

· 论著 ·

文章编号: 1007-8738(2013)05-0453-05

## 转基因表达 HBV 抗原特异性细胞毒性 T 淋巴细胞受体

吴静<sup>1,2</sup>, 王琳<sup>2</sup>, 刘妍<sup>2</sup>, 叶海燕<sup>3</sup>, 丁宁<sup>2</sup>, 刘永明<sup>1</sup>, 徐东平<sup>1,2\*</sup><sup>1</sup>桂林医学院, 广西 桂林 541004; <sup>2</sup>解放军 302 医院全军传染病研究所 肝衰竭研究中心病毒性肝炎研究室, 北京 100039;<sup>3</sup>桂林市第三人民医院肝病科, 广西 桂林 541004)

**[摘要]** 目的 通过逆转录病毒介导 HBV 抗原特异性细胞毒性 T 细胞 (CTL) 的 T 细胞受体 (TCR) 转基因表达, 初步观察其结合活性。方法 从 HLA-A2 阳性急性乙肝患者外周血中诱导、分选、克隆和扩增 HBV 抗原特异性 CTL; 提取细胞 RNA, 用 RT-PCR、5'-RACE 和 OVER-LAP PCR 等方法获取 TCR 的  $\alpha$  和  $\beta$  链编码基因; 构建 TCR 重组逆转录病毒, 介导特异性 TCR 分别在 Jurkat T 细胞和 HLA-A2 阳性健康人 CD8 T 淋巴细胞上表达。结果 从 1 例 HLA-A2 阳性急性乙肝患者样本中分别获得了 2 组 TCR V $\alpha$ 、V $\beta$  配对, 分别命名为  $\alpha 21\beta 13$ 、 $\alpha 15\beta 13$ , 包装的重组逆转录病毒滴度为  $(1.5 \sim 5.0) \times 10^5$  IU/mL, 用针对目标 TCR 的特异性 V $\beta$  链抗体 (抗 V $\beta 13$  TCR-PE) 和 HLA-A2 限制性表位特异性五聚体 (pentamer) 进行免疫荧光染色, 重组 TCR 在 T 细胞表面获得表达: 其中在 Jurkat 细胞上转人的 V $\beta 13$  链表达细胞占 1.06%~2.25%, 在 HLA-A2 阳性健康人 T 细胞上 V $\beta 13$  阳性细胞和 pentamer 阳性细胞分别占到 1.03%~2.06% 和 1.05%~1.12%, 在 HLA-A2 阴性健康人 T 细胞上 V $\beta 13$  阳性细胞和 pentamer 阳性细胞均低于 0.05%。结论 通过逆转录病毒介导可以使 HBV 特异性 CTL TCR 获得转基因表达, 具有结合 HLA-A2 限制性表位的活性。

**[关键词]** 乙型肝炎病毒; 细胞毒性 T 淋巴细胞; T 细胞受体; 表位特异性; 表达**[中图分类号]** R392.11, R373.2<sup>+</sup>1 **[文献标志码]** B

## Transgenic expression of T cell receptors on HBV-specific cytotoxic T lymphocytes

WU Jing<sup>1,2</sup>, WANG Lin<sup>2</sup>, LIU Yan<sup>2</sup>, YE Haiyan<sup>3</sup>, DING Ning<sup>2</sup>, LIU Yongming<sup>1</sup>, XU Dongping<sup>1,2\*</sup><sup>1</sup>Guilin Medical University, Guilin 541004; <sup>2</sup>PLA Institute of Infectious Diseases, Liver Failure Research Center, 302 Military Hospital of China, Beijing 100039; <sup>3</sup>Department of Liver Diseases, Guilin Third People's Hospital, Guilin 541004, China

