

不同临床类型乙型病毒性肝炎患者 淋巴细胞亚群的差异性分析

梁劲松 邓 鑫 文 彬 梁娟英

摘 要 **目的** 研究分析不同临床类型乙型病毒性肝炎 (HBV) 患者淋巴细胞亚群的差异性及其临床意义。**方法** 采用流式细胞术检测乙肝病毒携带者、慢性乙型肝炎、急性乙型肝炎、乙型肝炎肝硬化 (LC)、原发性肝癌 (HCC) 患者外周血 T 淋巴细胞亚群 ($CD3^{+}$ 、 $CD4^{+}$ 、 $CD4^{+}/CD8^{+}$)、NK 细胞 ($CD16^{+}CD56^{+}$) 所占淋巴细胞百分比, 并与健康对照组比较。**结果** 与健康对照组比较, 乙型肝炎病毒携带者、急性乙型肝炎患者 $CD3^{+}$ 、 $CD4^{+}$ T 细胞百分比及 $CD4^{+}/CD8^{+}$ 比值无统计学差异 ($P > 0.05$), 慢性乙型肝炎、LC 和 HCC 患者 $CD3^{+}$ 、 $CD4^{+}$ T 细胞百分比及 $CD4^{+}/CD8^{+}$ 比值逐步递减 ($P < 0.05$), 以 HCC 患者下降最为显著。与健康对照组相比, 急性乙型肝炎、慢性乙型肝炎患者 $CD8^{+}$ T 细胞计数显著升高 ($P < 0.05$), LC、HCC 患者 $CD8^{+}$ T 细胞则显著下降 ($P < 0.05$)。乙型肝炎病毒携带者、急性乙型肝炎患者 NK 细胞计数与对照组相比, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 慢性乙型肝炎患者 NK 细胞计数显著增加 ($P < 0.05$), LC、HCC 患者 NK 细胞计数则下降显著 ($P < 0.05$)。**结论** HBV 感染者临床类型不同, 各淋巴细胞亚群免疫调节差异有统计学意义, 对指导临床治疗及评判预后有一定的临床价值。

关键词 乙型病毒性肝炎 淋巴细胞亚群 流式细胞术

中图分类号 R512.6

文献标识码 A

DOI 10.3969/j.issn.1673-548X.2015.02.020

Analysis of Different Subsets of Lymphocytes in Different Clinical Types of Hepatitis B Patients. Liang Jinsong, Deng Xin, Wen Bin, Liang Juanying. The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Guangxi 530023, China

Abstract **Objective** To research and analysis the difference and clinical significance of lymphocyte subsets with different types of clinical hepatitis B (HBV) in patients. **Methods** Peripheral blood T lymphocyte subsets ($CD3^{+}$, $CD4^{+}$, $CD4^{+}/CD8^{+}$) and NK cells ($CD16^{+}CD56^{+}$) accounts for the lymphocyte percentage which in patients with the hepatitis B virus carriers, chronic hepatitis B, acute hepatitis B, liver cirrhosis (LC), hepatocellular carcinoma (HCC) are detected by flow - cytometry, and compared with the healthy control group. **Results** Compared with the healthy control group, the $CD3^{+}$, $CD4^{+}$ T lymphocyte percentage and $CD4^{+}/CD8^{+}$ ratio which in the hepatitis B virus carriers, acute hepatitis B patients are no significant difference ($P > 0.05$); The $CD3^{+}$, $CD4^{+}$ T cell percentage and $CD4^{+}/CD8^{+}$ ratio in patients with chronic hepatitis B, LC and HCC decreased significantly ($P < 0.05$), with the most significant decline in HCC patients. Compared with the healthy control group, The $CD8^{+}$ T cell count increase significantly which in the patients with acute hepatitis B and chronic hepatitis B ($P < 0.05$), but decrease significantly which in the patients with LC, HCC ($P < 0.05$). Compared with the healthy control group, the NK cell count was not significantly difference which in patients with Hepatitis B virus carriers, acute hepatitis B patients vs control group ($P > 0.05$), NK cell count increased significantly which in patients with chronic hepatitis B, but decreased significantly in LC and HCC patients ($P < 0.05$). **Conclusion** The HBV infection in different clinical types which have different immune regulation in lymphocyte subsets. This may guide the clinical treatment and evaluation of prognosis.

