

· 综 述 ·

调节性 T 淋巴细胞在乙型肝炎慢性化过程中的作用*

卢 林¹, 曾令伟¹综述, 秦 波^{2△}审校

(1. 重庆市渝北区人民医院感染科 401120; 2. 重庆医科大学附属第一医院感染科 400016)

关键词: T 淋巴细胞, 调节性; 肝炎, 乙型; 免疫耐受

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.04.041

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)04-0459-03

具有免疫抑制功能的 Th 细胞过去被称为抑制性 T 淋巴细胞(suppressor T cell), 近年来研究发现其能够介导免疫耐受并抑制自身免疫性疾病, 故更名为调节性 T 淋巴细胞(regulator T cell, Treg)。越来越多的证据表明, Treg 在抑制抗病毒 T 细胞免疫应答过程中发挥重要的作用。一方面, Treg 抑制过强的 T 细胞免疫应答避免对机体造成过度损伤; 另一方面, 由于限制了 T 细胞的抗病毒反应, 病毒不能被及时清除而可能引起感染的持续存在, 从而导致乙肝病毒感染后疾病慢性化的发生。

1 Treg 的分类及表面标志

Treg 是一组异质性的细胞, 按照其来源及功能不同主要分为两大亚群: 一种是自然性 Treg, 由胸腺的 T 细胞发育而成; 另一种是适应性 Treg, 由成熟 T 细胞或正在分化中的自然性 Treg 在一定条件下生成, 如存在转化生长因子-β(TGF-β), 抗原暴露少或者共刺激不足等^[1]。自然性 Treg 包括 CD25⁺ FoxP3⁺ T 细胞以及来自先天免疫系统的自然杀伤细胞(NK)。体外实验证实, 自然性 Treg 的功能是通过抗原非特异性、接触依赖但不依赖细胞因子的途径实现的^[2]。适应性 Treg 包括 CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ T 细胞、产生白细胞介素-10(IL-10)的 CD4⁺ T 细胞(Tr1)、产生 TGF-β 的 CD4⁺ T 细胞(Th3)、CD3⁺ CD4⁻ CD8⁻ T 细胞^[3-4]。适应性 Treg 在体内的免疫调节功能是通过细胞因子途径来实现的^[5]。另外, 一些 CD8⁺ T 细胞也具有免疫调节功能, CD8⁺ CD25⁻ T 细胞在抗原存在的情况下能够分化成 CD8⁺ Treg^[3,6]。然而, 目前针对 CD8⁺ Treg 的研究还非常少, 对 CD8⁺ Treg 的作用功能也知之甚少。

到目前为止, 还没有一种完全特异的细胞表面标志可以区分 Treg, 其中, 白细胞介素-2(IL-2)受体 α 链(CD25)是 Treg 的一个原始标志。将 CD4⁺ CD25⁺ T 细胞转移至 T 细胞缺失的小鼠可以预防自身免疫性疾病, 而将去除了 CD25⁺ T 的 CD4⁺ T 细胞移入该类小鼠则不能避免发生多器官特异的自身免疫性疾病。然而, 自然产生的 T 淋巴细胞毒性相关抗原-4(CTLA-4)+肿瘤坏死因子受体(GITR)+CD25⁻ T 细胞亚群对自身免疫性疾病有很强的抑制功能, 说明 CD25 并非功能性 Treg 的必须结构^[7]。此外, CD4⁺ CD25⁺ Treg 表面标志物还包括 CTLA-4^[8]、GITR^[9]。CTLA-4 单抗和 GITR 抗体均能够阻断 Treg 的免疫抑制功能^[7], 但是 CTLA-4 缺陷小鼠的 Treg 和 GITR-CD4⁺ CD25⁺ T 对 CD4⁺ CD25⁻ T 也有较强的抑制作用, 说明这些分子在 Treg 细胞的免疫抑制功能中发挥重要但非必要作用。和 CD25 相似, 这两种分子不仅表达于 Treg 也可表达于活化的效应性 T 淋巴细胞表面。FoxP3 基因编码的