**[Abstract]** **Objective** To express T lymphocyte receptors (TCRs) on hepatitis B virus (HBV)-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) mediated by retrovirus and investigate their binding affinity. **Methods** Peripheral blood mononuclear cells were isolated from acute hepatitis B patients with HLA-A2<sup>+</sup> phenotype, and after induced, HBV-specific CTLs were sorted out followed by cloning and proliferating. Cell RNAs were extracted. The sequences of TCR's  $\alpha$  and  $\beta$  chains were obtained by means of RT-PCR, 5' RACE and OVER-LAP PCR, for constructing TCR retrovirus vectors. Through retrovirus-mediated transduction, HBV-specific TCRs were expressed on Jurkat cells and CD8<sup>+</sup> T cells from HLA-A2<sup>+</sup> healthy subjects. **Results** Two paired TCR V $\alpha$  and V $\beta$ , respectively named  $\alpha 21\beta 13$  and  $\alpha 15\beta 13$ , were obtained from one patient with acute hepatitis B and HLA-A2<sup>+</sup>. The titers of packaged recombinant retroviruses were  $1.5 \times 10^5 - 5.0 \times 10^5$  IU/mL. Immunofluorescence staining by anti-V $\beta 13$  TCR-PE targeting the specific TCR and HLA-A2 restricted epitope-specific pentamer showed a positive expression of reconstructed TCR on T cells. The positive cells accounted for 1.06%~2.25% for V $\beta 13$  on Jurkat cells, 1.03%~2.06% for V $\beta 13$  chain and 1.05%~1.12% for the epitope-specific pentamer on T cells from healthy HLA-A2<sup>+</sup> subjects respectively. By contrast, only less than 0.05% cells from healthy HLA-A2<sup>-</sup> subjects were positive for either V $\beta 13$  or the pentamer. **Conclusion** TCRs on HBV-specific CTLs could be expressed by TCR gene transfer mediated by retrovirus, and they were proved with binding affinity to HLA-A2-restricted epitope.

**[Key words]** hepatitis B virus; cytotoxicity T lymphocytes; T cell receptor; epitope-specific; expression

收稿日期: 2012-12-04; 接受日期: 2013-01-11

基金项目: 国家自然科学基金(30771898); 军队“十一五”医药卫生科研杰出人才项目(06J024)

作者简介: 吴静(1985-), 女, 河北石家庄人, 硕士研究生

Tel: 010-66933391; E-mail: wujingreference@163.com

\*Corresponding author, 徐东平, E-mail: xudongping@yahoo.com

肝细胞内乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)清除主要依靠 HBV 抗原表位特异性细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxic T lymphocytes, CTL)的作用<sup>[1]</sup>, 急性乙肝患者可以产生较强的 CTL 反应, 慢性乙型肝炎患者的外周血中往往 CTL 反应很弱, 且针对的病毒抗原表位反应单一, 导致不能完全清除 HBV<sup>[2-3]</sup>。CTL 的特异性由 T 细胞受体(T cell receptor, TCR)决定, 参与特异性细胞免疫应答的 CTL 主要是 TCR $\alpha\beta$  CD8<sup>+</sup> T 细胞, 其多样性和特异性产生于 TCR 分子和链基因的 VDJ 重排<sup>[4]</sup>。而一些研究者认为 TCR 和链的亚家族取用偏性可以影响 TCR 的亲合性<sup>[5]</sup>, 从而影响病毒感染的转归。本课题组前期通过对我国人群流行的 A2 限制性 HBV 特异性 CTL 表位特点分析表明, HBsAg183~191(S183~191)和 HBsAg335~343(S335~343)两个表位在我国流行的 C、B 型 HBV 中变异率低<sup>[6]</sup>, 临床检测也证实急性乙型肝炎患者可以检测到这两种表位特异性 CTL, 其中 S183~191 特异性 CTL 为 0.23%、0.18%, S335~343 特异性 CTL 为 0.49%、0.31%<sup>[7]</sup>。进而分析了 S335~343 特异性 CTL TCR 和链亚家族取用特点, 对  $\alpha$  和  $\beta$  链可变区(V $\alpha$ 、V $\beta$ )基因进行了序列特点分析<sup>[8-9]</sup>。本研究在前期工作基础上, 构建了配对的  $\alpha$  和  $\beta$  链基因重组逆转录病毒表达载体, 包装获得 TCR/链基因重组假病毒, 介导 S335~343 特异性 CTL TCR 在 HLA-A2<sup>+</sup>的 Jurkat T 淋巴细胞系和健康人 T 淋巴细胞上表达, 为进一步研究 HBV 特异性 CTL 作用机制提供了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