Key words Hepatitis B virus; Lymphocyte subsets; Flow - cytometry

乙型肝炎病毒 (HBV) 感染是全球性问题, 人群普遍易感, 我国隶属高流行区, 据统计我国 HBV 感染者约 9300 万人, 每年约有 35 万人死于与 HBV 感染有关的疾病^[1]。目前多数研究者认可机体细胞免疫

功能紊乱, 未能及时有效清除病毒是慢性乙型病毒性肝炎发生、发展的主要原因^[2]。宿主细胞免疫应答对疾病的发展和转归起主导作用, 其中 T、NK 淋巴细胞介导的细胞免疫调节尤为重要^[3]。但机体的免疫功能差异及疾病所处不同阶段, 感染 HBV 后又会出现迥异的临床症状。因此本研究主要针对不同临床类型 HBV 感染者外周血淋巴细胞亚群的差异性, 探讨急性或持续感染 HBV 对机体细胞免疫功能的影响。

基金项目: 广西自然科学基金资助项目 (2011GXNSFD018035)

作者单位: 530023 南宁, 广西中医药大学第一附属医院 (梁劲松); 广西中医药大学瑞康医院 (邓鑫、文彬); 南宁市第四人民医院 (梁娟英)

响,旨在为临床治疗 HBV 提供依据。

材料与方法

1. 研究对象:2009 年 4 月~2012 年 8 月在笔者医院和南宁市第四人民医院门诊或住院的 195 例不同临床类型 HBV 感染患者。诊断依据中华医学会制定的《慢性乙型肝炎防治指南》的诊断标准,且 1 年内未使用免疫调节剂及抗病毒药治疗^[4]。其中乙型肝炎病毒携带者 32 例、慢性乙型肝炎 36 例、急性乙型肝炎 30 例、乙型肝炎肝硬化 33 例、原发性肝癌(HCC)30 例,健康对照者 34 例。各组所入选的 HBV 感染患者年龄、性别和肝功能均具有可比性。

2. 排除标准:所有入选患者均排除甲型肝炎、丙型肝炎、丁型肝炎、戊型肝炎等病毒的重叠感染;排除合并自身免疫性疾病或其他原因(乙醇、血吸虫、药物等)引起的肝脏损害;排除最近 1 年使用抗病毒药如干扰素或核苷类似物及免疫调节治疗者。

3. 实验方法:淋巴细胞亚群 CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺、CD16⁺CD56⁺ 均采用流式细胞术检测,具体步骤:取外周静脉血 2~3ml,以乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝,混匀后,各吸 100 μ l 全血于 4 支不同测定管中:第 1 管中加入单抗 CD3;第 2 管中加入单抗 CD4;第 3 管加入单抗 CD4、CD8;第 4 管加入单抗 CD16⁺CD56⁺,并加入同型对照抗体。各管混匀后置暗室孵育 30min,加溶血素 0.5ml,15min,然后磷酸盐缓冲液(phosphate buffer, PBS) 0.3ml,混匀,置于 4℃,24h 内分别测定 CD4⁺、CD8⁺ 和 CD4⁺/CD8⁺、CD16⁺CD56⁺。流式细胞仪为美国 BD 公司 FACSC Calibur 型,单克隆抗体及试剂均由美国 BD 公司提供。

4. 统计学方法:采用 SPSS 17.0 统计软件进行处理。计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,正态分布且方差齐时采用 *t* 检验;非正态分布的数据进行转换后采用校正 *t* 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 不同临床类型 HBV 感染者外周血 T 淋巴细胞百分比比较:与健康对照组相比,乙型肝炎病毒携带者、急性乙型肝炎患者 CD3⁺、CD4⁺T 细胞百分比及 CD4⁺/CD8⁺ 比值差异无统计学意义($P>0.05$);慢性乙型肝炎、乙型肝炎肝硬化及肝癌患者 CD3⁺、CD4⁺T 细胞百分比及 CD4⁺/CD8⁺ 比值较健康对照组呈逐步递减,差异均有统计学意义($P<0.05$),以原发性肝癌患者下降最为明显。比较 CD8⁺T 细胞发现,急性乙型肝炎、慢性乙型肝炎患者较对照组显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$);但乙型肝炎肝硬化、肝癌患者 CD8⁺T 细胞则显著下降,与健康对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$),详见表 1。

