

# 慢加急性肝衰竭患者Toll样受体3触发后DC分泌细胞因子的变化

李宁, 陈明泉, 李谦, 朱梦琪, 郑建铭, 王新宇, 施光峰(复旦大学附属华山医院 感染科, 上海200040)

**摘要:** 目的 探讨慢加急性肝衰竭(ACLF)患者外周血单核细胞衍生的树突状细胞(MoDC)上TLR3触发后细胞因子的分泌情况。方法 选择ACLF患者60例, 慢性乙型肝炎(CHB)患者40例, 20例健康者作对照组(NC组), 取其抗凝全血, 通过密度梯度法离心及免疫磁珠阳性选择法分离单核细胞, 体外诱导培养为MoDC, 经poly(I:C)刺激后, 实时荧光定量PCR检测TLR3及核因子 $\kappa$ B和干扰素调节因子3的表达, 液相蛋白流式检测促炎性因子IL-6、IL-8、IL-10、IL-12p70、IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 的分泌水平, 均数间两两比较采用 $t$ 检验。结果 poly(I:C)刺激后, ACLF组患者NF- $\kappa$ B mRNA显著高于CHB组和NC组( $P < 0.01$ ), 而其IRF3 mRNA低于CHB和NC组( $P < 0.01$ )。3组研究对象MoDC分泌的IL-6及TNF- $\alpha$ 差异有统计学意义( $P < 0.005$ ), 其分泌水平为ACLF组 $>$  CHB组 $>$  NC组。分泌的IL-10在ACLF组低于CHB组( $P = 0.021$ ), 但与NC组差异无统计学意义。IL-12p70的分泌水平在ACLF组显著低于CHB组和NC组( $P < 0.001$ )。IL-8分泌水平为ACLF组 $<$  CHB组 $<$  NC组( $P < 0.005$ )。IL-1 $\beta$ 的分泌水平在ACLF组与NC组( $P = 0.001$ )、CHB组与NC组( $P = 0.007$ )间差异均有显著统计学意义。结论 ACLF患者单核细胞来源的树突状细胞TLR3信号转导通路受损, 促炎性细胞因子分泌异常, 可能是肝细胞免疫功能严重受损的原因之一。

**关键词:** Toll样受体3; 肝功能衰竭, 急性; 细胞因子类

## Expression of cytokines in monocyte-derived dendritic cells after Toll like receptor 3 being triggered in patients with hepatitis B related acute-on-chronic liver failure

LI Ning, CHEN Ming-quan, LI Qian, ZHU Meng-qi, ZHENG Jian-ming, WANG Xin-yu, SHI Guang-feng (Department of Infectious Diseases, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China)

**Abstract: Objective** To investigate the expression of cytokines in monocyte-derived dendritic cells (MoDC) after Toll like receptor (TLR) 3 being triggered in acute-on-chronic liver failure (ACLF) patients. **Methods** Peripheral blood was collected from 60 ACLF patients, 40 chronic hepatitis B (CHB) patients, and 20 healthy individuals who are served as normal controls (NC). Purified monocytes were isolated by combination of Histopaque-1.077 and CD14 Microbeads. MoDCs were induced from CD14<sup>+</sup> monocytes and stimulated such cells in vitro with poly (I : C). TLR3, NF- $\kappa$ B and IRF3 were detected by real-time PCR. Supernatant fluids from the cultures were analyzed for levels of 6 different pro-inflammatory cytokines, interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, and TNF- $\alpha$  by flowcytomix measurements. **Results** With the progress of the disease, the expression of NF- $\kappa$ B was significantly higher in turn, while the level of IRF3 decreased, among three groups. The amounts of IL-10 produced were lower in ACLF than CHB ( $P = 0.021$ ), but this difference did not achieve statistical significance ( $P < 0.05$ ) compared to NC. The production of IL-12p70 in MoDC of ACLF was extremely decreased than other two groups ( $P < 0.001$ ). IL-8 levels were significantly lower in ACLF than in CHB. While, significantly lower amounts were found of IL-8 on MoDCs in CHB than in NC ( $P < 0.005$ ). IL-1 $\beta$  levels were lower in ACLF than in NC ( $P = 0.001$ ). Expression of IL-1 $\beta$  was also

lower in CHB than in NC ( $P = 0.007$ ). **Conclusions** The results suggest impaired TLR3 pathway signaling in MoDC from patients with ACLF, resulting in secretion of selective pro-inflammatory cytokines integral to the inflammatory response that may be critical in the pathogenesis of ACLF.

