

# 白细胞介素-35 对乙型肝炎病毒复制的影响研究\*

祝成亮, 李艳<sup>△</sup>, 袁丽(武汉大学人民医院检验科, 武汉 430060)

**【摘要】** 目的 探讨白细胞介素(IL)-35 对乙型肝炎病毒(HBV)复制的影响。方法 将 HBV 感染性克隆 pHBV1.3 及其启动子 pHBV-Luc 分别转染 HepG2 细胞, 加入不同浓度的重组人 IL-35 蛋白, 采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测细胞上清液中乙型肝炎表面抗原(HBsAg)和乙型肝炎 e 抗原(HBeAg)水平; 荧光定量聚合酶链反应检测细胞闭合环状 DNA(cccDNA)的水平; 采用 Luminometer 荧光检测仪分析 HBV 启动子活性的变化。结果 IL-35 能够抑制细胞上清液中 HBsAg 和 HBeAg 的水平及细胞内 HBV cccDNA 的拷贝数, 并下调 HBV 启动子的活性。结论 IL-35 能够在 HepG2 细胞中抑制 HBV 的复制。

**【关键词】** 乙型肝炎病毒; 白细胞介素-35; 酶联免疫吸附试验; 复制

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2016.02.001 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2016)02-0145-02

**Study on influence of interleukin-35 on replication of hepatitis B virus\*** ZHU Cheng-liang, LI Yan<sup>△</sup>, YUAN Li (Department of Clinical Laboratory, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei 430060, China)

**【Abstract】** **Objective** To explore the influence of interleukin-35(IL-35) on the replication of hepatitis B virus (HBV). **Methods** HBV infectious clone pHBV1.3 and its promoter pHBV-Luc were transfected into HepG2 cells respectively and different concentrations of IL-35 were added. The HBsAg and HBeAg levels in the supernatants were measured by adopting enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), and the covalently closed circular DNA (cccDNA) levels were measured by real-time PCR, and the HBV promoter activity was measured by the luminometer fluorescence detector. **Results** The levels of HBsAg and HBeAg, and cccDNA copy number were inhibited by IL-35 and the HBV promoter activity was down-regulated. **Conclusion** IL-35 can inhibit the replication of HBV in HepG2 cells.

**【Key words】** HBV; IL-35; ELISA; replication

乙型肝炎病毒(HBV)感染严重危害人类健康, 目前全球约有 3.5 亿 HBV 携带者, 每年被感染的人数达 5 000 万, 死于 HBV 感染相关疾病的人数约 100 万。白细胞介素(IL)-12 家族是一类由同源二聚体分子组成的细胞因子, 其成员包括 IL-12、IL-23、IL-27 和 IL-35。IL-35 是新发现的细胞因子, 由病毒诱导基因 3(EBI3) 和 IL-12 p35 两个亚基构成, 是一种免疫抑制性细胞因子, 在自身免疫性疾病及感染性疾病中起到重要的作用<sup>[1]</sup>。本研究旨在探讨 IL-35 对 HBV 复制的影响, 为 HBV 的免疫调控治疗提供一定的理论基础。现报道如下。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞系与试剂** 人肝癌细胞系 HepG2 购自武汉大学典型培养物保藏中心; HBV 感染性克隆 pHBV1.3 及 HBV 全基因启动子 pHBV-Luc 由本科构建<sup>[2]</sup>; 重组人 IL-35 蛋白购自 R&D system; 转染试剂 Lipofectamine2000 购自美国 Invitrogen 公司; 乙型肝炎表面抗原(HBsAg)和乙型肝炎 e 抗原(HBeAg)检测试剂盒购自北京万泰生物药业股份有限公司; HBV cccDNA 检测试剂盒购自北京索奥生物医药科技有限公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养及转染** HepG2 细胞培养在含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养基中, 于 5% CO<sub>2</sub>, 37 °C 细胞培养箱中培养。转染前将 HepG2 细胞接种 24 孔板, 待细胞生长至丰度

80%~90% 时, 将质粒 DNA 和 Lipofectamine2000 转染试剂分别稀释在无血清无双抗的 RPMI1640 培养基中后混匀, 室温下作用 20 min, 将配制好的转染液加入细胞培养板中, 细胞置 CO<sub>2</sub> 培养箱内继续培养。

