

· 基础论著 ·

慢性乙型肝炎病毒感染者外周血 T 细胞亚群及 NK 细胞的特点及意义

高海兵 许利军 潘晨 陈怡

【摘要】 目的 探讨慢性乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染者外周血 T 细胞亚群及 NK 细胞的特点及临床意义。**方法** 采用流式细胞术检测各研究组,包括慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)组 33 例、乙型肝炎失代偿期肝硬化(liver cirrhosis, LC)组 20 例、慢性乙型重型肝炎(chronic severe hepatitis B, CSH)组 17 例及健康对照组(Control)20 例的外周血 T 细胞亚群及 NK 细胞相对计数,并检测肝功能、HBV DNA 含量及 HBV 血清标志物。**结果** 按 Control、CHB、LC、CSH 顺序,CD3⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞百分比依次升高,而 CD4⁺ T 细胞、CD4⁺/CD8⁺ 比值及 NK 细胞百分比依次降低,且 CHB、LC、CSH 组与 Control 组及 CHB 组与 CSH 组相比,差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.008$)。CHB 患者的 CD3⁺ T 细胞与血清总胆红素(total bilirubin, TB)、HBV DNA 含量(\log_{10})呈正相关($P < 0.001$; $P < 0.001$);CD8⁺ T 细胞与 HBV DNA 含量(\log_{10})呈正相关($P = 0.007$),NK 细胞与 HBV DNA 含量(\log_{10})($P = 0.001$)呈负相关。CHB 组乙型肝炎 e 抗原(HBeAg)阳性者的 CD4⁺ T 细胞及 CD4⁺/CD8⁺ 比值低于 HBeAg 阴性者($P = 0.018$; $P < 0.001$),而 HBV DNA 含量(\log_{10})和 CD8⁺ T 细胞高于 HBeAg 阴性者($P = 0.012$; $P = 0.019$)。**结论** 慢性 HBV 感染者外周血 T 细胞亚群及 NK 细胞相对值紊乱,且与临床类型、病情、血清 HBV DNA 水平及 HBeAg 相关。

【关键词】 乙型肝炎病毒;T 细胞亚群;NK 细胞;流式细胞术

Characteristic and clinical significance of peripheral blood T cells subsets and NK cells in patients with chronic hepatitis B GAO Hai-bing, XU Li-jun, PAN Chen, CHEN Yi. Fujian Medical University Teaching Hospital (Fuzhou Municipal Infectious Diseases Hospital), Fuzhou 350025, China

Corresponding author: PAN Chen, Email: gaohb@yahoo.com.cn

【Abstract】 Objective To study the characteristic and clinical significance of peripheral blood T cells subsets and NK cells in patients with chronic hepatitis B. **Methods** Thirty-three patients with chronic hepatitis B (CHB), twenty hepatitis B patients with decompensated liver cirrhosis (LC), seventeen patients with chronic

作者单位:350025 福州市,福建医科大学教学医院(福州市传染病医院)

通讯作者:潘晨,Email:dr.gaohb@yahoo.com.cn

severe hepatitis B (CSH) and 20 healthy controls (Control) were enrolled for observation. The peripheral blood T cells subsets and NK cells were determined by flow cytometry, liver functions were assayed on automatic biochemistry analyzer, serum HBV DNA was amplified by real-time fluorescent quantitative PCR and serum HBV markers were examined by ELISA. **Results** The percentage of $CD3^+$ T and $CD8^+$ T cells in Control, CHB, LC and CSH groups increased gradually, while the percentage of $CD4^+$ T and NK cells and the ratio of $CD4^+/CD8^+$ reduced gradually. The differences between CHB and control, LC and control, CSH and control, CHB and CSH were statistically significant ($P < 0.05$ or $P < 0.008$) in percentages of $CD3^+$ T cells, $CD4^+$ T cells, $CD8^+$ T cells, NK cells and the ratio of $CD4^+/CD8^+$. In the patients with chronic hepatitis B, the correlations between $CD3^+$ T cells and serum total bilirubin (TB), $CD3^+$ T cells and HBV DNA, $CD8^+$ T cells and HBV DNA showed positive trend ($P < 0.001$; $P < 0.001$; $P = 0.007$), while the correlation between NK cells and HBV DNA was negative ($P = 0.001$). Meanwhile, in chronic hepatitis B patients with positive hepatitis B e antigen (HBeAg), the percentage of $CD4^+$ T cells and the ratio of $CD4^+/CD8^+$ were significantly lower ($P = 0.018$; $P < 0.001$), but HBV DNA and the percentage of $CD8^+$ T cells were considerably higher ($P = 0.012$; $P = 0.019$) than those with negative HBeAg. **Conclusions** Aberrant T cells subsets and NK cells exist in chronic hepatitis B patients which correlate with clinical types, pathogenetic conditions, serum HBV DNA load and HBeAg.

