

· 论 著 ·

人类白细胞抗原 DR 的表达水平与 HBV 感染不同转归的关系*

樊小群, 李 欢, 朱华雄, 蔡庆果, 何吕芬

海南省三亚市人民医院检验科, 海南三亚 572000

摘要:目的 探讨人类白细胞抗原(HLA)-DR mRNA 表达水平与 HBV 感染不同转归的关系。方法 收集该院 2014 年 8 月至 2017 年 10 月住院及门诊确诊的乙型肝炎病毒(HBV)急性感染者 7 例、急性自限性者 30 例和慢性感染者 64 例(乙型肝炎病毒轻度感染 24 例, 中度感染 12 例, 重度感染 8 例, 携带者 20 例)和体检健康者 53 例(疫苗免疫者 35 例和 HBV 5 项全阴者 18 例)的临床资料。采用实时荧光定量 PCR 检测各组 HBV-DNA 水平和 PBMC 中 HLA-DR mRNA 表达水平。**结果** HLA-DR mRNA 表达水平在急性、急性自限、慢性、疫苗免疫和 5 项全阴组中比较, 急性自限组最高, 5 项全阴组最低, 组间比较差异有统计学意义($F=9.75, P<0.05$)。其中, 急性自限组与慢性组 HLA-DR mRNA 表达水平高于疫苗免疫组($t=4.767, 4.576, P<0.05$); 慢性组、疫苗免疫组 HLA-DR mRNA 表达水平均高于 5 项全阴组($t=7.346, 3.374, 均 P<0.05$)。不同 HBV-DNA 水平组中 HLA-DR mRNA 表达水平比较, 差异无统计学意义($F=1.204, P=0.319$); 不同程度慢性 HBV 感染组中, HLA-DR mRNA 表达水平在重度组中最高, 但组间比较差异无统计学意义($F=0.540, P=0.657$)。**结论** 不同疾病阶段的 HBV 感染和疫苗免疫均可诱导 HLA-DR mRNA 表达水平升高, 在急性自限状态下最为明显; 慢性 HBV 感染中 HLA-DR mRNA 表达水平可能与细胞损伤程度有关。

关键词:人类白细胞抗原-DR; 乙型肝炎病毒; 不同转归

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2021.07.020 **中图法分类号:**R575.1

文章编号:1673-4130(2021)07-0852-04 **文献标志码:**A

The relationship between the expression level of human leukocyte antigen DR and the different outcomes of HBV infection*

FAN Xiaoqun, LI Huan, ZHU Huaxiong, CAI Qingguo, HE Lyufen

Department of Clinical Laboratory, Sanya People's Hospital, Sanya, Hainan 572000, China

Abstract: Objective To investigate the relationship between the expression of human leukocyte antigen (HLA)-DR mRNA and the different outcomes of HBV infection. **Methods** From August 2014 to October 2017, 7 cases of acute hepatitis B virus (HBV) infection, 30 cases of acute self-limiting, 64 cases of chronic infection (24 cases of mild infection of hepatitis B virus, 12 cases of moderate infection, 8 cases of severe infection, 20 cases of carriers), and 53 cases of healthy people (35 cases of vaccine-immunized patients and 18 cases of HBV 5 negative cases) who were hospitalized and diagnosed in the outpatient department of the hospital were collected. Real-time fluorescence quantitative PCR was used to detect the levels of HBV-DNA and HLA-DR mRNA expression in PBMC in each group. **Results** Among the acute, acute self-limiting, chronic, vaccine-immunized and 5-item negative patients, the HLA-DR mRNA expression level was the highest in the acute self-limiting group, and the 5-item negative group was the lowest. The difference between the groups were statistically significant ($F=9.75, P<0.05$). Among them, the HLA-DR mRNA expression levels of the acute self-limiting group and the chronic group were higher than that of the vaccine immunization group ($t=4.767, 4.576, P<0.05$); the HLA-DR mRNA expression levels of the chronic group and the vaccine immunization group were higher than that of 5-item group ($t=7.346, 3.374, P<0.05$). There were no statistically significant differences in HLA-DR expression levels in different HBV-DNA level groups ($F=1.204, P=0.319$). In

* 基金项目: 海南省自然科学基金青年基金项目(818QN326)。

作者简介: 樊小群, 女, 主管技师, 主要从事生化检验相关研究。

本文引用格式: 樊小群, 李欢, 朱华雄, 等. 人类白细胞抗原 DR 的表达水平与 HBV 感染不同转归的关系[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42

different degrees of chronic HBV infection groups, the HLA-DR expression levels was the highest in the severe group, but the differences between the groups were not statistically significant ($F = 0.540, P = 0.657$).

