

CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ 调节性 T 细胞与黑龙江省 HIV/AIDS 患者病情相关性的研究 *

周 慧¹ 朱丽影² 迟立君³ 刘 畅¹ 颜炳柱⁴

(1 哈尔滨医科大学附属第一医院感染科 黑龙江 哈尔滨 150001 2 哈尔滨医科大学附属第四医院感染科 黑龙江 哈尔滨 150001 ; 3 哈尔滨医科大学附属第一医院神经内科 黑龙江 哈尔滨 150001 ; 4 哈尔滨医科大学附属第二医院感染科 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要 目的 :比较黑龙江省 HIV/AIDS 患者与健康对照者(healthy controls, HCs) 外周血 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ 调节性 T 细胞数量、免疫抑制功能的变化,探讨 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ 调节性 T 细胞在 HIV/AIDS 感染过程中的作用。方法:采用流式细胞仪检测 21 例 HIV/AIDS 患者及 20 例健康对照组的外周血 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ 调节性 T 细胞数量的百分比及绝对数量,采用共同培养方法检测 HIV/AIDS 患者外周血 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ 调节性 T 细胞免疫抑制功能的变化;实时荧光定量聚合酶链反应 (RT-FQ-PCR) 检测 HIV/AIDS 患者外周血 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ 调节性 T 细胞中 FoxP3mRNA 的表达。结果:黑龙江省 HIV/AIDS 患者外周血 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ 调节性 T 细胞比率明显高于 HCs (P<0.01),而 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ 调节性 T 细胞的绝对计数显著下降,且与 CD4⁺T 细胞绝对计数成反比,混合淋巴细胞共同培养结果显示 HIV/AIDS 患者外周血 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ 调节性 T 细胞的抑制功能无明显变化,HIV/AIDS 患者外周血 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ 调节性 T 细胞的 FoxP3 mRNA 相对表达量无显著变化。结论:黑龙江省 HIV/AIDS 患者 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ 调节性 T 细胞的数量变化与病情相关。

关键词 HIV/AIDS ;CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ 调节性 T 细胞 ;FoxP3

中图分类号 R512.6+2 **文献标识码** :A **文章编号** :1673-6273(2012)21-4031-05

The Frequency of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Regulatory T Cells Correlates to the Disease Progress of HIV/AIDS in Heilongjiang Province*

ZHOU Hui¹, ZHU Li-ying², CHI Li-jun³, LIU Chang¹, YAN Bing-zhu⁴

(1 Department of Infectious Disease, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, China; 2 Department of Infectious Disease, the Fourth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, China; 3 Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, China; 4 Department of Infectious Disease, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, China)

ABSTRACT Objective: To analyze the number, suppressive function of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatory T cells in peripheral blood from patients with HIV/AIDS and healthy controls and to investigate the role of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatory T cells in the process of HIV/AIDS. **Methods:** Flow cytometry was used to analyze the frequency of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatory T cells from 21 patients with HIV/AIDS and 20 healthy controls; Functional characterization of Tregs from the peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of patients and healthy controls were analyzed by suppression of proliferation by co-cultured effector CD4⁺CD25⁺ T cells. Foxp3 message (mRNA) expression level was assessed by quantitative real-time polymerase chain reaction. **Results:** A significantly increased relative frequency of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatory T cells within the CD4 compartment of HIV/AIDS patients compared to that of healthy controls (P<0.0001) was observed. Additionally, there was a significant negative correlation between the frequency of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatory T cells and CD4 count, despite HIV/AIDS patients having lower absolute counts of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatory T cells. On the other hand, HIV/AIDS-derived CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T cells and that from healthy individuals exhibited equal FOXP3-expression of mRNA and their ability of suppressing the proliferation and cytokine secretion of CD4⁺ effector T cells was unimpaired in HIV/AIDS patients. **Conclusions:** These results suggest that the frequency of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatory T cells in HIV/AIDS patients of Heilongjiang Province significantly correlated with disease progression.

