

· 临床研究 ·

拉米夫定治疗慢性乙型肝炎患者后外周血 T 淋巴细胞亚群的变化研究*

杭双熊, 申红玉[△], 陈敏, 王永忠, 濮翔科

(江苏省常州市第三人民医院肝病研究所 213001)

摘要:目的 探讨拉米夫定治疗慢性乙型肝炎患者后外周血 T 淋巴细胞亚群状态的变化情况。方法 154 例慢性乙型肝炎患者按照 HBeAg 表达不同分为 HBeAg 阳性组(83 例)和 HBeAg 阴性组(71 例),采用流式细胞技术检测研究对象外周血的 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞的表达情况;并观察两组患者均给予拉米夫定治疗 24 周后,患者的 HBV-DNA、HBeAg、肝功能、CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞的变化情况。结果 两组的 CD4⁺ T 细胞均呈现不同程度的降低,而 CD8⁺ T 细胞则相对较高,与对照组相比差异有统计学意义($P < 0.05$);拉米夫定抗病毒治疗 24 周后,HBeAg 阳性组患者已有 60.2% 的患者 HBV-DNA 低于检测下限并有 HBeAg 阴转,且丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)均有明显降低,同时 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞较治疗前均有明显上升趋势($P < 0.05$);HBeAg 阴性组患者的 HBV-DNA、ALT、AST 等指标也呈明显降低,临床症状亦明显改善,CD4⁺ T 细胞的表达较治疗前明显提高($P < 0.05$),另有 5 例患者的病情未能得到有效控制,分析其外周血 CD4⁺ T 和 CD8⁺ T 细胞均有不同程度的表达下调。结论 T 淋巴细胞在慢性乙型肝炎的发病及转归中起到非常重要的作用,且核苷(酸)类似物抗病毒药物可以增强患者的细胞免疫,提高 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞的表达。

关键词:肝炎,乙型慢性;T 淋巴细胞亚群;CD4⁺ T 细胞;CD8⁺ T 细胞

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.04.010

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)04-0388-03

Analysis of the variations of T-lymphocyte subsets in peripheral blood in chronic hepatitis B patients after the therapy of Lamivudine*

Hang Shuangxiong, Shen Hongyu[△], Chen Min, Wang Yongzhong, Pu Xiangke

(Research Institute of Liver Disease of the Third People's Hospital of Changzhou, Changzhou, Jiangsu 213001, China)

Abstract: **Objective** To investigate the variations of T-lymphocyte subsets in peripheral blood in chronic hepatitis B patients after the therapy of Lamivudine. **Methods** Flow cytometry was used to detect the peripheral blood T-lymphocyte subsets in 154 patients of chronic hepatitis B who were divided into two groups according to the expression of HBeAg - the positive group and the negative group. The variations of HBV-DNA, HBeAg, liver function, CD4⁺ and CD8⁺ T cells in the patients were detected after a 24 weeks therapy of Lamivudine. **Results** Either in positive group or negative group, the percentage of CD4⁺ T cells was lower, but higher in CD8⁺ T cells, and both of the two groups had statistical differences compared with controls ($P < 0.05$). After the antiviral therapy by Lamivudine for 24 weeks, 60.2% patients' HBV-DNA and HBeAg became negative and the expressions of ALT and AST also obviously degraded in HBeAg positive group, meanwhile the expressions of CD4⁺ and CD8⁺ T cells were increasing and had significant differences compared with pre-therapy ($P < 0.05$) and in the HBeAg negative group, the expression of HBV-DNA, ALT and AST significantly degraded and the clinical symptoms also improved, furthermore the expression of CD4⁺ T cells obviously increased ($P < 0.05$). In addition, the analysis result of T-lymphocyte subsets in peripheral blood showed that the expressions of CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells degraded in the 5 patients whose conditions were not effectively controlled. **Conclusion** T lymphocyte played extremely important role in the course of disease with hepatitis B virus and Lamivudine could enhance cellular immunity of the patients, and improve the expression of CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells.

