

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2007)09-0843-03

慢性 HCV 感染患者 PBMC 体外 Th1 类细胞因子分泌及其相关因素分析

李跃旗¹, 许鹏辉², 苏海滨¹, 迟淑萍¹, 朱雷¹, 戚扬¹, 李金波¹, 程云¹(¹解放军 302 医院传染病研究所免疫研究室, 北京 100039, ²中国生物技术中心, 北京 100085)

Level of Th1 cytokine secreted by PBMC and its correlated factors in patients with chronic HCV infection

LI Yue-Qi¹, XU Peng-Hui², SU Hai-Bin¹, CHI Shu-Ping¹, ZHU Lei¹, QI Yang¹, LI Jin-Bo¹, CHENG Yun¹¹Department of Immunology, Institute of Infectious Diseases, PLA 302 Hospital, Beijing 100039, China, ²China Biotechnology Center, Beijing 100085, China

【Abstract】 AIM: To analyse the level of Th1 cytokine secreted by PBMC and its correlated factors in patients with chronic HCV infection. **METHODS:** Th1 cytokine (IL-2, IFN- γ , TNF- α) in supernatant and HCV RNA in serum were assayed by ELISA and fluorescent quantitative PCR respectively after PBMCs in patients with chronic HCV infection were cultured *in vitro* for 72 h. HCV RNA genotype was detected by RT-PCR. **RESULTS:** Compared with normal persons [(33.6 \pm 14.2) pg/mL], IFN- γ was increased in HCV RNA negative persons [(55.5 \pm 32.7) pg/mL], but not in HCV RNA positive persons. TNF- α was increased in all patients with chronic HCV infection. ALT and AST in HCV RNA positive persons were higher than those in negative persons. IFN- γ and TNF- α had no difference among the patients infected with different HCV genotypes. **CONCLUSION:** IFN- γ is important for viral clearance. TNF- α is one of the important factors in the mechanism of liver injury.

【Keywords】 HCV; PBMC; Th1 cytokine

【摘要】目的: 研究慢性 HCV(丙型肝炎病毒)感染患者外周血单个核细胞(PBMC)体外 Th1 类细胞因子的分泌, 进一步了解 HCV 感染慢性化和肝损伤机制。方法: 体外培养慢性 HCV 感染患者 PBMC 72 h 后, ELISA 检测培养上清 Th1 类细胞因子(IL-2, IFN- γ , TNF- α)。荧光定量 PCR 检测患者血清 HCV RNA 含量, RT-PCR 检测 HCV RNA 亚型。结果: 与正常人相比, IFN- γ 在 HCV RNA 阴性患者中明显增高, 而在 RNA

阳性患者中无明显升高。TNF- α 则不论 RNA 滴度的高低均较正常人显著增高。RNA 阳性患者 ALT(丙氨酸氨基转移酶), AST(门冬氨酸氨基转移酶)水平明显高于阴性患者。不同 HCV 基因型感染的患者 IFN- γ , TNF- α 的分泌无显著差异。结论: IFN- γ 在清除病毒中起重要作用, TNF- α 是引起肝脏损伤的重要因素之一。

【关键词】 C 型肝炎样病毒属; 外周血单个核细胞; Th1 类细胞因子**【中图分类号】** R512.6**【文献标识码】** A

0 引言

HCV(丙型肝炎病毒)感染后易于慢性化, 但其慢性化机制仍不十分清楚。有研究^[1-2]表明, 天然免疫、体液免疫以及细胞免疫均对病毒的清除有重要作用, 而细胞免疫尤为重要。Th1 类细胞因子是参与细胞免疫的重要物质, 在细胞清除细胞内病原体的免疫应答过程中起关键作用, 但同时也是诱发肝脏损伤的重要机制。我们比较了 HCV 感染后体内不同病毒滴度及不同的基因型患者的外周血单个核细胞(PBMC)体外分泌 Th1 类细胞因子及肝脏的炎症情况, 以进一步了解 HCV 感染慢性化和肝损伤机制。