【Key words】 Hepatitis B virus; T cells subsets; NK cells; Flow cytometry

HBV 激活的机体免疫效应,主要是 T 细胞,包括 $CD4^+$ 辅助性 T 细胞(Th)和 $CD8^+$ 细胞毒性 T 细胞(CTL)等,此外还激活 NK 细胞、单核巨噬细胞并活化免疫细胞分泌的多种细胞因子,通过非溶解或溶解被感染细胞的途径发挥抗病毒作用。本文就慢性 HBV 感染者的外周血 $CD3^+$ T 细胞、 $CD4^+$ T 细胞、 $CD8^+$ T 细胞及 NK 细胞的数量变化及其临床意义作一探讨。

资料与方法

一、研究对象和试剂

1. 研究对象:病例组为 2002 年~2008 年就诊于福州市传染病医院门诊及住院患者,在治疗过程中自愿接受相关检测。其中 CHB 组 33 例,男 25 例,女 8 例,年龄 18~55 岁,平均(32.79 ± 7.95)岁;LC 组 20 例,男 14 例,女 6 例,年龄 25~44 岁,平均(34.40 ± 5.99)岁;CSH 组 17 例,男 12 例,女 5 例,年龄 25~47 岁,平均(33.06 ± 6.24)岁;诊断标准符合 2000 年西安会议制定的病毒性肝炎防治方案,并排除 HAV、HCV、HDV、HEV、HIV 感染及脂肪肝和自身免疫性肝病。另外 Control 组为 20 例我院健康体检者,男 13 例,女 7 例,年龄 18~55 岁,平均(32.80 ± 10.50)岁。各组研究对象的年龄及性别分布的差别无统计学意义($F =$

0.20, $P = 0.896$; $\chi^2 = 0.73$, $P = 0.867$)。

2. 主要试剂: HBV 血清标记物的 ELISA 检测试剂盒为厦门晶美生物工程公司产品, HBV DNA 定量检测试剂盒为深圳匹基生物公司产品, T 细胞亚群及 NK 细胞检测采用 BD Multitest™ IMK Kit, 内含 CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC 试剂、CD3 FITC/CD16 PE + CD56 PE/CD4 PerCP/CD19 APC 试剂及 BD FAC-S™ 溶血素。

二、研究方法

1. 生物化学指标及血清标记物检测: 肝功能采用美国 Beckman CX9 ALX 型全自动生物化学分析仪及其配套试剂检测; HBV 血清标志物采用 ELISA 检测; HBV DNA 采用实时荧光定量 PCR 检测。所有检测均严格按照试剂盒说明书进行操作。

2. 外周血 CD3⁺T 细胞、CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞及 NK 细胞的检测: 采用美国 BD 公司的 FACS Calibur 流式细胞仪检测。向 TrueCount 管中分别加入 20 μ l 抗体和 50 μ l 的抗凝全血, 混匀后于室温暗处孵育 15 min, 加入 FACS(1 \times)溶血素 2 ml, 充分混匀于室温暗处孵育 10 min; 1000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加入 2 ml PBS 洗一次, 1000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加 0.5 ml PBS, 充分混匀, 24 h 内上流式细胞仪进行分析。应用 CaliBRITE 标准微球、FACS Comp 软件调节 PMT 电压、荧光补偿、灵敏度, 应用 Cell Quest 分析软件对处理好的标本进行 CD3⁺T 细胞、CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞及 NK 细胞相对计数。

