

HBV感染后外周血CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性T细胞与疾病进展的相关性

周立平, 陈昕, 巴静, 赵连爽, 李异玲

■背景资料

乙型肝炎病毒(HBV)是一种非细胞毒性病毒, 其导致的肝细胞损坏是由机体针对HBV特异性抗原的免疫反应所引起, 而且HBV感染的发生、发展和转归与宿主的免疫状态密切相关。CD4⁺CD25⁺调节性T细胞可抑制天然及获得性免疫系统, 对于维持免疫耐受及稳态具有重要作用。

周立平, 陈昕, 巴静, 赵连爽, 李异玲, 中国医科大学附属第一医院 辽宁省沈阳市 110001

辽宁省教育厅高等学校科研项目, No. 05L548

通讯作者: 李异玲, 110001, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属第一医院消化科. zhouliping750825@163.com

电话: 024-83282164

收稿日期: 2007-01-21 修回日期: 2007-02-08

Correlation between expression of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells and progression of hepatitis B virus infection

Li-Ping Zhou, Xin Chen, Jing Ba, Lian-Shuang Zhao, Yi-Ling Li

Li-Ping Zhou, Xin Chen, Jing Ba, Lian-Shuang Zhao, Yi-Ling Li, The First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China
Supported by: The Scientific Research Project for Universities of Education Department of Liaoning Province, No. 05L548

Correspondence to: Yi-Ling Li, the Department of Gastroenterology, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. zhouliping750825@163.com
Received: 2007-01-21 Revised: 2007-02-08

Abstract

AIM: To investigate the correlation between progression of hepatitis B virus (HBV) infection and expression of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells.

METHODS: One hundred and thirty-six HBV-infected patients and 40 healthy controls were selected. CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells expressing was detected by flowcytometry, clinical data of HBV infected patients was considered.

RESULTS: Expression of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells in HBV-infected patients increased markedly compared with that in healthy controls ($7.48 \pm 1.03\%$ vs $3.58 \pm 0.71\%$, $P < 0.01$). There was also a significant difference chronic hepatitis B compared with chronic severe hepati-

tis B ($6.55 \pm 1.26\%$ vs $8.65 \pm 2.58\%$, $P < 0.05$). The log value of HBV load correlated positively with the expression of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells ($r = 0.332$, $P < 0.05$).

CONCLUSION: Peripheral blood CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells levels are closely correlated with the progression of HBV infection.

Key Words: CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells; Hepatitis B virus; Flow cytometry

Zhou LP, Chen X, Ba J, Zhao LS, Li YL. Correlation between expression of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells and progression of hepatitis B virus infection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(21): 2366-2369

摘要

目的: 探讨HBV感染者外周血CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性T细胞水平与HBV感染后疾病进程的相关性。

方法: HBV感染者136名及健康对照40名, 应用流式细胞仪胞内染色技术检测外周血CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性T细胞表达, 结合HBV感染者临床情况进行分析。

结果: HBV感染者外周血CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性T细胞表达率较健康对照组显著增高($7.48\% \pm 1.03\%$ vs $3.58\% \pm 0.71\%$, $P < 0.01$); 慢性乙肝组与慢性重型乙肝组相比, 外周血CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T调节细胞的表达率有明显差异($6.55\% \pm 1.26\%$ vs $8.65\% \pm 2.58\%$, $P < 0.05$); HBV病毒载量的对数值与外周血CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T调节细胞的表达率之间存在正相关($r = 0.332$, $P < 0.01$)。

结论: HBV感染者外周血CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性T细胞水平与疾病进展明显相关。

关键词: CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性T细胞; 乙型肝炎病毒; 流式细胞仪

周立平, 陈昕, 巴静, 赵连爽, 李异玲. HBV感染后外周血

CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性T细胞与疾病进展的相关性. 世界华人消化杂志 2007;15(21):2366-2369
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2366.asp>

