

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.11.014

Treg 细胞在慢性乙肝患者外周血中的表达及其对 DC 细胞的抑制作用 *

余灵祥 李志伟 张培瑞 齐瑞兆 肖朝辉 李 鹏 张绍庚^Δ

(解放军第 302 医院肝胆外科一中心 北京 100039)

摘要 目的:检测慢性乙型肝炎患者外周血中 Treg 细胞的比例,探讨其对 DC 细胞的免疫抑制作用。**方法:**检测 CHB 患者和正常对照组外周血 CD4⁺, CD25⁺, Treg 及 DC 表面因子 CD80 和 HLA-DR 的表达;在 DC 培养不同时间内加入不同比例 CHB Treg 细胞,观察 DC 对淋巴细胞增殖的影响以及细胞因子 IL-10 及 TGF- β 的表达变化。**结果:**CHB 患者外周血 Treg 细胞比例高于对照组,差异有统计学意义 ($P<0.05$);CHB 患者 DC 细胞表面分子 CD80 和 HLA-DR 表达均低于对照组,差异有统计学意义 ($P<0.05$);经 Treg 细胞处理后,DC 细胞刺激淋巴细胞的增殖能力下降,淋巴细胞增殖的抑制率显著升高 ($P<0.05$);随 Treg 细胞增加,IL-10 及 TGF- β 水平升高,差异有统计学意义 ($P<0.05$)。**结论:**CHB 患者外周血中 Treg 细胞的增加可能通过诱导 IL-10 和 TGF- β 的表达来抑制 DC 细胞的免疫功能。

关键词:慢性乙型肝炎;Treg 细胞;DC 细胞;IL-10;TGF- β

中图分类号:R512.62 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2015)11-2053-03

Immunosuppression of Treg on the Regulation of Dendritic Cells in Patients with Chronic Hepatitis B*

YU Ling-xiang, LI Zhi-wei, ZHANG Pei-rui, QI Rui-zhao, XIAO Chao-hui, LI Peng, ZHANG Shao-geng^Δ

(The First Department of Hepatobiliary Surgery, 302 Hospital of PLA, Beijing, 100039, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the Treg cells suppressing the dendritic cells in the pathogenesis of chronic hepatitis B.

Methods: CD4⁺CD25⁺regulatory T cells and the expression of CD80 and HLA-DR on DC in patients with CHB and the control group were detected. Treg cells of CHB and DC of the controls were cultured with different ratio and time, then the concentrations of IL-10 and TGF- β were detected by ELISA. **Results:** The frequency of Treg cells in CHB group was higher than that of the control group with statistically significant difference ($P<0.05$); The expressions of CD80 and HLA-DR in CHB group were lower than those of the control group with statistically significant difference ($P<0.05$); Then CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in CHB group could significantly suppress effects on DC immunity with time-and-dose depended; The secretion of IL-10 and TGF- β increased significant in CHB group ($P<0.05$). **Conclusions:** The increasing Treg cells of patients with CHB may suppress DC by inducing the expressions of IL-10 and TGF- β .

Key words: Chronic hepatitis B; T cells; Dendritic cells; IL-10; TGF- β

Chinese Library Classification(CLC): R512.62 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2015)11-2053-03

前言

乙型肝炎(hepatitis B)是由乙型肝炎病毒感染引起的一种传染性疾病,主要以肝脏炎症和坏死为临床特征,最终会发展为肝硬化、重型肝炎及肝癌等,严重威胁患者生命^[1]。慢性乙型肝炎(Chronic hepatitis B, CHB)在全世界范围内广泛流行,而临床尚未明确其发病机制及有效的治疗方法^[2]。因此,充分了解 CHB 的发病机制并开发出安全有效的治疗方案是目前研究的重点。有研究发现,慢性乙型肝炎患者 DC 细胞功能存在缺陷,其抗原递呈功能也遭到破坏,导致患者免疫系统功能紊乱^[3]。还有研究认为,DC 细胞功能缺陷可能与 Treg 细胞的抑制作用有

关^[4]。本研究通过检测乙型肝炎患者外周血中 Treg 细胞及与其 DC 细胞间的相互作用,探讨慢性乙型肝炎的发病机制,为相关研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 标本来源

