DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.19.014

论著

文章编号:1000-5404(2004)19-1732-03

HCV核心区增强和抑制性多肽对小鼠CTL相互作用研究

马巧玉,王宇明,郝 飞 (第三军医大学西南医院全军传染病研究所,重庆 400038)

提 要:目的 建立细胞毒性T细胞(cytotoxic T cell, CTL)检测体系,探讨丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)感染者体内CTL功能缺陷的原因。方法 选择HCV核心区多肽中对CTL有抑制作用和增强作用的多肽各2条,交叉组合后共同皮下注射免疫BALB/c小鼠,用乳酸脱氢酶释放实验检测小鼠脾细胞CTL活性。结果 用LDH检测HCV核心区多肽免疫BALB/c小鼠的CTL活性,CTL活性可被CPA10(5~23位氨基酸)增强及被CPA9(39~74位氨基酸)抑制。CPB2+CPB8、CPB6+CPB8组中效靶比10∶1,20∶1的CTL活性显著高于对照组,CPB2+CPB7、CPB6+CPB7组与对照组无明显差异,双因素方差分析显示HCV核心区抑制性多肽和增强性多肽有交互作用。结论 LDH可稳定检测BALB/c小鼠的CTL活性,HCV核心区抑制性和增强性多肽有相互作用。

关键词:HCV;核心区多肽;细胞毒性T细胞
中图法分类号:R373.21;R392.12;R446.6 文献标识码:A

Effects of inhibitory and enhancing polypeptides from HCV core region on cytotoxic T cell functions

MA Qiao-yu, WANG Yu-ming, HAO Fei (Institute of Infectious Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To investigate the pathogenesis of cytotoxic T cell (CTL) dysfunction in patients with HCV infection. **Methods** CTL detecting system was established. Two polypeptides which could enhance CTL function and two polypeptides which could inhibit CTL function were selected and cross-combined. BALB/c mice were immunized by subcutaneous injection of the combined polypeptides, and the CTL activity in mouse spleen cells was detected by LDH release test. **Results** CTL activity in BLAB/c mice immunized by polypeptides in the core region of HCV could be enhanced by CPA10 (5—23 aa) and inhibited by CPA9 (39—74 aa). CTL activity in the mice could be enhanced by polypeptides from the HCV core region, CPB2+CPB8, and CPB6+CPB8, respectively. There was no obvious difference between CPB2+CPB7, CPB6+CPB7 and the negative control. Two-factor analysis of variance showed that there was reciprocal action between the inhibitory and enhancing polypeptides from the HCV core region. **Conclusion** CTL activity in BLAB/c mice can be detected stably by LDH. There is an interactive effect between the inhibitory and enhancing polypeptides from the HCV core region.

Key words: polypeptide; core region, hepatitis C virus; cytotoxic T cell

丙型肝炎病毒(hepatitis C viruses, HCV)所引起的丙型肝炎是严重危害人民健康的传染病,全世界约有1.7×10^8人感染HCV,至少有70%发展成慢性丙型肝炎,在10~20年内可进展成肝硬化,且与原发性肝癌发生密切相关[1]。细胞毒T淋巴细胞(cytotoxic T cell, CTL)是执行细胞免疫反应的主要效应细胞,在清除病毒感染和阻止感染慢性化中起关键作用,但在HCV感染中未能有效发挥其作用,其原因尚不清楚。本实验在不同条件下用乳酸脱氢酶试剂检测被免疫小鼠CTL活性,建立一个简便、有效检测CTL的方法;而HCV核心区增强性和抑制性多肽对CTL作用的互相影响,为我们本次研究的主要内容。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39770682)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (39770682)
作者简介:马巧玉(1966—),女,浙江省义乌市人,博士,主治医师,讲师,主要从事丙型肝炎免疫发病机制方面的研究,发表论文10余篇。电话:(023)68754475-8008
收稿日期:2003-08-11;修回日期:2003-10-30

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1　材料与方法

1.1　主要材料

LDH 试剂盒购自德国宝灵曼公司, PRMI1640 细胞培养基购自美国 GIBCO 公司。小牛血清由本校试剂中心提供, 用前 56 ℃× 30 min 灭活补体。HCV 核心区多肽由深圳瀚宇生物技术有限公司提供。不完全福氏佐剂由本校全军免疫学研究所惠赠。HCVC/ E2 区质粒转染小鼠杂交瘤细胞(SP2/ O)由华西医科大学肝炎研究所惠赠。BALB/ c 小鼠 11 只, 体质量 150～220 g, 由本校实验动物中心提供。

