

甘草酸二铵对丙型肝炎病毒相关性淋巴瘤单核细胞 PD-1 表达的影响

倪磊¹ 储真真² 许亚梅² 姚志强³ 郭健^{1*}

(1. 北京中医药大学基础医学院, 北京市朝阳区北三环东路 11 号, 100029;

2. 北京中医药大学东直门医院; 3. 美国东田纳西州州立大学 Quillen 医学院)

基金项目: 北京中医药大学自主选题资助项目(JYBZZ-JS007)

* 通讯作者: guojian323@sina.com, (010)64286592

[摘要] 目的 初步探究甘草酸二铵(DG)对丙型肝炎病毒相关性淋巴瘤(HCV-NHL)患者单核细胞 PD-1 表达的免疫调控作用。方法 从健康人、单纯丙型肝炎病毒(HCV)感染者和 HCV-NHL 患者的外周血中分离外周血单个核细胞(PBMC), 体外培养刺激后, 应用流式细胞仪分析健康人、单纯 HCV 感染者和 HCV-NHL 患者 CD14⁺ PD-1⁺ 细胞占 CD14⁺ 总单核细胞的比例; HCV-NHL 患者 PBMC 加入 DG 和阳性对照 HCV 核心抗原干预后较 HCV-NHL 空白对照 CD14⁺ PD-1⁺ 细胞占 CD14⁺ 总单核细胞比例的变化情况。结果 与健康人比较, 单纯 HCV 感染者和 HCV-NHL 患者 CD14⁺ PD-1⁺ / CD14⁺ 均明显升高, 并且 HCV-NHL 患者较单纯 HCV 感染者升高明显, 各组之间差异均有统计学意义($P < 0.05$)。HCV-NHL+HCV 核心抗原组 CD14⁺ PD-1⁺ / CD14⁺ 比例较 HCV-NHL 空白对照明显增加, 而 HCV-NHL+DG 组 CD14⁺ PD-1⁺ / CD14⁺ 比例较 HCV-NHL+HCV 核心抗原组明显降低, 各组之间差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论 HCV-NHL 患者单核细胞程序性死亡通路激活增加, 且程度重于单纯 HCV 感染, DG 可以降低 HCV-NHL 患者单核细胞 PD-1⁺ 的高表达。

[关键词] 甘草酸二铵; 丙型肝炎病毒相关性淋巴瘤; 单核细胞; 程序性死亡因子 1

Effect of Diammonium Glycyrrhizinate on Programmed Death-1 Expression in Monocytes of Hepatitis C Virus-Associated Non-Hodgkin Lymphomas

NI Lei¹, CHU Zhenzhen², XU Yamei², YAO Zhiqiang³, GUO Jian¹

(1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029; 2. Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine; 3. Quillen College of Medicine, East Tennessee State University)

ABSTRACT **Objective** To research the immune regulation of diammonium glycyrrhizinate (DG) on programmed death-1 (PD-1) expression in monocytes of hepatitis C virus-associated non-Hodgkin lymphomas (HCV-NHL). **Methods** The peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from the peripheral blood of healthy persons, patients with HCV infection and HCV-NHL patients. The PBMCs were cultured in vitro and stimulated. The flow cytometry was used to analyze the ratio of CD14⁺ PD-1⁺ / CD14⁺ in the healthy persons, patients with HCV infection and HCV-NHL patients. The ratio of CD14⁺ PD-1⁺ / CD14⁺ was analyzed in HCV-NHL patients after adding DG in the PBMCs and intervention with positive control HCV core antigen as compared with HCV-NHL blank control as well. **Results** Comparing with the healthy persons, the ratio of CD14⁺ PD-1⁺ / CD14⁺ in patients with HCV infection and HCV-NHL patients was significantly increased ($P < 0.05$), especially in HCV-NHL patients ($P < 0.05$). Comparing with the HCV-NHL blank control, the ratio of CD14⁺ PD-1⁺ / CD14⁺ in the HCV-NHL+HCV core antigen group was significantly increased ($P < 0.05$). But the ratio of CD14⁺ PD-1⁺ / CD14⁺ in the HCV-NHL+DG group was significantly decreased as compared with the HCV-NHL+HCV core antigen group ($P < 0.05$). **Conclusion** The activation of PD pathway obviously increases in HCV-NHL patients as compared with patients with HCV infection. DG can decrease the high expression of PD-1⁺ in HCV-NHL patients.

