

· 基础研究 ·

经 HBx 转染后的肾小管上皮细胞对 T 细胞激活、分化的影响

王轩 周益 袁伟杰 朱楠 尚明花 赵亚鹏 王玲 谷立杰

【摘要】 目的 探讨乙型肝炎病毒 x 基因 (hepatitis B virus x, HBx) 转染人近端肾小管上皮细胞系 (HK-2) 后其对 T 细胞激活、分化的影响。**方法** 分 4 组: 实验组 (即转染 HBx 质粒的 HK-2 细胞+CD4⁺T 细胞)、阴性对照组 (即转染 HBx 空载质粒的 HK-2 细胞+CD4⁺T 细胞)、单独培养组 (即 CD4⁺T 细胞) 和空白对照组 (未处理 HK-2 细胞+CD4⁺T 细胞)。体外培养 HK-2, 用分子克隆的方法构建 pcDNA3.1-myc-HBx 质粒, 采用脂质体转染法瞬时转染 HK-2 细胞, 实时荧光定量 PCR 及 Western 印迹法验证 HBx 在 HK-2 细胞中的表达。免疫磁珠法分选健康志愿者外周血 CD4⁺T 细胞, 分别与 HK-2 细胞共培养, 流式细胞术检测 HK-2 细胞共刺激分子 CD40 的表达、CD4⁺T 细胞 CD40 配体 (CD40L) 表达及细胞周期情况, ELISA 检测各组细胞培养上清中 Th1 型细胞因子 IFN- γ 及 Th2 型细胞因子 IL-4 水平。**结果** HK-2 细胞经转染 pcDNA3.1-myc-HBx 质粒后, 可高表达 HBx。转染 HBx 基因后 HK-2 细胞 CD40 表达显著上调 ($P < 0.01$); 与对照组相比, 实验组 CD4⁺T 细胞表面 CD40L 表达也显著增加 ($P < 0.01$), S 期与 G2/M 期细胞数之和增多 ($P < 0.01$), 培养上清中 IFN- γ 水平升高 ($P < 0.05$), IL-4 水平降低 ($P < 0.05$)。**结论** 肾小管上皮细胞经 HBx 转染后, 其共刺激分子表达上调, 并促进 CD4⁺T 细胞增殖, 诱导 CD4⁺T 细胞向 Th1 方向分化。由此推测, 乙肝相关性肾炎肾组织免疫损伤所导致病变的持续进展也可能与此因素的参与相关。

【关键词】 肝炎病毒, 乙型; 基因; 细胞增殖; T 淋巴细胞, 辅助诱导; 肾小管上皮细胞; 肾小管上皮细胞 (renal tubular epithelial cells) with hepatitis B virus x gene on mediating Th1, ZHAO Ya-peng, WANG Ling, GU Li-jie. Department of Nephrology, The Affiliated First People

's Hospital, Shanghai

Jiaotong University, Shanghai 200080, China

Corresponding author: YUAN Wei-jie, Email: ywj4169@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of renal tubular epithelial cells with hepatitis B virus x (HBx) gene on mediating T-cell activation and differentiation. **Methods** The eukaryotic vector pcDNA3.1-myc-HBx containing HBx gene was transiently transfected into HK-2 cells by lipofectamine mediation. The expression of HBx was confirmed by real-time PCR and Western blotting. CD4⁺T cell in peripheral blood of health volunteer was isolated and purified by immunomagnetic beads. Subsequently, purified CD4⁺T cells were co-cultured with HK-2 cells. Flow cytometry was used to detect the expression of CD40 of HK-2 and the expression of CD40L and cell cycle of CD4⁺T cells. ELISA assay was used to quantify the IFN- γ and IL-4 in co-culture supernatant. The experiment was divided into four groups: experimental group (HK-2 cells with HBx + CD4⁺T cells), negative control group (HK-2 cells with pcDNA3.1-myc + CD4⁺T cells), blank control group (HK-2 cells + CD4⁺T cells) and separate culture group (CD4⁺T cells). **Results** Real-time PCR and Western blotting results verified that HBx was successfully

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-7097.2013.07.005

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81170672); 国家自然科学基金青年项目 (81200527)

作者单位: 200080 上海交通大学附属第一人民医院肾内科

通信作者: 袁伟杰, Email: ywj4169@163.com

expressed in HK-2 cells after transfection. After transfection of HBx gene, the expression of CD40 was significantly increased on HK-2 cells ($P < 0.01$). Compared with control groups, the expression level of CD40L and the percentage of cells at S and G2/M phase increased (all $P < 0.01$). Meanwhile, the level of IFN- γ in the supernatant was higher ($P < 0.05$), but the level of IL-4 was lower in experimental group ($P < 0.05$).

