

# Toll样受体 4 在乙型肝炎组织及细胞株 HepG2/HepG2.2.15 内的表达特征

郭云蔚, 尉秀清, 李永伟, 杨绍基

(中山大学附属第三医院消化内科, 广东 广州 510630)

**摘要:** 【目的】探讨 Toll 样受体 4 (TLR4) 在乙型肝炎组织及细胞株 HepG2/HepG2.2.15 内的表达特征。【方法】采用免疫组化染色法检测慢性乙型病毒性肝炎(CHB)63 例、慢性重型肝炎(CSH)11 例及健康对照组 10 例肝组织 TLR4 的表达, 综合评分法判断结果。常规培养肝癌细胞株 HepG2 及 HepG2.2.15, 采用直接免疫荧光流式细胞术(FCM)检测 TLR4 在细胞上表达的平均荧光强度(MFI)及阳性细胞率。【结果】TLR4 在慢性乙型病毒性肝炎及慢性重型肝炎患者肝组织上的表达明显高于健康对照组 ( $P < 0.01$ ), 主要表达于肝细胞胞浆及部分胞膜, 在慢性乙型病毒性肝炎中, TLR4 的表达强度与肝组织炎症活动度分级(G) 呈显著正相关 ( $r=0.632$ ,  $P < 0.001$ )。TLR4 在肝癌细胞株 HepG2.2.15 上表达的平均荧光强度及阳性细胞率分别为  $18.24 \pm 8.18$ 、 $(17.79 \pm 9.46)\%$ , 明显高于 HepG2 的  $2.33 \pm 0.41$ 、 $(1.71 \pm 0.77)\%$  ( $P < 0.001$ )。【结论】TLR4 的表达与乙型病毒性肝炎肝组织的炎症活动密切相关, 而乙型肝炎病毒可直接上调细胞 TLR4 的表达, 故 TLR4 参与了乙型病毒性肝炎发病过程中的免疫反应并极有可能与免疫损伤有关。

**关键词:** TLR4; 乙型病毒性肝炎; 免疫组化; 流式细胞术

中图分类号: R512.6

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2007)03-0284-04

## Expression of TLR4 in Liver Tissue Infected HBV and HepG2/ HepG2.2.15

GUO Yun-wei, WEI Xiu-qing, LI Yong-wei, YANG Shao-ji

(Department of Gastroenterology, The Third Affiliated Hospital, SUN Yat-Sen University, Guangzhou 510630, China)

**Abstract:** 【Objective】To investigate the expression of Toll-like receptor (TLR4) in liver tissue with hepatitis B virus (HBV) and cell lines HepG2/HepG2.2.15. 【Methods】The expression of TLR4 was determined by immunohistochemistry in human livers with chronic viral hepatitis B (CHB), chronic severe hepatitis (CSH), and health control. The results were evaluated by integrative index. Hepatocellular carcinoma HepG2 and HepG2.2.15 cells were cultured by routine method. Immunofluorescence flow cytometry was used to detect TLR4+ cells and mean fluorescence intensity (MFI). 【Results】The intensity of TLR4 expression in liver tissue of CHB and CSH was significantly higher than that of health control ( $P < 0.01$ ). The positive staining was mainly located in cytoplasm and some on cell membrane. In chronic viral hepatitis B, the intensity of TLR4 expression was positively correlated with the grade of necroinflammatory activity ( $r=0.632$ ,  $P < 0.001$ ). MFI of TLR4 ( $18.24 \pm 8.18$ ) and TLR4+ cell percentage of HepG2.2.15 cells ( $17.79\% \pm 9.46\%$ ) were significantly higher than those of HepG2 ( $2.33 \pm 0.41$ ,  $1.71\% \pm 0.77\%$ ,  $P < 0.001$ ). 【Conclusions】The expression of TLR4 had closely correlation with the grade of necroinflammatory activity of viral hepatitis B. Hepatitis B virus might directly up-regulate the expression of TLR4. Therefore TLR4 might participate in immunoreaction, especially in immune-mediated hepatic damage in course of viral hepatitis B.

