

# 乙型肝炎患者外周血单个核细胞分泌 IFN- $\gamma$ 的实验研究

徐新前, 段永强, 何昭新, 吴继权

徐新前, 段永强, 何昭新, 吴继权, 黄石市第一医院内科  
湖北省黄石市 435001  
项目负责人: 徐新前, 435001, 湖北省黄石市西塞山区医院街 293 号, 黄石市第一医院内科  
收稿日期: 2004-05-27 接受日期: 2004-07-22

## 摘要

目的: 探讨外周血单个核细胞(PBMC)分泌 $\gamma$ 干扰素(IFN- $\gamma$ )水平在慢性乙型肝炎发生、发展中的意义。

方法: 采用ELISA法测定20名正常人和44例HBV感染者的PBMC经植物血凝素(PHA)刺激前后IFN- $\gamma$ 在上清液中的表达水平。

结果: 正常及患者组PBMC上清液中IFN- $\gamma$ 有低水平的活性表达; 经PHA刺激后其活性明显升高(对照组 $23.7 \pm 12.7$ 升高至 $117.2 \pm 64.7$  pg/mL,  $n=20$ ,  $t=10.41$ ,  $P<0.01$ ; 轻度组 $24.6 \pm 9.3$ 升高至 $57.4 \pm 27.1$  pg/mL,  $n=21$ ,  $t=4.92$ ,  $P<0.01$ ; 中度组 $30.1 \pm 15.5$ 升高至 $81.6 \pm 42.2$  pg/mL,  $n=15$ ,  $t=4.45$ ,  $P<0.01$ ; 重度组 $35.6 \pm 17.9$ 升高至 $114.5 \pm 49.3$  pg/mL,  $n=8$ ,  $t=4.26$ ,  $P<0.01$ ), 但患者组IFN- $\gamma$ 水平显著低于正常对照组( $177.2 \pm 64.7$  vs  $57.4 \pm 29.1$ 、 $81.6 \pm 42.2$ 、 $114.5 \pm 49.3$  pg/mL,  $t$ 值分别为7.50、5.28和2.77,  $P<0.01$ ); 患者组IFN- $\gamma$ 与血清HBV-DNA水平呈明显负相关( $r=-0.49$ ,  $P<0.01$ )。

结论: 乙型肝炎慢性化以及高复制状态可能与PBMC分泌IFN- $\gamma$ 活性降低有关。

徐新前, 段永强, 何昭新, 吴继权. 乙型肝炎患者外周血单个核细胞分泌IFN- $\gamma$ 的实验研究. 世界华人消化杂志 2004;12(10):2459-2461  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2459.asp>

## 0 引言

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T细胞(Th2). Th1分泌 $\gamma$ -干扰素(IFN- $\gamma$ )为主并介导细胞免疫, 而Th2以分泌白介素4(IL-4)等细胞因子并介导体液免疫. IL-18能够刺激Th1细胞产生IFN- $\gamma$ <sup>[1]</sup>, 促进Th1增生及Fas介导的NK细胞的细胞毒作用<sup>[2]</sup>. 检测IFN- $\gamma$ 活性水平, 可以反映Th1细胞和细胞因子IL-18的功能以及抗病毒作用<sup>[3]</sup>. 为研究IFN- $\gamma$ 在慢性乙型肝炎发生、发展中的意义, 我们检测外周血单个核细胞(PBMC)分泌IFN- $\gamma$ 的水平及其诱生活性。

## 1 材料和方法

1.1 材料 正常对照组20例, 年龄20-51岁, HBV-M阴性. 慢性乙型肝炎患者44例(诊断符合1995年第五次全国传染病寄生虫病学术会议制定的诊断标准), 年

龄20-55岁, 其中轻度组21例, 中度组15例, 重度组8例. HBsAg、HBeAg和抗-HBc阳性, HbsAg、抗-HBe和抗-HBc阳性, HBsAg和抗-HBc阳性. ALT为40-800 U/L. 实验仪器有西安二六二厂的FJ-2021型 $\gamma$ -计数器, 上海精密仪器公司的722s型分光光度器, 北京普朗公司的DNM-9602型酶标仪, 珠海黑马公司的Hema 800型扩增仪, 法国ABX Micros型全自动血球分析仪等。

