

• 论 著 •

兰州地区慢性乙型肝炎患者外周血 T 淋巴细胞亚群与 HBV DNA 水平的相关性研究*

李彩东, 吴斌, 陈锡莲, 田鹏飞, 段正军

(甘肃省兰州市第二人民医院肝病研究所, 甘肃兰州 730046)

摘要:目的 通过分析不同病毒载量慢性乙型肝炎(CHB)患者和乙型肝炎病毒携带者(ASC)外周血 T 淋巴细胞各亚群变化的规律,探讨乙肝病毒复制水平对 T 淋巴细胞免疫功能的影响及其可能机制。方法 选择兰州市第二人民医院 2012 年 7~12 月收治的 CHB 患者 63 例(CHB 组),选取同期 ASC 患者 112 例(ASC 组),健康体检者 84 例(对照组)。采用流式细胞仪检测三项分组血清中 T 淋巴细胞亚群水平,实时荧光定量法检测 HBV DNA 水平。结果 CHB 组患者和 ASC 组患者外周血 CD3⁺、CD4⁺及 CD4⁺/CD8⁺水平均低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);而 CD8⁺水平则显著高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 兰州地区慢性 HBV 感染者 T 淋巴细胞亚群存在不同程度免疫调节异常和功能障碍。

关键词:慢性乙型肝炎; T 淋巴细胞亚群; 兰州

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.06.005

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)06-0731-03

The correlation study of the peripheral blood T-lymphocyte subsets variation and HBV DNA in Lanzhou patients with chronic hepatitis B*

Li Caidong, Wu Bin, Chen Xilian, Tian Pengfei, Duan Zhengjun

(Research Institute of Liver Disease, Lanzhou Municipal Second People's Hospital, Lanzhou, Gansu 730046, China)

Abstract:Objective To investigate the influence of hepatitis B virus(HBV) replication level on the T lymphocyte immune function and its possible mechanism by analyzing the change rule of peripheral blood T lymphocyte subsets in the different HBV load patients with chronic hepatitis B (CHB) and asymptomatic hepatitis B virus carriers(ASC). **Methods** 63 cases of CHB(CHB group), 112 cases of ASC(ASC group) and 84 individuals of physical examination(control group) in our hospital from July to December 2012 were selected and detected the various T lymphocyte subsets by flow cytometry and the HBV DNA level by the real time fluorescence quantitative polymerase chain reaction. **Results** The levels of peripheral blood CD3⁺, CD4⁺ lymphocyte cells and CD4⁺/CD8⁺ T in the CHB group and ASC group were significantly lower than those in the control group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$); whereas the CD8⁺ T level was obviously higher than that in the control group with statistical difference ($P < 0.05$). **Conclusion** Different degrees of immune dysregulation and immune dysfunction exist among the patients with chronic HBV infection in Lanzhou area.

Key words: chronic hepatitis B; T-lymphocyte subsets; Lanzhou

机体感染乙型肝炎病毒(HBV)后,通过对抗 HBV 特异性抗原引起的一系列免疫反应而导致肝脏炎症。HBV 并不直接引起肝细胞损伤,而是免疫系统介导的免疫应答在清除被 HBV 感染的肝细胞时导致了细胞的免疫损伤^[1]。机体免疫功能状态能够影响疾病的发展,在清除感染了 HBV 的肝细胞时细胞免疫则发挥主要作用。T 淋巴细胞具有识别抗原、激活并产生调节因子和趋化因子的功能,是机体细胞免疫功能的重要执行者,对疾病的病情和转归有重要意义^[2]。因此,研究 HBV 感染后 T 淋巴细胞亚群及其临床相关指标的变化,有助于对 HBV 感染者做出合理的临床诊治及预后评价。本研究分析兰州地区 HBV 携带者(ASC)、慢性乙型肝炎(CHB)患者外周血 T 淋巴细胞亚群的变化规律,有利于进一步探讨 HBV 感染后的免疫病理机制,为病毒性乙型肝炎的特异性免疫治疗提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集本院 2012 年 7~12 月住院及肝病专家门诊 HBV 感染者 175 例,其中 CHB 患者 63 例(CHB 组),ASC 患者 112 例(ASC 组),所有患者均未接受治疗,排除其他

