

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.014.007
文章编号: 1005-8982 (2018) 014-0035-05

临床研究·论著

TIM-1 和 TIM-4 mRNA 在 HAV 患者中的表达及其临床意义*

胡耀华¹, 阳慧², 吴翔¹, 符春苗¹, 邵运禄¹, 郑才玲¹, 卓书伟¹

(海南省中医院 1. 检验科, 2. 妇产科, 海南 海口 570203)

摘要: 目的 观察典型病程甲型病毒性肝炎 (HAV) 患者外周血中 T 细胞免疫球蛋白域蛋白-1 (TIM-1) 和 T 细胞免疫球蛋白域蛋白-4 (TIM-4) mRNA 的表达水平, 探讨 HAV 患者病情进展的不同时期 TIM-1 和 TIM-4 mRNA 水平与 HAV RNA 含量, HAV 免疫球蛋白 M (IgM)、免疫球蛋白 G (IgG) 浓度及肝功能指标的关系。**方法** 选取 HAV 典型病程的 30 例患者作为 HAV 组, 分别于潜伏期或黄疸前期、黄疸期及恢复期留取血液标本, 以同期 30 例健康体检者作为对照组, 收集血液标本。采用实时荧光定量聚合酶链反应检测 TIM-1 和 TIM-4 mRNA 表达水平, 同时检测 HAV 患者外周血 HAV RNA 含量, 酶联免疫吸附法检测 HAV 患者外周血 HAV 抗体 IgM、IgG 滴度水平, 全自动生化分析仪检测肝功能指标谷丙转氨酶、谷草转氨酶及总胆红素。**结果** HAV 组患者外周血 TIM-1 和 TIM-4 mRNA 表达水平高于对照组患者 ($P < 0.05$)。随着疾病进程的继续, TIM-1 及 TIM-4 mRNA 表达水平于黄疸期达峰值, 恢复期下降。TIM-1 mRNA 表达水平与 HAV 患者 IgM 滴度、AST 及 TBIL 呈正相关 ($P < 0.05$), 与 IgG 滴度无关 ($P > 0.05$)。**结论** HAV 患者外周血中 TIM-1 和 TIM-4 mRNA 的表达水平与 HAV 的疾病进展有较好的拟合性, TIM-1 和 TIM-4 mRNA 可能在 HAV 的发生、发展中发挥作用。

关键词: 甲型病毒性肝炎; T 细胞免疫球蛋白域蛋白-1; T 细胞免疫球蛋白域蛋白-4

中图分类号: R392.7

文献标识码: A

Clinical significance of TIM-1 and TIM-4 mRNA levels in patients with hepatitis A*

Yao-hua Hu¹, Hui Yang², Xiang Wu¹, Chun-miao Fu¹, Yun-lu Shao¹, Cai-ling Zheng¹, Shu-wei Zhuo¹

(1. Clinical Laboratory, 2. Department of Gynecology and Obstetrics, Hainan Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Haikou, Hainan 570203, China)

Abstract: Objective To observe the expression levels of T cell immunoglobulin domain and mucin domain 1 (TIM-1) and TIM-4 mRNAs in peripheral blood of the patients with typical courses of viral hepatitis A, and to investigate the relationships of TIM-1 and TIM-4 mRNAs with RNA content of HAV, concentrations of anti-HAV IgM and IgG, and parameters of hepatic function. **Methods** Blood specimens were taken from 30 patients with typical courses of viral hepatitis A in incubation or pre-icterus stage, icterus stage and recovery stage and 30 healthy controls. TIM-1 and TIM-4 mRNA levels in the peripheral blood were assayed by RT-PCR. Also the HAV RNA content in the peripheral blood was detected. The concentrations of HAV antibody IgM and IgG in the peripheral blood of the viral hepatitis A patients were assayed by ELISA. The parameters of hepatic function (ALT, T-bil and

收稿日期: 2016-11-14

* 基金课题: 海南省卫生厅课题 (No: 15A200012)

D-bil) were assayed by the Hitachi 7600 Auto-biochemical Analyzer. **Results** The expression levels of TIM-1 and TIM-4 mRNAs in the peripheral blood of the hepatitis A patients were dramatically higher than those of the control group ($P < 0.05$), reached the peak value at the icterus stage and declined during the recovery stage. The expression levels of TIM-1 and TIM-4 mRNAs were in positive correlations with the titer of anti-HAV IgM and the parameters of hepatic function in the hepatitis A patients ($P < 0.05$), but did not have correlation with the titer of anti-HAV IgG ($P > 0.05$). **Conclusions** Expression levels of TIM-1 and TIM-4 mRNAs in the peripheral blood of hepatitis A patients have high degree to match the development of hepatitis A. TIM-1 and TIM-4 mRNAs are likely related to the incidence and development of hepatitis A.

