

李莉,李刚,曹红,等. 人正常肝细胞 LO2 感染 HBV 后表达 CCL22 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(4): 74 – 81.
Li L,Li G, Cao H, et al. Expression of CCL22 in human normal liver LO2 cells after infected with hepatitis B virus [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(4): 74 – 81.
doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2019. 04. 013

人正常肝细胞 LO2 感染 HBV 后表达 CCL22

李莉¹,李刚^{2*},曹红²,舒欣²,胡立立³,关瀛⁴,罗雪艳⁴

(1. 贵州省黔西南州人民医院全科医学科,贵州 兴义 562400; 2. 中山大学附属第三医院感染性疾病科,广州 510630;
3. 贵州省黔西南州人民医院肿瘤科,贵州 兴义 562400;4. 贵州省黔西南州人民医院,贵州 兴义 562400)

【摘要】目的 探讨感染 HBV 的人正常肝细胞 LO2 表达趋化因子 CCL22 的机制。方法 首先用 HBV 病毒感染 LO2 细胞,通过 ELISA 检测细胞 IL-32 表达情况;之后用外源人类重组 IL-32 蛋白刺激人急性单核细胞白血病细胞 THP-1 或用 HBV 感染共培养的 LO2 和 THP-1 细胞,通过 ELISA 检测 TNF-α 表达情况;其次用外源人类重组 TNF-α 蛋白刺激 LO2 细胞或用 HBV 感染共培养的 LO2 和 THP-1 细胞,使用特异性抗体通过 Western blot 检测 CREB 蛋白磷酸化情况,并通过 ELISA 检测趋化因子 CCL22 的表达情况。结果 HBV 诱导 LO2 细胞表达 IL-32;病毒诱导的 IL-32 诱导 THP-1 细胞分泌 TNF-α($P<0.05$);TNF-α 诱导 LO2 细胞活化 CREB 通路($P<0.05$);CREB 通路活化后促使 LO2 表达趋化因子 CCL22($P<0.05$)。结论 HBV 感染与 THP-1 共培养的 LO2 细胞可表达 CCL22,其机制可能是 HBV 诱导 LO2 细胞表达 IL-32,之后 IL-32 诱导 THP-1 细胞分泌 TNF-α,进而 TNF-α 促进 HBV 感染的 LO2 细胞表达趋化因子 CCL22。

【关键词】 白介素 32;肿瘤坏死因子 α;C-C 模体趋化因子配体 22;乙型肝炎病毒

【中图分类号】 R-33 【文献标识码】 A 【文章编号】1671-7856(2019) 04-0074-08

Expression of CCL22 in human normal liver LO2 cells after infected with hepatitis B virus

LI Li¹, LI Gang^{2*}, CAO Hong², SHU Xin², HU Lili³, GUAN Ying⁴, LUO Xueyan⁴
(1. Department of General Medicine, Qianxi People's Hospital, Guizhou Province, Xingyi 562400, China.
2. Department of Infectious Diseases, the Third Affiliated Hospital of Zhongshan University, Guangzhou 510000.
3. Department of Oncology, People's Hospital, Qianxi Prefecture, Guizhou Province, Xingyi 510000.
4. People's Hospital, Qianxi Prefecture, Xingyi 510000)

【Abstract】 Objective To investigate the mechanism of expression of the chemokine CCL22 in human normal liver LO2 cells after infected with hepatitis B virus(HBV). Methods LO2 cells were first infected with HBV virus and the expression of IL-32 was detected by ELISA. Then, exogenous human recombinant IL-32 protein was used to stimulate human acute leukemia cell line THP-1 or HEB and THP-1 cells co-cultured with HBV, and TNF-α expression was detected by ELISA. Second, exogenous human recombinant TNF-α protein was applied for stimulation or co-cultured LO2 and THP-1 cells were infected with HBV. LO2 cells were used to detect the phosphorylation of CREB protein by western blotting with

【基金项目】贵州省科计划项目,黔省专合字(2012)113 号。
【作者简介】李莉(1971—),女,主任医师,研究方向肝病的耐药机制研究,肿瘤靶向治疗,化疗。E-mail: 1444522659@qq.com
【通信作者】李刚(1964—),男,中山大学二级教授、一级主任医师、博士生导师。研究方向:传染病的防治/包括病毒性肝炎/登革热/乙脑等。E-mail: 18038583936@189.cn

specific antibody and to detect the expression of the chemokine CCL22 by ELISA. **Results** HBV induced IL-32 expression in LO2 cells ($P < 0.05$), and virus-induced IL-32 in turn induced the secretion of TNF- α by THP-1 cells ($P < 0.05$). TNF- α induced activation of the CREB pathway in LO2 cells. This activation then promoted the expression of the chemokine CCL22 in LO2 cells ($P < 0.05$). **Conclusions** LO2 cells co-cultured under conditions of HBV infection and in the presence of THP-1 can express CCL22. The mechanism behind this may involve HBV inducing IL-2 expression in LO2 cells, and then IL-32 induces the secretion of TNF- α by THP-1 cells, after which TNF- α promotes the HBV-infection. LO2 cells to express chemokine CCL22.