0 引言

CD4⁺CD25⁺调节性T细胞占健康人外周CD4⁺T细胞数量的5%-10%, 可抑制天然及获得性免疫系统的功能, 对于维持免疫耐受及稳态具有重要作用^[1], 但CD25分子在其他T淋巴细胞中也有表达, 不能作为调节性T细胞的特异性标志. 目前多项研究表明, 叉头状螺旋转录因子(forkhead/winged helix transcription factor, Foxp3)主要表达在CD4⁺CD25⁺调节性T细胞上, 与调节性T细胞的功能密切相关, 是目前定义CD4⁺CD25⁺调节性T细胞的最佳标志物^[2]. 乙型肝炎病毒(HBV)是一种非细胞毒性病毒, 其所致的肝细胞损坏是由机体针对HBV特异性抗原的免疫反应所引起, 而且HBV感染的发生、发展和转归与宿主的免疫状态密切相关. 由于CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性T细胞可以控制机体损伤后的免疫反应^[3], 我们通过流式细胞仪技术检测HBV感染者外周血CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性T细胞水平, 结合患者临床分期及病毒载量, 探讨CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性T细胞与HBV感染后疾病进程的相关性.

1 材料和方法

1.1 材料 2005-06/2006-12住院HBV感染者136例, 男84例, 女52例, 年龄21-75岁. 其中慢性乙肝53例, 慢性重型乙肝42例, 肝炎肝硬化41例, 无重叠或混合感染. 所有病例均符合2000年西安会议修订的《病毒性肝炎防治方案》诊断分型标准^[4]. 选择健康人40例作为健康对照组, 无急慢性心、肝、肾等疾病. APC标记的鼠抗人CD25mAb(抗CD25-APCmAb), FITC标记的鼠抗人CD4mAb(抗CD4-FITCmAb), PerCP标记的鼠抗人CD3mAb(抗CD3-PerCPmAb), 溶血素等均为美国BD公司产品; PE anti-human Foxp3染色试剂盒购自美国eBioscience公司; HBV DNA采用实时定量PCR定量检测, 试剂选用深圳匹基公司生产HBV核酸扩增(PCR)检测试剂盒.

1.2 方法 静脉血2 mL, EDTA抗凝, 混匀, 取全血100 μ L放入另一试管, 分别加入CD3-PerCP 10 μ L、抗CD4-FITC 10 μ L和抗CD25-APC 10 μ L, 混匀后室温避光放置30 min, 然后加入溶血素2 mL, 室温避光10 min. 用PBS洗涤后加入

破膜/固定剂1 mL, 4 $^{\circ}$ C避光染色40 min. 洗涤后加入20 mL/L鼠血清2 μ L, 4 $^{\circ}$ C避光15 min, 加入anti-Foxp3-PE及IgG2a-PE同型对照, 4 $^{\circ}$ C避光30 min, 洗涤后加入含10 g/L多聚甲醛的PBS重悬, FACS Aria流式细胞仪Diva软件进行分析. 以FSC、SSC、CD3-PerCP、CD4-FITC定义CD4⁺T细胞, 计算这一细胞群内CD25⁺Foxp3⁺细胞的比率. 病毒载量采用实时荧光定量PCR方法, 用美国Roche公司的LightCycler自动载量仪测定HBV病毒载量.

统计学处理 不同HBV感染组及健康组CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T细胞水平比较采用方差分析, LSD法进行两两比较; 相关性分析采用Pearson相关系数. 数据用mean \pm SD表示, 所有资料采用SPSS11.5软件系统进行分析.

2 结果

2.1 HBV感染者外周血CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T调节细胞的表达 HBV感染者外周血CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性T细胞表达率为7.48% \pm 1.03%, 健康对照组外周血CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性T细胞表达率为3.58% \pm 0.71%. HBV感染者外周血CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性T细胞表达率较健康对照组显著增高($t=14.724$, $P<0.001$).

2.2 外周血CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T调节细胞的表达与临床分期的关系 不同临床分期的HBV感染者外周血CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T调节细胞的表达率均明显高于健康对照组($P<0.05$, 表1), 其中慢性乙肝组, 重型乙肝组, 肝硬化组外周血CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T调节细胞的表达百分率分别为6.65%, 8.65%和7.26%. 慢性乙肝组外周血CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T调节细胞的表达率与慢性重型乙肝组相比有统计学意义($P<0.05$). 慢性乙肝组T调节细胞表达率虽低于乙肝后肝硬化组, 但差异无统计学意义($P>0.05$).

2.3 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T调节细胞表达与HBV载量的相关性 136位患者均进行了HBV-DNA含量的检测, 检测结果为 5.0×10^5 - 10^{10} copies/L. HBV载量的对数值与外周血CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T调节细胞的表达率之间存在正相关($r=0.332$, $P<0.01$).