**Key words:** Toll-like receptor 3; Liver failure, acute; Cytokines

树突状细胞(DC)是专职的抗原提呈细胞,是连接天然免疫与获得性免疫的桥梁,是平衡免疫应答与免疫耐受的关键。Toll样受体(TLR)是天然免疫系统中非常重要的一类模式识别受体,TLR3大量分布于树突状细胞,能够识别病毒及其复制中间产物,TLR3触发后能促进核因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)和干扰素调节因子3(IRF3)入核,继而分泌大量的促炎性细胞因子及干扰素- $\beta$ (IFN- $\beta$ ),可能与HBV感染的临床结局及预后相关。本研究旨在观察慢加急性肝衰竭(acute-on-chronic liver failure, ACLF)患者外周血单核细胞衍生的树突状细胞TLR3触发后信号转导通路的变化,探讨TLR3信号转导通路的改变在ACLF发病机制中的作用。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选择复旦大学附属华山医院和上海市公共卫生中心2008年2月~2009年9月住院以及门诊就诊病例。ACLF患者60例,其中男性51例,女性9例,年龄14~80岁,平均年龄40.9岁。疾病诊断符合2006年《肝衰竭诊疗指南》及《亚太地区慢加急性肝衰竭诊断共识》<sup>[1,2]</sup>。慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)患者40例,其中男性27例,女性13例,年龄21~67岁,平均年龄34岁,HBsAg阳性至少6个月。疾病诊断符合2005年《慢性乙型肝炎防治指南》执行<sup>[3]</sup>。排除并发HCV、HDV、HIV等病毒感染,自身免疫性肝炎或其他活动性肝病;排除有严重的活动性疾病(心、脑、肾病、糖尿病、神经精神疾病等);排除有酗酒、吸毒、怀孕、药物滥用者;入组前6个月内使用核苷(酸)类似物、干扰素等其他免疫调节剂、细胞毒性药物、免疫抑制剂者除外。选择同期健康体检者20例为对照组,其中男性14例,女性6例,年龄23~49岁,平均32岁。入组人员均签署知情同意书,试验符合复旦大学伦理委

员会规定。

**1.2 仪器与试剂** 流式细胞仪(LSR II)为BD公司生产,酶标仪为Spectra MAS190,人淋巴细胞分离液购自挪威AXIS-SHIELD PoCASA公司,细胞磁性分离系统及CD14阳性免疫磁珠购自德国Miltenyi Biotec公司,人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)和人白细胞介素4(hIL-4)购自英国Pepro Tech公司,聚肌胞苷酸(Poly I:C)购自美国Sigma公司,液相蛋白细胞因子检测试剂购自Bender Med Systems公司。

## 1.3 方法

**1.3.1 人外周血单核细胞的分离及树突状细胞的体外诱导分化培养** 依照本室体外分离培养DCs的方法<sup>[4]</sup>,于培养第6天加入浓度为50  $\mu$ g/ml的Poly(I:C),于刺激后48小时收集细胞及培养上清液。将细胞培养上清液保存于-80℃低温冰箱,以备检测细胞因子。

