

慢性HBV感染者、健康人树突状细胞经HBsAg活化后的免疫效应差异

马应杰, 韩际奥, 杨丽, 王志凌, 韩莉, 王郁杰

马应杰, 韩际奥, 杨丽, 王志凌, 韩莉, 王郁杰, 郑州人民医院
消化内科 郑州市消化疾病研究所 河南省郑州市 450003
马应杰, 主任医师, 硕士生导师, 主要从事肝病及胰腺疾病的临床及实验研究。

河南省院科技合作基金资助项目, No. 092106000032

作者贡献分布: 此课题由马应杰进行试验设计和论文整理写作; 韩际奥与韩莉进行实验操作; 杨丽、王志凌、韩莉及王郁杰进行文献查询、标本收集及数据处理。

通讯作者: 马应杰, 主任医师, 450003, 河南省郑州市黄河路33号, 郑州人民医院消化内科。mayingjie19@sina.com

收稿日期: 2011-11-19 修回日期: 2011-12-31

接受日期: 2012-01-19 在线出版日期: 2012-01-28

Difference in immune effect of dendritic cells activated by HBsAg between patients with chronic HBV infection and healthy people

Ying-Jie Ma, Ji-Ao Han, Li Yang, Zhi-Ling Wang,
Li Han, Yu-Jie Wang

Ying-Jie Ma, Ji-Ao Han, Li Yang, Zhi-Ling Wang, Li Han, Yu-Jie Wang, Department of Gastroenterology, Zhengzhou People's Hospital, Zhengzhou Institute of Liver and Gastrointestinal Disease, Zhengzhou 450003, Henan Province, China

Supported by: the Foundation for Henan Science and Technology Association and Academician Workstation Cooperation Medical Research, No. 092106000032

Correspondence to: Ying-Jie Ma, Chief Physician, Department of Gastroenterology, Zhengzhou People's Hospital, 33 Huanghe Road, Zhengzhou 450003, Henan Province, China. mayingjie19@sina.com

Received: 2011-11-19 Revised: 2011-12-31

Accepted: 2012-01-19 Published online: 2012-01-28

Abstract

AIM: To compare the difference in immune effect of dendritic cells activated by HBsAg in patients with chronic HBV and healthy people.

METHODS: Dendritic cells (DCs) and cytokine-induced killer (CIK) cells were cultured and amplified from the peripheral blood of patients with chronic HBV infection and healthy people. DCs were stimulated with pure HBsAg in cell culture medium prior to maturation. DC and CIK phenotypes were detected by flow cytometry. ELISA was used to detect the level of IL-12

in the supernatants of co-cultured DCs and CIK cells. The cell-killing activity of DC-induced CIK cells against HepG2.2.15 cells was measured using CCK-8 colorimetric assay.

RESULTS: Except HLA-DR, the positive rates of DC surface markers Cdla, CD80, and CD83 in DCs from healthy people were higher than those in DCs from patients with chronic HBV infection (all $P < 0.05$), but the positive rates of all four surface markers in healthy people DCs activated by HBsAg were significantly higher than in DCs from patients with chronic HBV infection ($P < 0.01$). There was no significant difference in the positive rates of DC surface markers between HBsAg-pulsed and non-pulsed DCs from patients with chronic HBV infection. The percentage of $CD3^+/CD8^+$ or $CD3^+/CD56^+$ CIK cells in HBsAg-pulsed healthy people was significantly higher than those in patients with chronic HBV infection and non-pulsed healthy people ($P < 0.01$, $P < 0.05$), but there was no significant difference between HBsAg-pulsed and non-pulsed patients with chronic HBV infection ($P > 0.05$). The cell-killing activity of HBsAg-pulsed DC-induced CIK cells against HepG2.2.15 cells was significantly higher in healthy people than in patients with chronic HBV infection ($P < 0.01$). The level of IL-12 in supernatants of co-cultured HBsAg-pulsed DC-CIK cells from healthy people was much higher than that from patients with chronic HBV infection ($P < 0.001$), but there was no significant difference between HBsAg-pulsed and non-pulsed DCs from patients with chronic HBV infection ($P > 0.05$).

CONCLUSION: The immune effect of HBsAg-pulsed DCs for HepG2.2.15 cells was significantly stronger in healthy people than in patients with chronic HBV infection.

