

日本血吸虫感染小鼠 CD8⁺T 细胞亚群的变化及其与肝脏免疫病理的相关性研究

俞 敏,陈梦星,徐志鹏,许 磊,陈晓军,周 莎,朱继峰,李 薇,金 鑫,宋 娴,李亚琳,张 阳,刘 丰,苏 川*
(南京医科大学病原生物系,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:研究 CD8⁺T 细胞中 Tc1(CD3⁺CD8⁺ IFN- γ ⁺)、Tc2(CD3⁺CD8⁺IL-4⁺)和调节性 CD8⁺T 细胞(CD8⁺CD28⁻)亚群在日本血吸虫感染导致的小鼠肝脏免疫病理发生发展中可能的作用。方法:取正常小鼠及日本血吸虫感染 8 周的小鼠脾脏淋巴细胞,采用流式细胞术检测 Tc1、Tc2 和调节性 CD8⁺T 细胞亚群分别占 T 淋巴细胞的比例及绝对数量,并分析感染血吸虫不同时期的 CD8⁺T 细胞亚群与血吸虫感染小鼠肝脏肉芽肿和肝纤维化指标的关系。结果:与正常对照小鼠比较,日本血吸虫感染后小鼠脾脏的单个核细胞绝对数显著增加($P < 0.001$);日本血吸虫感染小鼠脾脏中 T 细胞(CD3⁺)和 CD8⁺T 细胞(CD3⁺CD8⁺)的比例及绝对数均显著增加(P 均 < 0.05);此外,感染小鼠脾脏淋巴细胞中 Tc1、Tc2、调节性 CD8⁺T 比例均显著增加(P 均 < 0.001);与正常小鼠相比,感染小鼠 Tc2/Tc1 比率显著增加($P < 0.001$)。此外,多元线性逐步回归分析显示 Tc2 和调节性 CD8⁺T 细胞是影响血吸虫感染所致肝脏免疫病理的主要影响因素。结论:CD8⁺T 细胞及其 Tc1、Tc2、调节性 CD8⁺T 细胞亚群在日本血吸虫感染宿主的肝脏肉芽肿和纤维化发生发展中可能发挥重要作用。其中,Tc2 和调节性 CD8⁺T 细胞可能分别促进/抑制血吸虫感染所致的肝脏免疫病理。

[关键词] CD8⁺T 细胞;肉芽肿;纤维化;日本血吸虫

[中图分类号] R383.24

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)11-1497-07

doi: 10.7655/NYDXBNS20151101

The association between CD8⁺ T cell subsets and immunopathology during *Schistosoma japonicum* infection

Yu Min, Chen Mengxing, Xu Zhipeng, Xu Lei, Chen Xiaojun, Zhou Sha, Zhu Jifeng, Li Wei, Jin Xin, Song Xian, Li Yalin, Zhang Yang, Liu Feng, Su Chuan*

(Department of Pathogen Biology, NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] Objective: To study the role of CD8⁺T cell subsets in the development of liver immunopathology after *Schistosoma japonicum* (*S. japonicum*) infection. **Methods:** Splenocytes were prepared from spleens of mice with *S. japonicum* infection at 0 and 8 weeks, and the proportions of Tc1, Tc2 and CD8⁺T regulatory cells in T cells were determined by FACS. The relationship between CD8⁺T cell subsets and liver immunopathology were analyzed. **Results:** Compared to the control group, the spleen mononuclear cells (MNC) in *S. japonicum* infected mice were increased significantly ($P < 0.001$). In addition, the proportions and the absolute numbers of T cells and CD8⁺T cells in spleen of *S. japonicum* infected mice were significantly increased (all $P < 0.05$). Furthermore, the proportions of Tc1, Tc2 and CD8⁺T regulatory cells were significantly increased at 8 weeks post-infection (all P values < 0.05) and the proportions of Tc2 cells increased more significantly than Tc1 cells. Multiple linear regression analysis showed that Tc2 and regulatory CD8⁺T cells were the main factors affecting liver immunopathology during *S. japonicum* infection. **Conclusion:** Tc1, Tc2 and CD8⁺T regulatory cells in splenocytes increased significantly after *S. japonicum* infection. Tc2 and regulatory CD8⁺T cells play critical roles in promoting and inhibiting the liver immunopathology, respectively.

[Key words] CD8⁺T cells; granulomas; fibrosis; *Schistosoma japonicum*

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(11): 1497-1503]

[基金项目] 国家自然科学基金(81430052, 81271861)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: chuansu@njmu.edu.cn

血吸虫病仍然是一种严重危害人类健康的重大公共卫生问题。血吸虫感染对宿主最严重的影响是虫卵诱发的由多种免疫因素共同参与的免疫性肝脏肉芽肿以及纤维化并继发肝硬化,从而对宿主造成严重的免疫病理损伤^[1-2]。因此,公认血吸虫病是一种重要的免疫相关性疾病,其中,T 细胞免疫应答在宿主针对日本血吸虫感染的免疫应答中发挥着重要作用^[2]。迄今,绝大多数研究主要集中于探讨 CD4⁺ T 细胞及其亚群在血吸虫感染免疫病理进程中的抑制或促进作用^[3],而关于 CD8⁺ T 细胞及各个亚群在血吸虫感染过程的变化,及其与肝脏免疫病理发生发展关系的研究尚少报道。