**Key words:** TLR4; hepatitis B; immunohistochemistry; flow cytometry

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2007, 28(3):284-287]

目前认为, 乙型肝炎病毒侵入人体后, 免疫介导的肝损伤是乙型病毒性肝炎发病的主要机制。

收稿日期: 2006-10-14

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(05001710)

作者简介: 郭云蔚(1973-), 女, 福建泉州人, 博士, 主治医师; 杨绍基, 教授, 博士生导师, 通讯作者, E-mail: yangsj764@sdu.edu.cn

Toll样受体(Toll-like receptor, TLR),是近年来发现的I型跨膜蛋白质,已有10余个家族成员,它可通过识别病原相关的分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs),引发信号传导导致炎症介质的释放,在天然免疫防御中起重要作用,并最终激活获得性免疫系统<sup>[1]</sup>。部分研究显示,TLR4等在某些病毒感染的疾病过程中有重要作用<sup>[2]</sup>。本研究通过检测乙型病毒性肝炎患者肝组织,肝癌细胞株 HepG2 和 HepG2.2.15 细胞 TLR4 的表达,探讨 TLR4 与乙型病毒性肝炎的相关性。

## 1 材料和方法

### 1.1 研究对象

标本取自2003年6月至2006年2月中山大学附属第三医院部分住院病人共74例,男性69例,女性5例,平均年龄36(16~52)岁,其中慢性乙型病毒性肝炎组(chronic viral hepatitis B, CHB)为肝穿刺标本,共63例,慢性重型肝炎组(chronic severe hepatitis, CSH, 乙型)为肝移植病肝切除标本,11例。另设健康对照组,标本取自肝移植移植肝常规取标本,10例。均行常规石蜡包埋连续切片。诊断符合2005年《慢性乙型肝炎防治指南》及2000年《病毒性肝炎防治方案》<sup>[3,4]</sup>。

### 1.2 方法

1.2.1 肝组织病理切片的TLR4表达检测 采用Elivision二步法进行免疫组化染色(Elivision二步法试剂盒购自福州迈新公司),具体步骤参照试剂盒推荐步骤进行,一抗为anti-TLR4 PcAb(兔源性,美国Santa Cruz公司),稀释度为1:100, DAB显色,用柠檬酸高温高压法进行抗原修复,设立阴性对照,以PBS代替一抗。

1.2.2 诊断方法 所有病理切片均行HE、网状纤维染色及HBsAg、HBeAg免疫组化染色(SABC法)以辅助慢性乙型肝炎肝组织炎症活动度的分级(G)、纤维化程度的分期(S)的诊断,诊断标准参照2000年《病毒性肝炎防治方案》<sup>[2]</sup>。

1.2.3 免疫组化结果的判断 采用综合评分法(由研究者及1名病理师分别阅片评分)。阳性着色呈棕色细颗粒状。凡细胞质或细胞核浅棕色为1分、棕色为2分、深棕色为3分、不着色为0分;在高倍镜下随机计数5个视野,计算阳性细胞所占百分比,阳性细胞占有细胞的比例:10%为

0分,11%~25%为1分,26%~50%为2分,51%~75%为3分,76%为4分。根据上述2项指标的两积分相乘分为4级:0分为阴性(-)、1~4分为弱阳性(+)、5~8分为中等阳性(++)、9~12分为强阳性(+++)。

1.2.4 细胞培养 肝癌细胞株 HepG2 及 HepG2.2.15 (中山大学附属第三医院传染科实验室保存)培养液为含10%灭活新生牛血清的DMEM培养基(GIBCO公司),HepG2.2.15细胞培养液另加G418,细胞常规培养传代,然后取对数生长细胞以 $10^4$ /mL接种于6孔板中,至细胞贴壁融合90%以上时每株各取4孔消化收集细胞,进行TLR4表达检测,以上实验重复2次。

1.2.5 培养细胞的TLR4表达检测 采用直接免疫荧光流式细胞术。2种细胞株各收集4管,DMEM悬浮细胞, $1\sim5 \times 10^6$ /mL。检测前PBS洗涤细胞,分别加入PE-anti-TLR4抗体(美国Ebioscience公司)10  $\mu$ L和细胞100  $\mu$ L,设同型对照,以PE-mouse IgG 2a(美国Ebioscience公司)10  $\mu$ L代替PE-anti-TLR4抗体,震荡充分混匀,按常规方法室温、避光孵育20 min。以PBS常温1000 g离心5 min洗涤1次后,以PBS配成约 $10^6$ /mL液,用FCM及Cellquest软件检测并分析TLR4的平均荧光强度及阳性细胞率(采用BD FACS Calibur流式细胞仪)。以上实验重复2次。