1.2　实验方法

1.2.1　用已合成多肽免疫 BALB/ c 小鼠　　称取 HCV 核心区多肽 CPA9[2] 1 600 μg, CPA10[3] 1 000 μg, 分别加入超滤水 300、200 μl, 不完全福氏佐剂 500、300 μl, 用 2 只注射器双向推注 0.5 h 至乳化, 将实验的 BALB/ c 小鼠完全随机分为 4 组, 每组 3 只, 分别注射 BALB/ c 小鼠后足皮下 CPA9 25、50、100 μl、CPA10 50 μl, 每 2 周注射 1 次, 共 3 次。同时设立注射生理盐水至 BALB/ c 小鼠后足皮下的正常对照组, 无任何处理的空白对照组, 对照组每组 2 只 BALB/ c 小鼠。

1.2.2　选择 HCV 核心区抑制性和增强性多肽及免疫 BALB/ c 小鼠　　选择 HCV 核心区对 CTL 有增强作用的多肽 CPB6(63～72 位氨基酸)、CPB2(131～140 位氨基酸)和对 CTL 有抑制作用的多肽 CPB7(67～76 位氨基酸)、CPB8(71～80 位氨基酸)[4], 每组 1 条增强性多肽加抑制性多肽交叉组合成 4 组。称取上述已组合 HCV 核心区多肽各 1 000 μg, 加入超滤水 200 μl, 不完全福氏佐剂 300 μl, 用 2 只注射器双向推注至充分乳化, 50 μl 注射 BALB/ c 小鼠后足皮下, 1 次/2 周× 3 次(每组 3 只 BALB/ c 小鼠)。同时设立注射生理盐水的阴性对照组, 无任何处理的正常对照组(每组 2 只 BALB/ c 小鼠)。

1.2.3　确定靶细胞　　用 HCV C/ E2 区质粒转染的小鼠骨髓瘤细胞 SP2/ O 做为靶细胞, 经 Westein bloting 法及免疫组化证实上述质粒转染成功并可在传代 SP2/ O 细胞中稳定表达。

1.2.4　检测 CTL 功能　　取培养 SP2/ O 细胞, 0.25% 胰酶消化上述细胞, 计数稀释细胞至 5× 10^4/ ml, 按 100 μl/ 孔加入 96 孔培养板, 置于 37 ℃, 5% CO_2 孵箱过夜。次日处死上述实验及正常、对照组小鼠, 取出脾脏。将脾脏置于 100 目筛网上, 边加 1640 培养液边研磨脾脏, 分离其细胞吸于 50 ml 离心管。上述细胞悬液 1 500 r/ min× 5 min 离心, 弃上清, 加 1640 培养液按上述重复离心 1 遍。弃 96 孔培养板中 1640 培养液, 加入含 2% 小牛血清 1640 培养液 100 μl/ 孔。按 LDH 试剂说明设立对照。计数上述脾细胞, 用含 2% 小牛血清 1640 培养液调整 CPA9 组效靶细胞比分别为 20∶1、50∶1、100∶1、200∶1 及其余各组效靶细胞比为 10∶1、20∶1、40∶1、60∶1, 每种细胞浓度 50 μl/ 孔× 3 孔加入上述含靶细胞 SP2/ O 的 96 孔培养板。HCV 核心区多肽用含 2% 小牛血清 1640 培养液调配至 20 μl/ ml 浓度, 50 μl/ 孔加入上述培养板, 将此 96 孔培养板放入 37 ℃, 5% CO_2 培养箱中孵育 4 h。取出培养板, 移 100 μl/ 孔上清至另一 96 孔培养板, 加入配制好的 LDH 反应液 100 μl/ 孔, 在 20 ℃下避光保存 20 min, 用酶标仪 492 nm 检测, 检测结果将同 BALB/ c 小鼠、同浓度之 3 孔平均后按下述公式计算:

$$细胞毒性率(\%)=\frac{实验值-低对照值}{高对照值-低对照值}\times 100$$

1.3　统计学方法

实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 SPSS11.0 统计软件行双因素方差分析及均数间多重比较。

2　结果

2.1　CPA9、CPA10 免疫 BALB/ c 小鼠 CTL 活性

上述 CPA9 免疫 BALB/ c 小鼠 CTL 活性的检测结果去除效靶比为 200∶1、100∶1 各组结果(显色太过而超出检测范围), 剩余效靶比为 60∶1、50∶1、40∶1、20∶1、10∶1 各组 CTL 检测结果经单因素方差分析, 正常和空白对照组 CTL 活性无显著差异, 注射 CPA9 50 μg、效靶比为 20∶1、50∶1 各组 CTL 活性与空白、正常对照组为无显著差异, 注射 CPA9 100 μg, 效靶比为 20∶1、50∶1 的 2 组 BALB/ c 小鼠 CTL 活性明显低于空白及正常对照组($P<0.05$), 注射 CPA10 100 μg 的各组 BALB/ c 小鼠 CTL 活性明显高于空白及正常对照组($P<0.05$)。见表 1、2。

