

乙型肝炎病毒感染者血清和外周血单个核细胞培养上清细胞因子测定及临床意义

唐祖明 王寿明 张胜子 郑纪山

摘要 **目的** 观察不同 HBV 感染者血清和外周血单个核细胞(PBMC)培养上清中的细胞因子水平。**方法** 采集不同 HBV 感染者血清;制备 PBMC 并用 rHBcAg 刺激,培养 72h 后收集培养上清。采用酶联免疫吸附法检测血清和培养上清中的 IFN- γ 和 IL-4 水平。**结果** 血清 IFN- γ 水平,急性乙肝显著高于健康对照和 HBV 携带者($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$),也高于慢性乙肝;慢性乙肝显著高于健康对照($P < 0.05$)。血清 IL-4 水平,急、慢性乙肝均显著高于健康对照和 HBV 携带者($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$),HBV 携带者与健康对照相比差异无统计学意义。血清 IFN- γ /IL-4 比值,除慢性乙肝显著低于健康对照($P < 0.01$),其余组间差异无统计学意义。在 PBMC 培养上清中,急、慢性乙肝患者的 IFN- γ 水平显著高于健康对照和 HBV 携带者($P < 0.05$),急性肝炎组高于慢性组,但差异无统计学意义;HBV 携带者与健康对照相比,差异无统计学意义。3 个 HBV 感染组的 IL-4 水平与健康对照相比,差异无统计学意义。**结论** (1)与使用 rHBcAg 刺激后的 PBMC 培养上清相比,血清检测可能更加符合患者的真实细胞因子水平。(2)HBV 感染时 IFN- γ 表达水平和 IFN- γ /IL-4 比值与疾病转归密切相关。

关键词 乙型肝炎 γ 干扰素 白细胞介素-4

The Study of Cytokine Level in Sera and Culture Medium of Peripheral Blood Mononuclear Cells in Patients with Hepatitis B Virus Infection.

Tang Zuming, Wang Shouming, Zheng Jishan. State Key Laboratory for Bioelectronics, Southeast University, Jiangsu 210096, China

Abstract **Objective** To investigate cytokine levels in serum and culture medium of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with hepatitis B virus (HBV) infection. **Methods** PBMCs isolated from fresh heparinized blood were cultured and stimulated with rHBcAg. After 72h at 37°C 5% CO₂ in air, the culture supernatant was collected. Levels of interferon- γ (IFN- γ) and interleukin (IL)-4 in blood serum in spontaneous and supernatant were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** Serum IFN- γ levels in patients with acute self-limited hepatitis B (AH) and chronic hepatitis B (CHB) were significantly higher than those in normal control (NC) ($P < 0.01$ and $P < 0.05$), but there was significant difference between two HBV infection groups. Serum IL-4 levels in AH and CHB were significantly higher than those in NC ($P < 0.01$) and asymptomatic HBV carriers ($P < 0.05$). IFN- γ /IL-4 ratio in AH was closed to that in NC, but IFN- γ /IL-4 ratio in CHB showed significant decrease ($P < 0.01$). CHB groups showed significant decrease in IFN- γ /IL-4 ratio than that in NC. IFN- γ /IL-4 ratio had no significant differences between every two groups, except CHB. Compared with NC and HBV carriers, AH and CHB showed significant increase in supernatant IFN- γ levels, but three HBV infection groups showed no significant changes in supernatant IL-4 levels. **Conclusion** (1) Compared with culture supernatant obtained from stimulated with rHBcAg, spontaneous serum cytokine levels may be closer to real immune responses. (2) The elevated IFN- γ level and immune balance of cytokine profile exert a profound influence on the prognosis of HBV infections.

