

· 论 著 ·

尖锐湿疣患者外周血单个核细胞 TLR 2、3、9 mRNA 表达的研究

徐佩红¹, 袁定芬¹, 薛峰², 郑捷²

(上海交通大学: 1. 附属上海第六人民医院皮肤科 200233; 2. 医学院附属瑞金医院皮肤科 200025)

摘要:目的 从天然免疫角度探讨尖锐湿疣发病机制。方法 收集尖锐湿疣患者 45 例及健康对照者 25 例, 用实时荧光定量 PCR 技术检测外周血单个核细胞(PBMCs)TLR 2、3、9 mRNA 的表达。结果 尖锐湿疣组 PBMCs TLR 2、3、9 mRNA 表达水平与健康对照组比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 尖锐湿疣患者循环中的天然免疫受体 TLR 2、3、9 可能并未在抗尖锐湿疣病毒感染的免疫过程中起作用。

关键词:尖锐湿疣; Toll 样受体; 免疫

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.15.012

中图分类号: R752.5302

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2010)15-1968-02

Study on the expressions of TLR 2,3,9 mRNA in the peripheral blood mononuclear cells of Condylomata acuminata

XU Pei-hong¹, YUAN Ding-fen¹, XUE Feng², et al.

(1. Department of Dermatology, Shanghai The Sixth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200233, China; 2. Department of Dermatology, Ruijin Hospital, Medical School, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200025, China)

Abstract: **Objective** To investigate the pathogenesis of Condylomata acuminata from the views of innate immune responses. **Methods** Forty-five cases of Condylomata acuminata patients and 25 cases of healthy controls were collected. Real-time quantitative PCR method was used to detect TLR 2,3,9 mRNA in the peripheral blood mononuclear cells(PBMCs). **Results** The levels of TLR 2,3,9 mRNA had no significantly differences between patients and healthy controls. **Conclusion** It is suggested that systemic innate immunity may not play a role in the pathogenesis of condylomata acuminata.

Key words: condylomata acuminata; toll-like receptor; immunity

尖锐湿疣(condylomata acuminata, CA)是由人乳头瘤病毒(HPV)感染生殖器、会阴或肛门等部位所引起的一种常见的、易复发的性传播性疾病。Toll 样受体(toll-like receptors, TLRs)是近年来发现的天然免疫应答中的细胞跨膜受体及病原模式识别受体(pattern recognition receptor, PRR)之一,其可以通过广泛特异性识别病原微生物,偶联信号传导途径,并激活天然免疫细胞,最终导致一系列免疫反应^[1-2]。有研究表明,CA 病程与机体免疫有重要的关系,但在 TLRs 与 CA 易感性关系方面的研究尚鲜有报道。作者采用实时荧光定量 PCR 技术观察并比较 CA 患者和正常人外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)TLRs(主要是与病毒感染相关的 TLR 2、3、9)的表达,以从天然免疫角度探讨 CA 发病机制。

1 临床资料

1.1 研究对象 收集 2006 年 7 月至 2006 年 12 月在上海交通大学附属上海市第六人民医院皮肤科、性病科就诊的 CA^[3]患者 45 例,所有病例均经临床和病理确诊,年龄 19~80 岁,平均(31.1±12.4)岁,病程 2 周至 10 个月,1 个月内未接受系统糖皮质激素及其他免疫抑制剂治疗。另外收集健康对照者 25 例,年龄 22~57 岁,平均(29.5±8.7)岁。

1.2 PBMCs TLR 9 测定 无菌抽取外周静脉血 5 mL,予 3.8% 枸橼酸钠抗凝, Ficoll-hypzue 淋巴细胞分离液(上海华精高科技有限公司)分离 PBMCs,用 Trizol(美国 Invitrogen 公司)提取 PBMCs 内总 RNA,取等量 RNA 逆转录合成 cDNA(美国 Promega 公司),采用荧光染料法(SYBR Green)实时监测 PCR 产物量。TLR 9 及 β -actin 引物由上海生工生物工程

技术有限公司合成,见表 1。

1.3 建立标准曲线 通过构建标准品(已知拷贝数)标准曲线对样品进行定量检测。抽提 TLR 9 质粒作为标准品建立标准曲线,依据标准曲线得到样品中目的基因拷贝数;同时以管家基因 β -actin 作为内参建立标准曲线,得到标本样品中管家基因拷贝数;将目的基因的拷贝数用管家基因进行校准,最后得到的校正拷贝数即为目的基因绝对定量。

1.4 PCR 反应体系 TLR 及 β -actin PCR 反应体系: TLR 2/4/9/ β -actin 为 SYBR Green PCR Master Mix 12.5 μ L,引物 F 0.3 μ L,引物 R 0.3 μ L, cDNA 模板 3.0 μ L, ddH₂O 8.9 μ L。

1.5 扩增条件 上述各基因的扩增条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 40 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 20 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s。结果以目的基因绝对表达量,即(目的基因拷贝值/ β -actin 拷贝值) \times 1 000 的校正拷贝数以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

1.6 统计学方法 采用 SPSS 11.5 统计软件进行数据处理。各组数据间比较采用 t 检验分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 TLR 2、3、9 及 β -actin PCR 产物电泳图 封 2 图 1 为 TLR 2、3、9 及 β -actin PCR 产物 1.5% 琼脂糖凝胶电泳图,抽提的 RNA 没有降解及受到污染。

2.2 两组 PBMCs 中 TLR 2、3、9 基因表达水平比较 CA 组 PBMCs 中 TLR 2、3、9 mRNA 表达量与健康对照组比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$), t 值分别为 1.635、0.62、1.06,见表 2。

