

· 基础论著 ·

含 CpG 的不同寡脱氧核苷酸对慢性 HBV 感染者外周血单个核细胞刺激能力的研究

向天新 郭小萍 李明慧 谢尧 段元志 张斌 李小权 张华

【摘要】 目的 探讨人工合成硫代修饰的含 CpG 基序的寡脱氧核苷酸(ODN)作为佐剂对慢性 HBV 感染者外周血单个核细胞(PBMC)免疫应答能力的影响。**方法** 31 例慢性 HBV 感染者分成两组,免疫耐受组(14 例)和免疫清除组(17 例),同时设置 7 例正常对照。用 CpG1826、CpG1826m、CpGT7、HBsAg、M1(CpG1826 + HBsAg)、M2(CpG1826m + HBsAg)、M3(CpGT7 + HBsAg)分别与受试者的 PBMC 共同孵育,酶联免疫斑点法检测 IFN- γ 的分泌情况,以斑点数的多少评价细胞分泌 IFN- γ 的能力。**结果** CpG1826、CpG1826m、CpGT7、HBsAg、M1、M2、M3 与 PBMC 孵育后,IFN- γ 斑点数分别为 16 ± 10 、 17 ± 9 、 17 ± 10 、 201 ± 51 、 215 ± 63 、 218 ± 63 、 216 ± 59 。其中,免疫清除组分别为 21 ± 10 、 22 ± 9 、 23 ± 10 、 226 ± 49 、 261 ± 51 、 264 ± 47 、 254 ± 54 ;免疫耐受组分别为 8 ± 4 、 10 ± 3 、 8 ± 4 、 164 ± 42 、 155 ± 36 、 157 ± 41 、 167 ± 27 ;正常对照组分别为 17 ± 6 、 17 ± 7 、 18 ± 9 、 209 ± 17 、 217 ± 24 、 221 ± 17 、 217 ± 46 。在 3 种不同免疫状态组,单用 HBsAg 与 CpG ODN 联合 HBsAg 比较均无显著性差异,但不同免疫状态组间均有显著性差异($P < 0.05$)。**结论** 不同 CpG ODN 均不能显著增加 HBsAg 刺激 PBMC 分泌 IFN- γ 的能力,且 3 种 CpG ODN 联合 HBsAg 刺激 PBMC 分泌 IFN- γ 的能力间无显著性差异。

【关键词】 乙型肝炎病毒;树突状细胞;单个核细胞

The immunostimulatory comparison on peripheral blood mononuclear cell stimulated by CpG oligodeoxyribonucleotide in chronic HBV infection XIANG Tian-xin, WU Xiao-ping, LI Ming-hui, XIE Yao, DUAN Yuan-zhi, ZHANG Bin, LI Xiao-quan, ZHANG Hua. Department of Infectious Diseases, the First Hospital Affiliated to Nanchang University, Nanchang 330006, China

Corresponding author: XIE Yao, Email: xieyao@public.bta.net.cn

【Abstract】 Objective To study the effect of CpG oligodeoxyribonucleotide

基金项目:国家自然科学基金项目(30471520)

作者单位:330006 南昌市,南昌大学第一附属医院感染科(向天新、郭小萍、张华);北京地坛医院肝炎一科(李明慧、谢尧、张斌);西安交通大学医学院第一附属医院(李小权);江西瑞昌市人民医院(段元志)

通讯作者:谢尧 Email: xieyao@public.bta.net.cn

(ODN) as adjuvant on the immune responses in PBMC with chronic hepatitis B virus.

Methods Thirty-one patients with chronic HBV infection were divided into two groups, 14 examples in immune tolerance group and 17 examples in the immune clearance group. In addition, 7 examples as normal control. The frequency of IFN- γ secreting of PBMC in immune tolerant phase and in the immune clearance phase stimulated by CpG1826, CpG1826m, CpGT7, HBsAg, Mixture 1(CpG1826 + HBsAg), Mixture 2(CpG1826m + HBsAg), Mixture 3(CpGT7 + HBsAg) were detected by enzyme linked immune spot (ELISPOT), respectively. **Results** The numbers of spot of IFN- γ were incubated by CpG1826, CpG1826m, CpGT7, HBsAg, M1, M2, M3 were 16 ± 10 , 17 ± 9 , 17 ± 10 , 201 ± 51 , 215 ± 63 , 218 ± 63 , 216 ± 59 , respectively. The numbers of spot of IFN- γ were 21 ± 10 , 22 ± 9 , 23 ± 10 , 226 ± 49 , 261 ± 51 , 264 ± 47 , 254 ± 47 in immune clearance group, 8 ± 4 , 10 ± 3 , 8 ± 4 , 164 ± 42 , 155 ± 36 , 157 ± 41 , 167 ± 27 in immune tolerance group and 17 ± 6 , 17 ± 7 , 18 ± 9 , 209 ± 17 , 217 ± 24 , 221 ± 17 , 217 ± 46 in the control group. There were not significant difference between HBsAg and CpG ODN mixing HBsAg in the three immune states, but the results were opposite in comparison of any two immune states. **Conclusions** CpG ODN can not significantly increase the secreting of IFN- γ of PBMC. The ability of secreting IFN- γ did not have significant difference in any two mixtures.

