

· 临床论著 ·

外周血单个核细胞中 HBV DNA 与 HBV cccDNA 对慢性乙型肝炎患者免疫功能的影响

钟艳丹 谭德明 李涛 刘国珍 徐旭雯 刘菲

【摘要】 目的 比较外周血单个核细胞(PBMCs)有或无 HBV 感染证据组中免疫功能的差异。方法 常规分离 78 例 CHB 患者和 10 例健康对照组全血中的 PBMCs,提取 DNA,应用实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)法检测 PBMCs 中的 HBV DNA 和 HBV cccDNA;进行 PBMCs 的培养,孵育 72 h 后,收集 PBMCs 上清液,采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测干扰素- γ (IFN- γ)和白细胞介素-10(IL-10),并用四甲基偶氮唑盐(MTT)法检测 PBMCs 的增殖活性。结果 PBMCs 中 HBV cccDNA 阳性的患者组,其 PBMCs 产生 IFN- γ 水平显著下降,IL-10 水平显著升高,同时伴 PBMCs 的增殖能力显著下降。结论 HBV 感染 PBMCs 可能是 HBV 感染后机体 Th1/Th2 细胞因子比例失衡,特异性免疫功能低下,形成慢性 HBV 感染的主要原因之一。

【关键词】 外周血单个核细胞;细胞因子

Effects of HBV DNA and HBV cccDNA in peripheral blood mononuclear cells on immune function of chronic hepatitis B patients ZHONG Yan-dan*, TAN De-ming, LI Tao, LIU Guo-zhen, XU Xu-wen, LIU Fei. * Department of Infectious Diseases, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China

Corresponding author: TAN De-ming, Email: dmt2008@yahoo.com.cn

【Abstract】 **Objective** To compare the immune functions of PBMCs in chronic hepatitis B (CHB) patients with and without HBV cccDNA in PBMCs. **Methods** After PBMCs were routinely isolated from whole blood samples and DNA was extracted from PBMCs, HBV DNA and HBV cccDNA were detected by real-time fluorescent quantitation polymerase chain reaction, respectively. Meanwhile, after PBMCs were cultured for 72 h, the supernatant were collected to detect the levels of IFN γ and IL-10 by ELISA, respectively, and the PBMCs proliferation was determined by MTT method. **Results** HBV cccDNA has been found in PBMCs of patients with chronic hepatitis B. There were lower PBMCs proliferation and imbalance of Th1/Th2 cytokines, indicating down-regulation of IFN γ and up-regulation of IL-10 expression in the chronic hepatitis

基金项目:湖南省科技厅科研基金项目(05SK3080)

作者单位:410008 长沙,中南大学湘雅医院传染病学教研室[钟艳丹(现在东南大学医学院附属南京市第二医院)、谭德明、刘国珍、刘菲];上海市公共卫生中心 ICU 重肝病房(李涛);南方医科大学南方医院感染病科(徐旭雯)

通讯作者:谭德明 Email: dmt2008@yahoo.com.cn

B with HBV cccDNA in PBMCs than that in the patients without HBV cccDNA in PBMCs. **Conclusions** Therefore, PBMCs infected by HBV in chronic hepatitis B patients may be one of important factors responsible for the imbalance of Th1/Th2 cytokines, specific immunodepression against HBV and resulting in the persistent HBV infection.

【Key words】 peripheral blood mononuclear cells; Cytokine

乙型肝炎病毒(HBV)感染是我国最常见的病毒感染之一。HBV 直接致病能力较弱,病毒感染所致的免疫病理应答是 HBV 感染的主要发病机制。HBV 可引起慢性感染和慢性乙型肝炎。在慢性乙型肝炎和慢性 HBV 感染患者中往往存在针对 HBV 的免疫功能低下和免疫功能的紊乱。其体内的免疫功能的低下和紊乱是否与 HBV 直接感染免疫细胞有关,目前尚无肯定的结论。有学者从慢性乙型肝炎患者外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)中检测出了乙型肝炎病毒共价闭合环状 DNA(HBV cccDNA),证实了 HBV 能够真正感染 PBMCs^[1,2]。为了阐明 HBV 感染免疫细胞对慢性乙型肝炎患者免疫功能的影响,本文在通过 PBMCs 中 HBV cccDNA 的检测证实 HBV 感染了 PBMCs 的基础上,比较了 PBMCs 中 HBV cccDNA 阳性和阴性慢性乙型肝炎患者 PBMCs 的增殖能力和细胞因子干扰素- γ (IFN- γ)、白细胞介素-10(IL-10)的产生能力。

