

慢性乙肝和慢性重型乙肝患者血单核细胞 Toll样受体2的变化

尉秀清^{1,2}, 崇雨田², 文卓夫¹

(中山大学附属第三医院 1. 消化内科; 2. 感染科, 广东 广州 510630)

摘要:【目的】探讨慢性乙型肝炎和慢性重型乙型肝炎患者外周血单核细胞 Toll 样受体 2(TLR2)的变化情况及其意义。【方法】随机选取慢性乙型肝炎患者 31 例, 设定为慢性乙型肝炎组, 慢性重型乙型肝炎患者 30 例设定为慢性重型乙型肝炎组, 健康志愿者 30 例为正常对照组, 用流式细胞仪检测各组外周血单核细胞表面 Toll 样受体 2 的表达, ELISA 法检测血清肿瘤坏死因子 α (TNF- α)的水平, 荧光定量 PCR 法检测血清 HBV DNA 并取对数作为复制水平的指标, 总胆红素(TB)和凝血酶原时间(PT)的检测按照本院常规检测。三组均数间的比较采用单因素方差分析和 Scheffe 检验进行两两间的比较; 两组计量资料间的比较采用 Mann-Whitney *U* 秩和检验; 两组数据间的相关性分析采用线性相关分析; $P < 0.05$ 为有统计学意义。【结果】正常对照组、慢性乙型肝炎组及慢性重型乙型肝炎组外周血单核细胞 TLR2 表达强度和血清 TNF- α 水平平均分别为 (21.5 ± 2.7) MFI、 (39.0 ± 4.1) MFI、 (47.7 ± 21.4) MFI 和 (54 ± 38) ng/L、 (164 ± 90) ng/L、 (360 ± 140) ng/L, 依次逐渐升高, 且各组间比较均具有显著性差异; 外周血单核细胞 TLR2 表达水平与血清 TNF- α 表达水平呈现显著的正相关。慢性重型乙型肝炎组与慢性乙型肝炎组 TB、PT 和血清 HBV DNA 对数值分别为 (470 ± 225) μ mol/L 与 (101 ± 131) μ mol/L, (35.1 ± 21.1) s 与 (15.4 ± 2.2) s 和 5.9 ± 2.0 与 5.4 ± 1.6 ; 慢性重型乙型肝炎组与慢性乙型肝炎组比较, TB、PT 显著升高而血清 HBV DNA 对数值无显著性差异; 外周血单核细胞 TLR2 表达水平与 TB 及 PT 呈现显著的正相关, 但与血清 HBV DNA 对数值间无显著的相关性。【结论】TLR2 可能与慢性乙型肝炎及慢性重型乙型肝炎的发病有关。

关键词:乙型肝炎; Toll 样受体 2; 肿瘤坏死因子 α

中图分类号: R512.6

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2008)01-0091-04

Elevated Expression of Toll-like Receptor 2 on Peripheral Blood Monocytes in Patients with Chronic and Chronic Severe Hepatitis B

WEI Xiu-Qing^{1,2}, CHONG Yu-Tian², WEN Zhuo-Fu¹

(1. Department of Digestive Diseases, 2. Department of Infectious Diseases, The Third Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

Abstract: 【Objective】To study the change of TLR2 on peripheral blood monocytes (PBMCs) and its role in the pathogenesis of chronic and chronic severe hepatitis B. 【Methods】Randomly selected 31 patients with chronic hepatitis B, 30 patients with chronic severe hepatitis B and 30 healthy controls entered into this study. The expression of TLR2 on PBMCs was determined by flow cytometry. The level of serum tumor necrosis factor α (TNF- α) was determined by ELISA. The serum HBV DNA level was determined by fluorescence PCR and presented as Lg (HBV DNA). Total bilirubin (TB) and prothrombin time (PT) were routine tests. The differences between three means were determined by one-way ANOVA and Scheffe test. The difference between two means was determined by Mann-Whitney *U* test. The correlations between TLR2 and TNF- α , Lg (HBV DNA), TB, PT were determined by linear correlation test. 【Results】The values of TLR2 on PBMCs and serum TNF- α in the group of healthy controls, the group of patients with chronic hepatitis B and the group of patients with chronic severe hepatitis B were (21.5 ± 2.7) MFI, (39.0 ± 4.1) MFI, (47.7 ± 21.4) MFI, and (54 ± 38) ng/L, (164 ± 90) ng/L, (360 ± 140) ng/L. Both

