

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00142

## 原发性胆汁性肝硬化患者外周血单个核细胞趋化因子受体的表达及临床意义

韩志君, 吴传勇, 蒋廷旺, 唐裕杰, 周 晔, 陈 燕, 谷明莉, 邓安梅\*, 仲人前\*

第二军医大学长征医院实验诊断科, 全军医学免疫诊断中心, 全军临床免疫重点实验室, 上海 200003

**[摘要]** **目的:** 初步探讨趋化因子受体(chemokine receptor)与原发性胆汁性肝硬化(PBC, primary biliary cirrhosis)发生发展的关系。

**方法:** 采用实时荧光定量PCR和流式细胞术, 分别从基因转录和蛋白表达水平检测60例PBC、60例乙型肝炎肝硬化患者(疾病对照)和60例健康对照者的外周血单个核细胞(PBMCs)中CCR1、CCR3和CCR5的表达; 生化常规测定PBC患者和健康对照者的总胆红素(TBIL)、 $\gamma$ -谷氨酰转氨酶( $\gamma$ -GT)水平, 分析它们与趋化因子之间的相关性。**结果:** PBC患者PBMCs中的CCR1、CCR3、CCR5的mRNA和蛋白表达均明显低于健康对照组和疾病对照组( $P < 0.05$ ), 而疾病对照组和健康对照组PBMCs中CCR1、CCR3、CCR5 mRNA和蛋白表达无统计学差异( $P > 0.05$ ); PBC患者III、IV期PBMCs中的CCR1、CCR3、CCR5的mRNA和蛋白表达较I、II期明显降低( $P < 0.05$ ); PBC患者CCR1蛋白表达水平与TBIL水平显著负相关( $r = -0.445, P < 0.01$ ), 与 $\gamma$ -GT无线性相关关系( $r = -0.230, P > 0.05$ ); CCR3蛋白表达水平与TBIL水平无线性相关关系( $r = -0.173, P > 0.05$ ), 与 $\gamma$ -GT水平负相关( $r = -0.295, P < 0.05$ ); CCR5蛋白表达水平与TBIL、 $\gamma$ -GT水平均负相关( $r = -0.531, P < 0.01$ ;  $r = -0.665, P < 0.01$ )。**结论:** CCR1、CCR3、CCR5的表达与PBC的发生发展存在一定的相关性, 可能参与了PBC的调控机制, 为PBC的诊断和预防提供了新线索。

**[关键词]** 胆汁性肝硬化; 趋化因子受体; 流式细胞术; 单个核细胞

**[中图分类号]** R 575.22 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)02-0142-05

### Expression and clinical significance of chemokine receptor in peripheral blood mononuclear cells in patients with primary biliary cirrhosis

HAN Zhi-jun, WU Chuan-yong, JIANG Ting-wang, TANG Yu-jie, ZHOU Ye, CHEN Yan, GU Ming-li, DENG An-mei\*, ZHONG Ren-qian\*

Department of Laboratory Medicine, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, PLA Medical Immuno-diagnosis Center, Key Laboratory of Clinical Immunology of PLA, Shanghai 200003, China