1.2 方法 无菌采取静脉血10 mL, 其中4 mL分离血清, 6 mL肝素抗凝. 抗凝血用淋巴细胞分离液(上海试剂二厂产品)常规分离PBMC, PBMC用pH7.4 PBS洗涤细胞2次, 细胞计数后用于实验. 加入2 mL RPMI 1640培养液, 加入约2 mL PBS调整细胞密度为 $10^6/L$ . 一组为PBMC悬液; 另一组为PBMC+植物血凝素(PHA, 上海伊华医学科技公司产品), PHA终浓度30  $\mu g/mL$ . 两组置于37  $^{\circ}C$ , 50 ml/L CO<sub>2</sub>恒温箱培养48 h, 离心后取上清液置于-20  $^{\circ}C$ 备用. 用双抗体夹心ELISA法测定IFN- $\gamma$ (试剂为上海森雄公司进口分装产品), 严格按说明书操作. 血清用PCR-ELISA技术定量检测乙型肝炎病毒脱氧核糖核酸(HBV-DNA), 试剂为广州蓝星公司产品. 数据以mean $\pm$ SD表示, 采用配对 $t$ 检验。

## 2 结果

正常及患者组PBMC上清液中IFN- $\gamma$ 有低水平的活性表达, 经PHA刺激后其活性明显升高( $P<0.01$ ); 正常及患者组PBMC经PHA刺激后, 患者组IFN- $\gamma$ 水平显著低于正常对照组( $P<0.01$ , 表1). 慢性乙型肝炎患者组PBMC经PHA刺激后, IFN- $\gamma$ 表达水平与血清HBV-DNA水平呈明显负相关( $r=-0.49$ ,  $P<0.01$ ).

表1 慢性乙型肝炎患者PBMC分泌和IFN- $\gamma$ 活性

分组	<i>n</i>	PBMC	PBMC+PHA
对照组	20	$23.7 \pm 12.7$	$177.2 \pm 64.7^b$
轻度组	21	$24.6 \pm 9.3$	$57.4 \pm 29.1^{bd}$
中度组	15	$30.1 \pm 15.5$	$81.6 \pm 42.2^{bd}$
重度组	8	$35.6 \pm 17.9$	$114.5 \pm 49.3^{bd}$

<sup>b</sup> $P<0.01$  vs PBMC组比较; <sup>d</sup> $P<0.01$  vs 对照组比较。

## 3 讨论

ELISA法检测IFN- $\gamma$ 简单、实用、快捷、灵敏. PHA激活PBMC成功获得IFN- $\gamma$ 的活性表达. 实验的关键是分离PBMC和选择刺激物的浓度. 用淋巴细胞分离液所获的PBMC, 但以淋巴细胞为主, 有T淋巴细胞、B

淋巴细胞、单核细胞、K细胞和NK细胞等。

免疫功能紊乱是慢性乙型肝炎的主要发病机制,其主要表现有CD<sub>4</sub>细胞减少,CD<sub>8</sub>细胞增高,CD<sub>4</sub>/CD<sub>8</sub>比值降低;Th<sub>1</sub>和Th<sub>2</sub>免疫应答失衡;淋巴细胞凋亡增加等。由于免疫功能受损,使乙型肝炎患者不能清除HBV易成为慢性感染。Th<sub>1</sub>细胞分泌的IFN- $\gamma$ 能在转录后水平抑制肝炎病毒,又能通过免疫调节来增强机体防御能力<sup>[4]</sup>。Xing *et al*<sup>[5]</sup>应用ELISA和RT-PCR方法研究Th<sub>1</sub>和Th<sub>2</sub>表达与IFN- $\gamma$ 治疗作用之间关系时,发现乙肝患者PBMC上清液中的IFN- $\gamma$ 水平比正常人稍低,而在应用IFN- $\gamma$ 治疗后,IFN- $\gamma$ 水平稍升高,与治疗前相比,IFN- $\gamma$ 水平在治疗24 wk后明显升高。因此,Th<sub>2</sub>细胞因子表达在慢性乙肝患者中占优势,IFN- $\gamma$ 能够调节Th<sub>1</sub>和Th<sub>2</sub>之间的平衡,因而与临床效应有关,而Th<sub>1</sub>和Th<sub>2</sub>水平可能是预测干扰素治疗期间临床反应的重要因素。Th<sub>1</sub>细胞分泌IFN- $\gamma$ 的功能,是通过IL-18, IL-12等的调节,促进Th<sub>1</sub>细胞应答,维持Th<sub>1</sub>, Th<sub>2</sub>细胞平衡,促进IFN- $\gamma$ 的表达与合成。否则导致Th<sub>2</sub>细胞占优势而抑制细胞免疫,并导致HBV的持续感染<sup>[6]</sup>。Jiang *et al*<sup>[7]</sup>也发现Th<sub>1</sub>细胞不仅随着肝炎活动性增强而显著升高,而且在慢性乙肝活动期也明显升高。因此,Th<sub>1</sub>细胞就与慢性乙肝的肝炎活动性呈正相关,而Th<sub>2</sub>细胞则与乙肝病毒感染慢性化有关。

