

# CD68 在慢性乙型肝炎发病机制的临床初步研究

陈治东 管世鹤 杨凯 张浩 姚杰 程婉秋

**摘要** 目的 分析健康人群和慢性乙型肝炎(CHB)患者 CD68 表达情况,研究 CD68 表达与乙型肝炎病毒(HBV)血清学、肝功能等相关性。方法 分析血清、外周血单个核细胞(PBMC) CD68 含量及 mRNA 表达水平;采用免疫组化染色技术分析 PBMC 与肝组织 CD68 表达情况;运用实时荧光定量 PCR 检测患者外周血病毒载量及其基因分型。分别以 *t* 检验和 Pearson 相关性检验分析 CD68 在 CHB 患者与健康对照血清中差异及其与其它指标相关性。结果 与健康对照组比较,CHB 组血清 CD68 含量显著升高,且与 HBV DNA 载量、ALT、AST 水平呈显著正相关性( $r=0.3550$ ,  $P=0.0014$ ;  $r=0.3450$ ,  $P=0.0020$ ;  $r=0.3289$ ,  $P=0.0033$ ),而与乙肝表面抗原(HBsAg)含量、HBV 基因分型及乙肝 e 抗原(HBeAg)状态无相关性( $r=0.085$ ,  $P=0.459$ ;  $t=1.251$ ,  $P=0.215$ ;  $t=1.293$ ,  $P=0.200$ )。CD68 在 CHB 组和健康对照组 PBMC 中 mRNA 和蛋白表达水平差异无统计学意义,但 CHB 组肝组织 CD68 含量显著高于健康对照组。结论 CHB 患者 CD68 与病毒复制及肝细胞损伤密切相关,且在肝组织呈现较高表达,提示 CD68 在慢性乙型肝炎发病机制中可能具有重要作用。

**关键词** CD68;慢性乙型肝炎;乙型肝炎病毒

中图分类号 R 446.62

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)08-1271-05  
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.08.022

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)是一种双链 DNA 嗜肝病毒,感染人体后引起急慢性肝炎、肝纤维化、肝硬化甚至肝癌<sup>[1-2]</sup>。目前,全球约有 2.48 亿感染人群,其中我国慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)患者约为 2 000 万<sup>[3-6]</sup>。研究<sup>[6]</sup>表明,HBV 感染介导的间接免疫损伤是急慢性肝炎发病及病情进展重要机制。其中,以肝脏免疫细胞激活及其相关细胞因子分泌为特征的机体固有免疫,

在 HBV 感染早期发挥重要作用<sup>[1]</sup>。枯否细胞(Kupffer cells, KC)作为肝脏巨噬细胞,其激活不仅参与 CHB 患者肝脏固有免疫,还在抗病毒治疗过程中发挥重要功能<sup>[7]</sup>。CD68 是一种糖基化跨膜蛋白,在人体单核细胞和组织巨噬细胞均有表达,其含量与细胞激活状态密切相关,常用于研究巨噬细胞功能。据报道,HBV 及其结构蛋白能通过肝脏 CD68 阳性细胞 NF- $\kappa$ B 信号途径而上调白介素(IL)-1 $\beta$ 、IL-6、趋化因子配体 8(chemokine cc-motif ligand 8, CXCL8)和肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)等细胞因子分泌<sup>[2]</sup>。然而,目前关于 CHB 患者 CD68 含量及其与 HBV 感染关系尚未明。该研究拟通过分析比较 CHB 患者和健康对照者血清 CD68 分子含量及其与肝功能指标及 HBV 血清学标志物间关系,同时检测 CHB 患者外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)及肝组织 CD68 的表达情况,以探讨 CD68 能否作为评估 CHB 患者肝脏损伤程度及 HBV 病毒载量的免疫学指标。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 试剂和仪器** 人 CD68 分子检测试剂盒购自上海源叶生物科技有限公司;HBV DNA 定量和 HBV 基因分型诊断试剂盒购自上海复星长征医学科学有限公司;密度梯度分离液购自天津灏洋华科生物科技有限公司;RNA 提取、逆转录试剂盒购自美国 Thermo scientific 公司;聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction, PCR)试剂盒购自日本 TaKaRa 公司;CD68 单克隆抗体购自美国 Bioworld technology 公司;CD68 mRNA 引物购自生工生物工程上海股份有限公司;二抗及免疫组化试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司;荧光定量 PCR 仪 Agilent M $\times$ 3000P 购自美国 Stratagene 公司;酶标仪 KHB ST-360 购自上海科华实验系统有限公司。

