

HBV DNA 含量与 T 淋巴细胞的相关性研究

郝彦强, 欧超伟[△], 雷耀珍, 钟 琼 (广东医学院附属医院检验科, 广东湛江 524001)

【摘要】 目的 观察乙型肝炎病毒(HBV)感染者 HBV DNA 的含量与 T 淋巴细胞亚群的相关性, 探讨 HBV 感染者细胞免疫功能的变化。**方法** 收集 60 例 HBV 感染者的血清, 用荧光定量 PCR 仪检测其 HBV DNA 的含量, 按 HBV DNA 的浓度分为 HBV DNA 阴性组(<500.00 copy/mL)、HBV DNA 低浓度组[($500\sim1$) $\times10^5$ copy/mL]和 HBV DNA 高浓度组($1\times10^5\sim1\times10^8$ copy/mL), 另外取 20 例健康人的血清作对照, 同时取上述 80 例的新鲜外周血, 用流式细胞仪检测他们的 T 淋巴细胞亚群 CD3⁺、CD3⁺/CD4⁺、CD3⁺/CD8⁺ 及 CD3⁺CD4⁺/CD3⁺、CD8⁺, 对其结果进行分析。**结果** HBV DNA 阴性组和低浓度组的 CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD8⁺ 和 CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺ 与健康对照组相比, 差异无统计学意义($P>0.05$), HBV DNA 高浓度组的 CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD8⁺ 和 CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺ 与健康对照组相比, 差异有统计学意义($P<0.05$), HBV DNA 低浓度组和高浓度组的 HBV DNA 含量与 CD3⁺CD4⁺ 和 CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺ 呈现负相关关系, 与 CD3⁺CD8⁺ 呈现正相关关系, 相关系数分别为 0.46、0.69 和 0.52。**结论** HBV DNA 对细胞免疫产生了影响, HBV DNA 含量与 T 淋巴细胞亚群的分布存在一定的相关性。

【关键词】 T 淋巴细胞亚群; HBV DNA; 流式细胞仪

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2011.08.005 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2011)08-0905-02

Study on the correlation between the content of HBV DNA and T-lymphocyte HAO Yan-qiang, OU Chao-wei, LEI Yao-zhen, ZHONG Qiong (Affiliated Hospital of Guangdong Medical College, Zhanjiang, Guangdong 524001, China)

【Abstract】 Objective To observe the correlation between the content of HBV DNA and T-lymphocyte in HBV infected patients and investigate the variation of cellular immune function in them. **Methods** We collected the serum of 60 HBV infected patients, and tested the content of HBV DNA with fluorescence quantitative PCR method. According to the concentration of HBV DNA, 60 patients were divided into three groups, namely HBV DNA negative group(<500.00 copy/mL), low concentration group[($500-1$) $\times10^5$ copy/mL] and high concentration group($1\times10^5\sim1\times10^8$ copy/mL). Then we tested the serum of 20 healthy people as control group, and collected fresh peripheral blood of the 80 samples and tested their T-lymphocyte subsets by flow cytometry, including CD3⁺, CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺ and CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺, and then analyzed the results. **Results** Compared with the control group, the percentage of CD3⁺, CD3⁺CD4⁺ and CD3⁺CD8⁺ and the ratio of CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺ was not significantly different to the HBV DNA-negative group and low viral concentration group ($P>0.05$), however, the percentage of CD3⁺, CD3⁺CD4⁺ and CD3⁺CD8⁺ and the ratio of CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺ was significantly different to the high viral concentration group ($P<0.05$). The concentration of HBV DNA in HBV DNA positive groups was negatively correlated with the percentage of CD3⁺CD4⁺ as well as the ratio of CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺, but positively correlated with the percentage of CD3⁺CD8⁺, with the correlation coefficients respectively 0.46, 0.69 and 0.52. **Conclusion** HBV DNA has influence on cellular immunity, and there is a correlation between the content of HBV DNA and the distribution of T-lymphocyte subsets.

