DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.06.041
第23卷第6期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 6
2001年6月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jun. 2001

文章编号:1000-5404(2001)06-0713-03

论著

慢性乙型肝炎患者 PBMC Fas 表达和凋亡的检测及意义

李 玲[1],顾长海[1],李 欣[2],颜 杰[3],刘 俊[1] (第三军医大学:[1]附属西南医院全军感染病研究所;[3]高原军事医学系卫生统计学教研室,重庆 400038;[2]重庆医科大学附属儿童医院中心实验室,重庆 400014)

提 要:目的 探讨活化诱导细胞死亡(Activation-induced cell death, AICD)在乙型肝炎发病机制中的意义。方法 分离30例乙型肝炎患者和12例健康献血员外周血单个核细胞(PBMC),利用间接免疫荧光染色法,通过流式细胞仪检测PBMC Fas的表达;分离20例乙型肝炎病人和10例健康献血员PBMC,在PHA-P的刺激下短期培养,采用PI染色法,经流式细胞仪检测PBMC的凋亡。结果 慢性乙型肝炎组PBMC Fas表达率[(53.31±14.53)%]高于正常对照组PBMC Fas表达率[(39.32±11.28)%, $P<0.05$]和慢性重型乙型肝炎组PBMC Fas表达率[(37.93±15.89)%, $P<0.01$]。慢性乙型肝炎组PBMC凋亡率[(30.57±13.43)%]高于正常对照组PBMC凋亡率[(11.45±5.27)%, $P<0.01$]和慢性重型乙型肝炎组PBMC凋亡率[(13.59±6.44)%, $P<0.01$];HBeAg(+)组PBMC凋亡率高于正常对照组PBMC凋亡率[(29.50±12.25)% vs (11.45±5.27)%, $P<0.01$]。结论 HBV感染能诱导慢性乙型肝炎外周血淋巴细胞Fas表达增加,通过Fas/FasL途径使Fas+淋巴细胞发生AICD,这可能是形成HBV慢性感染免疫耐受的一个重要机制。

关键词:慢性乙型肝炎;活化诱导细胞死亡;Fas;免疫耐受
中图法分类号:R329.28;R394.2;R512.62 文献标识码:A

Fas expression and apoptosis of peripheral blood lymphocytes in patients with chronic hepatitis B and its significance

LI Ling, GU Chang-hai, LI Xin, YAN Jie, LIU Jun (Research Institute for Infectious Disease of Chinese PLA, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abastract: Objective To study the significance of AICD in the pathogenesis of hepatitis B. Methods The peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from 30 patients with hepatitis B and 12 healthy blood donors. The expression of Fas was assayed with flow cytometry. The peripheral blood mononuclear cells were isolated from 20 patients with hepatitis B and 10 healthy blood donors. Then the PBMC were cultured with PHA-P for 72 hours *in vitro*. The apoptosis of the PBMC was stained with PI and assayed with flow cytometry. Results The expression rate of Fas of PBMC in chronic hepatitis B [(53.31±14.53)%] was significantly higher than that in healthy blood donors [(39.32±11.28)%, $P<0.05$] and chronic severe hepatitis B [(37.93±15.89)%, $P<0.01$]. The apoptosis rate of PBMC in chronic hepatitis B [(30.57±13.43)%] was significantly higher than that in healthy blood donors [(11.45±5.27)%, $P<0.01$] and in chronic severe hepatitis B [(13.59±6.44)%, $P<0.01$]. The apoptosis rate of PBMC in HBeAg(+) patients was significantly higher than that in healthy blood donors [(29.50±12.25)% *vs* (11.45±5.27)%, $P<0.01$]. Conclusion These results show that the increase of Fas expression of PBMC can be induced in hepatitis B infection. AICD of Fas positive lymphocytes may be induced by Fas/FasL. AICD may be an important mechanism in the formation of immune tolerance in HBV chronic infection.

