

· 基础研究 ·

短波辐射对 HBV 转基因小鼠树突状细胞功能的影响

侯安继 杨占秋 高春华 蒋涵 黄菁

【摘要】目的 通过观察短波辐射对 HBV 转基因小鼠树突状细胞(DC)分泌白介素-12(IL-12)及 T 淋巴细胞分泌 IL-10、IFN- γ 的影响,从而探讨短波辐射治疗慢性乙型肝炎的可能相关机制。**方法** 选取 HBV 转基因小鼠 20 只,将其随机分为短波组和空白对照组,另取 10 只健康小鼠作为正常对照组,其中短波组小鼠给予短波辐射。各组小鼠分别于实验进行 10 d 后取其脾脏分离树突状细胞,经流式细胞仪检测 DC 表型,采用 ELISA 方法检测 DC 分泌 IL-12 以及在刺激混合淋巴细胞反应中 T 淋巴细胞分泌 IL-10、IFN- γ 的含量变化情况。**结果** 短波组 DC 分泌 IL-12 水平较空白对照组显著增高($P < 0.01$),与正常对照组比较,差异亦有统计学意义($P < 0.01$);在混合淋巴细胞反应中,短波辐射能显著抑制 T 淋巴细胞分泌 IL-10 ($P < 0.01$),并同时提高 IFN- γ 水平($P < 0.01$)。**结论** 短波辐射能显著上调 HBV 转基因小鼠 DC 功能,对 HBV 所致慢性乙型肝炎的临床治疗具有潜在应用价值。

【关键词】 短波; 树突状细胞; 转基因小鼠; 慢性乙型肝炎

The effect of short wave diathermy on dendritic cells in hepatitis B virus transgenic mice HOU An-ji*, YANG Zhan-qiu, GAO Chun-hun, JIANG Han, HUANG Jing. * Institute of Virology, Wuhan University School of Medicine, Wuhan 430071, China

【Abstract】Objective To observe the effect of short wave diathermy on the functioning of dendritic cells (DCs) derived from the spleens of hepatitis B virus (HBV) transgenic mice. **Methods** HBV transgenic mice were treated with short wave diathermy for 10 days. Dendritic cells were then separated from their spleens and incubated with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and interleukin-4 (IL-4). The phenotypes of the DCs were assayed by flow cytometry (FCM), IL-12 released by the DCs and IL-10 and IFN- γ produced by the T cells in a mixed lymphocyte reaction (MLR) were measured using ELISA. **Results** Short wave diathermy could enhance the DCs' phenotype expression, increase IL-12 levels ($P < 0.01$), promote the secretion of IFN- γ , and inhibit the secretion of IL-10 in a MLR ($P < 0.01$). **Conclusion** Shortwave diathermy can significantly up-regulate DC function, so it might be a potential modality used for the treatment of chronic hepatitis B and hepatocellular carcinoma.

【Key words】 Short wave diathermy; Dendritic cells; Transgenic mice; Chronic hepatitis B

慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)是导致原发性肝癌的重要原因之一,其演变过程极为复杂,与机体长期的慢性免疫异常有关。树突状细胞(dendritic cell, DC)是目前已知体内功能最强大的抗原提呈细胞(antigen presenting cell, APC),CHB 患者 DC 功能处于抑制状态,其 Th1/Th2 比例失衡。近几十年来,短波已被广泛地应用于治疗组织及器官急慢性炎症等,目前普遍认为其作用机制在于改善局部血液循环,促进炎症消散,提高机体免疫力等^[1],但短波在 CHB 临床方面的应用比较少见,特别是对 DC 的调节作用鲜见报道。本研究以 HBV 转基因小鼠作为动物模型,经短波辐射处理后,从其脾脏中分离单核淋巴细胞经体外培养为成熟 DC,并观测 DC 的功能状态及