Key words: hepatitis B, chronic; T-lymphocyte subsets; CD4⁺ T lymphocyte; CD8⁺ T lymphocyte

乙型病毒性肝炎的发病与宿主免疫应答和调控的紊乱有着十分密切的关系。各种免疫细胞特别是 T 淋巴细胞亚群之间的调节紊乱是体内不能清除病原体及病毒在肝内持续复制的主要原因,由于 T 淋巴细胞可直接对已感染 HBV 的肝细胞膜上所表达的病毒抗原产生免疫反应,并参与对病毒的清除过程,因此 T 淋巴细胞在 HBV 感染中对病毒的清除、控制以及疾病的转归都有重要的影响^[1-3]。本文针对 T 淋巴细胞的这一特点,深入研究其在慢性乙型肝炎的治疗转归中发挥的作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料 实验组:154 例慢性乙型肝炎患者均选自 2011 年 1~8 月常州市第三人民医院住院及门诊病例,其中男 98 例,女 56 例,年龄 22~68 岁,平均(37.4±7.8)岁。诊断符合 2011 年中华医学会制定的《慢性乙型肝炎防治指南》诊断标准,将患者按照乙型肝炎病毒 e 抗原(HBeAg)表达阳性与否分为 HBeAg 阳性组(83 例)与 HBeAg 阴性组(71 例)。所有患者排除甲型、丙型、丁型、戊型肝炎病毒的感染,无自身免疫性疾病史,无嗜酒史,无肝毒性药物使用史,且所有患者在入组前

* 基金项目:常州市卫生局重大科技项目(ZD201106)。 作者简介:杭双熊(1964~),主管检验技师,大专,主要从事细胞免疫学研究。

[△] 通讯作者, E-mail: shenhongyu_2004@126.com。

表 1 各组之间外周血淋巴细胞各亚群的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	CD3 ⁺ (%)	CD3 ⁺ CD4 ⁺ (%)	CD3 ⁺ CD8 ⁺ (%)	CD16 ⁺ CD56 ⁺ (NK,%)	CD19 ⁺ (B)(%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
HBeAg 阳性组	83	69.2±19.1	31.4±11.6*	34.4±18.2*	16.6±13.6	13.2±9.4	1.43±1.02
HBeAg 阴性组	71	78.8±15.2* [△]	34.5±12.6*	43.7±16.2* [△]	12.5±10.3	7.6±6.6* [△]	1.06±0.92*
对照组	60	71.3±16.5	41.2±13.7	27.1±16.9	13.5±11.4	12.6±7.2	1.52±1.16

*: $P < 0.01$, 与对照组比较; [△]: $P < 0.05$, 与 HBeAg 阳性组比较。

表 2 HBeAg 阳性组和 HBeAg 阴性组患者经拉米夫定治疗 24 周后乙型肝炎相应检测指标的变化情况

检测项目	HBeAg 阳性组			HBeAg 阴性组		
	治疗前	治疗 12 周	治疗 24 周	治疗前	治疗 12 周	治疗 24 周
HBV-DNA 低于检测下 限的病例数(n)	0	42	50	39	52	54
HBeAg(PEIU/mL)	189.57±153.19	55.31±74.82	51.36±70.87	0.29±0.21	0.38±0.35	0.32±0.31
HBeAg 阴性率(%)	(0.0)	50.6	60.2	100.0	97.2	92.9
ALT(U/L)	352.69±331.87	106.18±101.35	98.54±99.94	92.59±90.31	48.38±47.26	46.79±44.52
ALT 阴性率(%)	2.4	54.2	69.9	47.9	70.4	81.7
CD3 ⁺ CD4 ⁺ (%)	31.4±11.6	45.4±28.5	46.8±26.3*	34.4±18.2	39.5±26.3	42.2±19.8*
CD3 ⁺ CD8 ⁺ (%)	34.5±12.6	40.3±19.7	45.5±22.7*	43.7±16.2	40.7±27.4	39.3±21.6

*: $P < 0.05$, 与治疗前比较。

均未使用过核苷(酸)类似物抗病毒药,入组后均使用拉米夫定(贺普丁)100 mg 每日 1 次口服治疗。对照组:选自 2011 年 4~8 月常州市第三人民医院门诊健康体检者 60 名,其中男 38 名,女 22 名,平均年龄 35 岁。无其他自身免疫性疾病、感染性疾病等急慢性疾病史。

1.2 主要试剂、仪器及操作方法 流式细胞检测所用的荧光标记抗体(鼠抗人 CD3-FITC、CD8-PE、CD45-PerCP、CD4-APC、CD16-PE+CD56-PE、CD19-APC)、红细胞裂解液等均购自美国 BD 公司,用 BD FACSCalibur 流式细胞分析仪检测,检测的上限及下限值分别是(%);CD3⁺T 细胞 55~84,CD4⁺T 细胞 31~60,CD8⁺T 细胞 13~41,NK 细胞 5~27,B 细胞 6~25;美国 ABI 公司 7500 Real Time PCR System 检测 HBV 病毒载量,试剂盒购自上海克隆生物高科技有限公司,检测下限为 1×10^3 IU/mL;丙氨酸氨基转移酶(ALT),天门冬氨酸氨基转移酶(AST)等肝功能检测采用日本 OLYMPUS AU2700,试剂购自上海中能德赛诊断技术有限公司,参考值为 0~50 U/L;HBeAg 检测采用美国 PerkinElmer 公司 1235 AutoDELFIA,试剂购自中山大学达安基因股份有限公司,参考值为 0~0.5 PEIU/mL,所有操作均严格按照操作说明进行。

