

本文引文格式:黄新亮,余方流,王凤各,等.热应激联合 HBsAg 刺激增强人树突状细胞免疫学特性[J].右江民族医学院学报,2021,43(5):632-635.

【论著与临床报道】

## 热应激联合 HBsAg 刺激增强人树突状细胞免疫学特性

黄新亮,余方流,王凤各,董博翰

(皖南医学院基础医学院,安徽 芜湖 241002)

**摘要:**目的 探索热应激联合乙肝病毒表面抗原(HBsAg)刺激的树突状细胞(DC)的免疫特性及其诱导的特异性细胞毒性 T 细胞(CTL)的细胞毒效应。**方法** 选择 28 例健康志愿者分为 4 组,每组 7 例,热应激联合 HBsAg 组用人外周血单个核细胞制备 DC,DC 负载 HBsAg 后在 42℃ 下持续放置 30 min,检测 DC 表面分子。ELISA 法检测 HSP90,再与自身淋巴细胞共培养 7 d,用流式细胞仪检测 CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 数量。用 LDH 法检测特异性 CTL 细胞毒效应,与热应激联合 HBsAg 组不同的是热应激组 DC 不负载 HBsAg,HBsAg 组不用 42℃ 温度处理、对照组既不负载 HBsAg 也不经 42℃ 温度处理。**结果** 热应激联合 HBsAg 组 DC 中表达 CD80、CD40、HLA-DR 分子的比率、HSP90 水平、T 细胞中 CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 的比率及 CTL 细胞毒效应明显高于热应激组、HBsAg 组和对照组 ( $P < 0.05$ );且热应激联合 HBsAg 组 HSP90 水平与 DC 表达 CD80、CD40 及 HLA-DR 的比率呈正相关 ( $r$  分别为 0.73、0.69、0.78)。**结论** 与热应激、HBsAg 分别刺激 DC 比较,热应激联合 HBsAg 刺激的 DC 提呈抗原的活性增强,且能诱导更明显的特异性 CTL 细胞毒效应。

**关键词:**热应激;乙型肝炎病毒表面抗原;树突状细胞

中图分类号:R392.11

文献标识码:A

文章编号:1001-5817(2021)05-0632-04

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2021.05.012

## Heat stress combined with HBsAg stimulation to enhance the immunological characteristics of human dendritic cells

Huang Xinliang, Yu Fangliu, Wang Fengge, Dong Bohan

(School of Basic Medicine, Wannan Medical College, Wuhu 241002, Anhui, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the immune characteristics of dendrite cells(DC) stimulated by heat stress combined with hepatitis B surface antigen (HBsAg) and explore the cytotoxic effect of specific cytotoxic T lymphocyte (CTL) induced by them. **Methods** Twenty-eight healthy volunteers were selected and divided into 4 groups with 7 cases in each group. In the group of heat stress combining with HBsAg, DCs were prepared by using human peripheral blood mononuclear cells (PBMC). The surface molecules of DCs were detected after these DCs were loaded with HBsAg and placed at 42℃ for 30 min. The HSP90 was detected by ELISA. Then the DCs were co-cultured with autologous lymphocytes for 7 days and the number of CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T was detected by flow cytometry after the co-culture. The cytotoxic effect of specific CTL was detected by LDH (lumbar disc herniation). Different from those of the group of heat stress combining with HBsAg, DCs in the heat stress group were not loaded with HBsAg; those in the HBsAg group were not treated at 42℃, and those in the control group were neither loaded with HBsAg nor treated at 42℃. **Results** The group of heat stress combining with HBsAg had significantly higher ratios of CD80, CD40 and HLA-DR expressed in DCs, higher HSP90 level, and higher ratio of CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T in T cells and stronger cytotoxic effect of CTL than the heat stress group, the HBsAg group as well as the control group ( $P < 0.05$ ). And the HSP90 level of the group of heat stress combining with HBsAg was positively correlated with the ratios of CD80, CD40 and HLA-DR ex-

