

318-322

2

R512.63
R373.21

丙型肝炎病毒 NS3 蛋白辅助 T 细胞表位研究*

徐俊杰, 汪涛, 齐连权, 王海涛**

(军事医学科学院微生物流行病学研究所, 北京 100071)

摘要:对 2 例 HCV 持续性感染者 2 个时间点 NS3 区 C 末端克隆测序, 研究 HCV NS3 蛋白一个辅助 T 细胞表位(氨基酸位 1248-1261)在 HCV 感染者体内的保守性; 人工合成该表位进行淋巴细胞增殖试验和抑制试验, 观察该表位引起免疫应答的水平 and 特点; 通过“刺激-休息-刺激”多轮循环建立该表位特异性的 T 细胞系, 并用流式细胞仪鉴定表型。结果发现该表位在 2 个病人 2 个时间点均未变化; 观察的 2 例 HCV 持续性感染者和 1 例感染恢复者均对该表位有较强 CD4⁺ T 细胞应答。建立了针对该表位的表型均一的 CD4⁺ 辅助 T 细胞系。本研究提示该表位是一个序列保守的强辅助 T 细胞表位, 对 HCV T 细胞疫苗的研制有一定意义。

关键词:丙型肝炎病毒; 辅助 T 细胞; 表位; T 细胞系

中图分类号: R373.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5125(2000)04-0318-05

HCV 是病毒性肝炎的主要病原之一, 其持续性感染和慢性化机理还不清楚。已发现感染者体内辅助 T 细胞应答水平与病情的转归和 IFN 疗效关系密切^[1-3]。其中对 HCV NS3 蛋白有较强辅助 T 细胞应答的病人多呈自限性发病^[2]。在 NS3 蛋白内存在一个 14 个氨基酸的强辅助 T 细胞表位(氨基酸位 1248-1261), 能被大多数 HLA-DR 分子提呈产生应答^[4]。我们研究了该表位在不同病人和同一病人不同时间点的序列保守性, 在感染恢复者和持续性感染者体内的应答水平和特点, 并建立了表位特异性的 T 细胞系, 为进一步研究打下基础。

1 材料和方法

1.1 病例

2 例 HCV 持续性感染者(编号为 291, 941)和 1 例感染恢复者(编号为 681), 已随访多年, 其中 291、941 HCV RNA 和抗-HCV 持续阳性, 681 HCV RNA 转阴, 抗-HCV 持续阴性。8 例健康献血者作为对照组。两组均无菌取外周血, 用 Ficoll-Paque Plus(瑞典 Pharmacia 公司)分离外周血单个核细胞(PBMC), 在液氮中保存备用。

1.2 HLA- II 分型

用泰萨奇 HLA- II 分型干板(美国 One lambda 公司)对 3 例患者进行 HLA- II 分型, 由解放军 307 医院免疫室协助完成。

收稿日期: 1999-08-16, 修回日期: 1999-12-21

* 基金项目: 国家自然科学基金重点资助项目(39630020)

作者简介: 徐俊杰(1972年-), 男, 博士研究生, 主要从事肝炎病毒的分子生物学和免疫学研究。

** 通讯作者: 王海涛(1950年-), 男, 研究员, 博士生导师, 主要从事分子病毒学研究。

1.3 序列测定

RT-PCR 扩增 291、941 病人 96、99 年两个时间点 HCV NS3 区 C 端(1347 bp), PCR 产物和 T 载体(本室自制)连接,克隆测序,观察辅助 T 细胞表位(简称 GY)的保守性。扩增引物:外引物上游 5'-CCGTTGAGTC-CATGGAA-3', 下游 5'-GACAAGACAATCCTACCC-3'; 内引物上游 5'-TCCACCATGGTCTTCACGGACAAC-3', 下游 5'-ATAAGCTTGGTGACGACCTCCAGGTC-3'。序列分析采用 Goldkey 软件。

1.4 表位合成

用 433A 型多肽合成仪(美国 PE 公司)合成 GY 肽,序列为 GYKVLVILNPSVAAT,经 HPLC 分析,纯度 > 90%。由军事医学科学院生物工程研究所协助完成。用无血清 RPMI1640 培养液配成 0.5 mg/mL,分装后 -20℃ 保存备用。

