

参考文献

- 1 Hoeckel M, Schlenger K, Hoeckel S, *et al.* Hypoxia cervical cancers with low apoptotic index are highly aggressive[J]. *Cancer Res*, 2001, 59(18):4525-4528
- 2 Kunz M, Ibrahim S, Koczan D, *et al.* Activation of c-Jun NH2-terminal kinase/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK) is critical for hypoxia-induced apoptosis of human malignant melanoma[J]. *Cell Growth Differ*, 2001, 12(3):137-145
- 3 Dahl C, Guldberg P. The genome and epigenome of malignant melanoma[J]. *APMIS*, 2007, 115(10):1161-1176
- 4 Viniegra J, Martfnez N, Modirassari P, *et al.* Full activation of PKB/Akt in response to insulin or ionizing radiation is mediated through ATM[J]. *Biol Chem*, 2005, 280:4029-4036
- 5 Fayard E, Gill J, Paolino M, *et al.* Deletion of PKB alpha/Akt1 affects thymic development[J]. *PLoS One*, 2007, 2(10):992
- 6 Matter M, Ruoslahti E. A signaling pathway from the alpha5beta1 and

- alpha(v)beta3 integrins that elevates Bcl-2 transcription[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(30):27757-27763
- 7 王东海, 王建祥. PI3K/Akt 信号通路异常与白血病[J]. *国际输血及血液学杂志*, 2006, 29(1):12-24
- 8 苗丽君, 王静. AKT 与肿瘤的研究进展[J]. *国外医学生理、病理科学与临床分册*, 2004, 24(5):406-409
- 9 Gu K, Ke A. Transforming growth factor beta can be a parameter of aggressiveness of pT1 colorectal cancer[J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(8):1193
- 10 Singhal S, Vachani A, Antin-Ozerkis D, *et al.* Prognostic implications of cellcycle, apoptosis, and angiogenesis biomarkers in non-small cell lung cancer: a review[J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(11):3974-3986

(收稿:2011-06-30)

(修回:2011-07-07)

FOLFOX 方案化疗对胃癌术后患者外周血 CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞细胞增殖及功能的影响

蒋 平 唐湘莲 韩绍伟

摘 要 **目的** 探讨 FOLFOX 方案化疗对胃癌术后患者外周血 CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞(Treg 细胞)比例及功能的影响。**方法** 选择 43 例胃癌术后化疗患者,于化疗前 1 天、化疗结束后第 5 天采集外周血。采用流式细胞法检测外周血 Treg 细胞的比例;RT-PCR 法检测外周血 Treg 细胞 FoxP-3 mRNA 表达水平;将分选的 Treg 细胞和 CD4⁺CD25⁻T 细胞按单纯 Treg 细胞组、1:1 混合细胞组、单纯 CD4⁺CD25⁻T 细胞组培养,³H-TdR 掺入法检测 Treg 细胞体外抑制 CD4⁺CD25⁻T 细胞增殖的能力。**结果** 43 例胃癌患者化疗前 1 天外周血 Treg 细胞占 CD4⁺T 细胞的比例为 17.63%±6.31%,化疗后降至 13.79%±4.82%(*P*<0.01);化疗后 FoxP-3 表达水平较化疗前显著下降(*P*<0.01);化疗后 Treg 细胞对 CD4⁺CD25⁻T 细胞的增殖抑制率由化疗前的 54.64%±5.15%下降至 24.63%±2.34%(*P*<0.01)。**结论** FOLFOX 化疗方案可减少胃癌患者外周血 Treg 细胞数量,下调其表面标志物 FoxP3 基因的表达水平,减弱 Treg 细胞的免疫抑制功能,有利于诱生抗肿瘤免疫效应。

关键词 胃癌 CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞 化疗

Influence of FOLFOX Chemotherapy on the Percentage and Function of CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cell in Peripheral Blood of Gastric Cancer Patients after Operation. Jiang Ping, Tang Xianglian, Han Shaowei. Wenzhou Medical College Affiliated Second Hospital, Zhejiang 325000, China

