

降,凡进入增殖周期的细胞均为阳性,而处在G0/G1期细胞则基本不表达,他可作为细胞增殖的一个指标<sup>[10]</sup>,肿瘤组织中PCNA阳性细胞数可反映肿瘤组织增殖的速度<sup>[11]</sup>.我们的实验中IFN- $\alpha$ 组BEL-7402细胞PCNA的表达明显低于对照组,表明IFN- $\alpha$ 可以影响BEL-7402细胞PCNA的表达,其机制可能与肿瘤生长的抑制相关.细胞凋亡(apoptosis)与肿瘤的关系仍是目前研究的热点.我们应用TUNEL法检测发现,IFN- $\alpha$ 可以明显使BEL-7402细胞凋亡的阳性细胞数量增加,诱导肝癌细胞的凋亡.细胞凋亡对肿瘤起着负调控作用<sup>[12]</sup>,肿瘤的发生发展不仅是由于细胞增殖速率升高,而且与细胞死亡速率下降有关,细胞凋亡对评估肿瘤预后有一定意义.

总之,IFN- $\alpha$ 作为一种细胞因子,他既可用于全身治疗,也可用于局部治疗.他的作用机制是非常复杂的,而他的抗肿瘤作用是我们不能忽视的.目前将各种干扰素、干扰素与其他抗肿瘤药物以及干扰素与其他抗癌疗法联合应用的联合疗法是目前的发展趋势.

#### 4 参考文献

- 1 Kirkwood JM, Ibrahim JG, Sondak VK, Richards J, Flaherty LE, Ernstoff MS, Smith TJ, Rao U, Steele M, Blum RH. High- and low-dose interferon- $\alpha$ -2 $\beta$  in high-risk melanoma: first analysis of intergroup trial E1690/S9111/C9190. *J Clin Oncol* 2000;18:2444-58
- 2 Wakabayashi T, Hatano N, Kajita Y, Yoshida T, Mizuno M, Taniguchi K, Ohno T, Nagasaka T, Yoshida J. Initial and maintenance combination treatment with interferon-beta, MCNU (Ranimustine), and radiotherapy for patients with previously untreated malignant glioma. *J Neurooncol* 2000;49:57-62
- 3 王鲁, 汤钊猷, 薛琼, 孙惠川, 陈军, 高冬梅, 赵燕, 陈洁, 孙瑞霞, 刘银坤, 叶胜龙.  $\alpha$ 干扰素对肝癌切除术后转移复发干预作用的实验研究. *中华肝脏病杂志* 2001;9:154-156
- 4 Lin SM, Lin CJ, Hsu CW, Tai DI, Sheen IS, Lin DY, Liaw YF. Prospective randomized controlled study of interferon-alpha in preventing hepatocellular carcinoma recurrence after medical ablation therapy for primary tumors. *Cancer* 2004;100:376-382
- 5 Albini A, Iwamoto Y, Kleinman HK, Martin GR, Aaronson SA, Kozlowski JM, McEwan RN. A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells. *Cancer Res* 1987;47:3239-3245
- 6 沈关心, 周汝麟. 现代免疫学实验技术. 第1版. 湖北: 湖北科学技术出版社, 1998:162-168
- 7 杨吉成, 李丽斌, 盛伟华, 董宁征, 徐伦. 基因工程IFN $\alpha$  2 $\alpha$ 和IFN $\alpha$  2 $\beta$ 对肿瘤细胞生长的抑制作用. *实用癌症杂志* 1999;14:164-166
- 8 Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001;17:463-516
- 9 Pizem J, Marolt VF, Luzar B, Cor A. Proliferative and apoptotic activity in hepatocellular carcinoma and surrounding non neoplastic liver tissue. *Pflugers Arch* 2001;442(Suppl 1):R174-176
- 10 Kim YH, Lee JH, Chun H, Nam SJ, Lee WY, Song SY, Kwon OJ, Hyun JG, Sung IK, Son HJ, Rhee PL, Kim JJ, Paik SW, Rhee JC, Choi KW. Apoptosis and its correlation with proliferative activity in rectal cancer. *J Surg Oncol* 2002;79:236-242
- 11 Sever-Chroneos Z, Angus SP, Fribourg AF, Wan H, Todorov I, Knudsen KE, Knudsen ES. Retinoblastoma tumor suppressor protein signals through inhibition of cyclin-dependent kinase 2 activity to disrupt PCNA function in S phase. *Mol Cell Biol* 2001;21:4032-4045
- 12 Matturri L, Colombo B, Lavezzi AM. Evidence for apoptosis in non-small cell lung carcinoma. Relationship with cell kinetics and prognosis. *Anal Quant Cytol Histol* 1999;21:240-244

