



慢性乙型肝炎患者HBcAg特异性Th细胞克隆的建立及初步分析

近年来, Th细胞的效应功能在免疫反应中的作用令人关注[1][2][3]。为进一步阐明Th细胞在慢性HBV感染中的作用, 我们采用有限稀释法, 建立了慢性乙型肝炎(CHB)患者外周血及肝组织HBcAg特异性Th细胞克隆, 并对所获得细胞克隆进行分析。

1 病人与方法

1.1 病人

两位本科住院的患者, 男、女性各1例, 年龄分别为37、23岁。组织学诊断分别为CHB(G2S2)和CHB(G3S2), 其血清标志物检测: HBsAg与抗HBc阳性、抗HDV阴性与抗HCV阴性。其中1例HBeAg阳性, 另1例HBeAb阳性。

1.2 自肝组织及PBMCs中分离T细胞克隆

肝活检组织长约2.5 cm, 浸泡于50倍正常浓度的含双抗的1640培养液中, 常温1 h。以I型胶原酶(Sigma)1 g/L及双脱氧核酸酶(Sigma)2.5×10⁴g/L 37 °C消化1 h。之后以滴管轻轻吹打, 使其释放出浸润的淋巴单核细胞, 以无血清1640培养液洗涤, 常规Ficoll-hypaque液分离出单核淋巴细胞。采用有限稀释法, 将其重悬于RPMI-1640完全培养基中(含10%小牛血清、2 μmol/L谷氨酰胺、2 μmol/L丙酮酸钠、25 mmol/L HEPES、100 U/L青霉素G、100 μg/L链霉素), 以0.3个细胞/孔接种96孔培养板, 并加入0.5 μg/ml植物血凝素(PHA), 50 U/ml人重组rIL-2及丝裂霉素-C处理的自身性PBMCs(1×10⁵/孔), 每10 d刺激一次。约20 d左右, 筛选出对PHA即非特异性的Th细胞克隆。之后筛选其抗原特异性及表型。对HBcAg有特异性增殖反应的细胞进一步克隆化培养。

新鲜肝素抗凝全血6 ml, 常规分离PBMCs, 同上法采用有限稀释法, 筛选出对PHA即非特异性的Th细胞克隆, 进而筛选出HBcAg特异性的Th细胞克隆。

1.3 特异性淋巴细胞增殖试验

在96孔平底培养板中加入克隆细胞5×10⁴/孔, 并同时加入丝裂霉素-C处理的自身性PBMCs(1×10⁵/孔)及1 μg/ml rHBcAg(RDI, NJ), 37 °C, 5%CO₂培养72 h, 收获前18 h加入3H-TdR, 收获测CPM值。实验管与对照管脉冲数之比为刺激指数(SI)。SI>2.5为阳性。

1.4 HBcAg特异性T细胞克隆的表型鉴定

1×10⁶ T细胞以PBS洗涤后, 经鼠抗人CD3(FITC)/CD4(PE)单克隆抗体室温孵育30 min, 以PBS洗涤未结合的抗体, 经流式细胞仪(Coulter FACScan)分析5×10³个细胞。并参照文献[2]分析细胞内产生的细胞因子, T细胞克隆以T细胞刺激剂佛波二酯PMA(Sigma)1 ng/ml、钙离子导入剂伊屋诺霉素(ionomycin)1 μmol/L(Sigma)、1 μmol/L莫能星(monensin, Sigma)刺激细胞37 °C 4 h; 离心, 弃上清; 以含0.5% (m/V)牛血清白蛋白(BSA)的PBS洗涤1次, 离心, 去上清; 以固定液处理细胞样品, 10 min, 渗透液处理细胞样品, 10 min, 避光冰浴; 加入IFN-γmAb(PE)、IL-4 mAb(FITC)及TGF-βmAb(PE)[Pharmingen

Reagent, USA] 4 °C 避光, 45 min, 以含0.5% (m/v) BSA PBS洗涤1次, 离心, 去上清, 加500 μl PBS混匀细胞, 作流式细胞检测, 所有克隆均同步设一未加刺激剂的细胞样品作为对照。

