

• 临床检验研究论著 •

乙型肝炎、肝硬化和肝癌患者 ROR γ t mRNA 表达的研究

刘 军

(聊城市中心血站, 山东聊城 252000)

摘 要:目的 研究乙型肝炎、肝硬化和肝癌患者外周血单个核细胞 Th17 细胞特异转录因子——ROR γ t 的 mRNA 表达。方法 采用实时定量 RT-PCR 测定乙型肝炎、肝硬化和肝癌患者外周血单个核细胞 ROR γ t 基因 mRNA 表达。结果 健康对照组外周血单个核细胞 ROR γ t mRNA 表达为 0.31 ± 0.13 , 乙型肝炎组为 1.23 ± 0.25 , 肝硬化组为 1.36 ± 0.21 , 肝癌组为 1.42 ± 0.27 。乙型肝炎、肝硬化和肝癌组外周血单个核细胞 ROR γ t mRNA 表达与健康对照组比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。结论 乙型肝炎、肝硬化和肝癌患者外周血单个核细胞 ROR γ t mRNA 表达升高, ROR γ t 在乙型肝炎、肝硬化和肝癌的发病中具有重要作用。

关键词: 肝炎, 乙型; 肝硬化; 肝肿瘤; 转录因子
DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.19.012 文献标识码: A 文章编号: 1673-4130(2013)19-2524-02

The study of PBMC ROR γ t mRNA expression in patients with chronic hepatitis B, cirrhosis and liver cancer

Liu Jun

(Centre Blood Bank of Liaocheng City, Liaocheng, Shandong 252000, China)

Abstract: Objective To study peripheral blood mononuclear cells Th17 cell specific transcription factor ROR γ t mRNA expression in patients with chronic hepatitis B, cirrhosis and liver cancer. **Methods** PBMC ROR γ t mRNA expression in patients with chronic hepatitis B, cirrhosis and liver cancer were measured with real time RT-PCR. **Results** Healthy control group PBMC ROR γ t mRNA expression was 0.31 ± 0.13 , hepatitis B group was 1.23 ± 0.25 , liver cirrhosis group was 1.36 ± 0.21 , liver cancer group was 1.42 ± 0.27 . Compared with health control group, hepatitis B, liver cirrhosis and liver cancer group PBMC ROR γ t mRNA expression have significant differences ($P < 0.01$). **Conclusion** PBMC mRNA γ t expression increased in patients with chronic hepatitis B, liver cirrhosis and liver cancer, ROR γ t plays an important role in the pathogenesis of hepatitis B, liver cirrhosis and liver cancer.

Key words: hepatitis B; liver cirrhosis; liver neoplasms; transcription factors

Th17 细胞是在研究实验性自身免疫性脑脊髓炎鼠模型中发现的新的 Th 细胞亚型, 被认为与免疫介导的组织损伤有关, 该细胞亚型称为 Th17 细胞^[1]。ROR γ t 基因的表达激活促进前体细胞分化为 Th17 细胞, 是 Th17 细胞的特异转录因子^[2]。乙型肝炎、肝硬化和肝癌的发病和机体的免疫功能有关, 本文通过检测乙型肝炎、肝硬化和肝癌患者外周血单个核细胞 ROR γ t 的 mRNA 表达, 探讨 Th17 细胞特异转录因子 ROR γ t 在乙型肝炎、肝硬化和肝癌发病中的作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择乙型肝炎患者 63 例, 年龄 (51 ± 16.3) 岁; 肝硬化患者 56 例, 年龄 (53 ± 10.3) 岁。乙型肝炎和肝硬化疾病组诊断和分类按 2000 年中华医学会传染病与寄生虫学会、肝病学分会修订的诊断标准^[3]。肝癌患者 52 例, 年龄 (54 ± 8.6) 岁。肝癌病例参照 2001 年第五届全国传染病、寄生虫病学术会议修订的诊断分型标准进行诊断分型^[4]。肝硬化和肝癌患者均经影像和病理学检查确诊。健康对照组 30 例, 为正常健康体检人员, 均无心、脑血管疾病和肝肾疾病等器质性病变, 年龄 (51 ± 15.8) 岁。

1.2 主要试剂 淋巴细胞分离液 (中国医学科学院血液学研究所), Trizol 抽提试剂盒 (美国 Invitrogen 公司), Money 鼠白血病病毒 (MMLV) 反转录酶 (美国 Promega 公司), SYBR Green I 嵌合荧光 Real Time PCR 试剂盒 (大连宝生物公司)。

1.3 外周血单个核细胞的提取 取乙肝、肝硬化、肝癌患者和健康对照外周静脉血 2 mL, EDTA-K₂ 抗凝, 对抗凝血进行离心, $3\ 000\text{ r/min}$, 室温离心 10 min, 取白细胞层约 1 mL, 生理盐

