

· 论著 ·

单免疫球蛋白-白介素1受体蛋白在慢性乙肝患者中的表达水平变化及临床意义研究*

吴 刚 叶晓玲 张 宇 石 馨*
九江市第一人民医院肝病科 (江西 九江 332000)

【摘要】目的 分析慢性乙型肝炎(CHB)患者中单免疫球蛋白-白介素1受体蛋白(SIGIRR)的表达水平变化和临床意义。**方法** 选取2022.01-2022.12本院收治的CHB患者60例设为观察组,另选取同时段内本院健康体检人群50例设为对照组,两组测定外周血单个核细胞(PBMC)中SIGIRR mRNA表达、SIGIRR+细胞频率及CD3+SIGIRR+T淋巴细胞比率;外周血Th1和Treg细胞频率;血清干扰素- γ (IFN- γ)、白介素-10(IL-10)、白介素-6(IL-6)、白介素-18(IL-18)及肿瘤坏死因子- α (TNF- α)浓度;PBMC中Toll样受体4(TLR4)的mRNA水平;NK细胞表面NK细胞受体2A抗体(NKG2A)表达,比较两组各项指标差异,并分析SIGIRR和各项指标的相关性。**结果** 观察组PBMC中SIGIRR mRNA表达、SIGIRR+细胞频率及CD3+SIGIRR+T淋巴细胞比率低于对照组($P<0.05$),TLR4的mRNA高于对照组($P<0.05$)。观察组外周血Th1和Treg细胞频率高于对照组($P<0.05$)。观察组血清IFN- γ 、IL-10及IL-18浓度低于对照组($P<0.05$),IL-6及TNF- α 高于对照组($P<0.05$)。观察组NK细胞表面NKG2A的表达水平高于对照组($P<0.05$)。SIGIRR和TLR4的mRNA、Th1细胞频率、Treg细胞频率、IL-6、TNF- α 、NK细胞表面NKG2A表达水平之间均为负相关关系($P<0.05$),和IFN- γ 、IL-10、IL-18水平之间均为正相关关系($P<0.05$)。**结论** CHB患者SIGIRR表达水平异常,且和免疫功能紊乱有关。CHB患者的SIGIRR低表达能直接或者间接活化TLR4,上调NK细胞表面NKG2A和IL-6及TNF- α 等细胞因子表达,下调IFN- γ 、IL-10及IL-18等细胞因子表达,进而导致免疫调节功能紊乱。

【关键词】 慢性乙型肝炎;单免疫球蛋白-白介素1受体蛋白;免疫功能;相关性
【中图分类号】 R512.6+2
【文献标识码】 A
【基金项目】 江西省卫健委立项课题 (202211889)
DOI:10.3969/j.issn.1009-3257.2023.12.030

Changes in the Expression Level and Clinical Significance of Monoimmunoglobulin-interleukin 1 Receptor Protein in Patients with Chronic Hepatitis B*

WU Gang, YE Xiao-ling, ZHANG Yu, SHI Qing*
Liver Disease Department, Jiujiang First People's Hospital, Jiujiang 332000, Jiangxi Province, China

