

慢性乙型肝炎患者、乙型肝炎肝硬化患者外周血 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞的水平及意义

张 磊 谷甸娜 陈永平 郑明华

摘 要 **目的** 测定慢性乙型肝炎患者、乙型肝炎肝硬化患者外周血 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞 (Treg) 的水平并探讨其意义。**方法** 流式细胞术检测 12 例慢性乙型病毒性肝炎患者, 15 例乙型病毒性肝炎后肝硬化患者和 6 例健康对照者外周血中 CD4⁺ CD25⁺ Treg 的频率。**结果** 12 例慢性乙型病毒性肝炎患者外周血中 CD4⁺ CD25⁺ Treg 占 CD4⁺ 淋巴细胞的比例为 $(12.21 \pm 1.46)\%$, 15 例慢性乙型病毒性肝炎后肝硬化患者外周血中 CD4⁺ CD25⁺ Treg 占 CD4⁺ 淋巴细胞的比例为 $(11.36 \pm 1.06)\%$, 与 6 例健康对照组 $(9.86 \pm 1.00)\%$ 相比差异有显著性 ($P < 0.05$), 慢性乙型病毒性肝炎与慢性乙型病毒性肝炎后肝硬化组间比较差异无显著性 ($P > 0.05$)。**结论** Treg 与 CHB 患者持续 HBV 感染密切相关, 而是否参与乙肝后肝硬化的发病机制有待进一步研究。

关键词 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞 慢性乙型病毒性肝炎 肝硬化

The Level of CD4⁺ CD25⁺ Regulatory T Cells in Peripheral Blood in Patients with Chronic Hepatitis B and HBV-related Liver Cirrhosis.

Zhang Lei, Gu Dianna, Chen Yongping, Zheng Minghua. Department of Infection Diseases, First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Zhejiang 325000, China

Abstract Objective To analyze the level of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells (Treg) in peripheral blood of chronic HBV and HBV-related liver cirrhosis patients and study its clinical significance. **Methods** 12 CHB patients, 15 HBV-related liver cirrhosis patients and 6 healthy controls were enrolled in the study. The flow cytometry was used to detect the frequency of CD4⁺ CD25⁺ Tregs in the peripheral blood. **Results** The frequency of CD4⁺ CD25⁺ Tregs in the peripheral blood in the CHB and cirrhosis were $(12.21 \pm 1.46)\%$ and $(11.36 \pm 1.06)\%$ respectively, which were both higher than those $(9.86 \pm 1.00)\%$ of the controls ($P < 0.05$). There was no significant difference between the CHB and cirrhosis ($P > 0.05$). **Conclusion** These findings suggest that CD4⁺ CD25⁺ Treg plays an role in the persistent infection of HBV, but is not sure in the mechanism of HBV-related liver cirrhosis.

Key words CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells; Chronic hepatitis B; Liver cirrhosis

HBV 是一种非致细胞病变的嗜肝 DNA 病毒, 在全世界约有 3.5 亿人感染 HBV。大多数成人感染 HBV 后体内的病毒很快被清除而表现为急性感染过程, 约 10% 的成人和 90% 的儿童感染后成为慢性携带者。每年约有 100 万 ~ 200 万人死于 HBV 感染相关疾病, 如肝硬化、肝癌^[1, 2]。在我国大约有 1.3 亿的 HBV 携带者和 2 百多万的慢性乙肝患者^[3]。HBV 特异性 T 淋巴细胞和 CD4⁺ T 淋巴细胞在抑制 HBV 感染的过程中起着关键的作用。虽然很多证据表明宿主对病毒抗原的应答不足与阴性选择、免疫耐受、T 细胞低反应及淋巴因子产物失调有关, 但在 HBV

感染中 T 细胞耐受机制目前尚未阐明^[4]。CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞是一群特殊的 T 细胞亚群, 具有免疫无能性和免疫抑制性两大功能特征。肝硬化存在全身和肝脏本身免疫功能的紊乱, 是炎症反应的必然结果。目前有关肝硬化与 Treg 相关性的研究甚少, 本研究通过对乙型肝炎后肝硬化患者、慢性乙型肝炎患者及健康对照组者外周血 CD4⁺ CD25⁺ Treg 的表达水平及其意义作初步探讨。

材料与方法

1. 研究对象: 收集 2009 年 1 ~ 8 月在温州医学院附属第一医院感染科住院的乙型肝炎肝硬化患者 15 例 (LC 组), 其中男性 10 例, 女性 5 例, 年龄 30 ~ 71 岁, 平均年龄 51.47 ± 12.13 岁。慢性乙型肝炎 12 例 (CHB 组), 男性 7 例, 女性 5 例, 年龄 20 ~ 60 岁, 平均年龄 32.42 ± 12.80 岁。健康对照组 (NC 组) 来源于本科室志愿者, 共 6 例, 男性 4 例, 女性 2 例, 年龄 25 ~ 35 岁, 平均年龄 29.33 ± 3.27 岁。肝硬化诊断由病

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目 (Y207464); 浙江省科技厅新苗人才计划项目 (2008R40G2090022)

