

• 临床检验研究论著 •

外周血中 CD4<sup>+</sup> 调节性 T 细胞检测与慢性丙肝患者抗病毒疗效分析

胡志强

(湖北省襄阳市第一人民医院, 湖北襄阳 441000)

**摘要:**目的 研究 T 细胞调节性外周血中 CD4<sup>+</sup> 慢性丙肝患者与抗病毒疗效的关系。方法 以收集的经过抗病毒治疗和随访的 128 例慢性丙肝患者作为试验组, 分别抽取治疗前后以及随访 24 周患者的外周血, 采用流式细胞术检测外周血中的 CD4<sup>+</sup> 细胞的百分比, 并进行 HCV-RNA 定量和肝功能指标的检测。对照组为同期体检健康者 80 例。结果 试验组和对照组 HCV-RNA 定量、AST、ALT、CD4<sup>+</sup> (%) 在两组之间比较, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 治疗前后以及随访 24 周后, 患者的 HCV-RNA 定量、AST、ALT、CD4<sup>+</sup> (%) 的水平均显著的降低 ( $P < 0.05$ )。结论 抗病毒治疗可以有效地降低慢性丙型肝炎的伤害, 提高治愈率, 减少对肝脏的损害。外周血中 CD4<sup>+</sup> 调节性 T 细胞可以作为抗病毒治疗疗效以及丙型肝炎病毒感染的指标。

关键词: 慢性丙肝; 抗病毒; 疗效; 外周血

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.24.009

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)24-3319-03

Analysis on relation between peripheral blood CD4<sup>+</sup> regulatory T cells and curative effect in patients with chronic hepatitis C\*

Hu Zhiqiang

(Xiangyang Municipal First People's Hospital, Xiangyang, Hubei 441000, China)

**Abstract: Objective** To study the relationship between peripheral blood regulatory T cells CD4<sup>+</sup> and the antiviral effect in the patients with chronic hepatitis C. **Methods** 128 patients with chronic hepatitis C after antiviral treatment and follow-up were collected as the experimental group, the peripheral blood was respectively extracted before treatment and after treatment and at 24-week follow-up. The flow cytometry was adopted to detect CD4<sup>+</sup> percentage. Moreover the liver function indexes and HCV-RNA quantitation were detected. 80 individuals were selected as the normal control group. **Results** HCV-RNA quantitation, AST, ALT, CD4<sup>+</sup> (%) had statistical differences between the the experimental group and the control group ( $P < 0.05$ ); the HCV-RNA quantitation, AST, ALT, CD4<sup>+</sup> (%) levels after treatment and 24-week follow-up in the experiment group were significantly decreased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The antiviral treatment can effectively reduce the damage of chronic hepatitis C, raise the cure rate, reduce the liver damage. The peripheral blood CD4<sup>+</sup> regulatory T cells can be used as the index of the antiviral treatment efficacy and hepatitis C virus (HCV) infection.

Key words: chronic hepatitis C; antiviral; curative effect; peripheral blood

临床研究显示, 80% 以上的慢性丙肝患者可转变为慢性持续性感染, 同时该疾病还是诱发肝硬化和原发性肝细胞癌病变的主要因素, 因此加强慢性丙肝患者治疗成为医学界重要工作重心之一<sup>[1]</sup>。目前, 临床较为常用的慢性丙肝治疗方法为抗病毒治疗, 该种治疗方法疗效评价主要建立在患者 T 细胞反应上, 通过检测患者 CD4<sup>+</sup> T 细胞的比例可直接反映患者治疗效果<sup>[2]</sup>。笔者选取本院 128 例慢性丙肝患者以及 80 例健康人群进行了如下研究。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选取本院感染科 2010 年 6 月到 2013 年 6 月完成抗病毒治疗疗程和随访的丙肝患者 128 例, 其中男 72 例, 女 56 例, 年龄 21~75 岁, 平均 (48±16.021) 岁, 诊断标准均符合临床的金标准, 作为试验组; 对照组 80 例, 为同期体检健康者, 年龄 23~73 岁, 平均 (48±14.866)。试验组和对照组一般基线资料之间差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 具有可比性。(1) 纳入标准<sup>[4]</sup>: ①均符合丙型肝炎临床诊断标准。②未患有其他重要的合并症、并发症, 或者内分泌性疾病, 未服用可能对本研究指标有影响的药物以及未服用对肝脏有损害的药物。③6 个月内均未服用过抗病毒药物, 未进行过免疫治疗。④符合伦理道德, 家属或者患者签署了知情同意书等。(2) 排除标准<sup>[4]</sup>: ①患有其他重要的器官衰竭性疾病或者内分泌性疾病,