CD8⁺ T 细胞在不同抗原刺激下可主要分化为 3 个亚群^[4-5]:分泌大量 γ 干扰素(IFN- γ)的 Tc1 细胞,分泌白介素 IL-4、IL-5、IL-10、IL-13 为主的 Tc2 细胞以及分泌 IL-10 为主的调节性 CD8⁺(CD8⁺CD28⁻)T 细胞。目前研究认为,Tc1 和 Tc2 细胞主要参与抗病毒^[6]、移植排斥^[7]、肿瘤免疫^[8]及过敏反应^[9-10]等功能;而调节性 CD8⁺ T 细胞则具有重要免疫调节功能^[11-14]。本研究采用流式细胞术观察并比较正常及日本血吸虫感染小鼠的脾脏 CD8⁺ T 细胞及各个亚群的变化,并分析其与感染不同时期肝脏免疫病理的相关性,从而探讨 CD8⁺ T 细胞各个亚群在日本血吸虫感染所致的肝脏免疫病理发生发展过程中可能发挥的调节功能。

1 材料与方 法

1.1 材 料

清洁级 8 周龄雌性 ICR 小鼠(上海 SLAC 实验动物有限公司),日本血吸虫感染性钉螺(江苏省血吸虫病防治研究所)。

仓鼠抗小鼠 CD3-APC、大鼠抗小鼠 CD4-FITC、大鼠抗小鼠 CD8-FITC、大鼠抗小鼠 IFN- γ -PE、大鼠抗小鼠 CD28-PE、大鼠抗小鼠 IL-4-PE 等流式抗体(eBioscience 公司,美国),同型对照抗体采用大鼠 IgG2a 单克隆抗体(eBioscience 公司,美国);破膜固定剂(Fix/Perm Cell Permeabilization Kit,Invitrogen 公司,美国),蛋白质转运抑制剂(GolgiStop,BD 公司,美国);细胞培养用 RPMI1640 培养液、胎牛血清(FCS)、青霉素-链霉素(PS 双抗)等(Gibco 公司,美国),使用前按照 89:10:1 比例配制成完全 1640 培养液;红细胞裂解液:10.0 mmol/L 碳酸氢钾、155.0 mmol/L 氯化铵、0.1 mmol/L EDTA 加 ddH₂O 至 1 000 mL,调 pH 值至 7.2~7.4,高压灭菌。

1.2 方 法

1.2.1 动物模型建立

取 8 周龄雌性 ICR 小鼠,每鼠经腹部皮肤感染日本血吸虫尾蚴(12 ± 1)条(由日本血吸虫感染性钉螺溢出)。

1.2.2 单个淋巴细胞悬液制备

在感染前(0 周)和 8 周,将小鼠(每组 6 只)断颈处死,无菌条件下取脾脏并以注射器针芯推挤脾细胞至碎,将细胞通过尼龙膜(200 孔/25.4 mm)以制成单个细胞。1 500 r/min 离心 5 min,弃去上清,用红细胞裂解液裂解红细胞后以 PBS 缓冲液洗涤 2 次,以完全 1640 细胞培养液重悬后即制备成单个脾淋巴细胞悬液。

1.2.3 Tc1 和 Tc2 细胞比例检测

将上述每组小鼠的单个脾淋巴细胞分别以完全 1640 培养液调节浓度至 2×10^6 个/mL。在反应体系中加入 25 ng/mL 佛波酯(PMA)、1 μ g/mL 离子霉素及 0.66 μ L/mL GolgiStop,置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养 6 h。将细胞用 PBS 缓冲液洗 1 遍并重悬于 100 μ L PBS 缓冲液中,加入 CD3-APC(0.2 mg/mL)和 CD8-FITC(0.5 mg/mL)抗体,充分混匀后于室温避光孵育 20 min。以缓冲液洗 1 遍,加入 100 μ L Fix/Perm A 液并于室温避光孵育 15 min。1 500 r/min 离心后弃去上清,以 100 μ L Fix/Perm B 液重悬细胞后,分别加入同型对照 IgG2a 抗体(0.2 mg/mL)、抗 IFN- γ -PE(0.2 mg/mL)或抗 IL-4-PE(0.2 mg/mL)抗体,置 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 20 min。以 PBS 缓冲液洗 1 遍后,以 500 μ L PBS 缓冲液重悬细胞后用流式细胞仪(FACS Calibur,Becton Dickinson 公司,美国)检测。

1.2.4 CD8⁺调节性 T 细胞比例检测

将上述每组小鼠的单个脾淋巴细胞(2×10^6 个)用 PBS 缓冲液洗 1 遍并重悬于 100 μ L PBS 缓冲液中,加入 CD8-FITC(0.5 mg/mL)和 CD28-PE(0.1 mg/mL)抗体,充分混匀后于室温避光孵育 20 min。以 PBS 缓冲液洗 1 遍,以 500 μ L PBS 缓冲液重悬细胞后用流式细胞仪(FACS Calibur,Becton Dickinson 公司,美国)检测。