**1.2.2 酶联免疫吸附试验(ELISA)** 采用 HBV ELISA 检测试剂盒测定细胞上清液中 HBsAg 和 HBeAg 的水平, 检测方法按试剂盒说明书进行操作, 实验重复 3 次。

**1.2.3 荧光定量聚合酶链反应(PCR)测定** 提取的 HBV 闭合环状 DNA(cccDNA), 采用 HBV cccDNA 试剂盒进行荧光定量 PCR, 按试剂盒操作说明进行, 实验重复 3 次。

**1.2.4 荧光素酶的测定** 细胞转染后 48 h 后, 去除上清液, 洗涤后加入裂解液裂解细胞(每孔 100 μL)。取 20 μL 的细胞裂解液和 50 μL 的荧光素酶底物混匀, 用 Luminometer 荧光检测分析仪进行测定, 实验重复 3 次。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS19.0 统计软件进行分析, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用 *t* 检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 IL-35 蛋白不同浓度下 HBsAg 和 HBeAg 水平比较** 随着 IL-35 蛋白浓度的不断增加, HBsAg 和 HBeAg 的水平逐渐下降, 见表 1。表明 IL-35 蛋白能够在 HepG2 细胞抑制 HBsAg 和 HBeAg 的合成和分泌, 呈剂量依赖效应。

\* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81101485); 国家临床重点专科专项经费资助项目(2010305); 湖北省自然科学基金资助项目(ZRY2014000315)。

作者简介: 祝成亮, 男, 博士, 副主任技师, 主要研究方向为医学病毒学。 <sup>△</sup> 通讯作者, E-mail: yanlitf@163.com。

表 1 IL-35 蛋白不同浓度下 HBsAg 和 HBeAg 水平比较( $\bar{x} \pm s$ , ng/mL)

IL-35 蛋白浓度 (ng/mL)	HBsAg	HBeAg
0	0.872 ± 0.103	0.794 ± 0.112
20	0.654 ± 0.086	0.543 ± 0.083*
50	0.485 ± 0.066	0.401 ± 0.058*
100	0.485 ± 0.066	0.287 ± 0.042*

注:与 0 ng/mL 比较, \*  $P < 0.05$ 。

**2.2** IL-35 蛋白不同浓度下 HBV cccDNA 拷贝数比较 IL-35 蛋白浓度在 0、20、50、100 ng/mL, cccDNA 拷贝数分别为  $5.62 \times 10^6$ 、 $3.65 \times 10^5$ 、 $7.36 \times 10^4$ 、 $1.24 \times 10^4$  copy/mL。随着 IL-35 蛋白浓度的不断增加, HBV cccDNA 的拷贝数不断降低, 表明 IL-35 蛋白能够抑制 HBV cccDNA 的拷贝, 呈剂量依赖效应。

**2.3** IL-35 蛋白不同浓度下 HBV 启动子活性比较 随着 IL-35 蛋白浓度的不断增加, 荧光素酶的活性不断降低, 分别为 (1 052.7 ± 86.6)、(652.3 ± 53.9)、(438.2 ± 38.2)、(239.6 ± 22.1) RUL/ $\mu$ g 蛋白。结果表明 IL-35 能够抑制 HBV 启动子活性, 呈剂量依赖效应。

### 3 讨 论

慢性 HBV 感染的自然病程分为 4 个阶段: 免疫耐受期、免疫清除期、非活动或复制期和再活动期。研究表明, 细胞因子介导的免疫反应在 HBV 转归过程中起到重要作用, 很多 IL 都能够影响 HBV 的复制, 如 IL-12、IL-21 和 IL-27 等<sup>[3-7]</sup>, 但目前关于 IL-35 对 HBV 复制影响的相关研究还较少。

本研究主要探讨了 IL-35 对 HBV 复制的影响, 本研究结果表明, IL-35 能够在 HepG2 细胞抑制 HBsAg 和 HBeAg 的合成和分泌, 并且抑制 HBV cccDNA 的拷贝, 充分证明了 IL-35 能够在细胞水平抑制 HBV 的复制, 进一步研究发现, IL-35 通过抑制 HBV 启动子的活性来抑制 HBV 的复制。

