

维生素 D 对慢性乙型肝炎患者外周血单个核细胞 α 干扰素 JAK-STAT 信号转导途径的影响

侯杰, 管世鹤, 杨凯, 穆玄玄

摘要 目的 研究维生素 D(VD) 对慢性乙型肝炎患者干扰素-α(IFN-α) JAK-STAT 信号转导途径分子及其抗黏病毒 A 蛋白(MxA) 表达的影响。方法 选择 63 例就诊慢性乙型肝炎患者, 运用 Ficoll 分离液分离患者外周血单个核细胞(PB-MCs), 以不同浓度 IFN-α 和 VD 单独和联合处理 PBMCs 细胞, 再采用 Western blot 技术分析处理后细胞内 JAK-STAT 信号转导途径分子 STAT1、STAT2、干扰素调节因子 9(IRF-9) 以及 MxA 蛋白的表达水平。结果 经 0 ~ 1 600 IU/ml IFN-α 处理后, PBMCs JAK-STAT 信号转导途径分子 STAT1、STAT2、IRF-9 及 MxA 蛋白表达显著增高, 其中 400 IU/ml IFN-α 处理时, JAK-STAT 信号转导途径分子表达量最高。经 0 ~ 100 nmol/ml VD 处理后, PBMCs JAK-STAT 信号转导途径分子 STAT1、STAT2、IRF-9 及 MxA 蛋白表达增高, 其中 0. 1 nmol/ml VD 处理时, JAK-STAT 信号转导途径分子表达量最高。与 IFN-α 单独处理相比, VD 与 IFN-α 联合处理患者 PBMCs 后, 细胞内 STAT1、STAT2、IRF9 及 MxA 的蛋白表达显著升高。结论 VD 可能通过上调 IFN-α JAK-STAT 信号转导途径分子及抗病毒蛋白的表达进而增强 IFN-α 抗病毒效应。

关键词 维生素 D; 慢性乙肝; 外周血单个核细胞

中图分类号 R 446. 629

文献标志码 A **文章编号** 1000 - 1492(2017) 05 - 0666 - 05

doi: 10. 19405/j. cnki. issn1000 - 1492. 2017. 05. 009

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV) 的感染能导致人类肝脏的损伤, 病毒侵袭机体后, 导致肝细胞反复破坏, 发展为急、慢性肝炎, 肝硬化甚至肝细胞癌, 严重威胁人类健康。因此及时有效的抗病毒治疗对于慢性乙型肝炎患者具有重要意义。干扰素(interferon, IFN) -α 是治疗慢性乙型肝炎的重要药

物之一, 其通过激活细胞内酪氨酸蛋白激酶和信号转导与转录激活因子信号转导途径(janus kinase-signal transducers and activators of transcription, JAK-STAT) 发挥抗 HBV 效应。然而, 国内外临床研究^[1]显示, 约有 30% 患者对 IFN-α 治疗不理想, 其原因不明。维生素 D(vitamin D, VD) 是一种常见的维生素, 早期研究^[2]表明 VD 参与人体内钙磷的调节, 促进骨骼生长, 而最近有学者在慢性 HBV 患者的研究中发现存在 VD 的缺乏并且会导致不良后果的发生^[3]。该研究通过以 VD 和 IFN-α 单独及联合处理慢性 HBV 患者的外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs), 采用 Western blot 技术检测 JAK-STAT 信号转导途径中的信号转导子和转录激活子 1(signal transducer and activator of transcription1, STAT1)、STAT2、干扰素调节因子 9(IFN regulatory factor-9, IRF-9) 以及抗黏病毒 A 蛋白(Mx GTPase A, MxA) 的表达水平, 探讨 VD 对 HBV 患者 IFN-α JAK-STAT 信号转导途径分子及其抗病毒蛋白 MxA 表达的影响, 为临床治疗慢性乙型肝炎提供重要指导依据。

