

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2013.01.012

重型肝炎患者外周血 Toll 样受体信号通路负性调节因子基因表达的初步研究

兰淑青, 秦 波

(重庆医科大学附属第一医院感染科, 重庆 400016)

【摘要】目的:探讨 Toll 样受体(toll-like receptors, TLRs)信号转导通路负性调控因子在重型乙型肝炎患者免疫发病机制中的作用。**方法:**采用荧光定量 PCR 检测慢性乙型肝炎组 20 例、重型肝炎早期组 17 例、重型肝炎中晚期组 9 例患者及健康对照组 18 例外周血单个核细胞 TLRs 信号通路负性调节因子髓样分化蛋白 88 短臂(myeloid-differentiation-88-short, MyD88s)、白介素 1 受体相关激酶-M(interleukin-1R-associated-kinase-M, IRAK-M)、单免疫球蛋白白介素 1 受体相关蛋白(single-immunoglobulin-interleukin-1R-related-molecule, SIGIRR)、锌指蛋白 A20 及 TLR4 基因的表达;ELISA 法检测血浆肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白介素-10(interleukin-10, IL-10)的水平。**结果:**与健康对照组相比, MyD88s、IRAK-M、A20 的基因表达水平及血清 TNF- α 、IL-10 水平随病情加重逐渐升高($P<0.05$);而 IL-10 在慢性乙型肝炎组与重型肝炎早期组比较, 差异无统计学意义($P>0.05$);TLR4 mRNA 在慢性乙型肝炎组、重型肝炎早期组、重型肝炎中晚期组均高于健康对照组, 重型肝炎中晚期组低于早期组($P<0.05$)。相关性分析显示, 慢性乙型肝炎组、重型肝炎早期组 TLR4 mRNA 与同组 TNF- α 、总胆红素水平正相关($P<0.05$), 与凝血酶原活动度呈负相关($P<0.05$)。**结论:**TLRs 信号通路负性调节因子参与慢性肝炎和重型肝炎的发生, 且负性调节因子持续升高可能导致重型肝炎患者免疫抑制。

作者简介: 兰淑青, Email: lanshuqing@yahoo.com,

研究方向: 慢性乙型肝炎和重型乙型肝炎的发病机制。

通信作者: 秦 波, Email: eqqinbo@126.com。

基金资助: 重庆市卫生局重点资助项目(编号: 2011-1-040)。

参 考 文 献

- [1] Sanchez-Céspedes M.A role for LKB1 gene in human cancer beyond the Peutz-Jeghers syndrome[J]. *Oncogene*, 2007, 26(57): 7825-7832.
- [2] Ji H, Ramsey M R, Hayes D N, et al. LKB1 modulates lung cancer differentiation and metastasis[J]. *Nature*, 2007, 448(7155): 807-810.
- [3] Wingo S N, Gallardo T D, Akbay E A, et al. Somatic LKB1 mutations promote cervical cancer progression[J]. *PLoS One*, 2009, 4(4): e5137.
- [4] Zhou J, Huang W, Tao R, et al. Inactivation of AMPK alters gene expression and promotes growth of prostate cancer cells[J]. *Oncogene*, 2009, 28(18): 1993-2002.
- [5] Liang X, Wang P, Gao Q, et al. Endogenous LKB1 knockdown accelerates G(1)/S transition through p53 and p16 pathways[J]. *Cancer Biol Ther*, 2010, 9(2): 156-160.
- [6] Sclafani R A, Holzen T M. Cell cycle regulation of DNA replication[J]. *Annu Rev Genet*, 2007, 41: 237-280.
- [7] Giacinti C, Giordano A. RB and cell cycle progression[J]. *Oncogene*, 2006, 25(38): 5220-5227.
- [8] Hardie D G. AMP-activated protein kinase as a drug target[J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2007, 47: 185-210.
- [9] Bright N J, Thornton C, Carling D. The regulation and function of mammalian AMPK-related kinases[J]. *Acta Physiol (Oxf)*, 2009, 196(1): 15-26.
- [10] Jansen M, Ten Klooster J P, Offerhaus G J, et al. LKB1 and AMPK family signaling: the intimate link between cell polarity and energy metabolism[J]. *Physiol Rev*, 2009, 89(3): 777-798.
- [11] Lizcano J M, Göransson O, Toth R, et al. LKB1 is a master kinase that activates 13 kinases of the AMPK subfamily, including MARK/ PAR-1[J]. *EMBO J*, 2004, 23(4): 833-843.
- [12] Shackelford D B, Shaw R J. The LKB1-AMPK pathway: metabolism and growth control in tumour suppression[J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(8): 563-575.
- [13] Tassan J P, Le Goff X. An overview of the KIN1/PAR-1/MARK kinase family[J]. *Biol Cell*, 2004, 96(3): 193-199.
- [14] Jaleel M, McBride A, Lizcano J M, et al. Identification of the sucrose non-fermenting related kinase SNRK, as a novel LKB1 substrate[J]. *FEBS Lett*, 2005, 579(6): 1417-1423.
- [15] Hezel A F, Bardeesy N. LKB1: linking cell structure and tumor suppression[J]. *Oncogene*, 2008, 27(55): 6908-6919.
- [16] Williams T, Brenman J E. LKB1 and AMPK in cell polarity and division[J]. *Trends Cell Biol*, 2008, 18(4): 193-198.