【Key words】 T-lymphocyte subsets; HBV DNA; flow cytometry

HBV 为嗜肝病毒科的一个成员, 是一种亲肝的非细胞病变的 DNA 病毒, 可引起包括慢性无症状携带、慢性乙型肝炎、肝硬化和肝癌的一系列肝脏疾病。HBV DNA 含量是反映 HBV 感染和复制的最直接的指标, 通过干扰宿主细胞的正常代谢而限制机体抗病毒免疫^[1]。淋巴细胞主要分为三大亚群: CD3⁺T 细胞、CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞, T 淋巴细胞是细胞免疫的主要参与者, 对清除细胞内 HBV 起主要作用^[2]。人体感染 HBV 后, 导致人体内细胞免疫功能发生紊乱, T 淋巴细胞亚群失调, 因此对 HBV 的清除作用减弱, 成为 HBV DNA 在体内持续复制并不断变化的主要原因。全世界大约有 3 亿人已经成为慢性 HBV 携带者, 我国的 HBV 感染者约为 1.1

亿, 约有 3 000 万的乙型肝炎患者, 全国每年死于 HBV 感染相关肝病约 30 万例, 因此对 HBV 感染相关肝病的防治已经成为医疗卫生行业的当务之急, 本文通过探讨 HBV DNA 含量与 T 淋巴细胞的相关性, 为临床治疗 HBV 感染相关肝病提供参考。

1 材料与方法

1.1 研究对象 选择本院 2009 年 9 月至 2010 年 7 月 HBV 感染的住院患者 60 例, 诊断均符合 2000 年 9 月西安会议修订的《病毒性肝炎防治方案》的诊断标准, 其中男 34 例, 女 26 例, 年龄 16~76 岁, 平均 47.4 岁; 其中急性乙型肝炎 5 例, 慢性乙型肝炎 26 例, 乙型肝炎肝硬化 19 例, 原发性肝癌 10 例, 肝癌的诊

[△] 通讯作者, E-mail: ouchaowei@163.com.

断符合中国抗癌协会专业委员会 2004 年 9 月在广州修订《原发性肝癌的临床诊断与分期标准》^[3]。根据 HBV DNA 的浓度不同分为 HBV DNA 阴性组(<500.00 copy/mL)、HBV DNA 低浓度组(500~1×10⁵ copy/mL)和 HBV DNA 高浓度组(1×10⁵~1×10⁸ copy/mL),健康对照组 20 例,其中男 13 例,女 7 例,年龄 21~58 岁,平均 35.6 岁,均来自本院体检合格的健康人。

1.2 仪器和试剂 贝克曼公司 Epics XL 型流式细胞仪,试剂为贝克曼公司提供的原装 CYTO-STAT tetraCHROME CD³-PC5/CD⁸-ECD/CD¹⁵-FIDC/CD⁴-RD1 4 色荧光单克隆抗体试剂,批号为 7536029,含有 FACS 溶血素,PCR 扩增仪为 Roche 公司生产的 LightCycler 实时荧光定量 PCR 扩增仪,试剂由上海科华生物工程股份有限公司提供。

1.3 方法 所有病例及健康对照者均清晨空腹静脉采血,其中 2 mL 用 EDTA-K₂ 抗凝,用流式细胞仪测量 CD³⁺、CD³⁺CD⁴⁺、CD³⁺CD⁸⁺ T 淋巴细胞的百分含量并计算 CD³⁺CD⁴⁺/CD³⁺CD⁸⁺ 的比值,另取 3 mL 离心取血清,用 PCR 扩

增测量 HBV DNA 的含量,严格按照试剂盒说明书操作。
1.4 统计学方法 所有数据均采用 SPSS17.0 统计软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 随着 HBV DNA 含量的增高,CD³⁺CD⁴⁺ T 淋巴细胞的百分含量和 CD³⁺CD⁴⁺/CD³⁺CD⁸⁺ 的比值逐渐降低,CD³⁺CD⁸⁺ T 淋巴细胞的百分含量逐渐增高。HBV DNA 阴性组和低浓度组的 CD³⁺CD⁴⁺、CD³⁺CD⁸⁺ 和 CD³⁺CD⁴⁺/CD³⁺CD⁸⁺ 与对照组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$),而 HBV DNA 高浓度组的 CD³⁺CD⁴⁺、CD³⁺CD⁸⁺ 和 CD³⁺CD⁴⁺/CD³⁺CD⁸⁺ 与对照组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$),结果见表 1。
2.2 HBV DNA 低浓度组和高浓度组的 HBV DNA 含量与 CD³⁺CD⁴⁺ 和 CD³⁺CD⁴⁺/CD³⁺CD⁸⁺ 存在负相关关系,相关系数(r)分别为 0.46 和 0.69,HBV DNA 含量与 CD³⁺CD⁸⁺ 存在正相关关系($r = 0.52$)。

