

# pcDNA3- HBV 瞬时转染对巨噬细胞活性的影响

高立芬 孙汶生 马春红 张利宁 曹英林 刘素侠 梁晓红 刘华

**【摘要】** 目的 利用 HBV 全基因真核细胞表达载体 pcDNA3- HBV 研究 HBV 感染后对巨噬细胞活性的影响,探讨慢性乙型肝炎患者免疫耐受发生的机制。方法 常规制备小鼠腹腔巨噬细胞,分别将 pcDNA3- HBV、pcDNA3 质粒 DNA 与绿色荧光蛋白(GFP)的质粒 DNA pEGFP-N1 以 9:1 混合,利用脂质体转染试剂盒,共转染小鼠腹腔巨噬细胞。转染后 72 h,半定量逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测 HBV 前 S1、TNF- $\alpha$ 、白介素(IL)-1 mRNA 的表达,流式细胞术测 GFP 的表达强度、检测核因子 B(NF- $\kappa$ B)蛋白的表达,利用 Griess 反应检测转染前后培养上清液中 NO 的水平。结果 流式细胞术结果表明,pcDNA3- HBV 与 pcDNA3 转染的巨噬细胞中 GFP 的表达率无明显差异,pcDNA3- HBV 转染的巨噬细胞中检测到前 S1 mRNA 的表达。通过与  $\beta$ -actin 相比,pcDNA3- HBV 转染的巨噬细胞中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 mRNA 的表达量显著低于空载体对照组( $P < 0.01$ );pcDNA3- HBV 转染的巨噬细胞表达 NF- $\kappa$ B RelA 蛋白的百分数与空载体对照组相当,但平均荧光强度显著低于空载体对照组(pcDNA3- HBV 转染组为 125.05;pcDNA3 转染组为 203.88);pcDNA3- HBV 转染组巨噬细胞产生 NO 的水平显著低于 pcDNA3 转染组(分别为  $15.0 \pm 0.6$ ,  $45.0 \pm 1.3$ ,  $P < 0.01$ )。结论 pcDNA3- HBV 转染后使巨噬细胞 NF- $\kappa$ B 活性显著降低,TNF- $\alpha$ 、IL-1 mRNA 的表达及 NO 的产生水平明显下降。提示 HBV 感染可能直接抑制巨噬细胞的活化,导致功能降低,可能与慢性乙型肝炎患者免疫耐受的机制有关。

**【关键词】** 肝炎病毒,乙型;转染;巨噬细胞;基因表达

**Effects on macrophages activity transfected transiently with pcDNA3- HBV** GAO Li-fen, SUN Wen-sheng, MA Chun-hong, et al. Institute of Immunology, Medical School, Shandong University, Jinan 250012, China

Corresponding author: SUN Wen-sheng, Email: wsw@sdu.edu.cn

**【Abstract】 Objective** To explore the mechanism of immune tolerance in chronic B hepatitis, the effects of HBV infection on the functions of macrophages and related mechanism of signal transduction by transfection in vitro were studied. **Methods** Peritoneal macrophages of mice were isolated regularly and cultured, transfected transiently with pcDNA3- HBV or pcDNA3 plasmid DNA and cultured under the stimulation of LPS. After 72 h, RT-PCR was performed to detect the expression of PreS1, TNF- $\alpha$  or IL-1 mRNA. To detect the expression of NF- $\kappa$ B RelA protein by FCM, and the level of nitric oxide in cultural supernatant was measured with Griess reaction. **Results** After being transfected with pcDNA3- HBV, peritoneal macrophages had the expression of PreS1 mRNA, but have lower level of TNF- $\alpha$ , IL-1 mRNA and transcriptional factor NF- $\kappa$ B, compared with pcDNA3-transfected control group; the level of nitric oxide in pcDNA3- HBV group was also decreased. **Conclusions** Transient transfection of pcDNA3- HBV could decrease the function of macrophages directly by inhibiting NF- $\kappa$ B activity and effector molecules production, which may be one of the mechanisms of immune tolerance in chronic B hepatitis.