MACS 磁珠分选 CD8<sup>+</sup> T 细胞的试剂与分离柱和分离器购于 Miltenyi Biotec 公司, PE 标记的五聚体 HLA-A2/HBV 抗原表位肽复合物(Pro5 MHC Pentamer-PE), 所含 HBV 抗原表位分别为 HBsAg335~343(WLSLLVPFV)和 HBsAg183~191(FLLTRLITI), 同型对照购于 BD-Pharmingen 公司。PE 标记的抗  $\nu\beta 13$ TCR 抗体购于 Beckman 公司。CTL 培养所用饲养细胞 EBV 转化 B 淋巴母细胞由第四军医大学金伯泉教授惠赠。SAMEN CMV/SR $\alpha$  载体、pG13 细胞由美国芝加哥大学 Nishimura 教授惠赠。研究对象为 2008-01/2010-12 在解放军第 302 医院住院的 6 例 HLA-A2 阳性急性乙肝患者, 诊断标准参照 2000 年 9 月(西安)全国会议修订的《病毒性肝炎防治方案》标准。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 $\alpha$ 链、 $\beta$ 链全长基因的获得

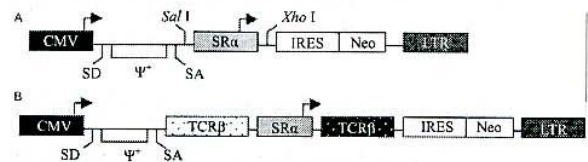
取 HLA-A2 阳性急性乙肝患者的外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC), 用 HBsAg335~343 表位多肽, 在含低剂量 IL-2、IL-7 20 U/mL 以及抗 CD28 条件下诱导培养 3~4 周, 用磁珠分选出 CD8<sup>+</sup> T 细胞后再用流式细胞仪分选出 CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> pen-

tamer<sup>+</sup> 细胞, 分选到 96 孔 U 型培养板中培养, 分选前用抗-CD3 抗体(1  $\mu$ g/mL)包被 96 孔 U 型培养板过夜。细胞分选的细胞数分别为每孔 1、5、20、100 个 CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Pentamer<sup>+</sup> 细胞, 每孔中加入 5 000 个饲养细胞, 用含 1 000 U/mL IL-2 和 200 ng/mL 抗 CD28 抗体的 RPMI1640 完全培养液培养 10~14 d。

提取细胞 mRNA, 用逆转录聚合酶链反应(reverse transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR), cDNA 5'末端快速扩增技术(rapid amplification of cDNA ends, RACE)获取 TCR 分子  $\alpha$  链和  $\beta$  链全长可变区基因片段并进行克隆和测序, 每个样本的克隆测序数 50 个。通过 Vector NTI 等软件和 IMG/PhyloGene 网站对所获序列结果进行分析。确定 TCR  $\alpha$  链、 $\beta$  链基因家族并比较 CDR3 区序列特点。

#### 1.2.2 TCR 分子表达载体构建

用 3'RACE 获取  $\alpha$  链和  $\beta$  链 3 恒定区基因片段, 然后以可变区和恒定区片段为模板, 用重叠 PCR(OVER-LAP PCR)扩增获取  $\alpha$  链、 $\beta$  链全长基因, 连入 T-easy 载体, 转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞, 挑取阳性菌落做 PCR 验证并测序。分别用 *Xho* I 和 *Sal* I 内切酶将 TCR $\beta$  链和 TCR $\alpha$  链从 T-easy 载体上切下, 连接到 SAMEN CMV/SR $\alpha$  载体(图 1), 用酶切图谱与测序分析确定是否连接成功。



