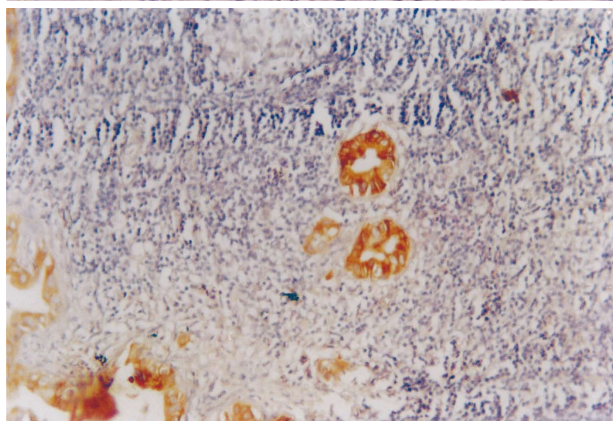
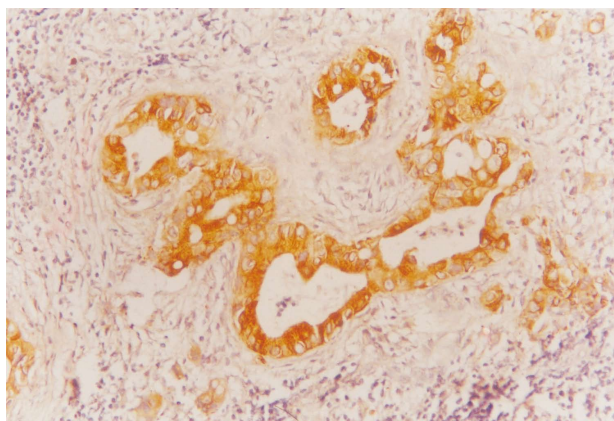
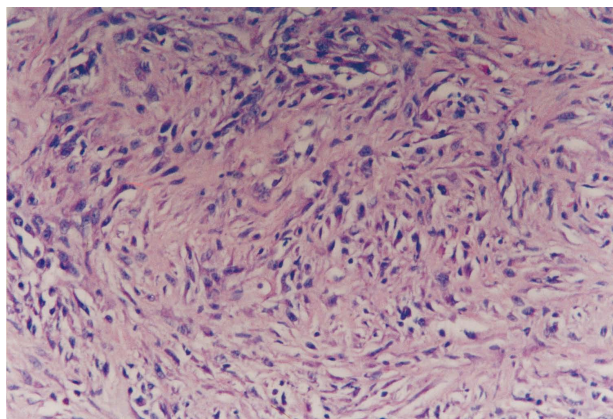
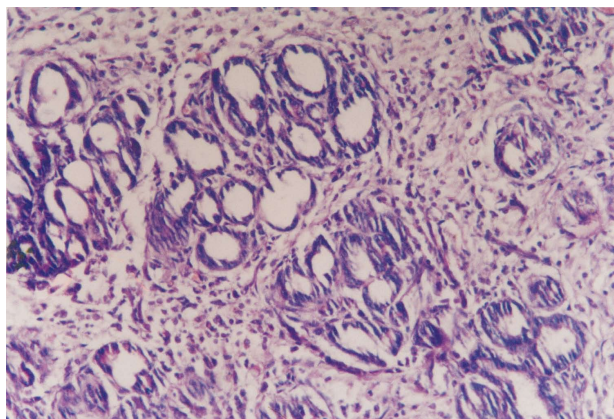


世界华人消化杂志

**WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2005 年 9 月 28 日 第 13 卷 第 18 期 (Volume 13 Number 18)



18/2005

名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

世界华人消化杂志被评为中国科技核心期刊,
2003年百种中国杰出学术期刊,

《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学
类的核心期刊, 中国科技论文统计源期刊.

世界华人消化杂志的英文摘要被美国《化学文摘》,
荷兰《医学文摘库/医学文摘》,
俄罗斯《文摘杂志》收录.

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ●

2005 年 9 月 28 日

第 13 卷

第 18 期

(总第146期)

述 评

- 2173 临床试验刍议 谭学瑞, 张学中
2179 RNA 干扰在肝病治疗中的研究进展 韩苏夏, 马瑾璐

基 础 研 究

- 2183 甘草甜素下调基质金属蛋白酶组织抑制因子-1基因的表达
王巧侠, 成军, 郭江, 李文凡, 魏红山
2188 改良聚合酶链反应检测 HBV 共价闭合环状 DNA 汤勃, 王宇明, 刘俊, 张瑞
2193 肝癌细胞 BEL7402 中神经元特异性烯醇化酶的表达
朱爱萍, 张青云, 王雅明, 徐建军, 孙丽
2197 肝移植前受体亚低温对急性肝衰大鼠移植肝脏的保护作用
王志东, 韩德恩, 崔云甫, 姜明山, 张新宇, 曾兆林
2201 慢性丙型肝炎患者 CD4⁺CD25⁺调节性T细胞表达增加 杨江华, 张永祥, 苏川, 孙南雄
2205 草苈蓉乙醇提取物对二甲基亚硝胺诱导大鼠肝纤维化的治疗作用 朴熙绪, 黄红果, 朴东明
2210 树突状细胞在黏膜免疫模型鼠体内的分布及趋化因子的表达
谢遵江, 贺业春, 贾立敏, 刘颖, 刘丽
2213 塞来昔布对胃癌细胞生长及 ERK2 表达的影响
张勇, 蒋明德, 曾维政, 徐辉, 熊碧君, 翁敏
2217 益气活血软坚解毒含药血清诱导人肝癌细胞系 Bel-7402 细胞的凋亡
李东涛, 孙桂芝, 裴迎霞, 祁鑫, 李杰, 林洪生
2222 肿瘤坏死因子- α 、细胞间黏附分子-1与扑热息痛肝损害
田丰, 王颖, 吴作艳, 王学清, 李岩
2227 SD 大鼠胰腺癌模型组神经生长因子 mRNA 表达
杨竹林, 邓星辉, 杨乐平, 李清龙, 范文涛, 梁珊, 苗雄鹰