Conclusion HBV infection and vaccine immunization at different disease stages can induce the increase of HLA-DR expression level, which is most obvious in the acute self-limiting state; HLA-DR expression level in chronic HBV infection may be related to the degree of cell damage.

Key words: human leukocyte antigen-DR; hepatitis B virus; different outcomes

随着慢性乙型肝炎(CHB)临床治愈观点的提出,研究引起乙型肝炎病毒(HBV)感染不同转归的因素尤为重要,宿主基因变异可能影响 HBV 感染的不同转归^[1]。人类白细胞抗原(HLA)是人类主要的组织相容性复合体(MHC),是 HBV 感染的重要宿主因子之一。HLA 基因多态性不仅与 HBV 的自发清除、血清转化、CHB 的持续感染密切相关,而且与疾病进展、肝硬化和 HBV 相关性肝癌的发展密切相关^[2]。HLA-DR 表位在抗 HBV 感染中发挥重要作用,且全基因组关联研究已确定 HLA-DR 是 HBV 相关慢、急性肝衰竭易感的主要位点^[3]。抗 HBV 感染免疫研究表明,HLA-DR 对 HBV 感染不同转归的影响可能是由于肽-主要组织相容性复合物(pMHC)与 T 淋巴细胞受体(TCR)相互作用,从而影响初始 T 淋巴细胞的分化途径,pMHC 与 TCR 相互作用的变化主要受 HLA 分子结构或表达水平的影响^[4]。已有研究明确 HLA-DR 分子结构与 HBV 慢性感染相关^[5],而对于 HLA-DR mRNA 的表达水平在 HBV 感染临床转归中的作用报道较少,目前 HLA-DR mRNA 表达水平作为判断脓毒血症和食管癌等疾病预后的指标^[6-7],因此探讨 HLA-DR 在 HBV 感染临床转归中的特点有十分重要的意义。本研究选择本地区人群中急性、急性自限和不同疾病阶段的慢性 HBV 感染者,疫苗免疫者和乙型肝炎 5 项[血清乙型肝炎表面抗原(HBsAg)、乙型肝炎表面抗体(抗-HBs)、乙型肝炎 E 抗原(HBeAg)、乙型肝炎 E 抗体(抗-HBe)、乙型肝炎核心抗体(抗-HBc)]结果阴性的健康人群,采用实时荧光定量 PCR(qPCR)检测各组外周血单个核细胞(PBMC)中 HLA-DR mRNA 的表达水平,分析在不同 HBV 感染者中 HLA-DR mRNA 的表达水平差异;HLA-DR mRNA 表达水平与疫苗免疫的关系;HLA-DR mRNA 表达水平与 HBeAg 抗原血清学转化的关系,为 HLA-DR mRNA 表达水平在 HBV 感染患者的预后评价提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择本院 2014 年 8 月至 2017 年 10 月住院和门诊 HBV 感染患者 101 例及体检中心的体检健康者 53 例为研究对象,均为汉族,无血缘关系。HBV 感染患者符合 2010 年修订的《慢性乙型肝炎防

治指南(2010 年版)》^[8]中的相关标准:(1)HBsAg 阳性、HBeAg 阳性或者阴性、抗-HBe 阳性或者阴性,HBV-DNA 阳性;(2)丙氨酸氨基转移酶(ALT)持续或反复升高,或在肝组织学检查中发现肝炎病变;(3)未经抗病毒治疗。排除标准:(1)合并其他类型肝炎病毒感染;(2)合并心、肾和造血系统严重疾病、自身免疫性疾病、肝硬化、肝癌。本研究经本院伦理委员会批准,受试者均知情同意并签署知情同意书。

本研究共纳入急性 HBV 感染者 7 例为急性组;不同感染阶段的慢性 HBV 感染者 64 例为慢性组(CHB 轻度感染 24 例,中度感染 12 例,重度感染 8 例,携带者 20 例);急性自限者 30 例为急性自限组。体检健康者 53 例,其中疫苗免疫者 35 例为疫苗免疫组,乙型肝炎 5 项全阴者 18 例为 5 项全阴组。急性自限组:既往否认有肝炎病史或抗 HBc-IgM 检测阴性,HBsAb、HBeAb 和抗-HBc 均为阳性。疫苗免疫组:经 HBV 疫苗免疫且乙型肝炎 5 项检测结果 HBsAb 阳性,其余 4 项均阴性。5 项全阴组:即乙型肝炎 5 项检测结果均为阴性。

