

利用流式细胞术测定 CTL 活性方法在 EIAV 免疫学中的应用 *

童晓^{1,2},沈弢²,梁华²,孟庆来^{1,2},钟卫洲¹,马燕²,魏丽丽³,相文华³,
沈荣显³,徐建青²,张晓燕^{2**},邵一鸣²

(1. 中国科学院武汉病毒研究所分子病毒学重点实验室,湖北武汉 430071;2. 中国疾病预防与控制中心国家性病艾滋病预防控制中心,北京 100050;3. 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所,黑龙江哈尔滨 150001)

A Novel Flow Cytometric Assay for Evaluating Antigen-specific CTL Responses and Its Application in EIAV Immunological Study

TONG Xiao^{1,2}, SHEN Tao², LIANG Hua², MENG Qing-lai^{1,2}, ZHONG Wei-zhou¹, MA Yan², WEI Li-li³,
XIANG Wen-hua³, SHEN Rong-xian³, XU Jian-qing², ZHANG Xiao-yan^{2*}, SHAO Yi-ming²

(1. The Key Laboratory of Molecular Virology, Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Science, Wuhan 430071, China; 2. Division of Virology and Immunology, China CDC/National Center for STD/AIDS Prevention and Control, Beijing 100050, China; 3. Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001, China)

Abstract: A novel flow cytometric assay for evaluating *Equine infectious anemia virus* (EIAV) antigen-specific CTL responses was established and by using PKH-26 and CFSE as cell colouration dyes. Compared with the traditional ^{51}Cr -release assay, the new method is more sensitive, has a decrease background and avoids the risk of radioactive exposure to workers. The cellular immuno-response against EIAV infection was detected using this method. The maturation of EIAV antigen-specific CTL response was characterized. The result showed that the CTL response reached a maximum at three months and remained relatively high. The novel method is directly applicable to research on the immune mechanism of the EIAV attenuated vaccine.

Key words: CTL; EIAV; Flow Cytometry

摘要: 利用 PKH-26 和 CFSE 两种荧光染料对靶细胞染色,建立了一种通过流式细胞术进行马传染性贫血症病毒(*Equine infectious anemia virus*, EIAV)抗原特异性细胞毒性 T 淋巴细胞(Cytotoxic T lymphocytes, CTL)反应的新方法,避免了经典的 ^{51}Cr 释放法对检测人员的放射线威胁,降低了本底释放,提高了检测的灵敏度。将该检测方法用于检测 EIAV 疫苗接种马和嵌合克隆接种马的细胞免疫反应变化趋势,数据显示细胞免疫反应在接种后 3 个月达到成熟阶段而后保持在较高的反应水平。该方法的成功建立和应用为研究 EIAV 减毒疫苗的免疫机制提供了好的研究手段,也为其他病毒的免疫学研究提供了新的参考方法。

关键词: 细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL); 马传染性贫血症病毒(*Equine infectious anemia virus*, EIAV); 流式细胞测定术
中图分类号:S852.65 文献标识码:A 文章编号:1003-5125(2005)06-0642-05

CD8⁺ 细胞毒性 T 淋巴细胞(Cytotoxic T lymphocytes, CTL)在机体免疫系统中占据重要作用^[1],通过细胞毒性作用可清除病毒或胞内细菌感染的细胞、肿瘤细胞,或者通过分泌细胞因子抑制细胞内的病原微生物等。CTL 是通过 T 细胞受体识

别细胞表面的 MHC-I 类分子与抗原表位肽的复合体来确定靶细胞^[2],其细胞毒性既可通过细胞表面的 CD95L 分子诱导靶细胞凋亡,也可通过分泌细胞毒性分子(穿孔素、颗粒素酶等)杀伤靶细胞^[3,4,5]。在过去的 30 多年里,CD8⁺ T 淋巴细胞的

