

慢性乙型肝炎患者 CD28 的表达及细胞毒性、免疫抑制性 T 细胞的研究

吴玉兰, 黄书明, 陈琳 (江苏省南通市第三人民医院检验科 226006)

【摘要】 目的 探讨慢性乙型肝炎患者外周血 CD28、CD8⁺ CD28⁺ (细胞毒性 T 细胞, CTL) 和 CD8⁺ CD28⁻ (免疫抑制性 T 细胞, Ts) 细胞分子的表达。**方法** 采用 HLA-A2 限制的 HBVcore18-27 抗原表位五聚体 (MHC pentamers) 法结合流式细胞技术分析 46 例慢性乙型肝炎 (CHB 组)、23 例乙型肝炎肝硬化 (LC 组) 患者和 23 例健康体检者 [健康对照 (NC) 组] 外周血 CD28、CD8⁺ CD28⁺、CD8⁺ CD28⁻ 细胞的表达变化, 比较他们在 CHB 分度中的作用; 并分析其与血清丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 水平和 HBV DNA 载量的关系。**结果** CD8⁺ CD28⁻ 在 CHB 和 LC 组中明显升高, 与 NC 组差异有统计学意义; CD8⁺ CD28⁺ 百分比在 CHB 轻、中、重度中逐渐升高, 而 CD8⁺ CD28⁻ 百分比逐渐下降; ALT 水平和 HBV DNA 载量与 CD8⁺ CD28⁺、CD8⁺ CD28⁻ 有一定的关系。**结论** CD28 对慢性乙肝免疫调节有重要作用, 但与肝脏的炎症程度无关; CTL 应答随炎症程度的增高而增强, 炎症程度越高细胞毒反应越明显, 更有利于病毒的清除。Ts 具有免疫抑制作用, 且 Ts 的抑制作用随炎症程度的增高而降低; ALT 水平和 HBV DNA 载量与 Ts 有一定的关系。

【关键词】 CD28; CD8⁺ CD28⁺; CD8⁺ CD28⁻; 慢性乙型肝炎; 乙型肝炎肝硬化

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2012.19.023 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2012)19-2444-02

Expression of CD28 and study on CTL, Ts in patients with chronic hepatitis B WU Yu-lan, HUANG Shu-ming, CHEN Lin (Department of Laboratory, Nantong Municipal Third People's Hospital, Nantong, Jiangsu 226006, China)

【Abstract】 Objective To explore the expression of cytotoxic lymphocyte (CTL) such as CD28, CD8⁺ CD28⁺ and CD8⁺ CD28⁻ (immune suppressor T cell, Ts) in peripheral blood. **Methods** The alteration of expression of CD28, CD8⁺ CD28⁺, CD8⁺ CD28⁻ in peripheral blood of 46 patients with chronic hepatitis B (CHB), 23 patients with chronic hepatitis B cirrhosis (LC) and 23 healthy examined people as the normal controls (NC) were measured by HLA-A2 limited HBV core 18-27 peptide pentamers combined with the flow cytometry. The role of these factors in grading CHB and the relationship between these factors with the ALT and HBV copies were compared. **Results** The level of CD8⁺ CD28⁻ in the CHB and LC groups was significantly higher than that in the NC group. The percent of CD8⁺ CD28⁺ was ascended gradually with the mild, moderate and severe CHB, while the percent of CD8⁺ CD28⁻ was decreased gradually. The level of CD8⁺ CD28⁺, CD8⁺ CD28⁻ were related to ALT and HBV copies load. **Conclusion** CD28 has important role in immunomodulation of CHB and has no relation with the degrees of liver inflammation. CTL response is increased with the increase of the inflammation degree, the higher the inflammation degrees, the more obvious the cytotoxic reaction, which better contributes to clean the virus. Ts has the immunosuppressive role and its inhibiting role is decreased with the increase of inflammatory degrees. Ts is related to ALT and HBV DNA load.

