维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253 - 3626(2005)04 - 0552 - 04

HBV 感染对人体 T 细胞免疫功能影响的研究

杨 炼,管小琴,陈显兵

(重庆医科大学基础医学院病理教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:通过检测乙型肝炎病毒(HBV)感染后外周血及感染肝组织内 $CD4^+$ T 和 $CD8^+$ T 细胞的数量及功能,探讨 HBV 对人体 T 细胞免疫的影响及其可能机制。方法:(1)用流式细胞仪检测 36 例 HBV 感染者和 20 例正常人外周血中 T 细胞亚群的数量。(2)用免疫组化 S - P 法检测 64 例慢性肝病的肝脏标本的 HBsAg 和 HBcAg,将 HBsAg 和(或)HBcAg 阳性的 50 例作为 HBV 感染组,而将肝组织 HBsAg 和 HBcAg 及血清病原学检查均为阴性的 10 例作为非 HBV 感染组(HBV 阴性组)。检测其中 CD4、CD8、CD25 表达情况。结果:(1)HBV 感染组外周血 T 细胞亚群测定值中,$CD4^+$ T 细胞和 $CD4^+$ T/$CD8^+$ T 比值明显低于对照组($P^b<0.05$);$CD8^+$ T 细胞升高,明显高于对照组($P^b<0.05$);(2)肝组织内浸润的淋巴细胞主要聚集在汇管区和小叶坏死区,免疫组化结果显示 HBV 感染组肝组织内的 $CD8^+$ T 和 $CD4^+$ T 细胞数量多于非 HBV 感染组,统计学上其差异有非常显著意义($P^c<0.01$)。HBV 感染组肝组织内与 T 细胞活性有关的 $CD25^+$ T 细胞数量与对照组相比有所减少,但统计学上无显著意义。结论:乙型肝炎病毒感染者外周血和肝内的 T 细胞亚群紊乱,且活性可能有下降,免疫功能受损。

【关键词】乙型肝炎病毒;T 细胞免疫;流式细胞仪;免疫组织化学

【中国图书分类法分类号】R735.7;R965.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2004 - 10 - 10

The effects of HBV infection on the ability of cellular immunity in human body

YANG Lian, et al

(*Department of Pathology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the probable mechanism of HBV effect on cellular immune system in human body by detecting the quantity and function of $CD4^+$ T and CD8 + T cells in peripheral blood and liver tisues. *Methods*: 1) The quantity of $CD4^+$ T and $CD8^+$ T cells in peripheral blood was detected by flow cytometry(FCM) in 36 patients with hepatitis B and 20 cases of controls; 2) The expressions of HBsAg and HBcAg were detected by streptavidin - peroxidase immunohistochemistry(SP). 50 cases of positive HBsAg and(or)HBcAg were selected as HBV(+) group, and 10 cases of negative HBsAg and HBcAg in liver tissue and blood serum were selected as HBV(-) group. The expressions of CD4, CD8, CD25 in liver tissues were detected in the two groups. *Results*: 1) The quantity of $CD4^+$ T cells and the ratio of $CD4^+$ T/$CD8^+$ T in peripheral blood of patients was significantly lower than those in controls; the quantity of $CD8^+$ T cells was considerably higher than that in controls. (2) T lymphoid cell infiltrates in the liver were most gathered in the lobules and the portal tract. The densities of $CD8^+$ T cells were higher in lobules and portal tracts than $CD4^+$ T cells. The quantity of CD8 + T and $CD4^+$ T cells in the liver tissues of HBV positive group showed significant difference from the liver tissues of HBV negative group($P^b<0.05$). The quantity of $CD25^+$ T related to ability of immunity in HBV positive group was less than HBV negative group, but no significant statistical difference was found between two groups. *Conclusion*: The T lymphoid subsets of peripheral blood mononuclear cells and the liver tissues of patients infected with HBV are disordered and the activity of T cells decreases, which suggests a possible weakened immunity.