Key words: HIV/AIDS; CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatory T cells; FoxP3

Chinese Library Classification: R512.6+2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)21-4031-05

前言

人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)的

持续存在、CD4⁺T 细胞进行性减少及过度的免疫活化是 HIV 感染的三大重要特征。HIV 感染与抗 HIV 免疫反应的无能状态导致机体免疫功能部分或完全丧失,继而发生机会性感染、

* 基金项目:黑龙江省教育厅基金资助(11541243)

作者简介:周慧(1974-)女,副主任医师,博士,主要从事传染病的基础与临床研究。

E-mail:zh70422@yahoo.com.cn

(收稿日期:2012-03-11 接受日期:2012-04-06)

恶性肿瘤等^[1]。而 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 调节性 T 淋巴细胞是近年来研究发现的人体内一群具有独特免疫调节功能的 CD4⁺T 细胞亚群,在维持自身免疫耐受中发挥重要作用^[2]。近期研究发现,CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 调节性 T 细胞的过度表达还可能与某些感染性疾病的病原体长期存在难以清除相关。Foxp3 是控制 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 调节性 T 细胞发育和功能的关键基因,是 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 细胞的一个特征性标志^[3]。本研究在单细胞水平定义黑龙江省 HIV 感染者 PBMC 中的 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 调节性 T 细胞,并对其表达水平与 HIV/AIDS 疾病病情相关性进行了研究。

1 材料和方法

1.1 研究对象

21 例未经抗病毒治疗的 HIV/AIDS 患者来自中国黑龙江省,其中男性 12 例,女性 9 例,年龄分布为 30-58 岁(41.2±12.3)。HIV 及 AIDS 诊断标准参照美国疾病控制中心(Centers for Disease Control, CDC)修订,于 1993 年 1 月 1 日起实行的 HIV/AIDS 分类标准,所有病例均经蛋白印迹试验确证为 HIV 感染。传播途径为血液传播及性传播,所有标本均在接受抗病毒治疗前采集。

1.2 材料

改良型 RPMI-1640 培养基(美国 HyClone 公司)、聚蔗糖-泛影葡胺分层液(淋巴细胞分离液 Ficoll, 天津), CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 调节性 T 细胞分选试剂盒(挪威 Dynal 公司), RNA 提取试剂盒(德国 QIAGEN 公司),引物及探针由上海生工公司合成。流式抗体 Foxp3-FITC 染色试剂盒及同型对照、CD3-Percep、CD4-APC、CD25-PE、Multitest CD3/CD4/CD8 检测试剂盒均购自美国 BD 公司。

1.3 方法

1.3.1 外周血 Tregs 细胞检测 密度梯度离心方法分离外周血中单个核细胞(PBMC),用 PBS 液洗涤 2 次,并重悬浮细胞。分离 PBMC 后取出约 1×10⁶ 细胞/管,加入 CD3-Percep 荧光抗体 20μL, CD4-APC 荧光抗体 5μL, CD25-PE 荧光抗体 20μL,同时设平行对照管,在 4℃、避光条件下孵育 20 min,再用 1×PBS 1 mL, 1500 r/min 离心 5 min,重复清洗 2 遍,后弃上清。按照试剂盒要求,加入固定液 2 mL,在室温避光条件下 10 min 孵育,以 1500 r/min 离心 5 min,弃上清,加入配制的破膜剂 500μL,室温避光孵育 30 min,500 g 离心 5 min,然后进行固定破膜,进而加入 Foxp3-FITC 抗体 20μL,室温下避光 30 min,用 1×PBS 清洗细胞 2 遍,弃上清,加 PBS 重悬细胞,混匀,用 FACS Calibur 流式细胞仪及 Cell Quest 软件上机检测,流式结果采用 FlowJo v5.7.2 软件分析。

1.3.2 人外周血 Tregs 的分选及纯化 (1) 阴性分选 CD4⁺T 淋巴细胞:应用 1000μL MACS 缓冲液重新悬浮已制备的 PBMC,按说明书指导加入 200μL 胎牛血清,100μL CD4 混合抗体与 100μL CD45RA mAb,在 2~8℃下孵育 10min,离心后,弃上清,洗涤并去除剩余抗体;再 9ml MACS 缓冲液重新悬浮 PBMC;加入 1mL Depletion Dynabeads®,室温下孵育 15min,放置离心管于 MACS 磁力架 2min,获取上清,即为 CD4⁺T 淋巴细胞悬液。