收稿日期: 2007-07-11

基金项目: 广东省自然科学基金(05001710)

作者简介: 尉秀清(1975-), 男, 山东莱阳人, 博士, 主治医师; 崇雨田, 通讯作者, 副教授, 硕士生导师, E-mail: weixiuqing1975@yahoo.com.cn

of them increased gradually and significantly. There was a significant positive correlation between the value of TLR2 and the value of serum TNF- α . The values of TB, PT and Lg(HBV DNA) in the group of patients with chronic severe hepatitis B and the group of patients with chronic hepatitis B were $(470 \pm 225) \mu\text{mol/L}$ and $(101 \pm 131) \mu\text{mol/L}$, $(35.1 \pm 21.1)\text{s}$ and $(15.4 \pm 2.2)\text{s}$, 5.9 ± 2.0 and 5.4 ± 1.6 . The values of TB and PT in the group of patients with chronic severe hepatitis B were significantly higher than those in the group of patients with chronic hepatitis B. But there was no significant difference for the values of Lg(HBV DNA) between the above two groups. There were significant positive correlations between the values of TLR2 and TB, PT, but not Lg(HBV DNA).

【Conclusion】 There may be a role of TLR2 in the pathogenesis of chronic hepatitis B and chronic severe hepatitis B.

Key words: hepatitis B; Toll-like receptor 2; tumor necrosis factor α

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2008,29(1):91-94]

乙型肝炎的发病机制非常复杂,与肝细胞内 HBV 数量无明显相关性,而主要取决于机体的免疫应答^[1-4]。目前已经有相当多的研究证实获得性免疫系统在乙型肝炎的发病机制中起到了重要的作用,但有关乙型肝炎患者的天然免疫功能变化的研究很少。Toll 样受体 (toll-like receptors, TLRs) 是重要的天然免疫受体,其中 TLR2 的识别谱广、生物学作用广泛,主要包括调控获得性免疫反应和引发炎症反应等^[5],新近的研究还发现,HBV 核衣壳的核心抗原成分通过其富含精氨酸的片段与人巨噬细胞细胞膜上的硫酸乙酰肝素成分结合后,可以激活 TLR2 信号通路,使 NF-kappaB 活化,导致肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α) 等的分泌,这一过程是 TLR2 特异性依赖的^[6]。TLR2 是否参与乙型肝炎的发病是一个值得探讨的问题,本文以慢性乙型肝炎患者和慢性重型乙型肝炎患者为研究对象,初步观察了外周血单核细胞表面 TLR2 受体表达水平的变化,初步探讨了上述问题。

1 材料和方法

1.1 临床资料

随机选取 2005 年 1 月到 2005 年 12 月于我院感染科住院的病例,慢性重型乙型肝炎患者 30 例,其中男 27 例,女 3 例,年龄 25 ~ 66 (44 ± 12) 岁;慢性乙型肝炎 31 例,其中,轻度 3 例,中度 10 例,重度 18 例,男 25 例,女 6 例,年龄 27 ~ 57 (39 ± 9) 岁。对慢性乙型肝炎的临床诊断根据 2000 年修订的病毒性肝炎防治方案中有关慢性病毒性肝炎的分度及慢性重型病毒性肝炎的临床诊断标准进行^[7]。以上病例均为 HBsAg 及 HBV DNA 阳性,且排除有合并其它病毒、细菌等感染或其它重大疾病,亦无酗酒情况。健康自愿者对照 30 例,男

