

Toll 样受体 4 在乙型肝炎相关性肝癌患者外周血 CD14⁺ 单核细胞表面的表达及意义

周东晓 马英杰 杨 丽 陈光耀 高 晓

摘 要 **目的** 通过观察 TLR4 在乙型肝炎相关性肝癌患者外周血 CD14⁺ 单核细胞表面的表达,探讨其在疾病发生、发展中的作用。**方法** 实验共选取慢性乙型肝炎患者 25 例(慢性乙型肝炎组)、乙型肝炎并肝癌 23 例(乙型肝炎相关性肝癌组)、健康对照 16 例(对照组),利用流式细胞术检测研究对象外周血 CD14⁺ 单核细胞表面 TLR4 阳性细胞表达百分率和平均荧光强度的几何均数(GMF),并分析 TLR4 阳性细胞表达百分率和 GMF 与内毒素水平及 CRP、PCT 的相关性。**结果** 乙型肝炎相关性肝癌组 TLR4 阳性细胞表达百分率和 GMF 分别为 79.56% ± 8.12%、54.14 ± 12.28,较慢性乙型肝炎组(46.15% ± 5.35%、32.27 ± 6.46)及正常对照组(14.89% ± 8.21%、15.21 ± 6.87)显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。乙型肝炎相关性肝癌患者 TLR4 阳性细胞百分率和 TLR4 GMF 与内毒素水平呈正相关($P < 0.05$),与临床指标 PCT、CRP 无显著相关性(均 $P > 0.05$)。**结论** TLR4 在乙型肝炎相关性肝癌患者外周血 CD14⁺ 单核细胞表面表达有显著升高,提示 TLR4 可能在乙型肝炎相关性肝癌的发生和发展中具有促进作用。

关键词 Toll 样受体 4 乙型肝炎相关性肝癌 外周血单核细胞

中图分类号 R735.7

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.04.035

Expression and Significance of Toll-like Receptor 4 on CD14⁺ Peripheral Blood Monocyte Cells Surface in Patients with HBV Related Hepatocellular Carcinoma. Zhou Dongxiao, Ma Yingjie, Yang Li, et al. Department of Gastroenterology, Zhengzhou People's Hospital, Xinxiang Medical University, Henan 450003, China

Abstract **Objective** To study the effect and possible mechanism of Toll-like receptors(TLR4) in the development and progress of HBV related hepatocellular carcinoma. **Methods** To-tally 64 patients were enrolled, including 25 patients with chronic hepatitis B (CHB), 23 cases with HBV related hepatocellular carcinoma and 16 healthy subjects, flow cytometry analysis was used to detect the expression of CD14⁺ monocyte surface TLR4 positive cells, the TLR4 expression rate, the geometric mean fluorescence (GMF) and the related clinical indicators. **Results** In HBV related hepatocellular carcinoma patients, the expression rate of TLR4 in the CD14⁺ monocytes was 79.56% ± 8.12%, which was significantly higher than that of CHB patients 46.15% ± 5.35% and control group 14.89% ± 8.21%, there were significant differences among these three groups ($P < 0.05$); the GMF of TLR4 on CD14⁺ monocyte in the peripheral blood was 54.14 ± 12.28 in HBV related hepatocellular carcinoma group, 32.27 (6.46 in the CHB group and 15.21 (6.87 in the healthy control group, the expression of TLR4 GMF in HBV related hepatocellular carcinoma group was significantly higher than that in the CHB group ($P < 0.05$) and control group ($P < 0.05$). It was shown that the expression of TLR4 was positive correlated with endotoxin level in related hepatocellular carcinoma group ($P < 0.05$). **Conclusion** The expression of TLR4 was up-regulated on CD14⁺ peripheral blood mononuclear cells in HBV related hepatocellular carcinoma patients. The results indicate that TLR4 play an important role in the development and progress of HBV related hepatocellular carcinoma.

