

◇ 临床医学研究 ◇

T 细胞亚群与慢性丙型肝炎病毒相关性分析

殷先尧^{1,2}, 郑美娟¹, 徐元宏¹

摘要 目的 探讨外周血中 T 淋巴细胞亚群与慢性丙型肝炎(CHC)患者丙型肝炎病毒(HCV)复制程度的关系。方法

采用流式细胞仪直接免疫荧光法检测 69 例 CHC 患者、20 例正常健康者外周血中的 T 细胞亚群;利用荧光定量 PCR 法检测患者血清 HCV RNA。结果 ① CHC 患者 CD4⁺T 细胞百分率 $[(42.87 \pm 6.11)]$ 及 CD4⁺/CD8⁺ 比值 $[(1.34 \pm 0.25)]$ 明显低于正常健康者 $[(49.55 \pm 6.68)]$ 和 $[(1.82 \pm 0.11)]$ $(P < 0.01)$, 而 CD8⁺T 细胞百分率 $[(32.78 \pm 5.48)]$ 则高于正常健康者 $[(27.35 \pm 4.32)]$ $(P < 0.01)$, CD3⁺T 细胞百分率差异无统计学意义 $(P > 0.05)$ 。② 随着 HCV RNA 复制载量的增加,CD8⁺T 细胞百分率逐渐增加,而 CD4⁺T 细胞百分率及 CD4⁺/CD8⁺ 比值逐渐降低。结论 CHC 患者外周 T 淋巴细胞亚群比例改变,可能是 HCV 感染慢性化的重要原因之一。随着 HCV RNA 表达水平的升高,可能是导致 T 淋巴细胞应答能力下降的重要原因。

关键词 HCV RNA; T 淋巴细胞亚群; 相关性

中图分类号 R 392.11

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2014)03-0327-04

慢性丙型肝炎(chronic hepatitis C, CHC)是全球范围的重要公共卫生问题之一,全世界约 2 亿人口感染丙肝病毒(hepatitis C virus, HCV),其中 54%~86% 的感染者 6 个月内出现感染慢性化,形成持续性感染。我国是该病的高发地区,感染率约为 3.2%^[1]。患者病程变化与 T 淋巴细胞亚群数量和功能的相关性,已被多项研究证明可能是致病及慢性化因素^[2]。CHC 慢性化的机制,尤其是宿主的免疫因素引起的免疫反应已成为研究的热点之一。该研究对患者外周血 T 淋巴细胞亚群及血清中 HCV RNA 复制载量水平进行检测,并对其之间相互关系进行了分析,以了解 CHC 患者机体的免疫功能紊乱情况,旨在对 CHC 发病机制及其防治提供一定的理论依据。

2013-11-10 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81302525)

作者单位:¹ 安徽医科大学第一附属医院检验科,合肥 230022

² 肥西县中医院检验科,肥西 231200

作者简介:殷先尧,男,硕士研究生;

徐元宏,男,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: xy-hong1964@163.com

1 材料与方法

1.1 病例资料 收集 2012 年 10 月~2013 年 7 月安徽医科大学第一附属医院门诊及住院的 69 例 CHC 患者,其中男 23 例,女 46 例,年龄 17~67 (45.8±13.8) 岁,诊断均符合 2011 年《丙型肝炎防治指南》的诊断标准^[3],并排除合并其他病毒性肝炎、自身免疫性疾病、酒精性肝病、肝硬化、肿瘤、代谢性疾病及严重基础疾病,实验检查前 6 个月均无抗病毒和免疫调节药物治疗。按照不同的 HCV RNA 载量水平分为高载量组、中载量组、低载量组作为实验组,其中高载量组的 HCV RNA 载量为 $> 1.00 \times 10^5$ copies/ml;中载量组的 HCV RNA 载量为 $1.00 \times 10^3 \sim 1.00 \times 10^5$ copies/ml;低载量组的 HCV RNA 载量为 $< 1.00 \times 10^3$ copies/ml。另选年龄和性别匹配的健康体检者 20 例作为正常对照组,年龄 36~59 (44.6±6.6) 岁。实验组及正常对照组肝肾功能各项指标处于正常范围。

1.2 仪器和试剂 COULTER Epics XL MCL 流式细胞仪为美国 BECKMAN COULTER 公司;CD3/CD4/CD8 荧光标记单克隆抗体及红细胞裂解液为 Opti-Clone 原装配套试剂;PCR 扩增仪为瑞士 Roche 公司的 Light-Cycler 荧光定量核酸扩增仪;HCV 核酸定量试剂盒为上海科华生物工程股份有限公司产品。