(责任编辑: 冉明会)

【关键词】重型肝炎; Toll 样受体 4; 负性调节因子; 肿瘤坏死因子- α ; 白介素-10

【中国图书分类法分类号】R512.6+2

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-04-23

Preliminary study on negative regulator gene expression of toll-like receptor signal pathways in patients with acute-on-chronic liver failure associated with hepatitis B virus infection

LAN Shuqing, QIN Bo

(Department of Infectious Disease, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】**Objective:** To explore the role of negative regulators of toll-like receptor (TLRs) signal pathways in immunological pathogenesis of severe hepatitis B virus infection (CHB). **Methods:** mRNA expressions of myeloid-differentiation-88-short (MyD88s), interleukin-1R-associated-kinase-M (IRAK-M), single-immunoglobulin-interleukin-1R-related-molecule (SIGIRR), zinc finger protein A20 and TLR4 in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in 20 cases of chronic CHB, 17 cases of acute-on-chronic liver failure at early stage (ACLF-E), 9 cases of acute-on-chronic liver failure at late stage (ACLF-L) and 18 healthy controls were detected by real time fluorescence quantitative PCR. Serum levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-10 (IL-10) were detected by ELISA assay. **Results:** Compared with those in healthy controls, mRNA expression levels of MyD88s, IRAK-M and A-20 as well as serum levels of TNF- α and IL-10 were unregulated with the progression of diseases in CHB patients, ALCF-E patients and ALCF-L patients ($P < 0.05$) ($P < 0.01$). There was no significant difference in serum levels of IL-10 between CHB and ALCF-E ($P > 0.05$). mRNA expressions of TLR4 were higher in CHB patients, ALCF-E patients and ALCF-L patients than in healthy controls. mRNA expressions of TLR4 were lower in ALCF-L patients than in ALCF-E patients ($P < 0.05$). **Conclusions:** Negative regulators of TLRs signaling pathway participate in the pathogenesis of chronic hepatitis and liver failure and upregulation of negative regulators may lead to immunosuppressive in patients with liver failure.

【Key words】liver failure; toll-like receptor 4; negative regulators; tumor necrosis factor- α ; interleukin-10

重型肝炎有类似脓毒症的免疫抑制, 这种免疫功能的紊乱常导致逐渐增加的感染和死亡率的上升^[1]。Toll 样受体 (toll-like receptors, TLRs) 是固有免疫最重要的模式识别受体之一, 主要表达于免疫细胞, 尤其是单核/巨噬细胞和树突状细胞表面, 可识别病原相关分子模式 (pathogen associated molecular patterns, PAMPs), 启动炎性应答, 构成机体免疫反应的第 1 道防线^[2], 还可以诱导 T 淋巴细胞活化, 调控适应性免疫^[3], 维持机体免疫平衡状态。TLR4 是内毒素的特异性受体, 内毒素与肝细胞和单核/巨噬细胞表面 TLR4 结合, 通过信号转导, 诱发炎症因子的“瀑布式”释放, 导致肝损伤^[4-5]。TLR4 信号通路异常失衡导致肝损伤的机制仍有待进一步研究。某些负性调节因子可调控 TLR 信号转导, 在维持 TLRs 信号通路的平衡方面起了很重要的作用^[6]。目前, 有关 TLRs 信号途径负性调节因子在重型肝炎的作用的研究甚少。本文探讨了 TLR4 信号通路几个负性调节因子在重型肝炎患者外周血的基因表达特点, 旨在进一步阐明内毒素所致肝损伤的发病机制。

