



论文

乙型肝炎病毒 B, C 基因型引起的慢性乙型肝炎患者特异性、非特异性细胞免疫比较

顾锡炳, 杨小娟, 王栋*, 华忠, 吴杭源, 陈浩坤, 徐月琴, 陆忠华

江苏省无锡市传染病医院, 无锡 214005

* 联系人, E-mail: wangdong7312@163.com

收稿日期: 2009-03-31; 接受日期: 2009-05-05

摘要 对 138 例 CHB 患者进行 HBV 基因分型, 检测非特异性 CTL, HBV 特异性 CTL, 肝功能, HBV DNA, HBVM(HBsAg, 抗-HBs, HBeAg, 抗-HBe, 抗-HBc). 结果显示, C 基因型感染者, 非特异性 CTL((19.91±6.01)%)高于 B 基因型感染者((16.12±3.12)%), $t=3.05$, $P<0.01$, HBV DNA 水平((6.25±0.81) $\log^{10}$ 拷贝/mL)高于 B 基因型感染者((5.02±0.61) $\log^{10}$ 拷贝/mL), $t=6.03$, $P<0.01$, HBeAg 阳性 46 例(74.19%), 高于 B 基因型感染者(39 例, 占 52%), $\chi^2=7.09$, $P<0.01$, 丙氨酸氨基转移酶(ALT)、血清总胆红素(TBIL)水平(分别为(507.15±312.17) IU/L 和 (46.10±40.18) $\mu\text{mol/L}$)高于 B 基因型感染者(分别为(290.05±215.12) IU/L 和 (29.12±17.12) $\mu\text{mol/L}$), $t=3.76$, 2.29 , $P<0.01$, $P<0.05$. C 基因型感染者的 HBV 特异性 CTL((0.21±0.05)%), 低于 B 基因型感染者((0.39±0.12)%), $t=5.61$, $P<0.01$. 与 CHB 患者 B 基因型感染者相比, C 基因型感染者的 HBV 特异性 CTL 较低, 导致 HBV DNA 水平高于 B 基因型感染者, HBeAg 阳性率也高于 B 基因型感染者, 因此, C 基因型感染者的肝功能损害比 B 基因型感染者重, 另外, C 基因型感染者的肝功能损害比 B 基因型感染者重, 可能也与 C 基因型感染者的非特异性 CTL 比 B 基因型感染者高有关.

关键词慢性乙型肝炎
HBV 基因型
HBV 特异性
CTL 非特异性
CTL HBV DNA
肝功能

慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)患者所具有的临床特征与其所感染的乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)基因型有关. 中国 CHB 患者以 B, C 基因型为主, 一般认为 CHB C 基因型感染者病毒复制较 B 基因型感染者活跃^[1,2], 肝损伤也较重^[3~5], 确切机制不明. 乙型肝炎的发病与机体免疫功能特别是特异性细胞免疫功能有关, 而目前世界上对 CHB 患者不同 HBV 基因型的特异性、非特异性细胞免疫功能的研究还不多. 对 138 例 CHB 患者 HBV 基因型进行检测, 对 C 基因型感染者和 B 基因型感染者之间进

行 HBV 特异性 CTL、非特异性 CTL 等细胞免疫功能、HBV DNA 水平、HBeAg 阳性率和肝功能损害情况进行对比, 探讨 CHB 患者肝功能损害、HBV 特异性 CTL 和非特异性 CTL 与 HBV 基因型的关系.

1 资料与方法

1.1 研究对象

共研究 138 例 CHB 患者, 为 2006 年 1 月~2008 年 7 月中国无锡地区的患者, 男性 102 例(73.91%),

英文版见: Gu X B, Yang X J, Wang D, et al. Comparison and significance of specific and non-specific cellular immunity in patients with chronic hepatitis B caused by infection with genotypes B or C of hepatitis B virus. Sci China Ser C: Life Sci, 2009, 52: 719—723, doi: 10.1007/s11427-009-0098-0

女性 36 例(26.09%), 平均年龄(35.95±8.15)岁, 诊断符合中国 2000 年病毒性肝炎防治方案^[6], HBV DNA 阳性, 肝功能有不同程度的异常, 所有患者排除甲型、丙型、丁型、戊型肝炎病毒的感染, 无自身免疫性疾病史, 无嗜酒史, 无肝毒性药物使用史, 未用过核苷(酸)类似物和干扰素等抗病毒药物或免疫调节剂. 健康对照组 30 例为健康献血员, 男性 22 例(73.33%), 女性 8 例(26.67%), 平均年龄(35.18±7.01)岁.