表 1 HBV DNA 不同浓度组的 T 淋巴细胞亚群分布情况[$\bar{x} \pm s$]

组别	<i>n</i>	CD3 ⁺	CD3 ⁺ CD4 ⁺	CD3 ⁺ CD8 ⁺	CD3 ⁺ CD4 ⁺ /CD3 ⁺ CD8 ⁺
健康对照组	20	68.30±6.13	39.33±7.28	23.65±6.04	1.80±0.62
DNA 阴性组	19	68.85±7.68	39.93±8.52	23.20±6.46	1.85±0.66
DNA 低浓度组	25	70.65±10.53	37.50±8.58	26.25±8.80	1.67±0.84
DNA 高浓度组	16	69.90±9.12	32.85±7.54*	31.25±7.23*	1.11±0.52*

注:与对照组相比,* $P < 0.05$ 。

3 讨 论

根据人外周血 T 淋巴细胞表面分子受体的表达不同,主要分为三大亚群:CD³⁺ T 细胞、CD⁴⁺ T 细胞和 CD⁸⁺ T 细胞。CD⁴⁺ T 细胞主要为辅助性 T 细胞(CD³⁺CD⁴⁺ T 细胞),可产生特异性抗体,而 CD⁸⁺ T 细胞主要为抑制性 T 细胞(CD³⁺CD⁸⁺ T 细胞),正常情况下,两者保持一定的比例,维持机体的细胞免疫功能^[4]。而 CD³⁺CD⁴⁺ T 细胞在 HBV 免疫中处于核心地位^[5]。本研究发现,HBV DNA 含量与 CD³⁺CD⁴⁺ 和 CD³⁺CD⁴⁺/CD³⁺CD⁸⁺ 存在负相关关系,与 CD³⁺CD⁸⁺ 存在正相关关系,说明随着 HBV DNA 含量的增加,CD³⁺CD⁴⁺ T 淋巴细胞逐渐减少,CD³⁺CD⁸⁺ T 淋巴细胞逐渐增多,可能是由于 HBV DNA 的不断复制使得细胞免疫功能发生紊乱,HBV DNA 对 CD³⁺CD⁴⁺ 和 CD³⁺CD⁸⁺ T 淋巴细胞都产生了影响,大量 HBV DNA 使得 CD³⁺CD⁴⁺ T 细胞减少,不能产生有效的免疫应答,CD³⁺CD⁴⁺ 细胞清除 HBV 的能力减弱,HBV DNA 便大量复制,如此恶性循环成为 HBV DNA 持续大量复制的主要原因,当然此过程也依赖于其他细胞的参与,有研究显示,HBV 严重感染组的调节性 T 细胞明显高于一般感染组^[6]。另外本研究可以看到,HBV DNA 与 CD³⁺CD⁴⁺/CD³⁺CD⁸⁺ 的相关系数为 0.69,高于 HBV DNA 与 CD³⁺CD⁴⁺ 和 CD³⁺CD⁸⁺ T 的相关系数,提示 CD³⁺CD⁴⁺/CD³⁺CD⁸⁺ 的比值可能能够更敏感地反映机体免疫功能的变化。研究发现,CD³⁺CD⁴⁺ T 细胞通过分泌细胞因子帮助 CD³⁺CD⁸⁺ T 细胞^[7],所以在 CD³⁺CD⁴⁺ 减少以后,CD³⁺CD⁸⁺ 发生了反应性的增高,双向性的变化导致比值的变化比单方面变化更明显,在 CD³⁺CD⁴⁺ 和 CD³⁺CD⁸⁺ 出现明显的变化之前,CD³⁺CD⁴⁺/CD³⁺CD⁸⁺ 的比值已经能够提