1.3 方法

1.3.1 HCV RNA 载量检测 采用实时荧光定量 PCR 法,严格按照试剂说明书步骤进行,HCV RNA 检测单位用 copies/ml 表示。

1.3.2 T 细胞亚群检测 取 CHC 患者及正常健康者外周静脉血 1 ml,EDTA-K₂ 抗凝。于干净试管中加入 20 μ l 三标记单克隆抗体 CD4-PE / CD8-ECD / CD3-PC5,再加入 100 μ l 抗凝静脉血,充分混匀,25℃ 避光孵育 15 min,加入红细胞溶解液 250 μ l,充分溶解红细胞 20 min 后,以 1 200 r/min 的速度离心 5 min,去上清液,PBS 缓冲液冲洗 2 次,最后以 500 μ l 的 PBS 缓冲液悬浮细胞,流式细胞仪检测 10 000 个淋巴细胞,各细胞亚群用百分比表示。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件进行

分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用 t 检验分析。多组间两两比较用方差检验分析,相关性分析采用 Spearman 等级相关分析。

2 结果

2.1 CHC 患者外周血 T 细胞亚群分布 CHC 患者外周血 T 细胞亚群与正常健康者之间关系见表 1。CHC 患者外周血 T 细胞亚群的流式散点图见图 1。

表 1 CHC 患者和正常健康者 T 细胞亚群分布 ($\bar{x} \pm s$)

项目	CHC 患者 (n=69)	正常健康者 (n=20)	t 值	P 值
CD3 ⁺ (%)	76.72 ± 8.75	77.25 ± 11.13	0.474	0.636
CD4 ⁺ (%)	42.87 ± 6.11	49.55 ± 6.68	4.212	0.000
CD8 ⁺ (%)	32.78 ± 5.48	27.35 ± 4.32	4.071	0.000
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	1.34 ± 0.25	1.82 ± 0.11	8.454	0.000

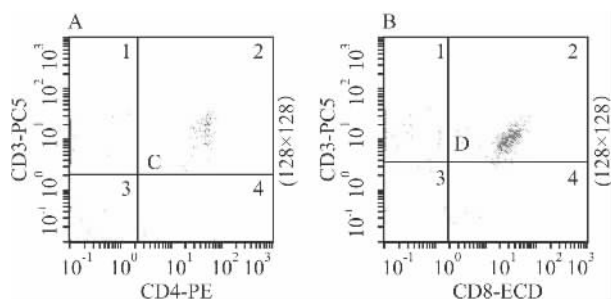


图 1 CHC 患者 CD4⁺、CD8⁺ 细胞流式散点图

A: CD4⁺ T 细胞流式散点图; B: CD8⁺ T 细胞流式散点图

2.2 CHC 患者 HCV RNA 载量与外周血 T 细胞亚群的相关性分析 从表 2 可看出各组之间比较,通过 Spearman 等级相关分析得知,CD3⁺ T 细胞百分率与 HCV RNA 载量无相关性 ($r = 0.068, P = 0.576$); CD4⁺ T 细胞百分率、CD8⁺ T 细胞百分率及 CD4⁺/CD8⁺ 比值均与 HCV RNA 载量相关 ($r = 0.477, P < 0.01; r = 0.599, P < 0.01; r = 0.896, P < 0.01$)。即随着 HCV RNA 载量的增加,CD8⁺ T 细胞百分率逐渐增加,而 CD4⁺ T 细胞百分率及 CD4⁺/CD8⁺ 比值逐渐降低,见图 2。

表 2 不同 HCV RNA 载量 CHC 患者外周血 T 细胞亚群分布 ($\bar{x} \pm s$)

项目	高载量组 (n=24)	中载量组 (n=23)	低载量组 (n=22)	正常对照组 (n=20)
CD3 ⁺ (%)	76.25 ± 9.23	75.65 ± 9.14	75.05 ± 8.90	77.00 ± 10.65
CD4 ⁺ (%)	39.01 ± 4.89	43.74 ± 5.72 ***	46.14 ± 5.66 ***	49.55 ± 6.68 **
CD8 ⁺ (%)	37.21 ± 5.24	31.87 ± 4.00 ***	28.91 ± 3.41 ***	27.35 ± 4.32 **
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	1.06 ± 0.11	1.38 ± 0.13 ***	1.60 ± 0.08 ***	1.82 ± 0.11 **