三、统计学方法

用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析。计量资料数据采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$), 方差齐性检验采用 Levene 检验, 方差齐则对多样本资料采用单因素方差分析及 LSD- t 检验比较组间差异, 两样本资料采用成组 t 检验, 方差不齐则采用 Kruskal-Wallis H 检验和 Mann-Whitney U 检验比较组间差异; 进行两变量直线相关分析; 计数资料采用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法。Mann-Whitney U 检验显著性水平为 0.008, 其他检验显著性水平为 0.05。

结 果

一、各组研究对象的外周血 T 细胞亚群及 NK 细胞相对值的比较(表 1)

表 1 HBV 感染者外周血 T 细胞亚群及 NK 细胞相对值的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	CD3 ⁺ T 细胞% *	CD4 ⁺ T 细胞% *	CD8 ⁺ T 细胞% *	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	NK 细胞% *
Control	20	62.25 \pm 6.85	36.55 \pm 4.17	21.35 \pm 2.62	1.72 \pm 0.16	19.10 \pm 4.08
CHB	33	67.30 \pm 11.11	32.79 \pm 7.95	26.33 \pm 7.36	1.36 \pm 0.52	14.82 \pm 9.59
LC	20	71.30 \pm 8.31	30.95 \pm 7.07	33.25 \pm 8.05	0.98 \pm 0.28	9.35 \pm 3.20
CSH	17	74.82 \pm 6.29	27.94 \pm 5.12	35.12 \pm 2.87	0.80 \pm 0.15	6.41 \pm 4.82

注: * 方差齐 ($F = 2.06$, $P = 0.112$; $F = 2.09$, $P = 0.068$); * 方差不齐 ($F = 4.63$, $P = 0.005$; $F = 8.99$, $P < 0.001$; $F = 9.59$, $P < 0.001$)

CD3⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞百分比在 Control、CHB、LC、CSH 组依次升高,而 CD4⁺T 细胞、CD4⁺/CD8⁺ 比值及 NK 细胞百分比依次降低。上述检测结果在 CHB、LC、CSH 组与 Control 组及 CHB 组与 CSH 组的比较中的差异均有显著统计学意义($P = 0.048, P = 0.002, P < 0.001, P = 0.006; P = 0.047, P = 0.009, P < 0.001, P = 0.016; U = 181.50, P = 0.006, U = 16.50, P < 0.001, U = 8.00, P < 0.001, U = 80.50, P < 0.001; U = 157.00, P = 0.001, UI = 0, P < 0.001, U = 0, P < 0.001, U = 85.00, P < 0.001; U = 184.00, P = 0.007, U = 13.50, P < 0.001, U = 21.00, P < 0.001, U = 110.50, P < 0.001$);按 CD3⁺T 细胞、CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞、CD4⁺/CD8⁺ 比值、NK 细胞顺序(LSD-*t* 具体值未显示);CHB 与 LC 组比较,在 CD3⁺T 细胞、CD4⁺T 细胞、CD4⁺/CD8⁺ 比值及 NK 细胞间,差别均无显著统计学意义($P = 0.116; P = 0.327; U = 193.00, P = 0.012; U = 212.50, P = 0.031$),但在 CD8⁺T 细胞间,差别有显著统计学意义($U = 176.00, P = 0.005$);LC 与 CSH 组比较,在 CD4⁺/CD8⁺ 比值及 NK 细胞百分比间,差别有显著统计学意义($U = 71.50, P = 0.003; U = 58.00, P = 0.001$),而 CD3⁺T 细胞、CD4⁺T 细胞及 CD8⁺T 细胞的差别则无显著统计学意义($P = 0.233; P = 0.169; U = 107.50, P = 0.055$)。

二、研究对象外周血 T 细胞亚群及 NK 细胞间的直线相关分析(表 2)

表 2 外周血 T 细胞亚群及 NK 细胞间的相关分析[r(P)]