文 献 综 述

- 2231 乳酸杆菌作为一种新型活疫苗抗原递送载体 庾庆华, 杨倩
2235 一氧化氮和一氧化氮合酶与肿瘤放疗敏感性的关系 江春平, 丁义涛
2238 Id 基因家族对消化系统实体瘤作用的研究进展
杨海彦, 刘连新, 曲志博, 刘改云, 陈炜, 郭化鑫, 陈曦
2243 影响拉米夫定相关乙型肝炎病毒 YMDD 变异的因素 陆德云, 王甦, 赵连三
2246 成人间活体肝移植中小肝综合征的预防策略 马跃峰, 李相成
2251 肝细胞癌生物标志物的研究进展 王嘉信, 刘连新
2257 肠黏膜免疫调节紊乱介导炎症性肠病的发生 王旭丹, 袁学勤

研 究 快 报

- 2263 sp600125 对乙醛刺激的大鼠肝星状细胞凋亡及 Caspase-3 蛋白表达的影响 唐文, 蒋明德, 李小安
2266 血小板活化因子对幼鼠肠道免疫屏障功能的影响 王丽杰, 刘冬妍, 孙梅, 赵恂

临 床 经 验

- 2269 肝硬化患者食管静脉曲张的相关因素分析 501 例
崔春吉, 金永日, 朴熙绪, 裴凤郁
2272 中晚期肝门部胆管癌诊治15例
张宗明, 邢海林, 李刚, 刘凯, 朱建平, 宿砚明, 钟华, 郭金星
2275 肝病患者 IgA 和 sIgA 含量变化的临床意义 刘冬妍, 刘沛
2278 全直肠系膜切除术切缘血管内皮生长因子检测的临床意义 战学雷, 田素礼
2281 善宁对急性胰腺炎患者血小板参数变化的影响 黄坚, 陆士奇, 陈建荣

病 例 报 告

- 2284 肝肾联合移植术治疗移植肾慢性失功伴肝硬化 1 例
朱建平, 张宗明, 管德林, 李刚, 黄庆荣, 宿砚明, 陈以安, 刘辉
2287 丙型肝炎肝硬化患者骨髓和血液同时分离出鼠伤寒沙门菌 1 例
郭微媛, 齐桂云, 多丽波, 闫立昕, 孙琪, 张和光

致 谢	2288 致谢世界华人消化杂志编委
消 息	2187 2006年第5届全国肝脏疾病学术研讨会议征文通知 2200 国际肝胆胰协会中国分会第二届全国学术研讨会暨第三届全国普通外科主任论坛第一轮通知 2209 首届北京地坛感染病学术会议 2221 《世界华人消化杂志》欢迎投稿 2226 2006年世界华人消化杂志由半月刊改为旬刊出版发行 2234 WJG和世界华人消化杂志全文网站免费开通 2237 世界华人消化杂志入编《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊 2250 欢迎订阅2006年《世界华人消化杂志》 2256 2006年即将召开的国际会议 2262 消化道肿瘤外科治疗2006高级论坛征文通知 2286 中国生物医学基金论文摘要注册方法
封面故事	2227 SD 大鼠胰腺癌模型组神经生长因子 mRNA 表达 杨竹林, 邓星辉, 杨乐平, 李清龙, 范文涛, 梁珊, 苗雄鹰 世界华人消化杂志 2005;13(18):2227-2230 http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2227.asp
国际会议	13th United European Gastroenterology Week, UEGW October 15-20, 2005 American College of Gastroenterology Annual Scientific Meeting October 28-November 2, 2005 ISGCON 2005 November 11-15, 2005 isgcon2005@yahoo.co.in isgcon2005.com Advanced Capsule Endoscopy Users Course November 18-19, 2005 www.asge.org/education II Latvian Gastroenterology Congress November 29, 2005 gec@stradini.lv www.gastroenterologs.lv 2005 CCFA National Research and Clinical Conference - 4th Annual Advances in the Inflammatory Bowel Diseases December 1-3, 2005 c.chase@imedex.com www.imedex.com/calendars/therapeutic.htm 10th World Congress of the International Society for Diseases of the Esophagus February 22-25, 2006 isde@sapmea.asn.au www.isde.net

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

吴阶平 题写封面刊名
陈可冀 题写版权刊名
(半月刊)

