

原发性胆汁性肝硬化患者外周血 单个核细胞中 Tim-1 表达增高及其意义^{*}

李腾达, 刘挺挺, 吴林洪, 邓顺江, 陈燕, 谷明莉, 邓安梅

(第二军医大学长海医院实验诊断科, 上海 200433)

摘要:目的 检测原发性胆汁性肝硬化(PBC)患者外周血 Tim-1, IFN- γ 和 IL-4 的表达水平, 分析其相关性, 初步探讨 Tim-1 在 PBC 诊治中的临床意义。方法 收集 2013 年 6 月~2015 年 11 月来长海医院就诊的 32 例 PBC 患者和 32 例同期就诊的健康成人的外周血, 分离外周血单个核细胞(PBMC), 反转录酶-聚合酶链锁反应(RT-PCR)法检测 PBMC 中 Tim-1 mRNA, 酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测血浆中 Tim-1 蛋白表达量, 对 Tim-1 和 IFN- γ , IL-4 之间的关系进行 Pearson 相关性分析。结果 患者组和对照组 Tim-1 mRNA 分别为 0.63 ± 0.40 和 0.36 ± 0.32 , 差异具有统计学意义($t=3.005$, $P=0.003$, $P<0.01$)。患者组与对照组 Tim-1 蛋白表达水平分别为 62.72 ± 38.60 和 35.66 ± 30.55 pg/ml ($t=3.11$, $P=0.0028$), IFN- γ 表达水平分别为 200.81 ± 18.06 和 79.23 ± 20.02 pg/ml ($t=25.51$, $P<0.0001$), IL-4 表达水平分别为 99.22 ± 14.67 和 30.18 ± 20.56 pg/ml, 差异均具有统计学意义($t=15.46$, $P<0.0001$)。Pearson 相关分析结果提示 Tim-1 与 IFN- γ 呈负相关($r=-0.552$, $P=0.0011$), 与 IL-4 呈正相关($r=0.652$, $P<0.0001$)。结论 Tim-1 可能参与了 PBC 的发病机制, 是该病潜在的标志物和治疗靶点。

关键词:原发性胆汁性肝硬化; T 细胞免疫球蛋白黏蛋白分子-1; 免疫功能; 干扰素- γ ; 白介素-4

中图分类号:R575.22; R392.11 **文献标志码:**A **文章编号:**1671-7414(2016)04-041-03

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2016.04.010

Increasing Expression of Tim-1 in Peripheral Blood Mononuclear Cell of Patients with Primary Biliary Cirrhosis and Its Significance

LI Teng-da, LIU Ting-ting, WU Lin-hong, DENG Shun-jiang, CHEN Yan, GU Ming-li, DENG An-mei
(Laboratory Diagnostics Division,

Changhai Hospital Affiliated to Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract: **Objective** To test the expression level of Tim-1, IFN- γ , IL-4 in peripheral blood of patients with primary biliary cirrhosis, analyze their correlation and preliminarily explore the clinical significance of Tim-1. **Methods** The peripheral blood were collected from 32 patients with PBC in June, 2013 to December, 2015 and 32 health individuals at the same time. PBMC was separated from the peripheral blood, mRNA expression of Tim-1 in PBMC was measured by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). Tim-1 protein existed in plasma was tested by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Pearson correlation analysis could be done to determine the relationship between Tim-1 and IFN- γ , IL-4. **Results** The mRNA level of Tim-1 in PBMC of patient and control groups were 0.63 ± 0.40 , 0.36 ± 0.32 separately, ($t=3.005$, $P=0.003$) with significant statistical difference ($P<0.01$). Expression levels of Tim-1 protein in patient and control groups were 62.72 ± 38.60 , 35.66 ± 30.55 pg/ml separately ($t=3.11$, $P=0.0028$), expression levels of IFN- γ were 200.81 ± 18.06 , 79.23 ± 20.02 pg/ml separately ($t=25.51$, $P<0.0001$), that of IL-4 were 99.22 ± 14.67 , 30.18 ± 20.56 pg/ml separately ($t=15.46$, $P<0.0001$), the differences were all with statistical meaning. The results of pearson correlation analysis suggested that Tim-1 in plasma was negatively related with IFN- γ ($r=-0.552$, $P=0.0011$) and positively with IL-4 ($r=0.652$, $P<0.0001$). **Conclusion** Tim-1 may be involved in pathogenesis of PBC, it can be the potential biomarker and therapeutic target of this disease.

