

· 论 著 ·

T 细胞亚群及其细胞因子检测对乙型肝炎的诊断价值

张 健

(四川省巴中市中心医院检验科 636600)

摘要:目的 研究 T 细胞亚群及其细胞因子检测对乙型肝炎的诊断价值。方法 选取 2015 年 1 月至 2016 年 10 月于该院接受治疗的乙型肝炎患者 146 例(观察组),根据外周血乙型肝炎病毒 DNA 检测结果分为阳性组(84 例)和阴性组(62 例),同期选取 100 例健康志愿者作为对照组,分别检测 $CD4^+$ 、 $CD4^+/CD8^+$ 、白细胞介素(IL)-6、IL-32 水平,并进行分析。结果 观察组患者 $CD4^+$ 、 $CD4^+/CD8^+$ 水平低于对照组, $CD8^+$ 、IL-6、IL-32 水平高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。观察组中轻度、中度、重度患者 $CD4^+$ 、 $CD4^+/CD8^+$ 水平依次降低,IL-6、IL-32、 $CD8^+$ 水平逐渐升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。阳性组患者 $CD4^+$ 、 $CD4^+/CD8^+$ 水平低于阴性组, $CD8^+$ 水平高于阴性组,差异有统计学意义($P<0.05$)。阴性组与阳性组患者 IL-32 和 IL-6 水平比较差异无统计学意义($P>0.05$)。乙型肝炎患者血清 IL-32 和 IL-6 水平与丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)水平呈正相关。结论 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ 、 $CD4^+/CD8^+$ 比值、IL-32 和 IL-6 水平的变化与乙型肝炎严重程度相关,对乙型肝炎诊断有一定指导意义;IL-32 和 IL-6 水平与病毒复制无关,仅与机体免疫异常有关,与肝脏功能指标呈一定相关性。

关键词:乙型肝炎; T 细胞亚群; 细胞因子

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2017.22.028 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2017)22-3355-03

Diagnostic value of T cell subsets and cytokines detection in hepatitis B

ZHANG Jian

(Department of Clinical Laboratory, Bazhong Municipal Central Hospital, Bazhong, Sichuan 636600, China)

Abstract: **Objective** To explore the diagnostic value of T cell subsets and cytokines in the patients with hepatitis B. **Methods** A total of 146 patients with hepatitis B receiving treatment in this hospital from January 2015 to October 2016 were selected as the observation group and divided into the positive group(84 cases) and negative group(62 cases) according to the detection results of peripheral blood hepatitis B virus(HBV)DNA. Contemporaneous 100 healthy volunteers were selected as the control group. The levels of $CD4^+$ and $CD4^+/CD8^+$, IL-32 and IL-6 were measured and analyzed. **Results** The levels of $CD4^+$ and $CD4^+/CD8^+$ in the observation group were lower than those in the control group, while the levels of $CD8^+$, IL-6 and IL-32 were higher than those in the control group, the differences were statistically significant($P<0.05$). The levels of $CD4^+$ and $CD4^+/CD8^+$ in mild, moderate and severe cases of the observation group were decreased in turn, while the levels of IL-6, IL-32 and $CD8^+$ were gradually increased, the differences were statistically significant($P<0.05$). The levels of $CD4^+$ and $CD4^+/CD8^+$ in the positive group were lower than those in the negative group, while $CD8^+$ level was higher than that in the negative group, the differences were statistically significant($P<0.05$). The IL-6 and IL-32 levels had no statistical significant difference between the negative group and positive group($P>0.05$). Serum IL-32 and IL-6 levels in the patients with hepatitis B were positively correlated with alanine aminotransferase(ALT) and aspartate aminotransferase(AST) levels. **Conclusion** $CD4^+$, $CD8^+$, $CD4^+/CD8^+$, IL-32 and IL-6 level changes are related with the severity of hepatitis B, has a certain guiding significance for the diagnosis of hepatitis B, but the IL-32 and IL-6 levels have no relation with virus replication, only have relation with the body immune abnormalities and have a certain relation with the liver function indicators.

