

- [4] 杜晓云,谢松业,丁星. 2 种不同方法测定血清高密度脂蛋白胆固醇的性能分析和评价[J]. 现代中西医结合杂志, 2005, 14(21): 2852-2853.
- [5] Miller WG, Myers GL, Sakurabayashi I, et al. Seven direct methods for measuring HDL and LDL cholesterol compared with ultracentrifugation reference measurement procedures [J]. Clin Chem, 2010, 56(6): 97.
- [6] Singh U, Otvos J, Dasgupta A, et al. High-dose α -tocopherol therapy does not affect HDL subfractions in patients with coronary artery disease on statin therapy[J]. Clin Chem, 2007, 53(3): 525-528.
- [7] Movva R, Rader DJ. Laboratory assessment of HDL heterogeneity and function[J]. Clin Chem, 2008, 54(5): 788-800.
- [8] Ridker PM, Rifai N, Cook NR, et al. Non-HDL cholesterol, apolipoproteins A-I and B₁₀₀, standard lipid measures, lipid ratios, and CRP as risk factors for cardiovascular disease in women[J]. JAMA. 2005; 294(3): 326-333.
- [9] 郑慧斐, 丛辉, 王惠明, 等. 高密度脂蛋白亚类的检测方法[J]. 临床检验杂志, 2009, 27(6): 477-479.
- [10] Nauck M, Warnick GR, Rifai N. Methods for measurement of LDL-cholesterol: a critical assessment of direct measurement by homogeneous assays versus calculation[J]. Clin Chem, 2002, 48(2): 236-254.
- [11] 王晓玲. 低密度脂蛋白测定方法的选择[J]. 中国医药指南, 2009, 7(17): 89-90.
- [12] Mora S, Rifai N, Buring JE, et al. Comparison of LDL cholesterol concentrations by friedewald calculation and direct measurement in relation to cardiovascular events in 27 331 women[J]. Clin Chem, 2009, 55(5): 888-894.
- [13] Miller WG, Waymack PP, Anderson FP, et al. Performance of four homogeneous direct methods for LDL-cholesterol[J]. Clin Chem, 2002, 48(3): 489-498.
- [14] 董军, 陈文祥. 血浆脂蛋白(a)检测的研究进展[J]. 中华检验医学杂志, 2006, 29(11): 1035-1037.
- [15] 康熙雄, 陈燕, 王亚杰, 等. 载脂蛋白 A 和 B 的结构功能与测定方法及其标准化[J]. 中华检验医学杂志, 2008, 31(8): 956.
- [16] Shih WJ, Bachorik PS, Haga JA, et al. Estimating the long-term effects of storage at -70°C on cholesterol, triglyceride, and HDL cholesterol measurements in stored sera[J]. Clin Chem, 2000, 46(3): 351-364.
- [17] 张江涛, 董军, 李红霞, 等. 高效液相色谱检测全血贮存对血清总胆固醇和高密度脂蛋白胆固醇的影响[J]. 中华检验医学杂志, 2005, 28(4): 364-368.
- [18] 易尚辉, 易银沙, 王治国, 等. 不同实验条件对高密度脂蛋白测定的偏倚分析[J]. 实用预防医学, 2008, 15(2): 298-300.
- [19] 曹永坚, 黄宪章, 孙蕾, 等. 不同检测系统测定载脂蛋白结果的可比性研究[J]. 国际检验医学杂志, 2006, 27(1): 15-17.
- [20] 吴甲文. 标本放置时间与温度对血脂测试的影响[J]. 检验医学与临床, 2009, 6(19): 1617-1618.
- [21] 汪旭强, 宋保利, 李丽萍. 酶法测超高浓度三酰甘油标本时结果偏低的原因分析[J]. 现代检测医学杂志, 2008, 23(1): 7-8.

(收稿日期: 2010-07-10)

• 综 述 •

调节性 T 细胞在乙型肝炎中免疫作用的研究现状

孔元梅 综述, 许红梅 审核
(重庆医科大学儿童医院 400014)

关键词: 调节性 T 细胞; 乙型肝炎; 免疫调节; FoxP3

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2011. 05. 025

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)05-0587-03

乙型肝炎是由乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)引起的流行性、进展性传染病。目前全球有 1/3 人口为 HBV 感染者, 约 3.6 亿人为无症状 HBV 携带者, 每年因感染 HBV 死亡的人数约 50~120 万, 乙型肝炎相关的肝硬化和肝癌死亡率逐年增加, 严重威胁人类的健康。乙型肝炎发病机制较为复杂, 机体感染 HBV 后引起细胞免疫和体液免疫应答, 并激发自身免疫反应及免疫调节功能紊乱, 导致机体特异性免疫功能损伤, 如: Th1/Th2 失衡, 调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg)增加等。Treg 细胞是体内具有免疫抑制功能的异质性细胞群, 在乙型肝炎病毒感染中由于抑制了 CD8⁺ T 细胞介导的特异性抗病毒免疫应答, 而使 HBV 感染慢性持续性存在, 现就 Treg 细胞在乙型肝炎中的免疫作用作一综述。