Abstract: Objective To analyze the altered expression level and clinical significance of monoimmunoglobulin-interleukin 1 receptor protein (SIGIRR) in patients with chronic hepatitis B (CHB). **Methods** 60 CHB patients admitted in 2022.01-2022.12 hospital were selected as the observation group, In addition, 50 patients with health examination in the same period were selected as the control group, Two groups determined SIGIRR mRNA expression, SIGIRR + cell frequency, and CD3 + SIGIRR + T lymphocyte ratio in peripheral blood mononuclear cells (PBMC); Frequency of Th 1 and Treg cells in peripheral blood; Concentrations of serum interferon- γ (IFN- γ), interleukin-10 (IL-10), interleukin-6 (IL-6), interleukin-18 (IL-18), and tumor necrosis factor- α (TNF- α); The mRNA level of Toll-like receptor 4 (TLR 4) in PBMC; NK cell surface NK cell receptor 2A antibody (NKG2A) expression, Comparing the differences between the various indicators of the two groups, And analyzed the correlation of SIGIRR and various indicators. **Results** SIGIRR mRNA expression, SIGIRR + cell frequency and CD3 + SIGIRR + T lymphocyte ratio in PBMC were lower ($P<0.05$) and mRNA in TLR 4 was higher than the control group ($P<0.05$). The frequency of peripheral Th 1 and Treg cells in the observation group was higher than that in the control group ($P<0.05$). Serum concentrations of IFN- γ , IL-10 and IL-18 in the observation group were lower than the control group ($P<0.05$), and IL-6 and TNF- α were higher than the control group ($P<0.05$). The expression level of NKG 2 A in the NK group was higher than that of the control group ($P<0.05$). A negative correlation between mRNA, Th 1, IL-6, TNF- α , NKG 2 A and TLR 4 ($P<0.05$) and a positive correlation between IFN- γ , IL-10, and IL-18 levels ($P<0.05$). **Conclusion** CHB patients have abnormal SIGIRR expression levels and a disordered immune function. The low expression of SIGIRR in CHB patients can directly or indirectly activate TLR 4, upregulate the expression of cytokines such as NKG2A and IL-6 and TNF- α on the surface of NK cells, and downregulate the expression of cytokines such as IFN- γ , IL-IL-10 and IL-18, thus leading to immunomodulation dysfunction.

Keywords: Chronic Hepatitis B; Monoimmunoglobulin-interleukin 1 Receptor Protein; Immune Function; Correlation

慢性乙型肝炎(CHB)属于一类较为常见的传染性疾病,其发病机制暂未完全明确,当前仍无根治方法。机体的免疫反应强弱与免疫调节功能是否处在正常状态,和CHB患者临床转归紧密相关^[1]。相关研究显示^[2],CHB患者中乙型肝炎病毒(HBV)诱导机体免疫系统产生有助于其免疫逃逸的微环境(TLRs下调、NK与Th1活化下降以及Treg增强),免疫功能降低以及免疫调节功能紊乱有可能是CHB发生以及发展的重要免疫学机制。但何种免疫调控分子参加了免疫细胞谱改变当前仍未明确。单免疫球蛋白-白介素1受体蛋白(SIGIRR)属于近年来新发现的一类免疫负调控分子,能对NK细胞、Th1细胞和TLRs信号通路产生影响进而发挥其免疫抑制效应,而这些细胞或者信号通路于CHB中存在功能紊乱^[3]。据

此推测具备负性调控功能的SIGIRR有可能参加了CHB有关免疫学机理,但有关SIGIRR在CHB患者中的表达水平是否异常,是否和这些细胞或者信号通路有关,未见有关临床报道。为此,本文现对2022.01-2022.12本院收治的CHB患者60例开展研究,并和同期本院健康体检人群50例对比,分析CHB患者中SIGIRR的表达水平变化和临床意义,旨在为制定疾病有关防治策略提供新的实验和理论依据,具体结果如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取2022.01-2022.12本院收治的CHB患者60例设为观察组,另选取同时段内本院健康体检人群50例设为对

【第一作者】吴 刚,男,主治医师,主要研究方向:肝病的临床与病理。E-mail: 554372631@qq.com
【通讯作者】石 馨,男,主治医师,主要研究方向:肝病的中西医结合治疗。E-mail: 6583227@qq.com

照组, 观察组男女比例是39:21; 年龄范围在20-78岁, 均值是(45.86±5.10)岁。对照组男女比例是28:22; 年龄范围在25-75岁, 均值是(46.32±5.24)岁。两组各项资料相比无显著差异($P>0.05$), 可对比分析。本研究得到院内伦理委员会通过, 同时取得研究对象知情同意。