Keywords: viral hepatitis A, TIM-1, TIM-4

甲型病毒性肝炎 (hepatitis a virus, HAV) 对人类健康危害极大, 2001 年 MCINTIRE 等^[1]发现了 1 个新的基因 T 细胞免疫球蛋白域蛋白 (T cell immunoglobulin domain and mucin domain, TIM) 家族, 包括 TIM-1、TIM-3 及 TIM-4。TIM-1 是 HAV 受体-1 (hepatitis A virus cellular receptor 1, HAVCR-1), TIM-4 是 TIM-1 的天然配体^[2-4]。在 HAV 发生、发展和转归的不同阶段, 目前国内外均未报道 TIM-1、TIM-4 的表达和作用。本研究拟通过检测 HAV 患者外周血 TIM-1 和 TIM-4 mRNA 表达水平, 探讨其与 HAV 的关系, 为防治 HAV 提供新的思路和靶点。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2016 年 9 月-2016 年 10 月海南省中医院收治的 30 例 HAV 患者作为 HAV 组。其中, 男性 21 例, 女性 9 例; 年龄 35 ~ 62 岁, 平均 (46 ± 1.3) 岁。同期选取 30 例健康体检者作为对照组。所有患者依据临床症状、体征、肝功能检查结果及抗-HAV 免疫球蛋白 M (immunoglobulin M, IgM) 阳性确诊为 HAV, 并根据临床症状和体征分为潜伏期、黄疸期及恢复期。参照 2000 年 9 月西安中华医学会传染病与寄生虫病学会和肝病学会修订的病毒性肝炎防治方案的标准^[5]。

1.2 静脉血标本

根据 HAV 疾病进展的 3 个阶段, 分别收集 30 例 HAV-IgM 阳性患者的静脉血标本。潜伏期或黄疸前期 (患者畏寒发热、全身乏力、食欲不振、厌油、恶心、呕吐及上腹部饱胀感或轻度腹泻等): 采集乙二胺四乙酸二钾 (Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt, EDTA-K2) 全血 2 ml 及不抗凝血 3 ml 分离血清; 黄疸期 (观察患者巩膜、皮肤黄染程度, 第 2 ~ 7 天):

采集 EDTA-K2 全血 2 ml 及不抗凝血 3 ml 分离血清; 恢复期 (患者症状消失、肝脾正常, 第 22 ~ 42 天): 采集 EDTA-K2 全血 2 ml 及不抗凝血 3 ml 分离血清。对照组分别在第 1、7 及 30 天采集静脉血, EDTA-K2 全血 2 ml 及不抗凝血 3 ml 分离血清。

1.3 实时荧光定量聚合酶链反应

1.3.1 引物设计与合成 应用生物信息学知识, 根据 GeneBank 中的 TIM-1 和 TIM-4 mRNA 以及甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) mRNA 全长序列, 用 Primer Express 软件设计目的基因 TIM-1、TIM-4 和内参照基因 GAPDH 引物。TIM-1 正向引物: 5' -CTAGCTAGCGCCACCATG-3', 反向引物: 5' -GGGGTACCTTAGTCCGTG-3'; TIM-4 正向引物: 5' -CCGCTACAGGCCTACCATGTCCA-3', 反向引物: 5' -GGGGTACCGTTGCCATTG-3'; GAPDH 正向引物: 5' -TGAGGTCAATGAAGGGGTGCG-3', 反向引物: 5' -TCTTGTGCAGTGCCAGCCT-3'。以上引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。

