

[文章编号] 1000-4718(2007)06-1161-03

乙肝病毒蛋白对慢性乙型肝炎患者 PBMCs 功能的影响*

高月求, 孙学华, 章晓鹰, 王灵台
(上海中医药大学附属曙光医院, 上海 200021)

[摘要] 目的: 乙肝病毒蛋白对不同感染状态慢性乙型肝炎患者的外周血单核细胞(PBMCs)功能的影响。方法: 收集乙肝表面抗原(HBeAg)阳性丙氨酸氨基转移酶(ALT)异常者40例(A组), 乙肝e抗原(HBeAg)阳性ALT持续正常者20例(B组), HBeAg及乙肝病毒脱氧核糖核酸(HBV-DNA)阴性ALT正常者20例(C组), 另外选择15例各型肝炎病原学标志检测均为阴性的健康体检者为正常对照组, 分离培养外周血单核细胞, 加入植物血凝素(PHA)、HBeAg、HBcAg, 培养48h后, 1500 r/min离心10 min, 收集上清液-20℃保存, 统一检测IFN- γ 、IL-10含量。采用流式细胞仪检测外周血CD8+CD28+T细胞亚群。结果: IFN- γ 在HBeAg阳性ALT正常组, HBeAg阳性ALT异常组中的含量明显低于正常对照组和HBeAg及HBV-DNA阴性ALT正常组; IL-10在HBeAg阳性ALT正常组, HBeAg阳性ALT异常组中的含量明显高于正常对照组和HBeAg及HBV-DNA阴性ALT正常组。CD8+CD28+T细胞在HBeAg阳性ALT正常组中明显低于其它各组。结论: HBeAg阳性的患者, Th1型细胞免疫反应明显低下, Th2型细胞免疫反应明显增高, CTL的数量减少。

[关键词] 肝炎病毒, 乙型; 肝炎, 乙型, 慢性; 单核细胞

[中图分类号] R363 **[文献标识码]** A

Effect of hepatitis virus B protein on the functions of PBMCs isolated from patients with chronic HBV infection

GAO Yue-qiu, SUN Xue-hua, ZHANG Xiao-ying, WANG Ling-tai

(Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of TCM, Shanghai 200021, China)

[ABSTRACT] **AIM:** To study the effect of hepatitis virus B proteins on peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from patients among various types of chronic hepatitis B virus (HBV) infection. **METHODS:** 80 patients of various types of chronic HBV infection were observed, including 40 HBeAg positive with abnormal alanine aminotransferase (ALT) (A group), 20 HBeAg positive with persistent normal ALT (B group), 20 HBeAg and HBV-DNA negative with persistent normal ALT level (C group). IL-10, IFN- γ in CD8+CD28+T cells, after stimulation with PHA, HBeAg and HBcAg for 48 h, were inspected respectively in PBMCs. **RESULTS:** IFN- γ was significantly lower in HBeAg positive patients. IL-10 was significantly higher in HBeAg positive with normal ALT. CD8+CD28+T were significantly lower than others. **CONCLUSION:** In HBeAg positive group, secretion of cytotoxic T lymphocyte (CTL) and Th1 type cellular immunologic reaction is decreased, Th2 type cellular immunologic reaction is enhanced.

[KEY WORDS] Hepatitis B virus; Hepatitis B, chronic; Monocytes

慢性乙型肝炎是由HBV导致的免疫失衡性疾病, 病毒及其蛋白为其免疫原, 外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)是体内免疫效应细胞之一, 在外周血中, 病毒蛋白如何影响PBMCs的功能值得进一步研究。本研究旨在观察乙肝病毒蛋白对不同感染状态慢性乙型肝炎患者PBMCs功能的影响。

材 料 和 方 法

1 病例收集

病例均为曙光医院肝病科自2003年3月至2005年3月的门诊或住院患者, 共80例, 所有病例均符合2000年(西安)中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学会联合修订的《病毒性肝炎的诊断

[收稿日期] 2005-09-21 [修回日期] 2005-12-01

* [基金项目] 上海市曙光计划资助项目; 上海市教育委员会E研究院建设计划资助项目(No. E03008); 上海市重点学科建设项目资助(No. Y0302)。

标准》中慢性乙肝的诊断标准^[1],且在3个月内未经免疫调节剂及抗病毒治疗的慢性乙肝病毒感染者,并排除肝硬化、肝癌及合并其它病毒性肝炎和免疫性疾病患者。其中 HBeAg 阳性 ALT 异常者 40 例(A 组),男 28 例,女 12 例,平均年龄(36.38 ± 7.88)岁,平均病程(3.90 ± 1.72)年。HBeAg 阳性 ALT 持续正常者 20 例(B 组),男 14 例,女 6 例,平均年龄(32.35 ± 8.94)岁,平均病程(4.00 ± 1.62)年。HBeAg 及 HBV - DNA 阴性 ALT 正常者 20 例(C 组),男 13 例,女 7 例,平均年龄(34.15 ± 8.13)岁,平均病程(3.85 ± 1.57)年。另外选择 15 例各型肝炎病原学标志检测均为阴性的健康体检者为正常对照组,男 10 例,女 5 例,平均年龄(35.87 ± 6.25)岁。

