

慢性乙型肝炎患者树突状细胞分泌 IL-12 功能的初步研究

向 瑛¹, 范学工¹, 黄振宇², 李 宁¹

(1 中南大学湘雅医院, 湖南 长沙 410008; 2 平江县人民医院, 湖南 岳阳 414500)

[摘 要] 目的 探讨乙型肝炎病毒(HBV)感染状态下树突状细胞(DCs)的免疫功能。方法 运用荧光定量聚合酶链反应(PCR)法,对 12 例慢性乙型肝炎血清 HBV DNA 阳性及 10 例血清 HBV DNA 阴性患者外周血来源 DCs 内的 HBV DNA 进行检测,并比较不同 HBV 滴度时 DCs 分泌白细胞介素(IL)-12 的功能,同时收集肝炎病毒标志物阴性,肝功能正常的健康志愿者 10 例作对照。结果 12 例血清 HBV DNA 阳性患者中有 7 例 DCs 内可检测到 HBV DNA,检出率为 58.33%。血清 HBV DNA 阳性组 DCs 培养上清 IL-12 水平明显低于血清 HBV DNA 阴性组及对照组(均 $P < 0.01$);而 IL-12 的表达水平在 DCs HBV DNA 阳性组明显低于 DCs HBV DNA 阴性组及对照组(均 $P < 0.01$)。结论 慢性乙型肝炎患者外周血 DCs 亦能受到 HBV 的感染,感染了 HBV 的 DCs,其 IL-12 分泌功能明显下降。

[关 键 词] 肝炎,乙型,慢性;肝炎病毒,乙型;树突状细胞;白细胞介素;IL-12

[中图分类号] R512.6⁺2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2010)05-0316-04

Function of dendritic cell to secrete interleukin-12 in patients with chronic hepatitis B

XIANG Ying¹, FAN Xue-gong¹, HUANG Zhen-yu², LI Ning¹ (Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China; 2 Pingjiang County Hospital, Yueyang 414500, China)

[Abstract] **Objective** To study the immune function of dendritic cell (DCs) in HBV-infected patients. **Methods** HBV DNA in DCs of 12 chronic hepatitis B (CHB) patients with serum positive HBV DNA and 10 CHB patients with serum negative HBV DNA were detected by fluorescent quantitative polymerase chain reaction, the function of secreting interleukin-12(IL-12) by DCs under different titers of HBV was compared, 10 persons with negative HBV markers and normal liver function were as control. **Results** HBV DNA in DCs was detected in 7 of 12 (58.33%) CHB patients with positive HBV DNA. The levels of IL-12 in DCs supernatants of serum positive HBV DNA group were obviously lower than that of HBV DNA negative and healthy control group(both $P < 0.01$); The expression levels of IL-12 in DCs HBV DNA positive group was obviously lower than that of DCs HBV DNA negative group and healthy control group(both $P < 0.01$). **Conclusion** The DCs derived from peripheral blood in patients with CHB can be infected by HBV, the secretion function of IL-2 by HBV-infected DCs decreased significantly

[Key words] hepatitis B, chronic; hepatitis B virus, chronic; dendritic cells; interleukin; interleukin-12

[Chin Infect Control, 2010, 9(5): 316-319]

乙型肝炎是我国最常见的疾病之一,乙型肝炎病毒(HBV)形成的特异性免疫耐受所致病毒持续感染是导致乙型肝炎患者病情迁延不愈的主要原因。研究表明,这种免疫耐受的形成一方面与病毒本身的致病基因及其编码的蛋白有关,另一方面机体异常免疫应答也起着十分重要的作用。在机体清

除 HBV 的免疫反应中,树突状细胞(dendritic cells, DCs)作为一种最具潜能的抗原提呈细胞而起重要作用。DCs 可对抗原进行捕获、加工处理后提呈给组织相容性复合物(MHC)-I、II 类分子,从而诱导 T 淋巴细胞的增殖,增强或调节细胞介导的免疫反应^[1-3]。笔者通过对慢性乙型肝炎患者 DCs 内

