

· 论 著 ·

慢性乙型肝炎患者趋化因子 Mig 表达水平的研究*

方良春, 管世鹤[△], 周 强, 毕惠娟

(安徽医科大学第二附属医院检验科, 安徽合肥 230601)

摘要:目的 研究慢性乙型肝炎患者中趋化因子 Mig 的表达水平。方法 分别采用酶联免疫吸附测定法(ELISA)、逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)和 Western-blotting 分析 88 例慢性乙型肝炎患者和 53 例健康人群血清、外周单个核细胞及肝脏组织中 Mig 的表达水平,同时以免疫组化技术分析 Mig 在肝脏组织中的分布情况。结果 乙型肝炎 e 抗原(HBeAg)阴性乙肝患者血清、外周单个核细胞和肝组织中 Mig 表达量分别为(247.03±63.14)pg/mL、(0.95±0.21)、(0.79±0.23),乙型肝炎 e 抗原(HBeAg)阳性乙肝患者血清、外周单个核细胞和肝组织中 Mig 表达量分别为(243.05±53.00)pg/mL、(0.98±0.35)、(0.74±0.18),与健康人群血清、外周单个核细胞和肝组织中 Mig 表达量比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。结论 慢性乙型肝炎患者体内 Mig 呈现较高的表达水平可能与患者机体状态相关。

关键词:肝炎病毒,乙型; 趋化因子; 酶联免疫吸附测定法

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.09.002

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)09-1164-02

The expression level of Mig in chronic hepatitis B patients*

Fang Liangchun, Guan Shihe[△], Zhou Qiang, Bi Huijuan

(Department of Clinical Laboratory, the Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei, Anhui 230601, China)

Abstract:Objective To observe the expression levels of Mig in the patients with chronic hepatitis B. **Methods** The study population consisted of 88 chronic hepatitis B patients and 53 healthy controls. The ELISA, RT-PCR and Western-blotting were used for analysing the expression levels of Mig in serum, peripheral blood mononuclear cells and liver tissue of the patients with chronic hepatitis B, while the immunohistochemistry was applied for analysing the distribution of Mig in liver tissue. **Results** The expression of Mig in serum, peripheral blood mononuclear cells and liver tissue of the chronic hepatitis B patients with HBeAg negative were (247.03±63.14)pg/mL, (0.95±0.21), (0.79±0.23), and that in the chronic hepatitis B patients with HBeAg positive were (243.05±53.00)pg/mL, (0.98±0.35), (0.74±0.18), which were both significantly higher than those in healthy controls, the difference was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** Increased levels of Mig in the patients with chronic hepatitis B may be related to immune state of patients.

Key words: hepatitis B virus; chemotactic factor; enzyme linked immunosorbent assay

乙型肝炎病毒(HBV)作为一种非细胞毒性的嗜肝病毒,感染机体后将导致急性慢性肝炎、肝硬化、肝癌等一系列肝脏疾病的发生,严重危害人类健康^[1]。其中,慢性乙肝是一种由 HBV 感染引起的以局部单核细胞、淋巴细胞及中性粒细胞等炎症细胞浸润为主的感染性疾病^[2]。因此,趋化因子受体及其配体在慢性乙肝患者肝脏局部炎症反应及病毒感染靶细胞清除方面发挥着重要作用^[3]。Mig 是一种含 ELR 序列的半胱氨酸-X-半胱氨酸趋化因子,能与免疫细胞表面 CXCR3 受体相互作用,通过产生肝脏的局部免疫应答,呈现出慢性炎症持续存在或慢性炎症急性发作表现^[4]。目前,在慢性乙型患者体内 HBV 感染与 Mig 表达的相关性尚不清楚。为此,本课题研究 Mig 在乙型肝炎 e 抗原(HBeAg)阳性和乙型肝炎 e 抗原(HBeAg)阴性乙肝患者血清、外周单个核细胞和肝脏表达水平。

1 材料与方 法

1.1 标本来源 收集 2010 年 2 月至 2011 年 2 月本院慢性乙型肝炎患者 88 例和健康者 53 例血样本和肝组织活检样本。其中男 43 例,女 44 例,平均年龄为(43.3±12.4)岁。所有患

