

文章编号 1006-8147(2017)01-0011-06

论著

自体特异性免疫效应淋巴细胞抑制转 HBV 基因小鼠 HBV 复制的研究

杨 柳¹, 王绕绕¹, 尹明丽¹, 杨 洋², 刘 涛³, 李代红², 王政禄², 沈中阳², 宋红丽⁴

(1. 天津医科大学一中心临床学院, 天津 300192; 2. 天津市第一中心医院器官移植中心, 天津 300192; 3. 天津市第一中心医院, 卫生部危重病急救医学重点实验室, 天津 300192; 4. 天津市第一中心医院器官移植中心, 天津市器官移植研究所, 天津 300192)

摘要 目的:探讨经乙型肝炎病毒(HBV)转基因小鼠树突状细胞(DCs)体外诱导的特异性免疫效应细胞(IECs)对自体 HBV 复制的影响。方法:从转 HBV 基因小鼠体内提取 DCs,体外诱导为成熟 DCs,与淋巴细胞共培养,诱导为特异性 IECs,将其经阴茎背静脉注入小鼠体内。实验分为 2 组:生理盐水(NS)组、IEC 组,观察 6 个时间点:0 h、2、4、6、8 周和 12 周;通过生化检测肝功能,PCR 检测血清中 HBV DNA 水平、ELISA 检测细胞因子、免疫组化检测肝组织内的 HBsAg 和 HBeAg,评估 IECs 对小鼠体内 HBV 复制的影响。结果:IEC 组小鼠于 6、8 周和 12 周时,肝功能明显改善,HBV DNA 水平明显降低,HBsAg 和 HBeAg 明显减少,且均优于 NS 组($P<0.05$)。结论:特异性 IECs 可修复转 HBV 基因小鼠肝脏功能、抑制 HBV 复制,相关的细胞因子参与其作用。

关键词 乙型肝炎病毒;树突状细胞;淋巴细胞;特异性免疫效应细胞

中图分类号 R512.6⁺2

文献标志码 A

Study on effect of autologous specific immune effective cells on inhibiting HBV replication in HBV transgenic mice

YANG Liu¹, WANG Rao-rao¹, YIN Ming-li¹, YANG Yang², LIU Tao³, LI Dai-hong², WANG Zheng-lu², SHEN Zhong-yang², SONG Hong-li⁴

(1. The First Central Clinical College, Tianjin Medical University, Tianjin 300192, China; 2. Department of Organ Transplantation, Tianjin First Central Hospital, Tianjin 300192, China; 3. Tianjin First Central Hospital, Key Laboratory of Critical Care Medicine, Ministry of Health, Tianjin 300192, China; 4. Department of Organ Transplantation, Tianjin First Central Hospital, Tianjin Organ Transplantation Research Laboratory, Tianjin 300192, China)

Abstract Objective: To investigate the effect of specific immune effective cells (IECs) induced by dendritic cells (DCs) from HBV transgenic mice on HBV replication. **Methods:** DCs were isolated from HBV transgenic mice, induced into mature DCs and co-cultured with lymphocytes to produce IECs, which were injected into transgenic mice by tentum dorsal veins. Samples were divided into two groups: normal saline (NS) group and IEC group, which were observed at 0 h, 2, 4, 6, 8 week and 12 week. To evaluate the effect of IECs, liver function were checked by biochemistry, the expression of HBV DNA were checked by PCR, the levels of cytokines were checked by ELISA, and HBsAg and HBeAg expression were checked by immunohistochemistry. **Results:** At 6, 8 week and 12 week after injection of IECs into transgenic mice, liver function were improved significantly. HBV DNA, HBsAg and HBeAg expression decreased significantly. And all indexes were better than NS group ($P<0.05$). **Conclusion:** IECs could protect liver function, and inhibit HBV replication in HBV transgenic mice, and the related cytokines are involved in this effect.

Key words hepatitis B virus; dendritic cell; lymphocyte; immune effective cell

乙型肝炎是由乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)引起的一种传染病,主要特征为炎症和坏死。持续 HBV 感染可致肝脏慢性损伤,最终发展为肝硬化、肝癌等^[1]。目前主要治疗和预防手段是核苷类似物、干扰素等的应用。核苷类似物药物在患者体

内发挥抑制病毒复制的作用,但不能有效清除 HBV;而干扰素方案的治疗,短期内抗病毒效率低,个体差异较大,副作用多等因素限制其疗效。因此寻求新的控制 HBV 的治疗方法显得尤为重要。由于树突状细胞(dendritic cells, DCs)是抗原提呈细胞,在诱导初始免疫、活化 T 淋巴细胞、调节 T 淋巴细胞反应及诱导免疫耐受方面具有重要作用^[2-3],目前有研究证实经体扩增的自体 DCs 经乙肝表面抗原(hepatitis B virus surface antigen, HBsAg)致敏后

基金项目 国家自然科学基金面上项目(81270528,81170444),天津市卫生局科技基金(攻关)资助项目(2011KY11)

作者简介 杨柳(1989-),女,硕士在读,研究方向:肝脏相关疾病;通信作者:宋红丽, E-mail: hlsong26@163.com。

回输给慢性乙型肝炎患者,可有效抑制 HBV 复制^[4],且体外研究已证明由 HBV 抗原活化的特异性免疫效应淋巴细胞对 HepG2.2.15 细胞具有抗 HBV 作用^[5]。故 HBV 特异性免疫疗法已成为治疗 HBV 感染的研究热点。因此,本实验旨在探讨经 HBV 活化的特异性免疫效应细胞 (immune effective cells, IECs) 对转 HBV 基因小鼠体内 HBV 复制的影响,为临床治疗乙型肝炎提供思路。