纳入标准: 观察组均和《慢性乙型肝炎防治指南》^[4]中CHB的诊断标准相符, 对照组均为体检无任何异常者; 年龄 ≥ 20 岁; 依从性良好, 可配合完成检查; 入组前6个月未应用抗病毒或者免疫调节药物。排除标准: 存在其他病毒感染者; 存在其他肝病者; 存在严重基础疾病者; 妊娠或者哺乳期女性; 拒绝研究或者期间退出者。

1.2 方法 抽取受检者清晨空腹状态下的静脉血液10mL, 其中6mL采取抗凝管使用EDTA抗凝全血, 另外4mL在干燥管内分离血清。(1)流式细胞术: 选取3mL的EDTA抗凝全血, 通过淋巴细胞分离液分离得到外周血的单个核细胞(PBMC), 用于开展流式细胞术, 检测内容如下: ①Th1细胞: 用RPMI 1640调整PBMC浓度至 $2.0 \times 10^6/\text{mL}$, 接种于6孔板中加25ng/mL佛波酯、500ng/mL离子霉素及1.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 莫能霉素, 37°C5%CO₂培养箱中培养4h。加入荧光标记抗CD3和CD4抗体各10 μL 室温避光孵育20 min, 用PBS洗2次离心去上清, 固定剂固定15 min, PBS洗1次离心去上清, 加入破膜剂室温孵育5 min离心去上清。分别加抗干扰素- γ (IFN- γ)抗体10 μL , 室温避光孵育20 min, 离心去上清后加入500 μL PBS悬浮后上机检测。圈定CD3+细胞群, 分析Th1细胞群, 表型为CD3+CD4+IFN- γ 。②SIGIRR+细胞: 依次加入CD3和SIGIRR抗体各10 μL , 室温避光孵育20 min, 离心去上清后加入500 μL PBS悬浮后上机检测。③NK细胞受体2A抗体(NKG2A)+NK细胞: 依次加入CD3、CD56和NKG2A抗体各10 μL , 室温避光孵育20 min, 离心去上清后加入500 μL PBS悬浮后上机检测。④Treg细胞: 依次加入CD3、CD4、CD25和CD127抗体各10 μL , 室温避光孵育20 min, 离心去上清后加入500 μL PBS悬浮后上机检测。(2)另3mLEDTA抗凝分离PBMC, 用于荧光定量PCR测定SIGIRR和Toll样受体4(TLR4)mRNA水平。具体如下: E.Z.N.A.Total RNA Kit II提取PBMC RNA; PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser合成cDNA; SYBR@Premix Ex TaqTM II用于Real time qPCR反应, 以上实验严格按照说明书操作。Real time qPCR扩增标准程序: 预变性95°C30s, 变性

95°C5s, 循环数为40, 退火60°C30s。选取 β -actin为参比基因。利用相对含量 $=2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 计算靶基因mRNA的相对含量, 具体引物序列以及产物大小见表1。(3)另4mL静脉血于干燥管中4000 rpm 10min离心分离血清并于-80°C冰箱保存, 用于血清IFN- γ 、白细胞介素-10(IL-10)、白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-18(IL-18)及肿瘤坏死因子- α (TNF- α)测定, 所需试剂盒均购自美国R&D公司, 方法为酶联免疫吸附法, 所有步骤均严格按照试剂盒操作说明书执行。

1.3 观察指标 观察两组PBMC中SIGIRR mRNA表达、SIGIRR+细胞频率及CD3+SIGIRR+T淋巴细胞比率; 外周血Th1和Treg细胞频率; 血清IFN- γ 、IL-10、IL-6、IL-18及TNF- α 浓度; PBMC中TLR4的mRNA水平; NK细胞表面NKG2A的表达, 比较两组各项指标差异, 并分析SIGIRR和各项指标的相关性。

1.4 统计学方法 利用SPSS 23.0统计软件分析, 正态分布计量资料采用均数±标准差表示, 组间比较采用独立样本t检验。计数资料用百分率表示, 组间比较采用卡方检验。使用Pearson相关系数量化变量之间的相关性, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组PBMC中SIGIRR mRNA表达、SIGIRR+细胞频率、CD3+SIGIRR+T淋巴细胞比率及TLR4的mRNA水平对比

