

· 临床研究 ·

广西桂北地区慢性 HBV 感染不同免疫状态与外周血 T、B 细胞亚群和 NK 细胞的相关性研究*

唐翔宇¹, 杨丽莎^{2△}, 唐美媛³, 欧阳清³, 吴淋玲¹, 辛 胜¹, 张 兵¹, 张 敏¹

(桂林医学院附属医院: 1. 消化内科; 2. 中医科; 3. 检验科, 广西桂林 541001)

摘要:目的 了解广西桂北地区慢性 HBV 感染者不同免疫状态外周血 T、B 细胞亚群和 NK 细胞的数值、相互关系及区别。方法 分析和比较免疫耐受组、免疫清除组、免疫不全组及对照组共 80 例慢性 HBV 感染者, 每组 20 例。用流式细胞仪检测其外周血淋巴细胞亚群和 NK 细胞, 分析其区别与联系。结果 百分比和绝对数结果中, 免疫清除组的 NK 细胞、CD4⁺ T 细胞及 CD4⁺/CD8⁺ 比值较对照组减少 ($P < 0.05$), B 细胞、CD8⁺ T 细胞较对照组增加 ($P < 0.05$)。百分比数值中, 免疫耐受组和免疫不全组的 CD4⁺ T 细胞及 CD4⁺/CD8⁺ 比值较对照组减少 ($P < 0.05$), CD8⁺ T 细胞较对照组增加 ($P < 0.05$)。绝对值数值中, 免疫耐受组和免疫不全组的 CD4⁺ T 细胞较对照组减少 ($P < 0.05$)。不同组间相比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 慢性 HBV 感染者体内存在淋巴细胞亚群失衡和细胞免疫功能紊乱。外周血淋巴细胞和 NK 细胞的检测对于了解患者免疫状态、评估病情、指导用药和疫苗开发有一定的临床应用价值。

关键词: 肝炎, 乙型, 慢性; 免疫耐受; 免疫清除; 免疫不全; T 淋巴细胞; B 淋巴细胞; 杀伤细胞, 天然

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2013.05.006

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)05-0496-03

Study on relationship between different immune states and the levels of peripheral blood T cell subsets, B cell subsets and NK cells in patients with chronic hepatitis B virus infection in North Guangxi*

Tang Xiangyu¹, Yang Lisha^{2△}, Tang Meiyuan³, Ou Yangqing³,Wu Linling¹, Xin Sheng¹, Zhang Bin¹, Zhang Min¹

(1. Department of Gastroenterology; 2. Department of Chinese Medicine; 3. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital, Guilin Medical University, Guilin, Guangxi 541001, China)

Abstract: Objective To investigate the relationship between different immune states and the levels of peripheral blood T cell subsets, B cell subsets and NK cells in patients with chronic hepatitis B virus infection in North Guangxi. **Methods** 80 patients: 20 immune tolerance cases, 20 immune clearance cases, 20 immunodeficiency (inactive) cases and 20 normal control cases, were selected. The levels of peripheral blood lymphocyte subsets and NK cells were detected by the flow cytometry. **Results** In the immune clearance group, the numbers of NK cells and CD4⁺ T lymphocytes, and CD4⁺/CD8⁺ ratio were lower than those in normal control group ($P < 0.05$). And the numbers of B lymphocytes and CD8⁺ T lymphocytes were higher than those in normal control group ($P < 0.05$). In the immune tolerance and immunodeficiency (inactive) group, the number of CD4⁺ T lymphocytes and CD4⁺/CD8⁺ ratio were lower than those in normal control group ($P < 0.05$). And the number of CD8⁺ T lymphocytes was higher than that in normal control group ($P < 0.05$). In the immune tolerance and immunodeficiency (inactive) groups, the number of CD4⁺ T lymphocytes was lower than that in normal control group ($P < 0.05$). There were statistically significant difference between different groups ($P < 0.05$). **Conclusion** There are lymphocyte subsets imbalance and immune dysfunction in patients with chronic HBV infection. The detection of peripheral blood lymphocyte subsets and NK cells have clinical valuable for understanding the immune status of patients, assessing the patients' condition, guiding treatment and developing vaccine.

