

# 慢性 HBV 感染患者特异性细胞免疫功能与病毒载量的关系研究\*

韩海霞, 吴玉兰, 陈琳, 吴月平, 邵建国<sup>△</sup> (江苏省南通市第三人民医院 226006)

**【摘要】** 目的 探讨慢性乙型肝炎病毒(HBV)感染患者特异性细胞免疫功能与病毒载量的关系。方法 选择 51 例慢性乙型肝炎患者(A组)、43 例乙型肝炎肝硬化患者(B组)和 40 例体检健康者(C组)外,采用流式细胞术检测人类白细胞抗原 A2(HLA-A2),采用 HLA-A2 限制的 HBVcore18-27 抗原表位肽五聚体(Pro5MHC)法检测 Pro5MHC/CD8 双阳性细胞[HBV 特异性细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)],并比较不同 HBV DNA 水平患者各指标检测结果。结果 A 组、B 组 HLA-A2 阳性率均明显高于 C 组( $P < 0.05$ )。随着 HBV DNA 水平的升高,HBV 特异性 CTL 水平逐渐减低( $P < 0.05$ ),但 CD8<sup>+</sup> 细胞水平无明显变化( $P > 0.05$ )。HBV DNA 水平大于  $10^5$  copies/mL 的患者,Pro5MHC/CD8<sup>+</sup> 水平明显低于 HBV DNA 水平为  $10^3 \sim 10^5$  copies/mL 的患者以及 HBV DNA 水平小于  $10^3$  copies/mL 的患者( $P < 0.05$ )。结论 HLA-A2 是乙型肝炎肝硬化的易感基因之一。HBV 感染患者体内 HBV 特异性 CTL 水平随着病毒复制程度的升高而减低。Pro5MHC/CD8<sup>+</sup> 可作为判断病毒复制程度的客观指标。

**【关键词】** 特异性细胞免疫; 人类白细胞抗原 A2; 慢性乙型肝炎; 肝硬化

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2014.18.032 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2014)18-2571-02

乙型肝炎由乙型肝炎病毒(HBV)感染所致。目前全球约有 3 亿 HBV 感染患者,中国则为 HBV 感染高流行地区<sup>[1-2]</sup>。HBV 特异性细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)介导的细胞免疫应答在病毒清除和肝细胞损伤过程中具有重要作用。因此,研究特异性 CTL 数量和功能的变化,有利于了解乙型肝炎患者体内特异性细胞免疫功能状态,阐明慢性乙型肝炎患者病情加重的免疫学机制,还能为抗病毒治疗提供用药依据<sup>[3]</sup>。本研究采用人类白细胞抗原 A2(HLA-A2)限制的 HBVcore18-27 抗原表位肽五聚体(Pro5MHC)法,分析了慢性 HBV 感染患者特异性细胞免疫功能与病毒载量之间的关系。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 将 2011 年 9 月至 2012 年 12 月本院感染性疾病科收治的乙型肝炎患者 94 例纳入患者组,其中男 67 例,女 27 例;年龄 34~62 岁,平均 47.5 岁;包括慢性乙型肝炎 51 例(A组)、乙型肝炎肝硬化 43 例(B组)。所有患者均符合《慢性乙型肝炎防治指南(2010 年版)》制订的相关诊断标准<sup>[4]</sup>。排除标准:合并其他类型肝炎病毒感染、酒精性肝炎、免疫性疾病,3 个月内未接受过免疫调节剂及抗病毒治疗。另选择于本院体检健康者 40 例纳入健康对照组(C组),其中男 24 例,女 16 例;年龄 32~55 岁,平均 39.5 岁;均排除肝脏及免疫性疾病。

### 1.2 方法

**1.2.1 标本采集** 采集所有受试者晨起空腹肘静脉血至少 4 mL,2 mL 置于普通试管中,分离血清标本用于 HBV DNA 检测;2 mL 置于乙二胺四乙酸二钾抗凝管中,用于流式细胞术检测。

**1.2.2 HLA-A2 基因等位型检测** 取全血 100  $\mu$ L,加入异硫氰酸荧光素(FITC)标记的鼠抗人 HLA-A2 单克隆抗体(美国 BD 公司)10  $\mu$ L,室温条件下避光孵育 30 min,溶血处理后采用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 2 次;加入 500  $\mu$ L PBS,采用 XL 流