选取 2011 年 2 月 -2012 年 10 月在我院接受治疗的 30 例慢性乙型肝炎患者为研究组,其中男 18 例,女 12 例,年龄 31-56 岁,平均(35.76 ± 6.8)岁。另选取 30 例健康体检者作为对照组,其中男 15 例,女 15 例,年龄 24-46 岁,平均(32.47 ± 7.3)岁。两组患者在性别、年龄等方面差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

* 基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(30901795)

作者简介:余灵祥(1976-),主治医师,主要研究方向:肝病外科诊断与手术治疗

^Δ 通讯作者:张绍庚,医学博士,教授,主任医师,主要研究方向:肝脏肿瘤、胆道外科、门脉高压症和腹腔镜微创外科手术等,

E-mail: laohushanshang@163.com

(收稿日期:2014-11-08 接受日期:2014-11-26)

1.2 实验方法

1.2.1 PBMC 分离 取对照组及 CHB 患者外周血于肝素抗凝管中,4℃,离心 1500 rpm,15 min,取与红细胞层紧邻的白膜层于无菌管中,与生理盐水 1:1 稀释,然后缓慢倾斜加入淋巴细胞分离液中,PBS 洗两遍,弃上清,稀释备用。

1.2.2 Treg 细胞提取 将 PBMC 用含胎牛血清及 EDTA 的 PBS 重悬,调整细胞悬液浓度,加入 anti-CD4 标记,混匀后置于 4℃ 冰箱暗处孵育 10 min,加入抗生素磁珠,混匀后置于 4℃ 冰箱中孵育 15 min,PBS 重悬后加入 anti-CD25 标记,混匀后置于 4℃ 冰箱中孵育 15 min,涡旋加入 PBS 上柱,收集流出液为 CD4⁺CD25⁻T 细胞,将柱中细胞推出收集为 CD4⁺CD25⁺T 细胞。

1.2.3 DC 细胞体外培养 PBMC 用含胎牛血清的 1640 重悬,将细胞浓度调整为 10⁵ 个/ml,将细胞接种于培养瓶中,置于 37℃ 5% CO₂ 培养箱孵育 2 h,收集贴壁细胞,加入 GM-CSF/IL-4 于 37℃ 5% CO₂ 培养箱中培养,分别于第 3 天和第 6 天换液并补充细胞因子,第 7 天加入 TNF-α 继续培养。

1.2.4 流式细胞仪检测细胞表达 用上述方法诱导培养 DC 细胞,磁珠分选得到 Treg 细胞,在 DC 细胞培养的不同时间段加入 Treg 细胞,设置不加 Treg 细胞的对照组,收集悬浮以及半悬浮细胞后离心弃上清,取细胞沉淀为受抑制的 DC 细胞,将受抑制的 DC 细胞及对照组 DC 细胞稀释至 10⁵ 个/ml,加入 CD80 和 HLA-DR 抗体,置于 4℃ 冰箱中孵育 15 min,PBS 洗两遍,稀释至 500 μL,待测。

1.2.5 ELISA 法检测细胞因子 取 Treg 细胞和 DC 细胞共培养的上清液,分别用 IL-10 和 TGF-β 试剂盒进行细胞因子水平检测,将培养上清稀释至不同倍数,根据说明书步骤加入反应液、加入标准品、阴性对照、阳性对照以及实验组,孵育后加入 Conjugate,再次孵育后加入显色液,终止后在波长为 450 nm 下检测吸光度。

1.2.6 Treg 细胞对 DC 的抑制率 将 DC:Treg 为 1:1 加入 96 孔培养板,加入 IL-2,37℃,5% CO₂ 孵育培养 3 天,结束前 4 h 每孔加入 MTT,继续孵育 4 h,离心后弃上清,再加入 DM-SO,振荡混匀后上酶标仪检测 OD 值。抑制率=(阳性对照组 - 阴性对照组 - 实验组)/(阳性对照组 - 阴性对照组)× 100%。

