

· 临床论著 ·

慢性 HBV 感染者不同免疫状态下及抗病毒治疗后
外周血 T 细胞亚群比例和细胞因子水平特点

杨晨辰 黄睿 刘勇 严晓敏 武抗抗 曹淑凤 唐勤 孙静 吴超

【摘要】 目的 观察不同免疫状态的慢性乙型肝炎病毒 (HBV) 感染者及抗病毒治疗后外周血 CD4⁺T、CD8⁺T 细胞比例、CD4⁺/CD8⁺ 比值及血清中细胞因子 IL-6、IL-10、TNF- α 和 IFN- γ 水平的变化特点及与 HBeAg 血清学转换的相关性。**方法** 纳入 79 例处于不同免疫状态的慢性 HBV 感染者 (其中非活动性 HBV 携带期 15 例、免疫耐受期 20 例、免疫活化期 44 例) 及 21 例健康对照者为研究对象, 采用流式细胞术检测其外周血 CD4⁺T、CD8⁺T 细胞比例。对其中 33 例免疫活化期患者进行核苷 (酸) 类似物抗病毒治疗并随访至 48 周。分别于治疗前 (T0 期) 及治疗后 4 周 (T1 期)、8 周 (T2 期)、12 周 (T3 期)、24 周 (T4 期) 和 48 周 (T5 期) 采集外周血, 流式细胞术检测各时间点患者外周血 CD4⁺T、CD8⁺T 细胞比例。同时对部分患者血清标本中的细胞因子水平进行检测。**结果** 在慢性 HBV 感染者中, 免疫活化组患者外周血 CD4⁺T 细胞比例及 CD4⁺/CD8⁺ 比值显著低于健康对照组 (P 均 < 0.05), 而 CD8⁺T 细胞比例显著高于健康对照组 ($F = 3.610$, $P < 0.05$)。抗病毒治疗后, $\Delta T0 \sim T1$ 、 $\Delta T0 \sim T2$ 期, HBeAg 血清学转换组外周血 CD8⁺T 细胞比例升高率显著高于未转换组 (P 均 < 0.05); $\Delta T0 \sim T5$ 期, HBeAg 血清学转换组外周血 CD4⁺T 细胞比例升高率显著高于未转换组 ($Z = -2.200$, $P < 0.05$)。免疫活化组患者血清 IL-10、IFN- γ 水平平均显著高于对照组和免疫耐受组 (P 均 < 0.05)。免疫活化组患者抗病毒治疗后 12 周及 24 周, 血清 IL-10 水平显著下降 ($t = 3.037$ 、 3.180 , P 均 < 0.05), 与 ALT 水平、HBV DNA 载量呈正相关关系 (P 均 < 0.05)。**结论** 慢性 HBV 感染者在不同免疫状态下外周血 T 细胞亚群比例及血清细胞因子水平表现不同, 免疫活化期患者与健康对照者比 CD4⁺T 比例及 CD4⁺/CD8⁺ 下降, CD8⁺T 比例升高, 血清 IL-10 水平显著升高。HBeAg 阳性患者, 核苷 (酸) 类似物抗病毒治疗过程中外周血 CD8⁺T 细胞和 CD4⁺T 细胞的比例升高可能有助于预测 HBeAg 的血清学转换。

【关键词】 肝炎病毒, 乙型; CD4⁺T 细胞; CD8⁺T 细胞; 细胞因子; 核苷 (酸) 类似物

Characteristics of T-cell subsets and serum cytokines in patients with chronic hepatitis B during different immune status and after antiviral treatment YANG Chenchen*, HUANG Rui, LIU Yong, YAN Xiaomin, WU Kangkang, CAO Shufeng, TANG Qin, SUN Jing, WU Chao. *Department of Infectious Diseases, Department of Laboratory Medicine, Drum Tower Clinical Medicine College of Nanjing Medical University, Nanjing 210008, China

Corresponding author: WU Chao, Email: wuchao1962@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the percentages of CD4⁺T and CD8⁺T cells in the peripheral blood and serum cytokine levels (IL-6, IL-10, IFN- γ and TNF- α) in patients with chronic hepatitis B virus (HBV) infection during different immune status and explore the association between the percentages of T cell subsets and HBeAg seroconversion. **Methods** Seventy-nine patients with chronic HBV infection as well as 21 healthy donors were enrolled in this study. Blood samples were collected for detecting the percentages of CD4⁺T and CD8⁺T cells by flow cytometry. Thirty-three HBeAg positive CHB patients received antiviral

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2014.02.009

基金项目: 江苏省医学领军人才与创新团队资助项目 (No. LJ201154); 江苏省临床医学科技专项项目 (No. BL2012034); 南京市医学科技发展重点项目 (No. ZKX10015)

