

论著 · 临床研究

慢性乙型肝炎患者共感染 EBV 时外周血单个核细胞 IL-21 mRNA 的表达水平^{*}

张 莉¹, 许红英², 杨 丽¹, 杨学文^{1△}

(江苏省中医院:1. 检验科;2. 病理科, 南京 210029)

摘要:目的 探讨慢性乙型肝炎患者共感染 EB 病毒(EBV)时外周血单个核细胞(PBMC)白细胞介素-21(IL-21) mRNA 的表达水平情况。**方法** 收集 20 例乙型肝炎病毒(HBV)、EBV 共感染者(病例组),20 例单纯 HBV 感染者(对照组)和 20 例体检健康者(健康组)血样及临床资料,Real-time PCR 分析外周血 PBMC IL-21 mRNA 表达。**结果** 病例组 IL-21 mRNA 表达水平明显高于对照组和健康组($P<0.05$),对照组 IL-21 mRNA 表达水平明显高于健康组($P<0.05$);病例组患者均发低热,对照组、健康组体温正常;病例组 ALT、AST 明显高于对照组和健康组($P<0.05$),对照组 ALT、AST 亦明显高于健康组($P<0.05$)。**结论** IL-21 在 HBV 感染者中表达上调,HBV、EBV 共感染者更甚,其可能是机体控制病毒复制的机制之一。

关键词:乙型肝炎; EB 病毒; 白细胞介素-21

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.17.015

中图法分类号:R446.11

文章编号:1673-4130(2018)17-2131-03

文献标识码:A

Expression level of PBMC IL-21 mRNA in peripheral blood of chronic hepatitis B patients with CO infection of EBV^{*}

ZHANG Li¹, XU Hongying², YANG Li¹, YANG Xuewen^{1△}

(1. Department of Clinical Laboratory, 2. Department of Pathology, Jiangsu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing, Jiangsu 210029, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of IL-21 mRNA in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of patients with chronic hepatitis B co-infected with EBV. **Methods** Blood samples and clinical data of 20 HBV, EBV co-infected patients (case group), 20 HBV-infected patients (control group) and 20 healthy subjects (healthy group) were collected. Real-time PCR analysis of peripheral blood PBMC IL-21 mRNA expression. **Results** The expression of IL-21 mRNA in the case group was significantly higher than that in the control group and the healthy group ($P<0.05$). The expression of IL-21 mRNA in the control group was significantly higher than that in the healthy group ($P<0.05$). The control group and healthy group had normal body temperature; ALT and AST in the case group were significantly higher than those in the control group and healthy group ($P<0.05$), and ALT and AST in the control group were significantly higher than those in the healthy group ($P<0.05$). **Conclusion** IL-21 is up-regulated in HBV-infected patients, and HBV and EBV co-infected patients are more likely, which may be one of the mechanisms by which the body controls viral replication.

Key words: hepatitis B; EB virus; interleukin -21

在世界范围内,中国已被确定为乙型肝炎病毒(HBV)感染高发地区^[1]。乙型肝炎是一种影响人体健康的重大疾病,感染后病毒持续存在,治疗难度大。爱泼斯坦-巴尔病毒(EBV)也被称为人类疱疹病毒 4,是疱疹病毒家族的成员,这是最常见的人类病毒之一,EBV 遍布世界各地,大多数人在他们生命中某个时候感染了 EBV,EBV 通常通过体液(主要是唾液)

传播^[2]。在临床中会发现某些慢性乙型肝炎患者表现低热症状,且难退,经检验为共感染 EBV。白细胞介素-21(IL-21)是一种对先天和适应性免疫反应具有广泛作用的细胞因子^[3],本文观察了 IL-21 mRNA 在 HBV、EBV 感染免疫的表达水平。

1 资料与方法

1.1 一般资料 病例组:明确诊断慢性乙型肝炎患

^{*} 基金项目:江苏省中医药管理局科技项目(No:JIZ13062)。

作者简介:张莉,女,副主任技师,主要从事免疫学检验工作。△ 通信作者, E-mail:jsfzsw@163.com。

本文引用格式:张莉,许红英,杨丽,等.慢性乙型肝炎患者共感染 EBV 时外周血单个核细胞 IL-21 mRNA 的表达水平[J].国际检验医学杂志,2018,39(17):2131-2133.