* 收稿日期:2005-07-08,修回日期:2005-09-14

* 基金项目:国家自然科学基金资助(30371319)。

作者简介:童晓(1969—),男,硕士,助理研究员,主要从事医学病毒学研究。

** 通讯作者:张晓燕(1966—),女,博士,副教授,主要从事医学病毒学研究。

Corresponding author, Tel:010-87789398, E-mail: zhang_xyen2002@yahoo.com.cn

CTL 活性都是采用经典的 Cr⁵¹ 释放法来完成^[6]。Cr⁵¹ 释放法通过检测被杀伤靶细胞释放的放射量来计算 CTL 反应的强度,这一经典的检测方法有其不足之处,包括较高的本底释放、Cr⁵¹ 对效应细胞的作用以及放射性对检测人员的伤害等。近十年来,新的抗原特异性 T 淋巴细胞的检测方法先后应用于免疫学领域,包括通过检测细胞因子来测定抗原特异性 T 细胞的 ELISPOT 技术^[7]、利用 MHC 四聚体显示 T 细胞受体的染色技术^[8]以及胞内细胞因子染色技术^[9]等,这些新方法在一定程度上取代了 Cr⁵¹ 释放法而成为衡量 T 淋巴细胞免疫反应强度的指标,并提供了比 Cr⁵¹ 释放法更高的反应灵敏度。尽管检测细胞因子的水平或 T 细胞表面受体和 CTL 反应具有一定的相关性,但研究表明, T 细胞的杀伤功能与细胞因子的分泌在特定情况下可出现分离^[10,11],而 T 细胞受体阳性的细胞并不一定具有功能^[12],所以,细胞因子水平或 T 细胞受体并不能取代 CTL 反应的功能评价。在 Cr⁵¹ 释放法之外,也曾出现其他的 CTL 检测方法,例如胞内乳酸脱氢酶释放反应^[13]以及精心设计的报告细胞系统^[14],但都不能广泛使用。近年来,流式细胞术被用于检测细胞的组成变化^[15]和裂解状况^[16],这给 CTL 的反应提供了新的检测途径。在对靶细胞进行标记之后,通过检测标记的保留或者消失的状况可以计算 CTL 的反应强度。用于对靶细胞进行标记的染料需要具备如下特点:不能改变细胞形态和功能,在细胞裂解后能够均匀释放,细胞完整情况下具有较低的本底释放水平。经过许多的试验,PKH-26 和 CFSE 被认为是符合这些条件的两种染料。PKH-26 是一种脂类染料,用于细胞膜的染色,已经在体内细胞跟踪^[17]和流式细胞术^[18]中得以应用。而 CFSE 是一种细胞质染色剂,能够顺利穿过细胞膜,在细胞内被降解成 CFSE 而不能透过细胞膜^[19],从而使这种染料的本底释放水平远低于 Cr⁵¹。CFSE 也已经被多次用于淋巴细胞增殖的检测^[20],近几年 CFSE 也逐渐被用于体内 CTL 反应的检测以及体外细胞凋亡的检测,PKH-26 和 CFSE 也曾被用于检测巨细胞病毒特异性的体外 CTL 反应^[21]。

本文建立了一种利用 PKH-26 和 CFSE 对靶细胞染色,采用流式细胞术进行 EIAV 抗原特异性 CTL 反应检测的新方法,并将该方法用于对 EIAV 感染马的细胞免疫反应跟踪,检测了 EIAV 疫苗株感染性克隆和 env 基因替换嵌合克隆衍生病毒感染马的 CTL 反应成熟过程,结果显示动物在接种病毒后的第三个月达到细胞免疫成熟期,其后细胞免疫

反应保持在较高水平波动。在确认该方法可靠性之后,已经将该检测法进一步用于 EIAV 减毒疫苗的免疫机理的研究中。

1 材料和方法

1.1 毒种及血样

EIAV 疫苗株 FDV 感染性克隆 pLGFD3-8 及其衍生病毒为本实验室构建;在 pLGFD3-8 基础上将 env 基因替换为强毒(LN40 株)序列得到感染性克隆 SFDLN-11 及其衍生病毒^[22];衍生病毒经颈部皮下接种到实验马,在接毒后 15、30、45、60、75、90、120、150 天静脉采集全血。纯化 DLV₁₂₆ 病毒由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所提供。