	CD3 ⁺ T 细胞%	CD4 ⁺ T 细胞%	CD8 ⁺ T 细胞%	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	NK 细胞%
CD3 ⁺ T 细胞%	1				
CD4 ⁺ T 细胞%	0.168(0.114)	1			
CD8 ⁺ T 细胞%	0.699(0.000)	-0.341(0.001)	1		
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	-0.459(0.000)	0.667(0.000)	-0.853(0.000)	1	
NK 细胞%	-0.679(0.000)	0.077(0.470)	-0.646(0.000)	0.570(0.000)	1

注:(0.000)表示 $P < 0.001$

由表 2 可见,CD3⁺T 细胞与 CD8⁺T 细胞百分比呈正相关,与 CD4⁺/CD8⁺ 比值、NK 细胞百分比呈负相关;CD4⁺T 细胞与 CD8⁺T 细胞百分比呈负相关,与 CD4⁺/CD8⁺ 比值呈正相关;CD8⁺T 细胞百分比与 CD4⁺/CD8⁺ 比值、NK 细胞百分比呈负相关;CD4⁺/CD8⁺ 比值与 NK 细胞呈正相关。

三、CHB 患者外周血 T 细胞亚群及 NK 细胞与肝功能、HBV DNA 水平直线相关分析(表 3)

表 3 CHB 外周血 T 细胞亚群及 NK 细胞与肝功能、HBV DNA 相关分析[r(P)]

	ALT(U/L)	AST(U/L)	TB(μmol/L)	log ₁₀ HBV DNA(拷贝/ml)
CD3 ⁺ T 细胞%	0.195(0.277)	0.123(0.495)	0.610(0.000)	0.523(0.000)
CD4 ⁺ T 细胞%	-0.036(0.843)	0.006(0.975)	0.291(0.100)	0.307(0.082)
CD8 ⁺ T 细胞%	0.156(0.386)	0.065(0.719)	0.270(0.128)	0.459(0.007)
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	-0.145(0.421)	-0.044(0.809)	-0.053(0.769)	-0.288(0.104)
NK 细胞%	-0.022(0.905)	0.010(0.957)	-0.307(0.082)	-0.545(0.001)

注:(0.000)表示 $P < 0.001$

为减少相关因素的影响,本研究仅对 CHB 患者外周血 T 细胞亚群及 NK 细胞与肝功能、HBV DNA 水平作直线相关分析。CHB 患者丙氨酸转氨酶(ALT)平均水平为(352.64 ± 50.97)U/L,天冬氨酸转氨酶(AST)平均为(192.79 ± 29.23)U/L,TB 平均(75.91 ± 12.05) $\mu\text{mol/L}$,HBV DNA 平均(6.08 ± 1.11) \log_{10} 拷贝/ml。由表中可见,CD3⁺T 细胞与 TB、HBV DNA 含量呈正相关,CD8⁺T 细胞与 HBV DNA 含量呈正相关,NK 细胞与 HBV DNA 呈负相关。

四、HBeAg 阳性与 HBeAg 阴性的 CHB 患者外周血 T 细胞亚群及 NK 细胞相对值等比较(表 4)

表 4 HBeAg 阳性与 HBeAg 阴性外周血 T 细胞亚群及 NK 细胞相对值等比较

组别	\log_{10} HBV DNA(拷贝/ml)*	CD3 ⁺ T 细胞%*	CD4 ⁺ T 细胞%*	CD8 ⁺ T 细胞%*	CD4 ⁺ /CD8 ⁺ *	NK 细胞%*
HBeAg(+)	6.46 ± 1.03	68.10 ± 9.43	30.20 ± 6.89	28.70 ± 6.21	1.10 ± 0.35	12.70 ± 8.74
HBeAg(-)	5.50 ± 0.99	66.08 ± 13.63	36.77 ± 8.05	22.69 ± 7.74	1.76 ± 0.51	18.08 ± 10.27

注:*方差齐($F=0.10, P=0.754; F=2.11, P=0.157; F=0.05, P=0.829; F=0.13, P=0.717; F=1.26, P=0.271; F=1.26, P=0.270$)

