

新生树鼯乙型肝炎病毒感染模型体内 IL-10 及 IL-18 的表达*

范倪¹, 陆玉秀², 唐艳萍¹, 李科志¹, 何盼¹, 曹骥¹, 杨春^{1△}

(1. 广西医科大学附属肿瘤医院, 南宁 530021; 2. 广西医科大学第三附属医院 南宁 530031)

摘要 目的:观察新生树鼯乙型肝炎病毒(HBV)感染模型外周血及肝组织白介素(IL)-10及IL-18的表达。**方法:**对16只新生期树鼯接种人HBV,6只未接种病毒的新生期树鼯为对照组。用PCR-荧光探针法检测血清HBV-DNA含量,电化学发光免疫分析法检测乙肝标志物确定感染组(HBsAg阳性或HBV-DNA阳性)。分别于接种后第8、第12、第16、第20、第24周,用酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测外周血IL-10、IL-18水平变化,接种后第24周用实时荧光定量PCR(qPCR)法检测肝组织IL-10、IL-18 mRNA相对表达量。**结果:**接种后第8周,HBsAg阳性5只,HBV-DNA阳性9只。对照组乙肝标志物及HBV-DNA均为阴性。HBV-DNA组接种后第12、第16、第20周血清IL-10水平明显高于对照组($P < 0.05$),HBsAg阳性组血清IL-10水平高于对照组,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。接种后第12、第16、第20周,HBsAg阳性组树鼯血清IL-18水平明显高于对照组($P < 0.05$);接种后第8、第12、第16、第20周,HBV-DNA阳性组树鼯血清IL-18水平明显高于对照组($P < 0.05$)。与对照组比较,HBsAg阳性组和HBV-DNA阳性组IL-10 mRNA相对表达量均显著升高,HBsAg阳性组IL-18 mRNA相对表达量显著升高(均 $P < 0.05$)。**结论:**IL-10、IL-18在树鼯体内HBV感染模型中的表达水平升高,两者在HBV感染慢性化过程中起重要作用。

关键词 慢性乙型肝炎;IL-10;IL-18;树鼯;乙型肝炎病毒

中图分类号:R512.62 **文献标志码:**A **文章编号:**1005-930X(2018)05-0623-05

DOI:10.16190/j.cnki.45-1211/r.2018.05.009

The expressions of IL-10 and IL-18 in neonatal tree shrew with hepatitis B infection

Fan Ni¹, Lu Yuxiu², Tang Yanping¹, Li Kezhi¹, He Pan¹, Cao Ji¹, Yang Chun¹. (1. The Affiliated Tumor Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 2. The Third Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530031, China)

Abstract Objective: To investigate the expressions of interleukin(IL)-10 and IL-18 in neonatal tree shrew with hepatitis B infection. **Methods:** Sixteen neonatal tree shrews were infected with human hepatitis B virus (HBV), and 6 non-vaccinated tree shrews were used as controls. Serum HBV-DNA level and the mRNA expressions of IL-10 and IL-18 in liver tissues were detected by real-time fluorescence quantitative PCR (qPCR). The levels of IL-10 and IL-18 in serum were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results:** Of 16 tree shrews, 5 cases were HBsAg positive and 9 cases were HBV-DNA positive. At week 12, 16 and 20 after infection of HBV, HBV-DNA positive tree shrews had markedly higher levels of IL-10 and IL-18 than controls ($P < 0.05$), but no significant difference in IL-10 level between the HBsAg positives and controls ($P > 0.05$). After 12, 16 and 20 weeks of infection, the serum IL-18 level was notably increased in HBsAg positive tree shrews compared with the controls ($P < 0.05$). The mRNA expressions of IL-10 and IL-18 were up-regulated in HBsAg or HBV-DNA positives than that in controls, and were higher in HBsAg positives ($P < 0.05$). **Conclusion:** IL-10 and IL-18 were highly expressed in tree shrews infected by HBV, which plays an important role in the process of chronic HBV infection.