1.3 标本采集 本院住院或门诊患者一经确认符合本实验入组条件者,即详细记录其联系方式,并定期[(12±1)周]进行随访,按时获得临床资料和血标本,并及时检测(包括 HBV-DNA,乙肝五项和肝功能)。

1.4 统计学处理 资料采用 SPSS13.0 进行数据处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计数资料比较用 Dunnett-t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 HBeAg 表达不同的慢性乙型肝炎患者外周血淋巴细胞各亚群的比较 与对照组相比,HBeAg 阳性组的 CD4⁺T 细胞明显降低,而 CD8⁺T 细胞则相对较高($P < 0.01$)。HBeAg 阴性组与对照组相比除 NK 细胞外,其他各指标差异有统计学

意义($P < 0.01$);HBeAg 阳性组和 HBeAg 阴性组的比较结果显示,CD3⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞和 B 淋巴细胞的表达差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 HBeAg 阳性组患者经抗病毒(贺普丁)治疗 24 周后,乙型肝炎相应检测指标的变化情况 本组 83 例患者经拉米夫定治疗 12 周后,有 42 例患者的 HBV-DNA 低于检测下限,治疗 24 周后,有 50 例患者低于检测下限,6 例患者明显降低,27 例没有明显变化;HBeAg、ALT 均有明显降低,其中 HBeAg 的阴转率为 60.2%;同时,CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞均有明显上升趋势($P < 0.01$)。见表 2。

2.3 HBeAg 阴性组患者经抗病毒(贺普丁)治疗 24 周后,各项检测指标的变化情况 经拉米夫定治疗 24 周后,本组 71 例患者中有 54 例患者的病情得到较好的控制,表现为 HBV-DNA 低于检测下限,HBeAg 持续阴性,患者的 ALT、AST 等指标明显降低,且临床症状亦有明显好转;与之相对应的 CD4⁺T 细胞的表达明显提高($P < 0.05$),而 CD8⁺T 细胞的表达略有降低趋势,但差异无统计学意义;另有 5 例患者 HBeAg 由阴性转为阳性,分析患者外周血 T 淋巴细胞亚群,结果显示有 3 例患者外周血的 CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞均低于检测下限,各 1 例患者的 CD4⁺T 细胞或 CD8⁺T 细胞低于检测下限。见表 2。

3 讨 论

慢性乙型肝炎的发病机制一直以来是困扰广大医护人员及科研人员的一大难题,宿主免疫调控的紊乱在慢性肝损伤中起到主要作用已成为国内外众多学者的一致共识^[4-6]。乙型肝炎的免疫病理主要由 T 淋巴细胞免疫应答状态决定,是由细胞免疫介导的免疫损伤,因此各种免疫细胞特别是 T 淋巴细胞亚群之间的调节紊乱,是体内不能清除病原体及 HBV 在肝内持续复制的主要原因^[7-10]。

T 淋巴细胞(CD3⁺)主要包括 CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞。CD4⁺T 细胞为辅助性 T 细胞,主要功能为调节体液免疫

和细胞免疫;CD8⁺T 细胞为杀伤性 T 细胞(CTL),是决定胞内微生物清除状态的关键细胞亚群。本研究结果显示,HBsAg 阳性组和 HBsAg 阴性组患者的外周血 CD4⁺T 细胞的表达比例普遍较低(分别为 66.7%和 31.7%,低于检测下限),与对照组比较差异有统计学意义($P<0.01$),经拉米夫定治疗后表达比例均有明显升高,且与治疗前比较差异有统计学意义($P<0.05$)。提示 CD4⁺T 细胞参与了慢性乙型肝炎的发病和疾病转归的过程,作者推测 CD4⁺T 细胞的低表达降低了其作为辅助性 T 细胞促进杀伤性 T 细胞和其他免疫细胞增殖及分化的能力,从而导致 HBV-DNA 的不断复制,因此 CD4⁺T 细胞很可能间接地参与了疾病的慢性化过程和病原体的清除。

