

## 探讨性别和年龄在慢性丙型肝炎患者 外周血 Toll 样受体 3 和 7 基因表达中的影响\*

牛志立, 张平安, 童永清 (武汉大学人民医院检验科, 武汉 430060)

**摘要:**目的 观察不同性别和年龄慢性丙型肝炎(CHC)患者外周血单个核细胞(PBMC)中 Toll 样受体 3(TLR3)和 Toll 样受体 7(TLR7)mRNA 表达,探讨性别和年龄在 CHC 患者外周血 TLR3 和 TLR7 基因表达中的影响。方法 选择 CHC 患者 115 例,健康人群 113 例,取抗凝全血,实时荧光定量 PCR 检测 TLR3 和 TLR7 mRNA 表达。结果 CHC 患者 TLR3 和 TLR7 表达量与健康人群相比,差异均有统计学意义( $t=38.73, 6.16, P<0.05$ )。CHC 患者中非绝经期女性 TLR3 和 TLR7 表达量与绝经期女性和青年男性相比,差异均有统计学意义( $t=61.210, 6.464, P<0.05$ ;  $t=24.166, 26.266, P<0.05$ )。CHC 患者中老年男性 TLR3 和 TLR7 表达量与青年男性相比,差异均有统计学意义( $t=86.349, 19.583, P<0.05$ ),而与绝经期女性相比,仅 TLR3 表达量差异有统计学意义( $t=122.941, P<0.05$ )。不同性别和年龄 CHC 患者的 TLR3, TLR7 基因表达量与 HCV-RNA 载量均无相关性( $|r|<0.40, P>0.05$ ),但是青年女性 CHC 患者 HCV 含量均比青年男性和老年女性低,差异有统计学意义( $t=3.49, 2.51, P<0.05$ ),老年男性患者 HCV 含量比青年男性低,差异有统计学意义( $t=2.35, P<0.05$ ),老年男性和女性 CHC 患者 HCV-RNA 含量差异无统计学意义( $t=1.20, P>0.05$ )。结论 性别和年龄与 CHC 患者 TLR 的表达有一定的关系,为临床合理有效治疗 CHC 提供理论依据和新方法。

**关键词:**慢性丙型肝炎;外周血单个核细胞;Toll 样受体;实时荧光定量 PCR

**中图分类号:**R512.63;Q786 **文献标志码:**A **文章编号:**1671-7414(2015)01-023-04

**doi:**10.3969/j.issn.1671-7414.2015.01.007

## Exploring Impact of Gender and Age Discrepancies on the Expression of Toll-like Receptor 3 and 7 Gene mRNA of Patients with Chronic Hepatitis C Infection

NIU Zhi-li, ZHANG Ping-an, TONG Yong-qing

(Department of Laboratory Medicine, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China)

**Abstract: Objective** Investigating the expression of TLR3 and TLR7 mRNA in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of patients with chronic hepatitis C infection (CHC), to explore the effects of gender and age on Toll-like receptor expression. **Methods** Peripheral blood was collected from 115 patients of chronic hepatitis C infection, 113 healthy individuals. Expression levels of TLR3 and TLR7 mRNA were detected by real-time quantitative PCR. **Results** The expression of TLR3 and TLR7 mRNA were significant difference between patients with CHC infection and healthy individuals ( $t=38.73, 6.16, P<0.05$ ), respectively. The expression of TLR3 and TLR7 mRNA were significant difference between premenopausal females with CHC infection, postmenopausal females and young males of CHC infection ( $t=61.210, 6.464, P<0.05$ ;  $t=24.166, 26.266, P<0.05$ ), respectively. The expression of TLR3 and TLR7 mRNA were significant differences between old males and young males of chronic hepatitis CHC infection ( $t=86.349, 19.583, P<0.05$ ). The expression of TLR3 mRNA was significant differences between old males and postmenopausal females of CHC infection ( $t=122.941, P<0.05$ ). There was no correlation between the expressions of TLR3 and TLR7 and HCV-RNA load of CHC patents of Gender and age discrepancies ( $|r|<0.40, P>0.05$ ). The HCV-RNA load of premenopausal females was significant lower than young males and old females ( $t=3.49, 2.51, P<0.05$ ), the load of old males was lower than old females ( $t=2.35, P<0.05$ ), however, there was no significant differences between old males and old females ( $t=1.20, P>0.05$ ). **Conclusion** Gender and age discrepancies have a relationship with the expression of Toll-like receptors of patients with CHC infection, which may provide a theoretical basis and a new method for CHC.