者的临床诊断均符合中华医学会肝病学会 2010 年推荐的慢性乙型肝炎防治指南的诊断标准。

1.2 仪器与试剂 基因扩增仪 ABI 2720 型由美国 ABI 公司提供。Mig 酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒由法国 DIACLONE 公司提供。Trizol[®] RNA 提取试剂盒和 Lipofectamine[™]2000 由自美国 Invitrogen 公司提供。基因扩增试剂盒由大连宝生物工程有限公司提供。

1.3 RT-PCR 分析 Mig 细胞总 RNA 的提取采用 Trizol 试剂,操作按照试剂和说明书进行。以 Oligo dT(18)为引物,将 RNA 逆转录为 cDNA,再以 cDNA 为模板,PCR 扩增目的基因 Mig,磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)为内参照,引物序列见表 1。反应条件均为 94 °C 5 min;94 °C 1 min,60 °C 1 min,72 °C 1 min,循环 30 次;72 °C 延伸 10 min。

1.4 免疫印迹(Western Blotting)分析 Mig 表达 细胞用预冷 PBS 洗 3 次,每孔加 120 μL 含有蛋白酶抑制剂的细胞裂解液,冰上反应 10 min,振荡,12 000 r/min,4 °C 离心 10 min,收集上清液,取 50 μL 用于 Bradford 蛋白定量。各组均取 20 μL 总蛋白经 seap 值平衡上样量后进行 SDS-PAGE 电泳,80 mA

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81171662)。 作者简介:方良春,女,技师,主要从事实验诊断学研究。 △ 通讯作者,E-mail: shiheguan@126.com。

电流 2 h 湿电转, 10% 脱脂奶粉封闭过夜, 加 1 : 1 000 稀释的鼠单克隆抗体(SBA 公司)过夜, PBS 洗 3 次, 加 1 : 20 000 稀释的辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗小鼠 IgG (北京中杉金桥公司)室温孵育 3 h, PBS 漂洗 3 次, 化学发光(ECL)试剂盒检测。将收集的上清液用 ELISA 法按试剂盒说明书检测 Mig 表达量。

1.5 统计学处理 数据采用统计软件 SPSS16.0 进行统计学分析, 数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两均数比较采用 Independent-Sample T Test 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

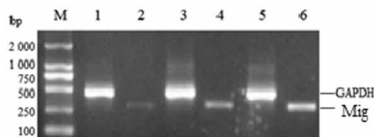
表 1 引物序列

目的基因	引物序列	扩增长度 (bp)
Mig	5'-CTT TGT CCA TTE CCA CTT CTG A-3'	306
	5'-TCC CTA ACG GTT GCC TTT GTA T-3'	
GAPDH	5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3'	452
	5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'	

2 结果

2.1 健康人群、乙肝患者血清 Mig 的水平 HBeAg 阴性、HBeAg 阳性乙肝患者血清 Mig 水平分别为 (247.03 ± 63.14) pg/mL、 (243.05 ± 53.00) pg/mL, 与健康人群 (143.82 ± 26.97) pg/mL 比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.2 健康人群、乙肝患者外周单个核细胞 Mig mRNA 表达水平 RT-PCR 结果显示, 与健康人群 Mig mRNA 表达水平 (0.62 ± 0.14) 相比, HBeAg 阴性乙肝患者 (0.95 ± 0.21) 、HBeAg 阳性乙肝患者 (0.98 ± 0.35) 均明显升高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。



M 为 DL2000 标志物; 1、3、5 分别为健康人群、HBeAg 阴性乙肝患者和 HBeAg 阳性乙肝患者外周单个核细胞 GAPDH; 2、4、6 分别为健康人群、HBeAg 阴性乙肝患者和 HBeAg 阳性乙肝患者外周单个核细胞 Mig。