而 CD8⁺T 细胞的表达在两实验组中都相对较高,与对照组比较差异有统计学意义($P<0.01$),特别是 HBsAg 阴性组有 63.4%患者的外周血 CD8⁺T 细胞高于检测上限,其与 HBsAg 阳性组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。经拉米夫定抗病毒治疗 24 周后,两组患者的乙肝相应检测指标和临床症状均得到明显改善,HBsAg 阳性组患者的外周血 CD8⁺T 细胞表达明显升高,与治疗前比较差异有统计学意义($P<0.01$),HBsAg 阴性组患者表达虽略有降低,但差异无统计学意义,提示 CD8⁺T 细胞参与了病原体的清除,且拉米夫定可以增强患者 CD8⁺T 细胞的这种 CTL 作用,从而将 HBV-DNA 控制在低载量复制状态中。5 例 HBsAg 由阴性转为阳性的患者 CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞分别呈现不同程度的低比例表达状态,提示可能由于 T 淋巴细胞数量的下降,机体参与细胞免疫反应的免疫活性细胞不足而导致病情出现反弹。

另外,NK 细胞在各组间的表达不存在差异,但 B 细胞在 HBsAg 阴性组中呈低表达状态,而在 HBsAg 阳性组中表达比例在正常值范围内,提示体液免疫在清除 HBV-DNA 的过程中亦发挥着一定的作用。

抗病毒目前已经成为治疗乙型肝炎的首选方案,虽然其作用机制尚不十分明确,但有学者观察到抗病毒药物治疗时机体对 HBV 的特异性免疫功能会显著增强^[11-12],且可能是一种间接作用的结果^[13-14]。还有报道称,HBV 的免疫清除依赖于其特异性 T 细胞反应的激活,该特异性 T 细胞反应强度和重量可以影响疾病的最终转归^[15]。本研究结果提示,T 淋巴细胞在慢性乙型肝炎的发病及转归中均起到非常重要的作用,且核苷(酸)类似物抗病毒药物可以增强患者的细胞免疫,提高 CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞的表达。

参考文献:

[1] Bauer T, Sprinzl M, Protzer U. Immune control of hepatitis B virus[J]. J Dig Dis, 2011, 29(4): 423-433.
 [2] Chang JJ, Lewin SR. Immunopathogenesis of hepatitis B virus infection[J]. Immunol Cell Biol, 2007, 85(1): 16-23.
 [3] Bertolotti A, Maini M, Williams R. Role of hepatitis B virus specific cytotoxic T cells in liver damage and viral con-

trol[J]. Antiviral Res, 2003, 60(2): 61-66.

[4] 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.
 [5] Rehermann B, Nascimbeni M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection[J]. Nat Rev Immunol, 2005, 5(3): 215-229.
 [6] Beckebaum S, Cicinnati VR, Zhang X, et al. Hepatitis B virus-induced defect of monocyte-derived dendritic cells leads to impaired T helper type 1 response in vitro: mechanisms for viral immune escape[J]. Immunology, 2003, 109(4): 487-495.
 [7] Boni C, Fiscaro P, Valdatta C, et al. Characterization of hepatitis B virus (HBV)-specific T-cell dysfunction in chronic HBV infection[J]. J Virol, 2007, 81(8): 4215-4225.
 [8] Fiscaro P, Valdatta C, Massari M, et al. Antiviral intrahepatic T-cell responses can be restored by blocking programmed death-1 pathway in chronic hepatitis B[J]. Gastroenterology, 2010, 138(2): 682-693.
 [9] Lopes AR, Kellam P, Das A, et al. Bim-mediated deletion of antigen-specific CD8 T cells in patients unable to control HBV infection[J]. J Clin Invest, 2008, 118(5): 1835-1845.
 [10] Das A, Hoare M, Davies N, et al. Functional skewing of the global CD8 T cell population in chronic hepatitis B virus infection[J]. J Exp Med, 2008, 205(9): 2111-2124.
 [11] Boni C, Penna A, Bertolotti A, et al. Transient restoration of antiviral T cell responses induced by lamivudine therapy in chronic hepatitis B[J]. J Hepatol, 2003, 39(4): 595-605.
 [12] Farrell GC, Teoh NC. Management of chronic hepatitis B cirrus infection: a new era of disease control[J]. Inter Med Jour, 2006, 36(2): 100-113.
 [13] 李建湘,恩替卡韦治疗对慢性乙型肝炎患者特异性细胞免疫功能的影响及其与 HBsAg 血清学转换的关系[J].中华实验和临床病毒学杂志, 2008, 22(2): 122-123.
 [14] Buster EH, Janssen HL. Antiviral treatment for chronic hepatitis B virus infection—immune modulation or viral suppression[J]. Neth J Med, 2006, 64(6): 175-185.
 [15] Carey I, D'Antiga L, Bansal S, et al. Immune and viral profile from tolerance to hepatitis B surface antigen clearance: a longitudinal study of vertically hepatitis B virus-infected children on combined therapy[J]. J Virol, 2011, 85(5): 2416-2428.

(收稿日期:2012-09-19 修回日期:2012-10-21)