

# HBeAg 对髓样树突状细胞 Toll 样受体 4 及 NF- $\kappa$ B 信号通路的影响

燕飞 汤永志 朱坚胜 朱敏 陈华忠 刘均艳

**【摘要】** 目的 探讨 HBeAg 对髓样树突状细胞(mDC)Toll 样受体 4(TLR4)及 NF- $\kappa$ B 信号通路的影响。方法 将健康者外周血单核细胞诱导分化为未成熟 mDC;加入 HBeAg 体外刺激,经脂多糖(LPS)刺激获得成熟 mDC。采用 Western blot 法检测 TLR4、NF- $\kappa$ B 信号通路蛋白相对表达量,MTS 法检测 mDC 刺激同种异体淋巴细胞增殖能力。结果 培养至第 9 天,HBeAg 刺激组 TLR4、NF- $\kappa$ B 相对表达量为  $0.12 \pm 0.01$ 、 $0.75 \pm 0.12$ ,分别低于对照组的  $0.27 \pm 0.03$ 、 $1.20 \pm 0.13$ (均  $P < 0.05$ )。在 DC/淋巴细胞比例为 1:5、1:10、1:20 的反应中,HBeAg 刺激组刺激指数为  $2.93 \pm 0.05$ 、 $2.56 \pm 0.19$ 、 $1.44 \pm 0.09$ ,分别低于对照组的  $4.83 \pm 0.05$ 、 $3.57 \pm 0.35$ 、 $2.13 \pm 0.11$ (均  $P < 0.05$ )。结论 HBeAg 抑制 mDC TLR4 信号通路蛋白的表达,减弱 mDC 刺激同种异体淋巴细胞增殖能力。

**【关键词】** 髓样树突状细胞 HBeAg Toll 样受体 4 NF- $\kappa$ B

Effect of HBeAg on toll like receptor 4 and NF- $\kappa$ B signaling pathway in human dendritic cells YAN Fei, TANG Yongzhi, ZHU Jiansheng, et al. Department of Infectious Diseases, Taizhou Hospital of Zhejiang Province, Taizhou 317000, China

**【Abstract】** **Objective** To investigate the effect of HBeAg on the toll-like receptor 4(TLR4) and nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) signaling pathway in human monocyte-derived dendritic cells (mDCs). **Methods** The peripheral blood mononuclear cells were isolated from healthy volunteers, and then induced and proliferated to immature mDC in vitro. Mature mDCs were obtained after HBeAg and lipopolysaccharide stimulation. The expression of TLR4 and NF- $\kappa$ B proteins was detected with Western blot, and the response of allogeneic lymphocytes was examined with MTS method. **Results** The expression of TLR4 and NF- $\kappa$ B proteins decreased in the HBeAg-stimulated groups ( $0.12 \pm 0.01$ ,  $0.75 \pm 0.12$ ) compared with that of control group ( $0.27 \pm 0.03$ ,  $1.20 \pm 0.13$ ,  $P < 0.05$ ). In response to the DC/lymphocyte with ratio of 1:5, 1:10 and 1:20, the stimulation indexes of the HBeAg stimulation group was  $2.93 \pm 0.05$ ,  $2.56 \pm 0.19$ ,  $1.44 \pm 0.09$  respectively, which were lower than that of the control group ( $4.83 \pm 0.05$ ,  $3.57 \pm 0.35$ ,  $2.13 \pm 0.11$ ,  $P < 0.05$ ). **Conclusion** HBeAg can inhibit TLR4 and NF- $\kappa$ B signaling pathway of mDC, weaken the ability of stimulating T cell proliferation.

**【Key words】** Monocyte-derived dendritic cell HBeAg TLR4 NF- $\kappa$ B

全球约 20 亿人感染过 HBV,约 3.5 亿人是慢性 HBV 携带者,每年约有 60 万人死于急、慢性 HBV 感染<sup>[1]</sup>。HBV 感染后,机体通过细胞毒性 T 淋巴细胞反应杀死或抑制感染细胞内的病毒,控制 HBV 感染。目前认为,机体对 HBV 固有免疫和特异性免疫反应不足是导致病

