

HBcAg 肽特异性 CD8⁺ T 细胞抑制乙型肝炎病毒的体外实验研究

郑纪山 唐雨德 何长伦 高 健 常静霞

摘 要 **目的** 观察 HBV 感染者的 HBcAg 肽特异性 CD8⁺ T 细胞体外抑制乙型肝炎病毒 (HBV) 的作用和探讨非溶细胞机制清除病毒的效应分子。**方法** 以 HepG2.2.15 细胞为靶细胞。用 HLA-A 匹配的 HBcAg 肽特异性 CD8⁺ T 细胞克隆 (效应细胞) 与靶细胞 (效靶比例 1:50) 共同培养, 于 24h、48h 和 72h 收集培养上清, 通过检测其中 HBV 产物的变化, 观察 CD8⁺ T 克隆对 HBV 的抑制作用。用抗体中和法观察 CD8⁺ T 细胞分泌的 IFN- γ 被封闭后 HBV 抑制的变化。**结果** HBV 特异性 CD8⁺ T 克隆与靶细胞共育后, 培养上清可检出高水平 IFN- γ 。共育后对 HBsAg、HBeAg 和 HBV-DNA 的最高抑制率分别为 54.55%、50.36% 和 74.55%, 均在 72h。IFN- γ 被抗体封闭后, 对 HBV DNA 的抑制率显著下降, 24h 和 48h 分别为 6.22% 和 17.48%。细胞毒活性最高见于 24h, 15.66%。**结论** ①病毒特异性 CD8⁺ T 细胞对靶细胞中 HBV 的清除既有溶细胞机制, 也有非溶细胞机制参与; ②IFN- γ 是非溶细胞机制清除病毒的主要效应分子。

关键词 乙型肝炎病毒 特异性 CD8⁺ T 细胞 干扰素- γ HepG2.2.15 细胞

HBcAg-specific CD8⁺ T Cells Inhibit HBV Replication in vitro. Zheng Jishan, Tang Yude, He Changlun, et al. Military Medicine Institute of Nanjing Military Region, Jiangsu 210002, China

Abstract Objective To investigate the effects of HBcAg-specific CD8⁺ T cells on inhibiting HBV replication *in vitro*, and to search the cytokine of noncytolytic mechanisms in viral clearance. **Methods** By the method of coculture of HepG2.2.15 cell (target cells) with HLA-A2 matched HBcAg-specific CD8⁺ T cell clone (effector cells) at E:T ratios of 1:50, and monitoring HBV production (HBsAg, HBeAg, and HBV-DNA) in coculture supernatants at 24h, 48h and 72h, the percentage of decrease in HBV replication level was observed. Furthermore, blocking experiment with neutralizing mAbs to IFN- γ was performed to evaluate the effect of this cytokine. **Results** CD8⁺ T clone produced high levels of IFN- γ following coculture with 2.2.15 cells. HBsAg, HBeAg and HBV-DNA in coculture supernatants were significantly reduced, and the greatest effect was observed at 72h by 54.55%, 50.36% and 74.55%, respectively. The reduction of HBV DNA was decreased followed by using neutralizing mAbs to IFN- γ . The maximum activity of cytotoxicity of target cells was at 24h by 15.66%. **Conclusion** ①HBV-specific CD8⁺ T cells inhibit HBV replication by cytolytic and noncytolytic mechanisms. ②The effect of noncytolytic mechanisms is mainly mediated by IFN- γ .

Key words Hepatitis B virus; Specific CD8⁺ T cells; IFN- γ ; HepG2.2.15 cells

乙型肝炎病毒 (HBV) 是一种非致细胞病变病毒。一般认为, HBV 特异性细胞毒 T 细胞 (cytotoxic T lymphocyte, CTL) 即活化的 CD8⁺ T 细胞, 杀伤病毒感染的肝细胞是清除病毒和控制 HBV 感染的主要机制。临床研究发现, 慢性 HBV 感染者肝组织中穿孔素和颗粒酶的表达强度与血清丙氨酸转氨酶 (ALT) 水平、肝组织炎症程度显著相关, 与血清 HBV-DNA 载量呈负相关^[1,2]; 而在应用干扰素- α 治疗