【Keywords】 IL-32; TNF- α ; CCL22; HBV

全球有约 3.5 亿人感染乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV), 感染 HBV 后易发展为肝硬化、肝癌等疾病^[1]。通常, HBV 在肝细胞内的复制不会对肝细胞造成损伤, 但机体免疫系统对病毒抗原的免疫反应会在清除病毒的同时损伤肝组织^[2]。研究显示, 慢性乙型病毒性肝炎 (chronic viral hepatitis B, CHB) 患者的肝组织会浸润大量 Th17 细胞, 并且 Th17 细胞与 CHB 炎症程度呈正相关^[3]。CHB 患者血清中趋化因子 CC 亚家族水平均比正常人增高, 且随着 CHB 患者病情的加重, 血清中 RANTES、MIF 浓度逐渐升高, 血清 RANTES 水平与 ALT、AST 和 TBIL 呈正相关, RANTES 水平可反映肝脏炎症活动及损害情况, 参与 CHB 发病^[3]。但 CHB 肝组织浸润 Th17 细胞的分子机制中尚不清楚。Yang 等^[4]发现由 HBV 诱导升高的 TGF- β 可抑制 microRNA-34a 的表达, 导致趋化因子 CCL22 的产生增加。Kim 等^[5]发现 IL-32 基因在 HT-29 细胞中的诱导 IL-8, TNF- α 和 CCL2 表达。但 HBV 感染后, CCL22 的产生是否依赖 IL-32 仍然未知。Xiang 等^[6]发现 HBV 的 HBc 蛋白能够调控 CREB 的磷酸化并激活 CREB 通路。Poole 等^[7]发现人巨细胞病毒感染人成纤维细胞 HFF 细胞后 CREB 通路的激活会产生 CCL22。基于此, 本文旨在探讨 HBV 感染人正常肝细胞 LO2 细胞后表达趋化因子 CCL22 的机制。

1 材料和方法

1.1 实验材料

人急性单核细胞白血病细胞 THP-1 购自北纳生物公司 (货号: BNCC100496); 人正常肝细胞 LO2 购自湘雅细胞库 (HTCC 编号: 1)。HBV 病毒获赠于华中科技大学同济医学院及中国科学院武汉病毒所。

1.2 主要试剂与仪器

外源人类重组 IL-32 和 TNF- α 蛋白购自 ABCAM 公司 (货号: ab117198, ab9642); 小分子抑制剂

Forskolin 购自 Selleck 公司 (货号: S2449); RPMI-1640 培养基购自 GE health 公司 (货号: SH30091); DMEDM 培养基购自北京索莱宝公司 (货号: 11965); 胎牛血清购自 Thermo Fisher Scientific 公司 (货号: 10099-133); CCL22、TNF- α 和 IL-32 的 ELISA 试剂盒购自上海邦奕生物科技有限公司 (货号: BYE10457, BYE10038, BYE10123); 逆转录试剂盒购自 TaKaRa 公司 (货号: RR037A); RT-qPCR 试剂盒购自南京诺唯赞公司 (货号: Q711)。CREB 抗体, p-CREB 抗体和 tubulin 抗体购自 CST 公司 (货号: 9197, 9198, 2146)。

Western blot 装置 (Bio-Rad, 货号: #1658004); 酶标仪 (Thermo Fisher Scientific, 货号: 51119700); 细胞培养箱 (Thermo Fisher Scientific, 货号: 51026331); 生物安全柜 (Thermo Fisher Scientific, 货号: 51022485)。

1.3 实验方法

1.3.1 实时荧光定量 PCR

采用 Trizol 法抽取总 RNA。利用核酸蛋白检测仪测定样品的 OD230、OD260 和 OD280, OD260 与 OD280 的比值在 1.7 至 2.0 之间, 用 1% 的琼脂糖胶进行电泳检测提取的 RNA 质量, 5S、18S 和 28S 的条带清晰可见。用 Takara 逆转录试剂盒将提取的总 RNA 中的 mRNA 逆转录为 cDNA。用南京诺唯赞 RT-qPCR 试剂盒, 在 ABI 的 qPCR 仪进行 RT-qPCR 反应。使用 Primer 5.0 设计 qPCR 引物, 由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成, 引物序列如表 1。将 LO2 细胞分为两组, 一组感染 HBV, 另一组不感染。使用实时荧光定量 PCR 测定 IL-32 的 mRNA 相对表达量 (图 1 上); PCR 结束后, 进行 2% 的琼脂糖电泳 (图 1 下)。将 THP-1 细胞分为两组, 一组用外源人类重组 IL-32 蛋白刺激, 一组不刺激。使用实时荧光定量 PCR 测定 TNF- α 的 mRNA 相对表达量 (图 3 上); PCR 结束后, 进行 2% 的琼脂糖电泳 (图 3 下)。

表 1 目的基因和内参基因引物
Table 1 Target gene and internal reference gene primers.

引物名称 Primer names	序列(5'-3') Sequence (5'-3')	扩增产物大小 Amplification product size
IL-32-F	GCAGAGCTGGAGGACGAC	146 bp
IL-32-R	CTCAACATCCGGGACAGG	
TNF-α-F	ATGAGCACTGAAAGCATGATCCGGG	148 bp
TNF-α-R	CCCGGATCATGCTTTCAGTGCTCAT	
CCL22-F	GTCCTCCTTGCTGTGGCG	150 bp
CCL22-R	CCTCGGGCAGGAGTCTGA	
ACTIN-F	CTGTGGCATCCACGAAACT	147 bp
ACTIN-R	AGGGCACTGATCTCCTTCTG	