编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

## 慢性丙型肝炎患者外周血单个核细胞 IFNAR2 mRNA 的表达

刘宁, 李颖, 刘沛

刘宁, 李颖, 刘沛, 中国医科大学附属第二医院感染科  
辽宁省沈阳市 110004  
通讯作者: 刘沛, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学附属第二医院感染科, syliupeit2003@yahoo.com.cn  
电话: 024-83956962 传真: 024-83956451  
收稿日期: 2005-02-14 接受日期: 2005-03-10

#### 摘要

目的: 探讨慢性丙型肝炎患者外周血单个核细胞(PBMCs)干扰素- $\alpha/\beta$ 受体(IFNAR2)mRNA的表达, 及其与干扰素(IFN)抗病毒疗效的关系.

方法: 密度梯度离心法分离26例慢性丙型肝炎患者PBMCs, RT-PCR法扩增IFNAR2 mRNA, 计算其表达水平.

结果: 慢性丙型肝炎患者PBMCs IFNAR2 mRNA表达显著高于健康对照组;其表达与血清病毒载量、病毒基因型及PBMCs HCV-RNA无关;干扰素治疗完全应答组PBMCs IFNAR2 mRNA表达显著高于部分应答及无应答组.

结论: PBMCs IFNAR2 mRNA表达与干扰素疗效相关, 可作为一个独立因素, 用于预测慢性丙型肝炎患者干扰素疗效.

刘宁, 李颖, 刘沛. 慢性丙型肝炎患者外周血单个核细胞 IFNAR2 mRNA 的表达. 世界华人消化杂志 2005;13(8):1023-1026  
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1023.asp

## 0 引言

干扰素 (IFN) 是目前用于慢性丙型肝炎抗病毒治疗的首选药物, 能抑制病毒复制, 降低血清 ALT 水平, 减轻肝组织炎症及纤维化程度<sup>[1-2]</sup>. 但 IFN 治疗慢性丙型肝炎的有效率仅为 30-50%, 且有一定副作用. 因此, 临床上选择能预测 IFN 疗效的指标极为重要. 已有报道 HCV 感染者肝组织内有 I 型干扰素受体的表达, 且其表达水平与干扰素疗效呈正相关<sup>[3-6]</sup>. 同时, 慢性丙型肝炎患者肝组织与外周血单个核细胞 (PBMCs) 中 IFNAR2 mRNA 的表达情况呈正相关<sup>[7]</sup>. 我们应用 RT-PCR 方法检测了 26 例慢性丙型肝炎患者 PBMCs IFNAR2 mRNA 的表达, 进一步分析了 IFNAR2 mRNA 表达与干扰素疗效的关系.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 26 例慢性丙型肝炎患者, 年龄 11-60 岁 (平均 43.5), 男 20 例, 女 6 例. 治疗前丙氨酸转氨酶 (ALT) 为正常值的 1.5 倍以上, 血清抗-HCV 阳性, HCV RNA 阳性, 无同性恋者、静脉药瘾者, 无甲、乙、丁、戊型肝炎病毒及 HIV 感染标志者、无抗核抗体阳性者, 排除近 3 mo 应用糖皮质激素、干扰素等影响免疫功能药物者. 诊断符合 2000-09 中华医学会传染病与寄生虫学分会、肝病学分会联合修订的病毒性肝炎防治方案<sup>[8]</sup>. 另取 15 名无肝炎病毒感染的健康志愿者做正常对照. 所有患者接受 IFN $\beta$ -1 a 治疗, 用法为 44 mg 隔日皮下注射, 疗程为 24 wk. 治疗结束时血清 ALT 正常, HCV RNA 阴性者为完全应答 (CR); 血清 ALT 正常, 而 HCV RNA 阳性者为部分应答 (PR); 血清 ALT 未降至正常, HCV RNA 阳性者为无应答 (NR). Trizol RNA 提取试剂 (美国 Gibco 公司); AMV Reverse Transcriptase (美国 Promega 公司); Taq DNA 聚合酶、RNA 酶抑制剂、PCR 应用试剂及丙肝病毒 PCR 检测试剂盒 (华美生物工程公司).