Keywords chronic hepatitis B; IL-10; IL-18; tree shrews; HBV

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81460418)

△通信作者, E-mail: cxi_yang@163.com

收稿日期: 2018-01-23

机体感染乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)后可有不同的表现形式和预后,分为急性感染阶段、慢性感染阶段、无症状携带病毒、肝硬化及肝癌等^[1]。急性感染性乙型肝炎通常呈自限性过

程,病毒在机体内很快被清除,常被称为免疫清除;慢性乙型肝炎感染阶段机体可产生免疫耐受,乙肝病毒在体内保持持续复制状态;无症状携带病毒者临床表现轻微或无症状,病毒可持续复制也可处于静止期。

目前认为免疫调节失衡是慢性乙型肝炎的主要致病机制,其主要表现为 Th1/Th2 免疫失衡^[2]。Th1 细胞可分泌干扰素(IFN)- γ 、白介素(IL)-2、IL-18 等,诱发细胞免疫直接清除病原体如病毒、细菌、寄生虫等,同时导致肝细胞损伤。Th2 细胞可分泌 IL-10、IL-6 等免疫因子,诱导 B 淋巴细胞的体液免疫反应,抑制 Th1 所诱导的免疫损伤,使病毒持续复制,使机体产生免疫耐受。当 Th1/Th2 平衡向 Th2 倾斜时,即 Th2 细胞处于高分泌状态,抑制 Th1 细胞因子的产生及其对病原体的直接清除作用,机体形成免疫耐受,病毒持续复制,机体的慢性感染持续存在。本研究通过观察新生儿树鼩接种人 HBV 后 24 周内外周血 IL-10、IL-18 水平的变化,探讨 Th1/Th2 细胞因子在树鼩慢性乙型肝炎发病机制中的作用。

1 材料与方法

1.1 感染血源

选用 HBsAg、HBeAg 和 HBcAb 3 项指标均为阳性且 HBV-DNA 拷贝数 $\geq 2.27 \times 10^7$ copies/mL (HBV 基因亚型为 C 型)的慢性乙型肝炎患者的血清作为感染源,患者同意并签署知情同意书,分离血清,分装后置于 -80 °C 冰箱中保存。

1.2 动物来源及处理

本实验 22 只新生儿树鼩均为成年树鼩(购自昆明动物研究所)雄雌合笼后自然受孕所产出的幼仔,随机分为对照组($n=6$)和感染组($n=16$),感染组于出生后第 1、第 3 天分别接种 300 μ L HBV 感染者血清,对照组不作任何处理。饲养环境保持 25 ~ 28 °C,湿度 60% ~ 80%,每日清洁 2 次^[3]。本实验所有动物处置均符合动物伦理学要求。

1.3 样本采集

1.3.1 血清采集 分别于接种后第 8、第 12、第 16、第 20、第 24 周经股静脉采血约 1.2 mL,室温下静置 30 min,4 °C、3 000 r/min 离心 15 min,取血清,置于 -80 °C 冰箱中保存。

1.3.2 肝组织采集 接种后第 24 周,肌肉注射氯胺酮(0.1 mL/100 g)和腹腔注射 0.1%戊巴比妥钠(0.3 mL/100 g)全身麻醉后,开胸,取肝组织约 100 mg,一部分立即放入液氮中,之后置于 -80 °C 冰箱中保存;另一部分置于 10%中性福尔马林液中固定。

1.4 观察指标

1.4.1 肝组织病理学观察 10%中性福尔马林液中固定 24 h 后,常规脱水、透明、浸蜡、石蜡包埋,4 μ m 连续切片,行苏木精—伊红(HE)染色,显微镜下观察肝组织病理学形态。

1.4.2 乙肝标志物及 HBV-DNA 病毒载量检测 用电化学发光免疫分析法定量检测乙肝标志物,在本院检验科完成,试剂盒购自北京科美生物技术公司;用 PCR-荧光探针法检测血清 HBV-DNA 含量,在本院实验研究部完成,试剂盒购自中山达安生物技术有限公司。