1.2.5 细胞绝对计数

镜下通过计数板直接计算得到脾脏单个核细胞(mononuclear cells,MNC)的细胞密度:细胞密度(个/mL)=(4 个大方格的细胞总数/4) $\times 10^4 \times$ 稀释倍数。通过流式细胞术检测得各个细胞亚群的比例及对应的细胞数目(c),再根据总 MNC(a)以及流式上样细胞数目(b)来换算出该亚群的绝对数目: $n = a \times c / b$ 。

1.2.6 肝脏病理切片

虫卵肉芽肿:分别取血吸虫感染后 3、5、8、13 周小鼠的肝脏以 10% 中性福尔马林固定,石蜡包埋,切片厚 4 μm,常规做 HE 染色,并于显微镜下检查。用计算机辅助形态分析系统(Zeiss 公司,德国)测定肉芽肿的大小,每只小鼠观察 50 个肝区视野(每只小鼠肝脏划分为 10 个区域,每个区域任意镜检 5 个视野)。

肝脏纤维化:对肝组织石蜡切片行天狼星红-苦味酸染色,偏振光显微镜(Zeiss 公司,德国)下阅片,利用 Image-Pro-Plus 6.0 图像分析软件对肝组织总胶原进行定量,每个切片随机选取 6 个视野进行计算^[15-16]。

1.3 统计学方法

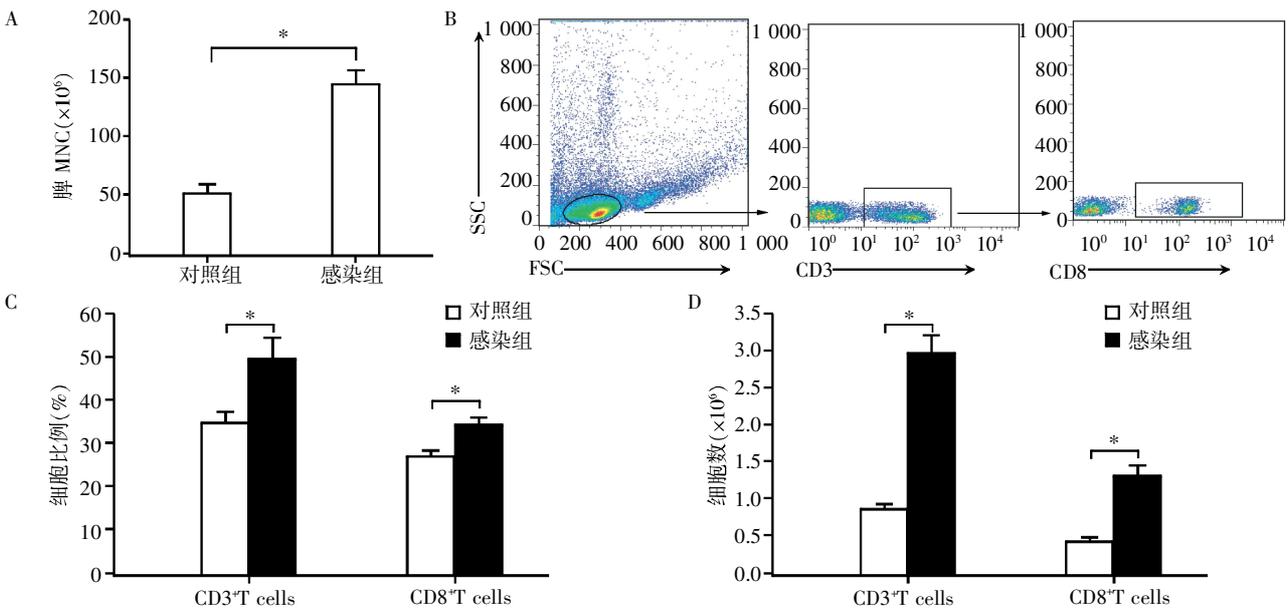
统计作图用 GraphPad Prism5.0 软件,采用 SPSS19.0 软件进行统计分析。两组间差异比较采用

Student's *t* 检验,CD8⁺T 细胞的各个亚群与肝脏免疫病理的关系采用多元线性逐步回归分析, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 日本血吸虫感染后脾脏淋巴细胞中 CD8⁺T 细胞变化

与正常小鼠比较,日本血吸虫感染 8 周(血吸虫感染小鼠肝脏肉芽肿反应最强的时间点)小鼠的脾脏 MNC 绝对数显著增加($P < 0.001$,图 1A)。与正常小鼠比较,日本血吸虫感染小鼠脾淋巴细胞中 T 细胞(CD3⁺)的比例显著增加($P < 0.01$,图 1B~C),其中 CD8⁺T 细胞(CD3⁺CD8⁺)的比例显著增加($P < 0.05$,图 1B~C)。此外,感染小鼠的脾脏 CD3⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞的绝对数亦均显著高于正常对照小鼠($P < 0.01$,图 1D)。



