

· 临床论著 ·

慢性乙型肝炎患者外周血调节性T细胞对树突状细胞功能的抑制作用

周培培 颜学兵 徐娟 武桂萍 石银月 赵爽

【摘要】 目的 研究慢性乙型肝炎(CHB)患者外周血CD4⁺CD25⁺调节性T细胞(Treg)对树突状细胞(DCs)免疫功能的抑制作用,探讨治疗CHB的新方法。**方法** 采用密度梯度离心法获得CHB患者和健康对照组(NC组)外周血单个核细胞(PBMC);部分PBMC体外诱导培养获得DCs,部分PBMCs用特异性免疫磁珠分选获得CD4⁺CD25⁺ Treg和CD4⁺CD25⁻ T细胞;不同来源的DCs和正常对照组CD4⁺CD25⁻ T细胞混合为反应细胞,将不同来源和不同比例的Treg分别加入到反应细胞中培养3 d,MTT法检测Treg抑制DCs的抑制指数(SI),并在培养DCs的不同时间加入Treg,应用流式细胞术检测DCs表面共刺激分子CD80和HLA-DR的表达。**结果** 来源于CHB患者及NC组的Treg均可抑制DCs的免疫作用,来源于CHB患者Treg抑制DCs能力显著高于NC,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。不同比例的Treg均可抑制DCs的免疫功能,随着Treg比例的增高抑制作用也越明显,抑制指数亦越高。在DCs培养的不同时间加入相同比例的Treg,发现Treg对DCs表面分子CD80、HLA-DR的表达均有抑制作用,与对照组相比,差异具有统计学意义($P < 0.01$),同时发现加入Treg的时间越早,DCs表面分子表达降低越明显。**结论** CHB患者Treg可显著抑制DCs免疫功能且呈时间和量的依赖,抑制DCs表面分子CD80和HLA-DR表达,可能是Treg抑制DC免疫功能的机制之一。

【关键词】 肝炎,乙型,慢性;CD4⁺CD25⁺调节性T细胞;树突状细胞

Immunosuppression effects of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells on dendritic cells from patients with chronic hepatitis B ZHOU Pei-pei*, YAN Xue-bing, XU Juan, WU Gui-ping, SHI Yin-yue, ZHAO Shuang.

*Department of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002, China

Corresponding author: YAN Xue-bing, Email: yxbxuzhou@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the suppression of regulatory T cells (Treg) on dendritic cells (DCs) in the pathogenesis of chronic hepatitis B (CHB), and to find out new method for CHB treatment. **Methods** Total of 15 cases with CHB and 15 healthy persons were enrolled in the study. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from patients with CHB and normal controls (NC) with density gradient centrifugation. DCs generated from peripheral blood mononuclear cells were cultured and induced by GM-CSF, IL-4 and TNF- α in vitro. Magnetic activated cell sorting (MACS) was applied to purify Treg and CD4⁺CD25⁻ T cell from PBMCs. Mature DCs were mixed with CD4⁺CD25⁻ T cell and cocultured with Treg derived from different sources and with different proportionalities for 3 days. MTT assay was used to determine the suppressing index. Treg were added to DCs at different culture stages. Costimulatory molecules CD80 and HLA-DR on DCs surface were analyzed by flow cytometry, respectively. **Results** Treg from CHB patients and NC suppressed DCs immunity. And treg from patients with CHB suppressed DCs much stronger than that from NC ($P < 0.01$). DCs were cultured with Treg at different proportions in three days. The

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2013.03.017

基金项目: 2011年江苏省“科教兴卫”医学重点人才培养基金(No. RC2011117); 2011年江苏省“六大人才高峰”项目; 2011年江苏省“333高层次人才培养工程”第三层次培养对象

作者单位: 271200 新泰市, 新泰市人民医院(周培培); 徐州医学院附属医院感染病科(武桂萍、石银月、徐娟、颜学兵); 无锡市第四人民医院消化科(赵爽)

通讯作者: 颜学兵, Email: yxbxuzhou@126.com

suppressing rate and index of Treg on DCs immunocapacity both increased with Treg proportion increasing. The expression level of CD80 and HLA-DR in DCs decreased, when adding Treg to the culture system at different times. Earlier addition of Treg, lower expression levels of CD80 and HLA-DR were observed.