者(HBV-DNA 在 $5.0\times10^3\sim5.0\times10^5$ IU) 20 例,其中男 13 例,女 7 例,平均(37 ± 7)岁,低热难退,检验确定感染 EB 病毒(EB-DNA 阳性),无淋巴结肿大,无鼻咽症状;对照组:明确诊断的慢性乙型肝炎患者(HBV-DNA 在 $5.0\times10^3\sim5.0\times10^5$ IU) 20 例,其中男 10 例,女 10 例,平均(39 ± 5)岁,无发热症状,检验确定未感染 EBV(EB-DNA 阴性);健康组:健康体检者 20 例,其中男 10 例,女 10 例,平均(35 ± 5)岁,指标一切正常。一般资料比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

1.2 仪器与试剂 ABI DX 实时荧光定量 PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司),AU5800 全自动生化仪(美国 Beckman Coulter),高速冷冻离心机、紫外分光光度计(德国 Eppendorf 公司)。ALI、AST 检测试剂(德国 LABO),Trizol(大连宝生物 Takara),异丙醇、三氯甲烷、无水乙醇(上海久亿),转录酶 M-MLV 等逆转录试剂、PCR 试剂(美国 Promega 公司),引物、探针委托上海 Invitrogen 公司合成。

1.3 方法

1.3.1 Real-time PCR 引物探针设计 根据 GenBank 中人源 IL-21、GAPDH 核酸序列,选定 CDS,用 Primer Express 3.0 软件跨内含子设计引物和探针,经过 Blast 验证。IL-21: Forward Primer: 5'-AAC CAC CCA AAG AAT TCC TAG AAA-3', Reverse Primer: 5'-ACT GCA AGT TAG ATC CTC AGG AAT C-3', Probe: 5'-CAT CAG CAT CTG TCC TCT AGA ACA CAC GGA-3', 扩增片段长度 114 bp。GAPDH: Forward Primer: 5'-ACC CAC TCC TCC ACC TTT GA-3', Reverse Primer: 5'-TGT TGC TGT AGC CAA ATT CGT T-3', Probe: 5'-CAT TGC CCT CAA CGA CCA CTT TGT CA-3', 扩增片段长度 100 bp。探针 5'标记 FAM 荧光报告基团,3'端标记 TAMRA 荧光淬灭基团。

1.3.2 外周血 PBMC 提取 采用密度梯度离心法,15 mL 离心管导入 3 mL Ficoll 液,倾斜于水平 30° ,将充分混匀的病例组、对照组、健康组新鲜全血 2 mL 缓缓倾注,确保分层,2 000 r/min 离心 20 min,完全提取云雾层,13 000 r/min 离心 5 min,弃上清。

1.3.3 PBMC 总 RNA 提取 每管 PBMC 加入 0.5 mL Trizol,震荡混匀,放置 5 min,经氯仿萃取→异丙醇沉淀→乙醇洗涤后,加入 30 μ L 无菌 DEPC 水溶解 RNA;采用紫外分光光度计检测 RNA 的吸光值 A260、A280,换算 A260/A280 比值分析 RNA 的纯度,根据“总 RNA(μ g/mL)=A260 $\times$ 稀释倍数 $\times 40$ ”公式计算 RNA 浓度。

1.3.4 cDNA 的合成 总 RNA 2 μ g,Oligo(dT) 18 (50 pmol/ μ L) 1 μ L、补 DEPC 水至 12 μ L;70 $^\circ$ C 5 min,冰上急冷 5 min;在前期体系中加入 5 $\times$ RT buffer 4 μ L、dNTP(10 mmol/L) 1 μ L、Rnase inhibitor (400 U/ μ L)0.5 μ L、M-MLV 酶(200 U/ μ L)1 μ L,补

DEPC 水至 20 μ L;42 $^\circ$ C 60 min,85 $^\circ$ C 5 min。cDNA 置于-20 $^\circ$ C 保存备用。

1.3.5 Real-time PCR 体系及反应条件 反应体系:10 $\times$ PCR Buffer 2.5 μ L,dNTP(10 mmol/L) 0.5 μ L,MgCl₂(25 mmol/L)1.5 μ L,引物(10 mmol/L)各 0.25 μ L,探针(10 mmol/L) 0.25 μ L,TaqDNA 聚合酶 1.25 U,cDNA 2 μ L,去离子水补足 25 μ L。反应条件:95 $^\circ$ C 预变性 2 min,(95 $^\circ$ C 15 s,56 $^\circ$ C 35 s)40 个循环并读取荧光信号,IL-21、GAPDH 反应条件相同。