1.2 方法

1.2.1 临床资料收集 记录受试者的性别、年龄、ALT、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、总胆红素(TBIL)和乙型肝炎 5 项等指标,并采集外周血 2 mL 于乙二胺四乙酸抗凝管中,离心分离血浆和血细胞备用。

1.2.2 HBV-DNA 检测 受试者血浆按 HBV 核酸定量检测试剂盒说明书(购自深圳凯杰生物工程有限公司)进行 HBV-DNA 提取、扩增和定量检测。MX3000P qPCR 仪购自美国 Stratagene 公司。

1.2.3 HLA-DR mRNA 表达水平检测 受试者血细胞使用人外周血淋巴细胞分离液(购自天津灏洋生物制品科技有限责任公司)制备 PBMC 备用;使用 RNA 提取试剂盒(购自北京百泰克生物有限公司)提取总 RNA,使用反转录试剂盒(购自北京百泰克生物有限公司)进行反转录,使用探针法 qPCR 试剂盒(购自北京天根生化科技有限公司)检测各组 HLA-DR 和 β -actin mRNA 表达水平,分别记录循环阈值(Ct)值,并用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行 HLA-DR mRNA 表达水平相对定量分析。HLA-DR 和 β -actin 的引物和探针购自

上海吉玛公司。HLA-DR 序列 F: 5'-GAC TTG ATG CTG ATG AGA TTT TCC-3', R: 5'-GAG CCT CAA AGC TGG CAA ATC-3'。β-actin 序列 F: 5'-CTG GAA CGG TGA AGG TGA CA-3', R: 5'-CAC CTC CCC TGT GTG GAC TT-3'。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行数据处理分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验或单因素方差分析。计数资料以例数和百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 一般资料比较 4 组性别比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$),年龄、ALT、AST 和 TBIL 水平比较,

差异均有统计学意义 ($P < 0.05$),符合该疾病分布状态。见表 1。

2.2 HLA-DR mRNA 表达水平与不同 HBV 感染者及疫苗免疫的关系 HLA-DR mRNA 表达水平在急性自限组 (2.75 ± 0.57) 中最高,5 项全阴组 (0.99 ± 0.36) 中最低,各组组间比较差异有统计学意义 ($F = 9.75, P < 0.05$)。其中,急性自限组、慢性组 (2.51 ± 0.23) HLA-DR mRNA 表达水平高于疫苗免疫组 ($1.83 \pm 0.21, t = 4.767, 4.576, 均 P < 0.05$),但急性自限组、慢性组和急性组 (1.92 ± 0.55) 比较,差异无统计学意义 ($t = 2.550, 1.910, 均 P > 0.05$)。慢性组、疫苗免疫组 HLA-DR mRNA 表达水平均高于 5 项全阴组 ($t = 7.346, 3.374, 均 P < 0.05$)。

表 1 一般资料比较

组别	n	性别(男/女, n/n)	年龄($\bar{x} \pm s$, 岁)	ALT($\bar{x} \pm s$, U/L)	AST($\bar{x} \pm s$, U/L)	TBIL($\bar{x} \pm s$, mmol/L)
急性组	7	5/2	33.00 ± 10.49	872.98 ± 422.84	435.53 ± 164.15	151.19 ± 74.32
急性自限组	30	14/16	38.83 ± 10.46	344.70 ± 170.92	296.01 ± 37.00	109.10 ± 53.31
慢性组	64	41/23	50.00 ± 12.23	10.43 ± 1.90	21.57 ± 5.77	12.03 ± 5.53
疫苗免疫组	35	19/16	38.51 ± 9.488	16.26 ± 6.95	18.06 ± 4.53	13.01 ± 3.47
χ^2/F		3.836	4.299	101.810	525.100	73.220
P		0.280	0.006	<0.001	<0.001	<0.001

2.3 HLA-DR mRNA 表达水平与不同感染阶段慢性 HBV 感染者的关系 重度 (2.98 ± 1.03)、中度 (2.54 ± 0.76)、轻度 (2.50 ± 0.87) 慢性 HBV 感染者 HLA-DR mRNA 表达水平和 HBV 携带者 (1.72 ± 0.60) 比较,差异无统计学意义 ($F = 0.540, P = 0.657$)。