水与白细胞层液 1 : 1 混匀后, 小心加于 2 mL 淋巴细胞分离液面上, 水平离心机上离心, $3\ 000\text{ r/min}$, 室温离心 25 min, 用吸管小心吸取云雾层, 加入 1.5 mL eppendorf 管中, 水平离心机上离心, $7\ 000\text{ r/min}$, 室温离心 10 min, 弃上清。

1.4 外周血单个核细胞总 RNA 的提取 Trizol 抽提试剂盒提取上述淋巴细胞分离液分离单个核细胞的总 RNA, 用紫外分光光度计测定提取的总 RNA 的吸光度 (A) 值, A_{260}/A_{280} 在 1.8~2.0 范围内, 表明所提取的 RNA 浓度较纯, 并根据 A 值计算提取的 RNA 浓度。

1.5 外周血单个核细胞 ROR γ t 基因引物序列设计 通过 genebank 检索 ROR γ t 基因序列, 输入 Primer Premier 5.0 软件设计基因引物, 同时检测看家基因 B-actin 水平作为 RNA 定量标准, 引物由上海生工合成引物。外周血单个核细胞 ROR γ t 基因引物序列为: 上游为 5'-CCT GGG CTC CTC GCC TGA CC-3', 下游为 5'-TCT CTC TGC CCT CAG CCT TGC C-3'; 内参 β -actin 引物: 上游 5'-TGA AGG TCG GTG TCA ACG GA-3', 下游 5'-GAT GGC ATG GAC TGT GGT C-3'。

1.6 实时定量 RT-PCR 首先反转录合成 cDNA, 在 eppendorf 管中加入 $5 \times$ RT buffer 4 μL , dNTP 1 μL , MLV 1 μL , Oligo-dT 引物 1 μL , 样品 RNA 1 μg , 补足双蒸水为 20 μL 。37 $^{\circ}\text{C}$ 60 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ RNA 酶灭活 5 min。后在 Light Cycler Real Time PCR 扩增仪上扩增外周血单个核细胞 ROR γ t 基因和 beta-actin 基因, 分别取相应的上下游引物进行 PCR 扩增。应用 TaKaRa 公司产品荧光染料实时定量 PCR 试剂盒, 在 eppendorf 管中加入 SYBR Premix Ex Taq ($2 \times$) 10 μL , 上游引物

0.4 μ L,下游引物 0.4 μ L ,cDNA 2 μ L,补足双蒸水至 20 μ L。95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s,95 $^{\circ}$ C 变性 5 s,55 $^{\circ}$ C 退火 20 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 15 s,40 个循环,在延伸阶段检测荧光信号。后 95 $^{\circ}$ C 1 s,65 $^{\circ}$ C 30 s,95 $^{\circ}$ C 1 s 进行熔解曲线分析。根据 2^{- Δ Ct} 值做 mRNA 表达的相对定量分析。

1.7 统计学处理 采用 SPSS14.0 软件进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用两样本 *t* 检验,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

健康对照组外周血单个核细胞 ROR γ t mRNA 表达为 0.31 $\pm$ 0.13,乙型肝炎组为 1.23 $\pm$ 0.25,肝硬化组为 1.36 $\pm$ 0.21,肝癌组为 1.42 $\pm$ 0.27。乙型肝炎、肝硬化和肝癌组外周血单个核细胞 ROR γ t mRNA 表达与健康对照组比较,差异均有统计学意义(*P*<0.01),见表 1。乙型肝炎、肝硬化和肝癌组之间外周血单个核细胞 ROR γ t mRNA 表达比较,差异无统计学意义(*P*>0.05)。

表 1 乙型肝炎、肝硬化和肝癌患者外周血单个核细胞 ROR γ t mRNA 表达($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	ROR γ t mRNA
健康对照组	30	0.31 $\pm$ 0.13
乙型肝炎组	63	1.23 $\pm$ 0.25*
肝硬化组	56	1.36 $\pm$ 0.21*
肝癌组	52	1.42 $\pm$ 0.27*

*:*P*<0.01,与健康对照组比较。

3 讨 论

乙型肝炎发病机制十分复杂,宿主免疫调节紊乱是导致不能有效清除病毒、病情迁延不愈的重要原因,肝硬化和肝癌与乙型肝炎关系密切。许多研究表明 Th1、Th2 细胞亚群的比例失衡、功能失调是导致乙型肝炎、肝硬化和肝癌发病的重要因素。

Th17 细胞是一类不同于 Th1 和 Th2 的 CD4⁺T 细胞新亚群,此类细胞以分泌 IL-17 为主而得名。ROR γ t 是控制 Th17 细胞分化的特异转录因子,对 Th17 细胞分化起关键作用,编码于 Rorc 位点^[2],为维 A 酸相关-孤儿核激素受体家族成员,

