

• 论 著 •

滤泡辅助性 T 淋巴细胞、免疫球蛋白水平与慢性乙型肝炎患者疾病严重程度的关系

卢宣霖, 胡 燃[△]

(重庆两江新区第一人民医院检验科, 重庆 401147)

摘 要:目的 探讨慢性乙型肝炎患者滤泡辅助性 T 淋巴细胞(Tfh)、免疫球蛋白(Ig)水平与疾病严重程度的相关性。方法 选取 2016 年 3 月至 2018 年 10 月该院收治的 112 例慢性乙型肝炎患者作为研究对象, 根据病情严重程度分为慢性非重型乙型肝炎组(69 例)和慢性重型乙型肝炎组(43 例), 另选取同期该院 70 例健康体检者作为对照组, 测定 3 组血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、总蛋白(TP)、总胆红素(TBIL)水平和凝血酶原时间(PT), 对 3 组 Tfh(检测项目为 CD4⁺CXCR5⁺ T 淋巴细胞比例)、Ig 水平进行比较, 同时检测慢性非重型乙型肝炎组和慢性重型乙型肝炎组患者乙型肝炎病毒(HBV) DNA 水平。结果 慢性重型乙型肝炎组患者 CD4⁺CXCR5⁺ T 淋巴细胞比例, IgA、IgG 和 IgM 水平显著高于慢性非重型乙型肝炎组和对照组, 慢性非重型乙型肝炎组患者 CD4⁺CXCR5⁺ T 淋巴细胞比例, IgA、IgG 和 IgM 水平显著高于对照组, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。对照组、慢性非重型乙型肝炎组和慢性重型乙型肝炎组 ALT、TBIL 水平和 PT 呈递增趋势, 组间比较差异均有统计学意义($P < 0.05$); 3 组 TP 水平相近, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。慢性重型乙型肝炎组 HBV DNA 水平显著高于慢性非重型乙型肝炎组($P < 0.05$)。CD4⁺CXCR5⁺ T 淋巴细胞比例, IgA、IgG 和 IgM 水平与 ALT、TBIL、PT、HBV DNA 呈正相关。结论 检测机体 Tfh 和 Ig 水平能够反映慢性乙型肝炎的病情变化, 可为临床诊治慢性乙型肝炎提供重要的依据。

关键词:乙型肝炎; 滤泡辅助性 T 淋巴细胞; 免疫球蛋白

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2020.14.016

中图法分类号:R446.63

文章编号:1673-4130(2020)14-1725-04

文献标识码:A

Relationship between follicular helper T lymphocytes and immunoglobulin levels with illness severity in patients with chronic hepatitis B

LU Xuanlin, HU Ran[△]

(Department of Clinical Laboratory, Liangjiang New Area First People's Hospital, Chongqing 401147, China)

Abstract: **Objective** To investigate the relationship between follicular helper T lymphocytes (Tfh) and immunoglobulin (Ig) levels with illness severity in the patients with chronic hepatitis B. **Methods** One hundred and twelve patients with chronic hepatitis B admitted to this hospital from March 2016 to October 2018 were selected as the study subjects and divided into the chronic non-severe hepatitis B group ($n = 69$) and chronic severe hepatitis B group ($n = 43$) according to the illness severity. Contemporaneous other 70 healthy people undergoing the physical examination in this hospital were selected as the control group. The levels of serum alanine aminotransferase (ALT), total protein (TP), total bilirubin (TBIL) and prothrombin time (PT) were detected in the 3 groups. The levels of Tfh and Ig were compared among 3 groups. Meanwhile the HBV DNA level was detected in the chronic non-severe hepatitis B group and chronic severe hepatitis B group. **Results** The ratio of CD4⁺CXCR5⁺ Tfh and the levels of IgA, IgG and IgM in the chronic severe hepatitis B group were significantly higher than those in the chronic non-severe hepatitis B group and the control group. The levels of CD4⁺CXCR5⁺ Tfh and IgA, IgG and IgM levels in the chronic non-severe hepatitis B group were significantly higher than those in the control group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). The levels of ALT, TBIL and PT in the control group, chronic non-severe hepatitis B group and chronic severe hepatitis B group showed the increasing trend, and the inter-group difference was statistically significant ($P < 0.05$); the TP level in 3 groups was similar with no statistical difference ($P > 0.05$). The HBV DNA level in the chronic severe hepatitis B group was significantly higher than that in the chronic non-

