙型肝炎组比较** $P < 0.01$

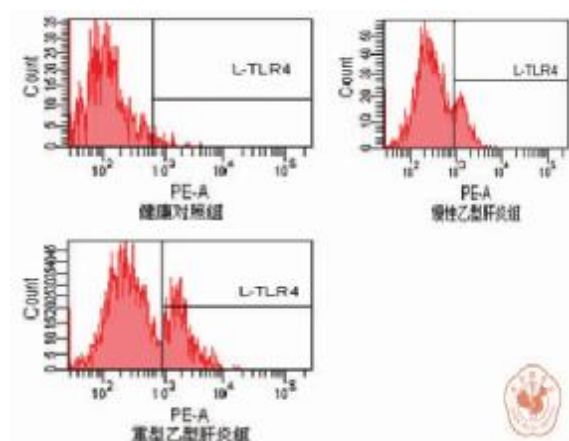


图 1 各组外周血淋巴细胞 TLR4 表达流式图

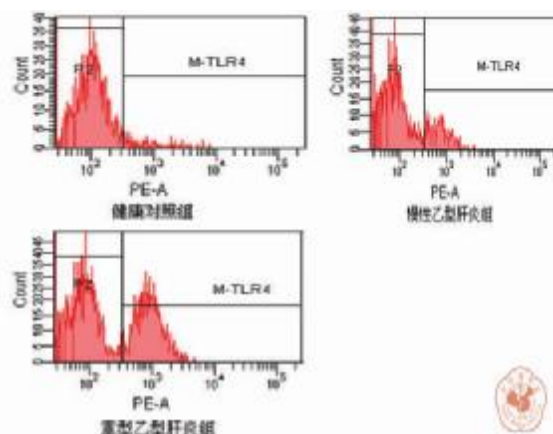


图 2 外周血单核细胞 TLR4 表达流式图

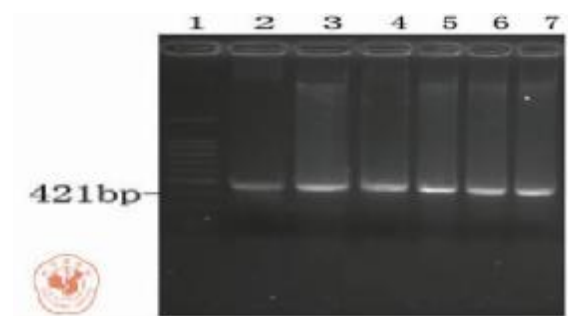


图3 各组外周血单核细胞 TLR4 mRNA 的表达
1. 分子量标准; 2. 正常对照组; 3. 正常对照组;
4. 慢性乙型肝炎组及重型乙型肝炎组; 5. 慢性
乙型肝炎组及重型乙型肝炎组 β -肌动蛋白 mRNA;
6. 重型乙型肝炎组; 7. 重型肝炎组 β -肌动
蛋白 mRNA

三、TLR4 mRNA 与其他各指标的相关关系

外周血单核细胞 TLR4 mRNA 的表达量与患者的肝功能指标 (AST、ALT、TBil) 及外周血中性粒细胞百分比之间呈正相关 (r 分别为 0.385、0.413、0.587、0.537, $P < 0.05$), 与 HBV DNA 及血小板之间无明显相关 (r 分别为 0.217、-0.080, $P > 0.05$)。

讨 论

TLR4 作为内毒素的特异性受体,通过识别血清内毒素,与 LPS/LBP/CD14 结合,招募 Myd88 (髓样分化蛋白),激活 IRAK (IL-1R 相关激酶) 及 MAPKKK (MAPK kinase kinase) 家族,最终诱导 NF- κ B (核因子) 活化,从而激活靶基因转录,释放一系列细胞因子,造成肝细胞损伤^[4,5]。慢性肝炎患者由于肠道菌群紊乱和细菌过度生长以及胃肠道黏膜淤血,使肠道产生、吸收内毒素增加,同时由于肝细胞大量坏死,免疫功能下降,枯否细胞清除能力下降,因而对内毒素及内毒素免疫复合物的清除减少,导致内毒素血症^[6]。Manigol 等^[7]认为肝硬化患者内毒素可致 TLR4 表达变化,而 TLR4 作为血清中内毒素的特异性受体,在慢性重型乙型肝炎致病过程中也必定发挥了重要作用。