1 对象和方法

1.1 研究对象

采用横断面研究, 分层抽样。样本量计算采用完全随机设计多个均数比较的样本量估计公式: $n = \psi^2 \left[\sum_{i=1}^k s_i^2 / k \right] / \left[\sum_{i=1}^k (\bar{X}_i - \bar{X})^2 / (k-1) \right]$; n 为各样本组所需样本含量, 假设各组样本含量均相等, S_i 分别为第 i 个样本的均数和标准差的初估值, κ 为组数, ψ 值查表获得。收集 2010 年 2 月到 2011 年 7 月重庆医科大学附属第一医院感染科住院的慢性乙型肝炎 (重度) 患者 20 例, 其中男性 12 例, 女性 8 例, 年龄 21~76 岁, 中位年龄 48 岁; 重型肝炎患者 26 例, 均为乙型肝炎病毒感染者, 男性 19 例, 女性 7 例, 年龄 23~71 岁, 中位年龄 46 岁。所有入选者均符合 2010 年《慢性乙型肝炎抗病毒治疗专家共识》^[7] 的诊断标准, 并根据 2006 年《肝衰竭诊疗指南》^[8], 将重型肝炎患者分为早期组 17 例和中晚期组 9 例。按性别和年龄匹配选择无肝炎病史的健康志愿者 18 例, 男 11 例, 女 7 例, 年龄 18~75 岁, 中位年龄 45 岁。并排除甲肝、丙肝、戊肝、巨细胞病毒、EB 病毒、艾滋病病毒感染及使用免疫调节药物, 合并肿瘤、自身免疫病。所有入选者临床参数见表 1。

1.2 主要试剂及仪器

Ficoll-Hypaque 淋巴细胞分离液 (天津灏洋生物制品有

限公司); Trizol (北京艾德莱生物科技有限公司); 逆转录试剂盒和 SYBR Green 荧光定量 PCR 试剂盒 (大连宝生物工程有限公司); 引物由大连宝生物工程有限公司设计并合成; 人血浆肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白介素-10 (interleukin-10, IL-10) ELISA 试剂盒 (北京永辉生物科技有限公司); 电泳仪、凝胶自动成像系统和 real-time PCR Detector (美国 BIO-RAD Laboratories); 酶标仪 (美国 Bio-Tek 公司)。

1.3 方法

1.3.1 标本采集 于患者入院第 2 天取清晨空腹静脉血 4 ml (EDTA 抗凝), 3 000 r/min 离心 10 min 分离血浆并于 -70 °C 保存备用。采用 Ficoll-Hypaque 密度梯度离心法分离外周血单个核细胞, Trizol 法抽提单个核细胞总 RNA, 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性; 紫外分光光度计测定 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 的值, 检测总 RNA 的纯度, 并根据 $A_{260\text{ nm}}$ 的值计算总 RNA 浓度。将比值位于 1.8~2.0 的 RNA 样本进行逆转录并于 -20 °C 保存。

1.3.2 荧光定量 PCR 检测 利用荧光定量 PCR 单个核细胞髓样分化蛋白 88 短臂 (myeloid-differentiation-88-short, MyD88s)、白介素 1 受体相关激酶-M (interleukin-1R-associated-kinase-M, IRAK-M)、单免疫球蛋白白细胞介素 1 受体相关蛋白 (single-immunoglobulin-interleukin-1R-related-molecule, SIGIRR)、A20、TLRs 4 mRNA 的表达水平取 2 μ l cDNA 模板 (引物序列见表 2), 总反应体系 25 μ l; 按 SYBR-

