

STING 在原发性胆汁性肝硬化患者外周血单个核细胞中的表达及临床意义*

陈燕^a, 谷明莉^a, 叶辛^b, 李腾达^a, 邓安梅^a

(第二军医大学长海医院 a. 实验诊断科; b. 输血科, 上海 200433)

摘要:目的 探讨刺激干扰素基因(STING)在原发性胆汁性肝硬化(PBC)中的表达及其潜在的临床意义。方法 纳入2014年1月~2015年10月期间在上海长海医院和长征医院就诊的PBC患者28例,平均年龄 32.5 ± 11.3 岁,纳入同期体检的健康对照28例,平均年龄 37.5 ± 13.7 岁。分离单个核细胞(PBMC),采用实时荧光定量PCR检测STING mRNA表达水平;采用Spearman检验分析STING表达水平与PBC患者临床指标的相关性;随访5例初诊的PBC患者,观察临床治疗前后STING表达水平的变化。结果 与健康对照组相比,STING mRNA在PBC患者PBMC中显著增高,在Ⅲ期和Ⅳ期中的表达显著高于Ⅰ期和Ⅱ期,差异有统计学意义($U=0.00, P<0.05$)。STING mRNA水平与患者Mayo评分、GGT正相关($R=0.45, R=0.42, P<0.05$),与AST、ALT和ALP无相关性($R=0.33, 0.21, 0.27, P>0.05$)。临床治疗有效后,STING mRNA的表达量显著降低,差异有统计学意义($U=0.00, P<0.05$)。结论 STING可能参与了PBC的发病机制。

关键词:原发性胆汁性肝硬化;刺激干扰素基因;干扰素

中图分类号:R575.22;R392.11 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2016)03-033-03

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2016.03.010

Expression of STING in Peripheral Blood in Patients with Primary Biliary Cirrhosis and Its Clinical Significance

CHEN Yan^a, GU Ming-li^a, YE Xin^b, LI Teng-da^a, DENG An-mei^a

(a. Department of Laboratory Diagnosis; b. Department of Transfusion Medicine, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract: **Objective** To explore the clinical significance of STING in peripheral blood in patients with primary biliary cirrhosis. **Methods** Admitted 28 PBC patients hospitalized in Shanghai Changhai Hospital and Shanghai Changzheng Hospital from January 2014 to October 2015. Also enrolled 28 healthy controls. Baseline data and laboratory indicators were extracted, and STING mRNA expression was determined using q-PCR. The correlation between STING and clinical parameters were analyzed. The changes of STING mRNA in 5 followed-up patients with PBC were analyzed. **Results** Compared with healthy controls, STING mRNA was significantly increased in PBC patients and was increased in patients with severer disease stages ($U=0.00, P<0.05$). STING was positively correlated with Mayo risk and GGT ($R=0.45, R=0.42, P<0.05$), and not AST, ALT or ALP ($R=0.33, 0.21, 0.27, P>0.05$). After therapy, STING mRNA were significantly reduced in 5 PBC patients ($U=0.00, P<0.05$). **Conclusion** STING may be involved in PBC pathogenesis.

Keywords: primary biliary cirrhosis; STING; interferon

原发性胆汁性肝硬化(primary biliary cirrhosis, PBC)是一种以肝小叶汇管区淋巴细胞浸润、小胆管炎性破坏、血清特征性抗线粒体抗体(AMA)阳性为特征的自身免疫性疾病^[1]。目前对PBC的治疗仍然十分棘手,熊脱氧胆酸(UDCA)是现在临床常用的治疗药物,能缓解症状,但是不能有效提高患者预后情况^[2],因此,深入研究PBC的免疫学

调控机制,将对临床患者的治疗和预后产生积极的作用。

干扰素(interferons, IFNs)是一类由多种免疫效应细胞产生的免疫调节分子,参与了多种生理病理过程。在稳态情况下,干扰素的产生受到机体的精密调节;在自身免疫性疾病时,调节系统紊乱,免疫系统过度活化,导致干扰素产生过多,造成严重