**Keywords:** chronic hepatitis C; peripheral blood mononuclear cells; toll like receptor; real-time quantitative PCR

Toll 样受体家族(Toll-like receptors, TLRs)是近年来发现的在抗病原微生物免疫防御反应中起重要作用的模式识别受体(pattern recognition receptors, PRR),通过识别细菌、病毒等不用病原体的相关模式分子(pathogen associated molecular patterns, PAMPs),启动天然免疫和调节免疫反

\* 作者简介:牛志立(1989-),男,在读硕士,从事临床免疫学研究, Tel:18207156885, E-mail:1060128042@qq.com。

通讯作者:张平安, E-mail:zhangpingan@aliyun.com。

应,在联系天然免疫和获得性免疫中也起着桥梁的作用<sup>[1]</sup>。迄今,在人类已发现了13个TLRs(TLR1-TLR13),其中TLR3是通过特异性地识别病毒双股RNA(double-stranded RNA, dsRNA)而活化细胞,丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)在复制和转录过程中产生大量的dsRNA可被TLR3识别,活化的TLR3通过MyD88非依赖性信号通路激活干扰素 $\beta$ (interferon- $\beta$ , IFN- $\beta$ )基因的转录和表达<sup>[2]</sup>。TLR7则可特异性地识别来自病毒的富含鸟苷和尿苷的单链RNA(single-stranded RNA, RNA), HCV是一种单股线性正链RNA病毒也能被TLR7识别,活化的TLR7通过MyD88依赖性信号通路激活IFN- $\alpha$ 基因的转录和表达。I型干扰素(IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ )基因表达的蛋白激活JAK-STAT信号通路,最终激活干扰素诱导基因(interferon stimulated gene, ISG)的表达而发挥抗病毒作用<sup>[3,4]</sup>。

据世界卫生组织统计,全球HCV的感染率约为3%<sup>[5]</sup>,最近报道认为女性比男性更易感染急性丙型肝炎,但是丙型肝炎患者的男性相对于女性而言病情更容易向肝纤维化、肝硬化和肝癌发展<sup>[6]</sup>。而且女性具有更强的清除能力和持续病毒学应答(sustained virologic response, SVR)<sup>[7,8]</sup>,但其具体机制目前并不是很清楚。本文将从性别和年龄的角度对CHC患者进行TLRs基因表达的研究和比较,探讨性别和年龄在HCV感染中的影响作

表1

TLR3, TLR7和GAPDH的上下游引物

目的基因	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')	大小(bp)
TLR3(NM_003265.2)	AAAACCTTTGCCTTCTGCACG	TGGACAGCTGGCTGTACTC	436
TLR7(NM_016562.3)	ACTCCTTGGGGCTAGATGGT	AGAAGCTGTAAGCTAGCGG	390
GAPDH(NM_002046.5)	AACGGATTGGTGGTATTGG	AGATGATGACCTTTTGGCT	340

象空腹静脉血2 ml于EDTA抗凝采血管中,按照淋巴细胞分离液说明书提取单个核细胞。Trizol法提取总mRNA。取11  $\mu$ l RNA模板进行逆转录,加入1  $\mu$ l oligo引物混匀并瞬时离心,65 $^{\circ}$ C 5 min,反应体系:4  $\mu$ l Reaction Buffer, 2  $\mu$ l Mix, 1  $\mu$ l RI, 1  $\mu$ l RT。反应条件:42 $^{\circ}$ C 60 min, 72 $^{\circ}$ C 10 min, 4 $^{\circ}$ C保存。得到的cDNA产物放置在-20 $^{\circ}$ C保存备用。

