

- (3):1151-1164
- 4 Lutsiak MEC, Semnani RT, Pascalis RD, *et al.* Inhibition of CD4⁺ CD25⁺ T regulatory cell function implicated in enhanced immune response by low-dose cyclophosphamide [J]. *Blood*, 2005, 105 (7): 2862-2868
- 5 Brode S, Raine T, Zacccone P, *et al.* Cyclophosphamide-induced type-1 diabetes in the nod mouse is associated with a reduction of CD4⁺ CD25⁺ foxp3⁺ regulatory T cells[J]. *Immunol*, 2006, 177 (10):6603-6612
- 6 Chu Y, Wang LX, Yang G, *et al.* Efficacy of GM-CSF-producing tumor vaccine after docetaxel chemotherapy in mice bearing established Lewis lung carcinoma[J]. *Immunother*, 2006, 29 (4):367-380
- 7 Beyer M, Kochanek M, Darabi K, *et al.* Reduced frequencies and suppressive function of CD4⁺ CD25^{hi} regulatory T cells in patients with chronic lymphocytic leukemia after therapy with fludarabine[J]. *Blood*, 2005, 106 (6):2018-2025
- 8 Lopez M, Aguilera R, Perez C, *et al.* The role of regulatory T lymphocytes in the induced immune response mediated by biological vaccines[J]. *Immunobiology*, 2006, 211 (1-2):127-136
- 9 王建, 李慧, 曹作荣. 手术及化疗对卵巢癌患者外周血 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞比例的影响 [T]. *天津医科大学学报*, 2007, 13 (2):217-220
- 10 Ghiringhelli F, Menard C, Puig PE, *et al.* Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2007, 56 (5):641-648
- 11 Sakaguchi S, Sakaguchi N, Shimizu J, *et al.* Immunologic tolerance maintained by CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance[J]. *Immunol Rev*, 2001, 182:18-32
- 12 Iizumi M, Bandyopadhyay S, Watabe K. Interaction of Duffy antigen receptor for chemokines and KAI1: a critical step in metastasis suppression[J]. *Cancer Res*, 2007, 67 (4):1411-1414
- 13 Woo EY, Yeh H, Chu CS, *et al.* Cutting edge: regulatory T cells from lung cancer patients directly inhibit autologous T cell proliferation[J]. *Immunol*, 2002, 168 (9):4272-4276

(收稿:2011-03-14)

(修回:2011-04-07)

慢性乙型肝炎患者 T 淋巴细胞及 激活亚群与基因型的分析

章松平 王莹 陈公英

摘要 目的 探讨慢性乙型肝炎(CHB)患者不同基因分型(B型和C型)外周血T淋巴细胞及激活亚群的表达情况。
方法 收集2008年11月~2010年12月杭州市第六人民医院175例CHB患者,另选取43名健康体检者作为对照。用流式细胞仪检测外周血T淋巴细胞亚群(CD3⁺、CD3⁺CD4⁺和CD3⁺CD8⁺)及激活亚群(CD3⁺HLA-DR⁺、CD4⁺HLA-DR⁺和CD8⁺HLA-DR⁺)的表达,荧光PCR法检测HBV基因型,化学发光法定量检测血清HBeAg含量。
结果 B基因型HBeAg(+)组与C基因型组间CD8细胞百分比有显著性差异,C基因型患者CD8细胞高于B基因型。各组间CD3、CD4淋巴细胞及激活亚群均无统计学意义。
结论 CHB患者不同基因分型与机体细胞免疫尤其是CD8细胞存在一定的关系。

关键词 慢性乙型肝炎 淋巴细胞 HLA-DR 抗原 基因型

Correlation between Genotype and T-lymphocyte and Activated T-lymphocyte Subsets in Chronic Hepatitis B. Zhang Songping, Wang Ying, Chen Gongying. Department of Open Laboratory, The Sixth People's Hospital of Hangzhou, Zhejiang 310014, China