观察组PBMC中SIGIRR mRNA表达、SIGIRR+细胞频率及CD3+SIGIRR+T淋巴细胞比率低于对照组($P<0.05$), TLR4的mRNA高于对照组($P<0.05$), 详见表2。

2.2 两组外周血Th1和Treg细胞频率对比 观察组外周血Th1和Treg细胞频率高于对照组($P<0.05$), 详见表3。

2.3 两组血清IFN- γ 、IL-10、IL-6、IL-18及TNF- α 浓度对比 观察组血清IFN- γ 、IL-10及IL-18浓度低于对照组($P<0.05$), IL-6及TNF- α 高于对照组($P<0.05$), 详见表4。

2.4 两组NK细胞表面NKG2A的表达水平相比 观察组NK细胞表面NKG2A的表达水平高于对照组($P<0.05$), 详见表5。

2.5 SIGIRR和各项指标的相关性 SIGIRR和TLR4的mRNA、Th1细胞频率、Treg细胞频率、IL-6、TNF- α 、NK细胞表面NKG2A表达水平之间均为负相关关系($P<0.05$), 和IFN- γ 、IL-10、IL-18水平之间均为正相关关系($P<0.05$), 详见表6。

表1 Real time qPCR的引物序列以及产物大小

	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')	产物大小
β -actin	5'-GAGACCTTCAACACCCCAFC-3'	5'-ATGTCACGCACGATTTC-3'	263bp
SIGIRR	5'-CACTGAAGTCTATGGGGCCTT-3'	5'-ACGTTGAGACGGCACTTGAC-3'	171bp
TLR4	5'-AGACCTGTCCTGAACCCTAT-3'	5'-CGATGGACTTCTAAACCAGCCA-3'	147bp

表2 两组PBMC中SIGIRR mRNA表达、SIGIRR+细胞频率及CD3+SIGIRR+T淋巴细胞比率对比

组别	例数	SIGIRR mRNA	SIGIRR+细胞频率(%)	CD3+SIGIRR+T淋巴细胞比率(%)	TLR4的mRNA
观察组	60	0.12±0.03	0.70±0.16	0.15±0.03	4.10±0.68
对照组	50	0.20±0.05	2.08±0.45	1.25±0.34	0.40±0.12
t		9.919	20.613	22.786	37.958
P		0.001	0.001	0.001	0.001

表3 两组外周血Th1和Treg细胞频率对比

组别	例数	Th1细胞频率	Treg细胞频率
观察组	60	4.98±0.62	5.84±0.75
对照组	50	3.12±0.45	3.05±0.50
t		17.679	22.463
P		0.001	0.001

表5 两组NK细胞表面NKG2A的表达水平相比

组别	例数	NKG2A
观察组	60	0.75±0.10
对照组	50	0.22±0.04
t		35.183
P		0.001

表4 两组血清IFN- γ 、IL-10、IL-6、IL-18及TNF- α 浓度对比(pg/mL)

组别	例数	IFN- γ	IL-10	IL-6	IL-18	TNF- α
观察组	60	126.34 $\pm$ 12.30	19.24 $\pm$ 3.10	120.75 $\pm$ 11.05	420.32 $\pm$ 12.10	455.76 $\pm$ 15.14
对照组	50	229.74 $\pm$ 15.48	62.76 $\pm$ 5.32	78.84 $\pm$ 9.26	709.44 $\pm$ 15.20	302.24 $\pm$ 20.32
t		39.034	51.049	21.298	111.067	44.163
P		0.001	0.001	0.001	0.001	0.001

表6 SIGIRR和各项指标的相关性

指标	SIGIRR	
	r	P
TLR4的mRNA	-0.622	0.001
Th1细胞频率	-0.614	0.001
Treg细胞频率	-0.735	0.001
IFN- γ	0.754	0.001
IL-10	0.696	0.001
IL-6	-0.795	0.001
IL-18	0.658	0.001
TNF- α	-0.690	0.001
NK细胞表面NKG2A表达水平	-0.702	0.001