1 Treg 细胞分类、分子表达与鉴定

机体中 Treg 细胞包括 CD4⁺ 调节性 T 细胞、Th3 细胞、Tr1 细胞和 CD8⁺ 调节性 T 细胞。自然生成的 Treg 细胞主要在胸腺中发育, 并经自身抗原刺激后在胸腺内被阳性选择。自然形成的 Treg 细胞占 CD4⁺ 群体的 5%~10%, 最早可见于 T 细胞发育的第 1 阶段, 使 T 细胞向 Treg 细胞发育的信号是通过胸腺内 CD4⁺ T 细胞的 T 细胞受体与胸腺内皮细胞递呈的

MHC-II 类分子结合, CD4⁺ T 细胞被“部分活化”, 从而表达 CD25 分子(IL-2 受体的 α 链), 同时 FoxP3(forkhead box P3)也呈阳性, 发育成具有免疫抑制功能的 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞, 而对自身 MHC-II 类分子亲和力过低的胸腺细胞则不能被选择。另外一类分化途径与自然形成的 Treg 细胞的不同, 其是由外周 T 细胞发育而来, 包括 Tr1 和 Th3Treg 细胞。Tr1 细胞 CD4⁺ CD25⁻ FoxP3⁻, 通过分泌 IL-10 来发挥调节免疫功能的作用; Th3 前体细胞与 Tr1 细胞相同, 体外用 TGF- β 刺激 CD4⁺ CD25⁻ FoxP3⁻ 细胞可使其转化为 CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ 细胞, 即 Th3 细胞^[1]。目前对 CD8⁺ Treg 细胞的研究较少, 有报道称其在体外可抑制 CD4⁺ T 细胞的功能^[2]。

Treg 细胞表面稳定表达 CD25 被认为是 Treg 细胞的显著特征, 细胞调节功能集中体现在强表达 CD25 的 CD4⁺ T 细胞上, 实验显示, 敲除 IL-2 受体(CD25 或 CD122)或它的配体 IL-2 都可导致 CD4⁺ CD25⁺ 细胞数量降低, 证明了 CD25 在 Treg 细胞发育过程中的重要作用^[3]; Treg 细胞在细胞表面及胞浆内表达抑制性共刺激分子 CTLA-4(cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4)(CD152), 它是细胞免疫的负反馈调节因子, 抗 CTLA-4 单抗可阻断 Treg 细胞的免疫抑制作用^[4]; 肿瘤

坏死因子受体超家族成员 TNFRSF-18 (tumor necrosis factor receptor superfamily member 18), 也称作 GITR (glucocorticoid-inducer tumor necrosis factor), 是 Treg 细胞维持自身免疫耐受的重要分子, 抗 GITR 抗体能阻断 Treg 细胞的免疫抑制作用^[5]; FoxP3 是叉头样转录因子家族中的成员, 特征性结构为蛋白 C 端的叉头螺旋 (forkhead/winged helix) 结构, 其在 Treg 细胞上特异性表达, 亦在调控 Treg 细胞的发育和分化中起决定性作用。用携带 FoxP3 基因的逆转录病毒载体向初始 CD4⁺ T 细胞导入 FoxP3, 可诱导 CD4⁺ T 细胞向 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞分化, 并能抑制免疫性疾病的发生, 在人类和鼠类中 FoxP3 基因突变与遗传性自身免疫性疾病有关^[6]。整合素 α E β 7 (CD103) 被认为能标记 Treg 细胞的某些亚群, 在 Treg 细胞向炎症部位的迁徙中有重要作用^[7]。但其他研究表明 CD103 对 Treg 细胞的功能并没有重要性, 而且该分子在除了 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞以外的其他非 T 细胞上也有表达^[8]; LAG-3 (lymphocyte activation gene-3) (CD223) 是与 CD4 同源的 MHC-II 类分子, 最近发现其在活化后的 Treg 细胞上选择性表达, 并与 Treg 细胞的抑制功能有关^[9]; GARP (glycoprotein A repetitions predominant) 也是最近发现的 Treg 细胞表面分子, 富含亮氨酸, 当 Treg 细胞经 TCR 活化后特异性表达^[10]。

