

白细胞介素 12 与慢性乙型病毒性肝炎的相关性研究进展

吴园园 综述, 管世鹤 审核

(安徽医科大学第二附属医院检验科, 合肥 230601)

关键词: 白细胞介素 12; 肝炎, 乙型, 慢性; 研究**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.02.024**文献标识码:** A**文章编号:** 1673-4130(2012)02-0184-03

白细胞介素 12(IL-12)是近二十年发现的一种重要细胞因子, IL-2 协同促进鼠细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)应答。研究表明^[1-2], IL-12 具有多种生物学活性, 如促进 T 细胞增殖和诱导 T 细胞的杀伤活性, 在免疫过程中可介导 Th 型免疫反应的发展等。近年来, 国内外大量研究资料表明^[3-6], 慢性乙型病毒性肝炎的发生、发展过程伴随着细胞因子浓度的变化, 其中 IL-12 与慢性乙型病毒性肝炎的相关性受到高度重视。

1 IL-12 的结构

IL-12 是由二硫键连接的异源双体, 两个亚单位的相对分子质量分别为 35×10^3 和 40×10^3 。人 IL-12 P35 亚单位有 197 个氨基酸残基, 含 7 个半胱氨酸和 3 个 N 糖基化位点, P40 亚单位有 306 个氨基酸残基, 含 10 个半胱氨酸和 4 个 N 糖基化位点。IL-12 的 P35 亚基与 IL-6、G-CSF 以及鸡骨髓单核细胞生长因子有一定的序列同源性, 并且与许多细胞因子一样, 有 α -螺旋富集区; P40 亚基与其他细胞因子无序列同源性, 却与促红细胞生成素受体超家族的 IL-6 受体 α -亚基和睫状神经营养因子(CNTF)受体有一定的同源性。两个亚单位是由不同的基因所编码, 基因转染实验结果表明, 只有同时转染编码两个亚单位的 cDNA 才能获得有生物学活性的 IL-12^[7]。

2 IL-12 的生物学作用

2.1 诱导免疫反应朝着 Th1 型方向发展 IL-12 主要由抗原提呈细胞(APC)分泌产生, 抗原刺激的巨噬细胞、树突状细胞和 B 细胞是 IL-12 产生的主要来源。IL-12 的生物活性主要是促进 T 细胞增殖和诱导 T 细胞的杀伤活性, 在免疫过程中可介导 Th 型免疫反应的发展。Th1 型免疫反应能增强宿主抵抗微生物的感染, 目前认为, IL-12 是诱导 Th0 向 Th1 分化的直接刺激因子, 故 IL-12 是 Th1 应答强度的重要衡量指标^[8-12]。Gately 等^[13]认为, IL-12 在免疫反应中可诱导 IFN- γ 的产生, 诱导免疫反应朝着 Th1 型方向发展, 最终激活体内的细胞免疫。

2.2 IL-12 具有抗肿瘤作用 IL-12 通过促进 NK 细胞的杀伤水平和黏附分子的表达, 调节淋巴细胞增生, 刺激 NK 细胞产生, 发挥其较强的抗肿瘤作用, 且能抑制肿瘤的复发^[14-16]。Rodriguez-Madoz 等^[17]对慢性病毒性肝炎和肝细胞癌土拨鼠模型的体内研究证实, 诱导 IL-12 的产生可明显提高土拨鼠的抗肿瘤能力。为了评估抗肿瘤效应, 他们用增剂量的可高水平表达 IL-12 的塞姆利基病毒(SFV)感染土拨鼠, 对肿瘤大小进行超声测量, 其中 83% 的土拨鼠出现具有剂量依赖性的、局部的肿瘤体积减少, 瘤组织的体积最高可减少 80%。

3 IL-12 与慢性乙型病毒性肝炎的相关性

慢性乙型病毒性肝炎是持续 6 个月以上的慢性炎症。研究表明, 乙型肝炎病毒在机体内的持续感染是由病毒和机体免疫状态两方面因素决定的。目前认为, 机体能否最终清除病毒与体内免疫反应是以 Th1 型为主还是以 Th2 型为主有关,

