

CpG对HBV感染者B细胞及Th1型细胞因子的活化作用

刘勇, 吴超, 陈军浩, 陈广梅, 薛世贵, 严晓敏

刘勇, 陈军浩, 南京大学医学院附属鼓楼医院检验科科研部
江苏省南京市 210008
吴超, 陈广梅, 薛世贵, 严晓敏, 南京大学医学院附属鼓楼医院
感染科 江苏省南京市 210008
卫生部科研课题资助项目, No. WKJ-2006-2-9
南京市社会发展资助项目, No. 2005019-5
作者贡献分布: 刘勇与吴超对此文所作贡献均等; 此课题由刘勇, 吴超及陈军浩设计; 研究过程由刘勇, 陈广梅, 薛世贵及严晓敏操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由吴超提供; 数据分析由刘勇, 陈广梅及吴超完成; 本论文写作由刘勇及吴超完成。
通讯作者: 吴超, 210008, 江苏省南京市中山路321号, 南京大学医学院附属鼓楼医院感染科. wuchao@jlonline.com
电话: 025-83304616-10373
收稿日期: 2008-02-02 修回日期: 2008-03-29

Immunostimulatory effects of CpG-ODN 2216 on the activation of peripheral blood B lymphocytes and Th1-type cytokines from patients with hepatitis B virus infection

Yong Liu, Chao Wu, Jun-Hao Chen, Guang-Mei Chen, Shi-Gui Xue, Xiao-Min Yan

Yong Liu, Jun-Hao Chen, Department of Laboratory, the Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical College, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China
Chao Wu, Guang-Mei Chen, Shi-Gui Xue, Xiao-Min Yan, Department of Infectious Diseases, the Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical College, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China
Supported by: the Science Research Fund of Healthy Ministry, No. WKJ-2006-2-9, and the Social Development Foundation of Nanjing City, No. 2005019-5
Correspondence to: Dr. Chao Wu, Department of Infectious Diseases, the Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical College, 321 Zhongshan Road, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China. wuchao@jlonline.com
Received: 2008-02-02 Revised: 2008-03-29

Abstract

AIM: To determine the effects of immunostimulatory action of CpG-ODN 2216 on the activation of B lymphocytes and Th1-type cytokines derived from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of patients infected with hepatitis B virus (HBV).

METHODS: PBMCs from donors infected with HBV were cultured in the presence of CpG-ODN 2216 for 48 h; B lymphocytes were analyzed for CD19/CD86, CD19/CD80, major histocompat-

ibility complex (MHC) class II and class I using flow cytometry. The supernatant levels of interleukin-12 (IL-12) and interferon- γ (IFN- γ) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

RESULTS: CpG-ODN 2216 promoted a strong up-regulation of CD86, CD80, MHC-I and MHC-II on B lymphocytes in HBV-infected patients (CD80: $48.84\% \pm 21.29\%$ vs $28.57\% \pm 18.70\%$; CD86: $50.12\% \pm 19.70\%$ vs $13.15\% \pm 8.81\%$; MHC-I: 2108.88 ± 289.04 vs 1679.22 ± 388.22 ; MHC-II: 1602.77 ± 362.61 vs 941.88 ± 237.35 ; all $P < 0.05$). IL-12 and IFN- γ levels in the stimulated supernatant were increased significantly (IFN- γ : 61.38 ± 38.81 ng/L vs 47.35 ± 38.76 ng/L; IL-12: 7.80 ± 4.34 ng/L vs 5.56 ± 3.56 ng/L; both $P < 0.05$).

CONCLUSION: CpG-ODN 2216 up-regulates the expression of B lymphocyte antigen presenting and costimulatory molecules on the surface of B lymphocytes derived from HBV-infected patients, and promotes the capability of PBMCs in secreting Th1-type cytokines.