1 对象和方法

1.1 对象 收集我院 2005 年门诊或住院的慢性 HCV 感染患者 44(男 35, 女 9)例, 平均年龄 42.3(15~67)岁, 所有病例均符合 2000 年西安全国第十次病毒性肝炎及肝病学术会议修订的《病毒性肝炎防治方案》慢性 HCV 感染诊断标准^[3]。对照 10 例为健康献血员。淋巴细胞提取液、Trizol、细胞因子 ELISA 检测试剂盒(晶美公司); AMV(逆转录酶), RNA 酶抑制剂、dNTP、Taq 酶(Promega 公司); RPMI 1640 母液(Gibico 公司); GeneAMP5700 型 HCV RNA 定量检测仪(美国 ABI 公司); AU600 肝功能检测仪(Olympus 公司); 其他试剂均购自北京中生公司产品。

1.2 方法

1.2.1 外周血 PBMC 的提取 采用 Ficoll 梯度离心法。

收稿日期 2006-12-04; 接受日期 2007-01-20

基金项目 国家“863”十五攻关课题(2006AA02Z494)

通讯作者: 程云. Tel (010)66933311 Email: yuncheng26@yahoo.com

作者简介: 李跃旗, 主任医师. Tel (010)66933201 Email: suhaibin@medmail.com.cn

1.2.2 PBMC 体外培养后上清细胞因子的检测 将分离所得 PBMC 用含有 100 mL/L 混合人血清的完全 RPMI 1640 培养液稀释细胞密度为 $5 \times 10^9/L$, 以 100 μL /孔加于 96 孔板, 37 $^{\circ}C$ 50 mL/L CO_2 孵箱中培养, 72 h 后收集培养上清, -20 $^{\circ}C$ 冻存. 同时设不加细胞的阴性对照和加入 ConA(刀豆蛋白 2 mg/L)刺激的阳性对照.

1.2.3 检测项目 全部病例采用荧光定量 PCR 检测 HCV RNA 滴度, 肝功能检测由我院临床检验中心完成.

1.2.4 血清 HCV RNA 基因分型 参照文献 [4] 进行. Trizol 提取血清中总 RNA, 逆转录合成 cDNA, 引物 5'-ATGTACCCCATGAGGTCGGC-3'. 巢式 PCR 进行 RNA 分型鉴定. 第 1 轮 PCR 引物: 正义: 5'-CGCGCGACTAGGAAGACTTC-3'; 反义: 5'-ATGTACCCCATGAGGTCGGC-3', 94 $^{\circ}C$ 变性 1 min, 55 $^{\circ}C$ 复性 1.5 min, 72 $^{\circ}C$ 延伸 2 min, 35 个循环. 第 2 轮 PCR 以第 1 轮 PCR 产物为模板, 使用同一个正义引物和 4 个型特异性反义引物, 正义: 5'-AGGAAGAC TTC-CGAGGGGTC-3', 反义: 5'-TGCCTTGGGATAGGCT-GAC-3'(I 型, 57 bp); 5'-GAGCCATCTGCCAC-CCCA-3'(II 型, 144 bp); 5'-CCAAGAGGGACGG-GAACCTA-3'(III 型, 174 bp); 5'-ACCCTCGTTTCCG-TACAGAG-3'(IV 型, 135 bp), 94 $^{\circ}C$ 变性 1 min, 60 $^{\circ}C$ 复性 1 min, 72 $^{\circ}C$ 延伸 1.5 min, 30 个循环. PCR 产物 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定.

统计学处理: 用 STATA7.0 软件进行统计学处理, 两组间比较采用 *t* 检验.

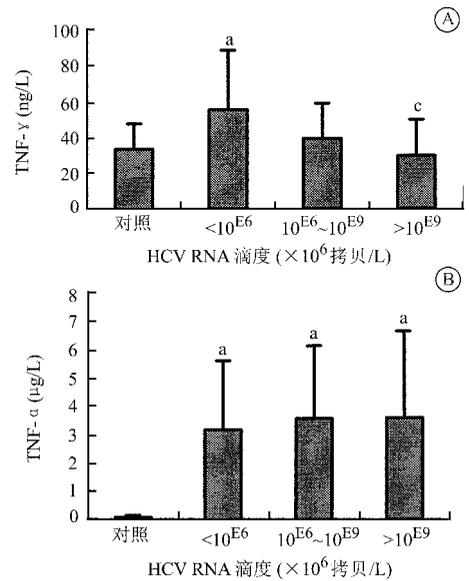
2 结果

2.1 HCV 感染患者 PBMC 体外培养 72 h 后 Th1 类细胞因子的分泌 培养 72 h 后, 对照及所有 HCV 患者 PBMC 培养上清中均未检测到 IL-2. HCV RNA 阴性(RNA <10⁶ 拷贝/L)患者 IFN- γ [(55 ± 33) ng/L] 较正常人 [(34 ± 14) ng/L] 和 RNA 大于 10⁹ 拷贝/L 的患者 [(29 ± 20) ng/L] 明显增高(图 1), 而所有 RNA 阳性患者与对照相比无显著差异. TNF- α 不论 RNA 滴度高低均较对照显著增高, RNA 不同滴度的患者间无显著差异.

