

大剂量 HBsAg 对 HBV 转基因小鼠 T 细胞免疫调节的研究 *

刘 博 苏文静 马 力 潘 蕾 连建奇 黄长形 白雪帆[△]

(第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心 陕西 西安 710038)

摘要 目的:研究大剂量 HBsAg 对 HBV 转基因小鼠其 T 细胞免疫效果的影响。方法:用大剂量血源性 HBsAg 免疫 HBV 转基因小鼠,采用 ELISA 方法观察转基因小鼠所诱生的 HBsAg 特异性 Th1 类细胞因子的水平,ELISPOT 方法检测不同免疫方案对小鼠 HBsAg 特异性分泌 IFN- γ T 细胞数量的影响,同时检测对小鼠淋巴细胞增殖的影响。结果:HBsAg 组免疫后脾细胞产生的 Th1 类细胞因子(IFN- γ 、IL-2)、HBsAg 特异性分泌 IFN- γ T 细胞及 T 细胞增殖水平较对照组显著增加($P<0.05$)。结论:大剂量的 HBsAg 可以诱导乙肝转基因小鼠产生高水平 Th1 类细胞因子并打破免疫耐受。

关键词 肝炎病毒;乙型 HBsAg 转基因小鼠;免疫耐受

中图分类号:Q95-3 R512.62 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2011)05-812-03

Study on T Cellular Immune Response to Large-dose HBsAg in Transgenic Mice*

LIU Bo, SU Wen-jing, MA Li, PAN Lei, LIAN Jian-qi, HUANG Chang-xing, BAI Xue-fan[△]

(Infectious Diseases, Tangdu hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shanxi, 710038, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of HBsAg on T cellular immune responses in HBV transgenic mice. **Methods:** HBV transgenic mice were immunized by HBsAg and Sodium Chloride. The Th1 cytokines (IFN- γ , IL-2) were detected by ELISA and the number of IFN-secreting T cells was examined by ELISPOT. The proliferation of spleen cells was measured by MTT. **Results:** Compared with control group, the IL-2, IFN- γ and HBs-specific IFN-secreting T cell of HBsAg group increased, and strong lymphocyte proliferation reaction was induced ($p<0.05$). **Conclusion:** HBsAg could increase Th1 cytokines in transgenic mice and break the immune tolerance to antigen in HBV transgenic mice.

Key words: Hepatitis B virus; HBsAg; Transgenic mice; Immune tolerance

Chinese Library Classification: Q95-3 R512.62 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)05-812-03

前言

我国是 HBV 感染的高发地区,目前 HBV 是我国最为突出的卫生问题之一。HBV 感染的慢性化与机体的免疫异常有很大关系,虽然有一些可供选择的抗病毒药物,但其效果却不尽人意。因此探寻有效地免疫调节手段来提高抗 HBV 特异性免疫应答,从而打破免疫耐受对患者清除病毒至关重要。近年来国内外先后有报道应用大剂量 HBsAg 作为免疫调节剂联合抗病毒药物治疗慢性乙型肝炎,并取得了一定的临床效果。因此我们利用 HBV 转基因小鼠模型,研究大剂量 HBsAg 对其 T 细胞免疫的影响,为 HBsAg 疫苗作为辅助治疗的措施提供依据。

1 材料方法

1.1 实验动物、试剂和仪器

HBV 转基因小鼠由解放军第 458 医院全军传染病中心提供,通过原核显微注射 1.3copy HBV 全基因制备。血源抗原

HBsAg 购自上海叶民生物有限公司,溶解状态,不含铝佐剂,终浓度 1mg/ml。IL-2、IFN- γ ELISA 试剂盒购自 RD 公司。ELISPOT 试剂盒购自澳大利亚 Mabtech 公司。酶标仪。ELISPOT 读板仪购自德国 AID 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 动物分组及免疫接种 10 只 8 周龄雌性 HBsAg 阳性 HBV 转基因小鼠,随机分为 2 组:HBsAg 组及生理盐水对照组,其中 HBsAg 组每只小鼠腹腔注射 HBsAg 200 μ l (含 HBsAg 10 μ g),生理盐水对照组腹腔注射 200 μ l 生理盐水。各组每两周免疫 1 次,共免疫 4 次。末次免疫后 2 周处死动物取脾。

