

慢性乙型肝炎病毒感染患者外周血特异性 CD8⁺T 淋巴细胞检测的临床意义^{*}

吴月平¹, 张红春², 韩 刚^{1△}, 沈张平², 宋健辉², 季沈杰², 陈 琳¹ (1. 江苏省南通市第三人民医院 226006; 2. 江苏省启东市人民医院 226200)

【摘要】 目的 研究慢性乙型肝炎病毒(HBV)感染患者外周血特异性 CD8⁺T 淋巴细胞(CTL)频率的变化及临床价值。**方法** 采用乙型肝炎病毒核心抗原(HBcAg)18-27 表位肽-人类白细胞抗原(HLA)-A * 0201 五聚体及 CD8 单克隆抗体,设计流式细胞技术检测 HLA-A₂⁺ 6 例、HLA-A₂⁻ 12 例非 HBV 感染者、HLA-A₂⁺ 49 例和 HLA-A₂⁻ 42 例 HBV 感染者外周血中针对该肽段的特异性 CTL 数量,占总计数 CD8⁺ 细胞数百分比表示。**结果** HLA-A₂⁻ HBV 感染未抗病毒治疗者特异性 CTL (0.30%~14.40%, 中位数 1.13%, $n=20$) 与 HLA-A₂⁻ 非 HBV 感染者 (0.33%~3.90%, 中位数 1.04%, $n=12$), 差异无统计学意义 ($P>0.05$), 但显著低于 HLA-A₂⁻ 抗病毒治疗者 (0.25%~20.30%, 中位数 2.11%, $n=22$, $P<0.05$); HLA-A₂⁻ 抗病毒治疗者特异性 CTL 和 HLA-A₂⁺ 未抗病毒治疗者特异性 CTL (0.20%~29.90%, 中位数 2.22%, $n=20$) 均显著高于 HLA-A₂⁻ 非 HBV 感染者 ($P<0.01$); HLA-A₂⁺ 抗病毒治疗者特异性 CTL (0.14%~39.22%, 中位数 1.33%, $n=29$) 显著高于 HLA-A₂⁻ 非 HBV 感染者 ($P<0.05$)。HLA-A₂⁺ 未抗病毒组中血清 HBV DNA $<10^3$ copy/mL、丙氨酸氨基转移酶小于 40 U/L 者特异性 CTL 频率增高 ($P<0.05, 0.01$)。**结论** HBV 抗原肽-HLA-A * 0201 五聚体流式细胞技术能在体外直接检测外周血 HBV 特异性 CTL 频率的变化,其水平一定程度反映不同临床感染状态慢性 HBV 感染患者 T 淋巴细胞对特异性抗原表位免疫应答的差异。

【关键词】 人类白细胞抗原-A2 抗原; 主要组织相容性复合物-五聚体; CD8⁺T 淋巴细胞; 流式细胞术
DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2013.19.002 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2013)19-2499-04

Significance of circulating specific CD8⁺ T cells detection in chronic hepatitis B patients^{*} WU Yue-ping¹, ZHANG Hong-chun², HAN Gang¹, SHEN Zhang-ping², SONG Jian-hui², JI Shen-jie², CHEN Lin¹ (1. the Third People's Hospital of Nantong, Nantong, Jiangsu 226006, China; 2. People's Hospital of Qidong, Qidong, Jiangsu 226200, China)