1.4.3 血清 IL-10、IL-18 蛋白水平的检测 取血清,平衡至室温后,采用 ELISA 检测血清中 IL-10、IL-18 的水平。ELISA 检测试剂盒购自深圳雅安达科技生物有限公司,严格按照试剂盒说明书进行操作。

1.4.4 荧光定量 PCR(qPCR)法检测肝组织 IL-10、IL-18 mRNA 相对表达量 提取肝组织总 RNA,逆转录成 cDNA,采用美国安捷伦 Mx3000p 型 PCR 仪进行 PCR 扩增反应,反应条件:95 °C 预变性 30 s;95 °C 变性 5 s、60 °C 退火 34 s、95 °C 延伸 15 s,共 40 个循环;添加熔解曲线。以 GAPDH 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因的相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

基因名称	序列	产物长度/bp
IL-10	上游 5'-CACCTACTTCCCAGCCAACC -3'	125
	下游 5'-TCAGCAGAGACTCACTCAGCAAC-3'	
IL-18	上游 5'-CTGACAGTAATAAATCCCAGGTCAA -3'	136
	下游 5'-AAGGAAAGAGTTTTGTCTCACAGG -3'	
GAPDH	上游 5'-AGAAGGCTGGGGCTCATTTG-3'	294
	下游 5'-GGGGCCATCCACAGTCTTC-3'	

1.5 统计学方法

使用 SPSS 19.0 统计软件对数据进行分析处理,计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用两独立样本 *t* 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 树鼯血清 HBV 感染标志物和 HBV-DNA 检测情况

接种后第 8 周,可检测出 ≥ 1 次 HBsAg 阳性树鼯 5 只(31.25%),为 HBsAg 阳性组, ≥ 1 次 HBV-DNA 阳性树鼯 9 只(56.25%),为 HBV-DNA 阳性

组。

2.2 树鼯血清 IL-10 水平

HBV-DNA 组接种后第 12、第 16、第 20 周血清 IL-10 水平明显高于对照组($P<0.05$);HBsAg 阳性组血清 IL-10 水平高于对照组,但差异无统计学意义($P>0.05$),见表 2。

2.3 树鼯血清 IL-18 水平

接种后第 12、第 16、第 20 周,HBsAg 阳性组树鼯血清 IL-18 水平明显高于对照组($P<0.05$);接种后第 8、第 12、第 16、第 20 周,HBV-DNA 阳性组树鼯血清 IL-18 水平明显高于对照组($P<0.05$),见表 3。

表 2 树鼯血清 IL-10 水平($\mu\text{g/L}, \bar{x}\pm s$)

组别	8 周	12 周	16 周	20 周	24 周
对照组 (<i>n</i> =6)	14.86±4.08	15.97±3.69	15.17±1.33	15.68±3.86	15.22±4.21
HBsAg 阳性组 (<i>n</i> =5)	18.74±3.89	20.24±6.83	34.32±17.01	30.62±14.33	32.85±39.22
HBV-DNA 阳性组 (<i>n</i> =9)	25.71±16.62	31.64±18.36*	37.16±17.46*	33.42±21.41*	35.55±41.37

与对照组比较,* $P<0.05$ 。

表 3 树鼯血清 IL-18 水平($\mu\text{g/L}, \bar{x}\pm s$)

组别	8 周	12 周	16 周	20 周	24 周
对照组 (<i>n</i> =6)	14.86±4.08	15.97±3.69	15.17±1.33	15.68±3.86	15.22±4.21
HBsAg 阳性组 (<i>n</i> =5)	80.97±62.20	60.34±13.63*	76.00±29.20*	70.03±28.69*	80.17±114.29
HBV-DNA 阳性组 (<i>n</i> =9)	84.55±54.21*	37.00±51.80*	101.56±53.60*	105.23±75.68*	127.42±130.36

与对照组比较,* $P<0.05$ 。

2.4 树鼯肝组织中 IL-10、IL-18 mRNA 相对表达量

qPCR 结果显示:树鼯接种人 HBV 后第 24 周,HBsAg 阳性组和 HBV-DNA 阳性组肝组织中 IL-10 mRNA 相对表达量均较对照组明显升高($P<0.05$);IL-18 mRNA 在 HBsAg 阳性组和 HBV-DNA 阳性组中的表达均高于对照组,HBsAg 阳性组与对照组比较差异具有统计学意义($P<0.05$),见表 4。