### 1.2 方法

**1.2.1 引物** 引物设计参照文献<sup>[9]</sup>, 序列如下: IFNAR2 mRNA: 上游引物: 5' -GCTTTTGAGCCAGAATGCCT -3' (nt329-348); 下游引物: 5' -CCCTCTGACTGTTCTTCAATG-3' (nt833-853). 产物预测长度 525 bp; G3PDH mRNA: 上游引物: 5' -ATTCAAGGCCACCGTCAAGG -3' (nt166-185); 下游引物: 5' -GGGCCATCGATAGTCTTCTG-3' (nt554-573). 产物预测长度 408 bp.

**1.2.2 PBMCs IFNAR2 mRNA 检测** 采 4 mL 肝素抗凝血, 密度梯度离心法分离 PBMCs, -70°C 保存. Trizol RNA 提取试剂提取总 RNA, -30°C 保存备用. RT-PCR 方法检测 IFNAR2 mRNA 表达, 以 G3PDH mRNA 表达作为内参照. 30  $\mu$ L 反应体系包括: 10  $\times$  Buffer 3  $\mu$ L (500 mmol/L

KCl, 100 mmol/L Tris-HCl (pH 9.0)、1.0% Triton X-100、15 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 各 0.2  $\mu$ mol/L 3-磷酸脱氧核苷 (dNTP), AMV Reverse Transcriptase 3 U, Taq DNA 聚合酶 2 U, RNA 酶抑制剂 20 U, 上、下游引物各 1  $\mu$ L (20 pmol/l), RNA 模板 3  $\mu$ L. 反应条件: 37°C 逆转录 30 min, 94°C 预变性 5 min, 94°C 变性 45 s, 56°C 退火 45 s, 72°C 延伸 60 s, 35 个循环, 72°C 末延伸 7 min. 将 PCR 扩增产物置于 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 结果置于凝胶成像分析系统上分析. 408 bp 条带为 G3PDH mRNA 扩增产物, 525 bp 条带为 IFNAR2 mRNA 扩增产物. IFNAR2 mRNA 表达水平 = IFNAR2 mRNA 光强度值 / 各自 G3PDH mRNA 光强度值.

**1.2.3 PBMCs HCV-RNA 检测** 总 RNA 同时进行 HCR-RNA 的检测. 检测方法按照丙肝病毒 PCR 检测试剂盒说明书中的操作步骤进行.

**1.2.4 HCV-RNA 定量及 HCV 基因分型检测** 采患者治疗前血清 100  $\mu$ L, 分别用于 HCV RNA 定量及 HCV 基因分型的检测. HCV RNA 定量应用 Bayer HCV kits; HCV 基因分型应用 Bayer Lipa assay.

**统计学处理** 应用 SPSS 软件. 应用  $\chi^2$  检验、方差分析、Pearson 相关分析和多因素 Logistic 回归分析进行统计分析.

## 2 结果

**2.1 RT-PCR 检测 PBMCs IFNAR2 mRNA 结果** (图 1) 26 例慢性丙型肝炎患者中, PBMCs IFNAR2 mRNA 阳性者 25 例 (96.2%); 15 例对照组中 PBMCs IFNAR2 mRNA 阳性者 5 例 (33.3%), 丙型肝炎组阳性率显著高于对照组. 26 例患者中男性、女性 PBMCs IFNAR2 mRNA 表达值分别为 0.7 979  $\pm$  0.3 763、0.8 575  $\pm$  0.2 405, 无显著性差异.

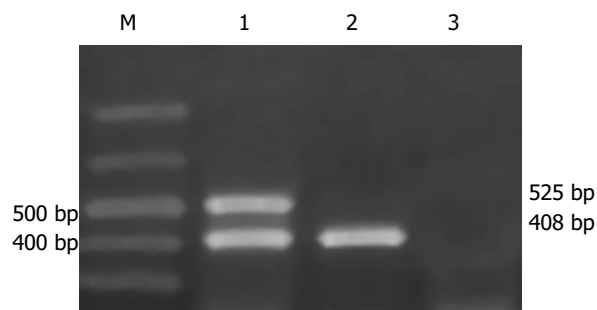


图 1 PBMCs IFNAR2 mRNA 电泳结果. 525 bp 为 IFNAR2 mRNA 扩增产物, 408 bp 为 G3PDH mRNA 扩增产物. 1: 阳性; 2: 阴性; 3: 空白对照.