1.2 主要试剂

PKH-26 荧光染料购自 Sigma; 荧光染料羧基荧光素二醋酸盐琥珀酰亚胺酯(5-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester, CFSE) kit 购自 Molecular Probe 公司; 1640 培养液和胎牛血清购自 GIBCO 公司; 人白细胞介素 IL-2 购自 Roche 公司; PWM 购自 Sigma; 马血清购自北京元亨圣马生物技术公司; gp90 蛋白由本研究室前硕士生培养纯化; 其余试剂均为国产分析纯。

1.3 马外周血杀核细胞(Peripheral blood mononuclear cell, PBMC)的制备

采集马肝素抗凝全血 100mL, 40℃/500g 离心 30min, 取白细胞富集层置 4 倍体积含 1% 马血清 PBS 中, 将 PBS-细胞混合液缓慢加入 1/2 体积的淋巴细胞分离液, 220℃/500g 离心 30min。吸取中间淋巴细胞层, 加入等体积含 1% 马血清 PBS, 22℃/300g 离心 10min。细胞沉淀用 PBS 洗涤一次, 用含有 20U/mL 的 IL-2, 2.5mg/mL 的两性霉素 B 的 1640 完全培养液(10% 马血清, 1% PS, 1% G, 1% HEPES, pH7.2)重悬细胞, 计数备用。

1.4 效应细胞的制备

上述新分离 PBMC 1×10^7 个离心收集后加入 100μL 纯化 DLV₁₂₆ 病毒(5×10^3 TCID₅₀/mL)感染 PBMC 中的巨噬细胞, 感染 1h 后, 离心收集再添加 1640 完全培养液 6mL, 1×10^7 /mL 细胞浓度, 37℃, 置 CO₂ 培养箱中培养 7d。在此培养体系中, 感染 EIAV 的巨嗜细胞可作为刺激细胞, 刺激相应效应细胞的增殖活化。

1.5 用 PKH-26 标记靶细胞

新分离 PBMC 加入 PWM 2.5 μg/ml 刺激, 调节细胞浓度至 2×10^6 /mL, 37℃ 培养, 第 4d 换新鲜的培养基, 第 7d 时, 每瓶细胞等分为两瓶, 其中一瓶

加入适量的 EIAV 病毒的 gp90 蛋白 ($20\mu\text{g}/\text{mL}$) 37°C 孵育 5h, 作为靶细胞; 另一瓶加入等体积的无菌去离子水, 作为对照细胞。用 PBS 缓冲液洗靶细胞和对照细胞, 按浓度计算分别取 1×10^6 细胞数量, 加入 PKH-26 染料, 终浓度为 $2.5 \times 10^{-6}\text{ mol/L}$, 室温放置 3~5min, 立即用等量的灭活胎牛血清加入细胞悬液终止染色, 室温 1min 后, 400g 离心 5min; 用 10 mL PBS 洗涤两遍, 离心 5min, 上清弃去。

1.6 CFSE 再标记靶细胞

CFSE 用 PBS 稀释至终浓度 $2.5 \times 10^{-6}\text{ mol/L}$, 加入靶细胞, 37°C 孵育 15min, 等量的灭活胎牛血清终止染色, 400g 离心 5min; 对照细胞不用 CFSE 染色。靶细胞用 PBS 洗一次, 用 1640 完全培养液重悬, 37°C 培养 1h(释放本底的 CFSE), 细胞用 PBS 洗两遍, 用 R-15 medium(加有 15% 热灭活胎牛血清的 1640 完全培养基)重悬;

1.7 CTL 杀伤反应

将靶细胞和对照细胞等数量混合; 在 U 型 96 孔板按复孔每孔加入 5×10^4 的靶细胞及对照细胞混合物; 效应细胞按不同效靶比 E : T (10 : 1、20 : 1 或 50 : 1) 与靶细胞混合; 剩下体积用完全 1640 培养液补足 $200\mu\text{L}$; 在 $37^\circ\text{C}, 5\% \text{CO}_2$ 温育 5h; 将 U 型 96 孔板离心 5min; 细胞沉淀用 $150\mu\text{l} 1\%$ 多聚甲醛(固定液)重悬; 24h 内流式细胞仪检测。(氩灯激光激发波长 488nm, CFSE 收集波长 530/25nm,