创 刊 1993-01-15
改 刊 1998-01-25
出 版 2005-09-28
原刊名 新消化病学杂志

名誉总编辑 潘伯荣 社长总编辑 马连生

编辑部主任 张海宁 中文编辑 潘伯荣 张海宁

英文编辑 张海宁 排版校对 张敏 张勇 李琪

编辑 世界华人消化杂志编辑委员会
030001, 山西省太原市双塔西街77号

出版 世界胃肠病学杂志社
100023, 北京市2345信箱

E-mail: wcjd @ wjgnet.com

<http://www.wjgnet.com>

电话: 010-85381901

传真: 010-85381893

印刷 北京科信印刷厂

发行 国内: 北京报刊发行局

国外: 中国国际图书贸易总公司

(100044, 北京市399信箱)

订购 全国各地邮电局

邮购 世界胃肠病学杂志社发行部

(100023, 北京市2345信箱)

电话: 010-85381901

传真: 010-85381893

世界华人消化杂志被评为中国科技核心期刊, 2003年百种中国杰出学术期刊, 《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊, 中国科技论文统计源期刊. 世界华人消化杂志的英文摘要被美国《化学文摘》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘》, 俄罗斯《文摘杂志》收录.

特别声明

本刊刊出的所有文章不代表世界胃肠病学杂志社和本刊编委会的观点, 除非特别声明. 本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换.

2005年版版权归世界胃肠病学杂志社所有

ISSN 1009-3079

CN 14-1260/R

邮发代号

82-262

国外代号

M 4481

国内定价

每期24.00元 全年576.00元

广告经营许可证

1401004000050

www.wjgnet.com

World Chinese Journal of Digestology

September 2005 Contents in Brief Volume 13 Number 18

EDITORIAL

Meager opinions on clinical experimentation

Tan XR, Zhang XZ 2173

Advancement of RNA intervention in the treatment of hepatic diseases

Han SX, Ma JL 2179

BASIC RESEARCH

Glycyrrhizin down-regulates expression of tissue inhibitor of metalloproteinases-1

Wang QX, Cheng J, Guo J, Li WF, Wei HS 2183

Detection of hepatitis B virus cccDNA with modified polymerase chain reaction

Tang B, Wang YM, Liu J, Zhang R 2188

Expression of human neuron-specific enolase gene in human hepatocellular cancer cells BEL7402

Zhu AP, Zhang QY, Wang YM, Xu JJ, Sun L 2193

Moderate hypothermia therapy for acute liver failure in rats before liver transplantation

Wang ZD, Han DE, Cui YF, Jiang MS, Zhang XY, Zeng ZL 2197

Increase of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in peripheral blood of patients with chronic hepatitis C

Yang JH, Zhang YX, Su CH, Sun NX 2201

Therapeutic role of ethanolic extract of *Boschniakia Rossica* in dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in rats

Piao XX, Huang HG, Piao DM 2205

Distribution of dendritic cells and expression of chemokines in mouse models of mucosal immune *in vivo*

Xie ZJ, He YC, Jiao LM, Liu Y, Liu L 2210

Effects of celecoxib on cell proliferation and ERK2 expression of ERK2 in gastric cancer cells

Zhang Y, Jiang MD, Zeng WZ, Xu H, Xiong BJ, Weng M 2213

Growth inhibitory and apoptosis inducing effect on hepatocellular carcinoma Bel-7402 cell line by serum from rabbit fed with *Yiqi Huoxue Ruanjian Jiedu* decoction

Li DT, Shun GZ, Pei YX, Qi X, Li J, Ling HS 2217

Association of tumor necrosis factor- α and intercellular adhesion molecule-1 with acetaminophen-induced liver damages

Tian F, Wang Y, Wu ZY, Wang XQ, Li Y 2222

Expression of nerve growth factor messenger RNA in pancreatic cancer tissues in Sprague Dawley rats

Yang ZL, Deng XH, Yang LP, Li QL, Fan WT, Liang S, Miao XY 2227

REVIEW

Lactobacillus as a new living vaccine carrier in delivery of antigen

Yu QH, Yang Q 2231

Influence of nitric oxide and nitric oxide synthase on tumor radiotherapy sensitivity

Jiang CP, Ding YT 2235

Advance in effect of Id family gene on solid tumor in digestive system

Yang HY, Liu LX, Qu ZB, Liu GY, Chen W, Guo HX, Chen X 2238

Influential factors of Lamivudine associated YMDD variations of hepatic B virus

Lu DY, Wang S, Zhao LS 2243

Preventive methods for small-for-size liver syndrome in adult-to-adult living-donor liver transplantation

Ma YF, Li XC 2246

Advance in research of biological markers of hepato-cellular carcinoma

Wang JB, Liu LX 2251

Occurrence of inflammatory intestinal disease mediated by intestinal mucosal immunoregulation disturbance

Wang XD, Yuan XQ 2257

BRIEF REPORT

Effects of sp600125 on acetaldehyde-induced apoptosis of hepatic stellate cells and expression of Caspase-3 protein in rats

Tang W, Jiang MD, Li XA 2263

Effect of platelet activating factor on intestinal immunological barrier in young rat

Wang LJ, Liu DY, Sun M, Zhao X 2266

CLINICAL PRACTICE

Correlative factors of esophageal varices in patients with hepatocirrhosis: an analysis of 501 cases

