



# 目 录

目 录.....	1
英文缩略词表.....	1
中英文摘要.....	2
前 言.....	4
实验目的.....	5
材料与方法.....	5
一、研究对象及项目.....	5
二、主要仪器和试剂.....	6
三、实验方法.....	8
四、统计分析.....	14
结 果.....	14
一、样本临床基本情况.....	14
二、提取 PBMC 总 RNA 结果.....	15
三、全基因组表达谱芯片检测结果.....	15
四、实时荧光定量 PCR 结果.....	20
五、ELISA 结果.....	36
讨论.....	40
第一部分 全基因组表达谱芯片检测结果分析.....	40
第二部分 荧光定量 PCR 及 ELISA 检测结果分析.....	41
1. CCL20 在 PBC 患者 PBMC 中 mRNA 表达水平及血清中蛋白表达水平的研究.....	41
2. CCL3 在 PBC 患者 PBMC 中 mRNA 表达水平的研究.....	42
3. PBEF1 在 PBC 患者 PBMC 中 mRNA 表达水平的研究.....	42
4. S100A12 在 PBC 患者 PBMC 中 mRNA 表达水平及血清中蛋白表达水平的研究.....	43
5. CD14 在 PBC 患者 PBMC 中 mRNA 表达水平的研究.....	44
第三部分 研究的影响因素、不足之处和改进方法.....	44
结论.....	45
参考文献.....	46
综述一：原发性胆汁性肝硬化 mRNA 及蛋白差异表达研究进展.....	49
综述二：TWEAK/Fn14 在自身免疫性疾病中的研究进展.....	59
致谢.....	64

## 英文缩略词表

缩略词	英文全称	中文全称
PBC	Primary biliary cirrhosis	原发性胆汁性肝硬化
ALP	Alkaline phosphatase	碱性磷酸酶
GGT	$\gamma$ - glutamyl transpeptidase	$\gamma$ -谷氨酰转肽酶
ALT	Alanine aminotransferase	谷氨酸氨基转移酶
AST	Aspartate aminotransferase	天门冬氨酸氨基转移酶
AMA	Anti-mitochondrial antibodies	抗线粒体抗体
AMA-M2	Anti-mitochondrial M2 antibodies	抗线粒体 M2 亚型抗体
AIH	Autoimmune hepatitis	自身免疫性肝炎
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid	互补脱氧核糖核酸
CHB	Chronic hepatitis B	慢性乙型肝炎
CHC	Chronic hepatitis C	慢性丙型肝炎
CVH	Chronic viral hepatitis	慢性病毒性肝炎
pSS	Primary Sjögren syndrome	原发性干燥综合征
SLE	Systemic lupus erythematosus	系统性红斑狼疮
RA	Rheumatoid arthritis	类风湿关节炎
SSc	Systemic sclerosis	系统性硬化症
HC	Healthy control	健康对照
Sp100	Nuclear autoantigen Sp100	自身抗原核蛋白 sp100
Gp210	Glycoprotein 210	核包膜蛋白 gp210
IgG	Immunoglobulin G	免疫球蛋白 G
mRNA	Messenger RNA	信使 RNA
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell	外周血单个核细胞
PBS	Phosphate buffered solution	磷酸盐缓冲溶液
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
qRT-PCR	Quantitative real-time PCR	实时荧光定量 PCR
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogease	3-磷酸甘油醛脱氢酶
S100A12	S100 calcium binding protein A12	钙结合蛋白 S100A12
CCL20	Chemokine (C-C motif) ligand 20	CC 亚族趋化因子配体 20
CCL3	Chemokine (C-C motif) ligand 3	CC 亚族趋化因子配体 3
PBEF1	Pre-B-cell colony enhancing factor 1	前 B 细胞克隆增强因子 1
CD14	CD14 antigen	CD14 抗原
Ct	Threshold cycle	循环阈值
FDR	False discovery rate	假发现率
ND	No data	资料缺失
BMI	Body mass index	体重指数
UDCA	Ursodeoxycholic acid	熊去氧胆酸

## 中英文摘要

### 第一部分 全基因组表达谱芯片检测

**目的** 利用基因芯片技术找出原发性胆汁性肝硬化(primary biliary cirrhosis, PBC)患者中差异表达的基因。**方法** 收集PBC患者和健康对照各3例,采集外周静脉血,提取PBMC总RNA,进行人类全基因组表达谱芯片(22K,约22000个基因)检测。**结果** 基因芯片共筛选出356个在PBC中差异表达的基因,其中296个表达上调,60个表达下调。**结论** 基因芯片为探索PBC的发病机制提供了方向。

### 第二部分 实时荧光定量PCR及ELISA检测

**目的** 扩大样本量验证芯片结果的准确性,进一步分析筛选基因mRNA及蛋白水平与疾病相关性。**方法** 选取5个基因CCL20、CCL3、PBEF1、S100A12、CD14,扩大样本量对PBC患者、健康对照、慢性乙肝患者进行RT-PCR及ELISA验证。**结果** PBC患者PBMC中CCL20、CCL3、PBEF1、S100A12、CD14 mRNA表达均升高,且与疾病活动性及进展相关;CD14 mRNA表达与细胞组分有关。PBC患者血清CCL20与S100A12浓度与疾病进展相关。**结论** PBC患者CCL20、CCL3、PBEF1、S100A12的表达水平可以成为判断疾病活动性及进展情况的指标。

**【关键词】**原发性胆汁性肝硬化;人类全基因组表达谱芯片;实时荧光定量PCR;发病机制;生物标志物

# The study of gene expression profiles in PBMC of patients with primary biliary cirrhosis

## Abstract

### Part1 Analysis by human genome expression profiling microarrays

**Objectives** To explore the differentially expressed genes in PBC compared with healthy controls. **Methods** Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from 3 PBC patients and 3 age and sex matched healthy controls. Total RNA was extracted from PBMCs, then analyzed by human genome expression profiling microarrays (22K). **Results** 356 genes differentially expressed in PBC were identified by microarray analysis, in which 296 genes were up-regulated and 60 genes were down-regulated. **Conclusions** Gene microarray provided a research direction for the pathogenesis of PBC.

### Part2 Analysis by qRT-PCR and ELISA

**Objectives** To confirm the microarrays results, and to find the relationship between the genes and the disease. **Methods** Real-time quantitative polymerase chain reaction and ELISA were used to verify the expression of CCL20, CCL3, PBEF1, S100A12, CD14 in larger populations. **Results** The mRNA expression were all up-regulated in PBC, and CCL20, CCL3, PBEF1, S100A12 were found to be correlated with the disease activity or progression, but CD14 mRNA expression were found to be correlated with the percentage of monocytes. The serum concentrations of CCL20 and S100A12 were found to be correlated with the disease progression. **Conclusions** CCL20, CCL3, PBEF1, S100A12 may be actively involved in the pathogenesis of PBC and may be indexes for the disease activity or progression.

**【key words】** PBC; human genome expression profiling microarrays (22K) ; Quantitative real-time PCR; pathogenesis; biomarker

## 前 言

原发性胆汁性肝硬化（PBC）是一种原因不明的以血清中出现高滴度抗线粒体抗体（AMAs）及自身免疫介导的肝内小胆管进行性破坏和炎细胞浸润为主要特点的自身免疫病。其病因至今未明，可能是遗传、环境、性别、感染、免疫等多个因素作用的结果。

目前疾病诊断主要依照美国肝脏病学会 2009 年制定的 PBC 诊疗指南：①胆汁淤积的生化证据：主要基于 ALP 升高；②AMA 阳性；③非化脓性破坏性胆管炎及小叶间胆管破坏的组织学证据（Class I, Level B）。如果符合上述三个标准中的两项则 PBC 的诊断可以成立。鉴别诊断包括药物引起的胆汁淤积反应、胆道阻塞、结节病、AIH 及原发性硬化性胆管炎[1]。

在最终确诊的 PBC 患者中，有 5%~10%AMA/AMA-M2 检测阴性，可通过肝穿活检进行病理诊断；而在临床实际工作中，肝脏病理不易获得。也有一部分患者 AMA/AMA-M2 阳性，但 ALP、GGT 不高。因此过分依赖 AMA 检测，容易造成漏诊或误诊。

PBC 患者血清中也存在其他的特异性抗核抗体（ANA），抗 gp210 抗体，抗 sp100 抗体。用抗 gp210 抗体诊断 PBC 的特异性可达 99%，但敏感性仅为 10%~41%；抗体阳性与阴性患者预后有明显差异，阳性患者死于肝衰竭者明显多于阴性者。用抗 sp100 抗体诊断 PBC 的特异性约为 97%，敏感性为 10%~30%；该抗体阳性 PBC 患者出现肝硬化几率明显增加，血清中胆红素升高，患者病情进展速度快，预后较差。但是有研究表明 35%的 PBC 患者 HIV-1 检测假阳性[2]，因为 sp100 蛋白的一个结构域与 HIV 的 nef 蛋白具有相似的序列[3, 4]。

鉴于以上自身抗体在特异性及敏感性上的不足，我们研究 PBC 发病机制，研究其基因表达谱，寻找新的生物标志物，为疾病早期诊断、疾病活动性评估、预后评估及治疗提供帮助是非常必要的。

多种因素导致的基因差异性表达与疾病的发生发展密切相关，分析差异表达的基因，对于研究疾病的发病机制、寻找新的标志物非常重要。随着分子生物学的进展，基因芯片技术的成熟为研究疾病的发病机制提供了新的平台，鉴于其快速、高通量、样品用量少等优点，现正广泛运用于生物学研究。该研究获得原发性胆汁性肝硬化外周血单个核细胞的基因表达谱，从一个较宽的层面上认识原发性胆汁性肝硬化的基因表达情况。有望为 PBC 的临床诊断、评估疾病活动度、预

后及治疗提供新的途径。

## 实验目的

利用人类全基因组表达谱芯片技术找出 PBC 患者外周血单个核细胞中差异表达的基因，并对其转录水平及翻译水平进行验证，从而为疾病诊断、评估、治疗及预后提供帮助。

## 材料与方法

### 一、研究对象及项目

#### 1. 样本来源:

全部 66 例 PBC 患者来自 2009 年 11 月至 2010 年 5 月就诊于北京协和医院和北京佑安医院的门诊或住院病例，全部 73 例正常健康对照来自北京协和医院健康医学部体检者，全部 55 例慢性乙型肝炎患者来自于北京协和医院肝炎门诊及北京佑安医院，患者、健康志愿者参加研究前均签署知情同意书。

#### 2. 入组标准及分组情况:

##### (1) PBC 入组标准及分组标准:

①根据美国肝病研究学会(AASLD) 2009 年制定的原发性胆汁性肝硬化指南: a. 胆汁淤积的生化证据:主要基于 ALP 升高; b. AMA 阳性; c.非化脓性破坏性胆管炎及小叶间胆管破坏的组织学证据(Class I, Level B)。如果符合上述三个标准中的两项则 PBC 的诊断可以建立。鉴别诊断包括药物引起的胆汁淤积反应、胆道梗阻、结节病、自身免疫性肝炎及原发性硬化性胆管炎[1]。

② PBC患者分组:一部分患者对UDCA治疗反应好,治疗后肝功完全正常;另一部分患者经UDCA治疗后ALP和GGT仍然高于正常上限;另外Tbil在很多晚期,存在肝硬化的患者中升高,在Mayo分期中占有较大比重,是一个非常好生存预后指标[5],但是Tbil水平容易受感染、药物等因素的影响。故在本研究中将PBC患者分为三组:稳定期(定义为:用UDCA治疗后,ALT、AST、GGT、ALP、Tbil完全正常);活动期(定义为GGT、ALP超出正常上限,Tbil在正常范围内,且B超未提示肝硬化);肝硬化期(定义为:除外感染、药物因素,胆红素升高,或B超证实有肝

硬化，门脉高压的患者)。

③根据公式计算 Mayo 危险评分(Mayo risk score, MRS):  $MRS=0.871 \times \log_e[\text{总胆红素}(\text{mg/dl})]-2.53 \times \log_e[\text{白蛋白}(\text{g/dl})]+0.039 \times (\text{年龄})+2.38 \times \log_e[\text{凝血酶原时间}(\text{s})]+0.859 \times (\text{水肿积分})$ ，其中水肿积分：0 分为无水肿；0.5 分为可控制的水肿；1 分为难控制的水肿。

④病理分期：根据 Ludwig 分期标准分为 4 期：I 期为汇管区炎症；II 期为弥漫性汇管区和汇管区周围炎症和/或纤维化；III 期为出现纤维间隔或桥接坏死；IV 期为肝硬化。若同时出现不同期别的病理表现，则归入高级别组，例如 II-III 期归入 III 期。

由病理科医生进行 PBC 肝脏病理分期。I-II 期为早期，III-IV 期为晚期。

## (2)健康对照入组标准：

全部健康对照来自北京协和医院体检中心的健康志愿者。入选条件：①无既往肝病史、自身免疫性疾病史、肿瘤病史及相应家族史；②无烟酒嗜好；③体检当日血常规、尿常规、大便常规、肝功能(ALT、AST、ALP、GGT、TBil、DBil、TP、ALB) 均正常；HBsAg 阴性。

## (3)慢性乙型肝炎入组标准：

根据中华医学会肝病学会中华医学会感染病学分会于 2005 年制定的《慢性乙型肝炎防治指南》：

①HBeAg 阳性慢性乙型肝炎血清 HBsAg、HBV DNA 和 HBeAg 阳性，抗-HBe 阴性，血清 ALT 持续或反复升高，或肝组织学检查有肝炎病变。

②HBeAg 阴性慢性乙型肝炎血清 HBsAg 和 HBV DNA 阳性，HBeAg 持续阴性，抗-HBe 阳性或阴性，血清 ALT 持续或反复异常，或肝组织学检查有肝炎病变。

## 二、主要仪器和试剂

### 1. 人类全基因组表达谱芯片 (22K)：

由博奥生物有限公司提供技术平台，是其研发的基因芯片产品之一，编号 220010，产品名称晶芯®人类全基因组寡核苷酸微阵列芯片服务 V1.0，包含 21522 条 70 mer 长度的寡核苷酸，每条寡核苷酸代表了人的一个基因转录本；其中 21329 条来自于 Operon 公司的 Human Genome Oligo Set Version 2.1，其余 193 条 Oligo DNA 为博奥公司合成。芯片上寡核苷酸代表的近 22000 个基因中包含少部分功能

未知或预测基因。

## 2. 仪器设备

低温低速离心机 Megafuge 1.0R	德国 Heraeus 公司
小型落地式离心机 Multifuge 4KR	德国 Heraeus 公司
微量台式高速离心机	德国 SORVALL 公司
JJT-2 型超净工作台	北京半导体设备一厂
EK-182A 电子天平	日本 Tokyo A&D 公司
Gene Amp2400 型 PCR 扩增仪	美国 PERKIN ELMER 公司
CH-2 型显微镜	日本 OLYMPUS 公司
4803-02 加热磁力搅拌器	Cole-Parmer 公司
ECP3000 型三恒电泳仪	北京六一仪器厂
FluorChem IS- 8800 凝胶成像系统	美国 Alpha Innotech 公司
H-84 微型混合器	江苏水泗实验设备厂
XK96-B 快速混匀器	姜堰市新康医疗器械有限公司
WD900ASL23-2 格兰仕微波炉	广州格兰仕电器实业有限公司
NanoDrop ND-1000 分光光度仪	美国 Thermo 公司
实时荧光定量 PCR 仪 IQ5	美国 Bio Rad 公司
4℃及-20℃低温冰箱	中国海尔集团有限公司
-80℃低温冰箱	日本 SANYO 公司

## 3. 主要试剂

### (1) 主要的生物化学试剂

氯仿	北京化学试剂厂
异丙醇	北京化学试剂厂
无水酒精	国药集团化学试剂有限公司
琼脂糖	北京赛百盛生物技术有限公司
淋巴细胞分离液	国药集团化学试剂有限公司
去离子水	北京天根生物有限公司
DNA Marker	北京天根生物有限公司
2×Taq MasterMix	北京康为试剂生物科技有限公司
Trizol 试剂	美国 Invitrogen 公司
PrimeScript™ RT-PCR Kit DRR037A	宝生物工程(大连)有限公司
SYBR Premix Ex Taq™ (Perfect Real Time)	宝生物工程(大连)有限公司
DRR041A	



Human CCL20/MIP-3a Quantikine ELISA Kit 美国 R&D 公司

S100A12/EN-RAGE ELISA Kit 日本 Circulex 公司

## (2) 主要试剂的配备

1×PBS (PH7.20)	NaCl 8.0g, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.2g, Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub> P <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O 2.9g, KCl 0.2g, 加蒸馏水至 1000ml
TAE buffer (50×TAE)	1L 中含 Tris.Cl 242g, 冰乙酸 57.1ml, 0.5mmol/l EDTA (PH8.0) 100ml。按 1:50 稀释配制使用。
琼脂糖凝胶制备 (1.5%)	0.3g 加入 20ml 1×TAE 电泳缓冲液中, 微波炉加热 30 秒后至沸腾, 加入 EB 2μl, 充分混匀, 将温热的凝胶倒入已放置好梳子的制胶盘中, 待凝胶凝固后待用,

## 三、实验方法

### 1. 实验标本采集:

PBC 患者、健康对照组及疾病对照组受试者, 均采集静脉血 7ml, (肝素或 EDTA 抗凝 5ml, 血清管 2ml) 取血后立即进行血浆和细胞的分离, 1500rpm, 常温, 离心 5 分钟, 血浆-80℃冻存储用, 细胞留作下一步分离。

### 2. 提取外周血单个核细胞 (PBMC):

- (1) 分离血浆后剩余的细胞层中加入 2 倍体积 PBS 缓冲液, 充分混匀。
- (2) 取 2 支试管, 每支试管均加入 3 ml 左右淋巴细胞分离液。
- (3) 将稀释后的血细胞均匀加入两支试管中, 注意小心缓慢操作, 保持淋巴细胞分离液层面不被破坏, 使稀释后的抗凝血置于淋巴细胞分离液层上。
- (4) 2500rpm, 常温, 离心 20 分钟。
- (5) 离心结束后立即小心吸取两支试管中的 PBMC 至另一试管, 并加入 3-4ml PBS 洗涤。
- (6) 1500rpm, 4℃, 离心 5 分钟。
- (7) 离心结束后弃去上清, 将剩余细胞团块敲打散开, 加入 PBS 定容至 2 ml, 混匀。
- (8) 取 9μ L 加入计数板, 计数细胞数目。
- (9) 重复洗涤离心一次。
- (10) 洗涤结束后, 弃上清, 将剩余细胞团块敲打散开, 加入适量 PBS, 将细胞加入一个 RNase free 的 1.5ml EP 管中。

- (1) 3000rpm, 4℃, 离心 10 分钟。
- (2) 离心结束后尽量弃净上清, 加入 1ml trizol 反复吹打至细胞团块完全溶解 (具体加入 trizol 量由细胞数目决定, 原则上每  $5-10 \times 10^6$  个细胞加入 1ml trizol)。
- (3) -80℃冻存用于 RNA 的制备。

### 3. 提取 PBMC 总 RNA:

- (1) 取出冻存的 trizol 细胞溶解液, 彻底混匀, 室温静置 5 分钟。
- (2) 加入 0.2ml 氯仿 (每 1ml trizol 加入 0.2ml 氯仿), 用力振荡混匀 (15 秒), 室温放置 10 分钟。
- (3) 12000rpm, 4℃, 离心 15 分钟。
- (4) 转移水相 (约 300-400 $\mu$  l) 入另一 EP 管 (RNase free), 加入 (500 $\mu$  l/1ml trizol) 异丙醇, 颠倒混匀, -20℃放置 1 小时。
- (5) 12000rpm, 4℃, 离心 15 分钟。
- (6) 弃去上清, 加入 1ml 75% 乙醇 (冰预冷) 洗涤。
- (7) 7500rpm, 4℃, 离心 10 分钟 (重复洗 2 遍)。
- (8) 弃上清, 吸干乙醇, 超净台内干燥 (不能完全干燥)。
- (9) 加入 30 $\mu$  L DEPC 处理水溶解 RNA, 55℃水浴 5-10 分钟。
- (10) 用凝胶电泳和分光光度计检测提取 RNA 纯度和浓度。
- (11) RNA -80℃立即冻存备用。

### 4. 凝胶电泳鉴定 RNA 质量:

#### (1) 琼脂糖凝胶的制备:

称取琼脂糖 0.3 克, 加 TAE 缓冲液 20 毫升, 微波炉加热, 直至琼脂糖完全溶解, 加入 EB 替代染料 1 微升, 摇匀, 将胶倒入胶槽中, 室温放置 30 分钟, 至其凝固。

#### (2) 上样电泳:

吸取 RNA 5 微升, 与 1 微升  $6 \times$  loading buffer 上样缓冲液混合后, 加样至已放置在 TAE 电泳缓冲液中的 1.5 %琼脂糖凝胶, 120 伏恒压电泳约 10-15 分钟, 利用紫外透射仪及凝胶图像成像分析仪照相留图分析。

### 5. 全基因组表达谱芯片检测:

- (1) 本次实验共使用 6 张全基因组表达谱芯片检测, PBC 患者、健康对照各 3 张, 保证年龄、性别匹配。

(2) 纯化总RNA:

进行基因芯片检测的RNA需进一步纯化, 采用NucleoSpin® RNA clean-up 试剂盒 (MACHEREY-NAGEL, Germany) 对总RNA 进行过柱纯化。

(3) 对样品RNA 进行荧光标记:

采用Cy5-dCTP、Cy3-dCTP (GE Healthcare Cat. No. PA 55021/ PA 53021) 。

(4) 杂交与清洗:

标记的DNA 溶于80 $\mu$  l杂交液中, 于42℃杂交过夜。杂交结束后, 先在42℃左右含0.2% SDS、2 $\times$ SSC的液体中洗5分钟, 然后在0.2 $\times$ SSC中室温洗5分钟。玻片甩干。

(5) 芯片扫描:

用LuxScan 10KA 双通道激光扫描仪 (CapitalBio 公司) 进行扫描。

(6) 芯片图像的采集与数据分析:

① 采用LuxScan 3.0 图像分析软件 (CapitalBio 公司) 对芯片图像进行分析, 把图像信号转化为数字信号;

② 片间校正: 根据Cy5和Cy3总体信号的global mean对各芯片进行片间线性校正, 使得各张芯片的global mean相同;

③ 片内归一化: Lowess方法或线性归一化;

④ 根据信号强度和图像质量对基因进行标记;

⑤ 筛选表达基因:

删除了荧光信号弱的基因以及芯片上的阴性对照、内标、外标等冗余的数据;

⑥ 筛选差异表达基因:

单张芯片——筛选标准为比值 (PBC/健康对照)  $\geq 2.0$ 或 $\leq 0.5$ , 包括了表达上调和下调的基因;

多张芯片——每个基因有9个重复比值, 用SAM软件进行分析, FDR控制在5%以内, 再以2倍及0.5倍标准筛选差异表达基因。

6. RNA 逆转录成 cDNA:

(1) 采用 TaKaRa 公司 PrimeScript 反转录试剂盒 DRR037A。

(2) 按照试剂盒要求严格操作, 冰上进行。

(3) 采用 10  $\mu$  L 反转录体系, 组成如下:

5 $\times$ PrimeScript™ Buffer 6  $\mu$  l;

PrimeScript™ Enzyme Mix I 1.5  $\mu$  l;

Oligo dT Primer 1.5  $\mu$  l;

Random 6 mers 1.5  $\mu$  l;

RNA (具体加入体积由其浓度决定, 每一反转录体系加入 1 $\mu$ g RNA);

DEPC 处理水 (加入体积由 RNA 加入量决定)。

(3) 反应条件: 37 $^{\circ}$ C 15 min, 85 $^{\circ}$ C 5s。

(4) cDNA 冻存于-20 $^{\circ}$ C 备用。

7. 实时定量 PCR 验证:

(1)引物设计、合成: 应用 Primer Premier5.0 和 DNAMAN 软件设计实时定量 PCR 所需引物, Invitrogen 公司完成引物合成。设计引物时尽量满足如下条件:

①PCR 扩增产物长度: 80-200bp 最为合适;

②引物长度: 18-25 核苷酸;

③GC 含量: 40-60%;

④引物序列: A、G、C、T 整体分布尽量均匀, 不要有部分的 GC rich 或 AT rich;