其与 Th₁/Th₂ 分化间的关系,从而探讨短波辐射对 HBV 感染模型的分子作用机制,为临床应用短波治疗 CHB 提供实验依据。

材料与方法

一、材料与试剂

RPMI 1640 培养液、胎牛血清液(Fetal Calf Serum, FCS)为美国 GIBCO 公司出品,HEPES 缓冲液、液丝裂霉素 C 粉剂、二甲基亚砷液(DMSO)为美国 Sigma 公司出品,L-谷氨酰胺粉剂为美国 Amresco 公司出品,植物血凝素粉剂(PHA)由北京大学医学部提供,噻唑蓝粉剂(MTT)为荷兰 Ducheфа 公司出品,粒-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、白细胞介素-4(IL-4)为以色列 Cyto-Lab/Peptotech Asia 公司出品,FITC-CD80 单克隆抗体、PE-CD11c 单克隆抗体为美国 BioLegend 公司产品,PE-MHCII 单克隆抗体为美国 eBioscience 公司出品,IL-12、

作者单位:430071 武汉,武汉大学医学院病毒所(侯安继、杨占秋);华中科技大学同济医学院附属同济医院康复医学科(高春华);武汉大学中南医院中西医结合科(蒋涵、黄菁)

IL-10、IFN- γ ELISA 双抗体夹心定量检测试剂盒为美国 Biosource 公司出品,余为国产优级纯或分析纯。

二、实验动物分组及处理方法

HBV 转基因小鼠由北京大学医学部实验动物中心提供,携带有 HBV pre-S、S 和 X 基因,品系为 C57BL/6J-TgN(Alb1 HBV)44Bri,雄性,体重(20 ± 2)g,共 20 只,将其随机分配到短波组和空白对照组,每组 10 只小鼠。短波组给予短波辐射,选用仪器为 SW-101 型短波治疗仪,仪器工作电压为 220 V,功率为 80 W,250 mA;短波频率为 10 MHz,波长为 17.6 m。将小鼠固定在板上,选其腹部为短波辐射野,短波工作电极采用治疗仪配置的直径 70 mm 辐射头,并采用特殊金属布进行屏蔽,中间保留直径 20 mm 的圆形开口以配合短波辐射,电极与腹部皮肤间距约 1 cm,微热量,每次辐射 5 min,每天 1 次,共连续辐射 10 d。空白对照组小鼠也经同样固定处理后置于短波辐射头下,但期间不给予短波辐射;另选 10 只健康 BALB/c 小鼠(由湖北省疾控中心实验动物中心提供)作为正常对照组,实验期间不给予任何特殊处理。

三、DC 的分离、纯化与培养

采用本研究参考文献[2]介绍的方法,将短波组小鼠于最后一次短波辐射 2 h 后采用颈椎脱臼法处死,用 75% 酒精浸泡 3 min,无菌取脾,经 Hank's 液漂洗 2 遍后,将脾研碎,于 200 目尼龙膜上过滤,低渗法去除红细胞,加入 RPMI 1640 完全培养液制备脾单个核细胞悬液,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中孵育 3 h,轻轻晃动培养板,此时吸取悬浮细胞(即淋巴细胞),用 RPMI 1640 培养液轻轻漂洗培养板 2 次,附着在培养板中的粘附细胞大多为单核细胞以及少量 B 淋巴细胞和微量 T 淋巴细胞。于光镜下进行细胞计数,加入 RPMI 1640 完全培养液调整细胞浓度至 10^6 个/ml,并加入细胞因子 GM-CSF(25 ng/ml)和 IL-4(25 ng/ml),置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养,隔天半量换液,加半量细胞因子(12.5 ng/ml),培养至第 7 天时即得到成熟 DC。其它各组小鼠也于实验开始 10 d 后采用上述方法培养成熟 DC。

四、流式细胞仪检测 DC

按上述方法制备成熟 DC 细胞后,将其细胞浓度调整至 10^6 个/ml,吸取 2 ml 至试管内,以 $9\,500 \times g$ 离心 5 min,用 pH 7.4 的 D-Hank's 液漂洗 2 次,待吹打均匀后分别加入 CD80-FITC、PE-CD11c、PE-MHC II 单抗,置于 4℃ 环境中反应 30 min,随即用 pH 7.4 的 D-Hank's 液漂洗 1 次后,于流式细胞仪下进行检测,采用 Cell Quest 软件分析检测结果。