疾病,其中男 95 例,女 80 例,年龄 11~66 岁,平均(39.38±12.72)岁,诊断符合 2010 年 12 月中华医学会肝病学会和中华医学会感染学会联合制定的慢性乙型肝炎诊治指南^[3]中的诊断标准。对照组为同期门诊健康体检者,年龄 23~58 岁,平均(38.68±13.01)岁,其中男 39 例,女 45 例。

1.2 方法

1.2.1 T 淋巴细胞亚群检测 取 3 组研究对象空腹血清标本 2 mL,乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K₂)抗凝,在样品测定管中加入 50 μL 抗凝血,然后加入 20 μL 单抗(CD4FITC/CD8PE/CD3PerCP),振荡混匀,避光孵育 20 min(室温),随后加入 2 mL 溶血素,继续振荡并混匀,避光放置 15 min(室温)。离心 5 min(1 500 r/min),弃上清液。加入 2 mL PBS,离心 5 min(1 500 r/min),弃上清液,重复 1 次。最后加入 500 μL PBS,上机(美国 Bectond-Dickinson 公司)检测。采用 BD FACSuite 软件系统对所有数据进行荧光参数获取和分析。

1.2.2 HBV DNA 检测 无菌采集 3 组研究对象空腹血清标本 2 mL,注入无菌离心管,室温保存 2 h,1 600 r/min 离心 5 min,吸取离心管中血清 200 μL,转入另一无菌 1.5 mL 离心

* 基金项目:兰州市科技发展计划项目(2012-1-12)。 作者简介:李彩东,女,主任药师,主要从事慢性肝病的发病机制研究。

管。最后取 5 μL 血清,用于 DNA 提取。采用美国 ABI-7300 荧光定量 PCR 分析仪进行基因扩增,试剂购自湖南圣湘生物科技有限公司。结果判断标准:小于 10² IU/mL 为阴性,10²~10⁴ IU/mL 为低载量组,10⁵~10⁶ IU/mL 为中载量组,>10⁷ IU/mL 为高载量组。

1.3 统计学处理 应用 SPSS17.0 统计软件包进行线性相关分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。成对样本均值用 *t* 检验,多组样本均值用方差分析,偏态分布资料的比较采用秩和检验,率的比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HBV 感染者 T 淋巴细胞亚群检测结果 与对照组比较,兰州地区 CHB 组和 ASC 组外周血 CD3⁺、CD4⁺ 及 CD4⁺/CD8⁺ 水平显著降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);CD8⁺ 水平则显著升高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);随着病情发展,CD4⁺ 和 CD4⁺/CD8⁺ 水平呈现逐渐下降的趋势,CD8⁺ 则呈现逐渐升高的趋势,见表 1。

表 1 各组外周血 T 淋巴细胞亚群检测结果 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	n	CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺ /
		T 淋巴细胞	T 淋巴细胞	T 淋巴细胞	CD8 ⁺
ASC 组	112	72.14 ± 5.79*	39.47 ± 8.74*	30.74 ± 8.44#	1.34 ± 0.63*
CHB 组	63	74.07 ± 6.89*	38.43 ± 8.35*	31.42 ± 9.02#	1.31 ± 0.67*
对照组	84	78.53 ± 9.02	42.69 ± 7.57	27.91 ± 6.15	1.54 ± 0.61

*: $P < 0.05$, 与对照组比较; #: $P < 0.05$, 与对照组比较。

2.2 ASC 患者 HBV DNA(+) 不同载量组 T 淋巴细胞检测结果 与对照组比较,ASC 患者 HBV DNA 高载量组 CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ 水平均有显著升高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);与对照组比较,CD8⁺ 显著降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见表 2。

2.3 CHB 患者 HBVDNA(+) 不同载量组 T 淋巴细胞检测结果 与对照组比较,CHB 患者高病毒载量组 CD3⁺、CD4⁺ 及 CD4⁺ T/CD8⁺ 水平均显著降低 ($P < 0.05$),CD8⁺ 水平显著

升高 ($P < 0.01$);且低病毒载量组 CD3⁺ 水平显著降低 ($P < 0.01$)。与低病毒载量组相比,高病毒载量组 CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ 水平显著降低 ($P < 0.05$),CD8⁺ 水平显著升高 ($P < 0.05$)。与中病毒载量组相比,高病毒载量组 CD8⁺ 水平显著升高 ($P < 0.05$)。其余差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见表 3。