* 基金项目:973计划(2013CB531606),国家自然科学基金(81471605, 81302579, 81300748, 81273282, 81202353, 81401358),上海申康基金(CHDC22014014),军队科研基金(BWS14J023),长海医院1255学科建设计划(CH125530300),南京军区医药卫生科研基金(12MA056)。

作者简介:陈燕,女,检验技师,主要从事临床检验诊断学工作。

作者简介:谷明莉,女,检验技师,主要从事临床检验诊断学工作,共同第一作者。

通讯作者:邓安梅,女, E-mail: amdeng70@163.com; 李腾达,女, E-mail: 809009946@qq.com。

的病理表现^[3]。刺激干扰素基因(stimulator of interferon genes, STING)是一型干扰素的上游调控分子,已有研究报道其参与了肿瘤、系统性红斑狼疮等慢性炎症状态^[4,5]。但 STING 在 PBC 中的作用尚未见报道。本文中,我们探讨了 PBC 患者外周血单个核细胞(PBMC)中 STING 的表达及其临床意义。

1 材料和方法

1.1 研究对象 本研究纳入对象为 2014 年 1 月~2015 年 10 月期间在上海长海医院和长征医院就诊的 PBC 患者 28 例,平均年龄 32.5 ± 11.3 岁,所有患者均符合中华医学会 PBC 诊治共识(2015)。排除标准:①并发其他自身免疫性疾病,如类风湿性关节炎等;②并发肿瘤;③急性炎症反应。纳入同期体检的健康对照 28 例,平均年龄 37.5 ± 13.7 岁。本研究经过上海长海医院和长征医院伦理委员会批准,所有受试对象均签署知情同意书。

1.2 试剂和仪器 淋巴细胞分离液(Sigma, USA), TRIZOL(Introgen, USA), Takara 反转录试剂盒(Takara, China); ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪(ABI, USA)。本研究所用引物均由上海生工生物有限公司合成。

1.3 方法

1.3.1 外周血 PBMC 分离:使用 EDTA-K₂ 抗凝管采集所有受试对象外周静脉血,根据密度梯度离心法分离 PBMC,置于 -80°C 保存。

1.3.2 总 RNA 抽提和 cDNA 合成:使用 TRIZOL 法抽提总 RNA,根据 Takara 反转录试剂盒说明书进行 cDNA 合成,置于 -20°C 保存。

1.3.3 实时荧光定量 PCR:采用 SYBR Green 法进行实时荧光定量 PCR 反应,以 β -actin 为内参基因。PCR 反应条件如下: 95°C 30 min, 95°C 5 min, 60°C 20 min, 72°C 30 min, 循环 40 次。基因相对表达量 = $2^{-[(\text{实验组靶基因} - \text{实验组内参基因}) - (\text{对照组靶基因} - \text{对照组内参基因})]}$ 。

1.4 统计学分析 采用 Graphpad Prism 进行数据分析,以 $\alpha=0.05$ 为检验水准。两组间差异性比较采用 Mann-Whitney 检验;两组间相关性分析采用 Spearman 检验。

2 结果

2.1 PBC 患者 PBMC 中 STING 表达增高 见图 1。与健康对照组相比,STING mRNA 在 PBC 患者 PBMC 中显著增高,差异有统计学意义($U=0.00, P<0.05$)。根据疾病严重程度将 PBC 患者分为 I 期、II 期、III 期和 IV 期,STING mRNA 在 III 期和 IV 期中的表达显著高于 I 期和 II 期,差异有统