Th1 型免疫反应能增强宿主抵抗微生物的感染, 尤其是病毒与病原体的胞内感染, 而 Th2 型免疫反应则与感染的进展、慢性化有关, 促进体内 Th1 型免疫反应有利于机体病毒的清除。IL-12 在免疫反应中可诱导 IFN- γ 的产生和抑制 IL-4 的产生, 从而诱导免疫反应朝着 Th1 型方向发展, 最终激活体内的细胞免疫。因此, IL-12 与慢性乙型肝炎病毒的相关性成为了目前的研究热点。

3.1 慢性乙型肝炎患者体内 IL-12 水平及外周血 DCs IL-12 分泌功能明显下降 何登明等^[18]根据第三军医大学西南医院感染病专科医院 45 例 HBV 感染者及 5 例健康献血员血清 IL-12 水平统计得出, 慢性乙型肝炎患者病变活动期血清 IL-12 含量 HBe 阳性组(17.95 ± 8.56), HBeAg 阴性组(16.24 ± 9.14), 均低于健康对照水平(52.22 ± 11.8), $P < 0.05$ 。

近年来的研究表明^[19], 慢性乙型肝炎患者外周血的 DCs 数量减少, 功能下调, 且临床往往表现出外周血高滴度的 HBV DNA 载量, 而且针对 HBV 的特异性 CTL 应答弱。向瑛等^[20]研究表明, 慢性乙型肝炎患者外周血 DCs 亦能受到 HBV 的感染, 感染了 HBV 的 DCs 分泌 IL-12 功能明显下降。课题组对 12 例慢性乙型肝炎血清 HBV DNA 阳性、10 例血清 HBV DNA 阴性患者及 10 例肝炎病毒标志物阴性, 肝功能正常的健康志愿者 DCs 进行体外定向诱导分化和培养, 收集培养第 7 天 DCs 上清用酶联免疫吸附法(ELISA)检测 IL-12 水平, IL-12 的表达水平在 HBV DNA 阳性、HBV DNA 阴性及对照组分别为(19.67 ± 7.32)、(30.74 ± 8.39)、(79.58 ± 6.68) ng/mL, HBV DNA 阳性组 IL-12 分泌水平明显低于 HBV DNA 阴性组及对照组, 均 $P < 0.01$, 且 HBV DNA 阴性组显著低于对照组, $P < 0.01$ 。此外, 课题组还对外周血来源 DCs 内的 HBV DNA 进行检测, 12 例血清 HBV DNA 阳性患者中有 7 例 DCs 内可检测到 HBV DNA, 检出率为 58.33%。

3.2 慢性乙型肝炎患者分泌 IL-12 水平与机体产生的重要抗病毒蛋白 2', 5'寡腺苷酸合成酶活性有关 章仕坚等^[21]通过检测数名健康对照者与慢性乙型肝炎(轻、中、重度组)患者体内 2', 5'寡腺苷酸合成酶(2', 5'OAS)与 IL-12 含量得出慢性乙型肝炎(轻、中、重度组)含量均显著低于健康对照组($P < 0.05$)。测静脉血单个核细胞 2', 5'OAS 相对计数值(counts/min)作为各样品 2', 5'OAS 活性水平进行比较, 20 名健康对照组为 3282 ± 858 , 30 名轻、中、重度组慢性乙型肝炎患者分别为 2496 ± 532 , 2409 ± 463 , 2319 ± 404 。用双抗体夹心 ELISA 法测定待测静脉血清 IL-12, 健康对照组为 39.92 ± 11.40 , 30 名轻、中、重度组慢性乙型肝炎患者分别为(36.75 ± 11.31)、(35.28 ± 8.35)、(33.36 ± 9.14) ng/L。