期间, ALT 升高的慢性乙型肝炎患者康复机会较大^[3]。这些观察似乎都支持上述观点。但最近几年有研究发现, CTL 还可以通过一种非溶细胞机制控制肝细胞中 HBV 复制以清除病毒^[4]。在 HBV 转基因鼠^[5] 和 HBV 感染黑猩猩^[6,7] 的动物实验中, 提示这种非溶细胞病毒清除机制是由 CD8⁺ T 细胞产生的细胞因子介导的。本研究试图通过体外人的 HBV 特异性 CD8⁺ T 细胞 (效应细胞) 与能复制和分泌 HBV 产物的肝癌细胞 (靶细胞) 共同培养, 观察 CD8⁺ T 细胞对 HBV 的抑制作用。

材料与方法

1. 材料: RPMI-1640 培养基、DMEM 培养基、胎牛血清 (Gibco 公司), G418 (Sigma 公司), 重组人白介素-2 (rhIL-2)

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30671929)

作者单位: 210002 南京军区军事医学研究所 (郑纪山、唐雨德、高健); 210002 南京, 解放军第八一医院 (何长伦、常静霞)

2, R&D 公司), 重组乙肝核心抗原 (rHBcAg, Prospec 公司), 乳酸脱氢酶细胞毒检测试剂盒 (Promega 公司); HLA-A 位点分型试剂盒 (PEL-FREEZ 公司); 荧光标记的鼠抗人 CD8/CD3/CD4/IFN- γ /IL-4 单克隆抗体, 流式细胞检测试剂盒 (内含固定-破膜混合液、破膜-洗涤缓冲液、蛋白转移抑制剂-BFA) (BD 公司), 鼠抗人 CD4 单抗 (Biolegend 公司); 抗人 IFN- γ 单抗, IFN- γ 检测试剂盒 (Mabtech 公司); HBV 核酸定量检测试剂盒 (PCR-荧光探针法, 上海科华生物工程有限公司)。HBV 核心 (HBc) 抗原肽由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。流式细胞仪为美国 BD 公司产品 (FACS Calibur)。

2. 乙型肝炎患者 HBcAg 特异性 CD8⁺T 细胞克隆建立:

(1) 患者资料: 男性, 22 岁, 急性乙型肝炎诊断依据中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会 2000 年联合修订的《病毒性肝炎防治方案》。该患者就诊时血清 HBsAg(+), HBsAb(-), HBeAg-, HBeAb+, HBcAb+, HBV DNA+; 采血时距发病 5 周, 其时 HBV DNA- (<500 拷贝/毫升)。血清抗 HAV-IgM、抗 HCV、抗 HEV 以及抗 HIV 检测均为阴性。(2) 人白细胞相关抗原 A 位点 (HLA-A) 基因分型: 采用序列特异引物聚合酶链反应基因分型技术, 按说明书操作。(3) HBV 特异性表位肽设计与合成: 合成 HBc18-27 表位肽, 长度为 10 个氨基酸, 序列 FLPSPDFPSV, 纯度 >98%。(4) 淋巴细胞激活和克隆化: 方法见文献[8]。常规分离外周血单个细胞 (PBMC), 2×10^6 个细胞加入 RPMI-1640 完全培养液, 于 24 孔培养板 1 毫升/孔, 另加 rHBcAg1 μ g, 合成肽 10 μ g 激活细胞。培养第 3、10 天加 rhIL-2 (终浓度 10U/ml); 第 7 天加合成肽、rhIL-2 和异体饲养细胞 2×10^6 /孔。将上述激活细胞加入用抗 CD4 单克隆抗体预包被的 6 孔板, 37℃ 放置 1h, 吸取未吸附的细胞悬液, 即为富含 CD8⁺T 细胞的组分。采用有限稀释法进行克隆化。96 孔培养板按 1 个/孔添加激活细胞, 并同时加入 rhIL-2、合成肽、PHA (1 μ g/ml) 和异体饲养细胞 (2×10^5 /孔)。间隔 7 天重复加刺激物和饲养细胞 1 次。根据克隆细胞生长情况扩大培养, 每 3 天换部分液体, 每 10 天重复刺激 1 次。(5) 淋巴细胞表型和胞内细胞因子检测: 克隆细胞以染色缓冲液洗涤后, 分别与荧光标记的鼠抗人 CD3/CD8/CD4 单克隆抗体混匀, 4℃ 避光孵育 30min, 洗去游离抗体, 经流式细胞仪分析。克隆细胞加 BFA10 μ g/ml 于 37℃ 5% CO₂ 培养 5h, 细胞经固定、破膜, 分别加入 FITC 标记的抗 IFN- γ /IL-4 室温避光放置 30min, 洗去游离抗体, 经流式细胞仪分析。