与高载量组比较: ** $P < 0.01$; 与中载量组比较: * $P < 0.05$, & $P < 0.01$; 与正常对照组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

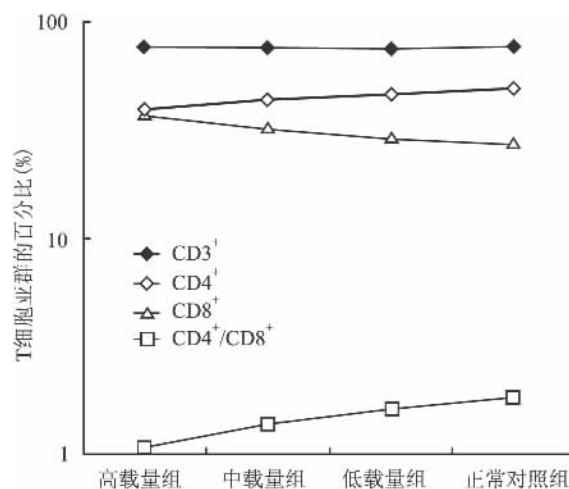


图 2 HCV RNA 载量与外周血 T 细胞亚群的相关性分析

3 讨论

研究^[4-5]显示细胞免疫应答对 CHC 患者病情发展及转归起主要作用,淋巴细胞是人体主要的免疫细胞也是机体免疫应答的基础,其数量的变化在一定程度上反映了机体的免疫水平。当 HCV 侵犯肝脏时,由于肝脏及机体本身有极强的代偿能力,导致临床上往往并不体现为血清生化指标的上升,而免疫功能紊乱才是造成肝损伤的重要因素^[6]。外周血 T 淋巴细胞各亚群水平间的相对稳定是机体发挥正常免疫功能的重要基础。T 淋巴细胞的数量和各亚群比例是反映机体免疫水平的主要标志,CD3⁺ T 细胞和 CD4⁺ T 细胞除在免疫应答中起辅助、诱导作用外,还可分泌淋巴因子,启动迟发性超敏反应,诱导巨噬细胞活化,引起肝细胞损伤的效应^[5]; CD4⁺ T 细胞还能促进 B 细胞、细胞毒性 T 淋巴细胞和其他免疫细胞的增殖及分化,调节体液免疫和细胞免疫。CD8⁺ T 细胞由细胞毒性 T 淋巴细胞和少许抑制性 T 细胞组成,正常情况下,两者保持一定的比例,维持机体的细胞免疫功能。

本研究显示,CHC 患者 CD8⁺ 比例高于正常健康者,而 CD4⁺ 细胞、CD4⁺/CD8⁺ 比值均低于正常健康者,CD3⁺ T 细胞与正常健康者之间比较差异无统计学意义,这与国内学者的报道^[7-8]一致。HCV 感染后引起外周血 T 细胞亚群的这种变化可能是 CHC 慢性化的重要原因之一,迄今为止,HCV 的致病机制仍不明确,细胞免疫可能是 HCV 发病的主要机制,CHC 患者在抗原提呈细胞的作用下 HCV 致敏的 CD8⁺ T 细胞攻击肝细胞从而导致自身肝细胞的溶解。最近,研究^[9]显示 HCV 特异性 CD8⁺ T 细

胞上存在多种抑制性受体的表达。具有抗原特异性的 CD4⁺T 细胞在清除 HCV 及致病过程中发挥着重要作用。两者比例发生变化后有可能导致两种细胞不能很好地协调作用,从而影响了机体清除 HCV 的能力,导致感染的持续^[10]。CD4⁺T 细胞在激发抗原提呈细胞活性及诱导 CD8⁺T 细胞的免疫反应中发挥重要作用。强而持久的 CD4⁺T 细胞免疫反应能增强机体清除病毒的能力。在 HCV 感染黑猩猩的动物试验中发现,即使在 CD8⁺T 细胞免疫反应正常的情况下,CD4⁺T 细胞的消耗也将导致 HCV 感染慢性化^[11-13]。有学者^[14]认为,CD4⁺、CD8⁺T 细胞的相互协调能有效控制病毒感染,有效控制 HCV 感染需要一个持久、广泛的辅助和细胞毒细胞反应,如果患者不能产生或不能维持持久的 CD4⁺T 细胞反应,通常不能有效清除病毒,导致感染慢性化。

