

亚硒酸钠作用的树突状细胞体外抗乙型肝炎病毒效应

陈显兵, 管小琴, 肖明

背景资料
抗乙型肝炎病毒的体外实验开展得很多, 但大多是观察药物直接对细胞或对病毒的作用。而大量研究发现机体免疫功能低下是造成HBV感染及慢性化的原因之一。HBV感染及慢性化与DC的关系已成为目前研究的热点, 现已证实DC是免疫激活途径中最重要的抗原呈递细胞, 是免疫应答启动的一个重要环节, 而且DC在免疫应答的发展和终止中也发挥决定性作用。因此改善DC功能状态在治疗乙肝方面具有广阔前景。

陈显兵, 重庆医科大学病理教研室(现在湖北民族学院工作) 重庆市 400016
管小琴, 肖明, 重庆医科大学病理教研室 重庆市 400016
通讯作者: 管小琴, 400016, 重庆市, 重庆医科大学病理学教研室. guanxiaojin2003@yahoo.com.cn
电话: 023-68485789
收稿日期: 2007-03-12 修回日期: 2007-08-24

Cytotoxic-T-lymphocyte-mediated anti-HBV effects of dendritic cells sensitized by sodium selenite *in vitro*

Xian-Bing Chen, Xiao-Qin Guan, Ming Xiao

Xian-Bing Chen, Department of Pathology, Chongqing University of Medical Science, Chongqing 400016, China
Xiao-Qin Guan, Ming Xiao, Department of Pathology, Chongqing University of Medical Science, Chongqing 400016, China
Correspondence to: Xiao-Qin Guan, Department of Pathology, Chongqing University of Medical Science, Chongqing 400016, China. guanxiaojin2003@yahoo.com.cn
Received: 2007-03-12 Revised: 2007-08-24

Abstract

AIM: To investigate the cytotoxic-T-lymphocyte (CTL)-mediated anti-HBV effects of dendritic cells (DCs) from patients with HBV sensitized by sodium selenite *in vitro*.

METHODS: DCs isolated from peripheral blood mononuclear cells of HBV patients were cultured and proliferated *in vitro*. They were divided into the sodium-selenite-stimulated group and the HBV group. DCs were stimulated with pure sodium selenite before maturation and then co-cultured with autolymphocytes after DC maturation. Lymphocytes were harvested 3 d later and added to the supernatant of 2.2.15 cell cultures. Supernatants were collected at 24, 48 and 72 h. ELISA was used to detect hepatitis B e antigen (HBeAg) and hepatitis B surface antigen (HBsAg), and to measure the concentration of interferon (IFN)- γ in the culture supernatants.

RESULTS: Proliferation, cytotoxicity and IFN- γ concentration of autolymphocytes were markedly enhanced in the sodium-selenite-stimulated

DCs and control groups compared with the HBV group (34.22 ± 3.17 ng/L and 38.39 ± 2.43 ng/L vs 21.47 ± 2.24 ng/L, $P < 0.05$). Compared with the liver group, CTLs activated in the sodium selenite and control groups had specific inhibitory effects on the expression of HBeAg in 2.2.15 cell supernatants ($25.90\% \pm 1.85\%$ and $23.03\% \pm 1.51\%$ vs $18.05\% \pm 3.64\%$; $37.26\% \pm 5.11\%$ and $36.88\% \pm 5.92\%$ vs $29.52\% \pm 2.63\%$; $38.76\% \pm 4.00\%$ and $40.76\% \pm 5.04\%$ vs $35.59\% \pm 3.09\%$; $P < 0.05$).

CONCLUSION: Human DCs sensitized by sodium selenite *in vitro* appear to efficiently enhance cytotoxicity and increase the level of IFN- γ , and effectively inhibit the expression of HBeAg in 2.2.15 cell supernatant. This may indicate a new route for therapy against chronic hepatitis B.

