

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

姜荣龙¹ 袁筱榕¹ 袁亚兵¹ 袁桥生¹ 袁金林¹ 袁廉¹ 袁路抗先¹ 袁富宁²(第一军医大学¹ 南方医院感染内科¹ 免疫学教研室² 广州 510515)

摘要 目的 了解 Th 细胞极化群体在慢性乙型肝炎患者外周血及肝组织中的分布情况。方法 采用有限稀释法建立 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。结果 发现自肝组织分离的 HBcAg 特异性 T 细胞克隆^{2.5%} 为 CD4⁺ 表型，主要以 Th1 为主；而来源于外周血的 T 细胞克隆主要以 Th0 为主，与 HBeAg 是否阳性无关。结论 15% 的 T 细胞克隆呈现明显的 HBcAg 特异性淋巴细胞增殖反应。在肝组织及外周血占主导地位的 Th 细胞极化群的不同比例的 Th1 细胞在肝组织炎症局部的聚集提示在 HBV 的免疫发病机制中 Th1 细胞可能起重要作用。

关键词 慢性乙型肝炎 Th 细胞克隆 免疫病理

中图分类号 R939.47;R373.2 文献标识码 A 文章编号 1000-2588(2001)09-0676-03

JIANGRong-long¹, FENGXiao-rong¹, GUOYa-bing¹, LUQiao-sheng¹, HOUJin-lin¹, ZHANG Lian¹, LUOKang-xian¹, FUNing²
(¹Department of Infectious Diseases, Nanfang Hospital; ²Department of Immunology, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China)

目的 为了解慢性乙型肝炎患者外周血及肝组织中 Th 细胞极化群体的分布情况，建立慢性乙型肝炎患者 HBcAg 特异性 Th 细胞克隆，分析其表型及增殖特性。方法 采用有限稀释法建立慢性乙型肝炎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。结果 在慢性乙型肝炎患者外周血及肝组织中均能建立 HBcAg 特异性 Th 细胞克隆，其中约 2.5% 为 CD4⁺ 表型，主要以 Th1 为主；而来源于外周血的 T 细胞克隆主要以 Th0 为主，与 HBeAg 是否阳性无关。结论 15% 的 T 细胞克隆呈现明显的 HBcAg 特异性淋巴细胞增殖反应。在肝组织及外周血占主导地位的 Th 细胞极化群的不同比例的 Th1 细胞在肝组织炎症局部的聚集提示在 HBV 的免疫发病机制中 Th1 细胞可能起重要作用。

慢性乙型肝炎；Th 细胞；细胞克隆；免疫发病机制

近年来，Th 细胞的效应功能在免疫反应中的作用令人关注。^{1~4} 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 岁和 33 岁。组织学诊断分别为 CHB 和 CHB，均为 S2 级。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。

1.2 性别 1 例 HBeAb 阳性

1.2.1 自肝组织及 PBMCs 中分离 T 细胞克隆

肝活检组织长约 2.5cm，泡于 50 倍正常浓度的含双抗的 1640 培养液中，常温 1 h。用胰型胶原酶消化 1 g/L 及双脱氧核酸酶消化 0.5 mg/L，37℃ 消化 1 h，之后以滴管轻轻吹打，使其释放出湿润的淋巴单核细胞。用无血清 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 mol/L 谷氨酰胺，5 mmol/L 丙酮酸钠，5 mmol/L HEPES，100 U/L 青霉素 G，0.005 μg/L 链霉素，以 0.3 个细胞/孔接种 96 孔培养板，并加入 0.5 μl 植物血凝素（PHA）0.5 μg/ml，重组 rIL-2 及丝裂霉素 C 处理的自身性 PBMCs，孔每 10 d 刺激一次，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

收稿日期 2000-06-01

基金项目 国家自然科学基金 9630280

作者简介 姜荣龙，男，浙江江山人，1987 年毕业于第一军医大学，博士，主治医师，电话 020-85141944。

殖反应的细胞进一步克隆化培养

新鲜肝素抗凝全血6ml常规分离PBMCs。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伊0⁴/孔，并同时加入丝裂霉素-C处理的自身性PBMCs5伊0⁵/孔，及1滋/ml rHBcAg（DI）5滋%CO₂培养72h。收获前18h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>2.5为阳性。