【Key words】 Hepatitis B virus; Dendritic cell; Mononuclear cell

随着分子生物学技术的发展,人工合成的 CpG 寡核苷酸序列,广泛地运用于治疗肿瘤、自身免疫性疾病和感染性疾病的研究。尤其是在 HBV 慢性感染者中, Th1/Th2 低下且患者的树突状细胞功能低下。CpG ODN 能够通过刺激抗原提呈细胞分泌 IL-2、IL-12、IFN- γ 诱导向 Th1 分化,从而活化细胞免疫应答途径^[1]。本文根据继往的研究获得了三种不同种类的 CpG ODN,研究其对慢性 HBV 感染者免疫细胞刺激,为慢性 HBV 感染者开创新的免疫治疗打下基础。

资料和方法

一、对象与试剂

1. 对象:参照 2000 年西安会议修订的临床诊断标准,于 2007 年 8 月至 2008 年 1 月在北京地坛医院门诊选择符合研究条件的 31 名慢性乙型肝炎病毒感染者,且在近 6 个月未采取任何抗病毒治疗,同时设置 7 名正常对照。依据 2000 年 6 月在日本召开的亚太地区肝病学术会议上共识的原则,将 31 例慢性 HBV 感染者分成免疫耐受期和免疫清除期。

2. 主要试剂:Ficoll-Hypaque(Pharmacia)、CpG ODN 1826:5'-TCCATGACGT-TCCTGACGTT-3'、CpG ODN 1826m:5'-TCCATGTCGTTCTGTCGTT-3'、CpG ODN T7:5'-TCGTCGTCGTCGTCGTCGTCG-3', 3 种 CpG ODN 5'-和 3'-末端均硫代磷酸化修饰,HAP 纯化,上海生物工程有限公司合成、CHO 表达 HBsAg(北京万

泰)、hIFN- γ ELISPOT kit (Diacclone)。

二、方法

1. 分离外周血单个核细胞(PBMC): 采用 Ficoll-Hypaque 密度梯度离心法提取外周血单个核细胞, 用完全 RPMI 1640 培养液稀释至 $1 \sim 2$ PBMC 混悬液, 将 PBMC 配成 $4 \times 10^5/100 \mu\text{l}$, 用于 ELISPOT 检测实验。

2. IFN- γ 分泌检测: 具体步骤严格按 hIFN- γ ELISPOT 试剂盒说明书操作, 设计好实验加样方案。确保每孔细胞数量为 4×10^5 , 刺激物的浓度分别为 CpG ODN 11 $\mu\text{g/ml}$ 、HBsAg 25 $\mu\text{g/ml}$ 、M (CpG ODN 11 $\mu\text{g/ml}$ + HBsAg 25 $\mu\text{g/ml}$), 同时设置空白对照 (不加入细胞和刺激物)、阴性对照 (只加细胞不加刺激物)、阳性对照 (ConA 50 $\mu\text{g/ml}$)。最后经计算机辅助成像分析系统计算斑点数, 并用斑点形成单位 (spot forming cell, SFC) 记录结果。

三、统计学处理

IFN- γ 斑点数用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS 11.5 软件分析数据, 计量资料采用单因素方差分析 (ANOVA), $P < 0.05$ 表示有显著性差异。

结 果

一、不同刺激物与 PBMC 孵育后产生的 IFN- γ 斑点数的基本描述 (表 1)

单独应用 CpG 刺激 PBMC 产生的斑点较少, 高剂量 HBsAg 组的斑点相对较多, 将两者联合刺激所产生的斑点均比两种刺激物的单独作用效果佳; 各种刺激物在不同的免疫状态下刺激 PBMC 产生的斑点数均有差异, 其中免疫清除组最多, 其次是正常对照, 免疫耐受组最少 (表 1)。