2 观察指标

2.1 肝脏血清生化学指标的检测 包括丙氨酸氨基转移酶(ALT)、门冬氨酸氨基转移酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、谷氨酰转肽酶(GGT)、总胆红素(TB)、白蛋白(A)及球蛋白(G),统一由曙光医院检验科检测。

2.2 血清 HBV 病毒学标志的检测 包括 HBsAg、HBsAb、HBeAg、HBeAb、HBcAb、HBV - DNA(罗氏荧光定量 PCR 法),统一由曙光医院检验科检测。

2.3 病毒蛋白诱导后 PBMCs 分泌 IFN - γ、IL - 10 水平的检测 无菌采集静脉血 2 mL,以生理盐水 2 mL 对冲,加入 2 mL 淋巴细胞分离液中,2 000 r/min 离心 20 min,分离 PBMCs,Hanks 洗液洗涤。分离的 PBMCs(活细胞 > 95%,单个核细胞 > 98%)加培养液(RPMI - 1640 液 9 份、灭活小牛血清 1 份)调细胞浓度为 10⁹ cells/L,置于 24 孔培养皿中,加入 PHA、HBeAg、HBcAg,终浓度分别为 20 mg/L、1 mg/L、1 mg/L,37 °C、5% CO₂ 培养 48 h 后,1 500 r/min 离心 10 min,收集上清液 - 20 °C 保存,统一检测 IFN - γ、IL - 10 水平。

2.4 病毒蛋白诱导后 PBMCs 中 CD8 + CD28 + T 细胞亚群的检测 无菌采集静脉血 2 mL,以生理盐水 2 mL 对冲,加入 2 mL 淋巴细胞分离液中,2 000 r/min 离心 20 min,分离 PBMCs,Hanks 洗液洗涤。分离的 PBMCs(活细胞 > 95%,单个核细胞 > 98%)加培养液(RPMI - 1640 液 9 份、灭活小牛血清 1 份)调细胞浓度为 10⁹ cells/L,置于 24 孔培养皿中,加入 PHA、HBeAg、HBcAg 各 20 μL,37 °C、5% CO₂ 培养 48 h 后,加入荧光标记单克隆抗体即鼠抗人 CD8 - FITC 和 CD28 - PE 各 10 μL,阴性对照管中加入小鼠 IgG - FITC 和 IgG - PE 各 10 μL,混匀置室温 20 °C 避光孵育 25 min,鞘液洗涤,离心后检测。标品置流式细

胞仪内,设门,做双色荧光流式细胞检测。以不同双荧光素标记组合分析 CD8 + CD28 + T 细胞亚群,每次每样品淋巴细胞计数均 > 5 000 个。

3 统计学处理

将所有数据输入电子计算机系统,采用美国 SPSS11.0 软件进行统计处理。统计学方法多组间均数($\bar{x} \pm s$)比较采用方差分析。

结 果

1 不同类型慢性乙肝病毒感染者体外 PBMCs 培养上清液中 IFN - γ、IL - 10 含量

由表 1 可知,加 PHA、HBeAg 和 HBcAg 培养液中,IFN - γ 在 HBeAg 阳性 ALT 正常组和 ALT 异常组中的含量明显低于正常对照组和 HBeAg 及 HBV - DNA 阴性 ALT 正常组;而 IL - 10 在 HBeAg 阳性 ALT 正常组和 ALT 异常组中的含量明显高于正常对照组和 HBeAg 及 HBV - DNA 阴性 ALT 正常组。

表 1 不同类型慢性乙肝病毒感染者体外 PBMCs 培养上清液中 IFN - γ、IL - 10 的含量

Tab 1 The different levels of IFN - γ and IL - 10 in mediums of PBMCs *in vitro* from different types of chronic HBV infectors ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	IFN - γ (ng/L)	IL - 10 (ng/L)
A	40	280.73 ± 44.57 [#]	126.51 ± 19.99 ^{***}
B	20	279.30 ± 35.56 ^{**}	130.85 ± 23.60 ^{***}
C	20	302.85 ± 33.28	112.49 ± 10.06
Normal control	15	318.67 ± 52.29	113.37 ± 23.21

A group: HBeAg positive with abnormal ALT; B group: HBeAg positive with persistent normal ALT; C group: HBeAg and HBV - DNA negative with persistent normal ALT level. [#] P < 0.05 vs normal group; ^{*} P < 0.05, ^{**} P < 0.01 vs group C.

