

从造血干细胞角度研究 乙肝病毒持续性感染机制

李用国 教授

哈尔滨医科大学附属第一医院感染科

一、研究背景

1、乙肝病毒持续性感染的危害没有解除

2、免疫耐受和免疫抑制是
乙肝病毒持续性感染的关键因素

(1) 病毒因素：主要是变异和抑制

(2) 机体因素：免疫抑制，免疫耐受

3、HBV感染造血干细胞可能是造成免疫耐受和免疫抑制的最重要原因之一

- * 无论是免疫耐受还是免疫抑制，免疫细胞处于对HBV抗原的无应答状态或低应答状态
- * 造血干细胞决定免疫细胞命运
- * 造血干细胞: 自我复制和分化，摄取外源基因，因此可能首先被HBV感染
- * 干细胞移植治疗白血病时HBVDNA和HBsAg转阴-免疫重建

免疫耐受
或抑制

← 个体发育越早期

免疫细胞



HBV抗原

无（低）应答

自我复制和分化
摄取外源基因

造血干细胞



HBV感染作用于造血干细胞，导致其活性降低，可能是垂直传播引起免疫耐受的另一种重要原因

二、研究目的

- 从造血干细胞角度研究HBV持续性感染机制-----
- 研究不同载量乙型肝炎病毒与脐血来源的造血干细胞之间的感染规律，以及探讨HBV感染造血干细胞后诱生的树突状细胞的功能状态。

免疫组化 原位杂交
电镜 RT-PCR



HBV可感染造血干细胞

不同载量病毒



感染规律

混合淋巴细胞反应
DC分子表达



分化DC细胞的功能

三、研究结果

1、HBV可以感染造血干细胞

★ 免疫组化:

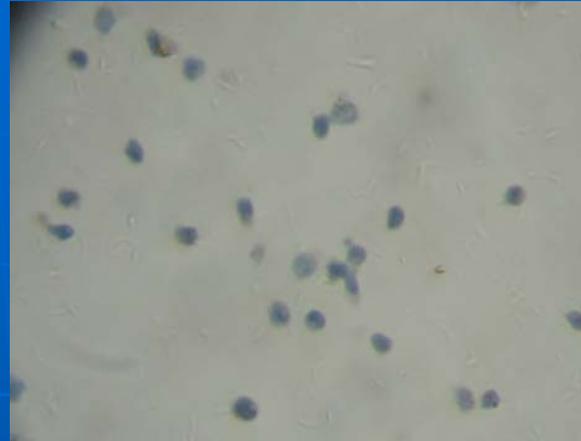
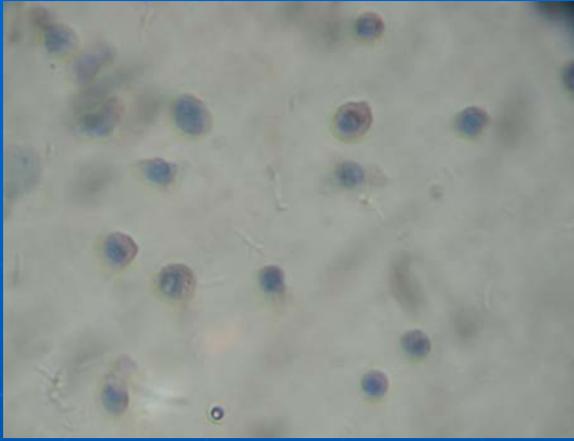


图1 HBV感染组干细胞HbsAg表达 (×400) 图2正常干细胞对照免疫组化 (×400)

★ 原位杂交:

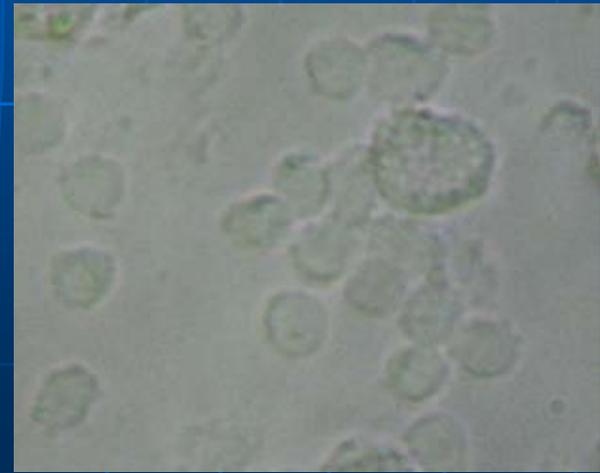
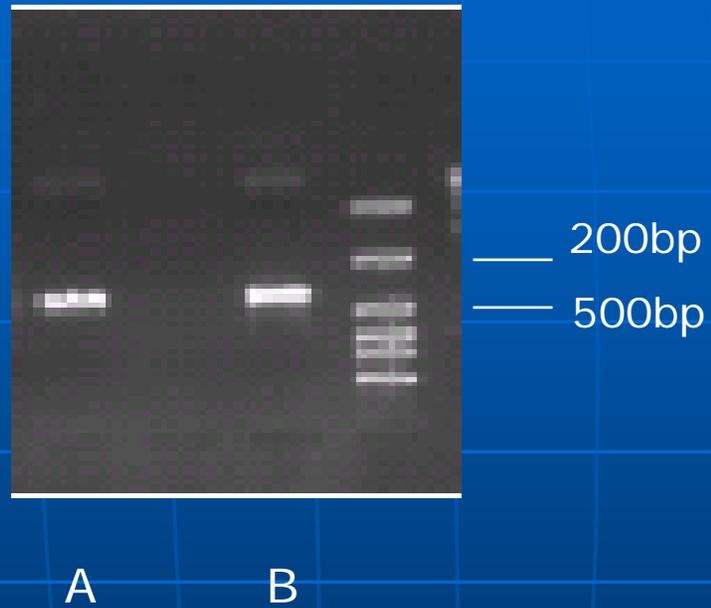


图3 HBV感染干细胞的原位杂交 (×400)

图4 正常干细胞的原位杂交 (×400)