作者简介:卢宣霖,男,技师,主要从事临床检验研究。 [△] 通信作者, E-mail:921844731@qq.com。

本文引用格式:卢宣霖,胡燃. 滤泡辅助性 T 淋巴细胞、免疫球蛋白水平与慢性乙型肝炎患者疾病严重程度的关系[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(14): 1725-1728.

severe hepatitis B group ($P<0.05$). The ratio of $CD4^{+}CXCR5^{+}$ T lymphocytes and the levels of IgA, IgG and IgM were positively correlated with ALT, TBIL, PT and HBV DNA. **Conclusion** The detection of Tfh and Ig levels can reflect the illness changes of chronic hepatitis B, which can provide the important auxiliary basis for clinical diagnosis and treatment of chronic hepatitis B.

Key words: hepatitis B; follicular helper T lymphocytes; immunoglobulin

慢性乙型肝炎是一种常见的传染性疾病,指乙型肝炎病毒(HBV)检测阳性,病程超过 6 个月或发病时间不明确但有相关症状出现的疾病^[1]。临床主要表现为恶心、厌食、腹胀和乏力等。近年来慢性乙型肝炎在全球有不断流行趋势,据统计,我国慢性乙型肝炎患者已高达 1.3 亿^[2]。由于该病难以治愈,且发展到后期能够导致肝硬化、肝癌等相关疾病的发生,对人们生命健康造成严重威胁。因此,及早诊断、及时治疗意义重大。尽管目前对慢性乙型肝炎的发病机制尚不清楚,但学术界普遍认为该病与 HBV 感染后肝细胞损伤、免疫应答紊乱关系密切^[3]。滤泡辅助性 T 淋巴细胞(Tfh)是由 BREITFELD 等^[4]在扁桃体中发现的一种新型 $CD4^{+}$ T 淋巴细胞亚群,有研究发现 HBV 感染者外周血 Tfh 不同程度升高,推测 Tfh 可能参与了 HBV 感染后的相关免疫反应^[5]。免疫球蛋白(Ig)是免疫活性分子中的一类,当有病毒入侵时,机体产生免疫反应,导致 Ig 水平升高。目前,Tfh 和 Ig 水平与乙型肝炎严重程度的相关性研究仍较少,因此,本研究通过检测乙型肝炎患者 Tfh 和 Ig 水平,探讨其与疾病严重程度的相关性,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2016 年 3 月至 2018 年 10 月本院收治的 112 例慢性乙型肝炎患者为研究对象,根据病情严重程度分为慢性非重型乙型肝炎组(69 例)和慢性重型乙型肝炎组(43 例)。以起病时临床表现同亚急性重型肝炎,血清总胆红素(TBIL) >10 倍正常值,凝血酶原活动度低于 40%判断为慢性重型乙型肝炎。另选取同期本院 70 例健康体检者作为对照组。3 组研究对象性别、年龄比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),具有可比性,见表 1。本研究经本院伦理委员会批准执行。纳入标准:(1)符合中华医学会肝病学会、中华医学会感染病学分会制定的《慢性乙型肝炎防治指南(2015 年版)》^[6]中的诊断标准;(2)年龄 18~65 岁;(3)Child-Pugh 评分为 A 级;(4)自愿参与本研究,并签署知情同意书。排除标准:(1)合并恶性肿瘤者;(2)伴有抑郁、精神疾病史者;(3)合并其他类型肝炎病毒感染者;(4)合并肾、心、肺功能异常者;(5)近期接受过免疫调节剂或抗菌药物治疗者;(6)孕妇或妊娠期女性。