**[ABSTRACT]** **Objective:** To investigate the relationship of chemokine receptor with the development and progression of primary biliary cirrhosis (PBC). **Methods:** Real-time PCR and flow cytometry were used to examine the mRNA and protein expression of chemokine receptor 1 (CCR1), CCR3 and CCR5 in the peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of 60 patients with PBC, 60 patients with hepatitis B-related cirrhosis, and 60 normal controls. Total bilirubin (TBIL) and  $\gamma$ -glutamyltransferase ( $\gamma$ -GT) levels were determined in the patients with PBC and normal controls, and their correlation with chemotactic factors was also analyzed. **Results:** Both the mRNA and protein expression levels of CCR1, CCR3 and CCR5 in the PBMCs were significantly lower in PBC patients than those in the other two groups ( $P < 0.05$ ), and there were no significant differences between the latter two groups. The mRNA and protein levels of CCR1, CCR3 and CCR5 were significantly lower in patients with stage III and IV PBC than those with stage I and II PBC. CCR1 protein expression was correlated with TBIL levels in PBC patients ( $r = -0.445, P < 0.01$ ), but not with  $\gamma$ -GT ( $r = -0.230, P > 0.05$ ). CCR3 protein was not linearly correlated with TBIL level ( $r = -0.173, P > 0.05$ ), but was correlated with  $\gamma$ -GT ( $r = -0.295, P < 0.05$ ). Expression of CCR5 protein was negatively correlated with both TBIL and  $\gamma$ -GT levels ( $r = -0.531, P < 0.01$ ;  $r = -0.665, P < 0.01$ ). **Conclusion:** CCR1, CCR3 and CCR5 expression is associated with the development and progression of PBC; they may be involved in the regulatory mechanism of PBC, which may cast new lights on the diagnosis and prevention of PBC.

**[KEY WORDS]** biliary liver cirrhosis; chemokine receptors; flow cytometry; mononuclear cells

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(2):142-146]

**[收稿日期]** 2008-07-08 **[接受日期]** 2008-07-29

**[基金项目]** 国家高科技研究发展计划(“863”计划, 2006AA02Z496), 国家自然科学基金(30671840, 30772017), 上海市科学技术委员会优秀学科带头人基金(07XD14013). Supported by National High-tech R&D Program (“863” Program, 2006AA02Z496), National Natural Science Foundation of China (30671840, 30772017), and Funds for Excellent Leading Scientist of Science and Technology Committee of Shanghai Municipality(07XD14013).

**[作者简介]** 韩志君, 博士生. E-mail: hanzhijun1125@yahoo.com.cn

\* 通讯作者(Corresponding authors). Tel: 021-63610109-73631, E-mail: amdeng70@yahoo.com; Tel: 021-63610109-73632, E-mail: rqzhong@yahoo.com

原发性胆汁性肝硬化(primary biliary cirrhosis, PBC)是一种原因不明,由免疫损伤介导的慢性进展性自身免疫性肝病,主要表现为肝内小胆管进行性破坏伴门脉炎症性改变,慢性胆汁淤积,严重者最终发展成肝纤维化和肝硬化<sup>[1]</sup>。PBC患者肝组织活检显示门管区浸润的淋巴细胞主要是活化的CD8<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup> T细胞,表明T细胞介导的免疫反应是胆管上皮细胞损伤的重要机制<sup>[2]</sup>。

趋化因子是一类对单核细胞和中性粒细胞有较强趋化活性的淋巴因子,其功能行使由趋化因子受体介导<sup>[3]</sup>。一种趋化因子可以通过多种受体起作用,并且这些受体在不同的T细胞亚群上的分布并不均衡,将淋巴细胞趋化、聚集到炎症部位,可以调控免疫细胞在循环系统和器官组织间迁移,诱导细胞分化,以维持组织细胞正常免疫功能的平衡,这些受体在T细胞上的表达、分布变化又可以影响相应趋化因子,参与疾病的发生<sup>[4]</sup>。研究趋化因子和不同免疫细胞上趋化因子受体的变化,有利于从新角度认识疾病发病机制。趋化因子与自身免疫病密切相关<sup>[5-7]</sup>。因此,本研究利用实时荧光定量PCR技术和流式细胞术,分别从基因和蛋白水平观察CCR1、CCR3和CCR5在PBC患者中的表达变化,探讨其在PBC发生发展中的意义。

## 1 材料和方法

1.1 标本来源 PBC患者组:第二军医大学长征医院确诊的PBC患者60例,均符合美国肝病学会2000年推荐的PBC诊断指南<sup>[8]</sup>;其中男4例,女56例,发病年龄(45.6±9.8)岁;按照组织学改变分为4期<sup>[9]</sup>,Ⅰ期;胆总管炎期,Ⅱ期;胆总管减少期,Ⅲ期;