**1.3.2 Real time PCR检测** 采用Invitrogen公司的TRizol试剂,按照说明书抽提MoDC的总RNA,经反转录合成cDNA;以cDNA为模板进行实时荧光定量PCR反应,反应体系为SYBR<sup>®</sup> qPCR Mix 7.5  $\mu$ l, ROX 0.3  $\mu$ l, NF- $\kappa$ B p50上下游引物各1  $\mu$ l, cDNA 1  $\mu$ l,加水至总体积15  $\mu$ l。PCR扩增条件:95℃ 1分钟,95℃ 15秒,60℃ 15秒,72℃ 30秒,40个循环。NF- $\kappa$ B的上下游引物5'-ATCTGTACCAGACGCCCTTG-3',下游引物5'-AGTGCTGCCTTTTGTGCTT-3',长度187 bp。IRF3的上下游引物5'-AAGGACAAGGAAGGAGGCG-3',下游引物5'-AGAGGGCATAGCGTGGTGA-3',长度97 bp。内参 $\beta$ -actin的上下游引物5'-GGGAAATCGTGCGTGACAT-3',下游引物5'-GTCAGGCAGCTCGTAGCTCTT-3',长度116 bp。按照 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算IRF3和NF- $\kappa$ B的相对量。

**1.3.3 液相蛋白流式检测** 依据Bender MedSystems公司液相蛋白检测试剂说明书,当检测微球与收集的培养上清反应后,微球可捕捉到与其包被抗体相应的抗原,再与荧光素标记的第二抗体(检测抗体),形成微球-捕捉抗体-待测抗原-检测抗体的复合物,经流式细胞仪检测微球所发射的两种不同的荧光信号,可以定量分析液体标本中IL-6、IL-8、IL-10、IL-12 p70、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 的含量。

**1.4 统计学处理** 用SPSS 11.0版软件系统分析,用 $\bar{x} \pm s$ 表示,所有数据均进行正态分布检验,两组间的比较采用 $t$ 检验,三组间的比较采用One-Way ANOVA分析法,并进行方差齐性检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 DC的TLR3信号通路上关键转录因子的表达** ACLF组NF- $\kappa$ B的表达是NC组的2.05倍( $P < 0.001$ ),是CHB组的2.23倍( $P = 0.02$ ),而NF- $\kappa$ B表达增强应导致促炎性细胞因子基因的转录激活增加;与NF- $\kappa$ B趋势相反,IRF3的表达在ACLF组最低,较NC组下降79%,较CHB组下降37.4%,见图1。

**2.2 MoDC分泌促炎性因子水平** 三组研究对象MoDC分泌的IL-6及TNF- $\alpha$ 均存在统计学差异( $P < 0.005$ ),其分泌水平为ACLF组 $>$  CHB组 $>$

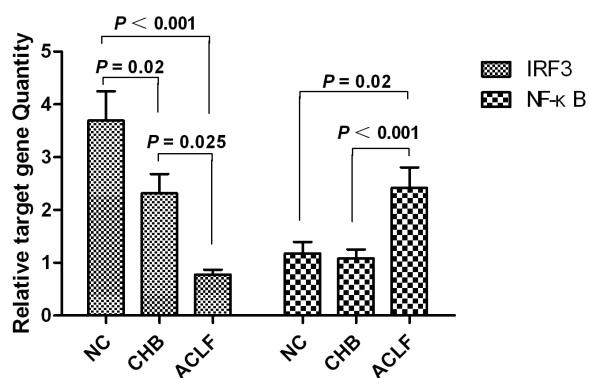


图1 TLR3信号通路上转录因子的表达

表1 各组poly(I:C)刺激后MoDC分泌细胞因子的水平比较(pg/ml,  $\bar{x} \pm s$ )

	IL-6	TNF- $\alpha$	IL-1 $\beta$	IL-8	IL-12 p70	IL-10
ACLF组	1551 $\pm$ 161 <sup>ab</sup>	19263.61 $\pm$ 1110.58 <sup>ab</sup>	25.12 $\pm$ 1.05 <sup>a</sup>	2959.86 $\pm$ 415.58 <sup>ab</sup>	29 $\pm$ 1.03 <sup>ab</sup>	30.62 $\pm$ 2.97 <sup>b</sup>
CHB组	1081.64 $\pm$ 82.5 <sup>a</sup>	12627.67 $\pm$ 924.33 <sup>a</sup>	27.75 $\pm$ 2.49 <sup>a</sup>	4181.66 $\pm$ 413.35 <sup>a</sup>	36.44 $\pm$ 2.66	59.44 $\pm$ 10.37
NC组	711.64 $\pm$ 61.6	7371.01 $\pm$ 597.66	40.55 $\pm$ 4.72	5893.53 $\pm$ 377.53	39 $\pm$ 0.89	51.66 $\pm$ 9.72