1.2 方法

1.2.1 外周血 Tfh 水平测定 本文中 Tfh 通过检测 $CD4^{+}CXCR5^{+}$ T 淋巴细胞比例来反映。于清晨空腹状态下采集研究对象静脉血 1 mL,置于含有肝素锂

的试管中。取 100 μ L,依次加入 5 μ L 荧光抗体 PerCP-anti- $CD4$ -PerCP(美国 BD 公司)和 5 μ L FITC-anti- $CXCR5$ (美国 BD 公司),避光染色 30 min,随后加入红细胞裂解液(按 1:10 的比例),混匀后避光 10 min,3 000 r/min 离心 5 min,弃上清液。加入 2 mL 磷酸盐缓冲液(PBS)重悬,1 000 r/min 离心 1 min,弃上清液,加入 200 μ L PBS 重悬细胞后采用 EPICS XL 型流式细胞仪(美国 Coulter 公司)检测外周血 Tfh(检测项目为 $CD4^{+}CXCR5^{+}$ T 淋巴细胞比例)水平,所有试剂购自美国 Beckman 公司,严格按照说明书要求操作。

表 1 3 组研究对象一般资料比较			
组别	<i>n</i>	男/女(<i>n</i> / <i>n</i>)	年龄($\bar{x}\pm s$,岁)
慢性非重型乙型肝炎组	69	38/31	43.7 $\pm$ 7.6
慢性重型乙型肝炎组	43	20/23	41.4 $\pm$ 8.0
对照组	70	42/28	42.0 $\pm$ 7.7
χ^2/F		1.961	1.412
<i>P</i>		0.376	0.246

1.2.2 Ig 水平测定 于清晨空腹状态下抽取研究对象肘静脉血 2 mL,3 000 r/min 离心 10 min,分离血浆后-80 $^{\circ}$ C 保存,采用免疫比浊法测定 IgA、IgG 和 IgM 水平。试剂盒由美国 Beckman 公司提供,严格按照说明书要求操作。

1.2.3 其他指标检测 于清晨空腹状态下抽取研究对象静脉血 6 mL,取 4 mL 1 500 r/min 离心 15 min,取上清液置于-80 $^{\circ}$ C 下保存。采用 LX20 全自动生化分析仪(美国 Beckman 公司)测定血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)和 TBIL 水平,采用双缩脲法测定血清总蛋白(TP)水平。将 2 mL 静脉血加入含有枸橼酸钠的抗凝管中,3 000 r/min 离心 10 min,采用 ACL7000 全自动血凝仪(美国 Beckman 公司)测定凝血酶原时间(PT),试剂盒均购自美国 Beckman 公司,严格按照说明书要求操作。采用 Piko Real 型实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)仪(美国赛默飞公司)检测慢性非重型乙型肝炎组和慢性重型乙型肝炎组患者 HBV DNA 水平,试剂购自上海科华生物有限公司。

1.3 统计学处理 采用 SPSS20.0 软件进行统计处理和分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用 *F* 检验,两组间比较采用 *t* 检验;计数资料以率表示,组间比较采用 χ^2 检验;相关性分析采用 Pearson 相

关。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 3 组 $CD4^{+}CXCR5^{+}$ T 淋巴细胞比例,Ig、HBV DNA 水平比较 慢性重型乙型肝炎组患者 $CD4^{+}CXCR5^{+}$ T 淋巴细胞比例,IgA、IgG 和 IgM 水平显著高于慢性非重型乙型肝炎组和对照组,并且慢性非重型乙型肝炎组患者 $CD4^{+}CXCR5^{+}$ T 淋巴细胞比例,IgA、IgG 和 IgM 水平显著高于对照组,差异均有统计学意义