Key Words: Chronic hepatitis B virus infection; Dendritic cells; Cytokine-induced killer cells; Immune response

Ma YJ, Han JA, Yang L, Wang ZL, Han L, Wang YJ. Difference in immune effect of dendritic cells activated by

■背景资料

机体免疫系统对乙型肝炎病毒免疫耐受的主要原因是机体树突状细胞(DC)的功能缺陷。目前干扰素和多种核苷/核苷酸类药物对慢性乙型肝炎取得了较好疗效,但是仍有相当多的患者应答不佳、耐药、复发。免疫活性细胞治疗得到广泛重视。

■同行评议者

党双锁, 教授, 西安交通大学医学院第二附属医院

■ 研发前沿

慢性乙型肝炎免疫治疗是一种很有前途的治疗策略,然而,细胞免疫疗法仍没有达到最初预期的效果。在进行机体外扩增DC,采用病毒抗原冲击致敏DC,再回输体内,是一个很好的免疫治疗思路。但是,患者DC本身存在的缺陷是否能够通过体外培养和刺激中得到修饰,恢复正常功能,是临床自体细胞免疫治疗开展前亟待解决的问题。

HBsAg between patients with chronic HBV infection and healthy people. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(4): 341-345

摘要

目的: 研究慢性HBV感染者、健康人外周血树突状细胞(dendritic cells, DC)经HBsAg活化后的免疫功能的差异。

方法: 从慢性HBV感染者、健康人外周血中培养扩增DC和CIK,在DC成熟前加入纯的HBsAg刺激,并再与同一来源的CIK共同培养。用流式细胞仪检测DC、CIK表型,用ELISA法检测DC、CIK共培养上清液中的IL-12浓度,用CCK-8比色法测定DC诱导CIK对HepG2.2.15细胞的杀伤活性。

结果: 未经HBsAg致敏的健康人DC表面标志CD1a、CD80及CD83明显高于慢性HBV感染者($P<0.05$);经HBsAg致敏的健康人DC表面标志均高于慢性HBV感染者,差异具有统计学意义($P<0.01$);慢性HBV感染者经HBsAg致敏的DC表面标志与未经HBsAg致敏无显著性差异。CIK细胞CD3、CD8、CD3、CD56的双阳性表达率,健康人HBsAg致敏者明显高于慢性HBV感染者及未经HBsAg致敏的健康人($P<0.01$, $P<0.05$);慢性HBV感染组HBsAg致敏与未经HBsAg致敏者比较无显著性差异($P>0.05$)。HBsAg致敏DC诱导CIK对HepG2.2.15细胞的杀伤率,健康人显著高于慢性HBV感染者($P<0.01$)。健康人HBsAg致敏DC、CIK共培养上清液中的IL-12浓度显著高于慢性HBV感染者($P<0.001$);慢性HBV感染者HBsAg致敏与未经HBsAg致敏IL-12含量差异不显著($P>0.05$)。

结论: 慢性HBV感染者、健康人DC经HBsAg活化后对HepG2.2.15细胞的免疫效应存在显著差异:健康人高于慢性HBV感染者。

关键词: 慢性乙型肝炎病毒感染者;树突状细胞;细胞因子诱导的杀伤细胞;免疫效应

马应杰, 韩际奥, 杨丽, 王志凌, 韩莉, 王郁杰. 慢性HBV感染者、健康人树突状细胞经HBsAg活化后的免疫效应差异. 世界华人消化杂志 2012; 20(4): 341-345

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/341.asp>

0 引言

树突状细胞(dendritic cells, DC)是诱导和维持抗原特异性免疫应答非常重要的抗原提呈细胞(antigen-presenting cell, APC),研究表明,慢性乙