**1.1.2 病例资料** 选取慢性乙型肝炎患者共计 78 例,男 53 例,女 25 例。按照《慢性乙型肝炎防治指南(2015 年版)》慢性乙型肝炎诊断标准:既往有乙型肝炎病史或乙肝表面抗原(HBsAg)阳性超过 6 个

2018-04-15 接收

基金项目:安徽省卫生计生委科研计划项目(全科医学临床科研课题)(编号:2016QK014);安徽省教育厅高等学校省级质量工程项目(编号:2016jxttd059)

作者单位:安徽医科大学第二附属医院检验科,合肥 230601

作者简介:陈治东 男 硕士研究生;

管世鹤 男,教授,主任技师,博士生导师,责任作者, E-mail: shiheguan@126.com

月。

排除标准:① HIV 病毒、丙型肝炎病毒及其它种类病毒感染;② 酒精性肝炎、药物性肝损伤、肝脏内外与胆管有梗阻或者占位病变;③ 较严重肝硬化及肝癌;④ 感染性疾病、心血管疾病、内分泌疾病、恶性肿瘤;⑤ 自身免疫性肝病、原发性硬化性胆管炎及其它自身免疫性疾病;⑥ 接受免疫增强或者免疫抑制药物治疗。选择同期体检人群健康者 84 例作为健康对照组。

1.2 方法

1.2.1 肝功能指标及 HBV 相关指标定量检测 肝功能指标、甲胎蛋白(alpha fetal protein ,AFP)及 HBV 血清学指标分析分别由西门子全自动生化分析仪 Dimension® EXL™ with LM、罗氏全自动电化学发光分析仪 Cobas e602 和雅培全自动化学发光分析仪 i4000 SR 检测。HBV DNA 定量和分型检测操作按照检测试剂盒说明书步骤。本研究所有涉及指标检测在安徽医科大学第二附属医院检验科完成,且试剂、质控品、定标品均在有效期内。

1.2.2 血清 CD68 分子测定 按照检测试剂盒说明书步骤 标准品孔加不同浓度标准品 50 μl;样本孔加待测样品 10 μl,再加稀释液 40 μl;加入酶标记抗体 100 μl,封板,37 °C 温育 60 min 后洗板;加入底物 A、B 各 50 μl,37 °C 避光孵育 15 min 后,加终止液 50 μl,15 min 内使用酶标仪 KHB ST-360 在波长 450 nm 处测定各孔的 OD 值。绘制标准曲线,按照曲线方程计算各样本浓度值。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 检测 PBMC 中 CD68 mRNA 水平 TRIzol 法提取 PBMC 总 RNA,逆转录成 cDNA。CD68 上游引物:5'-CATTCCCCTATGGA-CACCTCA-3',下游引物:5'-GTCTCCGGATGATG-CAGAAAG-3';β-actin 上游引物:5'-CCTGGCAC-CCAGACAAT-3',下游引物:5'-GGGCCGGACTCGT-CATAC-3'。扩增程序:37 °C 2 min;94 °C 保温 2 min;94 °C 15 s→56 °C 45 s,循环 40 次;72 °C 5 min。56 °C 采集荧光信号。