1 材料与方法

1.1 病例资料 选取自 2015 年 2 月 ~ 2016 年 1 月期间门诊 63 例 HBV 患者外周血标本, 其中男 39 例, 女 24 例; 年龄 20 ~ 50(36. 42 ± 9. 58) 岁, 均未接受过干扰素系统治疗, 并排除其他肝脏疾病影响。

1.2 材料 RPMI-1640 液购自美国 Hyclone 公司; 胎牛血清购自杭州四季青公司; 抗-STAT1 抗体、抗-STAT2 抗体购自英国 Abcam 公司; 抗-MxA 抗体、抗-IRF9 抗体购自美国 Proteintech Group 公司; IFN-α 购自安徽安科生物公司; VD 购自上海阿拉丁公司; PBS、辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP) 标记的山羊抗兔 IgG、抗-β-actin 抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 蛋白标准 Marker(10 ~ 170 ku) 购自美国 Fermentas 公司; SDS、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、Tris-base、TEMED 购自美国 Amresco 公司; 蛋白上样 buffer 购自上海生物工程有限公司; 硝

2017 - 01 - 20 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81171662); 安徽省卫生计生委科研计划项目(全科医学临床科研课题)(编号: 2016QK014); 安徽省高校自然科学基金重点项目(编号: KJ2016A351)

作者单位: 安徽医科大学第二附属医院检验科, 合肥 230601

作者简介: 侯杰, 男, 硕士研究生;

管世鹤, 男, 教授, 主任技师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: shiheguan@126.com

酸纤维素膜(nitrocellulose filter membrane, NC膜)购自浙江四青生化材料厂。

1.3 方法

1.3.1 PBMCs的分离和培养 将HBV患者外周血与PBS溶液1:1混合后,加入Ficoll-Hypaque分离液离心分层后,取中间一层薄薄的白色狭窄云雾层,即为PBMCs层,用RPMI-1640液清洗2次,用牛鲍氏计数板对PBMCs进行细胞计数,并调整细胞浓度至适宜,将其悬浮培养于含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基中,使1 ml/孔PBMCs悬液种于6孔培养板。

1.3.2 IFN- α 处理PBMCs细胞 IFN- α 用PBS溶液稀释至浓度100 IU/ μ l的储备液,稀释成不同浓度分别加入PBMCs 6孔培养板中,使每孔终浓度分别为0、200、400、800、1 600 IU/ml,置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中培养6 h。

1.3.3 VD处理PBMCs细胞 VD用PBS溶液溶解,配成1 mg/ml的储备液,稀释成不同浓度分别加入PBMCs 6孔培养板中,使每孔终浓度分别为0、0.1、1、10、100 nmol/ml,置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中培养6 h。

1.3.4 IFN- α 与VD单独及联合处理PBMCs细胞 将6孔培养板各孔PBMCs同时分别做空白处理、IFN- α (400 IU/ml)处理、VD(0.1 nmol/ml)处理和IFN- α (400 IU/ml) + VD(0.1 nmol/ml)联合处理。然后置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中培养6 h。

1.3.5 Western blot技术分析 收集6孔板内的培养液,用1 500 r/min离心10 min,弃去上清液,加入UP水震荡混匀,使细胞充分裂解,BCA法进行蛋白定量后,加入5 \times 蛋白上样缓冲液,沸水中煮10 min,冷却,上样,配制10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,半干转法转移到NC膜上,室温下用封闭液(5%的牛奶)封闭2 h,用TBST清洗3遍,加入一抗稀释液稀释的一抗中4 $^{\circ}$ C震荡过夜,第2天取出清洗后,室温下孵育二抗2 h,清洗待用。吸取等量的ECL两种试剂,使其混合均匀,轻轻均匀涂抹在NC膜的表面,在自动显影仪上曝光, β -actin作为内参。运用ger-Pro analyzer对蛋白条带进行半定量分析,将目的蛋白条带与 β -actin的密度相比,用相对光密度来表示。