Abstract Objective To observe the influence of FOLFOX chemotherapy on the percentage and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell(Treg) in peripheral blood(PB) of gastric cancer patients after operation. **Methods** The prevalence of Treg in PB one day before chemotherapy and five days after chemotherapy was examined by flow cytometry method in 43 cases patients suffering gastric cancer. RT-PCR techniques were used to detect the expression of FoxP3 mRNA in these Treg cells. To determine regulatory properties, Treg(freshly isolated) and CD4⁺CD25⁻T cell from tumor patients were cocuhured in a ratio of 1:1. Proliferation was measured by ³H-TdR assay. **Results** The percentage of cells in the PB of 32 patients before chemotherapy was 17.63%±6.31% in CD4⁺T cells, and the percent-

基金项目:温州市科技局科研科技合作资助项目(2008S0411)

作者单位:325000 温州医学院附属第二医院普外科(蒋平、韩绍伟);中南大学湘雅二医院普外科(唐湘莲)

通讯作者:蒋平,电子信箱:jiangstjst@163.com

age was decreased to $13.79\% \pm 4.82\%$ after chemotherapy ($P < 0.01$). The FoxP3 mRNA expression of Treg cells was significantly decreased after chemotherapy ($P < 0.01$). The inhibitory rate of Treg cells on $CD4^+ CD25^-$ T cell after chemotherapy was $24.63\% \pm 2.34\%$, which down from $54.64\% \pm 5.15\%$ before chemotherapy ($P < 0.01$). **Conclusion** FOLFOX chemotherapy in patients with gastric cancer can reduce the number of Treg cells, reduce the expression levels of their surface markers FoxP3 mRNA, reduce the function of Treg cells in immune suppression, which is beneficial for inducing anti-tumor immune response.

Key words Gastric cancer; $CD4^+ CD25^+$; Regulatory T cell; Chemotherapy

$CD4^+ CD25^+$ 调节性 T 细胞 (regulatory T cell, Treg) 是表达细胞内转录因子 FoxP3 (Fork-head box P3)、CD25 (IL-2R α)、CTLA-4 和 GITR 等的 $CD4^+$ T 细胞亚群, 其中 Foxp3 是 Treg 细胞发育和行使功能的关键分子^[1,2]。1995 年 Sakaguchi 等^[3]发现 Treg 细胞在机体免疫稳态维持、肿瘤免疫及移植耐受等方面发挥着重要的作用, 但在肿瘤免疫中却通过与效应 T 细胞的接触抑制或分泌细胞因子抑制抗肿瘤免疫应答, 其数量和功能的异常可能对机体造成严重影响。近年来的研究主要集中于 Treg 细胞发挥肿瘤免疫抑制作用的具体机制, 而关于化疗对 Treg 细胞数量及功能的影响研究较少, 只有少数研究局限在单个化疗药物对实验动物或血液病患者的作用上, 个别应用在临床晚期实体瘤上^[4-10]。本研究以临床胃癌术后患者为对象, 应用流式细胞技术和 RT-PCR 技术, 观察 FOLFOX 方案化疗对患者免疫系统中 Treg 细胞数量和功能及 FoxP3 mRNA 表达情况的影响。

材料与方法

1. 临床资料: 病例选自 2009 年 1~12 月间在笔者医院普外科住院的确诊胃癌患者, 共 43 例, 包括乳头状腺癌 20 例, 管状腺癌 13 例, 黏液腺癌 8 例, 印戒细胞癌 2 例; TNM 分期 I 期 8 例, II 期 21 例, III 期 12 例, IV 期 2 例; 其中男性 27 例, 女性 16 例, 年龄 38~70 岁, 平均年龄 58.9 岁, 均为行 D2 胃癌根治术术后, 所有研究对象近期内均无急、慢性感染、HIV 及病毒性肝炎并且未使用过免疫抑制剂, 无自身免疫性疾病史。所有患者均予 FOLFOX 方案 (第 1 天奥沙利铂 $130\text{mg}/\text{m}^2$ + 第 1~5 天 $5\text{-FU } 400\text{mg}/\text{m}^2$ + 第 1~5 天 CF $200\text{mg}/\text{m}^2$ 化疗, 每 3 周为 1 个周期。