型肝炎患者存在DC表型及功能缺失。以往研究多是以慢性乙型肝炎患者外周血中分离培养出DC再用HBsAg为免疫原进行活化,观察免疫效应。本研究应用慢性HBV感染者及健康人外周血中分离培养出DC,经HBsAg活化,与细胞因子诱导的杀伤细胞(cytokine-induced killer cells, CIK)共同培养。对两者DC、CIK细胞表型、分泌细胞因子能力及CIK细胞杀伤能力进行检测和对比,为临床开展DC治疗慢性乙型肝炎提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料 慢性HBV感染者18例,均为HBsAg、HBeAg、HbcAb 3项阳性。男9例,女9例,年龄为20-45岁,平均年龄30.6岁;对照组为乙肝病毒标志物均为阴性的健康人群随机纳入15例,男8例,女7例,年龄为18-48岁,平均年龄34.2岁。RPMI1640培养基、人淋巴细胞分离液(Ficoll)为北京索莱宝科技有限公司产品;胎牛血清(FCS)为Hyclone产品;CD3单克隆抗体购自武汉生物制品研究所;IFN- γ 购自上海凯茂生物医药有限公司;rhIL-2购自辽宁卫星生物制品研究所(有限公司);rhGM-CSF、rhIL-1、rhIL-4均为Perprotech公司产品;CCK-8试剂盒和IL-12试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司;肝细胞株HepG2.2.15为郑州大学肝病研究所郑立运教授惠赠;显微镜为奥林巴斯CKX41型倒置相差显微镜;流式细胞仪为Becton Dickinson公司产品。

1.2 方法

1.2.1 DC、CIK的体外培养、扩增: (1)外周血单个核细胞(PBMCs)的提取:无菌条件抽取各组研究对象外周血100 mL,肝素抗凝, Hanks液2倍稀释。吸取淋巴细胞分离液,缓慢加稀释血液至人淋巴细胞分离液上(稀释血液:分离液=1:1),室温2 000 r/min离心20 min。离心后用吸管轻轻吸出位于血浆层与淋巴细胞分离液层之间的单个核细胞层。将所得悬液用5倍体积的Hanks液洗涤2次,依次以1 800 r/min, 1 200 r/min离心5 min。末次离心后,弃上清,用RPMI1640培养液(含2%自体血清)重悬混匀,调整细胞浓度为 $(4-5) \times 10^6/\text{mL}$,置于37 °C、50 mL/L CO₂培养箱培养2 h。(2)DC的体外诱导、扩增: PBMCs培养2 h后,收集非贴壁细胞备用。在剩余含贴壁细胞的培养瓶中,加入RPMI1640培养液(含100 mL/L FCS)及细胞因子(1 000 U/mL GM-CSF、1 000 U/mL IL-4)置于37 °C、50 mL/L CO₂培养箱培养。

第3天半量换液1次并补充细胞因子, 第5天等分: 1份加入HBsAg(浓度1 000 $\mu\text{g/L}$); 1份不加乙肝表面抗原, 继续培养. 部分培养瓶加入乙肝表面抗原(HBsAg)(浓度1 000 $\mu\text{g/L}$)以诱导HBsAg致敏的DC. 第6天收集细胞进行检测或与CIK细胞共培养. (3)CIK细胞的体外诱导、扩增: PBMCs培养2 h后收集的非贴壁细胞, 用RPMI1640培养液(含100 mL/L FCS)调细胞浓度为 $(1-2) \times 10^6/\text{mL}$, 并加入1 000 U/mL的干扰素($\text{IFN-}\gamma$), 置37 $^{\circ}\text{C}$, 50 mL/L CO_2 培养箱培养24 h后加入IL(2 000 U/mL IL-2、1 000 U/mL IL-1)、抗CD3单克隆抗体(1 mg/L CD3McAb), 继续置于培养箱中培养. 以后每隔3 d换液1次, 补充rh IL-2, 调整细胞浓度始终为 $(1-2) \times 10^6$ 个/mL. (4)DC与CIK细胞共培养: 第6天收获DC(HBsAg致敏DC和无HBsAg致敏DC), 计数后和CIK按1:5混合, 以含有2 000 U/mL IL-2的RPMI 1640培养基(含100 mL/L FCS)继续培养3 d, 进行以下实验.