Key words: chronic hepatitis B; AICD; Fas; Immune tolerance

细胞免疫是机体对抗病毒感染的重要防御机制,而病毒则具有若干反防御手段。近年来发现外周血成熟淋巴细胞存在活化后细胞死亡的现象即活化诱导细胞死亡(Activation-induced cell death, AICD),现已发现某些病毒能通过诱导外周血淋巴细胞发生AICD以削弱和逃避机体免疫。迄今,乙型病毒性肝炎慢性化和重型化的机制仍不甚明了,据认为可能与AICD有一定关系。本实验分离乙型病毒性肝炎病人与正常人外周血单个核细胞(PBMC),利用鼠抗人Fas单抗和FITC标记羊抗鼠多抗的间接免疫染色法,通过流式细胞仪检测PBMC Fas的表达;利用乙型病毒性肝炎病人与正常人外周血PBMC在PHA刺激下短期培养,通过流式细胞仪检测PBMC发生的凋亡,并进行相互比较,以探讨AICD在乙型病毒性肝炎慢性化和重型化中的作用。

1 材料和方法

1.1 研究对象

1.1.1 PBMC Fas表达率检测组 30例住院乙型肝炎患者,诊断均符合1995年病毒性肝炎防治方案所定标准,男27例,女3例,年龄21~53岁,平均(34.43±7.51)岁。其中慢性乙型肝炎16例,慢性重型乙型肝炎14例。12例健康人取自我院输血科献血员,男9例,女3例,年龄27~45岁,平均(36.25±5.26)岁。

1.1.2 PBMC凋亡检测组 20例住院乙型肝炎患者均符合1995年病毒性肝炎防治方案所定标准,男18人,女2人,年龄

作者简介:李 玲(1963-),女,重庆市人,博士研究生,主治医师,主要从事有关乙型病毒性肝炎发病机制方面的研究。电话:(023)68773068
收稿日期:2000-12-03;修回日期:2001-03-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

22~44岁，平均(34.45±5.20)岁。其中慢性乙型肝炎14例，慢性重型肝炎6例。10例健康人取自我院输血科献血员，男8人，女2人，年龄28~45岁，平均(36.00±5.83)岁。

1.2 外周血淋巴细胞的分离

无菌抽取肝素抗凝全血6~8 ml，用淋巴细胞分离液(上海化学试剂二厂产品)，按常规分离PBMC，经2%台盼蓝染色证实活细胞>95%。

1.3 PBMC Fas表达率的检测

将PBMC调成1×10^6/ml浓度，每一小管加1 ml(共2管)，1 500 r/min离心5 min弃上清，加PBS振荡混匀，1 500 r/min离心洗涤5 min×2弃上清，一管加Fas鼠抗人单抗10 μl(美国ZYMED公司产品)，另一管设为对照管不加Fas单抗，放置4 ℃ 60 min，加PBS振荡混匀，1 500 r/min离心洗涤5 min×2弃上清，2管皆加入FITC标记羊抗鼠多抗10 μl(美国PHARMINGEN公司产品)，4 ℃ 60 min，加PBS振荡混匀，1 500 r/min离心5 min×2弃上清，加入PBS 0.3 ml，混匀后上流式细胞仪检测。

1.4 细胞培养

将PBMC调成1×10^6/ml浓度，每孔接种1 ml于12孔培养板上，加植物血凝素(PHA-P，美国SIGMA公司产品)10 μg/每孔，37 ℃ 5%CO_2培养箱孵育72 h。培养液为含10%小牛血清(我科自制)及青霉素100 U/ml、链霉素100 μg/ml的RPMI 1 640(美国GIBCOBRL公司产品)。

1.5 凋亡细胞的检测

收取培养细胞，加PBS后，1 500 r/min离心洗涤5 min×2弃上清，0.5 ml PBS重悬细胞，加70%乙醇2 ml 4 ℃固定细胞至少2 h，再加PBS 1 500 r/min×5 min离心洗涤细胞，加PI染液(含PI，RNA酶及Triton。美国SIGMA公司产品)0.5 ml 37 ℃孵育30 min，上流式细胞仪检测(美国BECTON-DICKINSON公司产品)细胞周期，以G_1峰左侧出现亚二倍体细胞群的峰型来检测凋亡细胞。