瘢痕形成期,Ⅳ期;肝硬化期。疾病对照组:第二军医大学长征医院确诊的乙型肝炎肝硬化患者60例,既往无自身免疫性疾病史,其中男6例,女54例,发病年龄(45.8±10.1)岁。健康对照组:第二军医大学长征医院无亲缘关系的健康体检者60例,肝肾功能正常,无其他自身免疫性疾病表现,年龄、性别与PBC组相匹配。

1.2 主要仪器和试剂 淋巴细胞分离液(上海生化试剂公司),MACS磁性细胞分选试剂盒(美国Miltenyi Biotec公司);RNA提取试剂盒RNeasy Mini Kits(德国Qiagen公司);TaqMan 2×PCR Master Mix, GeneAmp 7900 Sequence Detection Systems(美国Applied Biosystems公司);流式细胞仪、QPREP标本处理仪(美国Coulter公司);藻红素(PE)标记鼠抗人CCR1、CCR3和CCR5单抗(eBioscience, USA)。

1.3 抽提PBMC和提取细胞总RNA 取3 ml EDTA-K<sub>2</sub>抗凝的全血,加入等体积生理盐水稀释后,以5 ml淋巴细胞分离液按密度梯度离心法分离单个核细胞,1 000×g离心30 min,收集单个核细胞层,用pH 7.2 PBS缓冲液350×g离心10 min洗涤细胞2次,收集细胞沉淀,即为PBMCs。提取细胞总RNA,操作严格按照RNA提取试剂盒说明书进行,分别通过1.2%琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度仪,检测所得总RNA的质量和浓度。

1.4 引物、探针的设计与合成 根据基因库中人CCR1、CCR3、CCR5和选作内参的人β-actin的mRNA序列,以Primer Express软件设计基因的特异性引物和探针,引物和探针序列见表1。所有引物和探针均购自上海生工生物工程技术有限公司。

表1 CCR1、CCR3、CCR5和β-actin的引物和探针序列

Tab 1 Primer and probe sequences of CCR1, CCR3, CCR5 and β-actin

Gene		Sequence(5'-3')	Amplicon size (bp)
CCR1	Sense-primer	ACC TCT TTG GGC TGG TAT TG	108
	Antisense-primer	AAC GGA CAG CTT TGG ATT TC	
	Probe	CCC TGT GTA GCA GAT GAT CAT GAC CA	
CCR3	Sense-primer	CAG CTC TGT CTC TCC ATC CA	98
	Antisense-primer	TTC ATC TCC TTG GTC CTT CC	
	Probe	CAG CAG AGC CGG AAC TCT CTA TTG TG	
CCR5	Sense-primer	GCA TTG CTC CGT CTA AGT CA	93
	Antisense-primer	ATC CTT CCT GAC CCT CCT TT	
	Probe	CAA CCA GGA TCT CCC TGC TCA GC	
β-actin	Sense-primer	ACC CAG CAC AAT GAA GAT CA	129
	Antisense-primer	TCG TCA TAC TCC TGC TTG CT	
	Probe	CAT CCT GGC CTC GCT GTC CA	

1.5 RNA 的逆转录 采用美国 Applied Biosystems 公司的 TaqMan 逆转录试剂盒,以随机引物,分别从 PBC 患者、健康体检者及乙型肝炎肝硬化患者外周血各组细胞中抽提的总 RNA 逆转录为 cDNA。反应体系为:RNase free water 3  $\mu$ l,5 $\times$ RT buffer 4  $\mu$ l,dNTP mix(各 10 mmol/L)2  $\mu$ l,RNase inhibitor(10 U/L)1  $\mu$ l,Oligo dT 20 (10  $\mu$ mol/L) 1  $\mu$ l,总 RNA 8  $\mu$ l,ReverTra Ace 1  $\mu$ l,共 20  $\mu$ l。42 $^{\circ}$ C 20 min ,99 $^{\circ}$ C 5 min,4 $^{\circ}$ C 5 min,瞬时离心,将逆转录后的 cDNA 分装,冻存于-20 $^{\circ}$ C 冰箱备用。