A: SAMEN CMV/SR $\alpha$  空载体; B: TCR  $\alpha$  和  $\beta$  链重组载体。

图 1 SAMEN CMV/SR $\alpha$  载体

#### 1.2.3 重组载体转染包装细胞获取 TCR 基因重组逆转录病毒

pG13 细胞为兼性逆转录病毒包装细胞, 已用于介导黑色素瘤的肿瘤相关抗原 MART-1 的 TCR 转基因表达<sup>[10-11]</sup>。将 pG13 细胞置于 T25 瓶中培养, 细胞汇合度达到 70%~80% 时进行转染; 用 PBS 冲洗 3 次, 在每瓶加 12  $\mu$ L 脂质体转染试剂 Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000、4  $\mu$ g 构建载体、2.5 mL Optimem, 孵育 3~4 h; 用 PBS 洗 3 次, 加入 4~5 mL 含 100 mL/L 胎牛血清的 DMEM 培养液, 37 $^{\circ}$ C 培养 24 h; 将培养液换为被感染细胞所需培养液(Jurkat: 含 100 mL/L 胎牛血清 RPMI1640; 人淋巴细胞: 含 100 mL/L 人 AB 血清的 AIM-V), 分别于 24 h、48 h 收集上清, 取样提取上清中的病毒 RNA, 用反转录实时荧光 PCR 定量病毒滴度。

#### 1.2.4 重组病毒转导 TCR 表达

逆转录病毒上清液用被感染细胞所需培养液按 1:1 比例稀释, 加入 8  $\mu$ g/mL 的聚凝胺, 10 mmol/L HEPES 缓冲液, 50 mol/L 2-ME, 过滤法消毒。用流式细胞术进行 HLA-A2 分型, A2 亚型用基因测序确定。分别采取 HLA-A2 阳性和阴性的健康人的 PBMC, 以  $1 \times 10^6$ /mL 的密度接种到 24 孔板, 加入 600 IU/mL IL-2、50 ng/mL 抗 CD3 (OKT-3) 抗体至含 100 mL/L 人 AB 血清 AIM-V 培养基培养 2~3 d。Jurkat 细胞按  $1 \times 10^6$ /mL 混于上述逆转录病毒上

清液放于 24 孔板中, 在 32°C 以 1 000 g 速度离心 90 min; 4 h 后, 用新鲜培养液重悬细胞, 37°C 孵育过夜。两种细胞的感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 均为 0.15~0.5, 重复感染 2 次。孵育 48~72 h 后上流式机检测。应用荧光团标记抗体 (CD3-percp, CD8-FITC, HLA-A201-HBs335-343pentamer-PE, 抗 vβ13TCR-PE) 染色, 上机检测验证重组 TCR 分子的表达情况<sup>[12]</sup>。

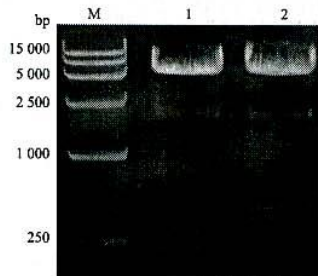
2 结果

2.1 TCR α、β 链的获得 从 1 例患者样本中获得 HBsAg335~343 表位特异性 CD8T 细胞 TCR 基因的

表 1 α15、α21 和 β13 氨基酸序列

V 区亚家族	序列	J 区亚家族
α15	MKTFAGFSFLFLWLQLDCMSRGEDVEQSLFLSVREGDSSVINCTYTDSSSTYLYWY KQEPGAGLQLLTYIFSNMDMKDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCA <u>ETFYGGSQGNLIFGKGTKLSVKPNIQNPDP</u> AVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTN VSQSKSDSVYITDKTVLDMRSMDFKSN SAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFP SPESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLVIGFRILLK VAGFNLLMTLRLWSS	Jα42
α21	MAMLLGASVLLWLQPDWVNSQQKNDDQVKQNSPSLSVQEGRISILNCDYTNS MFDYFLWYKKYPAEGPTFLISSIKDKNEDGRFTVFLNKSAAKHLHLHIVPSQPGDS <u>AVYFCAASDDKLFGTGTRLQVFPNIQNPDP</u> AVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTN NVSQSKSDSVYITDKTVLDMRSMDFKSN SAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTF FPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLVIGFRILLK VAGFNLLMTLRLWSS	Jα34
β13	MSIGLLCCAALLWAGPVNAGVTQTPKFQVLKGTQSM TLQCAQDMNHEYMSW YRQDPGMGLRLIHYSV GAGITDQGEVPNGYNVSRSTTEDFPLRLLSAAPSQTSVYF <u>CAQLRGLVARTDTQYFGPGTRLVLEDLNKVFPPEVA</u> VFEPSEAEISHTQKATLVCL ATGFFPDHVLSWWVNGKEVHSGVSTDPQLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFW QPNRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTVQIVSAEAWGRADCGFTSVSYQQG VLSATLYEILLGKATLYAVLSALVLMAMVVKRKDF	Jβ2.3

