

自然杀伤细胞分泌干扰素 γ 促进乙肝病毒的清除

胡 辛, 胡春松, 黄保军

摘要 目的 探讨自然杀伤细胞(NK)在乙型肝炎病毒(HBV)清除过程中的作用机制。方法 通过对成年小鼠高压注射 20 μ g pGEM4Z/HBV1.2 质粒建立 HBV 急性排斥小鼠模型,采用放射免疫试剂盒定量检测不同时间点(1、2、3、4、5周)小鼠血清中 HBsAg、免疫组化检测肝脏组织中 HBcAg 来评估模型的建立。流式细胞术分析对照小鼠和 HBV 小鼠肝脏中 NK 细胞比例和绝对数量变化,进一步分析两种小鼠 NK 细胞活化情况和分泌干扰素(IFN)- γ 的能力变化。通过肝脏组织切片 HE 染色以及谷丙转氨酶检测判断小鼠肝脏损伤状况。最后,通过 PK136 抗体清除小鼠 NK 细胞以及 IFN- γ 中和抗体进一步证实 NK 细胞分泌的 IFN- γ 是否参与 HBV 的清除过程。结果 小鼠高压注射 20 μ g pGEM4Z/ HBV1.2 质粒后,第 1 周血清中 HBsAg 和肝脏组织中 HBcAg 表达量都较高,但呈降低趋势,在 4~5 周后几乎转阴,很好地模拟了临床上急性感染 HBV 的病例。与对照组相比,HBV 小鼠肝脏中 NK 细胞比例和绝对数量明显增高;进一步研究显示 HBV 小鼠 NK 细胞活化分子 CD69 表达也显著上升,同时 IFN- γ 分泌增加。与此同时,小鼠肝脏呈无损伤状态。预先清除 NK 细胞或阻断 IFN- γ 的功能能显著增加 HBV 小鼠中相关抗原的含量,延缓 HBV 的排斥。结论 在 HBV 急性排斥模型中,NK 细胞通过分泌 IFN- γ 促进 HBV 的清除。

关键词 HBV;NK 细胞;IFN- γ

中图分类号 R 392.12

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)02-0215-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.02.014

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)是危害全球的重大传染性疾病^[1],全球约有 3.5 亿人感染 HBV。HBV 感染导致患者肝纤维化和肝癌发生的比例大幅度上升^[2]。HBV 感染后,患者会呈现两种截然相反的结果,分别是终身携带病毒的慢性感染状态或通过免疫系统彻底清除病毒的急性感染状态。成年人感染 HBV 后 90% 可以通过自身的免疫

系统清除 HBV,表现为一过性感染。这可能与婴儿的免疫系统尚未发育成熟,而成年人成熟的免疫系统能较好地清除 HBV 有关。

关于免疫细胞在 HBV 慢性感染中的作用已有大量的研究^[3-6]报道,包括 T 细胞、自然杀伤 T 细胞(nature killer T cell, NKT)、巨噬细胞和 NK 细胞等,但 NK 细胞在 HBV 急性感染中的作用尚不十分清楚。该研究通过成年小鼠尾静脉高压注射携带 HBV 1.2 倍基因组的质粒,模拟成年人感染 HBV 的过程,探讨 NK 细胞在 HBV 急性感染中的免疫学机制,对预防和治疗乙肝提供新的思路和免疫靶点。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 C57BL/6 小鼠,6~8 周,SPF 级,购自上海斯莱克实验动物中心,饲养于安徽医科大学实验动物中心。小牛血清购自杭州四季青公司;RPMI-1640 细胞培养液购自美国 GIBCO 公司;PK136 清除抗体和干扰素(interferon, IFN)- γ 中和抗体购自美国 BD 公司;小鼠 FITC-anti-CD3、PE-anti-CD69、Percp-cy 5.5-anti-NK 1.1、PE-anti-IFN- γ 流式抗体购自美国 eBioscience 公司;HBcAg 抗体购自美国 DAKO 公司;兔抗小鼠 IgG 抗体购自北京中杉金桥公司;HBsAg 免疫放射法定量检测试剂盒购自北京北方生物技术研究所;Endo 公司-free 质粒中抽试剂盒购自德国 QIGEN 公司;pGEM4Z/HBV1.2 质粒由台湾国立大学 Pei-Jer Chen 教授惠赠。