A: 对照组和感染组脾脏 MNC 计数统计分析结果, * $P < 0.001$ ($n=12$); B: 在脾脏 MNC 中选定淋巴细胞群(左), 分别设定 CD3⁺(中)和 CD8⁺(右)淋巴细胞; C: 对照组和感染组脾 CD3⁺和 CD8⁺T 细胞比例统计分析结果, * $P < 0.01$ ($n=12$); D: 对照组和感染组脾脏 CD3⁺和 CD8⁺T 细胞的绝对数统计分析结果, * $P < 0.01$ ($n=12$)。

图 1 日本血吸虫感染前后 CD3⁺T 细胞中 CD8⁺T 细胞比例

Figure 1 Proportions of CD8⁺T cells in CD3⁺T cells of splenocytes after *S. japonicum* infection

2.2 日本血吸虫感染后脾脏淋巴细胞中 Tc1、Tc2 细胞亚群变化

与正常小鼠比较,日本血吸虫感染后 CD8⁺T 细胞及其亚群 Tc1、Tc2 细胞比例显著增加 (P 均 < 0.001 ,图 2A~E),此外,与正常小鼠相比,感染小鼠的 CD8⁺T 细胞中 Tc2/Tc1 比率显著增加 ($P < 0.001$,图 2F)。

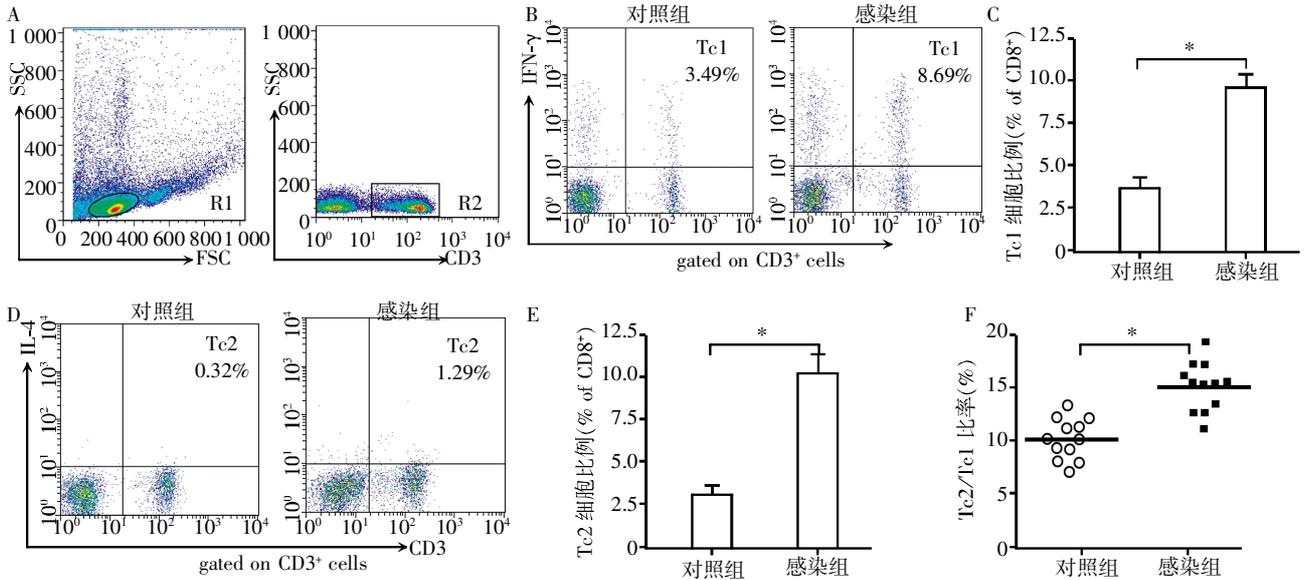
2.3 日本血吸虫感染后脾脏淋巴细胞中 CD8⁺调节

性 T 细胞亚群增加

进一步观察了脾脏淋巴细胞中调节性 CD8⁺T 细胞(CD8⁺CD28⁻)的比例,结果显示,与正常小鼠相比,感染小鼠脾淋巴细胞中 CD8⁺CD28⁻细胞的比例显著增加($P < 0.001$,图 3)。

2.4 CD8⁺T 细胞亚群与肝脏免疫病理相关性

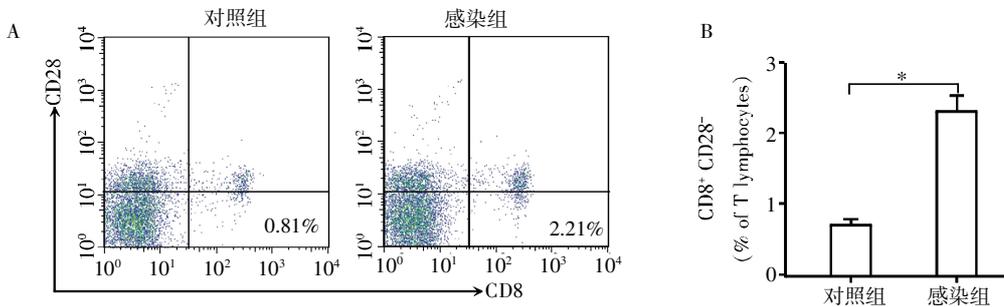
动态观察了感染血吸虫不同时期的肝脏免疫病理情况(图 4,表 1),结果发现,随着血吸虫感染