2.2 重组 TCR 分子的构建 将重组 TCR 分子 SAMEN-α21-β13、SAMEN-α15-β13 转化到 *E. coli* DH5α 感受态细胞, 挑取阳性菌落做 PCR, 提取质粒进行酶切, 进行初步验证并通过测序验证酶切结果。应用 *EcoR* V 酶酶切鉴定已连接上 α 链的 SAMEN 载体, 目的条带分别在 5 400 bp 和 1 800 bp 左右, 结果与预期相符 (图 2)。



M: DNA marker; 1: SAMEN-α15-β13; 2: SAMEN-α21-β13.

图 2 重组 TCR *EcoR* V 酶切电泳图

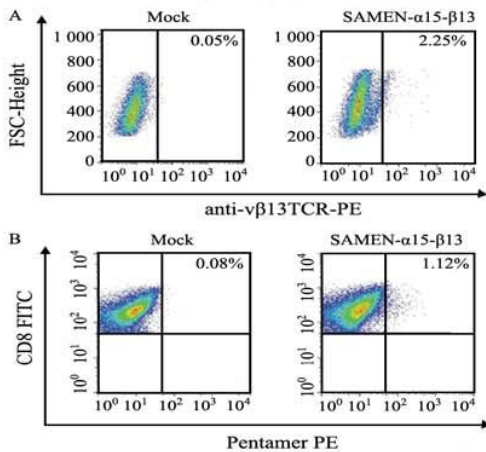
亚家族表达谱: α1 4%, α15 28% 和 α21 68%; β13 100%; 克隆测序表明同一种亚家族或链可变区序列在所测的大量克隆间完全一致。由于 β 链仅有 β13 表达, 因此只能出现 3 种 TCRα 与 β 链的配对形式, 即 α1 与 β13、α15 与 β13 和 α21 与 β13, 三种配对形式在该特异性 CTL TCR 中的比例也大致分别为 4%、28% 和 68%。用比例较高的后两对进行了进一步的转基因表达研究, α15、α21 和 β13 的可变区编码基因推导的氨基酸序列见表 1 (下划线标出的为 CDR3 区)。

2.3 TCR/链基因重组逆转录病毒的包装 通过荧光定量 PCR, 已转入 SAMEN-α15-β13 和 SAMEN-α21-β13 的逆转录病毒滴度分别为 1.5 × 10<sup>5</sup> ~5.0 × 10<sup>5</sup> IU/mL。

2.4 重组 TCR 在 Jurkat 细胞表面和健康人 T 细胞表面的转导表达与鉴定 用 pG13 细胞包装出含有 SAMEN-α21-β13、SAMEN-α15-β13 两对重组 TCR 的病毒, 分别感染 Jurkat 细胞、HLA-A2 阳性和 HLA-A2 阴性健康人的 PBMC。应用荧光团标记抗体 (CD3-percp、CD8-FITC、HLA-A201-HBS335-343 pentamer-PE 和 anti-vβ13TCR-PE) 染色, 流式细胞仪检测和 FlowJo 软件分析, TCR 转基因表达结果见表 2, 代表性样本的流式检测结果见图 3。HLA-A2<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T 细胞转导表达检测结果均低于 0.05%。

表2 重组 TCR 在 Jurkat 细胞表面和 HLA-A2<sup>+</sup> 健康人 T 细胞表面表达情况

重组 TCR	检测抗体	Jurkat 细胞	A2 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T 细胞
SAMEN- $\alpha$ 15- $\beta$ 13	抗 v $\beta$ 13TCR-PE	1.06%~1.42%	1.03%~2.06%
	pentamer	—	1.05%~1.12%
SAMEN- $\alpha$ 21- $\beta$ 13	抗 v $\beta$ 13TCR-PE	1.25%~2.25%	1.14%~1.78%
	pentamer	—	1.07%~1.10%



A: Jurkat 细胞; B: HLA-A2<sup>+</sup> 健康人 T 细胞.