2.5 肝组织病理学观察

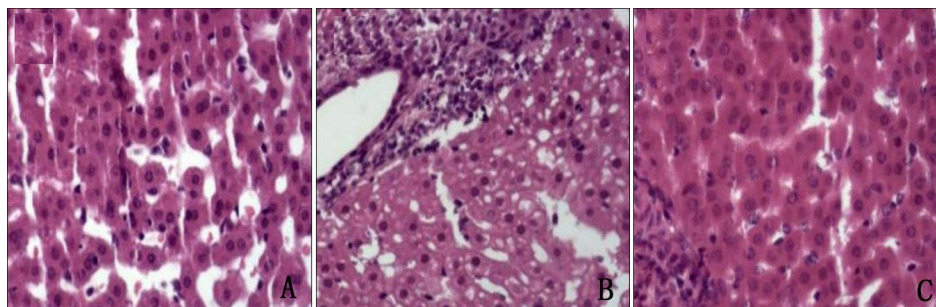
HE 染色后显微镜下观察,发现 HBsAg 阳性组、HBV-DNA 阳性组较对照组肝组织病理形态学

无明显变化,HBsAg 阳性组仅 1 只(1/5)可见少量单核或淋巴细胞浸润,HBV-DNA 阳性组 2 只(2/9)有炎性改变,对照组无炎性改变,见图 1。

表 4 树鼯肝组织中 IL-10 及 IL-18 mRNA 相对表达量($\bar{x}\pm s$)

组别	IL-10	IL-18
对照组 (<i>n</i> =6)	1.128±0.507	1.324±1.035
HBsAg 阳性组 (<i>n</i> =5)	6.937±3.004 [#]	4.668±2.455 [#]
HBV-DNA 阳性组 (<i>n</i> =9)	4.996±4.123 [#]	3.310±2.763

与对照组比较,[#] $P<0.05$ 。



A:对照组;B:HBsAg 阳性组;C:HBV-DNA 阳性组。

图1 树鼩肝组织病理学改变(HE,×400)

3 讨论

慢性乙型肝炎的致病机制主要是免疫反应介导的损伤。Th1 类细胞主要分泌 IFN- γ 、IL-2、IL-3、IL-18 等细胞因子,介导细胞免疫,直接清除病原体;Th2 类细胞主要分泌 IL-10、IL-4、IL-5、IL-6 等,刺激 B 淋巴细胞增生,产生相应抗体,诱导体液免疫反应,对免疫损伤及感染慢性化有重要影响^[4]。在慢性乙型肝炎患者体内,Th1/Th2 细胞比例及其分泌的细胞因子失衡可能是 HBV 感染慢性化的主要机制^[5]。IL-18 是由活化的巨噬细胞、T 细胞、NK 等细胞产生的一类免疫调节因子^[6-7]。IL-18 介导免疫损伤,促进 Th1/Th2 免疫平衡向 Th1 方向发展,诱导 IFN- γ 、IL-2 等产生,从而抑制病毒复制,促进病毒消除过程并有利于肝功能恢复;同时激发宿主对 HBV 的免疫应答,促进非特异性免疫,可导致一定程度的肝损伤^[8-9]。有临床研究显示,慢性乙肝患者不同时期血清 IL-18 水平均明显高于健康人群^[10]。IL-10 主要由 Th2 细胞产生,具有抗炎和诱导免疫耐受双重作用^[11]。IL-10 在免疫反应中主要起抑制作用,通过抑制 Th1 细胞产生 IFN- γ 、IL-2 等免疫因子,从而达到抑制 Th1 细胞应答的目的^[12]。有研究显示,在慢性乙肝患者体内,外周血 IL-10 蛋白较健康人群表达量升高^[13]。