($P<0.05$)。慢性重型乙型肝炎组 HBV DNA 水平高于慢性非重型乙型肝炎组($P<0.05$)。见表 2。

2.2 3 组生化指标水平比较 对照组、慢性非重型乙型肝炎组和慢性重型乙型肝炎组 ALT、TBIL 水平和 PT 水平逐级递增,组间比较差异均有统计学意义($P<0.05$);3 组 TP 水平相近,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 3。

表 2 3 组 $CD4^{+}CXCR5^{+}$ T 淋巴细胞比例,Ig、HBV DNA 水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	$CD4^{+}CXCR5^{+}$ T 淋巴细胞比例(%)	IgA(g/L)	IgG(g/L)	IgM(g/L)	HBV DNA(Ig copy/mL)
对照组	70	2.21±0.49	1.79±0.34	11.28±1.65	1.51±0.24	—
慢性非重型乙型肝炎组	69	4.02±1.02 [*]	2.34±0.54 [*]	14.05±2.06 [*]	2.15±0.37 [*]	4.82±0.39
慢性重型乙型肝炎组	43	6.62±1.56 ^{*#}	2.94±0.82 ^{*#}	15.74±2.79 ^{*#}	2.91±0.56 ^{*#}	6.54±0.62 [#]
<i>F/t</i>		267.520	61.883	69.596	178.297	7.492
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.002

注:与对照组比较,^{*} $P<0.05$;与慢性非重型乙型肝炎组比较,[#] $P<0.05$;—表示无数据。

表 3 3 组生化指标水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	ALT(U/L)	TP(g/L)	TBIL(μ mol/L)	PT(s)
对照组	70	29.2±6.7	77.1±5.8	121.1±13.2	10.2±1.9
慢性非重型乙型肝炎组	69	38.8±9.1 [*]	76.9±5.1	249.0±32.5 [*]	13.7±2.0 [*]
慢性重型乙型肝炎组	43	56.2±11.3 ^{*#}	78.7±5.2	382.5±36.6 ^{*#}	19.3±3.3 ^{*#}
<i>F</i>		123.458	1.648	1 182.203	201.771
<i>P</i>		<0.001	0.195	<0.001	<0.001

注:与对照组比较,^{*} $P<0.05$;与慢性非重型乙型肝炎组比较,[#] $P<0.05$ 。

2.3 $CD4^{+}CXCR5^{+}$ T 淋巴细胞比例、Ig 水平与 ALT、TBIL、PT、HBV DNA 的相关分析 Pearson 相关分析表明, $CD4^{+}CXCR5^{+}$ T 淋巴细胞比例,IgA、IgG 和 IgM 水平与 ALT、TBIL、PT 和 HBV DNA 呈正相关($P<0.05$),见表 4。

表 4 慢性乙型肝炎患者 $CD4^{+}CXCR5^{+}$ T 淋巴细胞比例、Ig 水平与 ALT、TBIL、PT、HBV DNA 的相关性分析

指标	统计量	ALT	TBIL	PT	HBV DNA
$CD4^{+}CXCR5^{+}$ T 淋巴细胞比例	<i>r</i>	0.347	0.382	0.220	0.391
	<i>P</i>	0.001	<0.001	0.012	0.001
IgA	<i>r</i>	0.291	0.366	0.215	0.242
	<i>P</i>	0.006	0.001	0.016	0.003
IgG	<i>r</i>	0.352	0.399	0.263	0.244
	<i>P</i>	<0.001	<0.001	0.005	0.005
IgM	<i>r</i>	0.307	0.274	0.260	0.302
	<i>P</i>	0.002	0.002	0.005	0.001

3 讨 论

慢性乙型肝炎是由 HBV 感染而引起的一种肝脏炎性病变,具有传染性。慢性乙型肝炎是一种全球性

疾病,全世界无症状 HBV 携带者超过 2 亿,尤其在发展中国家多见^[7]。我国 HBV 感染者中有 1/3 会发生肝脏损伤。慢性乙型肝炎的早期临床症状不典型,难以及时发现患者^[8]。HBV 传播方式较多,近年来乙型肝炎发病率具有不断升高趋势^[9]。目前尚无完全根除 HBV 的方法,抑制病毒蔓延是目前临床治疗乙型肝炎的主要手段。及时、有效的诊断对于乙型肝炎尤为重要。

