

网络出版时间: 2015-12-30 14:38 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20151230.1438.038.html>

◇ 临床医学研究 ◇

慢性 HBV 感染 HBsAg 含量与 T、B 淋巴细胞亚群及 NK 细胞相关性

聂琳¹ 杨丽莎² 彭德珍³ 张敏¹ 王君宜¹

摘要 目的 探讨慢性乙型肝炎病毒(HBV)感染免疫不全状态(非活动期)乙型肝炎表面抗原(HBsAg)含量与外周血 T、B 淋巴细胞亚群及 NK 细胞的相关性。方法 收集慢性 HBV 感染免疫不全状态(非活动期)者 34 例、健康者 20 例,采用流式细胞仪检测其外周血 T、B 淋巴细胞亚群及 NK 细胞百分比,实时荧光探针定量-聚合酶链反应(FQ-PCR)方法检测 HBsAg 的含量。结果 HBsAg 的含量与 B 淋巴细胞百分比呈正相关性($P < 0.05$),高 HBsAg 含量组的 B 淋巴细胞高于健康组与低 HBsAg 含量组,差异有统计学意义($P < 0.05$),与 T 淋巴细胞及 NK 细胞无相关性。结论 在慢性 HBV 感染免疫不全状态(非活动期)的人群中,HBsAg 含量在一定程度上能反映患者的免疫状态,外周血淋巴细胞亚群和 NK 细胞检测对于了解患者免疫状态有一定的临床价值。

关键词 乙肝病毒表面抗原含量; T 淋巴细胞; B 淋巴细胞;

自然杀伤细胞; 免疫不全状态(非活动期)

中图分类号 R 446.11; R 373.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)01-0082-04

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染是全球性的健康问题。而乙肝表面抗原(hepatitis B surface antigen, HBsAg)作为乙肝病毒的包膜蛋白是 HBV 感染的标志,在感染者体内大量存在,作为人体的异种蛋白,其持续存在对人体的作用了解的并不多。《慢性乙型肝炎防治指南(2010)年版》将婴幼儿时期 HBV 感染的自然史分为 4 个时期:免疫耐受期、免疫清除期、非活动或低(非)复制期、再活动期,但并不是所有的 HBV 感染者都经历以上时期^[1]。该实验通过检测非活动期的 HBV 感染人群的外周血 T、B 细胞亚群和 NK 细胞的百分比以及 HBsAg 含量,了解 HBsAg 含量对人体的免疫作用。

1 材料与方法

1.1 病例资料 选取 2014 年 9 月~2015 年 2 月在桂林医学院附属医院门诊体检的免疫不全状态(非

2015-10-13 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81260602)

作者单位:桂林医学院附属医院¹ 消化内科、² 中医科、³ 检验科,桂林 541001

作者简介:聂琳,女,硕士研究生;

杨丽莎,女,教授,硕士生导师,责任作者, E-mail: yangsha@glmc.edu.cn

cells by 5-fluorouracil and its possible mechanism. **Methods** The HepG2 inhibiting rate by 5-fluorouracil after alone or jointly acting on cells was detected by MTT method; cells apoptosis was detected by Hoechst33342 staining. The expressions of ERK1/2, p-ERK1/2, PARP, Cleaved PARP, Cleaved caspase 3 and Cleaved caspase 9 proteins were measured by Western blot. **Results** MTT staining showed that 5-fluorouracil inhibited the proliferation of HepG2 cells and presented dose and time-dependence. Furthermore, combining the Astragaloside II with 5-fluorouracil could further significantly enhance the effect of 5-fluorouracil on cancer cells inhibition ($P < 0.05$). Western blot result proved that combining the Astragaloside II with 5-fluorouracil could increase the expression of Cleaved PARP ($P < 0.05$). Hoechst33342 staining result further validated the level of apoptosis cells was far more increased in the combination group than the 5-fluorouracil group. Moreover, Western blot result also showed that Astragaloside II inhibited the phosphorylation of ERK1/2. Combining the inhibitor of ERK1/2 (PD98059) with 5-fluorouracil may increase apoptosis rate and the expressions of apoptosis related proteins like Cleaved caspase3, Cleaved caspase 9 in HepG2 cells. Astragaloside II showed negative increasing trend of apoptosis rate and the expressions of apoptosis related proteins like Cleaved caspase 3, Cleaved caspase 9 by 5-fluorouracil after blocking ERK1/2 in HepG2 cells. **Conclusion** Astragaloside II could increase inhibition of human hepatic cancer HepG2 cells by 5-fluorouracil, and the mechanism may be related to inhibiting p-ERK1/2 pathway.