【Abstract】 Objective To investigate frequency change of peripheral blood specific CD8⁺ T lymphocytes (CTL) in patients with chronic HBV infection and to evaluate its clinical value. **Methods** Total of 109 patients were enrolled, including 6 cases of HLA-A₂⁺, 12 cases of HLA-A₂⁻ without HBV infection, 49 cases of HLA-A₂⁺ and 42 cases of HLA-A₂⁻ with HBV infection. HBcAg 18-27 epitope peptide- HLA-A * 0201 pentamers and CD8 monoclonal antibody were designed to detect the number of specific CTL in peripheral blood by using flow cytometry. **Results** The detected result of specific CTL in HLA-A₂⁻ HBV-infected patients with no antiviral treatment (0.30%~14.40%, median 1.13%, $n=20$) was not statistically different with HLA-A₂⁻ non-HBV infected patients (0.33%~3.90%, median 1.04%, $n=12$, $P>0.05$), but was significantly lower than HLA-A₂⁻ HBV-infected patients with antiviral treatment (0.25%~20.30%, median 2.11%, $n=22$, $P<0.05$). The specific CTL both in HLA-A₂⁻ HBV-infected patients with antiviral treatment and HLA-A₂⁺ HBV-infected patients with no antiviral treatment (0.20%~29.90%, median 2.22%, $n=20$) were significantly higher than control group ($P<0.01$). The detected result of specific CTL in HLA-A₂⁺ HBV-infected patients with antiviral treatment (0.14%~39.22%, median 1.33%, $n=29$) was significantly higher than control group ($P<0.05$). The number of specific CTL was increased in HLA-A₂⁺ without antiviral therapy patients with serum HBV DNA less than 10^3 copy/mL and ALT less than 40 IU/L ($P<0.05, P<0.01$). **Conclusion** HBV antigen peptide- HLA-A * 0201 pentamers could directly detect the frequency change of peripheral blood specific CTL by using flow cytometry, and its level could reflect differences in epitope specificity of the immune response of T lymphocytes in patients with different clinical status of chronic HBV infection.

【Key words】 HLA-A2 antigen; MHC-pentamers; CD8⁺ T lymphocytes; flow cytometry

乙型肝炎病毒(HBV)的发病机制主要是机体清除 HBV 而引发的细胞免疫病理改变,而 T 辅助细胞、细胞毒性 T 细胞免疫机制可能是乙型肝炎发病机制的中心环节;特异性 CD8⁺T 淋巴细胞(CTL)活化以及生物学效应都严格受人类白细胞抗原-1(HLA-I)限制,不同 HLA-I 等位型个体可以有不同的

抗原表位。作者采用的表位肽是针对 HLA-A * 0201 等位型个体(与 HLA-A2 相同),在四聚体基础上改进的主要组织相容性复合物(MHC)五聚体(pentamers)结合流式细胞技术定量分析不同临床感染状态慢性 HBV 患者外周血抗原特异性 CTL,探讨其临床应用价值。

^{*} 基金项目:江苏省南通市科委课题(S9923, HS2013018);江苏省中医药局科技项目(IB11028)。 △ 通讯作者, E-mail: ntsytw@163.com。

1 资料与方法

1.1 一般资料 48 例慢性乙型肝炎(CHB)、31 例肝硬化(LC)、12 例原发性肝癌(PHC)为 2011 年 9 月至 2012 年 5 月南通市第三人民医院住院患者,其中男 55 例、女 36 例,年龄 17~86 岁,诊断符合 2000 年第十次全国病毒性肝炎及肝病学术会议修订的病毒性肝炎诊断标准。所有患者均排除甲、丙、丁、戊型肝炎病毒以及巨细胞病毒(CMV)、EB 病毒、人类免疫缺陷病毒(HIV)感染,无自身免疫性疾病,无嗜酒史,无肝毒性药物使用史。其中 51 例进行核苷类药物抗病毒治疗(单用拉米夫定 13 例、阿德福韦酯 10 例、恩替卡韦 10 例、替比夫定 2 例、16 例序贯治疗或联合治疗)。以 18 例手足口病、妊娠肝损害、酒精性肝炎、丙型肝炎、戊型肝炎等非 HBV 感染者作对照。

1.2 主要试剂及来源 异硫氰酸荧光素(FITC)结合鼠抗人 HLA-A2 单克隆抗体、FITC 结合的鼠抗人 CD8 单克隆抗体、溶血素购自 BD Pharmingen 公司,HLA-A * 0201 限制 HBV 抗原表位肽-五聚体复合体(Pro5™ MHC Prenamers)购自英国 Proimmune 公司,所含 HBV 抗原表位肽为 HBcAg 18-27,序列为 FLPSDFFPSV。

1.3 方法

1.3.1 HLA-A2 等位型的鉴定 采用流式细胞术,所有研究对象取 100 μL 肝素钠抗凝新鲜全血,加入检测管和对照管,分别加入 HLA-A2 单克隆抗体及同型对照 10 μL,16~27 ℃,避光放置 30 min,经溶血,用含 5 g/L 牛血清清蛋白、0.5 g/L 叠氮钠、0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤,用于流式细胞仪检测,每份样本均设阴性对照。