### 1.3 统计学分析

使用SPSS 12.0统计软件,相关分析采用Spearman等级相关分析,各组间的多重比较采用列联表分析,两组间计量资料采用t检验,取 $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 TLR4在慢性乙型病毒性肝炎患者肝组织上的表达

TLR4在CHB肝组织上主要表达于肝细胞胞浆及部分胞膜上,细胞核及汇管区无表达,与健康对照组相比,TLR4的表达明显增强( $P < 0.01$ ,见图1A~C),免疫组化染色强度与肝组织炎症活动度的分级(G)呈显著正相关( $r=0.632$ ,  $P < 0.001$ ),除G3组与G4组之间无显著性差异外,余各G组之间均有显著性差异,见表1。

### 2.2 TLR4在慢性重型肝炎肝组织上的表达

TLR4 在 CSH 肝组织上主要呈小灶性表达, 大片坏死区基本无表达, 与健康对照组相比, TLR4 的表达明显增强 ( $P < 0.05$ , 图 1D), 但低于 CHB 组 G2、G3、G4 级的表达 ( $P < 0.05$ ), 与 G1 级的表达无显著性差异。

### 2.3 TLR4 在 CHB 肝组织上的表达与其他临床指标的关系

TLR4 在 CHB 肝组织上的表达与其他临床指标, 包括纤维化程度的分期 (S), 肝组织 HBsAg、HBeAg 免疫组化染色强度、血 HBV-DNA 定量, AST、ALT、ALB、TBILI、PT 等肝功能指标均无显著性关系 ( $r=0.033-0.273$ , 均为  $P > 0.05$ )。

表 1 TLR4 在乙型病毒性肝炎患者肝组织上的表达

Table 1 Expression of TLR4 in liver tissue of viral hepatitis B

Group	n	Intensity of TLR4 expression (n/frequency)			
		-	+	++	+++
Normal liver tissue	10	8(0.80)	2(0.20)	0(0)	0(0)
Chronic viral hepatitis B					
G1	15	2(0.13)	8(0.53)	3(0.20)	2(0.13) <sup>1)</sup>
G2	18	0(0)	3(0.17)	9(0.50)	6(0.33) <sup>1)2)</sup>
G3	18	0(0)	0(0)	5(0.28)	13(0.72) <sup>1)2)</sup>
G4	12	0(0)	0(0)	2(0.17)	10(0.83) <sup>1)2)</sup>
Chronic severe hepatitis	11	1(0.10)	8(0.73)	1(0.09)	1(0.09) <sup>1)</sup>

1) TLR4 expression in liver tissue of chronic viral hepatitis B (Groups G1~G4:  $\chi^2=11.667$ ,  $\chi^2=22.773$ ,  $\chi^2=28.000$ ,  $\chi^2=22.000$ ,  $P < 0.001$ ) and chronic severe hepatitis ( $\chi^2=11.022$ ,  $P < 0.05$ ) were stronger than that of normal liver tissue; 2) In group of chronic viral hepatitis B, TLR4 expression in liver tissue of groups G3~G4 ( $\chi^2=18.446$ ,  $\chi^2=15.390$ ,  $P < 0.001$ ) and group G2 ( $\chi^2=9.075$ ,  $P < 0.05$ ) were stronger than that of group G1; TLR4 expression in liver tissue of groups G3~G4 were stronger than that of group G2 ( $\chi^2=6.722$ ,  $\chi^2=7.557$ ,  $P < 0.05$ ).

