

· 基础论著 ·

髓源抑制细胞对HBV转基因小鼠肝脏炎症损伤抑制作用的研究

贺改霞 张恒辉 陈衍辉 魏来 曾辉 陈红松

【摘要】目的 建立HBV抗原特异性细胞毒性T细胞(CTLs)介导的小鼠肝炎模型,探讨肿瘤诱导的髓源抑制性细胞(MDSCs)在免疫介导的HBV转基因小鼠肝损伤中的有效性。**方法** 制备新鲜的HBV转基因小鼠肝脏匀浆,予普通小鼠腹腔注射,1次/周,连续4周,以诱导致敏小鼠(Sensitized-mice)产生HBV抗原特异性CTLs(HBV-specific CTLs, HBV-CTLs)。分离致敏小鼠脾脏来源HBV-CTLs,静脉回输给高复制型HBV转基因小鼠,分别在注射前,注射后1 d、3 d、6 d和9 d经眶后取血测血清ALT/AST水平。分离荷瘤小鼠骨髓来源的MDSCs,静脉注射给HBV-CTLs诱导的肝炎小鼠,并在注射后24 h,经眶后取血测血清ALT/AST水平,肝脏组织经固定、石蜡包埋、HE染色进行组织形态学检测。**结果** 致敏小鼠脾脏来源的HBV-CTLs可诱导HBV转基因小鼠肝组织损伤,血清ALT、AST水平呈升高趋势;且与CTLs注射组小鼠相比,CTLs联合MDSCs注射组小鼠肝脏组织损伤程度减轻,小鼠血清转氨酶水平显著降低[ALT: (254.5 ± 25.50) vs (80.67 ± 11.57) , $P < 0.05$; AST: (301.5 ± 40.50) vs (249.0 ± 79.00) , $P > 0.05$]。**结论** 静脉回输肿瘤诱导的MDSCs可有效减轻HBV-CTLs诱导的肝炎小鼠中肝组织损伤。

【关键词】 肝炎小鼠模型; HBV转基因小鼠; 髓源抑制性细胞; 免疫性肝损伤

Role of myeloid-derived suppressor cells in amelioration of murine hepatitis models in HBV transgenic mice HE Gai-xia, ZHANG Heng-hui, CHEN Yan-hui, WEI Lai, ZENG Hui, CHEN Hong-song. Peking University People's Hospital, Peking University Hepatology Institute, Beijing Key Laboratory of Hepatitis C and Immunotherapy for Liver Diseases, Beijing 100044, China

Corresponding author: CHEN Hong-song, Email: chenhongsong2999@163.com

【Abstract】Objectives To establish murine hepatitis model in HBV transgenic mice and to investigate the role of Gr-1⁺CD11b⁺ myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) in attenuating liver injury in immune-mediated murine hepatitis model. **Methods** Repetitive intraperitoneal injection of liver homogenate from HBV transgenic mice into naïve BALB/c mice (recipient mice) was performed at once a for four weeks. HBV-specific CTLs (HBV-CTLs) were from spleen of recipient mice. Tumor-induced MDSCs were isolated from bone marrow of tumor-bearers and purified by magnetic system. HBV transgenic mice were treated with HBV-CTLs injection (1×10^7 /per mouse, i.v.) or co-injection of HBV-CTLs (1×10^7 /per mouse, i.v.) and MDSCs (5×10^6 /per mouse, i.v.). Serum ALT/AST levels were detected before and 24 hours after cells transfer to evaluate the liver injury. Paraffin-embedded liver tissue was sectioned for HE staining. **Results** HBV-CTLs injection caused acute liver injury in HBV transgenic mice were observed, characterized by acute increase of serum ALT and/or AST levels. Co-injection of CTLs and MDSCs could effectively attenuate liver injury in hepatitis mouse model (ALT: 254.5 ± 25.50 vs 80.67 ± 11.57 , $P < 0.05$ and AST: 301.5 ± 40.50 vs 249.0 ± 79.00 , $P > 0.05$). Morphological analysis showed alleviation of liver injury in mice injected with HBV-CTLs and MDSCs. **Conclusion** These results demonstrate that tumor-induced MDSCs play a role of suppressing immune-mediated hepatitis.