1.3.2 五聚体和 CD8 染色 所有研究对象分设双阴性对照管、五聚体阴性和 CD8 阳性对照管、五聚体和 CD8 双阳性检测管,每管取新鲜肝素钠抗凝全血 100 μL,加入 1 μL MHC-五聚体和 10 μL CD8 单克隆抗体以及相应的同型对照混匀,避光冰上孵育 30 min,加 2 mL 1×溶血素(FACS)裂解液置室温 10 min,待细胞悬液变成真性溶液后,用含 5 g/L 牛血清清蛋白、0.5 g/L 叠氮钠、0.01 mol/L PBS 洗涤 2 次。10 g/L 多聚甲醛固定,用于流式细胞仪检测。

1.3.3 流式细胞仪检测抗原特异性 CTL 采用贝克曼库尔特 EPICS XL-4 流式细胞仪。数据分析采用 XL-SYSTEM II 数据分析软件进行。以淋巴细胞设门,计数 20 000 个 CD8 阳性细胞。同时计数 CD8 和 Pentamers 双阳性细胞为 HBV 特异性的 CTL 细胞。特异性 CTL 细胞的阳性率(%) (Pentamers) = 五聚体⁺CD8⁺/CD8⁺ × 100%。

1.4 统计学处理 采用 SPSS10.0 统计软件中的相关方法,实验结果以中位数(全距)表示,组间资料显著性分析采用秩和检验^[1-2]。

2 结 果

2.1 HLA-A2 等位型鉴定 18 例非 HBV 感染者中 6 例

HLA-A₂⁺、12 例 HLA-A₂⁻。48 例 CHB 中 24 例 HLA-A₂⁺、24 例 HLA-A₂⁻;31 例 LC 中 18 例 HLA-A₂⁺、13 例 HLA-A₂⁻;12 例 PHC 中 7 例 HLA-A₂⁺、5 例 HLA-A₂⁻;不同临床感染状态慢性 HBV 感染者中 HLA-A₂⁺ 比例占 53.8% (49/91)。

2.2 特异性 CTL 与抗病毒治疗、血清 HBV DNA、丙氨酸氨基转移酶(ALT)的关系

2.2.1 慢性 HBV 感染患者外周血特异性 CTL 频率与抗病毒的关系 非 HBV 感染 HLA-A₂⁻ 者特异性 CTL 中位数与 HLA-A₂⁺ 者差异无统计学意义($P>0.05$),以 HLA-A₂⁻ 非 HBV 感染者作为本研究对照组。HLA-A₂⁻ 未抗病毒治疗者特异性 CTL 中位数与 HLA-A₂⁻ 对照组间差异无统计学意义($P>0.05$),HLA-A₂⁺ 抗病毒治疗者特异性 CTL 显著高于对照组($P<0.05$),HLA-A₂⁺ 未抗病毒治疗者和 HLA-A₂⁻ 抗病毒治疗者特异性 CTL 均显著高于对照组($P<0.01$,表 1)。HLA-A₂⁺ 抗病毒治疗者与 HLA-A₂⁺ 未抗病毒治疗者间特异性 CTL 中位数差异无统计学意义($P>0.05$),而 HLA-A₂⁻ 抗病毒治疗者特异性 CTL 中位数显著高于 HLA-A₂⁻ 未抗病毒治疗者($P<0.05$)。

表 1 慢性 HBV 感染患者外周血特异性 CTL 频率与抗病毒的关系

组别	HLA-A ₂ ⁻			HLA-A ₂ ⁺		
	全距%	中位数	<i>n</i>	全距%	中位数	<i>n</i>
抗病毒治疗	0.25~20.30	2.11 ^{ad}	22	0.14~39.22	1.33 ^b	29
未抗病毒治疗	0.30~14.40	1.13 ^c	20	0.20~29.90	2.22 ^a	20
非 HBV 感染者	0.33~3.90	1.04	12	0.29~3.30	1.43 ^c	6

注:与 HLA-A2 非 HBV 感染者比较,^a $P<0.01$,^b $P<0.05$,^c $P>0.05$;与 HLA-A₂⁻ 未抗病毒治疗比较,^d $P<0.05$ 。