### 2.4 TLR4 在 HepG2 及 HepG2.2.15 上的表达

TLR4 在肝癌细胞株 HepG2.2.15 上表达的平均荧光强度为  $18.24 \pm 8.18$  ( $n=12$ ), 明显高于在肝癌细胞株 HepG2 上表达的平均荧光强度  $2.33 \pm 0.41$  ( $n=12$ ,  $t=6.729$ ,  $P < 0.001$ ); 而 TLR4+ 的阳性细胞率, 在 HepG2.2.15 上为  $(17.79 \pm 9.46)\%$ , 亦明显高于 HepG2 的阳性细胞率  $(1.71 \pm 0.77)\%$  ( $t=5.870$ ,  $P < 0.001$ )。

## 3 讨论

目前所知, 免疫介导的肝损伤是慢性乙型病

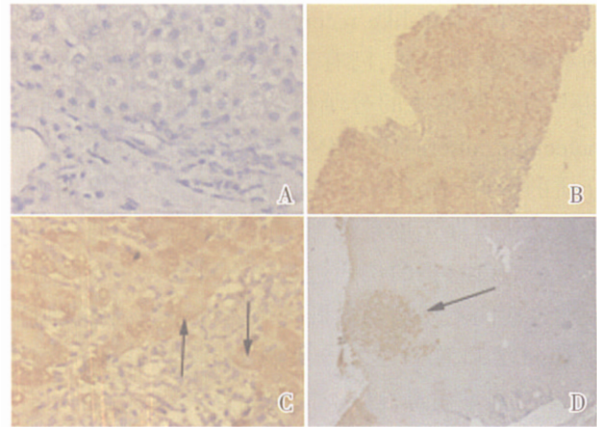


图 1 肝组织 TLR4 的表达

Fig.1 Expression of TLR4 in liver tissue

A: Normal liver tissue; Negative staining (Immunohistochemistry, Elivision  $\times 400$ ); B: Liver tissue of chronic hepatitis B; Positive reaction appears brown staining (Immunohistochemistry, Elivision  $\times 100$ ); C: Liver tissue of chronic hepatitis B; Positive staining locates in cytoplasm; No positive staining in nucleolus (Immunohistochemistry, Elivision  $\times 400$ ); D: Liver tissue of chronic severe hepatitis; Positive area appears small nodule (Immunohistochemistry, Elivision  $\times 40$ )

毒性肝炎发病的主要机制, HBV 感染后, 细胞毒性 T 细胞 (Tc)、辅助性 T 细胞 (Th)、库普弗细胞、自然杀伤细胞等各种免疫细胞均被激活, 释放 TNF (tumor necrosis factor)、IFN (interferon)、IL-2 (interleukin-2)、IL-6 (interleukin-6) 等细胞因子, 从而对肝脏造成损伤, 故研究免疫损伤的具体机制及寻找有效且副作用小的免疫治疗方法一直是慢性乙型肝炎治疗的热点及难点。

TLR 是连接天然免疫及获得性免疫系统的重要桥梁<sup>[1]</sup>, 其中 TLR4 是该家族中目前研究得较清楚的成员, 它主要表达在巨嗜细胞、中性粒细胞、树突状细胞及内皮细胞上, 它识别 PAMPs 或相关内源性配体后, 通过髓样分化因子 88 依赖性信号传导途径 (MyD88), 可引起细胞因子如 IL-1、IL-6、IL-8、IL-12、TNF 及 IFN 等的合成与释放, 促使免疫细胞成熟、分化和功能化, 并在部分研究中提示 TLR4 能促进机体对病毒的清除<sup>[2]</sup>。

正常肝脏是人体各组织中表达 TLR 最低的器官之一<sup>[3]</sup>, 新近细胞研究显示, 某些炎症或前炎症因子如细菌脂多肽、IL-1a、TGF- $\beta$  可以上调肝细胞 TLR 表达。在与病毒性肝炎相关性的研究中, Machida 等<sup>[4]</sup>的研究发现, 在感染 HCV 的 Raji 细胞系中, TLR4 的表达有明显的升高, 而在感染 HCV 的患者外周血单个核细胞中, TLR2 及 TLR4 均有

明显的升高,并认为 HCV 感染后 B 细胞分泌 IL-6 及 TNF 的能力明显加强,这一功能是由 TLR4 介导的。Mozer-Lisewska 等<sup>[7]</sup>对感染 HCV 的儿童患者的研究中发现,病肝组织上有 TLR2 及 TLR4 的表达,而正常肝组织则无,认为 TLR 在儿童丙型肝炎免疫清除及损伤中起重要作用。有研究发现,给转基因小鼠注射 TLR 配体,可抑制 HBV 的复制<sup>[8]</sup>。Duesberg 等<sup>[9]</sup>在对 HCV 疫苗的研究中,发现 HCV 的 T 细胞抗原决定表位与脂多肽结合,是有效的免疫刺激剂,而这一作用是由 TLR2、TLR4 介导的。至于 TLR 与乙型肝炎的关系如何,目前尚不清楚。