**【Key words】** Hepatitis B virus; Transfection; Macrophages; Gene expression

基金项目:国家自然科学基金委海外青年学者合作研究基金资助项目(30128023);国家自然科学基金资助项目(30070341)

作者单位:250012 济南,山东大学医学院免疫学研究所

通信作者:孙汶生,Email:wsw@sdu.edu.cn

慢性乙型肝炎的临床转归是由病毒和宿主双方面的因素决定的,抗病毒治疗是慢性乙型肝炎治疗的一个重要手段,但最终清除 HBV 还需要机体具有健全的特异性免疫功能。大量研究证明,慢性乙型肝炎患者存在免疫功能低下,尤其是对 HBV 的特异性免疫功能降低甚至处于免疫耐受状态,使机体不能清除 HBV<sup>[1]</sup>。抗原递呈细胞(APC)是激发机体免疫反应的首要环节,能否进行有效的抗原递呈直接关系到免疫激活或免疫耐受的诱导。研究发现,HBV 的免疫清除依赖于 HBV 特异性 T 细胞反应的激活,而 HBV 特异性免疫的建立有赖于 APC 功能的健全<sup>[2,3]</sup>。临床和动物实验研究表明,慢性乙型肝炎患者外周血树突状细胞(DC)功能低下<sup>[4-6]</sup>,但有关单核巨噬细胞(M $\phi$ )的相关研究未见报道。我们利用体外转染的模式,通过检测 M $\phi$  中细胞核因子(NF)-B 的活性、TNF- $\alpha$  与白介素(IL)-1 mRNA 的表达及产生 NO 的水平,对 HBV 感染后 M $\phi$  活性的变化进行了初步探讨。

## 材料与方 法

### 一、材料

(一)动物 SPF 级 BALB/c 小鼠,雄性,6~8 周龄,体重 16~18 g,由山东大学实验动物中心提供。

(二)质粒 pcDNA3-HBV 由本所构建,质粒 pcDNA3 及 pEGFP-N1 由本室保存。

(三)试剂 脂质体转染试剂 Lipofectamine、总 RNA 提取试剂盒(Trizol Reagent)及 RPMI 1640 培养基为 GIBCO 公司产品;M-MuLV 逆转录酶、Taq DNA 聚合酶由上海生工生物工程技术有限公司提供;新生小牛血清购自杭州四季青生物制品有限公司;焦碳酸二乙酯为 Sigma 公司产品;DNA 标记物 DL2000(100~2000 bp)为 TaKaRa 公司产品;NF-B RelA 单克隆抗体为美国 Santa Cruz 生物技术公司产品;一氧化氮(NO)检测试剂盒由江苏碧云天试剂公司提供。

(四)引物 BioAsia 上海博亚生物技术有限公司合成,引物序列参考文献及基因库提供的 DNA 序列设计,见表 1。

### 二、方法

(一)小鼠腹腔巨噬细胞的分离与培养 6%淀粉腹腔注射,每只小鼠 1 ml。72 h 后,小鼠去眼球放血,颈椎脱臼处死,75%酒精浸泡 10 min,无菌打开腹腔,以预冷的磷酸盐缓冲液(PBS)灌洗腹腔细胞,离心,2000 r/min  $\times$  10 min,离心半径为 15 cm 去上清液,沉淀以无血清 RPMI 1640 洗 2 次,调细胞密度至  $1 \times 10^6$ /ml。吸取细胞悬液加至 24 孔细胞培养板,每孔 1 ml。置 37 $^{\circ}$ C、5% CO $_2$  温箱中培养 2 h,洗去非粘附细胞即得 M $\phi$  单层,每孔加入 0.5 ml 无血清、无抗生素的 RPMI 1640 培养基,以备转染使用。

(二)瞬时共转染 取 pcDNA3-HBV 及空载体 pcDNA3 质粒 DNA 各 1  $\mu$ g,与 pEGFP-N1 9 1 混合后,分别加入无血清、无抗生素的 RPMI 1640 培养基,使终体积为 50  $\mu$ l,混匀。取脂质体 4  $\mu$ l,加入 96  $\mu$ l 无血清、无抗生素的 RPMI 1640 培养基,混匀,室温放置 5 min。然后取出 50  $\mu$ l,分别加到上述含质粒 DNA 的 Ep 管内(每管内总体积为 100  $\mu$ l),混匀,室温放置 20 min,30 min 内将 100  $\mu$ l 脂质体包裹的质粒 DNA 逐滴加到 M $\phi$  单层。轻轻晃动培养板,置 37 $^{\circ}$ C 培养,各做 6 个复孔。6 h 后,吸弃含脂质体的培养液,换成含 10% 小牛血清、20 ng/ml 脂多糖、无抗生素的 RPMI 1640 培养基,每孔 0.5 ml,继续培养。72 h 后,分别收集培养上清液,-20 $^{\circ}$ C 保存,检测 NO 备用。