**基金项目:**安徽高校省级自然科学研究重点项目(KJ2019A0415);高校优秀青年人才支持计划(gxyqZD2019040);皖南医学院第三批学术和技术带头人及后备人选资助计划(校政 2019 第 81 号)

**第一作者简介:**黄新亮(1974—),男,讲师,研究方向:免疫分子与应用,E-mail:1076222023@qq.com

**通讯作者简介:**董博翰(1980—),男,博士,教授,硕士研究生导师,研究方向:肿瘤生化与免疫,E-mail:240151563@qq.com

pressed in DCs ( $r$  was 0.73, 0.69 and 0.78, respectively). **Conclusion** Compared with the DCs stimulated by heat stress and HBsAg respectively, the DCs stimulated by heat stress combined with HBsAg have enhanced antigen activity and induce more obvious cytotoxic effect of specific CTL.

**Key words:** heat stress; hepatitis B surface antigen; dendritic cells

据世界卫生组织报道,全球约有 2.57 亿乙型肝炎病毒(Hepatitis B Virus, HBV)慢性感染者,每年约有 88.7 万人死于 HBV 感染相关疾病。中国一般人群慢性 HBV 感染者约 7 000 万例,对中国社会造成沉重的经济负担<sup>[1]</sup>。研究者发现慢性乙型肝炎患者树突状细胞(dendritic cell, DC)的功能低下可导致患者体内 T、B 细胞的耐受状态<sup>[2]</sup>。如何制备 DC 疫苗、增强其免疫活性及抗 HBV 的细胞毒效应成为难题。

DC 疫苗的安全性方面,德国美因茨大学(Mainz University)Jonuleit H 等<sup>[3]</sup>发现 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 3 种 CK(细胞因子)组合后,在无牛血清培养体系中能够将未成熟 DC 诱导成完全成熟的 DC,避免了动物血清培养 DC 对人产生的毒副作用。DC 疫苗的有效性方面, Tomoko Ichyanagi 发现经 42 $^{\circ}$ C 热应激后 DC 中的内源性热休克蛋白即 HSP90 对 OVA 抗原在抗原交叉呈递过程中也起着至关重要的作用<sup>[4]</sup>;也有研究者在 Nature 期刊发文指出外来的 HSP 亦能促进 DC 成熟<sup>[5]</sup>。

本研究基于 DC 的安全应用技术和热休克蛋白增强疫苗有效性的理论,进一步探讨热应激和 HBsAg 刺激的树突状细胞的免疫特性(成熟度、HSP90 的表达及功能、激活 CTL 的能力)及其诱导的特异性 CTL 的细胞毒效应。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 对象 选择健康志愿者,纳入标准:年龄均为 20 岁,经健康体检 HBV 为阴性且无乙型肝炎发病史。

1.1.2 主要试剂 静脉血中分离的人淋巴细胞。HBsAg、无血清 AIM-V 培养液、HepG2. 2. 15(转染 HBV 的 DNA)、荧光素标记抗人 CD3 单克隆抗体和抗人 CD8 单克隆抗体、IL-2、TNF- $\alpha$ 、IL-4、IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 GM-CSF(Biolegend 公司);HSP90 的 ELISA 试剂盒(上海森雄科技有限公司进口分装)。

### 1.2 方法

1.2.1 制备 DC 疫苗 实验细胞分 4 组,每组 7 例。热应激联合 HBsAg 组:即 HBsAg 联合 42 $^{\circ}$ C 加热刺激 DC。利用密度梯度离心法分离人外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC),将分离的 PBMC 置于 4 孔板中,在 37 $^{\circ}$ C、含 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养 2 h;4 孔板中贴壁的为 DC(收集未贴壁的细胞并且冻存,以便后期和 DC 共培养)。向 4 孔板中