Conclusions Treg from patients with CHB had stronger suppressing capacity on DCs immunocapacity than those from NC, which was time and dose dependent. Expression decreasing of DCs surface marker of CD80 and HLA-DR may be the possible

【Key words】 Chronic hepatitis B; $CD4^+CD25^+$ T cells; Dendritic cells

$CD4^+CD25^+$ 调节性T细胞(Treg)是迄今为止所发现的最重要的免疫抑制细胞^[1],几乎可抑制所有免疫反应,在机体免疫系统中发挥负向调节作用。Treg诱发免疫耐受,而肝脏在生理和某些病理情况下处于免疫豁免或免疫低下状态,因此,Treg在慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)、肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)及肝移植中的作用已成为近年来的研究热点。树突状细胞(dendritic cells, DCs)是乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)抑制机体免疫的中心靶点,在抗HBV研究中倍受重视^[2]。CHB患者的DCs功能缺陷,除与HBV直接作用有关外,可能存在另一种重要的免疫抑制机制,近期研究发现Treg可以通过调控DCs功能而发挥其免疫抑制作用^[3]。

Treg在CHB发病机制中作用的相关研究刚刚起步。CHB患者DCs功能缺陷,可能存在另一种重要的免疫抑制机制,因Treg通过抑制其他免疫细胞而发挥其免疫抑制功能,故推测Treg是DCs免疫抑制的重要因素之一。随着DCs应用于临床及HBV感染免疫治疗的研究深入,通过调控DCs功能即逐渐优化增强DCs功能的免疫治疗策略,有望建立靶向于调控DCs功能的有效方法来治疗HBV感染。因此,作为CHB患者发病机制中起重要作用的两个免疫细胞群——Treg与DCs,探讨两者相互作用在CHB患者发病机制中的意义,为进一步探索治疗HBV感染提供新的思路。

资料与方法

一、研究对象

本研究入组的15例CHB患者均为2009年4月至2009年12月徐州医学院附属医院感染性疾病科住院及门诊患者,其中男性11例,女性4例,年龄19~55岁,平均年龄(32.7 ± 10.4)岁。病例诊断均符合2010年12月中华医学会肝脏病学分会制定的《慢性乙型肝炎防治指南》^[4],排除甲型、丙型、戊型肝炎,药物性和酒精性肝病,自身免疫性肝病等患

者。15例健康对照组均来自徐州医学院附属医院的健康体检者,其中男性6例,女性9例,年龄20~45岁,平均年龄(30.1 ± 6.1)岁,与患者组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。所有入选患者均签署知情同意书。

二、方法

1. 外周血单个核细胞的分离:采集CHB患者和对照组外周血,肝素抗凝,采用密度梯度离心法获得CHB患者和对照组的外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs),备用。

2. 外周血单个核细胞来源的树突状细胞的培养:GM-CSF、IL-4、TNF- α 均购于Peprotech公司。将分离出的PBMCs悬浮于含10% FCS的RPMI-1640中,培养获得外周血单个核细胞来源的树突状细胞(dendritic cells from peripheral blood mononuclear cells, MoDCs)。

3. 特异性快速磁珠分离获得Treg及 $CD4^+CD25^-$ T: Mini-Magnetic cell separator、MACS selection column、MACS磁化分离板均购自Meltiny公司;快速磁珠分离法分别获得Treg和 $CD4^+CD25^-$ T细胞。

三、分离获得的Treg和 $CD4^+CD25^-$ T细胞及DCs表型鉴定

1. DCs表型流式检测:抗-CD80-FITC、抗-HLA-DR-PE及同型对照抗体购于杭州联科生物技术有限公司。取少量培养成熟的DCs,加入抗-CD80-FITC、抗-HLA-DR-PE及同型对照抗体,上流式细胞仪检测CD80和HLA-DR的表达。

2. $CD4^+CD25^+$ Treg和 $CD4^+CD25^-$ T细胞的检测:抗-CD4购于上海卓康生物科技有限公司,抗-CD25购于Meltiny公司。取所分离的细胞,分别加入抗-CD4-FITC、抗-CD25-PE,阴性对照管加入抗-IgG-FITC、抗-IgG-PE同样处理后上流式细胞仪检测。

