

[文章编号] 1000-4718(2007)01-0106-03

HBV 感染患者 2',5'寡腺苷酸合成酶、IL-2 和 IL-12 水平检测及意义

章仕坚¹, 唐永煌², 颜亮³

(暨南大学第一附属医院¹ 急诊科, ² 感染科, ³ 暨南大学医学院病理生理教研室, 广东 广州 510632)

[摘要] 目的: 选用 2',5'寡腺苷酸合成酶(2-5OAS)作为干扰素观察指标,IL-2、IL-12 作为 Th1 应答观察指标,了解内源性干扰素系统和 Th1 应答在 HBV 感染发病机制中作用。方法: 用放射同位素法测定单核细胞 2-5OAS 活性;ELISA 法测定血清 IL-2、IL-12。结果: 无症状 HBsAg 携带组 2-5OAS、IL-2、IL-12 含量与正常对照组无显著差异($P>0.05$),急性肝炎组均显著高于正常对照组($P<0.01$),慢性乙型肝炎轻、中、重度组、慢性重型肝炎组、肝硬化组、肝癌组均显著低于正常对照组($P<0.05$),并且随慢性肝炎病情加重以及肝硬化、肝癌发生而递减,其中肝硬化、肝癌组处于最低水平(与慢性肝炎各组比较 $P<0.05$)。结论: 在 HBV 感染发病过程的不同阶段和不同临床分型患者中,其内源性干扰素系统和 Th1 应答反应都是有显著差异的,细胞免疫对病毒感染的痊愈起主导作用。

[关键词] 肝炎病毒,乙型; 2',5'寡腺苷酸合成酶; 白细胞介素 2; 白细胞介素 12

[中图分类号] R363 **[文献标识码]** A

The levels of 2', 5' oligoadenylate synthetase, interleukin 2 and interleukin 12 in hepatitis B virus infection

ZHANG Shi-jian¹, TANG Yong-huang², YAN Liang³

(¹Department of Emergency, ²Department of Infectious Diseases, The First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou 510630, China. E-mail: tzshj@jnu.edu.cn; ³Department of Pathophysiology, Medical College of Jinan University, Guangzhou 510632, China)

[ABSTRACT] **AIM:** In order to study the effect of endogenous interferon system and Th1 response modes on hepatitis B virus infection, the 2', 5' oligoadenylate synthetase (2-5OAS), IL-2 and IL-12 were selected as the research parameters. **METHODS:** The activity of 2-5OAS in peripheral blood mononuclear cells was determined by sensitive radioenzymatic assay. IL-2 and IL-12 were determined by ELISA. **RESULTS:** Compared to normal control, the 2-5OAS, IL-2 or IL-12 were not significantly changed ($P>0.05$) in the asymptomatic HBsAg carrier group. The 2-5OAS, IL-2 and IL-12 were significantly up-regulated ($P<0.01$) in the group of acute hepatitis, but in the groups of chronic hepatitis, liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma, the 2-5OAS, IL-2, IL-12 were significantly down-regulated ($P<0.05$). Moreover, with the progression of patient's conditions and with the complications of liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma, the 2-5OAS, IL-2 and IL-12 decreased progressively, the 2-5OAS, IL-2, IL-12 were the lowest in groups of liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma (*vs* each groups of chronic hepatitis, $P<0.05$). **CONCLUSION:** The endogenous interferon system and Th1 response are significantly alterable in the different period of hepatitis B virus infection and among the different clinical types. The cellular immunity plays an important role in recovery from HBV infection.