表 1　CPA9 免疫 BALB/ c 小鼠 CTL 活性(%, $\bar{x}\pm s$)(效∶靶细胞)

Tab 1　CTL activity in BLAB/ c mice immunized by CPA9 (%, $\bar{x}\pm s$) (Effective∶Target cells)

Group	20∶1	50∶1
100 μg group of experiment	23.03±8.89	48.03±9.58
50 μg group of experiment	34.14±0.61 *	63.94±1.12 *
Normal control	39.45±0.22 *	68.08±3.32 **
Negative control	38.37±0.10 *	67.41±1.59 *

$F_G=14.99$, $P=0.00$; $F_t=155.097$, $P=0.000$; *: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* 100 μg

表 2　CPA10 免疫 BALB/ c 小鼠 CTL 活性($\bar{x}\pm s$)(效∶靶细胞)

Tab 2　CTL activity in BLAB/ c mice immunized by CPA10 (%, $\bar{x}\pm s$) (Effective∶Target cells)

Group	10∶1	20∶1	40∶1	60∶1
CPA10 group of experiment	9.07±2.31	21.29±3.56	43.77±7.03	56.74±2.80
Normal control	7.51±1.97	9.16±1.44 *	15.76±6.12 **	24.69±7.56 **
Negative control	6.47±2.36	8.40±2.88 **	13.60±3.19 **	19.79±4.77 **

$F_G=20.52$, $P=0.000$; $F_t=18.64$, $P=0.000$; *: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* CPA10

2.2　效靶细胞比为 20∶1 的 CPB2+CPB7 组

效靶比为 20∶1、40∶1 的 CPB6+ CPB7 组 CTL 活性显著高于对照组, 效靶比为 10∶1、20∶1、40∶1 的 CPB6+ CPB8 组 CTL 活性较对照组显著增强, 其余各实验组及效靶比为 60∶1 的各组 CTL 活性与对照组相比无显著性差异。将 2 个 CTL 表位和 2 个抑制性多肽进行双因素方差分析, 提示抑制性多肽与 CTL 表位之间有显著相互作用(表 3)。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表 3 HCV 核心区增强性、抑制性多肽免疫 BALB/c 小鼠 CTL 活性(%, $\bar{x}\pm s$)(效∶靶细胞)

Tab 3 CTL activity in BLAB/c mice immunized by the inhibitory and enhancing polypeptides from the HCV core region (%, $\bar{x}\pm s$) (Effective∶Target cells)

Group	10∶1	20∶1	40∶1	60∶1
CPB2+CPB7	17.15±2.76	26.61±1.83	38.89±5.08	53.99±9.95
CPB6+CPB7	17.45±0.35	26.61±1.19	36.86±3.38	58.97±2.27
CPB2+CPB8	17.25±1.27	29.04±3.63	48.63±8.15	66.47±9.40
CPB6+CPB8	22.31±1.22	30.70±1.06	48.43±9.45	70.96±11.35
Normal control	16.53±0.20 **	22.52±0.00 **△##	34.21±1.24 *#	56.73±0.83
Negative control	16.67±0.40 **	22.67±0.22 **△##	33.78±0.22 *#	56.58±1.03

F_G= 6.808, P=0.000; F_t= 218.11, P = 0.000; *: P< 0.05, **: P< 0.01, *vs* CPB6+ CPB8; △: P< 0.05 *vs* CPB2 + CPB7; #: P< 0.05, ##: P< 0.01, *vs* CPB6+CPB7

3 讨论

有研究表明, CTL 在 HCV 感染清除中起重要作用, 体外研究也证明 CTL 能较强地溶解 HCV 感染的靶细胞。在许多慢性 HCV 感染者体内可稳定地检测到 HCV 特异的 CTL 克隆, 而未见 HCV 感染被清除, 说明 CTL 对 HCV 的清除作用可能受多种因素影响而未正常发挥。现有研究[5] 表明病毒本身可发生 CTL 识别表位上的氨基酸替换, 这种突变使 CTL 不能识别病毒变异后的表位, 因此 HCV 可逃避宿主的 CTL 攻击致感染持续存在; 另有报道[1,6] 表明 HCV 核心蛋白可抑制宿主 CTL 反应, 减少 IFN-γ 和 IL-2 的产生, 延长病毒血症, 使 HCV 感染宿主死亡率增加, 在 HCV 持续感染中起重要作用, 除上述原因外, 体内复杂的免疫网络系统互相影响, 也是造成 HCV 特异性 CTL 不能正常发挥作用的重要原因。