Key words Hepatitis B; IFN- γ ; IL-4

一般认为,乙型肝炎病毒(HBV)是一种非细胞病理性的具包膜的双链 DNA 病毒,其感染肝细胞引发的急、慢性肝炎是人体免疫系统在清除 HBV 感染

的过程中对肝细胞的破坏^[1]。各种细胞因子在 HBV 感染的发生、发展以及在病毒的清除中所起的作用正日益引起重视。本文采用 ELISA 法检测 HBV 感染者血清和外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)培养上清中的 IFN- γ 和 IL-4 水平,以探讨其不同 HBV 感染状态的表达特征。

材料与方法

1. 研究对象:解放军第 81 医院住院及门诊病例 46 人,其

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30671929)

作者单位:210096 南京,东南大学生物电子学国家重点实验室(唐祖明、张胜子);210002 南京,解放军第 81 医院(王寿明);210002 南京军区军事医学研究所(郑纪山)

通讯作者:唐祖明,电子信箱:tangzm@seu.edu.cn;郑纪山,电子信箱:zhengjishannj@yahoo.com.cn

中急性乙肝患者 8 人,男性 6 例、女性 2 例,18~36 岁;慢性乙肝 27 人,男性 19 人,女性 8 人,年龄 28~52 岁;HBV 携带者 11 人,男性 2 例、女性 9 例,年龄 27~58 岁。诊断依据中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会 2000 年联合修订的《病毒性肝炎防治方案》。患者血清抗 HAV-IgM、抗 HCV、抗 HEV 以及抗 HIV 检测均为阴性。急性乙肝患者在发病 7~21 天时采集样本,其时病人血清 HBV DNA(-) (<500 拷贝/毫升)。慢性乙肝患者采样前均未使用抗病毒药物。对照组为 16 名志愿健康者,均未感染过 HBV。

2. 主要试剂:RPMI-1640 培养液、胎牛血清(Gibco 公司产品),人淋巴细胞分离液(天津灏洋生物制品有限公司),重组乙肝核心抗原(rHBcAg 1-183 a. a,Prospec 公司),IL-4 和 IFN-γ 检测试剂盒(Mabtech 公司)。

3. 方法:(1)血清采集与保存:采集患者静脉血,分离血清,-20℃ 保存备用。(2)PBMC 制备和培养:无菌采集肝素抗凝外周静脉血 5ml,用等量无钙、镁 Hanks 液稀释混匀,加于

人淋巴细胞分离液之上,2000r/min 离心 20min,收集 PBMC 层。无钙、镁 Hanks 液重复洗涤、离心 3 次,用含 10% 热灭活胎牛血清的 RPMI-1640 培养液调整细胞浓度至 1×10^6 /ml,接种于 24 孔培养板 1 毫升/孔,加 rHBcAg(终浓度 2μg/ml),于 37℃ 5% CO₂ 条件下培养 72h,离心后收获上清,-20℃ 保存备用,于同一时间点进行检测。(3)细胞因子检测:IL-4 及 IFN-γ 测定均采用双抗体夹心 ELISA 法。按试剂盒说明书操作。以标准品 OD450nm 值做标准曲线,计算待测样品中细胞因子的含量,每份样品设复孔。

4. 统计学处理:SPSS11.5 统计软件分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

HBV 感染者血清 IFN-γ 和 IL-4 检测结果见表 1。PBMC 体外培养上清液中 IFN-γ、IL-4 水平见表 2。

表 1 各组血清 IFN-γ 和 IL-4 水平比较 (pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	IFN-γ	IL-4	IFN-γ/IL-4
急性乙肝	8	74.05 ± 16.25* [△]	50.66 ± 12.43* [△]	1.22 ± 0.13
慢性乙肝	27	52.96 ± 9.66 [#]	56.33 ± 18.62* [△]	0.77 ± 0.11*
HBV 携带者	11	34.55 ± 13.21	28.03 ± 10.08	1.01 ± 0.08
健康对照	16	35.05 ± 8.73	20.40 ± 11.52	1.43 ± 0.22

与健康对照比较,* $P < 0.05$,* $P < 0.01$;与 HBV 携带者比较,[△] $P < 0.05$

血清 IFN-γ 水平,急性乙肝显著高于健康对照和 HBV 携带者($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$),也高于慢性乙肝;慢性乙肝显著高于健康对照($P < 0.05$)。血清 IL-4 水平,急、慢性乙肝均显著高于健康对照和 HBV 携带者($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$),HBV 携带者与健康对照相比差异无统计学意义。IFN-γ/IL-4 比值,慢性乙肝显著低于健康对照($P < 0.01$)。