毒持续感染的主要原因<sup>[2]</sup>。有效的天然免疫反应和相对较强、持续、多特异性的 T 细胞介导的适应性免疫应答,在 HBV 感染机体后的免疫清除中起着重要作用<sup>[3]</sup>。树突状细胞(DC)是脊椎动物免疫系统的前哨,具有捕捉和表达抗原的特殊能力<sup>[4-5]</sup>。在机体清除 HBV 的免疫反应中,DC 作为抗原提呈细胞而起着重要作用。目前研究发现,慢性乙肝患者体内 DC 成熟障碍和功能缺陷<sup>[6]</sup>。DC 表面有广泛的病原分子模式,能产生细胞内信号,以激活宿主反应来识别病原,其中 Toll 样受体(TLR)最具特征性。TLR 是一类跨膜模式识别受体,广泛表达于特异性免疫细胞和非特异性免疫细胞,它在促进先天免疫反应中起着重要作用<sup>[7]</sup>。相关研究表明,TLR4 在肝病进展

DOI: 10.12056/j.issn.1006-2785.2019.41.2.2018-2309

基金项目:浙江省卫生厅基金(2010KYB125);台州恩泽医疗中心(集团)科学研究基金(17EZB13)

作者单位:317000 浙江省台州医院感染科(燕飞、汤永志、朱坚胜、陈华忠、刘均艳),科教科(朱敏)

通信作者:朱坚胜,E-mail:zhujs@enzemed.com

中起着重要作用<sup>[8-9]</sup>。本研究通过体外培养将单核细胞诱导为髓样 DC(mDC),并探讨 HBeAg 对 mDC TLR-4 及 NF- $\kappa$ B 信号通路的影响。

## 1 材料和方法

1.1 主要试剂 重组人粒细胞巨嗜细胞集落刺激因子(rh GM-CSF)、rh IL-4 购自美国 R&D 公司;HBeAg 购自以色列 Prospec 公司;抗人 FITC-人类白细胞抗原-DR、抗人 CD11c-PE、同亚型对照抗体购自美国 Ebioscience 公司;细胞增殖检测(MTS)试剂购自美国 Promega 公司;脂多糖(LPS)购自美国 Sigma-aldrich 公司;RIPA-1640 培养基购自美国 Hyclone 公司;FBS 购自美国 Gibco 公司。

1.2 mDC 体外诱导分化 采集并分离健康志愿者外周血,经淋巴细胞分离液梯度离心法获得单核细胞;用无血清 RIPA-1640 培养基悬浮细胞,在 37℃、5%CO<sub>2</sub> 孵箱培养 2h,PBS 洗去非贴壁细胞,获得贴壁的单核细胞;加入含 20%FBS 的 RIPA-1640 培养基,rh GM-CSF 750IU/ml、rh IL-4 870IU/ml 诱导培养,隔日半量换液并补充 rh GM-CSF、rh IL-4,第 7 天收集悬浮细胞。

1.3 细胞形态及表型鉴定 收集培养 7d 的 mDC,在扫描电镜下观察细胞形态;使用抗人 FITC-人类白细胞抗原-DR、抗人 CD11c-PE 标记,采用流式细胞术鉴定细胞表型。

1.4 HBeAg 刺激 mDC 在培养 7d 的 mDC 中加入 HBeAg 5 $\mu$ g/ml 或不加 HBeAg(对照组),培养 24h;每孔加入 LPS 1 $\mu$ g/ml 培养,第 9 天收集悬浮细胞。

1.5 HBeAg 对 TLR4、NF- $\kappa$ B 信号通路蛋白表达的影响 采用 Western blot 法检测。收集上述各组培养 9d 的 mDC,提取蛋白;将各组蛋白等量上样,经过电泳、转膜、封闭,分别加入 TLR4、NF- $\kappa$ B 一抗,4℃孵育过夜,二抗室温孵育 2h,增强化学发光法显色。采用紫外投射凝胶成像系统扫描后,应用 Quantlty one 软件进行灰度值分析。计算样本目的蛋白灰度值/内参基因条带灰度值的比值,即蛋白相对表达量。