2. 不同临床类型 HBV 感染患者外周血 NK 细胞百分比比较:乙型肝炎病毒携带者、急性乙型肝炎患者 NK 细胞计数较健康对照组差异无统计学意义($P>0.05$);慢性乙型肝炎患者 NK 细胞计数较健康对照组显著增加,差异有统计学意义($P<0.05$);乙型肝炎肝硬化、肝癌患者 NK 细胞计数较正常组下降显著($P<0.05$),详见表 1。

表 1 各组患者外周血淋巴细胞亚群表达水平检测结果($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	CD3 ⁺ (%)	CD4 ⁺ (%)	CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	NK(CD16 ⁺ CD56 ⁺)(%)
健康对照组	34	69.47 $\pm$ 9.34	43.53 $\pm$ 7.32	26.63 $\pm$ 4.37	1.62 $\pm$ 0.36	11.46 $\pm$ 2.13
乙型肝炎携带者	32	68.62 $\pm$ 8.17	42.47 $\pm$ 7.27	28.72 $\pm$ 4.81	1.61 $\pm$ 0.34	11.56 $\pm$ 2.16
急性乙型肝炎	30	69.63 $\pm$ 9.57	42.36 $\pm$ 7.39	32.24 $\pm$ 5.37*	1.31 $\pm$ 0.38*	12.07 $\pm$ 2.31
慢性乙型肝炎	36	63.39 $\pm$ 7.97*	34.39 $\pm$ 6.83*	31.38 $\pm$ 5.69*	1.08 $\pm$ 0.25*	15.7 $\pm$ 3.62*
乙型肝炎肝硬化	33	60.72 $\pm$ 7.09*	29.15 $\pm$ 6.65*	19.42 $\pm$ 4.19*	1.17 $\pm$ 0.24*	8.37 $\pm$ 2.05*
原发性肝癌	30	55.36 $\pm$ 6.31*	19.18 $\pm$ 6.38*	18.83 $\pm$ 4.03*	0.97 $\pm$ 0.19*	8.02 $\pm$ 1.96*

与健康对照组比较,* $P<0.05$

讨 论

人体感染 HBV 后可出现不同的临床转归,目前大多研究者认为 HBV 本身并不直接损伤肝细胞,而是诱导宿主自身的免疫反应,间接损伤肝细胞,也就是机体免疫反应是 HBV 感染后肝细胞损害的主要病理机制^[5]。细胞免疫反应在病毒感染初期即对感染的转归和预后产生了影响。而宿主免疫功能主要由淋巴细胞各亚群的数量和功能维持,当淋巴细胞各亚群比例失衡或功能异常时,机体的免疫功能则发生紊乱,出现不同程度的临床转归。

1. 不同临床类型 HBV 感染者外周血 T 淋巴细胞群差异性分析:乙型肝炎病毒携带者大多数无症状,偶尔出现疲乏或其他非肝病特定的症状,其对肝损害的严重程度受许多因素影响,其中细胞毒性 T 淋巴细胞主要免疫表位的突变起重要作用^[6]。本研究结果发现,乙型肝炎病毒携带者 CD3⁺、CD4⁺T 细胞百分比及 CD4⁺/CD8⁺ 比值较健康对照组差异无统计学意义($P>0.05$),说明患者虽感染了 HBV,但机体细胞免疫调节功能尚未紊乱,可以通过多种途径抑制或清除体内 HBV 病毒,因此临床常见较多乙型肝炎病

毒携带者肝功能或病毒复制常处于静止状态。研究表明,乙型肝炎病毒侵入人体后,CD8⁺T 细胞在病毒的清除中发挥着重要的作用,细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte,CTL)由 CD8⁺T 细胞活化后生成,是免疫应答的重要效应细胞,可识别特异性抗原,能杀伤外来抗原和自身 MHC - I (major histocompatibility complex - I) 类抗原结合的复合物的靶细胞,因此 CD8⁺T 可作为初步评估机体免疫状态的指标,但其功能发挥常依赖于 CD4⁺T 细胞的存在。急性乙型肝炎患者 CD8⁺T 淋巴细胞比例升高,CD4⁺T 未见明显升高,CD4⁺/CD8⁺ 比值下降,说明 CD8⁺T 淋巴细胞可以浸润肝脏,一方面有利于抑制病毒,另一方面又可以破坏正常肝脏细胞。而 CD4⁺/CD8⁺ 比值的下降导致机体清除病毒能力减弱,是急性感染慢性化的重要因素,因此急性乙型肝炎如未及时治疗,常导致急性肝炎的慢性化^[7,8]。