1.2 方法

1.2.1 小鼠高压注射 pGEM4Z/HBV1.2 质粒 通过 Endo-free 质粒中抽试剂盒抽提质粒,检测质粒纯度和浓度。每只 C57BL/6 小鼠注射体积为小鼠 10% 体重(成年小鼠 20 g 左右,注射体积 2 ml),将 20 μ g 质粒溶于 2 ml 生理盐水中,通过尾静脉在 6 s 左右时间内匀速注射至小鼠体内。高压注射后部分小鼠会出现短暂的休克反应,2 min 左右恢复正常。

1.2.2 小鼠血清中 HBsAg 定量检测 在需要的时间点使用刀片割破一根尾静脉,用 0.6 ml 内壁光滑的 EP 管收集小鼠血液,室温放置 2~3 h 左右,或 4 $^{\circ}$ C 冰箱放置过夜,4 000 r/min 离心 5 min 后可观察

2017-01-13 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:1208085MH134)

作者单位:安徽医科大学基础医学院免疫教研室,合肥 230032

作者简介:胡 辛,男,硕士研究生;

黄保军,男,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:

huangbaojun516@163.com

到上面一层淡黄色透明的液体,即小鼠血清。用加样枪小心吸取上层血清,低温冰箱冷冻保存备用,注意进行分装,尽量不要循环冻融。按照 HBsAg 定量检测试剂盒的方法检测 HBsAg,需要注意的是,在第 1、2 周时间点血清稀释 40 倍检测,其他时间点稀释 10 倍。

1.2.3 肝单个核细胞分离 将实验小鼠死后,提取出肝脏放到小青霉素瓶内(内含 50% 1×PBS 溶液)并将其放到冰上;使用注射器柄和 200 目筛网对肝脏分别进行研磨和过滤,下面放 ϕ 8 cm 左右平皿转至离心管中;静置 3~5 min 后,去底部沉淀,收集上面液体;2 000 r/min,离心 10 min 后弃上清液;取另一支洁净的 15 ml 离心管,加入 2 ml 70% Percoll 溶液;向上述离心收集到的细胞添加 4 ml 含有 40% Percoll 溶液重悬细胞沉淀,利用滴定管将其缓缓添加到 70% Percoll 溶液上,要达到明显的分层效果,界面清晰;2 400 r/min(升速 5、降速 1)离心 30 min 后,收集云雾状的细胞层,添加 10 ml 1×PBS 溶液摇匀后 2 000 r/min 离心 10 min 采集细胞;1×PBS 溶液再次清洗 2 000 r/min 离心 10 min 采集细胞即肝脏单个核细胞。

1.2.4 流式细胞术检测细胞表面/胞内分子 根据细胞计数结果,取 10^6 个细胞至 1.5 ml EP 管中,调节终体积至 100 μ l;每管细胞加入 10 μ l 新鲜大鼠血清,室温封闭 15~30 min;准备 0.5~2 μ l 待测的荧光标记抗体 4 $^{\circ}$ C 避光标记半小时;1×PBS 溶液洗 2 次,35 000 r/min 离心 5 min 收集细胞;最后用 200 μ l 1×PBS 溶液重悬标记后的细胞, FACSCalibur 仪器检测。如检测胞内分子,需加入固定液、穿膜液后,再加入荧光抗体标记胞内待测分子的抗体。

1.2.5 免疫组化检测肝组织中 HBcAg 包埋肝组织蜡块 进行石蜡切片,然后将石蜡切片脱蜡水化;滴加 H_2O_2 去除内源性过氧化酶;1×PBS 冲洗 1 遍后,添加二抗动物来源的血清,并密封,在常温下孵育 15 min;去除残余的封闭液,直接滴加用 PBS 稀释 700 倍后的一抗(兔抗 HBcAg 抗体),37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h;PBS 洗 3 次,每次 3 min 挤 2 滴二抗工作液(生物素偶联),室温放置 40 min;PBS 洗 3 次,每次 3 min 然后将辣根过氧化物酶添加进去,在常温下孵育 20 min;PBS 洗 3 次,每次 3 min,添加 DAB 对其进行显色 5~10 min,并利用显微镜进行观测,待显色完毕后,将切片放入水中;最后在苏木精容器内放入切片继续染色 1 min,再进行脱水、透明和封片处理。

