

HCV 早期感染者病毒载量与 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 调节性 T 淋巴细胞相关性研究^{*}

黄启强, 黄丽庆, 周 青, 肖 寒, 黄伙荣, 胡淑燕(遵义医学院第五附属(珠海)医院, 广东珠海 519100)

【摘要】 目的 研究丙型肝炎病毒(HCV)早期感染者(抗原阳性、抗体阴性)的 HCV 病毒载量与 CD4⁺CD25⁺叉头/翅膀状螺旋转录因子(Foxp3⁺)调节性 T 淋巴细胞水平的相关性,分析 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 调节性 T 淋巴细胞在 HCV 感染中的作用。**方法** 应用实时荧光定量聚合酶链反应(FQ RT-PCR)技术检测 22 例 HCV 核心抗原阳性、抗体阴性(即 HCV Ag 阳性、抗-HCV 阴性)的早期感染病例、26 例核心抗原阳性、抗体阳性(即 HCV Ag 阳性、抗-HCV 阳性)的慢性 HCV 感染病例、24 例核心抗原阴性、抗体阳性(即 HCV Ag 阴性、抗-HCV 阳性)的既往 HCV 感染病例及 22 例健康对照组 HCV RNA 病毒载量;并用流式细胞技术检测各组外周血有核细胞中的 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 调节性 T 淋巴细胞水平。**结果** HCV Ag 阳性、抗-HCV 阴性组, HCV Ag 阳性、抗-HCV 阳性组, HCV Ag 阴性、抗-HCV 阳性组及健康对照组 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 调节性 T 淋巴细胞逐级下降,其中抗原阳性、抗体阴性组[(4.86±2.14)%]高于其他组[分别为(3.74±1.67)%、(2.74±1.27)%、(2.56±1.18)%],差异有统计学意义(*t* 值分别为 2.023、4.125、4.402, *P* < 0.05); HCV Ag 阳性、抗-HCV 阴性组 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 调节性 T 淋巴细胞与 HCV RNA 病毒载量的对数(copy/mL, Ig)呈正相关(*r* = 0.535, *P* < 0.05)。**结论** HCV 早期感染者 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 调节性 T 淋巴细胞水平与高病毒调定点相关, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 调节性 T 淋巴细胞水平可能是加速 HCV 早期感染的影响因素之一。

【关键词】 HCV; 早期感染; 调节性 T 淋巴细胞; 病毒载量; 相关性

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2015.08.008 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)08-1045-03

The correlation study between viral load in the early HCV-infected patients and CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells^{*}
HUANG Qi-qiang, HUANG Li-qing, ZHOU Qing, XIAO Han, HUANG Huo-rong, HU Shu-yan (The Fifth Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zhuhai, Guangdong 519100, China)

【Abstract】 Objective To study the correlation between HCV viral load in the early HCV-infected patients (antigen-positive antibody-negative) and CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells, and to know the function of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T lymphocytes in the HCV infections. **Methods** We will use the real-time quantitative polymerase chain reaction (FQ RT-PCR) technique to detect HCV RNA viral load in 22 cases of early infected patients with HCV core positive antigen negative antibody (positive HCV Ag, negative HCV Ab), 26 cases of chronic HCV-infected patients with core positive antigen and positive antibody (positive HCV Ag, positive HCV Ab), 24 cases of following HCV-infected patients with core negative antigen positive antibody (negative HCV Ag, positive HCV Ab) and 22 cases healthy controls. We also will use flow cytometry technique to detect the level of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T lymphocytes of nucleated cells in peripheral blood in each group. **Results** The CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T lymphocytes in the group of positive HCV Ag negative HCV Ab, the group of positive HCV Ag positive HCV Ab, the group of negative HCV Ag positive HCV Ab and healthy control group is step-down, of which the group of original positive antibody negative antigen (4.86±2.14)% is higher than other groups (3.74±1.67)%, (2.74±1.27)%, (2.56±1.18)%. The difference is statistically significant (*t* values were 2.023, 4.125, 4.402, *P* < 0.05); CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T lymphocytes and HCV RNA viral load logarithmic (copy/mL, Ig) were positively correlated (*r* = 0.535, *P* < 0.05) in core positive antigen negative antibody group. **Conclusion** The level of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T lymphocytes in HCV early infections is associated with the set-point of high virus. CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T lymphocytes level may be one of the factors to speed up the early HCV infection.