加入 3 毫升/孔无血清 AIM-V 培养液和 100 ng/ml GM-CSF、100 ng/ml IL-4。第 4 天 DC 中加入 HBsAg(10 ng/ml)并经过 42 $^{\circ}$ C 培养 30 min。加入 CK 后显微镜观察细胞形态的变化,CK 按照文献常规加入:TNF- $\alpha$  10 ng/ml、IL-1 $\beta$  10 ng/ml、IL-6 1000 U/ml,收集第 8 天实验组和对照组的 DC 准备鉴定<sup>[3]</sup>。热应激组:DC 经过 42 $^{\circ}$ C 培养 30 min,不负载 HBsAg,其余和热应激联合 HBsAg 组相同。HBsAg 组:DC 负载 HBsAg,不用 42 $^{\circ}$ C 温度处理,其余和热应激联合 HBsAg 组相同。对照组:DC 不负载 HBsAg,也不经 42 $^{\circ}$ C 温度处理,其余和热应激联合 HBsAg 组相同。

1.2.2 流式细胞仪鉴定 DC 培养过程中,倒置显微镜观察细胞形态学变化;采用流式细胞仪检测各组 DC 表面标志分子 CD80、CD40 及 HLA-DR 的变化。

1.2.3 ELISA 法检测 HSP90 按照热休克蛋白 90(HSP-90)ELISA 检测试剂盒说明书检测,于波长 450 nm 的酶标仪上读取各孔的 A 值,以吸光度 A 值为纵坐标(Y),相应的 HSP-90 标准品浓度为横坐标(X),做得相应的曲线,样品的 HSP-90 含量可根据其 A 值由标准曲线换算出相应的浓度。

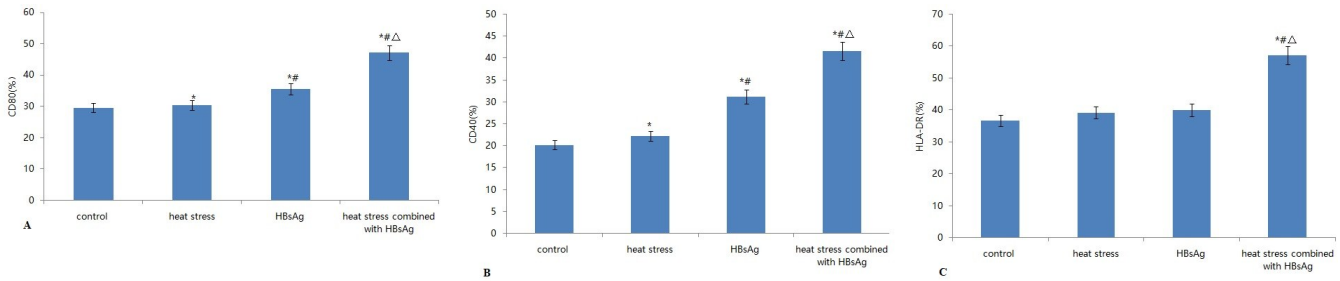
1.2.4 DC 刺激自身淋巴细胞反应与鉴定的方法 各组 DC 疫苗刺激自身淋巴细胞:收集第 8 天实验组和对照组的 DC,计数以  $1 \times 10^6$  个/毫升作为刺激细胞,加入到 4 孔板中(实验组和对照组 DC 数相同)。复苏冻存的初始 T 细胞,计数,按 T 细胞:DC=20:1 的比例往 DC 中加入初始 T 淋巴细胞。加入 500 IU/ml IL-2,置于 37 $^{\circ}$ C、含 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养,4 d 后收集活化的 T 细胞。台盼蓝染色后显微镜观察细胞形态和活性。检测 CD8<sup>+</sup> T 细胞:每孔 100  $\mu$ l PBMC 细胞悬液中加入 5  $\mu$ l PE 标记的抗人 CD3 克隆抗体、5  $\mu$ l FITC 标记抗人 CD8 单克隆抗体,4 $^{\circ}$ C 避光染色 30 min,用 3% FBS-PBS 洗细胞 1 次,悬浮于 500  $\mu$ l 3% FBS-PBS 中,4 $^{\circ}$ C 避光保存,荧光抗体染色后,用流式细胞仪 C6 检测,获取细胞数不少于 100 000 个。