1.2.2 细胞因子诱生实验 最后一次免疫后 2 周,将小鼠颈椎脱臼处死,取脾,按常规制备浓度为 5×10^6 /ml 的细胞悬液,分别加入 24 孔培养板(1 ml/孔),加 HBsAg 刺激(10 μ g/ml),37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 培养 48 h 后,收集培养上清置于 -20 $^{\circ}$ C 保存,参照 ELISA 试剂盒说明书统一检测 IL-2、IFN- γ 的含量。

1.2.3 小鼠 HBsAg 特异性分泌 IFN- γ T 细胞数量的检测 ELISPOT 检测操作按试剂盒说明书进行。

* 基金项目:国家科技重大专项资助项目(2008ZX10204)

作者简介:刘博(1984-)男,硕士研究生,Tel: 13659262181; E-mail: liubofmmu@hotmail.com

通讯作者:白雪帆, E-mail: xfbai@fmmu.edu.cn

(收稿日期 2010-12-06 接受日期 2010-12-30)

1.2.4 MTT 法测定淋巴细胞增殖功能 最后一次免疫后 2 周小鼠无菌取脾,制成细胞悬液,用含 10%小牛血清的 RPMI1640 培养基调细胞浓度到 10⁶/ml。每孔 100μl 加入 96 孔培养板,实验孔加 HBsAg 蛋白 5μg,对照孔加入含 10%小牛血清 RPMI1640 培养基,各孔总体积为 200μl。37℃,5%CO₂ 培养 72 h。每孔加入 MTT,5 mg/mL,10μL/孔,继续培养 4 h。2000rpm 离心 5~10min,小心吸取上清。每孔加二甲基亚砜 200μL 溶解 MTT。酶标仪 570nm 处测 A 值。计算刺激指数 SI= 实验孔 A

值 / 对照孔 A 值。
1.2.5 统计学处理 数据均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 17.0 软件分析数据。以 p<0.05 评价显著性。

2 结果

2.1 培养脾细胞中细胞因子的 ELISA 检测结果
HBsAg 组所诱生的 Th1 类细胞因子(IL-2、IFN-γ)的水平与生理盐水对照组相比明显增高,且差异有显著性(表 1)。

表 1 ELISA 方法检测细胞因子
Table 1 Th1 cytokines (IFN-γ, IL-2) were detected by ELISA

	IL-2(pg/mL)	IFN-γ (pg/mL)
HBsAg	306.7± 94.8	569.0± 132.1
0.9%Nacl	124.5± 55.7	99.2± 50.2

2.2 小鼠 HBsAg 特异性分泌 IFN-γT 细胞数量
大剂量 HBsAg 免疫组小鼠脾细胞 HBsAg 特异性分泌 IFN-γT 细胞数量较生理盐水组增加近 1 倍,有显著性差异(图 1)。
2.3 淋巴细胞特异性增殖试验

HBsAg 蛋白刺激小鼠淋巴细胞特异性增殖试验中,结果显示 HBsAg 组刺激指数(SI)明显高于生理盐水对照组,差异有统计学意义(P<0.05) 这与细胞因子检测的结果一致(图 2)。