Keywords: primary biliary cirrhosis; Tim-1; immunity function; IFN- γ ; IL-4

* 基金项目: 973 计划(2013CB531606), 国家自然科学基金(81471605, 81401358, 81501397, 31500721, 81501398, 81302579, 81273282, 81202353), 上海申康基金(SHDC22014014), 上海教委基金(D14017), 军队科研基金(BWS14J023, 12MA056, 15ZD009), 美捷登基金(MJR20150019)。

作者简介: 李腾达(1990—), 女, 在读硕士研究生, 主要从事感染和自身免疫研究, Tel: 18302192042, E-mail: tengdali@smmu.edu.cn。

刘挺挺(1989—), 女, 在读硕士研究生, 主要从事感染免疫和自免研究, E-mail: ltt2109@163.com, 共同第一作者。

通讯作者: 邓安梅, 女, 教授, E-mail: amdeng70@163.com。

谷明莉, 女, 检验技师, E-mail: mingligu@126.com, 共同通讯作者。

原发性胆汁性肝硬化(primary biliary cirrhosis, PBC)是一种慢性自身免疫性肝病,以小叶汇管区淋巴细胞浸润、小胆管特异性破坏、血清特征性抗线粒体抗体(AMA)为特征^[1]。其免疫活动主要受两种 CD4⁺ Th 细胞调节:Th1 和 Th2 细胞^[2]。Th1 细胞分泌 IL-2, IFN- γ 等细胞因子,辅助细胞毒性 T 细胞分化、介导细胞免疫应答;Th2 细胞分泌 IL-4, IL-13 等^[2],激活 B 细胞增殖分化为浆细胞,促进其分泌大量自身免疫性抗体,导致自身胆管破坏和慢性胆管炎的形成^[3]。

T 细胞免疫球蛋白黏蛋白分子(T-cell immunoglobulin and mucin, Tim)基因家族位于染色体 5q33.2,包括 Tim-1, Tim-3 和 Tim-4 三种基因型,主要编码细胞表面糖蛋白^[4,5]。Tim-1 蛋白表达于 Th2 细胞表面,参与 Th2 细胞介导的免疫调节活动^[4,5]。近来研究发现 Tim-1 能刺激 T 细胞扩展、影响其效应分子的功能。低亲和力的抗 Tim-1 抗体能提高 Th2 反应,高亲和力的抗 Tim-1 抗体能提高 Th1 型细胞因子如 IFN- γ 的表达,这表明 Tim-1 可能会影响 Th1 和 Th2 细胞介导的免疫反应,由于 Th1/Th2 细胞在自身免疫性疾病中有重要作用,故 Tim-1 亦可能和此类疾病相关^[4,5]。本文假设 PBC 患者中 Tim-1 表达出现异常,通过分析 Tim-1 在 PBC 患者外周血单个核细胞中的表达水平及其与 IL-4, IFN- γ 之间的相关性,初步了解其在 PBC 发病过程中的作用,为临床诊疗及相关机制的研究提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 研究对象 32 例 PBC 患者为 2013 年 6 月~2015 年 11 月在我院风湿科治疗的病人,其中男性 6 例,女性 26 例,平均年龄 43.8 ± 5.3 岁。患者纳入标准:①血碱性磷酸酶(ALP)升高;②线粒体抗体(AMA)阳性;③非化脓性破坏性胆管炎及小叶间胆管破坏的组织学证据。排除标准:①其他原因导致的肝病如酒精性、药物性肝病;②近一个月内有感染病史。健康对照组为随机抽取的同期来我院体检的 32 例健康个体,男性 7 例,女性 25 例,平均年龄 42.7 ± 4.6 岁。本研究经第二军医大学长海医院医学科研伦理委员会批准,所有受试对象均签署知情同意书。

1.2 试剂与仪器 淋巴细胞分离液 ficoll 400 * (美国 sigma-aldrich 公司), TRIZOL 试剂(美国 Invitrogen 公司),反转录试剂盒(Takara 公司),实时定量 PCR 引物和试剂(美国 Applied Biosystems 公司),ELISA 试剂盒(美国 eBioscience 公司),生物分光光度计(德国 Eppendorf 公司),721 型紫外分光光度计(美国 Beckman 公司)。

1.3 方法

1.3.1 血浆收集及 PBMC 的分离:抽取上述 32 例 PBC 患者和 32 例健康对照组无菌外周血 2~3 ml, EDTA-K₂ 抗凝, 3 000 r/min 离心 10 min, 收集血浆, 冻存于 -80℃ 待用。用 PBS 稀释外周血后加 ficoll, 离心得到 PBMC。