2.4 慢性 HBV 感染者 HLA-DR mRNA 在不同 HBV-DNA 表达水平中的比较 慢性 HBV 感染者共 64 例,随机选取其中 62 例患者进行 HBV-DNA 定量检测,根据 HBV-DNA 水平不同分 6 组 [$< 1 \times 10^3$ 、($1 \times 10^3 \sim < 1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^4 \sim < 1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^5 \sim < 1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^6 \sim < 1 \times 10^7$ 、 $\geq 1 \times 10^7$ IU/mL)],其 HBV-DNA mRNA 表达水平分别为 1.81 ± 0.69 、 1.71 ± 0.58 、 2.84 ± 0.92 、 3.44 ± 1.45 、 1.88 ± 0.60 、 1.42 ± 0.39 。不同 HBV-DNA 水平组 HLA-DR 表达水平比较,差异无统计学意义 ($F = 1.204, P = 0.319$)。但是在 HBV-DNA 水平为 $1 \times 10^3 \sim < 1 \times 10^4$ IU/mL, $1 \times 10^4 \sim < 1 \times 10^5$ IU/mL 时,其 HLA-DR mRNA 表达水平均较高,HBV-DNA mRNA 水平为 $1 \times 10^5 \sim < 1 \times 10^6$ IU/mL 的感染者 HLA-DR mRNA 表达水平最高,随着 HBV-DNA 的水平逐渐降低, PBMC 中的 HLA-DR mRNA 表达水平呈先升高后降低的趋势。

2.5 HLA-DR mRNA 表达水平在慢性 HBV 感染者不同 HBeAg 血清学状态中的比较 HBeAg 阴性的慢性 HBV 感染者 HLA-DR mRNA 表达水平 (2.28 ± 1.12) 高于 HBeAg 阳性的慢性 HBV 感染者 (1.48 ± 0.65),差异有统计学意义 ($t = 3.267, P = 0.069$)。

3 讨 论

HBV 感染后引起不同转归主要是宿主免疫系统对病毒抗原的免疫应答所致。免疫识别病毒需要 HLA-II 类分子把病毒抗原呈递给 CD4⁺ T 淋巴细胞后清除病毒或持续感染^[9]。在 HLA-II 类分子中 HLA-DR 最具多态性,HLA-DR 分子在 CD4⁺ T 淋巴细胞向 Th1 细胞分化的过程中起重要作用,不同 HLA-DR 表达水平在免疫功能中的作用不同。HLA-DR 表达水平不同激活的 CD4⁺ T 淋巴细胞功能亚群不同,致使其发挥不同抗病毒作用,进而导致不同转归^[10]。有研究表明在慢性 HBV 感染者树突细胞和单核细胞中 HLA-DR 表达水平均低于对照组,并认为其可能是抗原递呈功能失调及体液和细胞免疫紊乱导致 HBV 持续感染和患者病情迁延不愈的重要因素之一^[11-12]。PBMC 作为免疫细胞的集合体,其在 HBV 感染过程中起着至关重要的作用,但目前关于 HBV 感染后 PBMC 中 HLA-DR mRNA 表达水

平变化的报道较少。本研究对外周血 PBMC 中 HLA-DR mRNA 在不同感染组中的表达水平进行研究,发现急性自限组表达水平最高,慢性组次之,五项全阴组表达水平最低,不同 HBV 感染状态和疫苗免疫均可诱导 HLA-DR mRNA 表达水平不同程度地升高,原因可能是 HLA-DR mRNA 在静息 T 淋巴细胞上表达很弱,受抗原刺激后,HLA-DR 被激活,产生细胞免疫,进而消灭细胞内感染的病原体^[13],这也与毛学锋等^[14]发现慢性 HBV 感染者外周血 PBMC 中 HLA-DR mRNA 表达水平比健康对照组高的结论一致。

同时本研究对慢性 HBV 感染者的不同感染阶段、HBV-DNA 水平、和 HBeAg 血清学状态进行了分层分析,发现了 HBeAg 阴性的慢性 HBV 感染者 HLA-DR mRNA 表达水平高于 HBeAg 阳性,与相关研究结果一致^[15],进一步证明 HLA-DR mRNA 水平与 HBeAg 血清学状态关系重大。HBV 入侵时对机体免疫系统产生重大影响,章松平等^[13]在慢性 HBV 感染者的研究中,发现病毒水平较高时,HLA-DR mRNA 表达水平较低,与本研究相符。