作者单位: 210008 南京市, 南京医科大学鼓楼临床医学院感染科 (杨晨辰、黄睿、严晓敏、武抗抗、曹淑凤、唐勤、孙静、吴超), 科研部 (刘勇)

通讯作者: 吴超, Email: wuchao1962@163.com

treatment were successfully followed for 48 weeks. At the end of 48 weeks, 7 of 33 HBeAg positive CHB patients achieved HBeAg seroconversion. The percentages of CD4⁺ T and CD8⁺ T cells were detected at five time points of antiviral treatment: T1 (4 week), T2 (8 week), T3 (12 week), T4 (24 week) and T5 (48 week). Serum cytokine levels were also detected by cytometric bead array (CBA). **Results** As compared with normal controls, the percentage of CD4⁺ T cell and the ratio of CD4⁺/CD8⁺ were lower in patients in the immune reactive phase (P all < 0.05). However, the percentage of CD8⁺ T cell was higher than normal controls ($F = 3.610$, $P < 0.05$). During the same monitoring period, the HBV DNA loads and ALT levels in patients who achieved HBeAg seroconversion decreased significantly compared with patients without HBeAg seroconversion. Besides, the increase of CD8⁺ T cells during the period $\Delta T0-T1$ and $\Delta T0-T2$ and the increase of CD4⁺ T cells during period $\Delta T0-T5$ were significantly different between HBeAg seroconversion patients and HBeAg non-seroconversion patients ($Z = -2.200$, $P < 0.05$). The cytokine levels of IL-10 and IFN- γ in patients of immune reactive phase were higher than health controls and patients in immune tolerant phase (P all < 0.05). The cytokine levels of IL-10 decreased significantly at 12 weeks (T3) and 24 weeks (T4) of antiviral treatment ($t = 3.037$ and 3.180 , P all < 0.05) and were positively correlated with the HBV DNA loads and ALT levels. **Conclusions** The percentages of CD4⁺ T and CD8⁺ T cell and serum cytokine levels were changed in different immune status of chronic HBV infection. The increase of CD8⁺ T cell and CD4⁺ T cell percentage during the process of antiviral treatment with HBeAg positive CHB patients were associated with high HBeAg seroconversion rate.

【Key words】 Hepatitis B virus; CD4⁺ T cell; CD8⁺ T cell; Cytokines; Nucleos(t)ide analogues

HBV 为非致细胞病变性病毒, 其感染后的临床表现和转归取决于宿主自身免疫应答的强弱。大量研究证明, T 细胞及其分泌的细胞因子在病毒感染后的免疫应答过程中有着重要的作用, 且 T 细胞应答的强弱决定了 HBV 是被迅速清除, 还是发展成为慢性感染^[1]。为了解慢性 HBV 感染者外周血中 T 细胞亚群在的比例及血清细胞因子水平特点, 本研究对 79 例慢性 HBV 感染者外周血进行检测并分析, 以探讨不同免疫状态下及抗病毒治疗后 T 细胞亚群比例及其细胞因子水平特点。

资料与方法

一、研究对象

选取南京市鼓楼医院感染科2011年5月至2013年6月门诊患者, 诊断符合 2010年中华医学会肝病学会和感染病学分会联合制订发布的《慢性乙型肝炎防治指南》^[2]。共入组79例CHB患者, 并根据2009年《EASL临床实践指南: 慢性乙型肝炎的治疗》将慢性HBV感染者按不同的免疫状态进行分组: ①非活动性HBV携带组(HBsAg、HBeAb阳性, HBeAg阴性, HBV DNA < 500 拷贝/ml, ALT < 40 U/L) 15例, 其中男性9例, 女性6例, 年龄21~45 (28.27 ± 6.33) 岁; ②免疫耐受组(HBsAg、HBeAg 阳性, HBV DNA $> 10^7$ 拷贝/ml, ALT < 40

U/L) 20例, 其中男性13例, 女性7例, 年龄21~44 (30.75 ± 6.38) 岁; ③免疫活化组(HBsAg、HBeAg阳性, HBV DNA > 500 拷贝/ml, ALT > 40 U/L) 44例, 其中男性31例, 女性13例, 年龄18~55 (32.30 ± 7.06) 岁。并随访其中33例进行抗病毒治疗HBeAg阳性免疫活化组患者, 男性21例, 女性12例, 年龄23~44岁, 平均 (26.78 ± 4.34) 岁, 血清学特点为: HBsAg、HBeAg阳性, ALT ≥ 80 U/L, HBV DNA $\geq 10^5$ 拷贝/ml。所有病例均排除其他肝炎病毒、HIV、CMV和EBV等重叠感染以及自身免疫性肝炎、酒精性肝病等疾病, 且在入组前6个月内未经任何抗病毒和免疫抑制治疗。④健康对照组(HBsAg阴性, ALT < 40 U/L) 21例, 其中男性12例, 女性9例, 年龄20~38 (29.36 ± 4.77) 岁。入选的所有患者均在全面了解本研究方案的基础上签署知情同意书。研究方案经院医学伦理委员会批准。