⑤3' 末端序列: 最好为 G 或 C, 尽量避免为 T;

⑥互补序列: 尽量避免引物内部或两条引物之间有过多碱基互补的序列, 两条引物间的 3' 末端避开有 2 个碱基以上的互补序列;

⑦ 特异性: 使用 BLAST 检索确认引物的特异性。

⑧引物序列 (5'  $\rightarrow$  3') 如下:

GAPDH-F: TCGGAGTCAACGGATTTGGTC

GAPDH-R: GCCATGGGTGAATCATATTGG

CCL20-F: GAAGGCTGTGACATCAATGCTATC

CCL20-R: GACTTTTTTACTGAGGAGACGCAC

CCL3-F: TCTCTGCATCACTTGCTGCTG

CCL3-R: TTAGGAAGATGACACCGGGC

PBEF1-F: CCGACTCCTACAAGGTTACTCAC

PBEF1-R: TCTGTCTTCTTTTCACGGCATTG

S100A12-F: ATTGAGGGGTTAACATTAGGCTG

S100A12-R: GATATTCTTGATGGTGTGCAAGC

CD14-F1: ARACTTATCGACCATGGAGCG

CD14-R1: TCATCGTCCAGCTCACAAGG

(2)引物稀释、保存:

①稀释前, 将引物管离心数秒使 DNA 聚集至管底;

②确定引物量;

③配置储存液: 储存液浓度配置为 100  $\mu$ mol/L;

④配置工作液: 根据储存液浓度稀释配置到所需浓度, 一般为 10  $\mu$ mol/L;

⑤保存:  $-20^{\circ}\text{C}$ 。

(3)普通 PCR 验证引物特异性。

①采用北京康为世纪生物科技有限公司  $2\times\text{Taq MasterMix}$ . 采用  $25\mu\text{L}$  反应体系, 组成如下:

Taq MasterMix, $2\times$	$12.5\mu\text{L}$
Forward Primer( $10\mu\text{M}$ )	$1\mu\text{L}$
Reverse Primer( $10\mu\text{M}$ )	$1\mu\text{L}$
Template	$2\mu\text{L}$
RNase-Free water	$8.5\mu\text{L}$

②采用反应条件:

$94^{\circ}\text{C}$  3min  $\times$  1cycle;  
 $94^{\circ}\text{C}$  30sec +  $55^{\circ}\text{C}$  30sec +  $72^{\circ}\text{C}$  1min  $\times$  30cycles;  
 $72^{\circ}\text{C}$  5min  $\times$  1cycle

③制备琼脂糖凝胶, 取反应后产物  $5\mu\text{l}$ , 上样电泳, 利用紫外透射仪及凝胶图像成像分析仪照相留图分析。

(4) RT-PCR 验证:

①采用 TaKaRa 公司 SYBR PrimeScript RT-PCR 试剂盒 DRR041A。按照试剂盒要求严格操作, 冰上进行。采用  $25\mu\text{L}$  反应体系, 组成如下:

$2\times\text{Premix Ex Taq}^{\text{TM}}$   $12.5\mu\text{L}$ ;  
上游引物  $0.5\mu\text{L}$ ;  
下游引物  $0.5\mu\text{L}$ ;  
cDNA  $2\mu\text{L}$  (稀释至  $5\text{ng}/\mu\text{l}$ );  
ddH<sub>2</sub>O  $9.5\mu\text{L}$ 。

②反应条件:

$95^{\circ}\text{C}$  30sec  $\times$  1cycle;  
 $95^{\circ}\text{C}$  5sec +  $60^{\circ}\text{C}$  30sec  $\times$  40cycles;  
融解曲线分析  $95^{\circ}\text{C}$  60sec +  $55^{\circ}\text{C}$  10sec +  $55^{\circ}\text{C}$  10sec。

③每份标本以目标基因和内参基因各重复 3 孔, 求出目标基因 3 个复孔循环阈值 (Cycle threshold, Ct) 的平均值和内参基因 3 个复孔 Ct 值的平均值,  $\Delta\text{Ct}$  值 = Ct (目的基因) - Ct (内参基因)。

## 8. ELISA

(1) 检测血清 CCL20 浓度

- ①采用美国 R&D 公司 Human CCL20/ MIP-3a Quantikine ELISA 试剂盒。
- ②按试剂盒说明书严格操作。
- ③标准品梯度稀释：用蒸馏水溶解标准品干粉，室温混合>5 分钟；梯度稀释至 500、250、125、62.5、31.2、15.6、7.8pg/ml，以 calibrator diluent 作为 0pg/ml，用于标准曲线的制作。
- ④ELISA 检测血清 CCL20 浓度

加 Assay Diluent 100 $\mu$  l/孔

↓

加梯度标准品、标本各 100 $\mu$  l/孔

↓ 室温孵育 2 小时

洗涤×4 遍

↓

加 conjugate 200 $\mu$  l/孔

↓ 室温孵育 2 小时

洗涤×4 遍

↓

加显色剂 200 $\mu$  l/孔

↓ 室温避光孵育 30 分钟

加终止液 50 $\mu$  l/孔

↓

酶标仪检测

- ⑤根据标准曲线将测得的标本 OD 值换算为浓度 (pg/ml)。

## (2)检测血清 S100A12 浓度

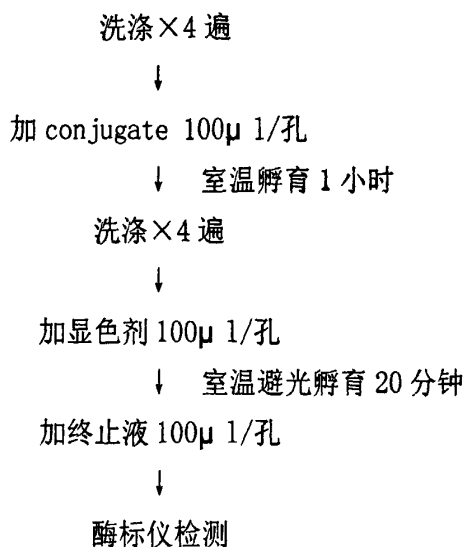
- ①采用日本 CircuLex 公司 S100A12/EN-RAGE ELISA 试剂盒
- ②按试剂盒说明书严格操作。
- ③标准品梯度稀释：用去离子水溶解标准品干粉，室温混合>5 分钟；梯度稀释至 5000、2500、1250、625、313、156、78pg/ml，以 calibrator diluent 作为 0pg/ml，用于标准曲线的制作。
- ④ELISA 检测血清 S100A12 浓度

稀释样本 (1.5 $\mu$  l 血清+300 $\mu$  l Dilution Buffer)

↓

加梯度标准品、活化标本各 50 $\mu$  l/孔

↓ 室温孵育 1 小时



⑤根据标准曲线将测得的标本 OD 值换算为浓度 (pg/ml)，再乘以稀释倍数 (×201)。

#### 四、统计分析

数据的统计学分析采用 SPSS 13.0 软件，对实时荧光定量 PCR 结果  $2^{-\Delta Ct}$  进行统计；组间比较符合正态分布采用两样本均数 t 检验，相关性分析采用 Pearson 相关检验，以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

### 一、样本临床基本情况

1. PBC 芯片检测组患者基本情况如表 1:

表 1 PBC 芯片检测组患者基本情况

	gender	age	ALP (U/L)	GGT (U/L)	ALT (U/L)	AST (U/L)	Tbil(umol/L)	biopsy
1	F	53	204	414	43	54	21	II
2	F	50	188	90	21	49	12.41	ND
3	F	35	67	13	10	19	12.2	I

## 2. qRT-PCR 及 ELISA 检测组临床基本情况如表 2

表 2 疾病组及对照组临床资料及生化指标

	PBC	CHB	HC
病例数	66	55	73
年龄(岁)	55	38	52
性别(男/女)	4/66	14/55	6/73
ALP(U/L)	154(42-966)	73(24-222)	57(34-90)
GGT(U/L)	100(13-1223)	45(9-355)	15(9-48)
ALT(U/L)	39(9-221)	61(11-1315)	17(10-31)
AST(U/L)	40(14-157)	43(19-894)	18(13-25)
TBil( $\mu\text{mol/L}$ )	14.8(6.2-253)	15(8-132)	12.1(5.9-20.8)
ALB(g/L)	42(28-50)	45(35-51)	45(41-50)

年龄及肝功能指标表示为中位数(范围)。正常范围: ALP 30-120U/L, GGT 10-67U/L, ALT 5-40U/L, AST 5-37U/L, TBil 5.1-22.2 $\mu\text{mol/L}$ , DBil 0-8.6 $\mu\text{mol/L}$ , ALB 35-51g/L。

## 二、提取 PBMC 总 RNA 结果

凝胶电泳检测: 28s 和 18s 条带清晰, 宽度及亮度比例基本符合 2:1(图 1), 分光光度计检测 A260/280>1.70, RNA 质量符合实验要求。

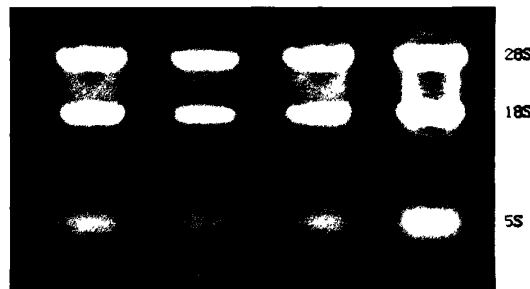


图 1 RNA 电泳图

## 三、全基因组表达谱芯片检测结果

### 1. 芯片杂交体系质控情况:

Hex、外标、内标等阳性对照信号正常, 阴性对照检测为阴性; 看家基因重复性好, 比值 CV 不超过 0.3; 无影响数据的污染, 漏点率不超过 3%。

### 2. 差异表达基因筛选情况:

6 张芯片共筛选出 356 个基因差异表达(图 2), 其中 296 个基因表达上调, 60 个基因表达下调。信号通路如(表 3)



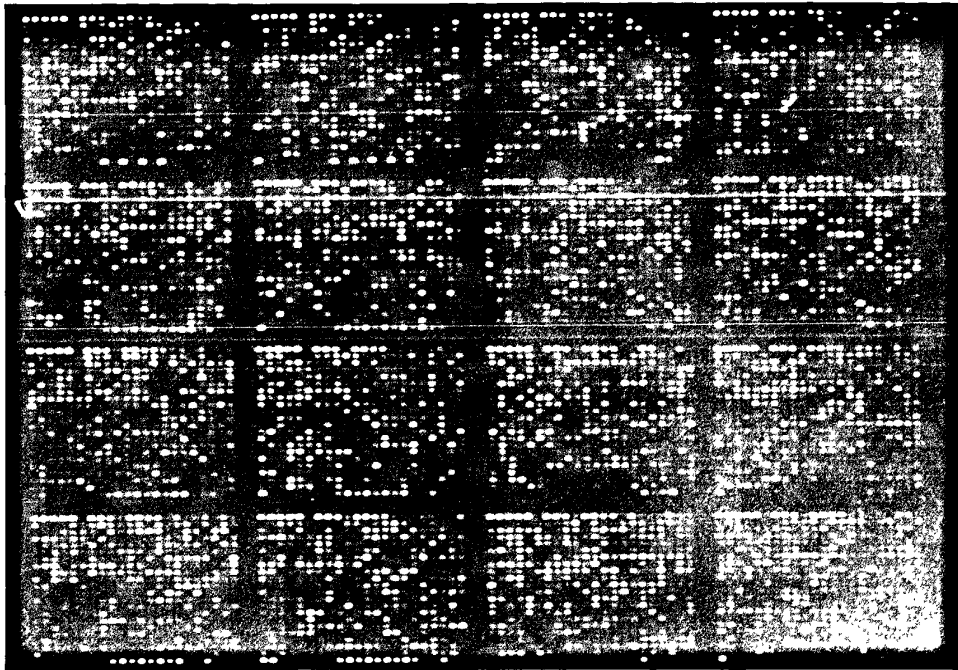


图2 芯片示意图（红点代表 PBC 中高表达基因，  
绿点代表低表达基因，黄点代表基因表达基本无差异）

### Log-Log Scatter plot

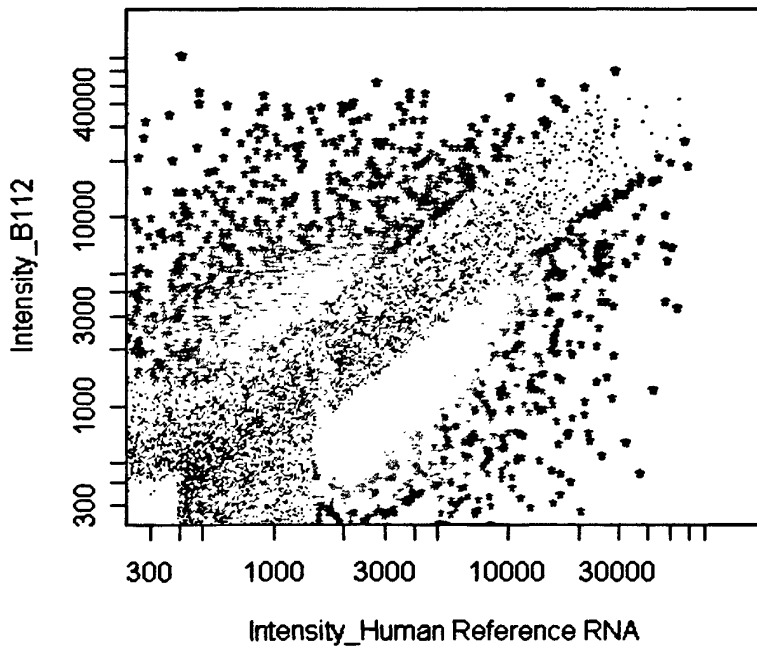


图3 比较分析散点图（红点代表 PBC 中高表达基因，  
绿点代表低表达基因，黑点代表基因表达基本无差异）

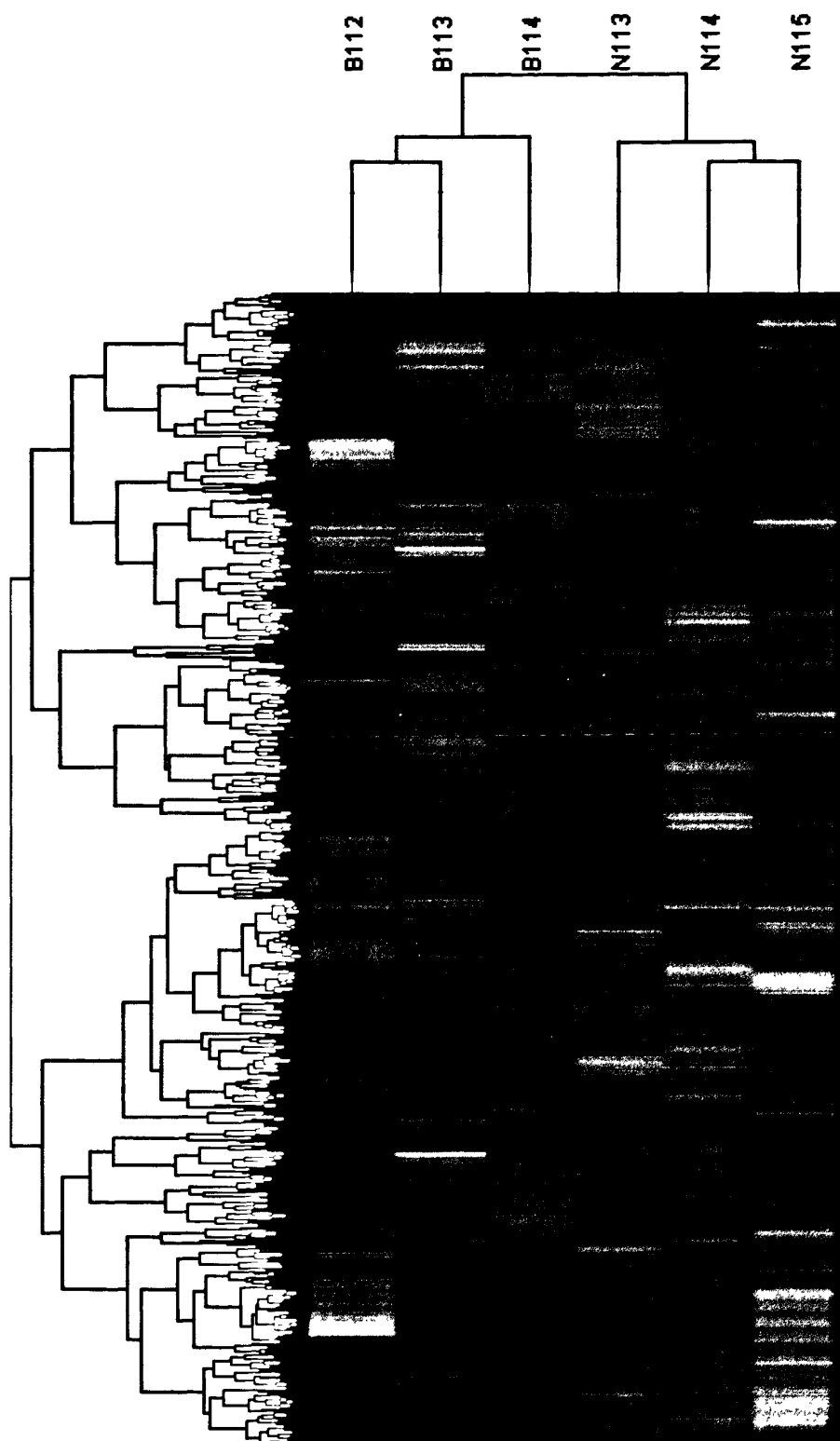


图 4 芯片非监督聚类分析图 (B112~B114 代表 PBC 患者, N113~N115 代表健康对照, 可见芯片结果基本能将 PBC 患者和健康对照区分开)

表 3 主要信号通路基因

PathwayName	Gene	q-value (%)	Fold Change (PBC/健康对照)
Cell adhesion molecules (CAMs)	CD22	4.03575	0.18692
	CDH1	0	3.22638
	CLDN4	0	3.11141
	HLA-DOB	1.68704	0.3053
	ICAM1	0	5.06762
	PECAM1	0	0.29139
	SELP	2.29828	0.19863
	F11R	3.21115	0.4666
	CD276	1.51511	2.23914
ECM-receptor interaction	COL1A2	2.29828	2.26391
	COL4A1	1.51511	4.75314
	ITGA1	3.21115	2.10211
	ITGB4	1.51511	3.29486
	VTN	1.21054	3.19097
	SV2A	0	3.28777
Cytokine-cytokine receptor interaction	CXCL2	2.20252	11.4505
	PPBP	2.20252	0.14206
	CCL2	4.00671	2.3133
	CCL20	0	14.5991
	XCL1	2.78756	0.3855
	XCL2	2.78756	0.3855
	GDF5	0	3.43712
	TNFSF14	2.20252	0.20326
	TNFRSF12A	2.78756	3.57895
Complement and coagulation cascades	CFB	2.29828	4.25
	F2	1.51511	3.16963
	F10	0.83464	2.37293
	CFI	0	4.44835
	TFPI	2.20252	2.54325
Leukocyte transendothelial migration	CLDN4	0	3.11141
	ICAM1	0	5.06762

	MMP2	4.00671	2.08511
	PECAM1	0	0.29139
	THY1	1.21054	3.81504
	F11R	3.21115	0.4666
Focal adhesion	COL1A2	2.29828	2.26391
	COL4A1	1.51511	4.75314
	DOCK1	3.21115	2.55126
	FLNC	2.78756	2.93236
	ITGA1	3.21115	2.10211
	ITGB4	1.51511	3.29486
	VTN	1.21054	3.19097
Arachidonic acid metabolism	GPX2	2.29828	2.79791
	GPX3	3.21115	2.69524
	PTGDS	0	0.17711
	PTGS2	0	9.33898
TGF-beta signaling pathway	BMP5	0.83464	2.91419
	SMAD6	0.83464	2.01329
	GDF5	0	3.43712
	FST	2.78756	2.50312
Regulation of actin cytoskeleton	DOCK1	3.21115	2.55126
	F2	1.51511	3.16963
	ITGA1	3.21115	2.10211
	ITGB4	1.51511	3.29486
	ENAH	2.78756	2.92378
	GNG12	0	4.42258
Nitrogen metabolism	CA9	2.78756	3.18186
	CA12	2.29828	2.38416
PPAR signaling pathway	APOA1	2.29828	2.81364
	FABP1	0.83464	3.47282
	FABP3	3.21115	2.402
Hematopoietic cell lineage	CD7	4.03575	0.30201
	CD22	4.03575	0.18692
	ITGA1	3.21115	2.10211

#### 四、实时荧光定量 PCR 结果

挑选芯片结果中与 PBC 发病机制相关的基因：CCL20、CCL3、PBEF1、S100A12、CD14 进行 qRT-PCR 验证。

##### 1. 普通 PCR 电泳图（图 5、图 6）：

目的条带单一清晰，说明引物特异性好，可以用于 RT-PCR。

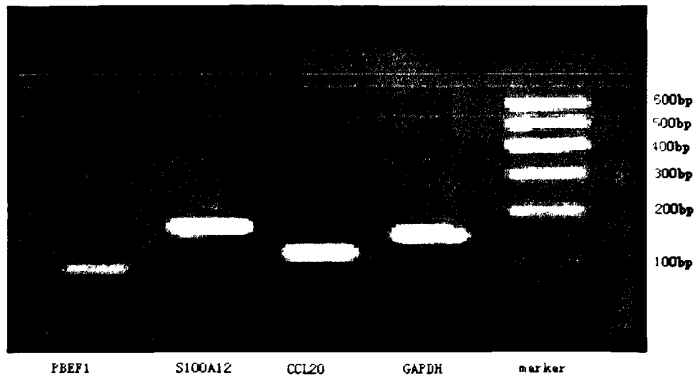


图 5 GAPDH、CCL20、S100A12、PBEF1 普通 PCR 电泳图

（GAPDH 目的基因片段长度为 146bp，CCL20 目的基因片段长度为 114bp，PBEF1 目的基因片段长度为 91bp，S100A12 目的基因片段长度为 172bp）

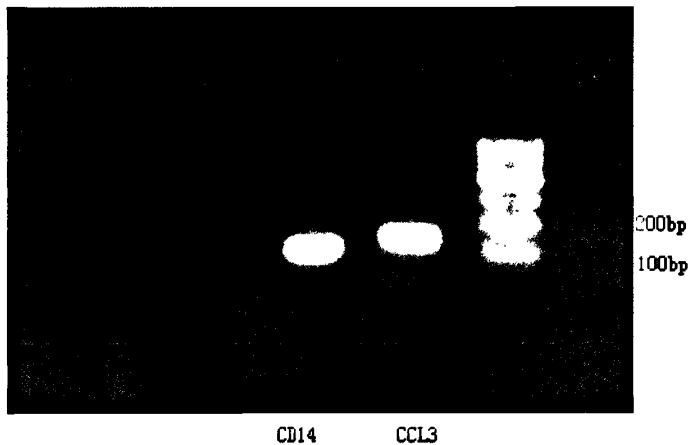


图 6 CCL3 CD14 普通 PCR 电泳图

（CCL3 目的基因片段长度为 135bp，CD14 目的基因片段长度为 102bp）

##### 2. 标准曲线：

(1) 10 倍（或 5 倍）系列稀释模板 cDNA，模板 cDNA 量为 100ng（或 50ng），稀释后的量分别是 10ng、1ng、0.1ng、0.01ng，进行实时定量 PCR 检测，建立标准曲线（图 7-11）。其中纵坐标代表 Ct 值，横坐标代表浓度对数。

(2) 从图中可见，基因 GAPDH、CCL20、PBEF1、S100A12 曲线 Ct 值和模板 cDNA 浓度对数之间均有良好的线性关系。GAPDH  $R^2=0.9992$ 、斜率=-3.193；CCL20

$R^2=0.9963$ 、斜率=-3.5839；CCL3  $R^2=0.9958$ 、斜率=-2.6455；PBEF1  $R^2=0.9983$ 、斜率=-3.0932；S100A12  $R^2=0.9968$ 、斜率=-3.5164。说明三个基因扩增效率一致，可以用  $2^{-\Delta Ct}$  进行统计比较。