(2) 阳性分选 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ 调节性 T 细胞:应用 1mL MACS 缓冲液重新悬浮获取的 CD4⁺T 淋巴细胞,加入 250μL CD25 磁珠 (Dynabeads® CD25),4~8℃下孵育 20min,促使 CD25 磁珠与 CD25⁺T 淋巴细胞充分结合,置于 MACS 磁力架 2min,吸出上清,获得 CD4⁺CD25⁺T 淋巴细胞,贴壁为 CD4⁺CD25⁺T 淋巴细胞与 CD25 磁珠的结合体;100μL MACS 缓冲液重悬浮结合体,加入 60μL DETACHaBEAD,孵育 50~60min,洗脱 CD4⁺CD25⁺T 细胞连接的 CD25 磁珠;置于 MACS 磁力架 2min,获取上清中 CD4⁺CD25⁺T 淋巴细胞。

1.3.3 Tregs 的功能检测 采用 96 孔板进行共同培养的方法来测定纯化的 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ 调节性 T 细胞的抑制功能,具体操作如下:应用小牛血清悬浮 RPMI 介质,悬浮培养液中按不同比例 (0:1, 1:1, 1:1/2, 1:1/4, 1:1/8 及 1:0) 加入 CD4⁺CD25⁺T 细胞和 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ 调节性 T 细胞,可溶性抗-CD3 及可溶性抗-CD28 抗体作为培养刺激物,每个培养孔中加入 1×10⁴ 个被照射过的外周血单个核细胞作为抗原递呈细胞。加入培养液至每孔终末液体量为 200μL,在 37℃培养箱中抚育 4 天。然后在每个培养孔中加入 1 μCi [3H] 抚育 18 小时,同时设未加 [3H] 为实验本底。收集细胞,在液闪计数器上测分钟脉冲数,结果用 cpm±SEM 表达。采用双抗体夹心 ELISA 法对外周血细胞培养上清中的 IFN-γ 进行检测。

1.3.4 RT-PCR 检测 Foxp3 mRNA 表达水平 (1) 总 RNA 提取及 cDNA 的合成:CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ 调节性 T 细胞总 RNA 的提取按着 TRIzol(上海生工公司产品)试剂产品说明书进行,采用琼脂糖凝胶电泳法鉴定 RNA 的质量,应用吸光度扫描计算总 RNA 的浓度。取细胞总 RNA 5μg,50pmol/L Oligo(dT)162μL,2.5mmol/L dNTP 3μL,DEPC 处理的双蒸水补充至 34μL,放入冰水中进行离心,依次加入 M2MLV5X 逆转录酶缓冲液 10μL,0.1mmol/L DDT 4μL, M2MLV 逆转录酶 200U,37℃ 60min,70℃ 15 min 后中止反应。所得 cDNA 置于 -20℃保存。

(2) RT-PCR 检测 Foxp3 mRNA 表达水平:由上海生工公司设计合成 Foxp3 引物,将 Foxp3 引物用无 RNA 酶的灭菌双蒸水溶解为 20μmol/L,在 -20℃下保存备用。Foxp3 引物序列如下:上游引物 5'TTCGAAGAGCCAGAGGACTT3',下游引物:5'GCTGCTCCAGAGACTGTACC3'。PCR 反应条件 93℃ 5min,扩增 40 个循环(93℃ 30sec,55℃ 30sec,72℃ 30sec)。为消除样本在提取、逆转录及反应过程中所造成的误差,本实验采用 FoxP3 mRNA 与 β-actin mRNA 比值,即 FoxP3 mRNA 的相对水平,作为评价 FoxP3 mRNA 表达的指标。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 10.0 软件进行数据分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异比较采用两独立样本 t 检验, P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HIV/AIDS 患者外周血中 Tregs 数量的改变

