

· 基础论著 ·

## IL-2 调控慢性丙型肝炎患者外周血 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> 调节性 T 细胞的抑制效应

杨江华 贺蕾 盛浩宇 喻艳林 苏川

**【摘要】 目的** 探讨慢性丙型肝炎患者外周血中 HCV 特异性 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> 调节性 T 细胞的抑制活性以及外源性 IL-2 对 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg 细胞抑制效应的影响。**方法** 采用免疫磁珠分选 18 例慢性丙型肝炎患者与 15 例正常人外周血中 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T 细胞与 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T 细胞,在此两种细胞共同培养体系中加入不同浓度外源性 IL-2 和 IL-4,检测 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T 细胞的抑制能力以及对 HCV 特异性 CD4<sup>+</sup> T 细胞的影响。**结果** 与正常对照相比,慢性丙型肝炎患者的 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg 细胞的抑制增殖活性高 ( $P=0.034$ ); CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg 细胞显著抑制 HCV 特异性 CD4<sup>+</sup> T 细胞的增殖;当 IL-2 浓度为 2 000 U/ml 时,能够显著改变 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg 细胞的低增殖能力,而且 IL-2 与 IL-4 的共同作用改变更明显,其中高浓度的 IL-2 能够阻断 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg 细胞对 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T 细胞的抑制功能。**结论** 慢性丙型肝炎患者外周血中 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg 细胞的抑制活性增强,高浓度 IL-2 可阻断 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg 细胞的抑制效应。

**【关键词】** 丙型肝炎病毒; CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg 细胞; IL-2

**Suppressive activity of IL-2 modulation to CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg cells in patients with chronic hepatitis C** YANG Jiang-hua, HE Lei, SHENG Hao-yu, YU Yan-lin, SU Chuan. Department of Infectious Diseases, Yijishan Hospital, Wannan Medical College, Wuhu 241001, China

Corresponding author: YANG Jiang-hua, Email: yjhpath@163.com

**【Abstract】 Objective** To study the role of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cells in CD4<sup>+</sup> T cell responses from persistent hepatitis C virus infected patients and the effect of exogenous IL-2 on inhibitory capacity of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cells. **Methods** CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cells were isolated from 18 chronic hepatitis C patients and 15 healthy donors by immunomagnetic beads. To assess the regulatory properties of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cells, CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cells were cocultured with CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T cells from patients or controls, then IL-2 and IL-4 were added to cultures. **Results** Chronic hepatitis C patients exhibited an increased inhibitory capacity ( $P=0.034$ ) of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cells, CD4<sup>+</sup>

基金项目:安徽省自然科学基金(070413111);国家自然科学基金青年基金(30700694)

作者单位:241001 芜湖市,皖南医学院弋矶山医院感染科(杨江华、盛浩宇、喻艳林);南京医科大学病原生物学系(贺蕾、苏川)

通讯作者:杨江华, Email: yjhpath@163.com

CD25<sup>+</sup>T cells dramatically suppress the proliferation of CD4<sup>+</sup>T cells; IL-2 enhanced the proliferation of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T cells only at high concentration (2000 U/ml) and IL-4 had a similar effect. When two cytokines were mixed, they had strong synergistic effects. High concentrations of IL-2 could break CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T cells anergy as well as overcoming its regulatory activity. **Conclusions** Persistent hepatitis C virus infected patients show an increased immunosuppressive capacity of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg cells in the peripheral blood and IL-2 could break its regulatory activity.

**【Key words】** HCV; CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg cells; IL-2

研究表明,急性自限性 HCV 感染的患者和猩猩有效控制 HCV 感染需要持久、广泛的 CD4<sup>+</sup>Th1 细胞和 CTL 反应。如果患者不能产生或不能维持持久的 CD4<sup>+</sup>Th1 反应,通常不能清除病毒而导致感染慢性化<sup>[1]</sup>。慢性丙型肝炎患者的 HCV 特异性 CD4<sup>+</sup>Th1 细胞数量减少、对抗原刺激的增生能力显著降低,主要分泌 Th2 细胞类细胞因子(IL-4、IL-6 和 IL-10 等)<sup>[2]</sup>。近来研究显示,在疟原虫<sup>[3]</sup>、利什曼原虫<sup>[4]</sup>和 HIV<sup>[5]</sup>感染时,能够诱导宿主上调表达一群 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞(CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>), CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 主要分泌 IL-10 和 TGF- $\beta$ ,能够抑制抗原特异性 CD4<sup>+</sup>T 细胞反应,下调 Th1 的功能,去除 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 细胞能够显著降低该类病原体的感染率<sup>[4,5]</sup>。本文就 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 细胞在持续性 HCV 感染过程中对 CD4<sup>+</sup>T 细胞下调作用的影响进行了初步探讨。