1.3 统计学处理 数据的录入和分析采用 Graph Pad 统计软件。实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠 HBV 急性排斥模型的建立 选取 10 只 C57BL/6 小鼠高压注射 20 μ g pGEM4Z/HBV 1.2 质粒后,分别在 1、2、3、4、5 周时间点尾静脉取血,使用 HBsAg 定量检测试剂盒检测小鼠血清中 HBsAg 含量。结果显示 1 周后血清中 HBsAg 含量最高,平均达到 1 000 ng/ml 左右;第 2~3 周,血清中 HBsAg 含量明显地急剧下降,但此时大部分小鼠仍然为 HBsAg 阳性小鼠;第 4~5 周时,全部小鼠 HBsAg 均转阴(图 1A),图 1B 显示的是小鼠 HBsAg 阳性率的变化,与图 1A 相一致。进一步免疫组化检测肝脏 HBcAg 的结果显示,HBV 质粒高压注射 1 周时肝脏中 HBcAg 阳性的细胞较多,到第 4 周时,HBcAg 阳性的细胞显著减少,几乎转阴(图 1C、D),很好地模拟了临床上成年人感染 HBV 后自动转阴的过程。

2.2 HBV 小鼠中 NK 细胞比例和数量变化 小鼠高压注射 HBV 质粒后,血清中产生大量 HBsAg 外来抗原,但随后却逐渐降低,推测有免疫细胞活化导致 HBV 的清除。通过观察显示小鼠高压注射 HBV 质粒后第 2~3 周,血清中 HBsAg 急剧减低,因此选取第 2 周作为观察免疫细胞的时间点(图 1)。采用流式细胞术分析肝脏单个核细胞各淋巴细胞比例,结果显示 HBV 小鼠肝脏 NK 细胞比例与对照小鼠相比显著上升(图 2A、B),NK 细胞绝对数量也同样明显增加(图 2C),但 NKT 细胞、T 细胞的比例在两种小鼠间没有明显的变化(数据未展示)。

2.3 HBV 小鼠中 NK 细胞功能 进一步分析 HBV 小鼠 2 周时间点时肝脏 NK 细胞的活化状态,结果显示 NK 细胞表面活化分子 CD69 的表达显著增加(图 3A、B),表明 HBV 小鼠肝脏 NK 细胞处于更加活化的状态。同时,流式细胞术内标检测 IFN- γ 显示 HBV 小鼠肝脏 NK 细胞分泌 IFN- γ 也显著增加(图 3C、D)。提示 NK 细胞可能通过分泌 IFN- γ 以非细胞毒性的方式清除 HBV 相关抗原。为了验证该推测,分别取小鼠高压注射 HBV 质粒后 1、2、3、4 周肝组织进行病理分析,HE 染色结果说明小鼠肝组织排列整齐,未见炎症反应;同时,HBV 小鼠血清中谷丙转氨酶一直低于 40 同样说明小鼠无肝损伤状态(图 4)。