2. 标本采集: 所有实验对象于第 1 次化疗前 1 天, 化疗结束后第 5 天清晨空腹外周血。

3. 主要试剂: 异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的鼠抗人 $CD4$ 和藻红荧光素 (PE) 标记的鼠抗人 $CD25$ 抗体 (Biolegend), FITC 标记小鼠 IgG 同型对照及 PE 标记小鼠 IgG 同型对照。淋巴细胞分离液 (Sigma 公司)。 $CD4^+ CD25^+$ regulatory T cell isolation kit (Miltenyi Biotec 公司)、单克隆抗人 $CD28$ 抗体 (R&D 公司)、LEAF 纯化抗人 $CD3$ 抗体 (Biolegend 公司)、重组人 IL-2 (Peprotech EC 公司)、[甲基- ^3H] 胸腺嘧啶核苷 (^3H -TdR) (中国科学院上海核技术开发公司)。

4. 流式细胞法检测外周血 Treg 含量: 每个样本取 $100\mu\text{l}$ 抗凝血和 $20\mu\text{l}$ $CD4$ (FITC) / $CD25$ (PE) 标记抗体加入流式管混匀, 室温避光孵育 30min; 加入红细胞裂解液 2ml 振荡混匀后避光放置 10min 至液体透亮; 1200g 离心 5min, 2ml PBS 重悬后洗涤 1 遍; 再加入 0.5ml PBS 重悬, 流式细胞仪检测 (BD 公司, FACS Calibur 检测), Cellquest 软件数据分析, 记录阳性细胞百分率。

5. 免疫磁珠分选法 (MACS) 分离 Treg 细胞: 取外周血 20ml, 利用密度梯度离心法, 获取 PBMCs, 利用 $CD4^+ CD25^-$ T 细胞磁珠分离试剂盒 (Miltenyi Biotec 公司) 分离细胞, 先阴性分选获得 $CD4^+$ T 细胞; 再用 PE 标记抗小鼠 $CD25$ 单克隆抗体, 并以磁珠标记抗 PE 抗体, 经阳性分选获得 $CD4^+ CD25^+$ T 细胞, 阴性分选获得 $CD4^+ CD25^-$ T 细胞; 通过 FACS (BD 公司, FACS Calibur) 分析细胞纯度。

6. RT-PCR 法检测 Treg 细胞表面标志 Foxp3 mRNA 的表达情况: 采取 Trizol 法提取和纯化各样本细胞总 RNA, 紫外分光光度计测定纯度、浓度并定量。取 $2\mu\text{g}$ 总 RNA, 按照 RT 试剂盒说明书进行 RT 操作程序合成 cDNA, 然后 PCR 扩增 Foxp3, 以 GAPDH 为内参照。Foxp3 引物上游: $5' - \text{GCTG-GTCGGGAGAAGAGGA} - \text{AAA} - 3'$, 下游: $5' - \text{CA GTATC-CCACGGAAATAACCT} - 3'$, 扩增片段大小为 433bp; GAPDH 引物上游: $5' - \text{ATCCCATCACCATCTTCCAG} - 3'$, 下游: $5' - \text{GAGTCCTTC} - \text{CACGATACCAA} - 3'$, 扩增片段大小为 308bp, 反应条件: 94°C 预变性 5min, 以 94°C 变性 35s, 52°C 退火 40s, 72°C 延伸 55s 为一个循环, 共 35 个循环, 最后 72°C 延伸 10min。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳分离, 凝胶成像系统扫描保存图像, 采用 Quantity One 4.6.2 (BIO-RAD) 分析软件, 对电泳条带的光密度进行分析, 测定各条带的灰度值, 通过与内参照的比较计算各样本 Foxp3 的相对 mRNA 表达丰度。

7. ^3H -TdR 掺入法检测 Treg 细胞体外抑制 $CD4^+ CD25^-$ T 细胞增殖的能力: 用小鼠抗人 $CD3$ 单抗 ($5\mu\text{g}/\text{ml}$) 包被 96 孔板, $200\mu\text{l}$ 每孔, 4°C 过夜, PBS 洗 3 遍, 然后每孔各加入新鲜分离的 Treg 细胞及 $CD4^+ CD25^-$ T 细胞, 每组细胞总数 1×10^5 个, 每组设 3 个复孔。实验分 3 组: ①单纯 Treg 细胞组; ②Treg 细胞: $CD4^+ CD25^-$ T 细胞 = 1:1 混合培养组; ③单纯 $CD4^+ CD25^-$ T 细胞组。加入小鼠抗人 $CD28$ 单抗 ($5\mu\text{g}/\text{ml}$) 及 10% FCS RPM I-1640 作为培养基, 每孔终体积 $200\mu\text{l}$ 。置于 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养 72h。终止培养前 16h, 每孔加入最终放射活性为 $1\mu\text{Ci}/\text{孔}$ 的 ^3H -TdR ($50\mu\text{l}$) 后继续培