HIV/AIDS 患者组与正常对照组比较,外周血中 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ 调节性 T 细胞占 CD4⁺T 淋巴细胞的百分比明显升高,见图 1;随着 CD4⁺T 细胞计数的降低,CD4⁺

CD25⁺FoxP3⁺ 调节性 T 细胞的百分比逐渐升高,二者呈明显负相关,见图 2;与正常对照组比较,HIV/AIDS 患者组 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ 调节性 T 细胞的绝对计数明显降低。

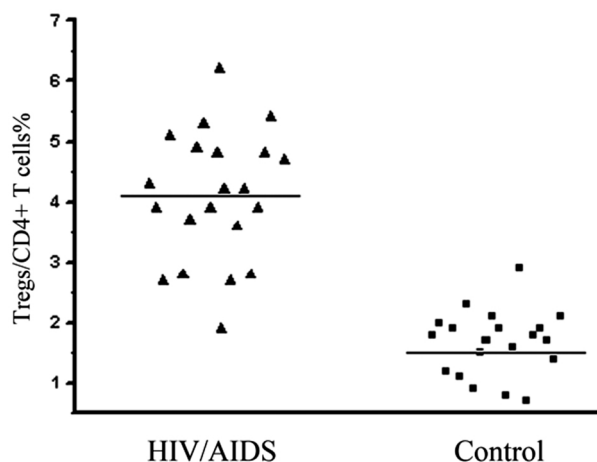


图 1 HIV/AIDS、健康对照组 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ 调节性 T 细胞表达水平

Fig.1 The proportions of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T cells in HIV/AIDS patients and controls

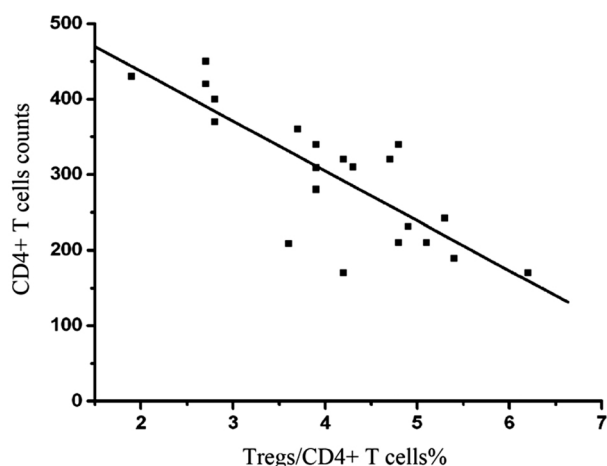


图 2 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ 调节性 T 细胞百分比与 CD4⁺ 细胞计数的相关性

Fig.2 The relationship between the percentage of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T cells and the counts of CD4⁺ T cells

2.2 HIV/AIDS 患者外周血中 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ 调节性 T 细胞抑制功能的检测

通过调整磁珠的作用时间达到分离纯化出单一的 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ 调节性 T 细胞和 CD4⁺CD25⁻ 细胞的目的。经检测,来自患者与对照组外周血中的 CD4⁺CD25⁻ 细胞在可溶性抗-CD3 和抗-CD28 的刺激下表现出同样强度的增值能力,而纯化的 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ 调节性 T 细胞对此种刺激表现为增殖无能。说明分离纯化达到了进一步进行功能测定的要求。

当 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ 调节性 T 细胞与同源性 CD4⁺CD25⁻ 细胞以不同比例共同培养时(CD4⁺CD25⁻/CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ ratios: 0:1, 1:1, 1:1/2, 1:1/4, 1:1/8 和 1:0),如图所示,HIV/AIDS 患者与对照组 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ 调节性 T 细胞表现出相似的抑制功能,随着 CD4⁺CD25⁻ 比例的升高,抑制百分率逐渐降低,两组之间无显著差异,见图 4A。