1.2 检测方法

(1) 肝功能. 用日立 7600 全自动生化分析仪检测.

(2) HBVM 和 HBV DNA. HBVM 用 1235 时间分辨荧光法, 上海新波试剂检测, HBV DNA 用 PCR 法, 上海科华试剂检测.

(3) HBV 基因型. 采用 PCR 微板核酸杂交-ELISA 技术, 基因扩增仪 PE9600 型, 美国 PE 公司生产, 试剂为中国人民解放军第一军医大学基础生物医学诊断研究中心提供. 引物及探针: 选择前 C 区的不同序列作为 PCR 引物和核酸杂交探针, 6 个基因型通用的序列作为 PCR 的引物和通用包被探针, 而同一部位的不同序列作为各型的显色探针. 显色探针 5' 标记生物素, 由上海生物工程公司合成. 引物序列为: 引物 W1: 5'-CCCTTCTTCGTCTGCGGTTCC-3' (1490~1510 nt); 引物 W2: 5'-ACCAATTTATGCCTA CAGCCTC-3' (1798~1777 nt), 按说明书操作.

(4) 人白细胞抗原(HLA)A₂ 等位型的鉴定. 取 100 μL 肝素钠抗凝新鲜全血, 加入检测管和对照管, 分别加入 HLA-A₂-PE 及同型对照 10 μL, 室温避光孵育 30 min, 经溶血处理后用流式细胞仪(Beckman-coulter 3XL)检测, 试剂购自英国 Proimmune 公司.

(5) HBV 特异性 CTL. 对 HLA-A₂ 阳性者做 HBV 特异性 CTL 检测, 试管中加入 10 μL PE 标记的 Tetramer HBV Core 和 CD₈-FITC, CD3-PC5, 再加入 100 μL 的肝素抗凝血, 同时做同型对照, 混匀室温避光孵育 20 min, 溶血洗涤后上流式细胞仪检测, 以淋巴细胞设门计数 50000 个 CD₈⁺细胞, 同时计数 CD₈⁺和 Tetramer 双阳性细胞为特异性 CD₈⁺细胞, 并以占总计数 CD₈⁺细胞的百分比表示, 所用试剂购自 Beckman coulter 公司.

(6) T 细胞亚群、NK 细胞、非特异性 CTL. 取 100 μL EDTA-K₂ 抗凝新鲜全血加入检测管和对照管,

分别加入单克隆抗体及荧光标记(CD4-FITC, CD8-PE, CD3-percp, CD3-FITC, CD16+CD56-PE, CD8-FITC, CD28-PE)及同型对照 10 μL, 室温避光孵育 15 min, 经溶血处理后上流式细胞仪检测.

(7) Th₁, Th₂. 肝素抗凝新鲜全血 200 μL 加入 RPMI 1640 培养基 200 μL 混匀, 加入刺激剂 PMA 和钙离子载体, 使其终浓度分别为 25 ng/mL 和 1 μg/mL, 同时加入终浓度 1.7 μg/mL 的抑制剂 Monensin, 未刺激对照只加 Monensin, 混匀后细胞在 37℃, 5%CO₂ 培养箱中培养 4 h, 加入 20 μL Pc5-CD₃ 和 FITC-CD₈ 单抗于培养管中, 混匀, 室温避光孵育 15 min, 分成 3 管, 每管 100 μL 染色的全血, 各管分别加入适量的破膜固定剂 A 液和 B 液进行破膜固定, 加入适量 IL-4-PE, IFN-γ-PE 和同型对照 IgG₁-PE 孵育 20 min, PBS 洗涤, 弃上清, 适量 PBS 重悬细胞上流式细胞仪检测. 以上所有项目均在治疗前检测.

1.3 统计学处理

用 SPSS12.0 软件进行统计分析, 计数资料用 χ^2 检验, 计量资料用 *t* 检验, *P*<0.05 示差异有统计学意义.