1.6 荧光定量 PCR 技术检测 CCR1、CCR3 和 CCR5 的表达 以逆转录的 cDNA 为模板,利用美国 Applied Biosystems 公司的 PCR 反应试剂盒进行荧光定量 PCR。反应体系:去离子水 13.25  $\mu$ l,10 $\times$ TaqMan 缓冲液 A 5  $\mu$ l,氯化镁溶液(25 mmol/L)7  $\mu$ l,dATP 1  $\mu$ l,dCTP 1  $\mu$ l,dGTP 1  $\mu$ l,dUTP 1  $\mu$ l,Forward Primer 5  $\mu$ l,Reverse Primer 5  $\mu$ l,Probe 5  $\mu$ l,AmpliTaq Gold DNA 聚合酶(5 U/ $\mu$ l)0.25  $\mu$ l,AmpErase UNG (1 U/ $\mu$ l)0.5  $\mu$ l,cDNA 5  $\mu$ l,读取测得阈循环(threshold cycle,Ct)值;根据公式  $\Delta Ct = [Ct(\text{目的基因})] - [Ct(\text{内参基因})]$ 和  $\Delta\Delta Ct = [\Delta Ct(\text{研究组})] - [\Delta Ct(\text{对照组})]$ ,计算出  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ,以反映出目的基因在研究组中表达水平(相对于对照组)。

1.7 流式细胞术检测 CCR1、CCR3 和 CCR5 表达 取 100  $\mu$ l 用 EDTA-K<sub>2</sub> 抗凝的全血,加入 20  $\mu$ l PE 标记单抗,混匀后室温避光孵育 30 min。用 Qprep 标本处理仪进行红细胞裂解和细胞固定,离心后弃上清,用 2 ml Stain buffer(pH 7.4 的磷酸盐缓冲液加 2% 小牛血清和 0.1% 叠氮钠)洗 2 次,细胞沉淀用 500  $\mu$ l Stain buffer 重悬后上流式细胞仪检测,同

时设不加标记抗体的阴性对照管。

1.8 临床肝功能生化指标的检测 采用 Roche P800 全自动生化分析仪,按生化常规测定 PBC 患者和健康对照者的总胆红素(TBIL)、 $\gamma$ -谷氨酰基转移酶( $\gamma$ -GT)。

1.9 统计学处理 两组之间比较采用 *t* 检验,多组资料之间比较用方差分析。相关性检验采用 Pearson 相关分析,以  $\alpha=0.05$  为检验水准。

2 结果

2.1 PBC 患者 PBMCs 中 CCR1、CCR3 和 CCR5 mRNA 表达情况 PBC 患者组 CCR1、CCR3、CCR5 mRNA 的表达量显著低于健康对照组和疾病对照组( $P<0.01$ ),而疾病对照组和健康对照组 PBMCs 中 CCR1、CCR3、CCR5 mRNA 的表达无统计学差异( $P>0.05$ ,图 1)。PBC 患者 III、IV 期 PBMCs 中的 CCR1、CCR3 和 CCR5 的 mRNA 的表达较 I、II 期明显降低( $P<0.05$ ,表 2)。

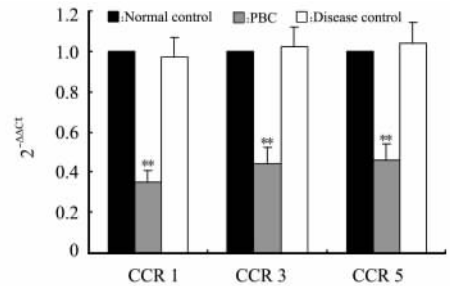


图 1 PBC 患者 PBMCs 中 CCR1、CCR3、CCR5 mRNA 的表达

Fig 1 CCR1, CCR3 and CCR5 mRNA expression in PBMCs of patients with PBC

\*\*  $P<0.01$  vs normal control.  $n=3, \bar{x}\pm s$

表 2 PBC 患者 I、II、III、IV 期 PBMCs 中的 CCR1、CCR3、CCR5 mRNA 的表达

Tab 2 CCR1, CCR3 and CCR5 mRNA expression in PBMCs of patients with stage I, II, III and IV PBC (Values are expressed as  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )

( $n=3, \bar{x}\pm s$ )

Stage	CCR1	CCR3	CCR5
I	0.39 $\pm$ 0.12	0.53 $\pm$ 0.12	0.57 $\pm$ 0.14
II	0.38 $\pm$ 0.12	0.55 $\pm$ 0.12	0.59 $\pm$ 0.13
III	0.31 $\pm$ 0.09*	0.43 $\pm$ 0.10*	0.51 $\pm$ 0.12*
IV	0.30 $\pm$ 0.08*	0.41 $\pm$ 0.06*	0.49 $\pm$ 0.08*

\*  $P<0.05$  vs stage I

2.2 PBC 患者 PBMCs 中 CCR1、CCR3、CCR5 蛋白表达情况 PBC 患者 PBMCs 中 CCR1、CCR3、CCR5 表达阳性率分别为(1.85 $\pm$ 0.62)%、(7.93 $\pm$ 1.12)%、(1.92 $\pm$ 0.71)% ,显著低于健康对照组

[(5.53 $\pm$ 0.93)%、(12.53 $\pm$ 2.43)%、(4.87 $\pm$ 1.21)%]和疾病对照组,差异具有统计学意义( $P<0.01$ ),而疾病对照组和健康对照组没有统计学差异( $P>0.05$ ,图 2)。PBC 患者 III、IV 期 PBMCs 中的

CCR1、CCR3、CCR5 的表达较 I、II 期明显降低 ( $P < 0.05$ , 图 3)。

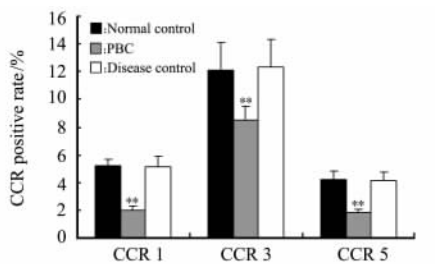


图 2 PBC 患者 PBMCs 中 CCR1、CCR3、CCR5 蛋白的表达

Fig 2 CCR1, CCR3 and CCR5 protein expression in PBMCs of patients with PBC

\*\*  $P < 0.01$  vs normal control.  $n = 3, \bar{x} \pm s$

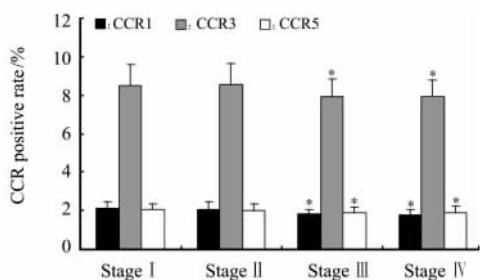


图 3 PBC 患者各期 CCR1、CCR3、CCR5 蛋白的表达

Fig 3 CCR1, CCR3 and CCR5 protein expression in patients with stage I, II, III and IV PBC

\*  $P < 0.05$  vs stage I.  $n = 3, \bar{x} \pm s$

2.3 PBC 患者 CCR1、CCR3、CCR5 与肝功能指标的相关性 PBC 患者组 TBIL、 $\gamma$ -GT 水平 [(107 ± 93)  $\mu\text{mol/L}$  和 (488 ± 274) IU/L] 均显著高于正常对照组 [(13 ± 7)  $\mu\text{mol/L}$  和 (19 ± 11) IU/L], 差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。PBC 患者组 CCR1 阳性细胞百分率与 TBIL 水平显著负相关 ( $r = -0.445, P < 0.01$ ); 与  $\gamma$ -GT 无线性相关关系 ( $r = -0.230, P > 0.05$ ); CCR3 阳性细胞百分率与 TBIL 水平无线性相关关系 ( $r = -0.173, P > 0.05$ ), 与  $\gamma$ -GT 水平负相关 ( $r = -0.295, P < 0.05$ ); CCR5 阳性细胞百分率与 TBIL、 $\gamma$ -GT 水平均显著负相关 ( $r = -0.531, P < 0.01$ ;  $r = -0.665, P < 0.01$ )。具体见图 4。