A: 在脾 MNC 设门淋巴细胞群为 R1, 在 R1 细胞内选 T 细胞(CD3⁺)设门 R2; B: 在 CD3⁺T 细胞(R2)中 CD8⁺和 IFN- γ 位置设定 Tc1, 对照组和感染组脾脏 Tc1 细胞的流式图; C: 对照组和感染组脾脏 Tc1 细胞比例的统计分析结果, * $P < 0.001$ ($n=12$); D: 在 CD3⁺T 细胞中 CD8⁺和 IL-4 位置设定 Tc2, 对照组和感染组脾脏 Tc2 细胞的流式图; E: 对照组和感染组脾脏 Tc2 细胞比例的统计分析结果, * $P < 0.001$ ($n=12$); F: 对照组和感染组 CD8⁺T 细胞中 Tc2/Tc1 比率的统计分析结果, * $P < 0.001$ ($n=12$)。

图 2 日本血吸虫感染前后 CD8⁺T 细胞中 Tc1、Tc2 细胞比例

Figure 2 Proportions of Tc1 and Tc2 cells in CD8⁺T cells of splenocytes after *S. japonicum* infection



A: 在 CD3⁺T 细胞中 CD8⁺和 CD28⁻ 位置设定 CD8⁺ 调节性 T 细胞, 对照组和感染组脾脏 CD8⁺调节性 T 细胞的流式图; B: 对照组和感染组脾脏 CD8⁺CD28⁻ 细胞比例的统计分析结果, * $P < 0.001$ ($n=12$)。

图 3 日本血吸虫感染前后 CD8⁺调节性 T 细胞比例

Figure 3 Proportions of CD8⁺ regulatory T cells in CD3⁺T cells after *S. japonicum* infection

的进展,小鼠肝脏虫卵肉芽肿及纤维化反应均显著增加。我们进一步以感染小鼠体内的 Tc1、Tc2、CD8⁺CD28⁻为自变量,分别以血吸虫感染所致的肉芽肿面积或纤维化水平作为因变量做多元线性逐步回归分析(向后),最终拟合免疫病理的影响因素方程为:肉芽肿面积=-21.336+32.769×Tc2 细胞+8.299×CD8⁺调节性 T 细胞;模型经方差检验, $F=192.144, P < 0.001$,模型相关系数 $R=0.933$,决定系数 $R^2=0.871$,即模型中引入的变量可解释血吸虫感染所致的肉芽肿面积的 87.1%(表 2)。而纤维化水平=-5.910+5.445×Tc2 细胞+3.959×CD8⁺调节性 T 细胞;模型经方差检验, $F=169.594, P < 0.001$,模型相关系数 $R=0.925$,决定系数 $R^2=0.856$,即模型中引入的变量可解

释血吸虫感染所致的纤维化水平的 85.6%(表 3)。这些结果表明,Tc2 和 CD8⁺调节性 T 细胞可能是参与日本血吸虫感染后肝脏免疫病理发生发展的重要因素。

3 讨论

血吸虫病是一种严重危害人类健康的人畜共患寄生虫病。目前,全球约有 76 个国家和地区流行血吸虫病,感染者超过 2 亿^[17]。我国主要流行日本血吸虫病,至 2013 年底全国仍有血吸虫患者约 18.5 万例^[18]。血吸虫感染对宿主的最重要致病机制是沉积在肝脏中的血吸虫卵引起的虫卵肉芽肿及纤维化免疫病理损害^[17]。T 细胞反应对血吸虫肝脏免疫病

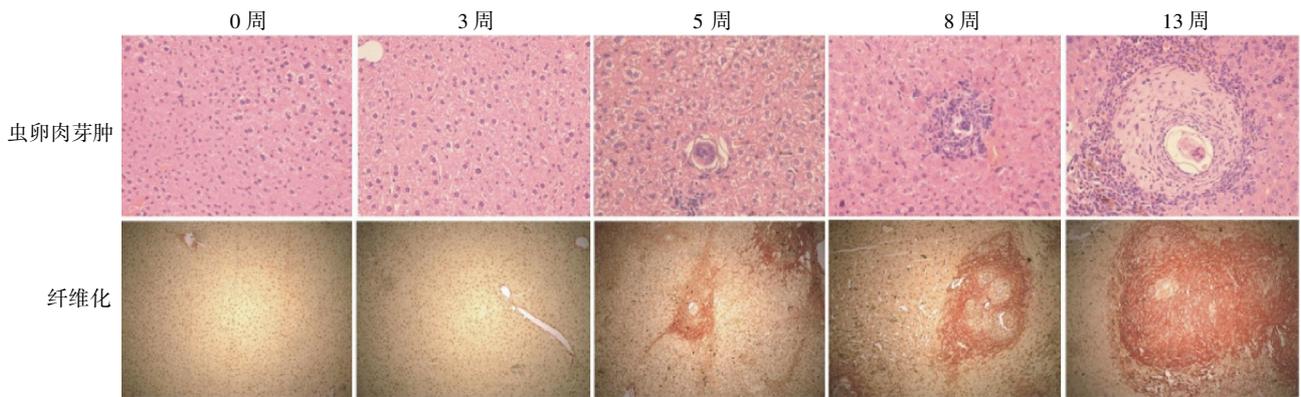


图 4 小鼠感染血吸虫后的不同时期肝脏虫卵肉芽肿及纤维化(×100)