比如: 肝肾衰竭、糖尿病等。②正在服用可能影响研究效果和结局药物的患者, 近期进行抗病毒或者免疫治疗。③具有自身免疫病史、嗜酒史、肝脏毒性药物使用史。④同时感染有其他肝炎病毒的患者。(3) 剔除标准<sup>[5]</sup>: ①凡对试验的调查研究不依从、不配合、容易失访的以及拒绝参加试验者都应排除。②试验过程中不按照规定进行检查, 或者在调查过程中采用了其他可能影响实验结果的治疗措施。③在治疗过程中病情突然加重不能再参加试验的。

**1.2 方法** 抽取试验组患者治疗前后以及随访 24 周患者的外周血, 采用流式细胞仪检测外周血中的 CD4<sup>+</sup> 淋巴细胞的百分比, 并进行 HCV-RNA 定量和肝功能指标的检测。CD4<sup>+</sup> 的百分比检测操作如下: 于患者治疗前后以及随访 24 周时取外周血 100  $\mu$ L, 室温存置 30 min, 行 2 500 r/min 离心 10 min, 去除杂质调成 10<sup>6</sup> 外周血单个核细胞 (PBMC) 溶液, 加入红细胞裂解液 0.5 mL, 震荡均匀, 洗涤一次, 标记后置于 4  $^{\circ}$ C 下避光环境中, 静置 30 min, 选 PE 抗人 Foxp3 试剂孵育 25 min 后行上流式细胞仪检测, 仪器为美国贝克曼库尔特 Gallios 流式细胞仪。HCV-DNA 检测: 选用荧光定量聚合酶链反应检测, 将 100  $\mu$ L 血清标本与 250  $\mu$ L 核酸提取液混合均匀, 室温下静置 10 min, 加入 80  $\mu$ L 三氯甲烷, 震荡 20 s, 再次室温放置, 时间为 8 min。将样本 2 500 r/min 离心 10 min, 去除杂质, 加入

400 μL 预冷的乙醇洗涤 1 次,再次离心 10 min,去除杂质,行定量检测,试剂选用中山医科大学达安基因股份有限公司生产试剂,仪器为美国 PE 公司 5700 型 DNA 扩增仪,严格依据说明书操作。肝功能指标检测:选用扬州市凯达医疗设备有限公司生产的 KYF-2006A 半自动生化分析仪,严格按照说明书操作,检测患者谷丙转氨酶(ALT)、谷丙转氨酶(AST)、总胆红素(TBIL)等指标,对照组患者行同样检测,统计检测结果。

**1.3 研究指标** 分别检测在治疗前后以及随访 24 周后患者外周血 CD4<sup>+</sup> 的百分比;HCV-DNA 定量;肝功能指标的检测(ALT/AST/TBIL)等。

**1.4 统计学处理** 用 SPSS13.0 统计分析软件进行,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  来表示,对于服从正态分布、方差齐性的资料应用两组之间的 *t* 检验;符合条件的计数资料可以采用  $\chi^2$  检验。检验标准取  $\alpha=0.05$ ,当  $P<0.05$  时差异具有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 试验组和对照组基线资料的比较** 试验组和对照组基线资料比较,显示 HCV-RNA 定量、AST、ALT、CD4<sup>+</sup>(%)在两组之间比较差异具有统计学意义( $P<0.05$ ),可得慢性丙肝患者 HCV-RNA 定量、AST、ALT、CD4<sup>+</sup>(%)都明显的升高。其他的性别、年龄、TBIL、PLT 等在两者之间比较差异无统计学意义( $P>0.05$ ),具有可比性。

**2.2 治疗前后以及随访 24 周外周血中 HCV-RNA 定量、AST、ALT、CD4<sup>+</sup>(%)的水平** 在治疗前后以及随访 24 周后,患者的 HCV-RNA 定量、AST、ALT、CD4<sup>+</sup>(%)的水平均显著的降低( $P<0.05$ )。说明抗病毒治疗可以有效地降低慢性丙型肝炎的伤害,提高治愈率,并减少对肝脏损害。

**2.3 抗病毒治疗有无应答的情况** 在抗病毒治疗的 128 例丙

型肝炎的患者中 93 例有应答反应,35 例无应答反应。93 例应答患者在随访 24 周后 HCV-RNA 定量、AST、ALT、CD4<sup>+</sup>(%)均明显低于健康对照组和 35 例无应答的患者,差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。而对照组和无应答患者之间的差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