Key words Astragaloside II; 5-fluorouracil; HepG2 cells; cell apoptosis

活动期)者34例,其中男20例,女14例,年龄21~59(36.88±11.45)岁。正常对照组20例,男12例,女8例,年龄18~50(35.42±8.27)岁,均为健康献血员。患者年龄、性别差异无统计学意义。

1.2 研究对象纳入、排除及分组情况

1.2.1 研究对象纳入标准 选择在门诊体检的慢性HBV感染不同免疫状态(非活动期)人群,诊断标准主要依据《慢性乙型肝炎防治指南(2010年版)》^[1]中非活动或低(非)复制期的诊断标准。免疫不全状态(非活动期):血清HBV标志物HBsAg、抗-HBe、抗-HBc阳性,肝功能谷丙转氨酶(ALT)基本正常,HBV-DNA低于检测下限,1年内连续3次以上肝功能ALT均在正常范围。所有的参与者未接受过抗病毒治疗和免疫治疗。所有受试者签署了自愿参加临床科研实验的知情同意书。

1.2.2 研究对象排除标准 ①排除其他类型肝炎病毒感染;②近期无服用影响免疫等药物情况;③已明确诊断为肝硬化、肝癌者;④合并心、脑、肾、肺功能障碍及糖尿病等已明确的疾病诊断;⑤无自身免疫性疾病史、嗜酒史及肝毒性药物使用史;⑥近期无致病的细菌病毒感染等疾病。

1.2.3 根据HBsAg定量分组情况 根据HBsAg的最高值466.20 ng/ml与最低值1.07 ng/ml之差,均分为3组,低含量组0~155.00 ng/ml,均数 \bar{x} = 62.07 ng/ml,例数 n = 13;中含量组155.01~310.00 ng/ml,均数 \bar{x} = 240.29 ng/ml,例数 n = 11;高含量组310.01~470.00 ng/ml,均数 \bar{x} = 406.21 ng/ml,例数 n = 10。由于所查文献并没有关于HBsAg定量高或者低的分类标准,所以均分HBsAg含量,以了解HBsAg含量增高对人体免疫的影响。

1.3 方法

1.3.1 检测HBV血清标志物(HBsAg、HBsAb、HBeAg、HBeAb、HBcAb) 采用时间分辨免疫荧光分析法,仪器为上海新波生物技术有限公司ANY-TEST2000时间分辨仪。

1.3.2 定量检测HBV-DNA 采用实时荧光探针定量-聚合酶链反应(FQ-PCR)方法,仪器为MJ Opticon Monitor实时荧光定量PCR仪(美国MJ Research公司)。

1.3.3 血细胞分析 采用全自动血液分析仪进行分析。

1.3.4 外周血淋巴细胞亚群检测方法 采用四色荧光标记流式细胞术(flow cytometry, FCM)进行分析。实验试剂:四色淋巴细胞亚群试剂、溶血素、

0.01 mol/L磷酸盐缓冲液(PBS)、乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝血。主要仪器:采用美国Beckman Coulter公司的EPICS-xL流式细胞仪。

1.4 统计学处理 采用SPSS 18.0统计软件进行分析,用Spearman以及Pearson相关分析方法分析HBsAg定量与免疫细胞之间关系以及各免疫细胞之间的相关性,用 t 检验分析免疫不全状态(非活动期)组与健康人群的免疫细胞百分比差异,统计学显著检验水准为0.05(双侧),以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义,用方差分析法分析高含量组与低含量组及健康组间的差异,统计学显著检验水准为0.05(双侧),以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫不全状态(非活动期)组与健康人群的T、B淋巴细胞亚群和NK细胞百分比 免疫不全状态(非活动期)组的T、B淋巴细胞以及NK细胞百分比与健康组的T、B淋巴细胞亚群以及NK细胞百分比比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表1。