[收稿日期] 2010-03-22

[作者简介] 向瑛(1982-),女(汉族),湖南省平江县人,医师,主要从事传染病学研究。

[通讯作者] 范学工 E-mail: xgfan57@126.com

HBV DNA 的存在状况进行研究,力求探讨慢性乙型肝炎患者 DCs 功能下降的可能原因。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 一般资料 收集肝炎病毒标志物阴性,肝功能正常的健康志愿者 10 例作对照。慢性乙型肝炎患者 22 例,为本院感染病科 2006 年 3—12 月的门诊及住院患者,其中男性 17 例,女性 5 例;年龄 22~45 岁,平均 33.42 岁;血清 HBV DNA 阳性 12 例(HBV DNA 阳性组),HBV DNA 阴性 10 例(HBV DNA 阴性组)。所有患者诊断均符合 2005 年修订的《慢性乙型肝炎防治指南》标准^[4]。

1.1.2 主要试剂与仪器 人白细胞介素(IL)-12 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒,购自深圳晶美生物工程有限公司;HBV DNA 聚合酶链反应(PCR)荧光检测试剂盒,购自上海申友生物技术有限公司;iCycler 荧光实时 PCR 仪,为美国 BIO-RAD 公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 DCs 体外定向诱导分化和培养 用含 10% FCS RPMI 1640 液调整外周血 PBMCs 浓度为 $3 \times 10^6/\text{mL}$,台盼蓝染色测定细胞活力 $>95\%$,移入 6 孔培养板,每孔 3 mL。5% CO_2 37°C 条件下培养 2 h,吸弃培养上清液,37°C 预热 RPMI 1640 液轻轻洗涤培养板 2 次,去除非贴壁细胞。每孔内加 3 mL 10% FCS RPMI 1640 培养液(含粒-巨噬细胞集落刺激因子 200 ng/mL,IL-4 500 U/mL),在 5% CO_2 37°C 条件下培养,隔天换液 1 次,弃原液 1 mL,加同体系培养液 1.5 mL,收集第 7 天悬浮细胞,台盼蓝染色测定细胞活力 $>95\%$,计数 DCs 获得量。同时取培养上清 -20°C 保存。

1.2.2 荧光定量 PCR 对血清 HBV DNA 及 DCs 内 HBV DNA 的检测 采用上海申友生物技术有限公司生产的 HBV DNA PCR 荧光检测试剂盒,严格按试剂和说明书操作。PCR 反应在荧光实时 PCR 仪上完成,实验结果由软件自动分析得出。实验的灵敏度为 10^3 拷贝/mL, $<10^3$ 拷贝/mL 为阴性结果。

1.2.3 DCs 培养上清 IL-12 水平的检测 采用双抗体夹心 ELISA 法,取标有 IL-12 单抗的酶标板,每孔加入 100 μL 样品,37°C 孵育 90 min。向酶标板各孔中加入 340 μL 洗涤液静置 30 s 后甩尽液体,在厚透吸水纸上拍干,连续手工洗板 4 次。除空白

孔外,每孔加入 100 μL 生物素抗体工作液,37°C 孵育 60 min,洗板 4 次。除空白孔外,每孔加入 100 μL 酶结合物工作液,37°C 孵育 30 min,洗板 4 次。每孔加入 100 μL 显色剂,避光 37°C 孵育 15 min。每孔加入 100 μL 终止液,混匀后 5 min 内读取波长 450 nm 处 A 值。根据标准品浓度,制作标准曲线,并求出样品中 IL-12 的浓度。

1.3 统计学处理 采用箱式图及 $\bar{x} \pm s$,描述不同人群之间的 DCs 分泌 IL-12 水平分布特征。采用方差分析法,检验不同人群 DCs 分泌 IL-12 水平是否有统计学差异;采用直线相关分析法,绘制散点图并计算相关系数(r),对 DCs 功能相关指标与 HBV DNA 的常用对数值是否具有相关关系进行检验。