二、抗病毒治疗和随访

33 例 HBeAg 阳性慢性乙型肝炎患者根据个体化治疗原则给予每天口服核苷(酸)类似物(恩替卡韦、拉米夫定、替比夫定和阿德福韦酯)进行抗病毒治疗, 随访时间为 48 周, 随访结束后根据 HBeAg 是否发生血清学转换及出现 HBeAb 分为两组: HBeAg 血清学未转换组(26 例, 男性 19 例, 女性 7 例), HBeAg 血清学转换组(7 例, 男性 5 例,

女性2例), 两组间性别、年龄无统计学差异。分别于抗病毒治疗前(T0期)、抗病毒治疗后4周(T1期)、8周(T2期)、12周(T3期)、24周(T4期)、48周(T5期)随访, 同时采集外周血检测T亚群比例, 并分别治疗前(T0期)及抗病毒治疗后12周(T3期)、24周(T4期)检测血清细胞因子IL-6、TL-10、TNF和IFN- γ 。

三、试剂和仪器

小鼠抗人CD4-FITC、CD8-FITC单克隆抗体(eBioscience公司), 同型对照抗体IgG1-FITC、PE; 红细胞裂解液(BD Biosciences公司); HBV血清标记物(HBsAg、HBsAb、HBeAg、HBeAb、HBcAb)酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(深圳华康生物医学工程有限公司); 外周HBV DNA荧光定量PCR试剂盒(上海申友生物技术有限公司); 外周血ALT检测试剂盒(四川迈克生物科技股份有限公司); BD CBA人Th1/Th2细胞因子检测试剂盒(BD Biosciences公司ABI PRISM[®]7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems公司); BD FACSCanto[™]流式细胞仪(BD Biosciences公司); 日立7600-020E全自动生化分析仪(Hitachi公司)。

四、方法

1. 流式细胞术检测外周血T亚群比例: 采用流式细胞仪单色荧光法标记外周血淋巴细胞表面分子标记, 检测外周血CD4⁺T及CD8⁺T细胞占单个核细胞比例, 具体为分别用CD4-FITC或CD8-FITC标记外周血淋巴细胞, 采用BD FACSDiva软件, 以前向角散射(FSC)和侧向角散射(SSC)为坐标射门识别单个核细胞, 进一步检测分析外周血CD4⁺T及CD8⁺T细胞比例。

2. 细胞因子的检测: 采用CBA试剂盒检测外周血Th1/Th2细胞因子(IL-6、TL-10、TNF- α 、IFN- γ), 操作严格按照试剂盒说明书进行, 具体为采用Th1/Th2细胞因子抗体微球捕获待测血清中的对应细胞因子, 而后上流式细胞仪检测, 数据分

析采用FCAP Array软件。

3. 血清HBV DNA载量、ALT水平的检测: 严格按照试剂盒说明书检测, HBV DNA检测下限为500拷贝/ml, ALT>40 U/L为异常。

五、统计学处理

本研究数据采用SPSS 17.0软件进行分析。计量资料数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 正态分布者多组间用单因素方差分析, 两组间用独立样本 t 检验或配对 t 检验, 非正态分布者用非参数检验比较组间差异, 相关性用Pearson相关分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、不同免疫状态下基线外周血T细胞亚群比例和血清HBV DNA载量及ALT水平

1. 外周血T细胞亚群比例: 非活动HBV携带组、免疫耐受组、免疫活化组与健康对照组4组间CD4⁺T、CD8⁺T比例及CD4⁺/CD8⁺比值差异具有统计学意义($F = 3.032$, $P = 0.033$; $F = 3.610$, $P = 0.016$; $F = 2.517$, $P = 0.063$), 其中免疫活化组CD4⁺T细胞比例、CD4⁺/CD8⁺显著低于健康对照组($P = 0.017$, $P = 0.036$), CD8⁺T细胞比例显著高于健康对照组($P = 0.026$), 其余各组间无明显差异, 见表1。

