

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.12.005
文章编号: 1005-8982 (2018) 12-0032-04

临床研究·论著

甲型肝炎患者黏蛋白域蛋白1和4表达与抗体产生的相关性研究*

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 探讨甲型肝炎患者恢复期T细胞免疫球蛋白及黏蛋白域蛋白(TIM)1和4 mRNA水平与体液免疫的关系, 了解TIM-1和TIM-4在体液免疫抗体产生过程中的相关作用。**方法** 选取甲型病毒性肝炎典型病程的60例患者于恢复期留取血液标本, 以同期60例健康体检志愿者血液标本作为对照, qRT-PCR检测TIM-1和TIM-4 mRNA水平, ELISA检测外周血白介素4(IL-4)、白介素10(IL-10)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)和血清总Ig(IgG、IgM和IgA)水平。**结果** 甲型病毒性肝炎患者外周血TIM-1及TIM-4 mRNA的表达水平高于对照组($P < 0.05$); 甲型病毒性肝炎患者血清中IL-4和IL-10水平高于对照组($P < 0.05$); 甲型病毒性肝炎患者血清总Ig(IgG、IgM和IgA)水平高于正常对照组($P < 0.05$)。**结论** TIM-1及TIM-4水平升高可能通过提高IL-4、IL-10和TNF- α 来增强体液免疫的功能。

关键词: T细胞免疫球蛋白及黏蛋白域蛋白1; 辅助性T细胞; 体液免疫

中图分类号: R512.6

文献标识码: A

Effect of TIM-1 and TIM-4 on immunity in recovery stage of hepatitis patients*

Yao-hua Hu¹, Hui Yang², Xiang Wu¹, Chun-miao Fu¹, Yun-lu Shao¹, Cai-ling Zheng¹, Shu-wei Zhuo¹
(1. Department of laboratory medicine, Hainan Hospital of Chinese medicine, Haikou, Hainan 570203, China; 2. Department of Obstetrics and Gynecology, Hainan Hospital of Chinese medicine, Haikou, Hainan 570203, China)

Abstract: Objective To study the correlation between T cell immunoglobulin domain and mucin domain-1 (TIM-1) and TIM-4 and humoral immunity in recovery stage of hepatitis patients. **Methods** A total of 60 hepatitis patients on recovery period were chosen, and 60 healthy volunteers were involved in control group. qRT-PCR were utilized to measure expression levels of TIM-1 and TIM-4. Levels of IL-4, IL-10, TNF- α and total serum Ig were identified by ELISA. **Results** Expression levels of TIM-1 and TIM-4 were upregulated significantly in hepatitis patients compared with control group ($P < 0.05$). Serum IL-4, IL-10 and total Ig increased significantly in hepatitis patients when compared with control group ($P < 0.05$). **Conclusion** TIM-1 and TIM-4 may enhance the humoral immunity by upregulating cytokines such as IL-4 and IL-10.

Keywords: T-cell immunoglobulin domain and mucin domain 1; T helper cell; humoral immune

T细胞免疫球蛋白及黏蛋白域蛋白(T cell immunoglobulin domain and mucin domain, TIM)家族是McIntire等于2001年发现的1个新的基因家族,在

人体中包括TIM-1、TIM-3和TIM-4^[1]。TIM-1是甲型肝炎病毒受体-1(hepatitis A virus cellular receptor 1, HAVCR-1), TIM-4是TIM-1的天然配体^[2]。流行

收稿日期: 2017-02-09

*基金课题: 海南省卫生厅课题(No: 15A200012)

病学发现甲型病毒性肝炎患者痊愈后具有较强的免疫能力^[3], 且 TIM 家族参与 T 细胞的增殖活化调节 T 细胞的功能, 而 T 细胞在体液免疫抗体产生的过程中起到重要作用, 所以笔者猜测 TIM-1 和 TIM-4 可能在参与细胞免疫的同时, 也参与机体的体液免疫的强化, 本研究通过检测甲型肝炎患者外周血 TIM-1 和 TIM-4 mRNA 表达水平以及血清中白介素 4 (interleukin-4, IL-4), 白介素 10 (interleukin-10, IL-10) 和总 Ig (IgG 和 IgA), 探讨 TIM-1、TIM-4 是否对体验免疫有强化作用, 为将来开发低毒的 HAV 疫苗从而间接提高体液免疫能力用以抗肿瘤和感染提供理论支持。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2015 年 11 月-2016 年 11 月本院收治的甲型病毒性肝炎患者 60 例 (研究组)。男性 46 例, 女性 14 例; 年龄 28 ~ 42 岁, 平均 (33 ± 8.3) 岁。所有患者依靠甲型肝炎典型症状和血清中抗 HAV IgM 阳性确诊为甲型肝炎, 诊断标准参照 2000 年 9 月西安中华医学会传染病与寄生虫病学分会和肝病学分会修订的病毒性肝炎防治方案。选取同期于本院体检中心健康体检的志愿者 60 例为对照组。男性 40 例, 女性 20 例; 年龄 26 ~ 43 岁, 平均 (31 ± 9.6) 岁。入选患者及志愿者均对本研究内容充分知情, 且均自愿签署知情同意书后入组, 符合伦理学要求。