(三)流式细胞术检测 收集转染后培养 72 h 的 M $\phi$   $1 \times 10^6$ ,0.01 mol/L PBS 漂洗一次,4000 r/min 离心 5 min,弃上清液,加入 0.5 ml 预冷的 70%乙醇混悬细胞,4 $^{\circ}$ C 保存,检测绿色荧光蛋白(GFP)的表达。M $\phi$  分别经一抗(NF-B RelA)、二抗标记后,过滤后上流式细胞仪,每个样本检测 1~2 万个细胞,检测 NF-B RelA 的表达。

表 1 RT-PCR 引物序列及扩增产物

引物	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')	扩增产物
前 S1	GCTCTA GACACCAAATGCCCTA	GCTCTA GA GAA TCCCA GA GG	625 bp
IL-1	GCAACTGTTCTCTGA ACTCA	CTCGGA GCCTGTA GTGCA G	372 bp
TNF- $\alpha$	ATGA GCACA GAAA GCA TGA TC	TACA GGCTTG TCACTCGA ATT	275 bp
-actin	ATGGA TGACGA TA TCGCT	ATGA GGTA GTCTGTCA GGT	578 bp

**(四) 逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR)** 收集上述培养 72 h 的 M, 抽提 RNA、逆转录成 cDNA: 5 × buffer 4 μl、三磷酸脱氧核糖核苷 (dNTP) 20 nmol、Rnase 抑制剂 20 U 及 M-MLV 逆转录酶 200 U, 于 42 进行逆转录反应 1 h, 70 水浴变性 10 min, 置 4 保存。以上述 cDNA 为模板, 利用相应的特异性引物, 按下列反应体系和条件进行扩增: 25 μl PCR 反应体系中, 分别含有 RT 产物 1 μl、10 × PCR buffer 2.5 μl、Mg<sup>2+</sup> 0.3 mmol/L、dNTP 5 nmol/L、Taq 酶 3 U 及上、下游引物各 10 nmol/L。前 S1 反应条件为: 94 预变性 3 min 后, 进行 30 轮循环 (94 变性 1 min, 50 退火 1 min, 72 延伸 1 min), 最后 72 延伸 5 min (-actin、IL-1 退火温度为 55)。TNF- 反应条件为: 94 预变性 3 min 后, 进行 30 轮循环 (94 变性 45 s, 58 退火 1 min, 72 延伸 30 s), 最后 72 延伸 5 min。取 10 μl PCR 产物于 2% 琼脂糖凝胶电泳, 70 V, 30 min。

**(五) NO 检测** 在 96 孔板中每孔加入待测上清液 50 μl, 加入等体积的 Griess 试剂, 每份标本作三复孔, 设培养液加 Griess 试剂为调零孔。室温下轻摇 10 min, 于酶联检测仪上读取 570 nm 处的 A 值, 根据标准曲线算出相应的 NO<sub>2</sub> 浓度, 并以此间接反映 NO 的含量。

**(六) 统计学分析** 用未配对计量资料的 t 检验, 检验水准 = 0.05。

**结 果**

**一、GFP 的表达**

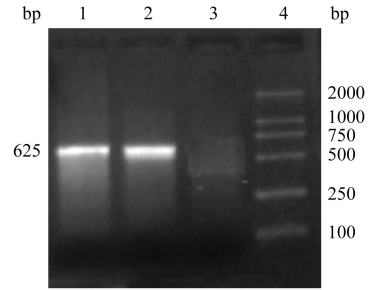
流式细胞术结果显示, pcDNA3- HBV 及空载体 pcDNA3 转染后的 M 均表达 GFP, 两组无明显差异。

**二、前 S1 mRNA 的表达**

如图 1 所示, 以 pcDNA3- HBV 质粒 DNA PCR 产物为阳性对照, pcDNA3- HBV 转染组在 625 bp 处出现特异性条带, 空载体对照组无特异性产物。