1.5 淋巴细胞增殖试验和抑制试验

3 例患者 PBMC 分别用含 10% 人 AB 型血清(美国 Omega 公司)的完全 RPMI1640 培养液(1640-10AB)配成 1×10^6 /mL, 96 孔板每孔 200 μ L, 并加 GY 肽至 10 μ g/mL。每例患者加肽和不加肽刺激各做 3 个复孔,在 37℃, 5.0% CO₂ 的培养箱中培养 5 d, 细胞收获前 16 h 在每孔中加入 1 μ Ci³H-TdR (20 Ci/mmol, 美国 NEN life science 公司), 收获细胞测液闪, 结果用刺激指数 SI 表示(SI = 加肽孔每分钟脉冲数(cpm)/不加肽孔 cpm), 以 SI > 2 为有明显增殖作用。对照组操作相同。抑制试验:在做增殖试验时,加 GY 肽的同时分别加 CD4 或 CD8 单抗(北京邦定泰克公司), 观察其对淋巴细胞增殖的抑制作用。

1.6 T 细胞系的建立

采用“刺激-休息-刺激”法^[5]。取 941 病人 PBMC, PBS 洗两遍,用 1640-10AB 配成 0.5×10^6 /mL, 24 孔板每孔 2 mL, 并加 GY 肽至 10 μ g/mL, 在 37℃, 5.0% CO₂ 的培养箱中培养。第 5 天加重重组人 IL-2(军事医学科学院生物工程研究所产)至 200 u/mL, 第 14 天用 Ficoll-Paque 分离 T 细胞, 2×10^5 T 细胞与 1×10^6 经丝裂霉素 C 处理的 941PBMC(作为滋养细胞和抗原提呈细胞)混合,加 GY 肽和 IL-2 至 10 μ g/mL 和 200 u/mL, 进行第 2 轮刺激。以后每 2 周刺激 1 次, 4 轮刺激之后做 FACS 检测 T 细胞系表型均一性。

1.7 T 细胞系 FACS 分析

2×10^5 刺激 4 轮 T 细胞用洗液(含 2% 小牛血清, 0.02% NaN₃ 的 PBS)洗两遍, 分别加 CD4 或 CD8 单抗置冰上 30 min, 洗 3 遍后加 FITC 标羊抗鼠 IgG(华美公司)置冰上 30 min, 洗 3 遍, 1% 多聚甲醛固定后做 FACS。941 PBMC 同样操作作对照。

2 结果

2.1 HLA-Ⅱ分型

结果见表 1。

表 1 3 例标本 HLA-Ⅱ 分型结果

Table 1 HLA class II typing of three patients

标本号 No. of specimen	HLA-Ⅱ HLA-Ⅱ pattern
941	DR11, 7; DR52, 53; DQ2, 7
291	DR8, 15; DR52, -; DQ1, -
681	DR4, 7; DR53, -; DQ2, -

2.2 序列测定

对 2 例 HCV 持续性感染者(291、941)两个时间点(96 年, 98 或 99 年)HCV NS3 区 C 端进行了克隆测序, 序列结果已在 GenBank 注册, 注册号分别为 AF156794, AF156795, AF152343, AF156793。用 Gold-key 软件将序列翻译成氨基酸, 其中部分序列比较如下(图 1), 可见辅助 T 细胞表位

GY 的序列(图 1 中划线部分)在两个病人两个时间点均相同。

2.3 淋巴细胞增殖试验和抑制试验

结果见表2。3例HCV感染者291、941、681的刺激指数(SI)均大于2,表明3例患者对GY表位均有明显增殖作用,而对照组SI均小于1.6。抑制试验显示,在加入CD4单抗后T细胞增殖被抑制,而加入CD8单抗后仍有明显增殖。表明为CD4阳性细胞增殖。

```

94196  VFTDNSSPPAVPQTFQVAHLHAPTCSGKSTKVPAAYAAQGYKVLVNLNPSVAATLGFGAYT
94199  VFTDNSSPPAVPQTFQVAHLHAPTCSGKSTKVPAAYAAQGYKVLVNLNPSVAATLGFGAYM
29196  VFTDNSSPPAVPQTFQVAHLHAPTCSGKSTKVPAAYAAQGYKVLVNLNPSVAATLGFGAYM
29198  VFTDNSSPPGVPQTFQVAHLHAPTCSGKSTKVPAAYAAQGYKVLVNLNPSVAATLGFGAYM
*****
94196  SKAHGIDPSIRTGVRTITTCGSPITYSTYKFLADGGCSGGAYDIICDECHSTDSTTILG
94199  SKAHGIDPSIRTGVRTITTCGSPITYSTYKFLADGGCSGGAYGIIICDECHSTDSTTILG
29196  SKAHGIDPSIRTGVRTITTCGSPITYSTYKFLADGGCSGGAYDIICDECHSTDSTTILG
29198  SKAHGIDPSIRTGVRTITTCGSPITYSTYKFLADGGCSGGAYDIIMCDECHSTDSTTILG
*****
94196  IGTVLDQAETAGARLVVLATATPPGCVTVPHPNIQEVALSNTGEIPFYGKAIPIEAIKGG
94199  IGTVLDQAETAGARLVVLATATPPGCVTVPHPNIQEVALSNTGEIPFYGKAIPIEAIKGG
29196  IGTVLDQAETAGARLVVLATATPPGCVTVPHPNIQEVALSNTGEIPFYGKAIPIEAIKGG
29198  IGTVLDQAETAGARLVVLATATPPGSITVPHPNIQEVALSNTGEIPFYGKAIPIEAIKGG
*****
    
```

