

慢病毒载体介导Runx3基因过表达对慢性乙型肝炎患者Th细胞分化的影响

张毅, 余永胜, 王洁玲, 唐余燕, 汤正好, 江红, 奚敏, 臧国庆 (上海交通大学附属第六人民医院 感染病科, 上海 200233)

摘要: 目的 探讨Runx3基因过表达对慢性乙型肝炎 (chronic hepatitis B, CHB) 患者Th细胞分化的影响。方法 重组慢病毒载体pGC-FU-Runx3与阴性对照慢病毒载体pGC-FU分别转染29例CHB患者外周血CD4⁺ T细胞, 分离培养5 d的细胞培养液上清, 应用ELISA检测Th1型细胞因子IFN- γ 和Th2型细胞因子IL-4的表达水平; 收集培养5 d的CD4⁺ T细胞, 应用实时定量PCR检测转录因子T-bet、GATA3 mRNA的表达水平。结果 ①与pGC-FU转染组比较, pGC-FU-Runx3转染组Th1型细胞因子IFN- γ 的表达水平明显升高 ($P = 0.003$)。②与pGC-FU转染组比较, pGC-FU-Runx3转染组Th2型细胞因子IL-4的表达水平明显降低 ($P = 0.007$)。③与pGC-FU转染组比较, pGC-FU-Runx3转染组IFN- γ /IL-4比值明显增大 ($P = 0.001$)。④与pGC-FU转染组比较, pGC-FU-Runx3转染组T-bet、GATA3 mRNA的表达水平无显著性差异 (P 均 > 0.05), 但pGC-FU-Runx3转染组T-bet/GATA3比值较pGC-FU转染组明显增大 ($P = 0.005$)。结论 Runx3过表达可促进CHB患者Th1型细胞因子的分泌, 抑制Th2型细胞因子分泌, 促使CHB患者外周血Th细胞向Th1细胞分化, 使其Th1/Th2失衡得到改善。

关键词: 肝炎, 乙型, 慢性; CD4⁺T细胞; Runx3; Th1细胞; Th2细胞

Effects of lentiviral vector-mediated Runx3 overexpression on Th cell differentiation in patients with chronic hepatitis B

ZHANG Yi, YU Yong-sheng, WANG Jie-ling, TANG Yu-yan, TANG Zheng-hao, JIANG Hong, XI Min, ZANG Guo-qing (Department of Infectious Diseases, Shanghai Jiao Tong University Affiliated Sixth People's Hospital, Shanghai 200233, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of lentiviral vector-mediated Runx3 overexpression on Th cell differentiation in patients with chronic hepatitis B (CHB). **Methods** Peripheral CD4⁺ T cells derived from 29 CHB patients were transfected with the recombinant lentiviral vector (pGC-FU-Runx3) and the negative control lentiviral vector (pGC-FU), respectively. Then the cell culture supernatants and the CD4⁺ T cells were collected on the 5th day. The expression of Th1-type cytokine (IFN- γ) and Th2-type cytokine (IL-4) were measured by ELISA and the expression of T-bet and GATA3 mRNA were assayed by quantitative real-time PCR. **Results** ①Compared with the pGC-FU transfected group, the expression of IFN- γ in the pGC-FU-Runx3 transfected group significantly increased ($P = 0.003$). ②Compared with the pGC-FU transfected group, the expression of IL-4 in the pGC-FU-Runx3 transfected group significantly decreased ($P = 0.007$). ③Compared with the pGC-FU transfected group, the ratio of IFN- γ /IL-4 in the pGC-FU-Runx3 transfected group significantly increased ($P = 0.001$). ④There was no difference in T-bet and GATA3 mRNA expression between the pGC-FU transfected group and the pGC-FU-Runx3 transfected group (both $P > 0.05$). However, compared with the pGC-FU transfected group, the ratio of T-bet/GATA3 in the pGC-FU-Runx3 transfected group significantly increased ($P = 0.005$). **Conclusions** Runx3 overexpression can promote the secretion of Th1-type cytokines and inhibit the secretion of Th2-type cytokines in CHB patients. It can also induce Th cell differentiating into Th1 cell lineage and improve the Th1/Th2 imbalance in CHB patients.