【Key words】 CD28; CD8⁺ CD28⁺; CD8⁺ CD28⁻; chronic hepatitis B; chronic hepatitis B cirrhosis

乙型肝炎病毒 (HBV) 慢性感染患者均存在免疫功能紊乱^[1-2], 病毒抗原的特异性 T 淋巴细胞免疫功能低下是造成乙型肝炎慢性化的主要原因^[3]。T 淋巴细胞表面协同刺激因子及其配体的正常表达是其活化和发挥功能的关键因素。本研究采用 HLA-A2 限制的 HBVcore18-27 抗原表位肽五聚体 (MHC Pentamers) 法结合流式细胞技术分析慢性乙型肝炎患者外周血 CD28、CD8⁺ CD28⁺ (细胞毒性 T 细胞, CTL) 和 CD8⁺ CD28⁻ (免疫抑制性 T 细胞, Ts) 细胞分子的表达情况。

1 资料与方法

1.1 一般资料 46 例慢性乙型肝炎 (CHB 组) 和 23 例乙型肝炎肝硬化 (LC 组) 患者来自 2011 年 8 月至 2012 年 3 月南通市第三人民医院感染性疾病科住院患者, 其中男 47 例, 女 22 例, 平均年龄 (48.08 ± 13.28) 岁。CHB 组中轻度 20 例、中度 15 例、重度 11 例。诊断符合中华医学会肝病学会、中华医学会感染病学会联合修订的《慢性乙型肝炎防治指南 (2010 年版)》^[4]。将 69 例患者按不同 ALT 水平分为: ≤3 倍组、>3 倍

组; 按不同 HBV-DNA 载量分为: ≤10⁵ copy/mL 组、>10⁵ copy/mL 组。所有患者 3 个月内未经免疫调节剂及抗病毒治疗, 并排除合并其他肝炎病毒感染, 酒精性肝炎等其他病毒性肝炎, 免疫性疾病及其他严重疾病。另选同期健康体检者 23 例为健康对照 (NC) 组, 其中男 14 例, 女 9 例, 平均年龄 (39.68 ± 4.67) 岁。

1.2 方法

1.2.1 CD8 和 CD28 染色 单克隆抗体 FITC 结合的鼠抗人 CD8 单克隆抗体、单克隆抗体 PC5 结合的鼠抗人 CD28 单克隆抗体购自 BD 公司。取全血 100 μL 加 CD8、CD28 单克隆抗体各 10 μL 染色, 室温, 避光, 孵育 30 min, 溶血。然后再用 PBS 洗 2 次, 之后悬浮在 500 μL PBS 缓冲液中, 用于流式细胞仪检测。

1.2.2 流式细胞仪检测 采用 Beckman coulter 公司流式细胞仪计数, 同时计数 CD28、CD8⁺ CD28⁺ 和 CD8⁺ CD28⁻ 细胞。

1.2.3 肝功能等指标检测 全自动生化仪 (Olympus

Au2700)检测肝功能指标丙氨酸氨基转移酶(ALT)。

1.2.4 HBV DNA 检测 荧光定量检测患者血清 HBV DNA 载量,检测下限 1 000 copy/mL。

1.3 统计学分析 采用 SPSS15.0 统计软件进行统计学处理,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多个组间比较用单因素方差分析,两两比较用 LSD 法,相关分析应用 Spearman's 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组外周血 CD28、CD8⁺CD28⁺、CD8⁺CD28⁻ 的表达,结果见表 1。

表 1 各组外周血淋巴细胞 CD28、CD8⁺CD28⁺、CD8⁺CD28⁻ 表达的比较($\bar{x} \pm s, \%$)

| 组别 | n | CD28 | CD8 ⁺ CD28 ⁺ | CD8 ⁺ CD28 ⁻ |
|-------|----|-------------|------------------------------------|------------------------------------|
| NC 组 | 23 | 41.69±8.76 | 12.79±7.17 | 9.31±7.28 |
| CHB 组 | 46 | 39.99±12.42 | 12.75±5.36 | 11.55±9.37 ^a |
| LC 组 | 23 | 38.10±9.11 | 11.35±4.24 | 12.90±9.07 ^a |

注:与 NC 组比较,^a $P < 0.01$ 。

2.2 CHB 分度与外周血淋巴细胞 CD28、CD8⁺CD28⁺、CD8⁺CD28⁻ 的关系,结果见表 2。

表 2 CHB 分度与外周血淋巴细胞 CD28、CD8⁺CD28⁺、CD8⁺CD28⁻ 的关系($\bar{x} \pm s, \%$)

| 组别 | n | CD28 | CD8 ⁺ CD28 ⁺ | CD8 ⁺ CD28 ⁻ |
|--------|----|--------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| CHB 轻度 | 20 | 42.21±9.74 | 11.73±6.14 | 14.90±12.11 |
| CHB 中度 | 15 | 35.62±17.64 ^b | 12.67±6.29 | 10.18±8.50 ^a |
| CHB 重度 | 11 | 41.90±5.98 | 13.57±4.04 ^a | 9.46±5.17 ^a |