资料与方法

一、标本来源

收集 2005 年 10 月至 2006 年 3 月中南大学湘雅医院感染病科门诊和住院患者的慢性乙型肝炎患者全血共计 78 份。其中男性 69 例,女性 9 例,平均年龄(33 ± 11)岁。所有患者诊断均符合 2000 年西安第 10 次全国病毒性肝炎与肝病学术会议修订的《病毒性肝炎防治方案》中有关的标准^[3]。此外还包括健康对照者 10 例,来自长沙市健康献血员。

二、实时荧光定量 PCR 检测 PBMCs 中 HBV cccDNA

1. PBMCs 中 HBV DNA 的提取:以肝素抗凝采取全血,用 Ficoll 密度梯度离心法获取 PBMCs,末次洗涤液亦留下备检,DNA 的提取根据 DNA 抽提试剂盒(上海科华生物工程股份公司)说明书进行,采用负压法。

2. 实时荧光定量 PCR 检测 PBMCs 中 HBV cccDNA:检测 PBMCs 中 HBV cccDNA 的探针和引物均采用 Shao 等^[4]的设计,引物序列如下。C1:5'-TCG CTT TCG GGT CCC T C ATG CGA CGT GC-3' (nt 1601 ~ nt 1612)(嵌合引物); C2:5'-TCG CTT TCG GGT CCC T-3' (无关序列); C3:5'-GCA CCT CTC TTA CGC GGT C-3' (nt 1528 ~ nt 1547)。探针为 T1:5'-FAM-CCC GTC TGT GCC TTC TTG CCG-TAM RA-3',均由上海英俊技术有限公司合成,扩增产物为 84 bp。采用巢式 PCR 扩增 HBV cccDNA,反应均在 ABI 7500 实时荧光 PCR 仪上进行。具体反应条件如下:(1)第 1 次 PCR 反应:总体积 50 μ l:10 \times PCR 缓冲液 5 μ l, C1 (20

$\mu\text{mol/L}$) 2.5 μl , dNTP(每种核苷酸均为 2.5 mmol/L) 4 μl , Taq 聚合酶 0.5 μl , DNA 模板 5 μl 。PCR 条件: 94 $^{\circ}\text{C}$, 10 min, 15 个循环; 94 $^{\circ}\text{C}$, 20 s, 50 $^{\circ}\text{C}$, 20 s, 72 $^{\circ}\text{C}$, 45 s; (2) 第 2 次 PCR 反应: 总体积 50 μl : 10 \times PCR 缓冲液 5 μl , C2 (20 $\mu\text{mol/L}$) 2.5 μl , C3 (20 $\mu\text{mol/L}$) 2.5 μl , T1 (20 $\mu\text{mol/L}$) 2 μl , dNTP (每种核苷酸均为 2.5 mmol/L) 4 μl , 热启动 Taq DNA 聚合酶 + UNG 酶 2 μl , 第 1 次反应产物 2 μl 。PCR 扩增条件: 37 $^{\circ}\text{C}$, 2 min, 95 $^{\circ}\text{C}$, 10 min, 40 个循环; 93 $^{\circ}\text{C}$, 10 s, 62 $^{\circ}\text{C}$, 35 s, 荧光检测点选择 62 $^{\circ}\text{C}$ 时(该检测体系检测 HBV DNA 的敏感性为 10^2 拷贝/ml, $< 3 \times 10^2$ 拷贝/ml 为阴性)。

三、PBMCs 培养及细胞增殖的测定流程

以 Ficoll 密度梯度离心法获取 PBMCs, 用 10% FCS RPMI 1640 培养基(含 100 U/ml 青霉素和链霉素)重悬细胞为 10^6 个细胞/ml, 种入 96 孔培养板中, 100 μl /孔, 每组设复孔, 加入植物血凝素(PHA) 25 $\mu\text{g/ml}$, 100 μl /孔, 另设阴性对照, 孵育 68 h; 加入 MTT 10 μl /孔, 孵育 4 h; 吸弃上清, 然后加入 150 μl 二甲亚砜; 溶解 10 min, 在 570 nm 波长处, 参考 630 nm 波长, 测吸光度(A)值。