PKH-26、收集波长 585/40nm)。

2 结果

2.1 流式细胞术的 CTL 检测示例

图 1 显示了完成 CTL 杀伤反应后, 流式细胞仪上观察到的体系内各细胞类群的分别计数。采用 PKH-26 和 CFSE 双染色法可以将效应细胞、靶细胞和对照细胞有效的区分开来并单独计数。图 1A 中显示的是全体细胞群, 其中活细胞划定为 R1 门; 效应细胞没有被任何染料染色, 分布于图 1B 的左下区域, 因为不作为计算的内容未单独划门给予计数; 由于靶细胞和对照细胞都有 PKH-26 染色, 可以通过图 1C 的 R2 门将效应细胞排除在外; 根据对照细胞和靶细胞在 CFSE 染色上的差别, 将它们分别计数, 如图 1D 中的 R3 和 R4 门。

对照细胞因为未经抗原刺激, 细胞表面没有特异性的抗原, 效应细胞无法识别, 从而免于被杀伤; 而靶细胞经过与病毒 GP90 蛋白共孵育, 导致细胞表面有病毒特异性的抗原呈递, 从而被效应细胞识别并杀伤, 由于对照细胞和靶细胞的初始浓度相同, 所以通过比较杀伤反应后靶细胞与对照细胞的数量变化就能得出靶细胞被特异杀伤的比例, 计算公式如下:

$$\text{CTL 杀伤比} = (R3 - R4)/R3 \times 100\%$$

R3 代表反应后对照细胞的计数, R4 代表反应后靶细胞的计数, 二者之差代表反应中被 CTL 反应

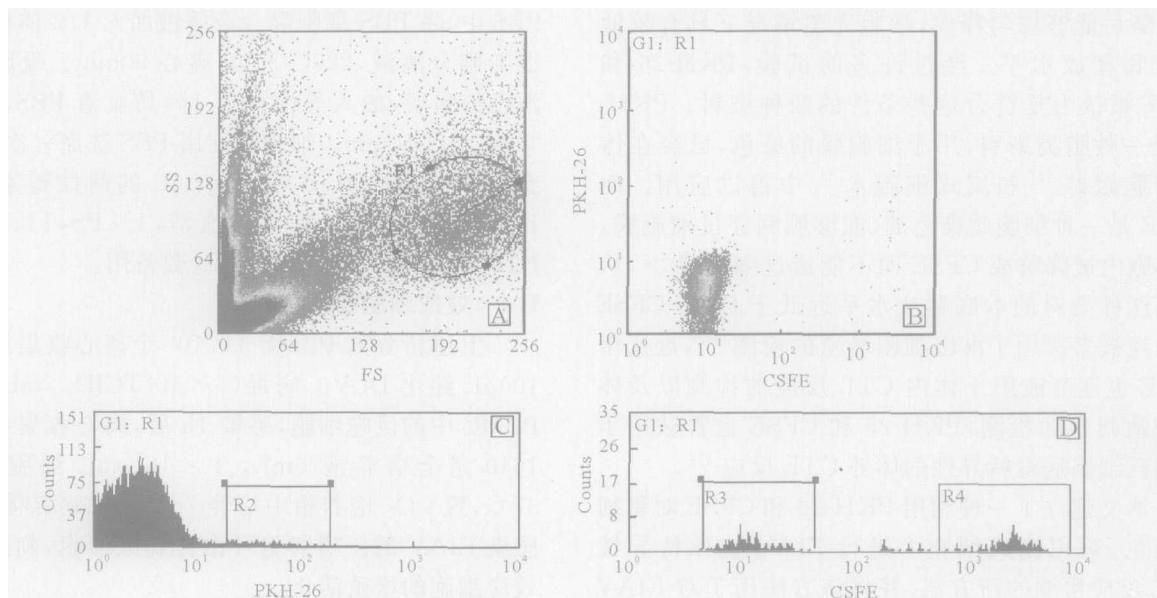


图 1 PKH-26 和 CFSE 染色可区分不同类型细胞

Fig. 1 PKH-26 and CFSE stainings discern different cells

A: Gated on alive cells (demonstrate a live gate, R1). B: Non-stained effector cells at the left bottom. C: Gated on PKH-26 stained cells (R2). D: Gated on target cells (R4) and control cells (R3).