表 2 rHBcAg 诱导 PBMC 体外培养上清液中 IFN-γ、IL-4 水平比较 (pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	IFN-γ	IL-4
急性乙肝	8	781.3 ± 201.6 ^{#△}	157.3 ± 65.9
慢性乙肝	27	582.7 ± 159.6 ^{#△}	119.0 ± 47.3
HBV 携带者	11	344.6 ± 103.6	111.3 ± 44.6
健康对照	16	289.6 ± 61.5	106.9 ± 29.5

与健康对照比较,* $P < 0.05$;与 HBV 携带者比较,[△] $P < 0.05$

在 PBMC 培养上清液中,急、慢性乙肝患者的 IFN-γ 水平显著高于健康对照和 HBV 携带者($P < 0.05$),急性肝炎组高于慢性组,但差异无统计学意义;HBV 携带者与健康对照相比,差异无统计学意义。3 个 HBV 感染组的 IL-4 水平与健康对照相比,差异无统计学意义。

讨 论

HBV 感染的发生、发展和转归主要取决于感染机体的抗病毒免疫强度。细胞免疫,包括细胞毒 T 细胞(cytotoxic T cell,Tc)和 T 辅助细胞(T helper,Th)在乙型肝炎发病机制中的作用备受关注。Tc 亚群与病毒清除和肝脏病理损伤密切相关,Th 亚群具有对整个免疫应答的调节作用。Tc 细胞和 Th 细胞依据分泌的细胞因子不同可分为 Tc1/Th1 和 Tc2/Th2 类细胞,Tc1/Th1 以分泌 IFN-γ 为主,Tc2/Th2 以分泌 IL-4 为主^[2]。IFN-γ 和 IL-4 表达水平可部分代表两类细胞的免疫状态。

HBcAg 具有高度的免疫原性,无论是在 T 细胞还是在 B 细胞水平上,其抗原性都较 HBsAg 和 HBeAg 要强得多。机体感染 HBV 后,最早出现的对 HBV 的 T 细胞免疫应答也是针对 HBcAg 的。因此在本研究中,我们选择 HBcAg 作为 PBMC 的刺激因子。在体外用 rHBcAg 刺激 PBMC 并连续培养 72h,我们发现培养上清液中,急、慢性乙肝的 IFN-γ 水平显著高于健康对照和 HBV 携带者,但在调高程度上急性肝炎更明显;实验结果还发现急、慢性乙肝的 IL-4 水平虽有所增高,但与健康对照相比,差异无显著性。较早 Milich 等^[3]就在实验动物发现,HBV 抗

原因结构不同而诱导不同的 Th 亚群, HBeAg 主要诱导产生 IL-2/IFN- γ 以及低水平的 IL-4, 而 HBeAg 主要诱导产生 IL-4 和少量的 IFN- γ , 提示 HBeAg 优先刺激 Th1 样的细胞, HBeAg 优先诱导 Th2 样细胞。Penna 等^[4] 在急性乙肝患者的研究也发现, HBeAg 特异性淋巴细胞群及克隆细胞株分别有 67% 和 77% 表达 IFN- γ 。本研究用 rHBeAg 刺激 PBMC, 主要诱导了急、慢性乙肝患者 IFN- γ 的增高, 而 IL-4 增加较少, 似乎佐证了上述发现。如此看来, 基础血清中的检测应该更加符合患者的真实细胞因子水平。

本研究对基础血清检测的结果显示, 急性乙肝患者血清 IFN- γ 、IL-4 水平显著高于健康对照组, 但 IFN- γ /IL-4 比值接近于健康对照, 表明急性自限性 HBV 感染时两类细胞因子的调高趋于平衡。慢性乙型肝炎患者血清中 IFN- γ 、IL-4 水平虽也显著高于健康对照组, 但 IFN- γ /IL-4 比值显著低于健康对照, 表明慢性乙型肝炎患者的细胞因子调高可能存在失衡。