3.3 IL-12 对慢性乙型肝炎病毒患者预后评估的作用 慢性肝炎患者经过 IFN- α 治疗后, 清除乙型肝炎病毒的患者体内 IL-12 含量增长, 而没有清除病毒的患者变化不显著。研究数

据还显示,体内一定浓度的 IL-12 是慢性 HBV 感染者建立免疫力的一个重要元素^[22]。Wu 等^[23]通过体外研究证实,IL-12 beta-10993C/G 基因型与外周血单个核细胞在 HBcAg 刺激下分泌高水平 IL-12 密切相关。在 HBcAg 阳性患者中,血清中高水平 IL-12 与自发的早期 HBcAg 血清转换密切相关。拉米夫定治疗过程中 HBV 未发生 YMDD 变异的患者,在治疗后第 3、6、12 个月可检测到血清 IL-12 水平的升高;发生 YMDD 变异的患者,其血清 IL-12 水平仅在治疗后第 3 个月升高,且变化幅度较无变异组低,提示 YMDD 变异与拉米夫定治疗期间血清 IL-12 水平的变化有关;治疗期间血清 IL-12 水平升高幅度小,且升高持续时间短暂者,体内 HBV 发生 YMDD 变异的可能性更大,动态检测血清 IL-12 水平可用于预测拉米夫定治疗过程中 HBV 发生 YMDD 变异的可能性。拉米夫定治疗可以纠正 Th1/Th2 细胞因子失衡,恢复机体的细胞免疫,增强机体抗 HBV 免疫。在治疗后的各个时间点通过检测血清 IL-12 水平来评价机体 Th1 反应的程度,反映机体抗 HBV 免疫功能恢复情况,间接反映拉米夫定的疗效。IL-12 与慢性乙型肝炎相关性研究的深入将丰富对疾病的认识,从而更好地评价患者对拉米夫定治疗反应性^[24]。

3.4 IL-12 对慢性乙型肝炎病毒治疗的可能作用 IL-12 有抗病毒的功能,Berraondo 等^[25]以重组 IL-12 处理慢性病毒性肝炎动物模型的研究亦证实,IL-12 可能对于慢性病毒性肝炎具有一定的疗效。值得注意的是,IL-12 基因治疗可以增加细胞因子在靶器官的表达,并有效避免其他系统、器官、组织中 IL-12 水平的大幅波动。Rodriguez-Madoz 等^[17]的实验也表明,肿瘤内部给予可分泌 IL-12 的塞姆利基森林病毒(SFV)可能成为慢性 HBV 感染和由 HBV 感染导致的人类肝细胞癌新的治疗对策。

HBV 的清除主要依赖于可特异性识别抗原 MHC I 类分子复合物的 CTL,CTL 反应低下时,HBV 持续存在。IL-12 可促进 Th1 型细胞免疫,在促发 CTL 反应中起着重要的作用。Carreno 等^[26]应用三种不同剂量重组人 IL-12(0.5、0.25、0.03 $\mu\text{g/kg}$)每周 1 次皮下注射共 12 次,治疗 46 例慢性乙型肝炎患者,发现与治疗前比较,HBV DNA 滴度的中位数水平在治疗结束后明显下降,治疗结束后,0.5 $\mu\text{g/kg}$ 治疗组患者 HBV DNA 清除达 25%,0.25 $\mu\text{g/kg}$ 治疗组患者 HBV DNA 清除为 13%,而 0.03 $\mu\text{g/kg}$ 治疗组患者 HBV DNA 清除仅为 7%,提示治疗效果呈剂量依赖性。此外,随访患者中 HBcAg 转阴的有 5 人,其中有 2 人给予的 IL-12 剂量为 0.25 $\mu\text{g/kg}$,3 人给予的 IL-12 剂量为 0.5 $\mu\text{g/kg}$ 。

对 IL-12 和慢性乙型肝炎病毒关系的研究表明,IL-12 水平是反映慢性乙型肝炎预后的重要指标之一,提高机体 IL-12 水平可能成为治疗慢性乙型肝炎的有效途径。