1.4 统计学处理 采用SPSS 17.0进行统计学分析,两组结果比较采用独立样本*t*检验,多组结果比较采用方差分析,以*P* < 0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IFN- α 处理后PBMCs内STAT1、STAT2、IRF-9和MxA蛋白表达水平 经IFN- α 处理后, PBMCs内STAT1、STAT2、IRF-9和MxA蛋白的表达量增高,其中400 IU/ml IFN- α 处理组STAT1、STAT2、IRF-9和MxA的相对表达量升高最为显著,分别为(0.841 \pm 0.127)、(1.094 \pm 0.175)、(0.793 \pm 0.105)、(1.060 \pm 0.040),与对照组比较,差异有统计学意义(*P* < 0.05),见图1。

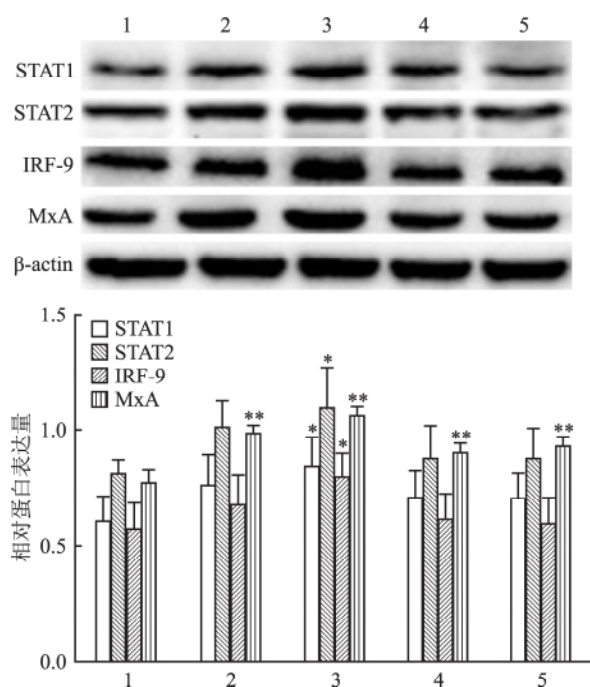


图1 不同浓度的IFN- α 处理后PBMCs内STAT1、STAT2、IRF-9和MxA蛋白表达水平

1: 0 IU/ml 对照组; 2: 200 IU/ml IFN- α 处理组; 3: 400 IU/ml IFN- α 处理组; 4: 800 IU/ml IFN- α 处理组; 5: 1 600 IU/ml IFN- α 处理组; 与对照组比较: * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01

2.2 VD处理后PBMCs内STAT1、STAT2、IRF-9和MxA蛋白表达水平 经VD处理后, PBMCs内STAT1、STAT2、IRF-9和MxA蛋白的表达量增高,其中0.1 nmol/ml VD处理组STAT1、STAT2、IRF-9和MxA的相对表达量升高最为显著,分别为(0.988 \pm 0.143)、(1.035 \pm 0.184)、(1.013 \pm 0.120)、(0.859 \pm 0.118)。与空白对照组比较,差异有统计学意义(*P* < 0.05),见图2。

2.3 IFN- α 和VD单独及联合处理后PBMCs内STAT1、STAT2、IRF-9和MxA蛋白表达水平 结果显示PBMCs内STAT1、STAT2、IRF-9和MxA蛋白

的表达量 4 组总体比较差异均有统计学意义 ($F = 63.954, P < 0.001; F = 13.429, P = 0.002; F = 5.061, P = 0.030; F = 12.609, P = 0.002$)。与空白对照组相比,IFN- α + VD 联合处理组的 PBMCs 内 STAT1、STAT2、IRF-9 和 MxA 蛋白的表达量增高,差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 与 IFN- α 处理组相比,IFN- α + VD 联合处理组的 PBMCs 内 STAT1、STAT2、IRF-9 和 MxA 蛋白的表达量增高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见图 3。