3 讨论

HBV感染属于急性或者慢性肝病的一类常见原因，成人感染者中有5-10%能演变成CHB，若肝脏损伤未得到有效控制，会发展成危及生命安全的肝硬化、肝癌或者肝衰竭，导致患者死亡^[5-6]。临床研究发现^[7-8]，HBV属于一类非致细胞病变有关病毒，肝细胞感染该病毒并复制繁殖不会直接引起肝细胞损伤，但HBV基因能整合至宿主肝细胞染色体内，机体经特异性体液与细胞反应以及非特异免疫反应将HBV清除，该过程能导致炎症反应以及肝细胞受损。HBV急性感染机体内占据主导的为固有免疫以及适应性免疫活化产生促炎微环境将病毒清除，但演变成慢性感染后，HBV通过机体免疫负性调控机制例如Treg等以抑制病毒特异免疫应答，诱导针对病毒的免疫耐受^[9-10]。慢性感染产生免疫微环境为CHB患者进展成肝硬化甚至肝癌的主要因素^[11]。因此，免疫反应强弱以及免疫功能是否正常，和CHB患者的临床转归存在紧密联系，积极探讨CHB有关免疫发病机制十分必要。

SIGIRR属于近年来观察到的TIR有关超家族成员，于机体内较多组织以及器官中存在表达^[12]。因结构和其他的TIR有关超家族成员不同，SIGIRR特殊性于炎症和免疫反应内起到负性调控作用，保持TIR超家族介导的下游信号通路平衡^[13-14]。SIGI于各类炎症免疫细胞内表达广泛，炎症状态下，该类指标的水平往往降低^[15-16]。相关研究显示^[17-18]，SIGIRR能对Th1细胞、NK细胞以及TLRs信号通路产生影响，进而起到免疫抑制效果，这些细胞或者信号通路于CHB中呈现功能紊乱状态。据此我们推测具备负性调控功能的SIGIRR有可能参加CHB免疫学机理。本文研究显示：观察组PBMC中SIGIRR mRNA表达、SIGIRR+细胞频率及CD3+SIGIRR+T淋巴细胞比率均低于对照组($P<0.05$)，这和有关研究中的结果一致。观察组TLR4的mRNA、外周血Th1及Treg细胞频率、血清IL-6及TNF- α 和NK细胞表面NKG2A的表达水平均高于对照组($P<0.05$)，血清IFN- γ 、IL-10及IL-18浓度均低于对照组($P<0.05$)。SIGIRR和TLR4的mRNA、Th1细胞频率、Treg细胞频率、IL-6、TNF- α 、NK细胞表面NKG2A表达水平之间为负相关关系($P<0.05$)，和IFN- γ 、IL-10、IL-18水平之间为正相关关系($P<0.05$)。上述结果显示CHB患者的SIGIRR表达处在异常状态，

能直接影响到机体的免疫功能。推测作用机制是SIGIRR表达下降，会负反馈性导致TLR4活化，促进NK细胞表面NKG2A和IL-6及TNF- α 等促炎细胞因子水平升高，导致IFN- γ 、IL-10及IL-18等抗炎细胞因子下降，最终引发免疫抑制。

综上所述，CHB患者SIGIRR表达水平异常，且和免疫功能紊乱有关。CHB患者的SIGIRR低表达能直接或者间接活化TLR4，上调NK细胞表面NKG2A和IL-6及TNF- α 等细胞因子表达，下调IFN- γ 、IL-10及IL-18等细胞因子表达，进而导致免疫调节功能紊乱。但本文依旧有不足的地方，如纳入的样本数不多，样本来源较为单一，且有关SIGIRR在不同进展阶段CHB患者中的作用和临床意义还需日后继续分析。