Figure 4 The liver egg granuloma and fibrosis at different stages during *Schistosoma japonicum* infection(×100)

表 1 日本血吸虫感染小鼠不同时期肝脏病理水平

Table 1 The liver pathology at different stages after *S. japonicum* infection (x̄ ± s)

病理变化	0 周	3 周	5 周	8 周	13 周
虫卵肉芽肿(×10 ³ μm ²)	0	0	4.51 ± 1.05	41.50 ± 9.54	52.08 ± 9.09
纤维化(×10 ⁴ IOD)	0	0	3.13 ± 0.65	8.23 ± 1.17	15.32 ± 3.73

表 2 影响血吸虫肝脏肉芽肿面积因素的多元回归分析

Table 2 Multiple regression analysis of the factors affecting the liver egg granuloma

变量	回归系数	标准误	标准回归系数	t 值	P 值
常数	-21.336	2.815		-7.371	<0.001
Tc1(%)	-0.386	0.581	-0.051	-0.663	0.510
Tc2(%)	32.769	5.583	0.664	5.869	<0.001
CD8 ⁺ CD28 ⁺ (%)	8.299	3.252	0.289	2.552	0.013

表 3 影响血吸虫肝脏纤维化水平因素的多元回归分析

Table 3 Multiple regression analysis of the factors affecting the liver fibrosis

变量	回归系数	标准误	标准回归系数	t 值	P 值
常数	-5.910	0.764		-8.220	<0.001
Tc1(%)	0.244	0.158	0.123	1.543	0.128
Tc2(%)	5.445	1.542	0.421	3.531	0.001
CD8 ⁺ CD28 ⁺ (%)	3.959	0.898	0.526	4.408	<0.001

理的发生发展起着重要的抑制或促进作用^[19]。然而, CD8⁺T 淋巴细胞及各个亚群在日本血吸虫感染免疫中可能具有的作用尚未完全明了。

研究认为, CD8⁺T 淋巴细胞在曼氏血吸虫感染宿主过程中可能具有抑制免疫病理的功能, 原因在于: 曼氏血吸虫感染小鼠后的早期和慢性期肉芽肿都观察到 CD8⁺T 细胞数目显著增加^[20]; 给曼氏血吸虫感染鼠内过继转移 CD8⁺T 细胞后能减小肺内肉芽肿的大小, CD8⁺T 细胞能够在体外抑制肉芽肿内细胞的增殖^[21]。此外, 在曼氏小鼠感染血吸虫的慢性阶段, Th2 反应诱导的肉芽肿逐渐减小, 这很大程度上依赖于 CD8⁺T 细胞的增加^[22-23]。本研究发现, 日

本血吸虫感染 8 周后脾脏 MNC 数、T 细胞以及 CD8⁺T 细胞比例及数量均增加, 说明血吸虫感染宿主后可以引起强烈的细胞免疫应答, 尤其是 CD8⁺T 细胞。日本血吸虫感染 8 周时, 为何如此高水平的具有抑制肝脏免疫病理的 CD8⁺T 细胞却并没有抑制肉芽肿的形成, 推测其原因可能是此时小鼠体内存在的可促进肝脏免疫病理发生发展的 CD4⁺T 细胞亚群(Th2、Th17 以及 Tfh)占有主导功能^[24-26]。

CD8⁺T 细胞根据分泌的细胞因子不同主要分为 Tc1 和 Tc2 两种亚型^[27], 这两大亚型在机体多种疾病病理生理过程中起着至关重要的作用^[28]。研究发现, 血吸虫感染的慢性阶段诱导宿主产生强烈的 Th2 应答(其可显著促进肝脏免疫病理)的同时, Tc1 细胞数目亦显著增加, 提示了在血吸虫感染过程中 Tc1 细胞可能通过产生 IFN-γ 参与 Th1 介导的对肝脏免疫病理的抑制^[29]。本研究表明, 日本血吸虫感染后除 Tc1 细胞比例增加, Tc2 细胞的比例亦显著增加, 提示 Tc2 可能通过分泌 IL-4 促进 Th2 细胞介导的血吸虫性肝脏免疫病理进展^[30]。本研究还发现, 在血吸虫感染过程中, Tc2 细胞比例增加远较 Tc1 更加明显, 从而提示了血吸虫感染的免疫病理进展过程中 Tc2 细胞可能比 Tc1 细胞更重要。此外, 多元线性逐步回归分析发现感染血吸虫不同时期小鼠体内 Tc2 细胞与肝脏免疫病理关系的结果亦证实了以上推测。