表 1 不同刺激物与 PBMC 孵育后产生的 IFN- γ 斑点数 ($\bar{x} \pm s$)

	空白	CpG1826	CpG1826m	CpG T7	HBsAg	M1	M2	M3
免疫清除组	9 \pm 6	21 \pm 10	22 \pm 9	23 \pm 10	226 \pm 49	261 \pm 51	264 \pm 47	254 \pm 54
免疫耐受组	5 \pm 2	8 \pm 4	10 \pm 3	8 \pm 4	164 \pm 42	155 \pm 36	157 \pm 41	167 \pm 27
正常对照组	8 \pm 5	17 \pm 6	17 \pm 7	18 \pm 9	209 \pm 17	217 \pm 24	221 \pm 17	217 \pm 46

注: M1: CpG 1826 和 HBsAg 的混合物; M2: CpG 1826m 和 HBsAg 的混合物; M3: CpG T7 和 HBsAg 的混合物

二、3 种混合刺激物产生 IFN- γ 斑点数在不同免疫状态之间的比较

1. 3 种免疫状态中, 无论各种混合刺激物与 HBsAg, 还是各种 M 之间统计分析比较均无显著性差异 ($P > 0.05$)。

2. 各种混合刺激物在 3 种免疫状态之间均有显著性差异 (图 1), M1 的免疫清除组与免疫耐受组间 $P = 0.00$, 免疫清除组与正常对照组间 $P = 0.026$, 正常对照组与免疫耐受组间 $P = 0.003$; M2 的免疫清除组与免疫耐受组间 $P = 0.001$, 免疫清除组与正常对照组间 $P = 0.023$, 正常对照组与免疫耐受组间 $P = 0.002$; M3 的免疫清除组与免疫耐受组间 $P = 0.002$, 免疫清除组与正常对照组间 $P = 0.048$, 正常对照组与免疫耐受组间 $P = 0.002$ 。

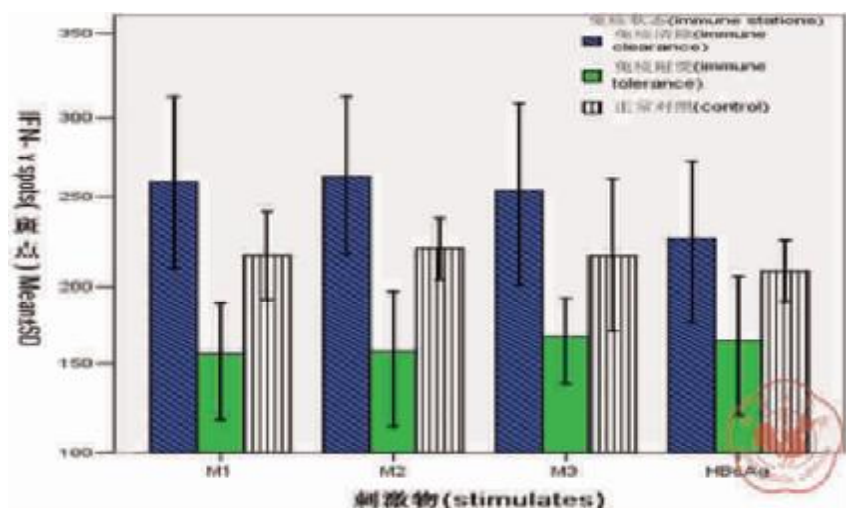


图1 3种混合刺激物的不同免疫状态之间的比较

三、相关性描述及分析

在17例处于免疫清除状态下的慢性HBV感染者中,CpG ODN和HBsAg混合刺激物的斑点均数与实验者血清ALT相关性的统计分析得 $r=0.856$ 和 $P=0.006$ (ALT为正态性分布,采用pearson检验),两者之间有显著相关性(图2)。