作者单位: 325000 温州医学院附属第一医院感染内科

通讯作者: 陈永平, 电子信箱: ypchen106@yahoo.com.cn

史、临床表现、实验室和影像学检查证实,所有患者均符合 2000 年修订的病毒性肝炎防治方案诊断标准。以上病例均排除有合并其他病毒性肝炎、酒精性肝病、药物性肝炎、自身免疫性肝病、遗传性肝病等。

2. 主要试剂:美国 BD FACS 流式细胞仪,小鼠抗人 CD4 - FITC、CD25 - PE、mouse IgG1 - PE Mouse IgG2a - FITC 均购自美国 BD Pharmingen 公司。

3. 实验方法:流式细胞术检测外周血 CD4⁺CD25⁺Treg 的水平。取新鲜采集的肝素抗凝血各 100μl,置于不同离心管中,分别加入下列抗体:一管加 CD4 - FITC,CD25 - PE 各 10μl,另一管加 IgG2a - FITC,IgG1 - PE 同型对照各 10μl。室温避光孵育 30min,PBS 离心洗涤 1 次,加入 2ml 红细胞裂解液室温避光 15min,PBS 离心洗涤 2 次,1% 多聚甲醛每管 300μl 固定重悬,流式细胞仪检测。

4. 统计学处理:采用 SPSS 13.0 统计软件,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用成组 *t* 检验,多组间均数采用单因素方差分

析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

LC 组、CHB 组、NC 组 Treg 占 CD4⁺T 淋巴细胞的比例分别为(9.86% ± 1.00%、12.21% ± 1.46%、11.36% ± 1.06%),CHB 组与 NC 组、LC 组与 NC 组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),LC 组与 CHB 组比较差异无统计学意义($P > 0.05$) (表 1、图 1)。

表 1 各组患者 CD4⁺CD25⁺Treg 数量占 CD4⁺T 细胞比例($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	Treg 比例 (%)
健康对照组	6	9.86 ± 1.00
慢乙肝组	12	12.21 ± 1.46 *
慢乙肝肝硬化组	15	11.36 ± 1.06 *

与正常对照组比较, * $P < 0.05$

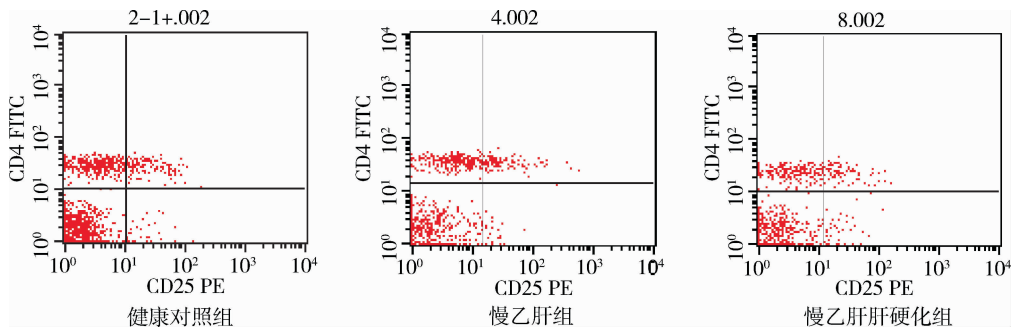


图 1 外周血 CD4⁺CD25⁺Treg 频率

讨 论

CD4⁺CD25⁺Treg 是由 Sakaguchi 等首次报道的具有免疫功能和免疫抑制两大功能特征的一群细胞,包括经典的 CD4⁺CD25⁺T 细胞、分泌 IL - 10 或 TGF - β 的 CD4T 细胞及某些 CD8T 细胞、双阴性 T 细胞和 γδ 细胞等^[5,6]。Treg 一方面可以抑制机体暴露病毒后的过度免疫病理破坏,另一方面又不利于病毒的清除而促进其持续感染。随着研究的进展,越来越多的证据提示 Treg 的表达频率和功能特征在慢性病毒感染及对疾病进程的影响发挥着重要的作用。研究表明,HBV 感染时,宿主免疫应答特别是细胞免疫应答在 HBV 的清除中起着关键作用,在 HBV 慢性感染患者中往往有 HBV 特异性 T 细胞活性的缺陷,如细胞增殖、分泌细胞因子、细胞毒效应等功能的损害,而 Treg 被发现可抑制有效的病毒特异性免疫反应^[7-9]。

目前关于 CHB 患者外周血中 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞频率、功能及这些因素是否与 HBV 持续感染存

在相关及是否与疾病进程相关等方面仍存在争议。本研究发现,慢性乙肝患者、乙肝肝硬化患者外周血 CD4⁺CD25⁺Treg 均高于对照组,差异具有统计学意义($P < 0.05$),提示 Treg 与 HBV 慢性感染有着密切关系。乙肝肝硬化患者数值虽然比乙肝患者低,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。考虑乙肝肝硬化患者 CD4⁺CD25⁺Treg 较慢性乙肝患者变化不同的原因有:肝硬化患者病程长,大都已服用抗病毒药物影响,是否受药物的影响;或者长期慢性炎症破坏中是否伴有 Treg 的减少从而影响免疫系统平衡破坏;抑或与病毒载量等因素有关有待进一步深入研究。

