

侗族乙型肝炎中 CCR5 mRNA 的表达*

张禾璇,何燕,单可人[△],官志忠

(贵阳医学院分子生物学重点实验室,贵州贵阳 550004)

摘要:目的 探讨贵州从江侗族人群外周血白细胞趋化因子受体 CCR5(CCR5)基因的 mRNA 表达与急性乙型肝炎(AHB组)、慢性乙型肝炎(CHB组)的相关性。**方法** 选取侗族人群 AHB 感染者 20 例(AHB组)、CHB 患者 32 例(CHB组),以同期该区健康侗族人群 50 例作为对照组,Trizol-酚-氯仿一步法提取外周血白细胞总 RNA,应用实时荧光定量 RQ-PCR 技术检测外周血 CCR5 mRNA 表达水平。**结果** AHB 组外周血 CCR5 mRNA 相对表达量为(1.119 9±0.723 3),CHB 组为(0.582 3±0.273 6),对照组外周血 CCR5 mRNA 相对表达量为(0.798 5±0.349 2)。AHB 组 CCR5 mRNA 表达水平显著高于对照组,CHB 组 CCR5 mRNA 表达水平显著低于对照组,AHB 组 CCR5 mRNA 表达水平显著高于 CHB 组,差异均有统计学意义($P<0.05$);而 CCR5 mRNA 相对表达水平与患者性别、年龄无相关性($P>0.05$)。**结论** CCR5 可能与 AHB、CHB 具有相关性,CCR5 mRNA 的表达强度很可能与机体清除乙型肝炎病毒(HBV)的能力呈正相关,高水平的 CCR5 mRNA 可能不利于 HBV 的复制。

关键词:受体,CCR5;肝炎,乙型;急性病;肝炎,乙型,慢性

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.13.021

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)13-1591-03

Expression of CCR5 gene mRNA to hepatitis B virus infection in Dong minority*

Zhang Hexuan, He Yan, Shan Keren[△], Guan Zhizhong

(Molecular Biological Key Laboratory, Guiyang Medical College, Guiyang, Guizhou 550004, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of CCR5 gene mRNA in peripheral blood of the population between Congjiang Dong minority from Guizhou, and to evaluate the relevance between CCR5 gene and hepatitis B infection. **Methods** A total of twenty individuals with AHB infection(AHB group, 20 cases), thirty individuals with CHB infection(CHB group, 32 cases), Fifty healthy controls of peripheral blood were recruited to conduct a case-control study among Dong ethnicity. Total RNA from blood was extracted and purified by the trizol-phenol-chloroform one-step method. Expression of CCR5 mRNA was detected by using SYBR green supermix real-time fluorescent quantitative PCR. **Results** The relative expression of CCR5 mRNA in AHB infection-group was (1.119 9±0.723 3), the data of CCR5 mRNA in CHB group was (0.582 3±0.273 6), the data of CCR5 mRNA in control group was (0.798 5±0.349 2) respectively. The results showed that the expression level of CCR5 mRNA in AHB group was significantly higher than that of the control group, CCR5 mRNA expression was lower in CHB group than in control group, the expression level of CCR5 mRNA in AHB group was significantly higher than CHB group($P<0.05$), However the relative expression of CCR5 mRNA had no correlation with age and gender($P>0.05$). **Conclusion** CCR5 gene is associated with AHB and CHB, there is positive correlation between the expression intensity of CCR5 mRNA and the clearance degrees of HBV possibly.

Key words: receptors, CCR5; hepatitis B; acute disease; hepatitis B, chronic

乙型肝炎病毒(hepatitis B Virus, HBV)感染是一个世界性的公共卫生问题,据世界卫生组织报道,全球约有 6% 的人慢性感染 HBV^[1],据估计全球每年有 100 万人死于 HBV 感染相关的肝衰竭、肝硬化和原发性肝癌^[2]。中国属 HBV 感染高流行地区,据调查结果显示,中国 3 岁以上人群 HBV 总感染率高达 50.04%,乙肝表面抗原(HBsAg)阳性率为 9.09%^[3],接种与未接种 HBV 疫苗人群的 HBsAg 阳性率分别为 4.51% 和 9.51%。目前,仍没有能够彻底清除 HBV 的药物,人类对 HBV 普遍易感,不同个体感染后的临床表型复杂多样,从一过性的自限性感染、急性乙型肝炎(acute hepatitis, AHB)、无症状长期病毒携带、慢性乙型肝炎(chronic hepatitis, CHB)乃至肝硬化、肝癌,形成了复杂的疾病谱。非侵袭性嗜肝病毒 HBV 是由其表达的抗原系统及其抗体所介导的特异