2. 血清HBV DNA载量和ALT水平: 健康对照组、非活动HBV携带组HBV DNA载量低于检测下限。免疫耐受组血清HBV DNA载量与免疫活化组差异无统计学意义。非活动HBV携带组、免疫耐受组、免疫活化组与健康对照组4组间ALT水平差异具有统计学意义($\chi^2 = 82.747$, $P = 0.000$), 其中免疫活化组血清ALT水平均显著高于健康对照组、非活动HBV携带组与免疫耐受组(P 均=0.000), 见表1。

二、抗病毒治疗后外周血T细胞亚群比例及血清HBV DNA载量和ALT水平

1. 免疫活化组不同时间点HBeAg血清未转换

表1 不同免疫状态下外周血T亚群比例及血清HBV DNA载量、ALT水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数 (男/女)	ALT (U/L)	HBV DNA (log ₁₀ 拷贝/ml)	CD4 ⁺ T%	CD8 ⁺ T%	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
健康对照组	12/9	19.94 ± 6.94	—	12.23 ± 3.32	6.61 ± 2.19	1.98 ± 1.23
非活动HBV携带组	9/6	21.60 ± 7.82	—	11.14 ± 3.17	6.71 ± 3.27	1.64 ± 0.57
免疫耐受组	13/7	20.15 ± 7.88	8.08 ± 0.54	10.57 ± 3.27	6.78 ± 2.41	1.84 ± 0.80
免疫活化组	31/13	117.97 ± 147.44 ^{abc}	7.18 ± 0.79	9.45 ± 2.73 ^a	7.93 ± 2.63 ^a	1.51 ± 0.64 ^a

注: “—”为低于检测下限; 与健康对照组相比: ^a $P < 0.05$; 与非活动HBV携带组相比: ^b $P < 0.05$; 与免疫耐受组相比: ^c $P < 0.05$

组与转换组各指标的变化特点:治疗前, HBeAg血清学转换组患者ALT水平显著高于未转换组 ($Z = -2.818$, $P = 0.005$), HBV DNA载量、 $CD4^+$ T%、 $CD8^+$ T%、 $CD4^+/CD8^+$ 差异均无统计学意义 ($Z = -0.088$ 、 -0.330 、 -0.837 和 -0.638 , P 均 > 0.05)。抗病毒治疗T1期(4周), HBeAg血清学转换组ALT水平显著高于未转换组 ($Z = -2.508$, $P = 0.012$); T2期(8周), HBeAg血清学转换组HBV DNA载量显著低于未转换组 ($Z = -2.355$, $P = 0.019$), HBeAg血清学转换组 $CD8^+$ T%显著高于未转换组 ($Z = -2.107$, $P = 0.035$); T3期(12周), HBeAg血清学转换组ALT水平及HBV DNA载量均显著低于未转换组 ($Z = -2.154$, $P = 0.031$; $Z = -2.711$, $P = 0.007$); T5期(48周), HBeAg血清学转换组 $CD4^+$ T细胞比例显著高于未转换组 ($Z = -2.200$, $P = 0.028$), 见表2。

2. HBeAg血清学未转换组与转换组外周血T细胞亚群比例、HBV DNA载量以及ALT水平变化特点: $\Delta T0 \sim T(n)$ 是指T(n)期的下降率或升高率, 即相对于基线水平的下降率或升高率。结果显示: $\Delta T0 \sim T1$ 及 $\Delta T0 \sim T2$ 时间段, HBeAg血清学转换组 $CD8^+$ T细胞比例的升高率显著高于未转换组 ($Z = -1.990$, $P = 0.047$, $Z = -2.392$, $P = 0.017$); $\Delta T0 \sim T5$ 时间段, HBeAg血清学转换组 $CD4^+$ T细胞比例的升高率显著高于未转换组 ($Z = -2.407$, $P = 0.016$); $\Delta T0 \sim T2$ 及 $\Delta T0 \sim T3$ 时间段, HBeAg血清学转换组HBV DNA载量、ALT水平的下降率显著高于未转换组 ($Z = -2.284$, $P = 0.005$, $Z = -2.291$,

$P = 0.022$, $Z = -2.200$, $P = 0.028$, $Z = -2.418$, $P = 0.016$), 见图1。

3. 外周血T细胞亚群比例与ALT、HBV DNA的相关性分析: 抗病毒治疗前及治疗后各个时间点, T细胞各亚群比例与ALT水平、HBV DNA载量均无显著相关性 ($P > 0.05$)。