2.4 NK 细胞通过分泌 IFN- γ 促进 HBV 的清除
 为了验证 NK 细胞和 IFN- γ 是否在 HBV 的清除过

程中发挥重要作用,将小鼠分为 3 组,分别是:高压注射 HBV 质粒前 2 天注射 PK136 抗体清除 NK 细

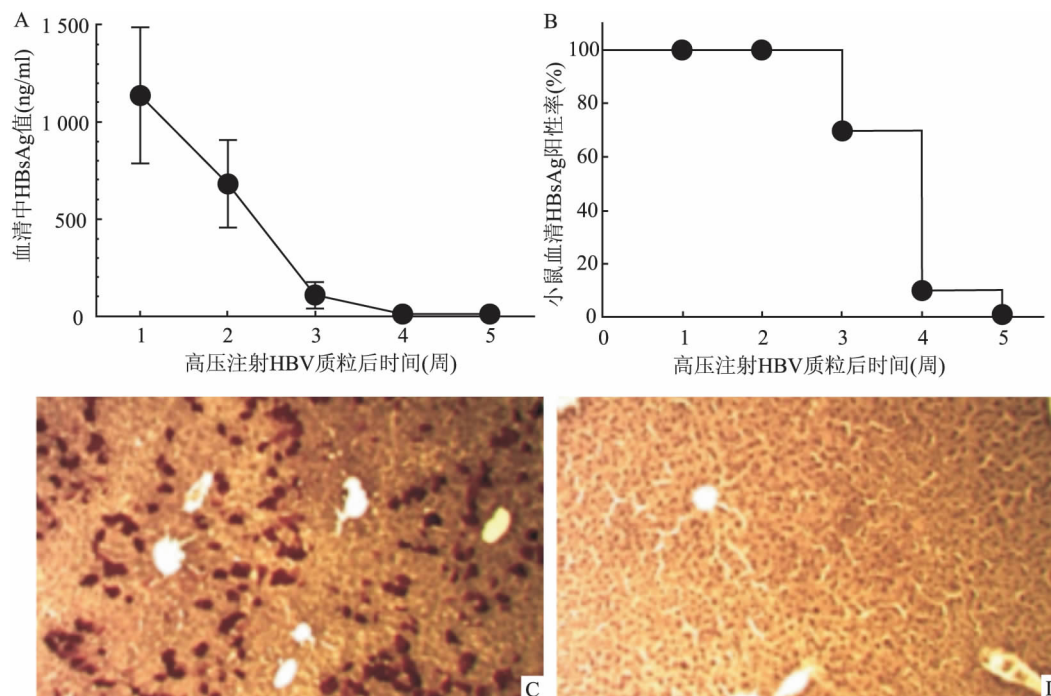


图 1 HBV 小鼠血清中 HBsAg 变化 SP \times 100

A: 血清中 HBsAg 值的变化曲线; B: 小鼠血清中 HBsAg 阳性率的变化曲线; C、D: 小鼠高压注射 HBV 质粒后,第 1 周和第 4 周取小鼠肝脏组织,免疫组化检测 HBcAg

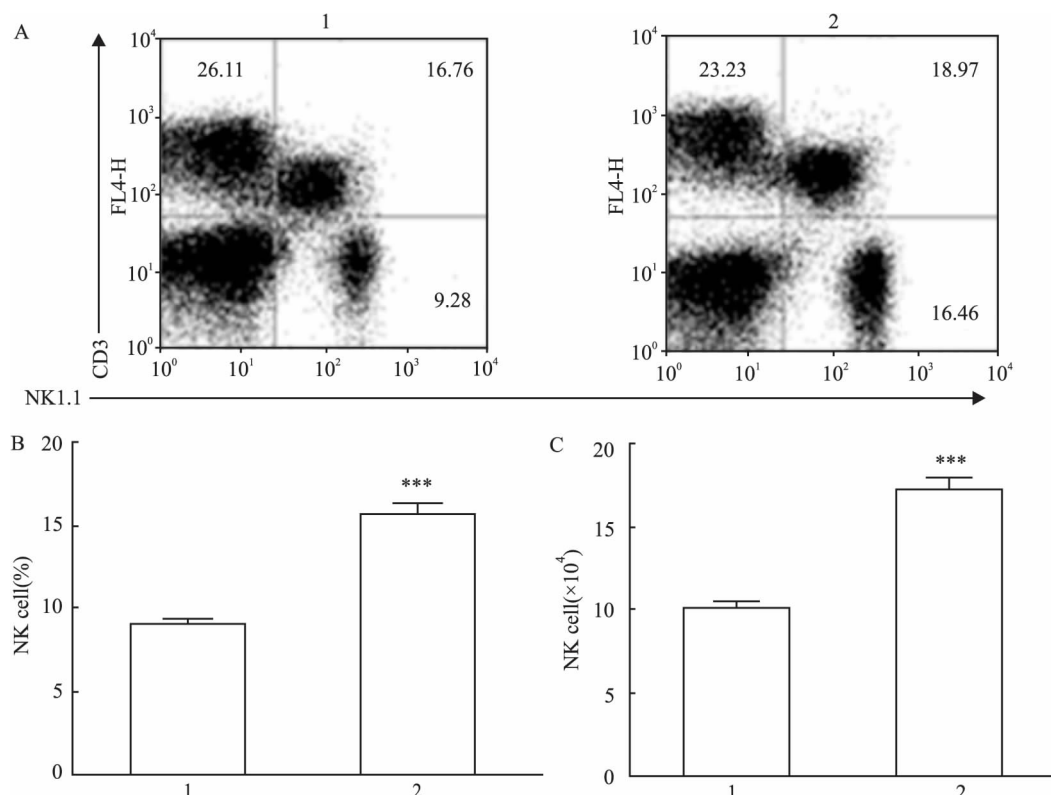


图 2 HBV 小鼠肝脏 NK 细胞比例

A: 高压注射后,第 2 周检测肝脏单个核细胞亚群; B: 统计分析 NK 细胞比例; C: 统计分析 NK 细胞绝对数; 1: 对照小鼠; 2: 20 μ g HBV 质粒小鼠; 与对照小鼠比较: *** $P < 0.001$