Key words: hepatitis B, chronic; immune tolerance; immune clearance; immunodeficiency; T-lymphocyte; B-lymphocyte; kill cells, nature

乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 感染与肝硬化、肝癌的发生密切相关^[1], 《慢性乙型肝炎防治指南 (2010 年版)》将慢性乙型病毒性肝炎自然史分为免疫耐受期、免疫清除期、非活动期 (低复制期) 及再活动期^[2]。HBV 感染后不同个体可以表现为免疫耐受、免疫清除和免疫不全 (包括非活动和再活

动期) 等状态^[3]。T 细胞、B 细胞及 NK 细胞是人体主要的免疫细胞。CD3⁺ 细胞代表总 T 细胞, T 细胞又可分为 CD4⁺ 和 CD8⁺ 两个亚群。本研究通过检测外周血 T、B 细胞亚群及 NK 细胞的百分比和绝对数, 分析慢性 HBV 患者不同免疫状态的区别与联系。现报道如下。

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81260602); 广西科学研究与技术开发计划资助项目 (桂科攻 10124001B); 广西中医药管理局中医药科技专项课题立项资助项目 (GZKZ09-85)。作者简介: 唐翔宇 (1986~), 硕士, 主要从事肝病的免疫方面的研究。△ 通讯作者, Tel: (0773) 2807914; E-mail: yangsha@glmc.edu.cn。

表 1 各组 T、B 细胞及 NK 细胞百分比 ($\bar{x} \pm s, n=20$)

组别	CD3 ⁺ T 细胞(%)	B 细胞(%)	NK 细胞(%)	CD4 ⁺ T 细胞(%)	CD8 ⁺ T 细胞(%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
免疫耐受组	71.5±8.1	12.8±4.1	13.3±4.7 [△]	34.6±5.2* [△]	27.7±5.9* [△]	1.30±0.4* [△]
免疫清除组	70.8±9.6	15.9±3.8*	9.7±4.2*	30.8±5.4*	32.6±6.3*	1.12±0.3*
免疫不全组	69.7±9.5	13.2±3.3	13.0±3.9 [△]	35.4±4.1* [△]	28.3±6.0* [△]	1.34±0.3* [△]
对照组	72.2±8.3	11.7±4.1	14.5±5.6	40.1±6.8	23.8±5.8	1.61±0.4

*: $P < 0.05$, 与对照组相比; [△]: $P < 0.05$, 与免疫清除组比。

表 2 各组 T、B 细胞及 NK 细胞绝对数 ($\bar{x} \pm s, n=20$)

组别	CD3 ⁺ T 细胞(μ L)	B 细胞(μ L)	NK 细胞(μ L)	CD4 ⁺ T 细胞(μ L)	CD8 ⁺ T 细胞(μ L)
免疫耐受组	1462±120	232±103	281±169 [△]	766±201* [△]	583±160
免疫清除组	1427±315	266±85*	210±118*	583±207*	598±138*
免疫不全组	1484±292	219±129	263±124 [△]	711±187* [△]	576±170
对照组	1577±421	228±79	320±165	962±198	558±196

*: $P < 0.05$, 与对照组相比; [△]: $P < 0.05$, 与免疫清除组比。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2011 年 6 月至 2012 年 6 月桂林医学院附属医院及桂林市传染病医院慢性 HBV 感染者 80 例, 年龄 18~65 岁, 中位年龄 35 岁, 其中男 46 例, 女 34 例, 均为本地人。按《慢性乙型肝炎防治指南(2010 年版)》标准分为免疫耐受组、免疫清除组、免疫不全(非活动期)组及对照组, 每组 20 例。排除其他类型肝炎、正在使用核苷(酸)类似物和干扰素等抗病毒药物或免疫调节剂、已明确诊断为肝癌者, 及合并严重的心、脑、肾、肺功能障碍、重症糖尿病等患者。

1.2 方法

1.2.1 肝功能检测 由 AEROSSET 全自动生化仪测定。
 1.2.2 HBV 血清标记物(乙肝两对半)检测 采用时间分辨免疫荧光分析法, 仪器为上海新波生物技术有限公司 ANY-TEST 2000 时间分辨仪。
 1.2.3 HBV-DNA 定量检测 采用实时荧光探针定量-聚合酶链反应(FQ-PCR)方法, 仪器为美国 MJ Research 公司 MJ Opticon Monitor 实时荧光定量 PCR 仪。
 1.2.4 血细胞分析 采用全自动血液分析仪。
 1.2.5 外周血淋巴细胞亚群检测方法 采用四色荧光标记流式细胞术(flow cytometry, FCM), 常规静脉采外周血。实验试剂: 四色淋巴细胞亚群试剂, 溶血素, 0.01 mol/L 磷酸缓冲液(PBS), EDTA 抗凝血。主要仪器: 采用美国 Beckman Coulter 公司的 EPICS-XL 流式细胞仪。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行统计学分析, 采用单因素方差分析, 统计学显著性检验水准为 0.05(双侧), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 T、B 细胞及 NK 细胞百分比 各组 CD3⁺ T 细胞与对照组相比差异无统计学意义($P > 0.05$); 各组 CD4⁺ T 细胞和 CD4⁺/CD8⁺ 比值与对照组相比均降低, 各组 CD8⁺ T 细胞与对照组相比均升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 免疫清除组与对照组相比, B 细胞升高, NK 细胞降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 免疫耐受组和免疫不全组 CD4⁺ T 细胞、