Conclusions Over-expression of HBx gene may up-regulate the expression of costimulatory molecules CD40 of renal tubular epithelial cells, which may active CD4⁺ T cells, promote the proliferation of CD4⁺ T cells and up-regulate Th1-type cytokines. These events may induce immune injury of renal in hepatitis B virus-associated glomerulonephritis.

【Key words】 Hepatitis B virus; Genes; Cell proliferation; T-lymphocytes, helper-inducer; Renal tubular epithelial cells; Costimulatory molecules

肾脏损伤是乙型肝炎病毒 (HBV) 感染最常见的一种肝外并发症, 我国是 HBV 感染高发地区, 乙肝相关性肾炎 (HBV-GN) 已成为我国主要的继发性肾脏疾病之一。HBV 免疫复合物致病^[1]、HBV 感染导致的免疫功能失调和病毒在局部组织的直接复制^[2]这 3 种发病机制是目前研究的热点。有报道显示, HBV 感染肾组织后, 可诱导 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 淋巴细胞浸润, 通过细胞免疫学机制加重肾小管间质损害^[3]。而 T 淋巴细胞免疫反应的激活依赖于抗原提呈细胞提供的抗原肽主要组织相容性复合体 (MHC) 及共刺激分子信号。肾小管上皮细胞作为非专职的抗原提呈细胞, 在生理情况下低表达 MHC- II 分子, 而在感染和炎性反应条件下, 肾小管上皮细胞可高表达 MHC- II 分子及共刺激分子, 使其在炎性反应防御和免疫启动中行使专职抗原提呈细胞的功能^[4]。我们前期研究发现乙型肝炎病毒 x 基因 (HBx) 转染肾小管上皮细胞后可上调 MHC- II 类分子及共刺激分子 CD40 的表达, 然而, HBx 转染的肾小管上皮细胞能否激活 T 细胞免疫反应参与 HBV-GN 进展尚未见到相关报道。因此, 本研究建立 HK-2 细胞与 CD4⁺ T 细胞共培养体系, 拟初步探讨 HBx 转染的肾小管上皮细胞对 CD4⁺ T 细胞免疫反应的影响。

材料与方 法

1. 主要材料: 人近端肾小管上皮细胞 (HK-2) 永生化细胞株由上海长征医院梅长林教授馈赠。K-SFM 无血清培养基 (美国 Gibco), 限制性内切酶 Kpn I 和 EcoR V、Taq 酶 (日本 Takara), T4 DNA 连接酶、感受态细菌 TOP 10、DNA 纯化回收试剂盒和质粒抽提试剂盒 (北京天根), 脂质体转

染试剂 Lipofectamine™ 2000、Trizol RNA 提取试剂盒 (美国 Invitrogen), HBx 抗体 (美国 Abcam), MHC- II 单克隆抗体、CD40 (美国 Santa Cruz), CD4、CD40 配体 (CD40L) 抗体 (美国 eBioscience), Ficoll 分离液 (挪威 Axis-Shield), 抗人 CD4 micro-Beads 和 MS 分选柱 (德国 Miltenyi Biotec), 白细胞介素 4 (IL-4) ELISA 试剂、 γ 干扰素 (IFN- γ) ELISA 试剂 (美国 Sunteam)。