2 结果

2.1 CHB 患者 HBV 基因型分布特点

138 例 CHB 患者, B 基因型 75 例(54.35%), C 基因型 62 例(44.93%), B, C 混合型 1 例(0.72%).

2.2 HBV B, C 基因型与性别、年龄的关系

B 基因型 75 例中, 男性 56 例(74.67%), 女性 19 例(25.33%), C 基因型 62 例中, 男性 46 例(74.19%), 女性 6 例(25.81%), $\chi^2=0.0039$, *P*>0.05, B 基因型感染者平均年龄(34.15±7.14)岁, C 基因型感染者平均年龄(36.61±9.12)岁, *t*=1.87, *P*>0.05, B, C 混合型 1 例(0.72%), 女, 45 岁.

2.3 HBV B, C 基因型与 HBV 特异性 CTL 和非特异性 CTL 等细胞免疫的关系

HLA-A₂ 阳性 69 例中, C 基因型感染者 34 例, HBV 特异性 CTL(0.21±0.05)%, B 基因型感染者 35 例, HBV 特异性 CTL(0.39±0.12)%, C 基因型感染者低于 B 基因型感染者, *t*=5.61, *P*<0.01(表 1). T 细胞亚群,

表 1 CHB 患者 HBV B, C 基因型 HBV 特异性 CTL 的比较($\bar{x} \pm SD$, %)

组别	例数	HBV 特异性 CTL
B 基因型	35	0.39±0.12
C 基因型	34	0.21±0.05
<i>t</i> 值		5.61
<i>P</i> 值		<0.01

Th₁, Th₂, 非特异性 CTL, NK 细胞: 138 例 CHB 患者与健康对照组比较见表 2, B 基因型感染者与 C 基因型感染者比较见表 3.

2.4 HBV B, C 基因型与血清 HBV DNA 水平和 HBeAg 的关系

C 基因型感染者 HBV DNA 水平((6.25±0.81) log¹⁰ 拷贝/mL)高于 B 基因型感染者((5.02±0.61) log¹⁰

拷贝/mL), *t*=6.03, *P*<0.01, HBeAg 阳性 46 例(74.19%), 高于 B 基因型感染者(39 例, 占 52%), $\chi^2=7.09$, *P*<0.01.

2.5 HBV B, C 基因型与肝功能的关系(表 4)

3 讨论

用 PCR 微板核酸杂交-ELISA 技术对 138 例 CHB 患者进行 HBV 基因分型的结果表明, B 基因型 75 例(54.35%), C 基因型 62 例(44.93%), B, C 混合型 1 例(0.72%), 表明中国无锡地区 CHB 患者的基因型以 B 基因型最多, 其次为 C 基因型, 个别 B, C 混合型. B 基因型感染者和 C 基因型感染者之间的性别、年龄比较差异不显著(*P*>0.05).

一般认为与 B 基因型感染者相比, C 基因型感染者, 血清 HBV DNA 水平较高, HBeAg 阳性率较高^[1,2], 肝组织学活动度较高^[3~5]. 本研究结果与之类似, C 基

表 2 CHB 患者与健康对照的非特异性细胞免疫相关指标比较($\bar{x} \pm SD$, %)

组别	例数	CD ₃ ⁺	CD ₄ ⁺	CD ₈ ⁺	CD ₄ ⁺ /CD ₈ ⁺	CTL	Th ₁	Th ₂	NK 细胞
CHB 患者	138	68.16±7.21	33.14±7.12	28.55±6.15	1.22±0.41	18.82±5.11	29.88±9.12	3.17±0.81	11.71±5.12
健康对照	30	68.83±5.51	37.21±6.09	25.13±4.78	1.54±0.43	15.83±4.99	32.75±7.89	2.57±0.51	15.04±4.17
<i>t</i> 值		0.12	2.67	2.59	3.49	2.24	1.34	3.59	2.98
<i>p</i> 值		>0.05	<0.01	<0.05	<0.01	<0.05	>0.05	<0.01	<0.01

表 3 CHB 患者 HBV B, C 基因型非特异性细胞免疫相关指标比较($\bar{x} \pm SD$, %)