Green 试剂盒操作说明, 反应条件: 95 °C, 预变性 30 s; 95 °C, 变性 5 s, 55 °C~65 °C, 退火 30 s, 重复 40 个循环; 55 °C~95 °C, 增加 0.5 °C/10 s。以 β -actin 为内参, 通过基因表达分析软件计算基因的相对表达量。

1.3.3 血浆 TNF- α 、IL-10 的检测 按 ELISA 试剂盒说明书操作, 分别测定样本 $A_{450\text{ nm}}$ 的值, EXCEL 软件绘制标准曲线, 并根据标准曲线计算其样本浓度。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析。正态资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析; 偏态资料以中位数 (M) 表示, 多组间比较采用 Kruskal-Wallis 检验; 相关性分析采用 Spearman 相关。检验水准为 $\alpha=0.05$ (双侧), 以 $P \leq 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 外周血单个核细胞 TLR4 及其信号通路负性调节因子的表达

健康对照组、慢性乙型肝炎组、重型肝炎早期组 TLR4 表达逐渐升高, 而重型肝炎中晚期组 TLR4 表达低于重型肝炎早期组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 负性调节因子 MyD88s、IRAK-M、A20 基因的表达从健康对照组到重型肝炎中晚期组逐渐升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); SIGIRR 在各组之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (表 3)。

表 1 所有入选者临床参数的基线水平

Tab.1 Baseline levels of clinical parameters of enrolled subjects

参考	健康对照组 ($n=18$)	慢性乙型肝炎组 ($n=20$)	重型肝炎早期组 ($n=17$)	重型肝炎中晚期组 ($n=9$)
年龄	45.06 $\pm$ 16.55	50.65 $\pm$ 16.40	46.41 $\pm$ 15.41	49.00 $\pm$ 15.31
男/女	10/8	12/8	12/5	7/2
白蛋白 (g/L)	46.00 $\pm$ 4.13	33.35 $\pm$ 6.22	30.76 $\pm$ 7.30	25.78 $\pm$ 3.56
HBV-DNA (10 ⁵ 拷贝/ml)	-	6.52	23.60	168.00
谷氨酸转氨酶 (IU/L)	27.11 $\pm$ 7.03	700.50	253.00	461.00
总胆红素 (μ mol/L)	13.61 $\pm$ 3.54	68.95	314.20	328.70
凝血酶原活动度 (%)	96.23 $\pm$ 29.33	88.52 $\pm$ 23.39	35.60 $\pm$ 7.56	24.76 $\pm$ 2.63

注: -, 无指标

表 2 荧光定量 PCR 引物序列

Tab.2 Primer sequences used for real-time PCR

基因名称	引物序列 (5'-3')	复性温度 (°C)	产物长度 (bp)
TLR4	上游正向引物: CGGTCCTCAGTGTGCTTAGTA	62	162
	下游反向引物: CATTCCTTACCCATGCCTCATCC		
MyD88s	上游正向引物: GGGACACAGCATTGGGCATA	58	250
	下游反向引物: ACATTCTTGCTCTGCAGGT		
IRAK-M	上游正向引物: CAAAGCCATTCACTACCTGCAC	62	143
	下游反向引物: GTTCTAGGTGGACCGGAAGT		
SIGIRR	上游正向引物: GCTTCTCCTCTTCACTCTTCAG	62	170
	下游反向引物: GTTTATCTCCACCTCCCACATACG		
A-20	上游正向引物: CTGCCCAGGAATGCTACAGATAC	62	140
	下游反向引物: GTCTTCAAATCTTCCCCGGTCT		
β -actin 内参	上游正向引物: CCACGAACTACCTTCAACTCC	60	132
	下游反向引物: GTGATCTCCTTCTGCATCCTGT		

表 3 TLR4 信号通路各基因相对表达量

Tab.3 Relative expressions of genes in TLR 4 signaling

组别	TLR4	MyD88S	IRAK-M	SIGIRR	A20
正常对照组	5.009 ± 3.236	2.73	10.65	4.86	1.63
慢性乙型肝炎组	20.460 ± 9.197 ^a	4.77 ^a	30.15 ^a	12.19	12.73 ^a
重型肝炎早期组	109.041 ± 42.014 ^b	11.08 ^{a*}	57.68 ^c	7.43	24.36 ^c
重型肝炎中晚期组	41.504 ± 19.942 ^c	16.19 ^{ab}	123.64 ^{ab}	2.82	42.62 ^{ab}