【Key words】 HCV; early infection; regulatory T lymphocytes; viral load; relevance

调节性 T 淋巴细胞(Treg)对免疫平衡及维持免疫耐受具 有重要意义,主要表现为免疫无能性和免疫抑制性,可以控制

^{*} 基金项目:广东省医学科研基金课题(A2013647)。

作者简介:黄启强,男,副主任检验师,本科,主要从事免疫微生物学检验方面的研究。

机体损伤的免疫反应^[1-2]。丙型肝炎病毒(HCV)感染者机体免疫功能紊乱,细胞免疫应答在丙型肝炎的发病机制中发挥着重要作用。具有抑制活性的标志性分子 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性 T 淋巴细胞在细胞免疫中起核心作用,对于维持免疫耐受及免疫平衡具有重要作用,病毒在体内不能彻底清除,组织损伤迁延不愈等都与机体的免疫耐受息息相关,因此,检测外周血 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性 T 淋巴细胞的水平可以较好地反映患者的免疫功能状态^[3-4]。在慢性乙型肝炎、人类免疫缺陷病毒等慢性感染中发现,CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性 T 淋巴细胞比例升高,并调节病毒特异 T 细胞应答^[5-6]。在 HCV 慢性感染中,调节性 T 淋巴细胞与疾病进展的关系有不少的研究,但由于研究对象和手段的不同,结果也不一致。陈瑜等^[7]研究认为,外周血 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性 T 淋巴细胞与疗效相关,可作为肝衰竭疗效评估及预后判定的指标。彭明喜等^[8]认为,现症慢性化的 HCV 感染 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性 T 淋巴细胞水平较高。但由于研究对象及手段不同,导致的结果并不一致;对早期的 HCV 感染中,CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性 T 淋巴细胞水平的研究还较少。本研究是以早期的 HCV 感染中病毒载量与 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性 T 淋巴细胞相关性进行探讨,以 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性 T 淋巴细胞水平分析其在 HCV 致病中的作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 22 例 HCV Ag 阳性、抗-HCV 阴性的早期感染病例;26 例核心抗原阴性、抗体阳性的既往 HCV 感染病例;24 例 HCV Ag 阳性、抗-HCV 阳性的慢性 HCV 感染病例及 22 例健康者作健康对照组。

1.2 酶联免疫吸附试验(ELISA)筛选 HCV 抗原和抗体 采用双抗体(抗原)夹心 ELISA。丙型肝炎核心抗原检测试剂由基因重组表达的丙型肝炎病毒核心区抗原(HCV-cAg)免疫制备的抗丙型肝炎病毒核心单克隆抗体包被微孔板、辣根过氧化物酶标志抗体(抗原)及阳性、阴性对照等组成,应用双抗体夹心酶联免疫吸附法检测人血清或血浆样品中丙型肝炎病毒核心抗原(抗体),按操作说明进行操作。用 CUT OFF 值来判读结果(CUT OFF=2.1×阴性对照,≥CUT OFF 值为阳性)。检测仪器为雷杜 RT6100 酶标仪;试剂由珠海丽珠生物工程有限公司生产;ELISA 试剂盒。