1.3.2 外周血单个核细胞的获取及总 RNA 的提取与逆转录 将 Ficoll 分离液和预先稀释的抗凝全血加入离心管中, 2 000 r/min 离心 20 min, 小心吸取密集在血浆层和分层液界面中呈白色雾状的单个核细胞, 经 RPMI 1640 细胞培养液调整细胞浓度为 1×10^6 个/L。用 Trizol 一步法抽提外周血单个核细胞总 RNA, 分析光密度 (optical density, OD) 260/OD280 纯度, 选取比值在 1.8~2.0 的样品进行检测, 使用 Thermo 逆转录试剂盒进行逆转录。

1.3.3 反应条件 采用美国 Applied Biosystems 公司的 SYBR® Green PCR Core Reagents 试剂盒。在专用检测板上配制各管反应液, 总体积 25 μ l。于聚合酶链式 (polymerase chain reaction, PCR) 反应仪中进行反应。实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real-time

polymerase chain reaction, qRT-PCR) 检测体 $10 \times$ PCR 缓冲液 $2 \mu\text{l}$, $25 \text{ mmol/L Mg}^{2+} 3.5 \mu\text{l}$, 10 mmol/L 高质量的脱氧核糖核苷酸 $0.4 \mu\text{l}$, $10 \mu\text{mol/L}$ 引物各 $0.5 \mu\text{l}$, 普通 TaqDNA 聚合酶 1 u ($1 \text{ u}/\mu\text{l}$), SYBR Green I $20 \times 1 \mu\text{l}$, 灭菌 H_2O 补齐。PCR 反应条件: 94°C 预变性 2 min , 94°C 变性 10 s , 59°C 退火 15 s , 72°C 延伸 15 s , 共 40 个循环后分别进行荧光检测, 并做溶解曲线对 PCR 产物的特异性进行鉴定, 最后反应冷却至 40°C 。

1.3.4 HAV 患者外周血 HAV RNA 含量 qRT-PCR 反应条件同 1.3.3, 正向引物: $5' -\text{TCTTTGTTCCA GGGCTCTCC}-3'$; 反向引物: $5' -\text{GCTCTTCCTCA ATGTCTGCC}-3'$ 。

1.4 酶联免疫吸附法

采用酶联免疫吸附法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 检测血中 IgM 和免疫球蛋白 G (immunoglobulin G, IgG) 抗体, Cut-off 值 <0.8 为阴性, $0.8 \sim 1.1$ 为弱阳性 (可疑), ≥ 1.1 为阳性。具体步骤: 向相应微孔中加 $100 \mu\text{l}$ 标准品、阳性对照、阴性对照及待检标本。室温 ($18 \sim 25^\circ\text{C}$) 温育 30 min , 倒掉板内液体, 用清洗缓冲液洗板 3 次, 拍干, 滴加酶结合物 $100 \mu\text{l}$ / 孔室温 ($18 \sim 25^\circ\text{C}$) 温育 30 min , 洗板 3 次, 拍干, 滴加显色液 A 和 B 各 $100 \mu\text{l}$, 室温 ($18 \sim 25^\circ\text{C}$) 避光温育 15 min 后加终止液 $100 \mu\text{l}$, 酶标仪 450 nm 处测 Cut-off 值。

1.5 肝功能检测

采用 7600 型全自动生化分析仪 (日本日立公司) 检测肝功能指标谷丙转氨酶 (glutamic pyruvic transaminase, ALT)、谷草转氨酶 (glutamic oxaloacetic transaminase, AST) 及总胆红素 (total bilirubin, TBIL)。使用血清标本, 方法参照仪器和试剂盒说明书。

1.6 统计学方法

数据分析采用 SPSS 13.0 统计软件, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较用 Kruskal-Wallis H 检验 (方差不齐), 独立样本两两比较用 Nemenyi 检验, 相关分析用 Pearson 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者 TIM-1 和 TIM-4 mRNA 表达水平比较