Key Words: CpG-ODN 2216; Antigen presenting cell; B lymphocyte; Enzyme-linked immunosorbent assay; Flow cytometry

Liu Y, Wu C, Chen JH, Chen GM, Xue SG, Yan XM. Immunostimulatory effects of CpG-ODN 2216 on the activation of peripheral blood B lymphocytes and Th1-type cytokines from patients with hepatitis B virus infection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(14): 1573-1576

摘要

目的: 观察CpG-ODN 2216对乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染者外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC)中B淋巴细胞抗原提呈相关分子CD80、CD86、MHC-I和MHC-II分子表达的影响, 同时观察CpG对Th1型细胞因子分泌的影响。

方法: 取HBV感染者PBMC与CpG-ODN 2216共培养48 h, 用流式细胞技术检测B淋巴细胞表面CD80、CD86、MHC-I和MHC-II分子

■背景资料

HBV慢性感染者存在着针对HBV的免疫耐受, 表现为特异性免疫细胞免疫低下及Th1及Th2的比例失衡。回顾性的研究资料表明, CpG-ODN能活化免疫细胞及促进Th1型细胞因子的表达。

■同行评议者

冯志杰, 主任医师, 河北医科大学第二医院消化内科; 陈国凤, 主任医师, 中国人民解放军第302医院感染七科

■研究前沿

CpG-ODN可以活化免疫细胞, 激发机体产生Th1型为主的免疫应答. CpG-ODN在抗肿瘤、变态反应和传染病等领域的研究是当前的热点.

的表达, 并与未加CpG组进行比较, 同时检测培养液中Th1型细胞因子白介素-12(IL-12)和干扰素- γ (IFN- γ)的水平.

结果: 经CpG-ODN 2216活化刺激后, PBMC中B淋巴细胞抗原提呈相关分子CD80、CD86、MHC-I及MHC-II分子的表达显著高于对照组(CD80: $48.84\% \pm 21.29\%$ vs $28.57\% \pm 18.7\%$; CD86: $50.12\% \pm 19.70\%$ vs $13.15\% \pm 8.81\%$; MHC-I: 2108.88 ± 289.04 vs 1679.22 ± 388.22 ; MHC-II: 1602.77 ± 362.61 vs 941.88 ± 237.35 ; 均 $P < 0.05$); 并且培养液中IFN- γ 及IL-12的水平也显著高于对照组(IFN- γ : 61.38 ± 38.81 ng/L vs 47.35 ± 38.76 ng/L; IL-12: 7.80 ± 4.34 ng/L vs 5.56 ± 3.56 ng/L; 均 $P < 0.05$).

结论: CpG-ODN 2216能够提高HBV感染者B淋巴细胞表面抗原提呈相关分子和共刺激分子的表达, 同时提高PBMC分泌Th1型细胞因子的能力.

关键词: CpG-ODN 2216; 抗原提呈细胞; B淋巴细胞; 酶联免疫吸附试验; 流式细胞术

刘勇, 吴超, 陈军浩, 陈广梅, 薛世贵, 严晓敏. CpG对HBV感染者B细胞及Th1型细胞因子的活化作用. 世界华人消化杂志 2008; 16(14): 1573-1576

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1573.asp>

0 引言

CpG基序(motif)或者称为免疫刺激序列(immunostimulatory sequences, ISS)是指非甲基化胞嘧啶-鸟嘌呤两侧具有特定碱基的双脱氧核苷酸序列, 他可以活化免疫细胞, 激发机体产生Th1型为主要的免疫应答. CpG序列除能刺激B细胞, 减少B细胞凋亡外, 还能使B细胞表面MHC-II类抗原和共刺激因子表达量增加^[1]. 但CPG对于乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染者的B细胞的活化作用目前尚未有报道, 本实验选择CpG-ODN 2216对HBV感染者外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC)进行刺激活化, 以观察CPG对HBV感染者的免疫活化作用.

