

慢性乙型肝炎患者 HBV DNA 含量与 T 淋巴细胞亚群变化的分析

姚 玮¹, 王贵峰² (1. 安徽省中医药大学第一附属医院实验中心, 合肥 230031; 2. 安徽省第二人民医院黄山路院区核医学科, 合肥 230022)

【摘要】 目的 研究慢性乙型肝炎患者血清 HBV DNA 含量与外周血 T 淋巴细胞亚群变化的关系, 探讨慢性乙型肝炎患者体内病毒含量与细胞免疫功能的的关系。**方法** 采用流式细胞术检测 63 例慢性乙型肝炎患者和 30 例体检健康者的外周血 T 淋巴细胞亚群; 应用荧光定量聚合酶链反应检测慢性乙型肝炎患者血清 HBV DNA 的含量。**结果** 慢性乙型肝炎患者 HBV DNA 阴性组、HBV DNA 阳性组与健康对照组比较, CD4⁺ 和 CD4⁺/CD8⁺ 与健康对照组比较逐渐降低 ($P < 0.01$)。HBV DNA 阳性组与 HBV DNA 阴性组比较, CD4⁺/CD8⁺ 减少 ($P < 0.05$)。HBV DNA 低拷贝组、HBV DNA 高拷贝组与健康对照组比较, CD4⁺ 和 CD4⁺/CD8⁺ 明显降低 ($P < 0.01$)。HBV DNA 高拷贝组 CD8⁺ 高于健康对照组 ($P < 0.05$)。HBV DNA 高拷贝组的 CD4⁺ 低于 HBV DNA 低拷贝组 ($P < 0.05$), CD4⁺/CD8⁺ 比值明显降低 ($P < 0.01$)。**结论** 慢性乙型肝炎患者因乙型肝炎病毒感染可导致体内 T 淋巴细胞亚群的变化, HBV DNA 高拷贝可加重患者细胞免疫功能的紊乱, 使患者的免疫功能持续下降。

【关键词】 慢性乙型肝炎; HBV DNA; T 淋巴细胞亚群; 流式细胞术

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2014.21.042 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2014)21-3043-02

乙型肝炎病毒 (HBV) 感染人体后, 如病毒在患者体内长期持续复制且不能被清除, 则导致疾病慢性化。慢性乙型肝炎是免疫介导的疾病, 患者机体细胞免疫功能紊乱, 因 T 淋巴细胞亚群失衡使机体不能有效地清除入侵的 HBV 而导致疾病的慢性化^[1]。本文通过检测慢性乙型肝炎患者血清 HBV DNA 含量及其外周血 T 淋巴细胞亚群, 分析 HBV 感染后患者血清 HBV DNA 含量与细胞免疫功能的变化的。

1 资料与方法

1.1 一般资料 63 例慢性乙型肝炎患者均为本院 2013 年 6~10 月住院患者, 其中男 39 例, 女 24 例, 年龄 16~56 岁。其诊断均符合 2010 年中华医学会肝病学会与中华医学会感染病学分会联合制定的《慢性乙型肝炎防治指南》中的诊断标准^[2]。根据 HBV 感染的 HBV DNA 的含量不同, 将其分为 HBV DNA 阴性组 (HBV DNA $< 10^3$ copies/mL) 和 HBV DNA 阳性组 (HBV DNA $> 10^3$ copies/mL)。HBV DNA 阳性组中 HBV DNA 含量在 $10^3 \sim 10^5$ copies/mL 的为 HBV DNA 低拷贝组, HBV DNA 含量在 $10^6 \sim 10^8$ copies/mL 的为 HBV DNA 高拷贝组。另设健康对照组 30 例, 其中男 17 例, 女 13 例, 年龄 18~53 岁, 均为本院健康管理中心同期体检合格者, 均无肝炎、肿瘤及其他免疫性疾病史。

1.2 仪器与试剂 流式细胞仪为 Beckman-Coulter (美国贝克曼) 公司的 Epics-XL 型流式细胞仪, CD3-PC5、CD4-FITC、CD8-

PE 荧光标记单克隆抗体及红细胞裂解液购于 Beckman-Coulter 公司; 荧光定量聚合酶链反应 (FQ-PCR) 扩增仪为上海宏石医疗科技有限公司的 SLAN-96P Real-Time PCR System, HBV DNA 定量检测试剂盒购于上海复星长征医学科学有限公司。

1.3 方法

1.3.1 T 淋巴细胞亚群检测 采集慢性乙型肝炎患者和健康人空腹肝素抗凝血 2 mL, 采用流式细胞仪测量 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞的百分含量, 并计算 CD4⁺/CD8⁺。