1.2.4 免疫组织化学染色检测 PBMC 及肝组织 CD68 的表达 PBMC 细胞染色:PBMC 置于洁净载玻片 0.4% 多聚甲醛固定 20 min。0.5% Triton X-100 通透 20 min。3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 孵育 15 min。加预稀释 CD68 单克隆抗体 37 °C 孵育 60 min。加二抗 37 °C 孵育 30 min。加二氨基联苯胺(DAB),室温下避光孵育 3 min。95% 乙醇 1 min,无水乙醇 1 min 加少量树脂封片。

免疫组化:肝穿组织组织切片后脱蜡、抗原修复 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浸泡 10 min,血清封闭 37 °C 温箱 30 min;加一抗(1:100)37 °C 温箱 90 min,加酶标二抗 37 °C 30 min,加 DAB 显色剂;冲洗后,苏木精复染 30 s;依次放入 70% 酒精、80% 酒精、90% 酒精、95% 酒精、100% 酒精、100% 酒精、二甲苯、二甲苯;中性树脂封片。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行分析,两组定量数据和定性数据分别采用 t 检验或 χ<sup>2</sup> 检验;相关性分析采用 Pearson 检验。以 P < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 人口学特征及实验室指标 本研究纳入 CHB 组 78 例,健康对照组 84 例,两组年龄及性别无统计差异无统计学意义。CHB 组丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase ,ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransaminase ,AST)、谷酰转肽酶(gamma - glutamyl transpeptidase ,GGT)、总胆红素(total bilirubin ,TBIL)、直接胆红素(direct bilirubin ,DBIL)显著高于健康对照组,碱性磷酸酶(alkaline phosphatase ,ALP)、AFP 无显著差异。见表 1。

表 1 研究对象基线资料(x̄ ± s)

项目	CHB 组 (n = 78)	健康对照组 (n = 84)	P 值	t/χ <sup>2</sup> 值
年龄(岁)	33.42 ± 11.07	34.95 ± 10.99	0.752	0.363
性别(男/女)	53/25	49/35	0.205	1.604
ALT(U/L)	74.38 ± 32.96	20.64 ± 9.14	<0.001	14.365
AST(U/L)	47.71 ± 21.58	21.83 ± 5.03	<0.001	10.689
GGT(U/L)	39.44 ± 17.96	26.50 ± 12.85	<0.001	5.300
ALP(U/L)	84.48 ± 24.84	78.94 ± 19.06	0.111	1.601
TBIL(μmol/L)	14.19 ± 5.97	11.18 ± 2.67	<0.001	4.189
DBIL(μmol/L)	3.62 ± 1.82	2.15 ± 0.93	<0.001	6.551
AFP(IU/L)	2.86 ± 2.17	2.68 ± 1.52	0.676	0.419

2.2 血清 CD68 含量与 HBV 血清学指标相关性分析 CHB 组血清 CD68 含量明显高于健康对照组(P < 0.001),且与 HBV DNA 载量的增高趋势相一致,即 CHB 组血清 CD68 与 HBV DNA 呈正相关性(r = 0.355 0, P = 0.001 4),而与 HBsAg 含量无显著相关性(r = 0.085, P = 0.459)。进一步分析 CD68 与 HBV 基因型、乙肝 e 抗原(HBeAg)(-/+ )相关性显示,B 型(40 例)和 C 型(38 例)CHB 患者血清 CD68 含量分别为(0.188 ± 0.033) pg/L、(0.196 ± 0.027) pg/L,差异无统计学意义(P =

0.215); HBeAg (+) 与 HBeAg (-) CHB 患者血清 CD68 含量分别为 (0.186 ± 0.043) pg/L、(0.195 ± 0.020) pg/L, 差异亦无统计学意义 ( $P = 0.200$ )。见图 1。

**2.3 血清 CD68 水平与肝功能关系相关性分析**  
ALT、AST、TBIL、DBIL、GGT 和 ALP 是评估肝脏损伤程度常用的生化指标, 尤其 ALT 和 AST 在慢性乙型肝炎临床分期和治疗中具有重要意义。通过分析 CHB 组血清 CD68 与肝脏损伤指标显示, 血清 CD68 与 ALT 和 AST 均呈正相关性 ( $r = 0.3450, P = 0.0020$ ;  $r = 0.3289, P = 0.0033$ ), 而与其它肝脏生物化学指标 TBIL、DBIL、GGT、ALP 间无显著相关