1 材料和方法

1.1 材料 CpG-ODN 2216委托上海生物工程技术服务有限公司合成, 全硫代修饰. CpG-ODN 2216序列为5'-GGG GGA CGA TCG TCG GGG GG-3'. RPMI 1640购自Gibco; 胎牛血清购自Hyclone. PE anti-human MHC-II、FITC anti-

human MHC-I, PE anti-human CD80, FITC anti-human CD86及CD19-APC均为BD Pharmingen公司产品. Facs Calibur流式细胞仪为美国BD公司产品. 人白介素-12(interleukin 12, IL-12)和干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ)的酶联免疫吸附实验(ELISA)检测试剂为晶美公司产品. 按2001年公布的《病毒性肝炎防治方案》^[2], 选择HBV感染者9例, 表面抗原(HBsAg)阳性6 mo以上的患者, 均不伴肝功能异常.

1.2 方法 抽取HBV感染者外周血5 mL, 以肝素抗凝. 淋巴细胞分离液分离PBMC. 调整细胞浓度为 2×10^9 /L, 加入到24孔培养板中, 1 mL/孔. 每例设一对照孔(PBS代替CpG, 与加入CpG的细胞组在共同条件下培养), 另一孔加入2 μ g CpG-ODN 2216, 37 $^{\circ}$ C, 50 mL/L CO₂条件下培养48 h. 取出细胞以PBS洗涤1次, 三色荧光法标记细胞表面抗原提呈相关分子(MHC-I-PE/MHC-II-FITC/CD19-PreCP、CD80-PE/CD86-FITC/CD19-PreCP), 用流式细胞仪“设门”于CD19阳性淋巴细胞, 分析B淋巴细胞表面MHC-I、MHC-II、CD80、CD86的表达量. CD80、CD86的表达量以阳性细胞百分比表示, MHC-I、MHC-II的表达量以几何平均荧光强度表示. 细胞培养48 h后收集培养上清液, ELISA方法检测培养液中IFN- γ 及IL-12含量, 所有操作均严格按照试剂盒操作说明书进行.

统计学处理 使用SPSS11.5统计软件. 组间比较用配对 t 检验. $P < 0.05$ 为有显著性差异.

2 结果

2.1 CPG提高PBMC中B淋巴细胞抗原提呈相关分子的表达 CpG-ODN 2216刺激PBMC 48 h后, B细胞表面抗原提呈相关分子CD80、CD86、MHC-I及MHC-II的表达显著增加($P < 0.05$, 图1, 表1).

2.2 CPG提高PBMC分泌Th1型细胞因子的能力 经CpG-ODN 2216刺激后, PBMC培养上清液中分泌的Th1型细胞因子IFN- γ 和IL-12水平明显提高, 与对照组相比有显著差异(IFN- γ : 61.38 ± 38.81 ng/L vs 47.35 ± 38.76 ng/L; IL-12: 7.8 ± 4.34 ng/L vs 5.56 ± 3.56 ng/L, 均 $P < 0.05$).

3 讨论

CpG-ODN刺激免疫细胞应答主要通过细胞表面的CpG基序受体实现的, 现已明确Toll样受体9(Toll-like receptor 9, TLR9)是CpG基序受体的必要