注:与 CHB 轻度组比较,^a $P < 0.01$;^b $P < 0.05$ 。

2.3 不同 ALT 水平与外周血淋巴细胞 CD28、CD8⁺CD28⁺、CD8⁺CD28⁻ 的关系,结果见表 3。

表 3 不同 ALT 水平与外周血淋巴细胞 CD28、CD8⁺CD28⁺、CD8⁺CD28⁻ 的关系($\bar{x} \pm s, \%$)

| 组别 | n | CD28 | CD8 ⁺ CD28 ⁺ | CD8 ⁺ CD28 ⁻ |
|-------|----|-------------|------------------------------------|------------------------------------|
| ≤3 倍组 | 32 | 37.99±11.87 | 11.32±4.46 | 13.84±10.50 |
| >3 倍组 | 37 | 40.53±10.98 | 13.11±5.32 ^b | 10.41±7.76 ^a |

注:与 ≤3 倍组比较,^a $P < 0.01$;^b $P < 0.05$ 。

2.4 不同 HBV-DNA 载量与外周血淋巴细胞 CD28、CD8⁺CD28⁺、CD8⁺CD28⁻ 的关系,结果见表 4。

表 4 不同 HBV-DNA 载量与外周血淋巴细胞 CD28、CD8⁺CD28⁺、CD8⁺CD28⁻ 的关系($\bar{x} \pm s, \%$)

| 组别 | n | CD28 | CD8 ⁺ CD28 ⁺ | CD8 ⁺ CD28 ⁻ |
|--------------------------|----|-------------|------------------------------------|------------------------------------|
| ≤10 ⁵ copy/mL | 38 | 37.94±11.79 | 11.02±3.99 | 12.62±9.54 |
| >10 ⁵ copy/mL | 31 | 41.10±10.81 | 13.83±5.67 ^a | 11.23±8.92 ^b |

注:与 ≤10⁵ copy/mL 组比较,^a $P < 0.01$;^b $P < 0.05$ 。

3 讨 论

细胞免疫应答在抗 HBV 感染中发挥主要作用,并且与乙型肝炎的发病机制密切相关。其中,针对 HBV 各类抗原表位的特异性 CTL 作为主要的效应细胞,与清除病毒和损伤细胞直接有关,是当前研究的热点^[5]。国内研究资料显示,在慢性活动性乙型肝炎患者体内出现多克隆的 CTL 反应,其中核心抗原 18-27 为优势性表达^[6]。可溶性-MHC 肽四聚体法的出

现使直接在体内定量检测抗原特异性 CTL 成为可能。这类方法采用可溶性重组 MHC 分子与相应的病毒的抗原表位,以及检测用荧光标记等多聚体,再结合流式细胞术可直接检测外周血或者肝组织内特异性 CD8 T 细胞数量,避免了体外培养技术存在的诸多外界条件影响因素,更真实地反映了体内特异性 CD8 T 细胞的实际情况^[7]。本研究采用 HLA-A2 限制的 HBV-core18-27 抗原表位 MHC 五聚体法,发现所有 HLA-A2 阳性患者均可检测到特异性 CTL。和四聚体相比,本法简便、精确,成本经济,敏感性高,为今后临床大样本检测和进一步研究 HBV 感染慢性化与机体细胞免疫功能强弱的关系提供了方法学平台^[8]。

CD28 是由 2 条肽链组成的跨膜糖蛋白,相对分子质量为 90×10³。成熟的人 CD28 属于 IgSF 成员,有一个 IgV 样区。CD28 表达于大部分 T 细胞及部分活化 B 细胞的表面,部分浆细胞表面也可表达。CD28 的配体是 B7 家族,包括 B7-1 (CD80)和 B7-2(CD86)。CD28 作为协同刺激分子,当与 B 细胞或 APC 表面的 B7 家族结合时,CD28 可提供 T 细胞活化的辅助(第二)信号,诱导和维持 T 细胞介导的免疫应答^[9]。根据 CD8⁺T 细胞上 CD28 分子的表达与否,可将 CD8⁺细胞分为 CD8⁺CD28⁺(细胞毒性 T 细胞,CTL)和 CD8⁺CD28⁻(免疫抑制性 T 细胞,Ts)两群细胞。病毒 HBcAg 呈肝细胞的膜型或膜下定位,是 CTL 识别和攻击肝细胞的主要靶抗原,往往慢性乙型肝炎的持续病毒复制多归咎于对 HBcAg 的 T 细胞应答低下。CTL 在 HBV 复制和病情再活动及慢性化方面的作用已得到肯定。Ts 细胞由 CTL 细胞分化而来,Ts 细胞的长期升高导致 CTL 细胞的消耗,最终导致机体免疫系统无反应性。本研究发现 CHB 组、LC 组外周血 CD8⁺CD28⁺T 细胞比例下降,而 CD8⁺CD28⁻T 细胞比例上升,与文献报道一致^[10],这可能是病毒持续存在的原因。CD8⁺T 淋巴细胞表面 CD28 分子的表达下降,会引起细胞毒性 T 细胞比例下降,而抑制性 T 细胞比例上升,导致病毒难以清除,病情逐渐进展。