Key words: Chronic hepatitis B; CD4⁺ T cells; Runx3; Th1 cells; Th2 cells

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7380.2015.03.011

基金项目: 上海市卫生和计划生育委员会中医药科研基金 (2014JQ019A)

通讯作者: 臧国庆 Email: zanguoqin@126.com

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染是一个严重的公共卫生问题。HBV感染者中,80%~90%的儿童和5%~10%的成人会转变为慢性HBV携带者,成为慢性肝炎、肝硬化和肝细胞癌发病的高危人群^[1,2]。在HBV特异性抗原的刺激下,初始CD4⁺ T细胞在不同细胞因子的作用下分化为Th1、Th2等细胞亚群,并因此影响细胞因子网络之间的平衡^[3,4]。研究发现慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)患者体内Th细胞分化出现偏移,存在Th1、Th2细胞及其分泌的细胞因子比例的失衡^[5]。Th1型免疫应答低下使机体不能产生足量的细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic T lymphocytes, CTL)和Th1型细胞因子以杀伤、破坏HBV感染的靶细胞,HBV复制不能得到抑制;而Th2型细胞因子又可抑制Th1细胞的免疫应答,使机体不能及时清除HBV,导致HBV慢性持续感染^[5]。因此,改善CHB患者Th1/Th2失衡是治疗CHB的一条可能途径。

T-bet (T-box expressed in T cells)属于T-box转录因子家族成员,是Th1细胞特征性的转录因子,在Th1细胞分化中起着决定性作用^[6]。GATA3 (GATA binding protein 3)属于GATA转录因子家族成员,是T细胞发育过程中最重要的转录因子之一。在Th2细胞分化过程中,GATA3发挥了中心性的作用^[7]。Runx3 (runt-related transcription factor 3)是一种肿瘤抑制基因,属于Runx转录因子家族成员。它在机体正常生长、发育和肿瘤发生、发展过程中起着重要的作用^[8,9]。人Runx3基因位于染色体1p36.1,基因全长约67 kb,含有2个启动子、6个外显子和1290 bp的开放阅读框^[10,11]。Runx3是调节Th细胞分化重要的转录因子,其可以通过增强T-bet或减弱GATA3的转录活性,促使CD4⁺ T细胞向Th1细胞分化^[12-14]。

前期研究发现CHB患者外周血CD4⁺ T细胞Runx3 mRNA的表达水平明显低于急性乙型肝炎(acute hepatitis B, AHB)患者和健康对照者,而AHB患者外周血CD4⁺ T细胞Runx3 mRNA的表达水平明显高于健康对照者,因此推测Runx3在CHB的发病过程中可能发挥了重要的作用,CHB患者Runx3表达水平降低可能与其Th1/Th2失衡有关。但Runx3过表达对CHB患者外周血Th细胞分化的影响如何尚不清楚。本研究将pGC-FU-Runx3重组慢病毒载体转染CHB患者外周血CD4⁺ T细胞,应用ELISA检测Th1型细胞因子IFN- γ 和Th2型细胞因子IL-4的表达水平,同时应用实时定量PCR检测Th1

细胞特征性转录因子T-bet和Th2细胞特征性转录因子GATA3 mRNA的表达水平以了解Runx3过表达对CHB患者外周血Th细胞分化的影响,为进一步研究Runx3在CHB发病机制中所起的作用奠定基础。

1 对象与方法

1.1 研究对象 2011年6月至2012年12月我科诊治的CHB患者29例,其中男性18例,女性11例,年龄24~59岁,平均年龄(39.6 \pm 17.3)岁,诊断符合2010年中华医学会肝病学分会、感染病学分会共同制定的《慢性乙型肝炎防治指南》^[15],并排除其他肝炎病毒、人类免疫缺陷病毒、EB病毒、巨细胞病毒感染,排除自身免疫性疾病、肿瘤。所有患者就诊前6个月内未使用过干扰素、核苷(酸)类似物等抗病毒药物和(或)胸腺肽等免疫调节药物。

1.2 方法

1.2.1 主要实验试剂 RosetteSep富集人CD4⁺ T细胞抗体(StemCell公司),人淋巴细胞分离液(StemCell公司),RPMI-1640(Gibco公司),Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28(Invitrogen公司),pGC-FU-Runx3重组慢病毒载体(本科实验室构建),慢病毒载体pGC-FU(上海吉凯基因化学技术有限公司),人IFN- γ 、IL-4 ELISA试剂盒(R&D systems公司),总RNA提取试剂盒(Invitrogen公司),反转录试剂盒(Promega公司),荧光定量PCR试剂盒(TaKaRa公司)。