血清 HCV RNA 含量反映了病毒复制的活跃程度和病情变化,从基因诊断角度直接反映了血清 HCV 存在的情况,也是反映 CHC 传染性的指标。血清中的 HCV RNA 载量与肝组织 HCV RNA 呈正相关^[15]。血清 HCV RNA 的检测能直接反映 CHC 的病毒血症水平。同时检测了 CHC 患者血清中 HCV RNA 的载量,研究病毒复制程度与细胞免疫功能的关系。结果表明随着病毒拷贝数的增加,CD4⁺T 细胞百分率及 CD4⁺/CD8⁺比值明显减少;CD8⁺T 细胞百分率则与 HCV RNA 拷贝数的增加成正比。说明免疫功能紊乱,导致循环病毒量增加,免疫应答低下使机体难以清除病毒。检测显示,HCV RNA 阴性组 CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞百分率与中载量组和高载量组比较差异有统计学意义,与正常健康者比较差异无统计学意义,但其 CD4⁺/CD8⁺比值却明显低于正常对照组。说明 HCV 感染后,机体免疫功能的改变首先反映在 CD4⁺/CD8⁺比值下降,推断该值的持续下降与 HCV 持续存在和复制水平有关。

综上所述,CHC 患者外周血 T 淋巴细胞亚群比例改变,可能是导致 HCV 感染慢性化的重要原因之一。HCV RNA 复制增加进一步加重 CHC 患者外周血 T 细胞亚群的紊乱,CD4⁺/CD8⁺比值的动态变化可及时提示临床 HCV 感染者细胞免疫功能的变化并加强临床的预测。因此联合检测血清 HCV RNA 和外周血 T 淋巴细胞亚群对观察 CHC 患者的病毒

复制程度及判断细胞免疫功能具有一定的临床价值。

参考文献

- [1] Post J J, Ratnarajah S, Lloyd A R. Immunological determinants of the outcomes from primary hepatitis C infection [J]. *Cell Mol Life Sci* 2009, 66(1): 733-56.
- [2] 陈淑兰, 边静, 张锋, 等. 慢性丙型肝炎患者的细胞免疫功能 [J]. *医学研究与教育* 2009, 26(6): 8-10.
- [3] European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: management of hepatitis C virus infection [J]. *J Hepatol* 2011, 55(2): 245-64.
- [4] Hiroishi K, Ito T, Imawari M. Immune responses in hepatitis C virus infection and mechanisms of hepatitis C virus persistence [J]. *J Gastroenterol Hepatol* 2008, 23(1): 473-82.
- [5] Satake S, Nagaki M, Kimura K. Significant effect of hepatitis C virus specific CTLs on viral clearance in patients with type C chronic hepatitis treated with antiviral agents [J]. *Hepatol Res* 2008, 38(5): 491-500.
- [6] 董西华, 周霞, 周立平, 等. 丙肝患者血清 HCV RNA 与 TNF- α 之间的关系及其与肝损伤程度相关性的研究 [J]. *现代医学检验杂志* 2011, 26(6): 21-7.
- [7] 王九平, 张野, 聂青和. PD-1 分子对慢性丙型肝炎患者 T 细胞免疫功能的影响 [J]. *肝脏* 2009, 14(3): 200-3.
- [8] 梁骑, 焦艳梅, 计云霞, 等. 慢性丙型肝炎患者 DNT 细胞及 T 细胞亚群的研究 [J]. *首都医科大学学报* 2012, 33(2): 214-7.
- [9] 刘毓刚, 王天然, 李国良. HCV 感染者外周血 T 淋巴细胞亚群的变化 [J]. *四川医学* 2010, 31(2): 241-2.
- [10] Bengsch B, Seigel B, Ruhl M, et al. Coexpression of PD-1, 2B4, CD160 and KLRG1 on exhausted HCV-specific CD8⁺T cell is linked to antigen recognition and T cell differentiation [J]. *J Pathol* 2010, 6(6): e1000947.
- [11] McCaughan G W, Bowen D G. Pathogenesis of cholestatic hepatitis C [J]. *J Hepatol* 2011, 54(2): 392-4.
- [12] Accapezzato D, Francavilla, Paroli M, et al. Hepatic expansion of a virus-specific regulatory CD8⁺ T cell population in chronic hepatitis C virus infection [J]. *J Clin Invest* 2004, 113(7): 963-72.
- [13] Spangenberg H C, Viazov S, Kersting N, et al. Intrahepatic CD8⁺T cell failure during chronic hepatitis C virus infection [J]. *Hepatology* 2005, 42(4): 828-37.
- [14] Sugimoto K, Stadanlick J, Ikeda F, et al. Influence of ethnicity in the outcome of hepatitis C virus infection and cellular immune response [J]. *Hepatology* 2003, 37(3): 590-9.
- [15] Lemon S M, McKeating J A, Pietschmann T, et al. Development of novel therapies for hepatitis C [J]. *Antiviral Res* 2010, 86(1): 79-92.