Key words: hepatitis B; T cell subsets; cytokines

乙型肝炎是常见传染性疾病,我国属乙型肝炎的高发区。据流行病学调查结果显示,我国 1~59 岁人群中,乙型肝炎的发病率为 7.18%。乙型肝炎与肝癌的发生具有相关性,存在乙型肝炎病史患者出现肝癌的危险性是非乙型肝炎的 200 倍^[1]。每年我国由乙型肝炎引起的相关疾病死亡例数约为 30 万。乙型肝炎病毒感染已成为我国危害最大的公共卫生问题之一^[2]。在病因学研究中,普遍认为乙型肝炎病毒慢性感染的主要病因为宿主免疫调控的紊乱^[3]。其中,T 细胞亚群及其相关细胞因子网络的调控在乙型肝炎肝细胞免疫病理损伤中起重要作用^[4]。因此,T 细胞亚群及其相关细胞因子的研究已成为乙型肝炎发病机制的研究热点^[5]。机体处于健康状态下,T 细胞介导的 $CD4^+$ T 和 $CD8^+$ T 细胞相互协调,并维持正常比

例,如 $CD4^+/CD8^+$ T 细胞比值降低,则会影响疾病的严重程度及预后情况,与疾病的发生和发展存在一定相关性。但是,T 细胞亚群及其相关细胞因子对乙型肝炎是否具有诊断价值尚未开展大范围研究,因此,本研究探讨 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ 、白细胞介素(IL)-6、IL-32 对乙型肝炎的诊断价值。现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2015 年 1 月至 2016 年 10 月于本院接受治疗的乙型肝炎患者 146 例(观察组);男 89 例,女 57 例;年龄 20~65 岁,平均(41.59±4.28)岁;急性患者 17 例,慢性患者 129 例;轻度 52 例,中度 60 例,重度 34 例。同期选取 100 例健康志愿者为对照组;男 58 例,女 42 例;年龄 20~65 岁,平

均(42.55±4.31)岁;2组患者在年龄、性别方面差异无统计学意义($P>0.05$)。在观察组中,根据外周血乙型肝炎病毒DNA检测结果分为阳性组(84例)和阴性组(62例)。阳性组中,男50例,女34例;年龄20~65岁,平均(41.42±4.30)岁;急性患者8例,慢性患者76例;轻度31例,中度39例,重度14例。阴性组中,男39例,女23例;年龄20~65岁,平均(41.31±4.26)岁;急性患者9例,慢性患者53例;轻度21例,中度21例,重度20例。阴性组与阳性组患者在年龄、性别方面差异无统计学意义($P>0.05$)。

1.2 纳入、排除及分级标准

1.2.1 纳入标准 观察组患者纳入标准:(1)符合乙型肝炎诊断及分级标准;(2)首次诊断为乙型肝炎;(3)入组前未接受过系统的保肝治疗;(4)入组前未接受过抗病毒和免疫调节治疗;(5)同意本次研究,签署知情同意书。对照组患者纳入标准:体检未发现任何疾病。

1.2.2 排除标准 (1)具有肝炎病史,但诊断为甲型肝炎、丙型肝炎、丁型肝炎、戊型肝炎;(2)精神异常,无法与医护进行正常沟通者;(3)近半年内存在免疫调解和抗病毒治疗史;(4)近半年内存在保肝治疗史;(5)近半年内服用过对肝脏有影响的药物;(6)心脏器质性疾病或心血管疾病;(7)肿瘤、自身免疫性疾病、其他感染性疾病者。

1.2.3 乙型肝炎严重程度分级标准 (1)轻度:病情较轻,可反复出现乏力、头晕、食欲有所减退、厌油、尿黄、肝区不适、睡眠欠佳、肝稍大有轻触痛,可有轻度脾大;部分患者症状、体征缺如;肝功能指标仅1、2项轻度异常。(2)中度:症状、体征、实验室检查居于轻度和重度之间。(3)重度:有明显或持续的肝炎症状,如乏力、纳差、腹胀、尿黄、便溏等,伴肝病面容、肝掌、蜘蛛痣、脾大,丙氨酸氨基转移酶(ALT)和天冬氨酸氨基转移酶(AST)反复或持续升高,清蛋白降低、丙种球蛋白明显升高。