1.2.2 细胞杀伤试验(CCK-8比色法测定): 与DC共同培养3 d的CIK(DC-CIK)为效应细胞, 取对数生长期HepG2.2.15肝细胞为靶细胞. 以RPMI 1640培养基(含100 mL/L FCS)调整靶细胞浓度为 $1 \times 10^5/\text{mL}$, DC-CIK的细胞浓度调整为 $5 \times 10^5/\text{mL}$. 96孔培养板: 实验孔每孔加靶细胞悬液及效应细胞悬液(HBsAg致敏或无HBsAg致敏DC-CIK)各100 μL ; 效应孔每孔加效应细胞悬液及RPMI 1640培养基(含100 mL/L FCS)各100 μL ; 靶细胞孔每孔加靶细胞悬液及RPMI 1640培养基(含100 mL/L FCS)各100 μL . 每组设6个复孔. 置37 $^{\circ}\text{C}$ 、50 mL/L CO_2 培养箱中培养24 h, 加入cck-8试剂20 $\mu\text{L}/\text{well}$, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育2 h, 酶联免疫检测仪(波长450 nm)检测吸光度值(A), 计算杀伤率. 计算公式为: 杀伤率 = $[1 - (A_{\text{实验孔}} - A_{\text{效应孔}}) / A_{\text{靶细胞孔}}] \times 100\%$

1.2.3 DC、DC-CIK(CIK)细胞群表型检测: 在DC培养的第6天用流式细胞仪进行免疫表型分析, DC-CIK共培养3 d后进行流式细胞术测定细胞表型.

1.2.4 细胞因子检测: DC与CIK共培养48 h取上清, -70 $^{\circ}\text{C}$ 冻存留做检测细胞因子. 采用ELISA法, 检测每个样品的IL-12 A_{450} 值, 然后根据标准曲线算出相对应的浓度值.

统计学处理 采用SAS软件进行 t 检验.

2 结果

2.1 DC表型分析 GM-CSF是DC发育成熟所必需

的细胞因子, IL-4可以抑制单核细胞向巨噬细胞转化并维持DC成熟, 使用含上述2种因子的1640培养基培养DC, 于培养的1-2 d可见细胞贴壁呈单层均匀分布, 3-4 d可见细胞呈簇状生长, 形成大小不等的DC集落, 至培养第7天, 无论有无HBsAg刺激, 两组均可见大部分细胞脱落, 形态不规则, 在倒置相差显微镜下可见细胞表面有许多毛刺, 为典型DC.

诱导成熟的DC经流式细胞仪分析显示, 未经HBsAg致敏的健康人DC表面标志CD1a、CD80及CD83明显高于慢性HBV感染者($P < 0.01$), HLA-DR在慢性HBV感染者、健康人无明显差异; 经HBsAg致敏的健康人DC表面标志CD1a、HLA-DR、CD80及CD83均高于慢性HBV感染者, 差异具有统计学意义; 健康人经HBsAg致敏的DC表面标志CD1a、HLA-DR、CD80及CD83明显高于未经HBsAg致敏的DC; 慢性HBV感染者经HBsAg致敏的DC表面标志CD1a、HLA-DR、CD80及CD83与未经HBsAg致敏的DC无显著性差异(表1).

2.2 CIK表型分析 经流式细胞仪分析表明, CIK细胞属于异质细胞群, 随着培养时间的延长, CIK细胞中CD3、CD8、CD3、CD56双阳性细胞的百分含量大幅度上升. CIK分别与经过及未经HBsAg致敏刺激的慢性HBV感染者、正常人DC共培养2 d, CIK细胞CD3、CD8、CD3、CD56的双阳性表达率, 健康人HBsAg致敏者明显高于未经HBsAg致敏者(74.62 ± 14.20 vs 61.24 ± 12.9 , 36.28 ± 6.49 vs 24.11 ± 6.75); 慢性HBV感染组HBsAg致敏与未经HBsAg致敏者比较无显著性差异($P > 0.05$); HBsAg致敏的健康人明显高于慢性HBV感染者($P < 0.01$, 表2).

2.3 HBsAg致敏DC诱导CIK对HepG2.2.15细胞的免疫效应

2.3.1 细胞杀伤试验: 用CCK-8比色法测定健康人和慢性HBV感染者HBsAg致敏DC诱导CIK对HepG2.2.15细胞的杀伤活性. 健康人、慢性HBV感染者HBsAg致敏DC诱导CIK对HepG2.2.15细胞的杀伤率分别为 $84.5\% \pm 8.32\%$ 、 $60.02\% \pm 5.45\%$, 具有显著性差异($P < 0.001$); 对于未HBsAg致敏DC诱导CIK细胞的杀伤率, 两者亦有明显差异($57.27\% \pm 5.35\%$, $43.76\% \pm 5.18\%$, $P < 0.01$).