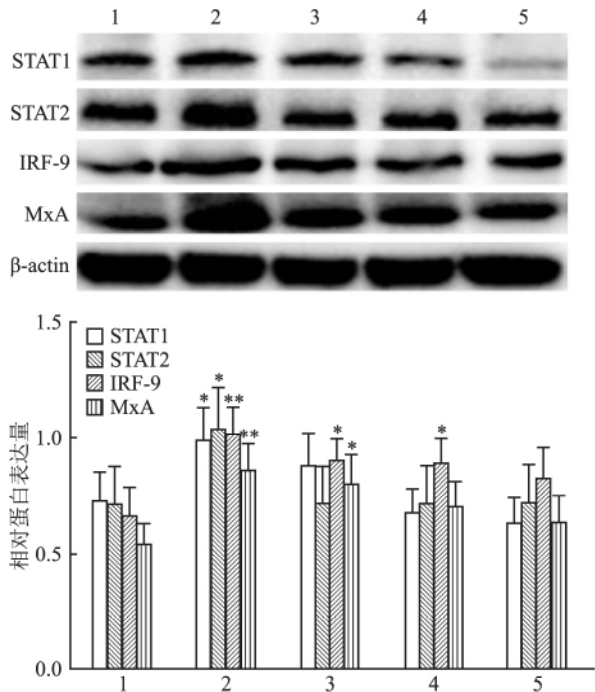


图 2 不同浓度的 VD 处理 PBMCs 内 STAT1、STAT2、IRF-9 和 MxA 蛋白表达水平

1: 0 nmol/ml 对照组; 2: 0.1 nmol/ml VD 处理组; 3: 1 nmol/ml VD 处理组; 4: 10 nmol/ml VD 处理组; 5: 100 nmol/ml VD 处理组; 与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3 讨论

全球不断增加的慢性 HBV 患者现状已经引起大家关注,尤其我国是 HBV 感染高发国家,形势更加严峻。然而对于慢性乙型肝炎的治疗仍然存在较多需要解决的问题。因此,及时有效地阻断病毒感染与复制,对于慢性乙型肝炎患者的疾病发展具有重要意义。

目前,IFN- α 在慢性 HBV 患者中的治疗已经得到较多应用,随着治疗时间的延长,耐药性的逐渐产生,临床上 IFN- α 的免疫应答效果逐渐下降,其疗效显著性也存在差异,原因不明。研究^[4]表明 IFN- α

主要通过激活肝细胞和免疫细胞内的 JAK-STAT 信号转导途径,诱导大量的干扰素应答基因,产生多种抗病毒蛋白,进而在机体内发挥出直接或间接抗病毒效应。本研究通过 IFN- α 处理慢性乙型肝炎患者 PBMCs 后,显示 JAK-STAT 信号转导途径中的 STAT1、STAT2、IRF-9 和 MxA 蛋白的表达量明显增加,而这些蛋白已经被证实具备抗病毒作用,进一步揭示 IFN- α 可以激活 HBV 感染患者 PBMCs 中的 JAK-STAT 信号转导途径,调节通路相关抗病毒蛋白的表达,发挥抗病毒效应。其中 400 IU/ml IFN- α 处理组 STAT1、STAT2、IRF-9 和 MxA 的相对表达量升高最为显著。