表 2 ASC 患者 HBV DNA(+) 不同载量组 T 淋巴细胞检测结果 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	n	CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺ /
		T 淋巴细胞	T 淋巴细胞	T 淋巴细胞	CD8 ⁺
高载量组	13	70.65 ± 4.50*	35.22 ± 5.60*	32.52 ± 5.79#	1.07 ± 0.31*
中载量组	15	73.44 ± 4.15	36.28 ± 6.15	31.13 ± 7.06	1.29 ± 0.52
低载量组	38	70.95 ± 7.57	36.86 ± 9.94	31.17 ± 10.18	1.31 ± 0.66
对照组	84	78.53 ± 9.02	42.69 ± 7.57	27.91 ± 6.15	1.54 ± 0.61

*: $P < 0.05$, 与对照组比较; #: $P < 0.05$, 与对照组比较。

2.4 HBV 感染者 T 淋巴细胞与 HBV DNA 载量的相关性分析 CHB 组 CD3⁺ 水平与 HBV DNA 载量呈正相关 ($r = 0.221, P < 0.05$);ASC 组 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺ 与 HBV DNA 载量均无相关性。CHB 组 CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺ 与 HBV DNA 载量亦无相关性,见表 4。

表 3 CHB 患者不同 HBV DNA 载量组 T 淋巴细胞检测结果 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	n	CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺ /
		T 淋巴细胞	T 淋巴细胞	T 淋巴细胞	CD8 ⁺
高载量组	18	72.98 ± 9.41*	35.83 ± 8.72*	35.82 ± 7.92*	0.87 ± 0.58*
中载量组	19	70.80 ± 8.59	40.52 ± 7.76	29.13 ± 8.25	1.45 ± 0.76
低高量组	26	72.45 ± 9.03	41.22 ± 8.98	30.05 ± 9.51	1.41 ± 0.63
对照组	84	78.53 ± 9.02	42.69 ± 7.57	27.91 ± 6.15	1.54 ± 0.61

*: $P < 0.05$, 与对照组比较。

表 4 HBV 感染者 T 淋巴细胞与 HBV DNA 载量的相关性分析

组别	n	CD3 ⁺ T 淋巴细胞 (%)		CD4 ⁺ T 淋巴细胞 (%)		CD8 ⁺ T 淋巴细胞 (%)		CD4 ⁺ /CD8 ⁺	
		r	P	r	P	r	P	r	P
		ASC 组	63	0.120	0.146	0.083	0.509	-0.015	0.905
CHB 组	63	0.221	0.048	-0.207	0.104	0.193	0.129	-0.175	0.170

3 讨论

特异性 T 淋巴细胞在慢性 HBV 感染的发病机制和病毒清除过程中发挥了十分重要的作用^[4]。根据其表面标志物不同,可将由不同的亚群组成的 T 淋巴细胞分为 CD3⁺、CD4⁺ 和 CD8⁺ T 淋巴细胞等若干亚群^[5]。机体发挥正常免疫功能的重要基础是 T 淋巴细胞各亚群间的相对稳定,同时 T 淋巴细胞的数量和比例可反映机体免疫水平,通过相互制约、相互作用,共同参与机体的免疫应答^[6]。一旦不同 T 淋巴细胞亚群的数量和功能发生变化时,可引起免疫功能紊乱,同时伴随一系列的病理变化。因此,检测 T 淋巴细胞亚群水平的变化对调节细胞免疫功能、指导临床治疗都有极为重要的意义。

自身免疫性疾病中,CD8⁺ T 淋巴细胞的功能低下,CD4⁺

T 淋巴细胞数量和功能的增高是发病的重要因素,免疫缺陷病的重要指征还包括 CD4⁺/CD8⁺ 比值降低^[7]。本研究结果显示:与对照组相比,兰州地区 CHB 组和 ASC 组外周血 CD8⁺ 水平显著升高,CD3⁺、CD4⁺ 及 CD4⁺/CD8⁺ 水平显著降低 ($P < 0.05$),与刘俊英等^[1] 及李鸿宾等^[8] 报道的结果相似;对照组、ASC 组和 CHB 组,CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ 水平均呈降低趋势,CD8⁺ 水平则表现为上升趋势。患者感染乙型肝炎病毒成为携带者时,血清中 HBV DNA 载量升高可能会引起 CD3⁺ T 淋巴细胞数量减少,T 淋巴细胞亚群在抗原刺激下发生细胞凋亡或免疫耐受的反应,数量不升反降,免疫效应由激活变为抑制。乙型肝炎的慢性化过程使 T 淋巴细胞大量损耗,导致 CD4⁺ T 淋巴细胞数量下降;同时,HBV 抗原长期存在,刺激 CD8⁺ T