1.3 方法

1.3.1 外周血 T 淋巴细胞亚群检测方法 空腹抽取观察组和对照组患者静脉血 2 mL,采用肝素钠抗凝,在样品测定管中加入 50 μ L 抗凝血,并于 6 h 内分析。向含 beads 的 Truecount 管中加入 20 μ L 抗体,振荡混匀 3 s,室温条件下避光孵育 20 min;加入溶血素 450 μ L,继续振荡并混匀,再次于室温条件下避光孵育 15 min。以 1 500 r/min 离心 5 min,弃上清液,加入 2 mL 磷酸盐缓冲溶液(PBS),再次以 1 500 r/min 离心 5 min,弃上清液,上机检测。试剂盒及仪器均购于美国 BD 公司。

1.3.2 人血清细胞因子 IL-6、IL-32 检测方法 检测数据盒均购于美国 BD 公司,采用酶联免疫吸附试验(ELISA)对其进行检测,操作过程和操作规范严格按照说明书进行,采用科华 ST-360 酶标仪进行检测。

1.3.3 乙型肝炎 DNA 检测方法 空腹抽取观察组和对照组患者静脉血 2 mL,置入无菌离心管中室温保存 2 h,以 1 600 r/min 离心 5 min,吸取离心管中血清 200 μ L,转入另 1 根无菌 1.5 mL 离心管,取 5 μ L 血清用于 DNA 提取。采用美国 ABI-7300 荧光定量聚合酶链式反应(PCR)分析仪进行基因扩增,试剂购于湖南圣湘生物科技有限公司。结果判断:小于 102 IU/mL 为阴性,102~104 IU/mL 为低载量组,>104~106 IU/mL 为中载量组,>106 IU/mL 为高载量组。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计学软件进行数据分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 SNK- q 检验。相关性分析采用直线相关分析。以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 2 组 T 细胞亚群检测水平 观察组患者 CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ 水平低于对照组,CD8⁺ 水平高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。观察组中,轻度、中度、重度患者 CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ 水平依次降低,CD8⁺ 水平逐渐升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

表 1 2 组 T 细胞亚群检测水平($\bar{x}\pm s$)				
分组	<i>n</i>	CD4 ⁺ (%)	CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
对照组	100	45.31±4.09	27.15±1.65	1.67±0.38
观察组	146	39.25±3.66	29.34±1.89	1.34±0.31
轻度	52	42.50±3.78	27.82±1.70	1.53±0.35
中度	60	39.73±3.59*	28.69±1.68*	1.38±0.30*
重度	34	37.56±3.20*#	30.55±2.05*#	1.23±0.27*#

注:与轻度比较,* $P<0.05$;与中度比较,# $P<0.05$

2.2 2 组相关细胞因子检测水平 观察组患者 IL-32 和 IL-6 水平高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。观察组中,轻度、中度、重度患者 IL-32 和 IL-6 水平依次升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

表 2 2 组相关细胞因子检测水平($\bar{x}\pm s$,pg/mL)			
分组	<i>n</i>	IL-6	IL-32
对照组	100	65.82±6.79	55.63±6.10
观察组	146	365.20±28.52	190.34±20.58
轻度	52	185.11±19.43	117.42±15.26
中度	60	391.54±30.47*	201.53±21.94*
重度	34	469.30±32.55*#	274.55±25.10*#

注:与轻度比较,* $P<0.05$;与中度比较,# $P<0.05$

2.3 阴性组与阳性组患者 T 细胞亚群检测水平 阳性组患者 CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ 水平低于阴性组,CD8⁺ 水平高于阴性组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 3。

表 3 阴性组与阳性组患者 T 细胞亚群检测水平($\bar{x}\pm s$)				
组别	<i>n</i>	CD4 ⁺ (%)	CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
阴性组	62	36.41±4.97	27.30±1.83	1.33±0.40
阳性组	84	34.82±4.55	29.46±2.05	1.18±0.25
<i>t</i>		4.531	5.016	4.922
<i>P</i>		<0.05	<0.05	<0.05