3. CD8⁺T 克隆细胞与肝癌细胞系 HepG2. 2. 15 细胞共培养及观察程序: 肝癌细胞系 HepG2. 2. 15 细胞株引自东南大学生物电子学国家重点实验室, 本室传代。HepG2. 2. 15 细胞 (靶细胞) 在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基 (含 G418 380 μ g/ml) 37℃ 5% CO₂ 条件培养, 定期传代。加 0. 25% 的胰酶消化, 加培养液吹打, 分散细胞后计数, 配制成 2×10^8 /L, 接种于 24 孔板, 1 毫升/孔, 37℃ 5% CO₂ 培养。呈对数生长期

时, 加入 CD8⁺T 克隆细胞 (效应细胞) 共同培养, 效: 靶比例 1: 50。对照孔不加 CD8⁺T 克隆细胞, 补同量培养基。分别于培养 24h、48h、72h 收集培养上清, -70℃ 冰箱中保存备检。

4. 培养上清液中 HBV 标志物测定: ELISA 法测 HBsAg 和 HBeAg, PCR-荧光定量法检测 HBV-DNA, 按试剂盒说明书进行。HBsAg (或 HBeAg) 抑制率 (%) = (对照孔 A 值 - 试验孔 A 值) / 对照孔 A 值 $\times$ 100%。HBV-DNA 抑制率 (%) = (对照孔拷贝数 - 试验孔拷贝数) / 对照孔拷贝数 $\times$ 100%。

5. 培养上清 IFN- γ 检测: ELISA 法检测, 按试剂盒说明书进行, 每次做 3 个复孔, 结果取平均值。

6. IFN- γ 的中和试验: CD8⁺T 克隆与 HepG2. 2. 15 细胞共培养时加入 4 μ g 的抗人 IFN- γ 单克隆抗体, 以中和培养上清中的 IFN- γ 。并分别于 24h 和 48h 检测培养上清中的 HBV DNA 拷贝数, 计算抑制率。

7. 细胞毒检测: 采用乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 释放试验, 按说明书操作。计算公式: 细胞毒活性 (%) = (实验孔 A 值 - 效应细胞自发释放孔 A 值 - 靶细胞自发释放孔 A 值) / (靶细胞最大释放孔 A 值 - 靶细胞自发释放孔 A 值) $\times$ 100%。

结 果

1. HLA-A 基因分型及 HLA-A 限制性表位肽的选择: 该例急性乙肝患者的 HLA-A 基因型经鉴定为 0201, 据此合成 HLA-A * 0201 限制的 CTL 优势表位肽 HBc18-27^[9], 用作 HBV 特异性 CD8⁺T 克隆建立中的抗原刺激物。

2. HBc18-27 表位特异性 CD8⁺T 克隆的建立和鉴定结果: 采用表位肽刺激及有限稀释法共获得 16 个细胞克隆株。经细胞表面标记鉴定, 16 株均为 CD8⁺T 克隆 (CD3⁺CD4⁻CD8⁺)。选择其中 2 株用于进一步实验。这 2 株 CD8⁺T 克隆 (细胞株代号分别为 A7, D6) 经细胞内细胞因子分析, 均为 Tc1 亚型, 即主要表达 IFN- γ 而不表达 IL-4。细胞内 IFN- γ 表达强度 A7 株为 53.4, D6 株为 31.2。采用经 EB 病毒诱导建立的自体 B 淋巴细胞系吸附 HBc18-27 肽作为靶细胞, 在效: 靶比例 5: 1 时, A7 株的细胞毒活性为 74.9%, D6 株的细胞毒活性为 79.3% (未发表资料), 表明 A7 株和 D6 株均为表位特异性 CD8⁺T 克隆。