- A. HBV感染干细胞6天细胞内病毒RT-PCR
- B. HBV感染干细胞12天细胞内病毒RT-PCR

HBV感染干细胞后在转录水平的表达

2、HBV随干细胞扩增而复制增加

★不同载量病毒感染造血干细胞后检测细胞内病毒情况

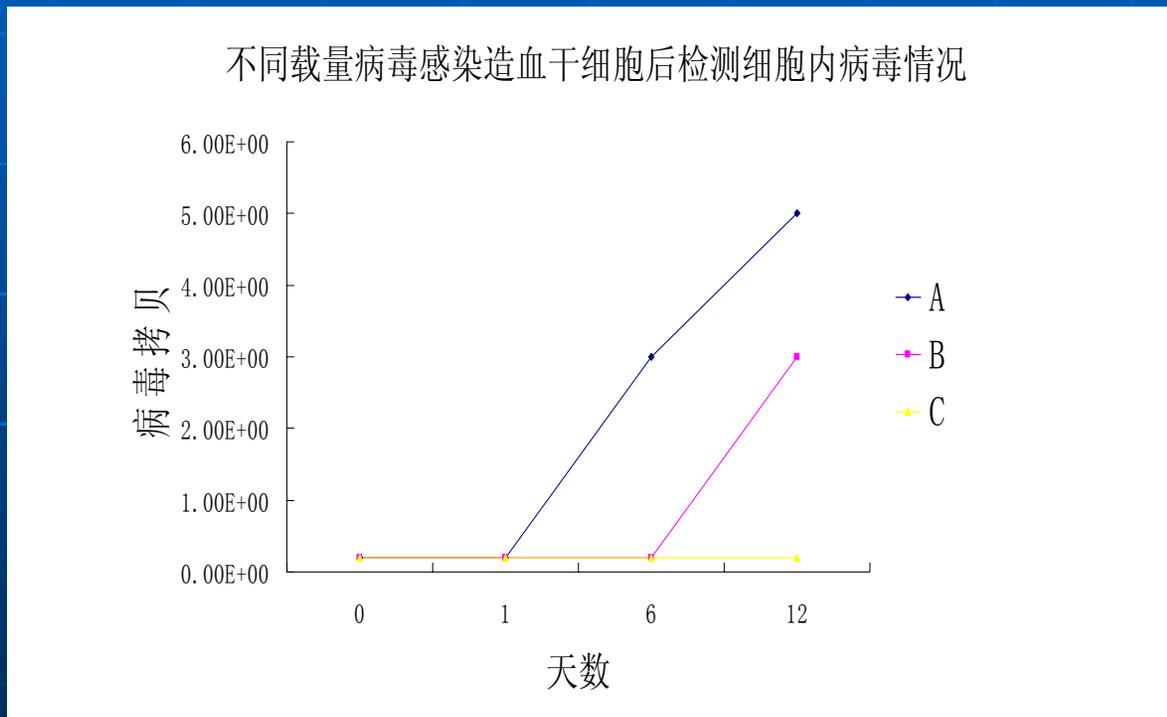


图-5 各组间干细胞内HBV-DNA变化曲线

★不同载量病毒感染造血干细胞后上清病毒变化

表-1各组间上清HBV-DNA载量变化

组别	上清HBV-DNA拷贝 (1×10^5)			
	0d	1d	6d	12d
A	28	31.5 ± 7	201 ± 84	515 ± 77
B	0.31	0.326 ± 0.11	0.729 ± 0.006	9.4 ± 0.56
C	0.0024	0	0	0

A组上清病毒载量在第六天明显上升，B组上清病毒载量在第十二天明显上升，C组上清始终测不出

3、HBV感染造血干细胞下调其诱生的免疫细胞功能

★ HBV感染造血干细胞下调其诱生的DC分子表达

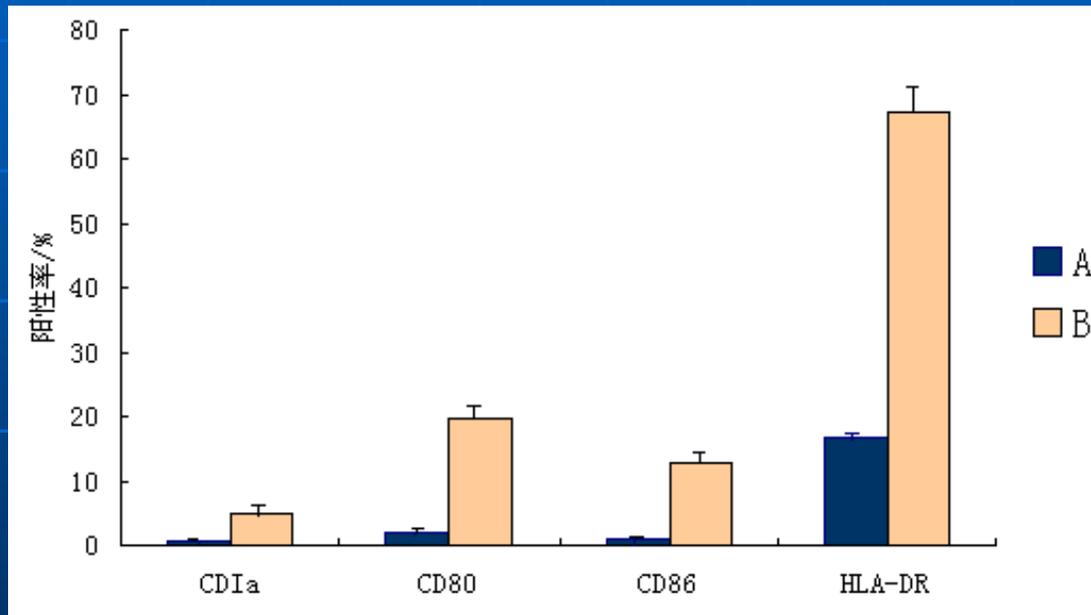


图-8 对照组与病毒组DCs免疫表型比较表达阳性率 (P<0.01)