[KEY WORDS] Hepatitis B virus; 2', 5'-oligoadenylate synthetase; Interleukin-2; Interleukin-12

人类 CD4⁺ 辅助性 T 细胞(helper T lymphocytes, Th)是机体免疫应答和免疫调节的中心环节,Th 细胞分为 Th1/Th2 两大亚群,Th1 类细胞因子包括:IL-2、IL-12、IFN- γ 、TNF- β 等,主要促进细胞免疫应答,如巨噬细胞的活化、抗体依赖细胞毒作用和迟

发型超敏反应,并在抵御病毒等细胞内病原体方面发挥重要作用。2',5' 寡腺苷酸合成酶(2',5' oligoadenylate synthetate, 2-5OAS)是干扰素(interferon, IFN),包括 IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 诱导的重要抗病毒蛋白之一,作为干扰素生化效应的放大指标,

[收稿日期] 2005-04-25 [修回日期] 2005-08-16

Tel: 020-85228512; E-mail: tzshj@jnu.edu.cn

在反映极少量或短暂的机体干扰素是非常有帮助的,是目前能够快速、敏感、直接反映机体干扰素系统水平的测定指标^[1]。乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染机体的 Th1 类细胞因子、内源性干扰素系统的改变一直倍受关注,它是 HBV 感染发病机制和临床应用干扰素等细胞因子治疗的重要依据^[2,3],因此本研究选用 IL-2、IL-12、2-5OAS 作为观察指标,旨在准确、全面了解 Th1 类细胞因子和内源性干扰素系统在 HBV 感染中的作用。

材 料 和 方 法

1 血样本来源

血样本取自 1999-2002 年暨南大学附属第一医院住院、门诊 HBV 感染者 280 例,男 188 例,女 92 例;年龄 18-65 岁,平均年龄(41±18)岁,诊断和临床分型均按第五次全国传染病寄生虫病学术会议修订的标准^[4]。其中无症状 HBsAg 携带者(asymptomatic carrier, ASC)40 例、急性肝炎(acute hepatitis, AHB)20 例、慢性肝炎(chronic hepatitis, CHB)(轻度 30 例、中度 30 例、重度 30 例)、慢性重型肝炎(chronic severe hepatitis, CSH)30 例、肝硬化(liver cirrhosis, LC)30 例、肝细胞癌(hepatic cellular cancer, HCC)30 例均有 HBV 感染血清学诊断依据,并排除其它病原感染,检测前均未使用过免疫调节剂,同时以健康体检者 20 例作为正常对照,麻疹(mealse)20 例作为其它疾病对照。

2 检测方法

2.1 2', 5'寡腺苷酸合成酶水平测定^[5] 采静脉血,分离单个核细胞(PMBC),按 1×10^{10} cells/L 裂解 PMBC,加 40 μ L poly(I):poly(C)-琼脂糖浓缩、纯化(2-5OAS),加入 60 μ L 反应液[3 mmol/L ATP (92.5×10^8 Bq/L),20 mmol/L Tris-HCl pH(7.6),16 mmol/L Mg(Oac)₂,30 mmol/L 基乙醇,10% 甘油,20 mg/L poly(I):poly(C),6 mmol/L 磷酸肌酸,1 g/L 磷酸肌酸激酶],37℃ 反应 18 h 后沸水煮 2 min,取 10 μ L 反应终止液点在 DE-81 滤纸上,并以已知样品作对照,在 0.4 mol/L NH₃HCO₃ 中层析 8 h,取出在紫外检测仪(波长 254 nm)照射下,以铅笔划出 ATP 和 2-5A 轮廓,并设置轮廓相同面积的空白对照,分别剪下后将产物放置液体闪烁计数器测定放射性,测得产物相对计数值(counts/min)作为各样品 2-5OAS 活性水平进行比较。[8-³H-ATP]由中国科学院原子能研究所提供,其它试剂均为 Sigma 公司提供。

2.2 IL-2、IL-12 水平测定 采取静脉血,分离血清,双抗体夹心 ELISA 法测定待测血清 IL-2 和 IL-12 的吸光度(A)值,同时以标准品倍比稀释 A 值

制作标准曲线,求出待测血清浓度值,试剂盒由深圳晶美公司提供。

3 统计学处理

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间的数据比较采用单因素方差分析。

结 果

1 各型 HBV 感染组 2-5OAS、IL-2、IL-12 比较

1.1 HBV 感染组 2-5OAS 水平的比较 无症状 HBsAg 携带组比正常对照组略低,但两组无统计学差异($P > 0.05$);其中麻疹组和急性肝炎组显著高于正常对照组($P < 0.01$);慢性乙型肝炎(轻、中、重度组)、慢性重型肝炎组、肝硬化组、肝癌组 2-5OAS 含量均显著低于正常对照组($P < 0.05$),其中肝硬化、肝癌组 2-5OAS 含量处于最低水平(与慢性肝炎各组比较: $P < 0.05$),见表 1。