2.4 阴性组与阳性组患者相关细胞因子检测水平 阴性组与阳性组患者 IL-32 和 IL-6 水平比较差异无统计学意义($P>0.05$),见表 4。

表 4 阴性组与阳性组患者相关细胞因子检测水平($\bar{x}\pm s$,pg/mL)			
分组	<i>n</i>	IL-6	IL-32
阴性组	62	160.41±10.59	305.10±25.09
阳性组	84	163.85±11.06	309.82±25.15
<i>t</i>		0.683	1.016
<i>P</i>		>0.05	>0.05

2.5 相关细胞因子水平与肝功能指标的相关性分析 乙型肝炎

炎患者血清 IL-32 水平与 ALT、AST 水平呈正相关(r 为 0.59、0.75),血清 IL-6 水平与 ALT、AST 水平呈正相关(r 为 0.68、0.50)。

3 讨 论

目前对感染乙型肝炎病毒患者的转归机制研究尚无明确的统一认识,但普遍认为乙型肝炎患者的病情及结局受病毒强弱和宿主免疫应答强度的影响^[6]。机体的免疫功能受细胞免疫和体液免疫调节,而细胞免疫主要由 T 细胞发挥功能。在机体处于健康状态下,T 细胞介导的 CD4⁺ T 和 CD8⁺ T 细胞相互协调,并通过相互制约、相互作用,共同参与机体免疫应答,维持正常比例,如果 CD4⁺/CD8⁺ T 细胞比值降低,则会影响疾病的严重程度及预后情况,其与疾病的发生发展存在一定相关性。因此,T 细胞亚群各水平间的相对稳定是机体发挥正常免疫功能的基础。有效的免疫应答有利于清除病毒,而抗病毒能力减弱是病毒持续存在的主要原因^[7]。有学者表明,T 细胞亚群及相关因子与乙型肝炎的发生发展具有一定相关性,但对 IL-32、IL-6 等新发现的细胞因子在免疫调节反应中发挥的作用还需深入研究。因此,本研究分析了 IL-32、IL-6 及 T 细胞亚群对乙型肝炎的诊断价值。

本研究结果显示,观察组患者 CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ 水平低于对照组,CD8⁺、IL-6、IL-32 水平高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);观察组中,轻度、中度、重度患者 CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ 水平依次降低,IL-6、IL-32、CD8⁺ 水平逐渐升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。提示乙型肝炎患者 IL-32、IL-6 及 T 细胞亚群相关指标变化明显,且随着疾病严重程度的加重,指标异常程度不断增大,这与以往研究结果相符^[8-9]。正常情况下,CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞保持一定比例,维持机体免疫功能;当感染乙型肝炎病毒时,免疫功能出现异常,肝脏发生炎症反应,导致单核巨嗜细胞产生 IL-6,IL-6 水平增高诱导毒性 T 细胞增殖分化,产生肝脏炎症反应。CD4⁺ 的减少可对辅助性 T 细胞(Th)1/Th2 比例平衡产生影响,致使细胞因子紊乱而使病毒长期存在。乙型肝炎患者外周血抑制性 T 细胞(Ts 细胞)增多,Ts 细胞靶细胞为 CD4⁺ T 细胞,可起到抑制免疫应答作用,如重度乙型肝炎患者免疫功能紊乱,对自然杀伤细胞(NK 细胞)功能的调节程度差,对单核细胞向巨噬细胞分化的诱导能力消失^[10]。乙型肝炎患者存在大量单核巨噬细胞浸润,引起肝脏炎症反应,诱发单核巨嗜细胞产生大量 IL-6,故 IL-32、IL-6 水平均不断升高^[11-12]。在本研究中,阳性组患者 CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ 水平低于阴性组,CD8⁺ 水平高于阴性组,差异有统计学意义($P < 0.05$),但阴性组与阳性组患者 IL-32 和 IL-6 水平比较差异无统计学意义($P > 0.05$),提示 IL-32 和 IL-6 水平与乙型肝炎病毒复制无关,或者乙型肝炎病毒并不直接引起感染细胞病变。当患者感染乙型肝炎病毒时,组织中大量的单核巨噬细胞浸润,进一步激活单核巨噬细胞产生大量的 IL-6。IL-32 诱导 IL-6 生成,其可能的原因是 IL-32 可能通过诱导单核细胞向巨噬细胞分化,增强了吞噬功能,进一步刺激 IL-6 及其他促炎因子产生,加重了肝细胞坏死和肝脏损伤。