1 材料与方法

1.1 材料 实验动物:正常 Balb/c 小鼠(军事医学科学院实验动物中心),转 HBV 基因 Balb/c 小鼠(解放军 458 医院全军传染中心转基因实验室),均为 6~8 周,雄性,18~22 g;试剂及仪器:RPMI-1640 培养基(Gibco,美国);胎牛血清(FBS)(Biowest,法国);重组小鼠粒细胞巨噬细胞-集落刺激因子(GM-CSF)、白介素-4(IL-4)、HBsAg、乙肝核心抗原(HBcAg)(PeProTech, 美国);CD3-APC、CD4-FITC、CD8-PE、CD11c-APC、MHC-II-FITC (eBioscience, 美国);小鼠淋巴细胞分离液、Tris-HCL 红细胞裂解液(索莱宝,北京,中国);IL-4 及干扰素- γ (IFN- γ) ELISA 试剂盒(Biovalue, 上海,中国);CO₂ 培养箱(SHELLAB, 美国),倒置荧光显微镜(Olympus, 日本),荧光定量 PCR 仪(Applied Biosystems 7300, 美国),FACSCalibur 流式细胞仪(BD, 美国),生化自动分析仪(Hitachi, 日本)。

1.2 方法

1.2.1 DCs 体外分离、培养及鉴定 颈椎脱位法处死 HBV 转基因 Balb/c 小鼠^[7],无菌取股骨和胫骨,用 RPMI-1640 培养基冲洗骨髓腔,收集骨髓细胞悬液裂解去除红细胞。将沉淀细胞用含 10%FBS 的 RPMI-1640 培养液悬浮铺于 6 孔板,添加 rGM-CSF、rIL-4,放入 37℃,5%CO₂ 培养箱。第 2 天,将悬浮细胞转移到新培养板中。第 4 天,半换液,加上述细胞因子。第 6 天,加入 HBsAg、HBcAg。第 9 天,收集成熟 DCs。流式检测 DCs 表面 CD11c、MHC-II 的表达。

1.2.2 自体胸腺淋巴细胞分离及培养 无菌取 HBV 转基因 Balb/c 小鼠胸腺,玻片研磨,经尼龙网过滤后收集细胞,淋巴细胞分离液离心分离,磷酸盐缓冲液洗涤,收集淋巴细胞。

1.2.3 特异性 IECs 的制备及鉴定 将成熟 DCs 按 1:10 的比例与新鲜淋巴细胞共培养 10 d 后,淋巴细胞被携带抗原的成熟 DCs 活化为 IECs。流式检测特异性 IECs 亚群,调整细胞浓度 10⁶/mL,加入 CD3-APC、CD4-FITC、CD8-PE,避光孵育 30 min,上

机检测。

1.2.4 特异性 IECs 输注 收集活化的 IECs,用生理盐水制成单细胞悬液,由阴茎背静脉注入小鼠(IEC 组)体内,注射细胞量为每只 10⁶/0.5 mL,生理盐水(NS)组注射等量 NS。

1.2.5 生化自动分析仪检测肝功能。

1.2.6 实时荧光定量 PCR 检测 HBV DNA 水平 按试剂盒说明书操作。

1.2.7 流式细胞仪检测 T 细胞亚群变化 取小鼠胸腺淋巴细胞,检测 CD3/CD4/CD8 的比例。

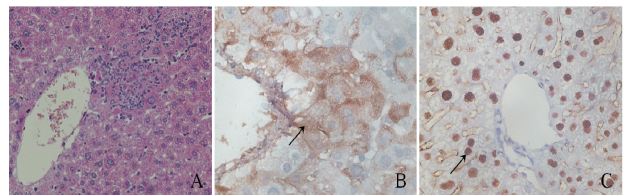
1.2.8 ELISA 检测血清中 IFN- γ 及 IL-4 的表达水平 具体按说明书进行。

1.2.9 肝脏病理学及免疫组织化学(IHC)分析 取小鼠肝脏,经固定、石蜡包埋、切片及苏木精-伊红(HE)染色,光镜观察肝组织病理学改变;IHC:取小鼠肝脏切片,脱蜡、水化、抗原修复,封闭、一抗、二抗孵育,显色、苏木素染色、分化、脱水、透明、封片,观察肝脏中 HBsAg、HBcAg 表达情况。免疫组化半定量判定方法见文献[6]。

1.3 统计学处理 采用 SPSS23.0 软件分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 *t* 检验,*P* < 0.05 为差异具有统计学意义。采用 GraphPad Prism5.0 软件制图。

2 结果

2.1 验证转基因小鼠 随机抽取 10 只 HBV 转基因 Balb/c 小鼠,检测血清 HBV DNA 为 (2 953 ± 953) IU/mL, IHC 检测肝内 HBsAg、HBcAg 阳性,肝内 cccDNA 阴性;肾功能正常;肝功能异常:白蛋白(ALB)为 (27.80 ± 2.31) g/L,丙氨酸转氨酶(ALT)为 (5256 ± 145) U/L,天门冬氨酸氨基转移酶(AST)为 (203.73 ± 32.93) U/L;病理学显示:肝细胞水肿及坏死,炎细胞浸润(图 1)。