1. 3. 2 细胞培养、药物处理和病毒感染

THP-1 维持在补充有 2 mmol/L L-谷氨酰胺的 RPMI-1640 培养基中的潮湿气氛(37℃, 5% CO₂) 中,添加 100 U/mL 青霉素,100 μg/ mL 链霉素和 10%热灭活的 FBS。LO2 细胞维持在补充有 DMEM 培养基中的潮湿气氛(37℃,5%CO₂) 中,添加 100 U/mL 青霉素,100 μg/mL 链霉素和 10%热灭活的 FBS。IL-32 终浓度为 0.4 μg/mL;TNF-α 终浓度分别为 0、5、10、15 ng/mL。处理 24 h 后收细胞。LO2 和 THP-1 细胞感染 30MOI 的 HBV,感染后 24 h 的细胞用于后续试验。

1. 3. 3 免疫印迹

进行 10%或 12% SDS-PAGE 的电泳,然后转移到 Immobilon-P PVDF 膜(0.45 μm 孔径)。将 PVDF 膜在室温下在含有 0.01% Tween-20 和 5%脱脂奶粉的 Tris 缓冲盐水(10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 150 mmol/L NaCl)中封闭 1 h,然后在 4℃下与目的蛋白的抗体温育过夜。然后将膜在室温下与缀合有 HRP 的相应二抗孵育 1 h。观察特定蛋白质使用 ECL Plus Western 印迹检测系统

1. 3. 4 酶联吸附试验

将包被缓冲液中的抗原(5~20 μg/ mL)加入到微量滴定板中。在 37℃ 孵育 4 h,然后在 4℃下储存直至使用。用洗涤液洗涤三次,在洗涤之间等待 10 min。通过完全填充管或所有孔,用 0.5%BSA 封闭 1 h。用洗涤液清洗 4 次,等待 10 min。向每个孔中加入 100 μL 用 PBS-TA 稀释的抗血清,在室温下孵育 5 h 或在冰箱中孵育过夜。如前所述洗涤平板,然后加入用 PBS-T 稀释的缀合物。在室温下 1.5 h 或在 37℃下 1 h。洗涤 4 次,然后向每个孔中加入 100 μL 底物。加入 100 μL 1 mol/L 磷酸停止反应。读取 450 nm 数据。将 LO2 细胞分为两组,一组感染 HBV,另一组不感染。使用 ELISA 试验对 LO2 细胞培养基上清中的 IL-32 进行蛋白表达量的

测定。将 THP-1 细胞分为两组,一组用外源人类重组 IL-32 蛋白刺激,一组不刺激。使用 ELISA 试验对 THP-1 细胞培养基上清中的 TNF-α 进行蛋白表达量的测定。

1. 4 统计学方法

所有数据使用 SPSS 23 软件分析,表示为平均值±标准差($\bar{x}\pm s$)。组间差异通过 Student's *t* 检验分析两组单向方差分析。qPCR 结果用 2^{-ΔΔCT} 法计算。使用 ImageJ 生物软件,对 Western blot 每个条带进行定量,将质量性状转化为数量性状,若符合正态分布采用 one-way ANOVA 分析,若不符合正态分布则采用秩和检验。所有实验独立重复至少 3 次。以 *P*<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2. 1 HBV 诱导 LO2 细胞表达 IL-32

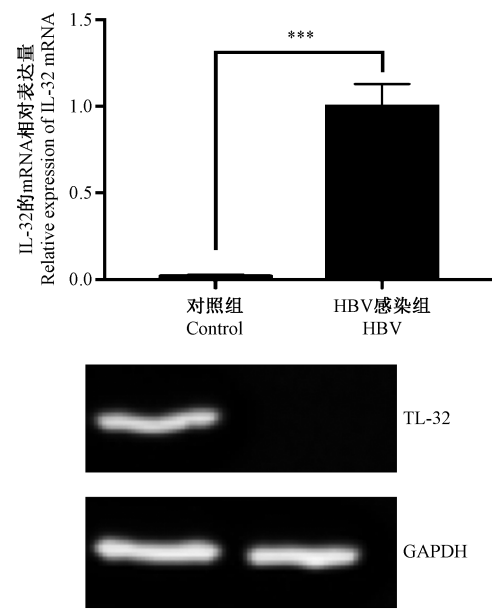
通过 qPCR 和 ELISA 发现感染了 HBV 的 LO2 细胞能够表达和分泌 IL-32。相对于不感染组,感染了 HBV 的 LO2 细胞能够表达 IL-32 的 mRNA,相应的能够检测到 LO2 细胞上清中的 IL-32 分泌蛋白。基于此,HBV 诱导 LO2 细胞表达 IL-32。(图 1、图 2)

2. 2 病毒诱导的 IL-32 诱导 THP-1 细胞分泌 TNF-α

发现用人 IL-32 刺激后的 THP-1 细胞能够表达和分泌 TNF-α。将 THP-1 细胞和 LO2 细胞共培养,TNF-α 并没有表达。用 HBV 感染 THP-1 细胞,TNF-α 略微表达(图 3、图 4)。只有在 THP-1 细胞和 LO2 细胞共培养时,再用 HBV 感染细胞,TNF-α 才能表达(图 5)。基于此,病毒诱导的 IL-32 诱导 THP-1 细胞分泌 TNF-α。

2. 3 TNF-α 诱导 LO2 细胞活化 CREB 通路

在 LO2 细胞中,外源刺激随梯度增加的 TNF-α,CREB 的表达量并没有明显变化,而磷酸化的

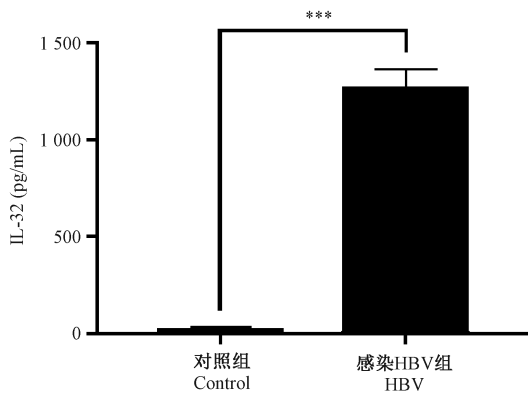


注：*** $P<0.001$ 。

图 1 感染与未感染 HBV 的 LO2 细胞中 IL-32 mRNA 的相对表达量

Note. *** $P<0.001$.