式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司)计数 HLA-A2 阳性细胞。

**1.2.3 HBV 抗原特异性 CTL 检测** Pro5MHC 检测试剂盒购自英国 Proimmune 公司,单克隆抗体针对的 HBV 抗原表位肽为 HBVcore18-27,序列为 FLPSDFFPSV。FITC 标记的 CD8 单克隆抗体购自美国 BD 公司。取全血 100  $\mu$ L,加入 CD8 单克隆抗体和五聚体单克隆抗体各 10  $\mu$ L,室温条件下避光孵育 30 min,溶血处理后采用 PBS 洗涤 2 次;加入 500  $\mu$ L PBS,采用流式细胞仪进行 CD8 和 Pro5MHC 检测,CD8 和 Pro5MHC 双阳性细胞为 HBV 特异性 CTL,计算 HBV 特异性 CTL 在 CD8<sup>+</sup> 细胞中所占百分比(Pro5MHC/CD8<sup>+</sup>)。

**1.2.4 HBV DNA 检测** 采用 7500 型荧光定量聚合酶链反应(PCR)检测仪(美国 ABI 公司)检测血清 HBV DNA 水平,检测下限为 1 000 copies/mL。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS15.0 软件进行数据处理及统计学分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用 *t* 检验。计数资料采用百分率表示,组间比较采用卡方检验。 $P < 0.05$  为比较差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 各研究组 HLA-A2 阳性率比较** A、B、C 组 HLA-A2 阳性率分别为 50.98%(26/51)、72.09%(31/43)、30.00%(12/40)。B 组 HLA-A2 阳性率明显高于 A、C 组( $P < 0.05$ ),A 组 HLA-A2 阳性率明显高于 C 组( $P < 0.05$ )。

**2.2 不同 HBV DNA 水平 HBV 感染患者 CTL 水平比较** 在 94 例乙型肝炎患者中,共检出 HLA-A2 阳性患者 57 例,按 HBV DNA 水平将其分为小于  $10^3$  copies/mL 组、 $10^3 \sim 10^5$  copies/mL 组、大于  $10^5$  copies/mL 组,比较各组间 HBV 特异性 CTL 水平的差异,结果显示,随着 HBV DNA 水平升高,HBV 特异性 CTL 水平逐渐减低,各组间比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ );各组间 CD8<sup>+</sup> 细胞水平比较差异无统计学意义( $P >$

\* 基金项目:江苏省中医药管理局科研项目(LB11028)。

<sup>△</sup> 通讯作者,E-mail: xiaobei227@sina.com。

0.05); HBV DNA 水平大于  $10^5$  copies/mL 组 Pro5MHC/CD8<sup>+</sup> 水平明显低于其他两组 ( $P < 0.05$ ),  $10^3 \sim 10^5$  copies/mL 组与小于  $10^3$  copies/mL 组 Pro5MHC/CD8<sup>+</sup> 水平比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见表 1。

表 1 不同 HBV DNA 水平 HBV 感染患者 CTL 水平比较

HBV DNA (copies/mL)	n	HBV 特异性 CTL	CD8 <sup>+</sup>	Pro5MHC/ CD8 <sup>+</sup>
<10 <sup>3</sup>	19	0.95±0.32	23.55±9.02	3.92±1.75
10 <sup>3</sup> ~10 <sup>5</sup>	21	0.73±0.24*	23.12±9.14	3.08±1.61 <sup>△</sup>
>10 <sup>5</sup>	17	0.42±0.23 <sup>#</sup>	22.34±8.65	1.97±1.13

注:与小于  $10^3$  copies/mL 组比较, \*  $P < 0.05$ ;与  $10^3 \sim 10^5$  copies/mL 组比较, <sup>#</sup>  $P < 0.05$ ;与大于  $10^5$  copies/mL 组比较, <sup>△</sup>  $P < 0.05$ 。

### 3 讨 论

机体免疫功能低下是 HBV 感染及大量复制的主要因素之一。有研究显示,在 HBV DNA 水平较高时进行抗病毒治疗,才可有效实现免疫调节<sup>[5]</sup>。HBV 感染患者体内 HBV 特异性 CTL 在清除病毒方面发挥着重要作用。有研究显示,急性 HBV 感染患者可针对不同 HBV 抗原产生高表达的特异性 CTL,而慢性 HBV 感染患者特异性 CTL 表达水平较低<sup>[6]</sup>。

采用 HLA-A2 限制的 HBV core18-27 抗原表位肽五聚体法检测 HBV 特异性 CTL,能真实、准确地反映 CTL 的实际水平<sup>[7]</sup>。与特异性 CTL 应答密切相关的主要是 HLA-A2。本研究结果显示,乙型肝炎肝硬化患者 HLA-A2 阳性率明显升高,说明 HLA-A2 阳性的慢性乙型肝炎患者更易进展至肝硬化。在 HBV DNA 水平较低的患者体内,HLA-A2 限制的 Pro5MHC 阳性 HBV 特异性 CTL 表达水平明显升高,说明 HBV 特异性 CTL 在 HBV 感染患者体内能够直接参与病毒的清除。这与本院研究者之前的研究报道相符,即 CTL 应答水平随炎症反应程度的增高而增强,炎症反应程度越高,细胞毒性反应越明显,更有利于病毒的清除<sup>[8]</sup>。