1.3.6 标准品构建 将 IL-21、GAPDH PCR 产物凝胶电泳切取纯化后与 pGEM-T 载体连接,构建重组质粒并测序,与 GenBank 中 mRNA 序列比对,确定完全正确后,提取重组质粒,纯化、定量,将重组质粒倍比稀释为 $1.0\times10^6\sim1.0\times10^3$ copy/ μ L 共 4 个梯度,作为 PCR Real-time 标准品。

1.4 统计学处理 用 SPSS16.0 软件进行统计学分析,IL-21 mRNA 表达水平以 IL-21/GAPDH 比值表示,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组数据比较用单因素方差分析,两两比较用 LSD 法,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PBMC IL-21 mRNA Real-time PCR 分析

2.1.1 PBMC RNA 提取的纯度、浓度 根据 PBMC 总 RNA A 值,A260/A280 比率均在 1.8~2.0 之间,浓度为(2.1 ± 0.6)mg/g,表明 RNA 的纯度、丰度良好。

2.1.2 PCR 扩增曲线良好,IL-21 标准品相关系数 $R^2>0.98$, $Y=-3.21X+38.22$,扩增效率良好;GAPDH 标准品相关系数 $R^2>0.98$, $Y=-3.27X+39.13$,扩增效率良好。

2.1.3 各组 PBMC IL-21 mRNA 表达水平 病例组 IL-21 mRNA 表达水平明显高于对照组、健康组,差异有统计学意义($P<0.05$),对照组 IL-21 mRNA 表达水平明显高于健康组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

表 1 各组 PBMC IL-21 mRNA 表达水平($\bar{x}\pm s$)

组别	n	IL-21/GAPDH
病例组	20	0.389 $\pm$ 0.285* [#]
对照组	20	0.087 $\pm$ 0.082 [#]
健康组	20	0.045 $\pm$ 0.029

注:与对照组比较,* $P<0.05$;与健康组比较,[#] $P<0.05$

表 2 各组血清 ALT、AST 的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	ALT(U/L)	AST(U/L)
病例组	20	77.45 $\pm$ 54.02* [#]	56.70 $\pm$ 41.12* [#]
对照组	20	35.60 $\pm$ 26.12 [#]	30.15 $\pm$ 16.11 [#]
健康组	20	20.85 $\pm$ 11.50	23.65 $\pm$ 11.37

注:与对照组比较,* $P<0.05$;与健康组比较,[#] $P<0.05$

2.2 各组血清 ALT、AST 的比较 病例组 ALT、

AST 明显高于对照组、健康组,差异有统计学意义($P<0.05$);对照组 ALT、AST 亦明显高于健康组,差异有统计学意义($P<0.05$),但 60% 左右对照组慢性乙型肝炎患者转氨酶水平处于检验科出具报告的参考范围内。见表 2。

3 讨论

HBV 介导的肝脏疾病可能导致肝纤维化,肝硬化,并最终导致肝癌。有研究显示抗炎和促炎细胞因子的上调或下调可能在非肝硬化慢性乙型肝炎患者进展为肝硬化和急性发作中起作用^[4]。亦有研究显示异常的 IL-21 反应可能与慢性乙型肝炎的进展有关,产生 IL-21 的 CD4⁺ T 细胞是 HBV 抗原清除所必需的^[5-6]。

很多人在童年时代就感染过 EBV,感染 EBV 自愈或治愈后,病毒会在体内潜伏(无活性),在某些情况下,EBV 可能会重新激活,并不会总是显现症状,但免疫系统减弱的人更容易显现症状。值得极力关注的是病毒再次激活后可能会具传染性^[2]。国内研究显示传染性单核细胞增多症的患儿外周血中存在异常增高的 IL-21,其可能协同参与了发病过程^[7]。另有研究阐明 IL-21 调节 EBV 影响的是 B 细胞裂解周期基因和蛋白的表达^[8]。

IL-21 是细胞因子常见 γ 链(γ_c)家族的成员^[9],各种 CD4⁺ T 细胞谱系能够产生 IL-21,定位于 B 细胞,IL-21 具有影响先天免疫应答和适应性免疫应答的能力,目前的研究支持其在自身免疫,肿瘤特异性反应,以及对感染免疫力的影响力^[10-12]。感染的严重程度以及病原体是否被清除或持续存在,与先天性和适应性免疫反应密切相关。IL-21 在促进 B 细胞应答和浆细胞形成中的作用,在确保对急性感染的持久 T 细胞免疫中的必要性角色似乎是微妙的^[13-14]。

