

慢性乙型肝炎患者 T 细胞亚群、IL-18、IFN- γ 变化与血清 HBV DNA 水平分析

黄少军, 莫 扬, 江 华

(华中科技大学同济医学院附属襄樊医院, 湖北襄樊 441021)

摘要:目的 研究慢性病毒性乙型肝炎患者 T 细胞亚群、IL-18、IFN- γ 变化与其血清 HBV DNA 的水平, 探讨病毒复制程度与机体免疫功能的关系。方法 应用流式细胞仪直接免疫荧光法检测 60 例乙型肝炎病毒感染者、25 例健康对照外周血 T 细胞亚群百分率; 用 ELISA 法检测血清中 IL-18、IFN- γ 水平; 用荧光定量 PCR 法检测乙型肝炎感染者血清 HBV DNA。结果 根据 HBV 感染者血清中 HBV DNA 载量的高低, 将它们分为低拷贝组 [$10^3 \sim 10^4$] copy/mL、高拷贝组 [$>10^4 \sim 10^8$] copy/mL 以及 DNA 阴性组 ($<10^3$ copy/mL)。HBV 感染者外周血 CD4⁺ T 细胞百分率及 CD4⁺/CD8⁺ 比值较健康对照组明显减低, 且随着 HBV DNA 载量的增加, CD4⁺ T 细胞百分率及 CD4⁺/CD8⁺ 比值降低更明显。CD8⁺ T 细胞百分率较健康对照组明显升高, 乙型肝炎患者 IL-18、IFN- γ 表达水平明显高于健康对照组, 且随着 HBV DNA 载量的增加, IL-18、IFN- γ 增加更明显。结论 慢性病毒性乙型肝炎患者存在免疫调节紊乱, HBV DNA 复制增加, 进一步加重乙型肝炎病毒感染者 T 细胞亚群和细胞因子的失衡, CD4⁺/CD8⁺ 比值、血清 IL-18、IFN- γ 的动态变化可及时提示 HBV 感染者机体免疫功能的变化。

关键词: 肝炎, 乙型; T 淋巴细胞亚群; 白细胞介素 18; 干扰素 γ , 重组

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.01.056

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)01-0112-02

由于非溶细胞性及溶细胞性杀伤是人体清除 HBV DNA 的两种途径, 非溶细胞性杀伤主要通过肝内非特异性免疫细胞及细胞因子作用, 溶细胞性杀伤主要是抗原特异性 T 细胞杀伤作用。目前, 研究发现特异性 T 细胞和细胞因子在 HBV 清除过程中发挥着重要作用。机体的免疫功能紊乱, 尤其是 T 细胞亚群和细胞因子的调节失衡与慢性病毒性肝炎的发生密切相关^[1]。本组检测 HBV 感染者外周血 T 淋巴细胞亚群 (CD4⁺、CD8⁺) 及 IL-18、IFN- γ 的变化情况, 分析其与血清中 HBV DNA 载量水平的关系。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2007 年 8~12 月在本院门诊及住院的乙型肝炎患者共 60 例, 均符合 2000 年第 10 次全国病毒性肝炎会议修订的病毒性肝炎诊断标准, 且在 3 个月内均未使用免疫调节剂和抗病毒药物治疗。其中男 38 例, 女 22 例; 平均 (35 \pm 15) 岁。其中 HBsAg、HBeAg、抗-HBc 阳性组 34 例, HBsAg、抗-HBe、抗-HBc 阳性组 26 例。健康对照组为 25 例门诊体检表面抗体阳性者, 男 14 例, 女 11 例; 平均 (27 \pm 9) 岁。所有对象排除甲、丙、丁及戊型病毒感染。

1.2 CD4 和 CD8 检测 取 100 μ L 抗凝血于流式专用试管中, 加入 BD 公司提供的 CD4 FITC/CD8 PE/CD3 PerCP 三标志单克隆荧光抗体 20 μ L, 室温避光反应 20 min, 加入 500 μ L 红细胞裂解液, 溶解红细胞 10 min, 以离心半径 8 cm, 1 000 r/

min 离心 5 min, 弃上清液, 再加入 1 mL PBS, 以离心半径 8 cm, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 补足 500 μ L PBS, 混匀后, 上 BD FACSCalibur 流式细胞仪检测并使用 cellquest 软件获取 10 000 个细胞, 以 SSC/CD3 设门, 记录辅助/诱导 T 淋巴细胞 (CD3⁺CD4⁺CD8⁻)、抑制/细胞毒性 T 淋巴细胞 (CD3⁺CD4⁻CD8⁺) 百分数并计算辅助/抑制 T 淋巴细胞比值 (CD3⁺CD4⁺CD8⁻/CD3⁺CD4⁻CD8⁺)。