【Key words】 Mouse model of hepatitis; HBV transgenic mice; myeloid-derived suppressor cells (MDSCs); Immune-mediated liver injury

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2013.06.003

基金项目: 国家自然科学基金重大计划(No. 91029741); 国家自然科学基金(No. 81001072, No. 81171550)

作者单位: 100044 北京, 北京大学人民医院, 北京大学肝病研究所, 丙型肝炎及肝病免疫治疗北京市重点实验室(贺改霞、张恒辉、陈衍辉、魏来、陈红松); 首都医科大学附属北京地坛医院(曾辉); 新发突发传染病研究北京市重点实验室(曾辉)

通讯作者: 陈红松, Email: chenhongsong2999@163.com

慢性肝炎是威胁人类健康的最常见疾病之一,多种因素可引起肝脏组织病变,如病毒感染、过量摄入酒精、代谢性疾病及化学毒性物质等。在中国,慢性病毒感染是慢性肝炎的最主要病因,病毒感染后通过激活CD8⁺细胞毒性T细胞(cytotoxic T lymphocytes, CTLs), CTLs一方面针对病毒感染的肝细胞产生免疫应答,帮助机体清除感染,另一方面不断造成肝实质破坏^[1-2]。因此,免疫介导的肝实质损伤在慢性肝炎疾病进展中发挥重要作用,而针对这一机制的治疗手段目前尚很欠缺。

肝炎病毒是一种嗜肝病毒,宿主特异性极强,因此用于研究的动物模型研究很受限制。Chisari等^[3]课题组曾利用高压注射含病毒载体,成功建立了HBV转基因小鼠,国内一些研究小组也通过显微注射法建立了稳定遗传的HBV转基因小鼠。本研究在前期研究的基础上,利用HBV转基因小鼠,成功建立了HBV-CTLs诱导的肝炎小鼠模型。

髓源抑制性细胞(myeloid-derived suppressor cells, MDSCs)是骨髓来源的具有免疫抑制功能的免疫细胞,根据形态及功能分为不同细胞亚群,主要包括单核样-MDSCs(monocytic-MDSCs, M-MDSCs)和粒细胞样-MDSCs(granulocytic-MDSCs, Gr-MDSCs)及少量的树突状细胞和髓系前体细胞。MDSCs参与免疫系统的负性调控,在生理和病理状态下发挥重要作用^[4-6]。在小鼠中,MDSCs以共表达Gr-1和CD11b为识别标记,在多种疾病模型中均有研究^[7]。MDSCs通过免疫抑制作用,在荷瘤动物、感染性疾病、炎症性肠病、器官移植等多种疾病模型中均有重要作用^[8-10]。慢性肝炎的病理改变主要是由免疫介导的肝组织损伤引起,肝脏作为机体的免疫耐受器官,同时也是MDSCs大量聚集的重要脏器之一^[11],本课题组前期研究也证实,在肝脏炎症及肿瘤情况下,肝内MDSCs聚集增多,那么MDSCs是否可参与维持肝脏免疫耐受是本研究关心的问题。本研究旨在观察MDSCs在HBV-CTLs介导的肝炎小鼠肝脏组织损伤中的作用,为慢性肝炎的治疗提供前期研究资料。

材料与方法

一、研究对象

高复制型的HBV转基因小鼠,6~8周龄,雌性, BALB/c背景,来自广州解放军第458医院^[12];普通BALB/c雌性小鼠,6~8周,来自中国军事科学院动物中心。实验动物均饲养于北京大学人民医