2 结果

2.1 血清及 DCs 内 HBV DNA 水平 将 DCs 离心所得上清液进行 HBV DNA 检测,所有标本均未检出 HBV DNA,排除了血清污染对实验结果的影响。

12 例血清 HBV DNA 阳性患者中有 7 例(58.33%)DCs 内可检测到 HBV DNA,各组 DCs 内检出 HBV DNA 情况见表 1。12 例血清 HBV DNA 阳性者,其血清 HBV DNA 拷贝数 lg 值为 6.71 ± 0.23 ,7 例 DCs HBV DNA 阳性者的 HBV DNA 拷贝数 lg 值为 5.97 ± 0.19 ,而 5 例 DCs HBV DNA 阴性者及 10 例血清 HBV DNA 阴性者 DCs HBV DNA 水平均 $<10^3$ 拷贝/mL。

表 1 各组 DCs 内检出 HBV DNA 情况(例,%)

Table 1 Detection rate of HBV DNA from DCs in each group (case, %)

组别	例数	DCs 内 HBV DNA	
		阳性	阴性
HBV DNA 阳性组	12	7(58.33)	5(41.67)
HBV DNA 阴性组	10	0(0.00)	10(100.00)
对照组	10	0(0.00)	10(100.00)

2.2 各组 DCs 分泌 IL-12 水平 收集培养第 7 天的 DCs 上清,用 ELISA 法检测其 IL-12 水平,发现在 DCs 培养上清液中,IL-12 的表达水平在 HBV DNA 阳性、HBV DNA 阴性及对照组分别为(19.67 ± 7.32) ng/mL、(30.74 ± 8.39) ng/mL、(79.58 ± 6.68) ng/mL, HBV DNA 阳性组 IL-12 分泌水平明显低于 HBV DNA 阴性组及对照组,差异有高度显著性($F = 24.93, P < 0.01$),而 HBV DNA 阴性组又显著低于对

照组($F = 30.12, P < 0.01$), 见图 1。

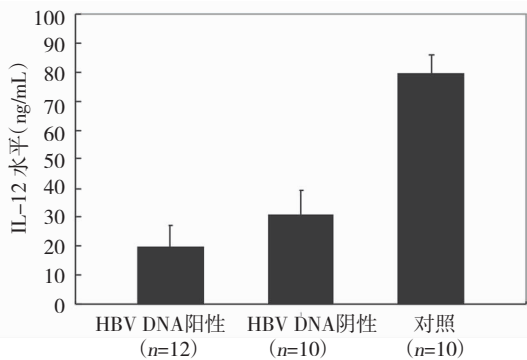


图 1 各组 DCs 分泌 IL-12 水平

Figure 1 The level of IL-12 secreted by DCs in each group

2.3 HBV DNA 阳性组 DCs 分泌 IL-12 水平 7 例血清 HBV DNA 阳性且 DCs 内检出 HBV DNA 患者 IL-12 表达水平为 (14.58 ± 6.49) ng/mL, 5 例血清 HBV DNA 阳性而 DCs 内未检出 HBV DNA 患者 IL-12 表达水平为 (21.25 ± 7.31) ng/mL, 前者 IL-12 表达水平较后者明显下降($F = 35.67, P < 0.01$), 见图 2。