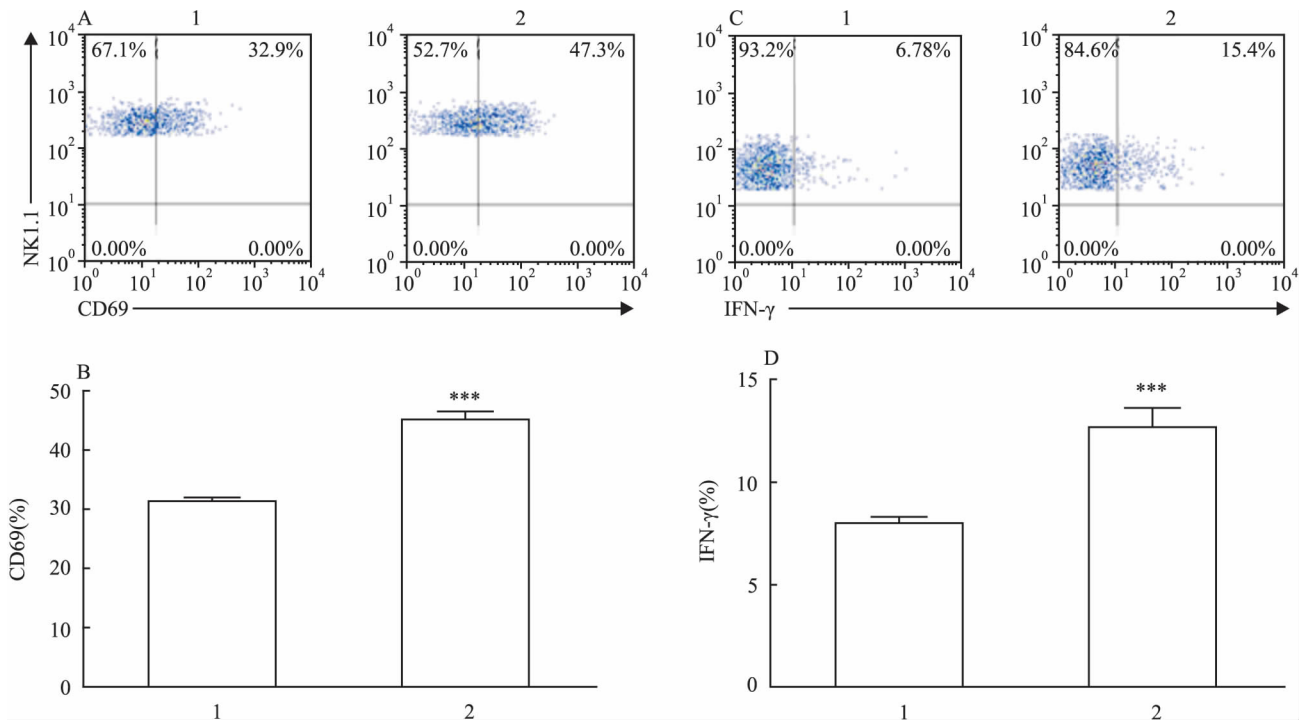


图3 HBV小鼠中NK细胞分泌IFN-γ能力变化

A:第2周检测NK细胞表面CD69分子;B:统计分析表达CD69分子的NK细胞比例;C:第2周检测NK细胞分泌IFN-γ;D:统计分析分泌IFN-γ的NK细胞比例;1:对照小鼠;2:20 µg HBV质粒小鼠;与对照小鼠比较:***P<0.001