Key Words: Chronic Hepatitis B; Dendritic cells; Sodium selenite; Antivirus effects

Chen XB, Guan XQ, Xiao M. Cytotoxic-T-lymphocyte-mediated anti-HBV effects of dendritic cells sensitized by sodium selenite *in vitro*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(25): 2730-2733

摘要

目的: 探讨亚硒酸钠作用的树突状细胞(DCs)体外诱导自体淋巴细胞特异性抗乙型肝炎病毒的效应。

方法: 从乙型肝炎患者外周单个核细胞(PBMC)中诱导DCs, 在DCs成熟前加入营养浓度的亚硒酸钠作用, 将成熟后的DCs与自身淋巴细胞体外共培养, 3 d后收集淋巴细胞, 分组(乙肝组, 加硒组)加入2.2.15细胞培养液中, 分别收集24, 48和72 h的培养上清, 检测其表面抗原(HBsAg)和e抗原的分泌以及其与淋巴细胞共培养产生IFN- γ 的含量。

结果: 经亚硒酸钠作用后的DCs组和正常对照组的DCs与自身淋巴细胞共培养产生IFN- γ 的浓度, 以及在24, 48和72 h对2.2.15细胞培养上清中HBeAg分泌的抑制效应明显高于乙肝组(34.22 ± 3.17 ng/L, 38.39 ± 2.43 ng/L vs 21.47

± 2.24 ng/L; $25.90\% \pm 1.85\%$, $23.03\% \pm 1.51\%$ vs $18.05\% \pm 3.64\%$; $37.26\% \pm 5.11\%$, $36.88\% \pm 5.92\%$ vs $29.52\% \pm 2.63\%$; $38.76\% \pm 4.00\%$, $40.76\% \pm 5.04\%$ vs $35.59\% \pm 3.09\%$, $P < 0.05$).

结论: 体外经亚硒酸钠作用后的乙肝患者的DC功能可在一定程度上恢复, 增强自身淋巴细胞毒性作用并可提高产生IFN- γ 的含量, 可有效的起到抗乙肝病毒的效应, 为以后基于DC的慢性乙型肝炎的免疫治疗提供新思路.

关键词: 慢性乙型肝炎; 树突状细胞; 亚硒酸钠; 抗病毒作用

陈显兵, 管小琴, 肖明. 亚硒酸钠作用的树突状细胞体外抗乙型肝炎病毒效应. 世界华人消化杂志 2007;15(25):2730-2733
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2730.asp>

0 引言

树突状细胞(dendritic cell, DC)是免疫激活途径中最重要的抗原呈递细胞, 广泛分布于淋巴组织和非淋巴组织, 是免疫应答启动的一个重要环节, 而且DC在免疫应答的发展和终止中也发挥决定性作用. HBV感染慢性化与DC的关系已成为目前研究的热点. 本研究采用营养浓度的亚硒酸钠体外作用于慢性HBV感染者外周DC后, 初步探讨经亚硒酸钠作用后的DCs诱导自身淋巴细胞产生的抗病毒效应及其产生IFN- γ 的情况.

1 材料和方法

1.1 材料 本院附属医院就诊慢性乙型肝炎患者10例, 年龄23-49(平均37.6)岁, 男女各5例. 慢性乙型肝炎诊断符合2000年西安中华医学会传染病与寄生虫病学会、肝病学分会联合修订标准^[1], 排除HAV, HCV, HDV, HEV等病毒及其他原因(药物、酒精、中毒)造成的急慢性肝损伤. 健康自愿者8例, 年龄18-43(平均31.7)岁, 男女各4例. 研究对象均无心脑血管等疾病, 及其他器官合并症. 所有患者及健康志愿者血液采集均经本人知情同意. 2.2.15细胞株(为HepG₂肝癌细胞转染HBV后能稳定表达HBsAg, HBeAg和HBV DNA的细胞), 由重庆医科大学病毒性肝炎研究所提供. 人重组粒细胞-单核细胞刺激集落因子(rhGM-CSF)、人重组白细胞介素4(rhIL-4)、干扰素 α (IFN- α)、无血清培养基AIM-V购自美国Gibco公司, 淋巴细胞分离液(1.077×10^3 g/L)购自天津TBD公司. IFN- γ ELISA试剂盒购自晶美公

司. HBVsAg, HBVeAg ELISA检测试剂盒为河南理利生物工程有限公司产品, 亚硒酸钠购自北京中联试剂公司AR级试剂.

1.2 方法 把乙肝患者外周血来源的DC分成2份, 一份直接培养诱导为乙肝组; 另一份加入亚硒酸钠共培养为加硒组, 健康人外周血DC为对照组. 从外周血单核细胞中分离培养DC, 具体方法参照Romani *et al*^[2]方法.