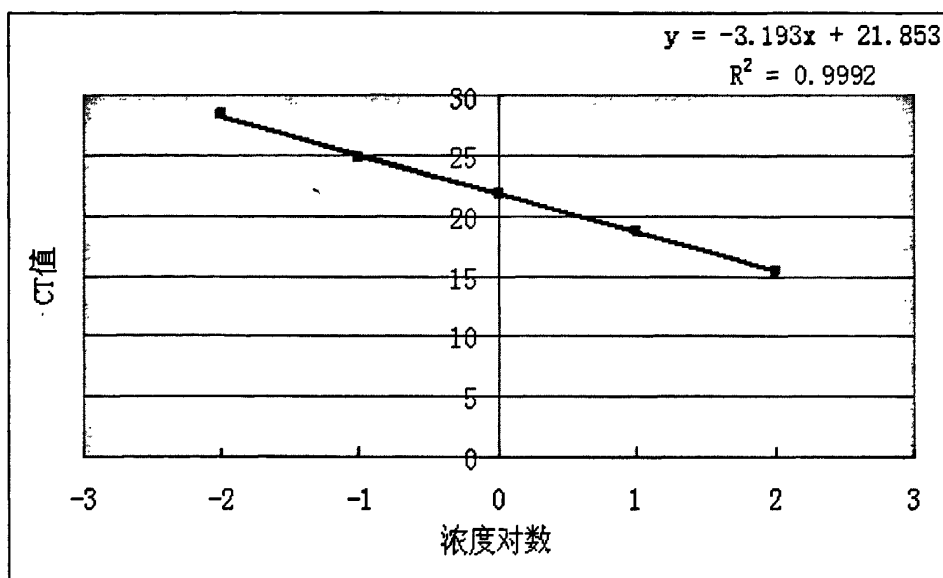


图 7 GAPDH 标准曲线

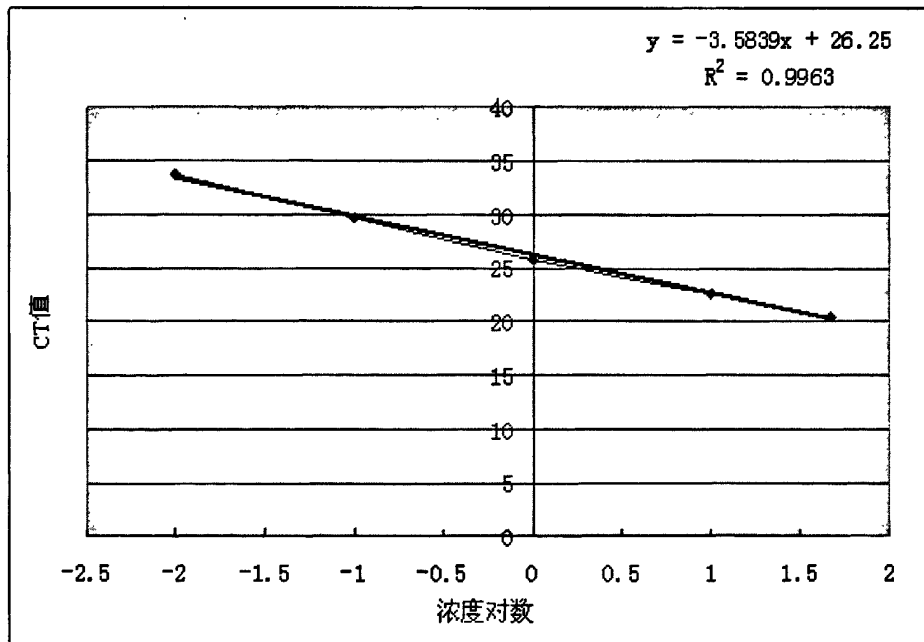


图 8 CCL20 标准曲线

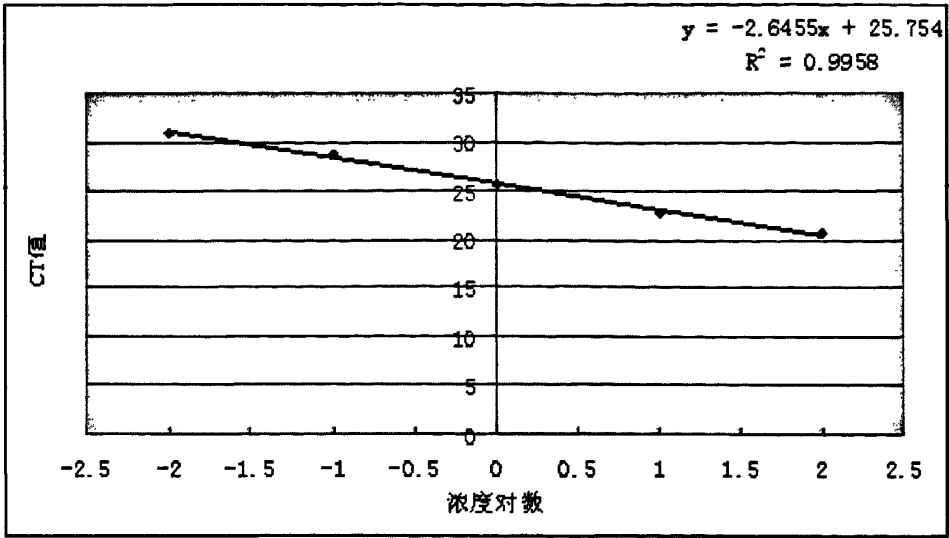


图9 CCL3 标准曲线

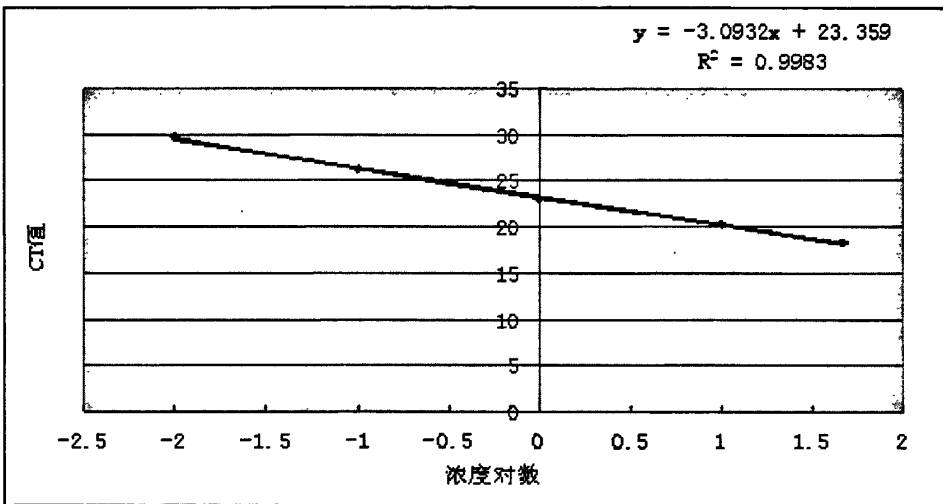


图10 PBEF1 标准曲线

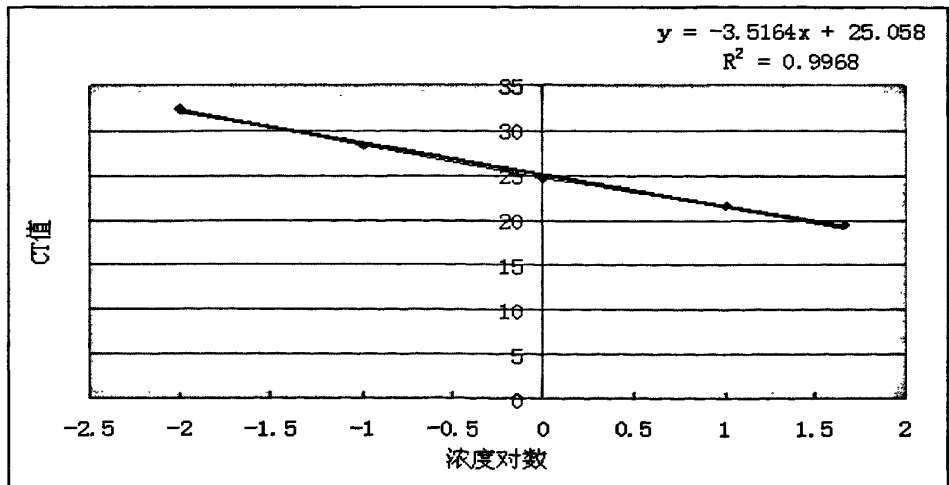


图11 S100A12 标准曲线

### 3. 基因 GAPDH、CCL20、CCL3、PBEF1、S100A12 扩增曲线、融解曲线：

#### (1) GAPDH 扩增曲线、融解曲线：

扩增曲线（图 12）表现为 S 型，荧光信号良好，多样本重复性好。

融解曲线（图 13）表现为单一明显主峰，无杂峰，表明扩增产物单一，不含有引物二聚体及非特异扩增产物，反应体系稳定。

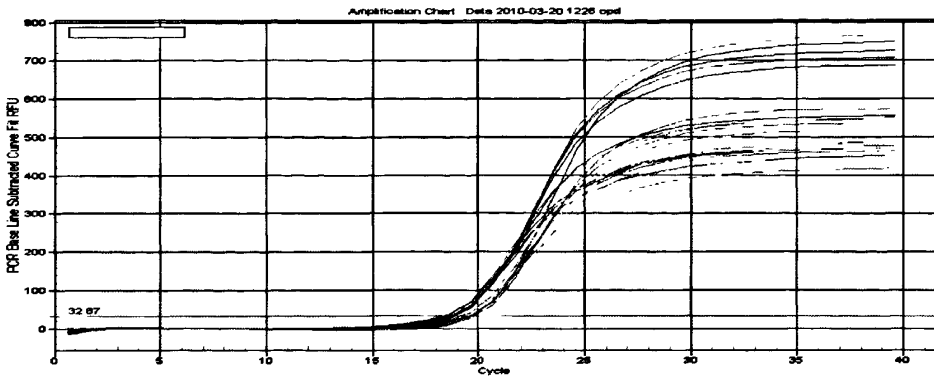


图 12 GAPDH 扩增曲线

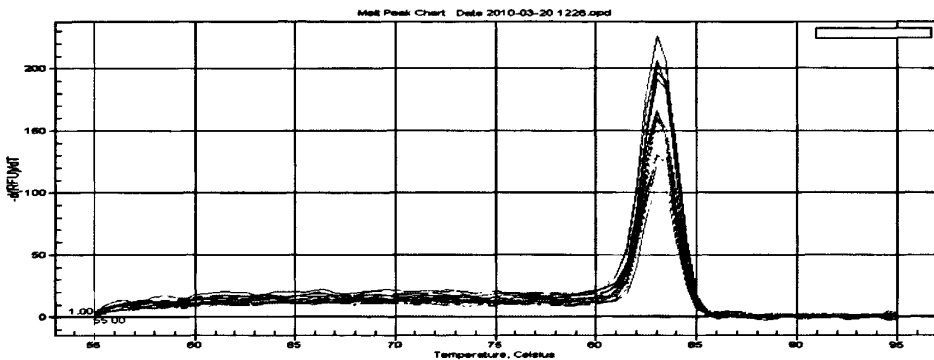


图 13 GAPDH 融解曲线

#### (2) CCL20 扩增曲线、融解曲线：

扩增曲线（图 14）表现为 S 型，荧光信号良好，多样本重复性好。

融解曲线（图 15）表现为单一明显的主峰，无杂峰，表明扩增产物单一，不含有引物二聚体及非特异扩增产物，反应体系稳定。

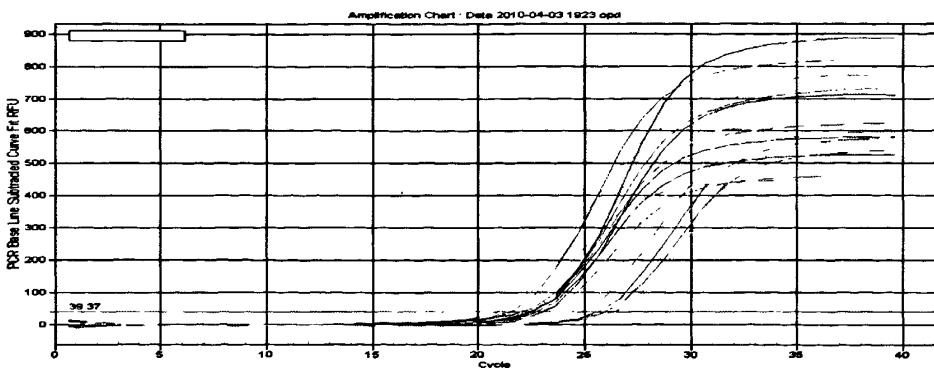


图 14 CCL20 扩增曲线



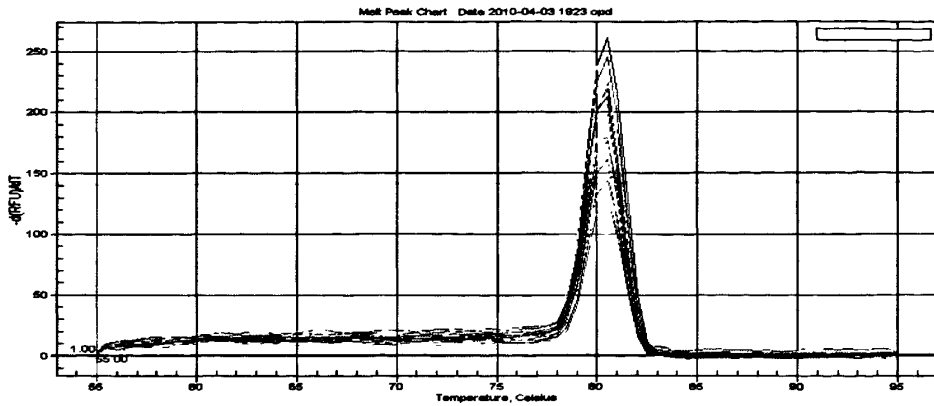


图 15 CCL20 融解曲线

(3) CCL3 扩增曲线、融解曲线:

扩增曲线 (图 16) 表现为 S 型, 荧光信号良好, 多样本重复性好。

融解曲线 (图 17) 表现为单一明显的主峰, 无杂峰, 表明扩增产物单一, 不含有引物二聚体及非特异扩增产物, 反应体系稳定。

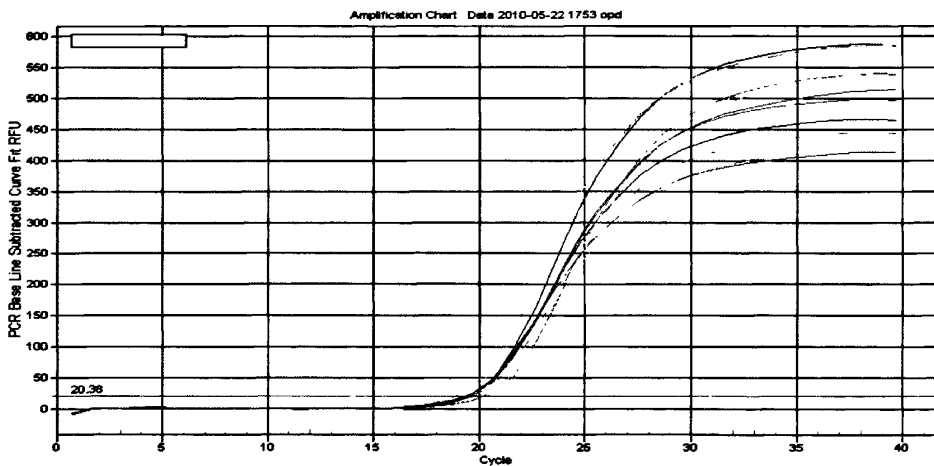


图 16 CCL3 扩增曲线

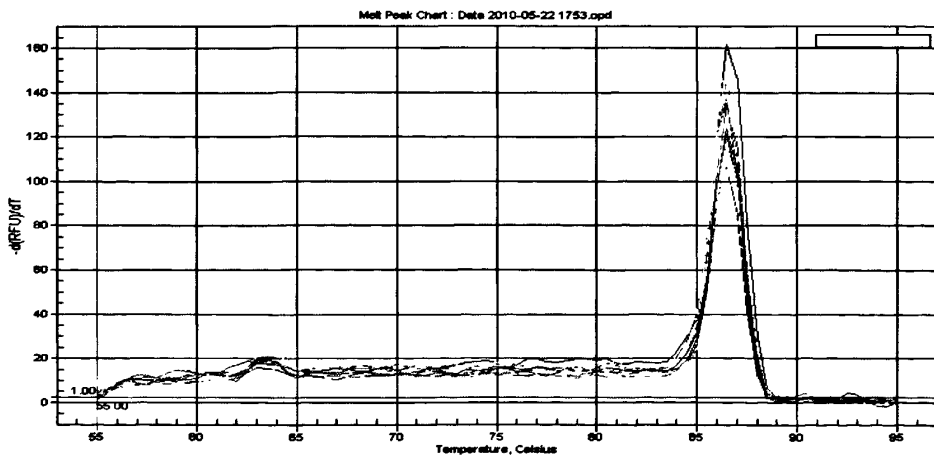


图 17 CCL3 融解曲线

(4) PBEF1 扩增曲线、融解曲线:

扩增曲线 (图 18) 表现为 S 型, 荧光信号良好, 多样本重复性好。

融解曲线 (图 19) 表现为单一明显的主峰, 无杂峰, 表明扩增产物单一, 不含有引物二聚体及非特异扩增产物, 反应体系稳定。

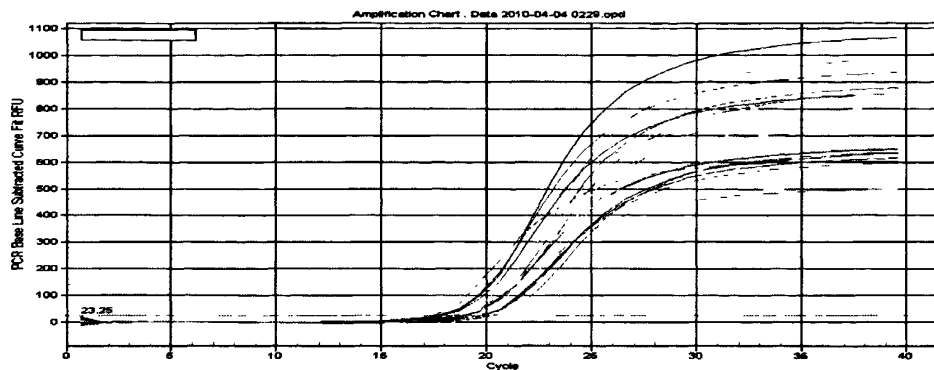


图 18 PBEF1 扩增曲线

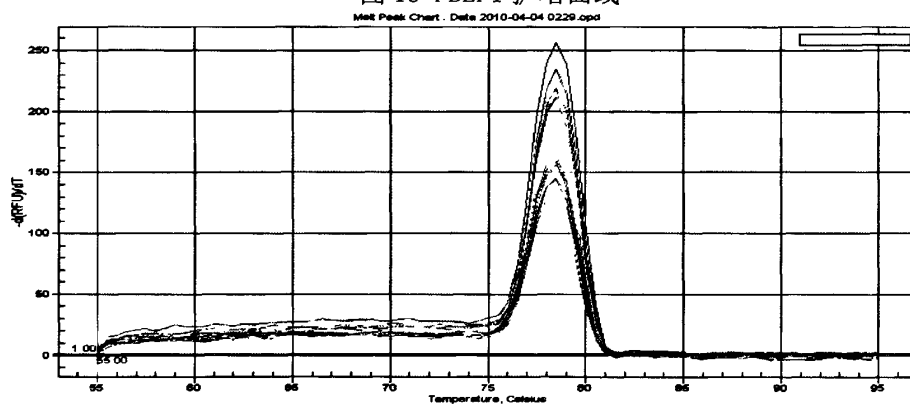


图 19 PBEF1 融解曲线

(5) S100A12 扩增曲线、融解曲线:

扩增曲线 (图 20) 表现为 S 型, 荧光信号良好, 多样本重复性好。

融解曲线 (图 21) 表现为单一明显的主峰, 无杂峰, 表明扩增产物单一, 不含有引物二聚体及非特异扩增产物, 反应体系稳定。

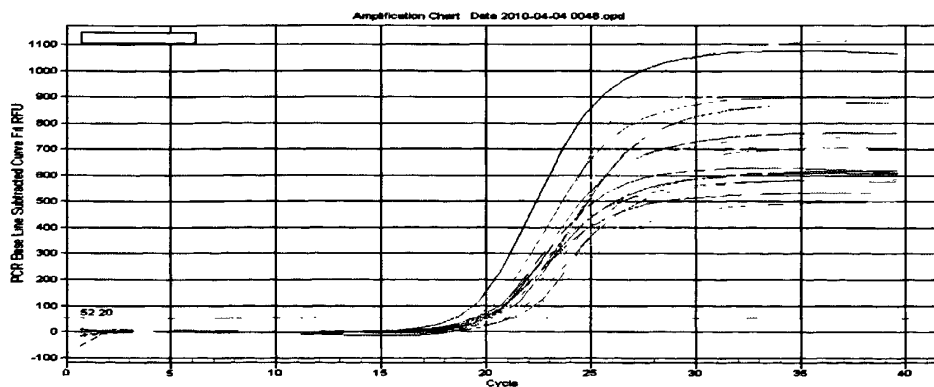


图 20 S100A12 扩增曲线

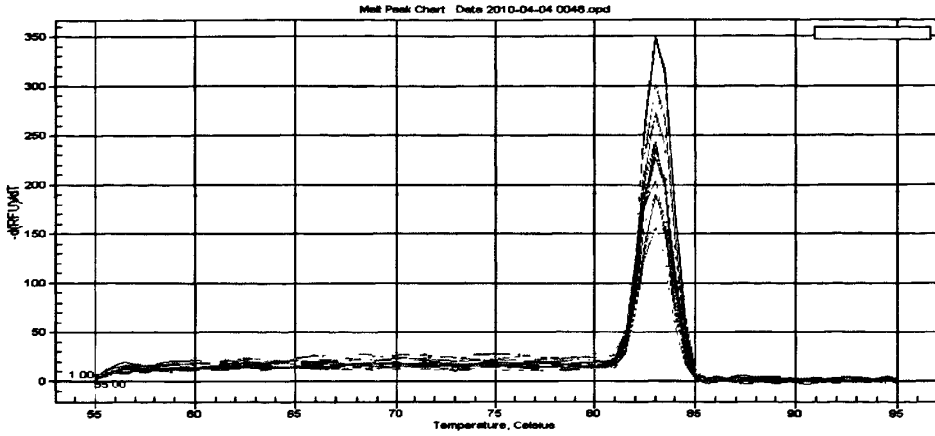


图 21 S100A12 融解曲线

(6) CD14 扩增曲线、融解曲线:

扩增曲线 (图 22) 表现为 S 型, 荧光信号良好, 多样本重复性好。

融解曲线 (图 23) 表现为单一明显的主峰, 无杂峰, 表明扩增产物单一, 不含引物二聚体及非特异扩增产物, 反应体系稳定。

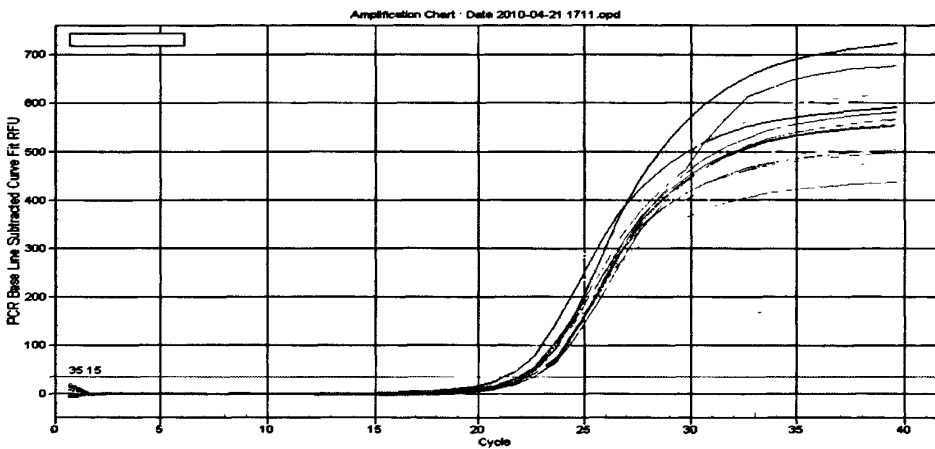


图 22 CD14 扩增曲线

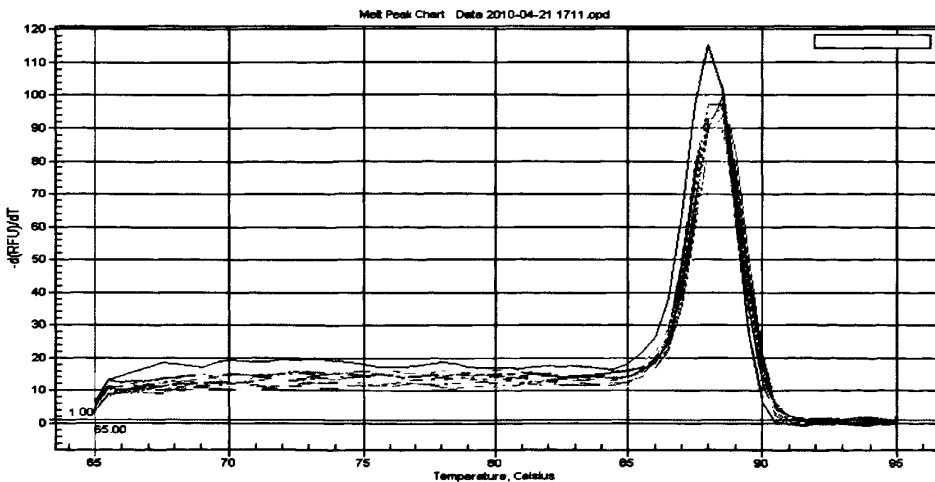


图 23 CD14 融解曲线

### 3. RT-PCR 验证结果

#### (1) CCL20 RT-PCR 验证结果

##### ①PBC HC CHB组CCL20 mRNA相对表达量比较

表4 PBC HC CHB CCL20 mRNA表达量的 $2^{-\Delta Ct}$ 统计比较

	例数	$2^{-\Delta Ct}$ 平均值±标准差
PBC患者	60	0.0470±0.06329
正常对照	67	0.0272±0.04195
乙肝患者	55	0.1151±0.09845

PBC和HC: P=0.043; PBC和CHB: P=0.000; HC和CHB: P=0.000

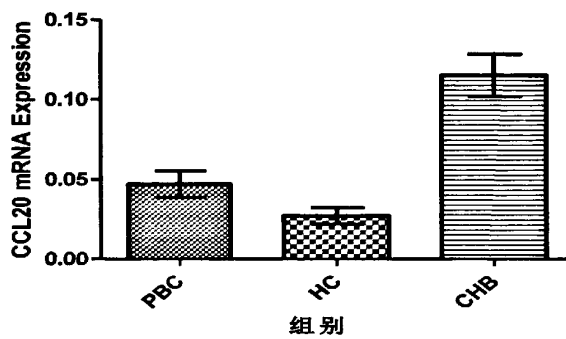


图24 PBC HC CHB CCL20 mRNA相对表达量比较

##### ②将PBC患者进一步分组统计

表5 PBC患者 稳定期 活动期 肝硬化期 CCL20 mRNA表达量的 $2^{-\Delta Ct}$ 统计比较

	例数	$2^{-\Delta Ct}$ 平均值±标准差
稳定期	14	0.0393±0.05404
活动期	29	0.0743±0.07237
肝硬化期	17	0.0043±0.00559

稳定期和活动期P=0.117, 稳定期和肝硬化期P=0.031, 活动期和肝硬化期P=0.000

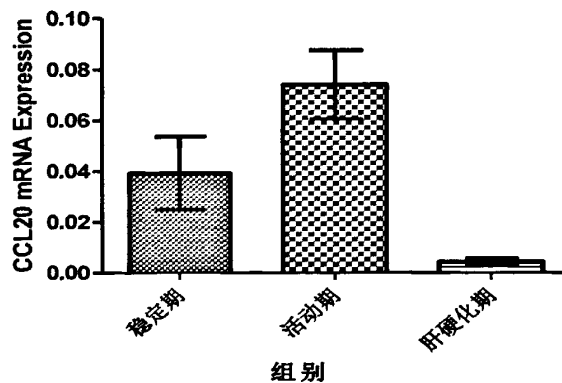


图25 稳定期 活动期 肝硬化期 PBC患者CCL20 mRNA相对表达量比较

③CCL20 mRNA相对表达量与mayo评分（29名患者有凝血功能检测结果，可以计算mayo评分）相关分析：相关系数=-0.545（P值=0.002）。

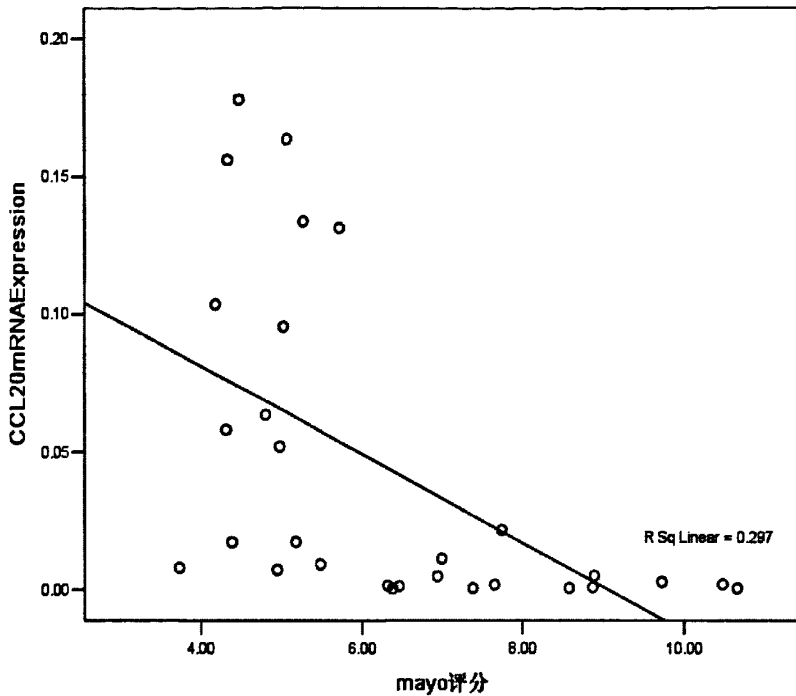


图26 PBC患者CCL20 mRNA相对表达量与mayo评分相关分析

④小结：a. PBC患者与健康对照相比，PBMC中CCL20 mRNA表达量升高（ $P=0.043$ ），有显著差异，与基因芯片结果一致，但是CHB患者PBMC中CCL20 mRNA表达量较PBC患者升高（ $P=0.000$ ）差异极显著。b. 进一步将PBC患者分组统计：活动期与稳定期相比，患者PBMC中CCL20的表达量升高，但未达到统计学水平（ $P=0.117$ ）；肝硬化期患者PBMC中CCL20的表达量较稳定期及活动期下降（ $P$ 值分别为0.031和0.000）。c. CCL20的表达量与mayo分期呈负相关（ $P=0.002$ ）。

(2) CCL3 RT-PCR 验证结果

① PBC HC CHB CCL3 mRNA相对表达量比较

表6 PBC HC CHB CCL3 mRNA表达量的 $2^{-\Delta Ct}$ 统计比较

	例数	$2^{-\Delta Ct}$ 平均值±标准差
PBC患者	61	0.1452±0.13121
正常对照	66	0.0792±0.05667
乙肝患者	55	0.3481±0.37723

PBC和HC:  $P=0.001$ ; PBC和CHB:  $P=0.000$ ; HC和CHB:  $P=0.000$

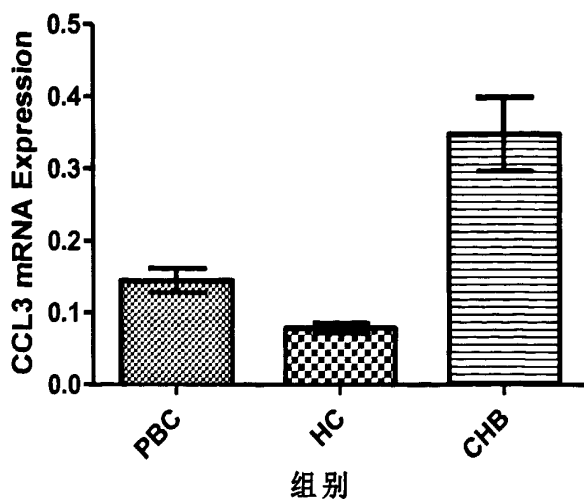


图27 PBC HC CHB CCL3 mRNA 相对表达量比较

②将PBC患者进一步分组统计:

表7 PBC患者 稳定期、活动期、肝硬化期 CCL3 mRNA表达量的 $2^{-\Delta Ct}$ 统计比较

	例数	$2^{-\Delta Ct}$ 平均值±标准差
稳定期	14	0.1062±0.08036
活动期	32	0.2056±0.14379
肝硬化期	15	0.0529±0.05526

稳定期和活动期 $P=0.005$ , 稳定期和肝硬化期 $P=0.046$ , 活动期和肝硬化期 $P=0.000$

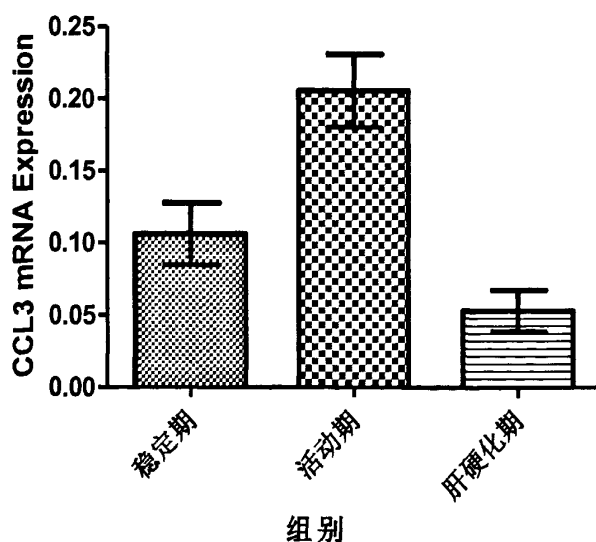


图28 PBC患者 稳定期 活动期 肝硬化期 CCL3 mRNA相对表达量比较

③ CCL3 mRNA相对表达量与mayo评分相关分析（30名患者有凝血功能检测结果，可以计算mayo评分）：相关系数-0.490（P=0.006）。

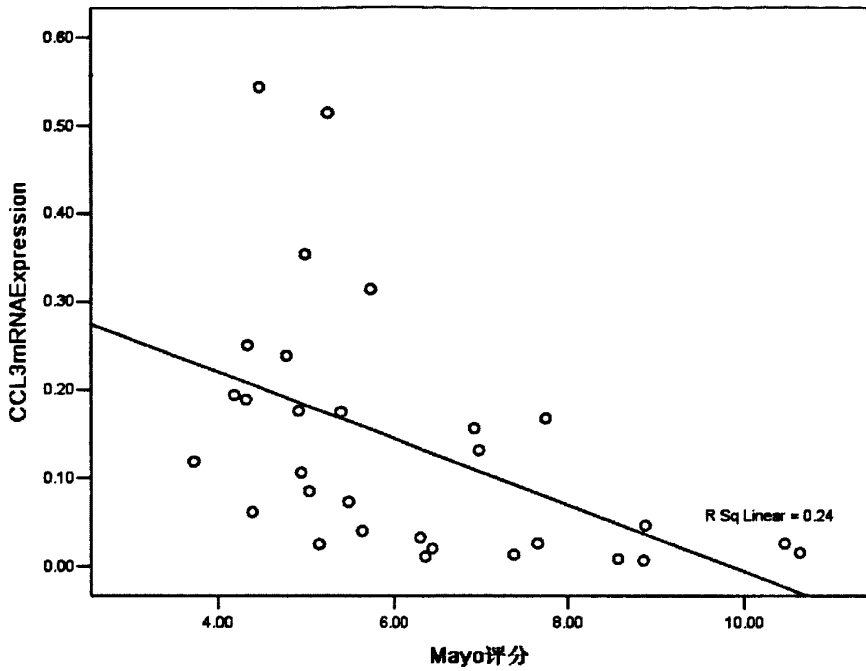


图29 PBC患者CCL3 mRNA相对表达量与mayo评分相关分析

④CCL3 mRNA与CCL20 mRNA相对表达量相关分析：相关系数0.712（P=0.000）

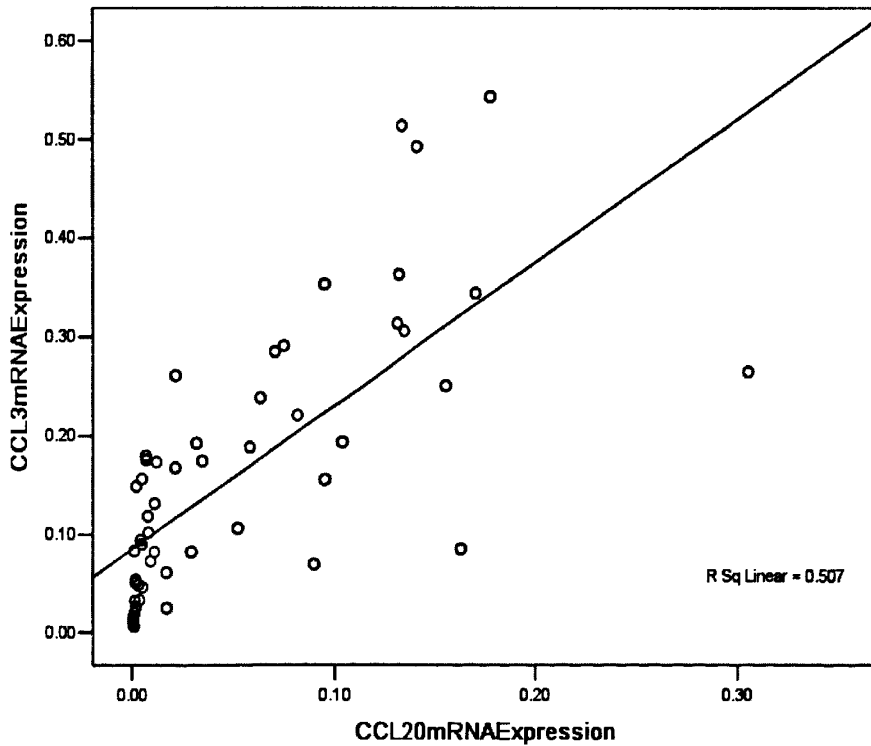


图30 CCL3 mRNA与CCL20 mRNA相对表达量相关分析

⑤小结：a. PBC患者与健康对照相比，PBMC中CCL3 mRNA表达量升高（ $P=0.001$ ），有差异极显著，但是CHB患者PBMC中CCL3 mRNA表达量较PBC患者升高（ $P=0.000$ ），差异极显著。b. 进一步将PBC患者分组统计：活动期与稳定期相比，患者PBMC中CCL3的表达量升高，差异极显著（ $P=0.005$ ）；肝硬化期患者PBMC中CCL3的表达量较稳定期及活动期下降（ $P$ 值分别为0.046和0.000）。c. CCL3 mRNA相对表达量与mayo评分负相关（ $P=0.006$ ）。d. CCL3 mRNA与CCL20 mRNA相对表达量呈正相关（ $P=0.000$ ）。

(3)PBEF1 RT-PCR 验证结果

①PBC HC CHB组PBEF1 mRNA相对表达量及BMI比较

表8 PBC HC CHB组PBEF1 mRNA表达量的 $2^{-\Delta Ct}$ 及BMI统计比较

	例数	BMI ( $\text{kg}/\text{m}^2$ )	$2^{-\Delta Ct}$ 平均值±标准差
PBC	62	22.8047±2.49723	0.6271±0.66217
HC	44	22.8943±2.55943	0.2568±0.16620
CHB	55	ND	0.7059±0.60479

PBC和健康对照BMI:  $P=0.857$

PBC和HC:  $P=0.000$ ; PBC和CHB:  $P=0.505$ ; HC和CHB:  $P=0.000$

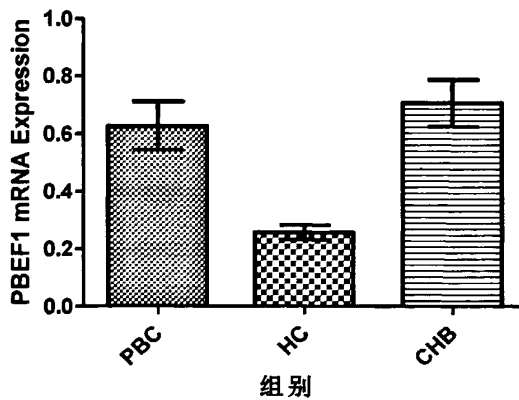


图31 PBC HC CHB PBEF1 mRNA 相对表达量比较

② 将PBC患者进一步分组比较

表9 PBC患者 稳定期、活动期、肝硬化期PBEF1mRNA表达量的 $2^{-\Delta Ct}$ 及BMI统计比较

	例数	BMI	$2^{-\Delta Ct}$ 平均值±标准差
稳定期	16	23.6269±2.12872	0.4849±0.32136
活动期	30	23.0900±2.62895	0.8187±0.86840
肝硬化期	16	21.4475±2.14901	0.4100±0.27679

稳定期和活动期 $P=0.147$ , 稳定期和肝硬化期 $P=0.485$ , 活动期和肝硬化期 $P=0.023$



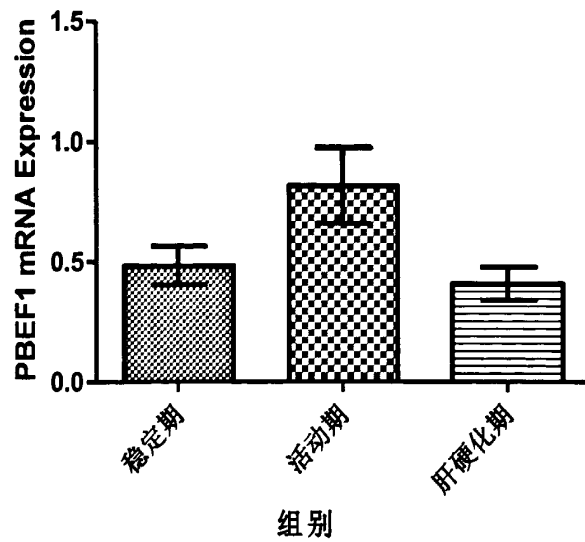


图 32 稳定期 活动期 肝硬化期 PBEF1mRNA 相对表达量比较

③PBEF1mRNA 相对表达量与 mayo 分期相关分析：相关系数-2.36 (P=0.201)

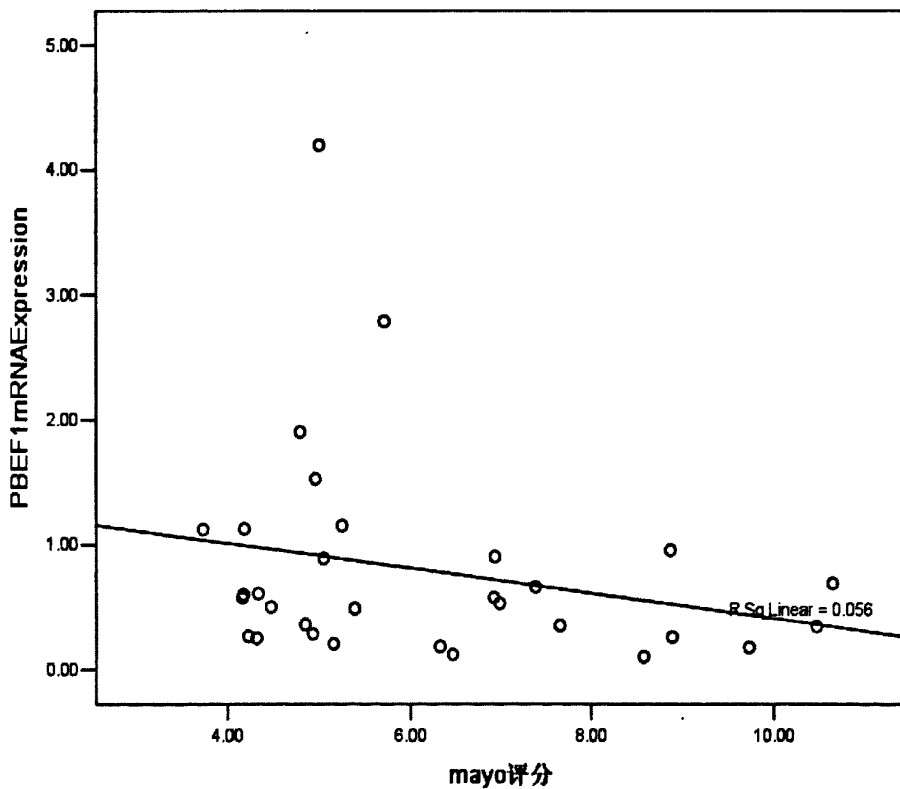


图 33 PBEF1mRNA 相对表达量与 mayo 分期相关分析

④小结：a. PBC 患者与健康对照相比 (BMI 相匹配)，PBMC 中 PBEF1mRNA 表达量升高 (P=0.000)，差异极显著，与基因芯片结果一致；但是 CHB 患者 PBMC 中 PBEF1 mRNA 表达量也较健康对照升高 (P=0.000)，差异极显著；CHB 患者 PBMC

中 PBEF1 mRNA 表达量较 PBC 患者升高, 但无统计学差异 ( $P=0.505$ )。b. 进一步将 PBC 患者分组统计: 活动期与稳定期相比, 患者 PBMC 中 PBEF1 mRNA 的表达量升高, 但没有统计学差异 ( $P=0.147$ ); 肝硬化期患者 PBMC 中 PBEF1 mRNA 的表达量较稳定期下降, 但没有统计学差异 ( $P=0.485$ ); 肝硬化期患者 PBMC 中 PBEF1 mRNA 表达量较活动期下降 ( $P=0.023$ ), 有显著差异。但是 PBC 患者肝硬化期 BMI 较稳定期及活动期低。c. PBEF1 mRNA 相对表达量与 mayo 分期无明显相关性 ( $P=0.201$ )。

#### (4) S100A12 RT-PCR 验证结果

##### ① PBC HC CHB S100A12 mRNA 相对表达量及比较

表10 PBC HC CHB S100A12 mRNA 表达量的  $2^{-\Delta Ct}$  统计比较

	例数	$2^{-\Delta Ct}$ 平均值 $\pm$ 标准差
PBC 患者	68	$0.3320 \pm 0.20040$
正常对照	73	$0.2676 \pm 0.14746$
乙肝患者	55	$0.1547 \pm 0.13003$

P 值: PBC 和 HC:  $P=0.033$ ; PBC 和 CHB:  $P=0.000$ ; HC 和 CHB:  $P=0.000$

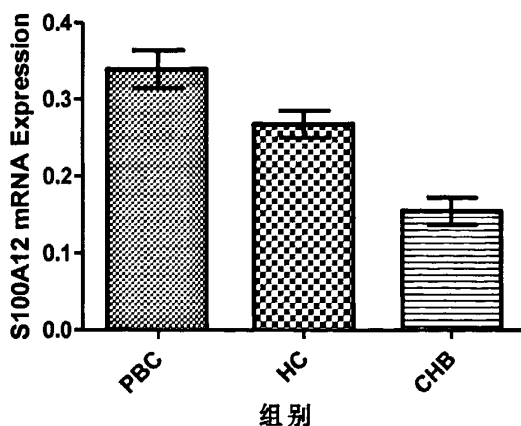


图34 PBC HC CHB S100A12 mRNA 相对表达量比较

##### ② 将 PBC 患者进一步分组比较

表11 PBC 患者 稳定期、活动期、肝硬化期 S100A12 mRNA 表达量的  $2^{-\Delta Ct}$  统计比较

	例数	$2^{-\Delta Ct}$ 平均值 $\pm$ 标准差
稳定期	15	$0.2613 \pm 0.12656$
活动期	31	$0.3850 \pm 0.19557$
肝硬化期	20	$0.3272 \pm 0.23383$