1.3 FQ RT-PCR 检测丙型肝炎的病毒载量 (1)样品 RNA 的抽提:标准或阴、阳性对照和待测血清 100 μL 加入 100 μL RNA 提取液 1,13 000 r/min 离心 10 min,弃上清液后加 25 μL

提取液 2 完全溶解。(2)样品 cDNA 合成:反应体系 10 μL 混合液在加入逆转录酶 MMLV 之前先 70 ℃干浴 3 min,取出后立即冰水浴至管内外温度一致,然后加逆转录酶 0.5 μL,37 ℃水浴 60 min,取出后立即 95 ℃干浴 3 min,得到逆转录终溶液即为 cDNA 溶液。(3)加样:在预定的反应管中加入相应体积的反应体系 38 μL;所定的反应分别加入样本、阴性对照、阳性对照和临界阳性对照及标准工作品各 2 μL 于 4 000 r/min 离心 5 s,至检测区(PCR 仪上)。(4)PCR 抗增:反应条件为 37 ℃ 5 min,94 ℃ 1 min,然后 95 ℃ 5 s,60 ℃ 30 s,共 40 个循环,荧光信号收集时设定为 Fam 荧光素,信号收集为 60 ℃,仪器自动判读结果;仪器为美国 ABI 型 PCR 扩增仪,由电脑自动分析计算 HCV RNA 定量结果;结果以 copy/mL 表示。HCV RNA 试剂盒由深圳凯杰生物工程有限公司生产。

1.4 流式细胞技术检测 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性 T 淋巴细胞水平及百分率 用乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝管(美国 BD 公司)采集全血,密度梯度离心机分离 HCV 感染者及健康对照外周血中单个核细胞(PBMC)。Foxp3⁺细胞的检测应用异硫氰酸荧光素(FITC)抗人 Foxp3 染色试剂盒(美国 eBioscience 公司)进行细胞染色,用 BD 公司的 FACSCalibur 流式细胞仪检测各组中 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性 T 淋巴细胞,具体方法如下:向流式 1×10⁶ 个 PBMC 中加入 CD4-APC-Cy7 抗体、CD25-APC 抗体、CD3-PE-Cy7 抗体(美国 BD 公司)40 ℃避光染色 30 min,用磷酸盐缓冲溶液(PBS)洗涤后加入 1 mL 的破膜/固定剂,40 ℃避光染色 40 min,洗涤后加入 2%(2 μL)的鼠血清,40 ℃避光 15 min,加入 Foxp3-FITC 抗体及同型对照,40 ℃避光 30 min,洗涤后加入含 1%聚甲醛的 PSB 重悬液,用流式细胞仪进行分析,以 FSC、SSC、CD3-PE-Cy7、CD4-APC-Cy7 定义淋巴细胞,计算这一群内的 CD25⁺Foxp3⁺细胞比率,CD4⁺T 淋巴细胞绝对值用 BD 公司 TruCOUNT 管 FACSCalibur 流式细胞仪测定,调节性 T 淋巴细胞绝对值=CD4⁺T 淋巴细胞绝对值×调节性 T 淋巴细胞比率,美国 BD 公司原厂试剂。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 18.0 统计分析软件进行分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,非正态分布资料经对数转换后分析(Ig_{HCV RNA}),计量资料比较采用 *t* 检验;两个变量间的相互关系应用直线相关分析,以相关系数 *r* 表示,*P*<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 研究对象临床资料及实验检测结果 见表 1。

表 1 4 组研究对象临床及实验室检测结果($\bar{x} \pm s$)

组别	年龄(岁)	男/女(<i>n</i>)	Ig _{HCV RNA} (copy/mL,Ig)	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ T 淋巴计数百分数(%)
HCV Ag 阳性、抗-HCV 阴性	29.8±9.2	13/9	4.18±1.70	4.86±2.14
HCV Ag 阳性、抗-HCV 阳性	28.4±8.6	18/8	3.80±1.40	3.74±1.67
HCV Ag 阴性、抗-HCV 阳性	27.2±9.8	12/12	—	2.74±1.27
健康对照组	25.4±8.6	16/6	—	2.56±1.18

