

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学号: 24520081153422

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

尼古丁刺激树突状细胞抗 HBV 的实验研究

The Study of Anti-HBV With Nicotine
Treated Dendritic Cells

李 海 涛

指 导 教 师: 高丰光 教授

专 业 名 称: 微 生 物 学

论 文 提 交 日 期: 2011 年 4 月

论 文 答 辩 时 间: 2011 年 5 月

学 位 授 予 日 期: 2011 年 6 月

答 辩 委 员 会 主 席: _____

评 阅 人: _____

2011 年 5 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名): 李海涛

2011年5月20日

厦门大学博硕士学位论文摘要库

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：李海涛

2011年 5月 20日

厦门大学博硕士学位论文摘要库

缩略语索引

缩略语	英文全名	中文全名
AEC	3- amino-9-ethylcarbozole	3-氨基-9-乙基卡唑
APC	antigen presenting cell	抗原提呈细胞
APC	allophycocyanin	别藻蓝蛋白
BCA	bicinchoninic acid	二喹啉甲酸
BrdU	5-bromo-2-deoxyuridine	5-溴尿嘧啶
BSA	bovine serum albumin	牛血清白蛋白
BTX	α -bungarotoxin	α 银环蛇毒素
CTL	cytotoxic T lymphocyte	杀伤性 T 淋巴细胞
CTLD	C-type lectin domain,	C 型凝集素结构域
DC	dendritic cell	树突状细胞
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附实验
ELISPOT	enzyme linked immunospot	酶联免疫斑点试验
FBS	fetal bovine serum	胎牛血清
FCM	flow cytometry	流式细胞术
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony- stimulating factor	粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子
HBcAg	hepatitis B virus core antigen	HBV 核心抗原
HBeAg	hepatitis B virus e antigen	HBV e 抗原
HBsAg	hepatitis B virus surface antigen	HBV 表面抗原
HBV	hepatitis B virus	乙型肝炎病毒
HCC	hepatocellular carcinoma	肝细胞癌
IFN- γ	interferon- γ	干扰素- γ
LDH	lactate dehydrogenase	乳酸脱氢酶
LPS	lipopolysaccharide	脂多糖
MAPK	mitogen activated protein kinase	丝裂原活化的蛋白激酶
MFI	mean fluorescent intensity	平均荧光密度
MHC	major histocompatibility complex	主要组织相容性复合体
MLR	mixed lymphocyte reaction	混合淋巴细胞反应
MR	mannose receptor	甘露糖受体
nAChR	nicotinic cholinergic receptor	烟碱性胆碱能受体
OVA	ovalbumin	鸡卵白蛋白
PBS	phosphate buffered saline	磷酸盐缓冲液
PRR	pattern recognition receptor	模式识别受体
TAP	transport associated protein,	转运相关蛋白
Tc	tubocurarine	筒箭毒碱
TCR	T cell receptor	T 细胞受体
Th	T helper cells	辅助性 T 淋巴细胞
TLR	toll like receptor	Toll 样受体
TMB	tetramethylbenzidine	四甲基联苯胺

厦门大学博硕士学位论文摘要库

摘要

乙型肝炎病毒(Hepatitis B Virus, HBV)感染是一个全球性的公共健康问题,其慢性感染引起的病毒性肝炎是严重威胁人类健康的常见病和多发病。目前对HBV的慢性感染尚缺乏非常有效的治疗手段。临床上具有持续性疗效的方法是利用IFN- α 进行系统治疗,可在40%患者体内取得抑制HBV复制的效果,但仅有5%~10%接受治疗的患者HBsAg转阴。此外,利用核酸类似物如拉米夫定(lamivudine)进行治疗可以快速降低血清HBV DNA水平并使得症状好转,但短期治疗会导致肝病迅速复发,长期治疗易形成抗性病毒变异株。近来对HBV感染的过继性免疫治疗研究日益增多,过继免疫治疗普遍采用体外抗原负载树突状细胞(Dendritic Cell, DC)后回输体内的方法,如将HBsAg负载的DC回输至HBV耐受者体内,可诱导出HBV特异性的免疫反应,抑制病毒复制,但这种方法诱导DC抗病毒的效率有待提高。因此,发现新的抗HBV的治疗方案非常必要。