性免疫反应和非特异性的以细胞因子为主的炎症介质导致的肝细胞损伤。

CC 类趋化因子受体 5(CC chemokine receptor 5, CCR5)是细胞内 β 趋化因子的受体,CCR5 属于 G 蛋白偶联受体,主要表达于粒细胞、巨噬细胞、幼稚树突状细胞、CD8⁺ T 淋巴细胞、Th1 淋巴细胞的细胞膜上。对单核细胞、NK 细胞、记忆 T 细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞有强烈的趋化作用,在病毒感染免疫反应中有着重要作用。目前,报道最多的是 CCR5 与免疫缺陷型病毒(HIV)的相关性,CCR5 为 HIV-1 毒株进入人体的最主要辅助受体。近年研究表明,CCR5 通过炎症反应参与诸多疾病的发病过程^[4-5],如 2 型糖尿病(T2DM)、慢性阻塞性肺疾病(COPD)、类风湿关节炎、动脉硬化、多发性硬化、肿瘤等,此外,CCR5 还通过与肿瘤相关基因的相互作用调控

肿瘤的发生、增殖和转移等过程^[6],如乳腺癌、神经胶质细胞瘤、结肠癌等。

目前,关于趋化因子受体 CCR5 基因与乙型肝炎相关性研究报道较少,本观察选用遗传学上相对隔离、对多基因疾病研究具有独特优势的人群——贵州从江侗族人,本课题组对贵州从江侗族人群进行乙肝血清学筛查其 HBV 感染率为 44%,本次通过检测其 AHB、CHB 患者与健康人群外周血白细胞内 CCR5 mRNA 的表达情况,探讨 CCR5 基因与 AHB、CHB 的相关性及意义,从而为寻找新的诊断和治疗乙型肝炎的分子标志提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

在知情同意的基础上选取贵州省少数民族中较封闭的隔离自然人群——侗族人群,侗族样本总量 100 例, AHB 患者 20 例,其中,男 12 例,平均(27.25±6.31)岁,女 8 例,平均(28.14±4.66)岁;CHB 患者 32 例,其中,男 21 例,平均(43.52±10.26)岁,女 11 例,平均(33.34±9.25)岁;对照组 50 例为健康人,其中,男 25 例,平均(41.64±10.38)岁,女 25 例,平均(38.49±7.73)岁。所选的研究对象 3 代之内无直接血缘关系及外族通婚史,无乙型肝炎疫苗接种史,排除合并其他病毒性肝炎。诊断均符合 2005 年中华医学会肝病与感染病学分会制订诊断标准。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂及仪器

SYBR Green Master ROX(德国 Roche 公司);RevertAid First Strand cDNA Synthesis 试剂盒(德国 Thermo 公司);Trizol(德国 Roche 公司);ABIStep-one-Plus 型实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司);DU-640 核酸蛋白定量分析仪(美国 Beckman 公司);GDS-8000 型 UVP 凝胶成像系统(美国 Bio-RAD 公司);ELX800 酶标分析仪(美国 Bio-Teck 公司)。