2.3 上清液中细胞因子 INF γ 的测定结果

CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ 调节性 T 细胞不仅能够抑制效应性 CD4⁺CD25⁻ T 的增殖,同时也能够抑制细胞因子的产生。因此,我们测定共同培养的上清液中 IFN γ 的浓度。如图 2B 所示,单独培养对照组或 HIV/AIDS 患者组的 CD4⁺CD25⁻ T 都产生大量的 IFN γ ,而单独培养 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ 调节性 T 细胞上清液中含少量的 IFN γ 。分别将 HIV/AIDS 患者和对照组的 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ 调节性 T 细胞与 CD4⁺CD25⁻ T 细胞按 1:1 比率共同培养,结果 IFN γ 的分泌明显受到抑制,HIV/AIDS 患者组与对照组的 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ 调节性 T 细胞抑制 IFN γ 的分泌作用无显著差异,见图 4B。

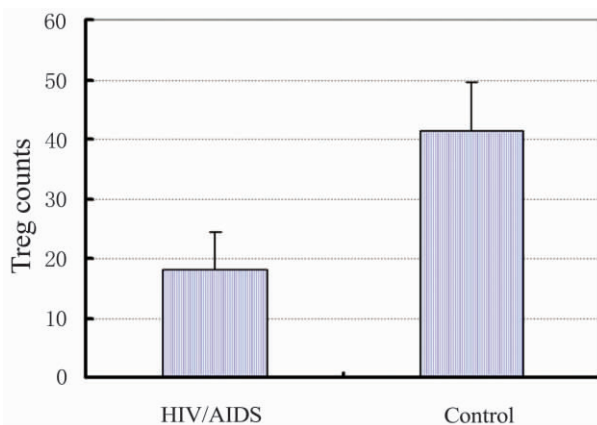


图 3 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ 调节性 T 细胞绝对计数

Fig.3 The counts of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T cells

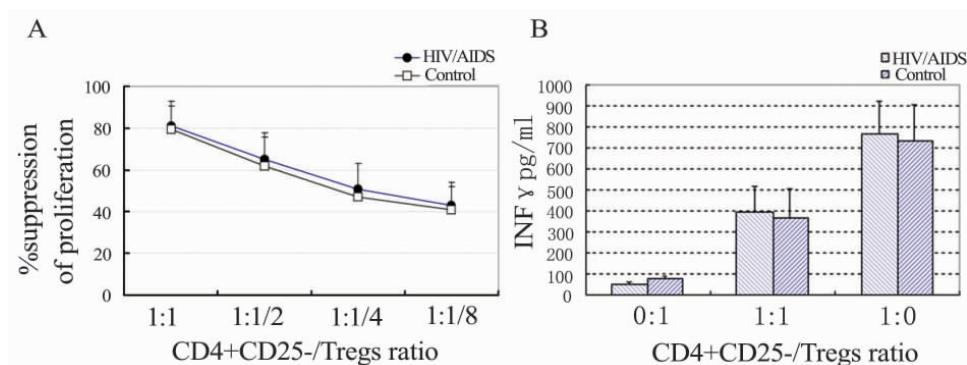


图 4 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ 调节性 T 细胞抑制功能比较

Fig.4 The regulatory function of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T cells

2.4 FoxP3 mRNA 转录水平检测

如图3所示,与正常对照组相比较,HIV/AIDS患者组外周血CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺调节性T细胞中FoxP3 mRNA相对表达量无明显变化($P>0.05$)。

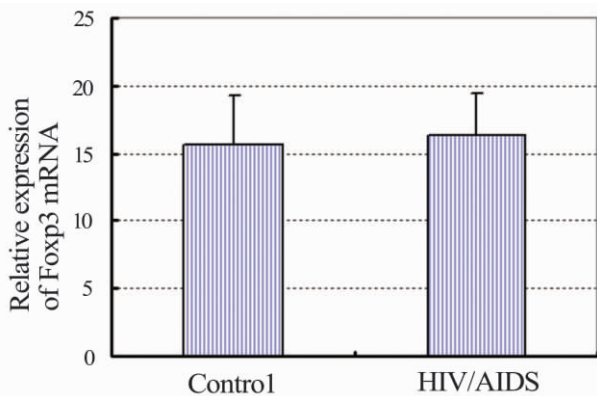


图5 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺调节性T细胞FoxP3 mRNA相对表达量

Fig.5 The expression levels of FoxP3⁺ of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T cells