注:a,与对照组比较, $P<0.01$;b,与慢性乙型肝炎组比较, $P<0.01$;c,与重型肝炎早期组相比, $P<0.01$

2.2 血浆 TNF- α 、IL-10 水平的变化

从健康对照组到重型肝炎中晚期组,TNF- α 水平逐渐上升,差异有统计学意义($P<0.05$);与正常对照组比较,IL-10 水平在慢性乙型肝炎组、重型肝炎组均明显升高($P<0.05$),重型肝炎早期组与慢性乙型肝炎组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)(表 4)。

表 4 血浆 TNF- α 和 IL-10 的水平Tab.4 Levels of TNF- α and IL-10 in plasma

组别	TNF- α (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)
正常对照组	24.291 ± 5.870	12.991 ± 3.939
慢性乙型肝炎组	56.335 ± 11.390 [*]	32.402 ± 9.328 [*]
重型肝炎早期组	95.415 ± 17.465 [#]	36.765 ± 10.650 [*]
重型肝炎中晚期组	110.869 ± 23.063 [▲]	57.577 ± 6.859 [▲]
F 值	108.293	62.672

注:*,与对照组比较, $P<0.01$;▲,与慢性乙型肝炎组比较, $P<0.01$;#,与重型肝炎早期组相比, $P<0.01$

2.3 相关性分析

慢性乙型肝炎组、重型肝炎早期组 TLR4 mRNA 与血清总胆红素(total bilirubin,Tbil)呈正相关($r_s=0.547$ vs. $r_s=0.635$, $P<0.05$),与凝血酶原活动度(prothrombin activity,PTA)呈负相关($r_s=-0.658$ vs. $r_s=-0.724$, $P<0.05$)(图 1)。慢性乙型肝炎组、重型肝炎早期组 TLR4 基因表达与同组 TNF- α 水平呈正相关($r_s=0.881$ vs. $r_s=0.842$, $P<0.01$)(图 2)。

3 讨论

重型肝炎常合并严重的内毒素血症,内毒素的主要成分脂多糖(lipopolysaccharides,LPS)与单核细胞或肝细胞表面受体 TLR4 结合通过信号转导最终激活核因子- κ B(nuclear factor- κ B,NF- κ B)诱导前炎症因子基因的转录^[4-5];众多研究表明,TLR4 信号途径异常活化与重型肝炎的发生有关^[1,9-11]。本实验同样观察到,TLR4 mRNA 在重型肝炎组明显升高,且慢性肝炎和重型肝炎早期组 TLR4 mRNA 表达水平与 TNF- α 和 Tbil 呈正相关,与 PTA 呈负相关,进一步证实患者存在 TLR4 途径的异常活化;而

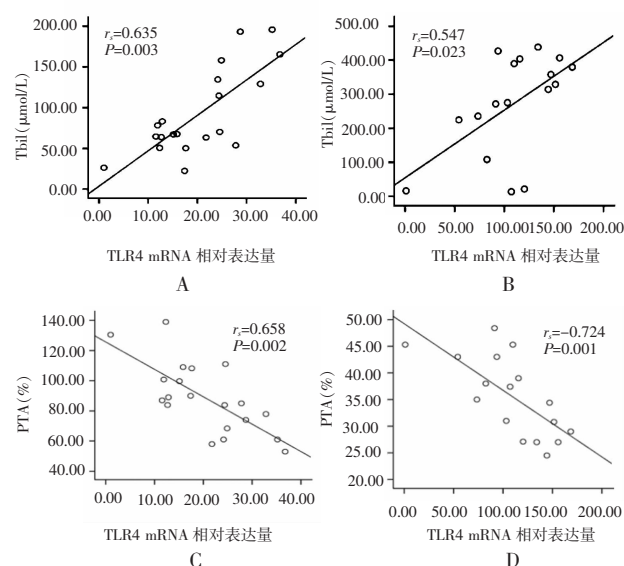


图 1 慢性乙型肝炎组 (A,C) 和重型肝炎早期组 (B,D) TLR4 mRNA、Tbil、PTA 的相关性

Fig.1 Correlation among TLR4 mRNA and Tbil and PTA in CHB (group A,C) and ACLF-E (group B,D)