五、混合淋巴细胞反应

本研究 DC 混合淋巴细胞反应(mixed lymphocyte

reaction, MLR)检测采用文献[3]介绍的方法,分别在无菌条件下取出转基因小鼠及 BALB/c 小鼠脾脏,按上述方法制备成熟 DC 细胞,用 RPMI 1640 完全培养液调整细胞浓度至 10^5 个/ml,于 37℃、5% CO₂ 培养箱中孵育 24 h,分别加入终浓度为 25 μ g/ml 的丝裂霉素 C,于 37℃、5% CO₂ 培养箱中孵育 45 min,随后以 $9\,500 \times g$ 离心 5 min,弃上清液;然后用 RPMI 1640 培养液洗涤细胞 2 次,调整细胞浓度至 10^4 个/ml,并将其作为刺激细胞样本;再分别于无菌条件下取出转基因小鼠及 BALB/c 小鼠脾脏,按前述方法提取淋巴细胞作为反应细胞样本,调整细胞浓度至 10^5 个/ml。将两种细胞液按 1:1 体积混合,待充分混匀后,于 96 孔板中每孔加入 100 μ l 混合细胞悬浊液,对照组采用等体积的 RPMI 1640 培养液代替,于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 6 d。留取培养细胞上清液,于 -70℃ 环境下冻存待测。IL-12、IL-10 及 IFN- γ 的检测采用酶联免疫吸附双抗体夹心法(ABC-ELISA),相关实验操作步骤^[4]严格按照试剂盒说明书进行。

六、统计学分析

实验所得数据以均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 11.5 版统计软件分析,多组间数据比较选用方差分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

一、正常小鼠与转基因小鼠 DC 的流式细胞仪检测结果比较

正常小鼠与转基因小鼠 DC 的流式细胞仪检测结果详见图 1~6。从图 1、图 2 可以看出,转基因小鼠 DC 数量较正常小鼠明显减少;图 3、图 4 显示,转基因小鼠 DC 表型 CD80、CD11c 较正常小鼠明显减少;图 5、图 6 显示,转基因小鼠 DC 表型 CD80、MHC-II 较正常小鼠明显减少。以上结果均表明 HBV 转基因小鼠无论在 DC 数量、还是在表型方面均较正常小鼠明显减弱,提示 HBV 转基因小鼠 DC 功能处于抑制状态。