### 3 讨论

PBC 是一种慢性胆汁淤积性肝病, 以血清中抗线粒体抗体阳性 (AMA) 和肝内小胆管进行性非化脓性损伤为特征, 最终发展为肝硬化和肝纤维化, 甚至是肝衰竭。PBC 也是一种典型的自身免疫性疾病, 对胞内抗原具有强烈的体液和细胞免疫反应, 其

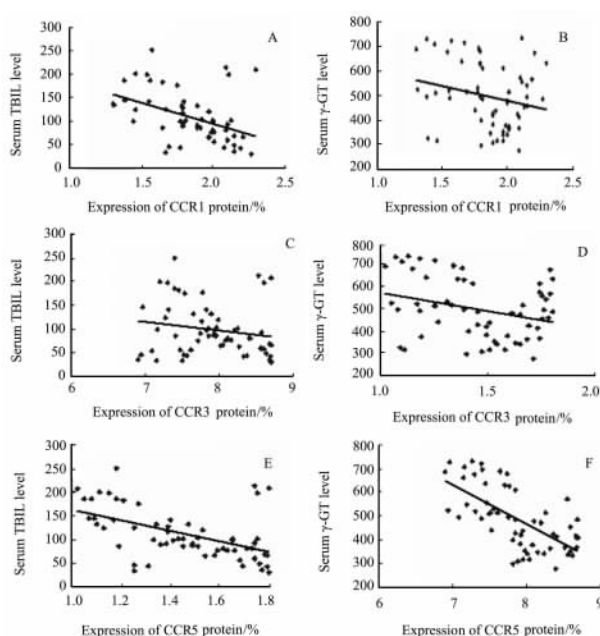


图 4 PBC 患者 CCR1、CCR3、CCR5 与血清 TBIL、 $\gamma$ -GT 相关性

Fig 4 Correlation of CCR1, CCR3 and CCR5 protein expression with TBIL and  $\gamma$ -GT levels in PBC patients

自身抗原为位于线粒体内膜的二氢硫辛酰胺乙酰转移酶复合物 (2-OADC), 其中以丙酮酸脱氢酶复合体的 E2 亚基 (PDC-E2) 为主, 大约 90% ~ 95% PBC 患者的血清中抗 PDC-E2 为阳性<sup>[10]</sup>。此外, PBC 中还存在自身反应性  $\text{CD4}^+$  T 细胞、 $\text{CD8}^+$  T 细胞和 B 细胞表位重叠<sup>[11]</sup>。因此, 深入研究 PBC 疾病进程中的分子调控机制, 探讨有效治疗 PBC 的新途径, 具有重要意义。

PBC 患者体内免疫系统紊乱, 细胞免疫中 Th1 细胞略占优势, Th1/Th2 比例上升。两者比例的失调促进 CTL 功能亢进以及 B 细胞分泌大量自身抗体引起免疫损伤<sup>[12]</sup>。此外, 大量的 T 细胞和 NK 细胞聚集于 PBC 患者胆管区周围, 说明淋巴细胞在 PBC 的疾病过程中起了重要作用, 但 PBC 患者免疫调节异常和免疫缺陷在致病机制中的作用仍不清楚。