HBeAg 阳性 CHB 患者 20 例,男 16 例,女 4 例,年龄 18~43 岁,平均(31.15 ± 8.00)岁;HBeAg 阴性 CHB 患者 13 例,男 9 例,女 4 例,年龄 27~55 岁,平均(35.23 ± 7.45)岁,两组在年龄、性别上的差异无显著统计学意义($t=1.47, P=0.152; P=0.681$)。HBeAg 阳性组,CD4⁺T 细胞百分比及 CD4⁺/CD8⁺比值低于 HBeAg 阴性组,差异有显著统计学意义($t=2.50, P=0.018; t=4.41, P<0.001$);HBV DNA、CD8⁺T 细胞百分比高于 HBeAg 阴性组,差异有统计学意义($t=2.68, P=0.012; t=2.47, P=0.019$);而 CD3⁺T 细胞及 NK 细胞百分比在两组间的差异无显著统计学意义($t=0.51, P=0.617; t=1.61, P=0.117$)。

讨 论

正常情况下,机体内的 CD4⁺T 细胞主要包括辅助性/诱导性 T 细胞(Th/Ti),CD8⁺T 细胞包括抑制性/杀伤性 T 细胞(Ts/Tc),CD3⁺T 细胞水平反映成熟的总 T 淋巴细胞水平。目前已证实,HBV 感染肝细胞后并非直接破坏细胞,而是诱导机体产生免疫应答,从而导致肝脏的炎性损伤。

本研究发现,不同临床类型的慢性 HBV 感染者的外周血 T 细胞亚群及 NK 细胞相对值发生变化,表现为随着病情加重,病程迁延,CD4⁺T 细胞、CD4⁺/CD8⁺比值及 NK 细胞呈逐渐降低趋势,而 CD3⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞呈逐渐升高趋势,这在各病例组与对照组的比较以及 CHB 组与 CSH 组比较中,差异均有统计学意义,而 CD4⁺T 细胞降低、CD8⁺T 细胞升高导致 CD4⁺/CD8⁺比值降低,在 LC、CSH 组甚至出现 CD4⁺/CD8⁺比值的倒置,提示发生严重的免疫功能紊乱。HBV 感染后,Th1、Th2 总量和 Th1/Th2 比值都低下^[1],病毒感染外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC)时直接或间接破坏 Th1、Th2 细胞,其中

Th1 破坏多,功能低下,使 HBV 不能得到清除,导致持续感染和肝细胞损伤^[2]。CD4⁺T 细胞缺乏导致机体不能产生能够有效清除 HBV 的特异性 CD8⁺CTL^[3],但非特异性 CD8⁺T 细胞增多,损伤肝细胞,引起肝脏炎症^[4]。笔者认为慢性 HBV 感染者 CD8⁺T 细胞升高的一个原因是这种非特异性 CD8⁺T 细胞增多,这也可能是在 CD4⁺T 细胞下降的情况下,CD3⁺T 细胞升高的一个原因。

笔者研究发现 CHB 患者血清 TB 与 CD3⁺T 细胞呈正相关,可能正是由于非特异性 CD8⁺T 细胞增多致肝功能损害,病情进展的反映。NK 细胞在各病例组均下降,在 CSH 下降尤为显著甚至低于 LC,差异有显著统计学意义,NK 细胞还与 CD3⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞呈负相关,与 CD4⁺/CD8⁺比值呈正相关,表明 NK 细胞在抗 HBV 感染中的重要性,NK 细胞减少可能与 HBV 感染后慢性化有关,甚至可能影响病情进展。Ahmad 等^[5]认为活化的 NK 细胞在肝组织中对病毒特异性 T 细胞的活化和诱导抗病毒免疫发挥了重要作用。NK 细胞属于 Th1 样细胞,其减少后可能致 HBV 特异性 CD8⁺T 细胞减少,而非特异性 CD8⁺T 细胞增多。