传统鉴定 Treg 细胞主要是通过 CD4 和 CD25 来标记, 但随着研究的进一步深入, 发现通过 CD4⁺ CD25⁺ 双阳性来定义的 Treg 细胞并不完全准确, 活化的 T 细胞也低表达 CD25, 因而传统鉴定方法只能获得中等-强表达 CD25 的 Treg 细胞, 造成部分 Treg 细胞的丢失。而 Treg 细胞表面表达的 CTLA-4、GITR 在活化的非 Treg 细胞亦有表达, 因而不能用于 Treg 细胞的分离鉴定。FoxP3 是目前公认的识别 Treg 细胞最敏感的指标, 在 CD4⁺ CD25⁺ T 细胞与 CD8⁺ CD25⁻ T 细胞内均有表达^[11], 其在 CD4⁺ T 细胞中的表达明显高于 CD8⁺ T 细胞, 因此通过标记 FoxP3 与 CD25 可以提高检测的特异性。检测 FoxP3 指标需要对细胞进行破膜, 一旦通过此方法检测后细胞将无法再培养或进行进一步的实验, 因而其应用受到了限制。目前研究发现, Treg 细胞下调表达 CD127, CD127 是 IL-7 受体的一部分, 在 T 细胞前体、B 细胞前体、成熟 T 细胞、成熟单核细胞及其他一些淋系和髓系细胞上表达。研究发现, CD127 在 T 细胞的增殖、分化和成熟中起重要作用, 体内实验显示, T 细胞活化后, CD127 蛋白下调表达。T 细胞 CD127 的下调表达与 CD25 的中等-强表达具有良好的相关性, 通过 CD127 的分选, 联合 CD25 可以得到高特异性的 Treg 细胞, 与 FoxP3 检测的特异性结果一致。因 CD127 在细胞表面表达, 易于检测, 染色时不会对细胞造成损害, 故可作为一种用于 Treg 鉴定和分选的最佳表型。

小鼠模型中 Treg 细胞的功能已阐明得比较清楚, 但因为缺乏特异性标志进行有效识别, 人类 Treg 细胞的鉴定及功能还有待进一步研究。总之, Treg 细胞的鉴定, 需要通过形态学和组合性细胞表面标志等综合判断。

2 肝脏 Treg 细胞和乙型肝炎

HBV 是一种嗜肝 DNA 病毒, 其本身对肝细胞并没有损害, 在清除胞内 HBV 和肝细胞的损伤中均起关键作用的是 CD8⁺ T 细胞, 分泌性膜溶解途径或分泌性受体介导途径是 CD8⁺ T 细胞清除机体感染 HBV 的主要方式。与健康对照组相比, 慢性乙型肝炎患者的 CD8⁺ T 细胞表达下降, 提示 CD8⁺ T 细胞在乙型肝炎的慢性化中起作用。最近 1 项研究对 37 例

慢性乙型肝炎患者和 3 例急性乙型肝炎恢复期患者的外周血进行实验, 将 Treg 细胞清除后对血液进行体外血培养发现 CD8⁺ T 细胞数量明显上升, CD8⁺ T 细胞释放的 IFN- γ 也增加, 由此推测, 血液循环中 Treg 细胞可以抑制 CD8⁺ T 细胞的激活, 而其具体机制尚有待于进一步研究^[12]。Treg 细胞通过抑制 HBV 特异性的 CD8⁺ T 细胞的激活, 一方面抑制过度免疫病理损伤, 另一方面也可能有利于病毒的持续感染。除可抑制 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞外, Treg 细胞还可以抑制树突状细胞的活化和分泌细胞因子, 防止炎症反应过强^[13]。

HBV 感染者外周血 Treg 细胞数量是否增高, 以及是否与 HBV 复制水平有相关性仍存在争议。部分学者的研究显示, 无症状 HBV 携带患者外周血和肝脏中 CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ Treg 细胞数量比恢复期患者和健康对照组高, 支持 Treg 细胞与 HBV 的持续感染有关的理论^[14]。Franzese 等^[12]亦发现慢性乙型肝炎患者外周血 Treg 细胞可以抑制 HBV 特异性细胞免疫反应, 但慢性乙型肝炎患者外周血 Treg 细胞频率与健康对照相比无显著差异。上述差异可能与对 Treg 细胞的界定和检测方法不同有关。虽然急性乙型肝炎发病初期及慢性重型乙型肝炎均有较重的炎症反应, 但外周血 Treg 细胞表现却不同, 表明 Treg 细胞与乙型肝炎的病情发展和预后有一定联系。