四、CHB患者及对照组Treg抑制DCs免疫效应去增殖DCs与 $CD4^+CD25^-$ T细胞混合为反应细胞,加入96孔培养板;CHB患者Treg和对照组Treg按比例加入培养板反应细胞中后分组,加入IL-2,

继续培养3 d; 结束前12 h每孔加入MTT液, 继续孵育4 h后, 每孔再加入DMSO, 上酶标仪测A值。抑制指数(SI)计算公式: $SI = (\text{阳性对照组} - \text{阴性对照组} - \text{实验组}) / (\text{阳性对照组} - \text{阴性对照组}) \times 100\%$ 。

五、不同比例Treg抑制DCs的免疫效应

去增殖DCs与 $CD4^+CD25^-$ T细胞按1:10混合为反应细胞, CHB患者来源的Treg分别以不同的比例加入到培养板反应细胞中, 之后加入IL-2, 继续培养3 d; 结束前12 h每孔加入MTT液, 继续孵育4 h后, 每孔再加入DMSO, 上酶标仪测A值; SI计算同前。

六、CHB患者来源的Treg抑制DCs表面分子表达效应

DCs培养的第1、第3和第5天分别加入相同比例的Treg, 不加Treg的设为对照组。DCs培养成熟后, 离心弃上清, 细胞沉淀为Treg抑制DCs, 未加Treg组培养获得DCs设为对照组。加入抗-CD80-FITC及同型对照抗体各5 μ l, 混匀后RT避光孵育15 min; 1 ml PBS稀释后上机检测。

七、统计学处理

采用SPSS 13.0统计分析软件进行数据处理。所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、 $CD4^+CD25^+$ Treg和 $CD4^+CD25^-$ T细胞的流式鉴定

采用流式细胞技术对免疫磁珠分离获得的 $CD4^+CD25^+$ Treg和 $CD4^+CD25^-$ T细胞进行纯度分析, 纯度分别为91.5%和85.1%, 见图1~2。

二、DC的表型测定

健康人外周血经密度梯度离心法获得的PBMCs, 在GM-CSF和IL-4诱导下, 培养获得DCs, 流式细胞仪检测DCs表面CD80和HLA-DR的表达量分别为75.2%和93%, 见图3~4。

三、Treg抑制DCs的免疫功能

CHB患者来源Treg和NC组来源Treg按照1:10的比例分别加入到NC组DCs和CHB患者DCs中共培养3 d, 检测抑制指数发现不论来源于CHB患者还是NC组Treg, 对来源于CHB患者和NC组DCs均具有抑制作用。CHB患者来源Treg对CHB患者DC的抑制作用最强, 与其他组比较, 差异具有统计学意义($P < 0.01$)。CHB患者Treg对NC组DCs的抑

制作用, 与其他组比较, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。虽然NC组来源Treg对来源于CHB患者和NC组的DCs均有抑制作用, 但差异无统计学意义($P > 0.05$), 见表1。

表1 CHB患者和对照组Treg抑制DCs增殖的抑制指数(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	抑制指数(SI)
NC组Treg + NC组DCs	15	21.5 \pm 4.3
NC组Treg + CHB组DCs	15	22.8 \pm 3.7
CHB组Treg + NC组DCs	15	28.3 \pm 6.2
CHB组Treg + CHB组DCs	15	34.3 \pm 3.1
<i>F</i>		25.4

注: 方差不齐时采用Dunnett T_3 检验, $F = 25.4$; CHB患者Treg + CHB患者DCs的SI最高, 与其他组比较, $P < 0.01$; CHB患者Treg + NC组DCs的SI, 与其他组比较, $P < 0.05$; NC组Treg + NC组DCs的SI, 与NC组Treg + CHB患者DCs的SI比较, $P > 0.05$

四、不同比例CHB患者来源Treg抑制DC的免疫效应

将Treg按照1:1、1:2、1:10、1:100的比例分别加入到反应细胞中共同培养3 d, 结果发现不同比例的Treg均可抑制DC的免疫功能。随着Treg比例升高, 其抑制作用更显著, 抑制指数也相应升高, 差异具有统计学意义($P < 0.01$), 见表2。