1.2.2 外周血CD4⁺ T细胞分离 无菌条件下采集CHB患者肘静脉血10 ml置于肝素抗凝管中;加入500 μ l RosetteSep富集人CD4⁺ T细胞抗体混合物,充分混匀,室温孵育20 min;用等体积含2% FBS的PBS稀释血液并缓慢混匀;按稀释血液:淋巴细胞分离液=2:1的比例在10 ml淋巴细胞分离液的上面缓慢加入稀释的血液样品,室温1200 rpm离心20 min;收集位于淋巴细胞分离液与血浆界面之间的灰色细胞层;加入5倍体积含2% FBS的PBS混匀,1200 rpm离心10 min,弃上清,再重复洗涤富集细胞1次,分离得到CD4⁺ T细胞;流式细胞仪检测CD4⁺ T细胞纯度达到90%以上。

1.2.3 慢病毒载体转染外周血CD4⁺ T细胞 将收集到的CD4⁺ T细胞用含10% FBS的RPMI-1640培养基调整细胞密度为 2×10^6 /(2 ml),接种于24孔培养板中,每孔加入25 μ l Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28和30 U/ml rIL-2,置于37 $^{\circ}$ C,5% CO₂细胞培养箱内培养24 h;pGC-FU-Runx3重组慢病毒载体预感染CD4⁺ T细胞,以确定感染目的细胞的最适

感染复数(multiplicity of infection, MOI)值;按照MOI = 50, pGC-FU-Runx3转染组每孔加入pGC-FU-Runx3重组慢病毒载体25 μ l (1×10^8 TU/ml), pGC-FU转染组每孔加入pGC-FU慢病毒载体25 μ l (1×10^8 TU/ml);各组每孔均加入终浓度为8 μ g/ml的polybrene,水平方向轻轻拍打培养板,使各试剂充分混合;将24孔培养板置于37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂细胞培养箱内继续培养。

1.2.4 ELISA检测细胞因子表达水平 收集培养5 d的CD4⁺T细胞培养液上清;实验前将细胞培养液上清取出,解冻,将ELISA试剂盒放置室温平衡30 min,并从已平衡至室温的密封袋中取出所需板条;将标准品按倍比稀释的方法配制不同浓度的标准品,加样孔中分别加入待测样品和不同浓度的标准品(100 μ l/孔),封板胶纸封住反应孔,37 $^{\circ}$ C孵育90 min,洗板4次,用滤纸印干;加样孔中加入生物素化抗体工作液(100 μ l/孔),封板胶纸封住反应孔,37 $^{\circ}$ C孵育60 min。洗板4次,用滤纸印干;加样孔中加入酶结合物工作液(100 μ l/孔),封板胶纸封住反应孔,37 $^{\circ}$ C孵育30 min,洗板4次,用滤纸印干;加样孔中加入底物工作液(100 μ l/孔),避光37 $^{\circ}$ C孵育20 min;加样孔中加入终止液(100 μ l/孔),轻轻敲打反应板使其混匀,混匀后即刻测量450 nm处吸光度;绘制标准曲线,计算待测样品浓度。

1.2.5 引物设计与合成 根据NCBI GenBank公布的人T-bet、GATA3基因编码区序列,以GAPDH基因为内参照,应用Primer Premier 5.0软件设计引物。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。T-bet上游引物5'-TCCTACCCAACCAAGTATC-3'; T-bet下游引物5'-GAAACTCAGCCTCATAGC-3'; GATA3上游引物5'-AGATGGCACGGGACACTAC-3'; GATA3下游引物5'-CTGACAGTTTCGCACAGGAC-3'; GAPDH上游引物5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3'; GAPDH下游引物5'-GCCTTCTCCATGGTGGTGAA-3'。

1.2.6 总RNA提取与反转录合成cDNA 收集培养5 d的CD4⁺T细胞进行总RNA提取。按照Invitrogen公司的总RNA提取试剂盒说明书进行操作提取总RNA;按照Promega公司的反转录试剂盒说明书进行操作反转录合成cDNA。反应条件(20 μ l反应体系):42 $^{\circ}$ C孵育60 min,70 $^{\circ}$ C灭活10 min。-80 $^{\circ}$ C保存备用。