Keywords diammonium glycyrrhizinate; hepatitis C virus-associated non-Hodgkin lymphomas; monocytes; programmed death-1

丙型肝炎病毒相关性淋巴瘤(HCV-NHL)是因感染丙型肝炎病毒(HCV)并在慢性免疫损伤过程中引起原发于淋巴结或淋巴组织的恶性肿瘤, 病理类型多见于 B 细胞非霍奇金淋巴瘤(B-NHL)。HCV 感染常伴发免疫调节功能紊乱, 可发展为

HCV-NHL^[1-2]。该淋巴瘤起病隐匿, 有效治疗方法有限。甘草酸二铵(DG)是甘草中提取的有效成分, 本实验观察其对 HCV-NHL 患者单核细胞程序性死亡因子-1(PD-1)表达的影响, 初步探讨 DG 对 HCV-NHL 单核细胞的免疫调控作用。

1 材料与方法

1.1 细胞

3 例 HCV-NHL 患者外周血、3 例单纯 HCV 感染者外周血、3 例健康人外周血均来自 2009 年美国东田纳西州州立大学 Quillen 医学院附属 VA 医院门诊,经肝素抗凝后用 Fico/Lite LymphoH 淋巴细胞分离液分离获得外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC),用细胞培养液调整细胞数为 $5 \times 10^6/\text{ml}$ 的细胞悬液。

1.2 主要试剂与仪器

DG(甘利欣,江苏正大天晴药业股份有限公司,国药准字 H10940190) $5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$; HCV 核心抗原(美国 Virogen 公司,编号 0000115-V); 细胞培养液(RPMI-1640 培养基 89.9%、胎牛血清 10%、L-谷氨酰胺 1%、10000U/ml 青链霉素双抗 0.1%); 脂多糖(LPS,美国 Sigma 公司,编号 L8274); 分离缓冲液(含 0.5% BSA、2mmol/L EDTA 的 PBS); FITC 标记的鼠抗人 PD-1(FITC PD-1,美国 eBioscience,编号 0011-9969)、FITC 标记的鼠抗人同型对照 IgG(FITC IgG Isotype,美国 eBioscience,编号 0011-4714); PE 标记的鼠抗人 CD14(PE CD14,美国 Miltenyi Biotec,编号 00130-091-242); PE 标记的鼠抗人同型对照 IgG(PE IgG Isotype,美国 Miltenyi Biotec,编号 00130-091-835); TLR7/8 配体 R848(美国 InvivoGen,编号 00tlrl-r848)。流式细胞仪(Becton Dickinson 公司, FACS Calibur)。

1.3 刺激、抗体孵育及染色

将 HCV-NHL 患者、HCV 感染者、健康人 PBMC 悬液各 $2000 \mu\text{l}$,置于 96 孔板中,每孔 $200 \mu\text{l}$,每例样品 10 孔。各孔中加入 $20 \mu\text{l}$ LPS($1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$)刺激, 37°C , 5% CO_2 培养箱中孵育 12h 后,加入 $5 \mu\text{l}$ R848($1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$)刺激, 37°C , 5% CO_2 培养箱中孵育 12h。每例样品中各取 4 个孔加入空白对照的 $5 \mu\text{l}$ PBS, 3 个孔加入阳性对照刺激的 $5 \mu\text{l}$ HCV 核心抗原($1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$), 3 个孔加入 $5 \mu\text{l}$ DG($500 \mu\text{g}/\text{ml}$)干预, 37°C , 5% CO_2 培养箱中孵育 12h, PBS 洗涤 1 次后用 $100 \mu\text{l}$ PBS 混悬细胞。每例中取加入 PBS 4 个孔中的 1 个孔,加入 FITC IgG Isotype 和 PE IgG Isotype,每例其余 9 孔均加入荧光标记抗体 FITC PD-1 和 PE CD14 各 $20 \mu\text{l}$,室温暗室下孵育 40 min,用 PBS 洗涤 2 次,用 $300 \mu\text{l}$ PBS 混悬细胞。

