

[文章编号] 1000- 4718(2005)09- 1843- 03

树突状细胞疫苗对慢性乙型肝炎的治疗作用*

赵岐刚, 张书广, 焉 鹏, 张颖新, 王伟华

(山东省聊城市人民医院, 山东 聊城 252000)

[摘要] 目的: 探讨自体乙肝疫苗致敏的树突状细胞(DC)对慢性乙型肝炎(CHB)免疫治疗的作用。方法: 取患者外周血 20 mL 分离单个核细胞, 加入重组人粒细胞- 巨噬细胞集落刺激因子(rhGM- CSF)和白细胞介素 4(IL- 4)进行 DC 体外扩增, 于培养第 5 d 加入 50 mg/L 乙型肝炎疫苗, 7 d 收获细胞。34 例慢性乙肝患者根据年龄和发病时间分为治疗 1 2 3 组, 皮内回输 DC。对照组患者注射等量生理盐水, 均每周 1 次, 连续 8 次。于回输 DC 后 2 周检测患者血清乙型肝炎病毒 DNA(HBV- DNA)含量。结果: 培养可得到形态及功能典型的 DC, 治疗 1 2 3 组患者回输 DC 后血清 HBV- DNA 拷贝数均显著低于对照组($P < 0.01$), 总应答率 58.8% (20/34), 对照组注射前后没有明显差异($P < 0.05$); 治疗 1 组与 3 组相比 HBV- DNA 定量拷贝数降低幅度有显著差异($P < 0.01$), 治疗 1 组与 2 组 2 组与 3 组相比无显著差异($P > 0.05$)。结论: 经乙型肝炎疫苗致敏的 DC 回输患者后, 其血清 HBV- DNA 含量明显降低, 且降低幅度与感染病毒时间和/或患者年龄有一定关系。

[关键词] 树突细胞; 肝炎疫苗, 乙型; 肝炎病毒, 乙型

[KEY WORDS] Dendritic cells; Hepatitis B vaccines; Hepatitis B virus

[中图分类号] R363 [文献标识码] A

慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)患者存在 DC 表型和功能的缺失, 抗原递呈不足可能是导致乙肝病毒(hepatitis B virus, HBV)感染慢性化的原因之一, 因此, 调控或恢复其 DC 的相关功能, 将 DC 作为一种免疫增强剂, 可能对降低 CHB 患者血清 HBV- DNA 含量有一定作用。本研究通过体外扩增并回输 DC, 观察对不同年龄组 CHB 患者的影响。

材 料 和 方 法

1 病例选择

按照 2000 年修订的《病毒性肝炎防治方案》^[1] 诊断标准, 选择 2001 年 1 月至 2002 年 1 月来本院感染科就诊的 CHB 患者 34 例, 按感染病毒的时间和患者年龄分为 3 组(见表 1)。对照组为 CHB 患者经治疗效果不明显, 自愿停止用药者。4 组患者均不合并其它肝脏疾病, 且不同程度存在丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)升高, 乙肝病毒表面抗原(HBsAg)、乙肝病毒 e 抗原(HBeAg)、乙肝病毒核心抗体(HBcAg)阳性, 血清 HBV- DNA 含量升高。同种混合淋巴细胞反应正常对照组选择 10 例健康自愿者, 其中男 7 例, 女 3 例, 年龄 21- 43 岁。

2 DC 体外培养

2.1 主要试剂 重组人粒细胞- 巨噬细胞集落刺激因子(rhGM- CSF)购自深圳晶美公司, 重组人白细胞介素 4(IL- 4)购自中国军事医学科学院, 乙型肝炎疫苗购自中国预防医学科学院华尔盾生物技术公司, 淋巴细胞分离液购自天津血

液病研究所。

表 1 各组患者一般情况比较表

Tab 1 General comparison among various groups

Contents	Control group	Group 1	Group 2	Group 3
Number	20	10	12	12
Sex				
Man	14	7	8	9
Women	6	3	4	3
Age(years)	24- 51	11- 20	21- 28	32- 60
History(years)	4.5- 36	0.5- 8.5	3.5- 18	10- 42.5