2.2.2 外周血特异性 CTL 中位数与血清 HBV DNA 的关系 血清 HBV DNA<10³ copy/mL HLA-A₂⁻、HLA-A₂⁺ 抗病毒治疗者特异性 CTL 中位数均高于 HBV DNA 为 10³~10⁵ copy/mL、>10⁵ copy/mL 者,但差异无统计学意义($P>0.05$)。HLA-A₂⁻ 未抗病毒治疗者特异性 CTL 中位数组间差异无统计学意义;HLA-A₂⁺ 未抗病毒治疗者特异性 CTL 中位数有增高趋势,且后两者间差异有统计学意义($P<0.05$,表 2)。

2.2.3 外周血特异性 CTL 中位数与血清 ALT 的关系 HLA-A₂⁻、HLA-A₂⁺ 抗病毒治疗者特异性 CTL 中位数随 ALT 水平降低,特异性 CTL 中位数有增高趋势,但差异无统计学意义。HLA-A₂⁻ 未抗病毒治疗者特异性 CTL 中位数组间差异无统计学意义;HLA-A₂⁺ 未抗病毒治疗者特异性 CTL 中位数在 ALT 40~100 U/L 者与 ALT<40 U/L 者间差异有统计学意义($P<0.01$,表 3)。

表 2 慢性 HBV 感染者外周血特异性 CTL 频率与血清 HBV DNA 的关系

HBV DNA (copy/mL)	HLA-A ₂ ⁻ 抗病毒			HLA-A ₂ ⁺ 抗病毒			HLA-A ₂ ⁻ 未抗病毒			HLA-A ₂ ⁺ 未抗病毒		
	全距(%)	中位数(%)	<i>n</i>	全距(%)	中位数(%)	<i>n</i>	全距(%)	中位数(%)	<i>n</i>	全距(%)	中位数(%)	<i>n</i>
>10 ⁵	0.38~7.82	1.88 ^a	6	0.14~2.40	1.44 ^a	4	0.34~6.48	1.48 ^a	12	0.33~10.00	1.55 ^a	9
10 ³ ~10 ⁵	0.84~12.20	1.48 ^a	4	0.58~39.22	1.31 ^a	11	0.93~1.56	1.25 ^a	2	0.20~3.05	1.93 ^b	6
<10 ³	0.25~20.30	2.80	12	0.32~18.40	2.25	14	0.30~14.40	0.66	6	0.72~29.90	5.17	5

注:与血清 HBV DNA<10³ copy/mL 组比较,^a $P>0.05$,^b $P<0.05$ 。

表 3 慢性 HBV 感染者外周血特异性 CTL 频率与血清 ALT 的关系

ALT (U/L)	HLA-A ₂ ⁻ 抗病毒			HLA-A ₂ ⁺ 抗病毒			HLA-A ₂ ⁻ 未抗病毒			HLA-A ₂ ⁺ 未抗病毒		
	全距(%)	中位数(%)	n	全距(%)	中位数(%)	n	全距(%)	中位数(%)	n	全距(%)	中位数(%)	n
>100	0.64~2.14	1.39 ^a	2	0.14~39.22	1.72 ^a	8	0.30~6.48	0.99 ^a	7	0.33~29.90	2.88 ^a	6
40~100	0.38~10.69	2.08 ^a	10	0.41~5.41	1.03 ^a	8	0.40~2.73	1.27 ^a	5	0.20~1.77	1.10 ^b	5
<40	0.25~20.30	3.43	10	0.32~18.40	2.30	13	0.34~14.40	1.25	8	0.72~10.00	3.05	9

注:与血清 ALT<40 U/L 组比较,^a*P*>0.05,^b*P*<0.01。

3 讨 论

细胞免疫在 HBV 感染中发挥主要作用,针对 HBV 各类抗原表位的特异性 CTL 作为主要的效应细胞与病毒清除和肝细胞损伤直接相关^[3]。CTL 细胞的活化以及生物学效应都严格地受主要组织相容性复合物(MHC)-I 类分子限制(人的 MHC 称 HLA 复合体),与特异性 CTL 应答密切相关的主要是 HLA-A、HLA-B、HLA-C,尤其是 HLA-A。目前已确定的 CTL 表位大多为 HLA-A0201 限制^[4]。本研究中,HLA-A2 等位型鉴定结果显示慢性 HBV 感染者中 HLA-A₂⁺ 占 53.8% (49/91)。朴文花等^[5]报道 HLA-A2(A*0201)约占我国健康人的 45%,占慢性乙型肝炎患者的 60%左右。另外 HLA-A*2402 型别也有报道,约占 32.9%^[6]。