Cui CJ, Jin YR, Piao XX, Pei FY 2269

Diagnosis and treatment for advanced hilar cholangiocarcinoma: an analysis of 15 cases

Zhang ZM, Xing HL, Li G, Liu K, Li G, Zhu JP, Su YM, Zhong H, Guo JX 2272

Changes of IgA and sIgA and its clinical significant in hepatic diseases

Liu DY, Liu P 2275

Clinical significance of detection for vascular endothelial growth factor in resection margin following total mesorectal excision

Zhan XL, Tian SL 2278

Effects of octreotide on platelet parameters in patients with acute pancreatitis

Huang J, Lu SQ, Chen JR 2281

Indexed/Abstracted by Chemical Abstracts, EMBASE/ Excerpta Medica and Abstract Journals

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi
World Chinese Journal of Digestology Monthly

Founded on January 15, 1993

Renamed on January 25, 1998

Publication date September 28, 2005

Honorary-Editor-in-Chief

Bo-Rong Pan

President and Editor-in-Chief

Lian-Sheng Ma

Edited by Editorial Board of

World Chinese Journal of Digestology

PO Box 2345, Beijing 100023, China

Published by The WJG Press

PO Box 2345, Beijing 100023, China

Overseas Distributor

China International Book Trading Corporation

PO Box 399, Beijing 100044, China

Code No.M4481

Mail-Order Circulation Section, The WJG Press

PO Box 2345, Beijing 100023, China

Telephone: +86-10-85381901

Fax: +86-10-85381893

Email: wcjd @ wjgnet.com

http://www.wjgnet.com

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

Copyright © 2005 by The WJG Press

慢性丙型肝炎患者 CD4⁺CD25⁺ 调节性T细胞表达增加

杨江华, 张永祥, 苏川, 孙南雄

杨江华, 张永祥, 孙南雄, 南京医科大学第一附属医院感染科 江苏省南京市 210029

苏川, 南京医科大学病原生物学系 江苏省南京市 210029

杨江华, 男, 1972-11-28 生, 安徽省铜陵市人, 汉族, 2003年南京医科大学博士研究生, 主要从事丙型肝炎慢性化机制研究。

江苏省现代病原生物学重点实验室开放课题, No. XDBY04002

通讯作者: 苏川, 江苏省南京市汉中140号, 南京医科大学病原生物学系。chuansu@njmu.edu.cn

电话: 025-86662773 传真: 025-86661318

共同通讯作者: 孙南雄, 210029, 江苏省南京市, 南京医科大学第一附属医院感染科。sun9876@126.com

电话: 025-83986144 传真: 025-83190852

收稿日期: 2005-05-30 接受日期: 2005-06-13

Increase of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in peripheral blood of patients with chronic hepatitis C

Jiang-Hua Yang, Yong-Xiang Zhang, Chuan Su, Nan-Xiong Sun

Jiang-Hua Yang, Yong-Xiang Zhang, Nan-Xiong Sun, Department of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Chuan Su, Department of Pathogenic Biology, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Supported by the Open Project from Pathogenic Biology Laboratory of Jiangsu Province, No. XDBY04002

Correspondence to: Chuan Su, Department of Pathogenic Biology, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. chuansu@njmu.edu.cn

Co-correspondence to: Nan-Xiong Sun, Department of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. sun9876@126.com.

Received: 2005-05-30 Accepted: 2005-06-13

Abstract

AIM: To investigate the role of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in the immune responses of patients with chronic hepatitis C.

METHODS: The number of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in the peripheral blood of chronic HC patients was detected by flow cytometry. Then the CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells were co-cultured with CD4⁺CD25⁻ T cells, and their inhibitory effect was analyzed. Flow cytometry was also used to examine the effect of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells on the synthesis of Interferon- γ and Interleukin-4 in CD4⁺CD25⁻ T cells. The expression of Foxp3 in CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells was detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR).

RESULTS: The percentage of CD4⁺CD25⁺ regulatory

T cells in the peripheral CD4⁺ T cells of the chronic HC patients was significantly higher than that of the healthy controls ($14.1 \pm 1.6\%$ vs $5.3 \pm 0.8\%$, $P < 0.01$). CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells significantly inhibited the proliferation of CD4⁺CD25⁻ T cells ($P = 0.002$) and the synthesis of IFN- γ . Foxp3 was highly expressed in CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells.

CONCLUSION: The level of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells increases in patients with chronic hepatitis C virus infection, which can specifically inhibit the response of Th1 cells.