1.3 IL-18、IFN- γ 含量测定 采用 ELISA 法, 试剂盒由深圳晶美生物有限公司提供, 严格按照说明书要求操作, 使用意大利 SEAC 全自动 ALISEI 型酶标仪检测。

1.4 HBV DNA 定量测定 采用 Roche Light Cycler 荧光定量 PCR 分析仪检测 HBV DNA, 试剂由深圳匹基生物工程股份有限公司提供, 严格按照说明书要求操作。

1.5 统计学处理 应用 SPSS11.0 软件分析数据, 结果以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较用 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 HBV 感染者外周血各指标分析 感染者外周血 CD4⁺ T 细胞百分率及 CD4⁺/CD8⁺ 比值则明显低于健康对照组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), CD8⁺ T 细胞百分率明显升高 ($P < 0.05$); 与健康对照组比较, 血清 IL-18、IFN- γ 水平明显增加 ($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 2 组外周血各指标结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数(<i>n</i>)	CD4 ⁺ (%)	CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	IL-18	IFN- γ
健康对照组	25	40.2 \pm 10.3	23.9 \pm 8.8	1.97 \pm 0.8	69.2 \pm 28.2	57.5 \pm 70.3
HBV 感染组	60	37.3 \pm 9.4	26.9 \pm 9.7	61.45 \pm 0.84	286.9 \pm 190.2	167.4 \pm 98.7

表 2 HBV DNA 不同载量及其外周血各指标分析($\bar{x} \pm s$)

组别	例数(n)	CD4 ⁺ (%)	CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	IL-18	IFN- γ
健康对照组	25	40.2 \pm 10.3	23.9 \pm 8.8	1.97 \pm 0.8	69.2 \pm 28.2	57.5 \pm 70.3
DNA 阴性组	24	38.7 \pm 9.0 Δ	25.1 \pm 9.3 \blacktriangle	61.75 \pm 0.81 \blacktriangle	134.1 \pm 118.7 \blacktriangle	107.4 \pm 88.7 \blacktriangle
DNA 低拷贝组	16	37.8 \pm 9.4 $\ast\Delta$	27.4 \pm 8.4 $\ast\Delta$	1.52 \pm 0.74 $\ast\blacktriangle$	361.0 \pm 251.1 $\ast\blacktriangle$	161.9 \pm 113.4 $\ast\blacktriangle$
DNA 高拷贝组	20	35.7 \pm 8.6 ^b	29.8 \pm 8.8 ^b	1.24 \pm 0.68 ^b	650.5 \pm 584.1 ^b	243.7 \pm 207.4 ^b

注:与健康对照组比较, $\ast P < 0.05$, $\# P < 0.01$;与 DNA 高拷贝组比较, $\Delta P < 0.05$, $\blacktriangle P < 0.01$ 。

2.2 HBV DNA 不同载量及其外周血各指标分析

2.2.1 根据乙型肝炎病毒感染的 HBV DNA 载量不同,将其分为 DNA 低拷贝组,载量($10^3 \sim 10^4$) copy/mL,平均 8.8×10^3 copy/mL;DNA 高拷贝组,载量($> 10^4 \sim 10^8$) copy/mL,平均 9.4×10^6 copy/mL;DNA 阴性组(载量小于最低检测限 10^3 copy/mL)。

2.2.2 与健康对照组比较,DNA 阴性组 CD4⁺ T 细胞百分率及 CD8⁺ T 细胞百分率无明显差异,但 CD4⁺/CD8⁺ 比值明显降低($P < 0.05$),血清 IL-18、IFN- γ 水平明显增加($P < 0.05$);低拷贝组 CD4⁺ T 细胞百分率及 CD4⁺/CD8⁺ 比值明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),CD8⁺ T 细胞百分率、血清 IL-18 及 IFN- γ 水平明显增加($P < 0.05$, $P < 0.01$);高拷贝组 CD4⁺ T 细胞百分率及 CD4⁺/CD8⁺ 比值明显降低($P < 0.01$),CD8⁺ T 细胞百分率、血清 IL-18 及 IFN- γ 水平明显增加($P < 0.01$)。

2.2.3 与高拷贝组比较,DNA 阴性组 CD4⁺ T 细胞百分率及 CD4⁺/CD8⁺ 比值明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),CD8⁺ T 细胞百分率、血清 IL-18 及 IFN- γ 水平明显增加($P < 0.01$);低拷贝组 CD4⁺ T 细胞百分率及 CD4⁺/CD8⁺ 比值明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),CD8⁺ T 细胞百分率、血清 IL-18 及 IFN- γ 水平明显增加($P < 0.05$, $P < 0.01$),见表 2。