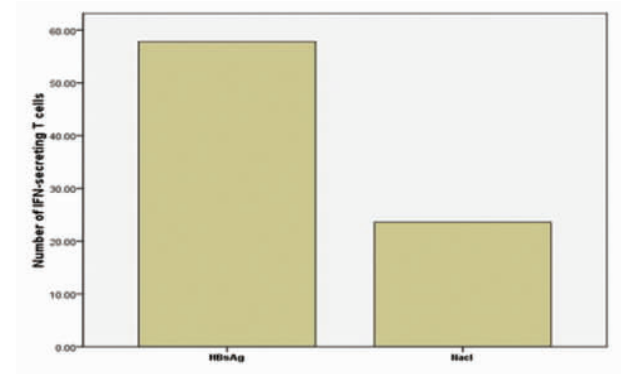


图 1 小鼠 IFN-γ 分泌 T 细胞数量
Fig. 1 the number of IFN-secreting T cells

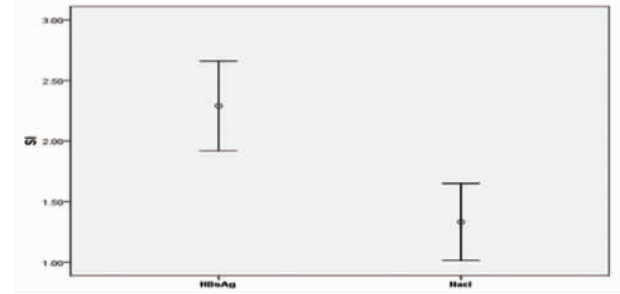


图 2 HBsAg 蛋白刺激小鼠淋巴细胞增殖
Fig. 2 lymphocyte proliferation reaction

3 讨论

免疫系统在 HBV 慢性感染的病程和转归中发挥着重要作用,主要表现为抗 HBV 特异性细胞免疫应答的低下,如何有效地提高特异性细胞免疫应答在抗病毒治疗中至关重要。故如何打破 HBV 慢性感染的免疫耐受成为近年来研究的热点,Yaron Ilan 小组应用重组乙肝疫苗(含 HBsAg PreS1 及 S2)治疗慢性乙肝病人,20 周后患者 HBV DNA 明显下降,α 抗原阴转率及 NKT 细胞活性均有显著提高。Morikazu Onji 小组报道应用 HBsAg 疫苗与抗病毒药物联合治疗慢性乙肝患者,结果显示联合治疗组 α 抗原阴转率明显高于单用抗病毒药物组,这些结果说明 HBsAg 作为一种免疫调节剂在抗病毒治疗中有明显的协同作用。为深入研究 HBsAg 对 HBV 慢性感染者的免疫作用,本研究采用 1.3copy HBV 转基因小鼠,该小鼠 DC 表面的 MHC-II 类分子及 CD80 分子表达显著低于非 Tg 鼠,经 HBsAg 刺激后淋巴细胞增殖试验结果同样证明 Tg 鼠淋巴细胞增殖能力显著低于非 Tg 鼠,表明该 Tg 鼠在不同程度上存在免疫耐

受,某种程度类似于慢性乙型肝炎患者。我们采用大剂量 HBsAg 免疫转基因小鼠,结果显示,免疫后 HBsAg 组所诱生的 Th1 类细胞因子(IFN-γ、IL-2)的水平较生理盐水对照组明显增加,同时可显著增加小鼠 HBsAg 特异性 IFN-γT 细胞数量,且差异有显著性。从淋巴细胞增殖试验结果来看,HBsAg 组也同时高于生理盐水对照组,且差异有显著性。

以上结果说明 HBsAg 可以诱导转基因小鼠产生特异性的细胞免疫应答,分泌高水平的 IL-2、IFN-γ 以及促进淋巴细胞特异性增殖。在 HBV 感染中,持续性暴露于病毒抗原中,可引起特异性 CD₈⁺T 细胞无论在数量上还是功能上均产生缺陷,导致机体发生免疫耐受,并最终引起了 HBV 感染向慢性化的转变。辅助性 T 细胞是机体重要的调节细胞,如果 Th1 类细胞占优势,将促进细胞内的免疫,其中 Th1 类细胞因子 IL-2 及 IFN-γ 又是很好的 CTL 刺激因子,IL-2 可促进 CTL 增殖、成熟,并可增强 CTL 细胞穿孔素基因的表达,IFN-γ 则可通过提高抗原的加工与递呈能力,诱导 CD₈⁺T 细胞的活性并促进其增殖。本试

验结果提示大剂量的 HBsAg 可以诱导 HBV 转基因小鼠体内产生大量的 Th1 类细胞因子,从而可以激活 CTL 功能,说明大剂量的 HBsAg 可以打破转基因小鼠免疫耐受状态。在 HBV 感染抗病毒治疗中,重建机体 T 淋巴细胞免疫,恢复其正常的免疫功能至关重要,研究表明高剂量的 HBsAg 可以提高 HBV 转基因小鼠的细胞免疫功能,这为治疗慢性乙型肝炎提供了新的策略,但其详细的作用机制我们仍需进一步研究。

参考文献(References)