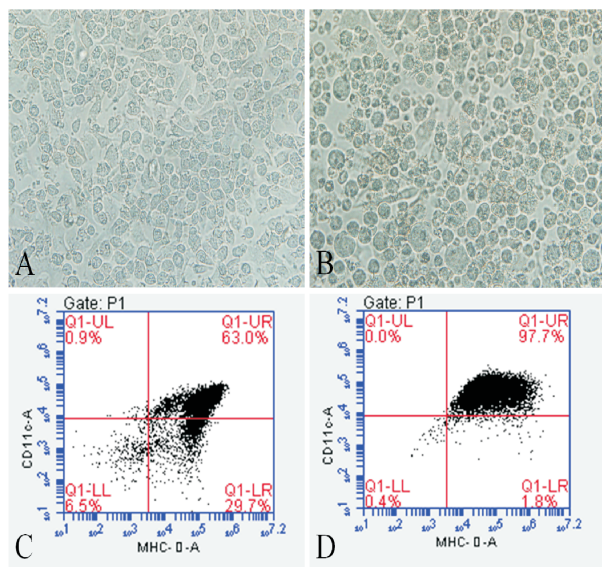
A: HE 染色 (×200); B: HBsAg 表达 (IHC, ×400); C: HBcAg 表达 (IHC, ×400); 箭头所指为阳性表达区域

图 1 HBV 转基因 Balb/c 小鼠肝脏组织学表现及 HBV 抗原表达
Fig 1 The histological changes and HBV antigen expression of liver

2.2 特异性 IECs 的制备与鉴定

2.2.1 成熟 DCs 的分离、培养及鉴定 镜下观察未成熟 DCs 为半贴壁状态,细胞表面突起较少或无突起;成熟 DCs 由半贴壁变为悬浮状态,细胞表面向

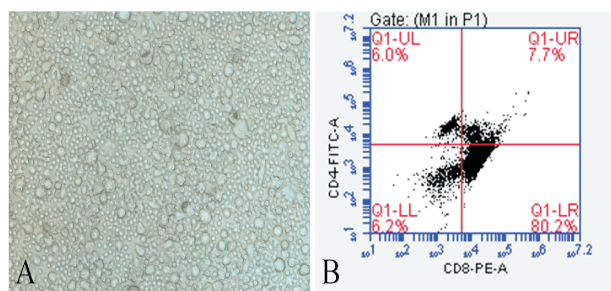
各个方面伸出较多不同形状、大小不一的突起,具有典型 DCs 的特征。流式结果表明:未成熟 DCs, $CD11c^+ MHC-II^+$ 表达率低,为 63.0% 左右,成熟 DCs, $CD11c^+ MHC-II^+$ 高表达为 97.7% (图 2)。



A: 未成熟 DCs 形态($\times 400$); B: 负载抗原的成熟 DCs($\times 400$); C: 未成熟 DCs 鉴定, $CD11c^+ MHC-II^+$ 表达; D: 成熟 DCs 鉴定, $CD11c^+ MHC-II^+$ 表达
图 2 DCs 形态及表面标志鉴定

Fig 2 Morphology of DCs and detection of surface markers on DCs

2.2.2 特异性 IECs 状态及流式鉴定 镜下观察与成熟 DCs 共培养的淋巴细胞状态较好, 检测 IECs 主要以 $CD8^+ T$ 细胞为主, 阳性率可达 80.2% (图 3)。



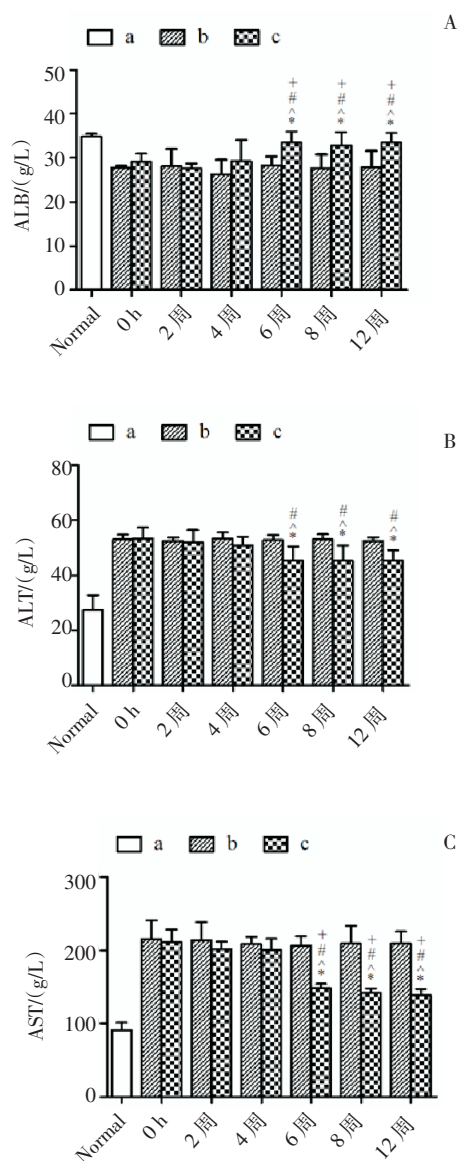
A: HBV 特异性 IECs 形态($\times 400$); B: IECs 鉴定, $CD4^+$ 、 $CD8^+$ 表达
图 3 HBV 特异性 IECs 形态及表面标志鉴定