2 不同类型慢性乙肝病毒感染者体外 PBMCs 培养后 CD8 + CD28 + T 细胞亚群变化

由表 2 可知,加 PHA、HBeAg 和 HBcAg 培养液中,HBeAg 阳性 ALT 正常组中 CD8 + CD28 + T 细胞水平明显低于其它各组。

表 2 不同类型慢性乙肝病毒感染者体外 PBMCs 培养后 CD8 + CD28 + T 细胞亚群的变化

Tab 2 The levels of CD8 + CD28 + in PBMCs *in vitro* from different types of chronic HBV infectors ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	CD8 + CD28 + (%)
A	40	22.58 ± 9.83
B	20	12.26 ± 3.31 ^{**Δ}
C	20	22.86 ± 6.90
Normal control	15	26.64 ± 7.34

^{*} P < 0.01 vs normal control; [#] P < 0.05 vs group C; ^Δ P < 0.05 vs group A.

讨 论

HBV 感染宿主后,机体的免疫应答反应决定了疾病的最终转归,正常的免疫应答可以清除乙肝病毒,表现为急性一过性的感染,如果细胞免疫功能低下或紊乱,则无法清除乙肝病毒,成为慢性感染者^[2]。CTL 功能低下、Th1/Th2 细胞失衡、某些单核细胞因子的分泌不足是导致感染慢性化的重要原因,也是近年来研究的热点。

IFN- γ 主要由 Th1 型细胞分泌,在细胞内 HBV 的清除中起着重要的作用^[3]。本结果表明,经 PHA、HBeAg 和 HBcAg 共刺激诱生的 IFN- γ 量在 HBeAg 阳性组明显低于正常对照组及 HBeAg 阴性组,提示 HBeAg 阳性的患者, Th1 型细胞免疫反应明显低下。

IL-10 是 Th2 型细胞分泌的一种强有力的免疫和炎症抑制因子。从起始阶段到效应阶段都抑制 Th1 型细胞免疫反应,抑制 Th1 型细胞分泌细胞因子。它能作用于 DC 成熟过程的早期阶段,抑制协同刺激分子的表达,降低 MHCII 类分子的表达,影响树突状细胞的成熟分化,从而使 CD4 + T 细胞对特定外源性抗原无反应力,引发机体对特异性抗原的免疫耐受^[4]。是导致 HBV 感染慢性化的重要原因。本结果表明,IL-10 在 HBeAg 阳性 ALT 正常组, HBeAg 阳性 ALT 异常组中的含量明显高于正常对照组和 HBeAg 及 HBV-DNA 阴性 ALT 正常组。IL-10 含量的增高提示 HBV 活动性复制,患者 Th2 型细胞免疫反应明显增高,抑制了机体对病毒的清除,导致 HBV 在体内的持续复制。

CD8 + T 细胞可以分为抑制性 T 淋巴细胞(Ts)和 CTL。CD28 分子是免疫球蛋白超家族成员,正常表达于 95% 的 CD4 + 和 50% 的 CD8 + T 细胞表面,CD28 分子的表达对 T 细胞的激活至关重要。T 细胞的活化除 T 细胞受体识别抗原-MHC 复合物的第一信号外,尚需协同刺激信号即第二信号的作用。

在协同刺激因子中,T 细胞表面的 CD28 分子与 B 细胞或其它抗原提呈细胞上的配体 B7-1 (CD80)、B7-2 (CD86) 的相互作用,对抗原特异性免疫反应的产生发挥了重要作用,缺乏 CD28-B7 (包括 CD80、CD86) 的相互作用,则导致 T 细胞免疫反应无能^[5]。CD8 + CD28 + 被认为是 T 亚群中的 CD8 + CTL, CD8 + CD28 - T 细胞被认为是抑制性 T 细胞^[6-7]。在特异性刺激后(加 PHA、HBeAg 和 HBcAg 培养液中), CD8 + CD28 + T 细胞在 HBeAg 阳性 ALT 正常组中明显低于其它各组,提示 HBeAg 阳性 ALT 正常患者 Ts 细胞数量增多, Th 细胞和 CTL 细胞受到抑制。

[参 考 文 献]

- [1] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学会. 病毒性肝炎防治方案[J]. 中华肝脏病杂志, 2000, 8 (6): 324-329.
- [2] Chisari FV, Ferrari C. Hepatitis B virus immunopathogenesis[J]. Annu Rev Immunol, 1995, 13: 29-60.
- [3] Dao T, Ohashi K, Kayano T, et al. Interferon γ -inducing factor, a novel cytokine, enhances Fas ligand-mediated cytotoxicity of murine T helper cells[J]. Cell Immunol, 1996, 173(2): 230-235.
- [4] Tsai SL, Sheen IS, Chien RN, et al. Activation of Th1 immunity is a common immune mechanism for the successful treatment of hepatitis B and C: tetramer assay and therapeutic implications[J]. J Biomed Sci, 2003, 10(1): 120-135.
- [5] Bian Y, Hiraoka S, Tomura M, et al. The capacity of the natural ligands for CD28 to drive IL-4 expression in naive and antigen-primed CD4 + and CD8 + T cells[J]. Int Immunol, 2005, 17(1): 73-83.
- [6] Rehermann B, Nascimbeni M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection[J]. Nat Rev Immunol, 2005, 5(3): 215-229.
- [7] 钱峰. CD28 协同刺激信号传导的研究进展[J]. 国外医学:分子生物学分册, 2002, 24(5): 273-276.