趋化因子及受体的表达和分布异常, 可以引起机体免疫功能紊乱, 导致各脏器免疫性炎症损害。目前还不清楚趋化因子亚群变化对机体免疫反应有何影响, 但不同的趋化因子受体在  $\text{CD4}^+$  T 和  $\text{CD8}^+$  T 细胞上异常表达, 可以引起机体的异常免疫。有研究<sup>[13]</sup>证明, 趋化因子受体表达的异常, 可以影响相应趋化因子对 Th1 或 Th2 细胞的趋化激活, 从而影响 Th1/Th2 平衡。Th1/Th2 细胞因子平衡紊乱在一些炎症性、自身免疫性疾病的发病过程中发挥着重要的作用。已经有研究<sup>[14-19]</sup>发现, 在系统性红

斑狼疮和多发性硬化等自身免疫病中,T细胞上趋化因子受体活性发生改变,但目前国内外关于趋化因子受体在PBC研究中的相关报道并不多见。

本研究利用实时荧光定量PCR技术和流式细胞技术,分别从基因转录和蛋白表达水平上,检测CCR1、CCR3、CCR5在PBC患者PBMCs中的表达。结果发现CCR1、CCR3、CCR5 mRNA在PBC患者PBMCs中的表达均明显低于健康对照者和疾病对照组,且与疾病活动相关,表明CCR1、CCR3、CCR5可能与PBC相关;进一步检测CCR1、CCR3、CCR5 mRNA在CD4<sup>+</sup>T细胞和CD8<sup>+</sup>T细胞中的表达,结果显示CCR1、CCR3、CCR5 mRNA在PBC患者CD4<sup>+</sup>T细胞和CD8<sup>+</sup>T细胞中表达均明显低于健康对照组的相应细胞亚群,提示在PBC中CCR1、CCR3、CCR5可能参与PBC中CD4<sup>+</sup>T细胞、CD8<sup>+</sup>T细胞的调控机制;PBC患者分期结果显示,PBC患者I、II期PBMCs中的CCR1、CCR3、CCR5的mRNA和蛋白表达无明显差异,PBC患者III、IV期PBMCs中的CCR1、CCR3、CCR5 mRNA和蛋白表达无明显差异,PBC患者III、IV期PBMCs中的CCR1、CCR3、CCR5 mRNA和蛋白表达较I、II期明显降低,从而也说明在疾病的不同发展阶段,CCR的表达也存在一定的差异。

TBIL、 $\gamma$ -GT是反映胆汁淤积、肝细胞损伤状况以及诊断PBC的重要实验室指标。本研究发现PBC患者CCR1、CCR3、CCR5与血清TBIL、 $\gamma$ -GT的表达显著相关,提示CCR1、CCR3、CCR5的表达与PBC的严重程度相关,可能在PBC患者肝细胞及胆管上皮细胞的损伤及自身抗原的产生中具有一定作用,也表明CCR1、CCR3、CCR5可能是PBC的一个辅助诊断指标。

本研究结果初步提示CCR1、CCR3、CCR5及其介导的天然免疫应答与PBC的发生发展存在一定相关性。但是CCR1、CCR3、CCR5在PBC中究竟起到什么作用,仍有待进一步研究探索。