**三、NF- B 的表达**

pcDNA3- HBV 转染组 M 表达 NF- B RelA 蛋白的百分数与空载体转染组相当, 但平均荧光强度显著低于空载体对照组 (P < 0.01)。实验重复 3 次, 其中一次的结果见表 2。



1: pcDNA3- HBV DNA 的 PCR 产物 (阳性对照); 2: pcDNA3- HBV 转染 M 后的 RT-PCR 产物; 3: pcDNA3 转染 M 后的 RT-PCR 产物; 4: DNA 分子量标志 DL2000

图 1 HBV 前 S1 mRNA 在转染 M 中的表达

表 2 流式细胞术检测 M NF- B RelA 蛋白的表达

组别	M 表达 NF- B RelA 蛋白	
	百分数 (%)	平均荧光强度
pcDNA3- HBV 转染组	96.93	125.05
pcDNA3 转染组	96.29	203.88

**四、IL-1、TNF- mRNA 的表达**

以 -actin 作为内参照, 检测 pcDNA3- HBV 及空载体 pcDNA3 转染后小鼠腹腔 M 中 TNF-、IL-1 mRNA 的表达, 用平均吸光度值表示其表达的相对强度。结果表明, pcDNA3 转染组 TNF-、IL-1 强表达, 而 pcDNA3- HBV 转染组表达显著降低, 见表 3。

表 3 HBV 对 TNF-、IL-1 mRNA 表达的影响 (A,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	TNF- / -actin	IL-1 / -actin
pcDNA3 转染组	0.74 ± 0.10	0.92 ± 0.13
pcDNA3- HBV 转染组	0.55 ± 0.08	0.69 ± 0.11
t 值	2.47	6.93

注: TNF- mRNA 的表达 pcDNA3- HBV 转染组与 pcDNA3 转染组相比, P < 0.05; IL-1 mRNA 的表达 pcDNA3- HBV 转染组与 pcDNA3 转染组相比, P < 0.01

**五、NO 水平的检测**

pcDNA3- HBV 转染后, M 继续培养 72 h, 培养上清液中 NO 的相对水平为 15.0 ± 0.6, 而空载体对照组为 45.0 ± 1.3, 两组相比差异有统计学意义 (P < 0.01)。

**讨 论**

慢性乙型肝炎患者外周血单核细胞来源的 DC 刺激 T 细胞增殖的能力及产生 IL-12 的水平显著低于健康个体, 通过原位杂交, 在 DC 中检测到了 HBV DNA 和 mRNA 的表达。体外研究发

现, HBV 感染的 DC 刺激 T 细胞增殖的能力降低, 并且利用核苷类似物抑制 HBV 的复制后可逆转上述效应<sup>[7]</sup>。该研究显示, HBV 在体内可以感染外周血单个核细胞, 并能进一步抑制 DC 的功能。M 作为一种专职的抗原递呈细胞, 在免疫应答中起着重要作用。