CD4⁺/CD8⁺ 及 NK 细胞均高于免疫清除组, CD8⁺ T 细胞低于免疫清除组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 各组 T、B 细胞及 NK 细胞绝对数 各组 CD3⁺ T 细胞与对照组相比差异无统计学意义($P > 0.05$); 各组 CD4⁺ T 细胞与对照组相比均降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 免疫清除组 CD8⁺ T 细胞以及 B 细胞与对照组相比升高, NK 细胞降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 免疫耐受组和免疫不全组 CD4⁺ T 细胞及 NK 细胞高于免疫清除组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

3 讨论

免疫耐受期是通常说的慢性 HBV 健康携带者, 其特点是血清 HBsAg、HBeAg 阳性, HBV-DNA 通常大于 10^6 copy/mL, 但血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)水平正常, 肝组织学无明显异常并可维持数年甚至数十年, 或轻度炎性坏死, 或仅有缓慢肝纤维化的进展。免疫清除期是通常说的慢性乙型肝炎, 表现为 HBV-DNA $> 10^4$ copy/mL, 伴有 ALT 持续或间歇性增高, 肝组织学中度或严重炎症坏死、肝纤维化可快速发展, 部分患者可发展为肝硬化和肝衰竭。非活动期又称低(非)复制期, 表现为 HBeAg 阴性、抗-HBe 阳性, HBV-DNA 持续低于 10^4 copy/mL 或检测不出(PCR 法)、ALT 水平正常, 肝组织学无炎症或仅有轻度炎症, 这是 HBV 感染获得免疫控制的结果, 大部分此期患者发生肝硬化和肝细胞癌的风险大大的减少。

目前业内学者普遍认为, HBV 病毒本身并不直接损伤肝细胞, 而是通过引起宿主自身的免疫反应间接导致肝细胞的损伤。其中, 细胞免疫反应是 HBV 感染后引起肝细胞损害的主要机制^[4]。

T 细胞是机体抗感染免疫反应中起主导作用的免疫活性细胞。其中, CD3⁺ 细胞代表总 T 细胞。T 细胞由其表型及功能的不同可以分为 CD4⁺ 与 CD8⁺ 两个亚群, CD4⁺ 细胞主要为辅助 T 细胞(Th), 除在免疫应答中起辅助和诱导作用外, 还分泌细胞因子如白细胞介素-2(IL-2)、 γ -干扰素(IFN- γ)等; CD8⁺ 细胞主要为细胞毒性 T 细胞(cytotoxic lymphocyte CTL), CTL 是免疫系统清除病毒感染细胞的主要效应细胞。在正常

机体内各 T 细胞亚群相互协作或相互制约。CD4⁺/CD8⁺ 比值是机体免疫平衡的重要指标之一,其比值变化可直接反应机体细胞免疫功能状态^[5]。本研究中各组 CD3⁺T 细胞百分比和绝对数的数值与对照组相比差异无统计学意义,这可能与患者在抗 HBV 过程中主要是由 CD4⁺ 和 CD8⁺T 细胞直接参与有关。各组 CD4⁺T 细胞百分比与绝对数、CD4⁺/CD8⁺ 比值与对照组相比降低,CD8⁺T 细胞则升高,以免疫清除组的幅度最明显,其差异有统计学意义,这与刘俊英等^[6]、田瑛等^[7]的研究结果相似。以上数据表明,在慢性 HBV 感染中,CD4⁺T 细胞遭受破坏致生成减少,提示体内特异性抗体生成不足,不能清除游离的乙肝病毒。CD8⁺T 细胞生成增加,一方面相对升高的 CD8⁺T 细胞中的 T 抑制细胞抑制 CD4⁺T 细胞,继而引发 CD4⁺T 细胞清除病毒力下降;另一方面升高的 CD8⁺T 细胞中的 CTL 损伤肝细胞。CD4⁺/CD8⁺ 的比值下降,提示免疫功能下降。免疫耐受组和免疫不全组各数值差异无统计学意义,可能与两组患者肝脏炎症活动度相当有关^[8]。