1.2.5 LDH 法检测 DC 诱导的特异性 CTL 细胞毒效应检测细胞毒性 T 细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)杀伤活性以乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)法,靶细胞为 HepG2. 2. 15(转染 HBV 的 DNA),效靶比为 1:25。CTL 杀伤活性=(效靶混合细胞释放 A 值-自然释放 A 值)/(最大释放 A 值-自然释放 A 值)。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 18.0 对数据进行处理, 计量资料数据以( $\bar{x} \pm s$ )表示, 多组比较采用单因素方差分析, 两两比较采用  $q$  检验, 相关性分析采用 Pearson, 检验水准  $P = 0.05$ 。

## 2 结果

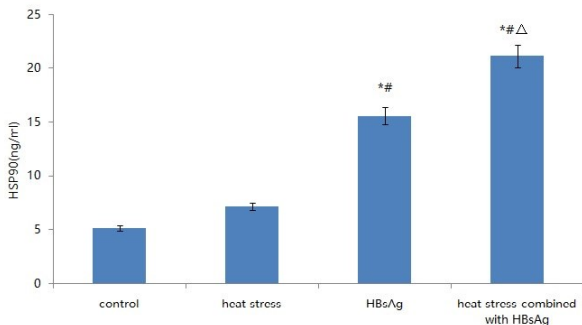
2.1 各组 DC 中表达 CD80、CD40、HLA-DR 的比率比较 热应激联合 HBsAg 组(heat stress combined with HBsAg 组)DC 中表达 CD80、CD40、HLA-DR 分子的比率显著高于热应激组(heat stress 组)、HBsAg 组和对照组( $P < 0.05$ ), 见图 1。



注:A 为 CD80 表达;B 为 CD40 表达;C 为 HLA-DR 表达;与 control 组比较, \*  $P < 0.05$ ; 与 heat stress 组比较, #  $P < 0.05$ ; 与 HBsAg 组比较,  $\Delta P < 0.05$ 。

图 1 各组 DC 中表达 CD80、CD40 及 HLA-DR 分子的比率

2.2 各组 DC 中表达 HSP90 水平比较 热应激联合 HBsAg 组 DC 中表达 HSP90 水平显著高于热应激组、HBsAg 组和对照组( $P < 0.05$ ), 见图 2。



注:与 control 组比较, \*  $P < 0.05$ ; 与 heat stress 组比较, #  $P < 0.05$ ; 与 HBsAg 组比较,  $\Delta P < 0.05$ 。

图 2 各组 DC 的内源性 HSP90 的表达水平

2.3 各组 DC 中 HSP90 水平与表达 CD80、CD40 及 HLA-DR 的比率的线性相关分析 热应激联合 HBsAg 组 HSP90 水平与 DC 中表达 CD80、CD40 及 HLA-DR 的比率呈现正相关(见图 3), 相关系数  $r$  分别是 0.73、0.69、0.78; 热应激组、HBsAg 组、对照组 HSP90 水平与该组 DC 中表达 CD80、CD40 及 HLA-DR 的比率呈现无相关(相关系数=0)。

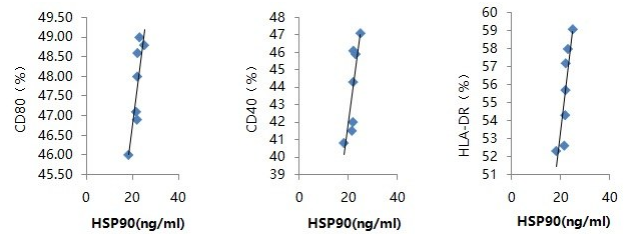
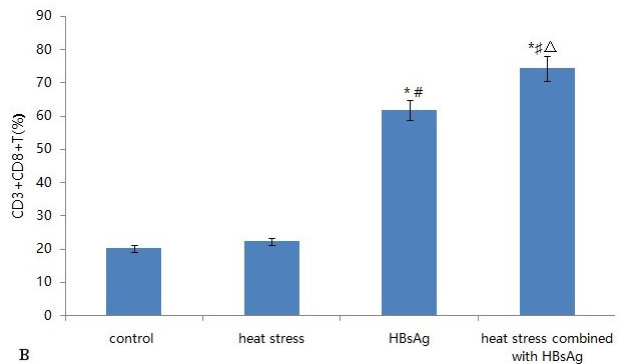
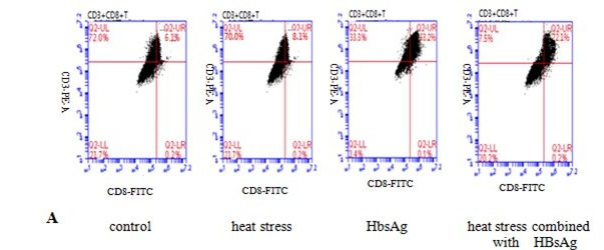