1.2 静脉血标本

于恢复期采集甲型病毒性肝炎患者静脉血抗凝 (EDTA-Na₂) 全血 2 ml 及不抗凝血 3 ml, 分离血清。同时采集健康体检志愿者静脉血抗凝 (EDTA-Na₂) 全血 2 ml 及不抗凝血 3 ml, 分离血清。

1.3 甲型肝炎患者和正常对照人群外周血单个核细胞 TIM-1 和 TIM-4 mRNA 表达水平检测

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 mRNA、TIM-4 mRNA 和甘油醛-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, 并由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

1.3.2 外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC) 的获取及总 RNA 的提取 与逆转录将聚蔗糖-泛影葡胺分离液和预先稀释的抗凝全血加

入离心管中, 密度梯度离心法 2 000 r/min 水平离心 20 min 后, 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。Trizol 法抽提外周血单个核细胞总 RNA, 人 TIM-1 和 TIM-4 基因的 cDNA 文库按照逆转录说明书宝生物工程 (大连) 有限公司合成。按照 pMD18-T Simple 载体说明书连接上述人 TIM-1 和 TIM-4 加 A 的片段。并转化感受态大肠杆菌 (Escherichia coli) DH5 α , 在链霉素选择性培养基上筛选, 按蓝白斑实验挑选白斑并用 PCR 菌液 PCR 证实。

1.3.3 实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 检测外周血单核细胞中 TIM-1 和 TIM-4 mRNA 表达 根据 NCBI GenBank 中人 GAPDH, TIM-1 和 TIM-4 的基因序列, 应用 Primer 5.0 引物设计软件设计特异性引物: GAPDH 正向 5'-CCAAACTACCTTCAACTCCATC-3', 反向 5'-AGTGATCTCCTTCTGCATCCT-3'; TIM-1 正向 5'-CGTAATCCGAGGCATAAT-3', 反向 5'-AAGCGACAACCCAAAGGT-3'; TIM-4 正向 5'-GCTAATCCCACGCATAAT-3', 反向 5'-ATGGAACAACCCAAATGT-3'。利用 Prime-STAR HSDNA 聚合酶 (TaKaRa) 分别扩增人 TIM-1 和 TIM-4 全长片段, 退火温度为 60℃, 纯化 PCR 产物。qRT-PCR 仪上进行扩增并进行实时检测, 具体为 real-time PCR 反应体系: 10 × PCR 缓冲液 2 μ l, 25 mmol/L Mg²⁺ 3.5 μ l, 10 mmol/L dNTPs 0.4 μ l, 10 μ mol/L 引物各 0.5 μ l, 普通 TaqDNA 聚合酶 1 u (1 u/ μ l), 质粒 DNA 1 μ l, 牛血清白蛋白 BSA (1 mg/ml) 2 μ l, SYBR GreenI 20 × 1 μ l, 灭菌 H₂O 8.1 μ l。空白对照管加 1.0 μ l 灭菌焦碳酸二乙酯 (DEPC) 水代替质粒 DNA, 盖上盖后瞬间离心, 使样品聚集在毛细管底部, 然后上机扩增。扩增条件为: 95℃ 预变性 4 min, 然后 3 步反应: 95℃ 变性 30 s; 60℃ 退火 30 s; 72℃ 延伸 30 s, 40 个循环, 再分别进行荧光检测, 并做熔解曲线对 PCR 产物的特异性进行鉴定, 最后反应冷却至 40℃。PCR 反应产物在 2% 琼脂糖凝胶电泳并测序检验其特异性。

1.4 ELISA 检测外周血 IL-4、IL-10、肿瘤坏死因子 α 和总 Ig (IgG、IgM 和 IgA) 水平

采用 ELISA 检测外周血 IL-4、IL-10、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor, TNF- α) 和总 Ig (IgG、IgM 和 IgA) 水平。具体步骤: 取抗凝血, 采用