Fig 3 Morphology of HBV specific IECs and detection of surface markers on IECs

2.3 特异性 IECs 对小鼠肝功能及病理学的影响

2.3.1 肝功能 ALB: NS 组各时间点比较无显著差异; IEC 组于 6、8 周及 12 周时较 NS 组差异有统计学意义($P < 0.05$), 随着时间的延长, ALB 于 6 周有升高趋势, 呈时间依赖性, 差异有统计学意义($F = 4.08$, $P < 0.01$)。ALT: NS 组各时间点比较无显著差异; IEC 组于 6、8 周及 12 周时较 NS 组比较差异有统计学

意义($P < 0.05$), 随着时间的延长, ALT 于 6 周有下降趋势, 呈时间依赖性, 差异有统计学意义($F = 3.55$, $P < 0.05$)。AST: NS 组各时间点比较无显著差异; IEC 组于 6、8 周及 12 周时较 NS 组比较差异有统计学意义($P < 0.01$), 随着时间的延长, AST 于 6 周有下降趋势, 呈时间依赖性, 差异有统计学意义($F = 42.73$, $P < 0.01$), 见图 4。



A: ALB; B: ALT; C: AST; a: 正常 BalB/c 小鼠; b: NS 组; c: IEC 组;
* $P < 0.05$ vs NS 组; * $P < 0.05$ vs 0 h; * $P < 0.05$ vs 2 周; * $P < 0.05$ vs 4 周

图 4 各组肝功能指标水平

Fig 4 The levels of liver function indexes

2.3.2 特异性 IECs 对小鼠肝脏病理学的影响 NS 组可见肝细胞水肿及肝细胞坏死, 汇管区有大量炎性细胞浸润, IECs 组于 6 周时肝病理学得到改善, 肝细胞水肿轻微, 少量炎性细胞浸润 (图 5)。

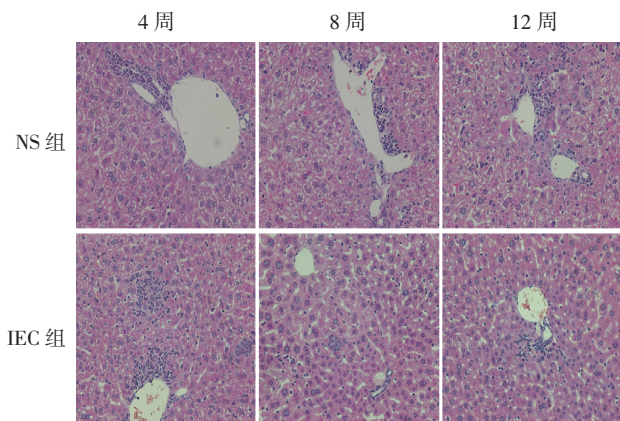


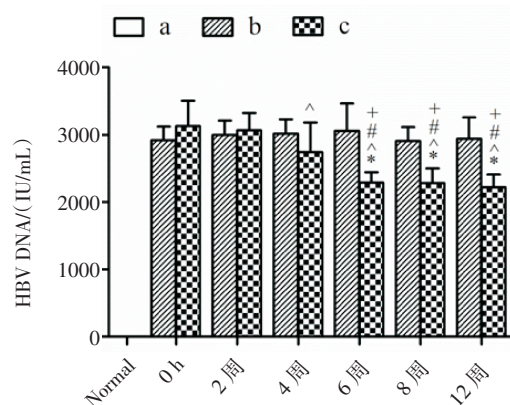
图5 肝脏病理学表现(HE×200)

Fig 5 The pathological changes of liver (HE×200)

2.4 特异性 IECs 对小鼠体内 HBV 复制的影响

2.4.1 特异性 IECs 对转基因小鼠 HBV DNA 水平的影响 IEC 组于 6、8 周及 12 周时较 NS 组差异有统计学意义($P<0.05$),各时间点比较差异有统计学意义($F=10.09, P<0.01$),随着时间的延长,HBV DNA 有

降低趋势,于 6 周下降明显,呈时间依赖性(图 6)。

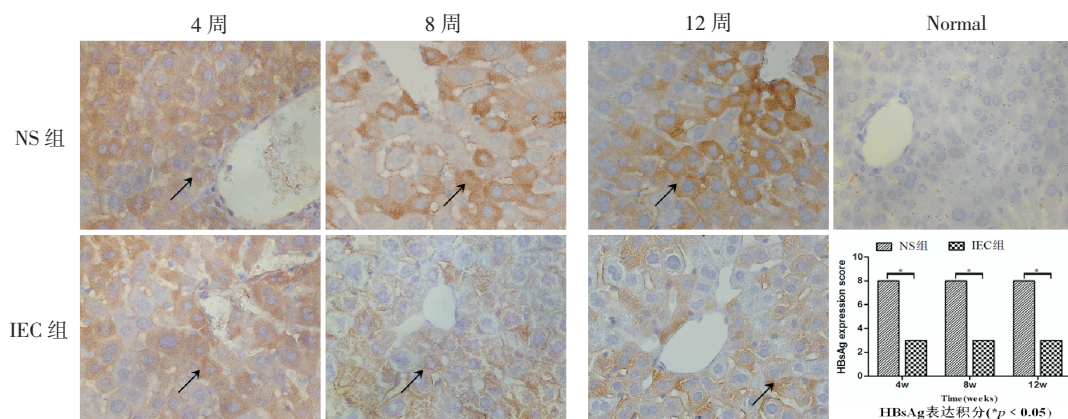


a: 正常 BalB/c 小鼠;b: NS 组;c: IEC 组;* $P<0.05$ vs NS 组;^ $P<0.05$ vs 0 h;# $P<0.05$ vs 2 周;+ $P<0.05$ vs 4 周