2. 质粒构建: 根据 GenBank 中 ayr 亚型 HBV 基因组序列, 设计 HBx 基因的引物, 其引物上、下游分别包含有 Kpn I 和 EcoR V 内切酶酶切位点 (画线处为酶切位点), 上游引物为 5'-GGGGTACCG TGG CAG AGG TGA AAA AGT TGC-3', 下游引物为 5'-GCCGATATC CTA ACA TTG AGA TTC CCGAG-3' (引物由上海舜田生物科技有限公司合成), 扩增纯化 HBx 基因片段, 将纯化得到的 HBx 片段与 pcDNA3.1-myc 质粒分别用限制性内切酶 Kpn I 和 EcoR V 进行双酶切, 于琼脂糖凝胶上电泳、回收纯化酶切产物, 经 T4 DNA 连接酶 16℃ 过夜连接后, 转化 TOP 10 感受态细胞, 氨苄青霉素筛选培养, 挑取阳性克隆扩增后提取质粒进行双酶切和 DNA 测序鉴定。

3. 质粒转染: 从液氮中取出冻存的 HK-2 细胞, 迅速复苏后置于 K-SFM 无血清培养基中, 培养条件为 37℃、5% CO₂, 隔天换液, 细胞贴壁生长, 密度达 80% 时, 0.25% 胰酶消化传代。真核表达质粒用 Lipofectamine™ 2000 转染试剂进行转染, 转染过程参照 Lipofectamine™ 2000 说明进行。

4. 实时荧光定量 PCR 法验证 HBx 转染: 用 Trizol 提取 RNA, RNA 用于反转录合成 cDNA。cDNA 模板于包含有 ddH₂O、10× 反应缓冲液、dNTP、SYBR Premix EX Taq、DNA 聚合酶和引物的

PCR 混合液中扩增。HBx 特异性引物序列正义链 TGCGGACGACCCTTCTCGGG, 反义链 GGGCAACA TTCGGTGGGCGT, 引物长度均为 195 bp。热循环体系: 95℃ 变性 30 s, 接着 40 个循环包括 95℃ 变性 20 s, 60℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 20 s。溶解曲线分析: 温度从 60℃ 以 0.2℃/s 的速度升至 95℃, 用于评估扩增的特异性。各样本 HBx 基因的扩增结果用 GAPDH 的浓度校正。2^{-ΔΔCT} 法计算 HBx mRNA 的倍数变化。

5. Western 印迹法检测质粒特异性: 细胞培养 24 h 后, 将培养的上述细胞吸去培养液, 用 PBS 冲洗两次后, 加入 2× 细胞裂解液在冰上裂解, 30 min 后 4℃ 12 000×g 离心 15 min, 弃上清, 用 BCA 试剂盒进行蛋白浓度定量。电泳、转膜和封闭后, 加入稀释后的相应的一抗 4℃ 孵育过夜, 次日洗膜后加入辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 2 h 后 ECL 法显影, X 线胶片扫描其灰度值。

6. CD4⁺T 淋巴细胞的制备: 分别采集 5 例未感染过乙型肝炎病毒且未注射过乙型肝炎病毒疫苗的健康志愿者外周静脉血 50 ml, 应用 Ficoll 分离法获得外周血单个核细胞 (PBMC) 悬液, 用抗人 CD4 micro-Beads 和 MS 分选柱依据试剂盒说明进行阳性分选获得 CD4⁺T 淋巴细胞, 并运用流式细胞仪对分选获得的 CD4⁺T 淋巴细胞进行分析, 计算其纯度。

7. HK-2 细胞与 CD4⁺T 淋巴细胞共培养^[5]: 将不同组别的 HK-2 细胞以 5×10⁴/孔接种于六孔板中作为下层, 在上层 1 μm 孔径的小室中加入 CD4⁺T 细胞, 约 5×10⁵ 个细胞/ml, ELISA 法检测细胞上清液中细胞因子情况。收集 HK-2 细胞, 使用流式细胞术检测其 CD40 表达情况。收集 T 细胞, 使用流式细胞术检测其 CD40L 表达水平及其增殖情况。设置实验分组如下: (1) 实验组, 即转染 HBx 质粒的 HK-2 细胞+CD4⁺T 细胞; (2) 阴性对照组, 即转染 HBx 空载质粒的 HK-2 细胞+CD4⁺T 细胞; (3) 空白对照组, 即未处理 HK-2 细胞+CD4⁺T 细胞; (4) 单独培养组, 即 CD4⁺T 细胞。