四、双抗体夹心 ELISA 法检测 PBMCs 产生 IL-10、IFN- γ 的能力

取 PBMCs 培养上清, 用双抗体夹心 ELISA 法定量检测 IL-10 和 IFN- γ 。严格按检测试剂盒(上海森雄科技实业有限公司)说明书进行操作。

五、统计学处理

数据利用 SPSS 13.0 软件进行统计学处理, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 并对 2 组 IFN- γ , IL-10 和 PBMCs 行 *t* 检验。

结 果

一、PBMCs 中 HBV cccDNA 检测结果

如图 1 所示, 实时荧光定量 PCR 方法扩增 PBMCs 中 HBV cccDNA 呈现良好的线性关系。患者血清, 淋巴细胞末次洗涤液以及 10 例正常对照 PBMCs 均未扩增到 HBV cccDNA。78 例 HBV 感染者, PBMCs 中 HBV cccDNA 阳性 31 例(31/78; 39.7%), HBV cccDNA 滴度范围 $5.6 \times 10^2 \sim 9.4 \times 10^4$ 拷贝/ 10^6 个细胞。所有 PBMCs 中 HBV cccDNA 阳性患者其血清和 PBMCs 中 HBV DNA 均阳性。

二、慢性乙型肝炎患者 PBMCs 表达 IFN- γ 、IL-10 和 PBMCs 的增殖活性

慢性 HBV 感染者, PBMCs 产生的 IFN- γ 水平比正常对照组显著下降, IL-10 水平显著升高, PBMCs 的增殖活性显著减少, 其差异经统计学分析, 均有非常显著性意义(表 1)。78 例慢性乙型肝炎患者中, IFN- γ 水平在轻度慢性乙型肝炎和重度慢性乙型肝炎之间有显著差异; 乙型肝炎携带者 IL-10 水平均分别高于轻度慢性乙型肝炎、中度慢性乙型肝炎、重度慢性乙型肝炎、慢性重型乙型肝炎, 其差异有显著性意义; 乙型肝炎携带者 PBMCs 增殖活性也均分别高于轻度慢性乙型肝炎、中度慢性乙型肝炎、重度慢性乙型肝炎、慢性重型乙型肝炎, 其差异有显著性意义; 且中度慢性乙型肝炎 PBMCs 增殖活性高于重度慢性乙型肝炎, 两者差异有显著性意义(表 1)。

三、PBMCs 中 HBV cccDNA 与 IFN- γ 、IL-10 的表达和 PBMCs 的增殖活性的关系

PBMCs 中 HBV DNA(+)和 HBV DNA(-)相比,IL-10 水平增高幅度较低, PBMCs 的增殖活性低下,其差异有显著意义;而 IFN- γ 改变两者无显著性差异(表2;图2)。同样,PBMCs 中 HBV cccDNA(+)和 HBV cccDNA(-)相比,PBMCs 的增殖活性低下,其差异有显著意义;而 IL-10、IFN- γ 的改变,均无显著性差异(表2,图3)。

表1 慢性乙型肝炎不同临床类型与 IFN- γ 、IL-10、PBMCs 增殖活性的关系($\bar{x} \pm s$)

分组	例数	IFN- γ (pg/ml)	IL-10(pg/ml)	A 值
正常对照组	10	941.74 \pm 297.48	39.54 \pm 19.29	0.63 \pm 0.17
HBV 携带者	13	427.92 \pm 281.07 *	116.46 \pm 45.12 *	0.47 \pm 0.12 *
轻度慢性乙型	15	566.27 \pm 401.23 *	63.26 \pm 41.59 *	0.33 \pm 0.14 *
中度慢性乙型	28	442.45 \pm 234.67 *	72.75 \pm 40.57 *	0.37 \pm 0.10 *
重度慢性乙型	10	282.24 \pm 191.00 *	63.10 \pm 46.03 *	0.26 \pm 0.09 *
慢性重型乙型	12	456.07 \pm 316.59 *	69.04 \pm 59.79 *	0.36 \pm 0.13 *