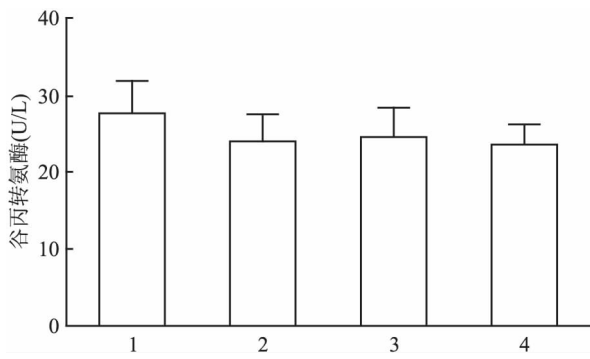


图4 小鼠血清谷丙转氨酶水平
1:1周;2:2周;3:3周;4:4周

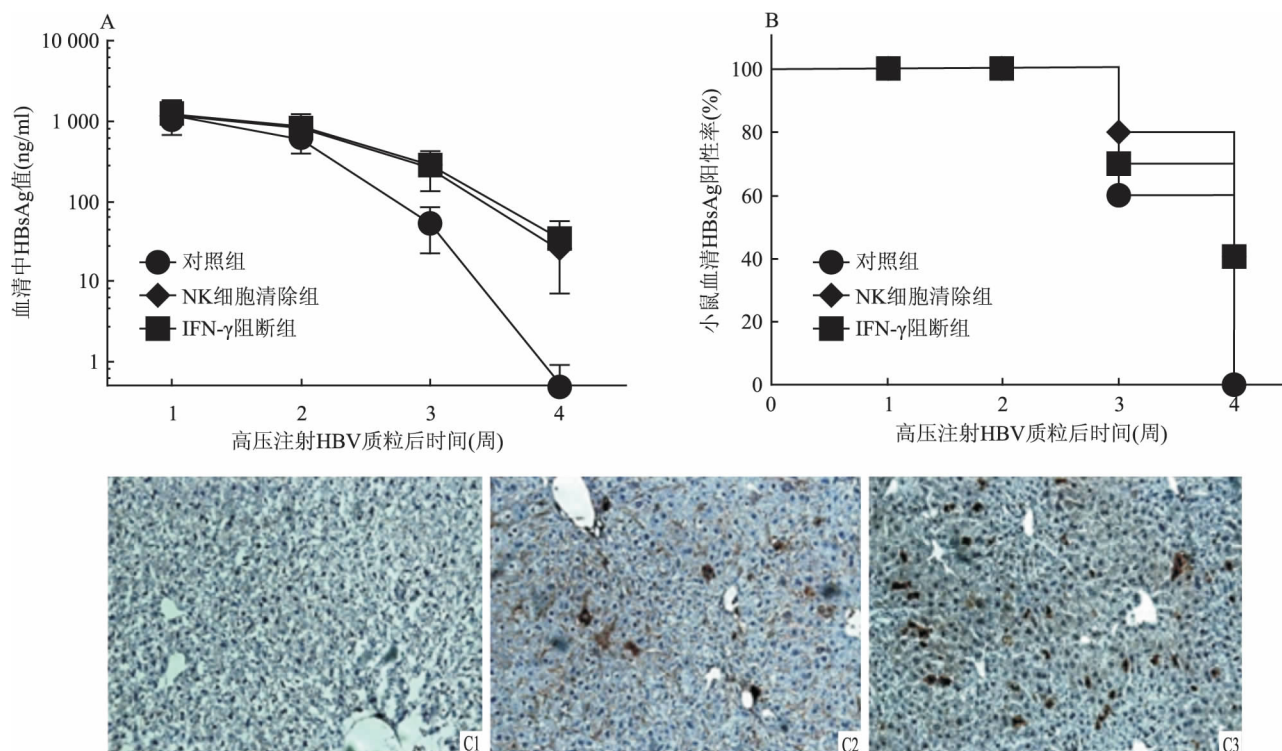
胞(NK细胞清除组)、注射抗IFN-γ中和抗体阻断IFN-γ发挥免疫效应(IFN-γ阻断组)和注射生理盐水(对照组),并每隔3d重复注射一次,且高压注射后每周取血检测血清中HBsAg的含量。结果显示不论是NK细胞清除组,还是IFN-γ阻断组,血清中HBsAg下降速度明显低于对照组(图5A);尤其显著的是对照组在第4周HBV全部转阴,而另外两组分别有40%的小鼠为HBV阳性(图5B)。与此相一致的是,第4周免疫组化检测肝组织中HBcAg显示除对照组小鼠外,其他两组小鼠肝组织中仍有HBcAg阳性的肝细胞存在(图5C)。这些结果说明在小鼠高压注射HBV质粒后,NK细胞通过分泌

IFN-γ促进了HBV的清除。

3 讨论

相关调查研究^[7]表明,我国乙肝携带者比例占总人口的8%~10%,已经成为乙肝重灾区。现阶段,尽管乙肝疫苗对抗HBV感染的效果不错,但从临床角度来说,仍然有超过1亿的乙肝感染者无法摆脱肝炎、肝硬化以及发展成肝癌的困扰。主要是因为对HBV感染人肝细胞的过程和发病机制的认识还不够深入,比如感染HBV的人群中,为何有的能清除HBV,有的则发展成慢性肝炎等。这与HBV只感染人和灵长类动物,研究HBV的动物模型较为匮乏密切相关。HBV转基因小鼠的构建促进了HBV感染机制的研究^[8],但由于转基因小鼠对所转的抗原胚胎耐受,不发生免疫应答,在研究HBV触发的免疫应答中的局限性较大。