本研究显示,接种 HBV 的新生树鼩血清 IL-10、IL-18 分泌持续高于对照组,说明人 HBV 成功感染新生树鼩,并激活树鼩体内的免疫应答。HBV 感染树鼩后,IL-18 水平升高可能导致 Th1 细胞分泌 IFN- γ 等水平上升,从而抑制 HBV 复制,促进病毒消除过程;体内相关免疫细胞大量分泌 IL-10,又可能抑制 Th1 细胞因子的释放,使病毒清除过程受阻。宿主体内 Th2 细胞免疫反应增强可能是促进 HBV 慢性感染的重要因素。此外,本研究发现,树鼩感染 HBV 后第 24 周肝组织 IL-10、IL-18 mRNA 相对表达量高于对照组,进一步验证 IL-10、IL-18 在乙肝慢性感染过程中可能起重要作用的推测。感

染组肝组织病理形态学改变不明显,仅偶见单核细胞、淋巴细胞浸润等炎性小灶,与 Wang 等^[14] 观察结果相似,考虑树鼩肝组织对 HBV 病毒的免疫应答反应较弱,免疫损伤轻微。

慢性乙型肝炎症状持续半年(即 24 周以上)可诊断为慢性乙肝感染^[15]。本研究中,IL-10 和 IL-18 在新生树鼩感染 HBV 后 24 周内均呈较高水平,两者之间的拮抗关系不明显,Th1/Th2 失衡不明显,可能的原因:第一,观察时间较短,细胞因子尚处于相互拮抗的动态平衡阶段,细胞因子之间的优势应答未显现;第二,影响体内免疫因子分泌的因素众多,IL-10、IL-18 水平变化并不能互相影响分泌状态。

本研究通过观察新生树鼩感染 HBV 后 IL-10、IL-18 水平变化,发现新生树鼩可出现与人感染 HBV 相似的免疫应答,Th1/Th2 细胞因子可能在 HBV 感染慢性化过程中起到重要作用。有研究表明,利用外源 IL-10 干扰机体免疫平衡,可抑制 HBV 感染^[16]。而外源性 IL-18 是否能够提高机体细胞免疫能力,诱导 IFN- γ 释放,从而减低外源给予 IFN- γ 所引起的不良反应,IL-10 及 IL-18 是否有可能成为监测早期 HBV 感染的指标,仍有待进一步研究。本研究树鼩体内 HBV 感染模型的建立为今后进一步研究人慢性乙型肝炎的致病机制及防治药物的研发奠定基础。

参考文献:

- [1] BISWAS A,PANIGRAHI R,PAL M,et al.Shift in the hepatitis B virus genotype distribution in the last decade among the HBV carriers from eastern India:possible effects on the disease status and HBV epidemiology [J].J Med Virol,2013,85(8):1340-1347.
- [2] JAFARZADEH A,SHOKRI F.TH1 and TH2 responses are influenced by HLA antigens in healthy neonates vaccinated with recombinant hepatitis B vaccine[J].Iran J Allergy Asthma Immunol,2012,11(4):308-315.
- [3] 梁亮,李瑗,杨春,等.树鼩实验室繁殖及育幼的