计学意义($U=0.00, P<0.05$)。

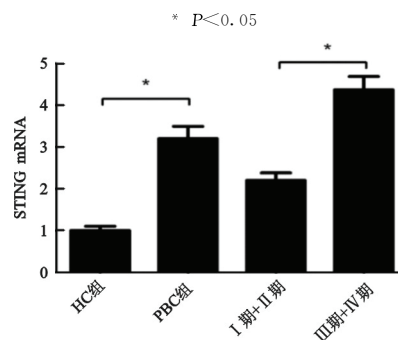


图1 STING mRNA 在 PBC 组与健康对照组(HC 组)之间的表达量

2.2 STING 的表达与患者临床特征的相关性分析 采用 Spearman 分析发现,PBC 患者 PBMC 中 STING mRNA 表达水平与患者 Mayo 评分,GGT 正相关($R=0.45, 0.42, P<0.05$),与 AST, ALT 和 ALP 无相关性($R=0.33, 0.21, 0.27, P>0.05$)。

2.3 治疗有效后 STING 表达下降 见图 2。本研究对 5 例初诊的 PBC 患者进行随访,发现临床治疗有效后,STING mRNA 的表达量显著降低,差异有统计学意义($U=0.00, P<0.05$)。

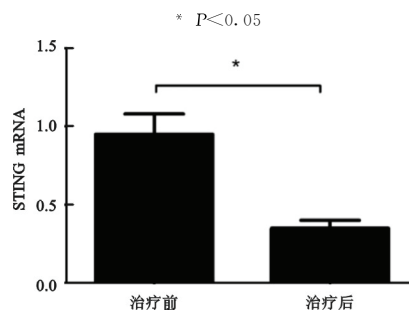


图2 STING mRNA 在 5 例 PBC 患者治疗前后的表达量

3 讨论 PBC 是一种慢性自身免疫性炎症疾病,患者细胞免疫调节紊乱占主导,特别是 T 细胞数量和功能的异常。研究表明,PBC 患者中 Th1/Th2 平衡紊乱,存在向 Th1 细胞反应极化趋势,产生促炎性细胞因子 IFN- γ , TNF- α 等^[6]。IFNs 对免疫系统有重要的调控作用,可以活化诸如巨噬细胞、NK 细胞等天然免疫细胞,也可以促进 T 细胞分化等,是天然免疫反应和适应性免疫反应之间的桥梁,在自身免疫性疾病的发生发展中起到了关键性作用^[7,8]。因此,在健康人体内 IFN 系统必须受到精密调节。

STING(也称 MITA,ERIS 或 MPYS)是一种近年来发现的干扰素刺激基因,其活性的动态调节可以影响天然免疫反应的程度,若过度活化则会破

坏机体免疫耐受,从而诱发肿瘤或者自身免疫性疾病等^[9]。STING 是分子量为 42 KDa 的 DNA 感受器,有三个功能性区域。研究发现 STING 在免疫相关细胞中的表达显著高于非免疫相关细胞,如 HELA 细胞等,提示其在免疫反应中有重要作用。STING 的异常高表达可以使 IRF3 形成二聚体,并进行核转位,产生大量 IFN;STING 缺陷的细胞产生 IFN- β 和其他促炎性细胞因子的能力显著下降^[10]。本研究发现,干扰素刺激基因 STING 水平在 PBC 患者外周血 PBMC 中显著增加,且与患者疾病严重程度相关;在疾病缓解后 STING 的表达下降,提示 STING 可能参与了 PBC 的发病机制。

综上,本研究发现 STING 与 PBC 的疾病严重程度有关,这将为 PBC 的免疫调节治疗提供新的理论依据,但具体机制尚待进一步研究。

参考文献:

- [1] Czul F, Levy C. Novel therapies on primary biliary cirrhosis[J]. *Clinics in Liver Disease*, 2016, 20(1): 113-130.
- [2] Cheung AC, Lapointe-Shaw L, Kowgier M, et al. Combined ursodeoxycholic acid (UDCA) and fenofibrate in primary biliary cholangitis patients with incomplete UDCA response may improve outcomes [J]. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 2016, 43(2): 283-293.
- [3] Galani IE, Koltsida O, Andreacos E. Type III interfer-

ons (IFNs): Emerging Master Regulators of Immunity [J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2015(850): 1-15.