院实验动物中心,SPF级,并经过北京大学人民医院动物伦理委员会批准。

H22肝癌细胞系, BALB/c小鼠背景,由中国科学院生物物理研究所赠送,使用前保存于-196℃液氮中。

二、主要实验试剂及耗材

无菌PBS(北京大学人民医院配制提供), APC正选试剂盒(加拿大Stemcell公司), PE正选试剂盒(加拿大Stemcell公司), 红细胞裂解液(美国BD公司), 流式抗体主要有:抗小鼠Gr-1-FITC, 抗小鼠CD11b-APC, 抗小鼠Gr-1-PE(流式抗体均购自美国eBioscience公司), 麻醉剂(异弗烷吸入麻醉)

三、实验方法

1. 建立HBV-CTLs诱导的肝炎小鼠模型:

(1) 制备致敏小鼠:6~8周龄HBV转基因小鼠,麻醉后处死,无菌条件下分离小鼠肝脏,剪碎、研磨至匀浆,70 μm筛网过滤,无菌PBS漂洗、重悬,15~20 ml PBS,得到HBV转基因小鼠的肝脏匀浆,经腹腔注射给予普通BALB/c小鼠,1次/周,共4周,得到致敏小鼠(Sensitized-mice)(图1)。

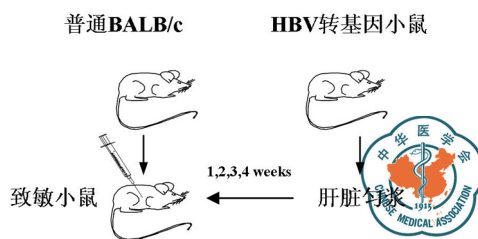
(2) 分离HBV-CTLs:致敏小鼠麻醉后处死,无菌条件下分离小鼠脾脏,剪碎、研磨、过滤, PBS漂洗1次,弃上清,加1倍浓度红细胞裂解液5 ml(去除红细胞),室温5 min, PBS漂洗后重悬,计数,调整细胞浓度至 1×10^8 cells/ml(图2)。

(3) 建立HBV-CTLs介导的肝炎小鼠模型:将HBV-CTLs静脉回输HBV转基因小鼠, 1×10^7 cells/只,分别在回输前、回输后不同时间点经眶后静脉采血,并测血清ALT和AST水平的动态变化,观察小鼠肝组织损伤情况。

2. MDSCs分选和过继回输: 4×10^5 cells/ml的H22肝癌细胞系,经皮下注射给普通BALB/c小鼠,建立肝癌移植瘤模型,观察2周待瘤体体积直径达1 cm以上,将荷瘤小鼠麻醉后处死小鼠,无菌条件下分离小鼠股骨和胫骨,分离骨髓细胞,磁珠分选骨髓及脾脏来源的MDSCs,将 5×10^6 cells/ml MDSCs/只与 1×10^7 cells/ml HBV-CTLs/只同时经尾静脉注射给HBV转基因小鼠,对照组仅注射 1×10^7 cells/ml/只HBV-CTLs,注射后24 h检测小鼠血清中的ALT和AST水平,小鼠血清转氨酶采用全自动生化仪检测得到。