1.2.2 RNA 提取和逆转录

运用标准 Trizol-酚-氯仿一步法提取外周血细胞总 RNA,血液标本的采集和保存按照知情同意的原则,在知情同意的基础上,采取受试对象空腹静脉血 0.5 mL,采集观察对象加入 Trizol 试剂 1 mL,置于-80℃保存。取上述提取的总 RNA 5 μL 加 1 μL 溴酚蓝,1.2%TAE 琼脂糖凝胶(含 0.51 μg/mL EB),常规电泳,5~6 V/cm,30 min,核酸凝胶图像分析系统鉴定总 RNA,紫外分光光度法鉴定 RNA 纯度和浓度。逆转录反应体系 20 μL,步骤如下:总 RNA 1.0 μg,Random Hexamer Primer 1.0 μL,加焦碳酸二乙酯水至 12 μL,65℃ 5 min,冰浴条件下加入 5×Reaction buffer 4 μL, dNTP Mix(10 mmol/L)2.0 μL,RiboLock RNase Inhibitor(20 U/μL) 1.0 μL,M-MLV(10 U/μL) 1.0 μL,42℃ 60 min, 25℃ 5 min,70℃ 5 min,-80℃保存待用。

1.2.3 实时荧光定量 PCR(RQ-PCR)测定

CCR5 mRNA 表达根据 GenBank 中人 CCR5 及管家基因 β actin cDNA 序列和 DNAMAN 软件设计 RT-PCR 的引物。 β -actin 引物,上游:5'-TGA AGA TCA AGA TCA TTG CTC C-3',下游:5'-GGA CTC GTC ATA CTC CTG CTT G-3',扩增产物 122 bp;CCR5 引物,上游:5'-GTT TTT CTT CCA GAA GTA ATG TGG-3',下游:5'-CCT GTG CCT CTT CTT CTC ATT TCG-3',扩增产物 189 bp。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。RT-PCR 反应体系:cDNA 100 ng,SYBR Green Master 10 μL,上游引物 0.5 μL,下游引物 0.5 μL,ddH₂O 补足体积至

20 μL。反应条件:50℃ 2 min;95℃ 10 min;95℃ 15 s,60℃ 1 min,40 个循环。每一份标本均设置 3 个副孔,实时荧光信号定量可以显示荧光信号达到设定阈值时所经过的循环数,即 Ct 值,目的基因 CCR5 的 Ct 值与内参 β actin Ct 值的差值为 Δ Ct 值, $2^{-\Delta}$ Ct 则为该样本中目的基因 CCR5 相对于 β -actin 的相对表达量,而 $2^{-\Delta\Delta}$ Ct 表示目的基因 CCR5 在 AHB 和 CHB 组与对照组之间拷贝数的倍数关系,用于统计学作图分析。

1.2.4 乙型肝炎相关血清血标志物检测

乙肝血液学检测采血样后离心取血浆,采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测乙型肝炎血清血标志物及血液生化指标。试剂盒由北京万泰生物制药股份有限公司生产(批号 X20100804),严格按说明书操作,利用美国 BiotecELX800 酶标仪判断结果。

1.3 统计学处理

采用 SPSS18.0 软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用单因素方差分析;方差齐性进一步两两比较采用 LSD-*q* 分析;方差不齐进一步两两比较采用 Dunnett'*t* 分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 总 RNA 的鉴定

凝胶图像分析系统密度扫描摄像,可见清晰的 28 S、18 S、5.8 S 3 条带,见图 1,提示所得总 RNA 完整性好。紫外分光光度计测定 OD260/OD280 值,该值介于 1.9~2.0,表示 RNA 纯度较高,可满足后续实验要求。

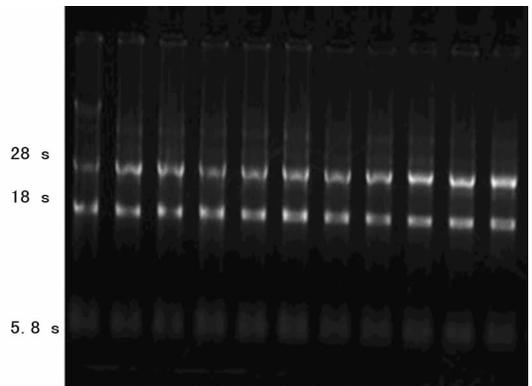


图 1 RNA 琼脂糖凝胶电泳图

表 1 3 组人群外周血 β -actin、CCR5 mRNA 表达水平

组别	β -actin	CCR5
对照组	27.44±1.26	27.89±1.41
AHB 组	26.82±1.58	26.95±1.55
CHB 组	27.32±1.49	29.95±2.26