注:—表示无数据。

2.2 HCV Ag 阳性、抗-HCV 阴性组 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性 T 淋巴细胞水平 通过单细胞水平检测外周血 PBMC 中 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性 T 淋巴细胞水平发现,HCV Ag 阳性、抗-HCV 阴性组,HCV Ag 阳性、抗-HCV 阳性组,HCV

Ag 阴性、抗-HCV 阳性组以及健康对照组 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性 T 淋巴细胞逐级下降,其中,抗原阳性、抗体阴性组[(4.86±2.14)%]高于其他组[分别为(3.74±1.67)%、(2.74±1.27)%、(2.56±1.18)%],差异有统计学意义(*t* 值分

别为 2.023、4.125、4.402; P 分别为 0.049、0.000、0.000, $P < 0.05$ 。

2.3 病毒载量 HCV Ag 阳性、抗-HCV 阴性组 (4.18 ± 1.70), HCV Ag 阳性、抗-HCV 阳性组 (3.80 ± 1.40), 两组比较差异有统计学意义, 分别与 HCV Ag 阳性、抗-HCV 阴性组, HCV Ag 阳性、抗-HCV 阳性组中 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ 调节性 T 淋巴细胞水平相关 ($r=0.535, 0.452, P < 0.05$)。两组间 HCV RNA 比较, 差异无统计学意义 ($t=0.846, P > 0.05$)。

3 讨 论

$CD4^+CD25^+$ 调节性 T 淋巴细胞作为天然调节性 T 淋巴细胞, 是调节性 T 细胞的主要组成成分, Foxp3 是调节性 T 淋巴细胞较为特异的标志, 与调节性 T 淋巴细胞的功能密切相关, 是定义 $CD4^+CD25^+$ 调节性 T 淋巴细胞的标志物。近年来, HCV 感染呈上升趋势, 慢性化程度高, 对肝脏损害严重, 目前尚无特效药及疫苗对丙型肝炎进行预防或治疗。当前认为 HCV 免疫耐受的机制可能不仅与病毒和宿主两方面的因素有关, 而且与病毒的基因、病毒变异、病毒载量以及宿主的年龄、种族、基因多态性、树突状细胞抗原递呈功能低下等因素有关^[9-10]。在抗病毒治疗中, 病毒血症被有效抑制, 但 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ 调节性 T 淋巴细胞不升高的感染者。因此, 在 HCV 感染早期寻找免疫耐受机制对治疗和探索新的免疫靶细胞具有非常重要的意义。近年来, $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ 调节性 T 淋巴细胞在 HCV 感染发病机制中的作用越来越受到重视, 一方面, $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ 调节性 T 淋巴细胞能抑制机体的过度免疫损伤; 另一方面, $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ 调节性 T 淋巴细胞也可能有利于 HCV 持续的感染。本研究分别以 HCV 早期、既往、慢性感染者外周血为样本, 用 PCR 技术检测 HCV RNA 病毒载量及用流式细胞技术检测 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ 调节性 T 淋巴细胞水平, 探讨 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ 与 HCV 病毒载量的相关性, 分析 HCV 早期感染的免疫调节作用, 了解丙型肝炎病毒清除情况及丙型肝炎慢性化进程, 为临床有效治疗和预防丙型肝炎病毒感染提供新的线索和方法。调节性 T 淋巴细胞是维持机体平衡的重要因素, 在 HCV 感染早期, 其与病毒进展的关系备受关注, 但研究的结果并不一致。HCV 感染早期, 病毒与宿主的相互作用已决定了疾病的预后, 这一时期的免疫应答对于了解其在 HCV 感染疾病进程发挥的作用具有重要意义。