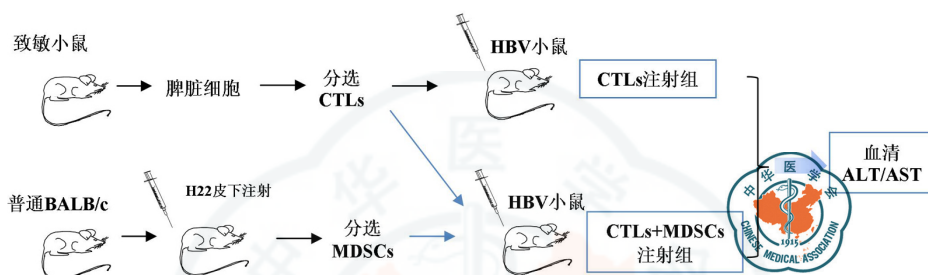
四、组织学染色

经冰PBS灌注小鼠后,分离肝脏,并用手术切片取肝脏组织,4%多聚甲醛固定,石蜡包埋,切



注：将HBV转基因小鼠肝脏匀浆注射给同品系正常小鼠，1次/周、连续4周

图1 制备致敏小鼠实验流程



注：致敏小鼠脾脏来源HBV-CTLs单独或联合荷瘤小鼠骨髓来源MDSCs，经静脉注射给HBV转基因小鼠，取HBV小鼠静脉血测血清ALT、AST水平

图2 HBV-CTLs诱导的肝炎小鼠模型的建立及MDSCs过继回输实验流程

5 μ m厚组织片，经伊红-苏木精（HE染色），显微镜下观察。

五、统计学分析

各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，用SPSS 16.0软件分析，计量资料的组间差异用独立样本非参数检验，采用GraphPad Prism 5.0绘图，以 $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

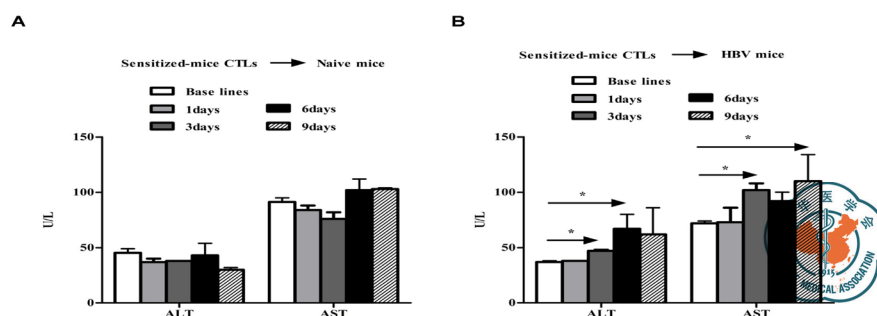
一、HBV-CTLs可诱导HBV转基因小鼠肝脏组织损伤

致敏小鼠在多次接受HBV转基因小鼠肝脏匀浆注射后，我们观察到小鼠血清转氨酶ALT和AST水平有一过性的升高，并且在连续多次刺激后致敏小鼠脾脏体积显著增大（结果未显示）。分离HBV-CTLs，通过尾静脉注射分别回输给普通小鼠和HBV转基因小鼠，不同时间点检测HBV转基因小鼠血清转氨酶水平。结果显示，HBV-CTLs注射给正常组小鼠后，血清中ALT、AST水平分别为，基线水平（即注射前）：ALT (45.33 \pm 3.71) U/L，AST (91.33 \pm 3.71) U/L；1 d后：ALT (37.00 \pm 3.00) U/L，AST (84.00 \pm 4.00) U/L；3 d后：ALT (38.00 \pm 4.31) U/L，AST (76.00 \pm 8.49) U/L；6 d后：ALT (43.00 \pm 15.56) U/L，AST (102.00 \pm

14.14) U/L；9 d后：ALT (30.00 \pm 2.83) U/L，AST (103.00 \pm 1.41) U/L，（图3A），而HBV-CTLs注射于HBV转基因小鼠后，血清中ALT和AST水平分别为，基线水平：ALT (37.00 \pm 1.41) U/L，AST (72.00 \pm 2.83) U/L；1 d后：ALT (38.00 \pm 3.00) U/L，AST (73.00 \pm 18.38) U/L；3 d后：ALT (47.00 \pm 1.41) U/L，AST (102.00 \pm 8.49) U/L；6 d后：ALT (67.00 \pm 18.38) U/L，AST (92.00 \pm 11.31) U/L；9 d后：ALT (62.00 \pm 33.94) U/L，AST (110.00 \pm 33.14) U/L，呈逐渐上升趋势，差异具有统计学意义 ($t = 2.864$, $P < 0.05$)（图3）。