1.2.7 实时定量PCR检测T-bet mRNA表达水平 在ABI 7500 PCR仪上进行实时定量PCR检测,按照Takara公司的荧光定量PCR试剂盒说明书进行操作,每份

cDNA做3个重复管。PCR反应体系:SYBR Premix Ex Taq 12.5 μ l,上下游引物各0.5 μ l,cDNA模板1.0 μ l,ddH₂O 10.5 μ l。PCR反应条件:预变性95 $^{\circ}$ C 5 min,变性95 $^{\circ}$ C 10 s,退火60 $^{\circ}$ C 20 s,延伸72 $^{\circ}$ C 20 s,共40个循环。PCR循环结束后对扩增曲线进行分析,3个重复管取平均Ct值计算,并对所扩增的PCR产物熔解曲线进行分析。应用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算T-bet mRNA的相对表达水平。

1.2.8 实时定量PCR检测GATA3 mRNA表达水平 实验方法与步骤同1.2.7。

1.3 统计学处理 应用SPSS 16.0统计软件进行分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 pGC-FU-Runx3重组慢病毒载体对CHB患者Th1、Th2型细胞因子表达水平的影响

2.1.1 pGC-FU-Runx3转染组CD4⁺T细胞培养液上清IFN- γ 的表达水平较pGC-FU转染组明显升高($P = 0.003$),见图1。

2.1.2 pGC-FU-Runx3转染组CD4⁺T细胞培养液上清IL-4的表达水平较pGC-FU转染组明显降低($P = 0.007$),见图2。

2.1.3 pGC-FU-Runx3转染组Th1型细胞因子IFN- γ 与Th2型细胞因子IL-4的比值IFN- γ /IL-4较pGC-FU转染组明显增大($P = 0.001$),见图3。

2.2 pGC-FU-Runx3重组慢病毒载体对CHB患者T-bet、GATA3 mRNA表达的影响

2.2.1 pGC-FU-Runx3转染组T-bet mRNA的表达水平与pGC-FU转染组无显著性差异($P > 0.05$),见图4。

2.2.2 pGC-FU-Runx3转染组GATA3 mRNA的表达水平与pGC-FU转染组无显著性差异($P > 0.05$),见图5。

2.2.3 pGC-FU-Runx3转染组T-bet/GATA3比值较pGC-FU转染组明显增大($P = 0.005$)见图6。

3 讨论

Th1、Th2细胞的分化状态及其相互之间的平衡在机体抗HBV的免疫应答中起着重要的作用^[16-18]。Maini等^[19]研究发现急性自限性HBV感染主要是细胞免疫反应的结果,细胞因子多为Th1型,而慢性HBV感染细胞免疫反应很弱或测不出,体液免疫却相对较强,细胞因子多为Th2型。Penna等^[20]研究发现Th1型细胞因子可造成肝细胞的损伤,但其在AHB的恢复过程中发挥了重要的作用。Akpola等^[21]研究发现HBV持续感染者体内细胞免疫类型向

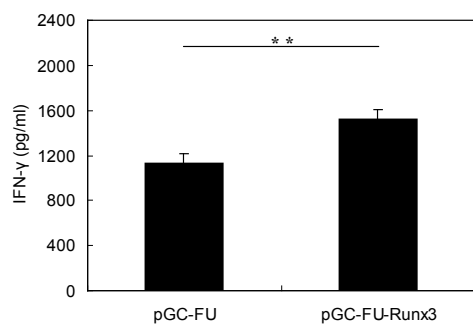


图1 pGC-FU-Runx3 转染组与 pGC-FU 转染组 CD4⁺ T 细胞培养液上清 IFN- γ 表达水平 (** $P = 0.003$)

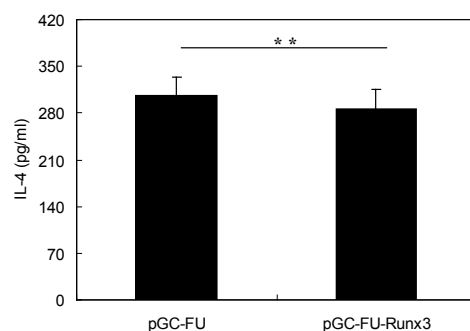


图2 pGC-FU-Runx3 转染组与 pGC-FU 转染组 CD4⁺ T 细胞培养液上清 IL-4 表达水平 (** $P = 0.007$)