Figure 1 The relative expression of IL-32 mRNA in the HBV-infected and uninfected LO2 cells.



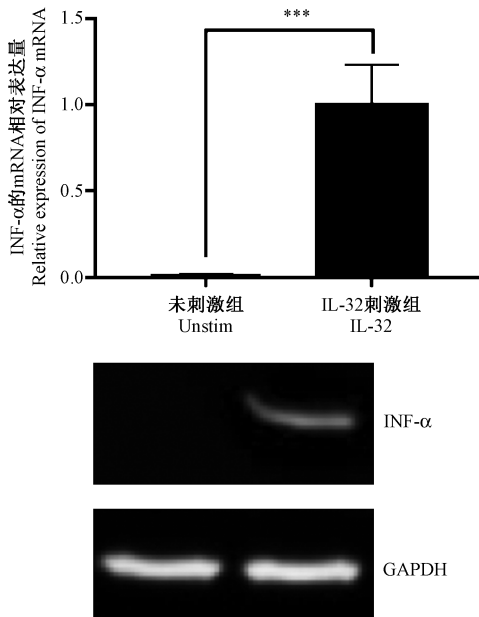
注：*** $P<0.001$ 。

图 2 HBV 感染与未感染的 LO2 细胞中 IL-32 蛋白表达量的比较

Note. *** $P<0.001$.

Figure 2 Comparison of the IL-32 protein levels in the HBV-infected and -uninfected LO2 cells

CREB 的含量随 TNF- α 浓度的升高而升高(图 6)。用 imageJ 软件量化条带后,可以明显看到 P-CREB 的含量随 TNF- α 浓度的升高而升高(图 7)。THP-1 细胞和 LO2 细胞共培养时,p-CREB 的表达量与对照基本无区别。HBV 感染 THP-1 细胞时,p-CREB 的表达量也几乎无区别。只有在 THP-1 细

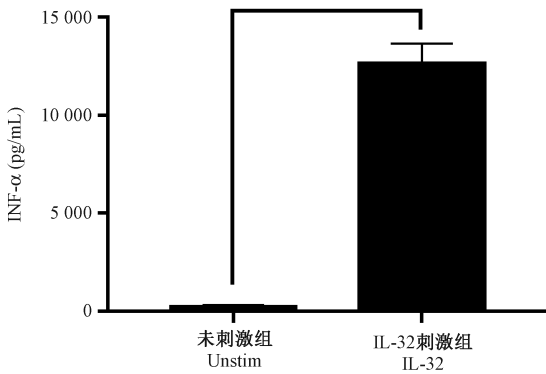


注：*** $P<0.001$ 。

图 3 IL-32 感染与未感染的 LO2 细胞中 TNF- α mRNA 相对表达量的比较

Note. *** $P<0.001$.

Figure 3 Relative mRNA expression of TNF- α in the IL-32-stimulated and unstimulated LO2 cells



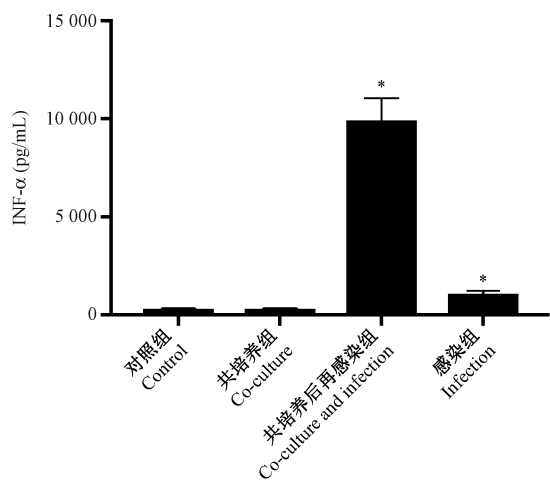
注:IL-32 刺激与不刺激时 TNF- α 蛋白量的对比,*** $P<0.001$ 。

图 4 TNF- α 的蛋白表达量

Note. Comparison of TNF- α protein expression in the IL-32-stimulated and unstimulated LO2 cells, *** $P<0.001$.

Figure 4 Comparison of TNF- α protein expression in the IL-32-stimulated and unstimulated LO2 cells

胞和 LO2 细胞共培养且 HBV 感染细胞时,p-CREB 的表达量显著增加(图 8)。基于此,TNF- α 能诱导 LO2 细胞活化 CREB 通路,且 THP-1 细胞和 LO2 细胞共培养后用 HBV 感染能使 p-CREB 的表达量上升。基于此,TNF- α 诱导 LO2 细胞活化 CREB 通路。



注:TNF-α 蛋白量与 control 的对比, * $P<0.05$ 。
图 5 病毒诱导的 IL-32 诱导 THP-1 细胞分泌 TNF-α
Note. The ratio of TNF-α protein in the treated cells to that of the control cells, * $P<0.05$.