性。见图 2。

**2.4 PBMC 中 CD68 mRNA 表达** RT-PCR 检测结果显示, CHB 组患者 PBMC CD68 mRNA 相对表达量为 (15.71 ± 15.04), 健康对照者 PBMC CD68 mRNA 相对表达量为 (13.95 ± 14.01); 两组间相对表达量差异无统计学意义 ( $P = 0.6680$ )。

**2.5 肝组织及 PBMC 中 CD68 表达** 免疫组化染色结果显示, CD68 阳性细胞呈棕褐色, 正常肝组织未见, CHB 患者肝组织 CD68 表达明显升高, 主要分布于门脉及肝小叶内, 见图 3A、3B。此外, CD68 均可见于 CHB 患者与健康对照者 PBMC, 呈低表达, 且无明显差异, 见图 3C、3D。

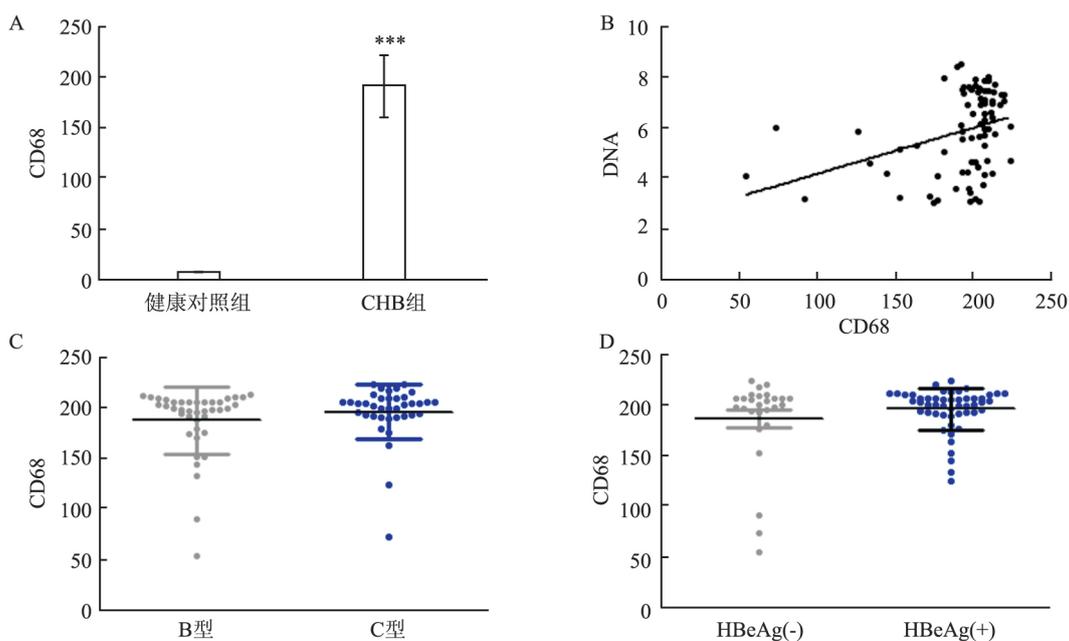


图 1 血清 CD68 含量与乙肝血清学指标关系

A: 健康对照组与 CHB 组患者血清 CD68 表达水平比较; 与健康对照组比较: \*\*\*  $P < 0.0001$ ; B: CHB 患者血清 CD68 含量与 HBV DNA 载量相关性分析; C: CHB 患者血清 CD68 含量与 HBV 基因型对应关系; D: CHB 患者血清 CD68 含量与 HBeAg 状态对应关系