8. ELISA 法检测细胞培养上清中 IL-4、IFN-γ 水平: 取上述细胞培养上清, -80℃ 保存。按照 ELISA 试剂盒要求操作, 酶标仪 450 nm 处测各孔 A 值, 根据标准曲线及 A 值计算各待测样本的浓度值。

9. 流式细胞术检测 HK-2 细胞 CD40、CD4⁺T

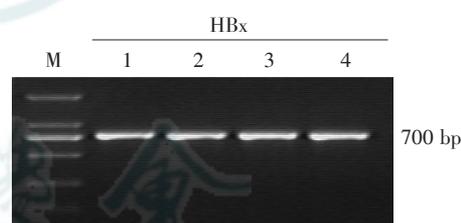
细胞 CD40L 的表达: HK-2 细胞和 CD4⁺T 细胞共培养 24 h 或 48 h 后, 分别收集 HK-2 细胞及 CD4⁺T 细胞, 经 PBS 洗涤, 每管细胞数 (4~5)×10⁶/ml, 并分别直接加入 1 μg 鼠抗人 CD40、鼠抗人 CD40L 单克隆抗体室温孵育 1 h, 同时加入正常鼠 IgG 用作同型对照, PBS 洗涤二次后, 用 PE 标记羊抗鼠二抗进行免疫标记反应, 并充分混匀, 于室温中孵育 30 min, 再用 PBS 洗涤 2 次后, 加入 0.4% 多聚甲醛-PBS 缓冲液重悬细胞, 上 FACS 流式细胞仪检测后, 用 CELLQuest 软件进行数据分析。

10. 流式细胞术检测 CD4⁺T 细胞周期: 收集上述各组 CD4⁺T 细胞制备单细胞悬液, 75% 冰乙醇固定过夜, PBS 洗涤, 调整细胞浓度, 依次加入 RNA 酶、碘化丙啶 (PI), 室温、避光孵育 30 min, 以流式细胞仪检测细胞周期分布, 实验重复 3 次。

11. 统计学处理: 计量结果数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间均值比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, 应用 SPSS 17.0 统计软件进行处理。

结 果

1. 质粒酶切验证: 菌液 PCR 鉴定, 采用 T7/BGH 测序引物鉴定, 序列正确, HBx 产物长度应为 700 bp。结果表明, 挑选的 4 个克隆都为阳性, 见图 1。

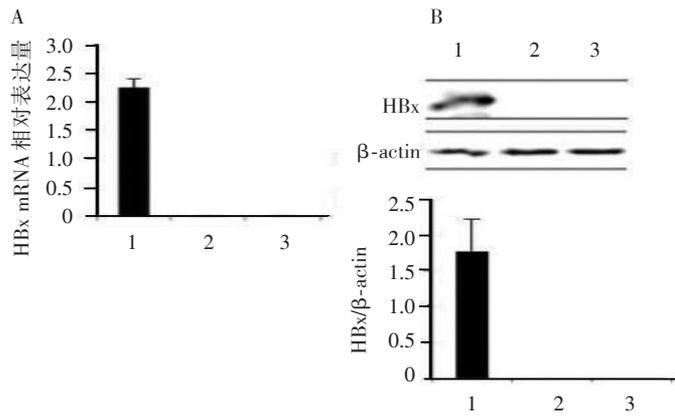


注: M: DL-2000 分子量标记; 1~4: HBx 的 4 个阳性克隆

图 1 质粒验证图

2. 转染 pcDNA3.1-myc-HBx 质粒后 HK-2 细胞中 HBx 的表达: 选取转染 24 h 后的细胞, 实时荧光定量 PCR 结果显示, 转染 pcDNA3.1-myc-HBx 质粒后 HK-2 细胞可见 HBx 表达, 而转染 pcDNA3.1-myc 质粒的 HK-2 细胞中未见 HBx 表达; 同时 Western 印迹检测也得到上述结果, 证实 HBx 基因成功整合并表达, 见图 2。

3. 各组 HK-2 细胞表面 CD40 表达: 流式分析结果显示, 未处理 HK-2 细胞组 CD40 表达为 6.89%±0.23%; 转染 pcDNA3.1-myc 质粒组 CD40 的