参考文献

- [1] 庄海莲,赵梅,刘峰.白细胞介素 12 抗肿瘤作用的研究现状[J]. 中华实用中西医杂志,2011,24(1):50-51.
- [2] 汤善宏,高柳村,张志勇,等. pCP 能够增强树突状细胞对乙肝表面抗原肽提呈能力[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2011,27(2):215-219.
- [3] 金萍,邵勇. 妊娠期肝胆淤积症患者血清中白细胞介素 18、12 及肿瘤坏死因子 α 的水平变化及其临床意义[J]. 中华妇产科杂志,2011,46(5):329-332.
- [4] Chen Z, Cao J, Liao X, et al. Plasmids enriched with CpG motifs activate human peripheral blood mononuclear cells in vitro and en-

- hance th-1 immune responses to hepatitis B surface antigen in mice[J]. *Viral Immunol*, 2011, 24(3):199-209.
- [5] Zhang Z, Zhang S, Zou Z, et al. Hypercytolytic activity of hepatic natural killer cells correlates with liver injury in chronic hepatitis B patients[J]. *Hepatology*, 2011, 53(1):73-85.
- [6] Wang H, Su X, Zhang P, et al. Recombinant heat shock protein 65 carrying PADRE and HBV epitopes activates dendritic cells and elicits HBV-specific CTL responses[J]. *Vaccine*, 2011, 29(12):2328-2335.
- [7] Tung NH, Quang TH, Son JH, et al. Inhibitory effect of ginsenosides from steamed ginseng-leaves and flowers on the LPS-stimulated IL-12 production in bone marrow-derived dendritic cells[J]. *Arch Pharm Res*, 2011, 34(4):681-685.
- [9] Smeltz RB, Chen J, Shevach EM. Transforming growth factor-beta1 enhances the interferon-gamma-dependent, interleukin-12-independent pathway of T helper 1 cell differentiation[J]. *Immunology*, 2005, 114(4):484-492.
- [10] Rodriguez-Galán MC, Bream JH, Farr A. Synergistic effect of IL-2, IL-12, and IL-18 on thymocyte apoptosis and Th1/Th2 cytokine expression[J]. *J Immunol*, 2005, 174(5):2796-2804.
- [11] Guan SH, Lu MJ, Grunewald P, et al. Interferon-alpha response in chronic hepatitis B-transfected HepG2. 2. 15 cells is partially restored by lamivudine treatment[J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13(2):228-235.
- [12] 黄家禹,赵岩,宋秀宇,等. TNF- α 和脂多糖刺激结核病患者树突状细胞成熟效果比较[J]. 国际检验医学杂志,2011,32(1):9-10,13.
- [13] Gately MK, Gubler U, Brunda MJ, et al. Interleukin-12: a cytokine with therapeutic potential in oncology and infectious diseases[J]. *Ther Immunol*, 1994, 1(3):187-196.
- [14] 付江东,张爱华,鲁艳,等. 自体骨髓干细胞移植治疗肝硬化患者血清 IL-18、TNF- α 、TGF- β 1、HGF 水平变化及临床意义[J]. 国际检验医学杂志,2011,32(3):329-330.
- [15] Tung NH, Quang TH, Son JH, et al. Inhibitory effect of ginsenosides from steamed ginseng-leaves and flowers on the LPS-stimulated IL-12 production in bone marrow-derived dendritic cells [J]. *Arch Pharm Res*, 2011, 34(4):681-685.
- [16] Chen Z, Cao J, Liao X, et al. Plasmids enriched with CpG motifs activate human peripheral blood mononuclear cells in vitro and enhance th-1 immune responses to hepatitis B surface antigen in mice[J]. *Viral Immunol*, 2011, 24(3):199-209.
- [17] Rodriguez-Madoz JR, Liu KH, Quetglas JI, et al. Semliki forest virus expressing interleukin-12 induces antiviral and antitumoral responses in woodchucks with chronic viral hepatitis and hepatocellular carcinoma[J]. *J Virol*, 2009, 83(23):12266-12278.
- [18] 何登明,毛青,王宇明. HBV 感染者血清 IL-12 水平检测及其意义[J]. 免疫学杂志,2004,20(3):244-245.
- [19] Takaki A, Tatsukawa M, Koike K, et al. Mechanism of immune surveillance against HBV infection[J]. *Nippon Rinsho*, 2004, 62(8):62-65.
- [20] 向瑛,范学工,黄振宇,等. 慢性乙型肝炎患者树突状细胞分泌 IL-12 功能的初步研究[J]. 中国感染控制杂志,2010,9(5):316-319.
- [21] 章仕坚,唐永煌,颜亮. 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[J]. 中国病理生理杂志,2007,23(1):106-108.
- [22] Naoumov NV, Rossol S. Studies of interleukin-12 in chronic hepatitis b virus infection[J]. *J Viral Hepat*, 1997, 4(2):87-91.
- [23] Wu JF, Wu TC, Chen CH, et al. Serum levels of interleukin-10