1.2 各组 HBV 感染组 IL-2、IL-12 水平比较 麻疹、急性肝炎组 IL-2 和 IL-12 含量显著高于正常对照组($P < 0.01$),无症状 HBsAg 携带组与正常组比较无明显差异($P > 0.05$),而在慢性肝炎、慢重肝、肝硬化、肝癌各组中,IL-2 和 IL-12 含量低于正常对照组($P < 0.05$),其中肝硬化、肝癌组含量处于最低水平(与慢性肝炎各组比较: $P < 0.05$),见表 1。

讨 论

本研究对 HBV 感染进行了较大量病例的研究,并对病情轻重及转归变化作了分组比较,实验检测结果显示急性肝炎和麻疹患者的急性期 2-5OAS 均有显著升高($P < 0.01$),说明急性 HBV 感染,机体激活了与麻疹病毒感染相类似的干扰素反应系统,参与急性期有效的抗 HBV 免疫。急性乙型肝炎痊愈率高达 85%,15% 转为病毒携带者,只有 5% 左右患者转化为慢性肝炎,这可能是 HBV 侵入机体后,免疫细胞被有效激活后产生足量干扰素,形成有效的抗病毒免疫从而控制病毒复制和促进疾病康复,这可能是治疗大多数急性肝炎不必使用干扰素的理由。

无症状携带组 2-5OAS 活性比正常对照组无统计学差别($P > 0.05$),提示无症状 HBV 携带者干扰素无明显不足,这可能是无症状携带者临床使用干扰素有效应答率偏低的原因;然而慢性乙型肝炎轻度组、中度组、重度组,慢性重型肝炎组、肝硬化组、肝癌组,2-5OAS 活性均显著降低($P < 0.05$),这提示 HBV 感染所致慢性肝脏疾病机体普遍存在干扰素产生不足,说明干扰素产生不足是引起 HBV 感染慢性化的重要原因,这为临床使用干扰素治疗慢性肝炎,防止感染慢性化加重以及肝硬化、肝癌发生提供实验依据。

表1 各型 HBV 感染组 2-5OAS、IL-2 和 IL-12 的测定结果

Tab 1 Changes of 2-5OAS, IL-2 and IL-12 in HBV infections ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	2-5OAS(counts/min)	IL-2(ng/L)	IL-12(ng/L)
Disease control	20	8 126 ± 1 748**	186.15 ± 37.56**	134.17 ± 37.23**
Normal control	20	3 282 ± 858	85.89 ± 22.63	39.92 ± 11.40
ASC	40	3 084 ± 1 026	82.18 ± 30.89	38.18 ± 11.38
AHB	20	6 749 ± 2 173**	156.41 ± 29.62**	124.19 ± 48.28**
CHB (mild)	30	2 496 ± 532*	79.24 ± 13.10*	36.75 ± 11.31*
CHB (moderate)	30	2 409 ± 463*	66.09 ± 16.31*	35.28 ± 8.35*
CHB (severe)	30	2 319 ± 404**	74.02 ± 12.95*	33.36 ± 9.14*
CSH	30	2 047 ± 544**	56.98 ± 9.53**	31.36 ± 7.76*
LC	30	1 631 ± 565** [△]	50.03 ± 17.00** [△]	25.04 ± 6.71** [△]
HCC	30	1 456 ± 508** [△]	46.69 ± 19.36** [△]	24.87 ± 6.71** [△]

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs normal control group; [△] $P < 0.05$ vs CHB groups.