表1 免疫不全状态(非活动期)组和健康组
T、B淋巴细胞和NK细胞百分比($\bar{x} \pm s$)

项目	非活动期组	健康组	t 值
CD3 ⁺ 细胞(%)	67.10±9.45	69.12±7.44	-0.817
B细胞(%)	11.96±3.24	10.52±2.67	1.680
NK细胞(%)	12.58±6.19	11.68±4.09	0.580
CD4 ⁺ 细胞(%)	34.29±7.72	37.06±6.98	-1.320
CD8 ⁺ 细胞(%)	24.35±6.35	24.34±3.27	0.000
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	1.54±0.67	1.55±0.38	0.000

2.2 免疫不全状态(非活动期)组的HBsAg定量与T、B淋巴细胞亚群和NK细胞百分比之间的相关性 HBsAg与B淋巴细胞呈正相关性,Spearman相关系数为 $r_s = 0.37$;在置信区间(双侧)为0.05时,相关性显著($P < 0.05$)。在置信区间(双侧)为0.05时,与T淋巴细胞亚群和NK细胞百分比无明显相关性。高、中、低含量组及健康组B淋巴细胞百分比分别为(13.44±3.64)、(11.61±1.72)、(10.78±3.51)、(10.52±2.67)。高含量组B淋巴细胞百分比与低含量组以及健康组比较,差异有统计学意义($F = 2.87$, $P < 0.05$)。

2.3 免疫不全状态(非活动期)组的T、B淋巴细胞和NK细胞百分比之间的关系 免疫不全状态(非活动期)组CD3⁺细胞与CD56⁺细胞之间呈负相关性,Pearson相关系数 $r = -0.886$,在置信区间(双侧)为0.05时,相关性显著($P < 0.05$)。其他免疫

细胞之间无相关性。

3 讨论

1968 年 Blumberg et al^[2] 首次报道了 HBsAg 是 HBV 感染的标志物。从确定其为乙型肝炎的病毒标志物以来,人类与乙肝病毒的斗争已经持续了 40 余年。乙肝病毒抗体至少有 3 个系统,即 HBsAg 系统(HBsAg 和抗 HBs)、核心抗原抗体系统(HBcAg 和抗 HBc)、e 抗原抗体系统(HBeAg 和抗 HBe); HBV 表达的 HBsAg 和 HBeAg 都是胸腺依赖性抗原,而 HBcAg 是胸腺依赖性非胸腺依赖性抗原^[3]。因此,HBV 感染患者虽然细胞免疫低下,体内任然可出现抗 HBc,但很少出现抗 HBe 或抗 HBs。临床病程中当患者 HBeAg 阴转的同时出现抗 HBe 则提示机体的细胞免疫有所好转。但是 e 抗原血清学转换的患者极少出现 HBsAg 的血清学转换,而且很多的肝硬化、肝癌患者也都是小三阳人群,病毒的复制并不高,人体的细胞免疫也大致恢复了,可是有些患者的身体状况却更差了,因此持续存在的 HBsAg 对人体作用的重要性显而易见。

一些学者对 HBsAg 做了一些相关的研究,在 HBsAg 定量方面:首先,HBsAg 定量与 HBV DNA 联用可以识别非活动性携带者。Brunetto et al^[4] 分析了意大利 209 例未治疗和无症状的携带者发现:HBsAg < 1 000 IU/ml 和 HBV DNA < 2 000 IU/ml 能识别 3 年非活动状态诊断的正确率是 94.3%,敏感性 91.1%,特异性 95.4%,阳性预测值 87.9%,阴性预测值 96.7%。本研究对象的选择正是这样的未治疗、无症状、复制阴性的小三阳人群,尽量的排除 DNA 复制、药物、e 抗原等对免疫的作用从而观察 HBsAg 含量对免疫的影响。