除 Tc1 和 Tc2 亚群外, CD8⁺T 细胞还存在另一个新的亚群(调节性 CD8⁺T 细胞), 研究发现其在

自身免疫性疾病和癌症中发挥重要的免疫抑制作用^[31-35]。本研究首次发现在日本血吸虫感染的小鼠体内 CD8⁺调节性 T 细胞显著增加,且多元线性回归分析发现感染血吸虫不同时期的小鼠体内 CD8⁺调节性 T 细胞是参与肝脏免疫病理形成的重要因素,从而提示了 CD8⁺调节性 T 细胞可能在日本血吸虫感染免疫病理形成的过程中发挥重要的免疫抑制功能,其机制可能是通过分泌的细胞因子 IL-10 等参与调节功能^[36],但其具体机制仍需进一步证实。

综上所述,本研究阐明了日本血吸虫感染后的 CD8⁺T 细胞应答增加,且 Tc2 或 CD8⁺调节性 T 细胞可能分别具有促进/抑制肝脏肉芽肿和肝纤维化的发生发展,Tc2 或 CD8⁺调节性 T 细胞可能对血吸虫肝脏免疫病理的靶向治疗具有一定的实际意义。

[参考文献]

- [1] Dunne DW, Pearce EJ. Immunology of hepatosplenic schistosomiasis mansoni; a human perspective[J]. *Microbes Infect*, 1999, 1(7): 553-560
- [2] Pearce EJ, MacDonald AS. The immunobiology of schistosomiasis[J]. *Nat Rev Immunol*, 2002, 2(7): 499-511
- [3] Stadecker MJ, Asahi H, Finger E, et al. The immunobiology of Th1 polarization in high-pathology schistosomiasis [J]. *Immunol Rev*, 2004, 201: 168-179
- [4] Sad S, Marcotte R, Mosmann TR. Cytokine-induced differentiation of precursor mouse CD8⁺T cells into cytotoxic CD8⁺T cells secreting Th1 or Th2 cytokines[J]. *Immunity*, 1995, 2(3): 271-279
- [5] Kemp RA, Ronchese F. Tumor-specific Tc1, but not Tc2, cells deliver protective antitumor immunity[J]. *J Immunol*, 2001, 167(11): 6497-6502
- [6] Maggi E, Manetti R, Annunziato F, et al. Functional characterization and modulation of cytokine production by CD8⁺ T cells from human immunodeficiency virus-infected individuals[J]. *Blood*, 1997, 89(10): 3672-3681
- [7] Fowler DH, Whitfield B, Livingston M, et al. Non-host-reactive donor CD8⁺T cells of Tc2 phenotype potently inhibit marrow graft rejection [J]. *Blood*, 1998, 91(11): 4045-4050
- [8] Dobrzanski MJ, Reome JB, Hollenbaugh JA, et al. Tc1 and Tc2 effector cell therapy elicit long-term tumor immunity by contrasting mechanisms that result in complementary endogenous type 1 antitumor responses[J]. *J Immunol*, 2004, 172(3): 1380-1390
- [9] Xu H, Heeger PS, Fairchild RL. Distinct roles for B7-1 and B7-2 determinants during priming of effector CD8⁺ Tc1 and regulatory CD4⁺ Th2 cells for contact hypersensitivity[J]. *J Immunol*, 1997, 159(9): 4217-4226
- [10] Sawicka E, Noble A, Walker C, et al. Tc2 cells respond to soluble antigen in the respiratory tract and induce lung eosinophilia and bronchial hyperresponsiveness[J]. *Eur J Immunol*, 2004, 34(9): 2599-2608
- [11] Ochi H, Wu XM, Osoegawa M, et al. Tc1/Tc2 and Th1/Th2 balance in Asian and Western types of multiple sclerosis, HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis and hyper IgE aemic myelitis[J]. *J Neuroimmunol*, 2001, 119(2): 297-305
- [12] Accapezzato D, Francavilla V, Paroli M, et al. Hepatic expansion of a virus-specific regulatory CD8(+)T cell population in chronic hepatitis C virus infection[J]. *J Clin Invest*, 2004, 113(7): 963-972
- [13] Faghhi Z, Rezaeifard S, Safaei A, et al. IL-17 and IL-4 producing CD8⁺T cells in tumor draining lymph nodes of breast cancer patients: positive association with tumor progression[J]. *Iran J Immunol*, 2013, 10(4): 193-204
- [14] Ito N, Nakamura H, Tanaka Y, et al. Lung carcinoma: analysis of T helper type 1 and 2 cells and T cytotoxic type 1 and 2 cells by intracellular cytokine detection with flow cytometry[J]. *Cancer*, 1999, 85(11): 2359-2367
- [15] Rutitzky LI, Hernandez HJ, Stadecker MJ. Th1-polarizing immunization with egg antigens correlates with severe exacerbation of immunopathology and death in schistosome infection [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(23): 13243-13248
- [16] Tao FF, Yang YF, Wang H, et al. Th1-type epitopes-based cocktail PDDV attenuates hepatic fibrosis in C57BL/6 mice with chronic *Schistosoma japonicum* infection [J]. *Vaccine*, 2009, 27(31): 4110-4117
- [17] Steinauer ML, Blouin MS, Criscione CD. Applying evolutionary genetics to schistosome epidemiology [J]. *Infect Genet Evol*, 10(4): 433-443
- [18] 雷正龙, 郑浩, 张利娟, 等. 2013 年全国血吸虫病疫情通报 [J]. *中国血吸虫病防治杂志*, 2014, 26(6): 591-597
- [19] Colley DG, Secor WE. Immunology of human schistosomiasis [J]. *Parasit Immunol*, 2014, 36(8): 347-357
- [20] Ragheb S, Boros DL. Characterization of granuloma T lymphocyte function from *Schistosoma mansoni*-infected mice [J]. *J Immunol*, 1989, 142(9): 3239-3246
- [21] Chensue SW, Warmington KS, Hershey SD, et al. Evolving T cell responses in murine schistosomiasis. Th2 cells mediate secondary granulomatous hypersensitivity and are regulated by CD8⁺T cells *in vivo* [J]. *J Immunol*, 1993, 151(3): 1391-1400
- [22] Weinstock JV, Chensue SW, Boros DL. Modulation of granulomatous hypersensitivity. V. Participation of histamine receptor positive and negative lymphocytes in the