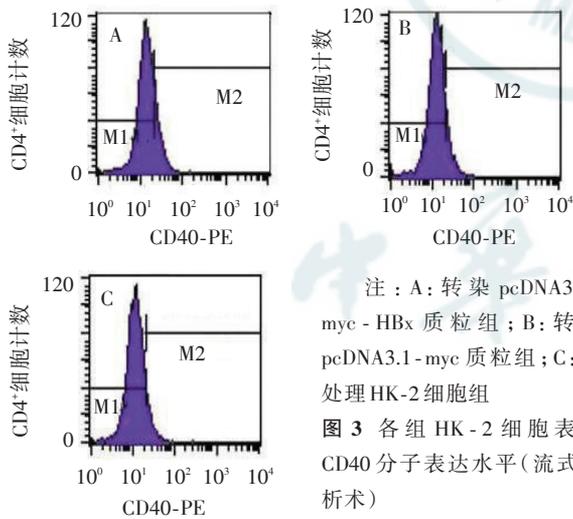


注:A:实时荧光定量PCR;B:Western印迹;1:转染pcDNA3.1-myc-HBx质粒组;2:转染pcDNA3.1-myc质粒组;3:未处理HK-2细胞组
图2 转染后HK-2细胞中HBx的表达

表达有所上调,为 $9.84\% \pm 0.58\%$;转染pcDNA3.1-myc-HBx质粒组CD40的表达明显增加,为 $16.53\% \pm 0.43\%$,且与前两组相比,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。见图3。

4. CD4⁺T细胞纯度检测:流式分析术结果显示,通过磁珠分离得到的CD4⁺T细胞的纯度为 $92.2\% \pm 2.26\%$,见图4。

5. 各组CD4⁺T细胞CD40L表达:实验组转染



注:A:转染pcDNA3.1-myc-HBx质粒组;B:转染pcDNA3.1-myc质粒组;C:未处理HK-2细胞组
图3 各组HK-2细胞表面CD40分子表达水平(流式分析术)

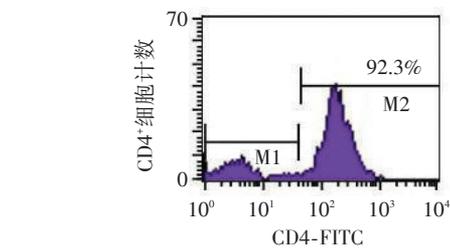
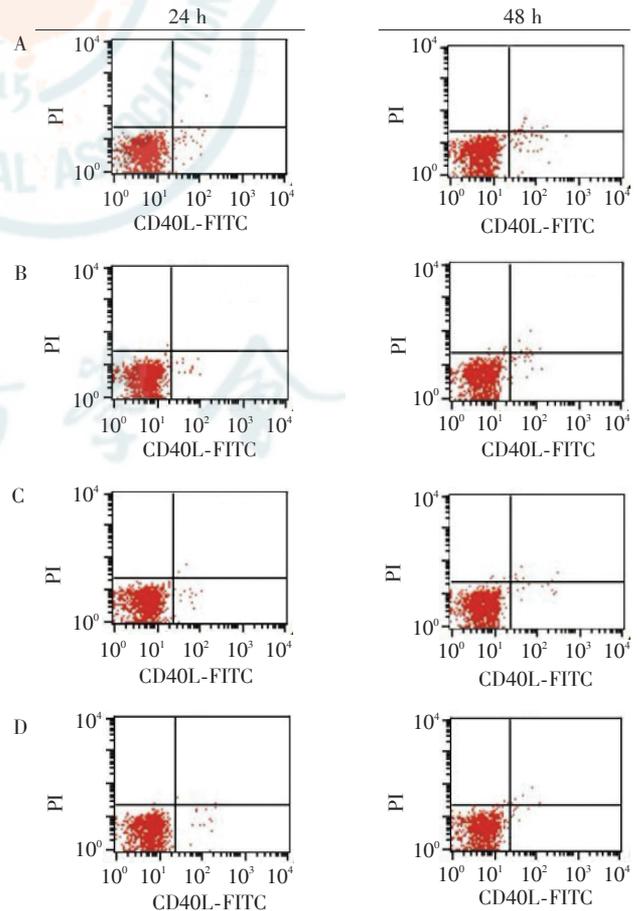