1.6 HBeAg 对 mDC 刺激同种异体淋巴细胞增殖能力的影响 采用 MTS 法。同样密度梯度离心法分离另一正常人外周血单核细胞,经贴壁 2h 后收集非贴壁细胞,用含 20%FBS 的 RIPA-1640 培养基重新悬浮作为淋巴细胞;收集第 9 天各组 mDC,经丝裂霉素 C 处理后作为刺激细胞。mDC 与淋巴细胞按 1:5、1:10、1:20 的比例加入 96 孔板,共培养 4d。培养结束前 4h,每孔加入 MTS 试剂孵育 4h,检测其吸光度(A)。刺激指数=(A<sub>实验组</sub>-本

底)/(A<sub>对照组</sub>-本底)。

1.7 统计学处理 应用 SPSS 18.0 统计软件。计量资料用  $\bar{x}\pm s$  表示,组间比较采用两独立样本 *t* 检验, $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 mDC 体外培养形态及表型鉴定 外周血单核细胞加入 rh GM-CSF、rh IL-4 培养 7d,光镜下可见悬浮细胞胞体增大,细胞表面可见较多树杈样突起,见图 1a-b;电镜下可见细胞表面粗糙,边缘短小毛刺样突起,为典型 mDC 形态特征,见图 1c。rh GM-CSF+rh IL-4 诱导培养 7d 的悬浮细胞中,CD11c/HLA-DR 双阳性细胞比例为 (86.2 $\pm$ 1.85)%,明显高于单纯培养组的 (9.01 $\pm$ 1.12)%,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见图 2。

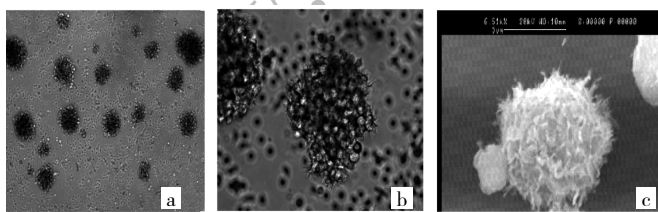


图 1 mDC 体外培养 7d 光镜及电镜下所见(a:光镜下,×100;b:光镜下,×400;c:电镜下,×6510)

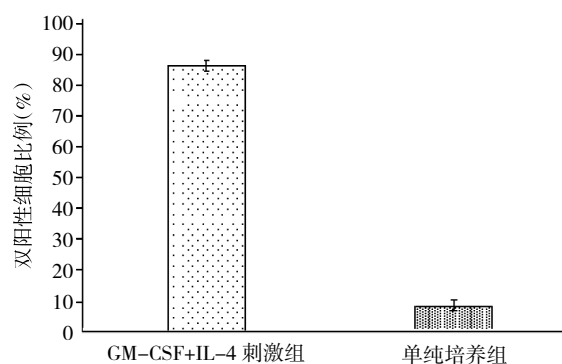


图 2 rh GM-CSF+rh IL-4 诱导组与单纯培养组双阳性细胞比例的比较

2.2 HBeAg 对 TLR4、NF- $\kappa$ B 信号通路蛋白表达的影响 培养至第 9 天,HBeAg 刺激组 TLR4、NF- $\kappa$ B 相对表达量为 0.12 $\pm$ 0.01、0.75 $\pm$ 0.12,分别低于对照组的 0.27 $\pm$ 0.03、1.20 $\pm$ 0.13,差异均有统计学意义(均  $P<0.05$ );提示 HBeAg 抑制 mDC TLR4 信号通路蛋白表达,见图 3。

2.3 HBeAg 对 mDC 刺激同种异体淋巴细胞增殖能力的影响 在 DC/淋巴细胞比例为 1:5、1:10、1:20 的反应中,HBeAg 刺激组刺激指数为 2.93 $\pm$ 0.05、2.56 $\pm$ 0.19、1.44 $\pm$ 0.09,分别低于对照组的 4.83 $\pm$ 0.05、3.57 $\pm$ 0.35、2.13 $\pm$