本研究中无症状 HBV 携带者无论是血清还是培养上清的 IFN- γ 和 IL-4 水平显著低于急、慢性乙肝患者, PBMC 培养上清的 IFN- γ 和 IL-4 水平虽高于健康对照但差异无显著性。该结果表明处在免疫耐受期和非活动型病毒携带期的无症状 HBV 携带者, 机体的免疫状态与急性乙肝的免疫清除期和慢性乙肝的活动期有所不同。在本研究中, 虽经 rHBeAg 刺激, 无症状 HBV 携带者培养上清的 IFN- γ 增高并不明显, 这与有些研究报道的结果不同^[5]。可能与添加刺激物的浓度不同以及是否使用共刺激抗体分子等因素有关。

Th1 样细胞分泌的 IL-2、IFN- γ 等细胞因子,

主要参与细胞免疫介导的炎症反应。Th2 样细胞分泌的 IL-4、IL-10 等细胞因子, 主要介导体液免疫应答。如 Th1 类细胞亚群占优势, 将促进细胞免疫反应, 增强 CD8⁺T 细胞的细胞毒活性, 从而清除细胞内病毒, 同时引起肝细胞损伤; 如 Th2 样细胞占优势, 将促进体液免疫反应, 并抑制细胞免疫反应, CD8⁺T 细胞活性减弱, 肝细胞损伤减轻。Th1/Th2 失衡被认为是 HBV 慢性感染发生和持续的原因^[3]。近年来, 人们对 HBV 感染时可能存在的非溶细胞机制清除肝细胞内病毒颇为关注, 多项研究提示其效应分子主要为 IFN- γ ^[6]。因而 HBV 感染时 IFN- γ 表达水平可能与疾病转归密切相关。

参考文献

- 1 Chang JJ, Lewin SR. Immunopathogenesis of hepatitis B virus infection[J]. Immunol Cell Biol, 2007, 85: 16-23
- 2 Slone SP, Martin AW, Wellhausen SR, et al. IL-4 production by CD8+ lymphomatoid papulosis, type C, attracts background eosinophils[J]. J Cutan Pathol. 2008, 35(Suppl 1): 38-45
- 3 Milich D R, Schödel F, Hughes JL, et al. The hepatitis B virus core and e antigens elicit different Th cell subsets: antigen structure can affect Th cell phenotype[J]. J Virol, 1997, 71(3): 2192-2201
- 4 Penna A, Del Prete G, Cavalli A, et al. Predominant T-helper 1 cytokine profile of hepatitis B virus nucleocapsid-specific T cells in acute self-limited hepatitis B[J]. Hepatology, 1997, 25(4): 1022-1027
- 5 熊仕秋, 王莉, 李明昌, 等. 无症状乙型肝炎病毒携带者外周血单个核细胞分泌细胞因子的研究[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(16): 1580-1583
- 6 Chang JJ, Lewin SR. Immunopathogenesis of hepatitis B virus infection[J]. Immunol Cell Biol, 2007, 85: 16-23

(收稿: 2009-12-11)

(修回: 2010-01-08)

渐进性咬合紊乱大鼠咬肌线粒体 Ca^{2+} 超载及超微结构变化的研究

张 婧 熊利峰 刘晓东 于世宾 付玉婷 王美青

摘 要 目的 研究渐进性咬合紊乱对大鼠咬肌线粒体 Ca^{2+} 含量及超微结构的影响。**方法** 8 周龄雌性 SD 大鼠 50 只, 实

基金项目: 国家自然科学基金资助(30540130469, 30872870)

作者单位: 710032 西安, 第四军医大学口腔医学院口腔解剖生理学教研室及颞下颌关节病科(张婧、刘晓东、于世宾、付玉婷、王美青); 441021 襄樊, 解放军 477 医院口腔科(熊利峰)

通讯作者: 王美青, 电子信箱: mqwang@fmmu.edu.cn