图1 2例持续性感染者2个时间点HCV NS3区部分氨基酸序列比较

Fig. 1 Partial amino acids sequence of HCV NS3 region of two chronic patients in two different time

表2 淋巴细胞增殖试验和抑制试验结果

Table 2 Summary of T lymphocyte Proliferation Assay and Inhibition Experiment

标本号 No. of specimen	刺激指数(SI) Stimulation Index		
	GY	GY + CD4McAb	GY + CD8McAb
291	3.29	0.60	2.94
941	3.98	0.56	3.04
681	3.81	未测	未测
对照组	<1.6	未测	未测

2.4 T细胞系的建立和FACS分析

HCV感染者941PBMC经GY肽反复刺激4轮后建立了T细胞系,FACS分析结果:941PBMC中CD4⁺细胞为34.9%,而T细胞系中CD4⁺细胞为86.4%(图2),考虑T细胞系中仍有滋养细胞存在,可认为已获得较均一的T细胞系。

3 讨论

丙型肝炎的发病机理十分复杂,已知机体的细胞免疫起重要作用^[1,6-8]。其中HCV特异性CD4⁺辅助T细胞能识别和MHC II类分子结合的病毒抗原,是感染过程的主要免疫调节细胞,与HCV感染的恢复有关^[2]。已发现对IFN治疗敏感的患者中CD4⁺T细胞反应较强^[3,9]。在约50%的慢性丙型肝炎中有对一个或多个HCV抗原的CD4⁺T细胞反应,最多的是对C蛋白,其次是对NS4蛋白;而在急性自限性丙肝病人中,有更多对NS3蛋白的CD4⁺T

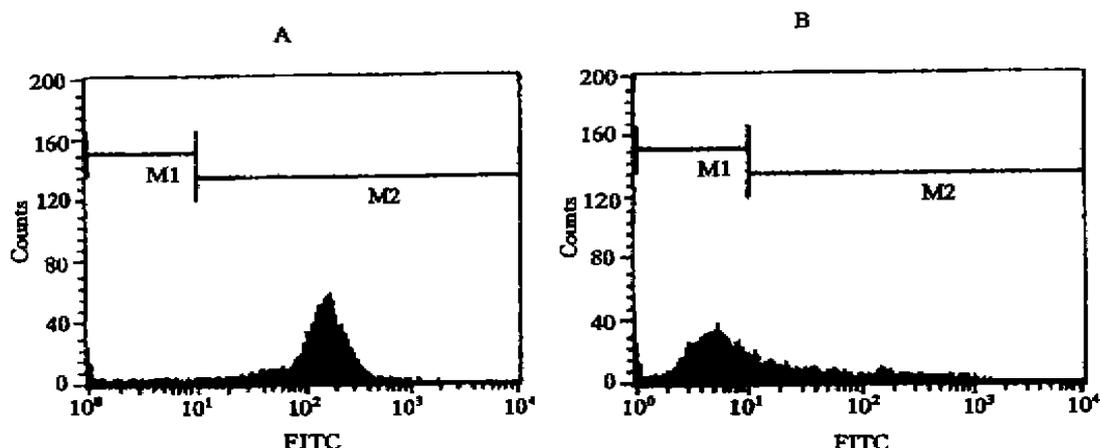


图2 T细胞系 FACS 分析结果

Fig. 2 Facs analysis of T-cell line

A: staining with a CD4 McAb B: staining with a CD8 McAb

细胞反应。Diepolder 等^[4]发现在 NS3 蛋白内存在一个 14 个氨基酸的强辅助 T 细胞表位(氨基酸位 1 248-1 261),能被大多数 HLA-DR 分子提呈产生应答,针对该表位的辅助 T 细胞应答强度与 HCV 感染的控制和疾病的转归密切相关,认为该表位对发展 HCV T 细胞疫苗有重要意义。我们检索了 GeneBank 中 33 个 HCV 全序列,发现仅有 4 个序列该表位存在 1 个氨基酸的差异,表明该表位是高度保守的。本研究对 2 例 HCV 持续性感染者 2 个时间点 NS3 区 C 末端进行了克隆测序,结果显示 GY 表位均未发生改变,证实该表位不易发生变异,有进一步研究的必要。