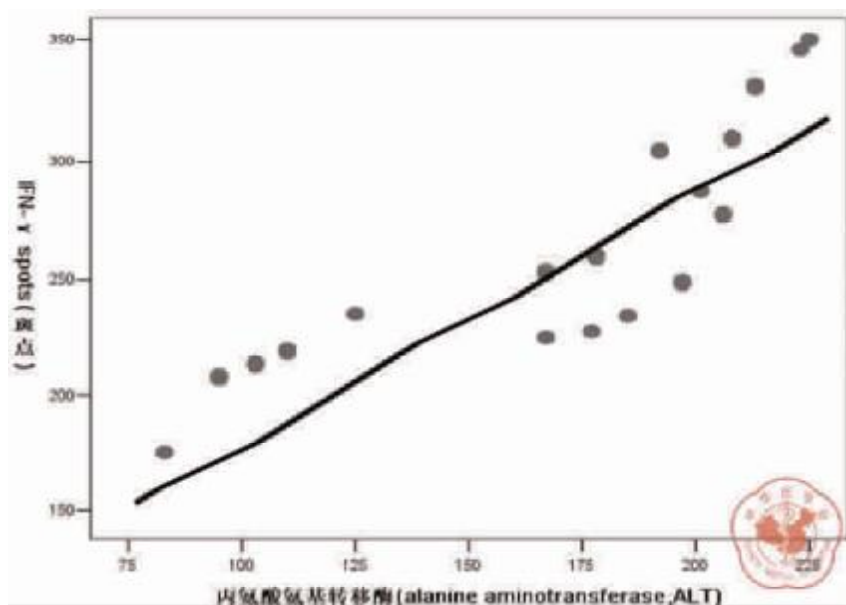


图2 CpG ODN和HBsAg混合刺激物的斑点均数与血清ALT散点图

讨 论

目前,CpG ODN作为免疫佐剂治疗乙型肝炎的机制尚未明确,且缺乏系统的研究^[2,3]。不同CpG ODN的疗效研究报道差异很大^[4,5]。5'-嘌呤-嘌呤-CG-嘧

啉-嘧啶-3' 是大多数免疫刺激基序的结构,但是 CpG 二聚核苷酸两侧临近序列也影响 CpG 的免疫激活效应^[6-8]。在此,我们从乙型肝炎病毒感染免疫学机制,来研究不同的 CpG ODN 刺激慢性 HBV 感染者免疫细胞的功能变化。

研究结果显示:在 31 例慢性 HBV 感染者中,HBsAg 和 3 种混合刺激物分别与 PBMC 孵育所产生的 IFN- γ 斑点数是 201 ± 51 和 215 ± 63 、 218 ± 63 、 216 ± 59 。HBsAg 与 3 种混合刺激物无论是在慢性 HBV 感染者还是正常对照组状态比较均无显著性差异;由于 PBMC 中表达 TLR9 的细胞主要是 DC 和 B 细胞,尤其是 pDC (plasmacytoid dendritic cell) 表达最为丰富,然而慢性 HBV 感染者的 DC 数量和功能均明显下降^[8],在本研究中 CpG ODN 不能显著增强 HBsAg 刺激 PBMC 分泌 IFN- γ ,其原因很可能是 DC 数量和功能均明显下降,同时与 HBV 病毒抗原特异性免疫有关,不足以体现 CpG ODN 在免疫治疗方面的优越性。

3 种混合物刺激 PBMC 产生 IFN- γ 的斑点数间两两比较的 P 值均大于 0.05,且在不同免疫状态组之间均一样。国内外许多学者在寻找对人和动物免疫细胞刺激效果好的 CpG ODN 做了大量的工作,其中效果比较理想的是含有主要基序 GTCGTC 的 CpGT7 和含有主要基序 GTCGTT 的 CpG1826m^[9,10]。本研究中这两种 CpG ODN 与含主要基序 GACGTT 的 CpG1826,对 HBsAg 增强慢性 HBV 感染者免疫细胞分泌 IFN- γ 的能力没有显著性差异。其可能原因是慢性 HBV 感染者 Th1/Th2 比例下降,细胞免疫功能的低下,导致其对 CpG ODN 的刺激效应差,不足以体现不同 CpG ODN 之间的差异;不同基序的 CpG ODN 刺激慢性 HBV 感染者免疫细胞尽管存在不同的差异,但 CpG ODN 的刺激性强,不足以体现 3 者之间的显著性差异。

不同 HBsAg + CpG ODN 刺激分泌 IFN- γ 斑点数在不同免疫状态组间两两比较均有显著性差异($P < 0.05$)。其中免疫清除组最多,其次是免疫耐受组,正常对照组最少。可能的原因:经 HBsAg + CpG ODN 孵育后 DC 细胞因子分泌异常状态改变,IL-12 分泌增加,IL-6 分泌减少,也促进 DC 功能恢复。由于 DC 功能缺陷的部分纠正,对 HBsAg 抗原呈递能力增强,特异性激活 CD8⁺T 细胞和 CD4⁺T 细胞 IFN- γ 、IL-2 等水平升高,机体免疫能力增强,诱导 HBsAg 特异的 CTL 反应,从而清除病毒及表达 HBsAg 抗原的感染了 HBV 的肝细胞^[11,12];在免疫清除组,机体进入免疫激活状态,许多 Th1 型淋巴细胞激活机体的 CTL 细胞的过程中已产生一定的 IFN- γ ,如 CD4⁺T、NK 细胞;处于免疫耐受状态下的慢性 HBV 感染者,Th1/Th2 免疫下降,以 Th2 免疫为主,当再次接触免疫原时,激起以 IFN- γ 为代表的 Th1 型反应免疫耐受比免疫清除状态下弱。