二、MDSCs过继回输可减轻HBV肝炎小鼠中肝脏损伤

MDSCs具有抗原非特异性和特异性的免疫抑制作用，在诱导机体免疫耐受中发挥重要作用。我们分离荷瘤小鼠骨髓来源的MDSCs，并进行纯化（图4），按 5×10^6 cells/ml MDSCs/只小鼠静脉回输，对照组注射等量PBS，24 h后测小鼠血清ALT和AST水平。研究结果显示，过继回输之前，对照组、CTLs回输组及CTLs联合MDSCs回输组小鼠的血清转氨酶水平分别为ALT：(53.00 \pm 5.03) U/L、(53.00 \pm 4.25) U/L和(54.33 \pm 10.41) U/L，AST：(83.00 \pm 12.27) U/L、(97.00 \pm 21.21) U/L和(66.00 \pm 8.48) U/L，回输后24 h，



注: A: HBV转基因小鼠肝脏匀浆注射给普通小鼠后, 致敏小鼠中肝脏转氨酶变化 (Baseline: 注射前); B: 致敏小鼠来源HBV-CTLs连续多次注射前、注射后1 d、3 d、6 d和9 d等不同时间点HBV转基因小鼠中血清转氨酶水平

图3 HBV-CTLs诱导HBV转基因小鼠肝炎模型的建立 (n = 20只/组)

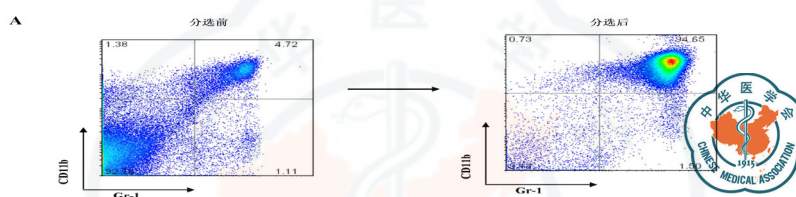
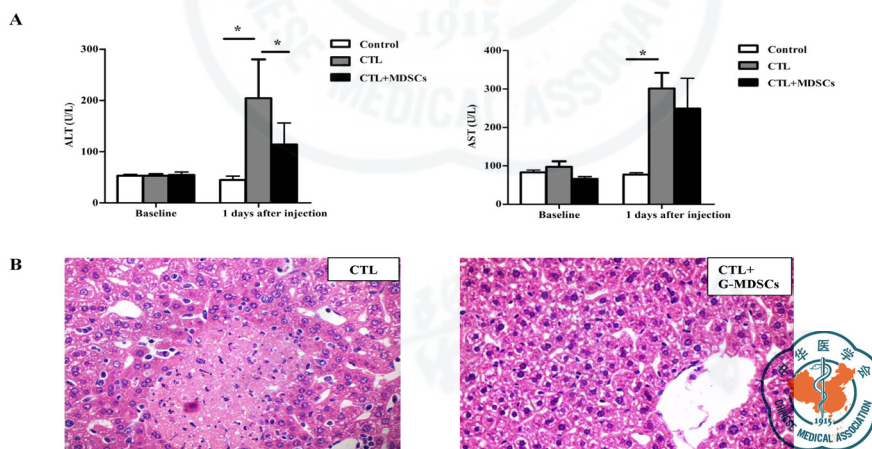


图4 肿瘤诱导的MDSCs分选前后流式细胞术的检测



注: A: PBS注射组 (白色)、HBV-CTLs单独回输 (灰色) 及HBV-CTLs联合MDSCs回输组 (黑色) HBV转基因小鼠血清中转氨酶水平比较, 注射前 (0 d) 及注射后 (1 d) 血清ALT (左)、AST (右) 水平变化。B, HBV-CTLs单独回输 (左) 及HBV-CTLs联合MDSCs回输组 (右) HBV转基因小鼠肝脏组织学改变