图 3 热应激联合 HBsAg 组 HSP90 与 CD80、CD40、HLA-DR 的比率的线性相关分析

2.4 各组 DC 刺激自身淋巴细胞增殖的比率 热应激联合 HBsAg 组 DC 刺激自身淋巴细胞增殖, T 细胞中  $CD3^+ CD8^+ T$  的比率显著高于热应激组、HBsAg 组和对照组( $P < 0.05$ ), 见图 4。



注:与 control 组比较, \*  $P < 0.05$ ; 与 heat stress 组比较, #  $P < 0.05$ ; 与 HBsAg 组比较,  $\Delta P < 0.05$ 。

图 4 流式细胞仪检测各组  $CD3^+ CD8^+ T$

2.5 各组 DC 诱导的特异性 CTL 细胞毒效应 热应激联合 HBsAg 组 CTL 杀伤活性的百分率明显高于热应激组、HBsAg 组和对照组 ( $P < 0.05$ ), 见表 1。

表 1 各组 DC 诱导的 CTL 对靶细胞的细胞毒效应

组别	n	百分率
control 组	7	18.70±1.30
heat stress 组	7	21.40±2.40
HBsAg 组	7	38.40±2.30 <sup>ab</sup>
heat stress combined with HBsAg 组	7	69.00±6.00 <sup>abc</sup>

注:与 control 组比较, a:  $P < 0.05$ ; 与 heat stress 组比较, b:  $P < 0.05$ ; 与 HBsAg 组比较, c:  $P < 0.05$ 。

### 3 讨论

本研究为探索 DC 免疫活性的增强提供了新思路。Ichiyanagi T 等<sup>[4]</sup>发现经 42℃ 热应激后 DC 中的内源性 HSP90 对 OVA 抗原在抗原交叉呈递过程起着至关重要的作用; 也有研究者发现 DC 之外的外源性 HSP 与 CD91 受体结合进入树突状细胞, 亦能促进 DC 成熟<sup>[5]</sup>。HSP70/HBxAg 复合物促进 DC 的成熟、HSP 通过 MHC I 和 II 类分子将肿瘤相关抗原呈递给抗肿瘤 CD8<sup>+</sup>T 和 CD4<sup>+</sup>T 细胞并使之活化, 这将会促进针对癌症和传染病的新一代预防和治疗候选 DC 疫苗的产生<sup>[6-8]</sup>。而本研究发现热应激联合 HBsAg 刺激的 DC 比 HBsAg 和热应激分别刺激的 DC 抗原提呈活性更强, 且能诱导自身淋巴细胞增殖、产生更多特异性 CTL。这些发现为探索 DC 免疫活性的增强提供了新途径。

本研究为提高 CTL 抗 HBV 的细胞毒效应提供新佐证。已有研究表明, 慢性 HBV 感染者发生免疫耐受的重要原因是 HBsAg 特异性细胞毒性 T 细胞数量缺乏和(或)功能不足<sup>[9]</sup>。因而选择合适的易受 HBV 感染的人群进行免疫治疗, 才能体现治疗性疫苗的功效<sup>[10]</sup>。本研究发现热应激联合 HBsAg 刺激的 DC 诱导的特异性 CTL 具有更强的细胞毒效应, 这一发现为探究抗 HBV 的细胞毒效应提供新佐证。