我们利用脂质体转染的方法, 将 HBV 全基因组重组体与报告基因共转染入小鼠腹腔 M 中, 转染后检测到 GFP 及前 S1 mRNA 的表达, 说明转染成功。研究结果显示, 在 pcDNA3- HBV 转染组, M 产生 NO 的水平、表达 TNF- $\alpha$  与 IL-1 mRNA 的量显著低于空载体转染组, 而且 NF- $\kappa$ B 的活性也明显降低。M 在抗微生物感染的过程中, 其直接细胞毒作用是次要的, 主要通过产生 NO、TNF- $\alpha$ 、IL-1 等效应分子协同作用以达到抗菌的目的, 并参与免疫应答和免疫调节。NO 是在一氧化氮合成酶作用下生成的一种具有信息传递和免疫效应功能的活性分子, 对多种病原体具有细胞毒性或抑制活性, 并有研究表明阻断 NO 合成, 机体杀菌抑菌活性降低<sup>[8]</sup>。TNF- $\alpha$  能增强 M 的吞噬和杀菌活性, 增强 M 促进免疫应答的能力。IL-1 是激活的 M 分泌的一种重要细胞因子, 可介导多种免疫效应, IL-1 的生物学效应主要由转录因子 NF- $\kappa$ B 调节, 而 TNF- $\alpha$ 、IL-1 又可调节 NF- $\kappa$ B 的活化<sup>[9-11]</sup>。研究表明, 活化的 NF- $\kappa$ B 可单独与其他转录因子协同, 参与上述介质基因的诱导表达, 而 M 产生的 TNF- $\alpha$ 、IL-1 等又可激活 NF- $\kappa$ B, 活化的 NF- $\kappa$ B 可促进 TNF- $\alpha$ 、IL-1 等的过度表达, 形成一个正反馈通路, 使最初的炎症信号放大, 生物学效应加强。NF- $\kappa$ B 抑制剂二巯氨基甲酸肽吡咯烷 (PDTC) 可阻断结合于 NF- $\kappa$ B 结合部位蛋白的激活, 同时也阻断 NO 生成<sup>[12]</sup>。因此, 通过检测 M 产生的主要效应分子水平及 NF- $\kappa$ B 的活性, 可以间接反映 M 的功能状态。本研究结果表明, HBV 直接感染 M 后可抑制其进一步活化, 导致功能降低, 表现为产生 TNF- $\alpha$ 、IL-1 及 NO 等效应分子的能力下降, 不能有效清除病毒。另外由于 M 的功能降低, 不能进行有效的抗原递呈, 机体不能产生高水平的 HBV 特异性的免疫应答, 并且 M 还可能成为 HBV 肝外寄生的场所, HBV 在体内继续复制、表达, 从而加重感染的程度。但至于

HBV 感染后抑制 M 功能的确切分子机制尚有待于进一步深入研究。

### 参 考 文 献

- 1 Lohr HF, Pingel S, Bocher WO, et al. Reduced virus specific T helper cell induction by autologous dendritic cells in patients with chronic hepatitis B-restoration by exogenous interleukin-12. *Clin Exp Immunol*, 2002, 130:107-114.
- 2 Rico MA, Quiroga JA, Subira D, et al. Hepatitis B virus-specific T-cell proliferation and cytokine secretion in chronic hepatitis B e antibody-positive patients treated with ribavirin and interferon alpha. *Hepatology*, 2001, 33:295-300.
- 3 Schlaak JF, Tully G, Lohr HF, et al. HBV-specific immune defect in chronic hepatitis B (CHB) is correlated with a dysregulation of pro- and anti-inflammatory cytokines. *Clin Exp Immunol*, 1999, 115:508-514.
- 4 Kakumu S, Ito S, Ishikawa T, et al. Decreased function of peripheral blood dendritic cells in patients with hepatocellular carcinoma with hepatitis B and C virus infection. *J Gastroenterol Hepatol*, 2000, 15:431-436.
- 5 Akbar SM, Abe M, Masumoto T, et al. Mechanism of action of vaccine therapy in murine hepatitis B virus carriers: vaccine-induced activation of antigen presenting dendritic cells. *J Hepatol*, 1999, 30:755-764.
- 6 邢利和, 王福生, 刘明旭, 等. 慢性乙型肝炎患者树突状细胞的培养鉴定和功能特点. *中华传染病杂志*, 2001, 19:348-351.
- 7 Beckebaum S, Cicinnati VR, Zhang X, et al. Hepatitis B virus-induced defect of monocyte-derived dendritic cells leads to impaired T helper type 1 response in vitro: mechanisms for viral immune escape. *Immunology*, 2003, 109:487-495.
- 8 Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S, et al. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelial-derived relaxing factor. *Nature*, 1987, 327:524-528.
- 9 O'Neill LA, Greene C. Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor family: ancient signaling machinery in mammals, insects, and plants. *J Leukoc Biol*, 1998, 63:650-657.
- 10 May MJ, Ghosh S. Signal transduction through NF- $\kappa$ B. *Immunol Today*, 1998, 19:80-88.
- 11 Kontny E, Kurowska M, Szczepanska K, et al. Rottlerin, a PKC isozyme-selective inhibitor, affects signaling events and cytokine production in human monocytes. *J Leukoc Biol*, 2000, 67:249-258.
- 12 Xie QW, Kashiwabara Y, Nathan C. Role of transcription factor NF- $\kappa$ B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J Biol Chem*, 1994, 269:4705-4708.

(收稿日期: 2004-07-13)

(本文编辑 沈漱瑜)