## 材料与方法

### 一、对象

慢性丙型肝炎患者 18 例,其中男性 12 例,女性 6 例,年龄为 14~60 岁,平均年龄 48.5 岁。诊断符合 2004 年丙型肝炎防治指南的诊断标准。所有病例 6 个月内未应用过免疫调节药物和抗病毒治疗,未合并 HBV 或其他病毒感染。另选正常人 15 例,其中男性 10 例,女性 5 例,年龄 15~55 岁,平均年龄 45.2 岁。

### 二、实验方法

1. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞的分离:采集患者和正常人静脉血 30 ml,用密度梯度离心法分离单个核细胞。采用 Dynabeads 阳性分选法(Dynal)去除单个核细胞中的 CD8<sup>+</sup>T 细胞;再以 Miltenyi 阴性磁珠(Miltenyi)分选 CD4<sup>+</sup>T 细胞。将去除 CD8<sup>+</sup>T 和 CD4<sup>+</sup>T 细胞的剩余细胞用 Co-60 照射(30 Gy)作为 APC。对总 CD4<sup>+</sup>T 细胞再通过抗-CD25 的磁珠进行阳性分选,将 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞与 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 细胞分开,用流式细胞仪鉴定分选细胞的纯度。

2. Foxp3 mRNA 检测:采用 RT-PCR 检测 Foxp3 mRNA 的表达。取  $1 \times 10^5$  个 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞与 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 细胞,用柱分离法抽提 RNA(QIAGEN),用 DEPC 处理过的水将 RNA 稀释为 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。FoxP3 引物为:正向引物,5'-TCACCTACGCCACGCTCAT-3';反向引物,5'-ACTCAGGTTGTGGCGGATGG-3'<sup>[9]</sup>。同

时设  $\beta$ -actin 作为内参照。反应条件:逆转录  $50^{\circ}\text{C}$  30 min,  $95^{\circ}\text{C}$  15 min 灭活逆转录酶,PCR 循环条件为  $95^{\circ}\text{C}$  60 s,  $53^{\circ}\text{C}$  60 s,  $72^{\circ}\text{C}$  60 s,  $72^{\circ}\text{C}$  10 min 延伸,循环 32 次。

3. 细胞刺激培养:分离细胞培养于 96 孔 U 型培养板 (Costar) 中, RPMI 1640 培养基含有 2 mmol/L 的 L-谷氨酰胺、100 U/ml 青霉素和链霉素 (HyClone), 以及 10% 人 AB 血清。分别取 PBMC、 $\text{CD4}^{+}\text{T}$  细胞、 $\text{CD4}^{+}\text{CD25}^{+}\text{T}$  细胞、 $\text{CD4}^{+}\text{CD25}^{-}\text{T}$  细胞和 APC, 按等比例混合共同培养, 同时加入抗-CD3 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (每群细胞  $5 \times 10^4$ ) 或 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  HCV 抗原合成肽 (包括 C 区、NS3 区、NS4a 区和 NS5a 区) (每群细胞  $1 \times 10^5$ ) 或加不同浓度细胞因子 IL-2 和 IL-4, 共同培养 5 d, 在培养结束前 16 h 加入  $^3\text{H}$ -TdR, 收集细胞, 在液闪计数仪上测每分钟脉冲数。

#### 四、统计学处理

$\text{CD4}^{+}\text{CD25}^{+}\text{Treg}$  细胞的数量和增殖功能的差异采用 SPSS 10.1 软件进行 Mann-Whitney U 检验分析。

## 结 果

### 一、慢性丙型肝炎患者 $\text{CD4}^{+}\text{CD25}^{+}\text{T}$ 细胞高表达 Foxp3

$\text{CD4}^{+}\text{CD25}^{+}\text{T}$  细胞表达转录因子 Foxp3, 并可作为其较为特异性的分子标记。我们的研究证实, 用 RT-PCR 扩增 Foxp3 mRNA 后, 当循环次数降到 30 时, 仅见  $\text{CD4}^{+}\text{CD25}^{+}\text{T}$  细胞表达 Foxp3, 并且慢性丙型肝炎患者较正常对照表达增高 (图 1)。