1.3.3 荧光定量PCR检测:反应体系为cDNA 1  $\mu$ l,上下游引物各1  $\mu$ l, SYBR Premix Ex Taq II 10  $\mu$ l, ROX II 0.4  $\mu$ l, ddH<sub>2</sub>O 7.6  $\mu$ l, 总体积为20  $\mu$ l。扩增反应条件为3个基因(TLR3, TLR7, GAPDH)的反应条件均为94 $^{\circ}$ C 30 s预变性, 94 $^{\circ}$ C 20 s, 60 $^{\circ}$ C 20 s, 72 $^{\circ}$ C 35 s, 50个循环, 溶解曲线条件: 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 95 $^{\circ}$ C 15 s。对CHC组和健康组3个基因mRNA的表达采用2<sup>-CT</sup>进行比

用。

## 1 材料与方法

1.1 研究对象 选择2013年3月~2014年8月在武汉大学人民医院感染科门诊就诊及住院的未治疗的CHC患者115例,其中绝经期女性31例和老年男性29例,年龄48~72岁,平均年龄(64 $\pm$ 5)岁,非绝经期女性28例和青年男性27例,年龄24~43岁,平均年龄(33 $\pm$ 7)岁,诊断符合《丙型肝炎防治指南》<sup>[9]</sup>。排除自身免疫系统疾病、其他系统严重疾病及感染性疾病。对照组为同期来我院进行体检的健康人群共113例,包括女性57例和男性56例,年龄25~68岁,平均年龄(53 $\pm$ 8)岁。所有研究对象均签订知情同意书。

1.2 主要试剂与仪器 淋巴细胞分离液由天津美德太平洋科技有限公司提供, Trizol和SYBR Premix Ex Taq II由TaKaRa公司提供,反转录试剂盒由Thermo SCIENTIFIC公司提供。PCR分析仪, Applied Biosystem Inc公司生产; VII7荧光定量分析仪, ABI公司生产。

## 1.3 研究方法

1.3.1 引物设计:利用美国国立生物技术信息中心(national center of biotechnology information, NCBI)网站中提供的TLR3和TLR7 mRNA序列和BLAST进行引物设计,见表1。所有引物均由上海因维基生物技术有限公司合成。

1.3.2 mRNA提取和逆转录 采集所有研究对

较<sup>[10]</sup>。扩增效率验证:本实验对3个基因(TLR3, TLR7, GAPDH)进行了10倍稀释,稀释5个梯度,目的基因和内参基因扩增效率相差小于5%,且在98%~102%之间,可以认为扩增效率近似相等<sup>[11]</sup>。

1.3.4 HCV-RNA含量的测定:根据试剂盒的操作说明,采用荧光定量PCR检测HCV RNA。HCV RNA最低检测限为1 $\times$ 10<sup>3</sup> copy/ml。

1.4 统计学分析 用SPSS 20.0软件对数据进行分析,计量资料呈正态分布且方差齐性的两组均数间比较采用t检验分析并以S表示。相关性分析使用Pearson(正态分布)相关分析法。以P<0.05为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 TLR3和TLR7基因mRNA在CHC患者和健康人群的表达量比较 健康人群比CHC患者

TLR3 和 TLR7 表达量高,  $2^{-\Delta\Delta CT}$  值分别为  $(4.83 \pm 0.17)$  和  $(1.71 \pm 0.19)$ , 差异均有统计学意义 ( $t = 38.73, 6.16, P < 0.05$ ), 且基因表达量是后者的 4.83 倍, 1.71 倍。

2.2 TLR3 和 TLR7 基因 mRNA 在老年 CHC 患者和同性别青年患者的表达情况 非绝经期女性 CHC 患者 TLR3 和 TLR7 表达量比绝经期女性高, 差异均有统计学意义 ( $t = 61.210, 6.464, P < 0.05$ ), 且基因表达量是后者的 6.61 倍, 1.6 倍。老年男性 CHC 患者 TLR3 和 TLR7 表达量比青年男性高, 差异均有统计学意义 ( $t = 86.349, 19.583, P < 0.05$ ), 且基因表达量是后者的 9.8 倍, 3.49 倍, 见表 2。