图3 代表性样本 TCR 在 Jurkat 细胞和 HLA-A2<sup>+</sup> 健康人 T 细胞的转基因表达

### 3 讨论

CTL 细胞通过两种途径发挥抗病毒作用。一种是释放细胞杀伤因子(如 IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$ )的非细胞裂解途径,另一种是直接释放溶细胞颗粒导致细胞程序性死亡的细胞裂解途径<sup>[13]</sup>。目前对 HBV 特异性 CTL 在清除/抑制病毒与引起肝细胞损伤两方面的作用及机制还有待进一步阐明,例如裂解和非细胞裂解机制在 CTL 效应中所占的比例各是多少?不同特异性和克隆来源的 CTL 是否存在作用机制上的差别等。然而,从急性乙肝患者难以获取大量血样分选 HBV 特异性 CTL,限制了这方面的深入研究。通过转基因表达的方法可获得足量的 HBV 特异性 CTL,为研究 CTL 的作用效果和机制提供基础。

TCR 转基因表达需要获得单一 CTL 细胞来源的配对  $\alpha$  和  $\beta$  链,但从单一细胞建立 CTL 系十分困难。何长伦等<sup>[14-15]</sup>虽已建立了急性肝炎和慢性肝炎 HBeAg 特异性 CTL 克隆,但未进行 TCR 转基因表达研究。迄今国际上只有一个课题组成功转基因表达了 HLA-A2 限制性 HBeAg18~27(C18~27)TCR 表位特异性 CTL<sup>[12]</sup>,而 C18~27 表位主要存在于欧美流行的 A、D 型 HBV<sup>[16]</sup>,在我国流行的 B、C 型 HBV 中其变异率分别高达 71% 和 97%,临床上特异性 CTL 检出率也较低。为此本研究选取了我国流行

HBV 株变异率很低的 S335~343 特异性 CTL 进行 TCR 转基因表达研究。本研究在流式分选 CTL 后设计了不同的细胞数/孔,但仅从 100 个细胞/孔中取得了 TCR V $\alpha$ 、V $\beta$  基因,可能是低细胞数在扩增中容易凋亡以及受技术水平限制达不到 5'RACE 要求的模板量。

只有少数病毒多肽具有诱导特异性 CD8<sup>+</sup>T 细胞免疫反应,该现象被称为免疫优势,主要原因一是表位多肽要与抗原提呈细胞有一定的亲和性,二是表位多肽需有与 MHC 结合形成复合物的合适结构<sup>[17]</sup>,某些亚家族、链在结构上具有使 TCR 保持对某种特定抗原表位结合活性的优势<sup>[18]</sup>。本研究获得的 S335~343 特异性 CTL TCR $\alpha$ 、 $\beta$  链取用分别只有 1 种和 3 种亚家族形式,表明该培养孔中有 3 种单克隆来源的 CTL,链不同但共用一种 TCR $\beta$  链。在经过体外抗原诱导后,抗原表位亲和力高的 CTL 克隆获得选择性扩增成为优势株。本文建立的方法可获得 TCR $\alpha\beta$  链配对正确的 TCR,为进行特异性 CTL TCR 转基因表达提供了新的方法途径。

Jurkat 细胞只表达  $\alpha$ 1 $\beta$ 8,因此 V $\beta$ 13 阳性的细胞为 TCR 转基因表达阳性的细胞,但 Jurkat 细胞不表达 CD8 分子,不能用 pentamer 染色鉴定重组 TCR 表达。本研究 TCR 转基因表达水平有限,分析主要原因是获得的重组病毒滴度不高,感染的感染复数(multiplicity of infection, MOI)过低(MOI 达到 10 为宜)。另外由于接受转导的细胞(Jurkat 和人 CD8 T 细胞)均自身表达 TCR $\alpha$  链和  $\beta$  链,对目的基因表达可产生一定影响。提高重组病毒滴度和产量、用不表达自身 TCR $\alpha$  链和  $\beta$  链的细胞系(如 JRT3.1 细胞)排除受体细胞自身 TCR 干扰,将有助于提高转基因表达 TCR 细胞的阳性率,增加特异性 CTL 获取量。

致谢:非常感谢美国芝加哥大学免疫学系、中国科学院生物生理研究所付阳新教授对我们的技术指导!