图5 HBV-CTLs单独或联合MDSCs后转基因小鼠血清转氨酶水平和肝脏组织HE染色

三组小鼠血清转氨酶水平分别为ALT: (44.66 ± 13.31) U/L、(254.50 ± 25.50) U/L和 (114.00 ± 72.58) U/L, 联合注射HBV-CTLs和MDSCs组小ALT水平显著低于HBV-CTLs注射组小鼠, 差异具有统计学意义 ($t = 1.595$, $P < 0.05$) (图5A)。在过继回输MDSCs后, 肝

炎小鼠血清AST水平分别是 (77.00 ± 8.88) U/L、(301.50 ± 57.27) U/L和 (249.00 ± 111.72) U/L, MDSCs联合HBV-CTLs回输组小鼠血清AST水平无显著降低 (图4A)。肝脏组织进行HE染色, 结果显示, 联合注射HBV-CTLs和MDSCs组小鼠肝脏组织损伤显著减轻 (图5B)。

讨 论

目前,病毒性肝炎的治疗虽然取得了很大的进展,但长期病毒感染造成的肝脏组织破坏、局部免疫紊乱、肝功能衰竭是导致患者出现并发症的重要原因,如何维持肝脏免疫耐受微环境、延缓肝功能衰竭成为关注热点。

免疫介导的肝损伤是慢性病毒感染造成慢性肝功能衰竭的重要机制。有研究中利用刀豆蛋白(Concanavalin, Con-A)诱导肝组织损伤,成功建立了实验性自身反应性肝炎小鼠模型^[13],但Con-A诱导的肝炎小鼠是抗原非特异性的。也有研究者利用动态注射含病毒DNA载体的方法诱导HBV-特异性小鼠肝炎模型,其发病机制接近于生理状态下HBV致病机制,但该方法受病毒基因型、宿主基因型等因素的影响^[3]。本研究利用稳定的高复制型的HBV转基因小鼠及相同背景的小鼠,诱导产生HBV-CTLs,并静脉回输给HBV转基因小鼠,模拟HBV感染后诱导人体产生HBV-CTLs并造成肝组织受损,成功建立HBV抗原特异性、免疫介导的肝炎小鼠模型,为研究由HBV病毒感染、抗原特异性肝损伤提供了方便可行的动物模型。

MDSCs作为负性调控的免疫细胞亚群,近年来在感染性疾病及自身免疫性疾病中的作用受到关注。MDSCs最早在肿瘤研究中被发现,可通过合成和释放诸如NO、iNOS、Arginase-1和MMPs等抑制效应T细胞的活化和增殖,进而促进肿瘤免疫逃逸^[4,6,9]。随着研究的深入,发现MDSCs可通过直接和间接的调节作用抑制免疫反应,如MDSCs亦可通过诱导调节性T细胞(Treg)的产生抑制效应细胞的免疫应答^[14];MDSCs可通过诱导PD-L1的表达上调参与负性免疫调控^[11],提示MDSCs免疫抑制作用并非抗原特异性。

本研究中,MDSCs主要来源于荷瘤小鼠的骨髓,并且以Gr-MDSCs占优势细胞亚群。早期关于肿瘤的研究显示,MDSCs在肿瘤局部数量较多。而近年来的研究发现,肝脏也是MDSCs聚集的重要器官^[11],本课题组前期研究也证实,外源MDSCs可向肝脏大量聚集,在肝炎小鼠和荷瘤小鼠中较正常小鼠中更为显著。本研究中Gr-MDSCs向肝脏聚集并发挥作用,一方面与HBV-CTLs诱发的肝脏炎症有关,另一方面还与肝脏产生的炎症因子如TNF- α 、IFN- γ 和IL-6等及趋化因子如CCL2、CXCL5和CXCL12密切相关^[14]。大量的MDSCs聚集到肝脏局部,通过直接和间接方式与作用于HBV-CTLs,抑