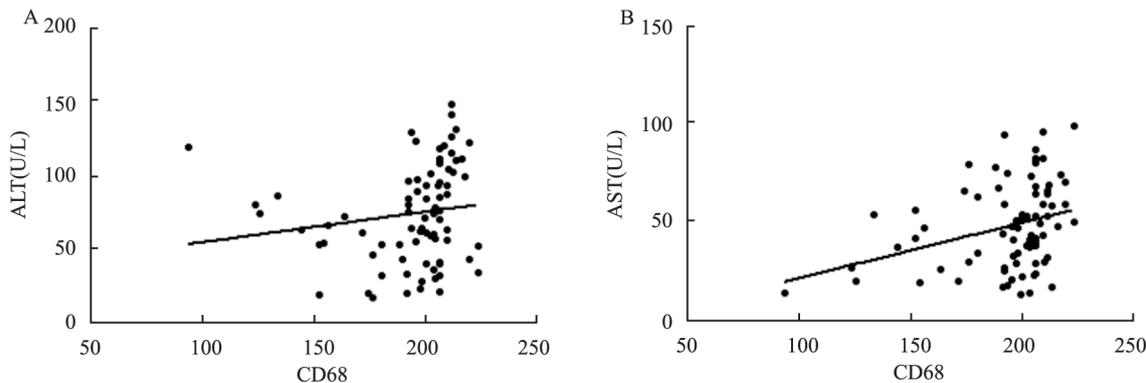


图 2 CHB 组 CD68 含量与肝功能指标关系

A: CHB 组 CD68 含量与 ALT 相关性分析; B: CHB 组 CD68 含量与 AST 相关性分析

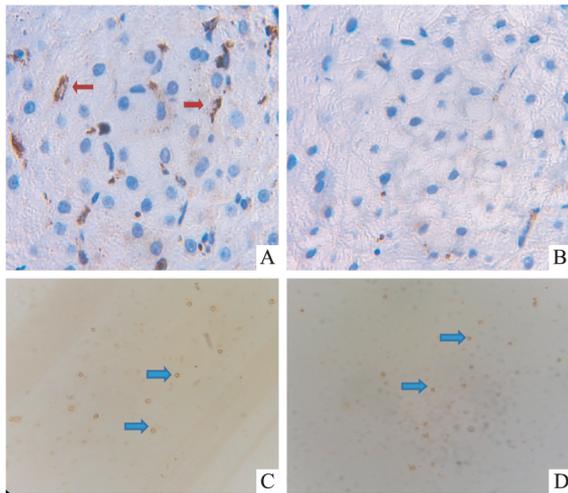


图3 肝组织及PBMC免疫组化染色结果

A:CHB患者肝组织 ×1 000;B:对照组肝组织 ×1 000;C:CHB患者PBMC ×400;D:对照组PBMC ×400;红色箭头:肝组织中CD68阳性细胞呈棕褐色;蓝色箭头:PBMC

### 3 讨论

慢性乙型肝炎病毒感染过程是HBV复制和宿主免疫反应之间相互作用的动态过程。肝脏免疫功能依赖于其组织结构,包括肝细胞、KC、NK细胞、NKT细胞等固有免疫细胞组成复杂肝脏免疫系统。其中KC约占肝脏非实质细胞的30%以上,数量显著高于T细胞。在HBV感染初期凭借诱导炎症细胞因子干扰素α(IFN-α)和IL-6发挥重要的固有免疫功能<sup>[8]</sup>。CD68分子是巨噬细胞的重要表面标记,常用于巨噬细胞鉴定和功能研究。目前,已明确CD68在HBV相关慢加急性肝衰竭、自身免疫性肝病、疟疾、肿瘤等疾病当中均能发挥重要免疫功能<sup>[9-10]</sup>。然而,CD68分子与CHB发病关系并未完全阐明。