**表 1 试验组和对照一般资料的比较**

比较的因素	对照组(n=80)	试验组治疗前(n=128)
性别(男/女)	62/18	72/56
年龄( $\bar{x} \pm s$ )	48 ± 15	48 ± 16
病程(年)	0	9.8 ± 5.7
抗-HCV	阴性	阳性
HCV-RNA 定量	0	4.5 ± 2.34*
AST( $\bar{x} \pm s$ )U/L	22.3 ± 16.7	67.3 ± 30.44*
ALT( $\bar{x} \pm s$ )U/L	25.3 ± 15.5	119.8 ± 51.30*
TBIL(μmol/L)	12.75 ± 5.5	14.32 ± 3.47
PLT 计数( $\times 10^9$ )	166 ± 73	156 ± 87
代谢紊乱	无	无
CD4 <sup>+</sup> (%)	3.99 ± 1.06	12.58 ± 3.78*

\* : $P<0.05$ ,与对照组比较。

**表 2 治疗前、治疗后以及随访 24 周各指标的变化( $\bar{x} \pm s$ )**

比较的因素	治疗前	完成疗程后(12周)	随访 24 周
HCV-RNA 定量	4.50 ± 2.34	0.75 ± 1.56	0.10 ± 0.04*
AST( $\bar{x} \pm s$ )U/L	67.30 ± 30.44	43.44 ± 19.05	11.33 ± 13.67*
ALT( $\bar{x} \pm s$ )U/L	119.80 ± 51.30	105.00 ± 30.27	28.65 ± 17.07*
TBIL(μmol/L)	14.32 ± 3.47	13.87 ± 3.04	12.99 ± 1.15
PLT 计数( $\times 10^9$ )	156.00 ± 87.00	154.00 ± 77.00	161.00 ± 75.00
CD4 <sup>+</sup> (%)	12.58 ± 3.78	9.00 ± 2.74	3.50 ± 2.45*

\* : $P<0.05$ ,与治疗前和完成疗程后比较。

**表 3 有应答和无应答反应之间指标的变化( $\bar{x} \pm s$ )**

情况	n	治疗前			随访 24 周后		
		ALT(U/L)	AST(U/L)	CD4 <sup>+</sup> (%)	ALT(U/L)	AST(U/L)	CD4 <sup>+</sup> (%)
有应答	93	119.8 ± 51.30	67.3 ± 30.44	12.58 ± 3.78	28.65 ± 17.0	11.33 ± 13.67	3.5 ± 2.449
无应答	35	118.8 ± 31.40	61.3 ± 40.40	13.69 ± 5.66	108.5 ± 62.3	60.3 ± 40.33	11.69 ± 5.56

\* : $P<0.05$ ,有应答的患者治疗前和随访 24 周后比较。

**3 讨 论**

不同慢性丙肝患者其感染后临床症状和免疫学检测结果存在差异。临床研究认为,这种现象主要与患者自身白细胞抗原(HLA)等遗传信息、细胞免疫应答以及 HCV 自身特性相关<sup>[6]</sup>。慢性丙肝患者由于自身 HLA-1 限制,针对 HCV 各类抗原表位的特异性细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)应答较为微弱,甚至无法应答,导致患者 HCV 病毒难以清除,临床治疗难度极大。有学者研究显示 CD4<sup>+</sup> T 细胞是 CTL 免疫应答的主要调控细胞,与 HCV 病发、进变等存在直接联系<sup>[7]</sup>。T 细胞是人体主要的免疫细胞,具有极强的免疫抑制性和免疫无能性,其在 IL-2 浓度较低时无法反应,但在 IL-2 浓度较高时可经 TCR 激活或增殖,抑制患者体内 CD4<sup>+</sup> 细胞中 IL-2 的表达和转录,可有效干扰 IL-2 的增殖和活化,同时还可作用于 CD8<sup>+</sup> 细胞上,抑制其杀伤效用<sup>[8]</sup>。临床研究发现,慢性丙肝患者外周血内 CD4<sup>+</sup> T 细胞含量显著高于健康人群,如去除患者外周血内 CD4<sup>+</sup> T 细胞,其 HCV 特异性反应显著增强<sup>[9]</sup>。另外有学者研究发现,慢性丙肝患者外周血内 T 细胞含量显著高于健康人群,并且该细胞水平与患者疾病程度呈正相关。该学者