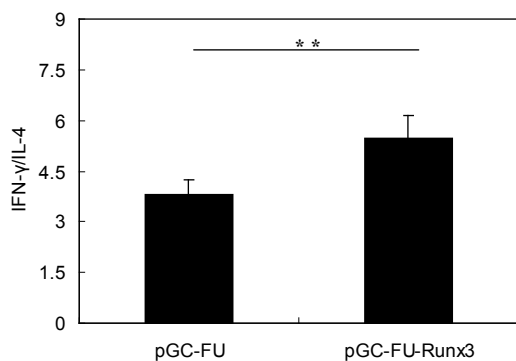


图3 pGC-FU-Runx3 转染组与 pGC-FU 转染组 CD4⁺ T 细胞培养液上清 IFN- γ /IL-4 比值 (** $P = 0.001$)

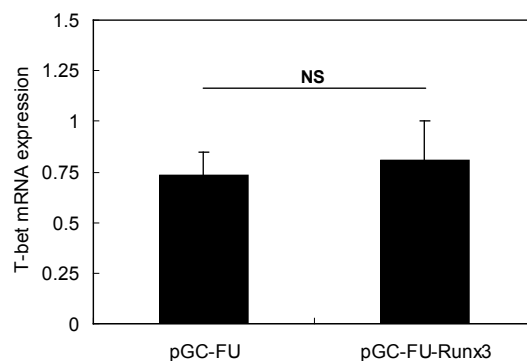


图4 pGC-FU-Runx3 转染组与 pGC-FU 转染组外周血 CD4⁺ T 细胞 T-bet mRNA 表达水平 (NS: 无统计学差异)

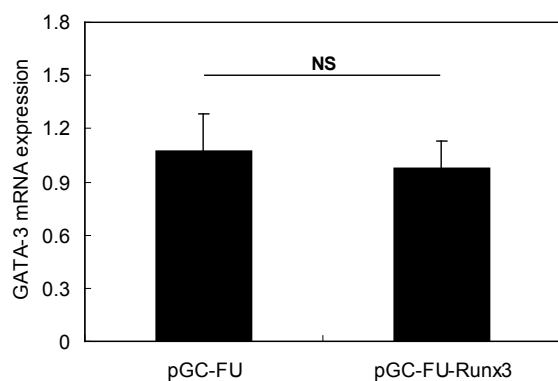


图5 pGC-FU-Runx3 转染组与 pGC-FU 转染组外周血 CD4⁺ T 细胞 GATA3 mRNA 表达水平 (NS: 无统计学差异)

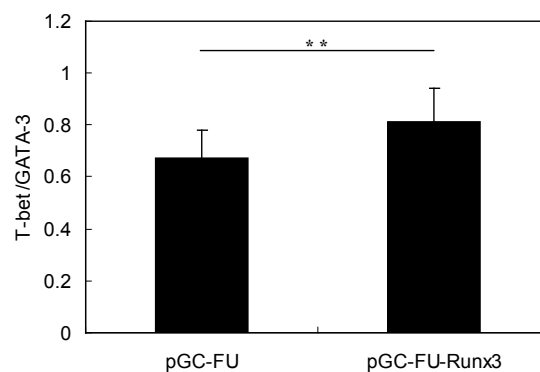


图6 pGC-FU-Runx3 转染组与 pGC-FU 转染组外周血 CD4⁺ T 细胞 T-bet/GATA3 比值 (** $P = 0.005$)

Th2偏移,并伴随IL-4的大量产生。Maruyama等^[22]研究发现Th2细胞及其细胞因子与HBV持续感染有关。Brooks等^[23]研究发现CHB患者体内存在Th1/Th2失衡,Th1细胞反应不足,Th1型免疫应答低下而Th2型免疫应答亢进。因此,Th1/Th2是否平衡是机体能否有效清除HBV并决定HBV感染预后与转归的重要因素。

Th细胞的分化和转化受多种因素影响,如局部微环境中细胞因子的作用、抗原类型和浓度、抗原提呈细胞类型、协同刺激分子的作用、激素及激素前体的作用、遗传背景等^[24]。其中局部微环境中细胞因子基因表达是影响Th细胞分化的关键因素。Th细胞亚群特异性转录因子可引起相应细胞因子基因染色质重塑并通过自身正反馈途径持续高表达,激活相应的细胞因子基因,合成相应的细胞因子,从而维持Th细胞亚群表型,调节Th细胞分化^[25]。