- granulomatous response of *Schistosoma mansoni*-infected mice[J]. *J Immunol*, 1983, 130(1):423-427
- [23] Perrin PJ, Phillips SM. The molecular basis of granuloma formation in schistosomiasis. I. A T cell-derived suppressor effector factor[J]. *J Immunol*, 1988, 141 (5):1714-1719
- [24] Kaplan MH, Whitfield JR, Boros DL, et al. Th2 cells are required for the *Schistosoma mansoni* egg-induced granulomatous response[J]. *J Immunol*, 1998, 160(4):1850-1856
- [25] Chen X, Yang X, Li Y, et al. Follicular helper T cells promote liver pathology in mice during *Schistosoma japonicum* infection[J]. *PLoS Pathogens*, 2014, 10(5):e1004097
- [26] Rutitzky LI, Bazzone L, Shainheit MG, et al. IL-23 is required for the development of severe egg-induced immunopathology in schistosomiasis and for lesional expression of IL-17[J]. *J Immunol*, 2008, 180(4):2486-2495
- [27] Cerwenka A, Carter LL, Reome JB, et al. *In vivo* persistence of CD8 polarized T cell subsets producing type 1 or type 2 cytokines[J]. *J Immunol*, 1998, 161(1):97-105
- [28] Ohta N, Fukase S, Suzuki Y, et al. Increase of Th2 and Tc1 cells in patients with Kimura's disease[J]. *Auris Nasus Larynx*, 2011, 38(1):77-82
- [29] Pedras-Vasconcelos JA, Pearce EJ. Type 1 CD8⁺ T cell responses during infection with the helminth *Schistosoma mansoni*[J]. *J Immunol*, 1996, 157(7):3046-3053
- [30] Pancre V, Delacre M, Herno J, et al. Schistosomal egg antigen-responsive CD8 T-cell population in *Schistosoma mansoni*-infected BALB/c mice[J]. *Immunol*, 1999, 98(4):525-534
- [31] Najafian N, Chitnis T, Salama AD, et al. Regulatory functions of CD8⁺CD28⁻ T cells in an autoimmune disease model[J]. *J Clin Invest*, 2003, 112(7):1037-1048
- [32] Kouchaki E, Salehi M, Reza Sharif M, et al. Numerical status of CD4(+)CD25(+)FoxP3(+) and CD8(+)CD28(-) regulatory T cells in multiple sclerosis[J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2014, 17(4):250-255
- [33] Chen C, Chen D, Zhang Y, et al. Changes of CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ and CD8⁺CD28⁻ regulatory T cells in non-small cell lung cancer patients undergoing surgery[J]. *Inter Immunopharmacol*, 2014, 18(2):255-261
- [34] Ceeraz S, Hall C, Choy EH, et al. Defective CD8⁺CD28⁺ regulatory T cell suppressor function in rheumatoid arthritis is restored by tumour necrosis factor inhibitor therapy [J]. *Clin Exp Immunol*, 2013, 174(1):18-26
- [35] Song G, Wang X, Jia J, et al. Elevated level of peripheral CD8(+)CD28(-)T lymphocytes are an independent predictor of progression-free survival in patients with metastatic breast cancer during the course of chemotherapy[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2013, 62(6):1123-1130
- [36] Menager-Marcq I, Pomie C, Romagnoli P, et al. CD8 + CD28- regulatory T lymphocytes prevent experimental inflammatory bowel disease in mice[J]. *Gastroenterology*, 2006, 131(6):1775-1785

[收稿日期] 2015-06-17