1.4 HBcAg特异性T细胞克隆的表型鉴定

1伊0⁶ T细胞以PBS洗涤后经鼠抗人CD3单克隆抗体室温孵育30min，以PBS洗涤未结合的抗体。经流式细胞仪 Coulter FACScan分析5伊0³个细胞，并参照文献咱暂分析细胞内产生的细胞因子。细胞克隆以T细胞刺激剂佛波二酯PMA（Sigma）1ng/ml，钙离子导入剂伊屋诺霉素（onomycin）1μmol/L（Sigma），莫能星菌素（monensin，Sigma）刺激细胞37益4h，离心去上清液，含0.5%BSA的PBS洗涤1次，离心去上清液，以固定液处理细胞样品0min，参透液处理细胞样品0min，避光冰浴加入IFN-γ Ab（PE）或L-4 mAb（FITC）及TGF-β mAb（PE）[Pharmingen Reagent, USA]，避光5min，含0.5%BSA的PBS洗涤1次，离心去上清液，500滋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为主，5.6%，63.2%；而来源于外周血的T细胞克隆主要以Th0为主，8.8%。与HBeAg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。

2.2 特异性淋巴细胞增殖试验

克隆化培养后来源于外周血及肝组织的T细胞克隆各随机取10株克隆共40株，分别进行HBsAg和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。

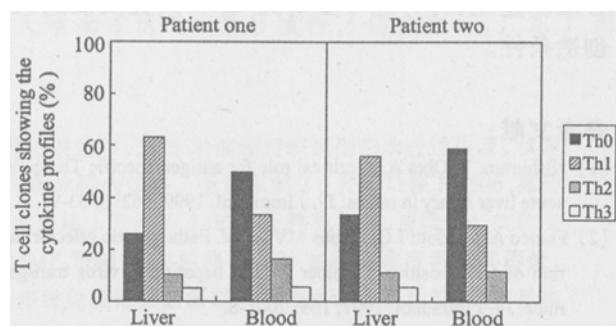


图1 慢性乙型肝炎患者外周血及肝组织T细胞克隆的细胞因子谱比较

TheseriesofTcellclonesincludes19and18clonesderivedfromliverbiopsy 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 are as Th0, and T cell clones able to produce TGF-β are Th3.

3 讨论

过去一直认为在CHB持续性肝损伤过程中激活的CD4⁺CD8⁺亚群及介导的细胞毒活性十分重要。但Lohr等的研究证实，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等将卵清蛋白（OVA）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rHBcAg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，D4⁺CD8⁺表型占92.5%，D4⁺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T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，仅有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。将 T 细胞克隆方法的建立，为进一步研究 CHB 的免疫发病机制创造条件。

参考文献院

- 1 Nishimura T, Ohta A. A critical role for antigen-specific Th1 cells in acute liver injury in mice. *J Immunol*, 1999, 162: 6503-9.
- 2 Franco A, Guidotti LG, Hobbs MV, et al. Cytokine profiles of intrahepatic T cells in chronic hepatitis B and hepatitis C virus infections. *J Gastroenterology*, 1997, 112(1): 193-8.
- 3 Chisari FV, Ferrari C. Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Annu Rev Immunol*, 1995, 13: 29-61.
- 4 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 Inf Dis*, 1993, 168: 1133-7.
- 5 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. *Hepatology*, 1995, 22: 1040-9.

6 Tokine profile of hepatitis B virus nucleocapsid-specific T cells in acute self-limited hepatitis B. *Hepatology*, 1997, 25: 1022-8.

7 Bertoletti 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.

8 Chisari FV, Ferrari C. Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Annu Rev Immunol*, 1995, 13: 29-61.

9 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 Inf Dis*, 1993, 168: 1133-7.