淋巴细胞数量升高,升高的 CD8⁺ T 淋巴细胞中的细胞毒性 T 淋巴细胞会对肝细胞造成损伤,同时 CD8⁺ T 淋巴细胞中的抑制性 T 淋巴细胞又会抑制 CD4⁺ T 淋巴细胞,降低其辅助清除 HBV 的能力,上述两个方面互为因果,导致 T 淋巴细胞亚群的紊乱^[9]。

本研究还发现,兰州地区 HBV 携带者 HBV DNA 载量与 T 淋巴细胞亚群中的各项指标(CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 及 CD4⁺/CD8⁺ 比值)之间均无相关性($P > 0.05$)。以上结果说明 HBV 携带者 T 淋巴细胞亚群变化与 HBV DNA 的载量无明显相关性,与吴健林等^[10]报道一致。在免疫耐受期,免疫细胞功能缺陷能导致机体的免疫功能障碍,这也许就能解释 HBV 携带者 T 淋巴细胞数量的变化与 HBV DNA 的载量无显著相关性的原因。CHB 组患者的 HBV DNA 水平与 CD3⁺ T 淋巴细胞呈正相关($r = 0.221, P < 0.05$),提示 HBV 感染能影响外周血 T 淋巴细胞亚群的变化和 HBV 的复制水平,促进细胞免疫功能紊乱,这和王辉等^[11]和朱银芳等^[12]的报道一致。

综上所述,T 淋巴细胞亚群失衡参与了 HBV 感染后疾病的发生、发展及转归,其可能是 HBV 感染后慢性化的重要原因。因此,慢性 HBV 感染是一个由多种免疫细胞和细胞因子参与的复杂过程。T 淋巴细胞免疫功能与 HBV DNA 载量变化具有一定相关性,是乙肝慢性化和成为携带者的重要原因。检测 T 淋巴细胞亚群有助于深入研究 HBV 的发病机制及预后判断。

参考文献

[1] 刘俊英,杨京,贾红云. 不同临床类型 HBV 感染者外周血 T 细胞亚群的差异[J]. 世界华人消化杂志,2009,17(29):3038-3042.
 [2] 邱洁,龙启强,冯艳红,等. 慢性乙型肝炎患者外周血 NK 细胞和 T 淋巴细胞计数变化及其临床意义[J]. 实用肝脏病杂志,2010,

13(3):178-179.
 [3] 中华医学会肝病学会,中华医学会感染病学分会. 乙型肝炎防治指南[J]. 临床肝胆病杂志,2011,27(1):88-89.
 [4] 赵永晓,冯丽英,刘艳瑾. 慢性 HBV 感染不同阶段肝脏局部细胞免疫状态与病毒复制的关系[J]. 胃肠病学和肝病学杂志,2010,19(10):889-892.
 [5] Hui CK, Lau CK. Immune system and hepatitis B virus infection [J]. J Clin Virol,2005,34(1):44-48.
 [6] 赵永晓,冯丽英,刘艳瑾. 慢性 HBV 感染不同阶段肝脏局部细胞免疫状态与病毒复制的关系[J]. 胃肠病学和肝病学杂志,2010,19(10):889-892.
 [7] 白留江. 乙型肝炎患者 T 淋巴细胞亚群检测的临床意义[J]. 肝脏,2011,16(1):87-88.
 [8] 李鸿宾,江晓萍,叶裙,等. 测定慢性乙型肝炎患者外周血 T 淋巴细胞亚群的临床意义[J]. 安徽医药,2006,10(8):1128-1131.
 [9] Wu JL, Zeng ZL. Analysis of relationship between cellular immune status and HBV DNA levels in patients with HBeAg-negative and HBeAg-positive chronic hepatitis B[J]. 临床荟萃,2008,23(3):116-168.
 [10] 吴健林,曾志勋,李国坚,等. 乙型肝炎 e 抗原阴,阳性慢性乙型肝炎患者细胞免疫状态与乙型肝炎病毒 DNA 水平相关分析[J]. 临床荟萃,2008,23(3):166-168.
 [11] 王辉,高建鹏,游晶. 慢性乙型肝炎病毒感染者外周血 T 细胞亚群变化与其血清 HBV DNA 的水平分析[J]. 临床医药实践,2012,21(6):418-422.
 [12] 朱银芳,顾锡炳,蒋亦明,等. HBeAg 阴性的慢性乙型病毒性肝炎外周血 T 细胞亚群的变化[J]. 现代中西医结合杂志,2011,20(21):2625-2626.