稳定期和活动期  $P=0.031$ , 稳定期和肝硬化期  $P=0.331$ , 活动期和肝硬化期  $P=0.345$ 。

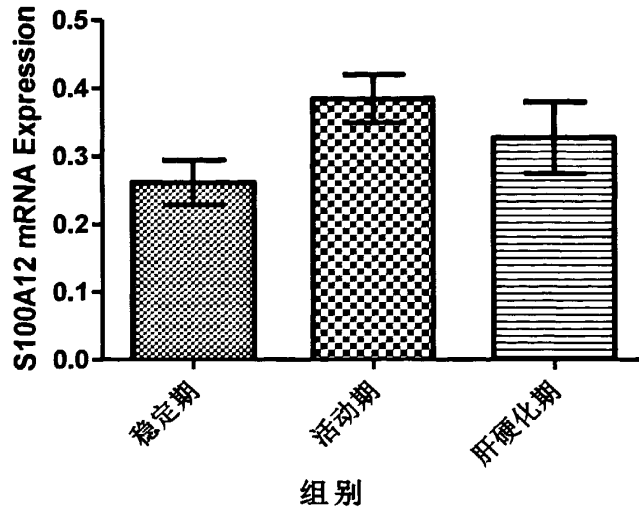


图 35 PBC 患者 稳定期 活动期 肝硬化期 S100A12 mRNA 相对表达量比较  
 ③S100A12 mRNA相对表达量与mayo分期相关分析 (30名患者有凝血功能检测结果, 可以计算mayo评分) 相关分析: 相关系数0.379 (P=0.039)

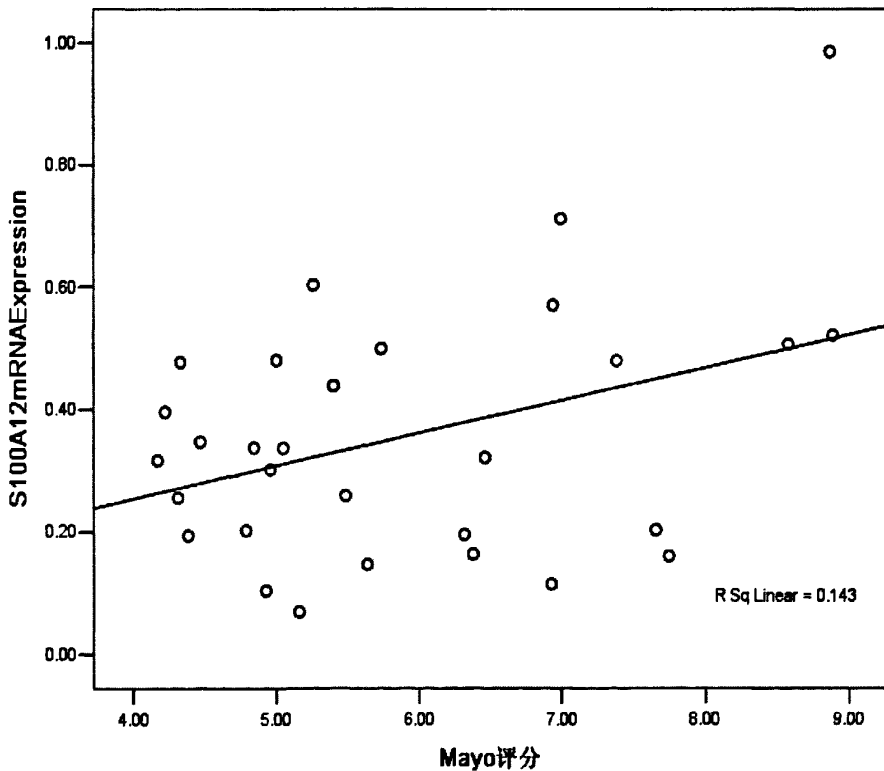


图36 S100A12 mRNA相对表达量与mayo评分相关分析

④小结: a. PBC患者与健康对照及慢性乙肝患者相比, PBMC中S100A12 mRNA表达量升高 (P值分别为0.033和0.000), 有显著差异; 但是CHB患者PBMC中S100A12 mRNA表达量较健康对照降低 (P=0.000), 差异极显著。b. 进一步将PBC患者分组

统计：活动期与稳定期相比，患者PBMC中S100A12 mRNA的表达量升高 (P=0.031)，有显著差异；肝硬化期患者PBMC中S100A12 mRNA的表达量较稳定期升高 (P=0.331)，无统计学差异；肝硬化期患者PBMC中S100A12的表达量较活动期下降 (P=0.345) 无统计学差异。c. PBC患者S100A12 mRNA的相对表达量与mayo分期呈正相关 (P=0.039)。

(5)CD14 RT-PCR 验证结果

① CD14 是单核细胞标志物，在中性粒细胞表面有少量表达。因用淋巴细胞分离液提取的 PBMC 中基本无中性粒细胞，故根据患者及健康对照当天血常规结果各种细胞比例进行计算：

$$\text{单核细胞在 PBMC 中比例} = \text{Mono\%} / (1 - \text{Neut\%})$$

② PBC HC组CD14mRNA表达量及单核细胞比例

表12 PBC HC组CD14mRNA表达量的 $2^{-\Delta Ct}$ 及单核细胞比例统计比较

	例数	单核细胞在PBMC中比例 (%)	$2^{-\Delta Ct}$ 平均值±标准差
PBC	32	0.1344±0.04041	0.2504±0.09934
HC	46	0.1125±0.02670	0.1482±0.06750

PBC 与 HC CD14 mRNA 表达量 P=0.000，单核细胞比例 P=0.001。

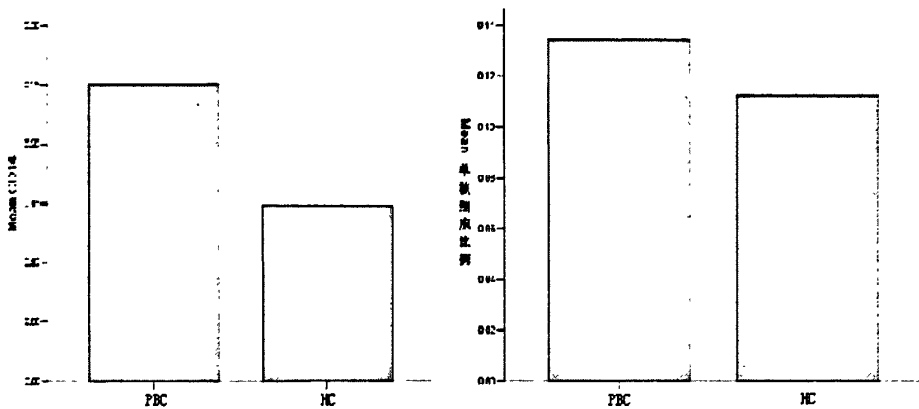


图37 PBC HC组CD14mRNA相对表达量及单核细胞比例比较

③ CD14 mRNA 表达和单核细胞比例的相关性：相关系数为 0.394 (P=0.000)，如图：

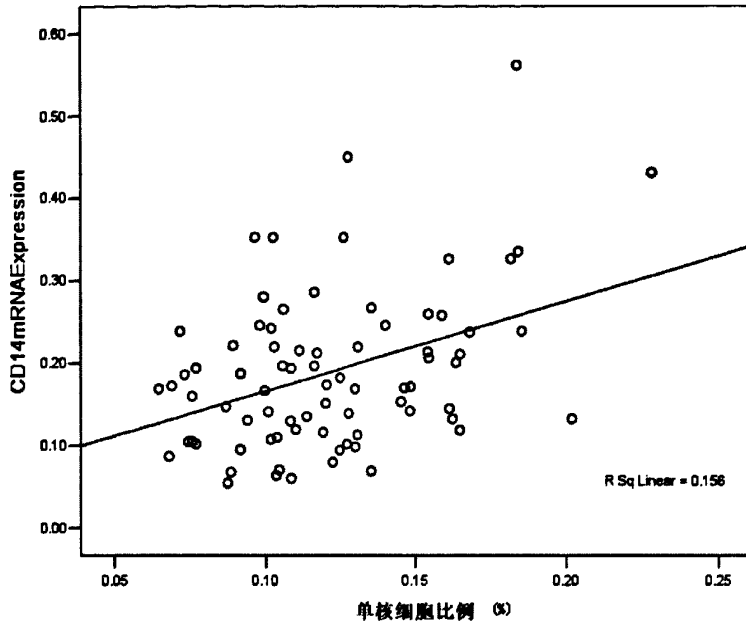


图38 CD14 mRNA表达和单核细胞比例的相关性

④小结：PBC 患者 PBMC 中 CD14 mRNA 的表达量较健康对照升高 ( $P=0.000$ )，差异极显著；但同时发现 PBC 患者 PBMC 中单核细胞的比例较健康对照升高 ( $P=0.01$ )，也有显著差异。相关分析示 PBMC 中 CD14 mRNA 的表达与单核细胞比例正相关，相关系数 0.394 ( $P=0.000$ )。

## 五、ELISA 结果

### 1. 血清 CCL20 ELISA 检测结果

#### (1) CCL20 ELISA 标准曲线

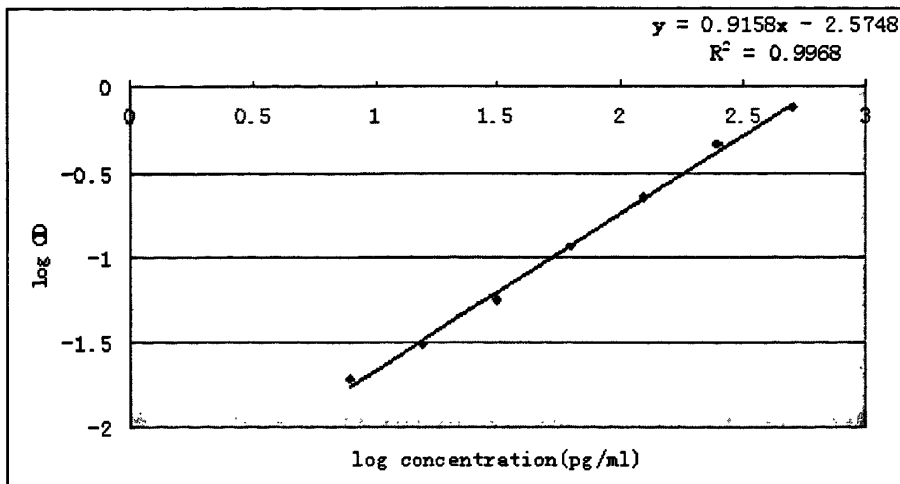


图 39 CCL20 ELISA 标准曲线

由图 39 可见，用梯度稀释的 CCL20 标准品的吸光度的 log 值对浓度的 log 值做图，所得标准曲线线性良好， $Y=0.9158X-2.5748$ ， $R^2=0.9968$ 。

(2)将测得的试验标本 OD 值根据标准曲线计算浓度值。

(3)将 PBC 组、CHB 和 HC 血清 CCL20 浓度进行比较：

表 13 PBC CHB HC 血清 CCL20 浓度统计比较

	例数	平均值±标准差 (pg/ml)
PBC 患者	37	53.2264±38.58734
正常对照	19	23.5369±21.95167
乙肝患者	19	32.9666±26.73952

PBC 和 HC: P 值 0.001; PBC 和 CHB: P 值 0.026; HC 和 CHB: 0.243

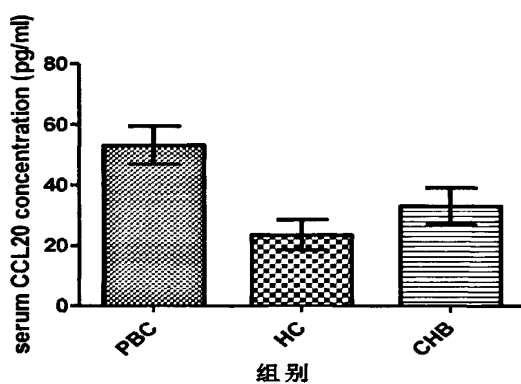


图 40 PBC CHB HC 组血清 CCL20 浓度比较

(4)PBC 患者血清 CCL20 浓度与 mayo 分期相关性分析: 相关系数 0.665, P 值 0.000。

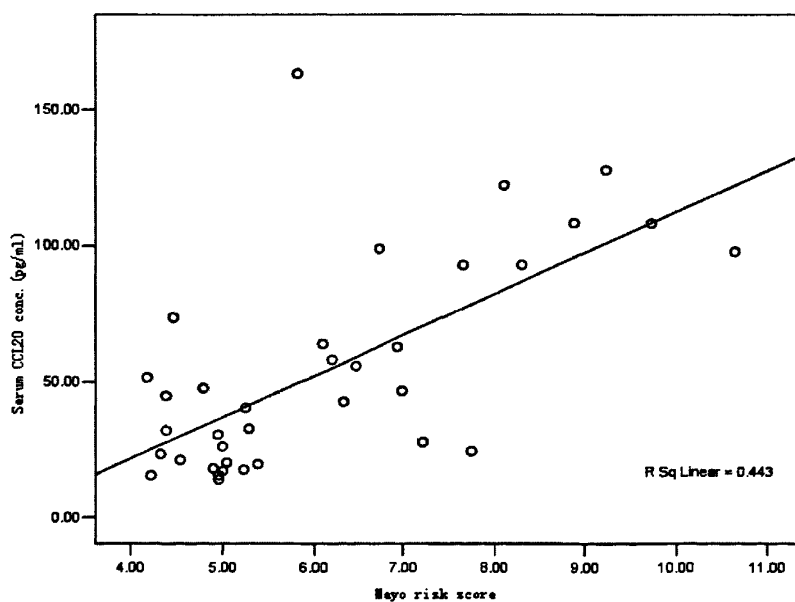


图 41 PBC 患者血清 CCL20 浓度和 mayo risk score 的相关性

(5)按肝穿刺病理分期进行分组:将PBC患者分为I/II期(早期),和III/IV期(晚期),并将临床表现为肝硬化肝功能失代偿期的患者归入IV期。

表 14 PBC 患者不同病理分期血清 CCL20 浓度比较

	例数	平均值±标准差(pg/ml)
早期	12	85.8833±32.10880
晚期	12	28.9777±13.57609

早期和晚期: P 值 0.000

(6)小结: ①PBC 患者血清 CCL20 浓度较正常对照及慢性乙肝患者均明显升高 (P 值分别为 0.001 和 0.026); 慢性乙肝患者血清 CCL20 水平较正常对照升高, 但无统计学差异 (P=0.243); ② PBC 患者血清 CCL20 浓度与 mayo risk score 呈正相关, 相关系数 0.665, P=0.000; ③按照肝穿病理分期, 晚期患者 CCL20 血清浓度较早期患者明显升高 (P=0.000)

## 2. 血清 S100A12 ELISA 检测结果

### (1)S100A12 ELISA 标准曲线

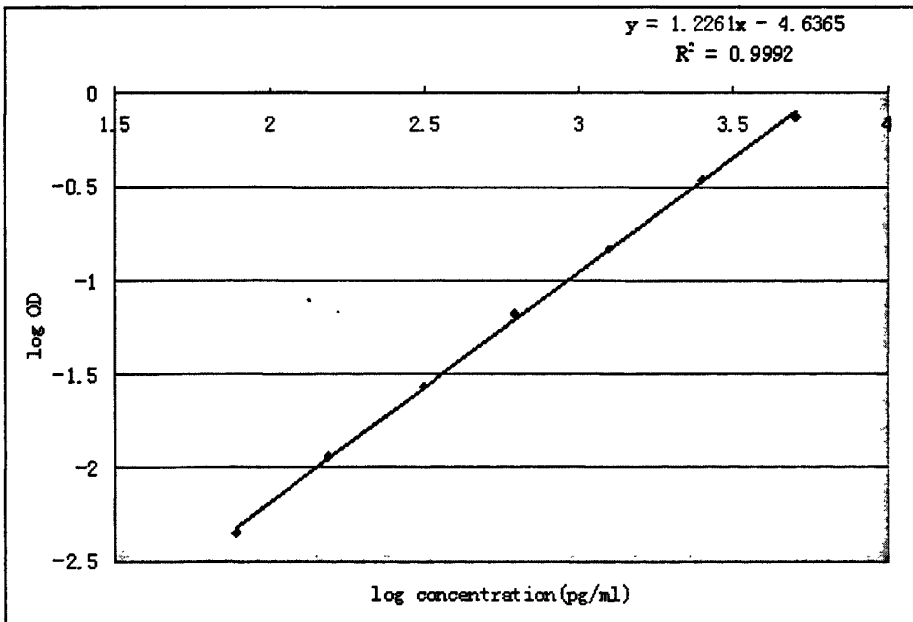


图 42 S100A12 ELISA 标准曲线

由图 42 可见, 用梯度稀释的 S100A12 标准品的吸光度的 log 值对浓度的 log 值做图, 所得标准曲线线性良好,  $Y=1.2261X-4.6365$ ,  $R^2=0.9992$ 。

(2)将测得的试验标本 OD 值根据标准曲线计算浓度值, 乘以稀释倍数 201 后得到各样本的实际测量浓度。

(3)将 PBC、CHB 和 HC 血清 S100A12 浓度进行比较，

表 15 PBC CHB HC 血清 S100A12 浓度统计比较

	例数	平均值±标准差(pg/ml)
PBC 患者	33	204689.6±99175.65585
正常对照	17	255828.6±80940.89579
乙肝患者	17	237418.5±71553.53194

PBC 和 HC: P=0.073; PBC 和 CHB: P=0.234; HC 和 CHB: P=0.487

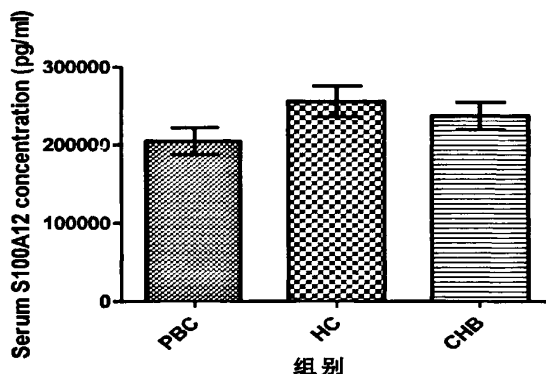


图 43 PBC CHB HC 血清 S100A12 浓度比较

(4)PBC 患者血清 S100A12 浓度与 mayo risk score 相关性分析: 相关系数 0.397, P=0.022。

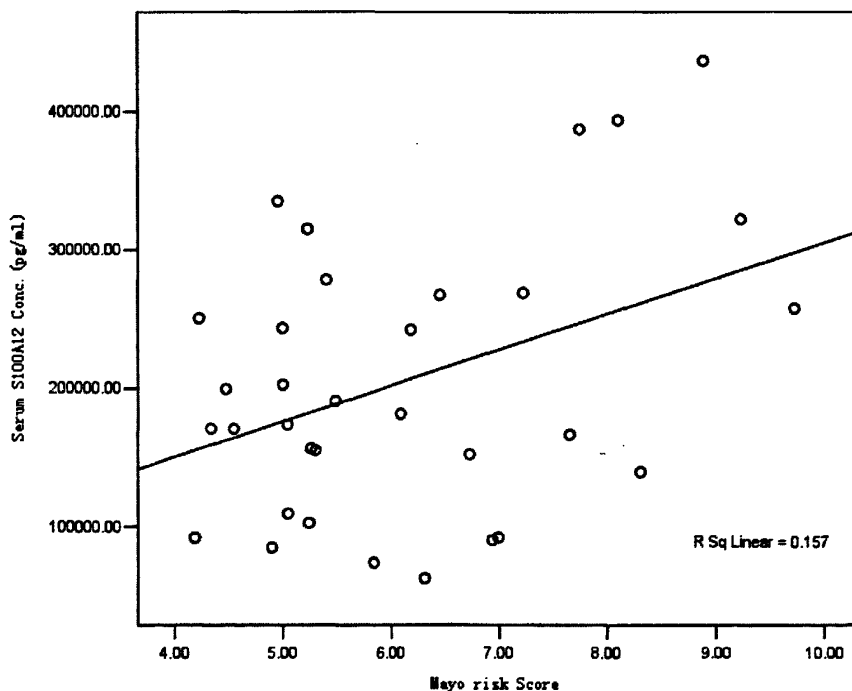


图44 PBC患者血清S100A12浓度和mayo 评分的相关性



(5)按肝穿刺病理分期进行分组:将PBC患者分为I/II期(早期),和III/IV期(晚期),并将临床表现为肝硬化肝功能失代偿期的患者归入IV期。

表 16 PBC 患者不同病理分期血清 S100A12 浓度比较

	例数	平均值±标准差(pg/ml)
早期	10	231555.1±123560.45244
晚期	10	216464.1±105189.37567

早期和晚期: P=0.772

(6)小结: ①血清 S100A12 浓度 PBC 患者、正常对照及慢性乙肝患者三者之间均无显著差异, ② PBC 患者 S100A12 血清浓度与 mayo risk score 呈正相关, 相关系数 0.397, P 值 0.022; ③按照肝穿病理分期, 早期及晚期患者之间血清 S100A12 浓度无显著差异 (P 值 0.772)。

## 讨论

### 第一部分 全基因组表达谱芯片检测结果分析

基因芯片技术是今年来应用于生物科学研究的一种高通量技术平台, 可以同时检测成千上万个基因的表达谱数据, 在较短的时间内发现大量的分子生物学信息, 从而可以揭示多种疾病各种临床特征背后 mRNA 转录水平的调控情况, 为疾病发病机制的研究提供了新的方法。

原发性胆汁性肝硬化 (PBC) 的靶器官为肝脏, 但常合并肝外器官特异的自身免疫性疾病如自身免疫性甲状腺疾病、干燥综合征、类风湿关节炎等; 95% 的患者外周血中存在抗线粒体抗体 (AMA) 和自身反应性 T 细胞, 因此认为该疾病是一种器官特异性的自身免疫性疾病。针对肝脏组织的基因表达谱芯片在 PBC 中已有应用。Honda M 等[6]比较了 AIH、PBC 肝组织表达谱的差异, 并将其应用到临床鉴别诊断; Baba N 等[7]将 PBC、CHC、健康对照者肝组织中的胆管上皮细胞分离出来进行表达谱分析; Furuta K 等[8]比较了 CHB、AIH、PBC、药物性肝炎之间肝组织表达谱差别; Chen L 等[9]比较了 UDCA 治疗前后肝组织表达谱的差异。

本研究选取外周血单个核细胞为研究对象的目的是因为: 在临床工作中, 肝组织不易获得, 外周血较易获得。如果能先从 PBMC mRNA 水平找到差异表达的基因, 再从 PBMC 细胞膜上或者血清中找到相应差异表达的蛋白, 找到疾病特异性或活动性相关的新的标志物, 将为临床诊断、评估、治疗提供便捷途径。

本次 6 张芯片共筛选出 356 个基因差异表达, 其中 296 个基因表达上调, 60

个基因表达下调，分属多个信号通路。但是由于芯片样本量太小，有待下一步 RT-PCR 验证。

## 第二部分 荧光定量 PCR 及 ELISA 检测结果分析

为了验证芯片的正确性及可靠性，本研究从芯片结果中选取了上调或下调表达的，并且可进行相应蛋白水平验证的基因：CCL20、CCL3、PBEF1、S100A12、CD14 进行验证。

### 1. CCL20 在 PBC 患者外周血单个核细胞中 mRNA 表达水平及血清中蛋白表达水平的研究

CCL20 为 CC 亚族趋化因子配体 20[ chemokine (C-C motif) ligand 20]; 又名巨噬细胞验证蛋白 3 $\alpha$  (macrophage inflammatory protein 3 alpha , MIP-3 $\alpha$  ), 亦称肝脏活化调节趋化因子 (liver and activation-regulated chemokine), 肝细胞受刺激后表达量增加。其与 CCL3 均为 CC 亚家族成员。CCL20 在人肝脏、肺脏、阑尾、扁桃体隐窝和上皮细胞上表达。具有促进树突细胞、淋巴细胞定向迁移的作用。

在肝脏疾病中, Shimizu 等[10]用免疫组化的方式证明: 慢性肝炎患者肝组织点状坏死周围浸润的单个核细胞表达 MIP-3 $\alpha$  。K. Yamauchi 等[11]用 ELISA 的方法证明: 慢性肝炎患者血清中 MIP-3 $\alpha$  的表达增高, 并与疾病严重程度相关。