1.4 流式细胞仪测定

以 FITC 标记的鼠抗人 Isotype、PE 标记的鼠

抗人 Isotype 标记的细胞为阴性对照,在流式细胞仪上以 488 nm 为第一激光、633 nm 为第二激光激发荧光,在 513 nm 带通滤镜进行 FITC 标记的测定,在 575 nm 带通滤镜进行 PE 标记的测定。通过 BD CellQuest Pro 软件分析数据,以前向散射角(FSC)和侧向散射角(SSC)设门,选定检测的细胞,分别以 FITC 和 PE 通道的组合观察细胞的染色,记录阳性细胞百分率,减去非特异对照值。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 15.0 统计软件包,计量资料以均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,以 Kolmogorov-Smirnov 检验各组数据的正态性分布,以 Levene's test 进行方差齐性检验;经 ANOVA、Welch、Dunnett's t、SNK 进行多组均数比较。

2 结果

2.1 各组受试者单核细胞 PD-1 表达比较

图 1 示,健康人、单纯 HCV 感染者和 HCV-NHL 患者 $\text{CD14}^+ \text{PD-1}^+$ 占总 CD14^+ 单核细胞比例比较显示:健康人 $<$ 单纯 HCV 感染者 $<$ HCV-NHL 患者,呈逐步递增的关系。表 1 示,与健康人比较,单纯 HCV 感染者和 HCV-NHL 患者 $\text{CD14}^+ \text{PD-1}^+/\text{CD14}^+$ 均明显升高,并且 HCV-NHL 患者较单纯 HCV 感染者升高明显,各组之间差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 各组受试者 $\text{CD14}^+ \text{PD-1}^+/\text{CD14}^+$ 比较(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	$\text{CD14}^+ \text{PD-1}^+/\text{CD14}^+$
健康人	3	5.54 ± 1.09
单纯 HCV 感染者	3	$12.96 \pm 0.87^*$
HCV-NHL 患者	3	$20.31 \pm 1.88^{*\Delta}$

注:与健康人比较, $* P < 0.05$; 与 HCV 感染者比较, $\Delta P < 0.05$

2.2 DG 对 HCV-NHL 单核细胞 PD-1 表达的影响

图 2 示,与 HCV-NHL 空白对照比较,HCV 核心抗原干预后单核细胞 PD-1^+ 表达阳性比例增加,而 DG 干预后比例降低。表 2 示, HCV-NHL + HCV 核心抗原组 $\text{CD14}^+ \text{PD-1}^+/\text{CD14}^+$ 比例较 HCV-NHL 空白对照明显增加,而 HCV-NHL + DG 组 $\text{CD14}^+ \text{PD-1}^+/\text{CD14}^+$ 比例较 HCV-NHL + HCV 核心抗原组明显降低,各组之间差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