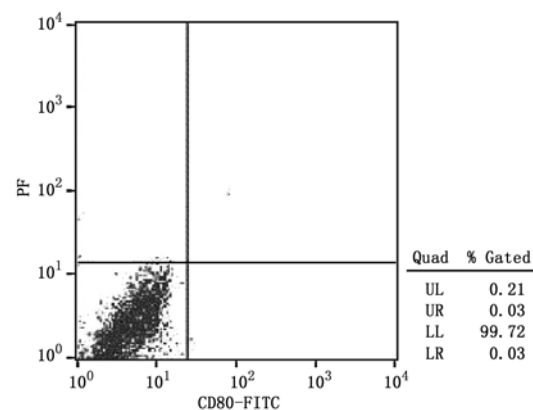


图 1 正常小鼠培养 DC 的流式细胞仪检测结果

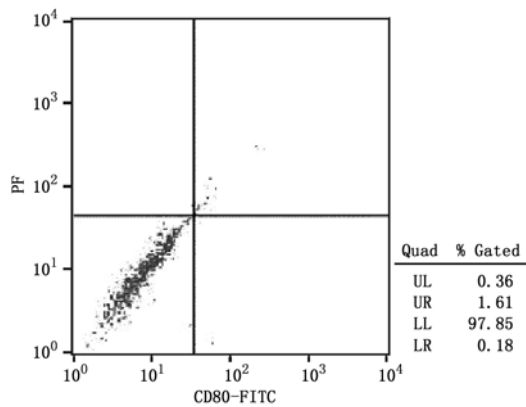


图2 转基因小鼠培养 DC 的流式细胞仪检测结果

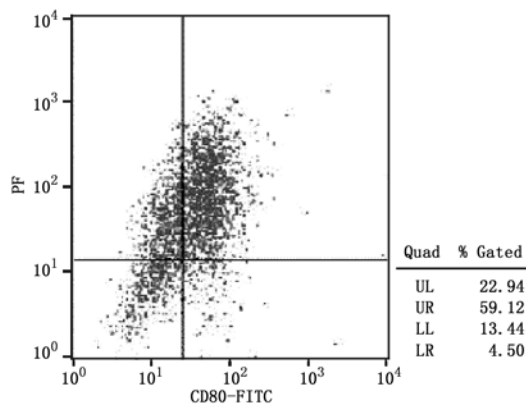


图3 正常小鼠 DC 的 CD80、CD11c 流式细胞仪检测结果

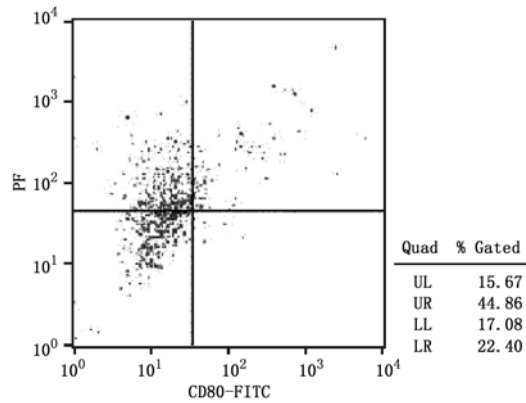


图4 转基因小鼠 DC 的 CD80、CD11c 流式细胞仪检测结果

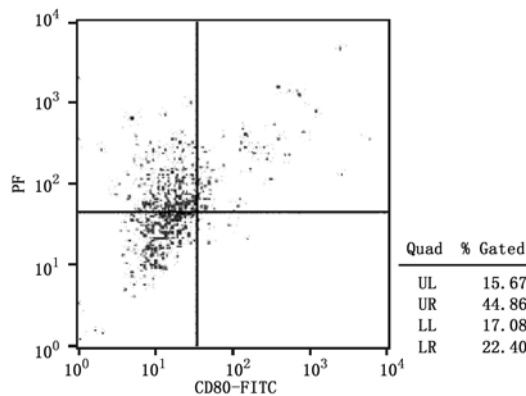


图5 正常小鼠 DC 的 CD80、MHC - II 流式细胞仪检测结果

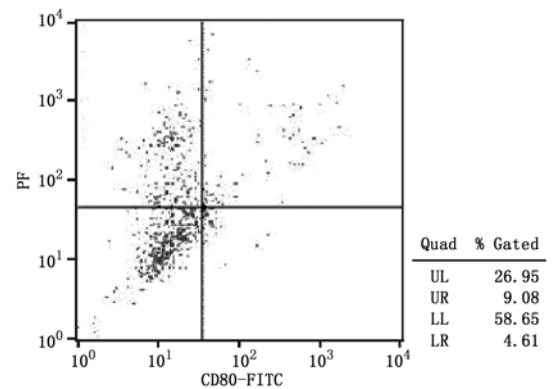


图6 转基因小鼠 DC 的 CD80、MHC - II 流式细胞仪检测结果

二、短波辐射对 DC 表型的影响

短波辐射对 DC 表型的影响详见表 1、表 2。表中数据显示,短波组 DC 表型较空白对照组小鼠有明显改善($P < 0.01$),说明短波辐射可改善转基因小鼠 DC 表型;但短波组小鼠与正常对照组比较,差异仍有统计学意义。实验过程中短波组有 1 只小鼠意外死亡,故该组实际小鼠数量只有 9 只。

表1 小鼠 CD 单标 CD80、CD11c 及双标
CD80/CD11c 细胞流式检测数据比较(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	只数	CD80 ⁺	CD11c ⁺	CD80 ⁺ /CD11c ⁺
短波组	9	65.10 ± 2.43 ^{*#}	75.48 ± 4.58 ^{*#}	52.58 ± 1.58 ^{*#}
空白对照组	10	34.79 ± 3.22 [*]	41.23 ± 3.26 [*]	24.79 ± 4.78 [*]
正常对照组	10	77.55 ± 4.03 [#]	83.36 ± 1.68 [#]	64.34 ± 2.83 [#]

注:与正常对照组比较,^{*} $P < 0.01$;与空白对照组比较,[#] $P < 0.01$

表2 小鼠 DC 单标 CD80、MHC - II 及双标
CD80/MHC - II 细胞流式检测数据比较(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	只数	CD80 ⁺	MHC-II ⁺	CD80 ⁺ /MHC-II ⁺
短波组	9	66.93 ± 2.44 ^{*#}	55.19 ± 3.75 ^{*#}	45.20 ± 2.56 ^{*#}
空白对照组	10	34.70 ± 2.57 [*]	23.43 ± 4.10 [*]	13.99 ± 4.64 [*]
正常对照组	10	83.96 ± 1.60 [#]	73.69 ± 1.07 [#]	63.65 ± 5.11 [#]