2.2 不同 HCV RNA 滴度情况下患者肝功能间的比较 RNA 阳性患者 ALT, AST 水平明显高于阴性患者(表 1), 其余肝功能指标两组患者间无明显差异.

2.3 不同 HCV RNA 基因型 Th1 类细胞因子的分泌 对 34 例 HCV RNA 阳性患者进行 HCV RNA 分型,

21 例 II/1b (62%) 5 例 III/2a (15%) 8 例 (23%) 未分出(表 2). 不论 HCV RNA 为何种基因型, PBMC 体外培养后 IFN- γ 的分泌都较对照组无显著差异, 而 TNF- α 则均较对照组明显增高. 但各基因型之间 IFN- γ , TNF- α 均无显著差异.



**P* < 0.05 vs 对照; **P* < 0.05 vs HCV RNA <10⁶ 拷贝/L; A: IFN- γ 的分泌水平; B: TNF- α 的分泌水平.

图 1 在不同 HCV RNA 滴度下的 PBMC IFN- γ 和 TNF- α 的分泌水平

表 1 不同 HCV RNA 滴度情况下患者的肝功能 ($\bar{x} \pm s$)

HCV RNA (拷贝/L) ⁿ	ALT (U/L)	AST (U/L)	TBIL (μ mol/L)	DBIL (μ mol/L)	ALB (g/L)	GLO (g/L)	CHE (U/L)
<10 ⁶	10 39 ± 22	34 ± 14	10 ± 6	2 ± 2	46 ± 2	31 ± 5	8886 ± 1962
10 ⁶ ~10 ⁹	18 94 ± 61*	71 ± 45*	13 ± 5	3 ± 2	44 ± 4	29 ± 7	6543 ± 2074
>10 ⁹	16 73 ± 54*	59 ± 29*	15 ± 9	4 ± 3	44 ± 2	29 ± 4	7450 ± 1253

**P* < 0.05 vs RNA <10⁶ 拷贝/L. ALT: 丙氨酸氨基转移酶; AST: 天门冬氨酸氨基转移酶; TBIL: 总胆红素; DBIL: 间接胆红素; ALB: 白蛋白; GLO: 球蛋白; CHE: 胆碱酯酶.

表 2 不同的 HCV RNA 基因型 Th1 类细胞因子的分泌

HCV RNA 基因型	<i>n</i>	IFN- γ (ng/L)	TNF- α (ng/L)
II/1b	21	37 ± 23	3633 ± 3032*
III/2a	5	35 ± 22	3728 ± 3152*
其他	8	28 ± 10	3004 ± 1886*
对照	10	34 ± 14	97 ± 76

**P* < 0.05 vs 对照.

3 讨论

虽然 HCV 感染后可诱导机体产生特异性的抗体, 但 HCV 感染仍倾向于慢性化, 可能原因是 HCV

在免疫压力的诱导下中和性表位发生变异,致使已产生的抗体不能中和病毒^[5]。因此,细胞免疫在 HCV 感染后的清除过程中可能起到决定性作用^[6]。有研究表明,在感染 HCV 后自发清除病毒的患者中,其体内 Th1 类细胞因子(IFN- γ , TNF- α)的产生显著高于病毒持续存在的患者^[7]。此外,在 HCV 感染后不论是否清除病毒,均可诱导机体产生特异性的细胞免疫,但免疫应答的强度不足以清除病毒,从而致使病毒长期存在^[8]。

