

## 慢性乙型肝炎患者 CXC 趋化因子 M<sub>ig</sub> 的表达

赵金红<sup>1</sup>, 王健<sup>1</sup>, 江水清<sup>2</sup>, 项桂菊<sup>2</sup> (1 安徽理工大学医学院病原学与免疫学教研室, 安徽淮南 232001; 2 淮南第二矿工医院感染科, 安徽淮南 232057)

**摘要:**目的 探讨慢性乙型肝炎(乙肝)患者 CXC 趋化因子 M<sub>ig</sub> 的表达水平及其与 HBV-DNA、丙氨酸转氨酶(ALT)的相关性。方法 以实时 PCR 法动态检测慢性乙肝患者外周血单个核细胞(PBMC)内 M<sub>ig</sub> mRNA 的表达水平, 以趋化因子与 GAPDH 比值为其最终含量。以 ELISA 法定量检测患者外周血中 M<sub>ig</sub> 蛋白含量。结果 慢性乙肝患者 PBMC 内 M<sub>ig</sub> mRNA 表达水平为  $0.6883 \pm 0.0693$ , 与正常对照组相比差异有显著性 ( $P < 0.001$ )。M<sub>ig</sub> 血清浓度为  $(609.6 \pm 73.8) \text{ pg/ml}$ , 与正常对照组相比差异有显著性 ( $P < 0.05$ )。患者 PBMC 内 M<sub>ig</sub> mRNA 与其外周血中 M<sub>ig</sub> 含量显著相关 ( $r = 0.7157$ ,  $P < 0.001$ ), 外周血中 M<sub>ig</sub> 含量与血清 ALT 水平显著相关 ( $r = 0.7220$ ,  $P < 0.001$ ), 外周血中 M<sub>ig</sub> 含量与血清中 HBV-DNA 含量显著相关 ( $r = 0.7266$ ,  $P < 0.001$ )。结论 慢性乙肝患者 M<sub>ig</sub> mRNA 及血清 M<sub>ig</sub> 含量表达均增高, M<sub>ig</sub> 介导了肝脏炎症细胞浸润, 参与了乙肝慢性化病程。

**关键词:** 乙型肝炎; 趋化因子; M<sub>ig</sub>; 丙氨酸转氨酶; 实时 PCR

中图分类号: R512.62 文献标识码: A 文章编号: 1673-4254(2006)11-1589-04

## Expression of chemokine monokine induced by interferon- $\gamma$ in patients with chronic hepatitis B

ZHANA Jin-hong<sup>1</sup>, WANG Jian<sup>1</sup>, JIANG Shui-qing<sup>2</sup>, XIANG Gui-ju<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Etiology and Immunology, Medical College of Anhui University of Science and Technology, Huainan 232001, China;

<sup>2</sup>Department of Infectious Diseases, Second Worker's Hospital of Huainan, Huainan 232057, China

**Abstract:** **Objective** To study the expression levels of monokine induced by interferon- $\gamma$  (M<sub>ig</sub>) mRNA and its association with HBV DNA and alanine aminotransferase (ALT) in patients with chronic hepatitis B. **Methods** The level of M<sub>ig</sub> mRNA in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) was dynamically detected with real-time quantitative PCR, and the ratio of chemokine/GAPDH was considered to represent the final chemokine level. The plasma level of M<sub>ig</sub> was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** The mean level of M<sub>ig</sub> mRNA in PBMCs of the patients with chronic hepatitis B was  $0.6883 \pm 0.0693$ , which was significantly higher than that in normal controls ( $P < 0.001$ ). The plasma M<sub>ig</sub> level in the patients was  $609.6 \pm 73.8 \text{ pg/ml}$ , also significantly higher than that in normal controls ( $P < 0.05$ ). In patients with chronic hepatitis B, the level of M<sub>ig</sub> mRNA in the PBMCs was significantly correlated with plasma M<sub>ig</sub> level ( $r = 0.7157$ ,  $P < 0.001$ ), and plasma M<sub>ig</sub> level was correlated with plasma ALT level ( $r = 0.7220$ ,  $P < 0.001$ ) and plasma HBV DNA level ( $r = 0.7266$ ,  $P < 0.001$ ). **Conclusion** Both the expression of M<sub>ig</sub> mRNA in PBMCs and plasma M<sub>ig</sub> concentration are elevated in patients with chronic hepatitis B. M<sub>ig</sub> plays an important role in migration of the inflammatory cells to the liver and mediates the development of chronic hepatitis B.