我们合成了 GY 表位,进行了体外淋巴细胞增殖试验,结果显示 3 例 HCV 感染者均对该表位有明显增殖反应,但他们的 HLA II 类型别却不同,表明该表位能被不同 HLA-DR 分子提呈。国外研究^[4,10]认为急性自限性丙肝患者对该表位的应答较强,慢性患者则较弱或检测不到,而我们的结果显示 2 例持续性感染者也有明显应答。这 2 例感染者感染 10 年来,肝功能一直正常,无明显发病迹象,推测其体内较强的辅助 T 细胞应答对控制病情的发展有一定作用。

我们用 CD4 和 CD8 单抗做了增殖抑制试验,结果表明增殖反应能被 CD4 单抗抑制,却不被 CD8 单抗抑制,证实了针对 GY 表位的反应是 CD4⁺ 辅助 T 细胞应答。将患者 941 的 PBMC 经过 GY 表位的多轮刺激,建立了特异性的 T 细胞系,FACS 结果表明,T 细胞系表型为均一的 CD4⁺。GY 表位特异性 T 细胞系的建立为获得特异性 T 细胞克隆,进一步研究该表位的功能特点及作为 T 细胞疫苗的可能性打下基础。

参 考 文 献

- [1] Koziel MJ. The role of immune responses in the pathogenesis of hepatitis C virus infection [J]. *J Virol Hepat*, 1997, 4 (Sup12):31-34
- [2] Diepolder HM. The role of hepatitis C virus specific CD4⁺ T lymphocytes in acute and chronic hepatitis C [J]. *J Mol Med*, 1996, 74:583-588
- [3] Hoffmann RM, Diepolder HM, Zachoval R, *et al*. Mapping of Immunodominant CD4⁺ T lymphocyte epitope of hepatitis C virus antigens and their relevance during the course of chronic infection [J]. *Hepatology*, 1995, 21:632-638
- [4] Diepolder HM, Gerlach JT, Zachoval R, *et al*. Immunodominant CD4⁺ T-cell Epitope within nonstructural protein 3 in acute hepatitis C virus infection [J]. *J Virol*, 1997, 71(8):6011-6019
- [5] Nutman TB. *Current Protocols in Immunology* [M]. New York: Greene Publishing and Wiley-Interscience, 1991, 7:191-7
- [6] Spengler U, Lechmann M, Irrgang B, *et al*. Immune responses in hepatitis C virus infection [J]. *J Hepatol*, 1996, 24 (supple 2):20-25
- [7] Koziel MJ. Immunology of viral hepatitis [J]. *Am J Med*, 1996, 100(1):98-109
- [8] Rice CM, Walker CM. Hepatitis C virus-specific T lymphocyte responses [J]. *Current Opinion in Immunology*, 1995, 7 (4):532-538
- [9] Missale G, Bertoni R, Lamonaca V, *et al*. Different clinical behaviors of acute hepatitis C virus infection are associated with different vigor of the antiviral cell-mediated immune response [J]. *J Clin Invest*, 1996, 98(3):706-714
- [10] Tabatabai NM, Bian TH, Rice CM, *et al*. Functionally Distinct T-cell epitopes within the hepatitis C virus non-structural 3 protein [J]. *Human Immunol*, 1999, 60:105-115

The Study of a Helper T-cell Epitope in Hepatitis C Virus Non-structural 3 Protein

XU Jun-jie, WANG Tao, QI Lian-quan, WANG Hai-tao

(*Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Science, Beijing 100071, China*)

Abstract: The genes of C terminal of HCV NS3 region of two chronic patients in two different time were sequenced to analyse the conservation of a helper T-cell epitope in HCV NS3 protein (amino acids 1248 to 1261). The epitope was synthesized and the immune response to it in a self-limited patient and two chronic patients was detected using T lymphocyte proliferation assay and inhibition experiment. The epitope-specific T-cell line was established by several cycles of "stimulation-relax-stimulation" and analysed with a FACScan. The results indicated that the epitope didn't change in two chronic patients, all three patients had strong CD4⁺ T-cell response to the epitope, and epitope-specific CD4⁺ T-cell line was established. These data suggest that the epitope is a conserved strong helper T-cell epitope and could become a promising candidate for designing a CD4⁺ T-cell vaccine.

Key words: Hepatitis C virus; Helper T-cell; Epitope; T-cell line