Key words Toll-like receptors 4; HBV related hepatocellular carcinoma; Peripheral blood mononuclear cells

乙型肝炎病毒(HBV)感染是一个全球性公共卫生问题。长期慢性 HBV 感染常导致肝功能受损,导致肝硬化、肝衰竭和肝细胞癌,每年致全球数百万人死亡^[1]。中国是 HBV 感染、肝癌高发地区,大量研究

探索了病毒因素与肝癌之间的关联,但有诸多问题仍不清楚^[2]。近年来研究表明,TLRs 介导的免疫反应在肿瘤的发生中起重要作用。本实验通过观察 TLR4 在乙型肝炎相关性肝癌患者外周血 CD14⁺ 单核细胞表面表达情况,试图了解 TLR4 在乙型肝炎相关性肝癌中的作用及意义,现报告如下。

资料及方法

1. 一般资料:选取 2015 年 8 月 ~ 2016 年 8 月郑

作者单位:450003 新乡医学院附属郑州人民医院消化科、郑州消化疾病研究所

通讯作者:马英杰,电子信箱:mayingjie19@sina.com

州人民医院消化内科收住院的 25 例慢性乙型肝炎患者(慢性乙型肝炎组)男性 15 例,女性 10 例,患者平均年龄 43.6 ± 9.5 岁;23 例肝癌患者(乙型肝炎相关性肝癌组)男性 14 例,女性 9 例,平均年龄 48.6 ± 12.1 岁;诊断均符合《慢性乙型肝炎防治指南(2015 年版)》^[3],肝癌患者诊断符合《原发性肝癌诊疗规范(2011 年版)》^[4]。此前未进行免疫调节剂治疗,无放疗或化疗史,排除其他病毒或药物、乙醇、自身免疫性疾病所致肝损害及其他肿瘤等。以 16 例健康志愿者为对照组,男性 10 例,女性 6 例,平均年龄 42.3 ± 10.7 岁。3 组患者年龄和性别比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。该实验得到当地伦理委员会批准,并取得所有参与者的知情同意。

2. 试剂和仪器:PE mouse Anti - Human TLR4 (CD284)、PE mouse IgG1 和 APC Mouse Anti - Human CD14 (BD Biosciences);低速离心机(中佳 SC - 2546);红细胞裂解液(BD FACS™ Lysing Solution);流式细胞仪(BD FACSCalibur);显色基质鲎试剂(厦门市鲎试剂实验厂有限公司生产);分光光度计(美国尤尼柯 UV - 2100)。

3. 实验步骤:(1)抽取被研究者清晨空腹静脉血 2ml 注入抗凝管中,保存于 4℃ 冰箱中,当日行流式细胞仪检测 TLR4 阳性细胞表达百分率和平均荧光强度的几何均数(GMF)。对每例研究者取 A、B 两支流式管,一支作为检测组,一支作为同型阴性对照组,向 A 流式管中依次加入 PE mouse Anti - Human TLR4 (CD284) 10μl 和 APC Mouse Anti - Human CD14 10μl 于管底,向 B 流式管中依次加入 PE mouse IgG1 和 APC Mouse Anti - Human CD14,各 10μl;后在 A、B 流式管内分别加入 100μl 的抗凝静脉血混匀,之后室温避光 20min,再分别加入 1ml 红细胞裂解液,充分混匀,避光 10min,之后 300g 离心 5min,弃上清液后加入 2ml 洗涤液洗涤细胞,混匀,再 300g 离心 5min,弃上清液后加入 1ml 洗涤液,上流式细胞仪检测。以平均荧光强度的几何均数(GMF)表示,并用 CellQuest Pro 软件分析数据。利用前向散射光(SSC)和侧向散射光(FSC)做散点图,并去除死亡细胞,CD14 标记外周血单核细胞。然后在 CD14⁺ - APC 和 TLR4 - PE 点阵图上记录 CD14 与 TLR4 双阳性细胞(CD14⁺/TLR4⁺)区域百分率,以及外周血单核细胞表面 TLR4 的 GMF,做直方图比较。(2)应用无热原注射器采集研究者空腹外周静脉血 1ml 置于含有抗凝剂的无热原试管中送检内毒素内毒素检测,采用