【Key words】HBV; T cellular immunity; Flow cytometry; Immunohistochemistry

在慢性 HBV 感染中,血液中 $CD4^+$ T/$CD8^+$ T 比值常常是降低的,抗病毒治疗后,随着病毒负载(抗原和 HBV DNA)的下降,$CD4^+$ T 细胞数量增多,$CD4^+$ T/$CD8^+$ T 比值得以恢复,但并不能准确地反映出机体的免疫功能状态,尤其是不能反映出肝内 T 细胞亚群的改变及功能(1)。目前有关肝内的 T 细胞亚群免疫功能的研究还少有报道。

作者介绍:杨 炼(1975 -),女,讲师,硕士,主要研究方向:肝脏病理。

维普资讯 http://www.cqvip.com

本研究从外周血及肝脏组织内两方面着手,检测了 HBV 感染者外周血 T 淋巴细胞 $CD4^+$ T、$CD8^+$T 亚群的数量,并结合临床生化指标分析比较;采用免疫组化法,检测 HBV 感染者肝组织内淋巴细胞 CD4、CD8、CD25 的表达,从两方面探讨 HBV 感染对机体 T 细胞免疫功能的影响及其可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验对象和分组

血液标本:

1)HBV 感染组:本校附属第一医院 2002 年 9 月到 10 月门诊及住院病人.根据 HBV 血清病原性检测阳性,肝功能及临床症状,排除其他疾病,确定为 HBV 感染者 36 例其中男性 24 例,女性 12 例,年龄 12~56 岁,平均年龄 31 岁。

2)正常对照组:门诊体检者,排除心、肺等重大疾病,血清乙肝病原检测阴性,共 20 例,平均年龄 33.1 岁。两组间性别、年龄无差异。所有血液标本均经肝素抗凝处理后,送我校儿童医院进行流式细胞仪检测 T 细胞亚群情况。

肝脏组织标本:

收集本校附属第一医院 1996~2002 年手术切除标本存档蜡块及肝穿组织 64 例及其血清病原学资料,以免疫组化方法检测 HBsAg 和 HBcAg 并将 50 例肝组织内 HBsAg 和 HBcAg 阳性者作为 HBV 感染组;而将 10 例肝组织 HBsAg 和(或)HBcAg 及血清病原学检查均为阴性者作为非 HBV 感染组(HBV 阴性组),有 10 例。

1.2 药品与方法

流式细胞术采用美国 BD 公司的 simulpest IMK 试剂盒。免疫组化用鼠 HBsAg 单克隆抗体、兔 HBcAg 多克隆抗体及 S-P 试剂盒均购自福州迈新公司;鼠 CD25、CD4、CD8 单克隆抗体购自美国 NEoMARKERS 公司。免疫组化详细步骤按试剂说明书要求进行。

结果判断:血液标本:$CD3^+$、$CD4^+$、$CD8^+$、$CD16^+56^+$、$CD4^+/CD8^+$系列直接采用流式细胞仪自动读数;肝组织内 $CD4^+$T、$CD8^+$T、$CD25^+$T 细胞采用淋巴细胞计数,选择十个有淋巴细胞浸润的事业,计数 100 个淋巴细胞中的阳性淋巴细胞数,取其平均值。

1.3 统计学处理

流式细胞检测的全部数据采用微机输入 SPSS 数据库后,进行成组设计资料样本均数比较 t 检验和直线相关分析。免疫组化结果输入 SPSS 数据库后,进行 t 检验。

2 结 果

2.1 流式细胞仪结果

正常对照组血清病原学检查及肝功能检查均正常,T 细胞亚群与 HBV 感染组外周血 T 细胞亚群比较的结果如表 1。

表 1 两组外周血 T 细胞亚群的百分率比较

	例数	CD3%	CD4%	CD8%	CD4/CD8	$CD3/CD16^+56^+$%
对照组	20	66.5±5.90	39.7±6.0	24.3±6.3	1.65±0.35	25.8±6.6
HBV 感染组	36	67.32±11.1	32.6±10.4	29.8±8.5	1.20±0.52	23.57±10.9
t 值	0.181	1.731	1.825	41.99	0.48	
P	P>0.05	P<0.05	P<0.05	P<0.05	P>0.05	