TAN 等^[3]通过全基因关联研究已明确 HLA-DR 是 HBV 相关 ACLF 易感性的主要位点。金茜等^[16]研究发现,在重度乙型肝炎患者外周血中,HLA-DR mRNA 表达水平高于中度和轻度乙型肝炎患者。本研究中,虽然 HLA-DR mRNA 表达水平在慢性感染者重度与中度中比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),但整体仍然是重度感染者高于其他感染者,提示 HLA-DR mRNA 表达水平与肝细胞的损伤程度有关。

综上所述,本研究表明 PBMC 中 HLA-DR mRNA 表达水平能反映 HBV 感染和疫苗免疫状态,以及肝细胞的损伤程度,这可为 HLA-DR 评价 HBV 感染转归提供参考依据,对深入认识不同 HBV 感染临床转归机制和指导科学研究有重要意义,为 HLA-DR mRNA 表达水平在 HBV 感染患者的预后评价提供依据。

参考文献

[1] TRÉPO C, CHAN H L, LOK A. Hepatitis B virus infection[J]. *Lancet*, 2018, 4(9959):18036.

[2] LI W, ZOU Z Q, KAI W. Clinical relevance of HLA gene variants in HBV infection[J]. *J Immunol Res*, 2016, 191(1):1-7.

[3] TAN W, XIA J, DAN Y, et al. Genome-wide association study identifies HLA-DR variants conferring risk of

HBV-related acute-on-chronic liver failure[J]. *Gut*, 2018, 67(4):757-766.

- [4] CORSE E, GOTTSCHALK R A, ALLISON J P. Gottschalk RA, allison JP. strength of TCR-peptide/MHC interactions and in vivo T cell responses[J]. *J Immunol*, 2011, 186(9):5039-5045.
- [5] XIA Y, SUN W, LI X, et al. Amino acids at positions 30 β 1 and 57 β 1 of HLA-DR confer susceptibility to or protection from chronic hepatitis B virus infection[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2016, 9(3):3816-3827.
- [6] DAS U. HLA-DR expression, cytokines and bioactive lipids in sepsis[J]. *Arch Med Sci*, 2014, 10(2):325-335.
- [7] DUNNE M R, MICHELSEN A J, O'SULLIVAN K E, et al. HLA-DR expression in tumor epithelium is an Independent prognostic indicator in esophageal adenocarcinoma patients[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2017, 66(7):841-850.
- [8] 中华医学会肝病学会, 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]. *临床肝胆病杂志*, 2011, 27(1):79-100.
- [9] DOGANAY L, FEJZULLAHU A, KATRINLI S, et al. Association of human leukocyte antigen DQB1 and DRB1 alleles with chronic hepatitis B[J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(25):8179-8186.
- [10] 李辉文. 慢性 HBV 感染患者 HLA-DR 等位特异性 CD4⁺T 细胞表位研究[D]. 重庆:第三军医大学, 2015.
- [11] WANG F S, XING L H, LIU M X, et al. Dysfunction of peripheral blood dendritic cells from patients with chronic hepatitis B virus infection[J]. *World J Gastroenterol*, 2001, 7(4):537-541.
- [12] 杨江华, 林敏, 孙静, 等. 单核巨噬细胞极化在慢性活动性乙型肝炎中的表达及意义[J]. *中国免疫学杂志*, 2016, 32(10):1503-1506.
- [13] 章松平, 张永乐, 朱明利, 等. 慢性乙型肝炎 T 淋巴细胞 HLADR 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.
- [14] 毛学锋, 彭丽珊, 刘显, 等. 慢性乙型肝炎病毒感染者外周血单个核细胞 Toll 样受体 9 水平与 CD38、HLA-DR、CD95 水平正相关[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2016, 32(5):660-665.
- [15] LIN C, ZOU H, WANG S. Hepatitis B e antigen seroconversion is related with the function of dendritic cells in chronic hepatitis B virus infection[Z]. *Gastroenterol Res Pract*, 2014:413952.
- [16] 金茜, 夏妍, 李兴库, 等. 不同乙型肝炎病毒感染者中人类白细胞抗原 DR 基因的表达水平[J]. *国际免疫学杂志*, 2017, 40(6):624-629.