25 例,女 5 例,年龄 25 ~ 68 (42 ± 11) 岁,均为 HBsAg 及 HBV DNA 阴性,其余要求同病例组。

1.2 方法

1.2.1 流式细胞仪检测外周血单核细胞表面 TLR2 的表达 分别于试管中依次加入 APC-anti-CD14 抗体 10 μL , FITC-anti-TLR2 抗体 10 μL , EDTA 抗凝全血 100 μL , 震荡充分混匀,按常规方法室温、避光孵育 30 min; 然后加溶血素 2 mL 溶血, 10 min, 然后离心,抛弃液体成分;以 PBS 洗涤 2 次后,再以 PBS 配成约 $10^6/\text{mL}$ 液,然后用 BD FACS Calibur 流式细胞仪检测。以 APC-CD14 阳性设门,坏死细胞和碎片等根据 SSC 特征予以排除,门内细胞即为 CD14+ 单核细胞,共获取门内 10 000 个单核细胞(图 1),以备分析。对上述 10 000 个单核细胞的数据,经 Cellquest 统计软件分析,获取直方图,以平均免疫荧光强度 (mean fluorescence intensity, MFI) 表示 TLR2 的表达强度。FITC-mouse IgG 2a, kappa 10 μL 代替 FITC-anti-TLR2 抗体作为同型对照。实验所用抗体及溶血素均为美国 Ebioscience 公司产品,流式细胞仪为美国 BD 公司产品。

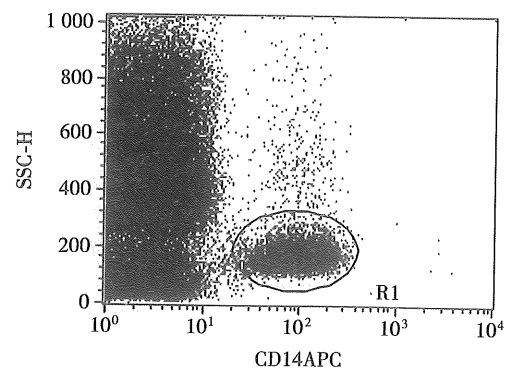


图 1 外周血单核细胞的获取

Fig.1 Acquisition of peripheral blood monocytes

10 000 CD14⁺ cells were acquired for each sample, and dead cells were gated out based on their light scatter properties

1.2.2 血清 TNF- α 检测 采用双抗体夹心酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测,试剂为加拿大 YES BIOTECH Laboratories LTD 的 Human TNF- α ELISA 试剂盒。

1.2.3 血清 HBV DNA 检测 采用荧光定量 PCR 法检测,试剂盒为广州中山大学达安基因股份有限公司产品,最小测出拷贝量值为 $1 \times 10^3/\text{mL}$,本研究纳入对象均高于此。以血清 HBV DNA 对数值 [lg(HBV DNA)] 记录数据,作为病毒复制的指标。

1.2.4 常规临床指标的检测 血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、总胆红素(TB)、凝血酶原时间(PT)、胆碱酯酶、乙肝两对半等常规临床项目的检测均严格按照本院的正规要求检测。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 11.0 统计软件进行分析,结果以均数 \pm 标准差表示。三组均数间的比较采用单因素方差分析和 Scheffe 检验进行两两间的比较;两组计

量资料间的比较采用 Mann-Whitney U 秩和检验;两组数据间的相关性分析采用线性相关分析;检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 外周血单核细胞 TLR2、血清 TNF- α 、血清总胆红素水平、凝血酶原时间水平和血清 HBV DNA 水平

自正常对照组到慢性乙型肝炎组及慢性重型乙型肝炎组外周血单核细胞 TLR2 表达强度和血清 TNF- α 水平依次升高,且各组间比较均具有显著性差异(表 1)。图 2 显示了一例患者外周血单核细胞 TLR2 表达的直方图及其同型对照。慢性重型乙型肝炎组外周血清 TB 和 PT 显著高于慢性乙型肝炎组(表 1),慢性重型乙型肝炎组和慢性乙型肝炎组外周血清 Lg(HBV DNA)无显著性差异(表 1)。

表 1 各组病例 TLR2, TNF- α , lg(HBV DNA), TB and PT 水平
Table 1 Levels of TLR2, TNF- α , Lg(HBV DNA), TB and PT in different groups ($\bar{x} \pm s$)