注: * 与正常对照组比较 $P < 0.01$

表2 PBMCs 中 HBV DNA 和 HBV cccDNA 与 IFN- γ 、IL-10、PBMCs 增殖活性的关系($\bar{x} \pm s$)

分组	例数	IFN- γ (pg/ml)	IL-10(pg/ml)	PBMCs 增殖活性
PBMCs HBV DNA(+)	38	409.52 \pm 334.13	63.94 \pm 39.72 *	0.32 \pm 0.10 *
PBMCs HBV DNA(-)	40	479.48 \pm 247.25	88.24 \pm 52.59 *	0.40 \pm 0.14 *
PBMCs HBV cccDNA(+)	31	441.17 \pm 355.68	67.01 \pm 42.31	0.33 \pm 0.10 *
PBMCs HBV cccDNA(-)	47	48.18 \pm 247.34	82.59 \pm 50.97	0.39 \pm 0.13 *

注: * 两组间比较 $P < 0.01$

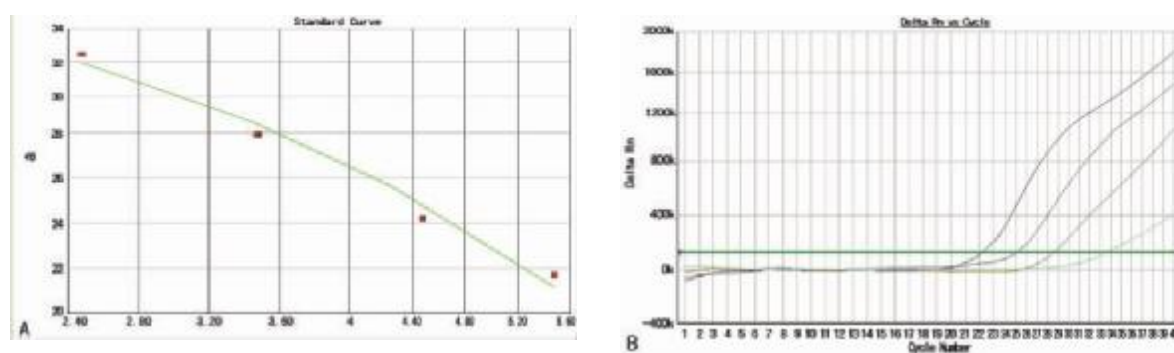


图1 实时荧光定量 PCR 方法扩增 PBMCs 中 HBV cccDNA($3 \times 10^2 \sim 3 \times 10^5$ 拷贝/ml)

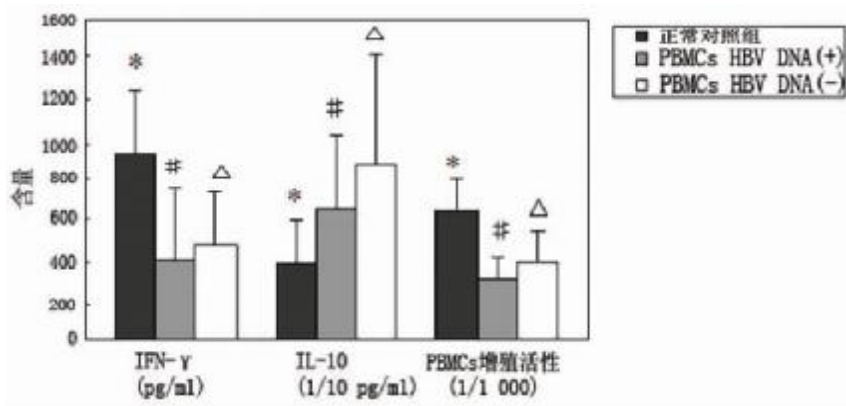


图2 PBMCs中HBV DNA与IFN-γ、IL-10及PBMCs增殖活性的关系
 IFNγ组: *与#比 $t = 4.575, P < 0.01$; *与△比 $t = 5.079, P < 0.01$; #与△比 $t = 1.055, P > 0.05$ 。
 IL-10组: *与#比 $t = 1.874, P > 0.05$; *与△比 $t = 4.732, P < 0.01$; #与△比 $t = 2.294, P = 0.025$ 。
 PBMCs增殖活性组: *与#比 $t = 5.584, P < 0.01$; *与△比 $t = 4.398, P < 0.01$; #与△比 $t = 2.950, P < 0.01$ 。