Figure 5 Virus-induced IL-32 in turn induces the secretion of TNF-α by THP-1 cells

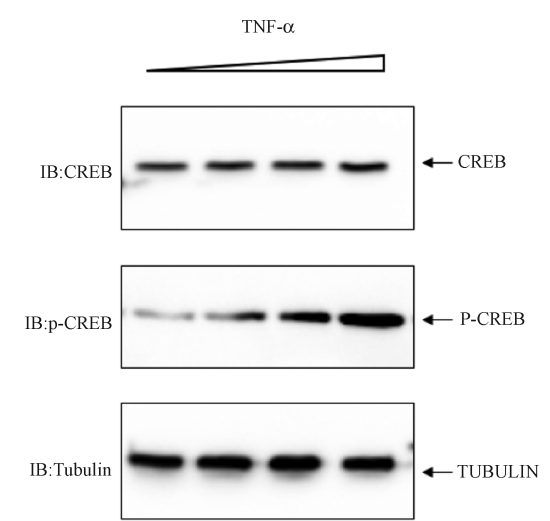
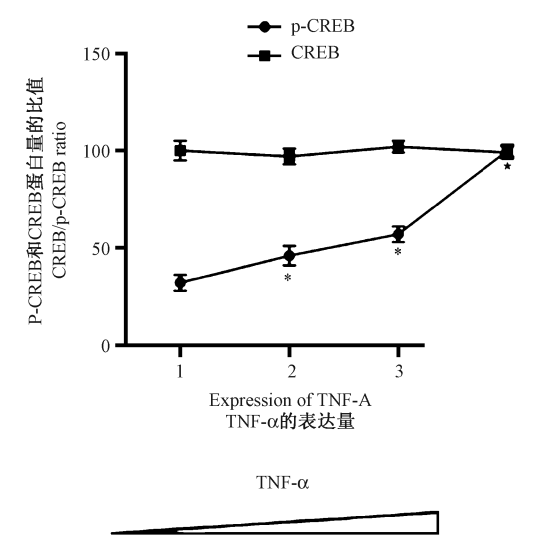


图 6 外源刺激随梯度增加的 TNF-α 时 CREB 和 p-CREB 的表达量
Figure 6 Expression of CREB and p-CREB upon stimulation with increasing exogenous TNF-α

2.4 CREB 通路活化后促使 LO2 表达趋化因子 CCL22

外源 TNF-α 刺激 LO2 细胞时,在 mRNA 水平上 CCL22 的表达量显著增高(图 9),且在蛋白水平上 CCL22 的表达量显著增高(图 10)。THP-1 和 LO2 细胞共培养且 TNF-α 刺激时,在蛋白水平上 CCL22 的表达量显著增高(图 11)。THP-1 和 LO2 细胞共培养且 HBV 感染时,在蛋白水平上



注:TNF-α 梯度增加时 p-CREB 表达量与最低浓度 TNF-α 时 p-CREB 表达量对比, * $P<0.05$ 。
图 7 LO2 细胞中外源刺激随梯度增加的 TNF-α 时 CREB 和 p-CREB 的表达量

Note. Comparison of p-CREB expression at the lowest concentration of TNF-α with that under conditions of increased TNF-α concentration, * $P<0.05$.

Figure 7 Expression of CREB and p-CREB in the LO2 cells upon stimulation with increasing exogenous TNF-α

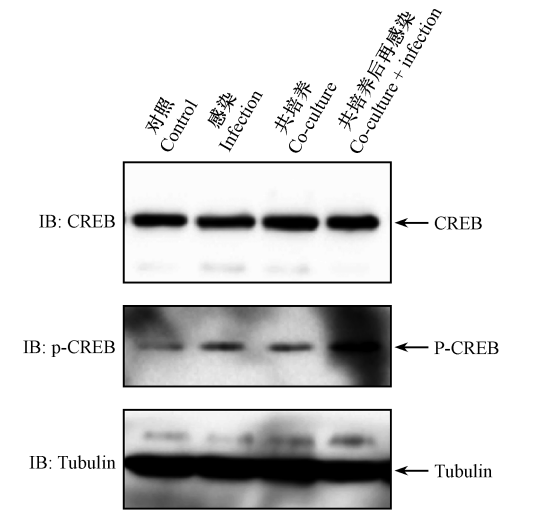
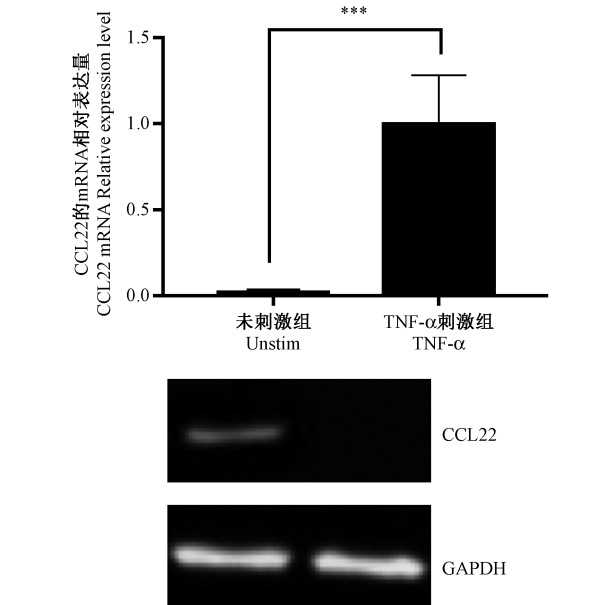