本研究通过研究早期 HCV 感染者 Treg 的变化, 探讨其在疾病进展中发挥的作用, 结果显示, HCV Ag 阳性、抗-HCV 阴性组, HCV Ag 阳性、抗-HCV 阳性组, HCV Ag 阴性、抗-HCV 阳性组及健康对照组 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ 调节性 T 淋巴细胞逐级下降, HCV Ag 阳性、抗-HCV 阴性组 [4.86 ± 2.14 %] 与各组比较差异均具有统计学意义, 且与 HCV RNA 呈正相关 ($r=0.535, P < 0.05$), 提示 HCV 感染者体内的免疫系统功能受到抑制, $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ 调节性 T 淋巴细胞可能会促进病毒的应答不完全, 不能及时、有效地清除病毒, 促使 HCV 的复制, 这是导致丙型肝炎慢性化发展的一个因素。由于 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ 调节性 T 淋巴细胞可以抑制多种效应功能, 因此可以推测, 感染 HCV 后, Treg $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ 调节性 T 淋巴细胞百分率升高, 使 $CD4^+$ 细胞群中抑制性细胞

比例升高, 对效应细胞有抑制作用, 削弱抗病毒免疫, 从而与高水平的病毒调定点有关, 导致了 HCV 的持续感染; 也可能是在 HCV 感染的免疫调节中, $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ 调节性 T 淋巴细胞的存在, 使机体的效应细胞和 HCV 之间维持机体的保护性免疫, 避免过度激发免疫反应而造成周围组织的损伤, 但也会造成 HCV 的持续存在, 促进了丙型肝炎慢性化进程, 具体的免疫机制有待进一步研究^[11]。

综上所述, 早期 HCV 感染者 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ 调节性 T 淋巴细胞的百分率与病毒载量有关, 是评价早期 HCV 感染进展的指标之一, 为进一步探讨 HCV 的致病机制及其与宿主免疫应答的相互关系提供了线索。

参考文献

- [1] Sakaguchi S, Wing K, Yamaguchi T. Dynamics of peripheral tolerance and immune regulation mediated by Treg [J]. Eur J Immunol, 2009, 39(9): 2331-2336.
- [2] Moriishi K, Matsuura Y. Pathogenesis of hepatitis C virus [J]. Uirusu, 2007, 57(2): 141-149.
- [3] Murphy TJ, Ni Choileain N, Zang Y, et al. $CD4^+CD25^+$ regulatory T cells control innate immune reactivity after injury [J]. J Immunol, 2005, 174(5): 2957-2963.
- [4] 张子宁, 胡斯文, 徐俊杰, 等. 中国 HIV 早期感染者 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ 调节性 T 淋巴细胞变化研究 [J]. 中华检验医学杂志, 2011, 34(8): 712-716.
- [5] 卿克勤, 杨朝国, 刘蓉. 慢性乙型肝炎患者外周血 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ 调节性 T 淋巴细胞变化水平及其与抗病毒疗效的关系 [J]. 检验医学, 2013, 28(9): 811-814.
- [6] Elpek KG, Yoleu ES, Franke DD, et al. Ex vivo expansion of $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ T regulatory cells based on synergy between IL-2 and 4-1BB signaling [J]. J Immunol, 2007, 179(11): 7295-7304.
- [7] 陈瑜, 毛卫林, 俞炯, 等. 肝衰竭患者外周血 $CD4^+CD25^+$ 调节性 T 淋巴细胞水平变化与疗效的相关性研究 [J]. 中华检验医学杂志, 2007, 30(8): 854-857.
- [8] 彭明喜, 张哲, 许德义, 等. HCV 感染者外周血 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ 调节性 T 细胞的检测及意义 [J]. 浙江医学, 2009, 7(2): 38-40.
- [9] Rehmann B, Nascimbeni M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection [J]. Nat Rev Immunol, 2005, 5(3): 215-229.
- [10] Fontenot JD, Rudensky AY. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3 [J]. Nat Immunol, 2005, 6(4): 331-337.
- [11] Fazekas B, Landay AL. Regulatory T cells in HIV infection: pathogenic or protective participants in the immune response [J]. Aids, 2008, 22(6): 671-683.