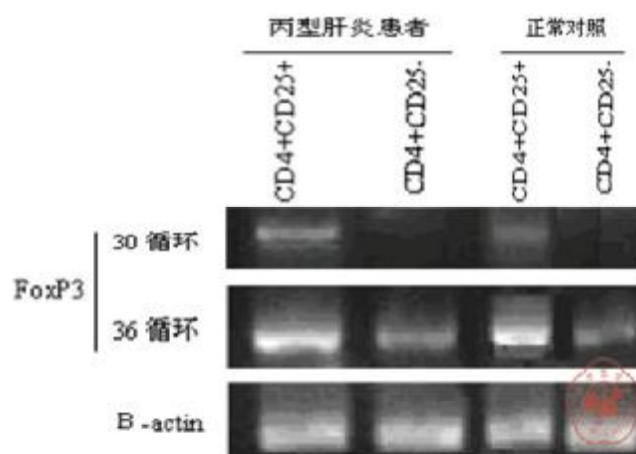


图 1 RT-PCR 检测  $\text{CD4}^{+}\text{CD25}^{+}\text{T}$  细胞 Foxp3 的表达

### 二、持续性 HCV 感染过程中 $\text{CD4}^{+}\text{CD25}^{+}\text{T}$ 细胞抑制活性上调

为观察持续性 HCV 感染过程中上调表达的  $\text{CD4}^{+}\text{CD25}^{+}\text{T}$  细胞是否具有抑制活性, 我们分别取  $\text{CD4}^{+}\text{T}$  细胞、 $\text{CD4}^{+}\text{CD25}^{+}\text{T}$  细胞、 $\text{CD4}^{+}\text{CD25}^{-}\text{T}$  细胞各  $5 \times 10^4$ , 与 APC 按等比例混合培养。图 2 显示, 经抗-CD3 刺激后, 丙型肝炎患者  $\text{CD4}^{+}\text{T}$  细胞的增殖能力低于正常对照; 两组  $\text{CD4}^{+}\text{CD25}^{+}\text{T}$  细胞对  $\text{CD4}^{+}\text{CD25}^{-}\text{T}$

细胞均有强烈的抑制效应(图2A),但患者的CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T细胞的抑制活性高于正常对照( $P=0.034$ )(图2B)。

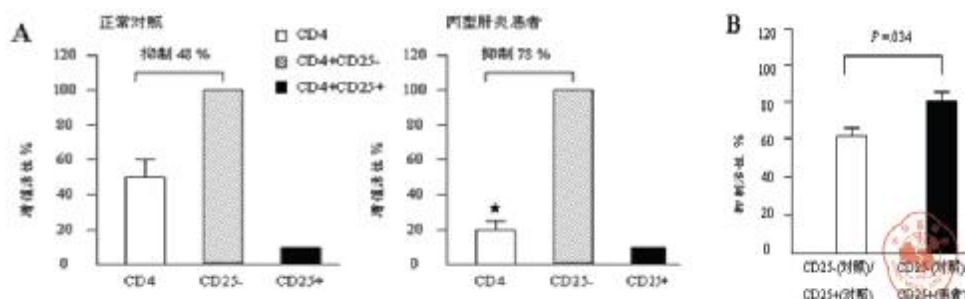


图2 慢性丙型肝炎患者的CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T细胞的增殖活性增高

A: 正常对照和患者的CD4<sup>+</sup>T细胞、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T细胞,以及CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T细胞增殖活性比较;B: 正常对照和患者的CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T细胞分别与正常对照的CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T细胞共同培养

### 三、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T细胞抑制HCV特异性CD4<sup>+</sup>T细胞反应

为检测丙型肝炎患者CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T细胞的抑制功能,我们将CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T细胞与CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T细胞混合,用HCV抗原肽刺激培养,结果CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T细胞可明显降低CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T细胞对HCV抗原的刺激反应(图3)。

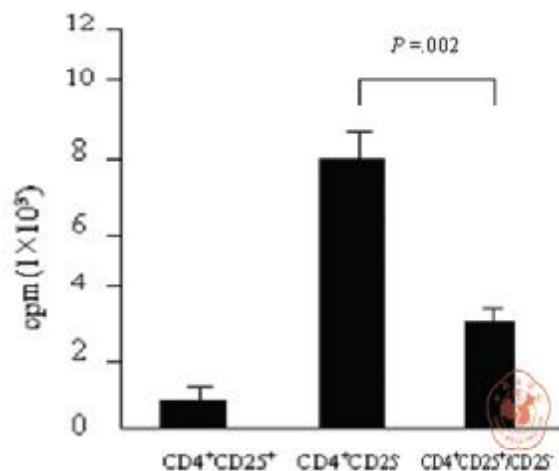


图3 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T细胞抑制HCV特异性CD4<sup>+</sup>T细胞的增殖