表 2 外周血淋巴细胞中 $CD3^+$、$CD4^+$、$CD8^+$、$CD16^+56^+$、$CD4^+/CD8^+$的相互间变化的相关分析

	CD3%	CD4/CD8	CD4%	CD8%	$CD3/CD16^+56^+$%
CD3%	1.000	–	–	–	–
CD4/CD8%	-0.152(0.414)	1.000	–	–	–
CD4%	0.428(0.016)	0.781(0.000)	1.000	–	–
CD8%	0.620(0.000)	-0.738(0.000)	-0.233(0.208)	1.000	–
CD3/CD16+56%	-0.898(0.000)	0.042(0.823)	-0.527(0.002)	-0.493(0.005)	1.000

注:'( )'表示相关显著性水平的 P 值,其中的'0.000'表示 $P<0.001$

HBV 感染组外周血 T 细胞亚群测定值中,CD4 细胞和 CD4/CD8 比值低于对照组,统计学有显著意义($P<0.05$);CD8 细胞高于对照组,统计学有显著意义($P<0.05$)。

T 细胞亚群之间的相关分析见表 2。从上表中可以看出 $CD16^+56^+$ 与 $CD3^+$、$CD4^+/CD8^+$ 负相关;$CD8^+$ 与 $CD3^+$ 正相关而与 $CD4^+/CD8^+$ 负相关;$CD4^+$ 与 $CD3^+$、$CD4^+/CD8^+$ 正相关。

HBV 感染组外周血 T 细胞亚群 CD3、CD4、CD8、$CD16^+56^+$、CD4/CD8 分别与肝功能各指标作相关分析,结果提示 $CD8^+$ 与丙氨酸氨基转移酶(ALT,$R=0.391$,$P=0.03<0.05$)、门冬氨酸氨基

维普资讯 http://www.cqvip.com

转移酶(AST, $R=0.368$, $P=0.042<0.05$)呈正相关。

2.2 免疫组化结果

光镜下观察所有病例(HBV 感染组 50 例,非 HBV 感染组 10 例)的 HE 切片,可见肝细胞或肝癌细胞变性、坏死等病变及不同程度的肝细胞坏死灶和汇管区炎症细胞浸润(图 1)。

免疫组化结果显示慢性肝炎及肝硬化组织中 CD8 主要表达在坏死灶和汇管区,$CD4^+$T 细胞多见于汇管区,也有个别枯氏细胞、内皮细胞及肝细胞表达 CD4。肝癌组织中炎性细胞浸润灶较少,炎细胞表达 CD4 和 CD8,且以 CD8 为主(图 2、图 3、图 4)。总的来说,$CD4^+$T 细胞数量少于 $CD8^+$T 细胞数量。CD25 主要在具有活性的 T 细胞胞膜上表达,在肝细胞坏死区和汇管区的淋巴细胞及在肝细胞、内皮细胞等可见 CD25 的表达。

HBV 感染组和非 HBV 感染组的 CD4、CD8、CD25 表达的比较见表 3。

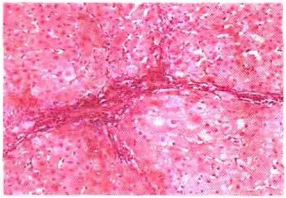


图 1 肝硬化组织的淋巴细胞聚集在汇管区 HE 染色 (×200 倍)

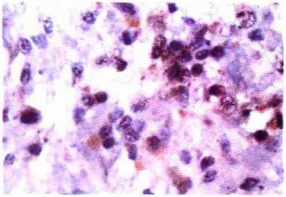


图 2 CD4 在肝组织浸润的淋巴细胞的表达免疫组化 (SP 法×1000 倍)

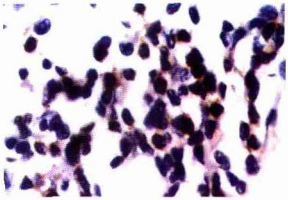


图 3 CD8 在肝组织浸润的淋巴细胞的表达免疫组化 (SP 法×1000 倍)