图6 各组 HBV DNA 水平

Fig 6 The levels of HBV DNA

2.4.2 HBsAg 表达水平 NS 组各时间点 HBsAg 表达水平无显著差异,IEC 组随着时间延长,HBsAg 表达积分减低,HBsAg 表达水平降低(图 7)。



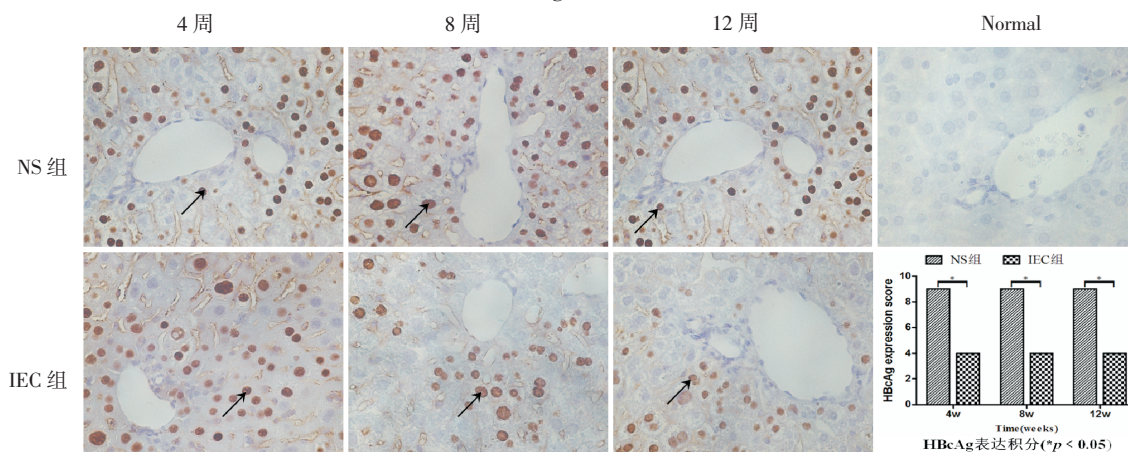
箭头所指为阳性表达区域

图7 肝组织 HBsAg 表达水平(IHC×400)

Fig 7 The levels of HBsAg expression in liver (IHC×400)

2.4.3 HBcAg 表达水平 NS 组各时间点 HBcAg 表达水平无显著差异,IEC 组随着时间延长,HBcAg

表达积分减低,HBcAg 表达水平降低($P<0.05$),见图 8。



箭头所指为阳性表达区域

图8 肝组织 HBcAg 表达水平(IHC×400)

Fig 8 The levels of HBcAg expression in liver (IHC×400)

2.5 特异性 IECs 对小鼠淋巴细胞亚群的影响 随着时间的延长, IEC 组于 4 周时, CD4⁺T、CD8⁺T 细胞

的比例均有所升高, 与 NS 组比较差异有统计学意义($P < 0.05$), 见图 9。

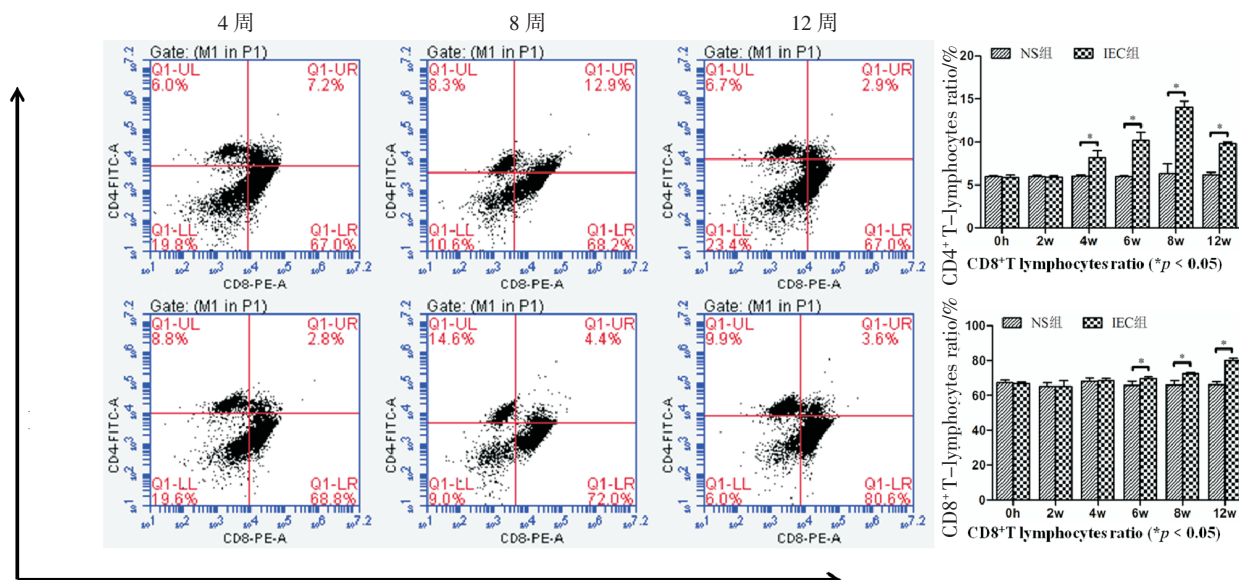
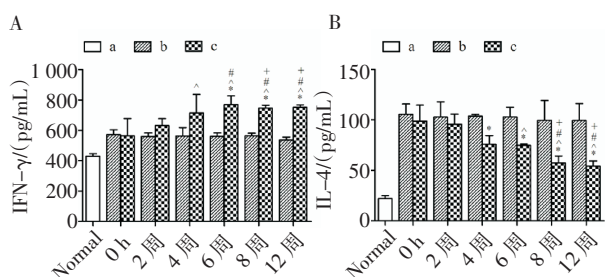