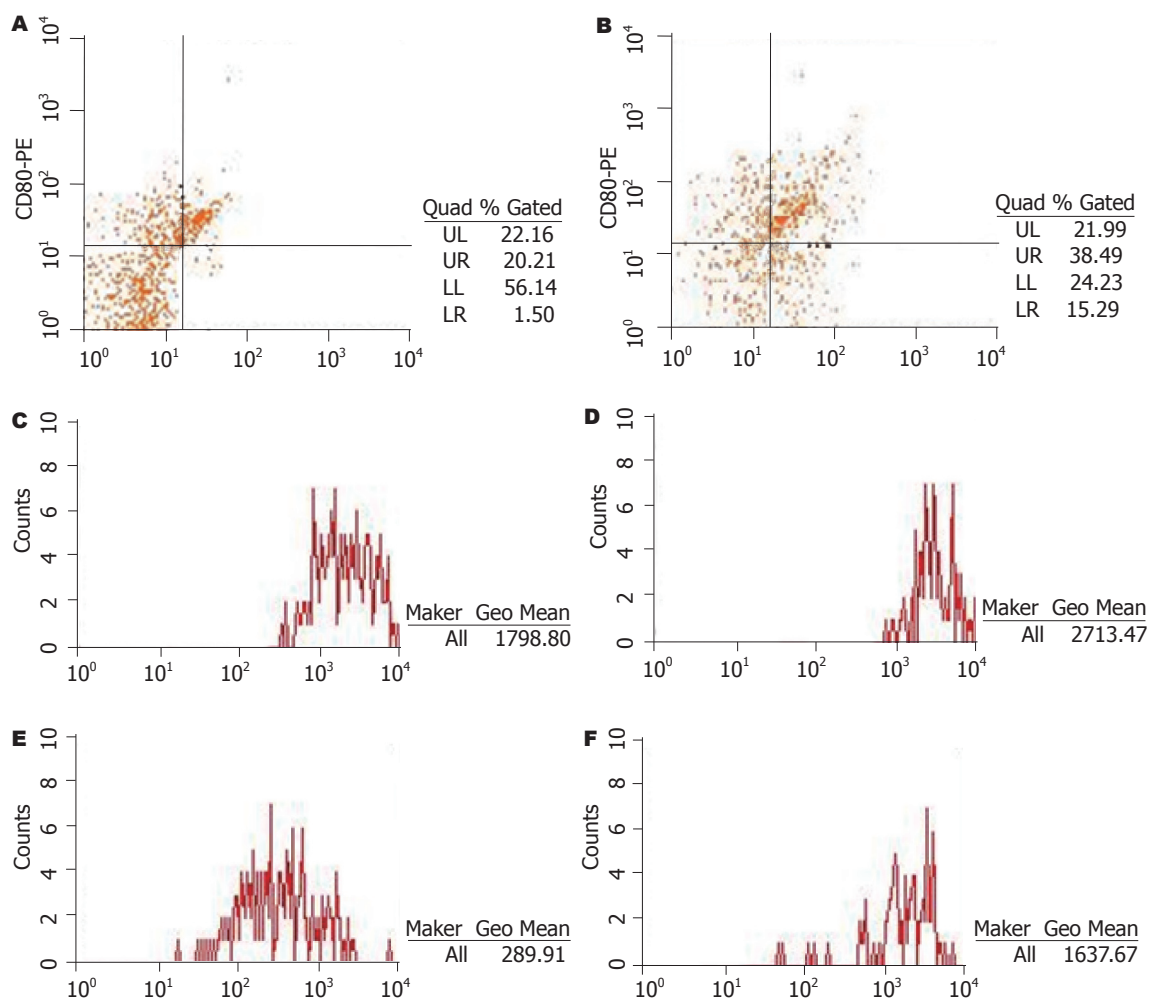


图 1 PBMC中B淋巴细胞抗原呈递相关分子的表达的流式细胞检测结果. A: 对照组CD86; B: CPG组CD86; C: 对照组MHC-I; D: CPG组MHC-I; E: 对照组MHC-II; F: CPG组MHC-II.

表 1 CPG提高PBMC中B淋巴细胞免疫相关分子表达的作用

检测项目	n	CPG刺激组	对照组
CD80/CD19(%)	9	48.84 ± 21.29 ^a	28.57 ± 18.70
CD86/CD19(%)	8	50.12 ± 19.70 ^a	13.15 ± 8.81
MHC-I /CD19 (荧光强度)	9	2108.88 ± 289.04 ^a	1679.22 ± 388.22
MHC-II /CD19 (荧光强度)	9	1602.77 ± 362.61 ^a	941.88 ± 237.35

^aP<0.05 vs 对照组.