本研究结果表明,慢性乙型肝炎患者 CD3⁺、CD4⁺T 细胞数及 CD4⁺/CD8⁺ 比值较健康组显著下降($P < 0.05$)。CD4⁺T 细胞主要是 Th 细胞,协助 B 细胞进行分化和产生抗体,CD4⁺T 细胞数量的减少及功能的下降不利于病毒的清除,CD4⁺/CD8⁺ 比值下降更表明慢性乙型肝炎患者确实存在免疫功能紊乱,且主要表现为免疫功能不足,免疫力不足则是机体不能清除病原体或 HBV 在肝内持续复制的主因。乙型肝炎肝硬化、原发性肝癌患者 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺T 细胞数及 CD4⁺/CD8⁺ 比值均同时下降,说明该类患者抗病毒及其清除病毒能力均显著降低,CD4⁺/CD8⁺ 比值倒置更表明机体免疫处于崩溃状态,因此临床上该类患者容易并发严重并发症。

2. 不同临床类型 HBV 感染者 NK 细胞差异性分析:NK 细胞能通过产生细胞因子和细胞毒性作用两种方式暂时控制感染并使感染尽量局限化,以待获得性免疫反应的形成,与免疫功能紊乱的程度紧密有关。患者外周血 NK 细胞的比例一定程度上反映了肝内 NK 细胞的非特异免疫应答状况。NK 细胞比例高,提示非特异性细胞免疫反应较为剧烈,既有彻底清除病毒的可能,也有造成免疫损伤较重的危险。本研究发现,慢性乙型肝炎患者外周血 NK 细胞的百分比明显高于对照组($P < 0.05$)。其机制可能为:当慢性乙型肝炎患者病毒特异性 CD8⁺T、CD4⁺T 细胞不足以控制或清除病毒,才征召非特异 T 淋巴细胞和自

然免疫细胞如 NK 细胞入肝,非特异细胞密集浸润使肝细胞炎性坏死,而炎性病变的持续存在并不能有效清除病毒,因此慢性乙型肝炎患者外周血 NK 细胞的比例增高考虑与上述机制有关^[9,10]。但 HBV 病毒长期不能清除,机体免疫功能受损,则会导致 NK 细胞计数逐渐下降,越来越多的证据表明 NK 细胞可以通过抑制肝星状细胞的活化,并能产生 γ 干扰素来发挥抗肝纤维化作用。本研究结果中乙型肝炎肝硬化、原发性肝癌患者 NK 细胞计数显著下降,使患者免疫平衡遭严重破坏,可进一步加重肝脏的损害,这与乙型肝炎肝衰竭患者外周血 NK 细胞计数减少机制有一定的相通性^[11]。

参考文献

- 1 Liu C, Wang YM, Fan K. Epidemiological and clinical features of hepatitis B virus related liver failure in China [J]. World J Gastroenterol, 2011, 17(25): 3054 - 3059
- 2 Frebel H, Richter K, Oxenius A. How chronic viral infections impact on antigen - specific T - cell responses? [J]. Eur J Immunology, 2010, 40(3): 654 - 663
- 3 邱洁, 龙启强, 冯艳红, 等. 急性和慢性乙型肝炎患者外周血 NK 细胞和 T 淋巴细胞亚群的动态变化[J]. 实用肝脏病杂志, 2013, 16(6): 508 - 510
- 4 中华医学会肝病学会、感染病学会. 慢性乙型肝炎防治指南 [J] 中华肝脏病杂志, 2005, 13(12): 881 - 891
- 5 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
- 6 刘军, 齐建勋, 高峰, 等. T 细胞功能学与结构免疫学结合方法鉴定 HLA - A2 限制性的细胞毒性 T 淋巴细胞表位富集区 [J]. 科技导报, 2011, 29(27): 19 - 26
- 7 Rehmann B. Pathogenesis of chronic viral hepatitis: differential roles of T cells and NK cells [J]. Nat Med, 2013, 19(7): 859 - 868
- 8 Dimitropoulou D, Karakantza M, Tsamandas AC, et al. T - lymphocyte subsets in peripheral blood and liver tissue of patients with chronic hepatitis B and C [J]. In vivo, 2011, 25(5): 833
- 9 Lopes AR, Ellam 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 - 1839
- 10 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]. Virol J, 2011, 8(2): 199 - 206
- 11 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

(收稿日期: 2014 - 07 - 24)

(修回日期: 2014 - 08 - 26)