1.3.2 HBV DNA 定量检测 采集慢性乙型肝炎患者空腹静脉血 2 mL, 分离出血清, 严格按照试剂盒说明书步骤操作, 采用 FQ-PCR 技术检测血清 HBV DNA 的含量。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组间差异采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 健康对照组、HBV DNA 阴性组与 HBV DNA 阳性组 T 淋巴细胞亚群比较 与健康对照组比较, HBV DNA 阴性组和 HBV DNA 阳性组的 CD3⁺ T 细胞百分率和 CD8⁺ T 细胞百分率均差异无统计学意义 ($P > 0.05$), CD4⁺ T 细胞百分率和 CD4⁺/CD8⁺ 明显减少 ($P < 0.01$)。HBV DNA 阳性组与 HBV DNA 阴性组相比较, CD4⁺/CD8⁺ 比值减少 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 健康对照组、HBV DNA 阴性组与 HBV DNA 阳性组 T 淋巴细胞亚群比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	CD3 ⁺ (%)	CD4 ⁺ (%)	CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
健康对照组	30	74.38 ± 8.66	36.04 ± 8.34	24.77 ± 5.99	1.47 ± 0.19
HBV DNA 阴性组	34	73.30 ± 8.98	29.18 ± 8.06 ^a	27.16 ± 9.88	1.23 ± 0.63 ^a
HBV DNA 阳性组	29	70.28 ± 11.71	25.77 ± 7.61 ^a	28.44 ± 7.82	0.94 ± 0.29 ^{ab}

注: 与健康对照组比较, ^a $P < 0.01$; 与 HBV DNA 阴性组比较, ^b $P < 0.05$ 。

2.2 健康对照组、HBV DNA 低拷贝组与 HBV DNA 高拷贝组 T 淋巴细胞亚群比较 与健康对照组比较, 随着 HBV 拷贝数的增加, HBV DNA 低拷贝组和高拷贝组的 CD4⁺ T 细胞百

分率及 CD4⁺/CD8⁺ 均明显减少 ($P < 0.01$)。HBV DNA 高拷贝组中 CD8⁺ T 细胞百分率则高于健康对照组 ($P < 0.05$), HBV DNA 低拷贝组中 CD8⁺ T 细胞百分率与健康对照组比

较,差异无统计学意义($P>0.05$)。HBV DNA 高拷贝组的 CD4⁺ 细胞百分率低于 HBV DNA 低拷贝组 ($P<0.05$),

CD4⁺/CD8⁺ 明显降低 ($P<0.01$)。见表 2。

表 2 健康对照组、HBV DNA 低拷贝组与 HBV DNA 高拷贝组 T 淋巴细胞亚群比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	CD3 ⁺ (%)	CD4 ⁺ (%)	CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
健康对照组	30	74.90±8.33	36.04±8.34	24.77±5.99	1.47±0.19
HBV DNA 低拷贝组	13	70.74±11.24	29.06±7.61 ^a	27.34±6.91	1.08±0.28 ^a
HBV DNA 高拷贝组	16	69.92±12.42	23.09±6.69 ^{ac}	29.34±8.60 ^b	0.83±0.26 ^{ad}

注:与健康对照组比较,^a $P<0.01$,^b $P<0.05$;与 HBV DNA 低拷贝组比较,^c $P<0.05$,^d $P<0.01$ 。

3 讨 论

慢性乙型肝炎是由于 HBV 感染持续存在而不能清除,机体长期处于免疫耐受状态,从而造成了肝组织的慢性损伤,其发病机制是免疫损伤而不是 HBV 对肝细胞的直接细胞毒作用^[3]。T 淋巴细胞在特异性免疫应答中起关键作用,是慢性乙型肝炎患者免疫状态的重要指标。CD4⁺ T 细胞即 T 辅助 (TH 细胞)和迟发型超敏反应性 T 细胞 (TD 细胞),能促进 B 细胞、细胞毒性 T 细胞和其他免疫细胞的增殖及分化,调节体液免疫和细胞免疫^[4]。CD8⁺ T 细胞主要包括细胞毒性 T 细胞 (TC 细胞)和抑制性 T 细胞 (TS 细胞)。TC 细胞是细胞免疫的主要效应细胞,对靶细胞具有杀伤活性,在接触病毒后,释放胞浆内颗粒,产生颗粒酶和穿孔素,破坏靶细胞,造成细胞溶解和细胞凋亡,这是 HBV 感染后引起肝细胞损伤的主要原因,也是机体清除细胞内病毒的主要机制^[5];TS 细胞通过分泌可溶性介质下调体液免疫和细胞免疫^[6],对免疫应答有重要的负调节功能。