**2.2 PBMCs IFNAR2 mRNA 表达与 PBMCs HCV RNA** 26 例慢性丙型肝炎患者中 PBMCs HCV RNA 阳性者 21 例, 阴性者 5 例, IFNAR2 mRNA 表达值分别为 0.784 804  $\pm$  0.2 934、0.8 572  $\pm$  0.2 142, 无显著性差异.

**2.3 PBMCs IFNAR2 mRNA 表达与血清病毒定量和基因**

分型血清HCV-RNA载量取自然对数,与PBMCs IFNAR2 mRNA表达值进行相关性分析,结果是二者间无显著相关性( $r = 0.133$ ,  $P = 0.637$ ).根据对干扰素疗效的不同影响,将慢性丙型肝炎患者分为1型基因型组14例与非1型基因型组12例,其IFNAR2 mRNA表达值分别为 $0.8049 \pm 0.1999$ 、 $0.7799 \pm 0.1896$ ,无显著性差异.

2.4 PBMCs IFNAR2 mRNA表达与干扰素疗效 治疗结束时完全应答(CR)者10例, PBMCs IFNAR2 mRNA表达值为 $1.0624 \pm 0.1633$ ;部分应答(PR)者7例,表达值为 $0.7977 \pm 0.1549$ ;非应答(NR)者9例,表达值为 $0.6055 \pm 0.2581$ .完全应答组PBMCs IFNAR2 mRNA表达值显著高于部分应答组和非应答组( $P < 0.05$ ),而部分应答组和非应答组表达值无显著性差异( $P = 0.069$ ).

2.5 对治疗前血清HCV RNA水平、病毒基因型、PBMCs HCV RNA及PBMCs IFNAR2 mRNA表达值4项因素与IFN疗效间进行Logistic回归分析,结果显示PBMCs IFNAR2 mRNA表达值对疗效影响较大,可视为一个独立预测因素.

### 3 讨论

干扰素受体可分为I型受体和II型受体. I型受体包括IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 和IFN- $\omega$ 受体; II型受体是指IFN- $\gamma$ 受体.临床上常用IFN- $\alpha$ 和IFN- $\beta$ 治疗慢性丙型肝炎, I型干扰素受体是IFN- $\alpha$ 和IFN- $\beta$ 共用受体<sup>[10]</sup>,至少由两个亚单位组成, IFNAR1 (IFN- $\alpha$ 受体)和IFNAR2 (IFN- $\alpha/\beta$ 受体),其结构和机能已经很明确了<sup>[11-12]</sup>.就IFNAR1和/或IFNAR2 mRNA在肝脏中的表达情况,很多学者进行了临床试验研究,结果显示IFNAR1和/或IFNAR2 mRNA的表达与患者临床表现及病毒基因分型无关,而与IFN治疗疗效相关.但人们对肝组织外干扰素受体的表达还知之甚少,哪些细胞或组织中干扰素受体的表达与肝组织一致,可以代替肝活检用以推测肝组织内干扰素受体的表达情况呢? PBMCs首先引起了人们的注意,因为PBMCs是丙型肝炎病毒肝外增殖的重要部位.已有研究表明慢性丙型肝炎患者肝组织与PBMCs IFNAR2 mRNA的表达情况正相关,我们进一步证实了PBMCs IFNAR2 mRNA表达与IFN疗效的关系.

本组26例慢性丙型肝炎患者PBMCs IFNAR2 mRNA的表达水平明显高于正常人. Yatsushashi *et al*<sup>[13]</sup>在同时检测急性甲型肝炎、慢性乙型肝炎及非病毒性肝病(脂肪肝)患者肝组织内IFNAR2 mRNA表达时,发现肝炎病毒感染均能上调IFNAR2基因在肝组织内的表达,这种上调可以解释为机体对病毒感染的一种反应,参与机体清除病毒的免疫应答:机体通过上调IFNAR2 mRNA的表达来提高与内源性或外源性IFN的结合,从而加强对病毒的清除. PBMCs是丙型肝炎病毒肝外复制的一个重要场所,故推测HCV感染也能够上调IFNAR2 mRNA在PBMCs内的表达,与我们的研究结果一致. PBMCs中IFNAR2 mRNA表达增加的机制尚不十分清楚,可能与某些细胞因子有关.慢性肝

炎患者血清中IFN- $\gamma$ 水平上升<sup>[14]</sup>,有报告IFN- $\gamma$ 能够调节IFN受体的表达<sup>[15]</sup>.本组PBMCs HCV-RNA定性“+”及“-”者,IFNAR2 mRNA表达值无显著性差异,提示IFNAR2 mRNA的表达与PBMCs HCV-RNA无关,其表达情况可能不依赖于PBMCs中是否有HCV的持续感染,而受宿主自身的免疫状况的影响,这与IFN抗病毒作用机制一致.