DC是体内功能最强的抗原提呈细胞(Antigen Presenting Cell, APC),作为适应性免疫应答的启动者,在机体抗病毒免疫反应中发挥重要作用。有研究发现,HBV感染可造成DC功能的异常,包括共刺激分子表达的下调和抗原提呈能力的下降等。尼古丁是烟草中的一种主要成分,近年来已被作为药物广泛应用于神经退行性疾病、结肠癌和唐氏综合症的治疗。我们的前期研究发现,尼古丁刺激可上调DC表面共刺激分子的表达,增强其抗原提呈能力。将尼古丁刺激的DC回输至小鼠体内可达到预防和治疗肿瘤的目的。由于机体抗肿瘤和抗病毒都需要抗原特异性的杀伤性T细胞(Cytotoxic T Lymphocyte, CTL),因此我们推测尼古丁刺激的DC对机体抗HBV的免疫反应具有相似的效果。本研究是将尼古丁刺激DC用于抗病毒的尝试和探索。

本研究中,我们首先以Western Blot和流式细胞术(Flow Cytometry, FCM)的方法检测尼古丁刺激后DC表面CD80和甘露糖受体(Mannose Receptor, MR)的表达,结果表明:尼古丁刺激后DC表面共刺激分子CD80

的表达明显提高, MR 的平均荧光密度 (Mean Fluorescent Intensity, MFI) 从 63.68 增加到 76.35。然后, 我们以尼古丁刺激 DC, 联合 HBV 抗原或抗原肽负载后, 与同种异型 T 淋巴细胞进行混合淋巴细胞反应 (Mixed Lymphocyte Reaction, MLR), 分别以 BrdU 掺入实验和酶联免疫吸附实验 (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA) 检测 HBV 特异性 T 细胞的增殖和 IL-12 的分泌。我们发现, 尼古丁刺激可增强 DC 介导 HBV 特异性 T 细胞增殖的能力, 并促进 MLR 中 IL-12 的分泌。表明尼古丁刺激可增强 DC 的抗原提呈功能并促使 DC 诱导 Th0 向 Th1 方向极化。我们又进一步将尼古丁处理联合 HBV 抗原负载的 DC 回输至小鼠体内, 以酶联免疫斑点试验 (Enzyme Linked Immunospot, ELISPOT) 检测 HBV 特异性 CTL 的增殖, 乳酸脱氢酶 (Lactate Dehydrogenase, LDH) 释放法检测 CTL 的功能。结果显示, 尼古丁刺激可增强 DC 诱导 HBV 特异性 CTL 的能力, 并对靶细胞具有特异性杀伤功能。考虑到临床应用的可能性, 我们比较了尼古丁与 IFN- γ 、IL-15 和 IL-18 在增强 DC 功能上的优劣, 结果发现: 在介导 HBV 特异性 T 细胞增殖方面, 尼古丁刺激 DC 的效果优于 IFN- γ , 与 IL-15 和 IL-18 相似; 在促进 IL-12 分泌方面, 尼古丁刺激 DC 的效果优于 IFN- γ 和 IL-15, 与 IL-18 相似。最后, 我们通过阻断相关的信号通路初步探讨了尼古丁刺激增强 DC 功能的可能机制, 细胞增殖实验和 ELISA 检测的结果均表明, 尼古丁对 DC 的刺激作用与 PI3K/Akt 和 MAPK 通路相关。

通过以上研究, 我们证明了尼古丁刺激 DC 可增强机体抗 HBV 的免疫反应, 尤其是可更有效的诱导出具特异性杀伤作用的 CTL, 且尼古丁刺激 DC 的作用优于或类似于 IFN- γ 、IL-15 和 IL-18, 为进一步研究有效的抗 HBV 的免疫治疗方法提供了依据。