HBV感染的清除需要活性T辅助细胞和T淋巴细胞反应的参与。Manigold *et al*<sup>[8]</sup>应用ELISA和RT-PCR方法测定急性和慢性乙型肝炎及健康人PBMC中HbcAg介导的IL-18产物的调节时,发现血清IFN- $\gamma$ 水平与慢性乙型肝炎患者病毒血症呈反相关。

树突细胞是最有效的抗原传递细胞,而在诱发抗病毒免疫反应中起重要作用。Beckebaum *et al*<sup>[9]</sup>应用体外繁殖和用HBV颗粒接种方法,探讨Mo-DC功能障碍机制时,发现HBV感染会遭致T辅助细胞I型反应减少,同时,由T细胞产生的IFN- $\gamma$ 水平亦明显降低,因此引起乙肝病毒逃避免疫治疗,从而导致乙型肝炎出现慢性化。自体树突细胞刺激能力不足可能是T细胞能力降低的原因,也因此导致乙型肝炎病毒感染患者慢性化。Lohr *et al*<sup>[10]</sup>的研究也发现,T细胞刺激能力不足会导致慢性乙型肝炎患者抗病毒免疫能力减弱,而IL-12免疫刺激可保存HBV抗原物异性T细胞反应,在对克服HBV慢性化的治疗上有益。

Hodgson *et al*<sup>[11]</sup>研究发现急性病毒性肝炎恢复后的患者,其IFN- $\gamma$ 水平可能会升高,而且,肝脏中这样的IFN- $\gamma$ 水平升高可能会持续多年,因此,他们认为抗病毒因子,特别是IFN- $\gamma$ 可能在肝脏中的潜伏性肝DNA病毒的长期控制治疗上起着重要作用。

HBV慢性化会导致潜在的破坏性极大的严重后果,而且,这种慢性化乙肝治疗起来难度极大。但应用干扰素,特别是IFN- $\gamma$ 治疗可能会有所效果。但是,为了保持肝脏中干扰素水平达到治疗效果,又常会引起严重

的不良反应,而应用基因治疗则可能会解决此问题。Matskevich *et al*<sup>[12]</sup>通过基因转染方法,将HBV全部基因组转染至肝细胞模拟成HBV感染时,发现IFN表达被激活,同时分泌和产生IFNs,从而保护肝细胞免受HBV的感染。而且,他还能保护周围未受转染的肝细胞免受HBV的感染。因此,应用基因载体表达的IFN治疗慢性乙型肝炎,可能是预防乙型肝炎慢性化的一个非常有吸引力的治疗选择。

由于IL-12可通过T细胞和NK细胞诱发产生并激活IFN- $\gamma$ 在抗肿瘤免疫反应中起重要作用,因此,Imanishi *et al*<sup>[13]</sup>在研究肝细胞癌、肝硬化、慢性肝炎及健康人PBMC中由IL-12诱发产生的IFN- $\gamma$ 水平活性时,发现肝细胞癌患者IFN- $\gamma$ 水平活性明显低于肝癌的癌前病变-肝硬化患者以及慢性肝炎患者的IFN- $\gamma$ 水平。因此,他们认为测定IFN- $\gamma$ 水平有利于从免疫学角度上评价慢性肝脏疾病的严重性。Watson *et al*<sup>[14]</sup>也发现丙型肝炎患者PBMC中IFN- $\gamma$ 水平活性是其疾病严重性的一个有效判别因子。因此,研究HBV感染者IFN- $\gamma$ 的诱生活性,有助于了解机体的免疫状态,对治疗有一定的指导意义。我们所用的PHA终浓度能激活PBMC分泌IFN- $\gamma$ 到一个较高水平。而且,我们观察到正常人和慢性乙型肝炎患者PBMC均有低水平的IFN- $\gamma$ 活性表达,被PHA激活后IFN- $\gamma$ 的表达水平显著升高,但慢性乙型肝炎患者的IFN- $\gamma$ 水平显著低于对照组。轻度患者的IFN- $\gamma$ 表达水平最低,这类患者临床症状较轻,肝功能损害不明显,对HBV感染呈现免疫耐受,可能与HBV的持续感染有关。重度患者的IFN- $\gamma$ 表达水平最高,这类患者临床症状较重,肝功能损害明显,对HBV感染有强烈的免疫反应,可能与HBV的免疫清除有关<sup>[3,15]</sup>。