本研究显示,CHB组患者血清CD68分子含量明显高于健康对照组,且与CHB组患者HBV DNA载量呈正相关性,提示CHB患者体内病毒复制活跃能刺激巨噬细胞激活并释放CD68分子。这与刘渊等<sup>[11]</sup>研究发现CHB患者肝组织中CD68阳性巨噬细胞数量明显高于健康对照组结论相符。在动物模型研究中,Kouwaki et al<sup>[12]</sup>发现HBV感染早期肝脏F4/80阳性NK细胞产生针对HBV病毒的干扰素-γ。然而,本研究未显示血清CD68分子含量和HBV血清学指标HBsAg含量及HBeAg状态呈显著相关性。HBV感染细胞模型研究显示,HBsAg可以通过CD1d依赖途径干扰细胞内脂质环境进而激活NKT细胞<sup>[13]</sup>。HBsAg可以选择性地阻断JNK-MARK通路,抑制单

核/巨噬细胞TLR2配体诱导的IL-12生成,HBV借此逃避免疫清除作用<sup>[14]</sup>。CD68分子含量在HBV DNA载量与HBsAg含量及HBeAg状态存在差异,究其原因可能与HBV分泌的相关病毒抗原组分诱导肝脏产生免疫抑制效应,包括巨噬细胞呈低反应性有关。本地区流行HBV基因型主要为B型与C型,研究显示血清CD68分子含量B型、C型CHB患者间无显著差异。该两种基因型HBV均可刺激巨噬细胞活化并增加机体CD68分子释放。血清ALT与AST是临床评估肝脏功能最常用的诊断指标,血清CD68含量与ALT、AST明显正相关。即CHB患者血清CD68含量随ALT和AST升高而逐渐升高,提示CD68与CHB患者肝脏免疫损伤及疾病严重程度也密切相关。

此外,本研究显示PBMC CD68 mRNA和蛋白的表达在CHB患者与健康对照者间比较差异无统计学意义。在PBMC中表达CD68的单个核细胞较少,其表达的mRNA量也比较少。CD68在PBMC与血清中差异性表达,提示血清中高表达CD68分子可能源于PBMC外细胞分泌。免疫组织化学染色结果显示,CD68在CHB患者肝组织的表达升高,主要分布于门脉及肝小叶区域,推测升高CD68可能体现HBV感染后巨噬细胞在肝脏局部微环境中增殖分化,通过调节免疫应答反应,参与慢性乙型肝炎疾病发展。

总之,免疫学标志物与疾病进展及抗病毒疗效日益受到关注。本研究结果表明,CD68分子除了可作为巨噬细胞表面标志物,还可能通过参与病毒复制和肝脏免疫,具有潜在评估CHB患者临床诊疗新型指标。后续从HBV感染诱导巨噬细胞分泌CD68分子机制入手,深入研究HBV与机体固有免疫相互作用关系,并探讨抗病毒治疗过程中CD68含量的动态变化,以阐明巨噬细胞CD68分子在病毒感染、复制及抗病毒治疗中可能存在的效应机制,为最终揭示HBV致病机制奠定理论基础。

### 参考文献

- [1] Busca A. Innate immune responses in hepatitis B virus (HBV) infection [J]. Virol J, 2014, 11(1):22.
- [2] Boltjes A, Movita D, Boonstra A. The role of Kupffer cells in hepatitis B and hepatitis C virus infections [J]. J Hepatol, 2014, 61(3): 660-71.
- [3] Ott JJ, Horn J, Krause G. Time trends of chronic HBV infection over prior decades -A global analysis [J]. J Hepatol, 2017, 66(1):48-54.
- [4] Schweitzer A, Horn J, Mikolajczyk R T, et al. Estimations of worldwide prevalence of chronic hepatitis B virus infection: a systematic review of data published between 1965 and 2013 [J]. Lancet, 2015,