目前急性乙型肝炎发病过程中对肝脏 Treg 细胞的观察报告较少, 因为临床上急性乙型肝炎患者通常不进行肝组织活检。有学者以 1 例急性乙型肝炎患者和 4 例非酒精性脂肪肝患者为对照, 检测慢性活动性乙型肝炎、无症状 HBV 携带者肝组织 Treg 细胞频率, 2 组 Treg 细胞频率明显升高, 且前者高于后者, 而对照组 Treg 细胞频率没有升高^[15]。慢性乙型肝炎以肝脏局部病变为主, 目前在慢性乙型肝炎和慢性重型乙型肝炎患者的肝组织中均发现了 Treg 细胞的浸润, 慢性重型乙型肝炎患者肝组织 Treg 细胞数明显高于慢性乙型肝炎患者和健康对照组, 且伴大量 CD4⁺ 和 CD8⁺ 细胞浸润。慢性乙型肝炎患者肝组织中 Treg 细胞、CD4⁺ 和 CD8⁺ 细胞数较健康者也明显增高, 但显著低于慢性重型乙型肝炎患者^[16]。肝组织中 Treg 细胞频率越高, 对乙型肝炎特异性 CD8⁺ T 细胞介导的抗病毒免疫反应的抑制作用越强。慢性重型乙型肝炎免疫反应过强, Treg 细胞数量明显不足, 功能下降, HBV 特异性 CD8⁺ 细胞过度扩增, 不断攻击 HBV 感染的靶细胞, 导致大量靶细胞坏死并同时触发肝细胞的凋亡机制, 故 Treg 细胞可作为临床慢性乙型肝炎重症化的 1 个潜在指标^[17]。

研究显示, 慢性乙型肝炎患者 Treg 细胞的浓度明显高于健康对照组, 且与患者血清 HBV DNA 成正相关, DNA > 108 copy/mL 的患者的 Treg 细胞数高于 DNA < 108 copy/mL 的患者^[18]。也有研究认为, DNA 阳性即 DNA > 103 copy/mL 的患者与 DNA 阴性即 DNA < 103 copy/mL 的患者的 Treg 细胞数比较差异无统计学意义^[15]。外周血 Treg 细胞浓度与血清 HBeAg 是否相关亦存在不同意见, 有研究结果为血清 HBeAg 阳性组 Treg 细胞浓度显著高于 HBeAg 阴性组^[19], 而其他研究并不能得出该结果。慢性活动性肝炎及无症状 HBV 携带者血清和肝组织 TGF- β 均明显升高, 其中慢性活动性肝炎升高较无症状 HBV 携带者明显, 且与 Treg 细胞频率及 FoxP3 mRNA 表达成正相关, 支持慢性乙型肝炎患者 TGF- β 参与诱导 Treg 细胞的理论。目前, HBV 抗原是否能直接诱导 Treg 细胞尚无确切证据, 需进一步实验阐明^[19]。

3 展望

阐明 HBV 逃逸机体免疫反应、引起持续感染和炎症的机

制具有重要意义。多种因素决定乙型肝炎应采用免疫介导的治疗策略,免疫控制在慢性乙型肝炎的治疗过程中发挥重要的作用。若能抑制 Treg 细胞的增生和分化,或阻断其调控途径,如剔除 Treg 细胞的过继治疗,抗 CD25 单抗的治疗,阻断 CTLA-4 的治疗或针对特异性转录因子 FoxP3 的基因治疗等,或许能够阻断其免疫抑制功能,提高表位特异性 CTL 的免疫效应,为乙型肝炎的治疗寻找到新的策略。

参考文献

- [1] Apostolou I, von Boehmer H. In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells[J]. J Exp Med, 2004, 199(10): 1401-1408.
- [2] Bisikirska B, Colgan J, Luban J, et al. TCR stimulation with modified anti-CD3 mAb expands CD8⁺ T cell population and induces CD8⁺ CD25⁺ Tregs[J]. J Clin. Invest, 2005, 115(10): 2904-2913.
- [3] Piccirillo CA, Thornton AM. Cornerstone of peripheral tolerance: naturally occurring CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cell[J]. Trends immunol, 2004, 25(7): 374-380.
- [4] Shevach EM. Control of T cell activation by CD4⁺ CD25⁺ T suppressor T cells[J]. Immunol Rev, 2001, 182(3): 59-67.
- [5] Hugh RS, Whitters MJ, Piccirillo CA, et al. CD4⁺ CD25⁺ T immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor[J]. Immunity, 2002, 16(2): 311-323.
- [6] Sakaguchi S. Naturally arising FoxP3-expressing CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cell in immunological self tolerance and non-self[J]. Nat immunol, 2005, 6(4): 345-352.
- [7] Suffa I, Reckling SK, Salay G, et al. A role for CD103 in the retention of CD4⁺ CD25⁺ Treg and control of Leishmania major infection[J]. J Immunol, 2005, 174(9): 5444-5455.
- [8] Jaensson E, Uronen-Hansson H, Pabst O, et al. Small intestinal CD103⁺ dendritic cells display unique functional properties that are conserved between mice and humans[J]. J Exp Med, 2008, 205(9): 2139-2149.
- [9] Huang CT, Workman CJ, Flies D, et al. Role of LAG-3 in regulatory T cells[J]. Immunity, 2004, 21(4): 503-513.