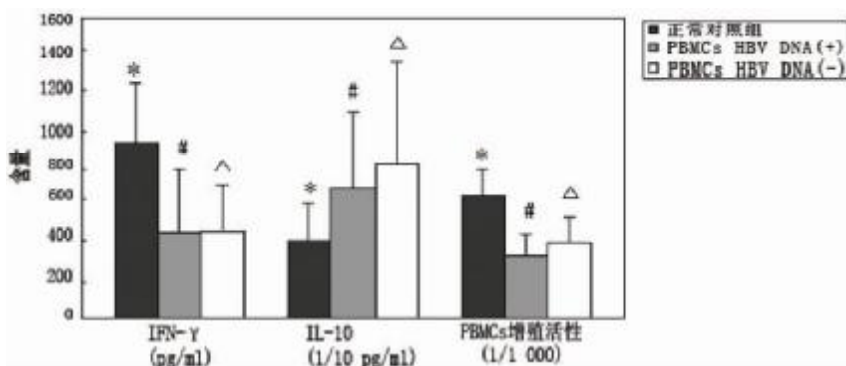


图3 PBMCs中HBV cccDNA与IFN-γ、IL-10及PBMCs增殖活性关系
 IFNγ组: *与#比 $t = 4.011, P < 0.01$; *与△比 $t = 5.531, P > 0.05$; #与△比 $t = 0.103, P > 0.05$ 。
 IL-10组: *与#比 $t = 1.975, P > 0.05$; *与△比 $t = 4.476, P < 0.01$; #与△比 $t = 1.410, P > 0.05$ 。
 PBMCs增殖活性组: *与#比 $t = 5.399, P < 0.01$; *与△比 $t = 4.871, P < 0.01$; #与△比 $t = 2.049, P = 0.044$ 。

讨 论

原始辅助性T细胞(Th0)根据其分泌细胞因子的功能不同,可分为I型辅助性T细胞(Th1)和II型辅助性T细胞(Th2)。Th1分泌IFN-γ为主,并介导细胞免疫和有利于病毒清除,而Th2分泌IL-10等细胞因子并介导体液免疫。Th1和Th2细胞之间有相互拮抗的关系,它们通过自身分泌的细胞因子刺激自身增殖的

同时,相互下调对方的生长分化^[5]。

人体感染乙型肝炎病毒后,产生的细胞免疫应答和体液免疫应答,激发自身免疫反应引起免疫调节紊乱,主要表现为 CD4⁺ 细胞减少,CD8⁺ 细胞增高,CD4⁺/CD8⁺ 细胞数比值降低;Th1 和 Th2 免疫应答失衡^[6];淋巴细胞凋亡增加等。免疫功能的紊乱与 HBV 的复制有明显关系。在慢性乙型肝炎患者中,高水平 HBV DNA 可以抑制 IL-12 诱导的 IFN- γ 的产生,病毒载量和抗原的减少可以恢复细胞毒 T 淋巴细胞的反应功能^[7,8]。Tang 等也发现当 HBV DNA 水平增加时,IFN- γ 和肿瘤坏死因子 α (TNF α) 水平可能减少^[9]。Schlaak 等^[10] 观察显示,血清 HBeAg 阳性的慢性乙型肝炎患者 PBMCs 产生 IFN- γ 的能力明显下降;宋闽宁等^[11] 的研究认为 IFN- γ 在无症状 HBeAg 阳性组测定值明显较低;但在无症状抗-HBe 增高,IL-10 不受 HBeAg/抗-HBe 的影响,经受刺激培养后其分泌明显高于正常对照组。本研究中我们也取得相同的结果。发现 HBV DNA 阳性的患者 PBMCs 产生 IFN- γ 的能力下降,PBMCs 的增殖能力减低和产生的 IL-10 水平增加,这些变化均削弱了机体清除 HBV 的免疫应答,有利于慢性 HBV 感染的建立。通过 PBMCs 中 HBV cccDNA 的检测。证明了 HBV 能感染免疫细胞。结果还进一步表明 PBMCs 中 HBV cccDNA 阳性者,其 PBMCs 的增殖能力明显下降。更直接证明了乙型肝炎患者免疫功能受损和紊乱与 HBV 感染免疫细胞有明显的关系。本文所观察到的 HBV 感染 PBMCs 直接影响免疫细胞功能是由于促进了免疫细胞的凋亡,还是感染后干扰了细胞因子的产生和细胞增殖过程中所需要的信号转导过程所导致的细胞增殖能力下降和 Th1/Th2 细胞因子失衡尚不清楚,有待进一步研究。