成份^[3]. Li *et al*^[4]研究表明, TLR9主要表达在DC2和B细胞上, 而DC1、单核细胞、T淋巴细胞、NK细胞只微弱表达或不表达TLR9. 因此, CpG-ODN诱导Th0细胞向Th1细胞转化可能是通过抗原呈递细胞(antigen presentation cells, APC)以及释放Th1型细胞因子间接作用的结果^[5]. 研究表明CpG-ODN可显著提高B淋巴细胞共刺激分子CD80、CD86及MHC I、II类分子的表达^[6], 增强其提呈抗原的能力, 同时CpG-ODN也能促进IFN-α、

IL-12等Th1型细胞因子的分泌^[7], 诱导机体的免疫水平向Th1方向极化.

成人慢性乙肝体内免疫耐受的机制目前尚不清楚. 不过与最终能够完全清除病毒而康复的急性乙肝患者强大的T细胞反应相比, 慢性乙肝的一个特点就是对抗病毒的CD4⁺和CD8⁺T细胞反应显著减少^[8], 针对HBV特异性的CTL不能有效清除病毒, 这些可能导致病毒的持续存在. HBV转基因鼠就是主要表现为体内的免疫系统对HBV的耐受, 而通过改变转基因鼠体内的T细胞反应可以打破其对HBV的免疫耐受^[9]. 以往研究通过HBV抗原冲击抗原提呈细胞树突状细胞(dendritic cell, DC)在乙肝治疗方面取得了一定的疗效^[10-12]. 但是, 由于树突状细胞在制备上存在许多问题, 在临床上应用难度大、成本高、效率低. 人们已熟知B细胞在体液免疫应答中的重要作用, 而B细胞作为一种APC, 越来越受到广泛的重视, 研究表明, B细胞经CD40L等刺激后可完全代替树突状细胞发挥APC的作用^[13-14].

■同行评价

本研究目的明确,方法先进,结果可靠,讨论条理清晰,参考文献引用恰当,具有较好的科学性。

而本实验通过CpG-ODN 2216刺激HBV感染者抗原提呈细胞B细胞,使B细胞的抗原提呈能力得到了增强,结果显示HBV感染者体内B淋巴细胞受CpG-ODN 2216刺激后,其抗原提呈相关表面分子MHC I、MHC II、CD80、CD86等的表达均显著增加。而这些相关分子的高表达增强了APC的共刺激能力,加强APC对T淋巴细胞的活化能力,使T淋巴细胞更容易识别抗原进行免疫应答,从而可能达到清除HBV的目的。

IFN- γ 及IL-12均属于Th1型细胞因子。IL-12是一种由APC产生的异源二聚体细胞因子,能促使Th0细胞向Th1细胞分化并增强细胞毒性T淋巴细胞及NK细胞的杀伤活性^[15],其分泌水平的升高可反映APC功能及细胞免疫水平的提高^[16],同时IL-12能够诱导T细胞和NK细胞分泌IFN- γ ,启动Th1型细胞免疫反应。而IFN- γ 又可以放大IL-12依赖的Th1分化,抑制Th0细胞向Th2分化^[17-18]。这些性质提示IL-12及IFN- γ 在抗病毒免疫反应中起重要作用。研究表明当B细胞向APC活化时可以促使IFN- γ 及IL-12的分泌^[11]。本实验中HBV感染者的PBMC经CPG-ODN 2216刺激48 h后培养液中的IL-12和IFN- γ 水平就显著增加,由于PBMC中树突状细胞含量极低,因而IL-12和IFN- γ 水平的升高极有可能是由于B细胞的抗原提呈能力的增强而引起的。而IL-12和IFN- γ 水平的升高为Th0细胞向Th1细胞分化提供了良好的微环境,对于改善HBV感染者Th1/Th2细胞平衡状况具有免疫促进作用,从而可能在治疗HBV慢性感染方面具有一定的作用。