12 000 r/min 离心 5 min。吸取上清液 100 μ l。室温 (18 ~ 25 $^{\circ}$ C) 温育 30 min, 倒掉板内液体, 用清洗缓冲液洗板 3 次拍干, 每孔滴加 100 μ l 酶结合物室温 (18 ~ 25 $^{\circ}$ C) 温育 30 min, 洗板 3 次拍干, 滴加显色液 A 和 B 各 100 μ l, 室温 (18 ~ 25 $^{\circ}$ C) 避光温育 15 min 后加终止液 100 μ l, 酶标仪 450 nm 读数。

1.5 统计学方法

数据分析采用 SPSS 20.0 统计软件, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组 TIM-1 和 TIM-4 mRNA 表达水平比较

由 qRT-PCR 反应曲线得到阈值循环数 (threshold cycle number, Ct) 值, 计算基因相对表达量, 采用 GAPDH 作为内参照。 $\Delta Ct = Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{GAPDH}}$ 基因表达相对量 $= 2^{-\Delta \Delta Ct} \times 100$ 。其中甲型肝炎患者 TIM-1、TIM-4 mRNA 阈值循环数为分别为 $Ct = 39.662 \sim 2.136 \log X$ ($r = 0.682$), $Ct = 30.279 \sim 3.028 \log X$ ($r = 0.748$)。测得甲型肝炎患者恢复期以及对照组血清中的 TIM-1 和 TIM-4 的 mRNA。结果见表 1, 甲型肝炎恢复期患者血清中 TIM-1 和 TIM-4 的 mRNA 的表达高于对照组 ($P < 0.05$)。

2.2 两组外周血清中 IL-4 和 IL-10 水平比较

甲型肝炎恢复期患者血清中 IL-4、IL-10 和 TNF- α 的水平均高于对照组 ($P < 0.01$)。其中 IL-4 水平在 2 次测量中变异较大, 第 2 次测量中高于对照组。见表 2。

2.3 两组组外周血清中总 Ig 水平比较

甲型肝炎恢复期患者血清 IgG 和 IgA 水平都高于对照组 ($P < 0.05$)。其中 IgG 的变异性较大, IgA 的变异较小; 甲型肝炎患者与对照组 IgM 比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 3。

表 1 两组 TIM-1 和 TIM-4 mRNA 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	TIM-1	TIM-4
研究组	3.879 \pm 0.328	3.562 \pm 0.298
对照组	0.453 \pm 0.091	0.289 \pm 0.017
t 值	5.128	6.224
P 值	0.000	0.000

表 2 两组外周血清中 IL-4、IL-10 及 TNF- α 水平比较 (pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	IL-4	IL-10	TNF- α
研究组	102.3 \pm 15.1	140.3 \pm 6.7	69.2 \pm 9.8
对照组	46.5 \pm 2.6	13.2 \pm 5.4	31.2 \pm 3.4
t 值	4.136	5.668	5.002
P 值	0.001	0.000	0.000

表 3 甲型肝炎患者和对照组外周血清中总 Ig 水平比较 (IU/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	IgG	IgM	IgA	总 Ig
研究组	250 \pm 140	15 \pm 6	210 \pm 60	640 \pm 220
对照组	150 \pm 121	13 \pm 5	140 \pm 36	470 \pm 180
t 值	3.668	0.768	2.854	3.275
P 值	0.000	0.423	0.000	0.000

3 讨论

TIM 家族目前在人类中已经发现 3 个 (TIM-1、TIM-3 和 TIM-4), 作为 T 细胞的免疫调节分子对免疫反应的调节起着重要作用^[4]。TIM-1 又称 HAVCR-1, 是 HAV 的特异性受体; TIM-4 是 TIM-1 的配体, 特异性的表达于抗原提呈细胞 (antigen present cell, APC) 表面, 且更多见于树突状细胞 (dendritic cell) 表面^[5]。研究发现, 甲型肝炎患者痊愈后血清中的 TIM-1 和 TIM-4 的 mRNA 水平高于对照组, 同时总 Ig (IgG 和 IgA) 水平也高于对照组。也就是说相比于对照组, HAV 感染后患者的体液免疫能力会高于对照组, 这与笔者的流行病学观察结果一致。

IL-4 和 IL-10 主要是由 Th2 (T help cell) 分泌, 是血液中重要的抗炎症因子, 具有促进 B 细胞增值分化以及浆细胞分泌抗体的功能。TNF- α 是由单核细胞和巨噬细胞分泌产生的, 参与细胞免疫和体液免疫。甲型肝炎患者愈后血清中 IL-4、IL-10 和 TNF- α 表达多于对照组, 这可能是由于 TIM-1 和 TIM-4 传递一种细胞信号刺激 Th2 使其分泌的 IL-4 和 IL-10 增多, 同时刺激单核巨噬分泌 TNF- α 增多。这与国外甲型肝炎患者恢复期 Th2 的功能增强的研究结果一致, 发现 TIM-4 可诱导 TIM-1 胞内尾巴区酪氨酸磷酸化, 提供 1 个共刺激信号, 增强 IL-4 启动子的转录, 并激活 T 细胞核因子 (nuclear factor of activated T cells, NFAT) 转录和活化蛋白 1 (AP-1) 促