养,收集细胞至玻璃纤维滤纸上,37℃ 孵箱烤干后予液闪计数器测量,记录每分钟放射计数(CPM),计算得到抑制率,公式为:抑制率 = (1 - 混合培养组 CPM 值/单纯 CD4⁺ CD25⁻ T 细胞培养组 CPM 值) × 100%。

8. 统计学方法:采用 SPSS 16.0 统计软件进行分析,主要采用单因素方差分析和 LSD - *t* 检验进行样本均数间两两比较,*P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

结 果

1. 患者外周血中 Treg 细胞的水平:FACS 结果显示:43 胃癌患者化疗前外周血中 Treg 细胞占淋巴细胞比例为 7.57% ± 2.91%,占 CD4⁺ T 细胞的比例为 17.63% ± 6.31%,化疗后患者 Treg 细胞占淋巴细胞比例下降至 5.21% ± 1.69%,占 CD4⁺ T 细胞的比例下降至 13.79% ± 4.82%,其差异均具有统计学意义 (*P* < 0.01),可见化疗后淋巴细胞的减少以 Treg 细胞尤为显著,导致 Treg 细胞占 CD4⁺ T 细胞比例下降,详见表 1。

表 1 患者化疗前后外周血 Treg 细胞水平 (% , <i>n</i> = 43)			
组别	CD4 ⁺	Treg	Treg/CD4 ⁺
化疗前	43.31 ± 6.32	7.57 ± 2.91	17.63 ± 6.31
化疗后	37.00 ± 5.53	5.21 ± 1.69	13.79 ± 4.82
<i>P</i>	< 0.01	< 0.01	< 0.01

2. MACS 分离后 Treg 细胞及 CD4⁺ CD25⁻ T 细胞纯度:FACS 结果显示:MACS 法分离各样本 Treg 细胞及 CD4⁺ CD25⁻ T 细胞纯度均 > 97.5%,化疗前后各细胞纯度差异无统计学意义,对后续实验无明显影响 (*P* > 0.01),详见表 2。

表 2 患者化疗前后外周血 Treg 细胞水平 (% , <i>n</i> = 43)		
组别	Treg	CD4 ⁺ CD25 ⁻ T
化疗前	98.32 ± 0.86	97.87 ± 0.72
化疗后	97.61 ± 0.89	98.20 ± 0.78
<i>P</i>	> 0.01	> 0.01

3. FoxP3 mRNA 在外周血 Treg 细胞中的表达:RT - PCR 结果显示:32 例患者化疗前外周血 Treg 细胞中 FoxP3 mRNA 相对表达水平为 87.32% ± 17.24%,化疗后其相对表达水平下降为 58.78% ± 13.12%,差异具有统计学意义 (*P* < 0.01),详见图 1。

4. Treg 细胞对 CD4⁺ CD25⁻ T 细胞增殖的抑制作用:³H - TdR 掺入法检测各样本细胞的增殖情况后结果显示:①化疗后 Treg 细胞的增殖活性较化疗前明显下降,差异具有统计学意义 (*P* < 0.05);②纯化

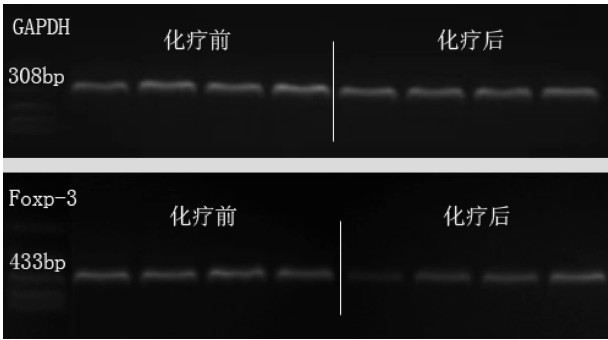


图 1 患者化疗前后外周血 Treg 细胞水平 FoxP3 mRNA 表达情况 (*n* = 4)

的 Treg 细胞可以降低 CD4⁺ CD25⁻ T 细胞的增殖能力,化疗后其免疫抑制功能较化疗前减弱,差异具有统计学意义 (*P* < 0.01),见图 2、图 3。