DNA 结合蛋白可以抑制包括生成细胞因子和 T 细胞增生在内的多种基因的转录^[10]。在 mRNA 和蛋白质水平上, FoxP3 都仅表达于 CD4⁺ CD25⁺ Treg, 在 CD4⁺ CD25⁻ T 和 B 淋巴细胞及 CD8⁺ T 细胞均无明显表达。在小鼠, FoxP3 是 Treg 的特异性细胞内标志物, 因此目前普遍将 FoxP3 作为鉴别 CD4⁺ CD25⁺ Treg 的首选分子。然而近来的研究发现, 在人类, 除了 Treg 一些非 T 细胞如肿瘤细胞也能够表达 FoxP3^[11]。最近发现, 白细胞介素 7(IL-7)受体(CD127)低表达有利于将 Treg 细胞同活化的 T 淋巴细胞区分开, 它不仅分离出 CD4⁺ CD25⁺ Treg, 还能够分离出 CD4⁺ CD25⁻ T 中的 Treg^[12]。综上, 若联合 FoxP3 和 CD127 可能会更加准确地区分出 CD4⁺ CD25⁺ Treg。

2 Treg 细胞水平和疾病状态

到目前为止, 在 HBV 感染不同阶段的 Treg 水平以及 Treg 与疾病状态之间是否存在相关性尚无定论。一项大规模的研究显示, 慢性 HBV 携带者外周血单核细胞和肝组织中 CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ 的数量高于感染后恢复者及健康者, 并与 HBeAg 状态相关^[13]。另外一项研究检测急性乙型肝炎、慢性乙型肝炎、慢性重型乙型肝炎患者外周血 Treg, 结果发现重型肝炎患者外周血 Treg 显著升高^[14]。同样, 慢性乙型肝炎和慢性重型乙型肝炎患者肝组织内的 Treg 也升高^[14]。另有研究也证实, 外周血和肝内的 Treg 与乙肝病毒核酸(HBV-DNA)及 HBsAg 水平显著相关^[15-16]。与之相反, Franzese 等^[17]发现慢性无症状携带者、慢性肝炎患者、自然恢复者以及健康者的 Treg 频率无明显差别。检测 HBV 感染的慢/急性肝衰竭患者外周血 Treg 和辅助性 T 细胞 17(Th17)的数量, 结果发现 Treg/Th17 的比值与肝衰竭预后呈正相关。经过抗病毒治疗后达到持续应答的急性加重的慢性乙型肝炎患者, 其 Treg 基因表达水平及病毒特异的 Treg 细胞数量均显著增加^[18]。另外一项研究显示, 恩替卡韦单抗抗病毒治疗并抑制了病毒复制之后, Th17 数量迅速增加而同时 Treg 下降^[19]。

3 Treg 与 HBV 感染的免疫耐受性

CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞调节对自身和外来抗原的免疫耐受性, 其调节作用可以是病毒特异的。HBV 感染慢性化可能与 Treg 介导的免疫耐受相关, 主要通过以下几个途径发挥作用。首先, Treg 自身可以分泌 TGF-β、IL-10 及低水平的 γ 干扰素(IFN-γ)和白细胞介素-4(IL-4), 从而介导免疫耐受。其次, Treg 细胞抑制效应 T 细胞的增殖和活化。在转基因小鼠的模型中证实, 肝内的 FoxP3⁺ CD4⁺ Treg 细胞数量显著增加能够有效抑制活化 T 细胞应答^[20]; 另外, 体外实验也证实,

* 基金项目: 重庆市卫生局医学科研重点基金资助项目(2011-1-040)。 作者简介: 卢林(1972~), 主治医师, 大专(现重庆医科大学本科在读), 主要从事肝病及感染性疾病的基础及临床研究。 △ 通讯作者, E-mail: cqjinbo@126.com。

CD4⁺CD25⁺Treg 不仅能够抑制 CD8⁺T 细胞增殖,还能够抑制其分泌 IFN- γ 等免疫应答活性^[21]。最后,Treg 能够抑制髓样树突状细胞成熟,从而使 T 细胞的活性减低^[1]。