1.3.2 mRNA 抽提及 RT-PCR: 在无酶条件下, 根据 TRIZOL 试剂盒操作步骤提取 PBMC 总 RNA, 用反转录试剂盒(Takara 公司)对 mRNA 进行反转录得到 cDNA。以 cDNA 为模板, 反应体系为 10 μ l, β -actin 为内参照基因, 设定平行对照组, 采用相对定量分析。

1.3.3 ELISA 检测外周血血浆 Tim-1, IL-4 和 IFN- γ 水平: 从 -80℃ 冰箱取出血浆复融后用 ELISA 试剂盒检测血浆 Tim-1, IL-4 和 IFN- γ 表达水平。

1.4 统计学分析 实验组和对照组数据的比较采用两独立样本 *t* 检验, Tim-1 与 IL-4, IFN- γ 相关性以 Pearson 相关系数表示, 检验水准为 0.05。统计软件为 IBM SPSS Statistics 21.0。

2 结果

2.1 两组间 Tim-1 表达水平的比较 患者组与对照组受试对象具有可比性;其年龄、性别差异无统计学意义($P > 0.05$)。患者组与对照组 Tim-1 mRNA 分别为 0.63 ± 0.40 , 0.36 ± 0.32 ($t = 3.005$, $P = 0.0038$);血浆 Tim-1 蛋白水平分别为 62.72 ± 38.60 , 35.66 ± 30.55 pg/ml ($t = 3.11$, $P = 0.0028$), 且患者组表达水平平均高于对照组。

2.2 两组间 IFN- γ , IL-4 表达水平的比较 患者组和对照组 IFN- γ 表达水平分别为 200.81 ± 18.06 , 79.23 ± 20.02 pg/ml ($t = 25.51$, $P < 0.0001$), IL-4 表达水平分别为 99.22 ± 14.67 , 30.18 ± 20.56 pg/ml ($t = 15.46$, $P < 0.0001$), 按照 $\alpha = 0.05$ 的水准, 两组间 IFN- γ , IL-4 表达水平的差异具有统计学意义, 且患者组水平平均高于对照组。

2.3 患者组 Tim-1 蛋白与 IFN- γ , IL-4 表达水平的 Pearson 相关性分析 见图 1。两计量变量线性相关性分析显示, 血浆中 Tim-1 蛋白与 IFN- γ 表达呈负相关, 与 IL-4 表达水平呈正相关, 差异具有统计学意义($P < 0.01$)。

3 讨论 PBC 好发于中老年女性, 是一种自身免疫性胆汁淤积性肝病^[1]。参与该病形成的 CD4⁺ 辅助性 T 细胞包括 Th1 和 Th2 细胞。Th1 主要分泌 IFN- γ , IL-5 等细胞因子^[3], Limongi^[6] 认为 IFN- γ 及其诱导蛋白与 PBC 疾病严重程度相关。Th2 主要分泌 IL-4, IL-10 等细胞因子, 可促使 B 细胞分化为浆细胞, 释放特异性抗体, 在系统性自

