



慢性乙型肝炎患者CXC趋化因子Mig的表达

慢性乙型病毒性肝炎是以局部炎症为主要特征,趋化因子是反应炎症活动的数量指标,能够趋化、激活中性粒细胞、单核细胞、NK细胞、淋巴细胞等趋化游走,在炎症部位聚集、活化,参与组织损伤和修复。CXC趋化因子 γ 干扰素诱生的单核因子(Mig)与其受体CXCR3相互作用,对表达该受体的NK细胞、T细胞、单核/巨噬细胞等活化、增殖,在机体抗感染、抑病毒等过程中起重要作用。国内外已有关于该趋化因子与丙型病毒性肝炎相关报道,但未见与乙型肝炎相关性研究。为了解CXC趋化因子Mig在慢性乙肝致病过程中的作用,本研究选择45例慢性乙肝患者以实时PCR法动态、定量检测Mig mRNA表达水平,以ELISA法定量检测血清Mig浓度,现将结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 临床资料

45例慢性乙肝病人为2004.1~2005.6淮南第二矿工医院收治的患者,其中男25例、女20例,年龄18~50岁,平均(30±9)岁。另选24例体检正常献血员为对照,其中男14例、女10例,年龄20~48岁,平均(25±5)岁。临床诊断符合2000年西安全国病毒性肝炎会议修订的诊断标准[1]。患者满足以下条件:血清HBsAg(+),HBeAg(+),抗-HBc(+)和血清HBV-DNA阳性(HBV-DNA $>1.0 \times 10^3$ copies/ml),丙氨酸转氨酶(ALT)升高,且下限高于正常值2倍,上限小于正常值8倍(80 U/L $<$ ALT $<$ 320 U/L)。病程均超过6个月,无合并HAV、HCV、HDV、HEV、HIV感染,无其他自身免疫性疾病,3个月内未系统用过抗病毒和免疫抑制剂治疗。

1.2 试剂与仪器

ELISA血清Mig检测试剂盒购自美国Sigma公司;Trizol试剂盒购自美国Invitrogen公司;淋巴细胞分离液购自上海试剂二厂。Light Cycler FastStart DNA Master SYBR Green I购自德国Roche公司。i-Cyclez 荧光实时定量PCR仪购自美国Bio-Rad公司。

1.3 标本采集

采取患者晨起空腹静脉血6ml,分别置于2支含肝素的无菌抗凝Eppendorf管和4支普通Eppendorf管。抗凝管用于外周血单个核细胞(PBMC)内趋化因子Mig mRNA检测,普通管用于血清Mig、HBV-DNA含量检测,严格按照说明书进行操作。

1.4 实时PCR检测

以淋巴细胞分离液常规分离PBMC,用Hank's液洗涤2次,以1640完全培养液调整细胞数至 $(1 \sim 2) \times 10^6$ 个/ml。以Trizol试剂抽提患者PBMC总RNA,并逆转录为cDNA,置-86℃冰箱备检。采用SYBR Green I荧光标记法检测PCR产物,总反应体系为25 μ l,包括上下游引物各10 pmol, MgCl₂ 2.5mmol, Ex-Taq 1.25U, dNTPs 0.2mmol, 1 \times PCR Buffer(500 mmol KCl, 100mmol Tris, 20mg/ml gelatin, pH 8.3), 2 \times SYBRTM Green I液。2 μ l标准品或模板cDNA,模板cDNA以1:4稀释。趋化因子引物设计参照Shields等方法进行[2][3],趋化因子Mig的引物序列见表1。扩增反应参数如下:95℃预变性300s,95℃变性50s,55℃退火

40s, 72°C延伸90s, 共35个循环, 最后72°C延伸300s。为减少模板cDNA浓度等其他因素对扩增效率的影响, 以趋化因子与管家基因GAPDH比值为其最终相对表达水平。

表 1 实时 PCR 扩增应用的趋因子引物序列

Tab.1 Primer sequences for real-time PCR of GAPDH and Mig

Type	Sense(5'→3')	Antisense(5'→3')	Length
GAPDH	GGTATC GTG GAA GGA CTC ATG AC	ATG CCA GTG AGC TTC CCG TTC AGC	188 bp
Mig	GGA ACT CCA TTC TAT CAC	TAT TGG TGA AGT GGT CTC	414 bp

1.5 标准品和标准曲线的制备

采用管家基因GAPDH的PCR产物为外参标准。为确定定量扩增的效率和灵敏度, 将起始浓度为1 ng (10⁵ copies/μl) 的GAPDH按1:10做连续的4个梯度稀释, 即10⁵、10⁴、10³和10² copies/μl做为扩增标准品绘制标准曲线。