供免疫功能紊乱的线索。因此,监测 CD³⁺CD⁴⁺/CD³⁺CD⁸⁺ 比值的变化对乙肝相关疾病的早期诊断和治疗具有重要意义。
本研究还发现,HBV DNA 高浓度组的 CD³⁺CD⁴⁺、CD³⁺CD⁸⁺ 和 CD³⁺CD⁴⁺/CD³⁺CD⁸⁺ 与健康对照组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$),而 HBV DNA 阴性组和低浓度组与对照组相比,并没有此明显差异,而总体上又显示出相关性,可能是由于在 HBV DNA 数量较少时,其对细胞免疫功能影响较小,T 淋巴细胞亚群分布没有发生太大的变化,结果不足以显示出来,而 HBV DNA 大量复制时,其已严重影响了细胞免疫,使 CD³⁺CD⁴⁺ 减少,CD³⁺CD⁸⁺ 增高,提示在高 HBV DNA 含量时,一定要进行抗病毒治疗,这样免疫调节才会有效。另外一种可能就是对照病例的入选标准没有达到精确化,数目太少,不足以代表相应人群的整体水平,具体原因,有待进一步考究。
本实验研究为 HBV 感染相关肝病的预防和病情监控提供一条新的线索,通过对 HBV DNA 和 T 淋巴细胞亚群的双重检测,可更好地评价 HBV 的复制和机体免疫功能的状况,为医生及时对症处理提供参考。另外,鉴于患者免疫功能的改变,可在治疗方法上考虑调节细胞的免疫功能,重建患者的免疫应答,从免疫调节的角度治疗 HBV 感染相关肝病,而对 HBV DNA 含量不同的患者,治疗策略上也应区别对待。
参考文献
[1] 郭海波,吴晓蔓,郭锐. 荧光定量 PCR 检测慢性乙肝患者外周血单个核细胞乙肝病毒 DNA[J]. 中国医师杂志, 2004,6(7):925-926. (下转第 908 页)

2.2 组间比较 HbA1c<6.2%组与 HbA1c>6.2%组 APTT 缩短差异有统计学意义。同时,低于参考值下限的 APTT 值出现在糖尿病组的比例为 32%。PT、FIB、TT 在两组之间比较差异无统计学意义。说明 APTT 缩短与 HbA1c 呈正相关。

表 1 不同 HbA1c 受试者一般资料比较			
项目	Hb1AC<6.2% (n=121)	Hb1AC>6.2% (n=79)	对照组(n=50)
年龄	54(40~72)	61(43~76)	57(50~60)
女性%	32(48%)	73(58%)	19(50%)
PT(s)	12.7 (10.9~13.7)	13.9(12.3~15.6)	13.2(11.9~13.8)
PT<9 s	3(<1%)	4(5%)	—
APTT(s)	32.3(28.3~42.6)	27.6(24.3~39.5)	36.4(30.2~39.4)
APTT<26 s	7(8%)	15(21%)	—
Fib(g/L)	4.7 (2.5~6.4)	6.7(4.4~10.5)	3.8(3~5)
Fib>4.0 g/L	64(52%)	42(53%)	—
TT(s)	16.8 (42%)	17.6(54%)	15

注:—表示无数据。

3 讨 论

糖尿病患者有高凝倾向,本试验结果表明,糖尿病患者 APTT 缩短,血液处于高凝状态,有血管并发症的患者表现得更加明显,与文献报道基本一致^[2]。目前 APTT 缩短被认为是高凝状态的标志^[3-4]。其原因可能是持续高血糖状态,使内源性凝血途径中的凝血因子Ⅶ、Ⅷ、Ⅺ、Ⅻ及血管性血友病因子(VWF)凝血因子活化,并激活蛋白激酶 C,刺激血小板分泌 VWF 因子,诱导体内多种蛋白,使内皮细胞表面发生糖基化,刺激巨噬细胞分泌肿瘤坏死因子和白介素-1,后两者诱导内皮细胞产生组织因子样前凝血素、抑制抗凝血蛋白 C 旁路活性,促进合成血浆素原激活物的抑制剂,最终产生凝血酶、激活因子 Xa。其中主要通过 3 方面机制使凝血功能异常:(1)非酶促糖基化、氧化应激增加的发生及硫化肝素水平的减少^[5]。(2)糖尿病患者还存在胰岛素抵抗^[6],其继发的高胰岛素血症可使纤溶酶原激活抑制物-1(PAI-1)增高,高血糖、胰岛素及胰岛素原均可使内皮细胞 PAI-1 的 mRNA 表达增加,PAI-1 分泌增多,促进高凝状态发生。糖尿病胰岛素抵抗和内源途径高活性状态的机制可能与内皮功能失调及感染有关^[7]。(3)APTT 缩短还与凝血酶的产生增多、反映凝血活性及纤溶系统的分子标志物--凝血酶原片段(F1+2)的增多有关。当血管内皮损伤时,