MHC-多肽复合物中的多肽通过与 CD8⁺ 抗原特异性的 CTL 表面的 αβ 型 T 细胞受体(TCR)相互作用,来完成 T 细胞对靶细胞抗原或 APC 递呈抗原的识别功能,进而杀伤感染细胞^[7]。本实验所用 MHC-肽五聚体是根据 T 细胞活化的双识别原理,用生物工程技术将 MHC-I 类分子重链 α 与 β2 微球蛋白在体外组装,并结合抗原表位肽形成一个能够与相应 TCR 特异性结合的单体,再将 5 个单体组装在一起。

王洪等^[8]利用可溶性 MHC-肽四聚体(tetramers)检测慢性肝炎患者的特异性 CTL,一般为 0.05%~1.20%。陈瑜等^[2]发现健康对照组、HLA-A₂⁻ 急性乙型肝炎对照组、HLA-A₂⁻ 慢性乙型肝炎对照组的特异性的 CD8⁺ T 细胞均不超过 0.02%。由于 MHC-五聚体法(MHC PentamerS)的 5 个 MHC-肽复合物呈平面构象,每个 MHC-肽复合物均可与 T 细胞受体(TCR)结合,而 tetramers 的 4 个 MHC-肽复合物呈四面体构象,至多只有 3 个 MHC-肽复合物可与同一 T 细胞表面的 TCR 结合,故 pentamers 比 tetramers 有更高的亲合力,从而能够检测更低亲合力的 T 细胞;另一方面,MHC Pentamers 法有更强的信号和减少背景染色,能够有更高的敏感性来检测稀少的抗原特异性 CTL,所以本研究对象特异性 CTL 水平平均高于文献的报道,甚至 HLA-A₂⁻ 患者具有较高的特异性 CTL,可能与 HLA-A2 等位型鉴定方法不同及 HLA-A*0201 限制性 CTL 能交叉识别那些非 HLA-A*0201 的其他 HLA-A2 超型分子递呈的表位肽也有关^[9]。另外 αβ 型 T 细胞受体(TCR)与辅受体(CD4 或 CD8)组成的复合受体,仅识别 MHC II 类分子或 MHC I 类分子荷载抗原肽的复合物(pMHC),至少存在有不同生理学意义的两种类型,一种为对抗原肽的特异性识别基本单位,是免疫应答特异性的基础;另一类是可特异性识别 MHC 分子的基本单位,其对抗原肽识别有混杂性,是识别时 MHC 制约性的基础^[10-11]。

本研究结果显示,HLA-A₂⁻ 未抗病毒治疗者特异性 CTL 中位数与 HLA-A₂⁻ 非 HBV 感染者间差异无统计学意义(*P*>0.05),HLA-A₂⁺ 未抗病毒治疗者、HLA-A₂⁻ 抗病毒治疗者特异性 CTL 中位数均高于对照组,表明在慢性 HBV 感染时,患者体内抗原特异性 CTL 与 HBV 并存,特异性 CTL 的存在并不能代表机体的保护性反应,不同临床感染状态慢性 HBV 患

者外周血特异性 CTL 频率存在差异。在 HBV 感染时,特异性 CTL 在感染急性期最高,其次是感染后自愈者,最后是慢性感染患者^[12]。由于慢性 HBV 感染者外周血和肝内 HBV 非特异性 CD8⁺ T 细胞 IL-2 表达低下、肝内细胞产生的免疫细胞抑制因子 IL-10、HBV 特异性 T 细胞产生的 TGFβ 发生协同作用,进而抑制 HBV 特异性 CD8⁺ T 细胞的增殖,使 T 淋巴细胞易于发生 Bim 介导的凋亡^[13-15];病毒持续性感染过程中,高滴度的抗原水平也是引起 T 细胞功能耗竭的重要因素之一。其可能机制是 CD8⁺ T 细胞持续性的同大量抗原-MHC 分子结合,最终导致 T 细胞的耗竭^[16]。因此推测过低的抗原特异性 CTL 反应可能是肝炎病毒感染更容易慢性化的原因之一。阻断 T 细胞自身抑制性受体-程序性死亡受体(PD-1)、细胞毒性 T 淋巴细胞抗原-4(CTLA-4)、凋亡前体蛋白(Bim)表达及介导的细胞凋亡能协同恢复耗竭的 HBV 特异性 CD8⁺ T 细胞的部分功能^[17-19]。