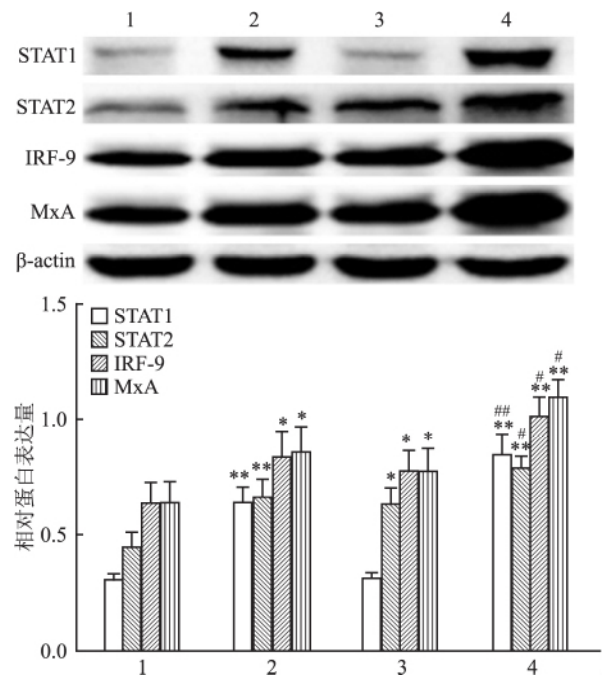


图 3 IFN- α 和 VD 单独及联合处理对 PBMCs 内 STAT1、STAT2、IRF-9 和 MxA 蛋白表达水平

1: 空白对照组; 2: 400 IU/ml IFN- α 处理组; 3: 0.1 nmol/ml VD 处理组; 4: 400 IU/ml IFN- α + 0.1 nmol/ml VD 联合处理组; 与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 IFN- α 处理组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

VD 为固醇类衍生物,其活性形式为 $1, 25 (OH)_2 D_3$, 也称为骨化三醇 (calcitriol), 近些年来其作用得到广泛关注,尤其是在机体的免疫调节中发挥重要作用。关于 VD 与肝脏疾病进程的发展也引起了国内外学者的关注,并且研究^[5-8]显示慢性肝硬化和肝衰竭患者中 VD 水平降低,推测 VD 含量降低可能是导致肝组织损伤加剧,病情发展快且愈后效果差的原因之一,这提示适当提高患者体内

VD 水平,可能会有助于缓解病程的发展。同时有研究^[9]显示,用 VD 处理急性肝炎模型的小鼠后,显著的降低了肝细胞的损伤程度,有效的控制了肝脏疾病的发展。VD 能有效改善肝炎病情的发展,然而其中机制仍不明。本研究采用 VD 处理慢性乙型肝炎患者 PBMCs,随后检测其 JAK-STAT 信号转导途径内 STAT1、STAT2、IRF-9 和 MxA 蛋白表达水平,显示这些蛋白量较对照组表达量增加,与 IFN- α 有相同的效应,可以加强免疫细胞的抗病毒效应。而且 Lange et al^[10] 研究表明 VD 参与 IFN- α 抗病毒过程,可以通过激活细胞 JAK-STAT 通路,增加抗病毒蛋白水平的表达,进而提高机体抗病毒能力。因此本研究进一步联合 VD 和 IFN- α 处理 PBMCs,显示联合处理后 JAK-STAT 信号转导途径内 STAT1、STAT2、IRF-9 和 MxA 蛋白表达量较分别处理时有显著升高,这与 Lange et al^[10] 的研究一致,提示 VD 会加强 IFN- α 激活 JAK-STAT 通路,增加相关抗病毒蛋白的表达,从而加强相关免疫细胞对 HBV 病毒的清除,增强 IFN- α 的药效,同时国内柯昌征等^[11] 研究显示,补充 VD 可有效地改善 HBV 患者的病情和预后,这可能是加强了药物疗效带来的良好反应。因此,本次研究结果提示,维持 HBV 患者体内一定的 VD 水平,可能与提高 IFN- α 抗病毒效果密切相关。然而,VD 是如何加强 IFN- α 激活 JAK-STAT 通路,从而引起抗病毒蛋白表达增加的机制没有进一步深入研究,这也将是进一步需要去阐明的方向。

综上所述,本研究提示 VD 可能通过调节慢性 HBV 患者免疫系统,加强 IFN- α 激活 JAK-STAT 信号通路,引起相关抗病毒蛋白的表达上调,上调机体对 HBV 病毒的清除,从而有效地改善 HBV 患者的病程发展,为临床上对于 IFN- α 治疗慢性 HBV 患者疗效不显著时提供了新的治疗思路,甚至对于其他慢性病毒感染性疾病的治疗的失败有一定提示作