图 9 T 细胞亚群变化

Fig 9 T-lymphocyte subsets changes

2.6 特异性 IECs 对小鼠体内细胞因子水平的作用 IFN- γ 水平变化: NS 组各时间点比较 IFN- γ 水平无显著差异; IEC 组各时间点比较差异有统计学意义 ($F=6.56, P < 0.01$), 随着时间的延长, 总体 IFN- γ 分泌水平有升高趋势; IL-4 水平变化: NS 组各时间点比较 IL-4 水平无显著差异, IEC 组各时间点比较差异有统计学意义 ($F=6.52, P < 0.01$), 随着时间的延长, 总体 IL-4 分泌水平呈下降趋势(图 10)。

成为成熟 DCs, 与淋巴细胞混合反应, 可活化 T 细胞, 刺激 T 细胞增殖, 启动 T 细胞反应^[2,9]。HBV 特异性免疫疗法的目的是将慢性乙型肝炎患者体内的特异性免疫应答有效地调动起来, 达到治愈乙型肝炎的效果。因此我们将以 CD8⁺T 细胞为主的自体 HBV 特异性 IECs 输入小鼠体内, 通过一系列检测, 验证特异性 IECs 对改善 HBV 转基因小鼠体内的免疫反应所发挥的作用。



A: IFN- γ 水平; B: IL-4 水平; a: 正常 BalB/c 小鼠; b: NS 组; c: IEC 组; * $P < 0.05$ vs NS 组; # $P < 0.05$ vs 0 h 组; * $P < 0.05$ vs 2 周组; * $P < 0.05$ vs 4 周组

图 10 各组细胞因子分泌水平

Fig 10 The levels of cytokines expression

3 讨论

DCs 是最有效的抗原提呈细胞, 可诱导初始免疫、活化 T 淋巴细胞, 是联系固有免疫和适应性免疫的重要枢纽^[8]。骨髓源及外周血单核细胞可经 GM-CSF 和 IL-4 体外诱导为 DCs, DCs 摄取抗原后

本研究体外刺激活化得到的自体 IECs 输注 HBV 小鼠体内, 结果显示 IEC 组 ALB 出现升高, ALT、AST 下降趋势, 与 NS 组比较有统计学差异。表明 IECs 对小鼠肝功能有改善作用, 不会造成肝细胞严重损伤^[10]。通过检测 HBV 小鼠体内的 HBV DNA 表达水平以及 IHC 分析肝组织中 HBsAg、HBcAg 的表达水平, 发现 IEC 组于输注 IECs 6 周后有明显降低趋势, 与 NS 组比较有统计学差异, 说明该种特异性 IECs 可随时间延长抑制体内 HBV 复制。

研究发现慢性乙型肝炎患者体内的 CD4⁺T、CD8⁺T 细胞在肝组织中表达水平的变化趋势在一定程度上反映了各期肝脏的免疫状态^[11]。乙型肝炎患者体内细胞毒性 T 细胞 (cytotoxic T lymphocyte, CTL) 介导的细胞免疫是清除 HBV 的主要机制, 但 HBV 慢性感染者体内 CTL 应答往往是低下甚至缺如^[12-13]。本实验检测 NS 组 HBV 小鼠体内 CD4⁺T、CD8⁺T 细胞的比例均较低, 而 IECs 作用后小鼠体内

CD4⁺T、CD8⁺T 细胞的比例均有升高趋势,且有统计学差异。推测这种 IECs 增强细胞免疫反应是通过提高体内 CD8⁺T 细胞增殖来发挥作用的。CD8⁺T 细胞主要是一类具有杀伤活性的效应细胞即 CTL,通过细胞毒及非细胞毒途径发挥抗 HBV 的作用,非细胞毒途径主要通过分泌 IFN- γ 、TNF- α 等清除细胞内的 HBV 而不杀伤肝细胞^[14-15]。检测小鼠体内细胞因子的变化,发现 IEC 组 IFN- γ 分泌水平于 4 周时开始升高,较 NS 组有统计学差异,这与 CTL 通过分泌 IFN- γ 的非细胞毒途径清除体内 HBV 的论证相符合^[14,16]。由于结果显示 IEC 组小鼠肝功表现较 NS 组有改善,病理显示未见严重的肝细胞损伤,且 IEC 组 HBV DNA 有下降趋势较 NS 组差异有统计学意义,我们考虑 IECs 在体内主要通过非细胞毒途径发挥抗 HBV 的作用。