2 结果

2.1 HBcAg特异性T细胞克隆的表型分析

对来源于肝组织的40株T细胞克隆进行表型分析, 其中37株为CD4⁺表型, 3株为CD8⁺表型。对2例患者外周血及肝组织CD4⁺表型的T细胞克隆细胞内产生的细胞因子进行分析, 结果如图1所示, 来源于肝组织的T细胞克隆主要以Th1 (55.6%, 63.2%) 为主, 而来源于外周血的T细胞克隆主要以Th0 (50%, 58.8%) 为主, 并与HBcAg是否阳性无关。在肝组织及外周血占主导地位的Th细胞极化群的不同, 较高比例的Th1细胞在肝组织炎症局部的聚集, 提示Th1细胞可能参与HBV对肝细胞的免疫损伤过程。

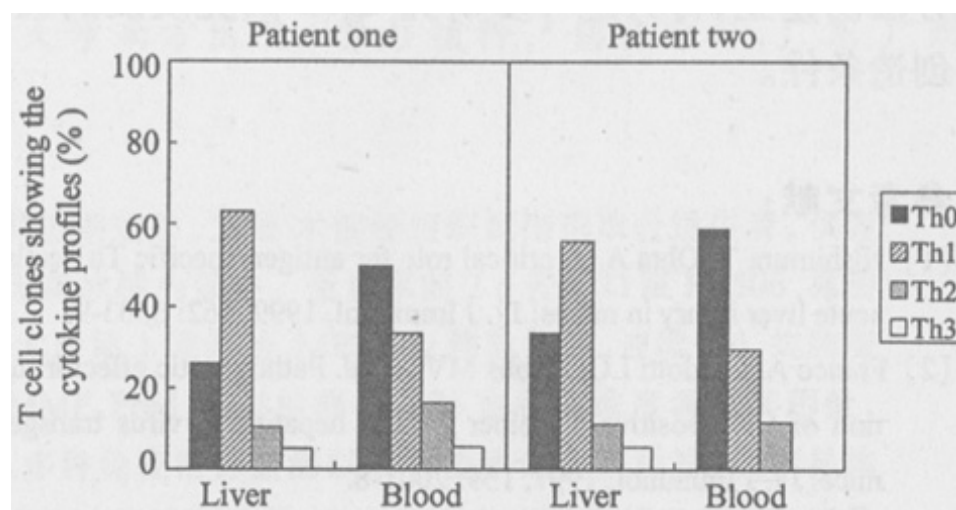


图1 慢性乙型肝炎患者外周血及肝组织T细胞克隆的细胞因子谱比较

Fig.1 Comparison of cytokines profiles expressed by T cell clones derived from liver and peripheral blood of 2 patients with chronic hepatitis B

The series of T cell clones includes 19 and 18 clones derived from liver biopsy specimen and 18 and 17 T cell clones derived from the corresponding peripheral blood samples. T cell clones able to produce IFN- γ , but not IL-4, are defined as Th1; T cell clones able to produce IL-4 and/or IL-5, but not IFN- γ , are defined as Th2; T cell clones able to produce IFN- γ plus IL-4 areas Th0, and T cell clones able to produce TGF- β are Th3

2.2 特异性淋巴细胞增殖试验

克隆化培养后, 对来源于外周血、肝组织的T细胞克隆各随机取10株克隆(共40株), 分别进行HBsAg、HBcAg特异性T细胞克隆淋巴细胞增殖试验。结果表明, 仅6株克隆呈现明显的HBcAg特异性淋巴细胞增殖反应, 所有克隆对HBsAg均未见特异性淋巴细胞增殖反应。

3 讨论

过去一直认为在CHB持续性肝损伤过程中, 被激活的CD4-CD8⁺亚群及介导的细胞毒活性十分重要[4][5][6]。但Lohr等[7]的研究证实, 在CHB患者肝组织中针对HBcAg和HBsAg特异性的细胞毒性T淋巴细胞(CTL)并不常见, 因此假设在炎症部位CTL的激活需要细胞因子的介导。目前认为Th细胞除了其免疫调节功能外, 尚具有效应功能。Nishimura等[1]将卵清蛋白(OVA)脂质体直接注入小鼠的肝脏, 过继转移OVA特异性的Th1细