在自身免疫性疾病, 如银屑病上皮细胞表面[12], 炎性肠病肠粘膜表面[13]CCL20 高表达。Chun He 等[14]用 RT-PCR 的方式证明炎性肠病患者外周血单个核细胞中 CCL20 表达升高, 并与疾病活动性相关。RA 患者关节滑液中 CCL20 表达较 OA 患者升高[15], 且在 RA、PsA、non-PsA SpA 患者滑液中 CCL20 表达较血清中升高, 提示 CCL20 在促进淋巴细胞向关节中迁移的作用[16, 17]。而且, CCL20 的配体为 CCR6, Th17 细胞表面表达 CCR6, 在 RA 中 CCR6 与 CCL20 结合, 从而促使 Th17 细胞募集到关节中, 从而刺激一些炎症因子的释放, 如 NO 和 MMPs[18, 19]。

汇管区淋巴细胞浸润为 PBC 的典型病理特征。已经有研究表明趋化因子 CCL21、CCL28、CX3CL1、CXCL9 和 CXCL10 在淋巴细胞募集至汇管区的过程中起到重要作用[20, 21]。CCL20 可能也参与了这一过程。已经有很多报道表明, Th17 细胞在 PBC 发病机制中起到重要作用[22], CCL20 可能也参与了趋化 Th17 的过程。

本研究证明: PBC 患者 PBMC 中 CCL20 mRNA 表达量较健康对照升高, 与基因芯片结果一致, 活动期较稳定期表达量有所升高; 同时血清中 CCL20 浓度较正常

对照及慢性乙肝患者明显升高,推测 CCL20 可能在 PBC 患者淋巴细胞迁移过程中起到了重要作用。但肝硬化期 mRNA 表达量明显下降,与 Mayo 分期呈负相关;而血清中 CCL20 表达却升高,与 Mayo 分期呈正相关。这一矛盾现象的出现可能与多种细胞及组织均表达 CCL20 有关;并且从 mRNA 至蛋白的这一翻译过程是非常复杂的,可能血清中蛋白浓度的升高会对 PBMC 中 mRNA 的表达形成负调控作用,具体机制有待进一步探索。而 CHB 患者 PBMC 中 mRNA 表达量与血清中蛋白表达量均较正常对照升高,与文献报道的 CCL20 在慢性肝炎的肝组织中及血清中高表达相一致。

## 2. CCL3 在 PBC 患者外周血单个核细胞中 mRNA 表达水平的研究

CCL3 [chemokine (C-C motif) ligand 3] 又称为巨噬细胞炎性蛋白 1- $\alpha$  (macrophage inflammatory protein 1-alpha, MIP-1 $\alpha$ ), 也属于 CC 亚家族成员,其配体为 CCR1 和 CCR5。CCL3 可以由多种细胞产生,包括活化的 T 细胞、B 细胞、单核细胞、肥大细胞、中性粒细胞、Langerhans 细胞、胶质细胞、内皮细胞、成纤维细胞和平滑肌细胞。

同其他趋化因子一样, CCL3 具有趋化单核细胞、淋巴细胞、NK 细胞的作用,使其进入组织的炎症损伤部位执行免疫应答功能[23]。在类风湿关节炎患者滑液中, CCL3 的水平高于骨关节炎等其他类型关节炎[24]。Cuello 等[25]用免疫组化的方法证明干燥综合症患者唇腺组织导管上皮 CCL3 高表达。本实验证明,在 PBC 患者 PBMC 中, CCL3 mRNA 高表达,且 CCL3 mRNA 表达量与 CCL20 表达量呈明显正相关,提示在淋巴细胞向汇管区趋化的过程中, CCL3 可能也起到了一定的作用。

同时 CCL3 对 Th1 分化有促进作用[26, 27]。PBC 被认为是 Th1 细胞作用为主的疾病[28, 29], Th1 型细胞主要表达趋化因子受体 CCR5, 其配体主要就是 CCL3, 本研究结果显示 CCL3 在 PBC 患者中的上调表达, 支持 Th1 细胞在 PBC 发病机制中的主导作用这一理论。同样, CCL3 在肝硬化期表达量明显下降, 且其表达量与 Mayo 分期呈负相关, 提示肝硬化期肝纤维化起主要作用。

在慢性丙型肝炎或慢性乙型肝炎肝组织及外周血中 CCR5 高表达, 其配体 CCL3 在汇管区聚集, 在血清中升高[30-32]。本实验证明 CCL3 mRNA 在 CHB 患者 PBMC 中高表达, 与文献报道一致。

## 3. PBEF1 在 PBC 患者外周血单个核细胞中 mRNA 表达水平的研究

PBEF1 (pre-B-cell colony enhancing factor 1) 与1994年发现的淋巴细胞所分泌的前B细胞克隆增强因子(PBEF)的免疫系统蛋白结构一致。又称

Visfatin, 是新近发现的一种脂肪细胞因子, 由脂肪细胞分泌, 也在肝脏和肌肉中高表达。多项研究表明该因子与内分泌代谢如肥胖及胰岛素抵抗相关。已经有文献用RT-PCR方法证明PBMC中PBEF1的表达与肥胖相关[33], 故本研究选择与PBC患者年龄及BMI匹配的健康对照进行试验。因此, 假设PBC患者有脂质代谢异常可能与该因素相关。

PBEF1还与炎性反应相关性疾病的发生、发展密切相关[34]。系统性炎症影响脂肪细胞代谢, 因此影响到脂肪因子; 脂肪组织也可产生大量炎症因子。Visfatin可活化人白细胞, 导致IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  和IL-6等炎症因子的产生。已经有很多研究表明, IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  和IL-6等炎症因子与PBC的发病机制相关。在免疫疾病中: 用ELISA方法检测到SLE患者血清中PBEF1水平高于健康对照[35]。有研究表明: RA患者血清中PBEF1水平高于健康对照; 也有研究表明, 肥胖者有较低的水平, 肥胖的RA患者, 疾病进展慢[36, 37]。

在肝脏疾病中, 有文献表明肝硬化患者血清中循环PBEF1下降[38]。

本研究证明: PBC患者及CHB患者PBMC中PBEF1 mRNA表达量较健康对照升高, 与基因芯片结果一致, PBC活动期较稳定期表达量有所升高, 说明PBEF1在PBC及CHB的炎症反应中有一定作用。肝硬化期表达量有所下降, 与文献报道一致。

#### 4. S100A12在PBC患者外周血单个核细胞中mRNA表达水平及血清中蛋白表达水平的研究

钙结合蛋白S100A12 (S100 calcium binding protein A12), 又名胞外RAGE配体 (extracellular newly identified RAGE-binding protein, ENRAGE), 可作用于晚期糖基化终末产物受体 (RAGE), 而激活多种免疫细胞和炎性细胞, 在机体的免疫反应和炎症反应中发挥重要作用。S100A12正常表达于中性粒细胞, 同时在单核细胞及巨噬细胞中有低表达。已经有多篇文献, 用基因芯片、RT-PCR或者ELISA的方法, 证明其表达与川崎病[39, 40]、类风湿关节炎[41, 42]、幼年类风湿关节炎[43]、炎性肠病[44]相关, 并与疾病活动性相关。

本研究证明: PBC患者PBMC中S100A12 mRNA表达量较健康对照升高, 较CHB患者升高, PBC活动期患者较稳定期患者表达量升高; 但是血清中S100A12的浓度PBC患者、正常对照、CHB之间无明显差异。一方面可能是由于S100A12主要由中性粒细胞表达有关, 本研究没有对中性粒细胞的mRNA水平进行研究, 只对PBMC中mRNA表达进行研究, Jun Abe等[45]同时用基因芯片和RT-PCR的方法证明在Kawasaki Disease: 无论采用PBMC, 还是采用分选的单核细胞中, S100A12表达水平都升高, 用IVIG治疗后下降。因此本实验RT-PCR结果能够部分提示

S100A12 mRNA 在 PBC 发病机制中的作用。另一方面可能与从 mRNA 到蛋白的表达调控有关。另外还可能与样本选取有关, ELISA 验证的 CHB 组及正常对照组样本量较小, 需要扩大样本量进行研究。但是 PBC 患者 PBMC 中 mRNA 表达水平及血清浓度均与 Mayo 评分呈正相关, 提示 S100A12 与疾病进展相关, 可能成为预示疾病进展程度的标志物。

### 5. CD14 在 PBC 患者外周血单个核细胞中 mRNA 表达水平的研究

感染被认为是 PBC 重要的促发因素之一, 其机制是分子模拟, LPS 为 G-细菌细胞壁的主要结构成分, TLR4 通过识别 LPS 与 CD14 复合物, 从而获取革兰阴性细菌感染的信息, 启动 LPS 信号途径。文献表明 TLR4 在 PBC 的发病过程中起到了重要作用[46]。本研究探讨了 CD14 在 PBC 发病机制中的作用。

实验表明 PBC 患者 PBMC CD14 mRNA 的表达水平较健康对照升高, 提示 CD14 可能在 PBC 的发病过程中可能起到了一定作用。

## 第三部分 研究的影响因素、不足之处和改进方法

### 1. 采用 PBMC 进行基因芯片及 RT-PCR 研究的影响因素

文献报道: 基因表达与年龄、性别、采血时间及 PBMC 细胞组成有关。Radich 等证明同一个体, 不用时间点采集外周血进行基因表达谱分析, 存在差异[47]。

本研究检测了 CD14 mRNA 在 PBMC 中的表达水平, 其为单核和巨噬细胞表面的标志物, 我们发现 CD14 mRNA 的表达量与单核细胞比例具有明显相关性。基因表达量与 PBMC 中细胞比例有关。Bovin 等[41]也用芯片技术分析 14 例 RA 患者及 7 例健康对照 PBMC 中的基因表达谱, 发现 RA 患者 CD14 上调, 用 RT-PCR 验证了 21 例 RA 患者及 13 例健康对照 PBMC 中 CD14 表达的差异, 但是 RA 患者中单核细胞在 PBMC 中的比例也高于健康对照。也支持基因表达与细胞成分有关。

Whitney 等[48]用基因芯片的方法比较了 77 个样本的基因表达谱, 也证明外周血的基因表达差异与年龄、性别及采血时间有关, 尤其是与各种血细胞之间比例相关, 例如: CD20、CD2、CD79A 等 55 个淋巴细胞相关基因表达与淋巴细胞绝对值之间的相关系数为 0.45, 52 个中性粒细胞相关基因表达与中性粒细胞绝对值之间的相关系数为 0.42。

因此无论是用基因芯片的方法还是用 RT-PCR 的方法在对 PBMC mRNA 表达水平进行研究, PBMC 的细胞组成成分是一个不可忽视的因素。有必要进行细胞分选从而对基因转录水平或翻译水平进一步研究。目前, 已经有多篇文献[49-51]

支持将 PBMC 细胞进行分选，再进行基因表达谱研究的优势。

从技术层面来讲，不同基因芯片由于探针序列、靶位点及敏感性的不同，检测结果不能达到完全一致，RT-PCR 的结果不能与芯片结果达到完全一致[52]。

## 2. 从 mRNA 到蛋白的表达调控

本研究证实了外周血单个核细胞中 CCL20、CCL3、S100A12、PBEF1 mRNA 的高表达，但是用 ELISA 验证血清中 CCL20 和 S100A12 的浓度，却与 RT-PCR 结果却不完全一致。

一方面是由于多种组织及细胞均表达该蛋白，另一方面是由于 mRNA 转录后的调节机制是复杂的，就可能产生同一细胞因子的 mRNA 水平和蛋白表达水平不完全平行。然而最终的效应分子仍是蛋白产物，所以对于外周血及靶器官肝脏是否存在相应蛋白水平的差异表达仍需要流式细胞术、ELISA、免疫组化等实验方法来证实。

## 3. 本研究的不足之处

由于实验经费限制，我们只采用了 3 例 PBC 患者及 3 例健康对照进行基因芯片检测。由于各个基因 mRNA 在 PBMC 中的表达水平，个体差异比较大，因此采用小样本进行基因芯片筛选命中率较低，因此需要扩大样本量进行芯片筛选及 RT-PCR 验证。

PBMC 细胞包括了淋巴细胞、单核细胞、NK 细胞等多种细胞，在对其进行芯片研究或者 RT-PCR 研究的过程中，细胞组分对实验结果有很大影响。一些差异表达的基因，可能是由于细胞组分的不同而出现表达的差异。因此在进行芯片筛选或 RT-PCR 研究时需要对细胞进行分选。

另外，由于 mRNA 翻译成蛋白这过程的复杂性，mRNA 与蛋白表达水平不完全平行，对于芯片所筛选的基因及 RT-PCR 所验证的基因仍需要流式细胞术、ELISA、免疫组化等实验方法来验证。

# 结论

1. 采用人外周血单个核细胞进行基因表达谱研究，为探索 PBC 的发病机制和新的生物标志物提供了方向及丰富的生物信息学资料。
2. PBC 患者 CCL20、S100A12 mRNA 及蛋白表达水平与疾病活动性及疾病进展情况相关。
3. PBC 患者 CCL3、PBEF1 mRNA 表达水平与疾病活动性及进展有一定相关性。
4. CD14 在 PBC 患者 PBMC 中 mRNA 的表达升高，但与单核细胞比例有关。

## 参考文献

1. Lindor, K.D., et al., *Primary biliary cirrhosis*. Hepatology, 2009. **50**(1): p. 291-308.
2. Mason, A.L., et al., *Detection of retroviral antibodies in primary biliary cirrhosis and other idiopathic biliary disorders*. Lancet, 1998. **351**(9116): p. 1620-4.
3. Jones, D.E., *Autoantigens in primary biliary cirrhosis*. J Clin Pathol, 2000. **53**(11): p. 813-21.
4. Szostecki, C., et al., *Autoantibodies to the nuclear Sp100 protein in primary biliary cirrhosis and associated diseases: epitope specificity and immunoglobulin class distribution*. Scand J Immunol, 1992. **36**(4): p. 555-64.
5. Heathcote, E.J., *Management of primary biliary cirrhosis. The American Association for the Study of Liver Diseases practice guidelines*. Hepatology, 2000. **31**(4): p. 1005-13.
6. Honda, M., et al., *cDNA microarray analysis of autoimmune hepatitis, primary biliary cirrhosis and consecutive disease manifestation*. J Autoimmun, 2005. **25**(2): p. 133-40.
7. Baba, N., et al., *Gene expression profiling in biliary epithelial cells of primary biliary cirrhosis using laser capture microdissection and cDNA microarray*. Transl Res, 2006. **148**(3): p. 103-13.
8. Furuta, K., et al., *Intrahepatic gene expression profiles in chronic hepatitis B and autoimmune liver disease*. J Gastroenterol, 2008. **43**(11): p. 866-74.
9. Chen, L., et al., *Gene expression profiling of early primary biliary cirrhosis: possible insights into the mechanism of action of ursodeoxycholic acid*. Liver Int, 2008. **28**(7): p. 997-1010.
10. Shimizu, Y., et al., *CC-chemokine receptor 6 and its ligand macrophage inflammatory protein 3alpha might be involved in the amplification of local necroinflammatory response in the liver*. Hepatology, 2001. **34**(2): p. 311-9.
11. Yamauchi, K., et al., *Increased serum levels of macrophage inflammatory protein-3alpha in chronic viral hepatitis: prognostic importance of macrophage inflammatory protein-3alpha during interferon therapy in chronic hepatitis C*. J Viral Hepat, 2002. **9**(3): p. 213-20.
12. Homey, B., et al., *Up-regulation of macrophage inflammatory protein-3 alpha/CCL20 and CC chemokine receptor 6 in psoriasis*. J Immunol, 2000. **164**(12): p. 6621-32.
13. Kaser, A., et al., *Increased expression of CCL20 in human inflammatory bowel disease*. J Clin Immunol, 2004. **24**(1): p. 74-85.
14. He, C., et al., *Higher levels of CCL20 expression on peripheral blood mononuclear cells of chinese patients with inflammatory bowel disease*. Immunol Invest, 2010. **39**(1): p. 16-26.
15. Ruth, J.H., et al., *Role of macrophage inflammatory protein-3alpha and its ligand CCR6 in rheumatoid arthritis*. Lab Invest, 2003. **83**(4): p. 579-88.
16. Melis, L., et al., *Systemic levels of IL-23 are strongly associated with disease activity in rheumatoid arthritis but not spondyloarthritis*. Ann Rheum Dis, 2010. **69**(3): p. 618-23.
17. Nanki, T., et al., *Chemokine receptor expression and functional effects of chemokines on B cells: implication in the pathogenesis of rheumatoid arthritis*. Arthritis Res Ther, 2009. **11**(5): p. R149.
18. Annunziato, F., et al., *Type 17 T helper cells—origins, features and possible roles in rheumatic disease*. Nat Rev Rheumatol, 2009. **5**(6): p. 325-31.
19. Kim, C.H., *Migration and function of Th17 cells*. Inflamm Allergy Drug Targets, 2009. **8**(3): p. 221-8.
20. Borchers, A.T., et al., *Lymphocyte recruitment and homing to the liver in primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis*. Semin Immunopathol, 2009. **31**(3): p. 309-22.

21. Shimoda, S., et al., *CX3CL1 (fractalkine): a signpost for biliary inflammation in primary biliary cirrhosis*. *Hepatology*, 2010. **51**(2): p. 567-75.
22. Rong, G., et al., *Imbalance between T helper type 17 and T regulatory cells in patients with primary biliary cirrhosis: the serum cytokine profile and peripheral cell population*. *Clin Exp Immunol*, 2009. **156**(2): p. 217-25.
23. Zeremski, M., L.M. Petrovic and A.H. Talal, *The role of chemokines as inflammatory mediators in chronic hepatitis C virus infection*. *J Viral Hepat*, 2007. **14**(10): p. 675-87.
24. Iwamoto, T., et al., *Molecular aspects of rheumatoid arthritis: chemokines in the joints of patients*. *FEBS J*, 2008. **275**(18): p. 4448-55.
25. Cuello, C., et al., *Chemokine expression and leucocyte infiltration in Sjogren's syndrome*. *Br J Rheumatol*, 1998. **37**(7): p. 779-83.
26. Nagai, S., et al., *Comprehensive gene expression profile of human activated T(h)1- and T(h)2-polarized cells*. *Int Immunol*, 2001. **13**(3): p. 367-76.
27. Rogge, L., et al., *Transcript imaging of the development of human T helper cells using oligonucleotide arrays*. *Nat Genet*, 2000. **25**(1): p. 96-101.
28. Berg, P.A., R. Klein and M. Rocken, *Cytokines in primary biliary cirrhosis*. *Semin Liver Dis*, 1997. **17**(2): p. 115-23.
29. Van de Water, J., et al., *Heterogeneity of autoreactive T cell clones specific for the E2 component of the pyruvate dehydrogenase complex in primary biliary cirrhosis*. *J Exp Med*, 1995. **181**(2): p. 723-33.
30. Shields, P.L., et al., *Chemokine and chemokine receptor interactions provide a mechanism for selective T cell recruitment to specific liver compartments within hepatitis C-infected liver*. *J Immunol*, 1999. **163**(11): p. 6236-43.
31. Larrubia, J.R., et al., *The role of CCR5/CXCR3 expressing CD8+ cells in liver damage and viral control during persistent hepatitis C virus infection*. *J Hepatol*, 2007. **47**(5): p. 632-41.
32. Leifeld, L., et al., *Early up-regulation of chemokine expression in fulminant hepatic failure*. *J Pathol*, 2003. **199**(3): p. 335-44.
33. Samara, A., et al., *Visfatin, low-grade inflammation and body mass index (BMI)*. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2008. **69**(4): p. 568-74.
34. Samal, B., et al., *Cloning and characterization of the cDNA encoding a novel human pre-B-cell colony-enhancing factor*. *Mol Cell Biol*, 1994. **14**(2): p. 1431-7.
35. De Sanctis, J.B., et al., *Serum adipokine levels in patients with systemic lupus erythematosus*. *Autoimmunity*, 2009. **42**(4): p. 272-4.
36. Gonzalez-Gay, M.A., et al., *Visfatin is not associated with inflammation or metabolic syndrome in patients with severe rheumatoid arthritis undergoing anti-TNF-alpha therapy*. *Clin Exp Rheumatol*, 2010. **28**(1): p. 56-62.
37. Straburzynska-Lupa, A., et al., *Visfatin, resistin, hsCRP and insulin resistance in relation to abdominal obesity in women with rheumatoid arthritis*. *Clin Exp Rheumatol*, 2010. **28**(1): p. 19-24.
38. de Boer, J.F., et al., *Plasma levels of PBEF/Nampt/visfatin are decreased in patients with liver cirrhosis*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2009. **296**(2): p. G196-201.
39. Abe, J., et al., *Gene expression profiling of the effect of high-dose intravenous Ig in patients with Kawasaki disease*. *J Immunol*, 2005. **174**(9): p. 5837-45.
40. Burns, J.C., *S100 proteins in the pathogenesis of Kawasaki disease*. *J Am Coll Cardiol*, 2006.



48(6): p. 1265-7.

41. Bovin, L.F., et al., *Blood cell gene expression profiling in rheumatoid arthritis. Discriminative genes and effect of rheumatoid factor.* Immunol Lett, 2004. **93**(2-3): p. 217-26.
42. Chen, Y.S., et al., *Serum levels of soluble receptor for advanced glycation end products and of S100 proteins are associated with inflammatory, autoantibody, and classical risk markers of joint and vascular damage in rheumatoid arthritis.* Arthritis Res Ther, 2009. **11**(2): p. R39.
43. Foell, D., et al., *Monitoring neutrophil activation in juvenile rheumatoid arthritis by S100A12 serum concentrations.* Arthritis Rheum, 2004. **50**(4): p. 1286-95.
44. Foell, D., et al., *Neutrophil derived human S100A12 (EN-RAGE) is strongly expressed during chronic active inflammatory bowel disease.* Gut, 2003. **52**(6): p. 847-53.
45. Abe, J., et al., *Gene expression profiling of the effect of high-dose intravenous Ig in patients with Kawasaki disease.* J Immunol, 2005. **174**(9): p. 5837-45.
46. Wang, A.P., et al., *Hepatic expression of toll-like receptor 4 in primary biliary cirrhosis.* J Autoimmun, 2005. **25**(1): p. 85-91.
47. Radich, J.P., et al., *Individual-specific variation of gene expression in peripheral blood leukocytes.* Genomics, 2004. **83**(6): p. 980-8.
48. Whitney, A.R., et al., *Individuality and variation in gene expression patterns in human blood.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(4): p. 1896-901.
49. Shen-Orr, S.S., et al., *Cell type-specific gene expression differences in complex tissues.* Nat Methods, 2010. **7**(4): p. 287-9.
50. McKinney, E.F., et al., *A CD8+ T cell transcription signature predicts prognosis in autoimmune disease.* Nat Med, 2010. **16**(5): p. 586-91, 1p following 591.
51. Lyons, P.A., et al., *Novel expression signatures identified by transcriptional analysis of separated leucocyte subsets in systemic lupus erythematosus and vasculitis.* Ann Rheum Dis, 2010. **69**(6): p. 1208-13.
52. Canales, R.D., et al., *Evaluation of DNA microarray results with quantitative gene expression platforms.* Nat Biotechnol, 2006. **24**(9): p. 1115-22.