尽管目前对乙型肝炎的发病机制尚未研究透彻,但一直以来学术界认为 HBV 感染后引起的肝细胞损伤并不是直接由 HBV 造成的,而是 HBV 侵入后使机体产生的一系列免疫反应,导致组织及细胞损伤。Tfh 是一种新型 $CD4^{+}$ T 淋巴细胞亚群,定位于次级淋巴细胞,检测时难以取材。IgA、IgM 和 IgG 是机体主要的 Ig,是目前慢性乙型肝炎患者常规检测指标。综合以上背景,本文探讨了不同群体 $CD4^{+}CXCR5^{+}$ T 淋巴细胞比例和 Ig 水平,结果显示,慢性重型乙型肝炎组和慢性非重型乙型肝炎组 $CD4^{+}CXCR5^{+}$ T 淋巴细胞比例,IgA、IgG 和 IgM 水平均显著高于对照组($P<0.05$),且慢性重型乙型肝炎组患者各指标水平显著高于慢性非重型乙型肝炎组($P<0.05$),说明慢性乙型肝炎患者 $CD4^{+}CXCR5^{+}$ T 淋巴细胞比例和

Ig 水平显著高于健康人群,且随着疾病程度的加重,以上指标的水平更高,提示 Tfh 和 Ig 可能参与了慢性乙型肝炎的发生和发展过程。Tfh 具有独立的分化调节机制,在 B 淋巴细胞的活化、分化等过程中具有辅助作用。近年的研究显示,Tfh 与慢性乙型肝炎的发生、发展具有一定关系。CXCR5 是 Tfh 最重要的表面标记分子^[10],目前一般认为外周血 CD4⁺CXCR5⁺ T 淋巴细胞具有与 Tfh 相似的功能,能够反映机体 Tfh 水平^[11]。HBV 属于非细胞性病毒,机体感染后免疫功能发生紊乱,从而刺激机体产生更多 B 淋巴细胞,转化为浆细胞后与 Ig 结合发挥免疫应答作用。Tfh 与乙型肝炎血清学转化有关,参与了 HBV 介导的免疫反应。吴翠萍等^[12]的研究认为,Tfh 参与慢性乙型肝炎的免疫反应,且与患者高球蛋白血症紧密相关。有研究显示,慢性乙型肝炎患者外周血 CD4⁺CXCR5⁺ T 淋巴细胞比例,IgA、IgG 和 IgM 水平明显高于健康人群,且 Ig 水平与疾病严重程度关系密切^[13-14],这与本研究结果相似。

ALT 是反映肝实质损伤最敏感的指标之一,肝细胞即使坏死率仅为 1%,血清 ALT 水平即可升高 1 倍。胆红素在肝脏的代谢和排泄等过程中发挥重要作用,肝脏受损后,间接胆红素无法转化,导致 TBIL 水平升高。PT 是反映肝损伤严重程度及预后的常用指标,并且凝血酶原为肝脏合成维生素的重要依赖因子。一般认为,排除其他因素后,患者 ALT、TBIL 水平越高,PT 越长,肝脏受损越严重。因此,临床常用这些指标反映肝脏损伤程度。本研究结果显示,健康体检者 ALT、TBIL 和 PT 水平均显著低于慢性乙型肝炎患者,且随着病情进展,这些指标水平具有递增趋势,而 TP 水平在 3 组中差异无统计学意义($P>0.05$),表明 ALT、TBIL 和 PT 能够反映肝脏损伤的程度。HBV DNA 是 HBV 感染最直接的指标,本研究结果显示,随着乙型肝炎患者病情加重,HBV DNA 水平越高,且 HBV DNA 水平与 CD4⁺CXCR5⁺ T 淋巴细胞比例、Ig 水平呈正相关,提示乙型肝炎的恶化与机体细胞免疫和体液免疫紊乱有密切关系。