- 386 (10003):1546–55.
- [5] Wang F S, Fan J G, Zhang Z *et al.* The global burden of liver disease: the major impact of China[J]. *Hepatology* 2014 60(6):2099–108.
- [6] 王贵强, 王福生, 成军 等. 慢性乙型肝炎防治指南(2015年版)[J]. *实用肝脏病杂志* 2016 19(3):1–18.
- [7] Zhang Z, Zhang J Y, Wang L F. Immunopathogenesis and prognostic immune markers of chronic hepatitis B virus infection[J]. *J Gastroenterol Hepatol* 2012 27(2):223–30.
- [8] Cheng X, Xia Y, Serti E *et al.* Hepatitis B virus evades innate immunity of hepatocytes but activates cytokine production by macrophages[J]. *Hepatology* 2017 66(6):1779–93.
- [9] Arterbery A S, Osafo-Addo A, Avitzur Y *et al.* Production of proinflammatory cytokines by monocytes in liver-transplanted recipients with De Novo autoimmune hepatitis is enhanced and induces TH1-like regulatory T cells[J]. *J Immunol* 2016 196(10):4040–51.
- [10] Qu Q X, Huang Q, Shen Y *et al.* The increase of circulating PD-L1-expressing CD68(+) macrophage in ovarian cancer[J]. *Tumour Biol* 2016 37(4):5031–7.
- [11] 刘渊, 卞兆连, 刘莹波 等. IL-17可能通过巨噬细胞参与慢性乙型肝炎发病[J]. *肝脏* 2015 20(6):453–6.
- [12] Kouwaki T, Fukushima Y, Daito T *et al.* Extracellular vesicles including exosomes regulate innate immune responses to hepatitis B virus infection[J]. *Front Immunol* 2016 7:335.
- [13] Zeissig S, Murata K, Sweet L *et al.* Hepatitis B virus-induced lipid alterations contribute to natural killer T cell-dependent protective immunity[J]. *Nat Med* 2012 18(7):1060–8.
- [14] Wang S, Chen Z, Hu C *et al.* Hepatitis B virus surface antigen selectively inhibits TLR2 ligand-induced IL-12 production in monocytes/macrophages by interfering with JNK activation[J]. *J Immunol* 2013 190(10):5142–51.

## Preliminary clinical study of CD68 in the pathogenesis of chronic hepatitis B

Chen Zhidong, Guan Shihe, Yang Kai, *et al*

(Dept of Laboratory, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

**Abstract Objective** To investigate the levels of CD68 in healthy controls and patients with chronic hepatitis B (CHB), and analyze whether it is associated with HBV markers as well as liver function indexes. **Methods** The levels of CD68 in serum and peripheral blood mononuclear cell (PBMC) were analyzed. Both the expression of CD68 in PBMC and hepatic tissue specimens were used to analyze by immunohistochemical (IHC) methods. Moreover, HBV DNA load and HBV genotype were detected by Real-Time PCR. The serum and PBMC levels of CD68, liver function indexes in patients with CHB and healthy controls were compared by *t* test. Meanwhile, the association between CD68 with HBV markers and liver function indexes were analysed using by Pearson correlation test. **Results** Compared with healthy controls, serum CD68 levels in patients with CHB were significantly increased, and positively correlated with HBV DNA load, ALT and AST, respectively ( $r = 0.3550$ ,  $P = 0.0014$ ;  $r = 0.3450$ ,  $P = 0.0020$ ;  $r = 0.3289$ ,  $P = 0.0033$ ). In contrast, there was no correlation between CD68 with hepatitis B surface antigen (HBsAg) quantification, HBV genotype and hepatitis B e antigen (HBeAg) status ( $r = 0.085$ ,  $P = 0.459$ ;  $t = 1.251$ ,  $P = 0.215$ ;  $t = 1.293$ ,  $P = 0.200$ ). There was no significant difference of CD68 in PBMC between CHB patients and healthy controls. However, the expression of CD68 in liver specimens of CHB patients was markedly higher than that in healthy controls. **Conclusion** The CD68 concentrations closely relate to HBV replication and liver injury in patients with CHB, especially high expression in liver of CHB patients, suggesting that it might plays an important roles of pathogenesis in CHB patients.

**Key words** CD68; chronic hepatitis B; HBV