**Key words:** hepatitis B; chemokine; monokine induced by interferon- $\gamma$ ; alanine aminotransferase; real-time polymerase chain reaction

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  $\gamma$  干扰素诱生的单核因子(M<sub>ig</sub>)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 M<sub>ig</sub> 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 M<sub>ig</sub> mRNA 表达水平, 以 ELISA 法定量检测血清 M<sub>ig</sub> 浓度, 现将结果报道如下。

收稿日期: 2006-03-09

基金项目: 安徽省教育厅自然科学基金重点项目(2003kj027zd)

Supported by Key Research Project sponsored by Education Department of Anhui Province (2003kj027zd)

作者简介: 赵金红(1978-), 女, 硕士研究生, 电话: 0554-6659942,

E-mail: zhaojr45@sohu.com

通讯作者: 王健, E-mail: wangjian8237@sina.com

### 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  $(30 \pm 9)$  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<sup>[1]</sup>。患者满足以下条件:血清 HBsAg (+)、HBeAg (+)、抗-HBc (+)和血清 HBV-DNA 阳性 (HBV-DNA >1.0×10<sup>3</sup> 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 6 ml, 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 (PBM C) 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 PBM C, 用 Hank's 液洗涤 2 次,以 1640 完全培养液调整细胞数至 (1~2) ×10<sup>6</sup> 个/ml。以 Trizol 试剂抽提患者 PBM C 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 μl, 包括上下游引物各 10 pmol, MgCl<sub>2</sub> 2.5 mmol, Ex-Taq 1.25 U, dNTPs 0.2 mmol, 1×PCR Buffer (500 mmol KCl, 100 mmol Tris, 20 mg/ml gelatin, pH 8.3), 2×SYBR Green I 液。2 μl 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<sup>[2-3]</sup>,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 300 s, 95℃变性 50 s, 55℃退火 40 s, 72℃延伸 90 s, 共 35 个循环,最后 72℃延伸 300 s。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	GGT ATC 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 (10<sup>5</sup> copies/μl) 的 GAPDH 按 1:10 做连续的 4 个梯度稀释,即 10<sup>5</sup>、10<sup>4</sup>、10<sup>3</sup> 和 10<sup>2</sup> 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 cDNA / 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 PBM C 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 PBM C 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 PBM C 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

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<sup>[4]</sup>, 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

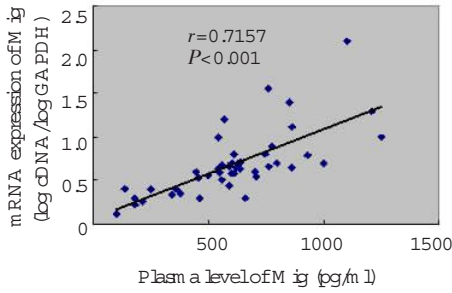


图 1A 慢性乙肝患者 MIP-1 $\beta$  mRNA 与血清 MIP-1 $\beta$  浓度相关性

Fig.1A Correlation between mRNA expression and plasma MIP-1 $\beta$  level in patients with chronic hepatitis B

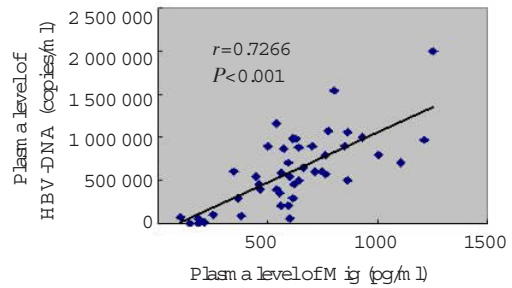


图 3 慢性乙肝患者血清 MIP-1 $\beta$  浓度与血清 HBV-DNA 含量相关性

Fig.3 Correlation between plasma MIP-1 $\beta$  level and HBV DNA in patients with chronic hepatitis B