1.6 统计学处理

为克服系统误差, 统计数据以趋化因子log cD-NA/log GAPDH比值的均数±标准差表示趋化因子mRNA表达水平, 以排除在RNA提取和逆转录过程中出现的变异。组间差异采用t检验, P<0.05为差异有显著性。

2 结果

慢性乙肝患者PBMC内Mig mRNA水平及血清Mig含量均升高, 与正常对照组比较差异有显著性(P<0.001, P<0.05, 表2)。慢性乙肝患者PBMC内Mig mRNA与其外周血中Mig含量显著相关(r=0.7157, P<0.001, 图1A), 而正常人群体内二者无相关性(r=0.2742, P>0.10, 图1B)。慢性乙肝患者外周血中Mig浓度与血清ALT水平显著相关(r=0.7220, P<0.001, 图2A), 而正常人群体内二者无相关性(r=0.2709, P>0.20, 图2B)。慢性乙肝患者外周血中Mig浓度与血清HBV-DNA含量显著相关(r=0.7266, P<0.001, 图3)。

表 2 慢性乙肝患者 PBMC 内 Mig mRNA 表达水平及血清 Mig 含量

Tab.2 mRNA expression (log cDNA/log GAPDH) in PBMCs and plasma Mig level in patients with chronic hepatitis B

Group	n	Mig mRNA	Mig (pg/ml)
Control	24	0.3921±0.0601	287.4±25.6
Chronic hepatitis B	45	0.6883±0.0693	609.6±73.8
		t=17.6787	t=26.4544
		P<0.001	P<0.05

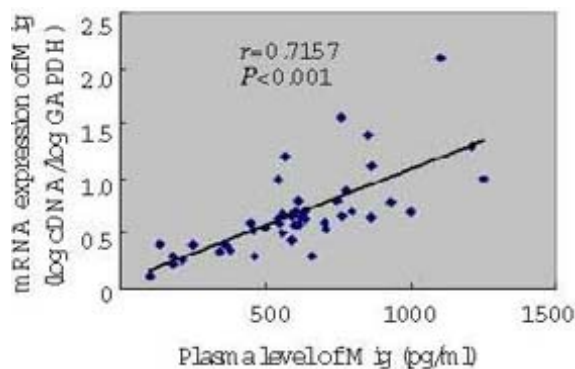


图1A 慢性乙肝患者Mig mRNA与血清Mig浓度相关性

Fig. 1A Correlation between mRNA expression and plasma Mig level in patients with chronic hepatitis B

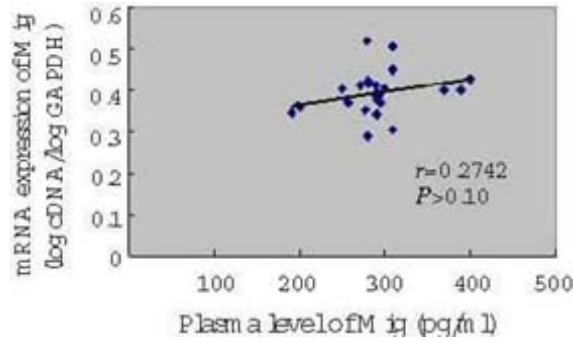


图1B 正常人群Mig mRNA与血清Mig浓度相关性

Fig. 1B Correlation between mRNA expression and plasma Mig level in healthy donors

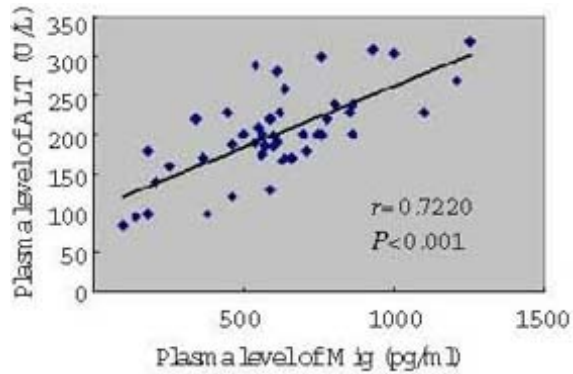


图2A 慢性乙肝患者血清Mig浓度与血清ALT相关性

Fig. 2A Correlation between plasma Mig level and ALT in patients with chronic hepatitis B