Disease control (mealse), ASC (asymptomatic carrier), AHB(acute hepatitis), CHB(chronic hepatitis), CSH(chronic severe hepatitis), LC(liver cirrhosis), HCC(hepatic cellular cancer)

造成各型 HBV 感染机体内源性干扰素产生差异的原因较为复杂,可能主要有以下几点:(1) 干扰素产生细胞激活程度:在急性肝炎,机体产生强烈的、多克隆的、多特异性的细胞毒性 T 细胞(CTL),同时单核巨噬细胞、NK 细胞活性也显著增强;而慢性 HBV 持续感染患者不能产生强烈的 CTL 反应,单核巨噬细胞、NK 细胞反应也存在缺陷^[6]。(2) 慢性感染患者机体对 HBV 的免疫耐受:大部分慢性 HBV 感染是在婴幼儿期开始的,机体对 HBV 都存在一定程度的免疫耐受^[7]。(3) HBV 抑制干扰素基因表达和信号转导:HBV 核心抗原、末端蛋白均能抑制 IFN-β 基因转录活化^[8];HBV 还能抑制干扰素 JAK/STAT 信号转导表达,降低 STATs、ISGF3A 活性,在慢性 HBV 感染,这种抑制作用可能更明显、更持久^[9]。

本研究表明无症状 HBsAg 携带者 Th1 类细胞因子(IL-2、IL-12)水平无明显改变($P > 0.05$),急性肝炎 IL-2、IL-12 水平呈显著上调($P < 0.01$),而在慢性肝炎、肝硬化、肝癌各组中 IL-2、IL-12 都有不同程度下调,并且随各组病情加重以及肝硬化、肝癌发生而递减,这说明无症状 HBsAg 携带者 Th1 应答无明显改变,急性肝炎 Th1 应答上调,与麻疹病毒急性感染 Th1 应答上调反应相似,而 Th1 应答下调导致慢性肝炎病情进展,以致肝硬化、肝癌发生。文献^[10]报道认为快速诱导的 Th1 类细胞因子同抗病毒 CTL 细胞功能密切相关,缺乏这些因子与完全缺乏或延迟的病毒诱导 CTL 反应有关。本研究提示急性 HBV 感染机体可能多克隆细胞免疫被激活,释放大量 Th1 类细胞因子以控制 HBV 复制,一旦这种急性反应存在缺陷,感染可能表现为慢性化以至肝硬化、肝癌发生。

[参 考 文 献]

[1] Mykhailyk IV, Ostapchenko LI, Kucherenko Mle. Interferon - induced 2',5' - oligoadenylate system: key components and biological functions [J]. Ukr Biokhim Zh, 2003, 75(3): 11 - 21.

[2] Yamagata Y, Yuasa Y, Yamamoto K, et al. Pharmacologic effect of recombinant human IFN - alpha, continuously released from a matrix prepared from a polyglycerol ester of fatty acids, on 2',5' - oligoadenylate synthetase activity in murine liver[J]. J Interferon Cytokine Res, 2000, 20(2): 153 - 160.

[3] Priimiagi LS, Tefanova VT, Tallo TG, et al. Th1 - cytokines in chronic hepatitis B and C [J]. Vopr Virusol, 2002, 47(3): 23 - 27.

[4] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会联合修订.病毒性肝炎防治方案[J]. 中华传染病杂志, 2001, 2(19): 56 - 62.

[5] Hassel BA, Tso PO. A sensitive assay for the IFN - regulated 2 - 5A synthetase enzyme [J]. J Virol Methods, 1994, 50(1 - 3): 323 - 334.

[6] Guidotti LG. The role of cytotoxic T cells and cytokines in the control of hepatitis B virus infection [J]. Vaccine, 2002, 19(20): 80 - 82.

[7] Jung MC, Pape GR. Immunology of hepatitis B infection [J]. Lancet Infect Dis, 2002, 2(1): 43 - 50.

[8] Bang G, Kim KH, Guarnieri M, et al. Effect of mutating the two cysteines required for HBe antigenicity on hepatitis B virus DNA replication and virion secretion [J]. Virology, 2005, 332(1): 216 - 224.

[9] Lee YH, Yun Y. HBx protein of hepatitis B virus activates Jak1 - STAT signaling [J]. J Biol Chem, 1998, 273(27): 25510 - 25515.

[10] Lohr HF, Krug S, Herr W, et al. Quantitative and functional analysis of core - specific T - helper cell and CTL activities in acute and chronic hepatitis B [J]. Liver, 1998, 18(6): 405 - 413.