图 8 不同条件下 p-CREB 的表达情况
Figure 8 Expression of p-CREB under different conditions

CCL22 的表达量显著增高(图 11)。但是,这两种 CCL22 表达量升高均能被小分子抑制剂 Forskolin 抑制(图 11)。为了排除趋化因子 CCL22 是 THP-1 细胞产生的,用 TNF-α 刺激或感染 HBV 细胞时,发现 CCL22 蛋白水平的变化并没有统计学意义(图 12)。基于此,CREB 通路活化后促使 LO2 表达趋化因子 CCL22。

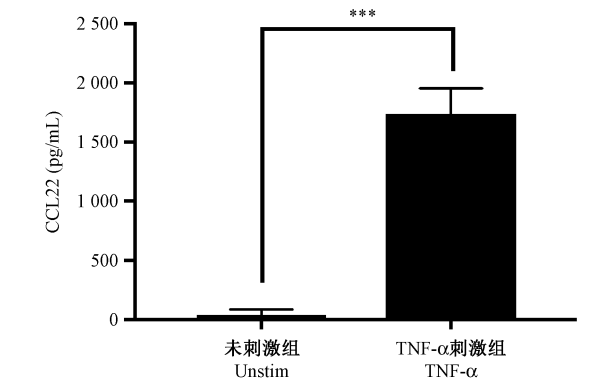


注:TNF-α 刺激与否时 CCL22 mRNA 表达量比较, *** $P<0.001$ 。

图 9 TNF-α 刺激与否时 CCL22 mRNA 表达量水平的比较

Note. Comparison of CCL22 mRNA expression when TNF-α stimulation was applied or not, *** $P<0.001$.

Figure 9 Comparison of CCL22 mRNA expression when TNF-α stimulation was applied or not



注:TNF-α 刺激与否时 CCL22 蛋白表达量比较; *** $P<0.001$ 。

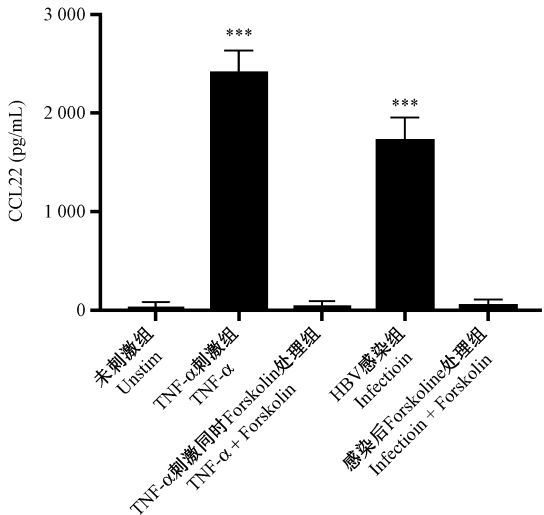
图 10 TNF-α 刺激与否时 CCL22 蛋白表达量水平的比较

Note: Comparison of CCL22 protein expression levels when TNF-α stimulation was applied or not, *** $P<0.001$.

Figure 10 Comparison of CCL22 protein expression levels when TNF-α stimulation was applied or not

3 讨论

慢性乙型肝炎病毒 (HBV) 感染影响全世界大约 3.75 亿人^[8]。目前其可以被抗病毒治疗有效控

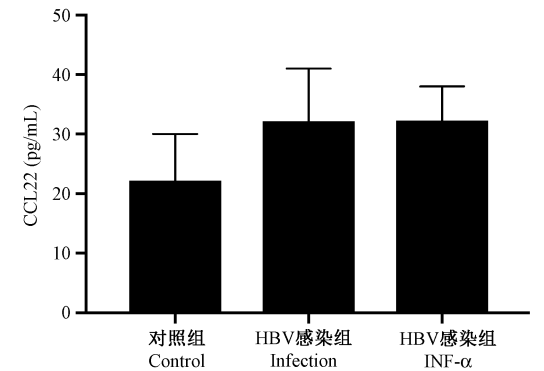


注:不同条件下 CCL22 的表达量与 control 对比, *** $P<0.001$ 。

图 11 不同条件下 CCL22 的蛋白表达量

Note. CCL22 protein expressions under different conditions compared with that of the controls, *** $P<0.001$.

Figure 11 CCL22 protein expressions under different conditions compared with that of the controls



注:CCL22 的表达量与 control 对比, $P>0.05$ 。

图 12 THP-1 细胞不同条件下 CCL22 表达量的对比

Note. Compared with the control cells, $P>0.05$.

Figure 12 Comparison of CCL22 expression in the THP-1 cells under different conditions

制,但很少能够完全清除慢性 HBV 感染^[9]。此外,很大一部分慢性 HBV 感染患者不适合目前可用的抗病毒治疗,并且仍然面临肝硬化和肝细胞癌的高风险^[8]。然而,对 HBV 感染的发病机制知之甚少是制定更有效治疗策略的主要障碍^[10]。HBV 发病机制的核心假设在于认为乙型肝炎是宿主特异性免疫介导的肝脏疾病^[11]。大量的研究证实 CD8⁺ T 细胞及非抗原特异性的淋巴细胞浸润慢性乙型病毒性肝炎 (chronic hepatitis B, CHB) 患者的肝组织^[2]。