组别	例数	CD ₃ ⁺	CD ₄ ⁺	CD ₈ ⁺	CD ₄ ⁺ /CD ₈ ⁺	CTL	Th ₁	Th ₂	NK 细胞
B 基因型	75	65.51±6.31	32.13±8.2	26.61±7.01	1.27±0.41	16.12±3.12	27.92±12.17	3.21±0.81	11.81±4.18
C 基因型	62	72.31±7.11	34.14±6.10	30.72±5.51	1.18±0.31	19.91±6.01	31.29±9.16	3.14±0.68	11.68±7.01
<i>t</i> 值		4.78	1.73	3.12	1.28	3.05	1.63	1.34	0.12
<i>P</i> 值		<0.01	>0.05	<0.01	>0.05	<0.01	>0.05	>0.05	>0.05

表 4 CHB 患者 HBV B, C 基因型肝功能的比较($\bar{x} \pm SD$)

组别	例数	ALT(IU/L)	TBIL(μmol/L)	ALB(g/L)
B 基因型	75	290.05±215.12	29.12±17.12	42.10±2.17
C 基因型	62	507.15±312.17	46.10±40.18	41.91±3.1
<i>t</i> 值		3.76	2.29	0.55
<i>P</i> 值		<0.01	<0.05	>0.05

因型感染者, HBV DNA 水平($(6.25 \pm 0.81) \log^{10}$ 拷贝/mL)高于 B 基因型感染者($(5.02 \pm 0.61) \log^{10}$ 拷贝/mL), $t=6.03$, $P<0.01$, HBeAg 阳性 46 例(74.19%), 高于 B 基因型感染者(39 例, 占 52%), $\chi^2=7.09$, $P<0.01$, ALT 和 TBIL(分别为 (507.15 ± 312.17) IU/L 和 (46.10 ± 40.18) $\mu\text{mol/L}$)高于 B 基因型感染者(分别为 (290.05 ± 215.12) IU/L 和 (29.12 ± 17.12) $\mu\text{mol/L}$), $t=3.76$, 2.29 , $P<0.01$, $P<0.05$. 不同 HBV 基因型为什么会出现这种情况还不清楚, 是否与不同 HBV 基因型之间的免疫功能差别有关? 对此, 本实验 138 例 CHB 患者, CD_4^+ ($(33.14 \pm 7.12)\%$)低于健康对照组($(37.21 \pm 6.09)\%$), $t=2.67$, $P<0.01$, 而 CD_8^+ ($(28.55 \pm 6.15)\%$)高于健康对照组($(25.13 \pm 4.78)\%$), $t=2.59$, $P<0.05$, $\text{CD}_4^+/\text{CD}_8^+$ 比值($(1.22 \pm 0.41)\%$)低于健康对照组($(1.54 \pm 0.43)\%$), $t=3.49$, $P<0.01$. 与文献报道类似^[7], Th_1 与健康对照组比较无显著性差异($P>0.05$), Th_2 ($(3.17 \pm 0.81)\%$)高于健康对照组($(2.57 \pm 0.51)\%$), $t=3.59$, $P<0.01$, NK 细胞($(11.71 \pm 5.12)\%$)低于健康对照组($(15.04 \pm 4.17)\%$), $t=2.98$, $P<0.01$, 非特异性 CTL ($(18.82 \pm 5.11)\%$)高于健康对照组($(15.83 \pm 4.99)\%$), $t=2.24$, $P<0.05$, 说明 CHB 患者存在免疫功能的紊乱.

对 B 基因型感染者和 C 基因型感染者之间的 HBV 特异性 CTL 和上述免疫功能比较发现, 与 B 基因型感染者比较, C 基因型感染者 CD_3^+ ($(72.31 \pm 7.11)\%$)高于 B 基因型感染者($(65.51 \pm 6.31)\%$), $t=4.78$, $P<0.01$, CD_4^+ , Th_1 , Th_2 , NK 细胞无显著性差异($P>0.05$), CD_8^+ ($(30.72 \pm 5.51)\%$)高于 B 基因型感染者($(26.61 \pm 7.01)\%$), $t=3.12$, $P<0.01$, 非特异性 CTL ($(19.91 \pm$

$6.01)\%$)高于 B 基因型感染者($(16.12 \pm 3.12)\%$), $t=3.05$, $P<0.01$. HLA-A2 阳性 69 例(50%), 与文献^[8]报道类似. 其中 C 基因型感染者 34 例, HBV 特异性 CTL ($(0.21 \pm 0.05)\%$), B 基因型感染者 35 例, HBV 特异性 CTL ($(0.39 \pm 0.12)\%$), HBV 特异性 CTL, C 基因型感染者低于 B 基因型感染者, $t=5.61$, $P<0.01$.