显色基质鲎试剂试管法,用分光光度计在于 545nm 波长处测定吸光度(A 值),通过标准曲线计算样品中的内毒素浓度(EU/ml)。

4. 统计学方法:应用 SPSS 17.0 统计学软件进行统计分析,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较时采用方差齐性检验,方差齐时采用 SNK - q 检验,方差不齐时采用 Dunnett T3 法;相关分析采用 Spearman 相关分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. TLR4 在乙型肝炎相关性肝癌患者外周血 CD14⁺单核细胞表面阳性率及 GMF 比较:TLR4 在乙型肝炎相关性肝癌患者组外周血 CD14⁺单核细胞表面阳性率及 GMF 最高,与慢性乙型肝炎组与健康对照组相比差异具有统计学意义($P < 0.05$),TLR4 在健康对照组外周血 CD14⁺单核细胞表面阳性率及 GMF 最低,与慢性乙型肝炎组相比,差异具有统计学意义($P < 0.05$,表 1,表 2,图 1)。

2. 乙型肝炎相关性肝癌患者外周血内毒素浓度比较:乙型肝炎相关性肝癌患者血浆内毒素浓度高于慢乙型肝炎组和健康对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$,表 1)。

表 1 外周血 CD14⁺单核细胞表面 TLR4 表达及外周血内毒素浓度的比较($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	TLR4 阳性 细胞比例	TLR4 ⁺ 细胞的 GMF	内毒素 (EU/ml)
健康对照组	14.89 ± 8.21 [#]	15.21 ± 6.87 [#]	0.05 ± 0.02 [#]
慢性乙型肝炎组	46.15 ± 5.35 [*]	32.27 ± 6.46 [*]	0.08 ± 0.04 [*]
乙型肝炎肝癌组	79.56 ± 8.12 ^{*#}	54.14 ± 12.28 ^{*#}	0.30 ± 0.10 ^{*#}

与健康对照组比较,^{*} $P < 0.05$;与慢性乙型肝炎组比较,[#] $P < 0.05$

表 2 TLR4 的表达水平与外周血内毒素浓度及 PCT、CRP 相关性

临床 指标	CD14 ⁺ /TLR4 ⁺ 双阳细胞比例		TLR4 ⁺ 细胞的 GMF	
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
PCT	0.071	0.75	-0.407	0.06
PCT	0.071	0.75	-0.407	0.06
CRP	-0.153	0.49	-0.064	0.77
内毒素	0.484	0.02	0.560	0.01

PCT.降钙素原;CRP.C 反应蛋白

3. CD14⁺/TLR4⁺ 双阳细胞百分率和 TLR4 GMF 与内毒素浓度及 PCT、CRP 关系:Spearman 相关性分析显示,乙型肝炎相关性肝癌患者 CD14⁺/TLR4⁺ 双阳细

胞百分率和 TLR4 GMF 与内毒素水平呈正相关(r 值分别为 0.48、0.56, P 均 <0.05); 乙型肝炎相关性肝癌患者 CD14⁺/TLR4⁺ 双阳细胞百分率和 TLR4 GMF 与内毒素水平、PCT、CRP 无明显相关性(P 均 >0.05 , 表 2)。