本研究对不同 HBV DNA 水平的 HBV 感染患者 CTL 水平进行了比较,结果显示,随着 HBV DNA 水平的升高,HBV 特异性 CTL 水平明显降低 ( $P < 0.05$ ),但 CD8<sup>+</sup> 细胞水平无明显变化 ( $P > 0.05$ );HBV DNA 水平大于  $10^5$  copies/mL 的患者,Pro5MHC/CD8<sup>+</sup> 明显低于 HBV DNA 为  $10^3 \sim 10^5$  copies/mL 的患者以及 HBV DNA 小于  $10^3$  copies/mL 的患者 ( $P < 0.05$ ),但 HBV DNA 为  $10^3 \sim 10^5$  copies/mL 的患者与 HBV DNA 小于  $10^3$  copies/mL 的患者之间,Pro5MHC/CD8<sup>+</sup> 比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。由此可见,HBV 感染患者体内 HBV 特异性 CTL 水平随着病毒复制活跃程度的增加而

减,Pro5MHC/CD8<sup>+</sup> 则可作为判断病毒复制活跃程度的客观指标。HBV DNA 水平越低的患者,其体内 HBV 特异性 CTL 水平越高,可能是由于 CTL 通过分泌干扰素-1(INF-1)产生抗病毒作用,从而减轻肝细胞的损伤程度。此外,有流行病学调查研究显示,HBV DNA 水平异常升高的患者,进展至肝硬化、肝癌的风险明显增加<sup>[9]</sup>。

综上所述,对慢性 HBV 感染患者进行特异性 CTL 检测,具有一定的临床应用价值,值得推广。本研究为慢性 HBV 感染患者的免疫治疗提供了依据,也为深入研究 HBV 感染导致肝细胞损伤的免疫学机制提供了新的思路。

### 参考文献

- [1] Dienstag JL. Hepatitis B virus infection[J]. N Engl J Med, 2008, 359(14): 1486-1500.
- [2] Peters M, Vierling J, Gershwin ME, et al. Immunology and the liver[J]. Hepatology, 1991, 13(5): 977-994.
- [3] Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection natural history and clinical consequences[J]. N Engl J Med, 2004, 350(11): 1118-1129.
- [4] 李海,贾继东. 2010 版慢性乙型肝炎防治指南解读--慢性乙型肝炎治疗目标和适应证[J]. 临床肝胆病杂志, 2011, 27(8): 791-793.
- [5] 郝彦强,欧超伟,雷耀珍,等. HBV DNA 含量与 T 淋巴细胞的相关性研究[J]. 检验医学与临床, 2011, 8(8): 905-908.
- [6] 裴豪,杨小娟,钱金娟,等. 流式细胞术细胞因子分析法检测乙型肝炎患者特异性细胞免疫功能的初步研究[J]. 检验医学, 2008, 23(2): 179-182.
- [7] 范振平,施明,徐东平,等. 乙型肝炎患者外周血病毒特异性 CD8 阳性细胞毒性 T 淋巴细胞的数量和功能分析[J]. 肝脏, 2012, 17(1): 11-16.
- [8] 吴玉兰,黄书明,陈琳,等. 慢性乙型肝炎患者 CD28 的表达及细胞毒性、免疫抑制性 T 细胞的研究[J]. 检验医学与临床, 2012, 9(19): 2444-2447.
- [9] You J, Zhuang I, Zhang YF, et al. Peripheral T-lymphocyte subpopulations in different clinical stages of chronic HBV infection correlate with HBV load[J]. World J Gastroenterol, 2009, 15(27): 3382-3393.

(收稿日期:2014-02-12 修回日期:2014-05-21)

(上接第 2570 页)

S, et al. Fluid-attenuated inversion recovery hyperintensity in acute ischemic stroke may not predict hemorrhagic transformation[J]. Cerebrovasc Dis, 2011, 32(4): 401-405.

- [10] 黄小钦,贾建平,马青峰,等. NIHSS 评分结合 CT 血管成像对超早期急性缺血性脑卒中临床预后的预测价值[J]. 中国康复理论与实践, 2010, 16(2): 109-112.

- [11] Knoflach M, Matosevic B, Rucker M, et al. Functional re-

covery after ischemic stroke-A matter of age Data from the Austrian Stroke Unit Registry[J]. Neurology, 2012, 78(4): 279-285.

- [12] 叶虹,罗群英. 阿司匹林对脑梗死患者神经功能康复及缺血性卒中再发的影响[J]. 临床合理用药杂志, 2010, 3(4): 6-7.

(收稿日期:2014-01-22 修回日期:2014-04-26)