基质金属蛋白酶-8 在急性 Stanford A 型主动脉夹层中的表达及临床意义

王 峦, 严中亚, 章庆春, 宋晓蓉

摘要 目的 探讨基质金属蛋白酶-8 (MMP-8) 在急性 Stanford A 型主动脉夹层中的表达及临床意义。方法 30 例急性 Stanford A 型主动脉夹层患者为实验组, 30 例同期接受单纯主动脉瓣置换的患者为对照组, 采用 ELISA 法、Western blot 法、免疫组化法等检测 MMP-8 在实验组和对照组血浆及升主动脉壁中的表达。结果 主动脉夹层患者血浆中 MMP-8 的表达 $[(106.51 \pm 28.27) \text{ ng/ml}]$ 明显高于对照组 $[(25.65 \pm 12.95) \text{ ng/ml}]$, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 实验组升主动脉中层病变显著, 炎性细胞浸润夹层边缘。弹性纤维与胶原纤维层变性、排列紊乱、破碎、崩解。其主动脉壁中层 MMP-8 大量表达。而对照组主动脉壁结构完整, 弹性

纤维与胶原纤维排列紧密有序, 无中层退行性变。MMP-8 在其主动脉中层仅少量表达或不表达。结论 MMP-8 在病变的升主动脉中层内高表达, 在正常的弹性纤维层低表达, 提示其在主动脉疾病的发生发展中可能发挥作用。

关键词 急性 Stanford A 主动脉夹层; 基质金属蛋白酶; 细胞外基质

中图分类号 R 543.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)03-0330-04

2013-11-11 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81071376)

作者单位: 安徽医科大学附属省立医院心脏外科, 合肥 230001

作者简介: 王 峦, 男, 硕士研究生;

严中亚, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: yan20047

@163.com

急性 Stanford A 型主动脉夹层是一种病情凶险、病死率极高的心血管疾病。随着生活水平提升及检测手段的增加, 其发病率呈上升趋势, 但其发病机制目前仍不清楚^[1]。基质金属酶是一个 Zn^{2+} 依赖性, 参与细胞外基质降解代谢的酶家族。其在血管重塑过程中发挥重要作用^[2]。研究^[3]表明, 在主动脉夹层中金属蛋白酶家族许多成员表达升高, 而关于基质金属蛋白酶 8 (matrix metalloproteinase-8,

Study on the relationship between T cell subsets and count and virus load in patients with hepatitis C

Yin Xianyao^{1, 2}, Zheng Meijuan¹, Xu Yuanhong¹

(¹Dept of Laboratory Medicine, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

²Dept of Laboratory, Tradition Hospital of Feixi, Feixi 231200)

Abstract Objective To investigate the correlation between T cell subsets and HCV viralload in HCV infection.

Methods Flow cytometry was used to detect peripheral T cell subsets count of 69 patients with hepatitis C and 20 cases of normal health human, and fluorescent quantitative PCR was used to detect viral load in patients with hepatitis C.

Results ① The study showed that the percentage ratio of CD4^+ T cells (42.87 ± 6.11) and of $\text{CD4}^+ / \text{CD8}^+$ (1.34 ± 0.25) in patients patients was significantly lower than those of normal health group, it was 49.55 ± 6.68 and 1.82 ± 0.11 ($P < 0.01$); but the percentage ratio of CD8^+ T cells (32.78 ± 5.48) was higher than that of the normal health human (27.35 ± 4.32) ($P < 0.01$). There were no significant differences between the two groups in the percentage ratio of CD3^+ T cells. ② The viral load gradually increased as the percentage ratio of CD8^+ T cells increased, while the percentage ratio of CD4^+ T cells and the percentage ratio of $\text{CD4}^+ / \text{CD8}^+$ were decreased gradually. **Conclusion** It may be one of the important reasons as the chronic infection of hepatitis C virus by change of T cell subsets, and may be an important cause leading to the decrease of T lymphocyte response ability as the expression level of HCV RNA increases.

Key words HCV RNA; T cell subsets; correlation