关键词: 尼古丁 乙型肝炎病毒 树突状细胞 免疫治疗

Abstract

More than 2 billion people alive today have been infected with hepatitis B virus (HBV) at some time in their life worldwide, and of these, about 350 million remain infected. Although many cases of chronic HBV infection can resolve spontaneously, some still progress to cirrhosis and hepatocellular carcinoma, which kill 1 million people every year. Thus, HBV infection had become a major public health problem. Treatment with IFN- α displayed persist effectiveness and could inhibit HBV DNA replication in 40% patients in clinic, but HBsAg only disappeared in 5%~10% subjects. Lamivudine, a kind of nucleic acid analog, was widely used and had proved an effective drug against HBV infection. But a relapse of liver disease was often observed if lamivudine was withdrawn during the treatment, while mutant viruses could appear with high possibility if it was used for a long period. Adoptive immunotherapy, which explored the transfer of *in vitro* cultured DCs, had showed promising prospect. However, the efficacy was still not satisfying. Thus, novel therapeutic strategies should be developed to deal with HBV infection.

Dendritic cells (DCs) are the most potent antigen-presenting cells (APCs) with unique ability to stimulate naive T lymphocytes, and are key players in anti-viral immune response. However, impaired DCs functions had been found in CHB patients. DCs in CHB patients had lower expression of surface costimulatory molecules, decreased cytokine production and reduced capacity of antigen presentation, which result in their failure to trigger efficient cellular immune responses against HBV. Nicotine is a major component of cigarette smoke, and had been used in the treatment of neurodegenerative diseases, ulcerative colitis and Tourette syndrome. Our previous studies demonstrated that nicotine had stimulatory effects on immature DCs, and adoptive transfer of nicotine stimulated DCs could achieve anti-tumor effects preventively and therapeutically in mice. Based on the fact that immune system explores the same

mechanism to achieve tumor eradication and virus clearance, we proposed that nicotine stimulated DCs could exhibit a similar effect against HBV infection. Our study could be recognized as a trial or an exploration of nicotine stimulated DCs on anti-virus application.

In our study, bone marrow derived DCs were firstly stimulated with nicotine for 12 hours and the expression of CD80 and mannose receptor (MR) were measured by Western blot and flow cytometry. We found that nicotine stimulation could notably upregulate CD80 expression with the mean fluorescent intensity (MFI) enhanced from 63.68 to 76.35. When HBV specific MLRs were performed with nicotine treated DCs and allotype T lymphocytes, we found that nicotine could augment HBV-specific T lymphocytes proliferation and promote IL-12 secretion as determined by BrdU cell proliferation assay and ELISA, indicating that nicotine could improve DCs' antigen presenting ability and facilitate Th1 polarization. Then, the HBV specific CTLs priming and their activities were further studied by intraperitoneally transfer of nicotine treated DCs. The results were determined by enzyme-linked immunospot assay (ELISPOT) and lactate dehydrogenase (LDH) release assay respectively. Our data suggested that adoptive transfer of nicotine stimulated DCs could induce HBV specific CTLs priming *in vivo* and those CTLs had cytolytic activities. We further compared nicotine's stimulation effect on DC with IFN- γ , IL-15 or IL-18, and found that nicotine was better, or as well as them both on DCs mediated T cell proliferation and IL-12 secretion. Finally, we investigated the possible mechanism by which nicotine exerted its effect on DC, and found that PI3K/Akt and MAPK signalling pathway were involved.

In conclusion, our results indicated that nicotine stimulated DCs could enhance HBV specific immune response, especially could induce more functional HBV specific CTLs. Notably, nicotine had better or similar effect on DCs compared to IFN- γ , IL-15 or IL-18. All the data indicated that nicotine might be a promising candidate in the preparing of cellular vaccine against HBV infection.