# 原发性胆汁性肝硬化 mRNA 及蛋白差异表达研究进展

原发性胆汁性肝硬化 (primary biliary cirrhosis, PBC) 是多见于中年女性的慢性进行性淤积性肝脏疾病。以乏力、瘙痒、黄疸、肝肿大、骨质疏松等为主要临床表现, 绝大多数患者抗线粒体抗体阳性。病理特点为肝内进行性非化脓性小胆管破坏伴门脉区炎症、纤维化, 最终可进展为肝硬化和肝衰竭需要肝移植治疗。其病因至今未明, 可能是遗传、环境、性别、感染、免疫等多个因素作用的结果。随着近年来分子生物学的进展, 目前发现其在 mRNA、蛋白水平都存在众多的差异表达, 认识这些差异表达的基因、蛋白及其相应功能, 对于揭示该疾病的发病机制具有重要意义。本文就该领域的研究进展进行综述, 按照其功能的不同进行分类阐述。

## 一、适应性免疫相关

### 1. 细胞免疫相关

通过免疫组化研究发现 PBC 患者肝组织汇管区浸润的淋巴细胞主要是活化的 CD4<sup>+</sup>和 CD8<sup>+</sup>T 细胞, 表明 T 细胞介导的免疫反应是胆管上皮损伤的重要机制[1]。根据 T 细胞在免疫应答中的功能的不同, 可以将 T 细胞分为辅助性 T 细胞(helper T lymphocyte)、细胞毒性 T 细胞 (cytotoxic T lymphocyte, CTL 或 cytotoxic T cell, Tc)、和调节性 T 细胞 (regulatory T cell, Tr)。

#### (1) 辅助性 T 细胞:

①Th1 细胞和 Th2 细胞功能的平衡和消长是免疫调节的核心环节。在 PBC 患者的外周血和肝脏中都有 PDC-E2 (丙酮酸脱氢酶复合体的二氢硫辛酸胺转移酶) 特异性的 CD4<sup>+</sup>T 细胞。PBC 患者肝脏中 PDC-E2 特异的 CD4<sup>+</sup>T 细胞出现频率比外周血大四倍。PDC-E2 特异的 CD8<sup>+</sup>T 细胞在 PBC 患者肝脏中出现的频率也是外周血的 10 倍, 而且在疾病早期, 此类细胞出现的频率更高。从功能上来讲, 该自身反应性 CD8<sup>+</sup>T 细胞不仅对 PDC-E2 抗原有细胞毒性, 而且其更倾向于产生 IFN- $\gamma$ , 而不是 IL-4 和 IL-10。因此, PBC 被认为是以 Th1 作用为主的慢性胆管炎症[2]。在 Th1 优势的疾病中, PPAR $\gamma$  (Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ ) 的配体能够通过下调促炎症因子表达而改善疾病状况。Harada 等[3]研究发现 PBC 患者肝组织受损胆道 PPAR $\gamma$  mRNA 表达下调, 因此 PPAR $\gamma$  配体可能对治疗 PBC 胆管炎症有益。

②Th17: Th17 细胞是近来发现的不同于 Th1 和 Th2 细胞亚群的新型效应性 CD4<sup>+</sup>T 细胞亚群。G. Rong 等[4]证明 PBC 患者 PBMC 中 IL-17A mRNA 表达升高, 血

清中 IL-17A 升高, CD4+ T 细胞中 Th17+的细胞增加。Lan 等[5]的研究发现, PBC 患者肝组织浸润淋巴细胞中 IL-17+的细胞比例较正常对照增加。

## (2) 细胞毒性 T 细胞:

CTL 的杀伤机制介导的细胞毒性反应主要是由细胞毒性颗粒的释放所介导的, 最终诱导细胞凋亡, 穿孔素和颗粒酶是杀伤靶细胞的两个最重要的颗粒蛋白。CTL 另外一个杀伤机制是通过 CTL 表面表达 FasL 和分泌 TNF- $\alpha$ , 启动 caspase 信号转导途径, 诱导细胞凋亡。关于 CTL 介导的免疫反应导致胆管上皮细胞损伤也有很多研究, 详见本文“细胞凋亡”部分。

## (3) 调节性 T 细胞:

其中 CD4+ CD25+ Tregs 是自然产生的调节性 T 细胞, 主要通过接触抑制的方式抑制 T 细胞的活化和增殖。Lan 等[6]研究发现: PBC 患者外周血 CD4+ CD25+ Tregs 数量低于健康对照。CD4+ CD25+ Tregs 缺乏会导致其抑制功能削弱, 产生 Th1 细胞驱动的有害的自身免疫反应。

## (4) T 淋巴细胞介导的免疫应答过程:

在这个连续过程中: 共刺激分子 CD28/B7 超家族的 PD-L1 (B7-H1/CD274)、PD-L2 (B7-DC) 是 PD-1 (programmed death-1/CD279) 的配体, 可抑制活化的 T 细胞的增殖和细胞因子的产生, 抑制 B 细胞功能, 参与免疫耐受。Makaki 等[7]用免疫组化和 RT-PCR 的方法发现 PBC 患者肝脏组织中 PD-1、PD-L1、PD-L2 表达水平较下调。

## 2. 体液免疫相关

PBC 患者体内可以出现多种自身抗体, 抗线粒体抗体、抗核孔膜蛋白 gp-210 及抗核小体蛋白 sp100 抗体等, 关于这方面有众多研究, 本文不再累述。PBC 患者血清免疫球蛋白特别是 IgM 明显升高; 肝组织中浸润的浆细胞主要表达 IgM, 而 AIH、PSC、CHC 等其他慢性肝病则主要表达 IgG[8]。

CD40-CD154 (又称 CD40L) 的结合提供了 B 细胞活化的第二信号。CD40 表达于 B 细胞, CD40L 表达于活化的 CD4+Th 细胞, 属于 TNF 家族成员。Mayo 等[9]研究发现 PBC 患者肝组织中 CD154 mRNA 表达增高, 并且肝脏 CD154 mRNA 表达量与分泌型 Ig mRNA 表达量正相关。因此, CD40-CD154 可能参与 PBC 患者肝脏 Ig 生成。

## 二、固有免疫相关

### 1. TLR (Toll-like receptor)

TLR 能够识别作为配体的病原相关分子模式 (pathogen associated molecular patterns, PAMPs), 从而启动机体的固有免疫, 进而引起获得性免疫。

可能通过 TLRs, PBC 患者固有免疫系统对微生物相关刺激处于高应答状态[10]。

Takii 等[11]通过 RT-PCR 和免疫组化的方法发现: PBC 患者肝门和肝实质组织中, TLR-3 较 AIH、CHC 表达水平均显著升高。在国内, 王红梅等[12]用 RT-PCR 证明 PBC 患者活动期 PBMC 中 TLR3 mRNA 的表达水平高于疾病缓解期, 同时也高于肝癌患者和健康对照组。

Mao 等[13]体外分离 PBC 患者的单核细胞, 用 TLRs 配体刺激, 其促炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8 和 TNF- $\alpha$  较健康对照明显升高。Honda 等[14]分离 PBC 患者、CVH 患者、健康对照外周血单个核细胞及单核细胞进行体外试验, 用脂多糖(TLR4 配体) 刺激后, PBC 患者组 NF- $\kappa$  B 活性、MyD88 mRNA 表达及单核细胞表面 TLR4 表达均明显升高, 参与 TLR4 信号转导的负向调节分子 RP105 mRNA 表达显著降低。因此, 研究认为 TLR4 配体刺激后, PBC 组 RP105、TLR4 表达改变, 导致对 LPS 刺激敏感增加, 从而导致炎症因子的分泌。Wang 等[15]用免疫组化的方法发现 PBC 患者胆管上皮细胞 TLR4 表达显著升高, 在 PBC 进展期, 门静脉周围的肝细胞和小叶间肝细胞也表达 TLR4。在国内, 仲人前等[16]证明 PBC 患者及乙型肝炎肝硬化患者 PBMC 中 TLR4 mRNA 的表达水平均显著高于健康对照。

Kikuchi 等[17]的研究表明:用 TLR9 的配体 CpG 刺激 PBC 患者的 PBMC, PBC 患者比健康对照产生了更多 IgM。

## 2. 单核巨噬细胞

单核细胞表面表达多种 TLRs, 被 PAMP 激活后产生大量的炎症因子, 包括 IL-1、IL-6、IL-18、IL-12 和 TNF- $\alpha$ , 从而可以调节 T 淋巴细胞的增生和活化。将 PBC 患者外周血单核细胞体外培养, 被 TLR2、TLR3、TLR4、TLR5 和 TLR9 的配体刺激, 不仅单核细胞数目增多, 而且可以产生更大量的炎症因子, 如 IL-1、IL-6、和 TNF- $\alpha$  [2, 18, 19]。研究表明 PBC 患者中巨噬细胞吞噬凋亡细胞的作用延迟, 血清抗 CD16 抗体, 可能通过阻断补体受体 3 (CD3) 对该机制作用[20]。

## 3. 树突状细胞

树突状细胞(DC)是专职的抗原递呈细胞, 可以有效刺激 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞活化, 从而将固有免疫和适应性免疫有机联系起来。免疫组化研究发现 PBC 病人内部交错突细胞(inter-digitating cells, IDC)数量增多及 CD83+DC 细胞分布较局限[21]。抗原负载的 DC 能更有效的诱导 PDC-E2 特异性的 CD4+T 细胞的增殖[22]。说明 DC 在 PBC 中发挥作用[23]。

## 4. NK 细胞

NK 细胞是执行固有免疫功能的重要细胞。Chuang YH 等[24]人的研究得出结论: PBC 患者 PBMC 及肝脏组织中 NK 细胞数目较对照增多, 外周血中 NK 细胞溶解细胞功能增强, NK 细胞 PRF1 表达上调, 但 NK 细胞合成的细胞因子 IFN- $\gamma$ 、IL-6

和 IL-8 较正常对照下调。

### 5. NKT 细胞

NKT 细胞是一群细胞表面既有 T 细胞受体,又有 NK 细胞受体的特殊 T 细胞亚群。接受 CD1d 分子递呈的糖脂抗原。NKT 细胞激活可以产生细胞因子和趋化因子,调节适应性免疫和固有免疫;另外 NKT 细胞也具有细胞毒作用。研究表明 PBC 患者 CD1d 限制性 NKT 细胞增多,而且该细胞在肝脏中比在外周血中多[25]。在 dnTGFβRII PBC 模型鼠肝脏中,CD1d 限制性 NKT 细胞增多,CD1d 缺陷的 dnTGFβRII PBC 模型鼠肝脏淋巴细胞浸润减少,胆管炎减轻[26]。

## 三、细胞因子相关

细胞因子精细调节着特异性免疫应答各个阶段对固有免疫和适应性免疫均有作用。PBC 中有多种细胞因子的表达异常:

### 1. 白细胞介素 (interleukin, IL):

IL 在传递信号、激活与调节免疫细胞、介导 T、B 细胞活化、增殖、分化及炎症反应中起重要作用。研究发现早期 PBC 患者肝脏组织中 IL-5、IL-6 mRNA 表达水平较 CHC、健康对照升高,IL-2、IL-4 mRNA 表达在早期 PBC 肝脏很难检测到,IL-10 mRNA 在早期 PBC 肝脏中表达低于 CHC 患者[27]。PBC 患者血清 IL-1β、IL-6[28]、IL-15[29]、IL-17A[4]、IL-18[30]、IL-22[31]较健康对照升高;PBMC 中 IL-15[29]、IL-17A[4] mRNA 的表达量升高。IL-12 及 IL-23 也在 PBC 的发病机制中起了重要作用,IL-12 缺陷的小鼠模型,证实了这一点[32]。

### 2. 干扰素 (interferon, IFN)

IFN 具有广谱抗病毒、抗肿瘤和免疫调节功能,研究发现早期 PBC 患者肝脏组织中,IFN-α、-β 在汇管区、肝实质中表达水平比 AIH、CHC 显著升高,且汇管区 IFN-α mRNA 表达水平和血清 ALP 之间存在正相关性[11]。肝组织中 IFN-γ mRNA 表达高于 CHC[27, 33]。血清中,IFN-γ 在 PBC 患者较正常对照升高,但非疾病特异性[34]。

### 3. 肿瘤坏死因子超家族 (tumor necrosis factor, TNF)

肿瘤坏死因子超家族最常见的为 TNF-α 和 TNF-β。PBC 患者血清 TNF-α [28]较正常对照升高。近年来,又不断有新成员加入该家族。B 淋巴细胞活化因子 (B cell-activating factor belonging to the TNF family, BAFF) 是肿瘤坏死因子超家族的新成员,是 B 淋巴细胞生长、分化和发育所需的细胞因子,其通过与细胞表面的 3 种受体—B 细胞成熟抗原 (B cell maturation antigen, BCMA)、穿膜蛋白活化物 (transmembrane activator and CAM1-interactor, TACI) 和 B 细胞活化因子受体 (BAFF receptor, BAFF-R) 结合产生信号发挥重要调节作

用。BAFF 的缺陷或过量表达均能引起机体的免疫失衡，从而诱发多种疾病。有研究表明 PBC 患者外周血单个核细胞 BCMA mRNA 表达水平显著升高，TACI 基因表达明显降低[35]，血清中 BAFF 水平也升高[36]，提示 PBC 发病机制与体液免疫增强、免疫耐受打破有关。TNFSF9，又名 4-1BBL 和 CD137L，是肿瘤坏死因子家族成员，在抗原提呈细胞表面作为协同刺激分子，它参与 T 细胞和 B 细胞的活化、增殖和凋亡。Xia 等[37]的研究表明 PBC 患者 PBMC 中 TNFSF9 mRNA 表达升高，并且与疾病进展相关；细胞膜表面与血清中 TNFSF9 较正常人显著增加。

增殖诱导配体 (APRIL) 也为肿瘤坏死因子超家族 (TNFSF) 的一名新成员，即 TNFSF13，APRIL 在免疫调节方面也发挥着重要作用。原发性胆汁性肝硬化患者 PBMC 中 APRIL mRNA 的表达升高[38]。但血清中 APRIL 的表达与正常对照比，没有明显差异[36]。

#### 4. 趋化性细胞因子 (chemokine)

汇管区淋巴细胞浸润为 PBC 的典型病理特征。已经有研究表明趋化因子 CCL21、CCL28、CX3CL1、CXCL9 和 CXCL10 在淋巴细胞募集至汇管区的过程中起到重要作用[39, 40]。

#### 5. 生长因子 (growth factor, GF)

生长因子是具有刺激细胞生长作用的细胞因子，其中转化生长因子- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 是一种重要的肝纤维化因子，也是 Th17 细胞分化的重要调节因子。PBC 患者血清 TGF- $\beta$  升高，且与 GGT 及 ALP 呈显著的相关性[41]。

### 四、细胞凋亡相关

PBC 患者胆管上皮细胞会出现胞浆皱缩和核固缩以及 DNA 断裂增加，因此胆管上皮凋亡在 PBC 的发病中具有重要作用。具有促凋亡作用的 FAS 分子及其配体在 PBC 患者肝门汇管区及外周血中的表达水平均有明显增加，可能参与 PBC 胆管上皮的损伤[42]。具有抗凋亡作用的 bcl-2 蛋白水平明显降低[43]。穿孔素和颗粒酶 B 属于同一条作用途径，Fox CK 等[44]发现，颗粒酶 B mRNA 水平在 PBC 患者肝脏组织中升高，Harada 等用免疫组化的方式，证明穿孔素和颗粒酶 B 在胆管上皮高表达。TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) 可以诱导凋亡发生。研究发现 PBC 及慢性乙型肝炎患者外周血单个核细胞中，TRAIL mRNA 表达、细胞表面膜结合 TRAIL 蛋白、血浆可溶性 TRAIL 蛋白水平较健康对照均有增加[45]。

另外，凋亡细胞清除机制的异常被认为与自身免疫机制紊乱相关。Berg 等[46]用 Western blot 的方式，用 PBC 患者的血清 IgG 可以检测到细胞内抗原，但是用健康对照的血清 IgG 检测不到。并且在用 staurosporine 或 TRAIL 介导凋亡

的细胞中, PBC 患者的血清 IgG 可以识别 caspase 底物。在国内, 仲人前等的研究表明 PBC 患者 PBMCs 中的 caspase 8 和 caspase 3 的 mRNA 和蛋白的表达明显低于健康对照组[47]。

但是究竟是 PBC 的发病机制导致凋亡途径的改变, 还是凋亡途径的改变导致 PBC 发病, 还有待于进一步研究。

## 五、细胞损伤相关

PBC 是以小胆管受损为主要病理表现的疾病, 胆管上皮细胞的损伤可能参与了发病的过程。

ITF(intestinal trefoil factor)能够促进炎症过程中上皮细胞迁移和粘膜重建。Kimura Y 等[48]人的研究发现 PBC 患者肝组织中 ITF mRNA 表达水平较 PSC 及健康对照显著升高, 但是原位杂交技术和免疫组化技术证明 PBC 患者中 ITF 大部分表达于大胆管, 与对照肝组织明显不同。可以解释 PBC 小胆管受损这一现象。

氧化机制可能在 PBC 的胆管损伤中存在一定作用。转录因子(Nuclear factor-E2-related factor-2, Nrf2)具有保护多个组织免受氧化损伤的作用。Kawata 等[49]的研究表明, UDCA 治疗后, PBC 患者肝组织中代表氧化损伤程度的 8-羟基脱氧鸟嘌呤(8-hydroxydeoxyguanosine, 8-OHdG)蛋白降低; 而 Nrf2 及 Nrf2 相关的抗氧化蛋白硫氧还蛋白(thioredoxin, TRX)和硫氧还蛋白还原酶 thioredoxin reductase1(TrxR1)升高。

## 六、细胞粘附相关

粘附分子在 PBC 的发病机制中也起着重要作用, 根据其结构特点可以分为整合素家族、选择素家族等。

属于免疫球蛋白超家族的细胞间粘附分子-1(Intercellular adhesion molecule 1, ICAM-1)和血管细胞粘附分子-1(vascular adhesion molecule 1, VCAM-1)在 PBC 患者肝组织中破坏的胆管上皮高表达。另外, 属于整合素家族的淋巴细胞功能相关抗原(lymphocyte function-associated antigens, LFA-1)和迟现抗原(very late antigens, VLA)也在汇管区或肝实质的血管上皮细胞或浸润的炎症细胞尤其是淋巴细胞表达[50]。Yokomori 等[51]用免疫组化、Western blot、免疫电镜及原位杂交的方式证明 ICAM-1 及其配体 IFA-1 在 PBC 胆管上皮及周围浸润淋巴细胞的差异表达, 提示 ICAM-1 及 IFA-1 可能参与了胆管上皮的破坏。UDCA 治疗后, ICAM-1 及 IFA-1 表达下调[52]。在 PBC 患者血清中, 有研究表明 sICAM-1 较正常对照升高, 且与疾病严重程度正相关, UDCA 治

疗后, sICAM-1 下降[53]。在国内也有研究表明: PBC 患者血清 sVCAM-1 水平明显高于对照组; child-pugh 分级 B、C 级患者血清 sVCAM-1 水平高于 A 级[54]。Siglec-1(sialic acid-binding immunoglobulin-like lectins, 唾液酸结合的免疫球蛋白样凝集素, CD169)也属于免疫球蛋白超家族的成员之一, 其在 PBC 患者 PBMC 中 mRNA 的表达量与在单核细胞表面蛋白的表达量均高于健康对照[55]。

属于选择素家族的 E 选择素(endothelial-leukocyte adhesion molecule 1, ELAM-1 or E-selectin) 在肝组织中表达[50, 56], 在 PBC 患者血清中表达升高, 提示白细胞与内皮细胞粘附或迁移可能对 PBC 的发病有一定的作用[57, 58]。

### 七、胆汁分泌、转运相关:

PBC 是慢性进行性胆汁淤积性肝病, 与胆汁分泌、转运相关的基因和蛋白是否与 PBC 的发病和进展有关?

在对未经治疗的 PBC 患者肝脏组织的研究中, 发现早期和晚期的 PBC 患者 MRP4(multidrug-resistance protein 4) mRNA 均较健康对照显著上调, 而 MRP2 mRNA、MRP3 mRNA 仅在早期 PBC 患者中显著上调, 因此研究认为 MRP2 mRNA、MRP3 mRNA 上调表达的缺失可能与疾病进展相关[59]。

碳酸氢盐载体 (Chloride-bicarbonate anion exchanger 2, AE2) 可能参与胆汁分泌过程的。研究发现 PBC 患者肝脏组织中 AE2 mRNA 及蛋白表达均下调[60, 61]。Arenas F 等[62]用 UDCA+糖皮质激素联合处理培养的正常人肝脏细胞系(包括肝细胞和胆管上皮细胞), 使得 AE2 b1、AE2 b2 mRNA 表达水平上调, 可能此联合治疗通过改变 AE2 表达, 增加富含碳酸氢盐的胆汁分泌来发挥作用。同时, PBC 患者外周血单个核细胞中 AE2 mRNA 表达水平较健康对照下调[60]。Ae2(a, b)缺陷的小鼠模型 AMA 阳性, 血清 IgG 和 IgM 升高, ALP 升高, 充分证明了 AE2 在 PBC 发病中的作用[63, 64]。

总之, PBC 的发病机制是非常复杂的, 可能是遗传、环境、性别、感染、免疫等多个因素作用的结果, 其发病机制的研究将是一个艰难而漫长的过程。随着科学技术的进步, 我们将会发现更多差异表达的基因和蛋白, 寻找关键的基因和蛋白作为该病的标志物, 从而可以实现 PBC 的早诊断、早治疗, 也许能将 PBC 根治。

## References:

1. Kita, H., M. Imawari and M.E. Gershwin, *Cellular immune response in primary biliary cirrhosis*. *Hepatol Res*, 2004. **28**(1): p. 12-17.
2. Selmi, C., et al., *Experimental evidence on the immunopathogenesis of primary biliary cirrhosis*.



Cell Mol Immunol, 2010. 7(1): p. 1-10.

3. Harada, K., et al., *Th1 cytokine-induced downregulation of PPARgamma in human biliary cells relates to cholangitis in primary biliary cirrhosis*. Hepatology, 2005. 41(6): p. 1329-38.
4. Rong, G., et al., *Imbalance between T helper type 17 and T regulatory cells in patients with primary biliary cirrhosis: the serum cytokine profile and peripheral cell population*. Clin Exp Immunol, 2009. 156(2): p. 217-25.
5. Lan, R.Y., et al., *Hepatic IL-17 responses in human and murine primary biliary cirrhosis*. J Autoimmun, 2009. 32(1): p. 43-51.
6. Lan, R.Y., et al., *Liver-targeted and peripheral blood alterations of regulatory T cells in primary biliary cirrhosis*. Hepatology, 2006. 43(4): p. 729-37.
7. Matakai, N., et al., *Expression of PD-1, PD-L1, and PD-L2 in the liver in autoimmune liver diseases*. Am J Gastroenterol, 2007. 102(2): p. 302-12.
8. Moreira, R.K., et al., *Diagnostic utility of IgG and IgM immunohistochemistry in autoimmune liver disease*. World J Gastroenterol, 2010. 16(4): p. 453-7.
9. Mayo, M.J., et al., *The relationship between hepatic immunoglobulin production and CD154 expression in chronic liver diseases*. Liver Int, 2006. 26(2): p. 187-96.
10. 赵丹彤 and 闫惠平, *Toll样受体与自身免疫性肝病*. 中国免疫学杂志, 2009. 25(4): p. 374-376,381.
11. Takii, Y., et al., *Enhanced expression of type I interferon and toll-like receptor-3 in primary biliary cirrhosis*. Lab Invest, 2005. 85(7): p. 908-20.
12. 王红梅, et al., *原发性胆汁性肝硬化患者外周血单个核细胞Toll样受体3 mRNA表达水平的研究*. 中华风湿病学杂志, 2008. 12(11): p. 762-765.
13. Mao, T.K., et al., *Altered monocyte responses to defined TLR ligands in patients with primary biliary cirrhosis*. Hepatology, 2005. 42(4): p. 802-8.
14. Honda, Y., et al., *Altered expression of TLR homolog RP105 on monocytes hypersensitive to LPS in patients with primary biliary cirrhosis*. J Hepatol, 2007. 47(3): p. 404-11.
15. Wang, A.P., et al., *Hepatic expression of toll-like receptor 4 in primary biliary cirrhosis*. J Autoimmun, 2005. 25(1): p. 85-91.
16. 杨再兴, et al., *原发性胆汁性肝硬化患者外周血单个核细胞Toll样受体4基因的表达及临床意义研究*. 中国实验诊断学, 2008. 12(5): p. 625-627.
17. Kikuchi, K., et al., *Bacterial CpG induces hyper-IgM production in CD27(+) memory B cells in primary biliary cirrhosis*. Gastroenterology, 2005. 128(2): p. 304-12.
18. Selmi, C., et al., *Innate immunity and primary biliary cirrhosis*. Curr Mol Med, 2009. 9(1): p. 45-51.
19. Invernizzi, P., C. Selmi and M.E. Gershwin, *Update on primary biliary cirrhosis*. Dig Liver Dis, 2010. 42(6): p. 401-8.
20. Allina, J., et al., *Anti-CD16 autoantibodies and delayed phagocytosis of apoptotic cells in primary biliary cirrhosis*. J Autoimmun, 2008. 30(4): p. 238-45.
21. Tanimoto, K., et al., *Immunohistochemical localization of antigen presenting cells in liver from patients with primary biliary cirrhosis; highly restricted distribution of CD83-positive activated dendritic cells*. Pathol Res Pract, 1999. 195(3): p. 157-62.
22. Akbar, S.M., et al., *Peripheral blood T-cell responses to pyruvate dehydrogenase complex in primary biliary cirrhosis: role of antigen-presenting dendritic cells*. Eur J Clin Invest, 2001. 31(7): p. 639-46.