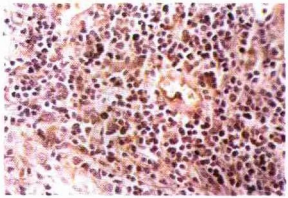


图 4 CD25 在肝组织浸润的淋巴细胞的表达免疫组化 (SP 法×400 倍)

表 3 HBV 阳性组与 HBV 阴性两组间 $CD4^+$T, $CD8^+$T, $CD25^+$T 表达的差异

组别	例数	$CD4^+$T	$CD8^+$T	$CD25^+$T	$CD4^+$T/$CD8^+$T
HBV(−)	10	0.97c	1.79c	9.82a	0.33a
HBV(+)	50	3.55c	9.42c	8.15a	0.38a

a 经 t 检验,两组间比较,$Pa>0.05$, $Pb<0.05$, $Pc<0.01$

在 HBV 感染组 $CD8^+$T 淋巴细胞平均为 8.14 每百个淋巴细胞,$CD4^+$T 细胞为 3.56 每百个淋巴细胞,与非 HBV 感染组相比有非常显著差异($Pc<0.01$)。而 $CD25^+$T 在 HBV 阳性组有减少的趋势,但在统计学上与 HBV 阴性组比较无显著差异($Pa>0.05$)。

3 讨 论

T 细胞免疫在 HBV 感染中对病毒的清除、控制和肝组织病理损伤起主要作用,并对疾病的转归有重要影响。

T 细胞亚群可以反映机体基本细胞免疫状态,$CD4^+$T/$CD8^+$T 比值可以在一定程度上反映机体细胞免疫调节功能。在慢性 HBV 感染中,$CD4^+$T/

维普资讯 http://www.cqvip.com

$CD8^+$ T 比值常常是降低的，抗病毒治疗后，随着病毒负载(抗原和 HBV DNA)的下降，$CD4^+$ T 细胞数量增多，$CD4^+$ T/$CD8^+$ T 比值得以恢复。我们的实验发现在 HBV 感染者外周血出现 $CD4^+$ T 细胞数量下降、$CD8^+$ T 细胞数量升高导致 $CD4^+$ T/$CD8^+$ T 比值下降并同时伴随转氨酶升高，肝功能下降，并且 $CD8^+$ T 数量与丙氨酸氨基转移酶(ALT)、门冬氨酸氨基转移酶(AST)呈正相关。此结果与已有的研究结果相符合(2～3)。而 $CD4^+$ T 和 $CD8^+$ T 细胞总数并没有太大改变，$CD16^+56^+$ 即 NK 细胞也与正常对照没有区别，但有研究发现肝硬化患者的 NK 细胞的绝对细胞数显著低于对照组和轻中度患者(4)。本研究没有发现此区别。在肝组织内 T 细胞免疫的研究较少，我的实验发现聚集在肝组织内的 $CD8^+$ T 细胞绝对数量多于 $CD4^+$ T 细胞数倍，与国外研究资料结果相同(5～6)，但国外实验发现在肝坏死区聚集的 T 淋巴细胞多为 $CD8^+$ T 细胞，而汇管区聚集的 T 淋巴细胞则以 $CD4^+$ T 居多。这点与本研究结果不同，无论在汇管区还是在坏死的小叶区，浸润的淋巴细胞均以 $CD8^+$ T 细胞占优势。