对致病性 Th17 细胞的分化中起关键作用^[1],并维持 Th17 细胞的分泌功能^[5]。

Th17 细胞作为炎症细胞,在参与炎症和自身免疫性疾病的病理进程中发挥了重要的作用。大量证据表明 ROR γ t 在乙型肝炎、肝硬化和肝癌的发生、发展中具有重要的作用。乙型肝炎是一种长期的慢性炎症,是机体免疫受到损害的一种表现。本研究显示,乙型肝炎、肝硬化和肝癌组外周血单个核细胞 ROR γ t mRNA 表达与健康对照组比较,差异有统计学意义(*P*<0.01)。当 ROR γ t 表达增强时,T 细胞的分化趋向于 Th17 细胞易于发生炎症损伤,容易造成慢性乙型肝炎,随后发展为肝硬化,慢性炎症长期不愈可诱导肿瘤的发生而发展成为肝癌^[6]。

综上所述,Th17 细胞特异转录因子 ROR γ t 在乙型肝炎、肝硬化和肝癌外周血单个核细胞中高表达,很可能是 ROR γ t 参与了乙型肝炎、肝硬化和肝癌的免疫进程,ROR γ t 在乙型肝炎、肝硬化和肝癌的发生、发展中具有重要的作用。

参考文献

[1] Langrish CL,Chen Y,Blumenschein WM,et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation[J]. JEM, 2005,201(3):233-240.
[2] Ivanov II,McKenzie BS,Zhou L,et al. The orphan nuclearreceptor ROR γ t directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells[J]. Cell,2006,126(11):1121-1133.
[3] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会和肝病学会. 病毒性肝炎防治方案[J]. 中华肝病杂志,2000,8(5):324-329.
[4] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学会. 病毒性肝炎防治方案[J]. 中华传染病杂志,2001,19(1):56-62.
[5] Manel N,Unutmaz D,Littman DR. The differentiation of human Th-17 cells requires transforming growth factor- β and induction of the nuclear receptor ROR γ t[J]. Nat Immunol, 2008,9(4):641-649.
[6] Rizvi M,Pathak D,Freedm an JE,et al. CD40-CD40ligand interactions in oxidative stress inflammation and vascular disease[J]. Trends Mol Med,2008,14(12):530- 538.

(收稿日期:2013-02-25)

(上接第 2523 页)

海市大人人群中地中海贫血的遗传筛查和产前诊断[J]. 中华医学遗传学杂志,2008,25(3):256-261.
[2] Liao C,Mo QH,Li J,et al. Carrier screening for alpha- and beta-thalassemia in pregnancy: the results of an 11-year prospective program in Guangzhou Maternal and Neonatal hospital[J]. Prenat Diagn,2005,25(2):163-171.
[3] Samavat A,Modell B. Iranian national thalassaemia screening programme[J]. BMJ. 2004,329(7435):1134-1137.
[4] 蔡稔,梁昕,潘莉珍,等. 血液学指标在育龄人群地贫筛查中的诊断价值[J]. 中国优生与遗传杂志,2003,11(1):129-132.
[5] 丁高依,郑雁坚,王治伟. MCV、MCH 和 RDW 对孕前期筛查地中海贫血的意义[J]. 白求恩军医学院学报,2011,9(3):163-166.
[6] 邓捷,刘新质,刘颖琳,等. 应用平均红细胞体积测定法及红细胞脆性一管定量法筛查地中海贫血[J]. 中华妇产科杂志,2000,35(6):610-612.
[7] 何雅军,马福广,杨小华. 2000 例血红蛋白全自动琼脂糖凝胶电泳检测血红蛋白异常结果分析[J]. 中国优生与遗传杂志,2001,12(3):24-25.
[8] Sirichotiyakul S,Wanapirak C,Srisupundit K,et al. A comparison

of the accuracy of the corpuscular fragility and mean corpuscular volume tests for the alpha-thalassemia 1 and beta-thalassemia traits [J]. Int J Gynaecol Obstet,2009,107(1):26-29.
[9] Mamtani M,Jawahirani A,Das K,et al. Bias-corrected diagnostic performance of the naked-eye single-tube red-cell osmotic fragility test (NESTROFT): an effective screening tool for beta-thalassemia [J]. Hematology,2006,11(4):277-286.
[10] Dumars KW,Boehm C,Eckman JR,et al. Practical guide to the diagnosis of thalassemia. Council of Regional Networks for Genetic Services (CORN) [J]. Am J Med Genet,1996,62(1):29-37.
[11] Sirichotiyakul S,Maneerat J,Sa-nguanseemsri T,et al. Sensitivity and specificity of mean corpuscular volume testing for screening for alpha-thalassemia-1 and beta-thalassemia traits[J]. J Obstet Gynaecol Res,2005,31(3):198-201.
[12] Chang PL,Kuo IT,Chiu TC,et al. Fast and sensitive diagnosis of thalassemia by capillary electrophoresis[J]. Anal Bioanal Chem, 2004,379(3):404-410.

(收稿日期:2013-03-13)