表 2 老年和青年 CHC 患者间 TLR3 和 TLR7 基因 mRNA 表达量的比较

组别		$2^{-\Delta\Delta CT}$	t 值	P 值
女性	TLR3	$6.61 \pm 0.158$	61.210	0.000 1
	TLR7	$1.60 \pm 0.16$	6.464	0.003
男性	TLR3	$9.8 \pm 0.17$	86.349	0.000 1
	TLR7	$3.49 \pm 0.22$	19.583	0.000 1

注: 女性组:  $\Delta\Delta CT = [CT_{(非绝经期组 目的基因)} - CT_{(非绝经期组 GAPDH)}] - [CT_{(绝经期组 目的基因)} - CT_{(绝经期组 GAPDH)}]$ , 男性组:  $\Delta\Delta CT = [CT_{(老年组 目的基因)} - CT_{(老年组 GAPDH)}] - [CT_{(青年组 目的基因)} - CT_{(青年组 GAPDH)}]$ 。

2.3 TLR3 和 TLR7 基因 mRNA 在女性 CHC 患者和年龄匹配男性人群中的表达情况 老年男性 CHC 患者 TLR3 表达量比绝经期女性高, 差异均有统计学意义 ( $t = 122.941, P < 0.05$ ), 且基因表达量是后者的 15.77 倍, 但是 TLR7 基因表达的差异无统计学意义 ( $t = 1.13, P > 0.05$ ), 非绝经女性 CHC 患者 TLR3 和 TLR7 表达量比青年男性高, 差异均有统计学意义 ( $t = 24.166, 26.266, P < 0.05$ ), 且基因表达量是后者的 4.06 倍, 4.81 倍, 见表 3。

表 3 不同性别 CHC 患者间 TLR3 和 TLR7 基因 mRNA 表达量的比较

组别		$2^{-\Delta\Delta CT}$	t 值	P 值
老年	TLR3	$15.77 \pm 0.2$	122.941	0.000 1
	TLR7	$1.13 \pm 0.21$	1.027	0.363
青年	TLR3	$4.06 \pm 0.21$	24.166	0.000 1
	TLR7	$4.81 \pm 0.251$	26.266	0.000 1

注: 老年组:  $\Delta\Delta CT = [CT_{(老年男性组 目的基因)} - CT_{(老年男性组 GAPDH)}] - [CT_{(绝经期组 目的基因)} - CT_{(绝经期组 GAPDH)}]$ , 青年组:  $\Delta\Delta CT = [CT_{(非绝经期组 目的基因)} - CT_{(非绝经期组 GAPDH)}] - [CT_{(青年男性组 目的基因)} - CT_{(青年男性组 GAPDH)}]$ 。

2.5 不同年龄和性别 CHC 患者 HCV 病毒载量 (lgHCV-RNA) 比较 对不同年龄和性别 CHC 患

者 HCV-RNA 含量进行比较, 结果发现青年女性患者 HCV 含量 ( $3.90 \pm 1.17$ ) 比青年男性 ( $5.30 \pm 1.79$ ) 和老年女性 ( $4.80 \pm 1.58$ ) 低, 差异有统计学意义 ( $t = 3.49, 2.51, P < 0.05$ )。老年男性患者 HCV 含量 ( $4.40 \pm 1.66$ ) 比青年男性低, 差异有统计学意义 ( $t = 2.35, P < 0.05$ )。但是 HCV-RNA 含量在老年男性和女性之间的差异无统计学意义 ( $t = 1.20, P > 0.05$ )。

2.4 不同性别 CHC 患者 TLR3 和 TLR7 基因表达量与 HCV-RNA 载量的相关性分析 将 CHC 患者 TLR3 和 TLR7 基因表达量与 HCV-RNA 载量进行相关性分析, 结果发现不同年龄和性别 CHC 患者间 TLR3 基因表达量与 HCV-RNA 载量无相关性 ( $r = 0.210, 0.370, 0.084, 0.128, P > 0.05$ ), 同样, TLR7 基因表达量与 HCV-RNA 载量无相关性 ( $r = 0.202, 0.284, 0.093, 0.362, P > 0.05$ )。