由 qRT-PCR 反应曲线得到 Ct 值, 计算基因相

对表达量, 采用 GAPDH 作为内参照。 $\Delta \text{Ct} = \text{Ct}_{\text{目的基因}} - \text{Ct}_{\text{GAPDH}}$ 。其中 HAV 患者 TIM-1 和 TIM-4 mRNA 的 Ct 值分别为 $38.029 \sim 32.272 \log X$ ($r = 0.927$)、 $32.719 \sim 2.582 \log X$ ($r = 0.975$)。两组患者在 HAV 感染的不同时期 TIM-1 和 TIM-4 mRNA 表达水平比较, 差异有统计学意义 ($H = 4.768$, $P = 0.013$), HAV 组高于对照组, 其表达水平较潜伏期升高数倍, 黄疸期达峰值, 恢复期降低, 但仍高于对照组。两组患者恢复期 TIM-1 和 TIM-4 mRNA 表达水平比较, 差异有统计学意义 ($H = 3.963$, $P = 0.027$)。不同时期的 TIM-1 和 TIM-4 mRNA 表达水平比较, 差异有统计学意义 ($H = 11.975$ 和 15.482 , 均 $P = 0.000$); 潜伏期与恢复期 TIM-1 和 TIM-4 mRNA 表达水平比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 1。

2.2 HAV 患者不同时期 TIM-1 和 TIM-4 mRNA 表达水平与 HAV RNA 含量的相关性

由 qRT-PCR 反应曲线得到 Ct 值, 计算基因相对表达量, 采用 GAPDH 作为内参照。 $\Delta \text{Ct} = \text{Ct}_{\text{目的基因}} - \text{Ct}_{\text{GAPDH}}$ 。得 $\text{Ct} = 40.049 \sim 3.579 \log X$ ($r = 0.955$)。TIM-1 和 TIM-4 mRNA 表达水平的变化趋势与 HAV mRNA 表达水平一致, 于黄疸期达峰值 ($r = 0.752$, $P = 0.035$)。其中 HAV 在潜伏期、黄疸期及恢复期的阳性率分别为 13.3% ($4/30$)、 100% ($30/30$) 和 46.7% ($14/30$)。其 mRNA 表达水平于黄疸期增高, 最高达 7.2×10^4 Copies。

2.3 HAV 患者外周血 TIM-1、TIM-4 mRNA 表达水平与 HAV 抗体、IgM 及 IgG 滴度的相关性

由 ELISA 法测得外周血中 HAV 抗体 IgM 和 IgG 水平。不同时期 IgM、IgG 及 HAV RNA 比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。其中 IgM 潜伏期就有较高水平, 随着病情不断进展于黄疸期达峰值, 恢复期下降, 黄疸期、潜伏期和恢复期比较, 差异有统计学意

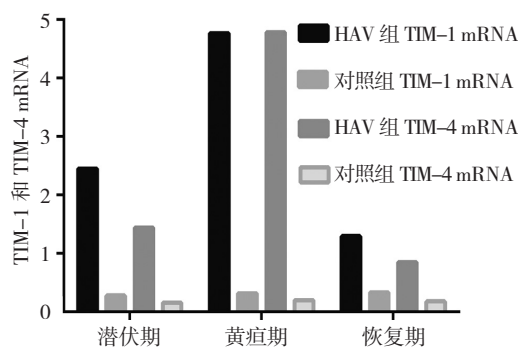


图 1 两组患者 TIM-1 和 TIM-4 mRNA 表达水平比较

义 ($H=11.221$ 和 9.478 , 均 $P=0.000$)。而 IgG 在潜伏期水平较低, 黄疸期和恢复期持续升高, 潜伏期与黄疸期、恢复期比较, 差异有统计学意义 ($H=5.324$ 和 7.332 , $P=0.011$ 和 0.002)。HAV RNA 黄疸期与潜伏期、恢复期比较, 差异有统计学意义 ($H=6.145$ 和 4.234 , $P=0.003$ 和 0.023), 潜伏期与恢复期比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。Pearson 相关性分析发现, HAV 患者病情进展不同时期血清中 TIM-1、TIM-4 mRNA 表达水平与 IgM 滴度变化呈正相关 ($r=0.790$ 和 0.900 , 均 $P=0.000$)。HAV 患者不同时期血清中 TIM-1、TIM-4 mRNA 表达水平与 IgG 滴度变化无关 ($P>0.05$)。见表 1、2。