总之,IFN- $\gamma$ 的活性水平降低可能是乙型肝炎慢性化的机制之一,了解IFN- $\gamma$ 在慢性乙型肝炎病毒感染不同阶段的水平变化有助于了解和观察病情演变及预后,评价慢性肝脏疾病的严重性,并为进一步探讨IFN- $\gamma$ 的抗病毒作用及研究开发慢性乙型肝炎的基因治疗等新的途径和方法提供重要的理论依据。

#### 4 参考文献

- 1 孙颖, 陈焕永, 王菲, 张新, 姜宏齐, 邵凤娟, 朱思和. 白细胞介素-18对慢性乙型肝炎患者外周血单个核细胞的作用及意义. 中华肝脏病杂志 2003;11:470-473
- 2 Tominaga K, Yoshimoto T, Torigoe K, Kurimoto M, Matsui K, Hada T, Okamura H, Nakanishi K. IL-12 synergizes with IL-18 of IL-1 $\beta$  for IFN-gamma production from human T cells. *Int Immunol* 2000;12:151-160
- 3 Duan YQ, He SX, Xu XQ, Yu H, Wang ZB, Wu JQ, Mei YQ, He HR, Chen Q. The expression level of IL-18 in PBMC of HBV infectors and its significance. *Asian J Nucl Med* 2003;3: 78-81
- 4 Tsuji H, Mukaida N, Harada A, Kaneko S, Matsushita E, Nakanuma Y, Tsutsui H, Okamura H, Nakanishi K, Tagawa Y, Iwakura Y, Kobayashi K, Matsushima K. Alleviation of lipopolysaccharide induced acute liver injury in propionibacterium acnes-primed IFN-gamma-deficient mice by a concomitant reduction of TNF-alpha, IL-12, and IL-18 production. *J Immunol* 1999;162:1049-1055

- 5 Xing T, Zhang L, Lu Q, Hou J, Feng X, Luo K. Th1/Th2 type cytokines in hepatitis B patients treated with interferon-alpha. *Chin Med J (Engl)* 2001;114:921-924
- 6 文维群, 张广亮, 戴琳. 肝炎患者外周血单个核细胞 IL-18 mRNA 和蛋白水平与 HBV 感染的关系. *上海免疫学杂志* 2002;22:417-420
- 7 Jiang R, Feng X, Guo Y, Lu Q, Hou J, Luo K, Fu N. T helper cells in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Chin Med J (Engl)* 2002;115:422-424
- 8 Manigold T, Bocker U, Chen J, Gundt J, Traber P, Singer MV, Rossol S. Hepatitis B core antigen is a potent inducer of interleukin-18 in peripheral blood mononuclear cells of healthy controls and patients with hepatitis B infection. *J Med Virol* 2003;71:31-40
- 9 Beckebaum S, Cicinnati VR, Zhang X, Ferencik S, Frilling A, Grosse-Wilde H, Broelsch CE, Gerken G. Hepatitis B virus-induced defect of monocyte-derived dendritic cells leads to impaired T helper type 1 response in vitro: mechanisms for viral immune escape. *Immunology* 2003;109:487-495
- 10 Lohr HF, Pingel S, Bocher WO, Bernhard H, Herzog-Hauff S, Rose-John S, Galle PR. Reduced virus specific T helper cell induction by autologous dendritic cells patients with chronic hepatitis B—restoration by exogenous interleukin-12. *Clin Exp Immunol* 2002;130:107-114
- 11 Hodgson PD, Michalak TI. Augmented hepatic interferon gamma expression and T-cell influx characterize acute hepatitis progressing to recovery and residual lifelong virus persistence in experimental adult woodchuck hepatitis virus infection. *Hepatology* 2001;34:1049-1059
- 12 Matskevich AA, Cordelier P, Strayer DS. Conditional expression of IFN-alpha and IFN-gamma activated by HBV as genetic therapy for hepatitis B. *J Interferon Cytokine Res* 2003;23:709-721
- 13 Imanishi H, Cheng J, Ikeda N, Saito M, Ohno M, Hara N, Shimomura S, Yamamoto T, Amuro Y, Fujiwara H, Hada T. Evaluation of interleukin-12-induced interferon- $\gamma$  production in vitro by peripheral blood mononuclear cells in patients with chronic liver disease. *Hepatogastroenterology* 2003;50:1502-1505
- 14 Watson MW, Jaksic A, Price P, Cheng W, McInerney M, French MA, Fisher S, Lee S, Flexman JP. Interferon-gamma response by peripheral blood mononuclear cells to hepatitis C virus core antigen is reduced in patients with liver fibrosis. *J Infect Dis* 2003;188:1533-1536
- 15 于乐成, 顾长海. 介导肝脏损害的细胞因子白细胞介素 18. *中华肝脏病杂志* 2001;9:379-380