作为一种免疫抑制因子, IL-35 主要通过抑制 T 细胞的分化和效应功能来发挥其免疫抑制作用, 在小细胞肺癌、自身免疫病、前列腺炎、系统性红斑狼疮和白血病等多种疾病发病过程中起到一定作用<sup>[8-13]</sup>。Liu 等<sup>[14]</sup>研究证实, 慢性 HBV 感染的患者循环 CD4<sup>+</sup> T 细胞可以检测到 IL-35 的表达, 而在健康对照组检测不到, 表明 HBV 可以诱导 CD4<sup>+</sup> T 细胞合成分泌 IL-35。因此, HBV 感染诱导了机体的免疫应答, 免疫细胞可能通过分泌细胞因子如 IL-35 等进而抑制病毒的复制。

IL-12 家族的成员如 IL-12 和 IL-27 均能抑制 HBV 的复制, 作者前期的研究工作证实 HBV 能够促进 IL-27 表达的升高, 进一步研究表明 IL-27 能够抑制 HBsAg 和 HBeAg 的合成和分泌, 并且抑制 HBV DNA 的复制, 其机制是通过调节 I 型和 III 型干扰素的表达来实现的<sup>[3]</sup>。本研究中, 证实了 IL-35 能够抑制 HBV 的复制, IL-35 能否在动物水平抑制 HBV 的复制, 其具体的机制尚待进一步研究。

### 参考文献

[1] Nicholl MB, Ledgewood CL, Chen X, et al. IL-35 promotes pancreas cancer growth through enhancement of proliferation and inhibition of apoptosis: evidence for a

role as an autocrine growth factor[J]. Cytokine, 2014, 70 (2):126-133.

[2] Zhu C, Zhang R, Liu L, et al. Hepatitis B virus enhances interleukin-27 expression both in vivo and in vitro[J]. Clin Immunol, 2009, 131(1):92-97.

[3] Cao Y, Zhang R, Zhang W, et al. IL-27, a cytokine, and IFN- $\lambda$ 1, a type III IFN, are coordinated to regulate virus replication through type I IFN[J]. J Immunol, 2014, 192 (2):691-703.

[4] Kapoor R, Kotttilil S. Strategies to eliminate HBV infection[J]. Future Virol, 2014, 9(6):565-585.

[5] Brass A, Frelin L, Milich DR, et al. Functional aspects of intrahepatic hepatitis B virus-specific T cells induced by therapeutic DNA vaccination[J]. Mol Ther, 2015, 23(3):578-590.

[6] Christina G, Amit A, Sameh B, et al. IL-27 enhances LPS-induced proinflammatory cytokine production via upregulation of TLR4 expression and signaling in human monocytes[J]. J Immunol, 2012, 188(2):864-873.

[7] Kao JT, Lai HC, Tsai SM, et al. Rather than interleukin-27, interleukin-6 expresses positive correlation with liver severity in naive hepatitis B infection patients[J]. Liver Int, 2012, 32(6):928-936.

[8] Skowron W, Zemanek K, Wojdan K, et al. The effect of interleukin-35 on the integrity, ICAM-1 expression and apoptosis of human aortic smooth muscle cells[J]. Pharmacol Rep, 2015, 67(2):376-381.

[9] Ouyang H, Shi YB, Liu ZC, et al. Decreased interleukin-35 and CD4<sup>+</sup> EB13<sup>+</sup> T cells in patients with active systemic lupus erythematosus[J]. Am J Med Sci, 2014, 348(2):156-161.

[10] Tedder TF, Leonard WJ. Autoimmunity: regulatory B cells IL-35 and IL-21 regulate the regulators[J]. Nat Rev Rheumatol, 2014, 10(8):452-453.

[11] Gu X, Tian T, Zhang B, et al. Elevated plasma interleukin-35 levels predict poor prognosis in patients with non-small cell lung cancer[J]. Tumour Biol, 2015, 36(4):2651-2656.

[12] Wang DY, Su C, Chen GM, et al. The decreased frequency of SIGIRR-positive CD4<sup>+</sup> T cells in peripheral blood of patients with SLE and its correlation with disease activity[J]. Molr Biol Rep, 2015, 42(2):423-430.

[13] Castellani ML, Anogeianaki A, Felaco P, et al. IL-35, an anti-inflammatory cytokine which expands CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg cells[J]. J Biol Regul Homeost Agents, 2010, 24(2):131-135.

[14] Liu F, Tong F, He Y, et al. Detectable expression of IL-35 in CD4<sup>+</sup> T cells from peripheral blood of chronic hepatitis B patients[J]. Clin Immunol, 2011, 139(1):1-5.

(收稿日期:2015-04-17 修回日期:2015-07-21)