目前比较一致地认为, 乙型肝炎的发病机制主要是机体清除 HBV 而引发的细胞免疫病理改变, 人们逐渐认识到机体清除 HBV 的细胞免疫机制可分为特异性和非特异性两种形式, 而机体对病毒所产生的特异性细胞免疫应答可能是清除机体内病毒的重要因素^[9]. 机体内病毒特异性 CTL 清除 HBV 主要是通过两条途径实现, 即胞毒途径和非溶胞途径^[10], 而非溶胞途径特异性 T 淋巴细胞只是清除了靶细胞内的病毒, 而对靶细胞本身并无损伤. 实验研究表明, 在特异性 T 细胞清除病毒的过程中, 非溶胞途径可能扮演着更重要的作用^[11]. 而非特异性细胞免疫清除 HBV 的作用相对较弱, 在清除 HBV 的过程中可引起肝细胞损伤^[12]. 本研究表明, 与 CHB B 基因型感染者相比较, C 基因型感染者的 HBV 特异性 CTL 较低, 导致 HBV DNA 水平高于 B 基因型感染者, HBeAg 阳性率也高于 B 基因型感染者, 因此, C 基因型感染者肝功能损害比 B 基因型感染者重, C 基因型感染者肝功能损害比 B 基因型感染者重, 可能也与 C 基因型感染者的非特异性 CTL 比 B 基因型感染者高有关. CHB B, C 基因型感染者之间的特异性、非特异性细胞免疫的差别和意义, 还需进一步研究.

参考文献

- 1 Sugauchi F, Chutaputti A, Orito E, et al. Hepatitis B virus genotypes and clinical manifestation among hepatitis B carriers in Thailand. *J Gastroenterol Hepatol*, 2002, 17: 671—676
- 2 Lindh M, Horal P, Dhillon A P, et al. Hepatitis B virus DNA levels, precore mutations, genotypes and histological activity in chronic hepatitis B. *J Viral Hepat*, 2000, 7: 258—267
- 3 Kao J H. Hepatitis B virus genotypes and hepatocellular carcinoma in Taiwan. *Intervirology*, 2003, 46: 400—407
- 4 Hagiwara S, Kudo M, Minami Y, et al. Clinical significance of the genotype and core promoter/pre-core mutations in hepatitis B virus carriers. *Intervirology*, 2006, 49: 200—206
- 5 庄辉. 乙型肝炎流行病学研究进展. 国外医学. 流行病学传染病分册, 2004, 31: 133—135
- 6 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案. 中华肝病杂志, 2000, 8: 324—329
- 7 乔燕伟, 游晶. 慢性乙型病毒性肝炎患者 T 细胞亚群研究进展. 临床肝胆病杂志, 2005, 21: 383—385

- 8 陈瑜, 李兰娟. 乙型肝炎病毒感染的特异性 CTL 细胞免疫应答研究进展. 国外医学. 流行病学传染病分册, 2004, 31: 27—30
- 9 郝友华, 杨东亮. 特异性细胞毒 T 淋巴细胞清除胞内乙肝病毒机制的研究进展. 细胞与分子免疫学杂志, 2005, 21: S128—S129
- 10 Rehemann B. Intrahepatic T cells in hepatitis B viral control versus liver cell injury. *Exp Med*, 2000, 191: 1263—1268
- 11 Bertolotti A, Ferrari C. Kinetics of the immune response during HBV and HCV infection. *Hepatology*, 2003, 38: 4—13
- 12 邓洪, 崇雨田, 韩晓燕, 等. 慢性乙型肝炎患者特异性细胞毒性 T 淋巴细胞的变化. 中华肝脏病杂志, 2006, 14: 721—724