1.6 统计学分析

多组资料均数差别比较采用方差分析(SPSS10.0统计软件分析)。

2 结果

2.1 正常对照组、慢性乙型肝炎组、慢性重型乙型肝炎组PBMC Fas表达率的比较，见表1

表1 正常对照组、慢性乙型肝炎组、慢性重型乙型肝炎组PBMC Fas表达率的比较

Tab 1 Comparison of Fas expression rate among normal control, chronic hepatitis B and chronic severe hepatitis B group

	n	Fas(%)
Control	12	39.32±11.28
Chronic hepatitis B	16	53.31±14.53 *△
Chronic severe hepatitis B	14	37.93±15.89

*: $P<0.05$ vs control; △: $P<0.01$ vs chronic severe hepatitis B

慢性乙型肝炎组PBMC Fas表达率最高[(53.31±14.53)%]，高于正常对照组PBMC Fas表达率[(39.32±11.28)%，$P<0.05$]和慢性重型乙型肝炎组PBMC Fas表达率[(37.93±15.89)%，$P<0.01$]；慢性重型乙型肝炎组PBMC Fas表达率与正常对照组PBMC Fas表达率两组之间差异无显著性($P>0.05$)。

2.2 正常对照组、慢性乙型肝炎HBeAg(+)组、HBeAg(-)组PBMC Fas表达率的比较，见表2

表2 正常对照组、乙型肝炎HBeAg(+)组、HBeAg(-)组PBMC Fas表达率的比较

Tab 2 Comparison of Fas expression rate among normal control, HBeAg(+) and HBeAg(-) hepatitis B group

	n	Fas(%)
Control	12	39.32±11.28
HBeAg(+) hepatitis B	11	43.66±14.25
HBeAg(-) hepatitis B	19	47.56±18.38

HBeAg(+)慢性乙型肝炎组PBMC Fas表达率[(43.66±14.25)%]和HBeAg(-)慢性乙型肝炎组PBMC Fas表达率[(47.56±18.38)%]较高，似高于正常对照组PBMC Fas表达率[39.32±11.28)%]，但3组间差异无显著性，P值皆大于0.05。

2.3 正常对照组、慢性乙型肝炎组、慢性重型乙型肝炎组PBMC经PHA-P刺激培养72 h后凋亡率的比较，见表3

表3 正常对照组、慢性乙型肝炎组、慢性重型乙型肝炎组PBMC凋亡率的比较

Tab 3 Comparison of PBMC apoptosis rate among normal control, chronic hepatitis B and chronic severe hepatitis B group

	n	Apoptosis(%)
Control	10	11.45±5.27
Chronic hepatitis B	14	30.57±13.43 *△
Chronic severe hepatitis B	6	13.59±6.44

*: $P<0.01$ vs control; △: $P<0.01$ vs chronic severe hepatitis B

慢性乙型肝炎组PBMC凋亡率为最高[(30.57±13.43)%]，显著高于正常对照组PBMC凋亡率[(11.45±5.27)%，$P<0.01$]及慢性重型乙型肝炎组的凋亡率[(13.59±6.44)%，$P<0.01$]；慢性重型乙型肝炎组PBMC凋亡率与正常对照组PBMC凋亡率两组之间差异无显著性($P>0.05$)。

2.4 正常对照组、慢性乙型肝炎HBeAg(+)组、HBeAg(-)组经PHA-P刺激培养72 h后PBMC凋亡率的比较，见表4

表4 正常对照组、乙型肝炎HBeAg(+)组、HBeAg(-)组PBMC凋亡率的比较

Tab 4 Comparison of PBMC apoptosis rate among normal control, HBeAg(+) and HBeAg(-) hepatitis B group

	n	Apoptosis(%)
Control	10	11.45±5.27
HBeAg(+) hepatitis B	9	29.50±12.25 *
HBeAg(-) hepatitis B	11	22.19±15.15