3 讨论

HIV持续存在使机体免疫系统功能部分或完全丧失,从而使机体易患感染、恶性肿瘤、自身免疫病等。迄今尚无有效的抗HIV病毒的药物及疫苗问世,因此,寻求有效的治疗靶点迫在眉睫。Sakaguchi等^[4]于1995年首次发现将去除了CD4⁺CD25⁺Tregs的T细胞转移到裸鼠体内会引发多种自身免疫性疾病,而当将CD4⁺CD25⁺Tregs细胞同时输入时则可抑制疾病的发生。随着对免疫耐受机制研究的不断深入,目前越来越多的证据表明,CD4⁺CD25⁺Tregs在维持自身免疫耐受,抑制免疫应答反应中发挥着不可替代的作用。同时,大量的研究表明CD4⁺CD25⁺Tregs的发现为治疗自身免疫性疾病、诱导肿瘤免疫及移植免疫耐受等提供了新思路^[5-7]。由于CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺调节性T细胞具有独特的免疫调节作用而日渐受到关注,近来的研究表明,其与艾滋病的发生发展关系密切。CD4⁺T细胞的逐渐缺失、过度的免疫活化以及病毒的持续存在是HIV感染的三大重要特征。由于CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺调节性T细胞表达CD4,因此它们亦为HIV的潜在靶点^[8,9]。

目前,关于CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺调节性T细胞在HIV感染中的变化规律研究结论不尽相同。有些研究认为,HIV感染者CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺调节性T细胞的数量明显高于健康人群,并且随着CD4⁺T细胞数量的降低,CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺调节性T细胞的数量却明显增加^[10];然而,另一些实验表明CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺调节性T细胞的绝对数量随着CD4⁺T细胞的下降而下降^[11]。Aandahl等^[12]的研究虽然发现HIV感染可导致CD4⁺CD25⁺T细胞向CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺调节性T细胞转化,但并未观察到HIV感染者CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺调节性T细胞水平高于健康对照组这一现象。国外研究表明,CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺调节性T细胞可特异性识别HIV抗原,抑制HIV特异性CD4⁺、CD8⁺T细胞免疫应答^[13-15],其数量升高与CD4⁺T细胞数量降低及Th1型向Th2型免疫应答转变相关^[16-18],可抑制HIV感染者免疫系统活化。上述结果提示,在HIV感染中,

CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺调节性T细胞发挥了“双刃剑”的作用,既可抑制HIV特异性T细胞功能,有利于病毒复制,对免疫功能造成损伤,同时又能抑制HIV引起的异常免疫活化,降低活化引起的凋亡,对免疫功能具有一定的保护作用。

我们的研究结果表明,黑龙江省HIV/AIDS患者外周血CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺调节性T细胞比率明显高于正常对照组($P<0.01$),而CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺调节性T细胞的绝对计数显著下降,且与CD4⁺T细胞绝对计数成反比在功能方面,在抑制功能方面,HIV/AIDS患者CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺调节性T细胞不仅抑制效应细胞的增殖,同时抑制细胞因子的产生,与对照组无显著差异。由于淋巴组织是HIV在体内复制的主要场所,推测外周血CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺调节性T细胞的减少可能与其优先集中至HIV复制较严重的淋巴结相关。对HIV进展期患者淋巴结的活检发现,其淋巴结内FoxP3 mRNA的水平远高于经过有效治疗的患者。国外研究表明^[19,20],CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺调节性T细胞对多克隆和特异性的抗原刺激具有低反应性和反应无能,用不同的抗原刺激从HIV/AIDS患者外周血获得的CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺调节性T细胞,发现其增殖反应极其微弱,但以相同的抗原刺激CD4⁺CD25⁺T细胞却能引起明显的增殖反应;其次,CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺调节性T细胞能够抑制由HIV引起的CD4⁺T细胞的增殖,不同比例的CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺调节性T细胞和CD4⁺CD25⁺T细胞混合培养后发现,随着CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺调节性T细胞比例的增加,CD4⁺CD25⁺T细胞的增殖越来越弱,呈现剂量依赖的特点。