Abstract Objective To investigate the correlation between genotype and T-lymphocyte and activated T-lymphocyte subsets in chronic hepatitis B. **Methods** Totally 175 chronic hepatitis B patients and 43 healthy blood donors were enrolled in the study. The T-lymphocyte subsets(CD3⁺, CD3⁺CD4⁺ and CD3⁺CD8⁺) and activated T-lymphocyte subsets(CD3⁺HLA-DR⁺, CD4⁺HLA-DR⁺ and CD8⁺HLA-DR⁺) were detected by flow cytometry. HBV genotypes was detected by a real time fluorescence PCR and HBeAg was detected by chemiluminescence method. **Results** Compared with the B genotype HBeAg(+) group, the percentage of CD8 cells was increased in C genotype patients. While there was no difference in the percentage of CD3, CD4 cells and activated T-lymphocyte subsets

基金项目:杭州市科技发展计划(2005633Q22)

作者单位:310014 杭州市第六人民医院开放实验室

通讯作者:陈公英,电子邮箱:chengongying@hotmail.com

with B genotype group and C genotype group. **Conclusion** There was certain relation between different genotype and cellular immune in chronic hepatitis B patients, especially CD8 cells.

Key words Chronic hepatitis B; Lymphocyte; HLA – DR antigens; Genotype

慢性乙型肝炎患者肝损伤主要是 T 细胞介导的细胞毒作用或免疫复合物的作用^[1]。已有关于不同基因型患者 HBeAg、HBV DNA 病毒载量以及肝功能指标等关系的研究,但不同基因分型与细胞免疫关系的报道较少^[2-4]。本研究通过对 175 例慢性乙型肝炎患者的血清标本进行基因分型研究,同时检测患者外周血 T 淋巴细胞及激活亚群的表达情况,旨在探讨 CHB 患者不同基因型与细胞免疫的关系。

对象与方法

1. 研究对象:收集 2008 年 9 月~2009 年 10 月杭州市第六人民医院住院治疗的 175 例慢性乙型肝炎患者,男性 116 例,女性 59 例,年龄 23~71 岁,平均年龄 45±7 岁。诊断标准依照 2000 年西安会议修订的《病毒性肝炎防治方案》。所有患者排除甲型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、戊型肝炎病毒及其他病毒感染,入选病例予以核苷类似物(拉米夫定、恩地卡韦或替比夫定)抗病毒治疗。175 例慢性乙型肝炎患者中,检测出 B 型基因型 99 例,其中 HBeAg(-)46 例,HBeAg(+)53 例(53.5%);C 型基因型 76 例,其中 HBeAg(-)29 例,HBeAg(+)47 例(61.8%),具体分布情况见表 1。不同基因分型各组的 ALT、AST 检测结果经统计学分析,各组间差异无统计学意义,见表 2。

表 1 175 例慢性乙型肝炎患者组别情况分布

基因分型	HBeAg (-)	HbeAg(+)	合计
B 型	46	53	99
C 型	29	47	76
合计	75	100	175

表 2 175 例慢性乙型肝炎患者肝功能情况分布

基因分型	HBeAg	n	ALT	AST
B 型	-	46	136.7 ± 118.5	97.3 ± 78.1
	+	53	154.3 ± 147.2	117.0 ± 89.2
C 型	-	29	101.1 ± 66.9	89.3 ± 77.7
	+	47	117.7 ± 88.4	106.5 ± 83.6

2. 基因分型的检测:采用 PCR 微量板核酸杂交酶联免疫法^[5]。

3. 血清 HBeAg 含量的检测:取肘静脉血 2ml,分离血清,化学发光法检测患者 HBeAg 含量,HBeAg 含量 ≤ 1PEIU/ml 为 HBeAg 阴性;>1PEIU/ml 为 HBeAg 为阳性。仪器为美国雅培公司生产的 ARCHITECT i2000SR 化学发光仪,试剂均为配套试剂。