此外,本研究显示,CD4⁺CXCR5⁺ T 淋巴细胞比例,IgA、IgG 和 IgM 水平与 ALT、TBIL 和 PT 呈正相关,表明 Tfh 和 Ig 水平与慢性乙型肝炎严重程度具有相关性,二者能够辅助判断疾病进展情况。

4 结 论

综上所述,检测 Tfh 和 Ig 水平能反映慢性乙型肝炎的病情变化,可为临床诊治慢性乙型肝炎提供重要的依据。

参考文献

[1] FISICARO P, BARILI V, MONTANINI B, et al. Targe-

ting mitochondrial dysfunction can restore antiviral activity of exhausted HBV-specific CD8 T cells in chronic hepatitis B[J]. Nat Med, 2017, 23(3): 327-336.

[2] 袁颖华, 杨潇瑾, 黄建芳, 等. 慢性乙型肝炎患者血清炎症反应指标与肝组织炎症反应分级及纤维化的关系[J]. 检验医学与临床, 2017, 14(16): 2369-2371.

[3] PARK J J, WONG D K, WAHED A S, et al. Hepatitis B virus-specific and global T-cell dysfunction in chronic hepatitis B[J]. Gastroenterology, 2016, 150(3): 684-689.

[4] BREITFELD D, OHL L, KREMMER E, et al. Follicular B helper T cells Express CXCR5 chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production[J]. J Exp Med, 2000, 192(11): 1545-1552.

[5] 纪龙珊, 孙学华, 周振华, 等. 滤泡辅助性 T 淋巴细胞及其在肝脏疾病发生发展中的作用[J]. 临床肝胆病杂志, 2016, 32(6): 1230-1234.

[6] 中华医学会肝病学会, 中华医学会感染病学会. 慢性乙型肝炎防治指南(2015 年版)[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版), 2015, 9(5): 570-589.

[7] 邓红丽. 基层慢性乙型病毒性肝炎现状调查及对策[J]. 深圳中西医结合杂志, 2016, 26(1): 196-197.

[8] 谢容根, 张丽华, 毕玉珍. 慢性乙型肝炎患者在不同肝功能情况下外周血中的 T 淋巴细胞亚群、补体 C3、补体 C4 及 HBV-DNA 的比较[J]. 国际检验医学杂志, 2017, 38(14): 1882-1884.

[9] NICKOVIC V, KATANIC R, KATANIC N, et al. Chronic hepatitis B[J]. Acta Medica Okayama, 2017, 56(4): 50-60.

[10] SNELL L M, OSOKINE I, YAMADA D H, et al. Overcoming CD4 Th1 cell fate restrictions to sustain antiviral CD8 T cells and control persistent virus infection[J]. Cell Rep, 2016, 16(12): 3286-3296.

[11] SPAAN M, KREEFFT K, DE GRAAV G N, et al. CD4⁺CXCR5⁺ T cells in chronic HCV infection produce less IL-21, yet are efficient at supporting B cell responses[J]. J Hepatol, 2015, 62(2): 303-310.

[12] 吴翠萍, 赵利. 外周血 T 淋巴细胞亚群变化特点及血清因子表达水平的研究[J]. 检验医学与临床, 2018, 15(4): 523-525.

[13] 王燕, 黄友英, 马燕, 等. 慢性乙型肝炎患者外周血中滤泡辅助性 T 淋巴细胞的表达特征[J]. 临床肝胆病杂志, 2018, 34(1): 58-62.

[14] 李小书, 张慧, 马忙妮, 等. 慢性乙型肝炎患者血清补体 C3、C4、ALT、AST 及 HBV-DNA 水平的表达及临床意义[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(22): 2804-2808.

(收稿日期: 2019-08-20 修回日期: 2020-03-29)