研究^[5] 显示在 HBeAg 阴性且 HBV DNA < 2 000 IU/ml 时,决定肝细胞癌(HCC)的因素包括性别、年龄、ALT 水平、HBsAg \geq 1 000 IU/ml,HBsAg > 1 000 IU/ml 成为了在 e 抗原阴性、DNA 低复制的人群中预测肝癌的重要指标。肝癌的发生与乙肝病毒有着密切的联系,目前的大多数观点认为,免疫介导的损伤是 HBV 感染肝细胞损害的主要原因^[6-7]。免疫作用在 HBV 感染以及肝炎的发生过程中扮演着“双刃剑”的角色^[8-9]。理想的免疫应答可通过中和病毒颗粒、清除被感染细胞以及抑制病毒复制等方式对抗病毒入侵;而不理想者,免疫细胞和细胞因子引起的炎症反应将导致部分慢性 HBV 感染患者的肝细胞损伤和坏死,持续性的损伤可导致肝纤

维化、肝硬化和肝细胞癌等病变。在本实验中研究对象与健康对照组人群的 T、B 淋巴细胞亚群和 NK 细胞百分比差异无统计学意义,可能是由于本实验的样本数较少,存在误差,同时可能与选择的实验人群是健康的携带者有关。

众所周知,B 淋巴细胞经过抗原的刺激后可以产生抗体,在体液免疫中发挥着重要作用,HBV 的抗原系统均能诱导抗体产生体液免疫应答,但是中和抗体只针对病毒的包膜蛋白,迄今为止,最明确的具有中和病毒作用的保护型抗体是抗 HBs。在本实验中乙肝 HBsAg 含量与 B 淋巴细胞有明显的相关性,高含量组的 B 淋巴细胞与低含量组和健康组方差分析是有统计学差异的,经 LSD 两两对比是有意义的。因此,推测乙肝 HBsAg 的持续存在刺激着 B 细胞的增殖分化,但是 B 细胞的功能不足以产生抗 HBs,从而清除 HBsAg。因此在临床中很多的患者不会发生 HBsAg 的血清学转换。而有报道^[10] 显示北京协和医院肝外科医师认为,根据我国的临床经验,大部分乙肝相关性肝癌患者在最初确诊时,多为丙氨酸转移酶正常的小三阳患者,不应忽略乙肝小三阳与肝癌的关联性。这部分患者恰恰因为其乙肝相关检查多为正常或者阴性而最容易被忽略,他们在临床上的受重视程度远低于大三阳、活动性肝炎患者。如此多的肝硬化、肝癌患者是小三阳人群,推测一方面可能是由于乙肝病毒携带多年,在人体免疫系统的作用下,病毒会发生 e 抗原血清学的转换,但是需要的时间长,机体免疫系统长期的与 HBV 对抗过程会使机体处于消耗状态,最终发展为严重疾病。另一方面,在乙肝病毒携带的小三阳人群中,可能是由于乙肝 HBsAg 的持续存在,刺激免疫系统,机体需要更多的能量去产生更多的体液免疫细胞,以期达到 HBsAg 的清除。对于肝硬化、肝癌的人群来说,推测可能是由于体液免疫的长期激活状态消耗了机体的物质能量,机体逐渐虚弱而发生更严重的疾病。临床上的治疗很多都以 e 抗原血清学转换作为停药的指标,然而当停止治疗的时候,也不能忽视患者机体还在进行的战斗,应该在还未发生更严重的疾病之前在免疫方面做一些相关工作。

CD3 分子是所有 T 淋巴细胞的共同标志,T 淋巴细胞是一类重要的免疫效应细胞和免疫调节细胞,CD56 是人 NK 细胞最有价值的表面标志之一,NK 细胞是机体天然免疫的主要承担者,参与非特异免疫,可以抑制杀伤肿瘤,也能杀伤病毒感染的靶细胞,同时它对 T 细胞、B 细胞、骨髓干细胞等均有