IFN分子本身并不具备抗病毒功能,必须与细胞表面相应受体相结合,并经过一系列细胞内信号传导,最终产生抗病毒蛋白而发挥作用,故与特异性受体相结合是IFN发挥抗病毒作用的第一步<sup>[16-17]</sup>. IFN发挥生物学效应与其靶细胞上特异性受体的水平有关.我们检测了26例慢性丙型肝炎患者PBMCs IFNAR2 mRNA表达与IFN抗病毒疗效间的关系,结果显示完全应答组表达值显著高于部分应答组和非应答组.这说明IFN抗病毒疗效与PBMCs IFNAR2表达水平密切相关, IFN疗效差—不应答或不能完全应答,可能与其受体表达不足有关,进一步推测PBMCs IFNAR2 mRNA表达情况是影响IFN疗效的宿主方面因素.丙型肝炎病毒基因型<sup>[18]</sup>及治疗前血清HCV RNA载量<sup>[19]</sup>是目前公认的影响IFN应答的病毒因素,而PBMCs中HCV-RNA也被认为是IFN疗效的预测因子<sup>[20]</sup>.本实验中, PBMCs IFNAR2 mRNA表达与治疗前血清病毒载量、病毒基因型及PBMCs HCV-RNA无关,故可作为一个独立因素用于预测IFN的疗效. Logistic回归分析进一步证明了这一结论.

### 4 参考文献

- 1 Davis GL, Balart LA, Schiff ER, Lindsay K, Bodenheimer HC Jr, Perrillo RP, Carey W, Jacobson IM, Payne J, Dienstag JL. Treatment of chronic hepatitis C with recombinant interferon alfa. A multicenter randomized, controlled trial. Hepatitis Interventional Therapy Group. *N Engl J Med* 1989;321:1501-1506
- 2 Di Bisceglie AM, Martin P, Kassianides C, Lisker-Melman M, Murray L, Waggoner J, Goodman Z, Banks SM, Hoofnagle JH. Recombinant interferon alpha therapy for chronic hepatitis C: a randomized double-blind, placebo-controlled trial. *N Engl J Med* 1989;321:1506-1510
- 3 Fukuda R, Ishimura N, Kushiyama Y, Moriyama N, Ishihara S, Nagasawa S, Miyake T, Niigaki M, Satoh S, Sakai S, Akagi S, Watanabe M, Fukumoto S. Effectiveness of interferon-alpha therapy in chronic hepatitis C is associated with the amount of interferon-alpha receptor mRNA in the liver. *J Hepatol* 1997;26:455-461
- 4 Mathai J, Shimoda K, Banner BF, Mori M, Bonkovsky HL, Barnard GF. IFN- $\alpha$  receptor mRNA expression in a United States sample with predominantly genotype 1a/I chronic hepatitis C liver biopsies correlates with response to IFN therapy. *J Interferon Cytokine Res* 1999;19:1011-1018
- 5 Mizukoshi E, Kaneko S, Yanagi M, Ohno H, Kaji K, Terasaki S, Shimoda A, Matsushita E, Kobayashi K. Expression of interferon alpha/beta receptor in the liver of chronic hepatitis C patients. *J Med Virol* 1998;56:217-223
- 6 Ishimura N, Fukuda R, Fumoto S. Relationship between the intrahepatic expression of interferon- $\alpha$  receptor mRNA and the histological progress of hepatitis C virus-associated chronic liver diseases. *J Gastroenterol Hepatol* 1996;11:712-717
- 7 Yamaguchi Y, Hino K, Fujiwara D, Ren F, Katoh Y, Satoh Y, Okita K. Expression of type 1 interferon receptor in liver and peripheral blood mononuclear cells in chronic hepatitis C