在本研究中,慢性乙型肝炎患者 HBV DNA 阴性组和阳性组与健康对照组比较,CD4⁺ T 细胞百分率及 CD4⁺/CD8⁺ 降低。CD4⁺ T 细胞生成减少,可致特异性抗体生成不足,机体不能及时清除 HBV,造成病毒在体内持续存在。HBV DNA 阳性组与 HBV DNA 阴性组相比较,CD4⁺/CD8⁺ 减少。CD4⁺/CD8⁺ 是监测机体细胞免疫功能、反映机体免疫状态的重要指标,该比值失衡可以导致免疫系统紊乱和一系列免疫病理改变^[7]。CD4⁺/CD8⁺ 下降与 HBV DNA 复制水平显示出一定的相关性,提示 CD4⁺/CD8⁺ 可作为病毒复制水平的一个参考指标^[8]。

HBV DNA 含量是反映 HBV 感染和复制程度的重要指标。本研究中与健康对照组比较,随着 HBV 拷贝数的增加,CD4⁺ T 细胞百分率及 CD4⁺/CD8⁺ 显著减少,显示 HBV 的复制与细胞免疫有关。HBV DNA 高拷贝组中 CD8⁺ T 细胞百分率则高于健康对照组,CD8⁺ T 细胞的增加是由于 TS 细胞的增加,TS 细胞能够抑制免疫反应,使机体对 HBV 反应低下,TS 细胞的增殖加重了免疫抑制^[9]。TS 细胞还具有抑制机体 TH 细胞的功能,使 TH 细胞数量减少,造成 HBV 难以清除。慢性乙型肝炎患者肝活检组织中发现大量的 TC 细胞存在于肝小叶坏死区周围,说明 TC 细胞可能与肝细胞的免疫损害有关,CD8⁺ T 细胞增多是引起肝细胞免疫损害的基础。HBV DNA 高拷贝组与 HBV DNA 低拷贝组比较,CD4⁺ T 细胞百分率及 CD4⁺/CD8⁺ 下降,说明 HBV DNA 高拷贝患者的 T 淋巴细胞亚群变化更加明显,病毒高拷贝增加了细胞免疫功能的紊乱。流行病学调查表明,持续高 HBV DNA 水平,发生肝硬化和肝细胞癌的患者明显增加,这说明高 HBV DNA 水平患者抗病毒、抗肿瘤免疫能力低下^[10]。

免疫力低下、不完全免疫耐受、自身免疫反应产生、HBV 基因突变逃避免疫清除等情况下,可导致慢性肝炎或病毒持续感染状态^[11]。HBV DNA 的复制可以使慢性乙型肝炎患者的 T 淋巴细胞亚群发生改变,细胞免疫功能下降。随着 HBV 长期持续感染,HBV DNA 拷贝数的增加,通过多种机制来抑制清除病毒的免疫应答,从而加重了细胞免疫功能紊乱,可致患者免疫功能持续下降。因此,慢性乙型肝炎患者在接受抑制病毒复制治疗时结合免疫治疗来增强机体免疫功能,调节免疫,打破机体免疫耐受状态,可降低 HBV 的持续感染。

参考文献

- [1] 王慰,任桂芳,刘玉珍,等.慢性乙型肝炎患者外周血 T 淋巴细胞亚群的变化[J].实用肝脏病杂志,2012,15(4):346-347.
- [2] 中华医学会肝病学分会和感染病学分会.慢性乙型肝炎防治指南(2010 年版)[J].胃肠病学,2011,14(6):351-366.
- [3] 李春娜,夏瑾瑜,周耀勇,等.慢性乙型肝炎患者肝脏病理与年龄、血清 ALT、HBV DNA、HBeAg 关系的探讨[J/CD].中华临床医师杂志:电子版,2013,7(4):1513-1516.
- [4] 冯广贵.慢性乙型肝炎病毒感染者外周血 T 细胞亚群变化分析[J].检验医学与临床,2010,7(1):21-22.
- [5] 李鸿宾,江晓萍,叶珺,等.测定慢性乙型肝炎患者外周血 T 淋巴细胞亚群的临床意义[J].安徽医药,2006,10(8):588-589.
- [6] 朱苏兰,鲁陈,熊德琴,等.慢性乙型肝炎病毒感染者外周血 T 细胞亚群分析及与病毒载量相关性研究[J].赣南医学院学报,2012,32(3):360-362.
- [7] 唐星火,卢东红.乙型肝炎相关疾病 HBV-DNA 载量与细胞免疫功能的研究[J].广西医科大学学报,2007,24(4):544-545.
- [8] 何英,张允奇,吴润香,等.慢性乙型肝炎患者外周血 T 淋巴细胞亚群变化与病毒复制的关系[J].检验医学,2009,24(11):808-811.
- [9] 刘明,沈颀,陆颖,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 HBV DNA 的水平分析[J].中国实验诊断学,2008,12(2):232-235.
- [10] 韩宏艳,王鑫,孙静,等.乙型肝炎患者外周血 T 淋巴细胞亚群变化与病毒复制的关系[J].临床合理用药杂志,2011,4(26):73-74.
- [11] 白留江.乙型肝炎患者 T 淋巴细胞亚群检测的临床意义[J].肝脏,2011,16(1):87-88.