清除的细胞数,此差值屏蔽了细胞自然死亡的影响。

2.2 不同效靶比对 CTL 检测结果的影响

首先比较了不同效靶比对 CTL 反应的影响,图 2 数据显示,随着效靶比的升高,检测到的杀伤比也相应提高,效靶比从 10 增加到 20 可以较大幅度的增加杀伤比;而将效靶比从 20 倍增加到 50 倍,杀伤效果提高幅度减缓,说明 20 倍效靶比已经能够有效反映 CTL 的反应水平。考虑到采用 50 倍效靶比对效应细胞的用量过大,反应体系细胞浓度太高有可能会对反应产生不利影响,在随后的测定中固定采用 20 倍的效靶比进行 CTL 反应。

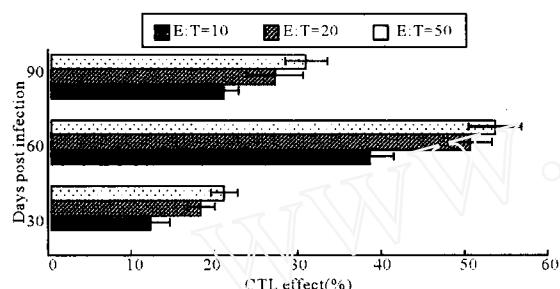


图 2 疫苗株接毒后不同效靶比对 CTL 反应的影响比较

Fig. 2 Cytotoxicity at different Effector/Target ratio with PBMCs from horse infected with pLGFD3-8.

2.3 病毒接种马的抗原特异性 CTL 反应变化趋势

在建立了双染色流式分析术的 CTL 检测方法之后,我们采用该方法对疫苗毒接种马和 env 替换嵌合克隆毒接种马进行了 CTL 反应的跟踪分析。

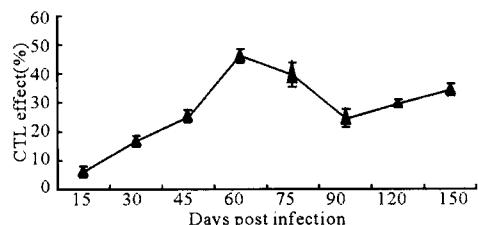


图 3 疫苗株接种马的 CTL 活性变化趋势

Fig. 3 CTL responses in a horse infected with vaccine strain Measured at the effector/target ratio of 20:1

图 3 显示了运用上述 CTL 检测法对疫苗株克隆衍生毒接种马细胞免疫反应成熟过程的监测,接种疫苗株病毒后,CTL 反应在第 2 个月后明显增加,在第 60 天达到最高的 46%,其后有所降低但仍保持在 20~30% 范围波动。

与疫苗接种马类似,env 基因替换的嵌合病毒接种马的 CTL 反应也在第二个月后快速增加,于第 75 天达到最高的 35.4%,其后有所下降并维持在 20~30% 的水平波动,如图 4。

将两匹马 CTL 反应相比较,它们的反应变化趋

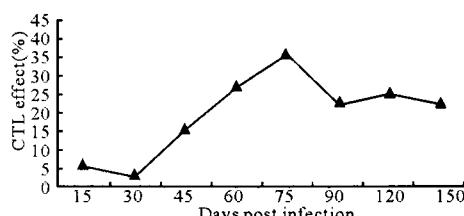


图 4 env 替换嵌合病毒接种马的 CTL 反应变化趋势

Fig. 4 CTL response of horse infected with env substrate chimeric virus Detected at a Effector/Target ratio of 20:1

势相近,都在第三个月达到最高,然后维持在一个相对较高的水平。疫苗株接毒的马反应成熟时间稍早于嵌合病毒接种马,疫苗株接毒马的最大 CTL 反应水平 46% 也高于嵌合病毒的 35.4%。说明 env 基因的替换在病毒的免疫源性上产生了一定的差别。