有关 IL-21 在病毒感染方面的研究至今无明确的指示性的定论,尤其是乙型肝炎病毒感染者共感染 EB 病毒方面,无人涉及。本实验单纯的就 HBV 单感染和 HBV、EBV 共感染患者 PBMC IL-21mRNA 表达水平和转氨酶进行了分析,发现共感染患者 IL-21mRNA 表达水平是升高的,伴随肝损所致的转氨酶升高,但 HBV-DNA 水平并无特殊的波动,同时大多数患者需经大于 1 周的干预治疗后,EBV-DNA 检测阴性。

4 结论

根据结果有两个推论:(1)慢性乙型肝炎患者免疫力的低下,可能导致了患者 EBV 的重新激活;(2)患者初次感染 EBV,导致肝脏损害,但其感染对 HBV 病毒的复制并无太大的影响。无论哪种推论 IL-21 均在其中发挥了作用,后续本课题组会着力于共感染患者 CD4⁺ T(Th1/ Th2、Th 17/ Tfh),CD8⁺ T, NK 细胞的分析,继续探讨。需要提醒临床的是乙型肝炎患者低热难退,检测 EBV-DNA 是必要的,其有利于治疗方案确定,及防止院内感染。

参考文献

- [1] YAN Y P, SU H X, JI Z H, et al. Epidemiology of Hepatitis B Virus Infection in China: Current Status and Challenges[J]. J Clin Transl Hepatol, 2014, 2(1): 15-22.
- [2] KAWAMOTO K, MIYOSHI H, SUZUKI T, et al. A distinct subtype of Epstein Barr virus positive T/NK-cell lymphoproliferative disorder: Adult patients with chronic active Epstein Barr virus infection-like features [J]. Haematologica, 2018, 103(6): 1018-1028.
- [3] YI J S, COX M A, ZAJAC A J. Interleukin-21: a multi-functional regulator of immunity to infections [J]. Microbes Infect, 2010, 12(14/15): 1111-1119.
- [4] HUDU S A, NIAZLIN M T, NORDIN S A, et al. Expression of Human Cytokine Genes Associated with Chronic Hepatitis B Disease Progression [J]. Iran J Immunol, 2017, 14(4): 281-292.
- [5] PAN Q, YU Y, TANG Z, et al. Increased levels of IL-21 responses are associated with the severity of liver injury in patients with chronic active hepatitis B [J]. J Viral Hepat, 2014, 21(9): 78-88.
- [6] 王驭风, 钱卫, 夏澍. HBV 不同感染状态者血清 IL-21、IFN- γ 水平变化及其临床意义 [J]. 山东医药, 2017, 57(4): 71-73.
- [7] 石沁, 宋建新. 传染性单核细胞增多症患儿血清 IL-21 的变化及意义 [J]. 中外医学研究, 2013(16): 63.
- [8] KONFORTE D, PAIGE C J. Interleukin-21 regulates expression of the immediate-early lytic cycle genes and proteins in Epstein-Barr Virus infected B cells [J]. Virus Res, 2009, 144(1/2): 339-343.
- [9] SPOLSKI R, LEONARD W J. Interleukin-21: basic biology and implications for cancer and autoimmunity [J]. Annu Rev Immunol, 2008(26): 57-79.
- [10] YI J S, INGRAM J T, ZAJAC A J. IL-21 deficiency influences CD8 T cell quality and recall responses following an acute viral infection [J]. J Immunol, 2010, 185(8): 4835-4845.
- [11] VYAS A K, TREHANPATI N. Commentary: IL-21 receptor antagonist inhibits differentiation of b cells toward plasmablasts upon alloantigen stimulation [J]. Front Immunol, 2017(8): 934.
- [12] WU Y, VAN BESOUW N M, SHI Y, et al. The Biological Effects of IL-21 Signaling on B-Cell-Mediated Responses in Organ Transplantation [J]. Front Immunol, 2016(7): 319.
- [13] FROHLICH A, KISIELOW J, SCHMITZ I, et al. IL-21R on T cells is critical for sustained functionality and control of chronic viral infection [J]. Science, 2009, 324(5934): 1576-1580.
- [14] SHEN Z, YANG H, YANG S, et al. Hepatitis B virus persistence in mice reveals IL-21 and IL-33 as regulators of viral clearance [J]. Nat Commun, 2017, 8(1): 2119.