10 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. *Hepatology*, 1995, 22: 1040-9.

成功抢救海洛因中毒性脑病 1 例

陈业民¹、陈爱华²、李公信²、傅向阳²、渊西藏军区 56108 部队³、拉萨 850000、第一军医大学珠江医院心内科¹、广东广州 510515

关键词：海洛因中毒性脑病、球麻痹、纳洛酮

中图分类号：R749.61 文献标识码：B 文章编号：1000-2588(2001)09-0678-01

1 临床资料

患者男，8岁。因吸食海洛因 0 余年，语言欠清晰 15 d，加重伴昏迷 7 d 入院。近 2 年来时感乏力等不适，未予特殊处理。7 d 前出现持续昏迷，当地医院治疗效果不佳转入我院。入院查体：体温 36.8℃，脉搏 85 次/min，呼吸 18 次/min，血压 16.7/10.7 kPa，意识不清，右侧瞳孔等大等圆约 1.0 mm，光反射迟钝，四肢少动，右侧肢体肌力 0 级，腱反射消失，病理征（+）。头颅 MRI 示双侧枕叶有囊肿后肢小脑半球及脑干多发低密度灶，双侧对称，髓质改变为主。脑电图检查示广泛中度异常脑电图。其它检查未见异常。结合患者病史特点，临床表现及相关检查，临床诊断：海洛因中毒性脑病。深昏迷，右侧肢体偏瘫。入院后即给予大剂量纳洛酮 0.1 mg/kg，2 次/d，大剂量激素（地塞米松、氢化可的松）静脉滴注，保护脑细胞，改善脑循环，脱水等治疗。之后给予康复高压氧治疗，感染治疗，营养支持治疗。患者于入院后第 10 天渐苏醒，能配合医护人员做点头、摇头等动作。但仍仍有饮水呛咳，流涎，球麻痹等症状。2 d 后左上肢能自主活动。之后在家属帮助下能下床活动。语言功能逐渐恢复，但吐词欠清，咳嗽无力。6 d 后患者球麻痹症状好转，进食饮水无呛咳，流涎，球麻痹等症状消失。

水无呛咳，意识完全恢复，能书写姓名，回忆往事，表情丰富。住院 6.5 d 治愈出院。

2 讨论

海洛因中毒致急性水肿昏迷等在临幊上多有报道。因海洛因中毒性脑病致昏迷 15 d，球麻痹 60 d，肢体瘫痪并抢救成功则较少见。海洛因为二乙酰吗啡，效力约为吗啡的 2 倍。进入人体后与阿片受体结合而产生毒性作用。过量吗啡致脑细胞线粒体变性，不致死。水肿中枢神经受到抑制，严重者可引起脑组织损伤，昏迷呼吸循环系统功能衰竭。抢救此类病人有以下几点经验：①海洛因中毒性脑病病人，大剂量纳洛酮治疗是关键。纳洛酮是内源性阿片受体拮抗剂，通过阻断内源性阿片样物质迅速逆转海洛因中毒所引起的生理功能失调。②激素应用对此类病人尤为重要。纳洛酮可稳定细胞溶酶体，降低细胞膜的通透性，减轻脑细胞水肿。③提高中枢神经系统兴奋性，促进脑细胞功能恢复。但由于病人球麻痹症状明显，进食饮水易呛咳，咳嗽无力，之长时间卧床，易出现肺部感染。所以激素的应用应非常谨慎。在有效抗感染及良好护理的基础上，我们采用了激素冲击疗法。激素使用 15 d 后，病人恢复明显，加速脱水，营养，保护脑细胞治疗是救治此类病人的主要手段。高压氧治疗对海洛因中毒性脑病的恢复也非常重要。改善全身供氧，尤其是脑供氧，有利于脑组织康复。减少后遗症。高压氧治疗有助于病人肢体功能的早日恢复。

收稿日期：2000-12-20

作者简介：陈业民，男，湖南邵阳人，1997 年毕业于第三军医大学，本科，住院医师，电话：3059143327。