HBV 感染者特异性 CTL 水平高低与病毒清除和 ALT 水平的关系研究结论存在差异^[8,20]。抗病毒治疗的 CHB 患者分析研究发现,HBV DNA 量的减少只能引起 HBV 特异性 CD8⁺ T 细胞短暂的重建^[17,21-22]。本研究结果显示,HLA-A₂⁺ 未抗病毒组中血清 HBV DNA<10³ copy/mL、ALT<40 U/L 者特异性 CTL 频率增高,说明在慢性感染患者之间低病毒复制、肝损伤轻者比高病毒复制、肝损伤重者高,与文献报道^[5,23-24]结果相似。HLA-A₂⁻ 抗病毒治疗者特异性 CTL 频率显著高于 HLA-A₂⁻ 未抗病毒治疗者,随着血清 HBV DNA、ALT 水平的降低 HLA-A₂⁻、HLA-A₂⁺ 抗病毒治疗者特异性 CTL 数有增高趋势,提示无论 HLA-A₂⁻ 还是 HLA-A₂⁺ 慢性 HBV 感染抗病毒治疗者特异性 CTL 检测均有指导意义。由于本文每组病例数偏少,在一定程度上影响了结果分析;此外,本文未对抗病毒治疗者治疗前后的进行动态观察,是明显的不足,准备扩大病例数及进行抗病毒前后的动态观察研究。

参考文献

[1] 成军,孙关忠,李早荣.一种实用的显著性检验法-中位数检验[J].数理医药学杂志,2000,13(3):226-227.
[2] 陈瑜,李兰娟,楼滨,等.组织相容性抗原-肽四聚体流式细胞技术检测乙型肝炎患者特异性 CD8⁺ T 细胞[J].中华检验医学杂志,2004,27(4):16-18.
[3] Sobao Y,Takiguchi M. The role of hepatitis B and C virus-specific CTL in the control of viral replication[J]. Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi,2002,25(1):79-88.
[4] Desmond CP,Bartholomeusz A,Gaudieri S,et al. A systematic review of T-cell epitopes in hepatitis B virus: identification,genotypic variation and relevance to antiviral therapeutics[J]. Antivir Ther,2008,13(2):161-175.
[5] 朴文花,何豫,席宏丽,等. HLA-A2 肽四聚体的构建及其在乙、丙型肝炎中的初步应用[J]. 中华医学杂志,2004,84(21):1818-1822.