1.2.1 亚硒酸钠浓度的确定 取诱导成熟的DC细胞制成 5×10^7 /L细胞悬液, 接种于96孔培养板内, 每孔200 μ L, 设3个复孔, 24 h后加入不同浓度的亚硒酸钠, 使其终浓度为0.05, 0.1, 0.3, 0.5, 1, 1.5, 2 mmol/L, 分别在加药后24, 48 h后, 采用MTT法检测各组细胞的光吸光度值, 具体方法如下: 在预定结束前4 h, 每个不同浓度组和对照组中加入20 μ L MTT(5 g/L), 继续培养4 h, 离心后吸去全部上清, 每孔加200 μ L二甲亚砜(DMSO), 摇匀振荡, 使结晶充分溶解, 在酶联免疫检测仪570 nm波长下测吸光度值(A值). 根据A值来确定亚硒酸钠对DC细胞适宜浓度范围, 选取中值浓度进行实验.

1.2.2 淋巴细胞与2.2.15细胞共培养 2.2.15细胞长满培养瓶后, 加入2.5 g/L胰酶, 37 $^{\circ}$ C消化, 加培养液吹打, 加入细胞计数板计数, 配制成 2×10^8 个细胞/L后接种于24孔细胞培养板, 每孔1 mL, 37 $^{\circ}$ C, 50 mL/L CO₂培养.

收集各组经IFN- α 刺激成熟的DC, AIM-V悬浮, 丝裂霉素25 mg/L处理45 min, Hank's洗4遍, 调整浓度为 2×10^8 /L, 5×10^3 /孔加入效应细胞孔中, 与自身淋巴细胞按1:20比例, 每孔 1×10^5 个细胞, 加入24孔板中, 37 $^{\circ}$ C, 50 mL/L CO₂培养3 d. 阴性孔不加DC, 用同一个体相同数量的淋巴细胞代替. 每组设3个复孔, 培养3 d, 收集上清, -70 $^{\circ}$ C冰箱中保存备用.

将上述经DC激活的自身淋巴细胞以1:20比例与接种于24孔板中呈对数生长期的2.2.15细胞(靶细胞, 每孔 2×10^5)共同培养, 同时分别设自身未经DC细胞激活的淋巴细胞为对照, 每组3个复孔, 倒置显微镜下观察. 分别于培养24, 48, 72 h收集2.2.15细胞培养上清液, -70 $^{\circ}$ C冰箱中保存备用.

1.2.3 上清中IFN- γ , HBsAg和HBeAg的测定 操作按试剂盒说明书进行. 抑制率 = 对照孔HBsAg(或HBeAg)效价-试验孔HBsAg(或HBeAg)效价/对照孔HBsAg(或HBeAg)效价. IFN- γ 检测采用IFN- γ ELISA试剂盒检测, 严格按

创新盘点
亚硒酸钠是微量元素, 在抗氧化损伤、抗衰老、提高机体免疫力方面具有作用. 但对DC功能的影响报道较少.

应用要点
为以后基于DC的乙肝免疫治疗提供理论依据;为微量元素硒的运用和开发利用提供了基础;将为DC治疗性疫苗的体内研究打下基础。

表 1 DC刺激自身淋巴细胞后分泌IFN- γ 的水平和对2.2.15细胞HBsAg、HBeAg抑制作用

分组	n	IFN- γ (ng/L)	HBsAg抑制率(%)			HBeAg抑制率(%)		
			24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
乙肝	10	21.47 \pm 2.24	12.27 \pm 1.13	12.58 \pm 0.74	13.87 \pm 1.10	18.05 \pm 3.64	29.52 \pm 2.63	35.59 \pm 3.09
加硒	10	34.22 \pm 3.17 ^a	12.70 \pm 2.61	13.64 \pm 0.87	16.12 \pm 1.29 ^a	25.90 \pm 1.85 ^a	37.26 \pm 5.11 ^a	38.76 \pm 4.00
对照	8	38.39 \pm 2.43	11.54 \pm 0.86	13.17 \pm 1.30	18.30 \pm 1.60 ^a	23.03 \pm 1.51 ^a	36.88 \pm 5.92 ^a	40.76 \pm 5.04 ^a

^a $P < 0.05$ vs 乙肝组.

照说明书操作, 酶标仪读数, 作标准曲线, 确定含量.

统计学处理 用SAS9.0程序进行方差分析, 结果以均数 \pm 标准差(mean \pm SD)表示, $P < 0.05$ 表示差异显著.

2 结果

2.1 亚硒酸钠浓度 亚硒酸钠在0.1-0.5 mmol/L浓度范围内作用DC 24, 48 h后A值的变化较小, 当浓度高于0.5 mmol/L时A值显著降低, 取中值浓度(0.3 mmol/L)进行实验.