2.2 DC 培养 无菌条件下取患者空腹静脉血 20 mL, 用 PBS 以 1:1 的比例稀释后沿离心管壁缓慢加到淋巴细胞分离液上, 1 000 r/min 离心 20 min 后, 取白膜层细胞, PBS 洗涤 2 次, 再用 pH 7.0 的 RPMI- 1640 洗涤 1 次, 最后用含体积分数为 10% 的人 AB 型血清的 RPMI- 1640 培养基悬浮细胞, 终浓度为 2×10^9 cells/L 于培养瓶内, 置 37 °C 5% CO₂ 培养箱孵育 2 h 后, 贴壁细胞用 pH 7.0 的 RPMI- 1640 洗涤 3 次, 洗去非粘附细胞。按终浓度 rhGM- CSF 10^6 U/L 1, rhIL- 4 5×10^5 U/L 加入细胞因子, 隔日加首次 1/2 浓度的细胞因子和培养基, 培养第 5 d 加入浓度 50 mg/L 乙肝疫苗, 37 °C 5% CO₂ 培养 2 d 后收集细胞。

3 DC 确证试验

应用光镜和扫描电镜观察 DC 形态; 免疫组化检测 DC 表

[收稿日期] 2003- 11- 04 [修回日期] 2004- 02- 04

* [基金项目] 山东省聊城市科技攻关项目(No. 2000219)

面的 CD1a 表达; 治疗 3 个组分别选择 10 例患者进行同种混合淋巴细胞培养, 检测 DC 刺激淋巴细胞增殖的能力。3 项试验操作步骤略。

4 HBV- DNA 含量测定

应用荧光定量聚合酶链反应(FQ- PCR)方法(操作步骤略)。HBV- DNA 下降 $\geq 10^6$ 拷贝/L 为明显应答, 应答率= (转阴例数+ 明显应答例数)/ 组例数。

5 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 差异显著性检验采用秩和检验。

结 果

1 DC 形态

单个核细胞培养 2 h 后, 获得贴壁细胞。加入 GM- CSF、IL- 4 后贴壁细胞逐渐减少, 悬浮细胞不断增多, 并呈细胞聚集现象, 同时出现形态不规则, 电镜下可见树突状突起(细胞形态见图 1)。培养 5 d 后, 可见大量具有树突状突起的悬浮细胞。并随着培养时间的延长, 细胞体积逐渐变大, 树突状突起更加明显。

2 CD1a 表达

培养过程中加入细胞因子 rhGM- CSF 和 rhIL- 4 后第 3 d 和第 5 d DC 的 CD1a 表达阳性率分别为 48% 和 73% (阳性细胞形态见图 2)。

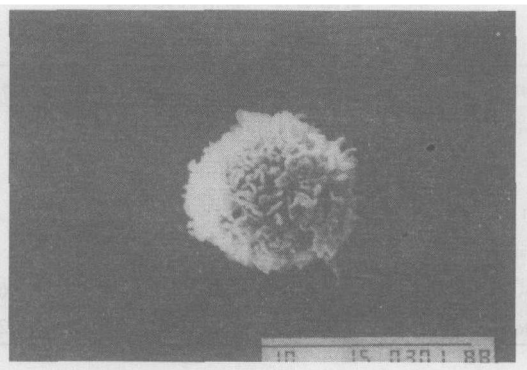


Fig 1 DCs morphology cultured for 7 days under scanning electron microscope ($\times 2\ 400$).