2.4 HAV 患者不同时期 TIM-1、TIM-4 mRNA 表达水平与 ALT、AST 及 TBIL 含量的相关性

ALT、AST 及 TBIL 3 个指标均从潜伏期开始增加, 至黄疸期达峰值, 进入恢复期后逐渐下降并恢复正常。Pearson 相关性分析发现, HAV 患者不同时期血清中 TIM-1、TIM-4 mRNA 表达水平与 AST、TBIL 含量呈正相关 ($P<0.05$), ALT 含量与 TIM-1 mRNA 表达呈正相关 ($P<0.05$)。其中 TIM-1、TIM-4 mRNA 表达水平与 TBIL 含量的最相关。见表 2。

表 1 HAV 患者病情进展不同时期 IgM、IgG 及 HAV RNA 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

时期	IgM/ (IU/L)	IgG/ (IU/L)	HAV RNA
潜伏期	1 115.000 ± 594.392	273.334 ± 181.589	1 506.667 ± 531.906
黄疸期	3 193.334 ± 1 478.800	1 361.667 ± 611.342	4 444.591 ± 1 444.591
恢复期	270.000 ± 165.237	1 461.667 ± 547.358	940.025 ± 1 265.892
H 值	11.771	9.972	14.087
P 值	0.000	0.000	0.000

表 2 HAV 患者不同时期 TIM-1、TIM-4 mRNA 表达水平与 IgM、IgG 滴度, ALT、AST 及 TBIL 含量的相关性

指标	TIM-1 mRNA		TIM-4 mRNA	
	r 值	P 值	r 值	P 值
IgM	0.790	0.000	0.900	0.000
IgG	0.116	0.926	0.303	0.402
ALT	0.785	0.000	0.470	0.345
AST	0.783	0.000	0.900	0.000
TBIL	0.900	0.000	0.910	0.000

3 讨论

本实验结果显示, HAV 患者血清中有较高的 TIM-1 和 TIM-4 mRNA 表达水平, 且高于健康人群。其表达水平与 HAV 患者 HAV RNA、IgM 滴度及肝功能损伤水平成正相关。

TIM-1 集成表达于 T 细胞表面, 作为一种辅刺激分子, 对 T 细胞的调节有重要作用, 可以促进细胞因子的分泌, 增强 NKT 细胞杀伤能力, 以及调节增强肿瘤抗原相关的 1 型免疫反应。鼠系研究表明, TIM-4 是 TIM-1 的天然配体, 集成性表达于抗原提呈细胞, 特别是成熟的树突状细胞^[5-6]。同时发现 TIM-4 可诱导 TIM-1 胞内尾巴区酪氨酸磷酸化, 从而提供 1 个共刺激信号, 增强白细胞介素 -4 启动子的转录, 并激活 T 细胞核因子转录和活化蛋白 -1 促使 T 细胞增殖和细胞因子产生^[7-8]。在 T 细胞增殖调控方面, TIM-1 和 TIM-4 协同作用有重要意义^[9]。同时 TIM-1 作为 HAV 的细胞表面受体, 可能参与 HAV 的发生^[6]。笔者研究发现, 在 HAV 患者潜伏期, HAV RNA、IgM 水平还处于较低水平时, TIM-1 和 TIM-4 mRNA 表达水平相比于健康人群升高, 其灵敏性高于前者。推测 HAV 在感染肝细胞前可能先与 TIM-1 病理性结合从而激活 NKT 细胞, 给 NKT 细胞提供增殖信号, 使 NKT 细胞大量复制, 参与肝细胞的免疫损伤。相关研究也发现, HAV 与 TIM-1 结合可以介导病毒插入靶细胞膜并进入宿主细胞, 具体过程为 HAV 与 TIM-1 的 D1 结构域结合, 吸附到易感细胞表面, 在黏膜样区域的协同作用下, HAV 外壳蛋白的结构发生变化, 将病毒表面与细胞融合相关的区域暴露出来, HAV 与 TIM-1 融合, 随着融合孔增大, HAV 继而插入靶细胞膜并进入宿主细胞^[4,10-11]。