既往研究表明,HCV 作为一种嗜淋巴组织病毒,感染后常伴发 T/B 细胞免疫调节功能紊乱^[3],

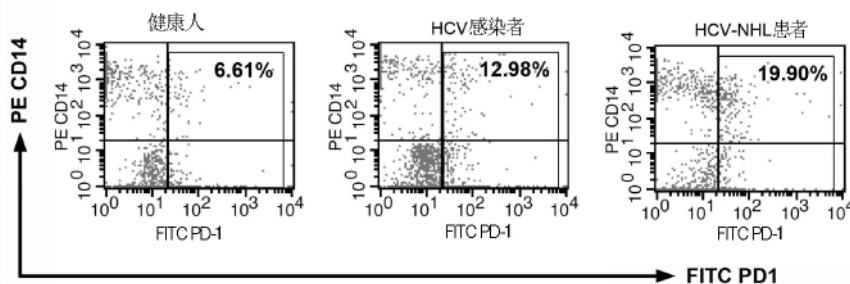
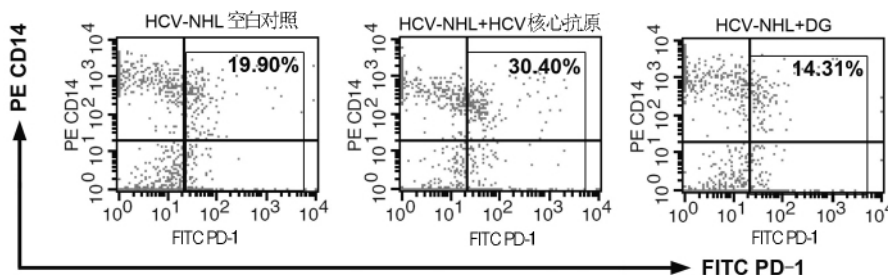


图 1 健康人、单纯 HCV 感染者和 HCV-NHL 患者单核细胞 PD-1 结果

图 2 HCV 核心抗原和 DG 分别干预 HCV-NHL 患者 PBMC 后的 CD14⁺PD-1⁺ 表达变化表 2 HCV-NHL 患者 PBMC 不同干预后
CD14⁺PD-1⁺/CD14⁺ 结果比较(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	CD14 ⁺ PD-1 ⁺ /CD14 ⁺
HCV-NHL 空白对照	3	20.31 ± 1.88
HCV-NHL + HCV 核心抗原	3	30.91 ± 1.05*
HCV-NHL + DG	3	14.57 ± 1.30*△

注:与 HCV-NHL 空白对照比较, * $P < 0.05$; 与 HCV-NHL + HCV 核心抗原比较, △ $P < 0.05$

可使慢性感染患者的 T 细胞呈现出一种耗竭状态; 而 B 细胞则出现细胞过度活跃的状态^[4], 进一步发展可导致淋巴瘤的发生, 主要病理类型为 B-NHL。由于 HCV 对肝细胞和淋巴细胞的双重侵袭, 使其与其他淋巴瘤发生、发展和预后略有不同^[4-6]。

CD14⁺ 单核细胞在 B-NHL 的全身性免疫抑制具有重要的角色^[7]。LinY 等^[8] 研究发现, B-NHL 患者治疗前外周血单核细胞对 Toll 样受体刺激反应下降, 进而抑制 T 细胞的增殖。MuellerCG 等^[9] 对 HCV 相关混合冷球蛋白血症(MC)和 B-NHL 患者的研究发现, HCV 核心蛋白质能够诱导 CD14⁺ 细胞的生产白细胞介素 6(IL-6)通过 Toll 样受体 2 导致 B-细胞增殖的加强。王红霞等^[10] 研究结果显示, CD14⁺ 单核细胞表达组织因子(TF)和血管内皮生长因子(VEGF)与患者危险分期密切相关, 可能是 NHL 患者的一个预后不良指标。作为 T、B 细胞活化的重要负性调控通路的 PD-1 及其配体(PD-L1)信号通路在淋巴瘤发生和发展中也发挥了重要作用。研究发现, PD-1/PD-L1 信号通路与 T 细胞

的功能损伤有关, 在 T 细胞淋巴瘤中 PD-1 表达增高^[11-12]。HCV 慢性感染可以作为直接原因, 诱导抑制性 T 细胞受体 PD-1 及 PD-L1 明显增加, 进而出现 T 细胞功能的下降, 导致淋巴瘤的发生^[13]。