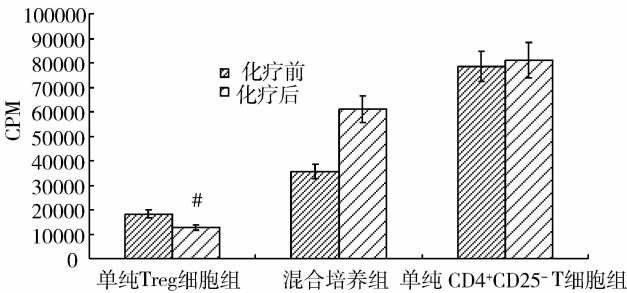


图 2 胃癌患者化疗前后外周血 Treg 细胞、CD4⁺ CD25⁻ T 细胞增殖情况
与化疗前组比较, # *P* < 0.05

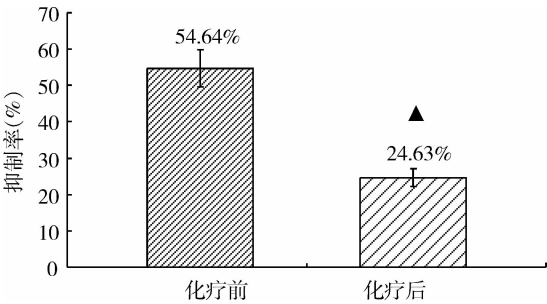


图 3 胃癌患者化疗前后外周血 Treg 细胞对 CD4⁺ CD25⁻ T 细胞增殖的抑制率 (%)
与化疗前组比较, ▲ *P* < 0.01

讨 论

近年来恶性肿瘤患者机体内在的抗肿瘤免疫力日益受到关注,当前临床胃癌治疗的研究热点已提

升到患者免疫功能的改变及其抗肿瘤机制的研究上。临床胃癌常规治疗方法包括根治性切除、化疗等,这些治疗手段同时也可能造成胃癌患者免疫功能的改变。因此通过提高胃癌患者免疫力改善胃癌患者预后从而提高胃癌患者生存质量还值得我们进一步的研究。

Treg 细胞是近年来发现的一种具有独特免疫调节功能的 T 细胞亚群,与肿瘤的免疫功能抑制密切相关,它们在肿瘤微环境中抑制性调节 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 细胞的活化与增殖,抑制免疫调节细胞因子的分泌,降低了肿瘤疫苗或肿瘤抗原多肽激活的树突状细胞所引起的肿瘤免疫反应,从而达到免疫的负性调节作用^[11]。化疗作为胃癌术后的重要治疗手段,在一定程度上可以减少术后肿瘤复发转移、改善生活质量并延长患者生存期,但化疗也可能导致机体免疫功能的下降。本研究将观察 FOLFOX 方案化疗对胃癌患者免疫系统中 Treg 细胞数量和功能的影响,有助于进一步探讨调节性 T 细胞在肿瘤免疫耐受中的作用,以及提高肿瘤免疫治疗的效果。

通过流式细胞技术对 FOLFOX 方案化疗前后胃癌患者外周血中 $CD4^+$ T 细胞、Treg 细胞进行检测,本研究发现应用 FOLFOX 方案化疗 5 天后患者外周血 $CD4^+$ T 细胞、Treg 细胞占外周血单核细胞的比例明显减少,且 Treg 细胞/ $CD4^+$ T 细胞显著下降,提示 FOLFOX 方案化疗可降低 Treg 细胞数量。既往有动物实验^[4,5]表明,小鼠体内注射化疗药物环磷酰胺后,Treg 细胞绝对数量及其占 $CD4^+$ T 细胞百分率比其他淋巴细胞亚群显著减少、凋亡细胞数明显增加。在临床试验方面,Ghiringhelli 等^[10]对 9 个发生转移的实体肿瘤患者低剂量反复给予环磷酰胺后,Treg 细胞发生明显的选择性的减少,除环磷酰胺外,蒽环类药物多西紫杉醇,阿糖胞苷类药物氟达拉滨对 Treg 也起抑制作用^[6,7]。这些研究均说明化疗导致的淋巴细胞减少状态下更多地杀伤 Treg 细胞,导致 Treg 细胞比例下降,从而使抑制免疫应答的因素减少,有利于诱导抗肿瘤免疫效应。