4 Treg 向肝脏迁移机制

Treg 是如何及时到达炎症或者感染部位发挥其免疫调节功能的呢?Oo 等^[22]分离慢性肝炎患者肝内的 Treg,并检测 Treg 表面的受体表达情况,发现肝内 Treg 高表达趋化因子受体 4(CCR4)和趋化因子受体 3(CXCR3),且显著高于其他受体的表达,并且 CCR4 和 CXCR3 在肝内 Treg 上的表达水平显著高于外周血 Treg 水平。在体外模型中,分别阻断 CXCR3 及 CCR4 以观察其对 Treg 黏附肝血窦内皮细胞的影响,结果发现只有当 CXCR3 阻断时,黏附于肝血窦内皮细胞上的 Treg 数量显著减少,并且分别阻断趋化因子配体 9(CXCL9)、趋化因子配体 10(CXCL10)、趋化因子配体 11(CXCL11)与 CXCR3 的结合,黏附于肝血窦内皮细胞上的 Treg 数量亦减少,但是效果没有 CXCR3 显著。Erhardt 等^[23]用次致死剂量(5 mg/kg)伴刀豆球蛋白(Con A)分别处理野生型(WT)及 CXCR3 缺陷型(CXCR3^{-/-})小鼠,后者出现的肝损害显著强于前者,再次用次致死剂量(5 mg/kg)Con A 处理,结果 WT 小鼠表现出对 Con A 耐受(无或者仅轻微的肝损害),而 CXCR3^{-/-}小鼠未耐受;分离已经接受两次 Con A 处理的 WT 及 CXCR3^{-/-}小鼠的 Treg 并分别输给未经处理过的 WT 小鼠,然后,再给予(5 mg/kg)Con A 处理,结果发现,WT 小鼠 Treg 对 Con A 诱导的肝损伤有保护作用,并且肝内的 CXCR3⁺Treg 显著多于 CXCR3⁻Treg,充分说明 CXCR3 介导 Treg 向肝脏迁移在诱导 Con A 耐受的过程中发挥重要作用。

体外研究证实,乙肝病毒 X 蛋白(HBx)以一种剂量依赖的模式促进肝细胞分泌 CXCL9 和 CXCL10^[24]。同时,临床报道指出慢性乙型肝炎患者肝内和外周血中的 CXCL9 及 CXCL10 表达水平均较健康者升高^[25]。因此,乙肝病毒感染后,通过 HBx 诱导趋化因子 CXCL9、CXCL10 分泌,趋化 Treg 向肝脏迁移并发挥其对免疫细胞的抑制效应,从而介导机体对肝炎病毒的免疫耐受。

5 阻断 Treg 与免疫活化

既然 Treg 在慢性乙肝免疫耐受过程中发挥主要的作用,那么抑制 Treg 是否就有望打破免疫耐受呢?将编码 IL-12 的质粒输入慢性感染土拨鼠肝炎病毒(WHV)的土拨鼠,结果发现所有外周血土拨鼠肝炎病毒核酸(WHV-DNA)小于 10¹⁰ 的土拨鼠接受治疗后,均出现持续而显著的外周血及肝内 WHV DNA 病毒载量下降,并伴随 e 抗原及表面抗原的消失。肝炎病毒诱导产生趋化因子,与受体 CXCR3 结合趋化 Treg 进入肝脏从而介导肝脏免疫耐受。治疗初期,所有土拨鼠肝内的 FoxP3⁺表达均下降,而 4 个月后,无应答土拨鼠肝内的 FoxP3⁺显著反弹,而应答鼠肝内的 FoxP3⁺则已降至检测线水平以下^[26]。这说明,土拨鼠对 IL-12 无应答可能是由于 Treg 的免疫抑制作用。Sprengers 等^[27]观察了聚乙二醇干扰素治疗应答与无应答患者的 Treg 数量差异发现,治疗开始时应答组与无应答组的 Treg 无差异,随着治疗的进行无应答患者的 Treg 数量开始增加,而应答组患者未出现这一情况,这说明 Treg 可能是干扰素治疗无应答的机制之一。Dikopoulos 等^[28]给小鼠注射编码 HBsAg 的 DNA 疫苗,肝内 CD8⁺T 增强的同时 CD4⁺CD25⁺Treg 向肝脏浸润及迁移增加并抑制 CD8⁺T 反应。Furuichi 等^[29]将小鼠体内的 CD25⁺T 细胞预先剔除后,注射 DNA 疫苗能够激起更加强烈的 HBV 特异 T