目前, 进行 HCV 感染中 CTL 活性检测的各项研究报道均用经典的 ^{51}Cr 释放试验, 靶试验动物除公认的黑猩猩外, 应用最多的为 BALB/c 小鼠, 由于 BALB/c 小鼠为近交系小鼠, 遗传基因相似, 用 SP2/0 作为靶细胞, 可保证与效应细胞同源性[7]。^{51}Cr 为放射性元素, 操作、保存不当可引起放射性污染及放射性损伤, 且放射性衰变保存时间有限; 本实验中用乳酸脱氢酶试剂检测 CTL 活性, 如注意减少影响因素(降低小牛血清在培养液中含量, 控制反应时间等), 则有价格便宜, 便于保存、操作简便、无放射性污染等优点。

近年来, 关于 HCV 感染中 CTL 作用的报道很多, 但绝大多数都是关于 CTL 增强性多肽(CTL 表位)方面的研究, 其中对 HCV 核心区(1~191 位氨基酸)CTL 表位研究显示: CTL 可识别 2~9、41~49、88~96、81~100 位氨基酸[8,9], 还可识别 35~44、90~98、131~140、156~165、177~185 位氨基酸[7], 另有显示 28~37、111~130、161~180 位氨基酸为 CTL 表位[2], 每个表位约 8~12 个氨基酸, 综上所述, 我们选择了在前段研究已证实为 CTL 表位的核心区多肽 CPB6、CPB2(63~72、131~140 位氨基酸), 与 HCV 核心区抑制性多肽 CPB7、CPB8(67~76、71~80 位氨基酸)交叉组合免疫 BALB/c 小鼠, 观察 HCV 核心区抑制性多肽对 CTL 表位的影响。

我们的研究不仅证实 HCV 核心区部分多肽确有抑制 CTL 功能的作用, 而且显示 HCV 核心区抑制性多肽与 CTL 表位共同免疫 BALB/c 小鼠时, 抑制性多肽可完全或部分抑制 CTL 表位对 CTL 活性的增强作用。为加强免疫保护作用, 应努力提高 CTL 增强性表位对 CTL 的正性作用, 降低或清除抑制性多肽对 CTL 的负性作用, 本研究揭示了 HCV 感染时 CTL 功能缺陷的原因之一, 对丰富 HCV 免疫发病机制, 指导 HCV 临床治疗及疫苗研制具有重大意义。

由于免疫网络系统的复杂性, HCV 核心区抑制性多肽为直接抑制 CTL, 或通过影响细胞因子、CTL 表位等抑制 CTL 作用尚不明确, 有待于进一步研究确定。

参考文献:

[1] Jackson M, Smith B, J. Bevitt D J, *et al*. Comparison of cytotoxic T-lymphocyte responses to hepatitis C virus core protein in uninfected and infected individuals[J]. J Med Virol, 1999, 58(3): 239-246.

[2] 郝 飞, 吴纯清, 陈国致, 等. 合成肽抗原 ELISA 检测丙型肝炎病毒核心抗体实验条件的初步探讨[J]. 第三军医大学学报, 1992, 14(2): 174-176.

[3] 郝 飞, 宋 霞, Thaler M M, 等. 合成肽与重组抗原检测丙型肝炎病毒抗体的对比研究[J]. 中华传染病杂志, 1995, 13(2): 69-72.

[4] 马巧玉, 王宇明, 郝 飞. HCV 核心区多肽对细胞毒 T 细胞作用的初步观察[J]. 中华传染病杂志, 2002, 20(5): 294-296.

[5] Borrow P, Shaw G M. Cytotoxic T-lymphocyte escape viral variants: how inportant are they in viral evasion of immune clearance *in vivo*[J]? Immunol Rev, 1998, 164: 37-51.

[6] Large M K, Kittlesen D J, Hahn Y S. Suppression of host immune response by the core protein of hepatitis C virus: possible implications for hepatiits C virus persistence[J]. J Immunol, 1999, 162(2): 931-938.

[7] Tokushige K, Wakita T, Pachuk C, *et al*. Expression and immune response to hepatitis C virus core DNA-Based vaccine constructs[J]. Hepatology, 1996, 24(1): 14-20.

[8] Koziel M J, Dudley D, Afdhal N, *et al*. Hepatitis C virus (HCV) specific cytotoxic T lymphocytes recognize epitopes in the core and envelope proteins of HCV[J]. J Virol, 1993, 67(12): 7522-7532.

[9] Kita H, Hiroishi K, Moriyama T, *et al*. A minimal and optimal cytotoxic T-cell epitope within hepatitis C virus nucleoprotein[J]. J Gen Virol, 1995, 76(Pt 12): 3189-3193.

(编辑 栾 嘉)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net