Foxp3 基因又称叉状头/翅膀状螺旋转录因子,Treg 细胞的诱导和作用发挥需要 Foxp3 基因的持续和高水平表达^[1,2]。研究表明胃癌患者的外周血 Treg 细胞中 FoxP3 mRNA 呈现高表达,表明在胃癌的发展过程中,转录因子 FoxP3 能够通过某种机制调控诱导了患者外周血 Treg 细胞的增殖,并且增强了 Treg 细胞对自身免疫系统的抑制功能,从而参与

机体对肿瘤的免疫耐受^[12]。本研究结果发现在化疗前胃癌患者的外周血 Treg 细胞中 FoxP3 mRNA 呈现较高表达,应用 FOLFOX 方案化疗 5 天后患者 FoxP3 mRNA 表达水平显著下降,初步说明 FOLFOX 化疗方案在减少 Treg 细胞数量的同时可下调其表面标志物 FoxP3 基因的表达水平,从而可能减弱 Treg 细胞的免疫抑制功能。Lutsiak、Brode 等^[4,5]研究发现,化疗药物环磷酰胺显著减少 Treg 细胞绝对数量的同时可下调 Foxp3 的表达量,从而削弱 Treg 细胞的功能使肿瘤细胞的生长受到抑制。

Treg 细胞免疫抑制性表现在经 TCR 介导的信号刺激活化后能够抑制 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 细胞的活化和增殖。最初 Woo 等^[13]研究发现 Treg 细胞可以抑制 $CD4^+$ $CD25^-$ T 细胞的增殖。本实验在分离纯化 Treg 细胞和 $CD4^+$ $CD25^-$ T 细胞后将其共同温育,结果发现应用 FOLFOX 方案化疗 5 天后患者外周血 Treg 细胞自身增殖活性较化疗前显著下降,且 Treg 细胞对 $CD4^+$ $CD25^-$ T 细胞的增殖抑制作用显著减弱,表明 Treg 细胞的免疫抑制功能减弱。此外,Lutsiak、Brode 等^[4,5]动物实验也表明环磷酰胺可致 Treg 细胞体外抑制 $CD4^+$ $CD25^-$ T 细胞增殖能力下降,Beyer 等^[7]检测 73 例接受氟达拉滨化疗方案的 B 细胞慢性淋巴性白血病患者化疗前、后(化疗后第 7 天)的外周血,结果显示化疗后,Treg 细胞数目明显减少,Treg 细胞抑制功能减弱甚至消失。

化疗作为一种重要的治疗肿瘤的手段,对 Treg 细胞产生的影响尚无统一的意见。本实验初步表明 FOLFOX 方案化疗可下调 Treg 细胞数量且可减弱其免疫抑制功能,从而增强机体抗肿瘤免疫效应,为肿瘤的化疗免疫治疗提供了一种新的思路。目前,关于各种化疗药物对 Treg 细胞的影响以及化疗药物在第几个周期后发挥明显作用的研究还不多,对于各种化疗药物对 Treg 细胞作用的机制更知之甚少,还有待于进一步研究。

参考文献

- 1 Williams LM, Rudensky AY. Maintenance of the Foxp3 - dependent develop - mental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3 [J]. Nat Immunol, 2007, 8(3):277 - 284
- 2 Wan YY, Flavell RA. Regulatory T - cell functions are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression [J]. Nature, 2007, 445 (7129):766 - 770
- 3 Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, et al. Immunologic self - tolerance maintained by activated T cells expressing IL - 2 receptor alpha - chains (CD25). Break down Of a single mechanism of self - tolerance causes various autoimmune diseases [J]. Immunol, 1995, 155