注: <sup>a</sup>与NC组比较 $P < 0.05$ , <sup>b</sup>与CHB组比较 $P < 0.05$

NC组。ACLF组MoDC分泌IL-10水平低于CHB组( $P = 0.021$ ),但与NC组相比差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。ACLF组IL-12p70的分泌水平显著低于CHB组和NC组( $P < 0.001$ ),但CHB组IL-12p70的分泌水平与NC组相比,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。IL-8分泌水平为ACLF组 $<$  CHB组 $<$  NC组( $P < 0.005$ )。ACLF组IL-1 $\beta$ 的分泌水平分别与NC组( $P = 0.001$ )、CHB组及NC组( $P = 0.007$ )相比,差异均有显著统计学意义,ACLF组IL-1 $\beta$ 的分泌水平与CHB组相比,差异无统计学意义( $P = 0.558$ ),见表1。

## 3 讨论

ACLF是一类病情凶险、临床表现复杂、病死率高、严重危害人们健康的肝脏疾病,其发病机制复杂,多数学者认为免疫损伤导致了肝细胞损伤,进而引起肝脏短期内出现大块及亚大块坏死,但对其天然免疫发病机制知之甚少。TLR是1997年新近发现的天然免疫系统中的模式识别受体,主要表达于DC上,构成机体抵御病原体入侵的第一道屏障。

当前,TLR在HBV感染和疾病进展中的意义日益突出。Isogawa等<sup>[5]</sup>发现除TLR2外的其他所有TLR配体均在24小时内以IFN- $\alpha/\beta$ 依赖方式抑制HBV复制。Wu等<sup>[6,7]</sup>发现TLR3、TLR4活化的KCs和TLR3活化的LSECs具有抑制HBV复制的能力,并证实了HBV能抑制TLR诱发的肝细胞抗病毒活性。在针对HBsAg阳性CHB患者的研究中发现,HBV前核心蛋白能下调CHB患者TLR2的表达,从而减少TNF- $\alpha$ 等细胞因子的生成<sup>[8]</sup>。袁正宏等<sup>[9]</sup>发现CHB患者PBMC上TLR2信号通路受损,且TLR2的下调与HBV基因C型相关。白雪帆等<sup>[10]</sup>观察到肝硬化患者PBMC上TLR4的表达与Treg细胞比例呈正相关,TLR2的表达与HBV病毒载量呈负相关。谢青等<sup>[11]</sup>发现HBV感染通过抑制TLR9的表达导致

pDC数量减少、功能缺陷。陈智等<sup>[12]</sup>发现CHB患者PBMC上TLR7和TLR9表达降低且功能受损,导致HBV持续感染与肝炎的慢性化。

上述研究分别从动物模型及人类临床样本层面探讨了TLR与HBV感染的密切关系,但多集中于TLR2、TLR4、TLR7、TLR9的研究,TLR3的研究甚少,且针对位于免疫网络枢纽的DC研究不多。TLR3能识别病毒基因组及病毒复制的中间产物dsRNA,参与抗病毒免疫。本课题组前期研究发现,CHB患者外周血DC上存在TLR3表达下调,可能是HBV感染慢性化的重要原因<sup>[13,14]</sup>,并发现慢性乙型肝炎患者单核细胞来源的树突状细胞功能障碍,经TLR3触发后IFN- $\beta$ 分泌水平显著低于健康人群<sup>[15]</sup>。

TLR3信号转导属于MyD88非依赖途径,能引起NF- $\kappa$ B的活化和IRF-3的核转位,调控促炎性细胞因子(IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-12、IL-10、IL-8、IL-1 $\beta$ )和I型干扰素的表达。进一步检测TLR3细胞通路下游的转录因子IRF3和NF- $\kappa$ B的表达,发现CHB组IRF3的表达低于NC组,ACLF组IRF3降低较CHB组更为显著,这可以解释前期研究发现的ACLF组MoDC经TLR3触发后IFN- $\beta$ 分泌水平显著降低<sup>[4]</sup>;而NF- $\kappa$ B在ACLF组显著高于CHB组及NC组,但其升高是否会影响促炎性因子的释放?