Key Words: Hepatitis C virus; CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells; CD4⁺ T cell; Foxp3

Yang JH, Zhang YX, Su C, Sun NX. Increase of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in peripheral blood of patients with chronic hepatitis C. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(18):2201-2204

摘要

目的: 探讨CD4⁺CD25⁺调节性T(Treg)细胞在慢性丙型肝炎患者免疫下调中的意义。

方法: 流式细胞仪检测慢性丙型肝炎患者外周血中CD4⁺CD25⁺Treg细胞的数量;与CD4⁺CD25⁻T细胞共同培养,检测其抑制功能;流式细胞仪检测其对CD4⁺CD25⁻T细胞合成IFN- γ 和IL-4的影响;RT-PCR检测CD4⁺CD25⁺Treg细胞中Foxp3的mRNA表达。

结果: CD4⁺CD25⁺Treg细胞约占慢性丙型肝炎患者外周血中CD4⁺T细胞的14.1 \pm 1.6%,显著高于正常对照5.3 \pm 0.8%($P < 0.01$),显著抑制CD4⁺T细胞的增殖($P = 0.002$),以及合成IFN- γ 。CD4⁺CD25⁺Treg细胞高表达Foxp3。

结论: 持续性HCV感染患者CD4⁺CD25⁺Treg细胞表达增加,特异性抑制Th1细胞反应。

关键词: HCV; CD4⁺CD25⁺Treg细胞; CD4⁺T细胞; Foxp3

杨江华, 张永祥, 苏川, 孙南雄. 慢性丙型肝炎患者CD4⁺CD25⁺调节性T细胞表达增加. *世界华人消化杂志* 2005;13(18):2201-2204
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2201.asp>

0 引言

HCV感染的显著临床特点是,80%以上的急性患者可

转变为慢性持续性感染,而慢性HCV感染又是肝硬化和原发性肝细胞癌的重要病因^[1].研究急性自限性HCV感染的患者和猩猩表明有效控制HCV感染需要一个持久、广泛的CD4⁺Th1细胞反应.而慢性丙型肝炎患者表现为HCV特异性CD4⁺Th细胞数量减少,对抗原刺激的增生能力显著降低,主要分泌Th2型细胞因子(IL-4、IL-6和IL-10),而分泌Th1型细胞因子能力减弱(IFN- γ)^[1-5].近来研究显示,在多种病原体的慢性感染中,如疟原虫^[6]、利什曼原虫^[7]和HIV^[8]等,能够诱导宿主上调表达一群具有免疫抑制功能的CD4⁺CD25⁺Treg(CD4⁺CD25⁺regulatory T cell)细胞,分泌的IL-10和TGF- β 能够抑制抗原特异性CD4⁺T细胞反应,下调Th1的功能.而去除CD4⁺CD25⁺Treg细胞能够显著降低这些病原体的感染率.现就CD4⁺CD25⁺Treg细胞在慢性丙型肝炎患者中的数量,功能以及发病中的意义进行了探讨.

1 材料和方法

1.1 材料 慢性丙型肝炎患者18例,男11例,女7例,年龄14-60(平均48)岁.诊断符合2004年丙型肝炎防治指南的诊断标准.所有病例6 mo内均未使用免疫调节药物和抗病毒治疗,不合并HBV感染以及其它病毒性肝炎.正常对照15例,男10例,女5例.

细胞培养在RPMI1640中,含有2.05 mmol/L谷氨酰胺;10⁵ U/L青霉素和链霉素(Hyclone),以及100 mL/L人AB血清,于96孔U型培养板(Costar).流式抗体有PE-Cy5标记的CD4, PE标记的CD25, FITC标记的CD45RO(BD PharMingen), PE标记的IFN- γ 抗体和IL-4抗体(eBioscience),同型对照抗体为PE标记的大鼠IgG1和小鼠IgG1(eBioscience).以及红细胞裂解液与抗CD3抗体(BD PharMingen).阳性分选CD8⁺T细胞磁珠(Dynal),分选CD4⁺CD25⁺T细胞的免疫磁珠(Miltenyi).RNA纯化试剂盒与RT-PCR试剂盒(QIAGEN).

1.2 方法

1.2.1 CD4⁺CD25⁺Treg细胞计数 取全血100 μ L,分别加入PE-Cy5标记的CD4, PE标记的CD25, FITC标记的CD45RO各10 μ L于标本管中,室温孵育20-30 min.再加红细胞裂解液,并振荡混匀.洗涤一次,重新悬浮细胞,上流式细胞仪检测.对于已分离的细胞用直接抗体标记后,即可检测.

1.2.2 CD4⁺CD25⁺T细胞的分离与培养 采患者或正常人静脉血,用密度梯度离心法分离单个核细胞.然后用Dynabeads阳性分选去除单个核细胞中的CD8⁺T细胞;再使用Miltenyi磁珠阴性分选CD4⁺T细胞.将这种去除T细胞(CD8⁺T和CD4⁺T细胞)的剩余细胞,用Co-60照射(30 Gy),作为APC.对总CD4⁺T细胞再通过抗CD25的磁珠阳性分选,将CD4⁺CD25⁺T细胞与

CD4⁺CD25⁺T细胞分开.

分别取CD4⁺CD25⁺T细胞、CD4⁺CD25⁺T细胞,或两者按1:1混合,以及APC各1 \times 10⁵个细胞,共同培养,同时加入10 mg/L抗HCV抗原肽(包括C区、NS3区、NS4a区和NS5a区)共同培养5 d,在培养结束前16 h加入³H-TdR,收集细胞,在液闪计数仪上测每分钟脉冲数.

1.2.3 细胞内因子检测 检测细胞内因子IL-4和IFN- γ ,取CD4⁺CD25⁺T细胞,CD4⁺CD25⁺T细胞,或与CD4⁺CD25⁺T细胞相混合,加入20 mg/L HCV抗原合成肽,37 $^{\circ}$ C,50 mL/L CO₂培养6 h.培养开始1 h后,每孔加入0.7 mg/L BFA.收集培养细胞,经Fix&Perm固定通透细胞后,加入PE标记的IFN- γ 抗体和IL-4抗体,阴性对照管加PE标记的大鼠IgG1和小鼠IgG1同型抗体对照,4 $^{\circ}$ C避光放置30 min;洗涤后,重悬于500 μ L PBS中,经FACSCalibur流式细胞仪检测.