甘草具有补脾益气、清热解毒、祛痰止咳、缓急止痛的功效。甘草在治疗自身免疫性疾病、慢性虚弱性疾病、严重病毒与细菌感染性疾病中疗效较好。DG 是甘草提取的有效成分。实验证明, DG 除了具有保护肝功能、诱生 α -干扰素作用外, 在 HCV-NHL 的 CD4⁺ 细胞的免疫调控中, 具有抑制 CD25⁺ T 细胞增殖而促进 CD25-T 细胞增殖的积极免疫调节作用^[14]。因此, 本实验从 HCV-NHL 单核细胞 PD-1 的表达入手, 观察 DG 对其干预情况。本研究发现 CD14⁺PD-1⁺ 占总 CD14⁺ 单核细胞的百分比呈现健康人 < 单纯 HCV 感染者 < HCV-NHL 患者的关系。HCV-NHL 患者外周血单核细胞 PD-1⁺ 表达较健康人、单纯 HCV 感染者均出现增高, 揭示出其对周围刺激的反应下降、对 T 细胞增殖抑制的可能原因—程序性死亡通路启动增加。DG 干预后 HCV-NHL 患者外周血 CD14⁺PD-1⁺ 占总 CD14⁺ 单核细胞的表达减少, 而作为阳性对照药物的 HCV 核心抗原干预后 CD14⁺PD-1⁺ 占总 CD14⁺ 单核细胞的表达增加, 表明 DG 对 HCV-NHL 能够有效的减少 PD-1⁺ 表达增高比例, 在恢复外周血单核细胞的活性和反应性上能够发挥积极作用。结合既往的研究结果分析, DG 具有抑制 HCV-NHL CD25⁺ T 细胞增殖而促进 CD25-T 细胞增殖的积极免疫调节

作用^[14],其机制可能是 DG 可以降低单核细胞 PD-1⁺ 的高表达,通过 PD-1/PD-L1 信号通路在 HCV-NHL 免疫调节紊乱调控中发挥积极干预作用。

综上,DG 通过减少单核细胞 PD-1⁺ 的高表达,进而减少 PD-1/PD-L1 信号通路的负向调控作用,在 HCV-NHL 免疫紊乱的干预能够发挥积极的作用。