戴炜等^[12] 研究结果显示慢性重型肝炎患者 PBMC 中分泌 IFN- γ 的 Th1 细胞比例明显增加,高于正常对照($P < 0.01$),而 HBV DNA 含量与 IFN- γ 表达细胞百分数呈负相关,提示 Th1 细胞不仅与肝组织损伤密切相关,而且对 HBV 复制也可能具有一定的抑制作用。本文的研究结果未能发现严重肝病,包括慢性重型肝炎和重度慢性乙型肝炎患者体内 IFN- γ 明显升高的迹象,而且还出现了重度慢性乙型肝炎患者 IFN- γ 的水平低于轻度慢性乙型肝炎患者,可能反映了机体过强的免疫应答后的免疫抑制状态,此时的 IFN- γ /IL-10 比值的增加可能是其较好的佐证。当然,本研究收集的病例数较少,检测值的波动范围大,也有可能影响检测结果。

总之,本研究的结果初步说明 HBV 直接感染 PBMCs 后,能使免疫细胞的功能改变,他可能是 HBV 感染后使机体抗 HBV 免疫功能低下,Th1/Th2 的失衡状态,形成慢性乙型肝炎的发病机制之一。

参 考 文 献

- 1 Davison F, Alexander GJ, Anastassakos C, et al. Leucocyte hepatitis B virus DNA in acute and chronic hepatitis B virus infection. J Med Virol, 1987, 22: 379-385.

- 2 Tripler M, Meyerzum Buschenfelde KH, Gerken G. HBV viral load within subpopulations of peripheral blood mononuclear cells in HBV infection using limiting dilution PCR. *J Virol Methods*, 1999, 78:129-147.
- 3 中华医学会传染病与寄生虫病学分会. 病毒性肝炎防治方案. *中华肝脏病杂志*, 2000, 8:324-329.
- 4 Shao JB, Chen Z, Ni WQ, et al. A quantitative method to detect HBV cccDNA by chimeric primer and real-time polymerase chain reaction. *J Virol Methods*, 2003, 112:45-52.
- 5 Moore KW, O'Garra A, de Waal Malefyt R, et al. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol*, 1993, 11:165-190.
- 6 Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Ann Rev Immunol*, 1989, 7: 145-173.
- 7 Boni C, Penna A, Ogg GS, et al. Lamivudine treatment can overcome cytotoxic T-cell hyporesponsiveness in chronic hepatitis B: new perspectives for immune therapy. *Hepatology*, 2001, 33:963-971.
- 8 Kondo Y, Asabe S, Kobayashi K, et al. Recovery of functional cytotoxic T lymphocytes during lamivudine therapy by acquiring multi-specificity. *J Med Virol*, 2004, 74:425-433.
- 9 Tang YM, Chen MH, Chen GH, et al. Kinetics of phytohemagglutinin induced IFN- γ and TNF α expression in peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic hepatitis B after liver transplantation. *World J Gastroenterol*, 2005, 11:4574-4578.
- 10 Schlaak JK, Tully G, Lohr HF, et al. HBV-specific immune defect in chronic hepatitis B (CHB) is correlated with a dysregulation of pro- and anti-inflammatory cytokines. *Immunology*, 1999, 115:508-514.
- 11 宋闰宁, 骆梅兰, 黄文棋, 等. 无症状 HBeAg 阳性患者外周血单个核细胞培养液中 IL-10、IL-12 及 IFN- γ 检测水平的研究. *临床肝胆病杂志*, 2003, 3:176-177.
- 12 戴炜, 余卫业, 姜荣龙, 等. 慢性重型肝炎患者外周血单个核细胞内干扰素和白细胞介素的表达及意义. *中华肝脏病杂志*, 2001, 9 Suppl:64-65.

(收稿日期:2006-12-13)

(本文编辑:张锦前)