对此,众多学者想通过构建正常免疫应答的成年小鼠感染HBV模型来解决这一难题,Yang et al^[9]首次凭借高压注射HBV质粒构建了小鼠感染HBV模型,7d之后,小鼠体内的HBV被自动清除,产生抗HBV免疫反应,类似于临床上成年人感染HBV后自愈的状态。Huang et al^[10]高压注射pGEM4Z/HBV 1.2质粒也达到了相似的结果。通过以上文献^[8-9],本研究选取对成年小鼠高压注射

图5 NK细胞通过分泌IFN- γ 促进HBV的清除 SP \times 100

A: 血清中HBsAg值的变化曲线; B: 小鼠血清中HBsAg阳性率的变化曲线; C: 小鼠高压注射HBV质粒后,第4周取小鼠肝脏组织,免疫组化检测HBcAg; 1: 对照组; 2: NK细胞清除组; 3: IFN- γ 阻断组

20 μ g pGEM4Z/HBV1.2质粒的方法来构建小鼠HBV排斥模型,从而研究机体清除HBV过程中的免疫机制。小鼠通过高压注射后,肝细胞表面会出现短暂的小孔,注射溶液中的质粒会进入肝细胞,从而在肝细胞中表达携带的基因产物^[11]。因此该方法是一种靶向肝脏表达目的基因的注射方法,操作简便。图1结果显示高压注射HBV质粒后,肝细胞中表达HBcAg,并将HBsAg分泌至血清中,在1周时间达到峰值。对于免疫应答正常的成年小鼠来说,大量外来的HBV相关抗原会激活相关免疫细胞,导致HBV的清除。在此过程中,适应性免疫应答一定起着至关重要的作用,因为T、B细胞缺陷的Rag1^{-/-}鼠在高压注射HBV质粒后并不能将其清除^[12]在本研究中,通过流式细胞术未显示T细胞亚群明显升高,但不能否定T细胞在HBV清除中的作用。实验结果显示NK细胞比例和绝对数量都明显增加,结合肝脏中天然免疫优势的特性—NK和NKT细胞比例占肝脏总淋巴细胞2/3左右,将研究焦点放在肝脏NK细胞上。

有文献^[13]报道NK细胞在HBV转基因小鼠中数量明显减少,活化程度下降。尽管如此,HBV转

基因小鼠肝细胞表面IFN- γ 受体的表达水平明显增高,因此通过NK细胞刺激剂polyI:C注射后,NK细胞分泌的IFN- γ 能够引起HBV转基因小鼠肝脏的轻微损伤^[14]。在HBV的急性排斥过程中,图3显示NK细胞活化程度明显增加(CD69分子表达升高),HBV感染急性期患者中也同样观察到NK细胞的活化,其机制是受到IL-2的激活,患者血清中HBV DNA的拷贝数与IL-2和NK细胞活化呈负相关性^[15]。本实验结果也表明HBV清除期NK细胞分泌IFN- γ 明显升高,而NK细胞的清除或IFN- γ 通路的阻断都阻碍了HBV清除的进程,充分说明了肝脏NK细胞可能通过分泌IFN- γ 促进HBV的清除,图4显示HBV小鼠肝脏无损伤状态也符合IFN- γ 通过非细胞毒性的方式清除HBV的特性^[16]。

NK细胞表面有着众多活化性受体和抑制性受体,两者信号的平衡性是NK细胞免疫状态的决定性因素。在机体免疫系统抗HBV感染过程中,来源肝脏微环境的NK细胞参与针对HBV的免疫应答。在该小鼠模型中,NK细胞是如何被HBV相关抗原激活,有哪些活化性受体参与等问题还需进一步研究。