TLR4 主要表达于外周血淋巴细胞及单核细胞,而中性粒细胞表达较少,提示 TLR4 介导免疫反应中发挥作用的靶细胞主要是外周血单核及淋巴细胞。本研究发现:慢性乙型肝炎患者外周血单核细胞表面 TLR4 蛋白及 mRNA 水平明显高于正常人,而慢性重型乙型肝炎患者的 TLR4 水平又显著高于慢性乙型肝炎患者。由此可见,在 HBV 感染整个过程中 TLR4 都发挥了作用,且随着疾病的进展其表达明显增加,与疾病的发生发展密切相关。本研究也发现:TLR4 水平与患者血清转氨酶及总胆红素水平呈正相关,提示外周血单核细胞 TLR4 的表达增高与肝脏损害及炎症活动度密切相关。另外,我们的研究结果也显示:TLR4 的表达与外周血中性粒细胞百分比呈正相关,说明慢性重型乙型肝炎感染患者虽无明显的感染

部位及征象,仍有内毒素血症的存在。范建高等^[8]发现 TLR4 的表达量随内毒素血症程度的增高和刺激时间延长而增加,且 LPS 能正性上调 TLR4 表达,进一步放大了 LPS 的生物学效应。因而在重型乙型肝炎中,肝细胞大量坏死,肝枯否细胞灭活能力减弱,进一步加速了内毒素血症的发生,而内毒素通过影响肝细胞代谢或 TLR4 介导的免疫反应加重病情的恶化,两者相互影响,互为因果。Isogawa 等^[9]研究表明急性乙型肝炎感染患者 TLR4 表达与血清 HBV DNA 含量呈负相关,提示它可通过识别病毒发挥免疫作用。本研究结果表明慢性肝炎患者 TLR4 表达与血清 HBV DNA 水平之间无明显相关性,这提示在急慢性 HBV 感染中,TLR4 造成肝细胞免疫损伤的机制是不同的。在急性 HBV 感染中 TLR4 可能主要通过识别病毒产生免疫反应导致肝细胞损伤,而在慢性 HBV 感染时 TLR4 则可能主要通过识别内毒素介导信号转导,从而造成肝细胞的损伤,病毒识别而导致的细胞损害为次要作用。

慢性肝炎特别是重型乙型肝炎外周血单核细胞 TLR4 水平显著升高,且与患者的肝功能及血中性粒细胞比值密切相关,监测 TLR4 值的动态变化有助于指导治疗。严重肝病通过抗菌治疗及提高免疫、调节肠道微生态环境等措施,可减少肠源性内毒素的产生和吸收,减少 TLR4 信号转导造成的免疫损伤,从而阻断 LPS 对肝细胞的进一步损害。

参 考 文 献

- 1 Medzhitov R, Presnyon-hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*,1997, 388:394-397.
- 2 Barton GM, Medzhitov R. Toll-like receptor signaling pathways. *Science*,2003, 300:1524-1525.
- 3 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案. *中华肝脏病杂志*,2000,8:324-329.
- 4 Nanji AA, Jokelainen K, Rahemtulla A, et al. Activation of nuclear factor kappa B and cytokine imbalance in experimental alcoholic liver disease in the rat. *Hepatology*,1999,30:934-943.
- 5 Fitzgerald KA, Palsson MC, Demott EM, et al. MAL(MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature*,2001,413:78-83.
- 6 Schwartz DA. The role of TLR4 in endotoxin responsiveness in humans. *Endotoxin Res*,2001,7:389-393.
- 7 Manigold T, Bocker U, Hanck C, et al. Differential expression of toll-like receptors 2 and 4 in patients with liver cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol*,2003, 15:275-282.
- 8 范建高,徐正婕,王国良,等. 大鼠非酒精性脂肪性肝炎形成过程中血清内毒素含量的变化. *中华肝脏病杂志*,2003,11:73-76.
- 9 Isogawa M, Robek MD, Furuichi Y, et al. Toll-like receptor signaling inhibits hepatitis B virus replication in vivo. *J Virol*,2005, 79:7269-7272.

(收稿日期:2007-06-12)

(本文编辑:韩俊燕)