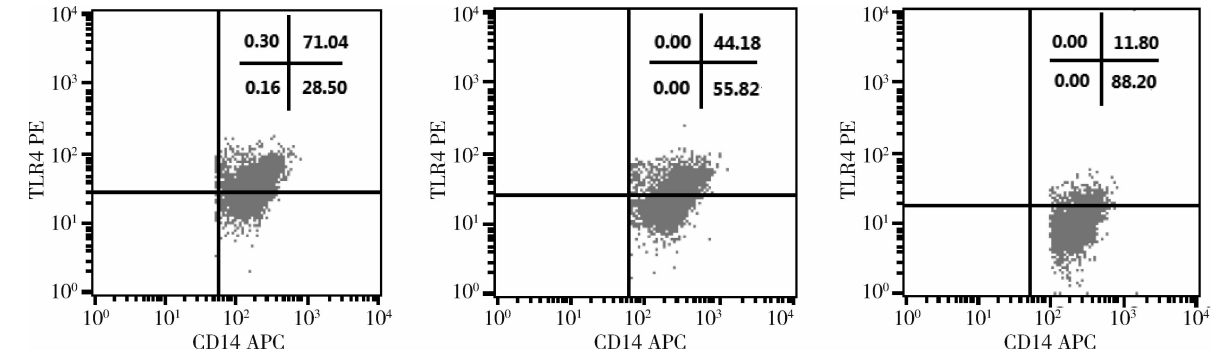


图 1 TLR4 分别在乙型肝炎相关性肝癌组、慢性乙型肝炎组和健康对照组外周血单核细胞表达的阳性率

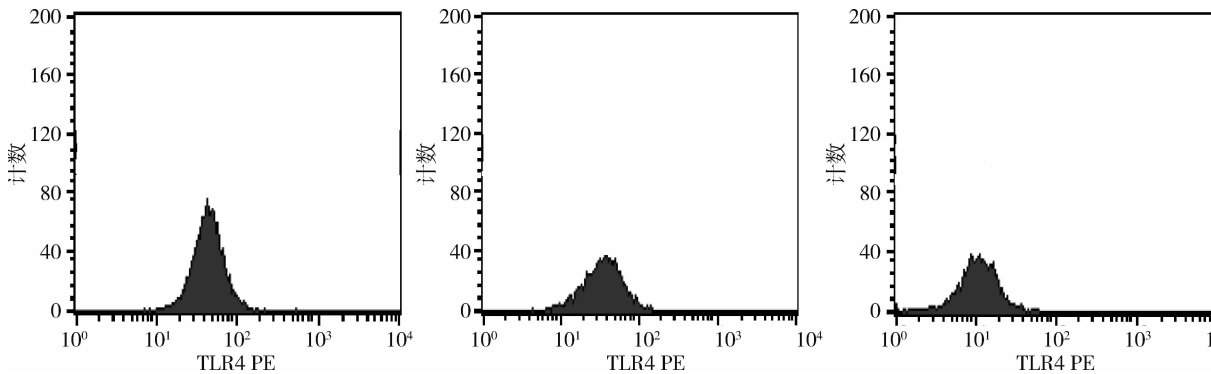


图 2 TLR4 分别在乙型肝炎相关性肝癌组、慢性乙型肝炎组和健康对照组外周血单核细胞表达 GMF 比较

讨 论

流行病学发现,我国的肝癌患者中约 80% 有 HBV 感染病史,HBV 感染人群发生肝癌的风险比非感染人群高 200 多倍。目前乙型肝炎病毒与肝癌的关系研究主要集中在基因和细胞因子水平,其通过影响细胞生长、增殖、抵抗凋亡、DNA 复制和病毒整合等,参与肝癌的发生、发展。HBV 可通过激活多种激酶及信号转导通路,干扰细胞的生长、增殖和分化,参与肝癌侵袭和转移^[5]。HBV 感染可引起原癌基因陷阱受体 3 (decoy receptor3) 异常高表达,从而影响肿瘤细胞的凋亡;转化生长因子-β 可通过影响 HBV-DNA 复制,加速细胞周期变化,促进肝癌的生长^[6]。HBV 可整合入宿主肝细胞基因组诱导肝癌的发生、发展^[7]。近年来,TLRs 介导的免疫反应在肿瘤的发生、发展中的作用越来越受关注。

Toll 样受体 (TLR) 作为一类跨膜受体家族,在先天性免疫和获得性免疫防御中扮演重要的角色,它们参与包括防止上皮损伤,促进上皮再生、促肝纤维化、促肿瘤生长、抗凋亡、促生长及血管生成等多种生理和病理过程^[8,9]。TLRs 已被证实在多种肿瘤中异常