• 综 述 •

- [10] Wang R, Wan Q, Kozhaya L, et al. Identification of a regulatory T cell specific cell surface molecule that mediates suppressive signals and induces FoxP3 expression[J]. PLoS One, 2008, 3(7): e2705.
- [11] Cosmi L, Liotta F, Lazzeri E, et al. Human CD8⁺ CD25⁺ thymocytes share phenotypic and functional features with CD4⁺ CD25⁺ regulatory thymocytes[J]. Blood, 2003, 102(12): 4107-4114.
- [12] Franzese O, Kennedy P, Gehring A, 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.
- [13] Misra N, Bayry J, Lacroix-Desmazes S, et al. Cutting edge: human CD4⁺ CD25⁺ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells[J]. J Immunol, 2004, 172(8): 4676-4680.
- [14] 吕峰, 浩玉峰, 崔明芳, 等. 慢性 HBV 感染患者外周血 CD4CD25 调节性 T 细胞表达及其临床意义[J]. 实用肝病杂志, 2010, 13(1): 13-15.
- [15] 刘佩芝, 詹爱琴, 季榕, 等. 慢性乙型肝炎患者外周血 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞、白细胞介素-10 水平及其临床意义[J]. 肝脏, 2009, 14(2): 124-125.
- [16] Xu D, Fu J, Jin L, et al. 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.
- [17] 颜学兵, 赵爽, 周培培, 等. 慢性乙型肝炎患者调节性 T 细胞检测及调控因素研究[J]. 中国医学检验杂志, 2009, 2(8): 47-49.
- [18] Nan XP, Zhang Y, Yu HT, et al. Circulating CD4⁺ CD25⁺ high regulatory T cells and expression of PD-1 and BTLA on CD4⁺ T cells in patients with chronic hepatitis B virus infection[J]. Viral Immunol, 2010, 23(1): 63-70.
- [19] 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.

(收稿日期: 2010-07-10)

量子点及其在肿瘤诊断中的应用研究进展

陈 栋 综述, 罗 阳, 黄 庆, 府伟灵[△] 审校
(第三军医大学西南医院检验科, 重庆 400038)

关键词: 量子点; 肿瘤; 诊断

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2011. 05. 026

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)05-0589-03

肿瘤是一种恶性疾病, 严重威胁着人类的健康, 其高死亡率与复发率已经引起广大学者的高度重视。研究一种可以对肿瘤进行早期诊断而且具有高敏感性与特异性的技术显得尤为重要^[1-3]。目前诊断肿瘤的方法主要有以下几种: (1) 影像诊断法, 如 CT、X 线、超声成像、MRI 以及 PET 用于各部位肿瘤的检测; (2) 实验室诊断法, 如肿瘤标志物用于部分肿瘤的筛查; (3) 其他, 如内镜用于消化道肿瘤的检测, 乳房造影法用于乳腺癌的检测。这些检测方法存在诸如敏感性及特异性低、费用高等缺点。近年来, 量子点 (quantum dot, QD) 以其独有的

特性在肿瘤的诊治中显示出诱人的应用前景。本文就 QD 的结构特点、光电特性、肿瘤诊断中的应用及其存在问题等内容作一综述, 并对其应用前景进行展望。

1 QD 的结构及合成修饰^[4-6]

1.1 QD 的结构 QD 又称半导体纳米晶体 (semiconductor nanocrystal), 是由核心与外壳组成的, 直径一般为 2~10 nm。其核心多为 III~V 族及 II~VI 族元素组成的金属与非金属化合物, 外壳则由另一种材料构成。目前以 CdSe/ZnS 核壳的 QD 为生物学研究的首选。

[△] 通讯作者, E-mail: weilingfu@yahoo. com.