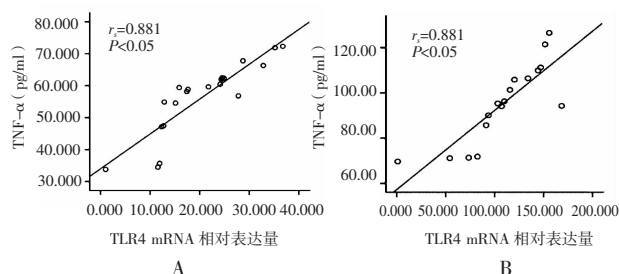


图 2 慢性乙型肝炎组 (A) 和重型肝炎早期组 (B) TLR4 mRNA 和 TNF- α 的相关性

Fig.2 Correlation between TLR4 mRNA and TNF- α in CHB (group A) and ACLF-E (group B)

TLR4 基因表达在重型肝炎中晚期组却出现相对下调,有学者有类似发现^[10-12];提示 TLR4 介导的信号传导在重型肝炎晚期受抑制。IL-10 是一种抗炎性细胞因子,血清 IL-10 水平的持续上升将导致炎症反应向抗炎反应的转换,最终出现抗炎反应综合征,单核细胞免疫抑制且升高的 IL-10 水平与逐

渐增加的感染和死亡率的上升有关^[1]。本实验进一步检测了血清 IL-10 的水平,结果发现,IL-10 水平随病情加重逐渐升高且以重型肝炎中晚期升高明显,而在重型肝炎早期与慢性乙型肝炎比较,差异无统计学意义,提示重型肝炎中晚期以抗炎症反应为主,IL-10 水平与 TLR4 mRNA 无相关性,表明 IL-10 对 TLR4 信号通路并没有直接抑制作用。另有研究表明,单核细胞的失活并不影响其 TLR4 对 LPS 的敏感性^[13]。因此负性调节因子(如 IRAK-M、MyD88s、SIGIRR 等)在维持信号通路平衡方面是必须的^[6]。IRAK-M 是 IRAK 家族成员,其无激酶活性,阻断 IRAK4/IRAK1 从 MyD88 上解离及 IRAK1-TRAF6 复合物的形成,从而抑制信号传导,IRAK-M 敲除的小鼠可引起严重的炎症反应^[14];Tazi 等^[15]也发现失代偿性肝硬化患者外周血 TNF- α 水平的升高与 IRAK-M 基因缺失有关;均提示 IRAK-M 的缺失导致放大的炎症反应,从另一个角度说明,IRAK-M 表达升高可抑制 TLRs 信号传导。体内外实验均证实,持续升高的 IRAK-M mRNA 表达与脓毒症患者免疫抑制有关^[16-18]。本研究结果恰好相反,IRAK-M mRNA 随病情加重逐渐升高,TLR4 mRNA 在重型肝炎中晚期表达下调,TNF- α 水平并无下降趋势,可能由于非 TLR4 途径参与;研究显示,慢性乙型肝炎及慢性重型乙型肝炎患者体内乙型肝炎病毒核心抗原、坏死细胞、凋亡细胞等可活化 TLR2 途径导致 TNF- α 产生^[19-20]。而 IRAK-M 对 LPS、IL-1、TNF- α 诱导的 TLRs 激活有抑制作用,是否可以抑制其它因素活化的 TLRs 信号途径,目前仍不明确。综上所述,IRAK-M mRNA 升高可能导致重型肝炎患者单核细胞免疫功能缺陷。

MyD88 短蛋白(MyD88-short, MyD88s)为媒介域缺失的 MyD88。细菌产物如 LPS 可诱导 MyD88s 产生,MyD88s 虽能与 TLR/IL-1R 和 IRAK-1 结合但不能使 IRAK-1 磷酸化从而抑制下游信号传导^[21]。锌指蛋白 A20,是经典的 NF- κ B 负反馈抑制因子,同时,A20 对 TNF- α 诱导的细胞凋亡也有抑制作用^[22]。本实验同样观察到 MyD88s、A20 基因表达与 IRAK-M 相似,随病情加重逐渐升高。而 Wiersinga 等^[16]发现脓毒症患者 MyD88s、A20 基因表达与正常对照组比较,差异无统计学意义,表明 MyD88s、A20 并不参与脓毒症的免疫调节;Adib-Conquy 等^[23]发现脓毒症患者 MyD88s 基因表达上调。出现这种不一致的原因可能是不同病原微生物或其成分活化