4 参考文献

- Yi AK, Peckham DW, Ashman RF, Krieg AM. CpG DNA rescues B cells from apoptosis by activating NF κ B and preventing mitochondrial membrane potential disruption via a chloroquine-sensitive pathway. *Int Immunol* 1999; 11: 2015-2024
- 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会联合修订. 病毒性肝炎防治方案. 中华传染病杂志 2001; 19: 56-62
- Jurk M, Vollmer J. Therapeutic applications of synthetic CpG oligodeoxynucleotides as TLR9 agonists for immune modulation. *BioDrugs* 2007; 21: 387-401
- Li J, Song W, Czerwinski DK, Varghese B, Uematsu S, Akira S, Krieg AM, Levy R. Lymphoma immunotherapy with CpG oligodeoxynucleotides requires TLR9 either in the host or in the tumor itself. *J Immunol* 2007; 179: 2493-2500
- Warren TL, Bhatia SK, Acosta AM, Dahle CE, Ratliff TL, Krieg AM, Weiner GJ. APC stimulated by CpG oligodeoxynucleotide enhance activation of MHC class I-restricted T cells. *J Immunol* 2000; 165: 6244-6251
- Decker T, Schneller F, Sparwasser T, Tretter T, Lipford GB, Wagner H, Peschel C. Immunostimulatory CpG-oligonucleotides cause proliferation, cytokine production, and an immunogenic phenotype in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* 2000; 95: 999-1006
- Becker Y. CpG ODNs treatments of HIV-1 infected patients may cause the decline of transmission in high risk populations - a review, hypothesis and implications. *Virus Genes* 2005; 30: 251-266
- Kakimi K, Isogawa M, Chung J, Sette A, Chisari FV. Immunogenicity and tolerogenicity of hepatitis B virus structural and nonstructural proteins: implications for immunotherapy of persistent viral infections. *J Virol* 2002; 76: 8609-8620
- Roh S, Kim K. Overcoming tolerance in hepatitis B virus transgenic mice: a possible involvement of regulatory T cells. *Microbiol Immunol* 2003; 47: 453-460
- Li RB, Chen HS, Xie Y, Fei R, Cong X, Jiang D, Wang SX, Wei L, Wang Y. Dendritic cells from chronic hepatitis B patients can induce HBV antigen-specific T cell responses. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1578-1582
- 司方明, 姜海山, 郑鹏远, 熊灵军, 范毅凯, 李俊红, 白经修. 树突状细胞治疗HBeAg阴性慢性乙型肝炎患者的临床观察. 世界华人消化杂志 2007; 15: 3746-3748
- Zhang Y, Song S, Liu C, Wang Y, Xian X, He Y, Wang J, Liu F, Sun S. Generation of chimeric HBc proteins with epitopes in E.coli: formation of virus-like particles and a potent inducer of antigen-specific cytotoxic immune response and anti-tumor effect in vivo. *Cell Immunol* 2007; 247: 18-27
- Rodriguez-Pinto D. B cells as antigen presenting cells. *Cell Immunol* 2005; 238: 67-75
- Lapointe R, Bellemare-Pelletier A, Housseau F, Thibodeau J, Hwu P. CD40-stimulated B lymphocytes pulsed with tumor antigens are effective antigen-presenting cells that can generate specific T cells. *Cancer Res* 2003; 63: 2836-2843
- Chang HD, Radbruch A. The pro- and anti-inflammatory potential of interleukin-12. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1109: 40-46
- Constantinescu CS, Tani M, Ransohoff RM, Wysocka M, Hilliard B, Fujioka T, Murphy S, Tighe PJ, Sarma JD, Trinchieri G, Rostami A. Astrocytes as antigen-presenting cells: expression of IL-12/IL-23. *J Neurochem* 2005; 95: 331-340
- Girart MV, Fuertes MB, Domaica CI, Rossi LE, Zwirner NW. Engagement of TLR3, TLR7, and NKG2D regulate IFN- γ secretion but not NKG2D-mediated cytotoxicity by human NK cells stimulated with suboptimal doses of IL-12. *J Immunol* 2007; 179: 3472-3479
- Iwabuchi N, Takahashi N, Xiao JZ, Miyaji K, Iwatsuki K. In vitro Th1 cytokine-independent Th2 suppressive effects of bifidobacteria. *Microbiol Immunol* 2007; 51: 649-660

编辑 李军亮 电编 郭海丽