图4 CD4⁺T细胞纯度检测(流式分析术)

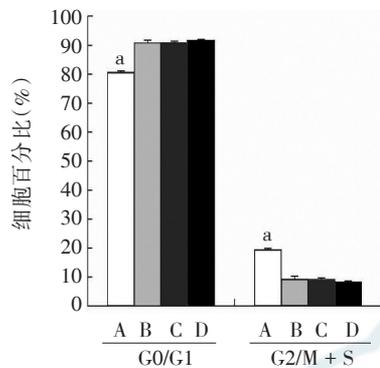
HBx基因的HK-2细胞与CD4⁺T细胞共培养24h及48h后,CD4⁺T细胞CD40L的表达分别增至 $2.86\% \pm 0.23\%$ 、 $3.72\% \pm 0.11\%$;而阴性对照组CD4⁺T细胞与转染HBx空载质粒的HK-2细胞共培养24h及48h后,CD40L表达为 $1.76\% \pm 0.29\%$ 、 $2.41\% \pm 0.15\%$,在这两个时间点两组之间的差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。单独培养24h的CD4⁺T细胞及与正常HK-2细胞共培养24h的CD4⁺T细胞CD40L表达分别为 $1.42\% \pm 0.15\%$ 、 $1.51\% \pm 0.42\%$,这两组与实验组相比,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);培养48h时这两组CD4⁺T细胞CD40L表达分别为 $1.36\% \pm 0.14\%$ 、 $1.91\% \pm 0.08\%$,这两组与实验组相比,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。见图5。

6. 各组CD4⁺T细胞周期比例:流式细胞仪结果显示,实验组CD4⁺T细胞与转染HBx基因的HK-2细胞共培养24h后,其处于G0/G1期细胞显著少于阴性对照组、空白对照组及单独培养组(均 $P < 0.01$),处于G2/M期、S期细胞显著高于阴



注:A:实验组;B:阴性对照组;C:空白对照组;D:单独培养组
图5 各组CD4⁺T细胞CD40L分子表达水平(流式分析术)

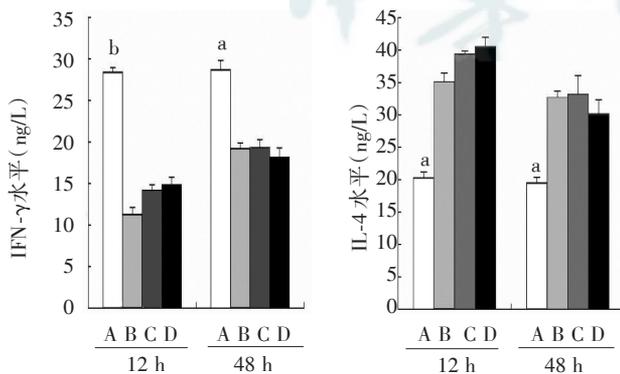
性对照组、空白对照组及单独培养组(均 $P < 0.01$); 相比于空白对照组及单独培养组, 阴性对照组处于 G0/G1 期细胞有所减少, 处于 G2/M 期、S 期细胞有所增加, 但差异均无统计学意义。见图 6。



注: A: 实验组; B: 阴性对照组; C: 空白对照组; D: 单独培养组; 与阴性对照组或空白对照组或单独培养组比较, $^aP < 0.01$

图 6 各组 CD4⁺ T 细胞周期比例(流式分析术)

7. 各组细胞培养上清中 IFN- γ 、IL-4 水平: 共培养 24 h 后, 实验组 IFN- γ 水平显著高于其他 3 组, 差异有统计学意义(均 $P < 0.01$); 共培养 48 h 后, 实验组 IFN- γ 水平略上升, 与阴性对照组、空白对照组、单独培养组差异仍有统计学意义(均 $P < 0.05$)。共培养 24 h 后, 实验组 IL-4 水平显著低于阴性对照组、空白对照组、单独培养组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$); 共培养 48 h 后, 实验组 IL-4 水平仍低于阴性对照组、空白对照组、单独培养组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。见图 7。



注: A: 实验组; B: 阴性对照组; C: 空白对照组; D: 单独培养组; 与同时时间点阴性对照组或空白对照组或单独培养组比较, $^aP < 0.05$, $^bP < 0.01$