(收稿日期:2014-11-18)

(上接第 730 页)

诱导血小板活化,使血小板激活并聚集在肿瘤细胞周围形成血小板-肿瘤细胞复合物(TCIPA)^[7]。随着分期越晚越易引起血小板形成微聚集,为肿瘤细胞在脉管系统中的存活及其成功转移提供了可能性。可表现为血小板体积大小不均,导致 MPV 和 PDW 升高。肿瘤细胞产生血小板衍生长因子致骨髓巨核细胞增生代谢活跃,产生大体积的血小板(P-LCR)。同时,肿瘤细胞能通过释放组织因子(TF)、凝血酶和基质金属蛋白酶(MMP)等诱导血小板活化,而被活化的血小板则进一步释放一些潜在的促聚集物质,如二磷酸腺苷(ADP)、TXA₂、纤维蛋白原(Fg)、花生四烯酸(AA)等^[8];同时发生黏附分子的变构及上调,一方面继续促进血小板的聚集,另一方面,聚集的血小板进一步与肿瘤细胞黏附,促进肿瘤的血行转移^[9-10]。

综上所述,血小板参数增高与肺癌的关系密切,测定血小板参数可作为肿瘤发生、发展及预后判断的参考指标。当对肺癌远处转移深入研究时,越来越多检测手段应用于临床,例如循环肿瘤细胞(CTCs)、可溶性组织因子等,但这些检测费用昂贵、不宜开展等缺点。因此更应关注常规检测项目,例如血小板的五项参数。通过这些简便易得、不用额外的检查费用而获得足够多的信息以指导临床。

参考文献

[1] Dashevsky O, Varon D, Brill A. Platelet-derived microparticles promote invasiveness of prostate cancer cells via upregulation of

MMP-2 production[J]. Int J Cancer,2009,124(8):1773-1777.
 [2] 宫亮,杨和平. 肺癌患者外周血血小板在肺癌血行转移中的作用研究[J]. 现代生物医学进展,2009,20(13):2502-2504.
 [3] Riaz SP, Luchtenborg M, Coupland VH, et al. Trends in incidence of small cell lung cancer and all lung cancer [J]. Lung Cancer, 2012,75(3):280-284.
 [4] Ohtsuka M, Sasaki K, Ueno T, et al. Platelet-derived microparticles augment the adhesion and neovascularization capacities of circulating angiogenic cells obtained from atherosclerotic patients [J]. Atherosclerosis,2013,227(2):275-282.
 [5] 高艳霞. 血小板参数在感染性休克患者中的变化[J]. 中华危重病急救医学,2014,26(1):28-32.
 [6] Bambace NM, Holmes CE. The platelet contribution to cancer progression [J]. J Thromb Haemost,2011,9(2):237-249.
 [7] 黄媛,陈建魁,于农,等. 肺癌患者血小板计数与血浆纤维蛋白原水平变化与肿瘤转移的关系[J]. 国际检验医学杂志,2013,20(19):2532-2533.
 [8] van den Berg YW, Osanto S, Reitsma PH, et al. The relationship between tissue factor and cancer progression: insights from bench and bedside[J]. Blood,2012,19(4):924-923.
 [9] 李娟,罗以勤. 血小板在恶性肿瘤中的作用[J]. 国际检验医学杂志,2013,34(20):2713-2716.
 [10] 李明德,王东. 血小板活化的研究进展[J]. 国际检验医学杂志,2011,32(2):218-220.

(收稿日期:2014-12-10)