三、CHB患者血清细胞因子水平

1. 不同免疫状态下基线血清细胞因子水平: 免疫耐受期、活化期与健康对照组3组间IL-10、IFN- γ 水平差异具有统计学意义 ($F = 10.545$, $P = 0.000$; $F = 7.574$, $P = 0.003$), 其中免疫活化期患者IL-10、IFN- γ 水平显著高于健康对照组及免疫耐受组患者 ($P = 0.041$ 、 0.024 和 $P = 0.024$ 、 0.021); 3组间IL-6、TNF水平差异无统计学意义 ($F = 2.212$ 、 0.847 , P 均 > 0.05), 见表3。

2. 抗病毒治疗后血清细胞因子水平及与ALT水平、HBV DNA的相关性分析: 免疫活化期8例患者均口服恩替卡韦进行抗病毒治疗。治疗至12周(T3期)及24周(T4期)时, IL-10较基线显著下降 ($t = 3.037$, $P = 0.019$; $t = 3.180$, $P = 0.015$), 与ALT水平、HBV DNA载量呈正相关 ($r = 0.668$, $P = 0.001$; $r = 0.668$, $P = 0.001$); 抗病毒治疗后12周及24周, IL-6、TNF- α 和IFN- γ 水平较基线差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图2。

讨 论

T淋巴细胞(以下简称T细胞)按其CD分子

表2 HBeAg血清学未转换组与转换组患者外周血T亚群比例、HBV DNA载量和血清ALT ($\bar{x} \pm s$)

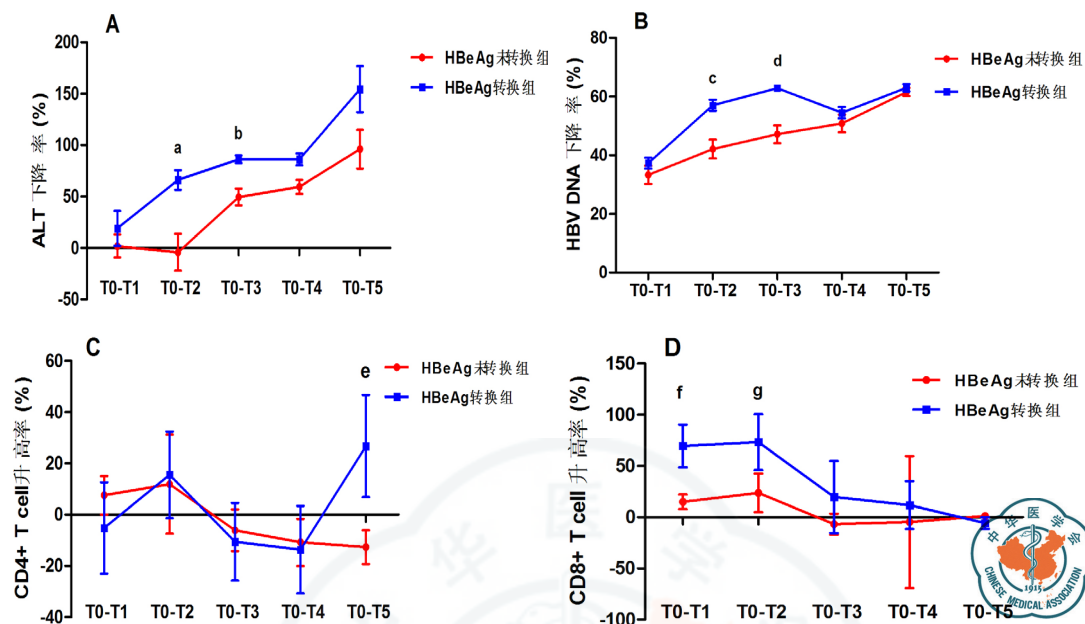
组别	HBV DNA (log ₁₀ 拷贝/ml)	ALT (U/L)	CD4 ⁺ T%	CD8 ⁺ T%	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
HBeAg血清学未转换组					
T0(治疗前)	7.38 ± 0.78	176.97 ± 156.74	10.65 ± 3.49	6.53 ± 3.02	1.57 ± 0.56
T1(4周)	5.01 ± 1.20	110.76 ± 49.82	10.85 ± 4.73	7.82 ± 3.13	1.52 ± 0.71
T2(8周)	4.32 ± 1.21	104.37 ± 81.37	12.39 ± 8.89	6.96 ± 2.67	1.64 ± 0.93
T3(12周)	3.89 ± 1.23	56.20 ± 34.85	9.33 ± 4.81	6.15 ± 3.47	1.54 ± 0.59
T4(24周)	3.62 ± 1.25	44.77 ± 33.25	9.56 ± 3.67	6.21 ± 2.19	1.75 ± 0.93
T5(48周)	2.97 ± 0.98	34.52 ± 33.75	9.38 ± 2.62	6.16 ± 2.55	1.54 ± 0.82
HBeAg血清学转换组					
T0(治疗前)	7.29 ± 0.25	286.15 ± 173.17 ^a	10.40 ± 2.36	7.77 ± 3.06	1.56 ± 0.95
T1(4周)	4.62 ± 0.42	211.78 ± 101.96 ^a	9.00 ± 3.81	10.75 ± 3.95	0.91 ± 0.34
T2(8周)	3.14 ± 0.36 ^a	94.40 ± 74.00	11.71 ± 2.85	11.63 ± 2.47 ^a	1.03 ± 0.31
T3(12周)	2.73 ± 0.27 ^a	26.45 ± 10.23 ^a	8.84 ± 3.93	7.10 ± 3.12	1.34 ± 0.58
T4(24周)	2.58 ± 0.33	30.40 ± 24.57	9.16 ± 4.23	7.60 ± 2.25	1.38 ± 0.81
T5(48周)	2.70 ± 0.00	25.68 ± 22.97	12.88 ± 3.26 [*]	7.32 ± 3.79	1.66 ± 0.34