表2 不同比例CHB患者来源Treg抑制DCs增殖的抑制指数(%, $\bar{x} \pm s$)

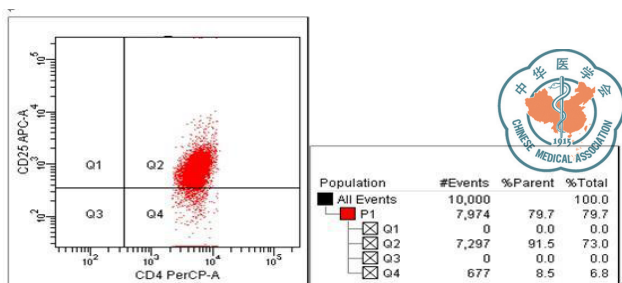
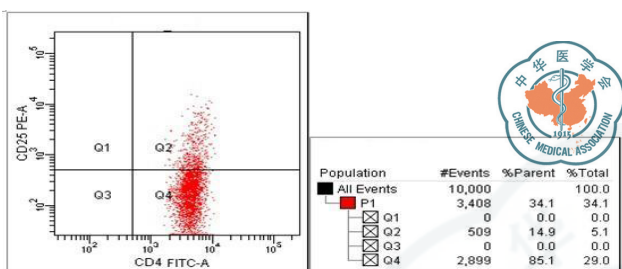
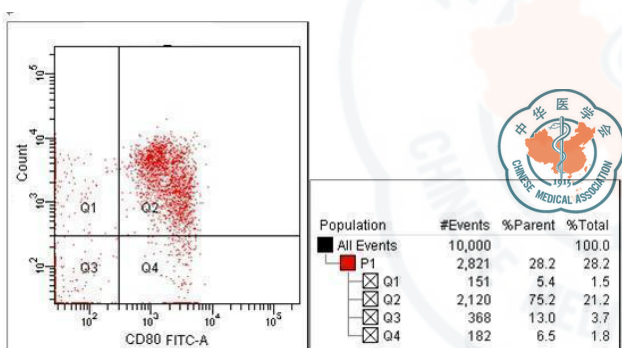
分组(Treg)	例数	抑制指数(SI)
1:1	15	46.9 \pm 7.7
1:2	15	39.3 \pm 6.1
1:10	15	28.3 \pm 6.2
1:100	15	8.9 \pm 3.8
<i>F</i>		109.80
<i>P</i>		< 0.01

五、CHB患者来源Treg抑制DCs表面分子的表达

于DCs培养的第1、第3和第5天, 将Treg加入到培养体系中, 待细胞培养成熟后, 采用流式细胞仪检测DCs表面分子CD80和HLA-DR。结果发现, 与未加Treg的空白对照组相比, DC的表型发生显著改变, CD80和HLA-DR的表达均显著下降, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。加入Treg时间越早, CD80和HLA-DR表达下降程度越明显, 见表3。

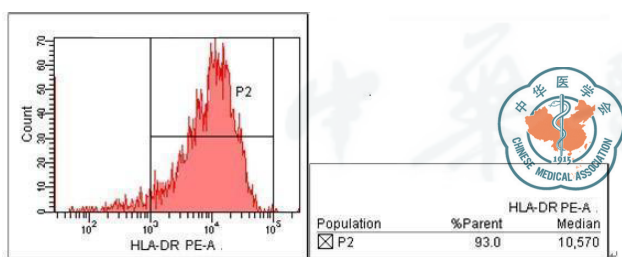
讨 论

研究发现Treg可通过细胞的直接接触、信号转

图1 免疫磁珠分选的CD4⁺CD25⁺Treg细胞图2 免疫磁珠分选的CD4⁺CD25⁻T细胞

注: DC表面CD80表达量为75.2%

图3 健康DC表面CD80的表达情况



注: DC表面HLA-DR表达量为93.0%

图4 健康人DC表面HLA-DR的表达情况

表3 不同时间加入Treg处理后DCs表型表达(%, $\bar{x} \pm s$)

分组	例数	CD80	HLA-DR
第1天	15	23.0 \pm 4.5	31.6 \pm 7.8
第3天	15	43.5 \pm 3.8	43.6 \pm 4.9
第5天	15	59.3 \pm 7.5	58.8 \pm 3.9
对照组	15	74.1 \pm 4.9 ^a	75.9 \pm 4.1 ^b
F		256.9	