3. CD8⁺T 克隆细胞与 HepG2. 2. 15 细胞共培养的观察: (1) IFN- γ 含量: CD8⁺T 克隆细胞单独培养以及与 HepG2. 2. 15 细胞共培养上清中 IFN- γ 含量见表 1。结果显示效靶细胞共培养时, IFN- γ 明显增高。在 3 个培养时间段, 以 24h 为最高。A7 株单独培养以及与靶细胞共培养时, 上清中的 IFN- γ 分泌量均高于 D6 株。(2) 对 HBV 的抑制: 通过检测

CD8⁺T 克隆细胞与 HepG2.2.15 细胞共同培养上清中 HBsAg、HBeAg 和 HBV-DNA, 观察表位特异性 CD8⁺T 克隆对 HBV 的抑制。结果见表 2。(3) 共培养中对 HepG2.2.15 的细胞毒作用: 于 CD8⁺T 克隆与 HepG2.2.15 共同培养 24h、48h 和 72h, 分别取上清, 用 LDH 释放试验测得 A7 株细胞毒百分率分别为 13.54%、9.32% 和 7.24%, D6 株为 15.66%、11.35% 和 7.11%。结果显示 24h 细胞毒百分率较高, 随后逐渐下降, 但都未达到 20%。(4) 共培养中抗 IFN- γ 抗体中和对 HBV DNA 的影响: A7 株与 HepG2.2.15

细胞共同培养时加入抗人 IFN- γ 单克隆抗体, 培养 24h 上清中的 HBV DNA 抑制率为 6.22%, 48h 为 17.48%。结果表明用抗人 IFN- γ 单抗中和 CD8⁺T 克隆产生的 IFN- γ , 能明显减少对 HepG2.2.15 细胞产生的 HBV DNA 的抑制。

表 1 CD8⁺T 克隆细胞单独培养及与 HepG2.2.15 细胞共培养上清中 IFN- γ 含量 (pg/ml)

细胞株	单独培养	共培养 24h	共培养 48h	共培养 72h
A7 株	11.2	151.5	101.3	75.6
D6 株	6.4	99.3	91.5	45.3

表 2 CD8⁺T 克隆与 HepG2.2.15 细胞共同培养对 HBV 的抑制作用 (%)

细胞株	HBsAg 抑制率			HBeAg 抑制率			HBV-DNA 抑制率		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h
A7 株	12.11	48.36	54.55	15.47	28.59	50.36	17.25	67.36	74.55
D6 株	9.36	27.29	31.36	13.23	17.33	22.35	16.27	40.46	51.17

讨 论

1987 年 Sells 等^[10]将带有 HBV DNA 的质粒转染肝癌细胞系 HepG2 细胞, 并从中筛选出能支持病毒复制并稳定地产生和分泌 HBsAg、HBeAg 及感染性病毒颗粒的克隆。该克隆随后被命名为 HepG2.2.15。该细胞系常用于体外抗 HBV 药物的筛选。在本研究中, 我们将 HepG2.2.15 细胞作为 HBV-靶细胞, 观察 HBV 表位特异性的 CD8⁺T 克隆对 HBV 的抑制作用和对靶细胞的细胞毒效应以及相互关系。HepG2.2.15 细胞是 HLA-A2 阳性的, 因此我们选择了 HLA-A 匹配的 (HLA-A*0201) 急性乙肝患者, 通过 HLA-A2 限制的 CTL 优势表位肽 HBe18-27 刺激患者的 PBMC, 并利用有限稀释法建立了 HBV 表位特异性 CD8⁺T 克隆, 从中选取 2 个克隆株用于本研究^[9]。