Runx3是CD4⁺T细胞分化过程中重要的转录因子,可以调节Th细胞的分化^[12-14]。Runx3在Th1细胞中被T-bet直接或间接诱导并与T-bet共同促进Th1细胞的分化,Th1细胞IFN- γ 的大量产生和IL-4基因的沉默需要T-bet和Runx3的共同作用^[13]。在Runx3缺失的Th1细胞中,IFN- γ 的产生明显减少,同时IL-2的产生也持续减少。T-bet是影响IFN- γ 表达最重要的转录因子,但IFN- γ 最大量的表达需要Runx3的参与,T-bet和Runx3协同作用可促使Th1细胞产生最大量的IFN- γ ^[13]。Runx3与T-bet可能以相互间正反馈作用的机制参与Th1细胞谱系的确定。Th2细胞也能表达Runx3,即使在Th2细胞极化的状态下,Runx3也可以促进IFN- γ 的表达并抑制IL-4的表达。在Runx3缺失的Th2细胞中,T-bet不能抑制IL-4的产生,但T-bet和Runx3协同作用却能显著抑制IL-4的产生,T-bet和Runx3都是抑制IL-4必须的转录因子^[13]。

在Th1细胞分化过程中,Runx3的表达同样需要T-bet的参与^[13]。T-bet缺失的Th细胞即使在Th1细胞极化的条件下,Runx3的表达水平仍显著下降。而通过逆转录病毒载体将T-bet转导进入正在分化的Th2细胞中可诱导Runx3的表达。在Runx3缺失的Th1细胞中,T-bet能被正常诱导,而异位表达Runx3的Th2细胞不能诱导T-bet的表达,因此Runx3不能影响T-bet的表达水平^[13]。这与本研究通过慢病毒载体将Runx3基因转入CHB患者外周血CD4⁺T细胞后T-bet表达水平无明显变化的结果相一致。

Runx3还可与GATA3相互影响并减弱GATA3对IFN- γ 、IL-4表达的影响^[14]。Runx3可以通过抑制GATA3 DNA的结合活性而减弱GATA3的转录活

性,这和Runx3与T-bet相互影响并增强T-bet的转录活性不同^[14]。通过转基因技术过表达Runx3能促使CD4⁺T细胞向Th1细胞分化,同时促进IFN- γ 的表达、抑制IL-4的表达,并下调Th2细胞的免疫应答^[14]。Runx3过表达同样不会影响GATA3的表达水平。这也与本研究通过慢病毒载体将Runx3基因转入CHB患者外周血CD4⁺T细胞后GATA3表达水平无明显变化的结果相一致。

本研究将慢病毒载体转染CHB患者外周血CD4⁺T细胞,应用ELISA检测Th1型细胞因子IFN- γ 和Th2型细胞因子IL-4的表达水平,并采用IFN- γ /IL-4比值作为反映Th1/Th2细胞免疫应答强度的指标。结果显示pGC-FU-Runx3转染组Th1型细胞因子IFN- γ 的表达水平较pGC-FU转染组明显升高,Th2型细胞因子IL-4的表达水平较pGC-FU转染组明显降低,pGC-FU-Runx3转染组IFN- γ /IL4比值明显高于pGC-FU转染组。同时应用实时定量PCR检测Th1细胞特征性转录因子T-bet和Th2细胞特征性转录因子GATA3 mRNA的表达水平,并采用T-bet/GATA3比值作为反映Th1/Th2细胞免疫平衡的指标。结果显示pGC-FU-Runx3转染组与pGC-FU转染组T-bet、GATA3 mRNA的表达水平无显著性差异,但pGC-FU-Runx3转染组T-bet/GATA3比值明显高于pGC-FU转染组。由此提示Runx3可参与调节CHB患者外周血Th细胞的分化和细胞因子的分泌。Runx3过表达可促进CHB患者Th1型细胞因子的分泌,抑制Th2型细胞因子的分泌,并促使CHB患者外周血Th细胞向Th1细胞分化,使其Th1/Th2失衡得到改善。而CHB患者Th1型细胞免疫的增强有利于HBV的清除。

但Runx3过表达调节CHB患者外周血Th细胞分化的作用机制可能不是通过直接调节转录因子T-bet、GATA3的表达水平来实现的。Runx3与T-bet协同作用并上调T-bet的转录活性,同时下调GATA3的转录活性可能是其调节CHB患者外周血Th细胞分化的作用机制之一。但Runx3是否还通过其他途径对CHB患者外周血Th细胞的分化产生影响还有待进一步研究。