- 探讨[J].四川动物,2005,24(2):199-200.
- [4] 李 杰,蒋昶宇,项 荣.免疫应答—乙型肝炎病毒治疗中的双刃剑[J].生命科学研究,2011,15(6):556-559,564.
- [5] 聂红明,汪 蓉,朱梅萍,等.不同临床状态的 HBV 感染相关肝病患者 T 淋巴细胞水平和主要细胞因子表达的比较[J].中西医结合肝病杂志,2015,25(1):8-12.
- [6] 汤 磊,李 旭,邹桂舟.白细胞介素 18 在 HBV 感染发病机制中作用研究进展[J].实用肝脏病杂志,2013,16(2):184-187.
- [7] LOTZE M T,TAHARA H,OKAMURA H.Interleukin-18 as a novel,distinct,and distant member of the interleukin-1 family promoting development of the adaptive immune response:the interleukin-18 issue of the Journal of Immunotherapy[J].J Immunother,2002,25(Suppl 1):S1-S3.
- [8] 肖 庆,迟秀文,刘晓峰.HBV 感染者血清中 IL-33 及 IL-18 的检测及其临床意义[J].国际检验医学杂志,2015(14):2070-2072.
- [9] 吕 峰,余 龙,张 唯.白细胞介素 18 在慢性乙型肝炎病毒感染发病机制中的作用[J].国际流行病学传染学杂志,2011,38(4):287-290.
- [10] 刘曦东.乙肝患者外周血 IL18、TGFβ1、ALT、TBIL、HBVDNA 定量测定及分析 [J].山东医药,2011,51(23):66-67.
- [11] 周 亮,李小燕,黄月华.白细胞介素 10 对慢性乙型肝炎患者自然杀伤细胞的调控作用[J].临床肝胆病杂志,2016,8(32):1600-1603.
- [12] GONG Y,ZHAO C,ZHAO P,et al.Role of IL-10-producing regulatory B cells in chronic hepatitis B virus infection[J].Dig Dis Sci,2015,60(5):1308-1314.
- [13] 田鹏飞,杨勇卫,陈锡莲,等.慢性乙型肝炎患者外周血 MIF、IL-17 和 IL-10 水平变化及临床相关性[J].国际检验医学杂志,2016,37(15):2150-2151.
- [14] WANG Q,SCHWARZENBERGER P,YANG F,et al.Experimental chronic hepatitis B infection of neonatal tree shrews (*Tupaia belangeri chinensis*): a model to study molecular causes for susceptibility and disease progression to chronic hepatitis in humans[J].Virol J,2012,9:170.
- [15] 王贵强,王福生,成 军,等.慢性乙型肝炎防治指南(2015 年版)[J].中华实验和临床感染病杂志,2015,19(3):1-18.
- [16] NI G,WANG T,WALTON S,et al.Manipulating IL-10 signalling blockade for better immunotherapy [J].Cell Immunol,2015,293(2):126-129.

(本文编辑:禩霏霏)

广西医科大学学报 2018 May;35(5)

不同微环境对牙髓再生组织的影响*

陈硕琳,陈 凤,周 谦,覃美娜,陈文霞[△]

(广西医科大学附属口腔医院,南宁 530021)

摘要 目的:体外比较不同微环境下牙髓再生的能力与再生组织结构的差异。方法:根据牙根段和皮质骨段管腔中植入物的不同将 32 个牙根段和 32 个皮质骨段,随机各分为 4 个亚组,每个亚组 8 个样本,管腔内分别植入血管内皮生长因子(VEGF)复合多肽水凝胶支架、血凝块、多肽水凝胶支架及不植入任何材料的空白对照,随后植入裸鼠背部,8 周后取材评价管腔内组织生长和组织结构情况。结果:牙根段和皮质骨段管腔内分别有 71%和 67%的样本有组织长入,再生组织均为含细胞和血管的疏松结缔组织。牙根段根管腔内再生组织中血管形成的量从多到少依次为 VEGF 复合水凝胶组、血凝块组、水凝胶组和空白对照组,而皮质骨段管腔内再生组织中有较丰富的血管形成,血管形成的量在 VEGF 复合水凝胶组、血凝块组、水凝胶组 3 组之间无明显差异。牙组的根管腔中可见沿着根管内壁排列的成牙本质细胞样细胞,少数细胞顶端有一细长分支伸入牙本质小管中。结论:牙根段根管腔由于牙本质的天然支架作用对微环境中的变化更为敏感,牙本质的特殊结构对再生组织的结构起到重要的作用。

关键词 牙本质;血管内皮生长因子;牙髓再生;支架材料**中图分类号**:R781.31 **文献标志码**:A **文章编号**:1005-930X(2018)05-0627-05

DOI:10.16190/j.cnki.45-1211/r.2018.05.010

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81560183)

[△]通信作者,E-mail:angelaxiacw@163.com

收稿日期:2018-03-01

Influence of different micro-environments on pulp regeneration

Chen Shuolin, Chen Feng, Zhou Qian, Qin Meina,