### 四、IL-2阻断CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T细胞的抑制效应

在单独CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T细胞和等比例的CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T细胞与CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T细胞中,分别加入终浓度为 $2 \times 10^3$  U/L、 $2 \times 10^4$  U/L、 $2 \times 10^5$  U/L和 $2 \times 10^6$  U/L的IL-2,以及 $2 \times 10^5$  U/L的IL-2与 $2 \times 10^5$  U/L的IL-4进行培养。当IL-2浓度为2000 U/ml时,能够显著改变CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T细胞的低增殖能力,而且IL-2与IL-4的共同作用改变更明显(图4A),其中较高浓度的IL-2能够阻断CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T细胞对CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T细胞的抑制功能(图4B)。



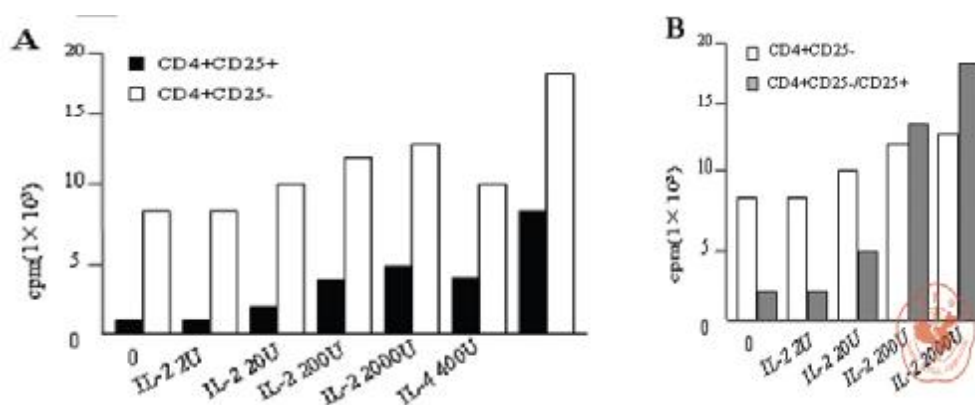


图4 IL-2 调节 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞的增殖活性与抑制功能

A: 加入不同浓度 IL-2 与 IL-4 后 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞与 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 细胞的增殖活性;

B: 加入不同浓度 IL-2 后 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞抑制 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 细胞的增殖活性

## 讨 论

急性自限性 HCV 感染的患者和猩猩的研究表明有效控制 HCV 感染需要一个持久、广泛的 CD4<sup>+</sup>Th1 细胞反应。慢性丙型肝炎患者表现为 HCV 特异性 CD4<sup>+</sup>Th1 细胞数量减少,对抗原刺激的增生能力显著降低,主要分泌 Th2 型细胞因子(IL-4、IL-6 和 IL-10),而分泌 Th1 型细胞因子能力减弱(IFN- $\gamma$  和 IL-2)<sup>[6-8]</sup>,但其发生机制尚未明了。本组研究数据表明,CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 细胞不仅抑制慢性丙型肝炎患者 CD4<sup>+</sup>T 细胞的增殖,而且经抗-CD3 活化后,还能显著抑制正常人 CD4<sup>+</sup>T 细胞的增殖,其抑制效应较正常人 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 细胞有所增强。Sugimoto 等<sup>[9]</sup>研究指出,慢性 HCV 感染患者体内 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 细胞的数量明显高于恢复患者(7.3% vs 2.5%,  $P=0.002$ ),正常对照则为(3.6%,  $P=0.017$ )。体外研究显示,CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 细胞能够抑制 HCV 特异性 CD8<sup>+</sup>T 细胞与 CD4<sup>+</sup>T 细胞增殖以及合成 IFN- $\gamma$ <sup>[10,11]</sup>。