2.2 AHB 组、CHB 组、对照组外周血 CCR5 mRNA 表达

以 Ct 值的 $\bar{x}\pm s$ 表示,AHB 组、CHB 组及各对照组 β actin、CCR5 的表达水平见表 1,AHB 组外周血 CCR5 mRNA 相对表达量($2^{-\Delta}$ Ct)为(1.119 9±0.723 3),CHB 组为(0.582 3±0.273 6),对照组为(0.798 5±0.349 2)。AHB 组 CCR5 mRNA 相对表达水平明显高于对照组($P=0.038$),CHB 组 CCR5 mRNA 相对表达水平明显高于对照组($P=0.041$),AHB 组 CCR5 mRNA 相对表达水平明显高于 CHB 组($P=0.002$)。根据 $2^{-\Delta\Delta}$ Ct 值提示急性 HBV 感染组 CCR5 mRNA 表达水平是对照组的 1.6 倍,CHB 组 CCR5 mRNA 表达水平是对照组的 0.6 倍,AHB 组 CCR5 mRNA 表达水平是 CHB 组的 2.7 倍。而

CCR5 mRNA 各组相对表达水平与性别、年龄无关,差异有统计学意义($P>0.05$)。

3 讨 论

HBV 作为一种非侵袭性嗜肝病毒,由 HBV 表达的抗原系统及其抗体所介导的特异性免疫反应和非特异性的以细胞因子为主的炎症介质导致肝细胞损伤组成。目前研究认为,特异性细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)以 HBV 各类抗原表位作为主要的效应细胞^[7-8],一方面通过直接破坏受感染的肝细胞来清除病毒,另一方面通过分泌干扰素- γ (IFN- γ)等细胞因子来发挥清除病毒的作用。CTL Th1 细胞主要分泌白细胞介素-2(IL-2)、IL-12、IFN- γ 、肿瘤坏死因子- β (TNF- β)等,通过介导与细胞毒和局部炎症有关的免疫应答而参与细胞免疫。CCR5 作为 Th1 细胞的特异性表面标志,其表达水平不仅参与调节 T 细胞的分化程度,还影响不同 T 细胞亚群的募集,从而干扰细胞免疫应答。Gastellino 等^[9]的研究显示,在抗原识别之前,淋巴结中幼稚 CD8⁺T 的 CCR5 表达上调,会吸引幼稚 CD8⁺T 细胞到树突状细胞与 CD4⁺T 细胞相互作用的区域。

当机体感染 HBV 后,机体内抗原提呈细胞——树突状细胞及 Th1 细胞在清除 HBV 过程中发挥重要作用,CCR5 在上述 2 种细胞的细胞膜表面均有一定量的表达。结合本实验观察,AHB 患者外周血 CCR5 mRNA 的表达水平明显增高,提示当树突状细胞及 Th1 细胞表面有足够量的 CCR5 表达时,趋化树突状细胞及 Th1 向 HBV 感染部位游走,高表达的 CCR5 mRNA 使清除、抑制 HBV 的功能增强;而 CHB 患者 CCR5 mRNA 的表达量较低,提示树突状细胞及 Th1 细胞表面没有足够量的 CCR5 表达时,CTL 向肝细胞的定向迁移量降低,不利于 HBV 的清除,启动非特异性 CTL 导致肝脏炎症反应,从而引起肝功能损害的加重。CCR5 mRNA 的表达强度很可能与机体清除 HBV 的能力呈正相关,可辅助鉴别 CHB 与 AHB。Lee 等^[10]观察到 HBV 特异性 CD8⁺T 细胞表面的 CCR5 密度明显升高,提示 CCR5 的表达似乎与机体清除 HBV 的反应有关。Ahmadabadi 等^[11]研究表明 CHB 患者外周血 CD8⁺T 细胞表面的 CCR5 表达量显著低于健康人群。颜学兵等^[12]研究认为患者外周血单核细胞的 CCR5 表达水平与乙型肝炎的临床转归可能有一定关系,高水平的 CCR5 患者预后较好;CCR5 的高表达可能不利于 HBV 的复制。本次观察结果与上述观点相符,认为高表达的 CCR5 可能利于 HBV 的抑制和清除、甚至乙型肝炎的恢复。