参考文献

- [1] Chisari F V, Ferrari C. Hepatitis B virus immunopathogenesis [J]. *Annu Rev Immunol* 1995, 13:29–60.
- [2] Seeger C, Mason W S. Hepatitis B virus biology [J]. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000, 64(1):51–68.
- [3] Li H J, Zhai N C, Song H X, et al. The role of immune cells in chronic HBV infection [J]. *J Clin Transl Hepatol* 2015, 3(4):277–83.
- [4] Franco A, Guidotti L G, Hobbs M V, et al. Pathogenetic effector function of CD4-positive T helper 1 cells in hepatitis B virus transgenic mice [J]. *J Immunol* 1997, 159(4):2001–8.
- [5] Kakimi K, Guidotti L G, Koezuka Y, et al. Natural killer T cell activation inhibits hepatitis B virus replication *in vivo* [J]. *J Exp Med* 2000, 192(7):921–30.
- [6] Dunn C, Brunetto M, Reynolds G, et al. Cytokines induced during chronic hepatitis B virus infection promote a pathway for NK cell-mediated liver damage [J]. *J Exp Med* 2007, 204(3):667–80.
- [7] Nelson N P, Easterbrook P J, McMahon B J. Epidemiology of hepatitis B virus infection and impact of vaccination on disease [J]. *Clin Liver Dis* 2016, 20(4):607–28.
- [8] Sette A D, Oseroff C, Sidney J, et al. Overcoming T cell tolerance to the hepatitis B virus surface antigen in hepatitis B virus-transgenic mice [J]. *J Immunol* 2001, 166(2):1389–97.
- [9] Yang P L, Althage A, Chung J, et al. Hydrodynamic injection of viral DNA: a mouse model of acute hepatitis B virus infection [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, 99(21):13825–30.
- [10] Huang L R, Wu H L, Chen P J, et al. An immunocompetent mouse model for the tolerance of human chronic hepatitis B virus infection [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, 103(47):17862–7.
- [11] Lin F, Song Y, Liu D. Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA [J]. *Gene Ther* 1999, 6(7):1258–66.
- [12] Xu L, Yin W, Sun R, et al. Kupffer cell-derived IL-10 plays a key role in maintaining humoral immune tolerance in Hepatitis B virus-persistent mice [J]. *Hepatology* 2014, 59(2):443–52.
- [13] Chen Y, Wei H, Sun R, et al. Impaired function of hepatic natural killer cells from murine chronic HBsAg carriers [J]. *Int Immunopharmacol* 2005, 5(13–14):1839–52.
- [14] Chen Y, Sun R, Jiang W, et al. Liver-specific HBsAg transgenic mice are over-sensitive to Poly(I:C)-induced liver injury in NK cell- and IFN- γ -dependent manner [J]. *J Hepatol* 2007, 47(2):183–90.
- [15] Fisicaro P, Valdatta C, Boni C, et al. Early kinetics of innate and adaptive immune responses during hepatitis B virus infection [J]. *Gut* 2009, 58(7):974–82.
- [16] Guidotti L G, Rochford R, Chung J, et al. Viral clearance without destruction of infected cells during acute HBV infection [J]. *Science* 1999, 284(5415):825–9.

Natural killer cell promotes the HBV clearance *via* secreting IFN- γ

Hu Xin, Hu Chunsong, Huang Baojun

(Dept of Immunology, School of Basic Medical Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the mechanism of NK cell in eliminating the Hepatitis B virus during HBV infection. **Methods** Acute HBV infection model was established by injecting adult mice hydrodynamically with 20 μ g of pGEM4Z/HBV1.2 plasmid. This model was evaluated by detecting serum level of HBsAg and HBeAg in liver tissue at the indicated time points by radioimmunoassay and immunohistochemistry respectively. The variation of frequency and absolute number of NK cell was analyzed between wide type (WT) mice and HBV plasmid-injected mice. Furthermore, the activation and the IFN- γ production of NK cell were investigated in these mice by flow cytometry. HE staining and alanine transaminase (ALT) detection were used to observe liver injury. To test whether NK cell and IFN- γ were involved in HBV elimination, we used PK136 antibody to clear NK cell and IFN- γ neutralization antibody to block IFN- γ effect. **Results** After the hydrodynamic injection with 20 μ g of pGEM4Z/HBV1.2, the serum level of HBsAg and expression of HBeAg in liver tissue were very high at 1 week, but then decreased gradually. However, these antigens almost became negative at 4 to 5 weeks, which mimic acute HBV infection patients. Compared with NK cell from WT mice, the frequency and absolute number of NK cell increased significantly from HBV mice. Also, the NK cells express higher level of CD69 and produce more IFN- γ . Meanwhile, there was no liver injury in HBV mice. Depletion of NK cell or blocking IFN- γ effect in HBV mice could significantly increase the level of HBV related antigens. **Conclusion** In the mouse model of acute HBV infection, NK cell could promote the HBV elimination through secreting IFN- γ .

Key words HBV; NK cell; IFN- γ