23. 仲人前 and 钱钱, 原发性胆汁性肝硬化发病机制研究及展望. 中国实验诊断学, 2008. 12(5): p. 691-694.
24. Chuang, Y.H., et al., *Increased killing activity and decreased cytokine production in NK cells in patients with primary biliary cirrhosis*. J Autoimmun, 2006. 26(4): p. 232-40.
25. Kita, H., et al., *Quantitation and phenotypic analysis of natural killer T cells in primary biliary cirrhosis using a human CD1d tetramer*. Gastroenterology, 2002. 123(4): p. 1031-43.
26. Chuang, Y.H., et al., *Natural killer T cells exacerbate liver injury in a transforming growth factor beta receptor II dominant-negative mouse model of primary biliary cirrhosis*. Hepatology, 2008. 47(2): p. 571-80.
27. Nagano, T., et al., *Cytokine profile in the liver of primary biliary cirrhosis*. J Clin Immunol, 1999. 19(6): p. 422-7.
28. Barak, V., et al., *Serum inflammatory cytokines, complement components, and soluble interleukin 2 receptor in primary biliary cirrhosis*. J Autoimmun, 2009. 33(3-4): p. 178-82.
29. 温海燕, et al., 原发性胆汁性肝硬化患者外周血IL15的表达及临床意义. 临床军医杂志, 2009. 37(6): p. 1037-1040.
30. Yamano, T., et al., *Serum interferon-gamma-inducing factor/IL-18 levels in primary biliary cirrhosis*. Clin Exp Immunol, 2000. 122(2): p. 227-31.
31. 王淇泓, et al., IL-22在原发性胆汁性肝硬化中的表达及其临床意义. 现代检验医学杂志, 2010. 25(1): p. 25-27.
32. Hirschfield, G.M. and K.A. Siminovitch, *Toward the molecular dissection of primary biliary cirrhosis*. Hepatology, 2009. 50(5): p. 1347-50.
33. Shindo, M., et al., *Cytokine mRNA expression in the liver of patients with primary biliary cirrhosis (PBC) and chronic hepatitis B (CHB)*. Clin Exp Immunol, 1996. 105(2): p. 254-9.
34. Fracchia, M., et al., *Serum interferon gamma in primary biliary cirrhosis: effect of ursodeoxycholic acid and prednisone therapy alone and in combination*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2000. 12(4): p. 463-8.
35. 梁艳, et al., B细胞激活因子受体家族基因表达与原发性胆汁性肝硬化相关性研究. 中华医学杂志, 2007. 87(2): p. 128-130.
36. Migita, K., et al., *Serum BAFF and APRIL levels in patients with PBC*. Clin Immunol, 2010. 134(2): p. 217-25.
37. Xia, R., et al., *TNFSF9 expression in primary biliary cirrhosis and its clinical significance*. Cytokine, 2010. 50(3): p. 311-6.
38. 陈波, et al., APRIL/BlyS表达与原发性胆汁性肝硬化的关联性研究. 现代检验医学杂志, 2009. 24(6): p. 1-3.
39. Borchers, A.T., et al., *Lymphocyte recruitment and homing to the liver in primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis*. Semin Immunopathol, 2009. 31(3): p. 309-22.
40. Shimoda, S., et al., *CX3CL1 (fractalkine): a signpost for biliary inflammation in primary biliary cirrhosis*. Hepatology, 2010. 51(2): p. 567-75.
41. 朱焯, et al., 转化生长因子- $\beta$  1在原发性胆汁性肝硬化患者血清中的表达及临床意义研究. 现代检验医学杂志, 2007. 22(6): p. 86-87.
42. Harada, K., et al., *Enhanced apoptosis relates to bile duct loss in primary biliary cirrhosis*. Hepatology, 1997. 26(6): p. 1399-405.
43. Harada, K. and Y. Nakanuma, *Molecular mechanisms of cholangiopathy in primary biliary cirrhosis*. Med Mol Morphol, 2006. 39(2): p. 55-61.

44. Fox, C.K., et al., *Apoptotic pathways in primary biliary cirrhosis and autoimmune hepatitis*. Liver, 2001. 21(4): p. 272-9.
45. Liang, Y., et al., *Characterisation of TNF-related apoptosis-inducing ligand in peripheral blood in patients with primary biliary cirrhosis*. Clin Exp Med, 2008. 8(1): p. 1-7.
46. Berg, C.P., et al., *Apoptosis-associated antigens recognized by autoantibodies in patients with the autoimmune liver disease primary biliary cirrhosis*. Apoptosis, 2008. 13(1): p. 63-75.
47. 韩志君, et al., *Caspase在原发性胆汁性肝硬化患者外周血单个核细胞的表达及其临床意义*. 临床军医杂志, 2009. 37(5): p. 775-777.
48. Kimura, Y., et al., *Differential expression of intestinal trefoil factor in biliary epithelial cells of primary biliary cirrhosis*. Hepatology, 2002. 36(5): p. 1227-35.
49. Kawata, K., et al., *Enhanced Hepatic Nrf2 Activation After Ursodeoxycholic Acid Treatment in Patients with Primary Biliary Cirrhosis*. Antioxid Redox Signal, 2010.
50. Nakanuma, Y., et al., *Histopathology of primary biliary cirrhosis with emphasis on expression of adhesion molecules*. Semin Liver Dis, 1997. 17(1): p. 35-47.
51. Yokomori, H., et al., *Expression of intercellular adhesion molecule-1 and lymphocyte function-associated antigen-1 protein and messenger RNA in primary biliary cirrhosis*. Intern Med, 2003. 42(10): p. 947-54.
52. Yokomori, H., et al., *Ursodeoxycholic acid therapy attenuated expression of adhesion molecule in primary biliary cirrhosis*. Intern Med, 2003. 42(12): p. 1259-61.
53. Polzien, F. and G. Ramadori, *Increased intercellular adhesion molecule-1 serum concentration in cholestasis*. J Hepatol, 1996. 25(6): p. 877-86.
54. 牛小平, 韩真 and 王郁杰, *原发性胆汁性肝硬化患者血清可溶性血管细胞黏附分子-1和可溶性细胞间黏附分子-1的表达及其临床意义*. 临床内科杂志, 2008. 25(12): p. 838-839.
55. 周晔, et al., *Siglec-1与原发性胆汁性肝硬化的相关性研究*. 现代检验医学杂志, 2009. 24(3): p. 20-24.
56. Adams, D.H., et al., *Expression of E-selectin and E-selectin ligands in human liver inflammation*. Hepatology, 1996. 24(3): p. 533-8.
57. Lim, A.G., et al., *Soluble E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in primary biliary cirrhosis*. J Hepatol, 1995. 22(4): p. 416-22.
58. Battista, S., et al., *Evidence of an increased nitric oxide production in primary biliary cirrhosis*. Am J Gastroenterol, 2001. 96(3): p. 869-75.
59. Takeyama, Y., et al., *Alternative transporter pathways in patients with untreated early-stage and late-stage primary biliary cirrhosis*. Liver Int, 2009. 29(3): p. 406-14.
60. Prieto, J., et al., *Abnormal expression of anion exchanger genes in primary biliary cirrhosis*. Gastroenterology, 1993. 105(2): p. 572-8.
61. Medina, J.F., et al., *Decreased anion exchanger 2 immunoreactivity in the liver of patients with primary biliary cirrhosis*. Hepatology, 1997. 25(1): p. 12-7.
62. Arenas, F., et al., *Combination of ursodeoxycholic acid and glucocorticoids upregulates the AE2 alternate promoter in human liver cells*. J Clin Invest, 2008. 118(2): p. 695-709.
63. Fickert, P. and M. Trauner, *When lightning strikes twice: the plot thickens for a dual role of the anion exchanger 2 (AE2/SLC4A2) in the pathogenesis and treatment of primary biliary cirrhosis*. J Hepatol, 2009. 50(3): p. 633-5.
64. Salas, J.T., et al., *Ae2a,b-deficient mice develop antimitochondrial antibodies and other features resembling primary biliary cirrhosis*. Gastroenterology, 2008. 134(5): p. 1482-93.

# TWEAK/Fn14 在自身免疫性疾病中的研究进展

肿瘤坏死因子样凋亡的微弱诱导剂 (tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis, TWEAK) 是肿瘤坏死因子配体超家族的新成员, 其受体为成纤维细胞因子诱导14 (fibroblast growth factor-inducible 14, FN14/TNFRSF12A)。TWEAK与其受体Fn14具有广泛的生物学活性, 在促进炎症反应, 诱导细胞凋亡, 促进上皮细胞增生和微血管的生成等方面发挥着重要的作用, 已有很多报道表明其对肿瘤的生物行为有重要影响, 近年来发现其与很多自身免疫性疾病, 如红斑狼疮、类风湿关节炎、硬皮病、多发性硬化也密切相关, 本文就TWEAK及其受体Fn14在自身免疫疾病中的作用进行综述。

## 1. TWEAK-Fn14的结构与表达

TWEAK是由249个氨基酸构成的II型跨膜蛋白。可经furin蛋白酶切割后分泌到细胞外。成为由156个氨基酸构成的可溶性细胞因子。Fn14是由129个氨基酸构成的I型跨膜蛋白。TWEAK与其受体Fn14在许多组织和细胞中表达[1]。

## 2. TWEAK-Fn14介导的信号传导通路:

TWEAK与Fn14结合后可通过接头分子TRAF(TNFR-associated factor, TRAF)激活转录因子(nuclear factor-kappa B, NF-kB)信号通路, 从而调节IL-6、IL-8、RANTES和ICAM-1的表达。另外, TWEAK与Fn14的结合还可以激活胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)、c-Jun氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)和p38丝裂原活化蛋白激酶(p38 mitogen activated protein kinase, p38MAPK)信号传导通路[2]。

## 3. TWEAK-Fn14与炎症反应

TWEAK可诱导PGE<sub>2</sub>、MMP-1[3]、IL-6、IL-8、RANTES[1]的产生; 可诱导成纤维细胞和滑膜细胞产生IP-10, 在上皮细胞中上调ICAM-1、E-selectin[4]、IL-8和MCP-1的表达, 从而引起炎症反应[5]。

## 4. TWEAK-Fn14与细胞凋亡

同肿瘤坏死因子配体超家族的其他成员, 如TRAIL、Fas一样, TWEAK也介导了细胞凋亡。Browning等[6]首先发现:TWEAK与 $\gamma$ 干扰素协同作用, 可导致HT29细胞(人腺癌细胞)凋亡。另外, TWEAK单独作用也可能引起细胞凋亡。Nakayama等[7]描述了另外两条TWEAK介导的细胞特异性凋亡的两条途径: caspase依赖

途径和 cathepsin-B 依赖途径。

## 5. TWEAK-Fn14与血管生成

TWEAK 具有诱导血管生成的作用。Wiley 等[8]发现在 TWEAK 的作用下,体外培养的多种血管上皮细胞增生速度增加 2-4 倍;接下来的体内试验[9],将 TWEAK 制剂植入大鼠角膜后能诱导强烈的血管生成作用,如果用 Fn14-Fc 阻断 TWEAK 信号传导途径可以抑制大鼠角膜血管的生成,降低血管密度。同时 TWEAK 可以促进上皮细胞迁移,Donohue 等[10]发现 TWEAK 能够增强 bFGF 和 VEGF 刺激 HUVECs 增生的总用,诱导上皮细胞迁移。TWEAK 的该作用与系统性硬化症的微血管病变有关。

## 6. TWEAK和自身免疫性疾病

### 6.1 多发性硬化

多发性硬化是中枢神经系统的一种慢性脱髓鞘疾病。实验性自身免疫性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)是多发性硬化的主要研究模型。在 EAE 模型中,脊髓内 TWEAK mRNA 表达增加,TWEAK 抗体能够减轻症状和白细胞浸润,但对 T 细胞增殖无影响[11]。TWEAK 过度表达的转基因小鼠 EAE 模型的症状明显加重,早期 T 细胞浸润增加。如果在 6—8 周前应用 Fn14 或 TWEAK 的胞外段免疫动物并使之产生抗体,则 EAE 模型动物的症状能够改善,而中枢神经系统炎症明显减轻[12]。

Serafini B 等[13]同时用免疫组化技术和 RT-PCR 技术证明在多发性硬化患者脑组织中 TWEAK 和 Fn14 均表达上调。血管和脑膜周围白质损伤的巨噬细胞、星形胶质细胞和小胶质细胞被认为是 MS 脑组织中 TWEAK 的主要来源。

Sophie 等[14]用流式细胞术证明 TWEAK 在多发性硬化患者单核细胞表面表达。

### 6.2 系统性红斑狼疮

狼疮肾炎和狼疮脑病是引起狼疮患者死亡的主要原因。Richardson 等[15]发现狼疮患者 T 淋巴细胞表面 TWEAK 表达上调,从而促进单核细胞的细胞毒性,引起单核细胞凋亡。凋亡物质的增多和清除的减少,可能导致抗原的产生异常,从而产生自身抗体,引起自身免疫疾病。

#### 6.2.1 狼疮肾病

Schwartz 等[16]发现 TWEAK 在狼疮肾脏受累的病人尿液中升高,并与疾病活动性相关,因此 uTWEAK 可能成为狼疮肾潜在的标志物。活动性狼疮肾炎的小鼠肾脏

TWEAK mRNA水平表达下调。肾脏系膜细胞表面表达Fn14,与TWEAK结合后可释放MCP-1、RANTES和IP-10等炎症因子,从而加重肾脏损伤。Alberto Molano等[17]培养了只在骨髓来源的细胞表达Fn14的慢性移植抗宿主狼疮小鼠模型,与只在非骨髓来源的细胞表达Fn14的小鼠模型对比,发现前者可以使疾病减轻和延缓;而后者对自身抗体滴度与狼疮肾炎无影响。进一步研究表明敲除巨噬细胞的小鼠,自身抗体滴度升高,狼疮肾炎加重。

#### 6.2.2 狼疮脑病

狼疮脑病的病理表现为弥漫性血管炎或局灶性血栓形成、血管闭塞。主要病理变化包括血管壁炎症细胞浸润,血管内皮细胞增生肥大,纤维素栓子形成;周围可有小胶质细胞聚集,白质坏死或出血。已经有证据表明,狼疮脑病患者脑脊液中IL-6、IL-8明显升高[18],TWEAK可能通过IL-6和IL-8破坏胶质细胞。TWEAK还可能通过其上调表达ICAM-1促进血管上皮细胞的增生,导致血管闭塞[5]。

### 6.3 类风湿关节炎

Park等[19]用ELISA方法检测RA患者血清中的TWEAK,发现其较健康对照明显升高,经过益赛普治疗后,RA患者血清中的TWEAK水平明显下降。而疾病对照组(强直性脊柱炎患者)血清中TWEAK水平较正常对照无明显区别。

van Kuijk等[20]用免疫组化的方式发现RA病人TWEAK在RA滑膜组织中表达明显高于银屑病关节炎患者。

S. Kamiyo等[21]用流式细胞术分析RA患者滑液细胞表面TWEAK和Fn14的表达,其中CD45阳性细胞表面检测到TWEAK表达,Fn14在CD45阳性和阴性细胞表面都能检测到。在rTWEAK的刺激下,培养的RA和OA滑膜细胞增生,产生。从RA患者分离的滑膜细胞,在抗TWEAK和抗Fn14的作用下,细胞增生和IL-6、IL-8和MCP-1细胞因子的产生被抑制。

TWEAK可以通过p38MAPK(mitogen-activated protein kinases)信号通路诱导类风湿关节炎(RA)成纤维样滑膜细胞(FLS)合成基质金属蛋白酶9(MMP-9),MMP-9与关节骨和软骨基质的降解有关[22]。

### 6.4 TWEAK和系统性硬化症

Yanaba K等[23]检测了70例SSc患者血清中TWEAK水平,较健康对照(31例)升高,较SLE患者(22例)升高。局限性SSc与弥漫性SSc相比较,TWEAK没有明显区别。但是TWEAK明显升高的患者有较低的肺间质纤维化的发生率。TWEAK可能成为肺间质纤维化的保护因素,可能成为治疗靶点。

Marek Bielecki等[24]对22例SSc患者和14例正常对照的PBMC进行培养,用

ELISA方法检测上清中TWEAK。同样也发现有肺纤维化的病人TWEAK表达量下降，在有严重微血管病变的患者中，TWEAK分泌量减少；TWEAK还与雷诺现象有关。

综上，TWEAK/Fn14通过其促进炎症反应，诱导细胞凋亡，促进上皮细胞增生和微血管的生成的作用，在自身免疫性疾病的发生有重要影响，阻断其信号传导途径可能为上述疾病提供了新的治疗靶点。

## References:

1. Wiley, S.R. and J.A. Winkles, *TWEAK, a member of the TNF superfamily, is a multifunctional cytokine that binds the TweakR/Fn14 receptor*. Cytokine Growth Factor Rev, 2003. 14(3-4): p. 241-9.
2. Winkles, J.A., et al., *Role of TWEAK and Fn14 in tumor biology*. Front Biosci, 2007. 12: p. 2761-71.
3. Chicheportiche, Y., et al., *Proinflammatory activity of TWEAK on human dermal fibroblasts and synoviocytes: blocking and enhancing effects of anti-TWEAK monoclonal antibodies*. Arthritis Res, 2002. 4(2): p. 126-33.
4. Harada, N., et al., *Pro-inflammatory effect of TWEAK/Fn14 interaction on human umbilical vein endothelial cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. 299(3): p. 488-93.
5. Campbell, S., et al., *The role of TWEAK/Fn14 in the pathogenesis of inflammation and systemic autoimmunity*. Front Biosci, 2004. 9: p. 2273-84.
6. Chicheportiche, Y., et al., *TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis*. J Biol Chem, 1997. 272(51): p. 32401-10.
7. Nakayama, M., et al., *Multiple pathways of TWEAK-induced cell death*. J Immunol, 2002. 168(2): p. 734-43.
8. Lynch, C.N., et al., *TWEAK induces angiogenesis and proliferation of endothelial cells*. J Biol Chem, 1999. 274(13): p. 8455-9.
9. Wiley, S.R., et al., *A novel TNF receptor family member binds TWEAK and is implicated in angiogenesis*. Immunity, 2001. 15(5): p. 837-46.
10. Donohue, P.J., et al., *TWEAK is an endothelial cell growth and chemotactic factor that also potentiates FGF-2 and VEGF-A mitogenic activity*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. 23(4): p. 594-600.
11. Desplat-Jego, S., et al., *Anti-TWEAK monoclonal antibodies reduce immune cell infiltration in the central nervous system and severity of experimental autoimmune encephalomyelitis*. Clin Immunol, 2005. 117(1): p. 15-23.
12. Mueller, A.M., et al., *Targeting fibroblast growth factor-inducible-14 signaling protects from chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Neuroimmunol, 2005. 159(1-2): p. 55-65.
13. Serafini, B., et al., *Expression of TWEAK and its receptor Fn14 in the multiple sclerosis brain: implications for inflammatory tissue injury*. J Neuropathol Exp Neurol, 2008. 67(12): p. 1137-48.

14. Desplat-Jego, S., et al., *TWEAK is expressed at the cell surface of monocytes during multiple sclerosis*. J Leukoc Biol, 2009. **85**(1): p. 132-5.
15. Kaplan, M.J., et al., *The apoptotic ligands TRAIL, TWEAK, and Fas ligand mediate monocyte death induced by autologous lupus T cells*. J Immunol, 2002. **169**(10): p. 6020-9.
16. Schwartz, N., et al., *Urinary TWEAK as a biomarker of lupus nephritis: a multicenter cohort study*. Arthritis Res Ther, 2009. **11**(5): p. R143.
17. Molano, A., et al., *TWEAK stimulation of kidney resident cells in the pathogenesis of graft versus host induced lupus nephritis*. Immunol Lett, 2009. **125**(2): p. 119-28.
18. Trysberg, E., H. Carlsen and A. Tarkowski, *Intrathecal cytokines in systemic lupus erythematosus with central nervous system involvement*. Lupus, 2000. **9**(7): p. 498-503.
19. Park, M.C., et al., *Relationship of serum TWEAK level to cytokine level, disease activity, and response to anti-TNF treatment in patients with rheumatoid arthritis*. Scand J Rheumatol, 2008. **37**(3): p. 173-8.
20. van Kuijk, A.W., et al., *TWEAK and its receptor Fn14 in the synovium of patients with rheumatoid arthritis compared to psoriatic arthritis and its response to tumour necrosis factor blockade*. Ann Rheum Dis, 2010. **69**(1): p. 301-4.
21. Kamijo, S., et al., *Involvement of TWEAK/Fn14 interaction in the synovial inflammation of RA*. Rheumatology (Oxford), 2008. **47**(4): p. 442-50.
22. 夏丽萍, 鲁静 and 肖卫国, *TWEAK诱导成纤维样滑膜细胞合成MMP-9的研究*. 中华微生物学和免疫学杂志, 2009. **29**(7): p. 581-585.
23. Yanaba, K., et al., *Elevated circulating TWEAK levels in systemic sclerosis: association with lower frequency of pulmonary fibrosis*. J Rheumatol, 2009. **36**(8): p. 1657-62.
24. Bielecki, M., et al., *Diminished production of TWEAK by the peripheral blood mononuclear cells is associated with vascular involvement in patients with systemic sclerosis*. Folia Histochem Cytobiol, 2009. **47**(3): p. 465-9.



## 致谢

8个月的科研训练即将结束，8年的大学生涯也随之画上句号。这八个月，是我成长最快、收获最多的八个月。从开始进入课题到论文的顺利完成，一直都离不开老师、同学、朋友给我的热情帮助，在这里请接受我诚挚的谢意。

感谢张奉春老师，感谢您将我带入风湿免疫学界，您广博的专业知识、一丝不苟的工作作风、崇高的医德深深地影响着我。虽然以后不能继续做风湿免疫科临床医生，但是我在您这里学到的科研方法、医德医风以及处世态度将使我受益终生。能成为您的学生，是我一生的荣幸。

感谢李永哲老师在整个科研训练的过程中给我的悉心指导和不懈支持。研究从选题立项、实验设计到具体实验、结果分析直至文章撰写和论文的修改都凝结了您的心血和智慧结晶。您严肃的科学态度，严谨的治学精神，精益求精的工作作风，深深地感染和激励着我。

感谢唐福林老师、于孟学老师、曾小峰老师、赵岩老师、田新平老师、张烜老师、史群老师、李梦涛老师、冷小梅老师、侯勇老师、沈敏老师、王迁老师、苏金梅老师、徐东老师、蒋颖老师、陈华老师以及王焕玲老师、刘晓清老师、刘正印老师在繁忙的门诊、病房及科研工作中不厌其烦地帮我收集病例。感谢健康医学部的老师们为我提供的便利条件。感谢北京佑安医院孟庆华老师、闫惠平老师、赵秀英老师、李娟老师和姚瑶同学帮我收集标本。

感谢门诊护士及抽血室护士为我提供的便利以及她们的辛勤劳动。

感谢我亲密的合作伙伴，李晞同学、张婷同学及王立师姐、张磊师姐。正是因为有了你们的帮助，才让我少走了很多弯路，不仅学到了本次课题所涉及的新知识，更让我感觉到了知识以外的东西，那就是团结的力量。

感谢实验室甘晓丹老师、史艳萍老师、李丽君老师、胡朝军老师、张蜀澜老师为我们创造了良好的实验环境。

感谢所有患者及健康志愿者对本研究的理解和支持。

感谢给了我生命的父亲和母亲，正是家人物质和精神上的支持和鼓励伴我完成学业，你们永远健康快乐是我最大的心愿。

学校生活即将结束，新的征程即将开始。感谢所有关心和帮助我的人，再多的话语不能表达我的谢意，再多的表白道不尽我的感恩之心，衷心祝愿所有关心我帮助我的人，祝你们永远幸福快乐。