Th1、Th2 属于 CD4⁺辅助性 T 细胞,Th1 产生 IFN- γ 、IL-2 和 TNF- β ,并促进细胞免疫,Th1 细胞因子在慢性炎症及自身免疫疾病中发挥重要作用;Th2 分泌 IL-4、IL-5、IL-6、IL-10 和 IL-13,促进体液免疫、变态反应以及抵抗蠕虫感染^[17-18]。Th1、Th2 在乙肝慢性化的发生和持续中占有重要地位,HBV 特异性 Th1 占优势,与 HBV 急性感染和自限性感染有关,Th2 占优势与 HBV 持续感染有关^[19]。慢性乙肝患者体内 IFN- γ 水平较低而 IL-4 水平较高,高水平 IL-4 可抑制慢性 HBV 感染者 CTL 的功能,导致抗病毒反应低下^[20]。本研究结果发现 IECs 作用后,小鼠体内 IFN- γ 水平升高,并伴随 IL-4 降低,与 NS 组比较有统计学差异。与 HBV 感染慢性化时 IFN- γ 和 IL-4 水平的关系相反,充分说明 IECs 在小鼠体内通过分泌 IFN- γ 的非细胞毒作用抗病毒。Th1 分泌的 IFN- γ 可促进 CTL 增殖^[21-22],小鼠体内淋巴细胞亚群的变化也说明 IECs 输注后 CTL 出现增殖,并通过分泌 IFN- γ 发挥抗病毒作用,这种 Th1、Th2 样细胞因子与 CD8⁺T 细胞的作用是相辅相成的。

IECs 通过分泌细胞因子(IFN- γ 、TNF- α)途径发挥抗病毒的作用,这些因子通过作用于肝细胞,使肝细胞应答细胞因子诱导的信号和激活特定的细胞内信号转导途径清除受感染细胞内的 HBV,而且这些细胞因子还可通过上调抗原提呈、促进受感染细胞抗原暴露的作用来调节免疫效应细胞的诱导、增殖、归巢及其功能^[23-24]。本研究发现随着时间延长,小鼠体内 CD8⁺T 比例增高且伴有 IFN- γ 分泌增多,HBV DNA 水平明显降低,HBsAg 和 HBeAg 表达明显减少,证实了非细胞毒性的细胞因子途径

发挥抑制 HBV 复制的作用^[23,25]。

综上所述,体外诱导的 HBV 特异性 IECs 可以对转 HBV 基因小鼠体内 HBV 的复制有抑制作用,并同时可以减轻肝细胞损伤,进一步证明相关细胞因子参与其作用,但是否有其它途径参与这种抗病毒作用有待我们进一步深入研究。

参考文献:

- [1] Wang L, Qiu J, Yu L, et al. Increased numbers of CD5⁺CD19⁺CD1dhighIL-10⁺ Bregs, CD4⁺Foxp3⁺ Tregs, CD4⁺CXCR5⁺Foxp3⁺ follicular regulatory T (TFR) cells in CHB or CHC patients[J]. J Transl Med, 2014, 12: 251
- [2] Schraml B U, Reise Sousa C. Defining dendritic cells[J]. Curr Opin Immunol, 2015, 32: 13
- [3] Chung C Y, Ysebaert D, Berneman Z N, et al. Dendritic cells: cellular mediators for immunological tolerance[J]. Clin Dev Immunol, 2013, 2013: 972865
- [4] 李国用,陈敏,张大志,等.自体树突状细胞疫苗治疗慢性乙型肝炎的临床研究[J].中华肝脏病杂志,2003,11(4):206
- [5] Shen Z, Zheng W, Liu T, et al. Effects of dendritic cells from hepatitis B virus transgenic mice -stimulated autologous lymphocytes on hepatitis B virus replication: a study on the impact of specific sensitized effector cells on in vitro virus replication[J]. Viral Immunol, 2015, 28(2): 85
- [6] Mochizuki K, Hayashi N, Hiramatsu N, et al. Fas antigen expression in liver tissues of patients with chronic hepatitis B[J]. J Hepatol, 1996, 24(1): 1
- [7] 刘光泽,熊一力,王洪敏,等.近交系高表达 HBV 转基因小鼠的建立及表达遗传稳定性[J].中国兽医学报,2003,23(6):580
- [8] Steinman R M. Decisions about dendritic cells: past, present, and future[J]. Annu Rev Immunol, 2012, 30: 1
- [9] Isotani M, Katsuma K, Tamura K, et al. Efficient Generation of canine bone marrow-derived dendritic cells[J]. J Vet Med Sci, 2006, 68(8): 809
- [10] Krebs K, Böttinger N, Huang L R, et al. T cells expressing a chimeric antigen receptor that binds hepatitis B virus envelope proteins control virus replication in mice[J]. Gastroenterology, 2013, 145(2): 456
- [11] 程婷婷,王凤梅,朱争艳,等.HBV 慢性感染者肝脏组织中 CD4⁺T、CD8⁺T 和 FoxP3⁺Tregs 细胞的表达水平[J].天津医科大学学报,2016,22(2):129
- [12] Ferrari C. HBV and the immune response[J]. Liver International, 2015, 35(1, SI): 121
- [13] Kong X, Sun R, Chen Y, et al. γ 8T cells drive myeloid-derived suppressor cell-mediated CD8⁺T cell exhaustion in hepatitis B virus-induced immunotolerance[J]. J Immunol, 2014, 193(4): 1645
- [14] Balmasova I P, Yushchuk N D, Mynbaev O A, et al. Immunopathogenesis of chronic hepatitis B[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(39): 14156
- [15] Grimm D, Heeg M, Thimme R. Hepatitis B virus: from immunobiology to immunotherapy[J]. Clin Sci (Lond), 2013, 124(2): 77
- [16] Komatsu H. Hepatitis B virus: where do we stand and what is the