通过对 CHB 患者分析发现,HBV DNA 含量与 CD3⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞呈正相关,与 NK 细胞呈负相关,结合前述 CD3⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞升高的原因,意味着高复制水平的 HBV 抑制 NK 细胞活性,导致 HBV 特异性 CD8⁺T 细胞减少,非特异性 CD8⁺T 细胞增多。在丙型肝炎的研究中发现对于 IFN- α 治疗有效的 HCV 感染者的 NK 细胞活性升高,而那些病毒量未见下降者的 NK 细胞也无明显改变^[6],反向说明高复制的 HCV 可抑制 NK 细胞活性,由此笔者推测 HBV 亦然。Rigopoulou 等^[7]也证实慢性 HBV 感染者的免疫缺陷与 HBV 复制水平一致,而通过抗病毒治疗抑制病毒复制后可恢复部分免疫功能。

对 HBeAg 阳性与 HBeAg 阴性的 CHB 患者分析后发现前者的 CD4⁺T 细胞及 CD4⁺/CD8⁺比值低于后者,而 HBV DNA 和 CD8⁺T 细胞均高于后者,且差异均具有统计学意义。血清 HBeAg 阳性是 HBV 复制活跃的一个标志,这与本研究中 HBeAg 阳性的 CHB 患者 HBV DNA 水平高于 HBeAg 阴性者的结论相符。对小鼠研究^[8,9]表明,HBeAg 诱导 Th2 细胞免疫反应,HBeAg 诱导 Th1 细胞免疫反应,若 Th2 细胞免疫反应占优势会导致特异性抗 HBcAg 的 Th1 细胞缺失,结合前述 Th1 减少后可能致 HBV 特异性 CD8⁺T 细胞减少,非特异性 CD8⁺T 细胞增多,考虑这可能是 HBeAg 阳性组,CD4⁺T 细胞及 CD4⁺/CD8⁺比值低于 HBeAg 阴性组,CD8⁺T 细胞高于 HBeAg 阴性组的一个原因。

总之,慢性 HBV 感染者外周血的 T 细胞亚群及 NK 细胞数量发生改变,且与临床类型、病情、血清 HBV DNA 水平及 HBeAg 密切相关。检测外周血 T 细胞亚群及 NK 细胞的数量,将有助于临床诊断、治疗及疗效观察。

参 考 文 献

- 1 Freeman AJ, Marinos G, French RA, et al. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection. *Immunol Cell Biol*. 2001;79: 515-536.

- 2 游晶,庄林,马永良,等. 慢性乙型肝炎的 Th 细胞亚群及相关细胞因子网络失衡. 世界华人消化杂志,2007,15:791-799.
- 3 Bertoletti A, Gehring AJ. The immune response during hepatitis B virus infection. J Gen Virol,2006,87:1439-1349.
- 4 Rehermann B. Intrahepatic T cells in hepatitis B: viral control versus liver cell injury. J Exp Med,2000,191:1263-1268.
- 5 Ahmad A, Alvarez F. Role of NK and NKT cells in the immunopathogenesis of HCV-induced hepatitis. J Leukoc Biol,2004,76:743-759.
- 6 Wozniakowska-Gesicka T, Wisniewska-Ligier M, Zeman K, et al. Prognostic value of natural killer cells monitoring in the course of IFN-alpha therapy in children with chronic hepatitis C. Pol Merkur Lekarski,2000,8:376-377.
- 7 Rigopoulou EI, Suri D, Chokshi S, et al. Lamivudine plus interleukin-12 combination therapy in chronic hepatitis B: antiviral and immunological activity. Hepatology,2005,42:1028-1036.
- 8 Milich DR, Schodel F, Hughes JL, et al. The hepatitis B virus core and e antigens elicit different Th cell subsets: antigen structure can affect Th cell phenotype. J Virol, 1997,71:2192-2201.
- 9 Milich DR, Chen MK, Hughes JL, et al. The secreted hepatitis B precore antigen can modulate the immune response to the nucleocapsid: a mechanism for persistence. J Immunol,1998,160:2013-2021.

(收稿日期:2008-09-08)

(本文编辑:温少芳)

高海兵,许利军,潘晨,等. 慢性乙型肝炎病毒感染者外周血 T 细胞亚群及 NK 细胞的特点及意义 [J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志:电子版, 2009,3(1):13-19.