TLR/IL-1R 信号通路机制不同。

SIGIRR 则通过干扰 MyD88、IRAK-1 的募集、激活和(或)从受体复合物上解离抑制信号通路的传导^[24],Wiersinga 等^[16]研究发现脓毒症患者 SIGIRR 下调,Adib-Conquy 等^[23]发现脓毒症患者细胞免疫抑制与上调的 SIGIRR 有关,本研究却显示 SIGIRR 基因表达在组之间差异无统计学意义,可能与 SIGIRR 的表达特点有关,SIGIRR 主要表达于肝、肺、肾、肠道组织,而外周血单核细胞或淋巴细胞表达量很少^[25]。

综上所述,TLRs 相关 PAMPs 触发 TLR 信号通路的同时启动负性调节因子的表达,负性调节因子 IRAK-M、MyD88s、A20 参与慢性乙型肝炎和重型肝炎的发生,重型肝炎患者死亡者 IRAK-M 表达较高,表明 IRAK-M 可能是导致免疫抑制的关键因子,需扩大病例数进一步研究。虽然重型肝炎有类似脓毒症的免疫抑制,但由于病原不同,其机制不同。负性调节因子在重型肝炎早期已出现明显升高,而抗炎性细胞因子的大量释放主要在重型肝炎中晚期,表明重型肝炎早期就已出现细胞内抗炎性反应的调节。深入研究 TLRs 途径负性调节因子在重型肝炎的作用,寻找导致重型肝炎免疫抑制的关键基因,可望进一步阐明重型肝炎的发病机制,并可能通过调控其关键基因重建细胞免疫平衡,有可能为重型肝炎及其他 TLRs 传导途径异常活化的疾病提供新的治疗途径。

参 考 文 献

- [1] Wasmuth H E, Kunz D, Yagmur E, et al. Patients with acute or chronic liver failure display 'sepsis-like' immune paralysis[J]. *J Hepatol*, 2005, 42(2): 195-201.
- [2] Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors[J]. *Nat Immunol*, 2010, 11(5): 373-384.
- [3] Uto T, Akagi T, Yoshinaga K, et al. The induction of innate and adaptive immunity by biodegradable poly(γ -glutamic acid) nanoparticles via a TLR4 and MyD88 signaling pathway[J]. *Biomaterials*, 2011, 32(22): 5206-5212.
- [4] Wu J, Meng Z, Jiang M, et al. Toll-like receptor-induced innate immune responses in non-parenchymal liver cells are cell type-specific[J]. *Immunology*, 2010, 129(3): 363-374.
- [5] Peri F, Piazza M, Calabrese V, et al. Exploring the LPS/TLR4 signal pathway with small molecules[J]. *Biochem Soc Trans*, 2010, 38(5): 1390-1395.
- [6] Jeong E, Lee J Y. Intrinsic and extrinsic regulation of innate immune

receptors[J].Yonsei Med J, 2011, 52(3): 379-392.

[7] 慢性乙型肝炎抗病毒治疗专家委员会.慢性乙型肝炎抗病毒治疗专家共识[J].中华实验和临床感染病杂志(电子版), 2010, 4(1): 82-91.

Expert Committee of Antiviral Treatment for Chronic Hepatitis B. Antiviral treatment consensus for chronic hepatitis B[J].Chin J Exp Clin Infect Dis(Electronic Edition), 2010, 4(1): 82-91.

[8] 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(9): 643-646.

Liver Failure and Artificial Liver Group of Chinese Society of Infectious Diseases of Chinese Medical Association, Severe liver Diseases and Artificial Liver Group of Chinese Society of Hepatology of Chinese Medical Association. Diagnostic and treatment guidelines for liver failure[J]. Chin J Hepatol, 2006, 14(9): 643-646.