- and interleukin-12 predict early, spontaneous hepatitis B virus e antigen seroconversion[J]. *Gastroenterology*, 2010, 138(1): 165-172.
- [24] 俞富军, 何生松, 张淑玲, 等. IL-12 和 IL-4 水平对观察和预测拉米夫定治疗乙病毒感染中发生 YMDD 变异的意义[J]. *世界华人消化杂志*, 2005, 13(12): 1460-1462.
- [25] Berraondo P, Prieto J, Gonzalez-Aseguinolaza G. *Advances in immunology*. London: Taylor & Francis, 2008: 1-12.
- terleukin-12 gene therapy for acquired liver diseases[J]. *Curr Gene Ther*, 2009, 9(2): 62-71.
- [26] Carreno V, Zeuzem S, Hopf U, et al. A phase I / II study of recombinant human interleukin-12 in patients with chronic hepatitis B[J]. *J Hepatol*, 2000, 32(2): 317-324.
- (收稿日期: 2011-10-08)
- 综 述 •

共刺激分子与类风湿关节炎

罗培欣 综述, 张莉萍[△] 审校

(重庆医科大学附属第一医院检验科 400016)

关键词: 类风湿, 关节炎; 共刺激分子; 可溶性共刺激分子

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.02.025

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)02-0186-03

共刺激/抑制分子为 T 细胞提供正性和负性信号, 调控 T 细胞的活化、增殖、分化和功能成熟, 在 T 细胞的动态平衡中起重要的作用^[1]。它们的表达失衡可能导致免疫性疾病的发生: ①共刺激分子如 CD28, 可诱导共刺激分子(ICOS)的上调, 有持续活化 T 细胞的能力; ②负调节因子如细胞毒性 T 细胞相关抗原 4 (CTLA-4), 程序性死亡蛋白 1 (PD-1) 的表达紊乱以及这些分子的可溶形式的功能拮抗导致免疫耐受的失调。虽然类风湿关节炎(RA)等常见的自身免疫性疾病的发病机制尚未明确, 但是近 1/4 个世纪的实验研究证明了共刺激/抑制信号参与了自身免疫性疾病的免疫调节紊乱。最近发现共刺激/抑制分子的可溶形式在一些自身免疫性疾病中特异地表达, 可能成为新的免疫学标记。而以共刺激信号通路为靶, 也为 RA 的治疗提供了新的思路。本文现就共刺激/抑制分子在 RA 的发病机制中的研究以及临床应用前景作一综述, 着重追踪了可溶性共刺激分子在 RA 等自身免疫性疾病中的新发现。

1 B7-1(CD80)/B7-2(CD86); CD28/CTLA-4(CD152)

T 细胞上的 CD28/CTLA-4 (CD152) 与抗原提呈细胞 (APC) 表面的天然配体 B7 分子家族成员 B7-1(CD80) 和 B7-2 (CD86) 是目前发现的最为重要的共刺激分子。CD28 表达于几乎所有 CD4⁺ T 细胞和大约 50% 的 CD8⁺ T 细胞。CTLA-4 在静息的 T 细胞上很低表达或测不出, 只在活化的 Th 细胞上表达。许多研究都显示 CD28 是最早表达的共刺激分子, 它促进 T 细胞的增殖, 调节 IL-2 和抗凋亡因子 (如 Bcl-xL) 的产生, 也促进包括 ICOS、OX40、4-1BB 等其他共刺激分子的表达, 从而共同增强或是维持免疫反应^[1]。相反, CTLA-4 对 T 细胞活化起负性调节作用。其抑制作用是通过改变它的外功能区的大小与 CD28 竞争配体 B7 以及通过它的胞内域传递负向信号而实现的^[2]。