2.2 DC刺激自身淋巴细胞后细胞因子IFN- γ 的检测 经亚硒酸钠作用后的DCs组和正常对照组的DCs与自身淋巴细胞共培养产生IFN- γ 的浓度明显高于乙肝组($P < 0.05$, 表1).

2.3 DC激活的淋巴细胞与2.2.15细胞培养时上清中HBsAg, HBeAg的分泌情况 试验发现乙肝组DC激活的淋巴细胞, 对2.2.15细胞培养上清中HBeAg分泌的抑制效应比加硒组和对照组明显减弱($P < 0.05$), 且随着培养时间的延长抑制作用越强. 但3组中对HBsAg的抑制作用不明显, 仅在培养72 h加硒组和对照组对其抑制率比乙肝组高, $P < 0.05$ (表1).

3 讨论

DCs是体内功能最强大的抗原呈递细胞, 就有激活MHC相同的自身反应性T细胞和激活MHC不同的同种反应性T细胞双重作用, 在人体抗病毒的免疫应答过程中, 成熟的DC表达高水平的MHC-抗原复合物、共刺激分子和分泌多种细胞因子, 并作为机体免疫应答的始动子和调节子, 成为抗病毒免疫应答的中心环节^[3-4]. 我们前期研究发现慢性HBV感染者外周血DC功能存在障碍, 表现在分泌的细胞因子IL-12减少, 刺激淋巴细胞增殖的能力下降, 同时还发现细胞内乙肝患者DC功能缺陷可能与HBV感染DC后产生的氧自由基损伤和GSH-Px过度消耗有关. 体

外经亚硒酸钠作用后的乙肝患者的DC可有效的刺激淋巴细胞增殖反应, 并可提高IL-12分泌水平, 保持膜流动性, 增强对自由基损伤的抵抗能力, 提示可在一定程度上恢复DC的功能^[5].

目前针对乙肝病毒的体外实验开展得很多^[6], 大多是观察药物直接对细胞和病毒的作用. 肝癌细胞系2.2.15可以稳定地分泌HBsAg, HBcAg和HBeAg及HBV DNA. 实验中我们用乙肝组、加硒组和对照组的DC刺激自身的淋巴细胞, 再与2.2.15细胞共培养, 观察其对肝癌细胞株2.2.15培养上清中HBsAg和HBeAg表达影响. 本实验结果显示, 各组淋巴细胞与2.2.15细胞培养时, 对抗原的分泌没有影响. 经DC激活的淋巴细胞中, 乙肝组对抗原的抑制率比对照组显著要低($P < 0.05$), 加硒组对HBeAg的抑制作用与乙肝组比较明显升高($P < 0.05$). 研究认为HBeAg为可溶性蛋白, 可自感染细胞分泌至细胞外, 也可定位于感染细胞膜, 成为机体免疫应答杀伤和破坏的细胞靶抗原, HBeAg与HBV DNA在血液循环中的消长动态相符, 故通常认为检出HBeAg是体内有HBV复制的标志^[7]. 本试验结果提示慢性乙肝患者DC经亚硒酸钠作用后一定程度上恢复其功能, 能一定程度上恢复CTL等免疫活性细胞的功能, 从而抑制乙肝病毒HBeAg的分泌和病毒复制的作用. 但实验中对HBsAg抑制作用均不明显.

T细胞介导的免疫应答在抗肿瘤和抗病毒免疫中起主导作用, T细胞的致敏激活和扩增依赖于抗原提呈细胞(APC)提呈相应的抗原多肽和提供刺激信号, 分泌Th1型应答主导因子, 诱导机体生成抗原特异性CTL, 并通过细胞裂解机制、细胞凋亡机制和CTL活化时产生的细胞因子(TNF- α , IFN- γ 等)对病毒或肿瘤产生杀伤或抑制作用, 因此APC是启动机体产生抗肿瘤免疫和抗病毒免疫的中心环节. 同样, 乙肝病毒清除机制也是CTL细胞通过杀伤感染的肝细胞和释放