*: $P<0.01$ vs control

HBeAg(+)乙型肝炎组PBMC凋亡率显著高于正常对照组PBMC凋亡率[(29.50±12.25)% vs (11.45±5.27)%，$P<0.01$]；HBeAg(-)乙型肝炎组PBMC凋亡率与正常对照组PBMC凋亡率两组之间差异无显著性($P>0.05$)。

3 讨论

Fas又称Apo-1或CD_{95}，广泛表达于机体各种组织

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

细胞表面, 抗 Fas 抗体或 Fas 配体(FasL)与 Fas 结合后, 可诱导 Fas+细胞凋亡, 故 Fas 又被称为"死亡受体"。近年发现 AICD 现象, 即成熟的外周血淋巴细胞被抗原刺激活化后在抗原、CD_3/TCR 单抗或 PHA 的再刺激下可发生凋亡[1~3]。研究发现 20%~30%的反应性 T 细胞在同种抗原的再刺激下发生凋亡[2,4]。AICD 现象被称作本体自杀性调节(Propriocidal regulation), 是一种生理性调节机制, 可限制淋巴细胞发生过强过度的免疫反应, 但同时可致外周免疫耐受[2~7]。

细胞免疫是机体清除病毒感染的重要机制, 然而病毒在进化过程中也演化出若干能对抗机体免疫的能力。现已发现一些病毒能通过诱导外周血淋巴细胞发生 AICD 以逃避机体免疫[8], 如淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)可引起 CD_8^+ T 细胞发生 AICD[9]。I 型单纯庖疹病毒(HSV-1)与淋巴细胞孵育后, 可引起 CD_4^+ T 细胞发生 AICD[10]。人免疫缺陷病毒(HIV)主要以人 CD_4^+ T 细胞为宿主细胞[11], 并通过凋亡等途径导致 CD_4^+ T 细胞的破坏。Taya 等[12] 报道, HCV 病人外周血 PBMC 表达大量的 Fas, 其血清可溶性 FasL(sFasL)也比正常对照显著增高, 且与 PBMC 的数量呈负相关。乙型肝炎慢性化和重型化机制现仍不甚明了。HBV 是否也具有这种诱导外周血淋巴细胞凋亡的能力呢? 针对此问题, 本实验分离乙型病毒性肝炎病人与正常人外周血 PBMC, 利用鼠抗人 Fas 单抗和 FITC 标记羊抗鼠多抗的间接免疫染色法, 通过流式细胞仪检测 PBMC Fas 的表达; 利用乙型病毒性肝炎病人与正常人外周血 PBMC 在 PHA 刺激下短期培养, 通过流式细胞仪检测 PBMC 发生的凋亡, 并进行相互比较。

结果发现乙型病毒性肝炎外周血淋巴细胞存在 AICD 现象, 我们在预实验中曾数次用新鲜分离的慢性乙型肝炎病人外周血 PBMC 经流式细胞仪进行凋亡的检测, 结果未能查见明显凋亡细胞, 这与有关报道是相符的[3]。本实验显示新鲜分离的外周血 PBMC 虽未查见明显凋亡细胞, 但存在着不同程度的 Fas 表达, 未被单核巨噬细胞吞噬的在 HBV 作用下已处于凋亡敏感期的 Fas+PBMC 在体外经 PHA 刺激培养下则发生明显凋亡。慢性乙型肝炎组 PBMC Fas 表达率和凋亡率皆明显高于正常对照组和慢性重型乙型肝炎组; HBeAg(+)组 PBMC 凋亡率明显高于正常对照组。结果显示 HBV 感染有诱导外周血淋巴细胞 AICD 的能力, 慢性乙型肝炎 PBMC Fas 表达的增加, 可能通过 Fas/FasL 的途径使表达 Fas 的淋巴细胞发生凋亡, 从而使得淋巴细胞的活力和数量减少, 不利于病毒的清除, 使 HBV 得以持续感染。由凋亡引起的淋巴细胞减少或活性下降可能是导致 HBV 慢性感染的一个重要原因。慢性重型乙型肝炎组 PBMC Fas 表达率和凋亡率比慢性乙型肝炎组低, 显示肝炎患者 PBMC 的凋亡率低, 这有利于 HBV 的清除, 但易致肝组织严重的免疫病理损伤。另一方面, 也应考虑是否由于慢性感染患者的免疫系统在与 HBV 长期战斗中, 淋巴细胞反复发生 AICD, 至重型化阶段已造成反应性淋巴细胞的耗竭和活化反应低下, 因而其 PBMC 发生的 AICD 也随之减少之故。HBeAg(+)组与 HBeAg(-)组 PBMC Fas 表达率和凋亡率比较, 差异无显著性($P>0.05$)。已有报道[13], 重组 HBcAg 可刺激慢性乙型肝炎病人 $CD3^+$ 淋巴细胞发生 AICD, 定量检测各型肝炎病人体内 HBV DNA 和 HBV 抗原水平与 PBMC AICD 的关系, 可能有助于进一步阐明 AICD 与乙型肝炎慢性化、重型化的相关性。