在以往的临床诊断中的常用诊断指标为 ALT,因此,本研究对 IL-6、IL-32 与 ALT 的相关性进行了分析,为 T 细胞亚群及相关细胞因子对乙型肝炎的诊断提供了一定基础。IL-32 和 IL-6 具有相互促进的作用,IL-32 可促进 IL-6 释放,介导免疫损伤。本研究结果显示,乙型肝炎患者血清 IL-32 和 IL-6 水平与 ALT、AST 水平呈正相关,提示 IL-32 和 IL-6 水平对乙

型肝炎诊断有一定指导意义。

综上所述,CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺ 比值、IL-32 和 IL-6 水平变化与乙型肝炎严重程度相关,对乙型肝炎诊断有一定指导意义;IL-32 和 IL-6 水平与病毒复制无关,仅与机体免疫异常有关,其与肝脏功能指标呈一定相关性。

参考文献

- [1] 中华医学会肝病学分会,中华医学会感染病学会.慢性乙型肝炎防治指南(2010 年版)[J].临床肝胆病杂志,2011,27(1):1-15.
- [2] 王慰,郑欢伟,任桂芳,等.慢性 HBV 感染及其相关肝病患者外周血 T 细胞亚群的变化[J].临床肝胆病杂志,2013,29(4):276-279.
- [3] Abu-Mouch S,Fireman Z,Jarchovsky J,et al. Vitamin D supplementation improves sustained virologic response in chronic hepatitis C(genotype 1)-naive patients[J]. World J Gastroenterol,2011(25):17-19.
- [4] Kang KY, Kim HO, Kwtk SK, et al. Impact of interleukin-21 in the pathogenesis of primary Sjogren's syndrome; increased serum levels of interleukin-21 and its expression in the labial salivary glands[J]. Arthritis Res Ther,2011,13(5):179-181.
- [5] 李彩东,陈锡莲,段正军,等.慢性 HBV 感染者外周血 T 淋巴细胞亚群的变化及其与白细胞介素 15、白细胞介素 16 的相关性分析[J].临床肝胆病杂志,2015,31(11):1857-1859.
- [6] Kitagishi Y, Kobayashi M, Yamshina Y, et al. Elucidating the regulation of T cell subsets (review) [J]. Int J Mol Med,2012,30(6):1255-1257.
- [7] Bemark M, Holmqvist J, Abrahamsson J, et al. Translational mini-review series on B cell subsets in disease, reconstitution after haematopoietic cell transplantation-revelation of B cell developmental pathways and lineage phenotypes[J]. Clin Exp Immunol,2012,167(1):15-16.
- [8] 马鹏. T 细胞亚群及炎症因子对乙型病毒性肝炎的诊断价值及相关性分析[J],2015,21(5):34-36.
- [9] 满昌军,董香玉. 外周血 T 细胞亚群、IL-32、IL-6 水平在乙型肝炎患者表达及相关性分析[J]. 中国实验诊断学,2014,18(1):62-64.
- [10] Husseiny NME, Fahmy HM, Mohamed WA, et al. Relationship between vitamin D and IL-23, IL-17 and macrophage chemoattractant protein-1 as markers of fibrosis in hepatitis C virus Egyptians[J]. World J Hepatol,2012,4(8):242-247.
- [11] Wang W, Zheng HW, Ren GF, et al. Differential profiles of T-cell subsets are present in peripheral blood of patients with various progressive forms of hepatitis B infection[J]. J Clin Hepatol,2013,29(4):276-279.
- [12] Chen C, Jiang DR, Zhang X, et al. Study of expression levels of regulatory T cells in patients with chronic hepatitis B[J]. Chin J Nosocomiol,2014,19(32):4714-4716.