许多体内实验均发现, RA 的发生和发展与 CD28/CTLA-4 的异常密切相关。RA 中调节性 T 细胞 (Treg) 表达的 CTLA-4 明显减少, 且 CTLA-4 的胞内摄取作用增加, 其发挥的调节功能是受限的^[3]。多项用 CTLA-4 Ig 治疗 CIA 模型 (胶原诱发性关节炎、类风湿关节炎的动物模型) 的实验发现, 其能特异地同 B7 分子结合阻断共刺激信号而诱导免疫耐受, 使 II 型胶原抗体下降且不出现明显的病理改变。在对不同人种的 RA 基因多态性研究中显示 CD28 的单核苷酸多态性

(SNPs) 可能与 RA 的风险有关。但是 CTLA-4 的 SNP 与 RA 的易感性在一些研究中显示无显著的关系。

T 细胞共刺激信号作为治疗 RA 等自身免疫性疾病的重要靶点一直是研究的热点。这些努力在 Abatacept 于 2005 年被 FDA 批准用于治疗中到重度的 RA 而达到了高潮。Abatacept 是一种选择性 T 细胞共刺激调节因子, 其与 CD80/86 高亲和, 就如同天然的 CTLA-4 一样, 序贯阻止 T 细胞活化的下游事件的产生。近期治疗 RA 的实验研究还在共刺激通路中不断地进行探索, 如靶向 DNA 疫苗^[4]、重组蛋白 Hph-1-ctCTLA-4^[5], 均在动物实验中证明有望成为 RA 的治疗方法。

sCTLA-4 在静息的 T 细胞上表达且释放到血浆, 它可能通过阻断 CD80/CD86 与 CTLA-4 的相互作用, 从而干扰抑制信号的传递, 也可能直接干扰 B7:CD28 介导的 T 细胞活化, 有研究还发现, sCTLA-4 对免疫细胞的氨基酸代谢产生影响, 其有趣的调节稳态的作用还有待进一步的研究。sCTLA-4 在几种自身免疫疾病如系统性红斑狼疮 (SLE)、重症肌无力等中增高, 可能成为自身免疫性疾病的潜在标志物。但有些研究却没有发现 sCTLA-4 在 RA 患者血清或关节滑膜液 (SF) 中升高^[6]。

2 PD-L1(B7-H1, CD274)/PD-L2 (B7-DC, CD273); PD-1

PD-1 是与 CD28 类似的免疫球蛋白超家族的成员。静息的 T 细胞表达低水平的 PD-1, 在活化后能被诱导表达。PD-1 的配体为 B7 家族成员 PD-L1 (PD ligand-1, B7-H1, CD274) 和 PD-L2 (B7-DC, CD273)。PD-1 在调节 T 细胞耐受中起关键作用, 早期即有研究发现 PD-1 (-/-) 小鼠发展成为进行性的狼疮样自身免疫性增生性关节炎和有 IgG3 沉积的肾小球肾炎^[7]。

PD-1/PDL-1 通路可能与 RA 的发病机制有关。PD-1 (-/-) 实验小鼠 CIA 的发病率和严重程度显著增加, 且和 II 型胶原反应的 T 细胞增殖和细胞因子 (如 IFN- γ 、IL-17) 的产生增多有关^[8]。在一些人类基因多态性研究中, PD-1 的 SNPs 也被证明与 RA 的易感性相关。最近的实验研究给予 CIA 模型小鼠 PDL-Ig 或是 PDL-1, Fc 治疗后均显示可减少 T 细胞反应和改善 CIA^[8-9], 也证明该通路可能是治疗 RA 的另一个免疫调节靶点。但有些实验却发现, PD-1、PD-L1 等共抑制分子在滑膜组织及滑液 T 细胞、巨噬细胞上过表达^[6, 8], 这

[△] 通讯作者, E-mail: liuzhangcq@yahoo.com。