Zhang 等^[12]研究发现 mDCs、pDCs 在 CHB 患者的肝组织内大量聚集,参与 HBV 感染后的肝损伤;且 MIG、IP-10、IL-6 等细胞因子在 CHB 肝组织中表达增高,并发现 HBV 的 HBx 蛋白通过活化 NF- κ B 诱导肝细胞表达 MIG^[13]、IP-10^[14]、IL-6^[15],MIG、IP-10 可以诱导免疫细胞聚集肝脏,IL-6 可以诱导免疫反应、炎症反应、调节肝内急性期反应蛋白的合成。而本研究发现,HBV 感染的 LO2 人肝细胞能够被诱导表达 IL-32。IL-32 调节细胞生长、代谢和免疫调节,是参与炎症性疾病的病理调节剂或保护剂^[16]。IL-32 具有 3 种剪接变体 IL-32 α 、IL-32 β 和 IL-32 γ ,其中 IL-32 γ 在其 N-末端具有疏水信号肽,这是分泌细胞因子的典型特征。基于此,推测 HBV 感染的 LO2 细胞后诱导产生并分泌的 IL-32 是 IL-32 γ 。并且 IL-32 能够诱导 THP-1 细胞分泌 TNF- α 。TNF- α 作为最重要的促炎细胞因子之一,通过诱导粘附分子的表达参与血管舒张和水肿的形成,以及白细胞与上皮细胞的粘附^[17]。有研究发现,TNF- α 水平降低后,CREB 和 pCREB 的表达水平均明显升高^[18]。本研究发现,通过外源 TNF- α 刺激 LO2 细胞,其胞内 CREB 磷酸化水平明显增高,CREB 通路被激活。且活化后的 CREB 通路促使 LO2 表达了趋化因子 CCL22。此外 THP-1 细胞和 LO2 细胞共培养后,再用 HBV 病毒感染,CREB 通路同样被活化,趋化因子 CCL22 同样表达。但这两种途径致使的 CCL22 表达能被小分子抑制剂 Forskolin 阻断。Forskolin 是一种腺苷酸环化酶的激活剂,其增加细胞内 cAMP 水平。cAMP 能够诱导 CREB 在 Ser133 发生磷酸化,来募集 CBP 以激活转录^[19]。而趋化因子 CCL22 在正常的肝组织中并不表达,但是 Riezu-Boj 等^[20]研究发现慢性丙肝患者肝内 CCL17、CCL22 表达增高,HCV 可以诱导 CCL17、CCL22 表达,增高的 CCL17、CCL22 诱导 Treg 聚集于肝组织。基于此,研究人员推测 HBV 感染宿主肝细胞后,诱导肝细胞表达 IL-32,之后作为分泌蛋白的 IL-32 刺激巨噬细胞表达分泌蛋白 TNF- α ,然后 TNF- α 又刺激肝细胞表达趋化因子 CCL22。之后,CCL22/CCR4 介导 Treg 细胞浸润至慢性肝炎患者的肝组织。而肝内 Treg 细胞高表达 CXCR3、CCR4 等趋化因子^[21],介导 Th17 细胞等免疫细胞浸润至慢性肝炎患者的肝组织。最后,肝内聚集的免疫细胞及细胞因子导致 CHB 患者肝损伤。

综上所述,IL-32 诱导 THP-1 细胞分泌的 TNF- α

促进 HBV 感染的 LO2 细胞表达趋化因子 CCL22。

参考文献:

- [1] Leumi S, Bigna JJ, Amougou MA, et al. Global, regional, and national prevalence of hepatitis B infection in the general and key populations living with HIV: a systematic review and meta-analysis protocol[J]. Syst Rev, 2018, 7(1): 146.
- [2] Maini MK, Boni C, Lee CK, et al. The role of virus-specific CD8⁺ cells in liver damage and viral control during persistent hepatitis B virus infection [J]. J Exp Med, 2000, 191(8): 1269-1280.
- [3] Guidotti LG, Chisari FV. Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immuneresponse [J]. Annu Rev Immunol, 2001, 19(1): 65-91.
- [4] Yang P, Li QJ, Feng Y, et al. TGF- β -miR-34a-CCL22 signaling-induced Treg cell recruitment promotes venous metastases of HBV-positive hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Cell, 2012, 22(3):291-303.
- [5] Kim MS, Kang JW, Jeon JS, et al. IL-32 θ gene expression in acute myeloid leukemia suppresses TNF- α production [J]. Oncotarget, 2015, 6(38):40747-40761.
- [6] Xiang A, Ren F, Lei X, et al. The hepatitis B virus (HBV) core protein enhances the transcription activation of CRE via the CRE/CREB/CBP pathway[J]. Antiviral Res, 2015, 120:7-15.
- [7] Poole E, Atkins E, Nakayama T, et al. NF- κ B-mediated activation of the chemokine CCL22 by the product of the human cytomegalovirus gene UL144 escapes regulation by viral IE86[J]. J Virol, 2008, 82(9):4250-4256.
- [8] Espinosa CM, Jhaveri R. Update on the management of hepatitis B and C infections in the neonatal period[J]. Semin Perinatol, 2018, 42(3): 185-190.
- [9] 刘祖明, 邹灿. 乙型肝炎肝硬化患者 FibroScan 参数与血清炎症指标、胶原代谢指标及纤维化指标的相关性[J]. 海南医学院学报, 2018(5).
- [10] 余文庆, 徐洪涛, 邢同京, 等. 滤泡辅助性 T 细胞及其相关分子在慢性 HBV 感染发病机制中的作用[J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2012, 06(16):4874-4876.
- [11] 秦少游, 王江滨. 肝脏免疫与 HBV 感染的免疫耐受[A]. 全国免疫学学术大会[C]. 2012.
- [12] Zhang YY, Hu KQ. Rethinking the pathogenesis of hepatitis B virus (HBV) infection[J]. J Med Virol, 2015, 87(12):1989-1999.
- [13] Xia LM, Huang WJ, Wu JG, et al. HBx protein induces expression of MIG and increases migration of leukocytes through activation of NF- κ B [J]. Virology, 2009, 385(2): 335-342.
- [14] Zhou Y, Wang S, Ma JW, et al. Hepatitis B virus protein X-induced expression of the CXC chemokine IP-10 Is mediated through activation of NF- κ B and increases migration of leukocytes [J]. J Biol Chem, 2010, 285(16):12159-12168.
- [15] Xiang WQ, Feng WF, Ke W, et al. Hepatitis B virus X protein