细胞以及记忆性 T 细胞免疫。因此,如果给予免疫刺激的同时能够抑制 Treg 细胞功能,可能获得持续的 T 细胞应答反应从而有利于控制病毒。

6 展 望

Treg 的结构和功能还有很多方面需要进一步研究。在乙型肝炎病毒感染后,Treg 通过调节免疫反应使机体保持在一个相对稳定的平衡状态,却也导致了病毒的持续存在。Treg 的功能,可能使机体进入免疫激活状态,有利于病毒的彻底清除,是抗 HBV 一个新的潜在治疗靶位。但是,免疫激活后若失去 Treg 的调节作用,是否会造成机体更加严重的损伤,也是值得思考的问题。

参考文献:

- [1] 骆抗先. 乙型肝炎基础和临床[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社,2006:157-163.
- [2] Shevach EM. CD4⁺ CD25⁺ suppressor T cells: more questions than answers[J]. Nat Rev Immunol, 2002, 2(6):389-400.
- [3] Shevach EM. From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells[J]. Immunity, 2006, 25(2):195-201.
- [4] Weiner HL. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells [J]. Immunol Rev, 2001, 182(10):207-214.
- [5] Kingsley CI, Karim M, Bushell AR, et al. CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4- and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses[J]. J Immunol, 2002, 168(3):1080-1086.
- [6] Billerbeck E, Blum HE, Thimme R. Parallel expansion of human virus-specific FoxP3⁺ effector memory and de novo-generated FoxP3⁺ regulatory CD8⁺ T cells upon antigen recognition in vitro [J]. J Immunol, 2007, 179(2):1039-1048.
- [7] 王礼文. CD4 CD25 调节性 T 淋巴细胞及相关标记物的研究进展[J]. 临床检验杂志, 2005, 23(2):157-159.
- [8] Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 [J]. J Exp Med, 2000, 192(2):303-310.
- [9] McHugh RS, Whitters MJ, Piccirillo CA, et al. CD4(+) CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor [J]. Immunity, 2002, 16(2):311-323.
- [10] Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, et al. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FoxP3 [J]. Nat Genet, 2001, 27(1):20-21.
- [11] Ebert LM, Tan BS, Browning J, et al. The regulatory T cell-associated transcription factor FoxP3 is expressed by tumor cells [J]. Cancer Res, 2008, 68(8):3001-3009.
- [12] Banham AH. Cell-sulfate IL-7 receptor expression facilitates the purification of FoxP3⁺ regulatory T cells [J]. Trends Immunol, 2006, 27(12):541-544.
- [13] Yang G, Liu A, Xie Q, et al. Association of CD4⁺ CD25⁺