4. 外周血 T 淋巴细胞及激活亚群的表达:取肘静脉血 2ml,EDTA - K₂ 抗凝,充分混匀后送检。取 6 支试管,分别加 IgG1 - FITC/IgG1 - PE/IgG1 - PC5、CD4 - FITC/CD8 - PE/CD3 - PC5、IgG1 - FITC/IgG1 - PE、CD3 - FITC/HLA - DR - PE、CD4 - FITC/HLA - DR - PE、CD8 - FITC/HLA - DR - PE 荧光素标记单克隆抗体各 20μl,每管加 100μl 抗凝全血后混匀避光反应 15min,在 Q - PREP 标本处理器(美国 Beckman Coulter 公司)上溶血、固定、混匀,上流式细胞仪分析 T (CD3⁺) 细胞、CD4⁺ (CD3⁺ CD4⁺) T 细胞、CD8⁺ (CD3⁺ CD8⁺) T 细胞及其激活亚群(HLA - DR⁺ CD3⁺/CD3⁺、HLA - DR⁺ CD4⁺/CD4⁺ 和 HLA - DR⁺ CD8⁺/CD8⁺)。分析前流式细胞仪处于正常工作状态,且应用 Flow - CheckTM Fluoropheres (美国 Beckman Coulter 公司)检测光路流路。同时全血标本上 CD3200 血细胞计数仪(美国雅培公司)进行血细胞计数分析,得出淋巴细胞绝对值。用淋巴细胞绝对值乘以各亚群细胞百分率,得出各亚群细胞绝对数。

5. 统计学方法:测得数据用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,均数间的比较采用独立样本 t 检验,以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. CHB 患者外周血 T 淋巴细胞亚群的表达:175 例 CHB 患者外周血 T 淋巴细胞亚群的表达,见表 3。经统计分析:B 型 HBeAg(+)组与 C 型 HBeAg(-)组和 C 型 HBeAg(+)组间 CD8 细胞百分比比较,差异均有统计学意义($t = 2.26$ 和 $t = 2.69$, P 均 < 0.05)。4 组间淋巴细胞数、CD3 和 CD4 差异均无统计学意义。

表 3 不同组别 CHB 患者外周血 T 淋巴细胞亚群分布($\bar{x} \pm s, \%$)

基因分型	HBeAg	n	淋巴细胞数	CD3	CD4	CD8
B 型	-	46	1541 ± 512	67.90 ± 6.17	35.20 ± 6.67	25.20 ± 6.75
	+	53	1682 ± 540	65.8 ± 10.4	37.90 ± 8.38	23.80 ± 5.83
C 型	-	29	1366 ± 256	67.90 ± 8.32	36.40 ± 5.66	28.20 ± 6.33
	+	47	1703 ± 509	66.9 ± 11.7	34.60 ± 7.27	29.90 ± 7.32

2. CHB 患者外周血 T 淋巴细胞激活亚群的表达:175 例 CHB 患者外周血 T 淋巴细胞激活亚群的表达,见表 4。经统计分析,4 组间 T 淋巴细胞激活亚

群($CD3^{+}HLA-DR^{+}$ 、 $CD4^{+}HLA-DR^{+}$ 和 $CD8^{+}HLA-DR^{+}$)差异均无统计学意义。

表 4 不同组别 CHB 患者外周血 T 淋巴细胞激活亚群的分布($\bar{x} \pm s, \%$)

基因分型	HBeAg	n	CD3 ⁺ HLADR ⁺	CD4 ⁺ HLADR ⁺	CD8 ⁺ HLADR ⁺	HLADR ⁺
B 型	-	46	5.78 ± 3.06	2.57 ± 1.64	3.07 ± 1.34	21.80 ± 6.91
	+	53	4.95 ± 2.58	2.45 ± 1.51	2.52 ± 1.75	19.80 ± 7.92
C 型	-	29	5.10 ± 2.49	3.01 ± 1.26	2.64 ± 1.73	19.70 ± 5.01
	+	47	5.69 ± 3.27	3.29 ± 1.21	2.43 ± 1.41	18.00 ± 7.88