1.2.4 Foxp3的mRNA检测 采用RT-PCR检测Foxp3的mRNA的表达.取1 \times 10⁵个细胞,用柱分离法抽提RNA,用DEPC处理过的水将RNA稀释为1 mg/L. FoxP3引物为: forward, 5'-TCACCTACGCCACGTCAT, reverse, 5'-ACTCAGGTTGTGGCGGATGG.反应条件:逆转录50 $^{\circ}$ C 30 min; 95 $^{\circ}$ C 15 min灭活逆转录酶;PCR循环条件为,95 $^{\circ}$ C 60 s, 53 $^{\circ}$ C 60 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s; 72 $^{\circ}$ C 10 min终延伸.同时设 β -actin作为内参照.

统计学处理 采用SPSS 10.1软件通过Mann-Whitney U检验分析比较丙型肝炎患者和正常对照CD4⁺CD25⁺Treg细胞的数量差异,其中两组之间的关系采用非参数Speaman相关性分析.

2 结果

2.1 CD4⁺CD25⁺Treg细胞的数量和功能 丙型肝炎患者外周血中CD4⁺CD25⁺CD45RO⁺T细胞约占CD4⁺T细胞14.1 \pm 1.6%,明显高于正常人外周血中CD4⁺CD25⁺CD45RO⁺T细胞约占CD4⁺T细胞的(5.3 \pm 0.8)% ($P = 0.004 < 0.01$) (图1A).同时慢性丙型肝炎患者CD4⁺CD25⁺Treg细胞,后者的数量与HCV RNA滴度之间呈正相关性($R = 0.575$, $P = 0.016 < 0.05$) (图1B).CD4⁺CD25⁺T细胞表达一种转录因子Foxp3,并可作为其一种较为特异性的分子标记^[9].我们的研究证实,用RT-PCR扩增Foxp3 mRNA后,当循环次数降到30时,仅见CD4⁺CD25⁺T细胞表达Foxp3,并且丙肝患者较正常对照表达增高(图1C).

2.2 CD4⁺CD25⁺T细胞抑制CD4⁺CD25⁺T细胞的增殖 CD4⁺CD25⁺Treg细胞具有免疫低反应性,CD4⁺CD25⁺Treg细胞不发生增殖,增殖能力显著低于CD4⁺CD25⁺T细胞.经HCV抗原活化后,CD4⁺CD25⁺Treg细胞对CD4⁺CD25⁺T细胞的增殖功能具有显著的抑制效应($P = 0.002 < 0.01$) (图2).

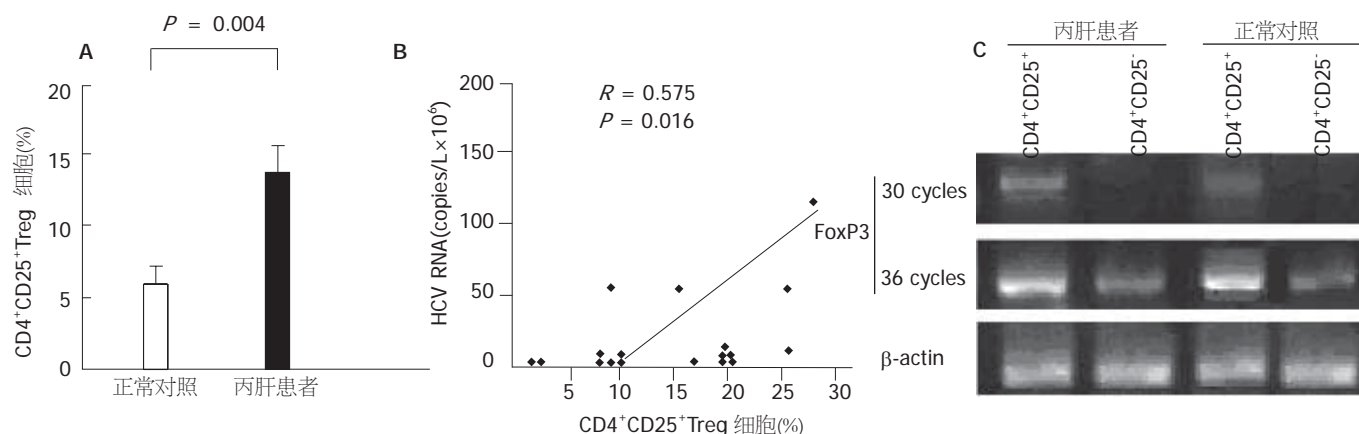


图1 慢性丙型肝炎患者外周血中CD4⁺CD25⁺CD45RO⁺T细胞占CD4⁺T细胞的比例. A: 与正常对照相比慢性丙型肝炎患者CD4⁺CD25⁺CD45RO⁺T细胞占CD4⁺T细胞的比例增加($P = 0.004$); B: 慢性丙型肝炎患者HCV RNA滴度与CD4⁺CD25⁺Treg细胞之间的相关性分析($R = 0.575$, $P = 0.016$); C: RT-PCR检测Foxp3的mRNA的表达.