较早就有体内实验研究发现, 给 HBV 转基因小鼠静脉输入 HBV 表位特异性 CTL, 可以显著抑制小鼠肝细胞的 HBV 基因表达, 并且是非溶细胞机制介导的, 这种非溶细胞抑制作用由细胞因子 TNF- α 和 IFN- γ 介导^[5]。Suri 等^[11]在体外实验研究发现用 rHBeAg 刺激 CD4⁺T 细胞产生的 IFN- γ 也能抑制 HBV 转录和复制, 而无细胞溶解。在本研究中, 我们应用体外实验, 将 2 株 CD8⁺T 克隆 (A7 株和 D6 株) 分别与 HepG2.2.15 细胞共育, 观察溶细胞和非溶细胞机制抑制 HBV 的作用。在预实验中, 高效靶比例产生显著的溶细胞毒性, 因此在本实验中选用了 1:50 的效靶比例, 使细胞毒百分率控制在 20% 以下。在

此比例的细胞共育培养上清液中, 我们检测到高水平的 IFN- γ , 但未检测到 TNF- α 。A7 株和 D6 株的细胞内 IFN- γ 表达强度不同, 在随后与 HepG2.2.15 共育激活后的 IFN- γ 分泌水平也不同, 对 HepG2.2.15 细胞的 HBV 抑制率也不同, 但 2 株 CD8⁺T 克隆的细胞毒活性相似。此结果证实了 IFN- γ 的非溶细胞抑制 HBV 作用。应用抗人 IFN- γ 单抗中和 A7 株 CD8⁺T 克隆的 IFN- γ , 使 HBV 抑制作用受到阻抑分别达到 64% (24h) 和 74% (48h), 但不影响 CD8⁺T 克隆对 HepG2.2.15 细胞的细胞毒性, 提示本实验中 CD8⁺T 克隆的 HBV 抑制作用与细胞毒活性既具有关联性又具有一定的相互独立性。

近年来 HBV 感染中非溶细胞清除病毒机制日益受到重视。本实验结果支持由细胞因子 IFN- γ 介导的非溶细胞作用控制 HBV。在应用抗人 IFN- γ 单抗封闭 IFN- γ 后, 仍保留了部分 HBV DNA 抑制, 推测是 CD8⁺T 克隆的溶细胞作用以及其他可能未检出的细胞因子在发挥抗病毒作用, 比如 TNF- α 、IL-4、IL-6 等^[12,13]。

我们也试用 HLA-A*1101 的 HBV 感染者的病毒特异性 CD8⁺T 细胞克隆 (用 HLA-A11 限制的 CTL 优势表位肽 HBe88-96 刺激产生) 与 HepG2.2.15 细胞共育, 虽然细胞毒反应极低, 但培养上清中 IFN- γ 水平以及对 HBV DNA 的抑制率也很低, 这可能与该 CD8⁺T 克隆和 HepG2.2.15 细胞的 HLA-A 错配有关 (未发表资料)。

参考文献

- 1 贺永文,朱传武.慢性乙型肝炎患者肝组织穿孔素表达的临床意义.世界华人消化杂志,2006,14(22):2207-2210
- 2 李明,朱传武,钱峰,等.慢性乙型肝炎患者外周血单个核细胞穿孔素表达与干扰素抗病毒疗效的关系.中华肝脏病杂志,2006,14(10):729-731
- 3 Nair S,Perrillo RP. Serum alanine aminotransferase flares during interferon treatment of chronic hepatitis B: is sustained clearance of HBV DNA dependent on levels of pretreatment viremia? Hepatology,2001,34:1021-1026
- 4 Ganem D,Prince AM. Hepatitis B Virus Infection - Natural History and Clinical Consequences. N Engl J Med, 2004, 350(11):2719-2720
- 5 Guidotti LG,Ando K,Hobbs MV, et al. Cytotoxic T lymphocytes inhibit hepatitis B virus gene expression by a noncytolytic mechanism in transgenic mice. Proc Natl Acad Sci, 1994,91(9):3764-3768
- 6 Thimme R, Wieland S, Steiger C, et al. CD8⁺ T cells mediate viral clearance and disease pathogenesis during acute hepatitis B virus infection. J Virol,2003,77(1):68-76
- 7 Guidotti LG, Rochford R, Chung J, et al. Viral clearance without destruction of infected cells during acute HBV infection. Science,1999,284(5415):825-829
- 8 郑纪山,何长伦,王寿明,等.急性乙型肝炎 HBcAg 特异性 CTL 克隆建立及初步分析.传染病信息,2009,22(8):200-202,206
- 9 Bertoni R, Sidney J, Fowler P, et al. Human histocompatibility leukocyte antigen-binding supermotifs predict broadly cross-reactive cytotoxic T lymphocyte responses in patients with acute hepatitis. J Clin Invest, 1997, 100(3):503-513
- 10 Sells MA,Chen ML,Acs G. Production of hepatitis B virus particles in Hep G2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA. Proc Natl Acad Sci, 1987, 84(4):1005-1009
- 11 Suri D, Schilling R, Lopes AR, et al. Non-cytolytic inhibition of hepatitis B virus replication in human hepatocytes. J Hepatol,2001,35(6):790-797
- 12 Lin SJ, Shu PY, Chang C, et al. IL-4 Suppresses the Expression and the Replication of Hepatitis B Virus in the Hepatocellular Carcinoma Cell Line Hep3B. J Immunol, 2003, 171(9):4708-4716
- 13 Kuo TM, Hu CP, Chen YL, et al. HBV replication is significantly reduced by IL-6. Biomed Sci,2009,16(1):41-49