3 讨论 有研究报道, 性别不同会导致对 HCV 的免疫反应不同, 比如: HCV 感染的女性比 HCV 感染的男性具有较高的病毒自我清除能力, 并且对抗病毒治疗的效果也不相同。如果对女性进一步分析, 有研究发现, 年轻女性比老年女性获得更高的持续病毒学应答, 但是青年男性和老年男性之间并无差异。对 HCV 感染的老年男性和老年女性研究发现, 经过抗病毒治疗的老年男性要比抗病毒治疗的老年女性更易获得持久病毒学应答反应, 但是他们都不如绝经前的女性更易获得持久的病毒学应答反应<sup>[8, 12~15]</sup>。但是其具体机制并不是很清楚。

本文首先对 CHC 和健康人群进行比较, 结果发现 CHC 患者均比健康人群的基因表达低, 这解释了 HCV 患者持续感染的原因, 本实验结果与 Motavaf 等<sup>[18]</sup> 人研究认为 TLR3, TLR7 在慢性 HCV 感染者中的表达是降低的结论是相一致的, 但是与 Dolganiuc 等<sup>[19]</sup> 报道 TLR3 在慢性 HCV 感染者中的表达是升高的相矛盾。出现不同的研究结果可能与 HCV 亚型, 研究对象的种族、性别、年龄, 以及人外周血细胞种类等因素有关。

对年龄和性别进一步分析发现, 非绝经期女性 CHC 患者比绝经期女性和青年男性均具有较高的 TLR3, TLR7 表达水平。这与雌激素具有增强免疫功能的作用有很大的关系<sup>[16]</sup>。而我们也发现非绝经期女性 CHC 患者 TLR3, TLR7 比其他感染者的表达水平高, 这解释了非绝经期女性比男性和绝经期女性更具有持久的病毒学免疫应答反应<sup>[8]</sup>。有研究表明, 雄激素对人体的免疫功能具有抑制作用, 但是随着年龄增长, 雄激素水平下降, 对免疫

的抑制作用减弱<sup>[17]</sup>。本次实验对男性研究发现,老年男性 CHC 患者比青年男性具有较高的 TLR3, TLR7 表达水平,同时比绝经期女性 CHC 患者具有较高的 TLR3 表达水平。这说明雄激素的下降对 TLRs 的抑制作用减弱,导致 TLRs 的表达有所上升,而绝经期女性的雌激素下降,对免疫功能的增强作用减弱,本实验发现比老年男性 TLRs 的表达量还低。

本实验对 TLRs 的表达量与其配体 HCV-RNA 含量进行了相关性分析,发现 TLR3 和 TLR7 的表达量与 HCV-RNA 的含量并没有相关性。这与魏新素等<sup>[20,21]</sup>人的研究结果一致。我们对不同性别和年龄 CHC 患者的 HCV-RNA 含量进行分析,结果发现青年女性患者 HCV-RNA 含量比青年男性和老年男性要低,这可能是雌激素通过影响 TLRs 的表达,导致不同性别和年龄段的人对 HCV 清除能力的不同,这与 Aziz 等<sup>[22]</sup>人研究相同。综上所述,有关性别和年龄与 CHC 的发病机制,以及如何通过固有免疫如 TLR 的调控来清除机体 HCV 的感染,需要进一步深入研究。