讨 论

HBV 基因型有一定的地理分布特征,在我国主要以 B 型和 C 型最为常见,不同的基因分型与临床病情轻重存在一定的关系,但与机体的细胞免疫的相关性报道较少^[2,6]。本文通过对 175 例慢性乙型肝炎患者不同基因分型时其外周血 T 淋巴细胞及激活亚群检测,结果显示:B 基因型 HBeAg(+)组与 C 基因型 HBeAg(-)组和 C 基因型 HBeAg(+)组间 CD8 细胞百分比有显著性差异,C 型基因型患者 CD8 细胞高于 B 型基因型。而各组间 CD3、CD4 百分比结果比较均没有统计学意义。王敏等^[7]动态监测慢性乙型肝炎患者抗病毒治疗前后外周血 CD8 淋巴细胞有升高趋势。有报道^[3]基因型和炎症程度差异无统计学意义,但和纤维化程度差异有统计学意义,即基因型 C 型的纤维化程度比基因型 B 型的纤维化程度重。提示基因 C 型比基因 B 型肝脏组织学易发生纤维组织增生。但 HBeAg 阴性组和阳性组肝脏病理组织炎症活动度无明显差异^[8]。邹怀宾等^[4]研究发现,基因 B 和 C 型对拉米夫定抗病毒治疗的疗效无影响,基因 B 型对干扰素 α 治疗的疗效优于 C 型。这其中是否具有关联性还有待进一步的探讨。

对 175 例 CHB 患者依据 B 和 C 基因型分组比较外周血 T 淋巴细胞激活亚群差异均无统计学意义,先前研究显示^[9],CHB 患者外周血 T 淋巴细胞 HLA-DR 抗原表达与不同含量 HBV DNA 和 HBeAg 间存在一定的关联性。本研究结果显示 CHB 患者中基因分型对 T 淋巴细胞激活状态无明显影响。

综上所述,慢性乙型肝炎患者基因分型与外周血 CD8 细胞存在一定的关系,但由于本研究本例数较少,且未进行抗病毒治疗前后的对比,因此有待进一步的深入研究。

参考文献

1 中华医学会肝病学分会,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].中华临床感染病杂志,2010,4(1):1-13

2 许军,王齐欣,蒋栋,等.乙型肝炎病毒基因型与病情轻重的关系[J].中华肝脏病杂志,2003,13(4):228-229

3 许家璋,谢琴秀,李平,等.乙型肝炎病毒的基因型和临床病理特征的分析[J].中华传染病杂志,2006,24(4):270-272

4 邹怀宾,朱理珉,赵桂鸣,等.e 抗原阳性慢性乙型肝炎患者感染病毒的基因型与抗病毒治疗疗效的关系[J].中华肝脏病杂志,2007,15(6):425-427

5 陈公英,邵俊斌,徐岱,等.浙江省乙型肝炎病毒 B、C 基因型感染者临床和肝组织病理的比较[J].中华传染病杂志,2006,24(2):113-115

6 夏国良,Omana V,贾志远,等.乙型肝炎病毒基因型和血清型在我国部分地区的分布及其特点[J].中华流行病学杂志,2001,22(5):348-351

7 王敏,张玲霞,罗生强,等.慢性乙型肝炎患者抗病毒治疗前后 HBV 特异性 T 细胞反应[J].中华实验和临床病毒学杂志,2005,19(4):387-390

8 欧晓娟,王晓明,王宝恩,等.e 抗原阳性及阴性慢性乙型肝炎患者临床特点比较[J].中华肝脏病杂志,2007,15(6):428-430

9 章松平,张永乐,朱明利,等.慢性乙型肝炎 T 淋巴细胞 HLA-DR 抗原表达与 HBV DNA 和 HBeAg 含量关系的初步分析[J].中华临床感染病杂志,2010,3(6):333-336

(收稿:2011-04-26)
(修回:2011-04-27)