分离 T 细胞后,发现患者 T 细胞具有诱导形成 HCV 抗原特异性能力,可作用于 HCV 感染的慢性化发展<sup>[10]</sup>。本次研究中,试验组和对照组基线资料显示 HCV-RNA 定量、AST、ALT、CD4<sup>+</sup>(%)两组之间比较差异具有统计学意义( $P<0.05$ ),可得慢性丙肝患者 HCV-RNA 定量、AST、ALT、CD4<sup>+</sup>(%)都明显的升高。其他的性别、年龄、TBIL、PLT 等在两者之间差异无统计学意义( $P>0.05$ ),与同类研究近似。与此同时,在治疗后以及随访 24 周后,患者的 HCV-RNA 定量、AST、ALT、CD4<sup>+</sup>(%)的水平均显著的降低( $P<0.05$ )。说表明抗病毒治疗可以有效地降低慢性丙型肝炎的伤害,提高治愈率,减少对肝脏的损害。此外,在抗病毒治疗的 128 例丙型肝炎的患者中 93 例有应答,35 例属于无应答反应,93 例应答的患者随访 24 周后 HCV-RNA 定量、AST、ALT、CD4<sup>+</sup>(%)均明显的低于对照组和 35 例无应答的患者,差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。而对照组和无应答之间的差异无统计学意义( $P>0.05$ )。由此可以发现,慢性丙肝患者体内 HCV-RNA 处于不断复制过程中,这个复制过程极大地诱导了 T 细胞 CD4<sup>+</sup> 的增殖和活化,导致患者体内 CD4<sup>+</sup> 百分比显著上升,使(下转第 3324 页)

针对动脉粥样硬化,而并非只是针对颈动脉的粥样硬化,因此其本身针对缺血性脑梗死的特异性较低,但与其他实验室指标相比,在缺血性事件的预测过程中价值较高,是一项有较高临床诊断价值的实验室指标。McQueen 等<sup>[16]</sup>深入研究 INTERHEART 试验,发现 apoB/apoA1 值优于传统的脂质指标,包括 LDL-C/HDL-C,且不受种族、性别、年龄的影响。本实验由于标本数量的有限、患者种族分布的不全面及研究面的表浅,未对其作详细的研究验证。

综上所述,apoB/apoA1 比值是针对缺血性脑梗死特异性、灵敏度较好的一个指标,并与缺血性脑梗死有较好的相关性。实验室诊断价值优于传统的脂质指标,对缺血性脑梗死诊断有一定的帮助。由于本实验样本量偏小,且只是根据超声、MRI 结果判断缺血性脑梗死病灶的存在,并未证明是否初次发作及有无临床药物进行降血脂治疗,故存在较大的局限性,需要做进一步深入研究。

参考文献

[1] 金露萍,黄淑田,张丽娜,等. 血浆载脂蛋白水平及 apoB/apoA1 与急性冠脉综合征的相关性研究[J]. 中国现代医药杂志,2011,9(1):52-54.

[2] 郭艳平,杨清成,刘建敏. 青年脑梗死患者危险因素分析[J]. 中国实用神经疾病杂志,2012,15(1):32-33.

[3] Panayiotou A, Griffin M, Georgiou N, et al. ApoB/ApoA1 ratio and subclinical atherosclerosis[J]. Int Angiol, 2008, 27(1): 74-80.

[4] Zhao D, Liu J, Wang W, et al. Epidemiological mmsitioll of stroke in China. Twenty-One • Year Observational Study from the Sino-MONICA-Beijing Project[J]. Stroke, 2008, 39(16): 1653-1654.

[5] 张玉,张小雨,李晓虹,等. 急性脑梗死患者颈动脉狭窄程度与相关载脂蛋白关系的研究[J]. 中华老年心脑血管病杂志,2012,14(12):1278-1281.

[6] 丁桂兵,潘风华,刘庆萍,等. 小剂量尿激酶联合银杏叶提取物治

疗急性脑梗死 60 例疗效分析[J]. 南京医科大学学报:自然科学版,2009,29(2):227-229.

[7] 邹晓辉,王咏龙,党利华. 动脉粥样硬化性血栓性脑梗死的临床治疗分析[J]. 中国医药导报,2011,8(1):50-51.

[8] 刘斌,李海涛,李世英,等. 颈动脉颅外段狭窄及其程度与脑梗死临床类型的相关[J]. Chinese Journal of Cliniced Rehabilitation, 2004, 8(1): 31-33.

[9] 周红英. 阿托伐他汀钙对脑梗死患者颈动脉斑块的疗效观察[J]. 中国医药指南,2011,9(2):104-106.