身免疫疾病的病理生理形成方面起到了关键作用^[2,3]。

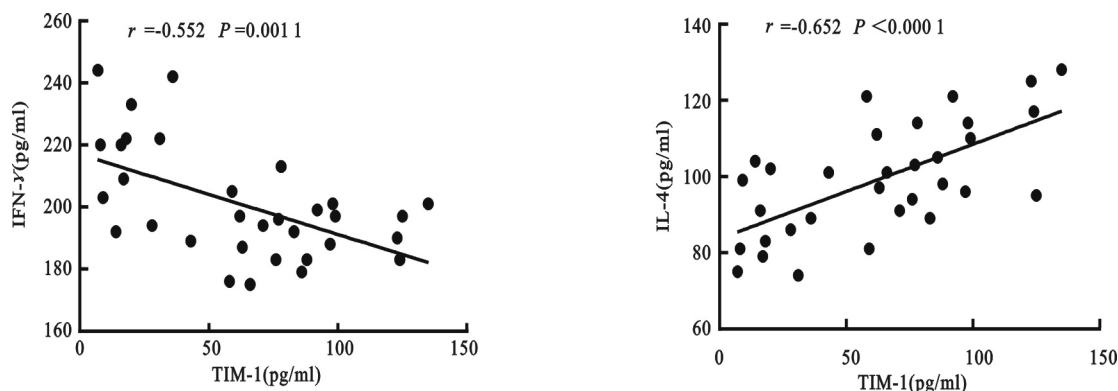


图1 PBC患者 Tim-1 与 IFN- γ , IL-4 的相关性

Tim-1 最初被认为是一种肾脏损伤分子和甲肝病毒细胞受体(HAVCR),其编码的蛋白受体选择性地表达于 Th2 细胞表面^[4]。Xu 等^[7]发现 Tim-1 基因的多态性与类风湿性关节炎疾病易感性相关;Zhang 等^[4]研究表明在原发性血小板减少性紫癜疾病活动期 PBMC 中 Tim-3/Tim-1 水平下降,其可能与疾病形成相关,但值得注意的是目前对于 Tim-1, Tim-3 在 PBC 中的作用机制尚未完全阐明。我们课题组在前期实验已证明 PBC 患者外周血单个核细胞中 Tim-3 mRNA 表达增高且具临床价值^[8]。本实验研究发现,PBC 患者 PBMC 中 Tim-1 的 mRNA 水平和血浆中 Tim-1 蛋白表达量在实验组均高于对照组,且与 IFN- γ 呈负相关,与 IL-4 呈正相关。IFN- γ 代表 Th1 细胞活性,主要介导细胞免疫应答;IL-4 代表 Th2 细胞活性,主要介导体液免疫^[3],正常情况下 Th1 和 Th2 细胞通过分泌细胞因子交互调节,相互抑制,在体内处于动态平衡^[3]。研究发现 Tim-1 配体能促进 T 细胞扩增和 Th2 细胞 IL-4 的生产^[4],Tim-1 在刚刚激活的细胞中显著上升,随着时间的推移,其会丧失在 Th1 细胞上的表达,却能维持在 Th2 细胞中的表达^[9,10],本实验表明 PBC 病人有相对提高的 Tim-1 mRNA 水平,且其蛋白表达量与 IFN- γ , IL-4 具有相关性,提示 Tim-1 可能参与了 PBC 的发病机制,具有临床意义。但本实验中 PBC 患者例数和检测的 Th1/Th2 相关细胞因子较少,后期需进一步探索和研究。

参考文献:

- [1] Carey EJ, Ali AH, Lindor KD. Primary biliary cirrhosis[J]. Lancet, 2015, 386(10003): 1565-1575.
- [2] Fenoglio D, Bernuzzi F, Battaglia F, et al. Th17 and regulatory T lymphocytes in primary biliary cirrhosis and systemic sclerosis as models of autoimmune fibrotic diseases[J]. Autoimmunity Reviews, 2012, 12(2): 300-304.
- [3] Baier JL, Mattner J. Mechanisms of autoimmune liver disease[J]. Discovery Medicine, 2014(18): 255-263.
- [4] Zhang XM, Shan NN, Sun M, et al. Imbalanced expression of human Tim-1 and Tim-3 in peripheral blood mononuclear cells from immune thrombocytopenia patients[J]. International Immunopharmacology, 2014, 19(1): 1-4.
- [5] Li WX, Chen GM, Yuan H, et al. Polymorphisms of the TIM-1 and TIM-3 genes are not associated with systemic lupus erythematosus in a Chinese population[J]. Mutagenesis, 2011, 26(4): 507-511.
- [6] Limongi F. Th1 cytokines and chemokines in primary biliary cirrhosis[J]. La Clinica Terapeutica, 2015, 166(2): e122-125.
- [7] Xu JR, Yang Y, Liu XM, et al. Polymorphisms of the TIM-1 gene are associated with rheumatoid arthritis in the Chinese Hui minority ethnic population[J]. Genet Mol Res, 2012, 11(1): 61-69.
- [8] 刘晓, 黄元兰, 胡志德, 等. 原发性胆汁性肝硬化患者外周血单个核细胞中 Tim-3 mRNA 表达增高及其意义[J]. 现代免疫学, 2012, 32(4): 299-302.
- [9] Liu X, Huang YL, Hu ZD, et al. Increased expression of Tim-3 mRNA in peripheral blood mononuclear cells of patients with primary biliary cirrhosis and its clinical significance[J]. Current Immunology, 2012, 32(4): 299-302.
- [9] Rennert PD. Novel roles for TIM-1 in immunity and infection[J]. Immunology Letters, 2011, 141(1): 28-35.
- [10] Li Z, Ju Z, Frieri M. The T-cell immunoglobulin and mucin domain(Tim) gene family in asthma, allergy, and autoimmunity[J]. Allergy Asthma Pro, 2013, 34(1): e21-26.

收稿日期: 2016-04-28

修回日期: 2016-05-19