## [参考文献]

- [1] Talwalkar J A, Lindor K D. Primary biliary cirrhosis[J]. *Lancet*, 2003, 362:53-61.
- [2] Kita H, Imawari M, Gershwin M E. Cellular immune response in primary biliary cirrhosis[J]. *Hepatology*, 2004, 28:12-17.
- [3] Barlic J, Murphy P M. Chemokine regulation of atherosclerosis[J]. *J Leukoc Biol*, 2007, 82:226-236.
- [4] Palmqvist C, Wardlaw A J, Bradding P. Chemokines and their receptors as potential targets for the treatment of asthma[J]. *Br J Pharmacol*, 2007, 151:725-736.
- [5] Misu T, Fujihara K, Itoyama Y. Chemokines and chemokine receptors in multiple sclerosis[J]. *Nippon Rinsho*, 2003, 61:1422-1427.
- [6] Ribeiro S, Horuk R. The clinical potential of chemokine receptor antagonists[J]. *Pharmacol Ther*, 2005, 107:44-58.
- [7] Kallinich T, Schmidt S, Hamelmann E, Fischer A, Qin S, Luttmann W, et al. Chemokine-receptor expression on T cells in lung compartments of challenged asthmatic patients[J]. *Clin Exp Allergy*, 2005, 35:26-33.
- [8] Heathcote E J. Management of primary biliary cirrhosis. The American Association for the Study of Liver Diseases practice guidelines[J]. *Hepatology*, 2000, 31:1005-1013.
- [9] Kaplan M M, Gershwin M E. Primary biliary cirrhosis[J]. *N Engl J Med*, 2005, 353:1261-1273.
- [10] Jones D E. Pathogenesis of primary biliary cirrhosis[J]. *Gut*, 2007, 56:1615-1624.
- [11] Kita H, Nalbandian G, Keefe E B, Coppel R L, Gershwin M E. Pathogenesis of primary biliary cirrhosis[J]. *Clin Liver Dis*, 2003, 7:821-839.
- [12] Mackay I R. Autoimmune diseases of the liver, autoimmune hepatitis and primary biliary cirrhosis: Unfinished business[J]. *Hepatology*, 2007, 37(Suppl 3):S357-S364.
- [13] Rotondi M, Chiovato L, Romagnani S, Serio M, Romagnani P. Role of chemokines in endocrine autoimmune diseases[J]. *Endocr Rev*, 2007, 28:492-520.
- [14] Szczuciński A, Losy J. Chemokines and chemokine receptors in multiple sclerosis. Potential targets for new therapies[J]. *Acta Neurol Scand*, 2007, 115:137-146.
- [15] Hase K, Tani K, Shimizu T, Ohmoto Y, Matsushima K, Sone S. Increased CCR4 expression in active systemic lupus erythematosus[J]. *J Leukoc Biol*, 2001, 70:749-755.
- [16] 钱 铮, 姚定康, 蒋廷旺, 吴传勇, 王 燕, 耿红莲, 等. 颗粒溶素在原发性胆汁性肝硬化患者外周血中的表达及临床意义[J]. *第二军医大学学报*, 2006, 27:1214-1217.  
Qian C, Yao D K, Jiang T W, Wu C Y, Wang Y, Geng H L, et al. Expression of granulysin in peripheral blood of patients with primary biliary cirrhosis and its clinical significance[J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2006, 27:1214-1217.
- [17] 刘海英, 周 晔, 姚定康, 陈 燕, 屠小卿, 张 建, 等. 原发性胆汁性肝硬化与HLA-DRB1等位基因的相关性[J]. *第二军医大学学报*, 2004, 25:1292-1294.  
Liu H Y, Zhou Y, Yao D K, Chen Y, Tu X Q, Zhang J, et al. Correlation analysis of primary biliary cirrhosis with HLA-DRB1 alleles polymorphism[J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2004, 25:1292-1294.
- [18] 梁 艳, 杨再兴, 王 燕, 李 畅, 曹伟娟, 仲人前. 原发性胆汁性肝硬化患者血浆可溶性肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体的表达及临床意义[J]. *第二军医大学学报*, 2007, 28:151-153.  
Liang Y, Yang Z X, Wang Y, Li C, Cao W J, Zhong R Q. Plasma level of soluble tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in patients with primary biliary cirrhosis: expression and clinical significance[J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2007, 28:151-153.
- [19] 赵 军, 苏海滨, 朱 冰, 迟淑萍, 吴贻琛, 辛绍杰, 等. 中国北方汉族人原发性胆汁性肝硬化与HLA-DRB基因相关性的初步研究[J]. *第二军医大学学报*, 2006, 27:1286-1289.  
Zhao J, Su H B, Zhu B, Chi S P, Wu Y C, Xin S J, et al. Relationship between HLA-DRB alleles and primary biliary cirrhosis in patients living in northern China[J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2006, 27:1286-1289.