注: CD80与对照组相比, 不同时间组间比较, P 均 < 0.01 ; HLA-DR与对照组相比, 不同时间组间比较 P 均 < 0.01

导或与细胞非接触的细胞因子旁分泌的形式发挥抑制作用^[5]。目前研究认为, Treg细胞可控制肝脏炎症的发生及避免肝细胞受到免疫攻击。这可从CD4⁺CD25⁺Treg在自身免疫性肝病、暴发性肝炎及肝脏移植免疫耐受的研究获得证据支持^[6-7]。树突状细胞是专职的抗原提呈细胞, 具有启动T细胞介导的免疫应答功能, 因其表面具有众多树突状突起而得名^[8]。DCs有成熟和未成熟两种功能和表型状态。有研究将DCs分为髓系(myeloid)、淋巴系(lymphoid)和类浆样细胞(plasmacytoid cells)三大类, 但目前对其分类仍存争议^[9-11]。CHB患者的DCs功能缺陷, 除与HBV直接作用有关外, 可能存在另一种重要的免疫抑制机制, 故推测Treg是DCs免疫抑制的重要因素之一。

自从Romani等^[12]建立了应用重组人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(rhGM-CSF)和重组人白细胞介素4(rhIL-4)从人外周血大规模制备DCs的方法后, 人们又建立并完善了多种培养扩增DCs的方法, 这使得对DCs的研究更加深入。本研究利用GM-CSF、IL-4和TNF- α 从外周血诱导培养DCs以用于研究。GM-CSF可维持DCs的分化、发育和存活, IL-4可抑制单核细胞向巨噬细胞分化^[12], 而TNF- α 可促进DCs的成熟。

研究认为, Treg可通过调节DCs对效应细胞的活化而发挥其调节免疫作用^[13]。目前, Treg抑制DCs效应的研究尚处于起步阶段, 研究较少涉及调控HBV感染者体内Treg功能的因素及如何通过调控Treg的功能来治疗CHB, 而研究Treg在HBV致病机制中作用的主要目的是为临床治疗CHB提供理论依据。DCs是“专职”抗原提呈细胞, 是机体免疫识别与激发的基础, 对机体抗病毒免疫调节起关键作用, 也是HBV感染后抑制机体免疫的中心靶点。有研究显示, CHB患者DCs功能存在缺陷, 但功能缺陷及其被调控的确切机制尚不清楚。本研究将免疫磁珠分离的CHB患者来源Treg和健康对照组来源Treg分别加入培养获得的DCs中, 结果发现CHB患者来源Treg和对照组Treg均对DCs有抑制作用, 且前者对CHB患者DCs的抑制作用最强, 显著高于其他组Treg对DCs的抑制作用。NC组Treg虽然对NC组DCs和CHB患者DCs均有抑制作用, 但两者差异无统计学意义。提示CHB患者体内的Treg与健康人功能存在一定差异, CHB患者Treg对DCs的抑制效应显著高于对照组。在对慢性HBV感染者中CD4⁺CD25⁺Treg的研究中, Dieckmann等^[14]通过四色流

式细胞分析发现慢性HBV感染者外周血中Treg细胞含量显著高于正常组。提示Treg在CHB患者体内不仅数量增多,其抑制作用也显著增强。

其次,本研究对不同比例Treg对DCs免疫功能的抑制作用进行比较。结果发现,随着CHB患者来源Treg比例的增加,其对DCs抑制效应也明显增强,呈显著量效关系。Treg含量在1:100的细胞比例时,与健康对照组相比已出现显著的抑制效应。虽然人体内Treg的含量达不到1:1的比例,但本研究收集的临床资料显示,CHB患者体内Treg含量明显高于1%。因此,本研究认为Treg是导致CHB患者DCs功能缺陷的原因之一。