图 1 健康人群、乙肝患者外周单个核细胞 Mig mRNA 表达的电泳图

2.3 健康人群、乙肝患者肝脏组织 Mig 表达水平比较 免疫组化结果显示, 正常肝组织仅可见少量棕黄色的 Mig 表达于肝细胞浆, HBeAg 阴性乙肝患者和 HBeAg 阳性乙肝患者除在肝细胞浆有 Mig 表达外, 还在肝窦内的炎性细胞有 Mig 的表达。进一步运用免疫印迹技术分析发现, 与健康人群 (0.37 ± 0.16) 相比较, HBeAg 阴性乙肝患者及 HBeAg 阳性乙肝患者肝组织的 Mig 蛋白表达相对量分别为 (0.79 ± 0.23) 和 (0.74 ± 0.18) , 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 2(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。

3 讨论

HBV 感染的发病机制尚未完全明了, 目前认为宿主免疫功能紊乱是其病理损伤的主要原因之一, 其中乙型肝炎免疫系

常有部分原因与趋化因子有关。当 HBV 侵入机体后, 在宿主细胞内复制增殖, 产生大量病毒抗原, 可使机体免疫系统活化, 产生并释放各种趋化因子如 Mig 等, 此过程可引起部分肝细胞损伤, 介导局部炎症细胞浸润, 使病程慢性化^[5]。

趋化因子 Mig 是 CXC 趋化家族的成员, 主要趋化白细胞参与机体炎性反应, 同时 Mig 亦能影响巨噬细胞、内皮细胞和肥大细胞活性, 在调节局部炎性反应中起重要作用, 具有广泛的生物学活性, 可能参与肿瘤血管形成、促进细胞有丝分裂和调节宿主免疫功能等作用^[6]。

本研究以 ELISA、RT-PCR 和 Western-blotting 等技术分析了 88 例慢性乙型肝炎患者在不同 HBeAg 状态下的血清、外周单个核细胞和肝组织的 Mig 表达水平。结果显示, HBeAg 阴性乙肝患者、HBeAg 阳性乙肝患者血清中 Mig 水平分别为 (247.03 ± 63.14) pg/mL、 (243.05 ± 53.00) pg/mL, 显著高于健康人群血清 Mig 水平 (143.82 ± 26.97) pg/mL。此外, 无论是外周单个核细胞或者肝穿组织, HBeAg 阴性乙肝患者和 HBeAg 阳性乙肝患者的中 Mig 表达均高于健康人群。免疫组化技术分析提示在乙肝患者肝穿组织中, 肝细胞中仅表达少量的 Mig 于肝细胞浆, 而肝窦内的炎性细胞表达大量 Mig。

综上所述, 本研究发现了 HBeAg 阴性乙肝患者和 HBeAg 阳性乙肝患者血清、外周单个核细胞及其肝组织表达 Mig 的特点, 为今后研究 HBV 的发病机制奠定一定实验基础。

参考文献

- [1] Akpolat N, Yahsi S, Godekmerdan A, et al. Relationship between serum cytokine levels and histopathological changes of liver in patients with hepatitis B[J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(21): 3260-3263.
- [2] Krohn N, Kapoor S, Enami Y, et al. Hepatocyte transplantation-induced liver inflammation is driven by cytokines-chemokines associated with neutrophils and Kupffer cells[J]. Gastroenterology, 2009, 136(5): 1806-1817.
- [3] 赵金红, 王健, 王平平. 趋化因子受体 CXCR3 在慢性乙肝患者肝脏组织中的表达[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2008, 28(5): 449.
- [4] Kakimi K, Lane TE, Wieland S, et al. Blocking chemokine responsive 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): 1755-1766.
- [5] 赵金红, 王健, 江水清, 等. 慢性乙型肝炎患者外周血单个核细胞中趋化因子 IP-10 和 Mig 表达及其与干扰素治疗的相互关系[J]. 中国实用内科杂志, 2007, 27(2): 285-288.
- [6] Dunn C, Brunetto M, Reynolds G, et al. Cytokines induced during chronic hepatitis B virus infection promote a pathway for NK cell-mediated liver damage[J]. J Exp Med, 2007, 204(3): 667-680.

(收稿日期: 2016-01-28)