注:与正常对照组比较,^{*} $P < 0.01$;与空白对照比较,[#] $P < 0.01$

三、短波辐射对 IL-12、IL-10 及 IFN- γ 含量的影响

短波辐射对各实验组小鼠 DC 分泌 IL-12 及混合淋巴细胞反应中 IL-10、IFN- γ 含量的影响详见表 3。表中数据提示,转基因小鼠 IL-12 水平较正常小鼠显著降低($P < 0.01$);在混合淋巴细胞反应中,转基因小鼠 IL-10 水平较正常小鼠显著提高($P < 0.01$),而 IFN- γ 水平显著降低($P < 0.01$);短波组小鼠 IL-10 水平显著低于空白对照组($P < 0.01$),而 IL-12 及 IFN- γ 水平则显著高于空白对照组($P < 0.01$);空白对照组与正常对照组比较,差异亦具有统计学意义($P < 0.01$)。

表 3 各组小鼠 IL-12、IL-10 及 IFN- γ 水平
检测结果比较 (pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

组 别	例数	IL-12	IL-10	IFN- γ
短波组	9	294.80 $\pm$ 8.49 ^{*#}	77.19 $\pm$ 10.67 [#]	324.79 $\pm$ 18.80 ^{**}
空白对照组	10	161.12 $\pm$ 11.79 [*]	116.80 $\pm$ 14.08 [*]	69.17 $\pm$ 4.97 [*]
正常对照组	10	369.55 $\pm$ 12.45 [#]	56.38 $\pm$ 3.51 [#]	140.44 $\pm$ 11.31 [#]

注:与正常对照组比较,^{*} $P < 0.05$;与空白对照组比较,[#] $P < 0.05$

讨 论

相关资料表明,HBV 感染是导致 CHB、肝硬化及原发性肝癌的主要原因之一。患者感染 HBV 后,病情易转为慢性,其机制目前尚未完全阐明。CHB 患者常表现为免疫应答水平低下或缺失,机体呈现免疫耐受状态,其体内仅产生较弱的针对 HBV 的细胞毒性 T 淋巴细胞 (cytotoxic T lymphocyte, CTL) 反应,致使病毒在患者体内长期持续存在,导致病变迁延发展。树突状细胞作为专职抗原提呈细胞 (antigen presenting cell, APC),其最大特点是能够有效活化 Th₀,具有超强的抗原提呈效率。近年来研究发现,造成 CHB 患者免疫功能低下或免疫耐受的原因与体内 DC 功能缺陷以及 Th₁/Th₂ 比例失衡有关^[5]。

IL-12 是调节 Th₁ 细胞分化的关键因素之一,是目前发现的最有效的 CTL 和 NK 细胞刺激因子,该物质主要由 APC 细胞分泌,由 P35 和 P40 两条多肽链结合而成。活化的 T 细胞可见 IL-12 受体表达,体外抗原通过诱导包含 Janus 激酶家族以及转录活化因子 (signal transducer and activator of transcription, STAT) 的细胞内信号转导途径激活 DC,上调 CD80 表达^[6]。当非专职 APC (如肥大细胞、嗜酸性粒细胞) 受到抗原刺激后,会产生大量 IL-4 和 IL-10,抑制 IFN- γ 及 IL-12 分泌,阻止 Th₀ 向 Th₁ 分化。IL-10 是具有免疫抑制作用的细胞因子,现已发现有多种细胞 (如 T 细胞、B 细胞、DC、单核细胞及肿瘤细胞等) 均可表达 IL-10。Guidotti 等^[7]发现 HBV 转基因小鼠体内的一氧化氮 (nitric oxide, NO) 可通过 IFN- γ 介导途径发挥抑制 HBV 复制的作用。Mancini 等^[8]的实验研究表明,来自于 HBV DNA 免疫小鼠的 CD8⁺T 或 CD4⁺T 能足以控制 HBV 转基因小鼠肝脏病毒基因的表达,其机制可能与由 T 细胞激活的 IFN- γ 表达有关。