用。

参考文献

- [1] Song Z W, Ma Y X, Fu B Q, et al. Altered mRNA levels of MOV10, A3G and IFN- α in patients with chronic hepatitis B [J]. *J Microbiol* 2014, 52(6): 510-4.
- [2] Heaney R P. Vitamin D-baseline status and effective doses [J]. *N Engl J Med* 2012, 367(1): 77-8.
- [3] Wong G L, Chan H L, Chan H Y, et al. Adverse effects of vitamin D deficiency on outcomes of patients with chronic hepatitis B [J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2015, 13(4): 783-90.
- [4] 管世鹤, 杨凯, 陆蒙吉. 乙型肝炎病毒及其抗原成分对干扰素信号传导途径分子和抗病毒蛋白表达的影响 [J]. *中华肝脏病杂志* 2011, 19(6): 440-4.
- [5] Stokes C S, Krawczyk M, Reichel C, et al. Vitamin D deficiency is associated with mortality in patients with advanced liver cirrhosis [J]. *Eur J Clin Invest* 2014, 44(2): 176-83.
- [6] Farnik H, Bojunga J, Berger A, et al. Low vitamin D serum concentrations associated with high levels of hepatitis B virus replication in chronically infected patients [J]. *Hepatology* 2013, 58(4): 1270-6.
- [7] Trépo E, Ouziel R, Pradat P, et al. Marked 25-hydroxyvitamin D deficiency is associated with poor prognosis in patients with alcoholic liver disease [J]. *J Hepatol* 2013, 59(2): 344-50.
- [8] Agmon-Levin N, Theodor E, Segal R M, et al. Vitamin D in systemic and organ-specific autoimmune diseases [J]. *Clin Rev Allergy Immunol* 2013, 45(2): 256-66.
- [9] Hu X D, Jiang S L, Liu C H, et al. Preventive effects of 1, 25-(OH)₂VD₃ against ConA-induced mouse hepatitis through promoting vitamin D receptor gene expression [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2010, 31(6): 703-8.
- [10] Lange C M, Gouttenoire J, Duong F H, et al. Vitamin D receptor and Jak-STAT signaling crosstalk results in calcitriol-mediated increase of hepatocellular response to IFN- α [J]. *J Immunol*, 2014, 192(12): 6037-44.
- [11] 柯昌征, 刘平, 陈丽娥. 乙型肝炎患者维生素 D 缺乏的相关研究 [J]. *中西医结合肝病杂志* 2015, 25(2): 83-5.

Effect of vitamin D on JAK-STAT signal transduction pathway of peripheral blood mononuclear cells in patients with chronic hepatitis B

Hou Jie, Guan Shihe, Yang Kai, et al

(Dept of Clinical Laboratory, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract Objective To investigate the influence of vitamin D (VD) and interferon- α (IFN- α) on the expression of JAK-STAT signal transduction molecules and MxA antiviral protein in chronic hepatitis B patients. **Methods** 63 patients with chronic hepatitis B were selected. The peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated

脂多糖诱导急性肺损伤小鼠肺脏蛋白质电泳图谱分析

张自丽^{1,2}, 胡璇², 刘慧莹², 柏长青^{1,2}

摘要 目的 蛋白质双向电泳技术观察气管滴注脂多糖诱导急性肺损伤后小鼠肺组织在蛋白质水平上的改变。方法

小鼠气管内滴注脂多糖制备小鼠急性肺损伤模型, 48 h 后做小鼠肺 CT、肺病理切片及测肺湿/干重比用于观察肺损伤程度; 并提取总蛋白, 进行双向电泳测定, 对获取的蛋白图谱进行分析, 寻找差异表达的蛋白质。结果 实验组肺 CT 显示明显炎症表现; 病理切片显示小鼠肺组织水肿充血改变明显, 肺泡中有大量红细胞和中性粒细胞浸润, 肺损伤评分和肺湿/干重比正常组增加; 双向电泳结果显示实验组小鼠比正常组小鼠的肺组织总蛋白数增加, 蛋白质点数为(100 ± 2), 其中有 21 个表达的蛋白差异点, 通过蛋白质谱鉴定和生物信息检索结果显示蛋白质过氧化物酶 6 在实验组和正常组中有明显差异, 其可能与急性肺损伤的发生相关。结论