1 例 HAV 患者发生肝衰竭, 其血清中 TIM-1 和 TIM-4 mRNA 呈高表达, 且迅速发生黄疸。其肝功能急剧恶化, HAV RNA 水平却在检测下限, 同时 HAV IgM 也呈低表达, 这可能是由于 HAV 不是本身攻击肝细胞, 而是其抗原所导致的一种免疫损伤。这与国外人群研究, 严重肝衰竭 HAV 患者血清中有着低浓度的病毒载量结论一致^[11]。也有阿根廷 HAV 患儿的研究表明, HAV 感染从无症状疾病到暴发性肝衰竭与 HAV RNA 的病毒载量无关, 而与 TIM-1 多态性 (TIM-1 长形式) 相关, 严重 HAV 诱导的肝衰竭可能与长形式 TIM-1 结合甲肝病毒有效率有关^[8,12]。

笔者研究发现, 相比于 HAV RNA 病毒载量和 HAV IgM 水平, TIM-1 和 TIM-4 mRNA 水平对于 HAV 的发病及预后的预测更加灵敏, 但是实验对于预测的特异性没有深入研究, 接下来将对 TIM-1 和 TIM-4 mRNA 在 HAV 的具体发病机制作进一步研究。相信对 *TIM* 家簇基因与疾病的相关研究, 必将加深人们对 HAV 免疫发病机制的理解, 为 HAV 的预防、诊断和治疗提供新思路。

参 考 文 献:

- [1] MCINTIRE J J, UMETSU S E, AKBARI O, et al. Identification of Tapr (an airway hyperreactivity regulatory locus) and the linked Tim gene family[J]. *Nat Immunol*, 2001, 2(12): 1109-1116.
- [2] FEIGELSTOCK D, THOMPSON P, MATTOO P, et al. The human homolog of HAVcr-1 codes for a hepatitis A virus cellular receptor[J]. *J Virol*, 1998, 72(8): 6621-6628.
- [3] DE SOUZA A J, ORISS T B, O'MALLEY K J, et al. T cell Ig and mucin 1 (TIM-1) is expressed on in vivo-activated T cells and provides a costimulatory signal for T cell activation[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(47): 17113-17118.
- [4] CORRAL-JARA K F, TRUJILLO-OCHOA J L, REALPE M, et al. Conjugated bilirubin differentially regulates cd4+t effector cells and t regulatory cell function through outside-in and inside-out mechanisms: the effects of HAV cell surface receptor and intracellular signaling[J]. *Mediators Inflamm*, 2016, 2016: DOI: 10.1155/2016/1759027.
- [5] LIN J, CHEN L, KANE L P. Murine Tim-1 is excluded from the immunological synapse[J]. *F1000Res*, 2012, 1: 10.
- [6] LI J, ZHAO X, LIU X, et al. Disruption of TIM-4 in dendritic cell ameliorates hepatic warm IR injury through the induction of regulatory T cells[J]. *Mol Immunol*, 2015, 66(2): 117-125.
- [7] RENNERT P D. Novel roles for TIM-1 in immunity and infection[J]. *Immunology Letters*, 2011, 141(1): 28.
- [8] MEYERS J H, CHAKRAVARTI S, SCHLESINGER D, et al. TIM-4 is the ligand for TIM-1, and the TIM-1-TIM-4 interaction regulates T cell proliferation[J]. *Nature Immunology*, 2005, 6(5): 455-464.
- [9] RODRIGUEZ-MANZANET R, DEKRUYFF R, KUCHROO V K, et al. The costimulatory role of TIM molecules[J]. *Immunol Rev*, 2009, 229(1): 259-270.
- [10] XU X G, HU J F, MA J X, et al. Essential roles of TIM-1 and TIM-4 homologs in adaptive humoral immunity in a zebrafish model[J]. *J Immunol*, 2016, 196(4): 1686-1699.
- [11] SUN H W, WU C, TAN H Y, et al. A new development of FG-CC' siRNA blocking interaction of Tim-1 and Tim-4 can enhance DC vaccine against gastric cancer[J]. *Hepatogastroenterology*, 2012, 59(120): 2677-2682.
- [12] KIM H Y, EYHERAMONHO M B, PICHAVANT M, et al. A polymorphism in TIM1 is associated with susceptibility to severe hepatitis A virus infection in humans[J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2011, 121(3): 1111-1118.

(李科 编辑)