1.3 统计学分析

数据采用 SPSS13.0 软件进行分析处理,两组比较采用 t 检验,多组比较采用方差分析,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CHB 患者与正常人外周血中 Treg 的表达

正常外周血中 Treg (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) 细胞的比例为 (4.12±1.36)%,CHB 患者外周血中 Treg 细胞的比例为 (10.54±3.27)%,CHB 患者外周血中的 Treg 细胞比例明显高于正常组,差异有统计学意义(P<0.05)。见图 1。

2.2 DC 细胞表面分子 CD80 和 HLA-DR 表达情况

CHB 患者 DC 细胞表面分子 CD80 的表达为 (60.12±5.23),HLA-DR 为 (61.21±4.28);而正常组 CD80 表达为 (84.13±4.33),HLA-DR 为 (86.57±3.82)。CHB 患者 DC 细胞

表面分子 CD80、HLA-DR 的表达显著低于正常组,差异有统计学意义(P<0.05)。见图 2。

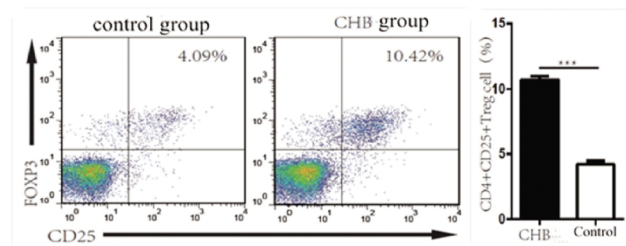


图 1 两组患者外周血中 CD4⁺、CD25⁺、Foxp3⁺ 及 Treg 细胞比例

Fig. 1 Levels of CD4⁺, CD25⁺, Foxp3⁺ and Treg in the peripheral blood in the two groups

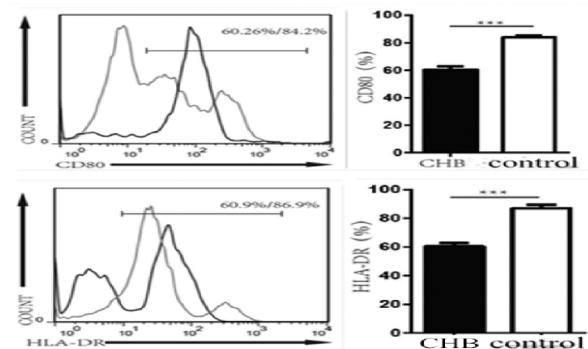


图 2 DC 细胞表面分子 CD80 和 HLA-DR 的表达

Fig. 2 Expressions of CD80 and HLA-DR in DC

2.3 DC 细胞刺激淋巴细胞的增殖能力

经 Treg 细胞处理后,DC 细胞刺激淋巴细胞的增殖能力下降,淋巴细胞增殖的抑制率较正常组均显著升高(P<0.05)。分别加入比例为 1:1,1:10 和 1:100 的 Treg 细胞与 DC 细胞,细胞增殖能力有显著差异(F 值分别为 73.23、24.23 和 4.28),差异有统计学意义(P<0.05)。

2.4 Treg 细胞与 DC 细胞共培养后 IL-10、TGF-β 的表达

EILSA 法检测上清中细胞因子 IL-10、TGF-β 的表达,发现 Treg 细胞与 DC 细胞比例为 1:1,1:10 和 1:100 时,IL-10 及 TGF-β 的表达均显著高于正常组,并且随着 Treg 细胞比例增高,IL-10 及 TGF-β 的水平也相应增高,差异具有统计学意义(P<0.05)。

3 讨论

Treg 细胞是一种具有免疫抑制功能的细胞,对机体免疫系统的负调节发挥着重要作用^[9]。相关研究表明,CHB 患者免疫功能缺陷不仅与 HBV 病毒的直接作用有关,还与 Treg 细胞的调控作用密切相关^[6-8]。还有研究证实,Treg 细胞可以再抑制免疫反应,从而诱发免疫耐受^[9]。因此,Treg 细胞在 CHB 中的作用受到越来越多的关注。本研究发现,CHB 患者外周血中的 Treg 细胞比例明显高于正常组(P<0.05),说明在慢性 HBV 感染过程中机体会产生炎症反应,过度的免疫病理损伤导致 T 细胞被激活,从而向 Treg 细胞分化使得 Treg 细胞数量增多。结果提示,Treg 细胞在抑制过度免疫病理损伤方面发挥着一定作用。