表达,如肝癌、肺癌、膀胱癌、结肠癌、乳腺癌等^[10-13]。Toll 样受体能识别乙型肝炎病毒,参与肝组织细胞的炎性损伤。目前在人类中已经发现 10 余种不同类型的 TLR,TLR4 作为目前研究最多的受体之一,主要表达与单核-吞噬细胞表面,并可通过接头分子髓样分化因子 (MyD88) 和 TIR 结构域诱导 IFNβ 的接头蛋白 (TRIF) 识别病原相关分子模式 (PAMPs) 和损伤相关分子模式 (DAMPs),从而激活 TLR4 的细胞内信号途径,导致恶性肿瘤产生^[14]。

正常的肝细胞也可表达少量的 TLR4,本研究采用流式细胞术检测 TLR4 在乙型肝炎相关性肝癌外周血 CD14⁺ 单核细胞表面表达,结果显示乙型肝炎相关性肝癌患者外周血 CD14⁺ 单核细胞表面 TLR4 阳性率和 TLR4 GMF 均高于慢性乙型肝炎组和健康对照组,且慢性乙型肝炎组高于健康对照组,笔者推测 HBV 可能通过调节 TLR4 的表达和干扰 TLR 信号通路导致病毒持续感染,并促进乙型肝炎相关性肝癌的发生、发展。Wei 等^[15] 揭示 TLR4 在 HBV-感染患者肝细胞中表达水平增加。另有研究表明,TLR4 在 HBV 感染患者单核细胞中的表达明显升高^[16]。

这与笔者的实验结果相一致。但也有文献表明,TLR4 在慢性乙型肝炎感染患者外周血单核细胞的表达明显减少,这可能与慢性乙型肝炎感染时机体的免疫状态、病毒复制水平和肝脏的受损情况不同有关。

该研究发现,乙型肝炎相关性肝癌患者外周血内毒素浓度高于慢性乙型肝炎炎组和健康对照组,且与外周血 CD14⁺ 单核细胞表面 TLR4 阳性率和 TLR4 GMF 呈正相关。这可能是由于正常情况下,内毒素可被肝脏的 Kupffer 细胞清除,肝癌发生时肝脏对内毒素清除能力减弱,大量内毒素进入血液循环,造成内毒素血症。而内毒素脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)作为 TLR4 的激动剂,可诱导 TLR4 与衔接分子 MyD88 的相互作用,激活下游 NF- κ B 信号途径,引发炎症介质的产生和促进肝癌细胞存活和增殖。目前越来越多证据表明,先天免疫在 HBV 相关肝癌的进展中起重要作用。Zhang 等^[17]通过对 Alb/HBs 小鼠肝细胞与 WT 小鼠肝组织研究发现,在 Alb/HBs 小鼠肝细胞中 TLR4 和炎症细胞因子 TNF 和 IL-6 表达上调,提示在 Alb/HBs 小鼠中可能通过先天免疫持续激活导致肝癌进展。Wang 等^[18]研究表明,在 HepG2. 2. 15 细胞中,TLR4 下调降低了细胞的增殖和诱导细胞周期的阻滞和凋亡,提示 TLR4 可能参与乙型肝炎相关性肝癌细胞的存活和生长,此外 TLR4 与 HBsAg 的相互作用可引起细胞外信号调节激酶 1/2(ERK1/2)激活,并通过调控肿瘤的生长、侵袭和迁移导致乙型肝炎相关性肝癌的恶化。

本研究证实,TLR4 在乙型肝炎相关性肝癌患者外周血 CD14⁺ 单核细胞表面表达升高,差异具有统计学意义,且与外周血内毒素浓度呈正相关,但与疾病炎症指标无明显相关性。笔者推测病毒感染可能是 TLR4 高表达的主要或初始因素,并通过干扰 TLR4 信号通路等参与肝癌发生、发展,而内毒素可通过 TLR4 通路加重肝癌的发生。为此,笔者可通过阻断 TLR4 的炎症信号通路等作为治疗靶点,延缓慢性乙型肝炎向肝癌的进展,但是否可行仍需开展进一步的研究。

参考文献

- 1 Hoofnagle JH, Lau D. New therapies for chronic hepatitis B[J]. J Viral Hepatitis, 2016, 36(6):775-782
- 2 Sherman M. Hepatocellular carcinoma: epidemiology, surveillance, and diagnosis[J]. Semina Liver Dis, 2010, 30(1):003-016
- 3 中华医学会肝病学会分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2015 更新版)[J]. 中华传染病杂志, 2015, 21(11):219-240
- 4 中华人民共和国卫生部. 原发性肝癌诊疗规范(2011 年版)[J].