- FoxP3⁺ regulatory T cells with chronic activity and viral clearance in patients with hepatitis B[J]. *Int Immunol*, 2007, 19(2):133-140.
- [14] Xu D, Fu J, Jin L. Circulating and liver resident CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells actively influence the antiviral immune response and disease progression in patients with hepatitis B[J]. *J Immunol*, 2006, 177(1):739-747.
- [15] Wang Q, Zheng Y, Huang Z, et al. Activated IL-23/IL-17 pathway closely correlates with increased FoxP3 expression in livers of chronic hepatitis B patients[J]. *BMC Immunol*, 2011, 12(2):25-28.
- [16] 邓敏, 李明慧, 刘顺爱, 等. 慢性 HBV 感染者调节性 T 细胞水平及 FoxP3 与 CD127 表达关系的研究[J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2010, 24(1):21-23.
- [17] 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]. *J Virol*, 2005, 79(6):3322-3328.
- [18] Koay LB, Feng IC, Sheu MJ, et al. Hepatitis B virus (HBV) core antigen-specific regulatory T cells confer sustained remission to anti-HBV therapy in chronic hepatitis B with acute exacerbation[J]. *Hum Immunol*, 2011, 72(9):687-698.
- [19] Zhang JY, Song CH, Shi F. Decreased ratio of Treg cells to Th17 cells correlates with HBV DNA suppression in chronic hepatitis B patients undergoing entecavir treatment[J]. *PLoS One*, 2010, 5(11):e13869.
- [20] Bochtler P, Riedl P, Gomez I, et al. Local accumulation and activation of regulatory FoxP3⁺ CD4⁺ TR cells accompanies the appearance of activated CD8T cells in the liver [J]. *Hepatology*, 2008, 48(6):1954-1963.
- [21] 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]. *J Virol*, 2005, 79(6):3322-3328.
- [22] Oo YH, Weston CJ, Lalor PF, et al. Distinct roles for CCR4 and CXCR3 in the recruitment and positioning of regulatory T cells in the inflamed human liver[J]. *J Immunol*, 2010, 184(6):2886-2898.
- [23] Erhardt A, Wegscheid C, Claass B, et al. CXCR3 deficiency exacerbates liver disease and abrogates tolerance in a mouse model of immune-mediated hepatitis[J]. *J Immunol*, 2011, 186(9):5284-5293.
- [24] Yu Z, Shuo W, Jing W, et al. Hepatitis B virus protein X-induced expression of the CXC chemokine IP-10 is mediated through activation of NF- κ B and increases migration of leukocytes[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(16):12159-12168.
- [25] 赵金红, 王健, 江水清, 等. 慢性乙型肝炎患者外周血单个核细胞中趋化因子 IP-10 和 Mig 表达及其与干扰素治疗的相互关系[J]. *中国实用内科杂志*, 2007, 27(4):285-288.
- [26] Crettaz J, Otano I, Ochoa-Callejero L, et al. Treatment of chronic viral hepatitis in woodchucks by prolonged intra-hepatic expression of interleukin-12[J]. *J Virol*, 2009, 83(6):2663-2674.
- [27] Sprengers D, Stoop JN, Binda RS, et al. Induction of regulatory T-cells and interleukin-10-producing cells in non-responders to pegylated interferon-alpha therapy for chronic hepatitis B[J]. *Antivir Ther*, 2007, 12(7):1087-1096.
- [28] Dikopoulos N, Riedl P, Schirmbeck R, et al. Novel peptide-based vaccines efficiently prime murine "help"-independent CD8⁺ T cell responses in the liver[J]. *Hepatology*, 2004, 40(2):300-309.
- [29] Furuichi Y, Tokuyama H, Ueha S, et al. Depletion of CD25⁺ CD4⁺ T cells (Tregs) enhances the HBV-specific CD8⁺ T cell response primed by DNA immunization[J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(24):3772-3777.

(收稿日期:2012-09-01 修回日期:2012-10-11)

新生儿疼痛非药物干预镇痛法研究进展*

冷虹瑶 综述, 郑显兰[△] 审校

(重庆医科大学附属儿童医院护理部 400014)

关键词: 新生儿; 非药物镇痛; 进展

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.04.042

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)04-0461-03

2001年,国际疼痛研究协会(IASP)更新疼痛的定义:疼痛是与实际的或潜在的组织损伤相关的不愉快感觉和情绪体验,或用这类组织损伤的词汇来描述的自觉症状;对于无交流能力的个体,绝不能否认其存在痛的体验,需要采取适当措施来缓解疼痛的可能性。新生儿就属于这类“无交流能力的个体”,所

以长期以来人们认为新生儿没有疼痛感觉。近年来,各种研究发现,新生儿包括早产儿均能感觉到疼痛,其痛觉传导在解剖学和功能学方面均已完备^[1]。长期、反复的疼痛刺激给新生儿带来了各种近期和远期的不良影响^[2],如痛觉过敏、血氧不足、血压升高、心动过速、神经发育异常、行为改变、社交障碍、认知

* 基金项目:重庆市卫生局医学科学研究基金重点资助项目(2011-1-071)。 作者简介:冷虹瑶(1988~),在读硕士,主要从事临床护理和护理管理工作。 [△] 通讯作者, E-mail: ZhengXL003@163.com。