2.3.2 DC与CIK共培养48 h上清液中IL-12水平: HBsAg致敏DC与CIK共培养48 h的上清液中, 正常人组IL-12含量显著高于慢性HBV感染

■创新盘点

本实验从慢性HBV感染者、健康人外周血中培养扩增DC和CIK, 在DC成熟前加入纯的HBsAg刺激, 并再与同一来源的CIK共同培养. 检测DC、CIK表型、IL-12浓度, CIK对HepG2.2.15细胞的杀伤活性. 发现健康人与慢性HBV感染者之间存在显著差异.

■应用要点

本研究结果提示慢性乙型肝炎自体DC体外矫正效果有限,为细胞免疫治疗的细胞来源选择提供了依据,对提高临床细胞免疫疗法的效果有重要价值。

表 1 健康人、慢性HBV感染者DC的表面标志

表型阳性率 (%)	健康人(<i>n</i> = 15)		慢性HBV感染者(<i>n</i> = 18)	
	经HBsAg致敏	未经HBsAg致敏	经HBsAg致敏	未经HBsAg致敏
CD1a	31.83 ± 1.52	25.10 ± 2.50 ^b	17.48 ± 2.27 ^c	15.65 ± 1.72 ^c
HLA-DR	96.49 ± 8.61	75.90 ± 7.32 ^b	81.49 ± 7.65 ^c	77.29 ± 8.43
CD80	38.13 ± 4.85	25.79 ± 3.18 ^b	22.13 ± 2.34 ^c	20.57 ± 2.31 ^c
CD83	57.33 ± 7.43	41.79 ± 7.27 ^b	34.42 ± 5.73 ^c	31.79 ± 3.54

^b*P* < 0.01 vs HBsAg致敏DC; ^c*P* < 0.05 vs HBsAg致敏的健康人DC; ^e*P* < 0.05 vs 未经HBsAg致敏DC。

表 2 两组共培养的CIK细胞CD3、CD8、CD3、CD56的双阳性表达

	健康人(<i>n</i> = 15)		慢性HBV感染者(<i>n</i> = 18)	
	经HBsAg致敏	未经HBsAg致敏	经HBsAg致敏	未经HBsAg致敏
CD3 ⁺ CD8 ⁺	74.62 ± 14.20	61.24 ± 12.9 ^b	60.31 ± 10.2 ^c	57.37 ± 11.25
CD3 ⁺ CD56 ⁺	36.28 ± 6.49	24.11 ± 6.75 ^b	25.43 ± 7.62 ^c	23.34 ± 4.98

^b*P* < 0.01 vs 经 HBsAg致敏; ^c*P* < 0.05 vs HBsAg致敏。

表 3 健康人、慢性HBV感染者HBsAg致敏DC诱导的免疫效应

	正常人(<i>n</i> = 15)		慢性HBV感染者(<i>n</i> = 18)	
	经HBsAg致敏	未经HBsAg致敏	经HBsAg致敏	未经HBsAg致敏
抑制率(%)	84.50 ± 8.32	57.27 ± 5.35	60.02 ± 5.45	3.76 ± 5.18
IL-12(g/mL)	55.36 ± 3.81	37.56 ± 3.24	29.86 ± 2.13	27.58 ± 1.95

者组(55.36 ± 3.81, 29.86 ± 2.13, *P* < 0.001)。未经HBsAg致敏MLR中, 正常人组IL-12含量高于慢性HBV感染者组(37.56 ± 3.24, 27.58 ± 1.95, *P* < 0.05)。慢性HBV感染者组HBsAg致敏与未经HBsAg致敏MLR中IL-12含量差异不显著(29.86 ± 2.13, 27.58 ± 1.95, *P* > 0.05, 表3)。

3 讨论

慢性乙型肝炎免疫治疗是一种很有前途的治疗策略, 然而, 这种方法仍没有达到最初预期的效果, 尤其是细胞免疫疗法^[1]。DC是机体内最重要的、功能最强的APC, 最初是Steinman和Cohn等于1973年从小鼠脾组织中分离发现的, DC最大的特点是能激活初始型T细胞增殖并建立初级免疫应答。CIK细胞是单个核细胞在体外用多种细胞因子共培养而获得的一群异质细胞, 兼有T淋巴细胞强大的抗瘤、抗病毒活性。