胞，建立了急性肝损伤的小鼠模型，发现血清转氨酶的升高与血清IFN- γ 的升高相平行；而过继转移OVA特异性的Th2细胞，可发现血清IL-4水平升高，但并未导致肝脏损伤，结果证实Th1细胞是急性肝损伤中最主要的效应细胞。Marinos等[8]也证实CHB针对HBcAg的Th细胞应答的诱导，是宿主针对HBV免疫反应的主要因素。我们对用r HBcAg刺激CHB患者肝组织浸润的淋巴细胞在获得的40株HBcAg特异性T细胞克隆作的表型分析结果表明，CD4⁺CD8⁻表型占92.5%，CD4⁻CD8⁺表型占7.5%。提示HBcAg是CHB中激活Th细胞，引起局部免疫反应的重要抗原之一。对两名患者外周血及肝组织获得的Th细胞克隆进行HBcAg特异性淋巴细胞增殖试验，大多数Th细胞克隆并未发现有明显的特异性增殖反应，仅15%的Th细胞克隆呈现明显的HBcAg特异性增殖反应。这一结果与CHB患者细胞免疫水平的低下相吻合。T细胞克隆方法的建立，将为进一步研究CHB的免疫发病机制创造条件。

参考文献：

- [1] Nishimura T, Ohta A. A critical role for antigen-specific Th1 cells in acute liver injury in mice[J]. *J Immunol*, 1999, 162: 6503-9.
- [2] Franco A, Guidotti LG, Hobbs MV, et al. Pathogenetic effector function of CD4-positive T helper 1 cells hepatitis B virus transgenic mice[J]. *J Immunol*, 1997, 159: 2001-8.
- [3] Katz JD, Benoist C, Mathis D, et al. T helper cell subsets in insulin-dependent diabetes[J]. *Science*, 1995, 268: 1185-7.
- [4] Penna A, Del Prete G, Cavalli A, et al. Predominant T helper 1 cytokine profile of hepatitis B virus nucleocapsid-specific T cells in acute self-limited hepatitis B[J]. *Hepatology*, 1997, 25: 1022-8.
- [5] Bertolotti A, Mario MD, Boni C, et al. Different cytokine profiles of intrahepatic T cells in chronic hepatitis B and hepatitis C virus infections[J]. *Gastroenterology*, 1997, 112 (1): 193-8.
- [6] Chisari FV, Ferrari C. Hepatitis B virus immunopathogenesis[J]. *Annu Rev Immunol*, 1995, 13: 29-61.
- [7] Lohr HF, Gerken G, Schlicht HJ, et al. Low frequency of cytotoxic liver-infiltrating T lymphocytes specific for endogenous processed surface and core proteins in chronic hepatitis B[J]. *J Inf Dis*, 1993, 168:1133-7.
- [8] Marinos G, Torre, Chokshi S, et al. Induction of T-helper cell response to hepatitis B core antigen in chronic hepatitis B: a major factor in activation of the host immune response to the hepatitis B virus[J]. *Hepatology*, 1995, 22: 1040-9.

参考文献：

- [1] Nishimura T, Ohta A. A critical role for antigen-specific Th1 cells in acute liver injury in mice[J]. *J Immunol*, 1999, 162: 6503-9.
- [2] Franco A, Guidotti LG, Hobbs MV, et al. Pathogenetic effector function of CD4-positive T helper 1 cells hepatitis B virus transgenic mice[J]. *J Immunol*, 1997, 159: 2001-8.
- [3] Katz JD, Benoist C, Mathis D, et al. T helper cell subsets in insulin-dependent diabetes[J]. *Science*, 1995, 268: 1185-7.
- [4] Penna A, Del Prete G, Cavalli A, et al. Predominant T helper 1 cytokine profile of hepatitis B virus nucleocapsid-specific T cells in acute self-limited hepatitis B[J]. *Hepatology*, 1997, 25: 1022-8.
- [5] Bertolotti A, Mario MD, Boni C, et al. Different cytokine profiles of

intrahepatic T cells in chronic hepatitis B and hepatitis C virus infections[J].
Gastroenterology, 1997, 112 (1): 193-8.

[6] Chisari FV, Ferrari C. Hepatitis B virus immunopathogenesis[J]. Annu Rev Immunol, 1995, 13: 29-61.

[7] Lohr HF, Gerken G, Schlicht HJ, et al. Low frequency of cytotoxic liver-infiltrating T lymphocytes specific for endogenous processed surface and core proteins in chronic hepatitis B[J]. J Inf Dis, 1993, 168:1133-7.

[8] Marinos G, Torre, Chokshi S, et al. Induction of T-helper cell response to hepatitis B core antigen in chronic hepatitis B: a major factor in activation of the host immune response to the hepatitis B virus[J]. Hepatology, 1995, 22: 1040-9.

[回结果列表](#)