目前,临床上治疗 HBV 感染的抗病毒药物主要包括干扰素和核苷类似物两大类,但干扰素的长期应答率低、不良反应大;核苷类似物不能完全清除病毒,容易出现耐药情况。随着中国 HBV 感染人数的不断上升,中国对乙型肝炎的防治力度逐渐加大。可望通过积极干预机体 CCR5 表达,间接影响机体特异性细胞免疫功能,如联合给予 CCR5 阻断剂和抗 HBV 药物增强对 HBV 抗原的 T 细胞反应以增加 HBV 的清除^[13]。从而为乙型肝炎的免疫治疗、筛选候选药物靶分子、药物开发等研究带来新的曙光。

参考文献:

[1] Zanetti AR, Van Damme P, Shouval D. The global impact

of vaccination against hepatitis B: a historical overview [J]. *Vaccine*, 2008, 26: 6266-6273.

- [2] 王兰天,陈心春,祝葆华,等. 乙型肝炎病毒相关性肝细胞癌发生机制[J]. *国际病毒学杂志*, 2010, 17(6): 178-183.
- [3] 梁晓峰,陈园生,王晓军,等. 中国 3 岁以上人群乙型肝炎血清流行病学研究[J]. *中华流行病学杂志*, 2005, 9: 655-658.
- [4] Venza I, Visalli M, Cucinotta M, et al. Proinflammatory gene expression at chronic perionitis and peri-Implantitis sites in patients with or without type 2 diabetes[J]. *J Periodontol*, 2010, 81(1): 99-108.
- [5] Balistreri CR, Caruso C, Grimaldi MP, et al. CCR5 receptor: biologic and genetic implications in age-related diseases[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2007, 11(2): 162-172.
- [6] Allavena P, Germano G, Marchesi F, et al. Chemokines in cancer related inflammation[J]. *Exp Cell Res*, 2011, 317(5): 664-673.
- [7] 郭芳,魏来. 急性乙型肝炎病毒性肝炎致病机理及转归[J]. *中华医学杂志*, 2002, 82(15): 1074-1077.
- [8] Maini MK, Boni C, Lee CK, et al. The role of virus-specific CD8⁺ cells in liver damage and viral control during persistent hepatitis B virus infection [J]. *J Exp Med*, 2000, 191(8): 1269-1280.
- [9] Gastellino F, Huang AY, Aitan-Bonnet C, et al. Chemokines enhance immunity by guiding naive CD8⁺ T cells to sites of CD4⁺ T cell-dendritic cell interaction[J]. *Nature*, 2006, 32(3): 440-450.
- [10] Lee CK, Suh JH, Cho YS, et al. Chemokine receptor expression of hepatitis B virus-specific CD8⁺ lymphocyte in chronic B viral infection[J]. *Taehan Kan Hakhoe Chi*, 2002, 8(4): 363-370.
- [11] Ahmadabadi BN, Hassanshahi G, Khoramdelazad H, et al. Downregulation of CCR5 expression on the peripheral blood CD8⁺ T cells of southeastern Iranian patients with chronic hepatitis B infection[J]. *Inflammation*, 2013, 36(1): 136-140.
- [12] 颜学兵,张萍,吴文漪,等. 细胞趋化因子受体 5 在病毒性肝炎患者外周血单核细胞中的表达[J]. *徐州医学院学报*, 2006, 26(1): 110-112.
- [13] Gu XB, Yang XJ, Wang D, et al. Relationship between serum HBV DNA level and HBV-specific, non-specific cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells in patients with chronic hepatitis B[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2009, 122(18): 2129-2132.

(收稿日期:2013-11-28 修回日期:2014-02-25)