注: ^a: HBeAg血清学转换组与未转换组差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)

表3 不同免疫状态的患者细胞因子浓度 (pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

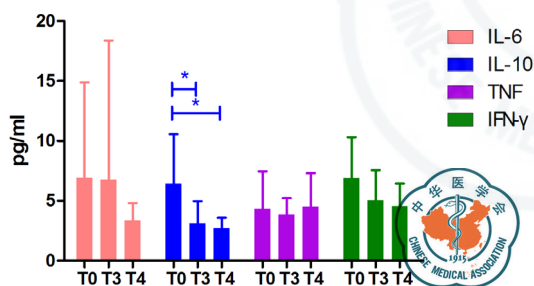
组别	例数	IL-6	IL-10	TNF- α	IFN- γ
健康对照组	7	2.30 ± 0.54	2.27 ± 0.46	3.34 ± 1.76	4.30 ± 1.50
免疫耐受组	14	3.28 ± 2.20	2.27 ± 0.57	3.21 ± 1.00	3.38 ± 1.17
免疫活化组	8	6.94 ± 7.94	6.44 ± 4.11 ^{ab}	4.33 ± 3.13	6.91 ± 3.37 ^{ab}

注: ^a: 与健康对照组比较 $P < 0.05$, ^b: 与免疫耐受组比较 $P < 0.05$



注: T0 为治疗前; T1 ~ T5 分别为为治疗后 4 周、8 周、12 周、24 周、48 周; a ~ g 为两组比较 $P < 0.05$; A: ALT, B: HBV DNA, C: CD4⁺T%; D: CD8⁺T%

图 1 两组 CHB 患者随访各期各项检测指标的变化



注: T0: 为抗病毒治疗前, T3: 为抗病毒治疗后 12 周, T4: 为抗病毒治疗后 24 周; *: 与基线相比 $P < 0.05$

图 2 抗病毒治疗后细胞因子浓度变化

表型不同可分为 CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞。CD4⁺T 细胞主要为辅助性 T 细胞 (helper T lymphocyte, Th), 通过分泌多种细胞因子促进免疫细胞的增殖、分化及抗-B 细胞的产生, 调节机体免疫反应。CD8⁺T 细胞主要为细胞毒性 T 淋巴细胞 (cytotoxic T lymphocyte, CTL), 在机体 HBV 感染时, 通过溶细胞或非溶细胞机制杀伤病毒感染的靶细胞, 降低循环中病毒的水平。慢性 HBV 感染时, 机体 T 细胞功能耗竭, 病毒特异性 CTL 不能有效地清除病毒, 以致病毒的持续存在和慢性感染, 因而外周血中 T 细胞亚群比例也相应的发生变化^[2]。

慢性 HBV 感染的自然史可概括分为非活动性 HBV 携带期、免疫耐受期、HBeAg 阴性 CHB 期、

HBeAg 阳性免疫活化期和 HBsAg 消失后的 HBsAg 阴性期这 5 个时期, 但这 5 个时期并非必然是连续性的, 临床上可以相互转化, 且每个时期反映了机体不同的免疫状态。非活动 HBV 携带状态发生于自发 HBeAg 血清学转换出现 HBeAb 之后, 其血清学特点为 ALT 正常, HBV DNA 非常低或检测不到, 病毒处于非活动状态。免疫耐受期血清学特点为高病毒载量, 但 ALT 正常, 机体对 HBV 各种抗原处于无应答状态。免疫活化期血清病毒载量及 ALT 水平持续升高, 机体免疫对病毒处于清除状态, 是抗病毒治疗的最佳时期, 正确地判断患者是否处于免疫活化期与抗病毒治疗的疗效密切相关。