3 讨论

本研究成功地建立了一种新型检测 CTL 活性的方法,并应用于 EIAV 的免疫学研究之中。本方法的建立与文献中描述的方法有所不同,本方法在反应中采用了对照细胞作为内标的方式,即对照细胞和靶细胞同处一个反应体系;而文献所述方才采用的是外标法,对照反应和靶细胞杀伤反应分处不同的反应体系。内标法使得对照细胞和靶细胞处于完全相同的体系,对照细胞数和靶细胞数的差值计算能排除细胞自然死亡的干扰,给出更加准确和直接的数据。不过内标法反应体系的细胞浓度比外标法高,在本反应中并没有观察到较高的细胞浓度对反应结果产生不利影响。

CFSE 在细胞内的滞留效果远好于 Cr⁵¹,但是在染色时需要注意的是,在 CFSE 染色之后,需要放置至少 1h,一方面为了释放掉本底的 CFSE 泄露,另一方面也让 CFSE 的前体 CFDA 充分转变为不具有穿透能力的 CFSE。如果在 FATAL 反应期间有 CFSE 的释放,将会对未染色的效应细胞进行 2 次染色,这样就会在对照细胞和靶细胞之间出现一群中间态的细胞,着色强度比靶细胞低约 2 个数量级,需要在流式图上加以区分以免影响数据分析。

在 EIAV 特异性 CTL 反应中,效应细胞的活化是采用纯化 DLV₁₂₆ 病毒感染 PBMC 中的单核细胞,在 7 天的培养过程中,病毒在单核细胞内不断表达并提呈有效的抗原给效应淋巴细胞,从而达到活化效应细胞的目的。靶细胞的活化,在理论上使用抗原肽会有好的刺激效果,由于 EIAV 的 GP90 蛋

白上的 CTL 抗原表位还不是很明确,不同的马对不同的表位肽反应强度也有差异^[23],因而采用了完全的 GP90 蛋白作为刺激源。

通过流式细胞术 CTL 检测,比较观察了两种病毒接种马的 CTL 变化趋势,从数据上显示疫苗接种马具有更早的 CTL 反应成熟时间和更高的反应强度,但是由于统计学的原因和可能存在的个体差异,尚难以作出免疫源性上的强弱判断。本实验主要检测的是针对膜蛋白的 CTL 反应,一般认为,慢病毒的 CTL 反应表位主要集中在 gag 基因上,env 基因上的 CTL 表位较少而更多的是中和抗体表位,要考察 env 基因替换的免疫源性变化除了检测 CTL 的细胞免疫反应,还需要观察中和抗体水平差别。本检测方法成功的用于 EIAV 膜蛋白抗原特异性细胞免疫反应检测之后,本实验室已将该方法进一步扩展到 GAG 蛋白特异性的 CTL 检测,并将该方法用于 EIAV 减毒疫苗的免疫学机理的深入研究。