(下转第 31 页)

pGL3-basic 中,与海肾荧光素酶报告基因载体 pRL-TK 共转染至细胞中。其中以 pRL-TK 为内对照使测试不被实验条件变化所干扰。应用此方法,可以减少内在的变化因素所降低的实验准确性。

参考文献:

- [1] 王清,刘倩,张学梅. P-糖蛋白及其逆转肿瘤细胞多药耐药性的研究进展[J]. 中国执业药师, 2013, 10(3): 33
- [2] Binkha Thlan Z, Lavasa NIFAR A. P-glycoprotein inhibition as a therapeutic approach for overcoming multidrug resistance in cancer: current status and future perspectives[J]. Curr Cancer Drug Targets, 2013, 13(3): 326
- [3] Wang X M, Li L, Cui Q, et al. Quantitative detection of peripheral MDR genes in breast cancer before chemotherapy and their clinical significances[J]. Chinese-German J Clin Oncol, 2008, 11(7): 641
- [4] 王向玲,纪春岩,马道新,等. MDR1 启动子驱动的 CD-TK 双自杀基因载体对耐药 K562 细胞的体外靶向杀伤作用[J]. 中华血液学杂志, 2006, 27(11): 757
- [5] 王波,王志云,王成伟,等. MDR1 启动子调控的双自杀基因靶向杀伤耐药胶质瘤细胞的研究[J]. 山东大学学报, 2008, 46(1): 15
- [6] Labialle S, Gayet L, Marthinet E, et al. Transcriptional regulators of the human multidrug resistance 1 gene, recent views[J]. Biochem Pharmacol, 2002, 64(5/6): 943
- [7] 贺赛,孙学军,郑见宝,等. hTERT, CEA 及 CMV 启动子在人结肠癌细胞株中的转录活性比较[J]. 中国普通外科杂志, 2014, 23(1): 78
- [8] 林燕真,程通,张雅丽,等. 肿瘤细胞特异启动子 hTERT 介导的靶向 MDR1 基因的 RNAi 用于逆转卵巢癌细胞 MDR 的研究[J]. 中国医学创新, 2015, 12(34): 9
- [9] Ogretmen B, Ahmad R S. Negative regulation of MDR1 promoter activity in MCF-7, but not in multidrug resistant MCF-7/Adr, cells by cross-coupled NF-kappa B/p65 and c-Fos transcription factors and their interaction with the CAAT region [J]. Biochemistry, 1999, 38(7): 2189
- [10] 李长龙,萨晓婴. MDR1 基因单靶点双荧光素酶报告基因系统的建立[J]. 中国比较医学杂志, 2008, 18(9): 28
- [11] Tesshi Y, Asako S T, Yasuyoshi N, et al. Transactivation of the multidrug resistance 1 gene by T-cell factor 4/beta-catenin complex in early colorectal carcinogenesis[J]. Cancer Res. 2000, 60(17): 4761
- [12] 李海平,高波,余宗涛. MDR1 基因的表达与肝癌生物学行为指标的关系[J]. 现代肿瘤医学, 2013, 21(1): 129
- [13] 况守龙,胡廷章. 启动子的克隆和研究方法[J]. 重庆工学院学报, 2007, 21(1): 136
- [14] Greer L F 3rd, Szalay A A. Imaging of light emission from the expression of luciferases in living cells and organisms: a review[J]. Luminescence, 2002, 17(1): 43
- [15] 吴胜昔,陈永文,朱广倍,等. B7-H1 启动子荧光素酶报告基因载体的构建及活性检测[J]. 基础医学与临床, 2014, 34(7): 957

(2016-04-19 收稿)

(上接第 16 页)

- next step for eradication[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(27): 8998
- [17] Piao R L, Liu Y, Tian D, et al. Adefovirdipivoxil modulates cytokine expression in Th1/Th2 cells in patients with chronic hepatitis B[J]. Mol Med Rep, 2012, 5(1): 184
- [18] Zhang Y, Zhang Y, Gu W, et al. Erratum to: Th1/Th2 cell differentiation and molecular signals[J]. Adv Exp Med Biol, 2014, 841: E1
- [19] Milich D R. Influence of T-helper cell subsets and crossregulation in hepatitis B virus infection[J]. J Viral Hepat, 1997, 4(Suppl 2): 48
- [20] Bertolotti A, D'elios M, Boni C, et al. Different cytokine profiles of intraphepatic T cells in chronic hepatitis B and hepatitis C virus infections[J]. Gastroenterology, 1997, 112(1): 193
- [21] Maini M K, Boni C, Lee C K, et al. The role of virus-specific CD8(+) cells in liver damage and viral control during persistent hepatitis B virus infection[J]. J Exp Med, 2000, 191(8): 1269
- [22] Bertolotti A, Maini M K. Protection or damage: a dual role for the virus-specific cytotoxic T lymphocyte response in hepatitis B and C infection[J]. Curr Opin Microbiol, 2000, 3(4): 387
- [23] Li X, Liu X, Tian L, et al. Cytokine-Mediated immunopathogenesis of hepatitis B virus infections[J]. Clin Rev Allergy Immunol, 2016, 50(1): 41
- [24] Guidotti L, Chisari F. Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response[J]. Annu Rev Immunol, 2001, 19: 65
- [25] Guidotti L, Ando K, Hobbs M, et al. Cytotoxic T lymphocytes inhibit hepatitis B virus gene expression by a noncytolytic mechanism in transgenic mice[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994, 91(9): 3764

(2016-06-29 收稿)