IL-6为一种介导炎性反应、具有多重免疫调节功能的细胞因子,对T杀伤细胞有促进作用;与其他细胞因子协同招募中性粒细胞,促进各种细胞释放炎性因子及细胞增殖,并促进肝细胞凋亡、坏死。TNF- $\alpha$ 主要由激活的单核/巨噬细胞产生,是炎性反应和特异性免疫应答的重要连接纽带<sup>[16,17]</sup>。在重型肝炎中,TNF- $\alpha$ 与肝细胞TNF-R1结合,通过一系列的信号转导,将凋亡信号向细胞内部传递,引起肝脏细胞大面积坏死<sup>[18]</sup>,并诱导肝脏发生非特异性超敏反应,激活多种细胞因子参与肝脏的炎性反应和组织损伤。

IL-12是Th1型细胞因子,能有效提高机体的细胞免疫防御功能,抵抗胞内病原微生物感染<sup>[19,20]</sup>。有学者将HBV颗粒、HBsAg与健康人

群mDC共培养,发现能抑制mDC成熟,分泌IL-12p70及刺激T细胞增殖能力低下,提示HBV能引起mDC功能异常,逃逸机体的免疫清除<sup>[21]</sup>。IL-10主要由Th2细胞产生,除了能一定程度地促进CTL诱导、增强B细胞增殖分化外,其主要生物学活性是免疫抑制作用。IL-1 $\beta$ 能增强Th1细胞的优势反应,与Th1/Th2细胞因子共同影响着机体对病毒的清除、组织损伤和慢性化过程。IL-8趋化并激活中性粒细胞,促进中性粒细胞的溶酶体酶活化和吞噬作用,对嗜碱粒细胞和T细胞也有一定的趋化作用。

本研究结果显示,IL-6和TNF- $\alpha$ 是机体炎性反应的重要介质,重型肝炎患者IL-6和TNF- $\alpha$ 显著增高,这与慢性重型乙型肝炎患者肝细胞内存在严重免疫损伤的病理表现相符,可能是导致肝细胞严重免疫损伤的原因之一。IL-12、IL-10、IL-1 $\beta$ 、IL-8等细胞因子和趋化因子主要与调节Th1/Th2免疫平衡相关,本研究中ACLF组和CHB组患者上述细胞因子分泌异常,导致细胞免疫低下,不能有效清除HBV,可能是HBV持续感染的原因之一。

#### 参考文献

- [1] 中华医学会感染病学分会肝衰竭与人工肝学组,中华医学会肝病学会重型肝病与人工肝学组. 肝衰竭诊疗指南[J]. 中华肝脏病杂志,2006,14:643-646.
- [2] Sarin SK, Kumar A, Almeida JA, et al. Acute-on-chronic liver failure: consensus recommendations of the Asian Pacific Association for the study of the liver (APASL)[J]. Hepatol Int,2009,3:269-282.
- [3] 中华医学会肝病学会,中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南[J]. 中华传染病杂志,2005,23:421-431.
- [4] Li N, Li Q, Qian ZP, et al. Impaired TLR3/IFN-beta signaling in monocyte-derived dendritic cells from patients with acute-on-chronic hepatitis B liver failure: relevance to the severity of liver damage[J]. Biochem Biophys Res Commun,2009,390:630-635.
- [5] Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses[J]. Nat Immunol,2004,5:987-995.
- [6] Wu J, Lu MJ, Meng ZJ, et al. Toll-like receptor-mediated control of HBV replication by nonparenchymal liver cells in mice[J]. Hepatology,2007,46:1769-1778.
- [7] Wu J, Meng ZJ, Jiang M, et al. Hepatitis B virus suppresses toll-like receptor-mediated innate immune responses in murine parenchymal and nonparenchymal liver cells[J]. Hepatology,2009,49:1132-1140.
- [8] Visvanathan K, Skinner NA, Thompson AJV, et al. Regulation of toll-like receptor-2 expression in chronic hepatitis B by the