### 参考文献:

- [1] Visvanathan K, Lewin SR. Immunopathogenesis: role of innate and adaptive immune responses[J]. *Semin Liver Dis*, 2006, 26(2): 104-115.
- [2] 徐东平,王福生,张玲霞. 特异性 CTL 在乙型肝炎病毒感染中作用的研究[J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2003, 17(4): 388-389.
- [3] Shimizu Y. T cell immunopathogenesis and immunotherapeutic strategies for chronic hepatitis B virus infection[J]. *World J Gastroenterol*, 2012, 18(20): 2443-2451.
- [4] 金伯泉. 细胞和分子免疫学[M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 2003: 370-371.

- [5] Kedzierska K, La Gruta NL, Stambas J, et al. Tracking phenotypically and functionally distinct T cell subsets *via* T cell repertoire diversity[J]. *Mol Immunol*, 2008, 45(3): 607-618.
- [6] 李晓东, 徐东平, 成军, 等. 中国人群流行的乙型肝炎病毒特异性 CTL 表位特点分析[J]. *解放军医学杂志*, 2006, 31(8): 775-777.
- [7] 丁宁, 黄丽利, 刘妍, 等. 乙肝患者 HBV 特异性细胞毒 T 淋巴细胞的分析[J]. *解放军医学杂志*, 2011, 36(4): 361-364.
- [8] 叶海燕, 王琳, 丁宁, 等. 急性乙型肝炎患者 HBV 特异性 CD8<sup>+</sup> T 细胞受体  $\alpha$  和  $\beta$  链亚家族特点[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2010, 26(9): 8622-8641.
- [9] 丁宁, 叶海燕, 刘妍, 等. 急性乙肝患者 HBV 特异性 CD8T 细胞受体基因的克隆分析[J]. *解放军医学杂志*, 2011, 36(5): 490-493.
- [10] Roszkowski JJ, Yu DC, Rubinstein MP, et al. CD8<sup>-</sup> independent tumor cell recognition is a property of the T cell receptor and not the T cell[J]. *J Immunol*, 2003, 170: 2582-2589.
- [11] Clay TM, Custer MC, Sachs J, et al. Efficient transfer of a tumor antigen-reactive TCR to human peripheral blood lymphocytes confers anti-tumor reactivity[J]. *J Immunol*, 1999, 163(1): 507-513.
- [12] Gehring AJ, Xue SA, Ho ZZ, et al. Engineering virus-specific T cells that target HBV infected hepatocytes and hepatocellular carcinoma cell lines[J]. *J Hepatol*, 2011, 55(1): 103-110.
- [13] Bertoletti A, Gehring AJ. The immune response during hepatitis B virus infection[J]. *J Gen Virol*, 2006, 87(Pt6): 1439-1449.
- [14] 郑纪山, 何长伦, 王寿明. 急性乙型肝炎 HBcAg 特异性 CTL 克隆建立及初步分析[J]. *传染病信息*, 2009, 22(4): 200-206.
- [15] 何长伦, 王寿明, 郑纪山. 慢性乙型肝炎病毒感染患者 HBcAg 特异性细胞毒性 T 细胞克隆的建立[J]. *实用肝病杂志*, 2010, 13(2): 85-88.
- [16] Kramvis A, Kew MC. Relationship of genotypes of hepatitis B virus to mutations, disease progression and response to antiviral therapy[J]. *J Viral Hepat*, 2005, 12(5): 456-464.
- [17] Woodberry T, Suscovich TJ, Henry LM, et al. Differential targeting and shifts in the immunodominance of Epstein Barr virus specific CD8 and CD4 T cell response during acute and persistent infection[J]. *J Infect Dis*, 2005, 192(9): 1513-1524.
- [18] Kjer-Nielsen L, Clements CS, Purcell AW, et al. A structural basis for the selection of dominant alphabeta T cell receptors in antiviral immunity[J]. *Immunity*, 2003, 18(1): 53-64.