IL-2 是一种 Th1 类细胞因子,能够促进 CD4<sup>+</sup>T 细胞、CLTs 和 B 细胞的增殖。研究显示,当急性 HCV 感染向自限性发展时伴随出现高水平的 IL-2,而向慢性感染发展时 IL-2 水平显著降低<sup>[12]</sup>。此外,IL-2 水平变化还与慢性丙型肝炎患者的抗病毒疗效相关<sup>[13,14]</sup>。本组研究中,为进一步探讨外源性 IL-2 的浓度对 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞功能的影响,我们在单独 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞或 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞与 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 细胞按照 1:1 共培养中,分别加入不同浓度的 IL-2,结果随着浓度的改变,当 IL-2 浓度为 2 000 U/ml 时,能够显著改变 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞的低增殖能力,而且 IL-2 与 IL-4 的共同作用改变更明显,其中高浓度的 IL-2 能够阻断 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞对 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 细胞的抑制功能。由此提示,加入高浓度的 IL-2 能够解除 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞的抑制功能,这为临床上给予高浓度的 IL-2 治疗肿瘤和病毒感染(HIV, HCV 等)提供理论基础。

总之,本研究证实了在慢性丙型肝炎患者外周血中 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 细胞的抑制活性增强,显著抑制 CD4<sup>+</sup>T 细胞的增殖。通过调控 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 细胞抑

制效应(如高浓度 IL-2),或许可为慢性 HCV 感染的治疗寻找一条新途径。

### 参 考 文 献

- 1 Gerlach JT, Diepolder HM, Jung MC, et al. Recurrence of hepatitis C virus after loss of virus-specific CD4<sup>+</sup> T-cell response in acute hepatitis C. *Gastroenterology*, 1999, 117:933-941.
- 2 Tsai SL, Liaw YF, Chen MH, et al. Detection of type 2-like T-helper cells in hepatitis C virus infection: implications for hepatitis C virus chronicity. *Hepatology*, 1997, 25:449-458.
- 3 Hiseida H, Maekawa Y, Iwakawa D, et al. Escape of malaria parasites from host immunity requires CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Nat Med*, 2004, 10:29-30.
- 4 Mendez S, Reckling SK, Piccirillo CA, et al. Role for CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in reactivation of persistent Leishmaniasis and control of concomitant immunity. *J Exp Med*, 2004, 200:201-210.
- 5 Aandahl EM, Michaelsson J, Moretto WJ, et al. Human CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells control T-cell responses to human immunodeficiency virus and cytomegalovirus antigens. *J Virol*, 2004, 78:2454-2459.
- 6 Ulsenheimer A, Gerlach JT, Gruener NH, et al. Detection of functionally altered hepatitis C virus-specific CD4<sup>+</sup> T cells in acute and chronic hepatitis C. *Hepatology*, 2003, 37:1189-1198.
- 7 Rosen HR, Miner C, Sasaki AW, et al. Frequencies of HCV-specific effector CD4<sup>+</sup> T cells by flow cytometry: correlation with clinical disease stages. *Hepatology*, 2002, 35:190-198.
- 8 Kantzanou M, Lucas M, Barnes E, et al. Viral escape and T cell exhaustion in hepatitis C virus infection analysed using Class I peptide tetramers. *Immunol Lett*, 2003, 85:165-171.
- 9 Sugimoto K, Ikeda F, Stadanlick J, et al. Suppression of HCV-specific T cells without differential hierarchy demonstrated ex vivo in persistent HCV infection. *Hepatology*, 2003, 38:1437-1448.
- 10 Cabrera R, Tu Z, Xu Y, et al. An immunomodulatory role for CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T lymphocytes in hepatitis C virus infection. *Hepatology*, 2004, 40:1062-1071.
- 11 杨江华, 张永祥, 喻荣彬, 等. CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg 细胞抑制持续性 HCV 感染患者 CD4<sup>+</sup> T 细胞反应. *中华内科杂志*, 2006, 45:29-33.
- 12 Semmo N, Day CL, Ward SM, et al. Preferential loss of IL-2-secreting CD4<sup>+</sup> T helper cells in chronic HCV infection. *Hepatology*, 2005, 41:1019-1028.
- 13 Czerwionka-Szaflarska M, Chrobot A, Szaflarska-Szczepanik A. Studies of the effectiveness of interferon alpha treatment for chronic hepatitis C in children. *Med Sci Monit*, 2000, 6:964-970.
- 14 Bozkaya H, Bozdayi AM, Aslan N, et al. Circulating IL-2 and IL-10 in chronic active hepatitis C with respect to the response to IFN treatment. *Infection*, 2000, 28:309-313.

(收稿日期:2008-08-05)

(本文编辑:温少芳)

杨江华, 贺蕾, 盛浩宇, 等. IL-2 调控慢性丙型肝炎患者外周血 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> 调节性 T 细胞的抑制效应 [J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志: 电子版*, 2009, 3(2): 145-150.