Groups	n	TLR2(MFI)	TNF- α (ng/L)	lg(HBV DNA)	TB($\mu\text{mol/L}$)	PT(Seconds)
Healthy Control	30	21.5 \pm 2.7	54 \pm 38	NA	NA	NA
Chronic Hepatitis B	31	39.0 \pm 4.1 ¹⁾	164 \pm 90 ¹⁾	5.9 \pm 2.0	101 \pm 131	15.4 \pm 2.2
Chronic Severe Hepatitis B	30	47.7 \pm 21.4 ^{1),2)}	360 \pm 140 ^{1),2)}	5.4 \pm 1.6 ²⁾	470 \pm 225 ²⁾	35.1 \pm 21.1 ²⁾
F or Z		74.304	33.735	-1.142	-5.973	-6.363
P		0.000	0.000	0.254	0.000	0.000

1) Compared with healthy control, $P < 0.05$; 2) Compared with chronic hepatitis B, $P < 0.05$

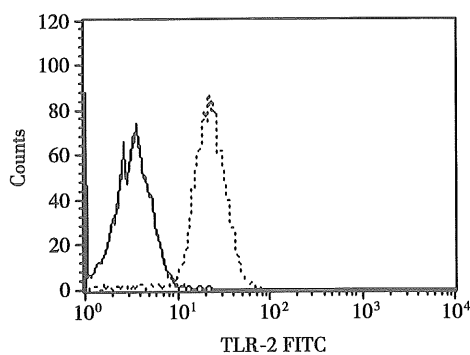


图 2 1 例患者外周血单核细胞 TLR2 的表达
Fig.2 The histogram of expression of TLR2 on peripheral blood monocytes in a typical patient
The solid line represents the isotope control

2.2 外周血单核细胞 TLR2 表达与血清 TNF- α 、TB、HBV DNA 对数值和 PT 水平间的相关性

经线性相关分析研究发现,外周血单核细胞 TLR2 表达水平与血清 TNF- α 表达水平呈现显著

的正相关,相关系数 $\gamma=0.885, P < 0.001$;与血清 TB 水平间呈现显著的正相关,相关系数 $\gamma=0.765, P < 0.001$;与 PT 水平间呈现显著的正相关,相关系数 $\gamma=0.254, P=0.048$;与血清 lg(HBV DNA)间无显著的相关性,相关系数 $\gamma=-0.152, P=0.166$ 。

3 讨 论

我们的研究发现自正常对照组到慢性乙型肝炎组、慢性重型乙型肝炎组外周血单核细胞 TLR2 表达强度和血清 TNF- α 水平均依次升高,且各组间比较均具有显著性差异;外周血单核细胞 TLR2 表达水平与血清 TNF- α 表达水平呈现显著高度的正相关。Hermoso 和 Wolfs 的研究证实 TNF- α 可以上调 TLR2 的表达^[8,9],阻断 TNF- α 的治疗可以下调血清阴性脊柱关节病患者关节滑膜及外周血单核细胞 TLR2 的表达水平^[10],在慢性乙型肝炎

及慢性重型乙型肝炎,高水平的 TNF- α 可能是外周血单核细胞 TLR2 表达上调的机制之一。Riordan 等^[11]在肝硬化的研究发现,肝硬化患者外周血单核细胞 TLR2 表达水平较正常对照显著为高,而肝硬化患者外周血单核细胞受到其配体脂壁酸的刺激后可以产生更高水平的 TNF- α , 揭示单核细胞 TLR2 高水平的表达可导致单核细胞对 TLR2 配体的刺激可以产生较为亢进的生物学反应。在慢性乙型肝炎以及慢性重型乙型肝炎患者外周血单核细胞 TLR2 的表达水平显著增高,而且在慢性乙型肝炎以及慢性重型乙型肝炎患者体内存在 HBV 核心抗原、坏死细胞、凋亡细胞等 TLR2 刺激信号^[6,12,13],因而笔者认为在慢性乙型肝炎患者外周血单核细胞 TLR2 高水平的表达有可能导致外周血单核细胞对上述的信号刺激产生过度的反应,导致单核细胞 TNF- α 高水平的表达。因而,在慢性乙型肝炎以及慢性重型乙型肝炎, TNF- α 可能可以上调单核细胞 TLR2 的表达,而单核细胞 TLR2 的表达上调又有可能导致单核细胞 TNF- α 的表达增加,两者之间可以相互促进,互为因果,共同参与慢性乙型肝炎及慢性重型乙型肝炎的发病。