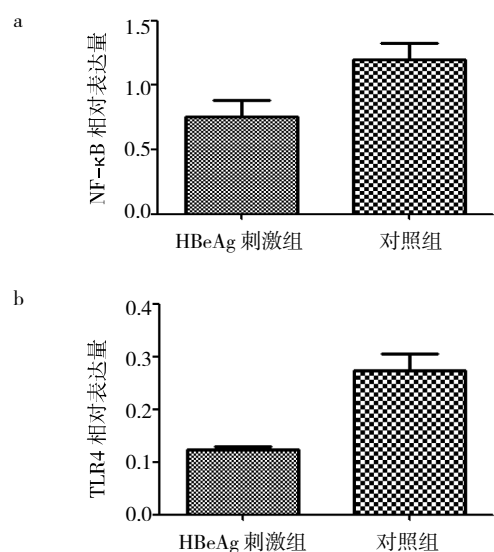


图3 培养至第9天 HBeAg 对通路蛋白表达的影响(a: NF-κB; b: TLR4)

0.11, 差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ ); 提示 HBeAg 减弱 mDC 刺激同种异体淋巴细胞增殖能力。

### 3 讨论

HBV 持续感染是导致肝硬化、肝功能衰竭和肝细胞癌的主要原因。研究发现,慢性乙肝患者针对 HBV 的特异性免疫应答减弱,CD8<sup>+</sup>细胞增殖能力及功能均下降<sup>[10]</sup>。在慢性乙肝患者体内激活 HBV 特异性免疫应答,可以有效控制病毒复制并减轻肝脏损伤<sup>[9]</sup>。现在普遍认为,免疫耐受可能是导致慢性 HBV 感染的一个关键因素,但是具体机制仍不清楚。

近年来,DC 在慢性 HBV 感染免疫学发病机制中的作用受到重视。mDC 是一种功能强大的抗原提呈细胞,在调节 T 细胞功能方面具有重要作用。受微生物抗原刺激后,mDC 可分泌大量 IL-12、IFN- $\gamma$ ,从而诱导 Th1 分化。最近研究表明,慢性 HBV 感染患者 DC 功能明显受损<sup>[6, 11]</sup>。Vander 等<sup>[12]</sup>研究发现,在慢性乙肝患者体内 mDC 数量减少。相关研究发现,与 HBsAg 携带者比较,免疫耐受患者 DC 表面 CD80、CD86 及 HLA-DR 表达下降,刺激淋巴细胞增殖能力下降,IL-12 分泌减少,与 HBV-DNA 呈负相关;同时,DC 功能对 HBeAg 血清学转换具有重要作用<sup>[13]</sup>。研究发现,健康者外周血来源的 mDC 与 HBsAg 共培养后,可刺激 T 细胞能力增强,IL-12 分泌增多<sup>[14]</sup>,DC 对 HBV 复制的抑制作用增强<sup>[6]</sup>。可见,DC 在慢性 HBV 感染的发病机制中具有重要作用。

HBV 的一种或多种抗原可能利用多种途径抑制针对 HBV 的免疫应答,从而导致针对 HBV 的免疫耐受。

HBeAg 对 HBV 感染和复制并不是必需的;但有研究表明 HBeAg 对慢性 HBV 感染是必需的,且可能在慢性乙肝患者免疫应答中起着免疫调节作用<sup>[10, 15]</sup>。Purvina 等<sup>[16]</sup>研究证实 HBeAg 通过 IL-1 信号抑制 T 淋巴细胞增殖,反过来又促进慢性感染的发生。另一研究结果发现,HBeAg 可通过下调 IL-18 介导的 IFN- $\gamma$  表达来调节免疫应答<sup>[17]</sup>。Chen 等<sup>[10]</sup>研究结果显示,HBeAg 可以抑制淋巴细胞的增殖,减少 IFN- $\gamma$  的产生,这可能是 HBV 免疫耐受的分子机制之一。健康者单核细胞来源的 mDC 经 HBeAg 刺激后,淋巴细胞增殖能力明显减弱,即 HBeAg 刺激后的 mDC 免疫应答反应明显减弱,但通过什么信号途径调节 DC 功能尚不清楚。TLR4 通过病原体相关分子模式识别病原体,从而激活下游 NF-κB、MAPK 信号转导途径,引起下游细胞因子分泌增加,发挥重要的免疫作用。研究发现 TLR4 的激活可抑制 HBV 感染,且 TLR4 的抗病毒作用通过 NF-κB 途径进行<sup>[18]</sup>。然而,HBeAg 抑制了 TLR 介导的炎症转录因子、NF-κB 和 IFN- $\beta$  的激活<sup>[19]</sup>,可能是慢性 HBV 感染的原因之一。但是,关于 HBeAg 能否通过 TLR4 信号通路影响 DC 功能,目前仍不清楚。本研究结果发现,HBeAg 刺激 mDC 后,TLR4、NF-κB 蛋白相对表达量明显下降;TLR4 及下游 NF-κB 蛋白被抑制后,mDC 刺激 T 淋巴细胞增殖能力明显减弱。可见,HBeAg 通过 TLR4 及 NF-κB 信号通路抑制 DC 的特异性免疫反应。