其血管内皮通透性增加,脂质在血管壁沉着增多,血小板在局部黏附聚集,同时可使凝血活性增加,纤溶系统受损,还可促进花生四烯酸代谢,使血栓素(TXA2)生成增加,导致血小板聚集。Madi 等人发现具有胸痛症状伴 APTT 缩短的患者,急性心肌梗死发病概率增加。APTT 缩短的患者静脉血栓栓塞(VTE)风险增加,因此,APTT 缩短着重提示糖代谢受损,且存在血小板聚集。

综上所述,HbA1c 与 APTT 缩短呈正相关,APTT 检测能较好地反映糖尿病患者,易凝、易聚、易栓的病情,而且 APTT 的检测具有方便快捷经济的特点。因此 APTT 是 2 型糖尿病凝血功能评价的较好指标。

参考文献

[1] Cleeman JI. Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education program (NCER) expert panel on detection,evaluation,and treatment of high blood Cholesterol in adults (Adult treatment Panel Ⅲ) [J]. JA-MA ,2001,285(3):2486-2497.

[2] American Diabetes association. Stadards of medical care in diabetes[J]. Diabetes Care,2004,27(Supp 1):S15-35.

[3] Tripodi A,Chantarangkul V,Martinelli I,et al. A short-ened activated partial thromboplastin time isassociated with therisk of venous thromboe mbolism [J]. Blood, 2004,104(12):3631-3634.

[4] Hron G,Eichinger S,Weltermann A,et al. Prediction of recurrent venous thromboembolism by the activated partial thromboplastin time[J]. J Thromb Haemost,2006,4 (4):752-756.

[5] Lippi G,Franchini M,Targher G,et al. Favaloro. Epide-miological association between fasting plasma glucose and shortened APTT[J]. Clin Biochemistry,2009,42(1-2): 118-120.

[6] 黄国良,李健榕. 2 型糖尿病伴高凝血症的对策与评价 [J]. 中国实用内科杂志,2004,24(3):1381.

[7] Grant PJ. Diabetes mellitus as a prothrombotic condition [J]. J Intern Med,2007,262(2):157-172.

(收稿日期:2010-12-20)

(上接第 906 页)

[2] 郭祥惠. 慢性肝炎的发病机制和治疗[J]. 现代实用医学, 2001,13(1):51.

[3] 中国抗癌协会肝癌专业委员会. 原发性肝癌的临床诊断与分期标准[J]. 中华肝脏病杂志,2004,12(9):378-388.

[4] 刘明,陆颖,项明清,等. 慢性乙型肝炎病毒感染者外周血 T 细胞亚群变化与其血清 HBVDNA 的水平分析[J]. 中国实验诊断学,2008,12(2):232-235.

[5] 何登明. 慢性 HBV 感染者辅助性 T 细胞功能分析及拉米夫定治疗对其影响[D]. 重庆:第三军医大学,2003.

[6] Miyaaki H,Zhou H,Ichikawa T,et al. Study of liver-tar-geted regulatory T cells in hepatitis B and C virus in chro-nically infected patient[J]. Liver Int,2009,29(5):702-707.

[7] Aslan N,Yurdaydin C,Wiegand J,et al. Cytotoxic CD4 T cells in viral hepatitis[J]. J Viral Hepat,2006,13(8):505-514.

(收稿日期:2010-12-19)