临床肝胆病杂志,2011,27(11):1141-1159

- 5 曹宽, 鲍仲明, 周新宇, 等. 乙型肝炎病毒 X 蛋白对肝癌细胞侵袭与迁移能力的作用及机制[J]. 中华消化外科杂志, 2017, 16(2):177-182
- 6 颜见, 姚志成, 邓美海. 乙型肝炎病毒相关性肝癌发生的分子机制研究进展[J]. 中华普通外科学文献电子版, 2012, 6(5):50-54
- 7 张原青, 郭津生. 乙型肝炎病毒促进肝细胞性肝癌发生的机制[J]. 中华肝脏病杂志, 2016, 24(2):152-156
- 8 Fukata M, Chen A, Klepper A, *et al.* Cox-2 is regulated by toll-like receptor-4 (TLR4) signaling and is important for proliferation and apoptosis in response to intestinal mucosal injury[J]. Gastroenterology, 2006, 131(3):862-877
- 9 Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, *et al.* Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis[J]. Cell, 2004, 118(2):229-241
- 10 Kurt H, Ozbayer C, Bayramoglu A, *et al.* Determination of the relationship between rs4986790 and rs4986791 variants of TLR4 gene and lung cancer[J]. Inflammation, 2016, 39(1):1-6
- 11 Afshari - Moghaddam A, Soleimani M, Lashei A, *et al.* Controversial roles played by toll like receptor 4 in urinary bladder cancer; a systematic review[J]. Life Sci, 2016, 158:31-36
- 12 Yang Y, Weng W, Peng J, *et al.* Fusobacterium nucleatum increases proliferation of colorectal cancer cells and tumor development in mice by activating toll-like receptor 4 signaling to nuclear factor- κ B, and up-regulating expression of microRNA-21 [J]. Gastroenterology, 2017, 152(4):851-866
- 13 Ge X, Cao Z, Gu Y, *et al.* PFKFB3 potentially contributes to paclitaxel resistance in breast cancer cells through TLR4 activation by stimulating lactate production[J]. Cell Mole Biol (Noisy-le-Grand, France), 2016, 62(6):119-125
- 14 Zuo QP, Liu SK, Li ZJ, *et al.* NF- κ B p65 modulates the telomerase reverse transcriptase in the HepG2, hepatoma cell line[J]. Eur J Pharmacol, 2011, 672(1-3):113-120
- 15 Wei XQ, Guo YW, Liu JJ, *et al.* The significance of Toll-like receptor 4 (TLR4) expression in patients with chronic hepatitis B[J]. Clin Investigat Med, 2008, 31(3):E123-130
- 16 Zhang Y, Lian JQ, Huang C X, *et al.* Overexpression of Toll-like receptor 2/4 on monocytes modulates the activities of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in chronic hepatitis B virus infection[J]. Virology, 2010, 397(1):34-42
- 17 Zhang R, Real C I, Liu C, *et al.* Hepatic expression of oncogenes Bmi1 and Dkk1 is up-regulated in hepatitis B virus surface antigen-transgenic mice and can be induced by treatment with HBV particles or lipopolysaccharides in vitro[J]. Int J Cancer, 2017, 141(2):354-363
- 18 Wang Y, Cai J, Zeng X, *et al.* Downregulation of toll-like receptor 4 induces suppressive effects on hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma via ERK1/2 signaling[J]. BMC Cancer, 2015, 15(1):821-829 (收稿日期:2017-06-02)

(修回日期:2017-08-23)