综上所述,HBeAg 刺激 mDC 后,可抑制 TLR4 及 NF-κB 信号通路,减弱 DC 的免疫功能,可能是 HBV 免疫耐受的机制之一,这为认识持续 HBV 感染的形成原因提供了新信息。由于 TLR4 下游有 NF-κB 和 MAPK 通路,因此进一步研究 HBeAg 是否通过影响 MAPK 信号通路来抑制 DC 免疫功能,有助于从分子机制方面阐明持续 HBV 感染的原因。

### 4 参考文献

- [1] Te HS, Jensen DM. Epidemiology of hepatitis B and C viruses: a global overview[J]. Clin Liver Dis, 2010, 14(1):1-21.DOI:10.1016/j.cld.2009.11.009.
- [2] Cheng X, Xia Y, Serti E, et al. Hepatitis B virus evades innate immunity of hepatocytes but activates cytokine production by macrophages[J]. Hepatology, 2017, 66(6):1779-1793.DOI:10.1002/hep.29348.
- [3] Boonstra A, Woltman AM, Janssen HL. Immunology of hepatitis B and hepatitis C virus infections[J]. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2008, 22(6):1049-1061.DOI:10.1016/j.bpg.2008.11.015.
- [4] Kim SJ, Diamond B. Modulation of tolerogenic dendritic cells and autoimmunity[J]. Semin Cell Dev Biol, 2015, 41:49-58. DOI:10.1016/

- j.semcd.2014.04.020.
- [5] Kis-Toth K, Szanto A, Thai TH, et al. Cytosolic DNA-activated human dendritic cells are potent activators of the adaptive immune response[J]. *J Immunol*, 2011, 187(3):1222-1234. DOI: 10.4049/jimmunol.1100469.
- [6] Ma YJ, He M, Han JA, et al. A clinical study of HBsAg-activated dendritic cells and cytokine-induced killer cells during the treatment for chronic hepatitis B[J]. *Scand J Immunol*, 2013, 78(4):387-393. DOI:10.1111/sji.12097.
- [7] Zhang Z, Zhang JY, Wang LF, et al. Immunopathogenesis and prognostic immune markers of chronic hepatitis B virus infection[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2012, 27(2):223-230. DOI:10.1111/j.1440-1746.2011.06940.x.
- [8] Nieto JC, Sanchez E, Roman E, et al. Cytokine production in patients with cirrhosis and TLR4 polymorphisms[J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(46):17516-17524. DOI:10.3748/wjg.v20.i46.17516.
- [9] Balmasova IP, Yushchuk ND, Mynbaev OA, et al. Immunopathogenesis of chronic hepatitis B[J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(39):14156-14171. DOI:10.3748/wjg.v20.i39.14156.
- [10] Chen LM, Fan XG, Ma J, et al. Molecular mechanisms of HBeAg in persistent HBV infection[J]. *Hepatol Int*, 2017, 11(1):79-86. DOI:10.1007/s12072-016-9734-5.
- [11] Liaw YF. Natural history of chronic hepatitis B virus infection and long-term outcome under treatment[J]. *Liver Int*, 2009, 29(Suppl 1):100-107. DOI:10.1111/j.1478-3231.2008.01941.x.
- [12] Vander MRG, Sprengers D, Biesta PJ, et al. Favorable effect of adefovir on the number and functionality of myeloid dendritic cells of patients with chronic HBV[J]. *Hepatology*, 2006, 44(4):907-914. DOI:10.1002/hep.21340.
- [13] Lin C, Zou H, Wang S. Hepatitis B e Antigen Seroconversion Is Related with the Function of Dendritic Cells in Chronic Hepatitis B Virus Infection[J]. *Gastroenterol Res Pract*, 2014, 2014:413952. DOI:10.1155/2014/413952.
- [14] 燕飞, 汤永志, 潘柯传, 等. 乙型肝炎表面抗原对单核细胞来源的树突状细胞 Toll 样受体 4 信号通路的影响[J]. *中华传染病杂志*, 2014, 32(2):94-99. DOI:10.3760/cma.j.issn.1000-6680.2014.02.007.
- [15] Han Y, Li J, Jiang L, et al. Regulation of B7-H1 expression on peripheral monocytes and IFN-gamma secretion in T lymphocytes by HBeAg[J]. *Cell Immunol*, 2013, 283(1-2):25-30. DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2017.10.023.
- [16] Purvina M, Hoste A, Rossignol JM, et al. Human hepatitis B viral e antigen and its precursor P20 inhibit T lymphocyte proliferation[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 417(4):1310-1315. DOI:10.1016/j.bbrc.2011.12.138.
- [17] Jegaskanda S, Ahn SH, Skinner N, et al. Downregulation of interleukin-18-mediated cell signaling and interferon gamma expression by the hepatitis B virus e antigen[J]. *J Virol*, 2014, 88(18):10412-10420. DOI: 10.1128/JVI.00111-14.
- [18] Das D, Sarkar N, Sengupta I, et al. Anti-viral role of toll like receptor 4 in hepatitis B virus infection: An in vitro study[J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(47):10341-10352. DOI:10.3748/wjg.v22.i47.10341.
- [19] Lang T, Lo C, Skinner N, et al. The hepatitis B e antigen (HBeAg) targets and suppresses activation of the toll-like receptor signaling pathway[J]. *J Hepatol*, 2011, 55(4):762-769. DOI: 10.1016/j.jhep.2010.12.042.