图 7 各组细胞培养上清中 IFN- γ 、IL-4 水平(ELISA 法)

讨 论

HBV 感染后出现不同临床转归的机制目前尚不完全清楚, 可能取决于病毒和宿主两方面的因素。国内外研究显示, 宿主的细胞免疫功能尤其是 HBV 特异性的 CD4⁺ T 细胞反应和 CD8⁺ T 细胞反应对乙肝病毒的清除和疾病的转归有重要影响^[6-7]。慢性乙肝患者体内细胞免疫功能紊乱, T 淋巴细胞亚群失衡, 使机体不能有效清除入侵的 HBV, 导致疾病的慢性化^[8-9]。而 HBV 的慢性持续性感染可使 HBV-GN 发生风险大大的增加。现有研究发现, HBV-GN 患者肾组织中能检测到 CD4⁺ T、CD8⁺ T 细胞浸润, 且其浸润程度与肾小管间质损伤密切相关^[3]。因此推测, 肾组织局部可能亦存在着 T 细胞的激活和免疫紊乱, 进而损伤肾小管上皮细胞, 参与 HBV-GN 小管间质纤维化的发生发展过程。

为了进一步探讨 HBV-GN 进展过程中 T 细胞活化和紊乱所起作用, 我们在体外构建 pcDNA3.1-myc-HBx 质粒后转染肾小管上皮细胞, 并与 CD4⁺ T 细胞共培养, 建立 HK-2-CD4⁺ T 细胞共培养体系, 检测共刺激分子的表达情况。结果显示, 共培养体系中 HK-2 细胞表面共刺激分子 CD40 表达上调, CD4⁺ T 细胞表面 CD40L 水平亦明显上升。早已有研究证实, 肾小管上皮细胞可以作为一种非专职的抗原提呈细胞, 在一些细胞因子的作用下表达大量 MHC-II 类分子形成第一信号, 同时表达协同刺激分子形成第二刺激信号, 行使抗原提呈功能^[10]。我们前期的研究亦发现 HBx 转染肾小管上皮细胞后, MHC-II 类分子及 CD40 的表达上调, 提示 HBx 蛋白可促进肾小管上皮细胞的抗原提呈活性。本研究进一步证实了 HBx 转染的 HK-2 细胞与 CD4⁺ T 细胞共培养体系中, CD40-CD40L 信号通路活化。CD40L 主要表达于活化的 CD4⁺ T 细胞, CD40L 与 CD40 结合后所产生的效应是双向性的: 一方面, 可以诱导抗原提呈细胞高水平表达 MHC-II 类分子和 B7 分子, 放大抗原提呈细胞的抗原提呈功能; 另一方面, 上调 T 细胞表面共刺激分子 CD28 的表达, 促进 T 细胞的活化、增殖、分化。本研究中, 在 HBx 转染的 HK-2 细胞与 CD4⁺ T 细胞共培养体系中发现, 共培养 24 h 或 48 h 后, CD4⁺ T 细胞处于 G0/G1 期的细胞比例减少, 而处于 S 期、G2/M 期的细胞比例显

著增加,细胞增殖明显,这可能与 CD40、CD40L 相互作用产生的促增殖效应有关。

CD4⁺T 细胞接受抗原刺激后,不仅出现大量增殖,亦可分化为 Th1、Th2 细胞。通常,CD4⁺T 细胞的分化方向受抗原的性质、抗原刺激强度、局部微环境等多种因素的调控。除此之外,抗原提呈细胞表达的协同刺激信号对 CD4⁺T 细胞的分化方向亦可发挥调节作用。本研究结果显示,实验组细胞共培养上清中,IFN- γ 水平增加,IL-4 水平降低。由于 IFN- γ 主要由 Th1 细胞分泌,IL-4 主要由 Th2 细胞分泌,因此,表明 HBx 转染的 HK-2 细胞与 CD4⁺T 细胞共培养后,可能通过协同刺激信号 CD40-CD40L 促进 CD4⁺T 细胞向 Th1 方向分化,并抑制其向 Th2 方向分化。早已明确,Th1 和 Th2 细胞可分别介导不同的免疫应答产生相应的免疫效应,这种不同的 Th1/Th2 模式应答可在抵御不同种类的病原体感染中发挥作用,Th1/Th2 的平衡对机体能否有效和安全地清除体内的病原体有着至关重要的意义。研究表明,在抗 HBV 感染的免疫应答过程中 Th1 处于中心地位,高效特异性的 Th1 反应及其细胞因子 IFN- γ 可增强 NK 细胞、巨噬细胞、细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)的活性,促进细胞免疫反应,加快体内病毒的清除,同时也加重组织的炎性损伤^[11-12]。HBx 转染的肾小管上皮细胞促进了 Th1 细胞的分化,Th1 细胞在清除病毒蛋白 HBx 的同时也可能造成肾小管上皮细胞的损伤,从而加重 HBV-GN 的进展。