通过向小鼠气管内滴注脂多糖可以诱发急性肺损伤, 蛋白质双向电泳结果显示实验组小鼠肺组织中蛋白质过氧化物酶 6 表达的增加, 机制还待进一步研究。

关键词 急性肺损伤; 脂多糖; 蛋白质双向电泳; 过氧化物酶 6

中图分类号 R 563

2017-01-11 接收

基金项目: 国家科技重大专项(编号: 2013ZX10004203); 解放军 307 医院创新科研基金(编号: FC-2014-01)

作者单位: ¹安徽医科大学解放军 307 医院临床学院, 合肥 230032

²军事医学科学院附属医院呼吸与危重症医学科, 北京 100071

作者简介: 张自丽, 女, 硕士研究生;

柏长青, 男, 主任医师, 责任作者, E-mail: mlp1604@sina.com;

刘慧莹, 女, 主治医师, 责任作者, E-mail: liuhuiying1982@sina.com

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)05-0670-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.05.010

急性肺损伤(acute lung injury, ALI) 是临床上常见的危重症, 可由多种因素导致其发生, 发生后可引起患者急性、进行性低氧性呼吸衰竭等, 其发病机制复杂, 迄今尚未完全阐明^[1]。目前 ALI 在治疗上主要以机械通气和对症治疗为主, 尚无切实有效的治疗方法, 总体死亡率仍高达 40%, 由于 ALI 具有较高的发病率和死亡率, 因此成为研究的热点^[2]。近年来人们发现多种方法可以诱导实验动物发生 ALI, 其中包括注射脂多糖的方法^[3]。脂多糖(lipopolysaccharide, LPS) 诱导的 ALI 小鼠模型主要表现为毛细血管通透性增加、肺泡和间质水肿、炎症细胞聚集等, 通过这一方法能很好的模拟临床常见疾病如肺炎、脓毒血症所导致的肺损伤^[4], 所以该研究采取气管滴注 LPS 的方法诱导 ALI 动物模型, 以小鼠肺组织为研究对象, 利用双向电泳技术(two-dimensional electrophoresis of protein 2-DE) 对模型小鼠肺组织进行分析^[5], 从蛋白质组水平揭示 ALI 的致病机制, 为进一步分析 ALI 提供了工具。

1 材料与方法

1.1 实验材料 健康成年雌性 C57BL/6J 小鼠, 8 周龄, 18 ~ 22 g, 购于北京华阜康生物科技公司, 于军事医学科学院实验动物中心内饲养; 脂多糖购于美国 Sigma 公司; 固定化 pH 梯度(immobilized pH gradient, IPIG) 胶条(18 cm, pH 4 ~ 7, pH 3 ~ 10)、丙

from blood samples that we collected by ficoll liquid separation and treated with different concentrations of IFN- α and VD. Western blot was used to analyze the expression levels of STAT1, STAT2, IRF-9 and MxA in PBMCs. **Results** After treatment with 0 ~ 1 600 IU/ml IFN- α , the expression levels of STAT1, STAT2, IRF-9 and MxA protein were significantly increased and reached the highest expression levels when treated with 400 IU/ml IFN- α . Similar to the results of IFN- α , VD alone enhanced the expression levels of STAT1, STAT2, IRF-9 and MxA protein, especially at concentrations of 0.1 nmol/ml. In comparison with IFN- α alone, the combination IFN- α with VD significantly promoted expression of STAT1, STAT2, IRF-9 and MxA. **Conclusion** VD may enhance IFN- α antiviral effect via up-regulation of JAK-STAT signal transduction molecules and the antiviral proteins expression.

Key words vitamin D; hepatitis B virus; peripheral blood mononuclear cells