(收稿日期:2018-09-10)

(本文编辑:陈丹)

(上接第 127 页)

- [4] 叶一农,高志良.乙型肝炎肝衰竭发生机制中的三重打击[J].*传染病信息*, 2009, 22(5):276-279. DOI:10.3969/j.issn.1007-8134.2009.05.006.
- [5] 罗光成,黄云丽,闫惠平,等.HBV 相关慢加急性肝衰竭患者血清细胞因子水平与疾病预后的关系研究[J].*检验医学*, 2014, 29(1):26-30. DOI:10.3969/j.issn.1673-8640.2014.01.006.
- [6] 田光敏,刘鹏.枯否细胞在肝衰竭中的作用及机制研究进展[J].*医学信息*, 2017, 30(2):18-20. DOI:10.3969/j.issn.1006-1959.2017.02.012.
- [7] 伍红艳,颜华东.全身炎症反应综合征对慢性乙型重型肝炎预后的影响研究[J].*现代实用医学*, 2015, 27(2):231-233. DOI:10.3969/j.issn.1671-0800.2014.02.057.
- [8] 胡锐东,刘寿荣.人工肝支持系统治疗肝衰竭的进展及其对细胞因子的影响[J].*中国现代医生*, 2016, 54(24):163-168.
- [9] 高梦丹,赵艳.慢加急性肝衰竭患者预后相关免疫因素研究进展[J].*临床肝胆病*, 2017, 33(12):2462-2465. DOI:10.3969/j.issn.1001-5256.2017.12.047.
- [10] 黄建荣.人工肝在慢加急性肝衰竭中的应用现状及展望[J].*中华肝病杂志*, 2016, 24(12):935-939. DOI:10.3760/cma.j.issn.1007-3418.2016.12.013.
- [11] 李兰娟.肝衰竭与李氏人工肝进展[J].*中华临床感染病杂志*, 2017, 10(2):92-94. DOI:10.3760/cma.j.issn.1674-2397.2017.02.002.
- [12] 吴李贤,叶一农,何宏亮,等.血浆置换联合持续性血液透析滤过治疗肝衰竭的疗效分析[J].*热带医学杂志*, 2014, 14:481-484.
- [13] 唐碧波,戴丽星,胡东辉,等.血浆置换与血浆灌流联合治疗肝衰竭的疗效及对炎症因子及肝功能的影响[J].*代生物医学进展*, 2017, 17(25):4904-4907. DOI:10.13241/j.cnki.pmb.2017.25.025.

(收稿日期:2018-04-25)

(本文编辑:陈丹)