[9] Wang K, Liu H, He Y, et al. Correlation of TLR1-10 expression in peripheral blood mononuclear cells with chronic hepatitis B and chronic hepatitis B-related liver failure[J]. Hum Immunol, 2010, 71(10): 950-956.

[10] 林希, 朱坚胜, 王赓歌, 等. 肝衰竭患者外周血单核细胞 TOLL 样受体表达与炎性细胞因子关系的研究[J]. 中华临床感染病杂志, 2009, 2(4): 197-200.

Lin X, Zhu J S, Wang G G, et al. Expression of Toll-like receptors in peripheral blood mononuclear cells and serum inflammatory cytokine in patients with liver failure[J]. Chin Clin Infect Dis, 2009, 2(4): 197-200.

[11] Chen Z, Cheng Y, Xu Y, et al. Expression profiles and function of toll-like receptors 2 and 4 in peripheral blood mononuclear cells of chronic hepatitis B patients[J]. Clin Immunol, 2008, 128(3): 400-408.

[12] Xing T, Li L, Cao H, Huang J. Altered immune function of monocytes in different stages of patients with acute on chronic liver failure[J]. Clin Exp Immunol, 2007, 147(1): 184-188.

[13] Mendes M E, Baggio-Zappia G L, Brunialti M K, et al. Differential expression of toll-like receptor signaling cascades in LPS-tolerant human peripheral blood mononuclear cells[J]. Immunobiology, 2011, 216(3): 285-295.

[14] Kobayashi K, Hernandez L D, Galan J E, et al. IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling[J]. Cell, 2002, 110(2): 191-202.

[15] Tazi K A, Saada V, Bezeaud A, et al. Upregulation of TNF- α production signaling pathways in monocytes from patients with advanced cirrhosis: possible role of Akt and IRAK-M[J]. J Hepatol, 2006, 45(2): 280-289.

[16] Wiersinga W J, van't Veer C, van den Pangaart P S, et al. Immunosuppression associated with interleukin-1R-associated-kinase-M upregulation predicts mortality in Gram-negative sepsis (melioidosis) [J]. Crit Care Med, 2009, 37(2): 569-576.

[17] Escoll P, del Fresno C, Garcia L, et al. Rapid up-regulation of IRAK-M expression following a second endotoxin challenge in human monocytes and in monocytes isolated from septic patients[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 311(2): 465-472.

[18] Deng J C, Cheng G, Newstead M W, et al. Sepsis-induced suppression of lung innate immunity is mediated by IRAK-M[J]. J Clin Invest, 2006, 116(9): 2532-2542.

[19] Lucas M, Stuart L M, Savill J, et al. Apoptotic cells and innate immune stimuli combine to regulate macrophage cytokine secretion[J]. J Immunol, 2003, 171(5): 2610-2615.

[20] Visvanathan K, Skinner N A, Thompson A J, et al. Regulation of Toll-like receptor-2 expression in chronic hepatitis B by the precore protein[J]. Hepatology, 2007, 45(1): 102-110.

[21] Mendoza-Barbera E, Corral-Rodriguez M A, Soares-Schanoski A, et al. Contribution of globular death domains and unstructured linkers to MyD88-IRAK-4 heterodimer formation: an explanation for the antagonistic activity of MyD88s[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 380(1): 183-187.

[22] Bosanac I, Wertz I E, Pan B, et al. Ubiquitin binding to A20 ZnF4 is required for modulation of NF- κ B signaling[J]. Mol Cell, 2010, 40(4): 548-557.

[23] Adib-Conquy M, Adrie C, Fitting C, et al. Up-regulation of MyD88s and SIGIRR, molecules inhibiting Toll-like receptor signaling, in monocytes from septic patients[J]. Crit Care Med, 2006, 34(9): 2377-2385.

[24] Gong J, Wei T, Stark R W, et al. Inhibition of Toll-like receptors TLR4 and 7 signaling pathways by SIGIRR: a computational approach [J]. J Struct Biol, 2010, 169(3): 323-330.

[25] Polentarutti N, Penton Rol G, Muzio M, et al. Unique pattern of expression and inhibition of IL-1 signaling by the IL-1 receptor family member TIR8/SIGIRR[J]. Eur Cytokine Netw, 2003, 14(4): 211-218.

(责任编辑: 关蕴良)