综上所述,HIV/AIDS与CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺调节性T细胞密切相关。因此,深入了解CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺调节性T细胞对HIV/AIDS患者的作用有助于设计抗HIV的方案,并有望为艾滋病的治疗提供新的靶点。

参考文献(References)

- [1] Eggena MP, Vaccari M, Nilsson J, et al. T cell activation in HIV-seropositive Ugandans: differential associations with viral load, CD4⁺ T cell depletion, and coinfection [J]. *J Infect Dis*, 2005, 191: 694-701
- [2] Baecher-Allan C, Wolf E, Hafler DA. Functional analysis of highly defined, FACS-isolated populations of human regulatory CD4⁺CD25⁺T cells [J]. *Clin Immunol*, 2005, 115(1): 10-18
- [3] Kim JM, Rudensky A. The role of the transcription factor Foxp3 in the development of regulatory T cells [J]. *Immunol Rev*, 2006, 212: 86-98
- [4] Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, et al. Immunologic self-tolerance, maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance cause various autoimmune disease [J]. *Immunol*, 1995, 155(3): 1151-1164
- [5] Nilsson J, Boasso A, Velilla PA, et al. HIV-1-driven regulatory T-cell accumulation in lymphoid tissues is associated with disease progression in HIV/AIDS [J]. *Blood*, 2006, 108: 3808-3817
- [6] De St Groth BFL, Alan LB. Regulatory T cells in HIV infection: pathogenic or protective participants in the immune response? [J]. *AIDS*, 2008, 22: 671-683
- [7] Sousa AE, Carneiro J, Meier-Schellersheim M, et al. CD4 T Cell Depletion Is Linked Directly to Immune Activation in the Pathogenesis

- of HIV-1 and HIV-2 but Only Indirectly to the Viral Load [J]. *J Immunol*, 2002, 169: 3400-3406
- [8] Kinter AL, Horak R, Sion M, et al. CD25⁺ regulatory T cells isolated from HIV-infected individuals suppress the cytolytic and nonlytic antiviral activity of HIV-specific CD8⁺ T cells in vitro [J]. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2007, 23: 438-450
- [9] Weiss L, Donkova-Petrini V, Caccavelli L, et al. Human immunodeficiency virus-driven expansion of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells, which suppress HIV-specific CD4 T-cell responses in HIV-infected patients [J]. *Blood*, 2004, 104: 3249-3256
- [10] Tsunemi S, Iwasaki T, Imado T, et al. Relationship of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells to immune status in HIV infected patients [J]. *AIDS*, 2005, 19: 879-886
- [11] Kinter A L, Hennessey M, Bell A, et al. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells from the peripheral blood of asymptomatic HIV infected individuals regulate CD4 (+) and CD8 (+) HIV-specific T cell immune responses in vitro and associated with favorable clinical markers of disease status [J]. *J Exp Med*, 2004, 200: 331-343
- [12] Aandahl EM, Michaëlsson J, Moretto WJ, et al. Human CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells control T-cell responses to human immunodeficiency virus and cytomegalovirus antigens [J]. *J Virol*, 2004, 78(5): 2454-2459
- [13] Oswald-Richter K, Grill SM, Shariat N, et al. HIV infection of naturally occurring and genetically reprogrammed human regulatory T-cells [J]. *PLoS Biol*, 2004, 2: E198
- [14] Apoil PA, Puissant B, Roubinet F, et al. FOXP3 mRNA levels are decreased in peripheral blood CD4⁺ lymphocytes from HIV positive patients [J]. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2005, 39: 381-385
- [15] Lim A, Tan D, Price P, et al. Proportions of circulating T cells with a regulatory cell phenotype increase with HIV-associated immune activation and remain high on antiretroviral therapy [J]. *AIDS*, 2007, 21: 1525-1534
- [16] Montes M, Lewis DE, Sanchez C, et al. Foxp3⁺ regulatory T cells in antiretroviral-naïve HIV patients [J]. *AIDS*, 2006, 20: 1669-1671
- [17] Rallon NI, Lopez M, Soriano V, et al. Level, phenotype and activation status of CD4⁺FoxP3⁺ regulatory T cells in patients chronically infected with human immunodeficiency virus and/or hepatitis C virus [J]. *Clin Exp Immunol*, 2009, 155: 35-43
- [18] Gaardbo JC, Nielsen SD, Vedel SJ, et al. Regulatory T cells in human immunodeficiency virus-infected patients are elevated and independent of immunological and virological status, as well as initiation of highly active anti-retroviral therapy [J]. *Clin Exp Immunol*, 2008, 154: 80-86
- [19] Kolte L, Gaardbo JC, Skogstrand K, et al. Increased levels of regulatory T cells (Tregs) in human immunodeficiency virus-infected patients after 5 years of highly active anti-retroviral therapy may be due to increased thymic production of naïve Tregs [J]. *Clin Exp Immunol*, 2009, 155: 44-52
- [20] Tsunemi S, Iwasaki T, Imado T, et al. Relationship of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells to immune status in HIV-infected patients [J]. *AIDS*, 2005, 19: 879-886