本研究结果表明,与正常小鼠 BALB/c 比较,转基因小鼠 DC 数量明显减少,表型出现显著变化,DC 表面低水平表达 MHCII 类分子及协同刺激信号,抗原提呈功能缺陷,引发 IL-12 分泌下降,导致 IFN- γ 水平下降、IL-10 大量释放及 Th₁/Th₂ 比例失衡,从而致使 CHB 患者病情迁延难愈,甚至有部分患者进而发展成为原发性肝癌,这与其它研究的结果基本一致。经短波辐射处理后,转基因小鼠 IL-12 的分泌水平显著高于空白对照组

($P < 0.05$),表明短波辐射能提高 IL-12 含量;在混合淋巴细胞反应中,经短波处理后,小鼠 T 淋巴细胞产生 IFN- γ 的能力较空白对照组显著增强,而 IL-10 水平则较空白对照组显著降低,说明短波辐射能提高 DC 的功能,从而纠正 Th₁/Th₂ 比例失衡,上调 DC 免疫功能。

经过多年的基础研究及临床观察,短波辐射的抗炎作用早已得到肯定,其临床应用亦日趋广泛^[9,10]。短波辐射在治疗各类炎症时,并非直接杀灭细菌、病毒,而是通过增强吞噬细胞功能,减少炎症介质释放,抑制自由基产生,诱发干扰素等环节发挥治疗作用^[11]。本研究结果表明,短波辐射对转基因小鼠 DC 功能缺陷确有调整作用,其可能原因包括:①短波作为一种高频电物理治疗手段,有着与中医药疗法相同的活血化淤、促进局部血液循环的功效;②短波辐射对机体免疫功能具有调节作用,特别是对慢性炎症的治疗效果尤为显著。综上所述,短波辐射治疗简便、经济、安全,具有良好的临床应用前景,但目前对于短波辐射治疗 CHB 的量效关系、应用时机、作用机制、安全性及副作用等还缺乏系统了解,尚待进一步研究。

参 考 文 献

- 1 南登崑,主编. 康复医学. 北京:人民卫生出版社, 2000. 107.
- 2 Lunga TL, Saurwein TM, Parsonb W, et al. Unimpaired dendritic cells can be derived from monocytes in old age and can mobilize residual function in senescent T cells. Vaccine, 2000, 18: 1606-1612.
- 3 Dakic A, Shao QX, D'Amico A, et al. Development of the dendritic cell system during mouse ontogeny. J Immunol, 2004, 172: 1018-1027.
- 4 Wattegedera S, Sills K, Howard CJ, et al. Variability in cytokine production and cell proliferation by mitogen-activated ovine peripheral blood mononuclear cells; modulation by interleukin (IL)-10 and IL-12. Vet Immunol Immunopathol, 2004, 102: 67-76.
- 5 Lopez RM, Maliszewski C, Urbain J, et al. Lymkines regulate the capacity of CD8⁺ and CD8⁻ dendritic cells to prime Th₁/Th₂ cell in vivo. J Immunol, 2001, 167: 4345-4350.
- 6 Kelleher P, Knight SC. IL-12 increases CD80 expression and the stimulatory capacity of bone marrow-derived dendritic cells. Int Immunol, 1998, 10: 749-755.
- 7 Guidotti BL, McClary H, Loudis JM, et al. Nitric oxide inhibits hepatitis B virus replication in the livers of transgenic mice. J Exp Med, 2000, 191: 1247-1252.
- 8 Mancini M, Hadchouel M, Tiollais P, et al. Regulation of hepatitis B virus mRNA expression in a hepatitis B surface antigen transgenic mouse model by IFN- γ -secreting T cells after DNA-based immunization. J Immunol, 1998, 161: 5564-5570.
- 9 王伟,孙强三,徐少华,等. 超短波辅助治疗慢性阻塞性肺疾病患者气道炎症的临床研究. 中华物理医学与康复杂志, 2003, 25: 477-479.
- 10 周淑华,蒋小燕,杨朝晖,等. 超短波对实验性肺间质纤维化的影响. 中华物理医学与康复杂志, 2002, 24: 533-535.
- 11 孙昭辉,孙强三,张秀芳. 超短波对肠易激综合征患者免疫功能的影响. 中华物理医学与康复杂志, 2003, 25: 623-625.

(修回日期: 2006-01-19)

(本文编辑: 易 浩)