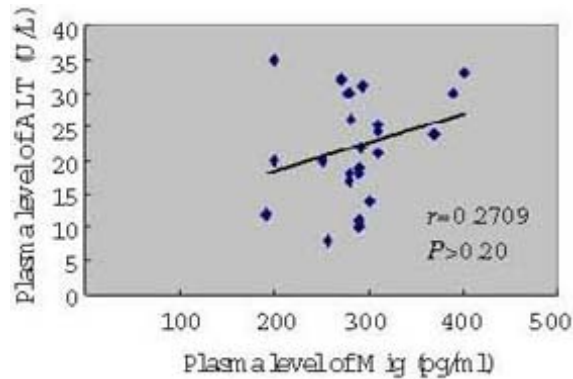


图2B 正常人群血清Mig浓度与血清ALT相关性

Fig. 2B Correlation between plasma Mig level and ALT in healthy donors

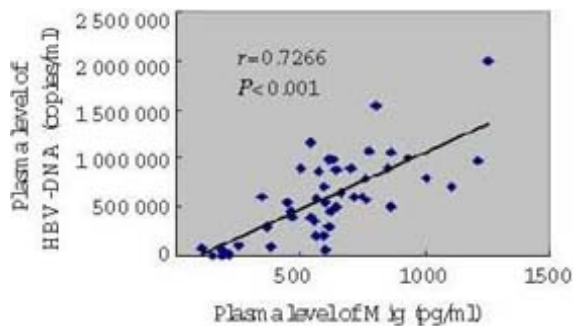


图3 慢性乙肝患者血清Mig浓度与血清HBV-DNA含量相关性

Fig. 3 Correlation between plasma Mig level and HBV DNA in patients with chronic hepatitis B

3 讨论

趋化因子是能使细胞发生趋化作用的细胞因子总称[4]，分为CXC、CC、C、CX3C四个亚家族(C代表半胱氨酸，X代表任意氨基酸)，以CXC和CC亚家族最为重要。不同趋化因子亚家族趋化不同的炎症细胞[5]。CC趋化因子主要趋化单核细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞和T细胞。CXC趋化因子按其分子N-端前是否存在谷氨酸-亮氨酸-精氨酸(Glu-Leu-Arg)即ELR结构，进一步分为ELR+CXC和ELR-CXC两亚族，ELR+CXC主要趋化中性粒细胞，而ELR-CXC趋化因子尤其是 γ 干扰素诱生蛋白10(IP-10)、Mig、干扰素诱生的T细胞趋化剂 α (I-TAC)均可由IFN- γ 诱导单核/巨噬细胞、肝细胞、成纤维细胞、角质形成细胞和内皮细胞等分泌，通过其共同受体CXCR3对表达该受体的活化T细胞、NK细胞等趋化和激活，发挥抗感染、抑病毒等多种生物学功能[6][7]。

本研究发现慢性乙肝患者PBMC内Mig mRNA和血清Mig浓度均显著升高，与对照组有显著性差异，且二者具有明显相关性，正常人群则无相关性，此与Kakimi等[8]报道类似。Kakimi等利用转基因鼠模型转导对HBV特异的CTL，发现CTL能够分泌IFN- γ 、TNF- α 等刺激肝细胞产生Mig和IP-10，趋化非特异性单核细胞和其他炎性细胞浸润于肝脏。当阻断这些趋化因子则减少了宿主源性单核细胞在肝脏的浸润，降低了肝组织损伤严重性。Apolinario等[3]利用RT-PCR技术、ELISA法研究表明Mig mRNA及Mig蛋白含量在体外培养肝细胞株经感染HCV后表达均增加。最近Bieche等[9]也证实Mig、IP-10、I-TAC在慢性乙肝患者中表达显著增高。而与Mihm等[10]报道结果不同，Mihm等通过RT-PCR技术发现慢性丙肝患者中IP-10 mRNA和血清中蛋白浓度均表达增高，而在慢性乙肝患者中虽表达增高，但未达到显著性差异。但其发现慢性乙肝、丙肝患者肝脏炎症局部浸润细胞均主要为Th1和Th0，无Th2细胞，也有天然T细胞、NK细胞、单核/巨噬细胞浸润，这与IP-10作用的靶细胞一致。Sallusto等[11]早已证实Th1细胞能够表达高水平的CXCR3受体。国内学者胡芸文等[12]也报道慢性丙肝患者PBMC内趋化因子IL-8、Mig、I-309、TARC mRNA表达明显增高，经IFN治疗6个月后IL-8、Mig、TARC mRNA水平显著降低至接近正常水平。已知乙型肝炎是以淋巴单核细胞浸润和Kupffer细胞增生为特征，因此，慢性乙肝患者表达高水平的Mig，通过趋化、激活表达其受体CXCR3的单核细胞、淋巴细胞等向肝脏组织定向迁移，在感染局部发挥辅助CTL及活化其他免疫细胞作用，同时这些活化细胞又分泌更多趋化因子，进一步介导炎症细胞在肝脏内聚集，参与肝脏炎性反应。