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

## 野生型 P53 基因对肝癌组织端粒酶活性及 bcl-2 表达的影响

曲波, 潘海乐, 吕志武, 关景明

曲波, 吕志武, 关景明, 哈尔滨医科大学附属二院消化内科 黑龙江省哈尔滨市 150086

潘海乐, 哈尔滨医科大学附属二院骨科 黑龙江省哈尔滨市 150086

项目负责人: 曲波, 150086, 黑龙江省哈尔滨市南岗区保健路 157 号, 哈尔滨医科大学附属二院消化内科.

收稿日期: 2004-04-15 接受日期: 2004-05-24

### 摘要

目的: 观察野生型 p53 基因对昆明鼠肝癌组织端粒酶活性及 bcl-2 表达的影响, 探讨 p53 基因的抑瘤机制.

方法:  $\delta$  5 周龄昆明鼠 30 只, 随机分类肝癌组(I)和 p53 基因治疗组(II). 每只鼠于后肢股部皮下接种 Hep-A-22 肝癌细胞悬液 0.2 mL, 建立动物模型. 接种后 24 h, II 组实验动物于荷瘤局部皮下注射介导野生型 p53 基因的复制缺陷型重组腺病毒液 0.2 mL, 14 d 后处死实验动物. PCR-ELISA 定量检测肝癌组织端粒酶活性, 免疫组化观察肝癌细胞中 Bcl-2 蛋白的表达情况.

结果: 腺病毒介导的野生型 p53 基因能够显著抑制肝癌的生长(肿瘤直径  $23.32 \pm 1.45$  cm vs  $5.13 \pm 0.37$  cm,  $P < 0.001$ ), 明显降低端粒酶的活性表达(A 值  $2.46 \pm 0.35$  vs  $0.78 \pm 0.06$ ,  $P < 0.01$ ), 下调 Bcl-2 基因蛋白的生成(表达阳性率 67.8% vs 25.9%,  $P < 0.05$ ).

结论: 野生型 p53 基因从抑制肝癌细胞增生, 促进肿瘤细胞凋亡两个方面发挥抑癌功能.

曲波, 潘海乐, 吕志武, 关景明. 野生型 P53 基因对肝癌组织端粒酶活性及 bcl-2 表达的影响. *世界华人消化杂志* 2004;12(10):2461-2463

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2461.asp>

### 0 引言

肿瘤细胞的无限增生与细胞端粒酶激活有关, 是正常细胞转变为恶性细胞的初始信号, 是恶性肿瘤发生发展的重要机制. p53 是研究最为广泛和深入的肿瘤抑制基因之一, 他在多种肿瘤中的高突变率是人们认识到其用于肿瘤基因治疗的潜在价值.

### 1 材料和方法

1.1 材料 含野生型 p53 基因的复制缺陷型重组腺病毒, 由尹新华博士惠赠. 病毒滴度为  $8.2 \times 10^{13}$  pfu/L. TRAP-PCR-ELISA 端粒酶检测试剂盒和 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒, 购自宝灵曼公司. Bcl-2mAb 购自博士公司. 鼠 Hep-A-22 肝癌细胞株, 由黑龙江省肿瘤研究所提供. 昆明鼠,  $\delta$ , 体质量 28-30 g, 购自黑龙江省肿瘤研究所.

1.2 方法 复苏 Hep-A-22 肝癌细胞株, 接种到小鼠腹腔中, 2 wk 后取腹水, 离心, 用 RPMI1640 营养液调细胞密度为  $1 \times 10^{10}$ /mL, 每只鼠于后肢股部皮下接种 0.2 mL 细胞悬液, 7d 后长出实体瘤. 小鼠随机分为 2 组, 肝癌组(I)和 p53 基因治疗组(II), 每组 15 只. 带 p53 基