综上所述,经 HBx 转染后肾小管上皮细胞共刺激分子表达上调,共刺激信号的作用可激活并促进 CD4⁺T 细胞增殖,诱导 CD4⁺T 细胞向 Th1 方向分化。由此推测,这可能是引起 HBV-GN 患者肾组织免疫损伤及病变持续进展的重要机制之一。

参 考 文 献

- [1] Ozdamar SO, Gucer S, Tinaztepe K. Hepatitis - B virus associated nephropathies: a clinicopathological study in 14 children. *Pediatr Nephrol*, 2003, 18: 23-28.
- [2] 周益, 袁伟杰. 病毒直接损伤作用在乙肝相关性肾炎发病机制中的地位. *中华肾脏病杂志*, 2010, 26: 646-648.
- [3] 马学玲, 张月娥, 方利君, 等. HBV 感染与 IgA 肾病肾小管-间质病变的关系. *中华病理学杂志*, 1998, 27: 269-272.
- [4] Zhou T, Li X, Zou J, et al. Effects of DC-SIGN expression on tubulointerstitial fibrosis in nephritis. *Front Biosci*, 2009, 14: 3814-3824.
- [5] Rodig N, Ryan T, Allen JA, et al. Endothelial expression of PD - L1 and PD - L2 down - regulates CD8⁺ T cell activation and cytotoxicity. *Eur J Immunol*, 2003, 33: 3117-3126.
- [6] Alatrakchi N, Koziel MJ. Antiviral T - cell responses and therapy in chronic hepatitis B. *J Hepatol*, 2003, 39: 631-634.
- [7] Jung MC, Pape GR. Immunology of hepatitis B infection. *Lancet Infect Dis*, 2002, 2: 43-50.
- [8] Böcher WO, Galun E, Marcus H, et al. Reduced hepatitis B virus surface antigen - specific Th1 helper cell frequency of chronic HBV carriers is associated with a failure to produce antigen - specific antibodies in the trimera mouse. *Hepatology*, 2000, 31: 480-487.
- [9] Jiang Y, Ma Z, Xin G, et al. Th1 and Th2 immune response in chronic hepatitis B patients during a long-term treatment with adefovir dipivoxil. *Mediators Inflamm*, 2010, 2010:143026.
- [10] Waeckerle - Men Y, Starke A, Wahl PR, et al. Limited costimulatory molecule expression on renal tubular epithelial cells impairs T cell activation. *Kidney Blood Press Res*, 2007, 30: 421-429.
- [11] Bertoletti A, Maini MK. Protection or damage: a dual role for the virus-specific cytotoxic T lymphocyte response in hepatitis B and C infection? *Curr Opin Microbiol*, 2000, 3: 387-392.
- [12] Chisari FV, Isogawa M, Wieland SF. Pathogenesis of hepatitis B virus infection. *Pathol Biol (Paris)*, 2010, 58: 258-266.

(收稿日期: 2012-12-07)

(本文编辑: 杨克魁)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

关于投稿提供伦理委员会批准文件及受试对象知情同意书的通告

根据中华医学会杂志社的相关规定,当论文的主体是以人为研究对象的试验时,作者应该说明其遵循的程序是否符合负责人体试验的委员会(单位性的、地区性的或国家性的)所制定的伦理学标准,并提供该委员会的批准文件及受试对象的知情同意书。

本刊编辑部