(上接 452 页)

比较中,发现肺脏的  $\gamma\delta$ T 细胞产生细胞因子的能力最强。其 IL-17<sup>+</sup> 细胞的含量达到 (26.6 ± 12.1)%, 显著高于其他器官 ( $P < 0.05$ )。其次, IL-4<sup>+</sup> 细胞的含量也高于其他器官。 $\gamma\delta$ T 细胞具有免疫记忆性<sup>[14]</sup>, 肺脏  $\gamma\delta$ T 细胞的高反应性可能与其存在部分记忆性  $\gamma\delta$ T 细胞有关。此外,这可能与不同组织器官的微环境不同有关。研究表明  $\gamma\delta$ T 细胞分泌细胞因子的能力也会受到一些共刺激分子生长因子和细胞因子的影响。因为在肺脏中有大量抗原提呈细胞的存在,这也可能增强  $\gamma\delta$ T 细胞的反应性。

#### 参考文献:

- [1] 范登轩, 金莉萍, 李大金. T 细胞抗原受体  $\gamma\delta$ T 细胞与母胎免疫耐受[J]. *国际生殖健康/计划生育杂志*, 2010, 29(6): 457-460.
- [2] 张晋渝, 石云, 邹全明.  $\gamma\delta$ T 细胞在感染性疾病中的研究进展[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2011, 28(7): 825-827.
- [3] 陈小奇, 徐焱成, 邓浩华, 等. IL-17A 与自身免疫性疾病发病机制的初步探讨[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2010, 26(3): 270-272.
- [4] 杨淑萍, 智绪亭, 卢雪峰, 等. IL-17A 及 Th17 在炎症性肠病中的作用[J]. *中国现代普通外科进展*, 2009, 12(3): 222-225.
- [5] 汤新逸, 王胜军. IL-17<sup>+</sup>  $\gamma\delta$ T 细胞[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2011, 28(7): 817-819.
- [6] 李丽, 吴长有. 人  $\gamma\delta$ T 细胞表型与功能特征的探讨[J]. *免疫学杂志*, 2008, 24(6): 609-612.
- [7] 李丽, 付笑迎, 吴长有. 多色流式细胞术检测人外周血 BCG 特异性效应型记忆  $\gamma\delta$ T 细胞的表型特征[J]. *免疫学杂志*, 2011, 27(5): 369-372.
- [8] Ye Y, Yue M, Jin X, et al. Isolation of murine small intestinal intraepithelial gammadelta cells[J]. *Immunol Invest*, 2010, 39(7): 661-673.
- [9] Andreu-Ballester JC, Garcia-Ballesteros C, Benet-Campos C, et al. Values for alphabeta and gammadelta T-lymphocytes and CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, and CD56<sup>+</sup> subsets in healthy adult subjects: assessment by age and gender[J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2012, 82(4): 238-244.
- [10] Saito K, Katsuragi H, Mikami M, et al. Increase of heat-shock protein and induction of gamma/delta T cells in peritoneal exudate of mice after injection of live *Fusobacterium nucleatum*[J]. *Immunology*, 1997, 90(2): 229-235.
- [11] 何维.  $\gamma\delta$ T 细胞的抗原识别机制[J]. *中国免疫学杂志*, 1999, 15(10): 433-435.
- [12] van den Brule S, Heymans J, Havaux X, et al. Profibrotic effect of IL-9 overexpression in a model of airway remodeling[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2007, 37(2): 202-209.
- [13] Stark MA, Huo Y, Burcin TL, et al. Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis *via* IL-23 and IL-17[J]. *Immunity*, 2005, 22(3): 285-294.
- [14] Blumerman SL, Herzig CT, Baldwin CL. WC1<sup>+</sup> gammadelta T cell memory population is induced by killed bacterial vaccine[J]. *Eur J Immunol*, 2007, 37(5): 1204-1216.