Key words: nicotine; hepatitis B virus; dendritic cell; immunotherapy

目 录

缩略语索引.....	I
中文摘要.....	II
英文摘要.....	IV
前言.....	1
第一章 尼古丁刺激对 DC 表型影响的研究	
引言.....	3
实验材料.....	4
实验方法.....	7
实验结果.....	10
讨论.....	14
第二章 尼古丁刺激 DC 增强 HBV 特异性免疫应答	
引言.....	16
实验材料.....	17
实验方法.....	19
实验结果.....	25
讨论.....	37
结论.....	43
参考文献.....	44
文献综述.....	52
攻读学位期间所发表文章.....	63
致谢.....	64

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Table of Contents

Abbreviations.....	I
Abstract in Chinese.....	II
Abstract in English.....	IV
Introduction.....	1
Chapter 1 The Effect of Nicotine Stimulation on DC's Phenotype	
Introduction.....	3
Materials.....	4
Methods.....	7
Results.....	10
Discussion.....	14
Chapter 2 Nicotine Treated DC Enhanced HBV Specific Immune Response	
Introduction.....	16
Materials.....	17
Methods.....	19
Results.....	25
Discussion.....	37
Conclusion.....	43
References.....	44
Article Review.....	52
Achievements.....	63
Acknowledgement.....	64

厦门大学博硕士学位论文摘要库

前 言

HBV 感染是一个全球性的公共健康问题，其慢性感染引起的病毒性肝炎是严重威胁人类健康的常见病和多发病。据世界卫生组织（WHO）报道，全球约超过 20 亿人曾感染过 HBV，其中约 3.5 亿发展为慢性感染^[1]。HBV 携带者的母亲可以通过垂直传播使婴儿受染，婴儿时期感染 HBV 者，90%以上成为慢性 HBV 携带者^[2,3]，随着年龄的增长，可反复发作肝炎，演变为慢性肝炎、肝硬化、肝衰竭和 HCC。因此 HBV 危害极大，已成为重大的公共卫生问题。

目前，慢性乙型肝炎的治疗方法主要包括：1、利用 IFN- α 进行系统治疗。效果有限，有 40%的患者表现为对 IFN- α 的低应答，且仅有 5%~10%接受治疗的患者 HBsAg 消失^[4]。2、核苷类似物。核苷类似物如拉米夫定的长期使用易导致耐药突变株的出现，短期使用停药后会导导致肝病迅速复发^[5]。3、联合使用抗病毒药物。但临床显示抗病毒效果无明显增强^[6]。因而，寻找新的更有效的抗病毒治疗方法具有重要意义。

DC 是体内功能最强的抗原提呈细胞，在机体抗病毒免疫中扮演极其重要的角色^[7]。DC 能够摄取入侵病毒的抗原并启动初始免疫应答，促使初始 T 细胞转化为效应性 T 细胞和病毒抗原特异性 CD8⁺记忆性 T 细胞而发挥抗病毒效应^[8]。但在 HBV 感染者体内发现了 DC 功能的缺失，以及由此导致的免疫系统对 HBV 的耐受或免疫忽视^[9-11]。研究表明，在 HBV 慢性感染者中，DC 表达共刺激分子及 MHC-I 类和 MHC-II 类分子的水平明显低于正常，同时刺激 T 淋巴细胞增殖和细胞因子分泌的能力亦低于正常，并进一步造成 HBV 特异性 CTL 功能不足，导致 HBV 持续性感染^[12-14]。因此，寻找可以重新激活体内适应性免疫应答尤其是增强 DC 功能的方法对乙型肝炎的治疗具有重要意义。

目前对慢性 HBV 感染的过继性免疫治疗研究方兴未艾。过继细胞免疫治疗（Adoptive Cellular Immunotherapy）是指在体外将患者的免疫细胞进行筛选、扩增、改造或药物处理，然后回输至患者体内，以重新激活或改变机体免疫反应，达到预防或治疗疾病目的。过继免疫治疗普遍采用体外抗原冲击 DC 后回输体内的方法。已有文献报道，由 HBV 表面抗原（Hepatitis B Surface Antigen,

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库