机体对病毒的识别以及提呈依赖于抗原提呈细胞的参与^[10]。DC 细胞是一类能够激活初始 T 细胞并在抗原识别和提呈中发挥着重要作用的专职抗原提呈细胞,对机体的抗病毒免疫有着关键的作用^[11,12]。DC 细胞的数量或功能缺陷会对机体的免疫应答产生显著的不良影响^[13]。CD80 是 DC 细胞活化 T 淋巴细胞的重要刺激分子,HLA-DR 则是 DC 成熟的重要标志^[14]。我们通过流式细胞术检测了 DC 细胞的表面分子的表达,结果发现 CHB 患者 DC 细胞表面分子 CD80、HLA-DR 表达显著低于正常组($P<0.05$)。结果提示,在 CHB 患者外周血中,DC 细胞成熟能力以及活化 T 淋巴细胞的能力明显下降,CHB 患者的特异性免疫应答能力低下。为进一步研究 Treg 细胞是否通过抑制 DC 细胞的功能在 CHB 中发挥作用,我们将 CHB 患者 Treg 细胞与正常组 DC 细胞进行共培养,并用培养后的 DC 细胞刺激淋巴细胞检测其增殖能力,发现培养后的 DC 细胞刺激淋巴细胞增殖的功能显著下降($P<0.05$),并且与 Treg 的比例和作用时间有关($P<0.05$)。结果提示,CHB 患者的 Treg 细胞作用的时间越长,DC 细胞的抗原提呈能力越弱。

Treg 细胞对 DC 细胞发挥抑制作用可以通过多种途径,如分泌 IL-10、TGF- β 等抑制性细胞因子,与效应性 T 细胞竞争结合 IL-2,诱导抗原提呈细胞向免疫耐受方向发展等^[15,16]。IL-10 是一个作用广泛的抑制性细胞因子,可以有效的抑制效应性细胞的作用,诱导免疫抑制^[17]。TGF- β 可以诱导转录因子 Foxp3 的表达,Foxp3 是 Treg 细胞获得免疫活性的关键转录因子,TGF- β 表达上调可以诱导 T 细胞向 Treg 细胞方向活化^[18-20]。在本研究发现,Treg 细胞抑制 DC 细胞的功能可能与分泌 IL-10、TGF- β 等抑制性细胞因子有关,Treg 细胞与 DC 细胞比例为 1:1、1:10 以及 1:100 时,IL-10、TGF- β 的表达均显著高于正常组($P<0.05$)。结果说明,在 CHB 患者外周血中,Treg 细胞可能是通过调节细胞因子的水平抑制 DC 细胞的功能。

综上所述,在 CHB 患者外周血中,Treg 细胞对 DC 细胞功能存在明显的抑制作用。因此,降低 Treg 细胞的抑制作用,提高 DC 细胞免疫功能将成为治疗慢性乙型肝炎的新靶点。

参考文献(References)