图 1 培养 7 d 扫描电镜下 DC 形态

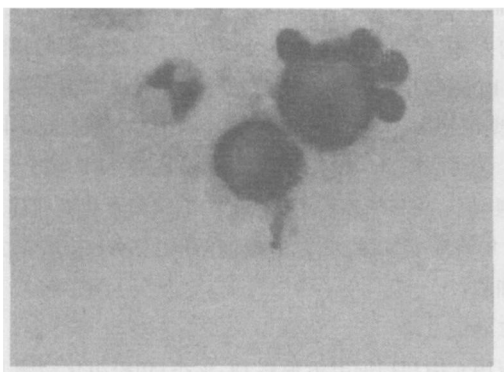


Fig 2 Morphology of CD1a positive DCs ($\times 1\ 000$).

图 2 CD1a 阳性细胞形态

3 同种混合淋巴细胞反应

DC 刺激效应细胞增殖能力用刺激指数(SI)表示, SI= 实验孔 A_{550} / 对照孔 A_{550} 。治疗 1 2 3 组培养得到的 DC 均具有较强的刺激淋巴细胞增殖的能力, 且随 DC 比例的提高刺激能力增强, 3 组 DC 之间的 SI 值没有显著差异($P > 0.05$)。3 个治疗组 SI 值明显低于正常对照组($P < 0.01$) (结果见表 2)。

表 2 DC 刺激同种淋巴细胞增殖的刺激指数

Tab 2 Stimulated index allogenic lymphocytes proliferation by DCs ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

DC: lym	Control	Group 1	Group 2	Group 3
1: 100	2.24 \pm 0.39	1.76 \pm 0.31 Δ	1.58 \pm 0.32 Δ	1.40 \pm 0.31 Δ
1: 50	2.96 \pm 0.52	2.19 \pm 0.45 Δ	1.98 \pm 0.43 Δ	1.83 \pm 0.40 Δ
1: 10	3.68 \pm 0.56	2.53 \pm 0.50 Δ	2.45 \pm 0.47 Δ	2.25 \pm 0.31 Δ

$\Delta P < 0.01$ vs control group; lym: lymphocyte.

4 HBV- DNA 检测

3 个治疗组回输 DC 后转阴例数无明显区别(2: 1: 1 例), 明显应答例数依次为 7、6、3 例, 应答率为 90.0%、58.3%、33.3%, 总应答率 58.8% (20/34), 对照组输注生理盐水前后没有明显差异。3 个治疗组 HBV- DNA 定量拷贝数下降与对照组以及治疗 1 组与治疗 3 组相比均具有显著差异($P < 0.01$), 治疗 1 组与 2 组、2 组与 3 组相比没有显著差异($P > 0.05$)。

讨 论

细胞免疫功能低下是 HBV 感染慢性化的主要因素^[2], 作为主要的抗原递呈细胞, DC 不仅将处理后的抗原决定簇传递给淋巴细胞, 实际上, 它还具有调节和控制淋巴细胞活化、增殖、分化的作用, 因此, DC 的功能缺陷将直接影响 T 细胞免疫反应而形成免疫耐受。Shimizu 等^[3]发现给 HBV 转基因小鼠输入经细胞因子活化的 DC 即可打破这种耐受。本实验中培养得到的 DC 回输 CHB 患者后具有较强识别体内 HBV 的能力, 可不同程度地上调 DC 介导的针对 HBV 特异性免疫反应, 这种应答效果的差异性, 有学者认为可能为个体免疫状态如 T 淋巴细胞反应的强度、表位特异性以及细胞因子分泌情况等差异较大, 免疫应答水平降低程度不同而引起^[4]。研究中还发现, 应答水平的强弱还与患者携带病毒的时间和/或年龄有一定关系, 治疗 1 组患者年龄小、携带病毒时间短, 应答率高, 与治疗 3 组相比有显著差异, 原因可能与自身细胞免疫抑制程度的不同有关; 另外病毒在体内容易发生变异, 这种变异的程度与病毒潜伏的时间有关, 时间长变异程度大, 更加促使机体成为一种免疫耐受状态, 使患者不同程度地产生比较弱的细胞毒性淋巴细胞(CTL)反应; 再者从表 2 可知, 3 个治疗组培养得到的 DC 刺激自体淋巴细胞增殖的 SI 间虽没有显著差异, 但 3 个组的 DC 与效应细胞不同比例间存在一定差距, 即 $SI_1 > SI_2 > SI_3$, 说明患者感染病毒时间和/或年龄