- [4] Lemos H, Huang L, McGaha T, et al. STING, nanoparticles, autoimmune disease and cancer; a novel paradigm for immunotherapy [J]. *Expert Review of Clinical Immunology*, 2015, 11(1): 155-165.
- [5] Woo SR, Corrales L, Gajewski TF. The STING pathway and the T cell-inflamed tumor microenvironment [J]. *Trends Immunology*, 2015, 36(4): 250-256.
- [6] Peng A, Ke P, Zhao R, et al. Elevated circulating CD14^{low} CD16⁺ monocyte subset in primary biliary cirrhosis correlates with liver injury and promotes Th1 polarization [J]. *Clinical and Experimental Medicine*, 2015 [Epub ahead of print].
- [7] Lazear HM, Nice TJ, Diamond MS. Interferon-lambda: Immune Functions at Barrier Surfaces and Beyond [J]. *Immunity*, 2015, 43(1): 15-28.
- [8] McGlasson S, Jury A, Jackson A, et al. Type I interferon dysregulation and neurological disease [J]. *Nature Reviews Neurology*, 2015, 11(9): 515-523.
- [9] Barber GN. STING; infection, inflammation and cancer [J]. *Nature Reviews Immunology*, 2015, 15(12): 760-770.
- [10] Liu X, Wang C. The emerging roles of the STING adaptor protein in immunity and diseases [J]. *Immunology*, 2016, 147(3): 285-291.

收稿日期: 2015-12-18

修回日期: 2016-02-23

(上接 32 页) Westernbolt 检测, 应用价值较高。

总之我们成功预测了 HPV18 E6 的多肽抗原表位, 获得了理想的多肽片段, 同时制备了相应的单克隆抗体, 该抗体可以特异性识别 HPV18 E6 抗原, 为日后该蛋白的研究以及 HPV18 检测方法的建立奠定了基础。

参考文献:

- [1] Tao X, Griffith CC, Zhou X, et al. History of high-risk HPV and Pap test results in a large cohort of patients with invasive cervical carcinoma; experience from the largest women's hospital in China [J]. *Cancer Cytopathol*, 2015, 123(7): 421-427.
- [2] Chakraborty S, Das K, Saha S, et al. Nuclear matrix protein SMAR1 represses c-Fos-mediated HPV18 E6 transcription through alteration of chromatin histone deacetylation [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(42): 29074-29085.
- [3] 王红梅, 陈晔洲, 田晶晶, 等. 新型肿瘤标志物人 PF4 重组表达、活性鉴定及单克隆抗体制备 [J]. *现代检验医学杂志*, 2015, 30(5): 12-16, 21.

Wang HM, Chen YZ, Tian JJ, et al. Recombination, expression, activity identification and monoclonal antibody preparation of the human platelet factor 4 as a new cancer marker [J]. *J Mod Lab Med*, 2015, 30(5):

12-16, 21.

- [4] 许华斌. 安徽省六安市女性 HPV 感染流行病学调查及 HPV 疫苗影响预估 [J]. *现代检验医学杂志*, 2014, 29(4): 52-55.
- Xu HB. Epidemiological investigation on human papillomavirus infection in townswomen of Liu'an, Anhui province and estimating the impact of HPV vaccine [J]. *J Mod Lab Med*, 2014, 29(4): 52-55.
- [5] Wang YY, Li L, Wei S, et al. Human papillomavirus (HPV) infection in women participating in cervical cancer screening from 2006 to 2010 in Shenzhen City, South China [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2013, 14(12): 7483-7487.
- [6] Monroy-Garcia A, Gomez-Lim MA, Weiss-Steider B, et al. A novel HPV 16 L1-based chimeric virus-like particle containing E6 and E7 seroreactive epitopes permits highly specific detection of antibodies in patients with CIN 1 and HPV-16 infection [J]. *Virology Journal*, 2011(8): 59.
- [7] Rubenstein LM, Smith EM, Pawlita M, et al. Human papillomavirus serologic follow-up response and relationship to survival in head and neck cancer; a case-comparison study [J]. *Infect Agent Cancer*, 2011(6): 9.

收稿日期: 2015-11-08

修回日期: 2016-02-19