使 T 细胞增殖和细胞因子产生^[6-8]。最新在斑马鱼上关于 TIM-1 和 TIM-4 的研究也证实 TIM-1 可以增强体液免疫能力而且具有记忆能力, 这与甲型肝炎患者长期的自我保护的能力是一致的^[9]。国外有研究发现, TIM-1 和 TIM-4 可以相互作用通过影响树突状细胞 DC 来影响体液免疫的能力, 且与 Th2 细胞所分泌的细胞因子 IL-4 和 IL-10 相关^[11-12]。最近流行病学发现, 甲型病毒性肝炎患者预后患哮喘和类风湿等过敏性和自身免疫性疾病的风险会降低, 而对于其他病毒感染也会有较强的抵抗能力, 研究认为可能是由于 TIM-1 和 TIM-4 之间传递一种双向调节信号, 可以既提高免疫耐受同时激活免疫防御^[10-11]。但是实验还存在一些不足: TIM-1 和 TIM-4 的具体相互关系以及如何刺激 Th2 细胞还是不清楚; 笔者只是通过 IL-4 和 IL-10 间接反映 Th2 细胞的能力, 至于是由于 Th2 细胞的增值还是活化还不清楚; 同时样本量还是偏小。下一步将通过基因敲除的大鼠同时结合免疫共沉淀技术进一步探讨 TIM-1 和 TIM-4 与 Th2 细胞的具体作用机制; 利用流式细胞方法进一步检测 Th2 细胞的数量来探讨 Th2 细胞的增值和活化; 利用基因芯片技术进一步从 TIM-1 和 TIM-4 基因多态性角度进一步阐述其对体液免疫调节的复杂机制。

TIM-1 和 TIM-4 是调节 T 细胞功能的重要分子, 对 T 细胞的影响是很容易理解, 但如何调节体液免疫一直不太清楚。通过 T 细胞影响体液免疫还是直接影响 B 细胞来实现调节体液免疫也不清楚。本研究发现, TIM-1 和 TIM-4 可能是通过刺激 Th2 细胞分泌 IL-4 和 IL-10 来激活体液免疫。对甲型病毒性肝炎患者而言, HAV 病毒会特异性的结合于 TIM-1, TIM-1 高表达会较持续的激活 T 细胞进一步影响 B 细胞。从而达到进一步保护机体的作用。本研究结果认为, 可以通过接种低毒性的甲肝疫苗, 从而达到刺激 TIM-1 和 TIM-4 的表达, 从而给机体提供较强的细胞免疫和体液免疫的能力。笔者相信通过对甲型病毒性肝炎患者血清中的 TIM-1 和 TIM-4 的进一步研究, 可为 T 细胞和 B 细胞之间的信号传递提供一种新的方式^[13]。

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] RENNERT P D. Novel roles for TIM-1 in immunity and infection[J]. *Immunology Letters*, 2011, 141(1): 28-35.
- [3] 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.
- [4] RODRIGUEZ-MANZANET R, DEKRUYFF R, KUCHROO V K, et al. The costimulatory role of TIM molecules[J]. *Immunol Rev*, 2009, 229(1): 259-270.
- [5] 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.
- [6] ZHAO C Q, LI T L, HE S H, et al. Specific immunotherapy suppresses Th2 responses via modulating TIM1/TIM4 interaction on dendritic cells[J]. *Allergy*, 2010, 65(8): 986-995.
- [7] YEUNG M Y, DING Q, BROOKS C R, et al. TIM-1 signaling is required for maintenance and induction of regulatory B cells[J]. *American Journal of Transplantation*, 2015, 15(4): 942-953.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] 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 U S A*, 2005, 102(47): 17113-17118.
- [11] CHAKRAVARTI S, SABATOS C A, XIAO S, et al. Tim-2 regulates T helper type 2 responses and autoimmunity[J]. *The Journal of Experimental Medicine*, 2005, 202(3): 437-444.
- [12] XIAO S, ZHU B, JIN H, et al. Tim-1 stimulation of dendritic cells regulates the balance between effector and regulatory T cells[J]. *Eur J Immunol*, 2011, 41(6): 1539-1549.
- [13] DU P, XIONG R, LI X, et al. Immune regulation and antitumor effect of TIM-1[J]. *Journal of Immunology Research*, 2016(2016): 1-6.

(王荣兵 编辑)