3 讨论

目前研究认为HBV感染引起的慢性肝炎主要是免疫损伤所致, HBV感染免疫状态研究对于进一步分析HBV感染的发病机制有重要的作用^[5].

■应用要点
监测外周血CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T细胞比例有望成为评价HBV感染者体内细胞免疫状态和了解疾病进展的有效细胞免疫指标.

■名词解释

调节性T细胞: 是近年发现的具有免疫抑制功能的抑制性T细胞群, 对于维持免疫系统稳态及免疫耐受具有重要作用, 可通过非抗原特异性方式如直接接触抑制或分泌细胞因子等抑制免疫系统的功能, 但其免疫抑制机制尚不完全清楚。

CD4⁺CD25⁺调节性T细胞是近年发现的具有免疫抑制功能的抑制性T细胞群, 对于维持免疫系统稳态及免疫耐受具有重要作用, 可通过非抗原特异性方式如直接接触抑制或分泌细胞因子等抑制免疫系统的功能, 但其免疫抑制机制尚不完全清楚^[6]。Franzese *et al*^[7]对CD4⁺CD25⁺调节性T细胞在急慢性HBV感染中的发病机制进行了研究, 认为无论急性HBV感染还是慢性HBV感染, CD4⁺CD25⁺调节性T细胞均可下调针对HBV特异性抗原的CD8⁺ T细胞的功能。Stoop *et al*^[8]研究认为CD4⁺CD25⁺调节性T细胞与HBV感染慢性化机制有关。目前尚未见到有关CD4⁺CD25⁺调节性T细胞与HBV感染后疾病进展相关性的报道。我们的研究结果表明, HBV患者外周血CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性T细胞表达率较健康对照组显著增高, 这与国外文献报道相一致^[7-8], 提示HBV感染者体内免疫系统功能受抑制, 不能及时有效的清除病毒, 促进疾病慢性化。我们还发现: 外周血CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性T细胞的表达水平与HBV感染的临床分期相关。与慢性重型乙肝组相比, 慢性乙肝组外周血CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T调节细胞的表达率有明显统计学差异, 提示HBV感染者外周血CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性T细胞介导的免疫耐受和HBV感染后疾病进展程度密切相关, 可能直接参与肝脏免疫损伤的发生过程。因此, 外周血CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性T细胞的表达率可能是一个较好的反映细胞免疫功能的参考指标, 可以在临床上用于免疫功能的监测, 同时该指标亦可判断HBV感染后疾病的进展及预后。我们分析其机制可能为CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T调节细胞能够抑制HBV特异性CD8⁺ T细胞的功能, 使CTL功能受损, 导致疾病进展^[9]。

我们的实验结果还显示, HBV感染后其病毒载量的对数值与外周血CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T调节细胞的表达率之间存在正相关, 提示HBV感染后体内CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T调节细胞表达上调, 促进HBV病毒复制。其机制可能为CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T细胞可以通过抑制单核细胞和巨噬细胞产生IFN- γ , 而后者可以通过阻断病毒前基因组mRNA介导的核心颗粒装配来抑制HBV复制的^[10]。Furuichi *et al*^[11]在活体动物实验中发现, 如果预先清除小鼠体内的CD25⁺ T细胞, 通过基因治疗后的鼠体内针对HBV特异性的效应CD8⁺ T细胞数量显著升高。因此如果我们能够抑制CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T细胞的增生

表 1 HBV感染者临床分期与外周血CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T调节细胞的表达百分率(%)

分组	n	CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺
慢性乙肝	53	67.8 ± 8.2	39.3 ± 8.7	6.6 ± 1.3 ^{ac}
慢性重型乙肝	42	66.4 ± 7.4	37.8 ± 7.5	8.6 ± 2.6 ^a
乙肝后肝硬化	41	64.6 ± 6.5	36.6 ± 7.0	7.3 ± 2.0 ^a
健康对照	40	69.4 ± 10.4	41.2 ± 9.3	3.6 ± 1.1

^aP<0.05 vs 健康对照组; ^cP<0.05 vs 慢性重型乙肝组。

和分化或阻断其调控途径, 或许能够下调其免疫抑制功能, 同时降低HBV病毒复制, 这将为慢性HBV感染的治疗寻找一条新途径。

总之, HBV感染者CD4⁺CD25⁺调节性T细胞与疾病进展密切相关, 监测外周血CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T细胞比例有望成为评价患者体内细胞免疫状态和了解疾病进展的有效细胞免疫指标。我们初步探讨了不同临床分期的HBV感染者外周血CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性T细胞的数量, 为以后的进一步深入研究打下基础。为了进一步阐明CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T调节细胞在HBV感染后发病机制及治疗中的作用, 还需要对患者体内CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T细胞功能进行详细的研究。