本研究还发现慢性乙肝患者血清中Mig含量与自身体内ALT、HBV-DNA水平显著相关。Apolinario等[13]报道Mig、IP-10在慢性丙肝患者中的表达与炎症密切相关。Harvey等[14]利用免疫组化技术证实，IP-10在慢性丙肝患者肝脏中表达增高，且高表达的IP-10与肝脏炎症活动程度密切相关。Kusano等[15]证实慢性丙肝患者RANTES mRNA水平与血清ALT水平显著相关，反应了炎症浸润过程。我们对慢性乙肝患者研究发现亦有类似结果。ALT是细胞损害的敏感标志，在一定程度上反应肝细胞损害和坏死的程度。HBV-DNA(+)说明存在乙肝病毒感染，且病毒正在复制。慢性乙肝患者体内Mig表达同血清ALT、HBV-DNA水平密切相关，该结果进一步支持Mig刺激T细胞、NK细胞活化，趋化到达肝脏浸润，在清除病毒及被病毒感染肝细胞同时，分泌各种炎症递质造成组织损伤，导致感染肝细胞破裂，释放大量病毒及ALT入血，进一步参与乙肝慢性化。

综上所述，慢性乙肝患者Mig mRNA及蛋白含量均显著增高，其增高与血清中HBV-DNA、ALT水平显著相关。Mig参与了肝脏炎症细胞的浸润，介导了肝组织损伤，在慢性乙肝发病机制中起一定作用。

参考文献:

[1]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[J]. 中华传染病杂志, 2001, 19(1): 56-62.

- [2]Shields PL, Morland CM, Salmon M, et al. Chemokine and chemokine receptor interactions provide a mechanism for selective T cell recruitment to specific liver compartments within hepatitis C-infected liver[J]. *J Immunol*, 1999, 163(11): 6236-43.
- [3]Apolinario A, Majano PL, Lorente R, et al. Gene expression profile of T-cell-specific chemokines in human hepatocyte-derived cells: evidence for a synergistic inducer effect of cytokines and hepatitis C virus proteins[J]. *J Viral Hepat*, 2005, 12(1): 27-37.
- [4]Laing KJ, Secombes CJ. Chemokines[J]. *Dev Comp Immunol*, 2004, 28(5): 443-60.
- [5]赵金红, 王 健. 趋化因子研究进展[J]. *陕西医学杂志*, 2005, 34(12): 1542-4.
- [6]Salazar-Mather TP, Hamilton TA, Biron CA. A chemokine-to-cytokine-to-chemokine cascade critical in antiviral defense[J]. *J Clin Invest*, 2000, 105(7): 985-93.
- [7]Schweyer S, Mihm S, Radzun HJ, et al. Liver infiltrating T lymphocytes express interferon gamma and inducible nitric oxide synthase in chronic hepatitis C virus infection[J]. *Gut*, 2000, 46(2): 255-9.
- [8]Kakimi K, Lane TE, Wieland S, et al. Blocking chemokine response to gamma-2/interferon (IFN)-gamma inducible protein and monokine induced by IFN-gamma activity in vivo reduces the pathogenetic but not the antiviral potential of hepatitis B virus-specific cytotoxic T lymphocytes[J]. *J Exp Med*, 2001, 194(12): 1755-66.
- [9]Bieche I, Asselah T, Laurendeau I, et al. Molecular profiling of early stage liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C virus infection[J]. *Virology*, 2005, 332(1): 130-44.
- [10]Mihm S, Schweyer S, Ramadori G. Expression of the chemokine IP-10 correlates with the accumulation of hepatic IFN-gamma and IL-18 mRNA in chronic hepatitis C but not in hepatitis B[J]. *J Med Virol*, 2003, 70(4): 562-70.
- [11]Sallusto F, Lenig D, Mackay CR, et al. Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes[J]. *J Exp Med*, 1998, 187(6): 875-83.
- [12]胡芸文, 王 健, 张继明, 等. 慢性丙型肝炎患者外周血单个核细胞中趋化因子水平与干扰素治疗的关系[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2005, 25(6): 457-62.
- [13]Apolinario A, Majano PL, Alvarez-Perez E, et al. Increased expression of T cell chemokines and their receptors in chronic hepatitis C: relationship with the histological activity of liver disease[J]. *Am J Gastroenterol*, 2002, 97(11): 2861-70.
- [14]Harvey CE, Post JJ, Palladinetti P, et al. Expression of the chemokine IP-10 (CXCL10) by hepatocytes in chronic hepatitis C virus infection correlates with histological severity and lobular inflammation[J]. *J Leukoc Biol*, 2003, 74(3): 360-9.
- [15]Kusano F, Tanaka Y, Marumo F, et al. Expression of C-C chemokines is associated with portal and periportal inflammation in the liver of patients with chronic hepatitis C [J]. *Lab Invest*, 2000, 80(3): 415-22.