(收稿:2010-01-11)

(修回:2010-03-12)

人参皂甙 Rb1 改善奥氮平致糖脂紊乱的实验研究

郑 慧 宋学勤 蔡东联 吕路线 冯晓慧 林 宁 金 迪

摘 要 **目的** 观察人参皂甙 Rb1 预防奥氮平所致大鼠糖脂代谢障碍的效果。**方法** 50 只雌性 SD 大鼠随机分为正常对照(NC)、奥氮平对照(OC)、奥+低剂量 Rb1 (OR-L)、奥+中剂量 Rb1 (OR-M)、奥+高剂量 Rb1 (OR-H)。NC 组给予生理盐水,OC 组给予奥氮平[2mg/(kg·d)],OR-L、OR-M、OR-H 组在给予奥氮平[2mg/(kg·d)]基础上,分别以 2mg/(kg·d)、5mg/(kg·d)、10mg/(kg·d)剂量给予人参皂甙 Rb1,21 天后测定空腹血糖、胰岛素、血脂水平,计算胰岛素敏感指数。**结果** OC 组腹内脂肪、空腹血糖、胰岛素、三酰甘油水平显著高于 NC 组,胰岛素敏感指数显著低于 NC 组,OR-H 组空腹血糖、胰岛素、三酰甘油水平显著低于 OC 组,胰岛素敏感指数显著高于 OC 组,OR 各组间无显著差异。**结论** 人参皂甙可预防大鼠奥氮平所致糖脂代谢紊乱。

关键词 人参皂甙 奥氮平 血糖 血脂 大鼠

Effect of Ginsenosides Rb1 on the Prevention of Olanzapine-induced Adverse Metabolic Effects in Rats. Zheng Hui, Song Xueqin, Cai Donglian, Lü Luxian, Feng Xiaohui, Lin Ning, Jin Di. Department of Clinical Nutrition, Chang Hai Hospital, The Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

Abstract Objective To investigate the effect of ginsenosides Rb1 on preventing olanzapine-induced metabolism disorder in rats. **Methods** Fifty female SD rats were randomly divided into 5 groups: olanzapine 2.0mg/kg, olanzapine 2.0mg/kg plus Ginsenosides Rb1 2.5mg/kg, olanzapine 2.0mg/kg plus Rb1 5.0mg/kg, olanzapine 2.0mg/kg plus Rb1 10mg/kg and control group. All drugs were administered via the intraperitoneal route (ip). Body weight, abdominal fat, blood glucose, lipids levels and insulin sensitivity index were

基金项目:国家自然科学基金项目(30971058),上海市科委技攻关项目基金(04DZ19506)

作者单位:200433 上海,第二军医大学附属长海医院营养科(郑慧、蔡东联、冯晓慧、林宁、金迪);450052 郑州大学第一附属医院精神医学科(宋学勤);453002 新乡医学院第二附属医院(吕路线)

通讯作者:蔡东联,电子信箱:nutritien1226@sohu.com