3 讨 论

CD4⁺ T 细胞为辅助性 T 细胞,能促进 B 细胞、细胞毒性 T 淋巴细胞和其他免疫细胞的增殖及分化,调节体液免疫和细胞免疫。CD8⁺ T 细胞由细胞毒性 T 淋巴细胞和抑制性 T 细胞组成,CD8⁺ T 细胞是决定 HBV 清除状态的关键细胞亚群,通过细胞溶解或非溶解机制是 CD8⁺ T 细胞清除机体感染 HBV 的主要方式^[2]。本组结果表明,乙型肝炎感染者外周血 CD4⁺ T 细胞明显低于健康对照组($P < 0.05$),而 CD8⁺ T 细胞则明显高于健康对照组($P < 0.05$),CD4⁺/CD8⁺ 比值显著低于健康对照组($P < 0.01$),表明感染者特异性 T 细胞作用有所加强,而 CD4⁺ T 细胞生成减少,使特异性抗体产生不足,不能清除游离的乙型肝炎病毒,可造成病毒在体内持续存在并影响 CD8⁺ T 细胞活性^[3]。而 CD8⁺ 细胞的增加是由于抑制性 T 细胞的增加,T 细胞能够抑制免疫反应,使机体对乙型肝炎病毒反应低下,T 细胞的增殖,加重了免疫抑制^[4]。因此,慢性 HBV 感染者主要表现为 CD4⁺ T 细胞减少,而 CD8⁺ T 细胞增高,CD4⁺/CD8⁺ 比值下降,提示免疫功能下降。这一结果也与其他报道一致^[5-6]。慢性乙型肝炎感染者由于存在不同程度的细胞免疫功能异常,随着病毒复制的增加,高载量的病毒会诱发机体免疫耐受,导致免疫应答低下,尤其是 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞功能。CD8⁺ T 细胞作为主要的免疫效应细胞,数量的增加与病毒的清除有关,在清除病毒的同时也造成肝细胞大量破坏,症状加重;但由于 CD4⁺ T 细胞数量降低,缺乏 Th₁ 细胞有效辅助,CD8⁺ T 细胞不能有效清除病毒,可能是造成病程迁延的主要因素之一。

应,促使 IFN- γ 产生而抑制病毒复制,有利于病毒清除^[7]。表达有 FASL 的 HBV 特异的 CTL 可刺激巨噬细胞使其分泌 IL-18,从而上调 CTL 或周围 T 细胞的 IFN- γ 产生,这又可进一步加强巨噬细胞表面 FASL 的表达。IL-18 通过激发 IFN- γ 表达与合成,从而促使原始辅助性 T 细胞(Th₀)向 Th₁ 转化,促进 Th₁ 增殖,进一步促进 Th₁ 细胞分泌 IL-12、IFN- γ 、IL-2 等,形成由 IL-18、IFN- γ 、IL-2 等 Th₁ 细胞因子组成的细胞因子级联,这是由 HBV 诱导的免疫反应。本研究结果表明,在 HBV DNA 阳性组中,IL-18、IFN- γ 较 HBV DNA 阴性组明显偏高;高拷贝组较低拷贝组明显偏高,说明 HBV DNA 阳性患者 Th₁ 细胞免疫反应明显增高,尤其以高拷贝组为多,IL-18、IFN- γ 的增高促进了机体对病毒的清除。本组观察发现,IL-18、IFN- γ 水平随 HBV DNA 增加而升高,呈正相关,表明病毒体内复制越厉害,IL-18、IFN- γ 表达越高,这就越有利于病毒清除。通过本实验的观察发现,IL-18、IFN- γ 表达水平与乙型肝炎病毒感染状态和病毒量具有一定的相关性,IL-18 与 HBV DNA 同时检测可作为了解乙型肝炎病毒感染状态和机体免疫状态的指标。

参考文献

- [1] 闫峻,郑君杰,李东复,等.慢性病毒性肝炎患者血清 IL-12 水平 T 细胞亚群的变化及意义[J].浙江临床医学,2004,6(12):1037.
- [2] Hyodo N, Nakamura I, Imawari M. Hepatitis B core antigen stimulates interleukin-10 secretion by both T cells and monocytes from peripheral blood of patients with chronic hepatitis B virus infection[J]. Chin Exp Immunol, 2004, 135:462-466.
- [3] Xu D, Fu J, Jin L, et al. Circulation and liver resident CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells actively influence the antiviral immune response and disease[J]. J Immunol, 2006, 177:739-747.
- [4] Maini MK, Boni C, Lee CK, et al. The role of virus-specific CD8⁺ cells and viral control during persistent hepatitis B virus infection[J]. J Exp Med, 2000, 191:1269-1280.
- [5] 朱传武,罗瑞德,曾令兰,等.慢性重型乙型肝炎患者 T 细胞免疫状态与 HBV 前 C 区基因变异的关系[J].中华传染病学杂志,2003,21(2):136-138.
- [6] 张静,徐维家,王青,等.乙肝后肝硬化患者外周血 T 淋巴细胞亚群及 HBV DNA 含量变化分析[J].国际检验医学杂志,2006,27(9):1081-1083.
- [7] 江华,沈丹,曹红,等.乙型肝炎患者外周血细胞因子 IL-18 的检测及其意义[J].中华医院感染学杂志,2006,16(9):1021-1023.