2.3 CD4⁺CD25⁺T细胞抑制CD4⁺T细胞合成细胞因子
取CD4⁺CD25⁺T细胞或CD4⁺CD25⁺T细胞与CD4⁺CD25⁺T细胞相混合, 用HCV抗原刺激培养. 在加入CD4⁺CD25⁺T细胞的一组合成IFN- γ 的CD4⁺T细胞显著减少, 而对IL-4数量影响并不明显(图3). 由此提示, 在持续性HCV感染过程中CD4⁺CD25⁺T细胞主要抑制HCV特异性Th1细胞反应.

3 讨论

在持续性HCV感染患者外周血中一群具有免疫抑制功能的CD4⁺CD25⁺Treg细胞表达上调, 不仅数量增加, 而且功能也较正常人CD4⁺CD25⁺Treg细胞增强, 并显著抑制CD4⁺T细胞的增殖, 以及HCV特异性CD4⁺T细胞合成IFN- γ . 由此提示, CD4⁺CD25⁺Treg细胞介导的免疫抑制作用在持续性HCV感染过程中起着重要作用. CD4⁺CD25⁺Treg细胞是一类具有免疫抑制功能抑制性T细胞群, 特征性地表达IL-2的 α 链(CD25). CD4⁺CD25⁺Treg细胞主要分泌细胞因子IL-10和TGF- β , 活化后的细胞表面分子CTLA-4表达增加, 表达转录因子Foxp3^[10]. CD4⁺CD25⁺Treg细胞具有免疫低反应性,

多表现为记忆细胞表型(CD45RO⁺). 经多克隆激活剂或特异性抗原激活后, CD4⁺CD25⁺Treg细胞能够通过依赖细胞接触的方式抑制CD4⁺和CD8⁺T细胞的增生、分化, 以及分泌细胞因子^[11]. 已有研究表明, 在多种病原体的慢性感染中, 都能够诱导宿主上调表达CD4⁺CD25⁺Treg细胞, 抑制抗原特异性CD4⁺T细胞反应, 而去除CD4⁺CD25⁺Treg细胞能够显著降低这些病原体的感染率^[6-8]. Sugimoto *et al*^[12]研究指出, 在慢性HCV感染患者体内CD4⁺CD25⁺Treg细胞的数量明显高于恢复患者(7.3% *vs* 2.5%, $P = 0.002$), 而正常对照则为3.6%($P = 0.017$). 体外研究显示, CD4⁺CD25⁺Treg细胞能够抑制HCV特异性CD8⁺T细胞的增殖. 以及最近研究报道, CD4⁺CD25⁺Treg细胞能够调节持续性HCV中的细胞免疫反应^[13]. 多项研究表明, HCV特异性Th1细胞在控制急性HCV感染中起着重要作用, 慢性患者多表现为HCV特异性CD4⁺T细胞数量减少、增殖功能减弱, 以及分泌Th1型细胞因子(IFN- γ)功能降低等^[3, 14-17], 但尚未阐明其发生机制. 本组研究数据表明, CD4⁺CD25⁺Treg细胞不仅抑制慢性丙型肝炎患者

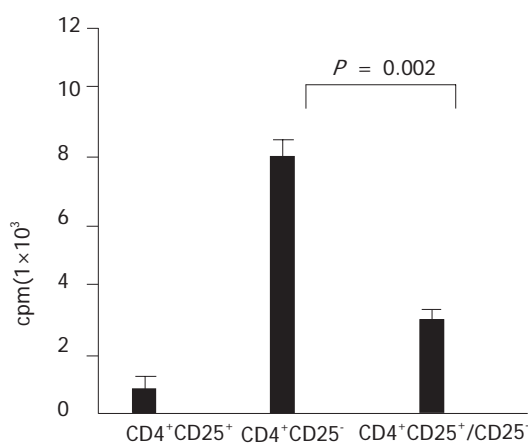


图2 CD4⁺CD25⁺T细胞抑制HCV特异性CD4⁺CD25⁺T细胞的增殖($P = 0.002$).

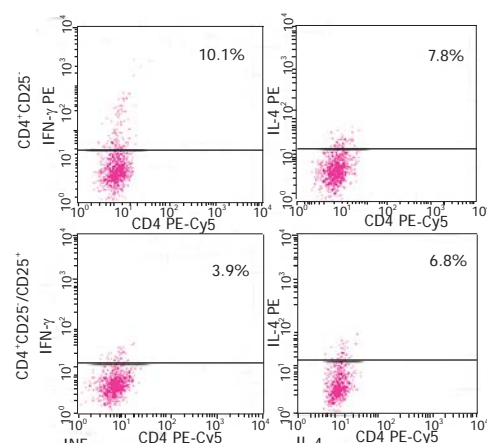


图3 CD4⁺CD25⁺T细胞抑制HCV特异性CD4⁺CD25⁺T细胞合成细胞因子.

CD4⁺T细胞的增殖,并显著抑制HCV特异性Th1细胞反应(IFN- γ),对Th2细胞反应(IL-4)的抑制作用不明显.或许这将有助于解释为什么在慢性HCV感染以及其它慢性病原体感染中存在Th细胞极化异常现象.