抗病毒的细胞因子来清除乙肝病毒^[8-9], 而CTL的激活依赖于APC提供的抗原肽复合物、共刺激分子及其释放的细胞因子如IL-12. 然而HBV慢性感染者体内的CTL反应是低下的. 有报道在包括HBV感染在内的各种不同病毒感染中, 存在抗原提呈功能的缺陷^[10]. 特别是DC功能的缺陷, 而且这种特异性的免疫调节和抗原提呈功能的缺陷往往预示着感染HBV后发展成慢性肝炎^[11]. 所以, 除母婴垂直传播引起的先天性免疫缺陷外, 抗原提呈细胞(主要是DC)功能缺陷或异常是HBV慢性感染者体内CTL反应低下的重要原因. 因此通过提高DC功能来提高CTL反应活性、打破免疫低下的方法很可能成为治愈慢性乙型肝炎的一种重要的治疗手段. 由于体内具有杀伤活性的T细胞应答不足以清除病毒, 而通过体外培养扩增患者的抗原提呈细胞, 并经体外功能修复后进一步刺激激活T细胞的活性, 可能有助于病毒的清除, 这将为DC治疗性疫苗的体内研究打下基础. 补充微量元素硒将有助于提高机体的免疫力和抗HBV感染具有一定作用.

4 参考文献

- 1 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案. 中华肝脏病杂志 2000; 8: 324-329
- 2 Romani N, Reider D, Heuer M, Ebner S, Kampgen E, Eibl B, Niederwieser D, Schuler G. Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. *J Immunol Methods* 1996; 196: 137-151
- 3 van den Broeke LT, Daschbach E, Thomas EK, Andringa G, Berzofsky JA. Dendritic cell-induced activation of adaptive and innate antitumor immunity. *J Immunol* 2003; 171: 5842-5852
- 4 Holtl L, Zelle-Rieser C, Gander H, Papesch C, Ramoner R, Bartsch G, Rogatsch H, Barsoum AL, Coggin JH Jr, Thurnher M. Immunotherapy of metastatic renal cell carcinoma with tumor lysate-pulsed autologous dendritic cells. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 3369-3376
- 5 陈显兵, 管小琴. 亚硒酸钠对慢性乙型肝炎患者外周血树突状细胞的作用及机制. 世界华人消化杂志 2007; 15: 528-532
- 6 Mancini-Bourgine M, Fontaine H, Scott-Algara D, Pol S, Brechot C, Michel ML. Induction or expansion of T-cell responses by a hepatitis B DNA vaccine administered to chronic HBV carriers. *Hepatology* 2004; 40: 874-882
- 7 梁英锐, 丁灏, 朱世能. 现代肝脏病理学. 天津: 天津科学技术出版社, 1998: 245-254
- 8 Nayersina R, Fowler P, Guilhot S, Missale G, Cerny A, Schlicht HJ, Vitiello A, Chesnut R, Person JL, Redeker AG, Chisari FV. HLA A2 restricted cytotoxic T lymphocyte responses to multiple hepatitis B surface antigen epitopes during hepatitis B virus infection. *J Immunol* 1993; 150: 4659-4671
- 9 Rehmann B, Fowler P, Sidney J, Person J, Redeker A, Brown M, Moss B, Sette A, Chisari FV. The cytotoxic T lymphocyte response to multiple hepatitis B virus polymerase epitopes during and after acute viral hepatitis. *J Exp Med* 1995; 181: 1047-1058
- 10 李用国. 树突细胞与抗HIV免疫. 国外医学流行病学传染病学分册 2000; 27: 244-246
- 11 Egea E, Iglesias A, Salazar M, Morimoto C, Kruskall MS, Awdeh Z, Schlossman SF, Alper CA, Yunis EJ. The cellular basis for lack of antibody response to hepatitis B vaccine in humans. *J Exp Med* 1991; 173: 531-538

同行评价
本文研究亚硒酸钠提高抗原提呈细胞功能的机制, 立题新颖, 设计合理, 方法成熟, 对临床研究有一定的参考意义和指导价值.

编辑 程剑侠 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

关于2006年度山西省期刊质量评估结果的通报

本刊讯 为推动期刊出版事业的繁荣和发展, 中共山西省委宣传部、山西省新闻出版局、山西省科学技术厅共同组织了2006年度期刊质量评估工作. 此次参评的为2005年度山西省出版的196种期刊, 其中, 社科期刊110种、科技期刊86种. 评估结果如下: 一级(优秀)期刊共88种, 其中社科期刊42种, 科技期刊46种, 包括世界胃肠病学杂志和世界华人消化杂志; 二级期刊共103种, 其中社科期刊64种, 科技期刊39种; 三级期刊共5种, 其中社科期刊4种, 科技期刊1种. (中共山西省委宣传部、山西省新闻出版局、山西省科学技术厅)