的病理生理过程。本结果表明 tPA 在内皮细胞缺氧损伤过程中已发挥作用。其作用可能一方面通过降解细胞外基质,促进新生血管形成;同时通过触发蛋白水解级联反应而引起脑缺血后出血转变。

以往认为 PAI-1 是一种具有促进血栓形成作用的因子^[5]。本实验内皮细胞损伤后 PAI-1 表达增多,推测 PAI-1 可能通过抑制 tPA 的早期蛋白水解活性,起促进血栓形成的作用;同时可能通过阻断 tPA 引起的蛋白水解级联反应而维持基膜的完整性,在一定程度上发挥保护作用。

本实验应用液体石蜡封闭内皮细胞培养液表面,阻止氧气进入培养液,由此造成细胞缺氧。本模型简便易行,缺氧效果确切。实验结果显示,该模型可用于研究缺氧条件下细胞病理生理变化。本实验结果表明,低氧低糖可使体外培养的内皮细胞分泌 tPA PAI-1 增多,参与脑缺血内皮细胞损伤过程。

[参 考 文 献]

[1] Plate KH. Mechanisms of angiogenesis in the brain[J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1999, 58(4): 313- 320.
 [2] Xu J, He L, Ahmed SH, et al. Oxygen- glucose deprivation

induces inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine expression in cerebral endothelial cells[J]. *Stroke*, 2000, 31(7): 1744- 1751.

[3] Uchiyama T, Kurabayashi M, Ohyama Y, et al. Hypoxia induces transcription of the plasminogen activator inhibitor- 1 gene through genistein- sensitive tyrosine kinase pathways in vascular endothelial cells[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, 20(4): 1155- 1161.
 [4] Shatos MA, Doherty JM, Stump DC, et al. Oxygen radicals generated during anoxia followed by reoxygenation reduce the synthesis of tissue- type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor- 1 in human endothelial cell culture [J]. *J Biol Chem*, 1990, 265(33): 20443- 20448.
 [5] Dietzmann K, von Bossanyi P, Krause D, et al. Expression of the plasminogen activator system and the inhibitors PAI- 1 and PAI- 2 in posttraumatic lesions of the CNS and brain injuries following dramatic circulatory arrests: an immunohistochemical study[J]. *Pathol Res Pract*, 2000, 196(1): 15- 21.

(上接第 1844 页)

不同,DC 功能缺失程度不同。提示应用 DC 进行免疫治疗宜选择年龄较小且感染病毒时间较短的患者。

总之,本研究所应用的方法可成功培养得到 DC,经乙肝疫苗致敏后回输,可使 58.8% 的 CHB 患者产生较强的免疫应答,将来可能是 CHB 患者免疫治疗较有前途的方法之一。但由于本实验样本数量小,随访观察时间短,有许多问题需扩大样本数目进行进一步研究探讨。

[参 考 文 献]

[1] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝脏病学分会. 病毒性肝炎防治方案[J]. *中华肝脏病杂志*, 2000, 8(6): 324- 329.

[2] You Z, Huang XF, Hester J, et al. Induction of vigorous helper and cytotoxic T cell as well as B cell responses by dendritic cells expressing a modified antigen targeting receptor mediated internalization pathway [J]. *J Immunol*, 2000, 65: 4581- 4591.
 [3] Shimizu Y, Guidotti LG, Fowler P, et al. Dendritic cell immunization breaks cytotoxic T lymphocyte tolerance in hepatitis B virus transgenic mice[J]. *J Immunol*, 1998, 161: 4520- 4529.
 [4] Lipscomb MF, Masten BJ. Dendritic cells, immune regulators in health and disease[J]. *Physiol Rev*, 2002, 82: 97- 130.