既往研究发现, CHB 患者外周血 T 细胞亚群存在比例失衡, 这种失衡体现在 CD8⁺T 细胞比例增高、CD4⁺T 细胞比例及 CD4⁺/CD8⁺ 的下降^[3-4], 由于 HBV 感染后机体抗病毒免疫水平是一种动态的变化, 表现其在非活动 HBV 携带期、免疫耐受期和免疫活化期 T 细胞亚群有着不同的变化特点。因而, 既往研究结果并不一致^[5-6], 本研究中, 免疫活化组患者外周血中 CD8⁺T 细胞比例增高、CD4⁺T 细胞比例及 CD4⁺/CD8⁺ 的下降, 与 Choong 等^[7] 及 Chu 等^[8] 研究结果相同。但在非活动 HBV 携带及免疫耐受期患者中, 未发现上述现象。原因可能由于携带与耐受患者肝脏无炎症或仅轻度炎

症,血清 ALT 正常,机体对 HBV 感染获得免疫控制或机体对 HBV 各种抗原处于无应答或低应答状态,T 亚群比例变化与健康对照组无显著差别。同时,既往研究的分组及纳入病例标准不同同样可以导致 T 细胞亚群比例的检测结果不一致。不同免疫状态下 CHB 患者外周血 T 细胞亚群的变化,提示 T 淋巴细胞及其亚群在慢性 HBV 感染病毒的清除过程中起着重要的作用。

研究证实,T 细胞亚群比例的失衡与 HBV DNA 载量以及 HBeAg 滴度密切相关^[9]。CHB 患者抗病毒治疗后,病毒载量下降,可短暂地恢复抗病毒效应 T 细胞反应,也提示治疗前高病毒载量与 CHB 患者 T 细胞低反应性有关^[10]。也有研究发现,CHB 患者经阿德福韦酯单药治疗至 12 周时,应答良好患者的外周血 CD8⁺ T 细胞比例的增高较应答不良患者更为显著^[11]。本研究对抗病毒治疗后 CHB 患者进行了 T 细胞亚群比例及细胞因子的检测,发现抗病毒治疗后早期,第 4 周及第 8 周(T1、T2 期)与治疗前基线(T0 期)相比 HBeAg 血清学转换组外周血 CD8⁺ T 细胞比例的升高显著高于未转换组。同时,HBeAg 血清学转换组 HBV DNA 载量的下降率在治疗后第 8 周及第 12 周(T2、T3 期)也显著高于血清学未转换组。CD4⁺ T 细胞比例的升高和治疗前相比则表现在第 48 周(T5 期),HBeAg 血清学转换组显著高于血清未转换组。上述结果表明抗病毒治疗早期 HBeAg 血清学转换组 CD8⁺ T 细胞比例显著升高,随后伴有血清病毒水平快速下调,提示部分升高的 CD8⁺ T 细胞可能参与了病毒的清除过程,治疗后期 CD4⁺ T 细胞比例的升高,对机体的病毒清除及血清学转换有着重要的意义。

在 CHB 患者外周血中存在着显著的 Th1/Th2 比例的失衡,Th1 型细胞因子分泌减少,Th2 型细胞因子分泌增多^[12]。IL-10 是属 Th2 型细胞因子,是机体重要的免疫调节细胞因子。其参与抑制细胞合成炎症因子,同时其分泌的增多也可抑制 T 细胞及其他免疫细胞的活性,从而抑制机体对 HBV 的清除^[13]。有研究发现阻断 IL-10/IL-10R 通路可恢复病毒特异性 CTL 的活性^[14],本研究中免疫活化患者血清 IL-10 水平较免疫耐受患者及健康对照者显著增高,其升高可能是机体的一种自我保护机制,抑制肝脏炎症反应的进一步加剧,但同时也抑制了 CD4⁺ T、CD8⁺ T 细胞的免疫活性,以致其 T 细胞亚群比例的改变而不能有效地清除病毒。在抗病毒治疗后 12 周及 24 周(T3、T4 期),患者血

清 IL-10 水平较基线显著下降,与 ALT 水平、HBV DNA 载量的下降呈正相关关系,且抗病毒治疗早期 CD8⁺ T 细胞比例和后期 CD4⁺ T 细胞比例升高,进一步说明 IL-10 分泌的增多能够抑制 T 细胞免疫活性。IFN- γ 属 Th1 型细胞因子,急性 HBV 感染时,血清 IFN- γ 分泌显著增多,病毒被清除^[15]。本研究发现免疫活化患者血清 IFN- γ 水平显著高于健康对照者及免疫耐受患者,推测机体可能处于免疫清除病毒阶段,IFN- γ 分泌增多以清除病毒。免疫耐受患者血清 ALT 正常,机体对 HBV 各抗原免疫无应答,故其细胞因子水平分泌与健康对照者无明显差异,与 He 等^[16]研究结果一致。抗病毒治疗后,IFN- γ 变化无统计学差异,可能由于本研究样本量较小,需扩大样本量进一步证实。