CD25 是低亲和性膜门细胞介素 2 受体(mIL－2R)的 α 链，主要分布于活化 T 淋巴细胞表面，是活化 T 细胞标志(7)。但目前也有人发现 $CD4CD25^+$ T 可抑制调节 T 细胞活化与增殖，因此，CD25 是否只能激活和调节 T/B/NK 细胞的功能并促进增殖，还有争议。但金秀国[8]等用流式细胞术定量检测了 150 例不同肝病患者外周血 $CD25^+$ T 细胞含量，结果显示各肝病患者 $CD25^+$ T 细胞含量均明显低于正常对照组。说明肝病患者 T 细胞活性明显低下，这也可能是导致慢性肝病患者对病毒产生耐受，使病毒难以消除、病情迁延不愈的一个重要因素。本实验结果显示肝组织内 HBV 标志阴性组的 $CD25^+$ T 细胞为 9.8 个每百个淋巴细胞，而 HBV 标志阳性组的 $CD25^+$ T 细胞为 8.14 个每百个淋巴细胞，但可以看出 HBV 标志阳性组的 $CD25^+$ T 细胞数量有减少的趋势，但统计学上来说没有显著意义，可能还需扩大样本量，尤其是 HBV 标志阴性组的样本量。

近年来，我国的 HIV 的感染率不断上升，并有不少患者同时合并 HBV 感染。由于 $CD4^+$ T 细胞是 HIV 攻击的主要靶细胞，可使外周血 $CD4^+$ T 细胞数目显著减少和功能严重受损，$CD4^+$ T 和 $CD8^+$ T 细胞比值下降；而由本实验可看出 HBV 感染者本就可导致 $CD4^+$ T 细胞数目减少，T 细胞功能下降，HBV 感染者可能易受 HIV 感染易使病情恶化。与 HBV 单独感染相比，合并感染 HIV 者体内有较高的 HBV DNA 聚合酶链反应，较低的 ALT、白蛋白水平、抗 HBe 和抗 HBs 的血清转化率也较低，且有证据表明 HIV 能加快 HBV 感染者向失代偿性肝硬化转变的过程[9]。就目前研究资料来看，很多研究都已经提出证据认为 HIV 能加快 HBV 感染的病程，降低生存率。合并感染 HIV 可使肝炎患者病情加重，但几个前瞻性研究还没有发现 HBV 影响 HIV 的证据。因此，HBV 与 HIV 是否具有相互协同的作用，需要进一步研究。由于我国 HBV 感染者众多，因其所存在的 T 细胞紊乱可能为 HIV 的感染提供有利条件，因此有必要对此保持关注。

参 考 文 献

[1] Maini MK, Boni C, Lee CK, et al. The role of virus－specific $CD8^+$ cellsin liver damage and viral control during persistent hepatitis B virus infection[J]. J Exp Med, 2000; 191: 1269－1280.

[2] 杨婉凤，金树根，汤小青，等. 肝脏患者外周血 $CD4^+$、$CD8^+$ 和 $CD16^+56^+$ 细胞亚群变化[J]. 世界肿瘤杂志，2002; 1(2): 119－122.

[3] 曹兴国，詹龙娥，汪向红. 乙型病毒性肝炎 T 淋巴细胞亚群的测定及其意义[J]. 南京铁道医学院学报，2000; 19(1): 55－56.

[4] 王 敏，王复生，刘敬超. 慢性乙型肝炎患者外周血淋巴细胞亚群与病程相关性研究[J]. 肝脏，2003; 8(2): 18－20.

[5] Jean－francois M, MD, Bach－nga P, et al. Relationship between composition of lymphoid cell infiltractes in the liver and replication status in chronic hepatitis B replication status in chronic hepatitis B[J]. Anatomic Pathology, 1996; 10: 625－633.

[6] Keiichi A, Takashi K, Kyouichi I, et al. Immunohistochemical investigation of hepatitis B virus associated antigens HLA antigens and lymphocyte subsets in type B chronic hepatitis[J]. Gastroenterologia Japonica, 1990; 25(1): 41－53.

[7] 孙文辉，邱国强，吴浩清. CD25 在检测恶性肿瘤中的临床研究[J]. 中国肿瘤临床与康复，1998; 5(1): 17.

[8] 金秀国，方国安，刘 波. 不同肝病患者外周血 $CD25^+$ 细胞检测的临床意义[J]. 浙江医学，2000; 22(8): 466－467.

[9] Puoti M, Airoldi M, Bruno R. Hepatitis B virus co－infection in human immunodeficieny virus－infected subjects[J]. Aids Rev, 2002; 4(1): 27－35.