参考文献

- 1 Lavanchy D. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. J Virol Hepat, 2004,11 (2):97 - 107
- 2 Rehmann B,Nascimbeni M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. Nat Rev Immunol, 2005,5 (3):215 - 229
- 3 Sun Z, Ming L,Zhu X, et al. Prevention and control of hepatitis B in

- China. J Med Virol, 2002, 67(3): 447-450
- 4 Kakimi K, Isogawa M, Chung J, *et al.* Immunogenicity and tolerogenicity of hepatitis B virus structural and nonstructural proteins: implications for immunotherapy of persistent viral infections. J Virol, 2002, 76(17): 8609-8620
- 5 Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, *et al.* Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. J Immunol, 1995, 155(3): 1151-1164
- 6 Alatrakchi N, Koziel M. Regulatory T cells and viral liver disease. J Viral Hepat, 2009, 16(4): 223-229
- 7 Webster G J, Reignat S, Brown D, *et al.* Longitudinal analysis of CD8⁺ T cells specific for structural and nonstructural hepatitis B virus proteins in patients with chronic hepatitis B: implications for immunotherapy. J Virol, 2004, 78(11): 5707-5719
- 8 Franzese O, Kennedy PT, Gehring AJ, *et al.* Modulation of the CD8⁺-T-cell response by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in patients with hepatitis B virus infection. J Virol, 2005, 79(6): 3322-3328
- 9 Stoop JN, van der Molen RG, Baan CC, *et al.* Regulatory T cells contribute to the impaired immune response in patients with chronic hepatitis B virus infection. Hepatology, 2005, 41(4): 771-778
- (收稿: 2010-12-16)

不同负荷运动训练对大鼠大脑皮质躯体感觉区神经型一氧化氮合酶活性的影响

李浩旭 刘江静 鲁彦 李保利

摘要 目的 探讨不同负荷运动训练对大鼠大脑皮质躯体感觉区 nNOS 活性的影响。方法 健康雄性大鼠 60 只,分为对照组、一般负荷组和过度负荷组(后两组统称负荷组)。负荷组大鼠按照修改的 Beford 运动负荷标准进行训练。8 周后处死大鼠,称重,检测红细胞数目;取大鼠大脑,免疫组织化学法检测大脑皮质躯体感觉区 nNOS 免疫组化阳性产物。**结果** 过度负荷组大鼠训练后 8 周体重、红细胞数目和对照组、一般负荷组比较有统计学差异;正常对照组大鼠皮质 nNOS 平均灰度值大于一般负荷运动组和过度运动负荷组($P < 0.01$);一般运动负荷组的平均灰度值与过度运动负荷组无显著性差异($P > 0.05$)。**结论** 适量运动能使大鼠大脑皮质 nNOS 活性增加,有益于神经元信息的传递和递质的释放,促进大脑功能的发挥。

关键词 大鼠 运动训练 nNOS 皮质躯体感觉区

The Influences of Different Loading Excise on the Expression of Nitrogen Monoxidum in the Cerebral Cortex Somathetic Area. Li Haoxu, Liu Jiangjing, Lu Yan, Li Baoli. The Department of Anatomy, Xi'an Medical College, Shanxi 710021, China

Abstract Objective To explore the influences of different loading excise on the expression of nitrogen monoxidum(nNOS) in the cerebral cortex somathetic area(CCSA). **Methods** Sixty healthy rats were randomly assigned to control or experimental groups with 20 animals for each group of control, general exertion (GE) and overexertion (OE). The rats in GE and OE were forced to excise according to the revised beford standard. After having been excised for 8 weeks, all rats were killed, weighed and their brains were disassociated. The numbers of red blood cell of rats were counted and the expression nNOS in the CCSA was determined by immunohistochemistry. **Results** Our study showed that the expression of nNOS in the CCSA of OE group was significantly higher than that of control; however, it had no significant difference between GE group and OE group. **Conclusion** Moderate excise increases the activities of nNOS in cortex, which is benefit to the transformation of information and release of transmitter.

Key words Rat; Motion; Nitrogen monoxidum; Cerebral cortex somathetic area

不同负荷运动训练对中枢神经系统的影响是运

动医学研究的热点之一,特别是中枢神经疲劳时脑内某些神经递质或信号分子的变化^[1,2]。研究表明一氧化氮(NO)是一种气体信号转导分子,介导神经传递过程,并参与血管调节和免疫反应^[3]。目前虽然有文献报道运动能对脑组织中一氧化氮合酶(NOS)及其亚型表达有一定的影响,但不同负荷的运动对皮

基金项目:陕西省卫生厅基金资助项目(06E05)

作者单位:710021 西安医学院解剖学教研室(李浩旭、李保利);
710065 西安,陕西省博爱医院(刘江静);730030 兰州,解放军第一医院检验科(鲁彦)