★同种异体混合淋巴细胞反应MLR (功能试验)

表-2 不同DC在 MLR中T细胞增殖的吸光度值 (±S, n=3)

组别	DC/T淋巴细胞		
	0.05	0.1	0.5
对照组	0.037 ± 0.0026	0.045 ± 0.0031	0.053 ± 0.0012
实验组	0.029 ± 0.0025	0.033 ± 0.0017	0.045 ± 0.0015

注* 对照组DC表现出比实验组强的刺激T淋巴细胞增殖的能力。且差异有统计学意义, 在DC与T淋巴细胞的比例达到0.05时, $P < 0.05$, 在比例达到 0.1, 0.5时, $P < 0.01$ 。

4、慢性乙型肝炎病人骨髓CD34+干细胞被HBV感染

★ 免疫组化：



图9 阳性对照组HBsAg的表达

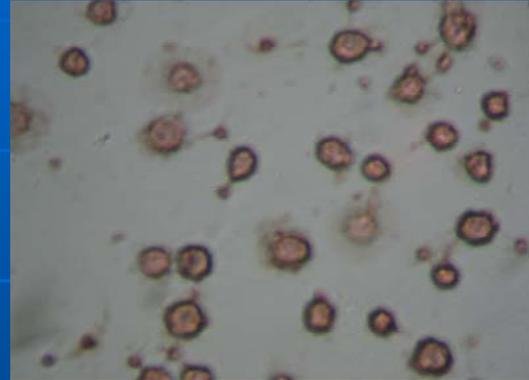


图10 乙肝病人骨髓干细胞HBsAg的表达

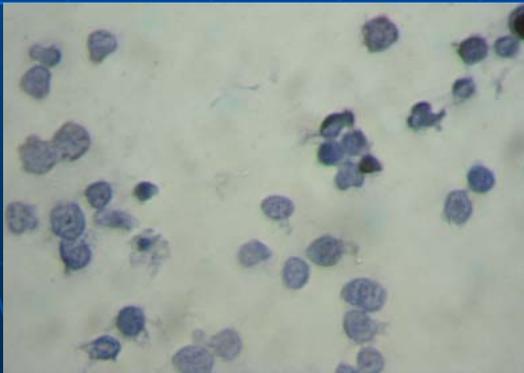


图11 健康人骨髓免疫组化

★ 分子杂交:

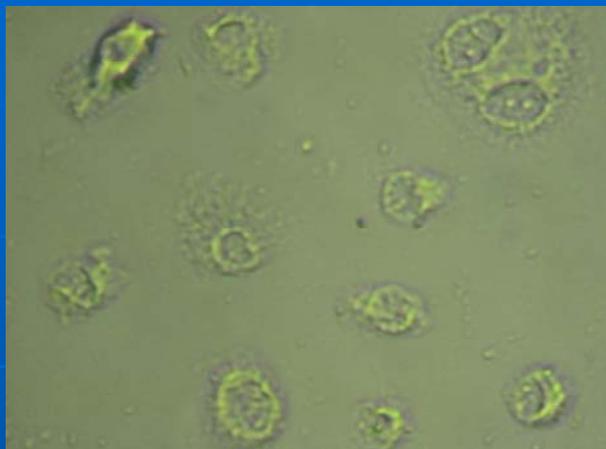


图12 乙肝病人骨髓干细胞

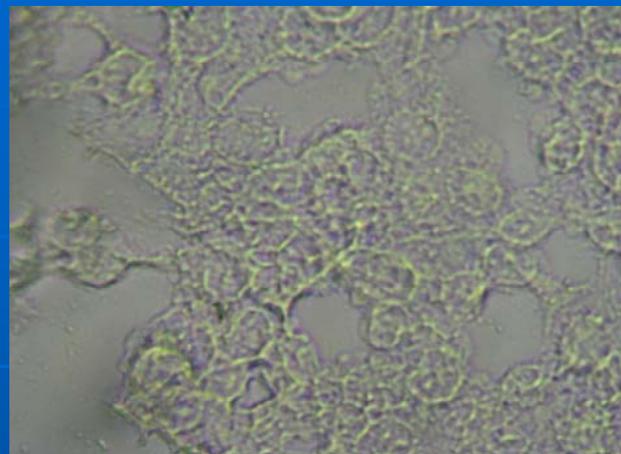


图13阳性对照

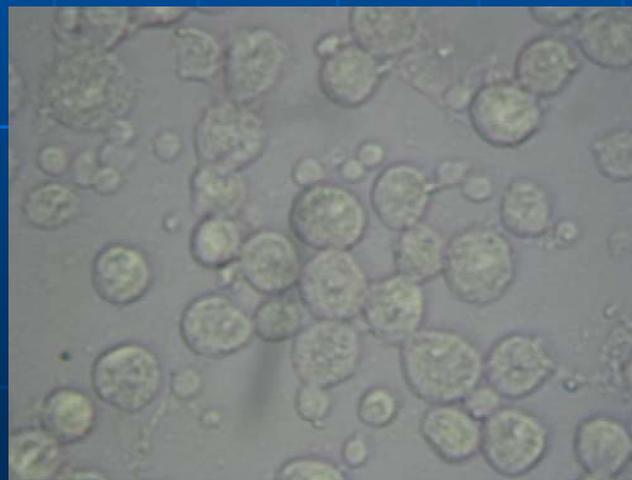
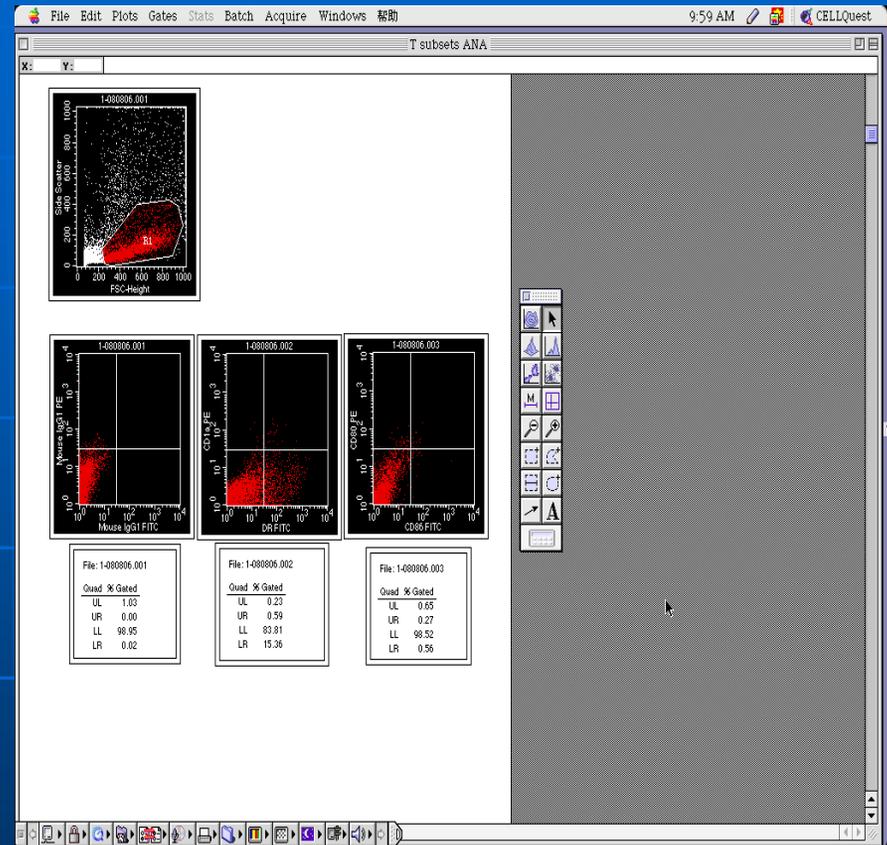
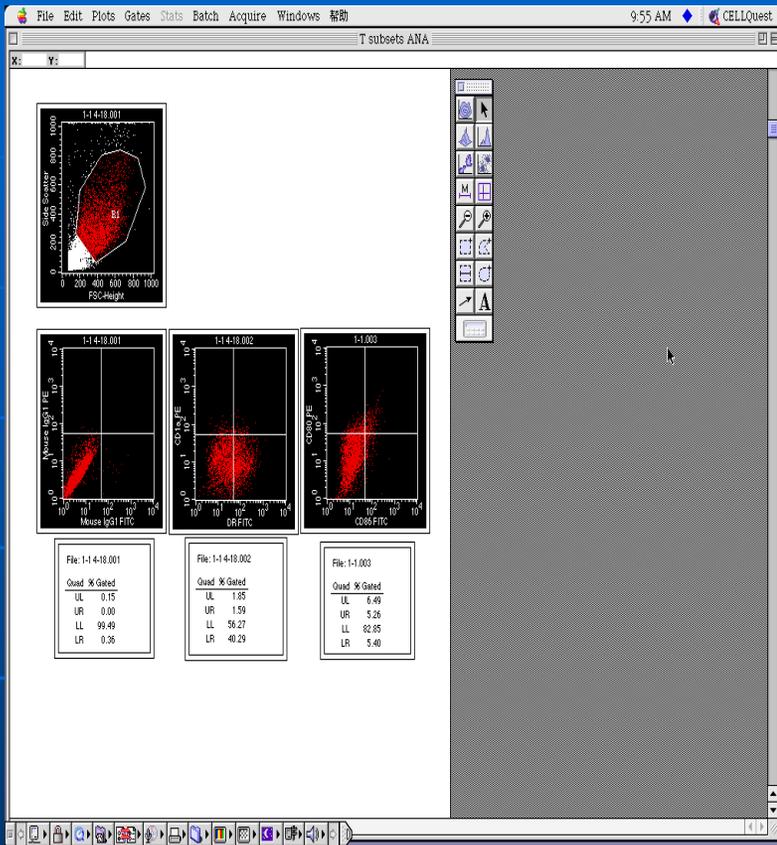


图14健康人骨髓干细胞

5、乙肝骨髓造血干细胞诱导的DC功能下降



正常干细胞诱导的DCs表面分子表达流式图

病毒感染干细胞诱导的DCs表面分子表达流式图

CD86: 10.86 ; CD80: 11.75

CD86: 0.83 ; CD80: 0.82

CD1a: 3.44 ; HLA-DR: 41.88

CD1a: 0.82 ; HLA-DR: 15.95

四、主要创新点：

- 1、该项研究体外证实HBV感染造血干细胞。
- 2、该项研究体外证实HBV可随干细胞扩增而复制增加
- 3、该项研究体外证实HBV可抑制干细胞扩增
- 4、该项研究体外证实HBV下调其分化的DCs功能
- 5、该项研究证实慢性乙型肝炎病人骨髓造血干细胞被HBV感染，并且其分化的DCs功能降低

五、结论

HBV感染造血干细胞是HBV持续性
感染的重要原因

造血干细胞移植治疗慢性乙肝？

■ 课题资助

- 国家自然科学基金资助 (30571638)
- 2006年1月 - 2008年12月

Thank you