[10] 李玉莲,潘廷甫,史天奇. 颈动脉颅外段狭窄及其程度与脑梗死病变部位的关系研究[J]. 中国医药指南,2008,6(1):102-103.

[11] 叶桂云,胡望平,池细倮,等. 载脂蛋白 B 与 A-1 比值对预测血管疾病风险的价值[J]. 中华实用诊断与治疗杂志,2012,26(4): 336-337.

[12] 王晓晨,徐岩,程自平,等. 血清载脂蛋白 A-1、载脂蛋白 B 和脂蛋白(a)与冠心病相关性的临床分析[J]. 安徽医科大学学报,2009,20(3):395-398.

[13] Moon, Hee-Won. Assessment of apoB dyslipoproteinemia in Korean population[J]. Clinical biochemistry, 2013, 29(2): 216-218.

[14] Walldius G, Jungner I, Aastveit AH, et al. The apoB/apoAI ratio is better than the cholesterol ratios to estimate the balance between the plasm aproatherogenic and antiatherogenic lipoproteins and to predict coronary risk [J]. Clin Chem Lab Med, 2004, 42(12): 1355-1357.

[15] Barter PJ, Rye KA. The rationale for using apoA-I as a clinical marker for cardiovascular risk[J]. J Intern Med, 2010, 259(5): 447.

[16] McQueen MJ, Hawken S, Wang X, et al. Lipids, lipoproteins, and apolipopmteins as risk markers of myocardial infarction in 52 countries(the INTERHEART study): a case-control study[J]. Lancet, 2008, 372(2): 224-233.

(收稿日期:2014-03-17)

(上接第 3320 页)

患者机体无法完全免疫清除 HCV 病毒,进而诱发 HCV 的慢性转化。抗病毒治疗可以一定程度上抑制 CD4<sup>+</sup> 细胞百分比,进而改善机体免疫清除和肝功能,改善患者临床症状。值得注意的是,由于个体存在不同差异,患者抗病毒治疗时,其 CD4<sup>+</sup> 百分比下降程度也不一致,患者应答也不同,并且停药后患者 CD4<sup>+</sup> 维持水平和回复上升水平也存在一定差异,因此患者复发与否、复发时间也存在差异。

综上所述,外周血中 CD4<sup>+</sup> 调节性 T 细胞可以作为抗病毒治疗疗效以及丙型肝炎病毒感染的指标。

参考文献

[1] 李新华,张爱秋,曹春蕊,等. 慢性丙型肝炎伴自身抗体阳性患者的抗病毒治疗临床观察[J]. 中国热带医学,2011,5(1):156-158.

[2] 李志勤,武淑环,孙长宇,等. 干扰素 α-2b 联合利巴韦林治疗慢性丙型肝炎 72 周疗效分析[J]. 中国现代药物应用,2010,11(1): 152-153.

[3] Amoroso A, D'Amico F, Consolo M, et al. Evaluation of circulating CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> and liver-infiltrating Foxp 3<sup>+</sup> cells in HCV-associated liver disease[J]. Int J Mol Med, 2012, 29(6): 983-988.

[4] 中华医学学会肝病学会,中华医学学会传染病与寄生虫病学会.

丙型肝炎防治指南[J]. 中华医学杂志,2004,84(2):194-195.

[5] Hartling HJ, Gaardbo JC, Ronit A. CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> Regulatory T Cells(Tregs)are Elevated and Display an Active Phenotype in Patients with Chronic HCV Mono-Infection and HIV/HCV Co-Infection[J]. Sandiavian J Immunol, 2012, 76(3): 294-296.

[6] 窦晓光,丁洋. 慢性丙型肝炎抗病毒治疗的新策略和新方法[J]. 中国实用内科杂志,2010,7(3):213-214.

[7] 柳龙根,申红玉,叶春艳. 慢性丙型肝炎患者外周血 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> 调节性 T 细胞与抗病毒疗效的关系[J]. 上海交通大学学报:医学版,2012,32(1):147-149.

[8] 谭雨龙,张绪清,张梦军,等. 乙肝病毒感染患者外周血中 CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> T 细胞亚群的表达及临床意义[J]. 免疫学杂志,2010,6(1):116-118.

[9] 吕峰,郜玉峰,崔明芳,等. 慢性 HBV 感染患者外周血 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> 调节性 T 细胞表达及其临床意义[J]. 实用肝脏病杂志,2010,3(1):136-138.

[10] 胡学玲,陈天宝,范公忍,等. 慢性乙型肝炎外周血 T 淋巴细胞亚群变化及其临床意义[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2010,11(1): 96-97.

(收稿日期:2014-03-09)