调节作用,并通过释放细胞因子($\text{INF-}\alpha$ 、 $\text{INF-}\gamma$ 和 IL-2) 对机体免疫功能进行调节^[11]。权衡和平衡是免疫系统运行的基本策略,生物体在一生中经历无数次的斗争和变化,免疫系统经受无数次的权衡和平横,一边倒似的胜利并不多,更多的是权衡处理,以求体内的平横^[12]。本实验显示在免疫不全状态组 CD3^+ 细胞与 CD56^+ 细胞之间存在负相关性,可以用机体的免疫细胞之间存在的互相权衡,已到达平横的观点来解释,同时也可以证明上段提出的假设,机体在长期制造更多地体液免疫细胞的同时也会引起机体的另一些细胞或者一些物质、能量的减少,带来的结果可能是不好的。

参考文献

- [1] 中华医学会肝病学会,中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2010年版) [J]. 中国病毒病杂志, 2011, 1(1): 9-23.
- [2] Blumberg B S, Sutnick A I, London W T. Hepatitis and Leukemia: their relation to Australia antigen [J]. *Bull N Y Acad Med*, 1968, 44(12): 1566-86.
- [3] 陈紫榕. 病毒性肝炎(第2版) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012: 92.
- [4] Brunetto M R, Oliveri F, Colombatto P, et al. Hepatitis B surface antigen serum levels help to distinguish active from inactive hepatitis B virus genotype D carriers [J]. *Gastroenterology*, 2010, 139(2): 483-90.
- [5] Tseng T C, Liu C J, Yang H C, et al. High levels of hepatitis B surface antigen increase risk of hepatocellular carcinoma in patients with low HBV load [J]. *Gastroenterology*, 2012, 142(5): 1140-9.
- [6] Rehermann B, Nascimbeni M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection [J]. *Nat Rev Immunol*, 2005, 5(3): 215-29.
- [7] Wang F S, Zhang Z. Host immunity influences disease progression and antiviral efficacy in humans infected with hepatitis B virus [J]. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2009, 3(4): 499-512.
- [8] 于新蕾, 许金波. 乙型肝炎病毒与宿主天然免疫间相互作用 [J]. 军事医学, 2011, 35(4): 310-4.
- [9] 李树龙, 姜颖, 贺福初. 乙型肝炎免疫发病机制研究进展 [J]. 军事医学科学院院刊, 2006, 30(4): 580-3.
- [10] 陈明雁, 赵海涛. 乙肝小三阳患者罹患肝癌可能性不容忽视 [EB/OL]. (2009-09-18). <http://www.jkb.com.cn/news/industryNews/2009/0918/159873.html>
- [11] 窦肇华, 张远强, 郭顺根. 免疫细胞学与疾病 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2004, 6: 115-7.
- [12] 吴克复. 免疫的细胞社会生态学原理 [M]. 北京: 科学出版社, 2012(生命科学前沿): 92-5.

Association between HBsAg levels and T, B lymphocyte subsets or NK cells in chronic HBV infected patients

Nie Lin¹, Yang Lisha², Peng Dezhen³, et al

(¹Dept of Gastroenterology, ²Dept of Traditional Chinese Medicine, ³Dept of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guilin 541001)

Abstract Objective To investigate the correlation between the levels of HBsAg and T, B and NK cells subgroup in immune incompetence (inactive phase) which were infected by HBV. **Methods** Thirty four cases of immunodeficiency (inactive phase) which were infected by HBV were selected in our study, at the same time, twenty normal cases for control. The levels of peripheral blood lymphocyte subsets and NK cells were detected by the flow cytometry. Serum HBsAg levels were tested by Real-time fluorescent probe quantitative polymerase chain reaction (FQ-PCR). **Results** The content of HBsAg was positively correlated with the percentage of B lymphocytes in inactive state cases. The levels of B lymphocytes in the group of high content of HBsAg was higher than that in the healthy group as well as the group of low content of HBsAg ($P < 0.05$). However, there was no statistically significant correlation between it and T, B or NK cells. **Conclusion** Among patients which were infected by HBV in inactive phase, the serum HBsAg levels could represent B cells levels to some extent. The detection of peripheral blood lymphocyte subsets and NK cells have clinical value for understanding the immune status of patients.

Key words hepatitis B surface antigen quantification; T-lymphocytes; B-lymphocytes; natural killer cells; immunodeficiency (inactive phase)