参考文献

- [1] Chisari FV, Ferrari C. Hepatitis B virus immunopathogenesis [J]. Annu Rev Immunol, 1995, 13: 29-60.
- [2] Te HS, Jensen DM. Epidemiology of hepatitis B and C viruses: a global overview [J]. Clin Liver Dis, 2010, 14: 1-21.
- [3] Bertolotti A, Gehring AJ. The immune response during hepatitis B virus infection [J]. J Gen Virol, 2006, 87: 1439-1449.
- [4] Mizukoshi E, Sidney J, Livingston B, et al. Cellular

- immune responses to the hepatitis B virus polymerase [J]. *J Immunol*,2004,173:5863-5871.
- [5] Marinos G, Rossol S, Carucci P, et al. Immunopathogenesis of hepatitis B virus recurrence after liver transplantation [J]. *Transplantation*,2000,69:559-568.
- [6] Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, et al. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment [J]. *Cell*,2000,100:655-669.
- [7] Zheng W, Flavell RA. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells [J]. *Cell*,1997,89:587-596.
- [8] Cohen MM Jr. Perspectives on RUNX genes: an update [J]. *Am J Med Genet A*,2009,149A:2629-2646.
- [9] Bangsow C, Rubins N, Glusman G, et al. The RUNX3 gene--sequence, structure and regulated expression [J]. *Gene*,2001,279:221-232.
- [10] Puig-Kröger A, Corbi A. RUNX3: a new player in myeloid gene expression and immune response [J]. *J Cell Biochem*,2006,98:744-756.
- [11] Bae SC, Takahashi E, Zhang YW, et al. Cloning, mapping and expression of PEBP2 alpha C, a third gene encoding the mammalian Runt domain [J]. *Gene*,1995,159:245-248.
- [12] Wong WF, Kohu K, Chiba T, et al. Interplay of transcription factors in T-cell differentiation and function: the role of Runx [J]. *Immunology*,2011,132:157-164.
- [13] Djuretic IM, Levanon D, Negreanu V, et al. Transcription factors T-bet and Runx3 cooperate to activate Ifng and silence Il4 in T helper type 1 cells [J]. *Nat Immunol*,2007,8:145-153.
- [14] Kohu K, Ohmori H, Wong WF, et al. The Runx3 transcription factor augments Th1 and down-modulates Th2 phenotypes by interacting with and attenuating GATA3 [J]. *J Immunol*,2009,183:7817-7824.
- [15] 中华医学会肝病学会, 中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2010年版)[J]. *中华肝脏病杂志*,2011,19:13-24.
- [16] Jiang YF, Ma ZH, Zhao PW, et al. Effect of thymosin- α_1 on T-helper 1 cell and T-helper 2 cell cytokine synthesis in patients with hepatitis B virus e antigen-positive chronic hepatitis B [J]. *J Int Med Res*,2010,38:2053-2062.
- [17] 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 [J]. *Mediators Inflamm*,2010,2010:143026.
- [18] Zheng Y, Huang Z, Chen X, et al. Effects of telbivudine treatment on the circulating CD4⁺ T-cell subpopulations in chronic hepatitis B patients [J]. *Mediators Inflamm*,2012,2012:789859.
- [19] 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*,2000,191:1269-1280.
- [20] Penna A, Del Prete G, Cavalli A, et al. Predominant T-helper 1 cytokine profile of hepatitis B virus nucleocapsid-specific T cells in acute self-limited hepatitis B [J]. *Hepatology*,1997,25:1022-1027.
- [21] Akpolat N, Yahsi S, Godekmerdan A, et al. Relationship between serum cytokine levels and histopathological changes of liver in patients with hepatitis B [J]. *World J Gastroenterol*,2005,11:3260-3263.
- [22] Maruyama T, McLachlan A, Iino S, et al. The serology of chronic hepatitis B infection revisited [J]. *J Clin Invest*,1993,91:2586-2595.
- [23] Brooks DG, Teyton L, Oldstone MB, et al. Intrinsic functional dysregulation of CD4 T cells occurs rapidly following persistent viral infection [J]. *J Virol*,2005,79:10514-10527.
- [24] Mendoza L. A network model for the control of the differentiation process in Th cells [J]. *Biosystems*,2006,84:101-114.
- [25] Mostoslavsky R, Alt FW, Bassing CH. Chromatin dynamics and locus accessibility in the immune system [J]. *Nat Immunol*,2003,4:603-606.

收稿日期: 2015-02-02