综上所述,CHB 患者在不同免疫状态下外周血有不同程度的 T 亚群比例失衡。抗病毒治疗早期 CD8⁺ T 细胞比例的显著升高对后期 HBeAg 的血清学转换有提示作用。治疗后期 CD4⁺ T 细胞比例的升高,及血清 IL-10 的水平的下降,对机体的免疫重建、病毒清除及血清学转换有着重要的意义。

参考文献

- 1 Zhang Z, Zhang S, Zou Z, et al. Hypercytolytic activity of hepatic natural killer cells correlates with liver injury in chronic hepatitis B patients[J]. *Hepatology*,2011,53(1):73-85.
- 2 中华医学会肝病学分会,中华医学会感染病学分会.慢性乙型肝炎防治指南[J].*中华流行病学杂志*,2011,32(4):405-415.
- 3 Tsai SL, Chen PJ, Lai MY, et al. Acute exacerbations of chronic type B hepatitis are accompanied by increased T cell responses to hepatitis B core and e antigens. Implications for hepatitis B e antigen seroconversion[J]. *J Clin Invest*,1992,89(1):87-96.
- 4 Rehermann B, Lau D, Hoofnagle JH, et al. Cytotoxic T lymphocyte responsiveness after resolution of chronic hepatitis B virus infection[J]. *J Clin Invest*,1996,97(7):1655-1665.
- 5 Lin CM, Wang FH. Selective modification of antigen-specific CD4(+) T cells by retroviral-mediated gene transfer and in vitro sensitization with dendritic cells[J]. *Clin Immunol*,2002,104(1):58-66.
- 6 Lau GK, Suri D, Liang R, et al. Resolution of chronic hepatitis B and anti-HBs seroconversion in humans by adoptive transfer of immunity to hepatitis B core antigen[J]. *Gastroenterology*,2002,122(3):614-624.
- 7 Choong ML, Ton SH, Cheong SK. The cellular immune status of HBsAg-positive carriers in Malaysia[J]. *Asian Pac J Allergy Immunol*,1996,14(1):19-24.
- 8 Chu CM, Liaw YF. Peripheral T-cell subsets in asymptomatic hepatitis B-virus carriers[J]. *Cell Immunol*,1986,98(2):533-537.
- 9 Baumert TF, Thimme R, von Weizsäcker F. Pathogenesis of hepatitis B virus infection[J]. *World J Gastroenterol*,2007,13(1):82-90.
- 10 Boni C, Bertolotti A, Penna A, et al. Lamivudine treatment can restore T cell responsiveness in chronic hepatitis B[J]. *J Clin*

- Invest,1998,102(5):968-975.
 - 11 Cao W, Qiu ZF, Li TS. Parallel decline of CD8⁺CD38⁺ lymphocytes and viremia in treated hepatitis B patients[J]. World J Gastroenterol, 2011,17(17):2191-2198.
 - 12 Jiang Y, Ma Z, Xin G, et al. Th1 and Th2 immune response in chronic hepatitis B patients during a long-term treatment with adefovir dipivoxil[J]. Mediators Inflamm,2010.
 - 13 Zheng Y, Huang Z, Chen X, et al. Effects of telbivudine treatment on the circulating CD4⁺ T-cell subpopulations in chronic hepatitis B patients[J]. Mediators Inflamm,2012.
 - 14 Blackburn SD, Wherry EJ. IL-10, T cell exhaustion and viral persistence[J]. Trends Microbiol,2007,15(4):143-146.
 - 15 Dunn C, Peppas D, Khanna P, et al. Temporal analysis of early immune responses in patients with acute hepatitis B virus infection[J]. Gastroenterology,2009,137(4):1289-1300.
 - 16 He D, Li M, Guo S, et al. Expression pattern of serum cytokines in hepatitis B virus infected patients with persistently normal alanine aminotransferase levels[J]. J Clin Immunol,2013,33(7):1240-1249.
- (收稿日期: 2013-12-16)
(本文编辑: 孙荣华)

杨晨辰, 黄睿, 刘勇, 等. 慢性HBV感染者不同免疫状态下及抗病毒治疗后外周血T细胞亚群比例和细胞因子水平特点[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2014, 8 (2): 191-197.