- [6] 杨新星,郝友华,宋娜,等. HBV 抗原肽-HLA-A * 2402 复合物四聚体的构建及初步检测应用[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2007,23(10):943-945.
- [7] 陈永良. TCR-多肽-MHC 复合物的相互识别[J]. 国外医学:免疫学分册,1995,18(4):177-180.
- [8] 王洪,周吉军,王宇明. MHC-表位肽四聚体技术在病毒性肝炎研究中的应用[J]. 世界华人消化杂志,2004,12(6):1432-1436.
- [9] 安娟,耿排力. HLA 超型鉴定技术和疾病关系的研究进展[J]. 国际免疫学杂志,2008,31(2):156-158.
- [10] 刘燕明,罗晶. CD4+T 细胞免疫识别的一种新理解[J]. 现代生物医学进展,2007,7(1):1-4.
- [11] 刘燕明,罗晶. T 细胞识别谱与获得性免疫[J]. 现代免疫学,2009,29(3):185-189.
- [12] Reignat S, Webster GJ, Brown D, et al. Escaping high viral load exhaustion; CD8 cells with altered tetramer binding in chronic hepatitis B virus infection[J]. J Exp Med, 2002,195(9):1089-1101.
- [13] Maini MK, Reignat S, Boni C, et al. T cell receptor usage of virus-specific CD8 cells and recognition of viral mutations during acute and persistent hepatitis B virus infection[J]. Eur J Immunol, 2000,30(11):3067-3078.
- [14] Das A, Hoare M, Davies N, et al. Functional skewing of the global CD8 T cell population in chronic hepatitis B virus infection[J]. J Exp Med, 2008,205(9):2111-2124.
- [15] Yoshimura A, Muto G. TGF- β function in immune suppression[J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2011, 350: 127-147.
- [16] Mueller SN, Ahmed R. High antigen levels are the cause of T cell exhaustion during chronic viral infection[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009,106(21):8623-8628.
- [17] Schurich A, Khanna P, Lopes AR, et al. Role of the coinhibitory receptor cytotoxic T lymphocyte antigen-4 on apoptosis-Prone CD8 T cells in persistent hepatitis B virus infection[J]. Hepatology, 2011,53(5):1494-1503.
- [18] Lopes AR, Kellam P, Das A, et al. Bim-mediated deletion of antigen-specific CD8 T cells in patients unable to control HBV infection[J]. J Clin Invest, 2008,118(5):1835-1845.
- [19] Kutscher S, Bauer T, Dembek C, et al. Design of therapeutic vaccines; hepatitis B as an example[J]. Microb Biotechnol, 2012,5(2):270-282.
- [20] 范振平,王福生,徐东平,等. 乙型肝炎患者 HBcAg 特异性细胞毒性 T 细胞的检测及其与临床疾病状态的关系[J]. 中华医学杂志,2004,84(24):2073-2076.
- [21] Carey I, D'antiga L, Bansal S, et al. Immune and viral profile from tolerance to hepatitis B surface antigen clearance; a longitudinal study of vertically hepatitis B virus-infected children on combined therapy[J]. J Virol, 2011, 85(5):2416-2428.
- [22] Bertoletti A, Ferrari C. Republished; innate and adaptive immune responses in chronic hepatitis B virus infections; towards restoration of immune control of viral infection[J]. Gut, 2013,89(1051):294-304.
- [23] Maini MK, Boni C, Ogg GS, et al. Direct ex vivo analysis of hepatitis B virus-specific CD8(+) T cells associated with the control of infection[J]. Gastroenterology, 1999, 117(6):1386-1396.
- [24] Maini MK, Boni C, Lee CK, 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):1269-1280.

(收稿日期:2013-04-08 修回日期:2013-05-15)

(上接第 2498 页)

剂 STI-571 能否治疗这部分患者则有待进一步验证。

综上所述, c-Kit 阳性胃癌患者具有较差的预后, 但 c-Kit 的生物学功能及是否能够成为治疗靶点则有待进一步体内外研究。

参考文献

- [1] Went PT, Dirnhofer S, Bundi M, et al. Prevalence of KIT expression in human tumors[J]. J Clin Oncol, 2004, 22(22):4514-4522.
- [2] Singer CF, Hudelist G, Lamm W, et al. Expression of tyrosine kinases in human malignancies as potential targets for kinase-specific inhibitors[J]. Endocr Relat Cancer, 2004,11(4):861-869.
- [3] Ashman LK. The biology of stem cell factor and its receptor C-kit[J]. Int J Biochem Cell Biol, 1999,31(10):1037-1051.
- [4] Rivera RS, Nagatsuka H, Gunduz M, et al. C-kit protein expression correlated with activating mutations in KIT gene in oral mucosal melanoma[J]. Virchows Arch, 2008, 452(1):27-32.
- [5] Demetri GD, von Mehren M, Blanke CD, et al. Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. [J]. N Engl J Med, 2002, 347(7): 472-480.
- [6] Verweij J, Casali PG, Zalcberg J, et al. Progression-free survival in gastrointestinal stromal tumors with high-dose imatinib: randomised trial[J]. Lancet, 2004, 364(9440): 1127-1134.
- [7] Carvajal RD, Antonescu CR, Wolchok JD, et al. KIT as a therapeutic target in metastatic melanoma[J]. JAMA, 2011,305(22):2327-2334.
- [8] Guo J, Si L, Kong Y, et al. Phase II, open-label, single-arm trial of imatinib mesylate in patients with metastatic melanoma harboring c-Kit mutation or amplification[J]. J Clin Oncol, 2011,29(21):2904-2909.
- [9] Gupta PB, Onder TT, Jiang G, et al. Identification of selective inhibitors of Cancer stem cells by high-throughput screening[J]. Cell, 2009,138(4):645-659.

(收稿日期:2013-02-18 修回日期:2013-05-12)