IFN- γ 主要由 NK 细胞、CD8⁺T 淋巴细胞、CD4⁺T 淋巴细胞分泌,可增强抗原提呈细胞的吞噬能力,促进 MHC I、II 类抗原的表达、IL-12 的分泌,诱导机体免疫应答向 Th1 类分化^[9],同时其本身也具有抗病毒作用。我们的实验表明,慢性 HCV 感染患者 PBMC 体外培养后,在 HCVRNA 阴性(< 10⁶ 拷贝/L)患者中,IFN- γ , TNF- α 的产生明显高于正常人,而在 HCVRNA 阳性患者中,不论滴度的高低, TNF- α 均有所升高,但 IFN- γ 的产生却与正常人无显著差异,且 HCVRNA 滴度越高, IFN- γ 的产生越低。这在一定程度上表明, IFN- γ 在病毒清除中起重要作用,细胞因子(IFN- γ , TNF- α)分泌的不平衡可能是导致病毒不能清除的原因之一。

细胞免疫在 HCV 感染中具有双重作用, HCV 感染后诱导机体产生的 Th1 类细胞因子(IFN- γ , TNF- α)虽然不足以清除病毒,但仍可诱导机体肝脏损伤^[10]。IFN- γ , TNF- α 同时具有抗病毒和明显的诱发炎症作用,在 HCV 感染后引起肝脏损伤中起重要作用。我们的实验发现,在 RNA 阳性患者中,代表肝脏炎症指标的 ALT、AST 较 RNA 阴性患者明显增高,且 TNF- α 也较正常人明显增高,表明 RNA 含量与病毒引起的肝脏损伤有一定关系,这可能由于在 RNA 阳性患者中,由于 IFN- γ 分泌不足,单独的 TNF- α 升高表现为肝损伤为主,但不足以清除病毒。而在 RNA 阴性、肝功能正常的患者,虽然 TNF- α 也明显增高,但 IFN- γ 同时增高,二者一同起到了抗病毒的协同作

用,体内病毒含量的减少使得肝脏炎症减轻。另外,虽然 RNA 阴性患者表现为 ALT、AST 正常,但其诱导产生的免疫应答仍有可能造成损伤,肝脏炎症依然存在,病理检查将有助于进一步的明确。

在我国, HCV 基因型 II/1b、III/2a 为主要感染病毒株,在我们的研究中基因型 II/1b、III/2a 占 RNA 阳性患者的 76%,各基因型之间 IFN- γ , TNF- α 的分泌均无显著差异,提示慢性 HCV 感染后诱导产生的免疫应答与基因型无关。

【参考文献】

- [1] Mizukoshi E, Rehermann B. Immune responses and immunity in hepatitis C virus infection[J]. J Gastroenterol, 2001, 36(12): 799 - 808.
- [2] Thimme R, Lohmann V, Weber FA. Target on the move: Innate and adaptive immune escape strategies of hepatitis C virus[J]. Antiviral Res, 2006, 69(3): 129 - 141.
- [3] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案[J]. 中华肝病杂志, 2000, 8(6): 249 - 250.
- [4] Hiroaki O, Yasushi S, Shunichi O, et al. Typing hepatitis C virus by polymerase chain reaction with type-specific primers: Application to clinical surveys and tracing infectious sources[J]. J General Virol, 1992, 73(3): 673 - 679.
- [5] Pavio N, Lai MM. The hepatitis C virus persistence: how to evade the immune system? [J]. J Biosci, 2003, 28(3): 287 - 304.
- [6] Christie JM, Healey CJ, Watson J, et al. Clinical outcome of hypogammaglobulinemic patients following outbreak of acute hepatitis C: 2 Year followup[J]. Clin Exp Immunol, 1997, 110(1): 4 - 8.
- [7] Rosen HR, Miner C, Lewinsohn D, et al. Frequencies of HCV-specific effector CD4 T cells by flow cytometry: Correlation with clinical disease stages[J]. Hepatology, 2002, 35(1): 190 - 198.
- [8] Rosen HR. Hepatitis C Pathogenesis: Mechanisms of Viral Clearance and Liver Injury[J]. Liver Transplant, 2003, 9(11): S35 - S43.
- [9] Szabo SJ, Sullivan BM, Peng SL, et al. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses[J]. Annu Rev Immunol, 2003, 21: 713 - 758.
- [10] Sun J, Li K, Shata MT, et al. The immunologic basis for hepatitis C infection[J]. Curr Opin Gastroenterol, 2004, 20(6): 598 - 602.

编辑 王 睿