我们的研究显示,TLR4 在健康肝中基本不表达或仅有轻度表达,而在慢性乙型肝炎及慢性重型肝炎肝组织中,TLR4 的表达明显升高,主要表达于肝细胞胞浆及部分胞膜,与 Mozer-Lisewska 等关于儿童丙型肝炎的研究基本一致。另外,在慢性乙型肝炎中,随着肝组织炎症活动度分级(G)的升高,TLR4 的表达有升高的趋势。故我们认为,TLR4 作为可对微生物病原体直接做出防御反应同时诱发继发免疫反应的受体之一,参与了慢性乙型肝炎发病过程的免疫反应,并且这种参与较倾向于免疫介导的肝损伤。慢性重型肝炎肝组织 TLR4 的表达强度低于慢性乙型肝炎组 G2~4 级,与 G1 级相当的原因,可能与重型肝炎存在较多的坏死区,导致有功能的肝细胞大量减少且活性降低,进而合成 TLR4 分子的能力下降有关。为了进一步了解乙型肝炎病毒本身与 TLR4 表达的关系,我们进行了细胞实验。HepG2.2.15 细胞株是由 HepG2 细胞株转染了乙型肝炎全病毒形成,实验结果表明,TLR4 在 HepG2.2.15 细胞上表达的平均荧光强度和阳性细胞率均明显高于 HepG2,故可推测乙型肝炎病毒能直接上调细胞 TLR4 的表达。

由此可知,TLR4 与乙型肝炎的关系密切并且可能在病毒性肝炎的免疫损伤中起较重要作用。但是,乙型肝炎病毒是通过何种途径上调 TLR4 的表达,TLR4 又是如何引起免疫细胞的聚集成熟,刺激细胞因子的释放,具体机制均需进一

步研究,而调节或干扰 TLR4 信号途径,是否有望成为较为有效的病毒性肝炎的免疫治疗方法,有待进一步证实。

#### 参考文献:

- [1] MEDZHITOV R, PRESTON -HURLBURT P, JANEWAY C A Jr. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity [J]. *Nature*, 1997, 388(6640): 394-397.
- [2] KURT- JONES E A, POPOVA L, KWINN L, et al. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus [J]. *Nat Immunol*, 2000, 1(5): 398-401.
- [3] 中华医学会传染病与肝病学会. 慢性乙型肝炎防治指南 [J]. *中华传染病杂志*, 2005, 23(6): 421-431.
- [4] 中华医学会传染病与寄生虫病学会、肝病学会. 病毒性肝炎防治方案 [J]. *中华肝脏病杂志*, 2000, 8(6): 342-329.
- [5] ASAHINA Y, YOSHIOKA N, KANO R, et al. Full-length cDNA cloning of Toll-like receptor 4 in dogs and cats [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2003, 96(3-4): 159-167.
- [6] MACHIDA K, CHENG K T, SUNG V M, et al. Hepatitis C virus induces toll-like receptor 4 expression, leading to enhanced production of beta interferon and interleukin-6 [J]. *J Virol*, 2006, 80(2): 866-874.
- [7] MOZER-LISEWSKA I, SLUZEWSKI W, KACKZMAREK M, et al. Tissue localization of Toll-like receptors in biopsy specimens of liver from children infected with hepatitis C virus [J]. *Scand J Immunol*, 2005, 62(4): 407-412.
- [8] ISOGAWA M, ROBEK M D, FURUICHI Y, et al. Toll-like receptor signaling inhibits hepatitis B virus replication in vivo [J]. *J Virol*, 2005, 79(11): 7269-7272.
- [9] DUESBERG U, VON DEM BUSSCHE A, KIRSCHING C, et al. Cell activation by synthetic lipopeptides of the hepatitis C virus (HCV)-core protein is mediated by toll like receptors (TLRs) 2 and 4 [J]. *Immunol Lett*, 2002, 84(2): 89-95.

(编辑 孙慧兰)