当机体感染病原体时,多种微生物的分子及其代谢产物都能够作用静止APC上的TLR(Toll-like receptors),如作用后的APC不能分化成熟,则诱导初始CD4⁺T细胞表达转录因子Foxp3,分化为CD4⁺CD25⁺Treg细胞,从而抑制效应T细胞的应答^[18].本研究也表明,CD4⁺CD25⁺Treg细胞高表达Foxp3,可作为CD4⁺CD25⁺Treg细胞一种特异性标记.总之,持续性HCV感染患者外周血中一群具有免疫抑制功能的CD4⁺CD25⁺Treg细胞数量增加,显著抑制CD4⁺T细胞的增殖,以及HCV特异性Th1细胞反应.因而提示,CD4⁺CD25⁺Treg细胞在丙型肝炎慢性化过程中起着免疫调节作用.这为进一步研究在持续性HCV感染中如何调控CD4⁺CD25⁺Treg细胞的功能奠定了基础.

4 参考文献

- 1 Frank C, Mohamed MK, Strickland GT, Lavanchy D, Arthur RR, Magder LS, El Khoby T, Abdel-Wahab Y, Aly Ohn ES, Anwar W, Sallam I. The role of parenteral antischistosomal therapy in the spread of hepatitis C virus in Egypt. *Lancet* 2000;355:887-891
- 2 Chang KM. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection. *Clin Liver Dis* 2003;7:89-105
- 3 Gerlach JT, Diepolder HM, Jung MC, Gruener NH, Schraut WW, Zachoval R, Hoffmann R, Schirren CA, Santantonio T, Pape GR. Recurrence of hepatitis C virus after loss of virus-specific CD4(+) T-cell response in acute hepatitis C. *Gastroenterology* 1999;117:933-941
- 4 Tsai SL, Liaw YF, Chen MH, Huang CY, Kuo GC. Detection of type 2-like T-helper cells in hepatitis C virus infection: implications for hepatitis C virus chronicity. *Hepatology* 1997;25:449-458
- 5 MacDonald AJ, Duffy M, Brady MT, McKiernan S, Hall W, Hegarty J, Curry M, Mills KH. CD4 T helper type 1 and regulatory T cells induced against the same epitopes on the core protein in hepatitis C virus-infected persons. *J Infect Dis* 2002;185:720-727
- 6 Hisaeda H, Maekawa Y, Iwakawa D, Okada H, Himeno K, Kishihara K, Tsukumo S, Yasutomo K. Escape of malaria parasites from host immunity requires CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Med* 2004;10:29-30
- 7 Mendez S, Reckling SK, Piccirillo CA, Sacks D, Belkaid Y. Role for CD4(+) CD25(+) regulatory T cells in reactivation of persistent leishmaniasis and control of concomitant immunity. *J Exp Med* 2004;200:201-210
- 8 Aandahl EM, Michaelsson J, Moretto WJ, Hecht FM, Nixon DF. Human CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells control T-cell responses to human immunodeficiency virus and cytomegalovirus antigens. *J Virol* 2004;78:2454-2459
- 9 Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003;4:330-336
- 10 Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA. CD4⁺CD25⁺ high regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol* 2001;167:1245-1253
- 11 Asseman C, von Herrath M. About CD4pos CD25pos regulatory cells. *Autoimmun Rev* 2002;1:190-197
- 12 Sugimoto K, Ikeda F, Stadanlick J, Nunes FA, Alter HJ, Chang KM. Suppression of HCV-specific T cells without differential hierarchy demonstrated ex vivo in persistent HCV infection. *Hepatology* 2003;38:1437-1448
- 13 Cabrera R, Tu Z, Xu Y, Firpi RJ, Rosen HR, Liu C, Nelson DR. An immunomodulatory role for CD4(+)CD25(+) regulatory T lymphocytes in hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2004;40:1062-1071
- 14 Ulsenheimer A, Gerlach JT, Gruener NH, Jung MC, Schirren CA, Schraut W, Zachoval R, Pape GR, Diepolder HM. Detection of functionally altered hepatitis C virus-specific CD4 T cells in acute and chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003;37:1189-1198
- 15 Rosen HR, Miner C, Sasaki AW, Lewinsohn DM, Conrad AJ, Bakke A, Bouwer HG, Hinrichs DJ. Frequencies of HCV-specific effector CD4⁺ T cells by flow cytometry: correlation with clinical disease stages. *Hepatology* 2002;35:190-198
- 16 Kantzanou M, Lucas M, Barnes E, Komatsu H, Dusheiko G, Ward S, Harcourt G, Klenerman P. Viral escape and T cell exhaustion in hepatitis C virus infection analysed using Class I peptide tetramers. *Immunol Lett* 2003;85:165-171
- 17 Nascimbeni M, Mizukoshi E, Bosmann M, Major ME, Mihalik K, Rice CM, Feinstone SM, Rehermann B. Kinetics of CD4⁺ and CD8⁺ memory T-cell responses during hepatitis C virus rechallenge of previously recovered chimpanzees. *J Virol* 2003;77:4781-4793
- 18 Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003;299:1057-1061

电编 李琪 编辑 潘伯荣 审读 张海宁