- precure protein[J]. *Hepatology*,2007,45:102-110.
- [9] Chen Z, Cheng YM, Xu YF, et al. Expression profiles and function of Toll-like receptors 2 and 4 in peripheral blood mononuclear cells of chronic hepatitis B patients[J]. *Clinical Immunology*,2008,128:400-408.
- [10] Lian JQ, Wang XQ, Zhang Y, et al. Correlation of circulating TLR2/4 expression with CD3(+)/4(+)/8(+) T cells and treg cells in HBV-related liver cirrhosis[J]. *Viral Immunology*,2009,22:301-308.
- [11] Xie Q, Shen HC, Jia NN, et al. Patients with chronic hepatitis B infection display deficiency of plasmacytoid dendritic cells with reduced expression of TLR9[J]. *Microbes and Infection*,2009,11:515-523.
- [12] Xu N, Yao HP, Sun Z, et al. Toll-like receptor 7 and 9 expression in peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic hepatitis B and related hepatocellular carcinoma[J]. *Acta Pharmacologica Sinica*,2008,29:239-244.
- [13] 陈明泉, 施光峰, 卢清, 等. 慢性乙型肝炎患者外周血树突状细胞上Toll样受体的表达变化[J]. *中华传染病杂志*,2007,12:719-722.
- [14] 李谦, 陈明泉, 李宁, 等. 聚肌胞刺激后慢乙肝患者树突状细胞内Toll样受体3的表达变化[J]. *中华传染病杂志*,2009,27:733-737.
- [15] 张玉杰, 施光峰, 李谦, 等. 慢乙肝患者树突状细胞Toll样受体3触发后I型干扰素表达的研究[J]. *中华传染病杂志*,2009,27:343-347.
- [16] Watts TH. Tnf/tnfr family members in costimulation of T cell responses[J]. *Annual Review of Immunology*,2005,23:23-68.
- [17] Jin XL, Zimmers TA, Perez EA, et al. Paradoxical effects of short- and long-term interleukin-6 exposure on liver injury and repair[J]. *Hepatology*,2006,43:474-484.
- [18] Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis[J]. *Immunity*,1995,3:673-682.
- [19] Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity[J]. *Nature Reviews Immunology*,2003,3:133-146.
- [20] O'Garra, Murphy KM. From IL-10 to IL-12: how pathogens and their products stimulate APCs to induce T(H)1 development[J]. *Nature Immunology*,2009,10:929-932.
- [21] Cavanaugh VJ, Guidotti LG, and Chisari FV. Interleukin-12 inhibits hepatitis B virus replication in transgenic mice[J]. *Journal of Virology*,1997,71:3236-3243.

收稿日期: 2011-12-09

## •消息•

## 《中国医学前沿杂志(电子版)》征稿启事

《中国医学前沿杂志(电子版)》为卫生部主管、人民卫生出版社主办、北京大学第一医院承办的一本集纸版、光盘版、网络版三位一体的国家级电子期刊,创刊于2008年9月,由北京大学第一医院霍勇教授担任主编,现为月刊。标准刊号:ISSN 1674-7372, CN 11-9298/R。

本刊常设栏目:述评、专题笔谈、专家论坛、临床/基础研究、指南共识、病例报告、继续教育园地、百家讲坛(视频)、会议纪要、医海拾零等。本刊内容主要包括医学各领域相关流行病学、预防、诊断、治疗等临床及基础研究的最新进展及实践经验,欢迎国内外专家、同行踊跃投稿。

编辑部联系方式:

地址:北京市朝阳区西大望路15号A901室

邮编:100022

Email: yixueqianyan@sina.com

电话: 010-87723176