慢性乙型肝炎患者存在DC数量和功能缺陷^[2,3], DC功能低下一方面可导致其递呈抗原的功能明显下降, 不能有效地激活T细胞, 使T细胞处于无能状态, 机体对HBV免疫耐受; 另一方面

还可使DC分泌IL-12显著受到抑制。王福生等^[4]研究发现健康受试者与慢性乙型肝炎患者体外培养DC都表现了典型形态, 但慢性乙型肝炎患者DC表面HLA-DR、CD-80、CD-86均降低, DC数量及增殖能力与健康受试者相比显著降低。大量研究^[5,6]表明, Th0细胞向Th1细胞分化的关键因素是IL-12^[7], 而DC分泌的IL-12是促进Th0细胞向Th1细胞分化的重要因素, Th1细胞产生的Th1因子具有中和乙肝病毒的作用, 并在T细胞的增殖活化, 尤其是在促进CTL的杀伤活性, 介导细胞免疫应答及机体抗病毒中发挥重要作用^[8,9]。

在机体外扩增DC, 采用病毒抗原冲击致敏DC再回输体内, 是一个很好的免疫治疗思路。但是, 患者DC本身存在的缺陷是否能通过体外培养和刺激中得到修饰, 恢复正常功能, 是基础研究与临床研究共同关注的关键问题, 综述目前研究, 就此还存在很大争议^[10-12]。

我们的研究发现, 以HBsAg分别刺激慢性乙型肝炎患者外周血DC和正常人外周血DC, 与同一来源CIK共培养48 h, 测定共培养上清

液中的IL-12浓度, 在HBsAg致敏MLR中, 正常人组IL-12含量显著高于慢性HBV感染者组 ($P<0.001$); 慢性HBV感染者组HBsAg致敏与未经HBsAg致敏MLR中IL-12含量差异不显著 ($P>0.05$). IL-12是迄今为止所发现的DC细胞释放的最有效CTL和NK细胞活性刺激因子, 在机体抗病毒过程中发挥关键作用^[13]. 大量的IL-12可活化T细胞产生内源性IFN- γ , 通过CTL反应使靶细胞发生程序性死亡^[14].

细胞免疫是乙型肝炎病毒感染慢性化的主要因素. 在该研究中, HBsAg致敏刺激的正常人、慢性乙型肝炎患者DC的表面标志及两组共培养的CIK细胞CD3、CD8、CD3、CD56的双阳性表达率差异显著. 健康人经HBsAg致敏的DC表面标志CD1a、HLA-DR、CD80及CD83均高于慢性HBV感染者, 差异具有统计学意义 ($P<0.01$); 慢性HBV感染者经HBsAg致敏的DC表面标志CD1a、HLA-DR、CD80及CD83与未经HBsAg致敏的DC无显著性差异 ($P>0.05$). 健康人HBsAg致敏DC诱导CIK的CD3、CD8、CD3、CD56的双阳性表达率明显高于未经HBsAg致敏者 ($P<0.05$); 慢性HBV感染组HBsAg致敏与未经HBsAg致敏者比较无显著性差异 ($P>0.05$). 健康人、慢性HBV感染者HBsAg致敏DC诱导CIK对HepG2.2.15细胞的杀伤率(%)分别为 84.5 ± 8.3 、 60.02 ± 9.5 , 具有显著性差异 ($P<0.001$). 支持慢性HBV感染者CIK免疫活性低于正常人^[15]. 提示慢性HBV感染者DC缺陷通过体外修饰难以纠正, 免疫效应难以恢复.

总之, 体外HBsAg刺激DC可以提高其抗原提呈功能, 有效诱导特异性CTL细胞效应. 这种免疫效应在正常人明显强于慢性HBV感染者; 对于慢性HBV感染者, 通过体外修饰, 不能获得完全的DC的功能恢复. 这是今后利用HBsAg致敏的DC治疗慢性乙型肝炎研究中应注意的问题.