参考文献:

[1] Webb S, Morris C, Sprent J. Extrathymic tolerance of mature T cell: clonal elimination as a consequence of immunity[J]. Cell, 1990, 63(6): 1 249-1 256.

[2] Kabelitz D, Pohl T, Pechhold K. Activation-induced cell death (apoptosis) of mature peripheral T lymphocytes[J]. Immunol Today, 1998, 14(7): 338-339.

[3] Wesselborg S, Janssen O, Kabelitz D. Induction of activation-driven death (apoptosis) in activated but not resting peripheral blood T cells[J]. J Immunol, 1993, 150(10): 4 338-4 345.

[4] Critchfield J M, Pflucker J C Z, Lenardo M J. Parameters controlling the programmed death of mature mouse T lymphocyte in high-dose suppression [J]. Cell Immunol, 1995, 160(1): 71-78.

[5] Kawabe Y, Ochi A. Programmed cell death and extrathymic reduction of $V\beta8^+CD_4^+$T cells in mice tolerant to staphylococcus aureus enterotoxin B [J]. Nature, 1991, 349(6 306): 245-248.

[6] Rahelu M, Williams G T, Kumaratne D S, *et al*. Human CD_4^+ cytolytic T cells kill antigen-pulsed target T cells by induction of apoptosis[J]. J Immunol, 1993, 150(11): 4 856-4 866.

[7] Berard M, Casmayor-Pallleja C, Billian G, *et al*. Activation sensitizes human memory B cells to B-cell receptor-induced apoptosis[J]. Immunology, 1999, 98(1): 47-54.

[8] Sieg S, Huang Y, Kaplan D. Viral regulation of CD95 expression and apoptosis in T lymphocytes[J]. J Immunol, 1997, 159(3): 1 193-1 199.

[9] Kyburz D, Aichele P, Speiser D E, *et al*. T cell immunity after a viral infection versus T cell tolerance induced by soluble viral peptides[J]. Eur J Immunol, 1993, 23(8): 1 956-1 962.

[10] Ito M, Watanabe M, Kamiya H, *et al*. Herpes simplex virus type 1 induces apoptosis in peripheral blood T lymphocytes[J]. J Infec Dis, 1997, 175(5): 1 220-1 224.

[11] Gougeon M L, Lecoeur H, Dulioust A, *et al*. Programmed cell death in peripheral lymphocytes from HIV-infected persons[J]. J Immunol, 1996, 156(9): 3 509-3 520.

[12] Taya N, Torimoto Y, Shindo M, *et al*. Fas-mediated apoptosis of peripheral blood mononuclear cells in patients with hepatitis C[J]. Br J Haematol, 2000, 110(1): 89-97.

[13] Nakamura K, Yuh K, Sugyo S, *et al*. Apoptosis observed in peripheral T lymphocytes from patients with chronic hepatitis B[J]. Gastroenterology, 1996, 111(1): 156-164.

(编辑　陈聪连)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net