参考文献

- [1]Saadoun D, Suarez F, Lefrere F, et al. Splenic lymphoma with villous lymphocytes, associated with type II cryoglobulinemia and HCV infection; a new entity? [J]. Blood, 2005, 105(1): 74-76.
- [2]Suarez F, Lefrere F, Besson C, et al. Splenic lymphoma with villous lymphocytes, mixed cryoglobulinemia and HCV infection; deciphering the role of HCV in B-cell lymphomagenesis[J]. Dig Liver Dis, 2007, 39 (Suppl 1): 32-37.
- [3]Yao ZQ, Ni L, Zhang Y, et al. Differential Regulation of T and B lymphocytes by PD-1 and SOCS-1 signaling in hepatitis C virus-associated non-Hodgkin's Lymphoma[J]. Immunol Invest, 2011, 40(3): 243-246.
- [4]Moorman J, Dong ZP, Ni L, et al. Abnormal B-cell activation associated with TALL-1 over-expression and SOCS-1 suppression during chronic hepatitis C virus infection[J]. Immunology, 2009, 128(2): 227-235.
- [5]揭伟,郭瑞珍,唐文台,等.非霍奇金淋巴瘤与丙型肝炎病毒感染的相关性研究[J].肿瘤,2003,23(6):479-480.
- [6]Vallisa D, Bernuzzi P, Arcaini L, et al. Role of anti-hepatitis C virus (HCV) treatment in HCV-related, low-grade, B-cell, non-Hodgkin's lymphoma; a multicenter Italian experience [J]. J Clin Oncol, 2005, 23(3): 468-473.
- [7]Vari F, Gandhi MK. Broad-spectrum immunosuppression by classless monocytes in non-Hodgkin's lymphoma[J]. Immunotherapy, 2011, 3(6): 723-726.
- [8]Lin Y, Gustafson MP, Bulur PA, et al. Immunosuppressive CD14⁺ HLA-DR (low)/- monocytes in B-cell non-Hodgkin lymphoma[J]. Blood, 2011, 117(3): 872-881.
- [9]Mueller CG, Boix C, Kwan WH, et al. Critical role of monocytes to support normal B cell and diffuse large B cell lymphoma survival and proliferation[J]. J Leukoc Biol, 2007, 82(3): 567-575.
- [10]王红霞,李秀梅,韩秀华,等.检测非霍奇金淋巴瘤患者外周血 CD14⁺ 单核细胞组织因子和血管内皮生长因子的临床意义[J].中国医学科学院学报,2011,33(4): 427-431.
- [11]Yamamoto R, Nishikori M, Kitawaki T, et al. PD-1-PD-1 ligand interaction contributes to immunosuppressive microenvironment of Hodgkin lymphoma[J]. Blood, 2008, 111(6): 3220-3224.
- [12]Krishnan C, Warnke RA, Arber DA, et al. PD-1 expression in T-cell lymphomas and reactive lymphoid entities: potential overlap in staining patterns between lymphoma and viral lymphadenitis[J]. Am J Surg Pathol, 2010, 34 (2): 178-189.
- [13]Ni L, Ma CJ, Zhang Y, et al. PD-1 modulates regulatory T cells and suppresses T-cell responses in HCV-associated lymphoma[J]. Immunol Cell Biol, 2011, 89(4): 535-539.
- [14]倪磊,姚志强,陈信义.甘草酸二铵对于 HCV 相关性 B 细胞淋巴瘤 CD25⁺ 和 CD25⁺ T 细胞增殖影响研究[J].现代生物医学进展,2010,10(6):1020-1026.

(收稿日期:2012-11-09;修回日期:2012-12-28)

[编辑:邓媛]

第三届“白云山奇星·华佗再造丸”杯优秀论文征集通知

为进一步提示脑中风的发病机制,提高对这一疾病的认识,探索治疗新方法,获取国际上的最新研究进展。由中华中医药学会主办、《中医杂志》、《中国中药杂志》协办,广州白云山奇星药业有限公司、数源汇通(北京)医药科技有限公司承办,共同发起第三届全国脑卒中诊疗实践学术研讨会暨第三届“白云山奇星·华佗再造丸”杯脑卒中诊疗实践优秀医学论文征集活动,具体事宜通知如下:

一、征文内容:出血性中风和缺血性中风的病理机制的研究进展;探讨脑的耐受和保护机制;中风内外科治疗的实验和临床进展探讨;中风病辨证论治规律、病因病机、治则治法、证候标准规范、方案优化、临床疗效评价方法、疗效机理以及新药研发等相关研究成果。

二、征文要求:1. 凡未公开发表的论著、述评、病例报告、讲座综述、实验研究、临床研究、经验总结等,均可投稿。按照杂志论文格式,要求 800 字中文摘要 1 份,包括目的、方法、结果、结论四部分,数据准确、重点突出、文字精炼。请在征文后详细注明姓名、工作单位、科室、邮政编码和电话、征文。截稿日期:2013 年 10 月 30 日。请自留底稿,恕不退稿。论文投稿方式:邮寄地址:北京市海淀区西三环北路 11 号海通时代商务中心 A1 栋,数源汇通(北京)医药科技有限公司收,邮编:100089,电话:010-68718711;或电子版发至:cnyxyx@cnyxyx.com。

三、联系方式:数源汇通(北京)医药科技有限公司,联系人:赵森,电话:010-68412716 转 603,传真:010-68715756,Email:cnyxyx@cnyxyx.com