- [1] Wang L, Qiu J, Yu L, et al. Increased numbers of CD5⁺CD19⁺CD1 high IL-10⁺ Bregs, CD4⁺Foxp3⁺ Tregs, CD4⁺CXCR5⁺Foxp3⁺ follicular regulatory T (TFR) cells in CHB or CHC patients [J]. J Transl Med, 2014, 9(12): 251
- [2] Raziorrouh B, Heeg M, Kurtschiv P, et al. Inhibitory phenotype of HBV-specific CD4⁺T-cells is characterized by high PD-1 expression but absent coregulation of multiple inhibitory molecules [J]. PLoS One, 2014, 9(8): e105703
- [3] Guo X, Xiong L, Zou L, et al. Upregulation of bone morphogenetic protein 4 is associated with poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma[J]. Pathol Oncol Res, 2012, 18(3): 635-640
- [4] Papatheodoridis GV, Manolakopoulos S, Liaw YF, et al. Follow-up and indications for liver biopsy in HBeAg-negative chronic hepatitis B virus infection with persistently normal ALT: a systematic review [J]. J Hepatol, 2012, 57(1): 196-202
- [5] Li X, Kong H, Tian L, et al. Changes of costimulatory molecule CD28 on circulating CD8⁺T cells correlate with disease pathogenesis of chronic hepatitis B[J]. Biomed Res Int, 2014, 2014: 423181
- [6] Liu Y, Huang R, Xiong Y, et al. Soluble CD40 ligand-activated B cells from patients with chronic hepatitis B virus infection as antigen presenting cells to induce hepatitis B virus specific cytotoxic T lymphocytes[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014, 450(1): 61-66
- [7] Jiang X, Ma Y, Cui W, et al. Association of variants in HLA-DP on chromosome 6 with chronic hepatitis B virus infection and related phenotypes[J]. Amino Acids, 2014, 46(8): 1819-1826
- [8] Lv B, Zhao H, Bai X, et al. Entecavir promotes CD34⁺ stem cell proliferation in the peripheral blood and liver of chronic hepatitis B and liver cirrhosis patients[J]. Discov Med, 2014, 18(100): 227-236
- [9] Xu P, Chen YJ, Chen H, et al. The expression of programmed death-1 in circulating CD4⁺ and CD8⁺ T cells during hepatitis B virus infection progression and its correlation with clinical baseline characteristics[J]. Gut Liver, 2014, 8(2): 186-195
- [10] Wang L, Zhao C, Peng Q, et al. Expression levels of CD28, CTLA-4, PD-1 and Tim-3 as novel indicators of T-cell immune function in patients with chronic hepatitis B virus infection [J]. Biomed Rep, 2014, 2(2): 270-274
- [11] Cao W, Qiu Z, Zhu T, et al. CD8⁺ T cell responses specific for hepatitis B virus core protein in patients with chronic hepatitis B virus infection[J]. J Clin Virol, 2014, 61(1): 40-46
- [12] Grzegorzewska AE. Hepatitis B vaccination in chronic kidney disease:review of evidence in non-dialyzed patients [J]. Hepat Mon, 2012, 12(11): e7359
- [13] Li XF, Tian L, Wang YY, et al. Inhibition of SATB1 expression in regulatory T cells contributes to hepatitis B virus-related chronic liver inflammation[J]. Mol Med Rep, 2015, 11(1): 231-236
- [14] Chen CF, Feng X, Liao HY, et al. Regulation of T cell proliferation by JMJD6 and PDGF-BB during chronic hepatitis B infection [J]. Sci Rep, 2014, 15(4): 6359
- [15] Su ZJ, Yu XP, Guo RY, et al. Changes in the balance between Treg and Th17 cells in patients with chronic hepatitis B [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2013, 76(4): 437-444
- [16] Lai Q, Ma S, Ge J, et al. TCR $\gamma\delta$ (+)CD4(-)CD8(-) T cells suppress the CD8 (+) T-cell response to hepatitis B virus peptides, and are associated with viral control in chronic hepatitis B [J]. PLoS One, 2014, 9(2): e88475
- [17] Yu XP, Guo RY, Su ML, et al. Dynamic Changes of Treg and Th17 Cells and Related Cytokines Closely Correlate With the Virological and Biochemical Response in Chronic Hepatitis B Patients Undergoing Nucleos(t)ide Analogues Treatment[J]. Hepat Mon, 2013, 13(12): e15332
- [18] Specialist Panel on Chronic Hepatitis B in the Middle East. A review of chronic hepatitis B epidemiology and management issues in selected countries in the Middle East [J]. J Viral Hepat, 2012, 19(1): 9-22
- [19] Ye Y, Liu J, Lai Q, et al. Decreases in Activated CD8 (+) T Cells in Patients with Severe Hepatitis B Are Related to Outcomes[J]. Dig Dis Sci, 2014, 1[Epub ahead of print]
- [20] Brunetto MR, Cavallone D, Oliveri F, et al. A Serum MicroRNA Signature Is Associated with the Immune Control of Chronic Hepatitis B Virus Infection[J]. PLoS One, 2014, 9(10): e110782