- stimulates IL-6 expression in hepatocytes via a MyD88-dependent pathway[J]. J Hepatol, 2011, 54(1):26-33.
- [16] Hong JT, Son DJ, Lee CK, et al. Interleukin 32, inflammation and cancer [J]. Pharmacol Ther, 2017, 174:127-137.
- [17] Zelov   H, Ho sek J. TNF-  signalling and inflammation; interactions between old acquaintances[J]. Inflamm Res, 2013, 62(7):641-651.
- [18] Miao Y, He T, Zhu Y, et al. Activation of hippocampal CREB by rolipram partially recovers balance between TNF-  and IL-10 levels and improves cognitive deficits in diabetic rats [J]. Cell Mol Neurobiol, 2015, 35(8):1157-1164.
- [19] Xiang A, Ren F, Lei X, et al. The hepatitis B virus (HBV) core protein enhances the transcription activation of CRE via the CRE/CREB/CBP pathway[J]. Antiviral Res, 2015, 120:7-15.
- [20] Riezu-Boj JI, Larrea E, Aldabe R, et al. Hepatitis C virus induced the expression of CCL17 and CCL22 chemokines that attract regulatory T cells to the site of infection[J]. J Hepatol, 2011, 54(3):422-431.
- [21] Ye HO, Weston CJ, Lalor PF, et al. Distinct roles for CCR4 and CXCR3 in the recruitment and positioning of regulatory T cells in the inflamed human liver[J]. J Immunol, 2010, 184(6):2886-2898.

[收稿日期]2018-08-29

(上接第 63 页)

- [11] 美国糖尿病协会. 美国糖尿病协会糖尿病完全指南[M]. 北京:北京科学技术出版社, 2014.
- [12] Pattamaprapanont P, Muanprasat C, Soodvilai S, et al. Effect of exercise training on signaling of interleukin-6 in skeletal muscles of type 2 diabetic rats[J]. Rev Diabet Stud, 2016, 13(2-3):197-206.
- [13] Schramm A, Matusik P, Osmenda G, et al. Targeting NADPH oxidases in vascular pharmacology[J]. Vascu Pharmacol, 2012, 56(5-6):216-231.
- [14] Wang W, Wu QH, Sui Y, et al. Rutin protects endothelial dysfunction by disturbing Nox4 and ROS-sensitive NLRP3 inflammasome[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 86:32-40.
- [15] Sato N, Takasaka N, Yoshida M, et al. Metformin attenuates lung fibrosis development via NOX4 suppression [J]. Respir Res, 2016, 17(1):107.
- [16] Keum YS, Choi BY. Molecular and chemical regulation of the Keap1-Nrf2 signaling pathway [J]. Molecules, 2014, 19:10074-10089.
- [17] Muthusamy VR, Kannan S, Sadhaasivam K, et al. Acute exercise stress activates Nrf2/ARE signaling and promotes antioxidant mechanisms in the myocardium[J]. Free Radic Biol Med, 2012, 52(2):366-376.
- [18] Martin-montalvo A, Mercken EM, Mitchell SJ, et al. Metformin improves healthspan and lifespan in mice [J]. Nat Commun, 2013, 4(7):2192.
- [19] Zhou ZY, Ren LW, Zhan P, et al. Metformin exerts glucose-lowering action in high-fat fed mice via attenuating endotoxemia and enhancing insulin signaling[J]. Acta Pharmacol Sin, 2016, 37(8):1063-1075.
- [20] Tafani M, Sansone L, Limana F, et al. The interplay of reactive oxygen species, hypoxia, inflammation, and sirtuins in cancer initiation and progression [J]. Oxid Med Cell Longev, 2016, 2016(1):3907147.
- [21] Nedeljkovic ZS, Gokce N, Loscalzo J. Mechanisms of oxidative stress and vascular dysfunction[J]. Postgrad Med J, 2003, 79(930):195-199.
- [22] Hopkins PN. Molecular biology of atherosclerosis [J]. Physiol Rev, 2013, 93(3):1317-1542.
- [23] Hyun B, Shin S, Lee A, et al. Metformin down-regulates TNF-  secretion via suppression of scavenger receptors in macrophages [J]. Immune Netw, 2013, 13(4):123-132.
- [24] 李俊, 王少兵, 许桂清, 等. 有氧运动和二甲双胍对糖尿病大鼠血清 IL-1 , TNF-  和 MCP-1 的影响 [J]. 中国体育科技, 2017, 53(3):41-47.
- [25] Codellar R, Luzi L, Inverardi L, et al. The anti-inflammatory effects of exercise in the syndromic thread of diabetes and autoimmunity[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2015, 19(19):3709-3722.

[收稿日期]2018-09-05