4 参考文献

- 1 Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995; 155: 1151-1164
- 2 Fontenot JD, Rudensky AY. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nat Immunol* 2005; 6: 331-337
- 3 Murphy TJ, Ni Choileain N, Zang Y, Mannick JA, Lederer JA. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells control innate immune reactivity after injury. *J Immunol* 2005; 174: 2957-2963
- 4 传染病与寄生虫学会. 病毒性肝炎防治方案. 中华传染病杂志 2001; 19: 52-62
- 5 Diepolder HM, Gruener NH, Gerlach JT, Jung MC, Wierenga EA, Pape GR. Different levels of T-cell receptor triggering induce distinct functions in hepatitis B and hepatitis C virus-specific human CD4(+) T-cell clones. *J Virol* 2001; 75: 7803-7810
- 6 von Boehmer H. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat Immunol* 2005; 6: 338-344
- 7 Franzese O, Kennedy PT, Gehring AJ, Gotto J,

- Williams R, Maini MK, Bertolotti A. Modulation of the CD8⁺-T-cell response by CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in patients with hepatitis B virus infection. *J Virol* 2005; 79: 3322-3328
- 8 Stoop JN, van der Molen RG, Baan CC, van der Laan LJ, Kuipers EJ, Kusters JG, Janssen HL. Regulatory T cells contribute to the impaired immune response in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* 2005; 41: 771-778
- 9 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
- 10 Taams LS, van Amelsfort JM, Tiemessen MM, Jacobs KM, de Jong EC, Akbar AN, Bijlsma JW, Lafeber FP. Modulation of monocyte/macrophage function by human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Hum Immunol* 2005; 66: 222-230
- 11 Furuichi Y, Tokuyama H, Ueha S, Kurachi M, Moriyasu F, Kakimi K. Depletion of CD25⁺CD4⁺T cells (Tregs) enhances the HBV-specific CD8⁺ T cell response primed by DNA immunization. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3772-3777

■同行评价

本文检测不同乙肝患者CD4⁺CD25⁺调节性T细胞水平与乙肝病程等的关系,有一定学术价值,结果可信,讨论条理分明,参考文献引用较新,对HBV感染者的防治提供了有意义的信息。

编辑 何燕 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

●消息●

2007 年原位肝脏移植新技术及进展学习班通知

本刊讯 为促进国内肝脏移植领域的交流与合作,为拟开展肝脏移植的同道提供技术支持,提高我国肝移植的技术水平,推动肝移植的健康发展,中山大学附属第三医院肝脏移植中心将于2007-08-29/09-02与《世界华人消化杂志》合作举办“原位肝肝移植新技术及进展”学习班,由中山大学器官移植研究所所长陈规划教授主持,并邀请海内外肝移植知名专家授课,就目前我国肝移植存在的重点和难点问题以及近几年来肝移植技术的新进展进行学术讲座。

中山大学附属第三医院肝脏移植中心是广东省器官移植研究所和中山大学器官移植研究所挂靠单位,也是广东省卫生厅重点专科和广东省器官移植学会主任委员单位。目前,已开展近1000例肝脏移植术,术后1 a生存率超过80%,居国内领先水平。本中心已举办3期肝脏移植技术学习班,并协助国内60余家单位开展了肝脏移植术。本项目为2007年国家级继续医学教育项目,项目编号为:2007-04-10-024,授予I类学分14分。授课内容主要涉及肝脏移植手术技巧、高危受者的麻醉管理、重症感染病人的无肝素化持续血液净化治疗、个体化免疫抑制方案、术后随访管理系统、抗乙肝病毒治疗新策略、西罗莫司及超声造影技术在肝脏移植中的应用等方面。学习对象为省级、地市级医院的医护人员。收费标准:培训费900元/人(统一安排食宿,费用自理)

通讯地址:510630,广州市天河路600号,中山大学附属第三医院肝脏移植中心。联系人:汪根树 电话:020-87595523 传真:020-87595523 E-mail:chengying_827@163.com。