B 细胞是人体的主要体液免疫细胞。本研究中各组 B 细胞百分比和绝对数中,免疫清除组与对照组相比数值明显增加,差异有统计学意义,与强占荣等^[9]、郑源海等^[10]研究结果相似。HBV 感染人体后,激发免疫系统使致敏 B 细胞转化成浆细胞,产生与相应抗原结合的抗体,提示特异性体液免疫在 HBV 的病理生理进程中起一定作用。研究证明细胞和体液免疫应答活化并且相互作用有助于宿主控制感染,如果这种相互作用,因某一方作用不足将影响另一方的作用,以及保护性效应^[11]。

NK 细胞是机体天然免疫的主要承担者,也是获得性细胞免疫的核心调节细胞。NK 细胞一方面可通过 CTL 途径直接杀伤病毒感染的靶细胞,另一方面可通过死亡受体系统诱导细胞凋亡,清除已受病毒所感染的细胞,此外,还可分泌大量的免疫调节效应因子和炎症细胞因子发挥抗病毒的功能^[12-13]。本研究中免疫清除组的 NK 细胞绝对数和百分比在各组中数值最低,与其他 3 组相比差异有统计学意义,结果与强占荣等^[9]、张政等^[14]相似。免疫耐受组和免疫不全组的数值也较对照组有所下降。结果提示慢性 HBV 感染者 NK 细胞活性降低,一方面表明 NK 细胞计数对病情严重程度评估有一定临床意义,另一方面表明 HBV 感染转归中 NK 细胞的减少可能与 HBV 感染后的慢性化有关^[9]。

由于机体感染 HBV 后,人体各淋巴细胞亚群间的平衡被打破,表现为外周血淋巴细胞亚群百分比、绝对数或功能改变。因此,临床上常进行外周血淋巴细胞免疫功能检测以评估患者的病情状况及预后。

参考文献:

[1] 陆再英,钟南山. 内科学[M]. 7 版. 北京:人民卫生出版

社,2008:368.

- [2] 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]. 中国病毒病杂志, 2011,1(1):9-23.
- [3] 杨丽莎. 乙型肝炎病毒感染不同免疫状态证候的研究思路[J]. 中国药物与临床,2008,8(9):682-683.
- [4] Wang FS, Zhang Z. Host immunity influences disease progression and antiviral efficacy in humans infected with hepatitis B virus[J]. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2009,3(4):499-512.
- [5] Jing Y, Lin Z, Yi Z, et al. Peripheral T-lymphocyte subpopulations in different clinical stages of chronic HBV infection correlate with HBV load[J]. *World J Gastroenterol*, 2009,15(27):3382-3393.
- [6] 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):3039-3042.
- [7] 田瑛,邱志峰,李太生. 慢性乙型肝炎患者和乙型肝炎病毒携带者外周血 T 细胞亚群的变化和意义[J]. 中华医学杂志,2005,85(47):3354-3358.
- [8] 李嘉,赵桂鸣,朱理珉,等. 免疫耐受期和非活动复制期乙型肝炎病毒感染者的肝脏病理与临床特征[J]. 中华肝病病杂志,2007,15(5):326-329.
- [9] 强占荣,林中,易彩霞,等. 慢性 HBV 感染者外周血淋巴细胞亚群及自然杀伤细胞检测的临床意义[J]. 中国中医药咨讯,2011,3(18):44-45.
- [10] 郑源海,周艳贞,林元峰,等. 慢性乙型肝炎患者外周血 T、B 淋巴细胞变化与其 HBV-DNA 的水平相关性探讨[J]. 实验与检验医学,2010,28(6):584-585.
- [11] Chisari FV, Isogawa M, Wieland SF. Pathogenesis of hepatitis B virus infection[J]. *Pathol Biol (Paris)*, 2010, 58(4):258-266.
- [12] Mondelli MU, Varchetta S, Oliviero B. Natural killer cells in viral hepatitis: facts and controversies[J]. *Eur J Clin Invest*, 2010,40(9):851-853.
- [13] Li J, Han YP, Jin K, et al. Dynamic changes of cytotoxic T lymphocytes(CTLs), natural killer(NK) cells, and natural killer T(NKT) cells in patients with acute hepatitis B infection[J]. *Virology*, 2011,8(2):199-206.
- [14] 张政,福军亮,周春保,等. 中国乙型肝炎患者外周血淋巴细胞亚群频率参考值范围[J]. 传染病信息,2011,24(8):206-210.

(收稿日期:2012-09-11 修回日期:2012-11-04)