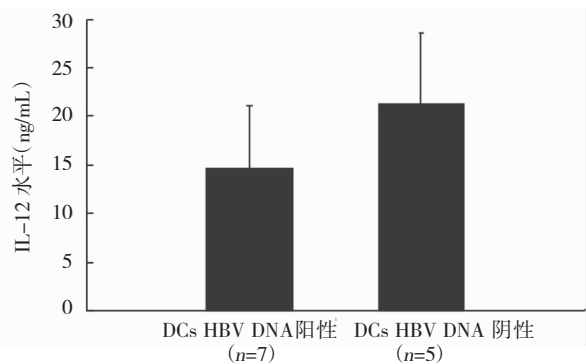


图 2 HBV DNA 阳性组 DCs 分泌 IL-12 水平

Figure 2 The level of IL-12 secreted by DCs in HBV DNA positive group

2.4 DCs HBV DNA 水平与 DCs 分泌 IL-12 的关系 我们对 7 份 DCs 内检出 HBV DNA 的样本作 HBV DNA 水平与 IL-12 分泌的相关性分析, 结果显示 DCs 分泌 IL-12 的水平与 DCs HBV 载量呈显著负相关($r = -0.53, P < 0.05$), 见图 3。

图 3 DCs HBV DNA 水平与其分泌 IL-12 直线相关性分析 ($n = 7$)

Figure 3 Linear correlation between DCs HBV DNA level and IL-12 ($n = 7$)

3 讨论

DCs 是人体内功能最强的专职性 APC, 是机体免疫功能的始动者, 能显著活化初始 T 淋巴细胞, 还与单核细胞、内皮细胞及活化的 B 淋巴细胞一起参与再次免疫应答。其功能缺陷将导致抗原无法被有效地提呈给 CD 4 + Th 和 CD 8 + 细胞毒 T 淋巴细胞(CTL), 从而产生异常的细胞和体液免疫应答。目前不少研究表明, 慢性乙型肝炎患者 DCs 的功能存在缺陷, 认为这是导致 HBV 持续感染的重要因素之一。近年来的研究表明^[5], 慢性乙型肝炎患者外周血 DCs 数量减少, 表型不成熟、功能下调, 并且临床往往表现出外周血高滴度的 HBV DNA 载量, 而且针对 HBV 的特异性 CTL 应答很弱, 甚至检测不到。

曾有研究将 HBV 导入正常人的 DCs, 发现其表型和功能明显降低。Arima^[6]运用原位杂交 PCR 和 RT-PCR 的方法, 从慢性乙型肝炎患者外周血来源的 DCs 内检测到了 HBV DNA 和 HBV RNA, 并发现其同种异体混合淋巴细胞反应水平下降, 表明 DCs 可能作为 HBV 的肝外贮存场所并与 HBV 的复制有关。Munz^[7]等发现, 慢性乙型肝炎患者外周血 DCs 中可检测到 HBV DNA 基因片段, 这说明 DCs 可被 HBV 感染, DCs 的生物学功能可能受 HBV 直接影响; 研究还发现, 慢性乙型肝炎患者 DCs 的表型以及抗原提呈能力与体内 HBV 载量密切相关, 表型以及抗原提呈能力良好者病毒载量低, 而表型以及抗原提呈能力差者则病毒载量高^[8]。

本研究 12 例慢性乙型肝炎血清 HBV DNA 阳性患者中, 有 7 例(58.33%)外周血来源 DCs 内可检测到 HBV DNA, 说明 DCs 亦能受到 HBV 感染。进一步发现 7 例 DCs 内 HBV DNA 阳性患者, 其 DCs 分泌 IL-12 水平较 DCs 内未检出 HBV DNA 者明显下降, 且 IL-12 分泌水平与 HBV DNA 载量呈显著负相关, 说明在血清 HBV DNA 阳性条件下, DCs 被 HBV 感染者的 DCs 功能受损更加明显。

IL-12 是迄今为止所发现的 DCs 细胞释放的最有效的 CTL 和 NK 细胞活性刺激因子, 其在机体抗

病毒和抗肿瘤的一系列免疫病理条件下均能发挥关键作用。Chouaib 等^[9-10]报道,在混合淋巴细胞反应(MLR)阶段,内源性 IL-12 的产生对细胞的增殖和 CTL 分化起重要作用。因此,IL-12 产生的缺失可能是慢性乙型肝炎患者 DCs 刺激 T 细胞增殖能力降低的重要原因之一。本研究发现 HBV DNA 阳性组 DCs 分泌 IL-12 水平较 HBV DNA 阴性组明显下降,并且 DCs 分泌 IL-12 水平与 DCs 内 HBV DNA 水平呈显著负相关,提示慢性乙型肝炎患者体内血清 HBV DNA 及 DCs HBV DNA 载量与其 DCs 功能有密切的联系,HBV DNA 载量能影响 DCs 分泌 IL-12 水平,具体机制有待进一步研究。因此,寻求恢复或提高患者 DCs 的功能,可能是治疗慢性乙型肝炎的一种有效的方法。