参考文献

- [1] Zinkernagel R M. Immunology taught by viruses [J]. Science, 1996, 271: 173-178.
- [2] Zinkernagel R M, Doherty P C. MHC-restricted cytotoxic T cells; studies on the biological role of polymorphic major transplantation antigens determining T-cell restriction-specificity, function, and responsiveness [J]. Adv Immunol, 1979, 27: 51-177.
- [3] Gallimore A, Dumrese T, Hengartner H, et al. Protective immunity does not correlate with the hierarchy of virus-specific cytotoxic T cell responses to naturally processed peptides[J]. J Exp Med, 1998, 187: 1647-1657.
- [4] Harty J T, Twinnereim A R, White D W. CD81 T cell effector mechanisms in resistance to infection[J]. Annu Rev Immunol, 2000, 18: 275-308.
- [5] Price G E, Gaszewska-Mastarlarz A, Moskophidis D. The role of alpha / beta and gamma interferons in development of immunity to influenza A virus in mice[J]. J Virol, 2000, 74: 3996-4003.
- [6] Brunner K T, Mauel J, Cerottini J C, et al. Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoidcells on 51 Cr-labelled allogeneic target cells in vitro; inhibition by isoantibody and by drugs[J]. Immunology, 1968, 14: 181-196.
- [7] Rininsland F H, Helms T, Asaad R J, et al. Granzyme B ELISPOT assay for ex vivo measurements of T cell immunity [J]. J Immunol Methods, 2000, 240: 143-155.
- [8] Kuroda M J, Schmitz J E, Barouch D H, et al. Analysis of Gag-specific cytotoxic T lymphocytes in simian immunodeficiency virus-infected rhesus monkeys by cell staining with a tetrameric major histocompatibility complex class I-peptide complex[J]. J Exp Med, 1998, 187: 1373-1381.
- [9] Maecker H T, Maino V C, Picker L J. Immunofluorescence analysis of T cell responses in health and disease[J]. J Clin Immunol, 2000, 20: 391-399.
- [10] Bartholdy C, Christensen J P, Wodarz D, et al. Persistent virus infection despite chronic cytotoxic T-lymphocyte activation in gamma interferon-deficient mice infected with lymphocytic choriomeningitis virus[J]. J Virol, 2000, 74: 10304-10311.
- [11] Belz G T, Xie W, Doherty P C. Diversity of epitope and cytokine profiles for primary and secondary influenza a virus-specific CD8+ T cell responses[J]. J Immunol, 2001, 166: 4627-4633.
- [12] Ueno T, Tomiyama H, Fujiwara M, et al. Functionally impaired HIV-specific CD8 T cells show high affinity TCR-ligand interactions[J]. J Immunol, 2004, 173: 5451-5457.
- [13] Senp A, Binns R M, Lechner R I. Improved protocol for colorimetric detection of complement-mediated cytotoxicity based on the measurement of cytoplasmic lactate dehydrogenase activity[J]. J Immunol Methods, 1996, 196: 175-180.
- [14] Schafer H, Schafer A, Kiderlen A F, et al. A highly sensitive cytotoxicity assay based on the release of reporter enzymes, from stably transfected cell lines[J]. J Immunol Methods, 1997, 204: 89-98.
- [15] Zamai L, Mariani A R, Zauli G, et al. Kinetics of in vitro natural killer activity against K562 cells as detected by flow cytometry[J]. Cytometry, 1998, 32: 280-285.
- [16] Aubry J P, Blaecke A, Lecoanet-Henchoz S, et al. Annexin V used for measuring apoptosis in the early events of cellular cytotoxicity[J]. Cytometry, 1999, 37: 197-204.
- [17] Rosenblatt-Velin N, Arrighi J F, Dietrich P Y, et al. Transformed and nontransformed human T lymphocytes migrate to skin in a chimeric human skin /SCID mouse model [J]. J Invest Dermatol, 1997, 109: 744-750.
- [18] Flieger D, Spengler U, Beier I, et al. Enhancement of antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC) by combination of cytokines[J]. Hybridoma, 1999, 18: 63-68.
- [19] Oostendorp R A, Audet J, Eaves C J. High-resolution tracking of cell division suggests similar cell cycle kinetics of hematopoietic stem cells stimulated in vitro and in vivo[J]. Blood, 2000, 95: 855-862.
- [20] Oehen S, Brdusch-Riem K, Oxenius A, et al. A simple method for evaluating the rejection of grafted spleen cells by flow cytometry and tracing adoptively transferred cells by light microscopy[J]. J Immunol Methods, 1997, 207: 33-42.
- [21] Sheehy M E, McDermott A B, Furlan S N, et al. A novel technique for the fluorometric assessment of T lymphocyte antigen specific lysis[J]. J Immunol Methods, 2001, 249: 99-110.
- [22] 何翔, 邵一鸣, 薛飞, 等. 感染性马传染性贫血病毒嵌合克隆的构建[J]. 病毒学报, 2003, 19: 128-132.
- [23] McGuire T C, Fraser D G, Mealey R H. Cytotoxic T Lymphocytes and Neutralizing Antibody in the Control of Equine Infectious Anemia Virus[J]. Viral Immuno, 2002, 15(4): 521-531.