参考文献

- [1] 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 (2022年版) [J]. 中华传染病杂志, 2023, 41 (1): 3-28.
- [2] 斯汝佳, 石莹, 牛俊奇. 白细胞介素1相关受体SIGIRR在免疫相关疾病中的作用 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2021, 41 (3): 233-236.
- [3] 雷桂花, 吴小青, 项慧芬, 等. 老年急性胰腺炎继发脓毒症外周血单免疫球蛋白白细胞介素-1受体相关蛋白表达及意义 [J]. 中华医院感染学杂志, 2023, 33 (5): 728-732.
- [4] 宋燕萍, 周小江, 谢勇. SIGIRR在机体炎症与免疫反应中负性调控作用的研究进展 [J]. 中国免疫学杂志, 2022, 38 (5): 620-625.
- [5] 李伟绪, 张勉, 卢梦, 等. 单免疫球蛋白白细胞介素1受体相关蛋白在牙周膜干细胞中的抗作用 [J]. 实用口腔医学杂志, 2022, 38 (2): 243-247.
- [6] GIANNOUDAKI E, STEFANSKA AM, LAWLER H, et al. SIGIRR negatively regulates IL-36-driven psoriasiform inflammation and neutrophil infiltration in the skin [J]. The Journal of Immunology: Official Journal of the American Association of Immunologists, 2021, 207 (2): 651-660.
- [7] 叶军, 韩山山, 卢昕奕, 等. microRNA-18a通过PPAR α / γ 信号通路上调慢性乙型肝炎患者调节性免疫功能 [J]. 临床肝胆病杂志, 2020, 36 (5): 1024-1028.
- [8] 高鹏, 雒艳萍, 李俊峰, 等. 乙型肝炎病毒在不同丙氨酸氨基转移酶状态下对Th17、Treg细胞及其比率的影响 [J]. 北京大学学报 (医学版), 2022, 54 (2): 272-277.
- [9] 李璐璐. 慢性乙型肝炎患者外周血免疫细胞及免疫球蛋白的表达及意义 [J]. 实用中西医结合临床, 2021, 21 (1): 65-66.
- [10] 王芳, 卢建华, 刘勇钢, 等. 慢性乙型肝炎相关慢急性肝衰竭前期免疫细胞的表达及意义 [J]. 临床肝胆病杂志, 2023, 39 (1): 77-82.
- [11] 王雷捷, 曹婉嘉, 李德瑶, 等. 乙型肝炎病毒蛋白对宿主免疫的影响及其临床意义 [J]. 中华肝病杂志, 2021, 29 (7): 625-630.
- [12] 董转丽, 肖丽昕, 付婷, 等. 炎症因子介导乙型肝炎病毒感染后机体免疫反应的研究进展 [J]. 中华老年多器官疾病杂志, 2022, 21 (9): 704-706.
- [13] 晋聪, 郝海昀, 陈文鑫, 等. 外周血单个核细胞TLR3信号通路活化在重组乙型肝炎表面抗原免疫应答中的作用 [J]. 中华流行病学杂志, 2022, 43 (4): 560-565.
- [14] 魏鑫, 姚伟峰, 陈鹤, 等. 乙型肝炎病毒相关性肝硬化患者外周血NK和NKT细胞功能特点及意义 [J]. 临床检验杂志, 2021, 39 (8): 595-600.
- [15] 杨丽, 付万智, 李建东, 等. HBV相关慢急性肝衰竭患者外周血TLR4信号通路及短期预后的相关性 [J]. 临床和实验医学杂志, 2022, 21 (20): 2145-2148.
- [16] Razavi H. Global epidemiology of viral hepatitis [J]. Gastroenterol Clin North Am, 2020, 49 (2): 179-189.
- [17] Li MR, Xu ZG, Lu JH, et al. Clinical features of hepatitis B patients at immune-tolerance phase with basal core promoter and/or precore mutations [J]. J Viral Hepat, 2020, 27 (10): 1044-1051.
- [18] Zheng Y, Wu J, Ding C, et al. Disease burden of chronic hepatitis B and complications in China from 2006 to 2050: an individual-based modeling study [J]. Virol J, 2020, 17 (1): 132.

(收稿日期: 2023-07-25)
(校对编辑: 韩敏求)