[参考文献]

- [1] Lok A S. Chronic hepatitis B[J]. N Engl J Med, 2002, 346(22): 1682-1683.
- [2] Siegal F P, Kadowaki N, Shodell M, *et al.* The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood[J]. Science, 1999, 284(5412):1835-1837.

(上接第 342 页)

直到 SaO₂ > 90%, 心率恢复正常后再重新插管操作。

综上所述,支气管镜下治疗心胸外科患儿手术后肺不张的效果好,安全可靠,值得临床推广。

[参考文献]

- [1] 朱元珏,陈文彬. 呼吸病学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2006:902.
- [2] 中华医学会呼吸病学分会. 诊断性可弯曲支气管镜应用指南(2008 年版)[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2008, 31(1): 14-

- [3] Messmer D, Yang H, Telusma G, *et al.* High mobility group box protein 1: an endogenous signal for dendritic cell maturation and Th1 polarization[J]. J Immunol, 2004, 173(1): 307-313.
- [4] 中华医学会肝病学分会,中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南[J]. 肝脏, 2005, 10(4): 348-357.
- [5] Takaki A, Tatsukawa M, Koike K, *et al.* Mechanism of immune surveillance against HBV infection[J]. Nippon Rinsho, 2004, 62(Suppl 8):62-65.
- [6] Arima S, Akbar S M, Michitaka K, *et al.* Impaired function of antigen-presenting dendritic cells in patients with chronic hepatitis B: localization of HBV DNA and HBV RNA in blood DC by in situ hybridization[J]. Int J Mol Med, 2003, 11(2):169-174.
- [7] Munz C, Steinman R M, Fujii S. Dendritic cell maturation by innate lymphocytes: coordinated stimulation of innate and adaptive immunity[J]. J Exp Med, 2005, 202(2):203-207.
- [8] 钱峰,贺永文,朱传武. 慢性乙型肝炎患者外周血树突状细胞表型及抗原提呈能力与 HBV 载量的关系[J]. 肝脏, 2005, 10(1):8-10.
- [9] Chouaib S, Chehimi J, Bani L, *et al.* Interleukin 12 induces the differentiation of major histocompatibility complex class I-primed cytotoxic T-lymphocyte precursors into allospecific cytotoxic effectors[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(26):12659-12663.
- [10] Lung T L, Saurwein Teissl M, Parson W, *et al.* Unimpaired dendritic cells can be derived from monocytes in old age and can mobilize residual function in senescent T cells[J]. Vaccine, 2000, 18(16):1606-1612.

- 17.
- [3] 陈裕胜,林材元,赵子文. 支气管肺泡灌洗术治疗肺不张的疗效观察[J]. 广东医学杂志, 1999, 20(3):218-219.
- [4] 张忠德,张文青,李建华. 纤维支气管镜吸痰和灌注后注药对胸外术后并发肺部感染的治疗作用[J]. 中国内镜杂志, 2005, 11(7):724-725.
- [5] 李强. 呼吸内镜学[M]. 上海:上海科学技术出版社, 2003: 176.
- [6] 温文川,欧素华. 纤维支气管镜床旁治疗术后肺不张的疗效及安全性分析[J]. 中国内镜杂志, 2003, 9(11):63-65.
- [7] Mitchell D. British Thoracic society guidelines on diagnostic flexible bronchoscopy[J]. Thorax, 2001, 56(Suppl 1): 11-22.