- (3):1151-1164
- 4 Lutsiak MEC, Semnani RT, Pascalis RD, *et al.* Inhibition of CD4⁺ CD25⁺ T regulatory cell function implicated in enhanced immune response by low-dose cyclophosphamide [J]. *Blood*, 2005, 105 (7): 2862-2868
- 5 Brode S, Raine T, Zacccone P, *et al.* Cyclophosphamide-induced type-1 diabetes in the nod mouse is associated with a reduction of CD4⁺ CD25⁺ foxp3⁺ regulatory T cells[J]. *Immunol*, 2006, 177 (10):6603-6612
- 6 Chu Y, Wang LX, Yang G, *et al.* Efficacy of GM-CSF-producing tumor vaccine after docetaxel chemotherapy in mice bearing established Lewis lung carcinoma[J]. *Immunother*, 2006, 29 (4):367-380
- 7 Beyer M, Kochanek M, Darabi K, *et al.* Reduced frequencies and suppressive function of CD4⁺ CD25^{hi} regulatory T cells in patients with chronic lymphocytic leukemia after therapy with fludarabine[J]. *Blood*, 2005, 106 (6):2018-2025
- 8 Lopez M, Aguilera R, Perez C, *et al.* The role of regulatory T lymphocytes in the induced immune response mediated by biological vaccines[J]. *Immunobiology*, 2006, 211 (1-2):127-136
- 9 王建, 李慧, 曹作荣. 手术及化疗对卵巢癌患者外周血 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞比例的影响 [T]. *天津医科大学学报*, 2007, 13 (2):217-220
- 10 Ghiringhelli F, Menard C, Puig PE, *et al.* Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2007, 56 (5):641-648
- 11 Sakaguchi S, Sakaguchi N, Shimizu J, *et al.* Immunologic tolerance maintained by CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance[J]. *Immunol Rev*, 2001, 182:18-32
- 12 Iizumi M, Bandyopadhyay S, Watabe K. Interaction of Duffy antigen receptor for chemokines and KAI1: a critical step in metastasis suppression[J]. *Cancer Res*, 2007, 67 (4):1411-1414
- 13 Woo EY, Yeh H, Chu CS, *et al.* Cutting edge: regulatory T cells from lung cancer patients directly inhibit autologous T cell proliferation[J]. *Immunol*, 2002, 168 (9):4272-4276

(收稿:2011-03-14)

(修回:2011-04-07)

慢性乙型肝炎患者 T 淋巴细胞及 激活亚群与基因型的分析

章松平 王莹 陈公英

摘要 目的 探讨慢性乙型肝炎 (CHB) 患者不同基因分型 (B 型和 C 型) 外周血 T 淋巴细胞及激活亚群的表达情况。
方法 收集 2008 年 11 月 ~ 2010 年 12 月杭州市第六人民医院 175 例 CHB 患者,另选取 43 名健康体检者作为对照。用流式细胞仪检测外周血 T 淋巴细胞亚群 (CD3⁺、CD3⁺ CD4⁺ 和 CD3⁺ CD8⁺) 及激活亚群 (CD3⁺ HLA-DR⁺、CD4⁺ HLA-DR⁺ 和 CD8⁺ HLA-DR⁺) 的表达,荧光 PCR 法检测 HBV 基因型,化学发光法定量检测血清 HBeAg 含量。**结果** B 基因型 HBeAg (+) 组与 C 基因型组间 CD8 细胞百分比有显著性差异,C 基因型患者 CD8 细胞高于 B 基因型。各组间 CD3、CD4 淋巴细胞及激活亚群均无统计学意义。**结论** CHB 患者不同基因分型与机体细胞免疫尤其是 CD8 细胞存在一定的关系。

关键词 慢性乙型肝炎 淋巴细胞 HLA-DR 抗原 基因型

Correlation between Genotype and T-lymphocyte and Activated T-lymphocyte Subsets in Chronic Hepatitis B. Zhang Songping, Wang Ying, Chen Gongying. *Department of Open Laboratory, The Sixth People's Hospital of Hangzhou, Zhejiang 310014, China*

Abstract Objective To investigate the correlation between genotype and T-lymphocyte and activated T-lymphocyte subsets in chronic hepatitis B. **Methods** Totally 175 chronic hepatitis B patients and 43 healthy blood donors were enrolled in the study. The T-lymphocyte subsets (CD3⁺, CD3⁺ CD4⁺ and CD3⁺ CD8⁺) and activated T-lymphocyte subsets (CD3⁺ HLA-DR⁺, CD4⁺ HLA-DR⁺ and CD8⁺ HLA-DR⁺) were detected by flow cytometry. HBV genotypes was detected by a real time fluorescence PCR and HBeAg was detected by chemiluminescence method. **Results** Compared with the B genotype HBeAg (+) group, the percentage of CD8 cells was increased in C genotype patients. While there was no difference in the percentage of CD3, CD4 cells and activated T-lymphocyte subsets

基金项目:杭州市科技发展计划 (2005633Q22)

作者单位:310014 杭州市第六人民医院开放实验室

通讯作者:陈公英,电子邮箱:chengongying@hotmail.com