表 1 TLR 2、3、9 及 β -actin 引物序列及扩增片段

引物	序列	扩增片段(bp)
TLR 2-F	5'-TCG GAA TGT CAC AGG ACA GC -3'	
TLR 2-R	5'-CAG TTC ATA CTT GCA CCA CTC AC -3	405
TLR 3-F	(5'-3');CAA GTA CCT GCA GCT GAC TAG;	
TLR 3-R	(5'-3');AGC CGT TGG ACT CCA AGT TAA;	323
TLR 9-F	5'-ACAGCTGCGCAAGCTTAACC-3'	
TLR 9-R	5'-CTGATGCGGTTGTCCGACAG-3'	282
Human β -actin-F	5'-TCA CCC ACA CTG TGC CCA TCT ACG A-3'	
Human β -actin-R	5'-CAG CGG AAC CGC TCA TTG CCA ATG G-3'	300

表 3 两组 PBMCs 中 TLR 2、3、9 mRNA 表达量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TLR 2	TLR 3	TLR 9
CA 组	45	0.369 \pm 0.109	1.01 \pm 0.280	0.120 \pm 0.028
健康对照组	25	0.421 \pm 0.128	1.06 \pm 0.288	0.129 \pm 0.034

3 讨 论

CA 是由 HPV 引起的增生性疾病。人体免疫状态是影响 CA 发生、转归的重要基础之一。临床上伴细胞免疫缺陷的 CA 患者皮疹常持续不退,其外周血中抑制性 T 细胞数增多、自然杀伤细胞功能低下,CA 者自然杀伤细胞产生 γ -干扰素和白介素-2 减少^[4]。

自 1997 年 Janeway 等鉴定了第 1 个果蝇 Toll 蛋白的人类同源体——TLRs 后,迄今为止,已相继报道在人类发现了 11 种 TLRs(hTLR 1~11)。其主要分布于免疫细胞,如树突状细胞(DCs)、淋巴细胞、单核巨噬细胞及少数非免疫细胞,如成纤维细胞及上皮细胞中,通过识别病原微生物表面保守的病原体相关分子模式及一些内源性配体,介导急性炎症反应,释放大量致炎因子,如 IL-1、IL-6、TNF- α 等,同时通过诱导 DCs 分化成熟,辅助抗原特异性的获得性免疫应答(主要是 Th1 型免疫应答)的建立^[5]。因此,作为天然免疫系统的主要组成部分,TLRs 在宿主抗感染的防御反应中扮演着重要角色。不同的 TLRs 可以在一定程度上识别并区分不同类型病原体,TLR 2 识别肽聚糖、脂磷壁酸等成分;TLR 3 识别双链 RNA;TLR 9 识别细菌、病毒特殊序列胞嘧啶磷酸鸟苷(CpG DNA)。目前对 TLRs 在病毒感染中作用的研究主要集中在 TLR 2、3、9^[6]。在本实验中应用实时荧光定量 PCR 技术观察并比较 CA 患者和健康者 PBMCs 中与病毒感染相关的 TLRs(TLR 2、3、9)的表达,结果显示,CA 组与健康对照组比较,TLR 2、3、9 表达的差异均无统计学意义($P > 0.05$),提示 CA 患者循环中的天然免疫受体 TLR 2、3、9 可能并未在抗 CA 病毒感染的免疫过程中起作用。病毒感染后建立有效的免疫机制涉及到病毒抗原的提呈、免疫反应的激活和效应细胞清除病毒感染的靶细胞等 3 个环节,其中任何一个或多个环节发生障碍即可导致免疫功能缺陷^[7-9],由于 HPV 感染是非溶细胞性的,很少由病毒抗原释放给抗原提呈细胞,且 HPV 抗原主要在分化成熟的角质形

成细胞中表达,而皮肤中的抗原提呈细胞——郎罕细胞主要分布在基底层和中层表皮细胞,所以很少有机会接触病毒抗原并递呈给真皮内免疫活性细胞,不能形成针对 HPV 感染的免疫反应^[10]。因此作者推测 CA 患者的免疫缺陷主要存在于感染局部,对系统中天然免疫受体识别作用影响不大。当然也不能排除机体通过其他途径来识别 CA 病毒。

参考文献:

- [1] Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity[J]. Nature, 1997, 388:394.
- [2] Terry K. The biology of Toll-like receptors[J]. Cytokine Growth Factor Reviews, 2000, 11:219.
- [3] 赵辨. 临床皮肤病学[M]. 3 版. 南京:江苏科学技术出版社, 2003:535.
- [4] 林能兴, 涂亚庭. 尖锐湿疣患者自然杀伤细胞活性及其与血清 IFN- γ 、IL-4 的相关性研究[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2002, 16(3):150.
- [5] Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity[J]. Cell, 2006, 124(4):783.
- [6] Kiyoshi Takeda, Shizuo Akira. Toll-like receptors in innate immunity[J]. Int Immunol, 2005, 17(1):1.
- [7] Szolnoky G, Bata-Csorgo Z, Kenderessy AS, et al. A mannose-binding receptor is expressed on human keratinocytes and mediates killing of Candida albicans[J]. J Invest Dermatol, 2001, 117(2):205.
- [8] Song PI, Park YM, Abraham T, et al. Human keratinocytes express functional CD14 and toll-like receptor 4[J]. J Invest Dermatol, 2002, 119(2):424.
- [9] 郝飞, 叶庆倩. 人乳头瘤病毒感染局部细胞免疫缺陷的形成机制[J]. 国外医学皮肤性病学分册, 2001, 27(3):163.
- [10] Leigh IM, Glover MJ. Cutaneous warts and tumours in immunosuppressed patients[J]. J R Soc Med, 1995, 88(2):61.

(收稿日期:2009-11-10 修回日期:2010-01-10)