(上接第 4030 页)

- Wu Ping, Chunyan Xue, Zhen-ping Huang, et al. Alpha cyanoacrylate used in rabbit corneal penetrating injury research [J]. *Journal of Medical Postgraduates*, 2008, 01(2): 61-63
- [10] B Mulholland, SJ Tuft and PT Khaw Matrix. Metalloproteinase distribution during early corneal wound healing [J]. *Eye*, 2007, 19(4): 584-588
- [11] Nakano Y, Oyamada M, Dai P, et al. Connexin43 Knockdown Accelerates Wound Healing but Inhibits Mesenchymal Transition after Corneal Endothelial Injury In Vivo [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2008, 49(4): 93-104
- [12] Andrea L. Blitzer, Lampros Panagis, G. Luca Gusella, et al. Primary cilia dynamics instruct tissue patterning and repair of corneal endothelium [J]. *PNAS*, 2010, 108(7): 2819-2824
- [13] D. Kampik, R.R. Ali, D.F.P. Larkin. Experimental gene transfer to the corneal endothelium [J]. *Experimental Eye Research*, 2012, 95(1): 54-59
- [14] Van Dooren BT, Mulder PG, Nieuwendaal CP, et al. Endothelial cell density after posterior lamellar keratoplasty: five- to seven-year follow-up [J]. *Am J Ophthalmol*, 2007, 144(47): 1-3
- [15] Yamagami S, Yokoo S, Mimura T, et al. Distribution of precursors in human corneal stromal cells and endothelial cells [J]. *Ophthalmology*, 2007, 114(43): 3-9
- [16] Claerhout I, Beele H, Kestelyn P, et al. Endothelial cell loss [J]. *Int Ophthalmol*, 2008, 28(1): 65-67
- [17] Mimura T, Joyce NC. Replication competence and senescence in central and peripheral human corneal endothelium [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2006, 47(13): 87-96
- [18] Tseng SC. Regulation and clinical implications of corneal epithelial stem cells [J]. *Mol Biol Rep*, 1996, 23(4): 47-58
- [19] Koizumi N, Inatomi T, Suzuki T, et al. Cultivated corneal epithelial stem cell transplantation in ocular surface disorders [J]. *Ophthalmology*, 2001, 108(15): 69-74
- [20] Thompson CG, Kumar N, Billson FA, et al. The aetiology of perforating ocular injuries in children [J]. *Br J Ophthalmol*, 2002, 86(8): 920-922
- [21] McGwin G, Jr, Hall TA, Xie A, et al. Trends in eye injury in the United States, 1992-2001 [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2006, 47 (2): 521-527