我们的研究还发现在慢性乙型肝炎组及慢性重型乙型肝炎组外周血单核细胞 TLR2 表达强度和血清 TB 水平及 PT 间均呈现显著的正相关,但与血清 Lg(HBV DNA)间无显著的相关性。血清 TB 水平及 PT 时间是反映肝脏功能的常用指标,它们越高、越长,肝脏功能越差,在慢性乙型肝炎组及慢性重型乙型肝炎组外周血单核细胞 TLR2 表达强度和血清 TB 水平及 PT 间均呈现显著的正相关,表明外周血单核细胞 TLR2 表达强度与肝功能水平密切相关,外周血单核细胞 TLR2 表达升高能够间接反映肝功能的恶化。由于本研究所纳入的病例往往已经接受过降酶药物治疗,因而血清 AST 和 ALT 水平受到了干扰,不能准确的反应肝脏炎症程度,因而本研究未对外周血单核细胞 TLR2 与 AST 和 ALT 水平进行相关性研究。

总之,在慢性乙型肝炎和慢性重型乙型肝炎,外周血单核细胞 TLR2 表达水平能够反映肝功能情况,TLR2 可能与慢性乙型肝炎及慢性重型乙型肝炎的发病有关。

参考文献:

[1] Ichiki Y, He XS, Shimoda S, et al. T cell immunity

in hepatitis B and hepatitis C virus infection: implications for autoimmunity [J]. *Autoimmun Rev*, 2005, 4(2):82-95.

- [2] 尉秀清, 文卓夫, 马会慧, 等. 肝脏趋化因子 RANTES 水平与慢性乙型肝炎患者肝脏炎症程度的关系 [J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2006, 27(4s):146-148.
- [3] 邓洪, 韩晓燕, 陈幼明, 等. 慢性 HBV 感染患者抗原表位特异性 CTL 与 ALT 水平无关 [J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2006, 27(4):401-404.
- [4] 沐小敏, 谢志春. CpGODN 的体外免疫活性及其作为乙肝疫苗佐剂的研究新进展 [J]. *热带医学杂志*, 2007, 7(8):833-836.
- [5] Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses [J]. *Nat Immunol*, 2004, 5(10):987-995.
- [6] Cooper A, Tal G, Lider O, et al. Cytokine induction by the hepatitis B virus capsid in macrophages is facilitated by membrane heparan sulfate and involves TLR2 [J]. *J Immunol*, 2005, 175(5):3165-3176.
- [7] 中华医学会传染病与寄生虫学分会、肝病学会. 病毒性肝炎防治方案 [J]. *中华肝脏病杂志*, 2000, 8(6):324-329.
- [8] Hermoso MA, Matsuguchi T, Smoak K, et al. Glucocorticoids and tumor necrosis factor alpha cooperatively regulate toll-like receptor 2 gene expression [J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(11):4743-4756.
- [9] Wolfs TG, Buurman WA, van Schadewijk A, et al. In vivo expression of Toll-like receptor 2 and 4 by renal epithelial cells: IFN-gamma and TNF-alpha mediated up-regulation during inflammation [J]. *J Immunol*, 2002, 168(3):1286-1293.
- [10] De Rycke L, Vandooren B, Kruithof E, et al. Tumor necrosis factor alpha blockade treatment downmodulates the increased systemic and local expression of Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 in spondylarthropathy [J]. *Arthritis Rheum*, 2005, 52(7):2146-2158.
- [11] Riordan SM, Skinner N, Nagree A, et al. Peripheral blood mononuclear cell expression of toll-like receptors and relation to cytokine levels in cirrhosis [J]. *Hepatology*, 2003, 37(5):1154-1164.
- [12] Li M, Carpio DF, Zheng Y, et al. An essential role of the NF-kB/Toll-like receptor pathway in induction of inflammatory and tissue-repair gene expression by necrotic cells [J]. *J Immunol*, 2001, 166(12):7128-7135.
- [13] Lucas M, Stuart LM, Savill J, et al. Apoptotic cells and innate immune stimuli combine to regulate macrophage cytokine secretion [J]. *J Immunol*, 2003, 171(5):2610-2615.

(编辑 孙慧兰)