有研究表明,Treg可以抑制DCs的成熟^[15]。为分析CHB患者来源的Treg对DCs表型的影响,本研究将分选出的CHB患者Treg在DCs培养的不同时间加入到培养体系中,检测DCs的免疫表型,结果发现CHB患者Treg对DCs的表型有显著抑制作用,使其表面分子的表达下调,且这种抑制作用与加入时间有关。CHB患者来源Treg加入的时间越长,对DCs表面分子表达的抑制越明显。提示CHB患者来源Treg的作用时间与其抑制效应明显相关。由于DCs表面分子的表达对DCs的功能有重要的意义,因此,CHB患者来源Treg可通过抑制DCs相关功能分子的表达而抑制DCs的免疫功能。这与以往对Treg功能研究结果一致^[16]。同时,这些表面分子在DCs成熟时表达才上调,故认为Treg的持续作用可能抑制DCs的成熟,从而发挥其抑制DCs免疫功能的作用。

以上研究表明,CHB患者来源Treg对DCs的免疫存在显著抑制,也是造成CHB患者体内DCs功能缺陷的重要原因之一。目前临床上已存在针对增强CHB患者体内DCs免疫功能的免疫疗法,如何利用特定手段清除Treg或对抗Treg对DCs的抑制作用,将成为CHB生物治疗的新热点。

参 考 文 献

- 1 Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, et al. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cell 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.
- 2 Akbar SM, Horiike N, Onji M, et al. Immune therapy including dendritic cell based therapy in chronic hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol*,2006,12(18):2876-2883.

- 3 Onishi Y, Fehervari Z, Yamaguchi T, et al. Foxp3⁺ natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation. *Proc Natl Acad Sci USA*,2008,105(29):10113-10118.
- 4 中华医学会中华医学学会肝病学会,中华医学学会感染病学分会.慢性乙型肝炎防治指南(2010年版).中国肝病杂志:电子版,2011,3(1):40-56.
- 5 Taams LS, Smith J, Rustin MH, et al. Human anergic/suppressive CD4⁺CD25⁺ T cells: a highly differentiated and apoptosis-prone population. *Eur J Immunol*,2001,31(4):1122-1131.
- 6 Akbar SM, Horiike N, Onji M, et al. Immune therapy including dendritic cell based therapy in chronic hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol*,2006,12(18):2876-2883.
- 7 Sakaguchi S, Shimizu J. Immunologic tolerance maintained by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol Rev*,2001,182(1):18-32.
- 8 Shevach EM, Shevach EM, McHugh RS, et al. Control of T cell activation by CD4⁺CD25⁺ T suppressor T cells. *Immunol Rev*,2001,182(1):59-67.
- 9 McHugh RS, Whitters MJ, Piccirillo CA, et al. CD4⁺CD25⁺ T immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for glucocorticoid induced TNF receptor. *Immunity*,2002,16(2):311-323.
- 10 Wang K, Fan X, Fan Y, et al. Study on the function of circulating plasmacytoid dendritic cells in the immunoactive phase of patients with chronic genotype B and C HBV infection. *J Viral Hepat*,2007,14(4):276-282.
- 11 Steinman RM, Banchereau J. Taking dendritic cells into medicine. *Nature*,2007,449(7161):419-426.
- 12 Romani N, Gruner S, Brang D, et al. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *Exp Med*,1994,180(1):83-93.
- 13 Santini SM, Di Pucchio T, Lapenta C, et al. A new type I IFN mediated pathway for the rapid differentiation of monocytes into highly active dendritic cells. *Stem Cells*,2003,21(3):357-362.
- 14 Dieckmann D, Plottner H, Berchtold S, et al. Ex vivo isolation and characterization of CD4⁺CD25⁺ T cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med*,2001,193(11):1303-1310.
- 15 Piccirillo CA, Shevach EM. Cutting edge: control of CD8⁺ T cell activation by CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory cells. *J Immunol*,2001,167(3):1137-1140.
- 16 Taams LS, Smith J, Rustin MH, et al. Human anergic/suppressive CD4⁺CD25⁺ T cells: a highly differentiated and apoptosis-prone population. *Eur J Immunol*,2001,31(4):1122-1131.

(收稿日期: 2012-08-06)

(本文编辑: 孙荣华)

周培培, 颜学兵, 徐娟, 等. 慢性乙型肝炎患者外周血Treg对树突状细胞功能的抑制作用[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2013, 7 (3): 399-403.