- [1] Horiike N, Akba SMF, et al. In vivo immunization by vaccine therapy following virus suppression by lamivudine:a novel approach for treating patients with chronic hepatitis B [J].J Clin Virol,2005,32:156-161
- [2] Akbar SM, Furukawa S, Hasebe A, et al. Production and efficacy of a dendritic cell based therapeutic vaccine for murine chronic hepatitis B virus carrierer [J]. Int J Mol Med, 2004,14(2):295-299
- [3] Didici B, Bosnak M, Ucmak H, et al. Failure of therapeutic vaccination using hepatitis B surface antigen vaccine in the immunotolerant phase of children with chronic hepatitis B infection [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2003,18(2):218-222
- [4] Page M, Jones CD, Bailey C. A novel, recombinant triple antigen hepatitis B vaccine [J]. Intervirology, 2001,44:88-97
- [5] Shimizu Y, Guidotti LG, Fowler P, et al. Dendritic cell immunization breaks cytotoxic T lymphocyte tolerance in hepatitis B virus transgenic mice[J]. J Immunol, 1998, 161(9):4520-4529
- [6] Belz GT, Behrens GMN, Smith CM, et al. The CD8 α + dendritic cell is responsible for inducing peripheral self-tolerance to tissue-associated antigens[J].J Exp Med, 2002,196(8):1099-1104
- [7] 熊一力,刘光泽,贾彦征. HBV 转基因小鼠免疫耐受机制的试验研究[J].世界华人消化杂志, 2002,10(6):642-645
XIONG Yi-li, LIU Guang-ze, JIA Yan-zheng, Mechanism of immune tolerance with chronic hepatitis B virus infection in hepatitis B virus transgenic mice[J].World Chin J Digestol,2002,10(6):642-645(In Chinese)
- [8] Maura D, Marc L, Tassilo V.Small Animal Model Systems for Studying Hepatitis B Virus Replication and Pathogenesis [J]. J SEMINARS IN LIVER DISEASE,2006,26(2):181-191
- [9] Boni C, Fasicaro, P, Valdatta, C., Amadei, B, Di Vincenzo, P, Giuberti, T., Laccabue, D, Zerbini A, Cavalli, A, Missale, G., et al. Characterization of hepatitis B virus (HBV)-specific T-cell dysfunction in chronic HBV infection[J]. J Virol,2007,81:4215-4225
- [10] Boni C, Fasicaro P, ValdattaC, Amadei B, Di Vincenzo P, Giuberti T, Laccabue D, Zerbini A, Cavalli A, Missale G, et al.Characterization of hepatitis B virus (HBV)-specific T-cell dysfunction in chronic HBV infection[J]. J Virol,2007,81:4215-4225
- [11] Safadi R,Israeli E,Papo O,et al.Treatment of chronic hepatitis virus infection via oral immune regulation toward hepatitis B virus proteins [J].Am J Gastroenterol,2003,98:2505-2515

封面说明

共同的画卷

封面设计说明

自 1997 年第一只克隆羊多利的诞生拉开了人造生命的序幕,2010 年,可谓是人造生命科学发展的一个新的里程碑。本刊 2011 年封面设计的灵感来自于人造生命技术的蓬勃发展。① 封面背景以第三代测序技术即基于纳米孔的单分子实时 DNA 测序技术的研制成功为契机(图中,偏下),这为人造生命及人类健康提供了强有力的技术支撑。② 封面图案以 2010 年诺贝尔生理与医学奖的体外受精技术(即试管婴儿),最强壮晶胚的筛选技术,人工卵巢及人类卵细胞的培育技术为主体(图上,右,中,左),这些不仅为不孕不育患者带来了福音,同时为社会的稳定与和谐贡献了力量。③ 封面图案同时也融合了人造生命的最新研究成果即首个能自我生长,繁殖的人造生命细胞 Synthia 的问世(六边形图,右),由干细胞培育出的肺脏(六边形图,左)等最新研究成果。④ 封面图案同时也展示了人造生命发展的伦理学争议与潜在的危机,关于艾滋病的研究取得了很多成就,但我们还没有攻克艾滋病,特别是 Superbug 耐药性超级细菌的出现,让无数人感到前所未有的恐慌(六边形,中)。⑤ 生命科学的一切研究成果,只不过是生物医学历史的长河中一朵浪花,因此图片采用波浪形设计,如河流奔涌向前,如画卷色彩缤纷,如电影胶片所有的成就与辉煌一闪而过,未来会更加让人期待。新技术新理论的发明与发展,需要有准备的大脑,也需要灵光突闪的思想火花。对于与人类密切相关的生物医学领域,我们如图中的小孩一样,睁大纯真的眼睛,好奇的观察、了解,我们也需要运用一系列的技术手段,面对未知的一个个"黑箱"问题,需要细心大胆的研究、推断,同时我们需要时刻警觉生命科学技术发展应用这把双刃剑潜伏的危机,应当科学探索并利用自然规律来更好的为人类服务。

我们坚信,《现代生物医学进展》正是为生物医学领域的科研工作者提供了这样一个可以充分挥洒展示的画卷的平台,不断记录着生物医学领域最新最成功的成果。这是我们共同的画卷,让我们与你们共同分享灵感与喜悦,成功与辉煌!