#### 参考文献:

- [1] Song DH, Lee JO. Sensing of microbial molecular patterns by Toll-like receptors[J]. *Immunol Rev*, 2012, 250(1):216-229.
- [2] Lester SN, Li K. Toll-like receptors in antiviral innate immunity[J]. *J Mol Biol*, 2014, 426(6):1246-1264.
- [3] Howell J, Angus P, Gow P, et al. Toll-like receptors in hepatitis C infection; implications for pathogenesis and treatment[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2013, 28(5):766-776.
- [4] Ivashkiv LB, Donlin LT. Regulation of type I interferon responses[J]. *Nat Rev Immunol*, 2014, 14(1):36-49.
- [5] Lavanchy D. The global burden of hepatitis C[J]. *Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver*, 2009, 29(Suppl):74-81.
- [6] Baden R, Rockstroh JK, Buti M. Natural history and management of hepatitis C; does sex play a role[J]. *J Infect Dis*, 2014, 209(Suppl 3):S81-S85.
- [7] Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, et al. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomized trial[J]. *Lancet*, 2001, 358(9286):958-965.
- [8] Bakr I, Rekaewicz C, El Hosseiny M, et al. Higher clearance of hepatitis C virus infection in females compared with males[J]. *Gut*, 2006, 55(8):1183-1187.
- [9] 中华医学会肝病学会, 中华医学会传染病与寄生虫病学分会. 丙型肝炎防治指南[J]. *中华肝脏病杂志*, 2004, 12(4):194-198.  
Chinese Society of Hepatology and Chinese Society of Infectious Diseases, Chinese Medical Association. The guideline of prevention and treatment for chronic hepatitis C[J]. *Chinese Journal of Hepatology*, 2004, 12(4):194-198.
- [10] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup> $\Delta\Delta C_T$  Method[J]. *Methods*, 2001, 25(4):402-408.
- [11] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR[J]. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29(9):e45.
- [12] Hannah MF, Bajic VB, Klein SL. Sex differences in the recognition of and innate antiviral responses to Seoul virus in Norway rats[J]. *Brain Behav Immun*, 2008, 22(4):503-516.
- [13] Klingstrom J, Lindgren T, Ahlm C. Sex-dependent differences in plasma cytokine responses to hantavirus infection[J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2008, 15(5):885-887.
- [14] Sezaki H, Suzuki F, Kawamura Y, et al. Poor response to pegylated interferon and ribavirin in older women infected with hepatitis C virus of genotype 1b in high viral loads[J]. *Dig Dis Sci*, 2009, 54(6):1317-1324.
- [15] Villa E, Karampatou A, Camma C, et al. Early menopause is associated with lack of response to antiviral therapy in women with chronic hepatitis C[J]. *Gastroenterology*, 2011, 140(3):818-829.
- [16] Marriott I, Huet-Hudson YM. Sexual dimorphism in innate immune responses to infectious organisms[J]. *Immunol Res*, 2006, 34(3):177-192.
- [17] Sasaki M, Fujii Y, Iwamoto M, et al. Effect of sex steroids on Babesia microti infection in mice[J]. *Am J Trop Med Hyg*, 2013, 88(2):367-375.
- [18] Motavaf M, Noorbakhsh F, Alavian SM, et al. Distinct toll-like receptor 3 and 7 expression in peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic hepatitis C infection[J]. *Hepat Mon*, 2014, 14(4):e16421.
- [19] Dolganiuc A, Garcia C, Kodys K, et al. Distinct toll-like receptor expression in monocytes and T cells in chronic HCV infection[J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2006, 12(8):1198-1204.
- [20] 魏新素, 张平安, 吴泽刚, 等. 慢性丙型肝炎患者 TLR3 和 TLR7 mRNA 表达及其与 IL-27 和病毒载量的关系[J]. *中华临床感染病杂志*, 2012, 5(5):298-300.  
Wei XS, Zhang PA, Wu ZG, et al. Expression of toll-like receptors 3 and 7 mRNA in peripheral blood mononuclear cells and its correlation with interleukin-27 level and viral load in patients with chronic hepatitis C[J]. *Chinese Journal of Clinical Infectious Diseases*, 2012, 5(5):298-300.
- [21] Zhou J, Huang YC, Tian DY, et al. Expression of toll-like receptor 9 in peripheral blood mononuclear cells from patients with different hepatitis B and C viral loads[J]. *J Huazhong Univ Sci Technolog (Med Sci)*, 2009, 29(3):313-317.
- [22] Aziz H, Athar MA, Murtaza S, et al. Predictors of response to antiviral therapy in patients with chronic hepatitis C from pakistani population[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2011, 124(9):1333-1337.

收稿日期:2014-04-05

修回日期:2014-04-23