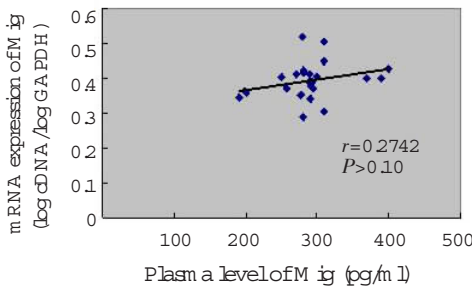


图 1B 正常人群 MIP-1 $\beta$  mRNA 与血清 MIP-1 $\beta$  浓度相关性

Fig.1B Correlation between mRNA expression and plasma MIP-1 $\beta$  level in healthy donors

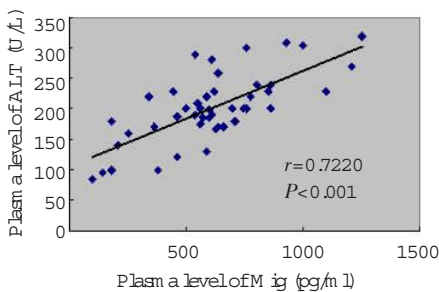


图 2A 慢性乙肝患者血清 MIP-1 $\beta$  浓度与血清 ALT 相关性

Fig.2A Correlation between plasma MIP-1 $\beta$  level and ALT in patients with chronic hepatitis B

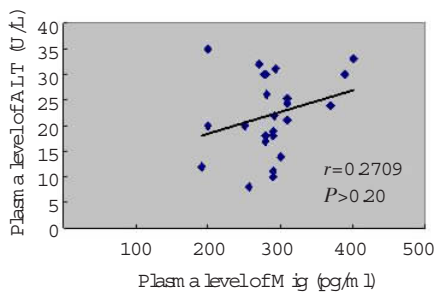


图 2B 正常人群血清 MIP-1 $\beta$  浓度与血清 ALT 相关性

Fig.2B Correlation between plasma MIP-1 $\beta$  level and ALT in healthy donors

族最为重要。不同趋化因子亚家族趋化不同的炎症细胞<sup>[5]</sup>。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  $\gamma$  干扰素诱生蛋白 10 (IP-10)、MIP-1 $\beta$ 、干扰素诱生的 T 细胞趋化剂  $\alpha$  (I-TAC)均可由 IFN- $\gamma$  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<sup>[6-7]</sup>。

本研究发现慢性乙肝患者 PBM C 内 MIP-1 $\beta$  mRNA 和血清 MIP-1 $\beta$  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 Kakim i 等<sup>[8]</sup>报道类似。Kakim i 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- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  等刺激肝细胞产生 MIP-1 $\beta$  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<sup>[3]</sup>利用 RT-PCR 技术、ELISA 法研究表明 MIP-1 $\beta$  mRNA 及 MIP-1 $\beta$  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<sup>[9]</sup>也证实 MIP-1 $\beta$ 、IP-10、I-TAC 在慢性乙肝患者中表达显著增高。而与 Mirm 等<sup>[10]</sup>报道结果不同,Mirm 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<sup>[11]</sup>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 PBM C 内趋化因子 IL-8、MIP-1 $\alpha$ 、I-309、TARC mRNA 表达明显增高,经 IFN 治疗 6 个月后 IL-8、MIP-1 $\alpha$ 、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 MIP-1 $\alpha$ ,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,参与肝脏炎症反应。

本研究还发现慢性乙肝患者血清中 MIP-1 $\alpha$  含量与自身体内 ALT、HBV-DNA 水平显著相关。Apolinario 等 [13] 报道 MIP-1 $\alpha$ 、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 MIP-1 $\alpha$  表达同血清 ALT、HBV-DNA 水平密切相关,该结果进一步支持 MIP-1 $\alpha$  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,释放大量的病毒及 ALT 入血,进一步参与乙肝慢性化。

综上所述,慢性乙肝患者 MIP-1 $\alpha$  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。MIP-1 $\alpha$  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, M ajano 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] Kakinoki K, Lane TE, Wieland S, et al. Blocking chemokine responsive to gamma-a-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 program 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, M ajano 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, Mizumoto 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.