本研究亦为开发治疗慢性乙肝的安全、有效的 DC 疫苗提供新的实验依据。一方面, 本研究从临床前期研究出发, 以人外周血单个核细胞制备 DC, 在无动物血清培养体系中将未成熟 DC 诱导成完全成熟的 DC; 从而避免疫苗中动物血清成分对人体的毒副作用。另一方面, 世界卫生组织提出了 2030 年消除病毒性肝炎的目标<sup>[11-12]</sup>, 这给有效治疗慢性乙型肝炎带来挑战。而本研究发现热应激联合 HBsAg 刺激的树突状细胞具有良好的抗原提呈能力, 其能诱导更明显的特异性 CTL 细胞毒效应。这为临床研发有效地治疗慢性肝

炎的 DC 疫苗提供依据, 有望成为治疗慢性肝炎的新的候选疫苗。从本研究的结果可知, 与热应激、HBsAg 分别刺激 DC 比较, 热应激联合 HBsAg 刺激的 DC 成熟度、HSP90 的表达水平及激活 CTL 的能力均提升, 且能诱导更明显的特异性 CTL 细胞毒效应。但 HSP90 以何种信号转导机制促进 DC 的免疫活性, 有待深入研究。另外受条件限制, 未进行研究对象的性别和不同年龄段的分类研究, 因而研究结果有一定的局限性。

### 参考文献:

- [1] Wu J, Han M, Li J, et al. Immunopathogenesis of HBV Infection[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2020, 117(9): 71-107.
- [2] 马应杰, 韩际奥, 杨丽, 等. 慢性 HBV 感染者、健康人树突状细胞经 HBsAg 活化后的免疫效应差异[J]. *世界华人消化杂志*, 2012, 20(4): 341-345.
- [3] Jonuleit H, Kühn U, Müller G. Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions[J]. *Eur J Immunol*, 1997, 27(12): 3135-3142.
- [4] Ichiyanagi T, Imai T, Kajiwara C, et al. Essential role of endogenous heat shock protein 90 of dendritic cells in antigen cross-presentation[J]. *J Immunol*, 2010, 185(5): 2693-2700.
- [5] Srivastava P. Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity[J]. *Nat Rev Immunol*, 2002, 2(3): 185-194.
- [6] Martin CA, Carsons SE, Kowalewski R, et al. Aberrant extracellular and dendritic cell (DC) surface expression of heat shock protein (hsp)70 in the rheumatoid joint: possible mechanisms of hsp/DC-mediated cross-priming[J]. *J Immunol*, 2003, 171(11): 5736-5742.
- [7] Wang H, Feng F, Wang XP, et al. Dendritic cells pulsed with Hsp70 and HBxAg induce specific antitumor immune responses in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13(2): 1077-1082.
- [8] Ciocca DR, Cayado-Gutierrez N, Maccioni M, et al. Heat shock proteins (HSPs) based anti-cancer vaccines[J]. *Curr Mol Med*, 2012, 12(9): 1183-1197.
- [9] Tseng TC, Huang LR. Immunopathogenesis of Hepatitis B Virus[J]. *J Infect Dis*, 2017, 216(Suppl-8): S765-S770.
- [10] Bertolotti A, Ferrari C. Innate and adaptive immune responses in chronic hepatitis B virus infections; towards restoration of immune control of viral infection[J]. *Gut*, 2012, 61(12): 1754-1764.
- [11] 王贵强, 王福生, 庄辉, 等. 慢性乙型肝炎防治指南(2019年版)[J]. *中国医学前沿杂志(电子版)*, 2019, 11(12): 51-77.
- [12] 梁寻杰, 覃小珊, 黄赞松. 肝癌预后影响因素研究进展[J]. *右江民族医学院学报*, 2020, 42(5): 642-645.

收稿日期: 2021-07-05; 修回日期: 2021-08-09