处于免疫清除期, M 刺激 PBMC 产生的 IFN- γ 斑点数与血清 ALT 之间相关性分析均有显著性差异。ALT 是评价慢性 HBV 感染者肝脏炎症状况和免疫状态分期常用的临床指标,通过研究免疫清除状态下 HBV 感染者 ALT 与 IFN- γ 分泌的相关性,对于寻找 CpG ODN 的最适治疗时机,使 CpG ODN 能够更好地通过刺激抗原提呈细胞,分泌 IFN- γ 诱导向 Th1 分化,增强慢性 HBV 感染者细胞免疫应

答途径具有重要的意义。此实验研究表明,在慢性 HBV 感染 $80 \text{ U/L} < \text{ALT} < 400 \text{ U/L}$ 时, M 刺激机体免疫细胞产生 $\text{IFN-}\gamma$ 的量与机体本身的肝脏炎症活动度具有正相关性($r = 0.856; P = 0.006$)。

因此纯化 PBMC 中的 DC, 深入探讨慢性 HBV 持续感染的发病机制, 寻找对慢性 HBV 感染者免疫细胞功能刺激效果更好的 CpG ODN 和探索更加适宜的刺激条件和免疫状态, 对于后续研究 CpG ODN 治疗慢性 HBV 感染者具有重要的意义。

参 考 文 献

- 1 Chisari FV, Ferrari C. Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Annu Rev Immunol*, 1995, 13:29-60.
- 2 Chichester JA, Feitelson MA, Calkins CE. Transient inhibition of Th1-type cytokine production by CD4 T cells in hepatitis B core antigen immunized mice is mediated by regulatory T cells. *Immunology*, 2006, 118:438-448.
- 3 Malanchère-Brès E, Payette PJ, Mancini M, et al. CpG oligodeoxynucleotides with hepatitis B surface antigen(HBsAg) for vaccination in HBsAg-transgenic mice. *J Virol*, 2001, 75:6482-6491.
- 4 Verthelyi D, Ishii KJ, Gursel M, et al. Human peripheral blood cells differentially recognize and respond to two distinct CPG motifs. *J Immunol*, 2001, 166:2372-2377.
- 5 Li N, Fan XG, Chen ZH, et al. Anti-HBV effects of CpG oligodeoxynucleotide-activated peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic hepatitis B. *APMIS*, 2005, 113:647-654.
- 6 Klinman DM. Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides. *Nat Rev Immunol*, 2004, 4:249-258.
- 7 Verthelyi D, Klinman DM. Immunoregulatory activity of CpG oligonucleotides in humans and nonhuman primates. *Clin Immunol*, 2003, 109:64-71.
- 8 van der Molen RG, Sprengers D, Binda RS, et al. Functional impairment of myeloid and plasmacytoid dendritic cells of patients with chronic hepatitis B. *Hepatology*, 2004, 40:738-746.
- 9 Hartmann G, Weeratna RD, Ballas ZK, et al. Delineation of a CpG phosphorothioate oligodeoxynucleotide for activating primate immune responses in vitro and in vivo. *J Immunol*, 2000, 164:1617-1624.
- 10 Xu HL, Wang SQ, Wang SF, et al. Delineation of CpG motifs for activating human immune cells. *Chin J Microbiol Immunol*, 2001, 121:471-475.
- 11 刘惠萍, 郑曲波, 祖萍, 等. 高剂量乙型肝炎疫苗对体内血树突状细胞的影响. *上海免疫学杂志*, 2003, 23, 351-356.
- 12 曲建慧, 张玲霞, 成军, 等. 乙型肝炎治疗的新靶点与新方法. *世界华人消化杂志* 2004, 12:1663-1666.

(收稿日期:2008-06-21)

(本文编辑:王丹静)

向天新, 鄢小萍, 李明慧, 等. 含 CpG 的不同寡脱氧核苷酸对慢性 HBV 感染者外周血单个核细胞刺激能力的研究[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志: 电子版*, 2008, 2(4):271-276.