4 参考文献

- 1 Michel ML, Deng Q, Mancini-Bourguine M. Therapeutic vaccines and immune-based therapies for the treatment of chronic hepatitis B: perspectives and challenges. *J Hepatol* 2011; 54: 1286-1296
- 2 van der Molen RG, Sprengers D, Binda RS, de

- Jong EC, Niesters HG, Kusters JG, Kwekkeboom J, Janssen HL. Functional impairment of myeloid and plasmacytoid dendritic cells of patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* 2004; 40: 738-746
- 3 Liu SR, Zhang Y, Li ZL, Yu ZY, Lu HM. The changes in morphology, epitope and function of dendritic cells isolated from patients with chronic hepatitis B. *J Cell Mol Immunol* 2001; 5: 437-439
- 4 邢利和, 王福生, 刘明旭, 朱传琳, 李捍卫, 雷周云, 王慧芬, 张冰, 金磊. 慢性乙型肝炎患者树突状细胞的培养鉴定和功能特点. *中华传染病杂志* 2001; 19: 348-351
- 5 Ohteki T. The dynamics of dendritic cell: mediated innate immune regulation. *Allergol Int* 2007; 56: 209-214
- 6 Zoll B, Lefterova P, Csipai M, Finke S, Trojaneck B, Ebert O, Micka B, Roigk K, Fehlinger M, Schmidt-Wolf GD, Huhn D, Schmidt-Wolf IG. Generation of cytokine-induced killer cells using exogenous interleukin-2, -7 or -12. *Cancer Immunol Immunother* 1998; 47: 221-226
- 7 Vergani D, Mieli-Vergani G. Aetiopathogenesis of autoimmune hepatitis. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 3306-3312
- 8 Chen W, Shi M, Shi F, Mao Y, Tang Z, Zhang B, Zhang H, Chen L, Chen L, Xin S, Wang FS. HBcAg-pulsed dendritic cell vaccine induces Th1 polarization and production of hepatitis B virus-specific cytotoxic T lymphocytes. *Hepatol Res* 2009; 39: 355-365
- 9 Huang Y, Chen Z, Jia H, Wu W, Zhong S, Zhou C. Induction of Tc1 response and enhanced cytotoxic T lymphocyte activity in mice by dendritic cells transduced with adenovirus expressing HBsAg. *Clin Immunol* 2006; 119: 280-290
- 10 Zheng BJ, Zhou J, Qu D, Siu KL, Lam TW, Lo HY, Lee SS, Wen YM. Selective functional deficit in dendritic cell-T cell interaction is a crucial mechanism in chronic hepatitis B virus infection. *J Viral Hepat* 2004; 11: 217-224
- 11 Chen M, Li YG, Zhang DZ, Wang ZY, Zeng WQ, Shi XF, Guo Y, Guo SH, Ren H. Therapeutic effect of autologous dendritic cell vaccine on patients with chronic hepatitis B: a clinical study. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1806-1808
- 12 牛春燕, 任天顺, 陈旭, 成碧萍. HBV抗原肽冲击的DC对慢性乙型肝炎及HBV携带者的免疫治疗作用. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 2635-2639
- 13 Huang LY, Reis e Sousa C, Itoh Y, Inman J, Scott DE. IL-12 induction by a TH1-inducing adjuvant in vivo: dendritic cell subsets and regulation by IL-10. *J Immunol* 2001; 167: 1423-1430
- 14 Jaime-Ramirez AC, Mundy-Bosse BL, Kondadasula S, Jones NB, Roda JM, Mani A, Parihar R, Karpav, Papenfuss TL, LaPerle KM, Biller E, Lehman A, Chaudhury AR, Jarjoura D, Burry RW, Carson WE. IL-12 enhances the antitumor actions of trastuzumab via NK cell IFN- γ production. *J Immunol* 2011; 186: 3401-3409
- 15 月蓉, 邱红, 刘军权, 陈复兴. 20例慢性乙型肝炎患者细胞因子活化的杀伤细胞动态观察. *江苏大学学报(医学版)* 2007; 17: 175-177, 179

■同行评价

本实验设计合理, 立题紧密结合治疗乙肝中难点问题有意义, 实验方法可行, 结果可信. 对于慢性HBV感染者与DC相关的免疫治疗研究有一定参考价值.

编辑 张姗姗 电编 闫晋利