制HBV-CTLs的活化,抑制CTLs对肝组织的损伤,进而降低肝组织的损伤程度,因此HBV-CTLs联合MDSCs回输组小鼠血清转氨酶水平较HBV-CTLs注射组显著降低。此外,本研究中利用的动物模型类似于病毒感染后慢性肝炎急变期的病理变化,而MDSCs在慢性肝炎疾病进展的不同阶段的功能有待进一步研究。

综上所述,MDSCs在不同的疾病中可能发挥双重作用,既可以抑制免疫应答并促进肿瘤的进展,同时可通过抑制免疫细胞的过度活化在抗移植排斥及免疫系统紊乱导致诸如自身免疫性疾病中发挥保护作用。HBV感染引起的慢性肝炎最终因免疫介导的、长期的慢性肝组织受损,极易发生慢性肝功能衰竭及慢加急性肝功能衰竭,本研究提示,MDSCs有望成为急性肝炎及慢加急性肝损伤的有效治疗手段。

参 考 文 献

- Chisari FV, Ferrari C. Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Annu Rev Immunol*,1995,13:29-60.
- Levy GA, Chisari FV. The immunopathogenesis of chronic HBV induced liver disease. *Springer Semin Immunopathol*,1981,3(4):439-459.
- Yang PL, Althage A, Chung J, et al. Hydrodynamic injection of viral DNA: a mouse model of acute hepatitis B virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA*,2002,99(21):13825-13830.
- Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol*,2009,9(3):162-174.
- Nagaraj S, Gabrielovich DI. Tumor escape mechanism governed by myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res*,2008,68(8):2561-2563.
- Nagaraj S, Schrum AG, Cho HI, et al. Mechanism of T cell tolerance induced by myeloid-derived suppressor cells. *J Immunol*,2010,184(6):3106-3116.
- Hoechst B, Ormandy LA, Ballmaier M, et al. A new population of myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients induces CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T cells. *Gastroenterology*,2008,135(1):234-243.
- Haile LA, von Wasielewski R, Gamrekashvili J, et al. Myeloid-derived suppressor cells in inflammatory bowel disease: a new immunoregulatory pathway. *Gastroenterology*,2008,135(3):871-881, 881. e1-5.
- Bunt SK, Sinha P, Clements VK, et al. Inflammation induces myeloid-derived suppressor cells that facilitate tumor progression. *J Immunol*,2006,176(1):284-290.
- Chou HS, Hsieh CC, Charles R, et al. Myeloid-derived suppressor cells protect islet transplants by B7-H1 mediated enhancement of T regulatory cells. *Transplantation*,2012,93(3):272-282.
- Ilkovitch D, Lopez DM. The liver is a site for tumor-induced myeloid-derived suppressor cell accumulation and

- immunosuppression. *Cancer Res*,2009,69(13):5514-5521.
- 12 刘光泽, 熊一力, 王洪敏, 等. 近交系高表达HBV转基因小鼠的建立及表达传代稳定性. *中国兽医学报*,2003,23(6):580-582.
- 13 Li B, Sun R, Wei H, et al. Interleukin-15 prevents concanavalin A-induced liver injury in mice via NKT cell-dependent mechanism. *Hepatology*,2006,43(6):1211-1219.
- 14 Hoechst B, Ormandy LA, Ballmaier M, et al. A new population of myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients induces CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) T cells. *Gastroenterology*,2008,135(1):234-243.
- 15 Huang B, Lei Z, Zhao J, et al. CCL2/CCR2 pathway mediates recruitment of myeloid suppressor cells to cancers. *Cancer Lett*,2007,252(1):86-92.

(收稿日期: 2013-08-22)

(本文编辑: 孙荣华)

贺改霞, 张恒辉, 陈衍辉, 等. 髓源抑制细胞对HBV转基因小鼠肝脏炎症损伤[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2013, 7 (6): 804-809.