本研究对 46 例慢性乙型肝炎患者进行分度后进一步研究,发现 CD28⁺在轻、中、重度之间无差异性,说明 CD28 分子的表达与肝脏的炎症程度无关,肝细胞的损伤并不影响 CD28⁺的表达;而 CD8⁺CD28⁺的百分数在轻、中、重度之间有明显的差异,且逐级升高;而 CD8⁺CD28⁻的百分数在轻、中、重度之间也存在明显的差异,且逐级降低。说明 CTL 应答随炎症程度的增高而增强,细胞毒反应也就越明显,这样更有利于病毒的清除,而 Ts 的抑制作用随炎症程度的增高而降低。因此,在临床实践中也发现,慢性乙型肝炎轻度患者对抗病毒药物所起免疫反应有限,效果相对较差;而慢性乙型肝炎中、重度患者抗病毒效果优于轻度患者。

血清 ALT 水平是反映肝损伤最为敏感和特异性最强的指标之一;HBV-DNA 是 HBV 感染最直接的依据,是判断乙型肝炎病毒有无复制的“金指标”。有研究认为,HBV 感染者特异性 CTL 水平高低与病毒清除和 ALT 水平之间有一定的联系,这可能更证明了特异性 CTL 在体内直接发挥清除病毒的作用^[5]。但也有人认为,尽管 HBV 特异性的 CTL 在慢性活动性肝炎的外周血中容易被检测到,但与病毒载量和 ALT 水平没有直接的关系^[9]。本研究发现,慢性乙型肝炎患者 ALT 水平和病毒载量与 CD8⁺CD28⁺和 CD28⁺T 细胞没有直接的关系,而 CD8⁺CD28⁻的百分数在 ALT < 3 倍组及 HBV-DNA 载量小于或等于 10⁵ copy/mL 组明显升高,说明慢性乙型肝炎患者 CTL 应答不足,使分化的 Ts 细胞反应性增加。

(下转第 2447 页)

续表 1 各组一般资料比较

| 分组 | n | 年龄(岁) | 男性 | BUN(mmol/L) | Cr(μ mol/L) | hs-CRP(mg/L) | Ccr[mL/(min·1.73 m ²)] |
|-------|----|----------|----|-------------|------------------|--------------|------------------------------------|
| CKD-3 | 26 | 42.2±3.8 | 17 | 14.5±1.7 | 387.8±23.5 | 4.8±0.5 | 21.8±6.0 |
| CKD-4 | 14 | 40.3±6.2 | 11 | 16.7±2.6* | 489.6±16.7* | 6.7±0.5* | 11.4±3.6* |

注:与其他各组比较,* $P<0.05$ 。

2.2 血浆 hs-CRP 水平与 Ccr 相关性分析 采用 Pearson 相关性分析提示,慢性肾功能不全患者血浆 hs-CRP 水平与 Ccr 呈负相关,相关系数(r)=-0.816($P<0.05$),对于肾功能正常的对照组,其血浆 hs-CRP 水平与 Ccr 无明显相关,相关系数 $r=-0.366(P=0.164)$ 。

3 讨 论

本研究结果表明,对于慢性肾功能不全患者,随着 Ccr 的降低,其血浆 hs-CRP 水平呈逐渐增高趋势,Pearson 相关分析提示,慢性肾功能不全患者血浆 hs-CRP 水平与 Ccr 呈负相关($r=-0.816, P<0.05$),而对于肾功能正常人群,其血浆 hs-CRP 水平与 Ccr 无明显相关($r=-0.366, P=0.164$)。

既往大量相关研究结果提示,慢性肾功能不全患者多死于心脑血管并发症,如心肌梗死和大面积脑梗死^[5-6];因此,对于慢性肾功能不全患者,指南明确规定应给予心脑血管疾病一级及二级预防。现已证明心脑血管疾病高危人群均存在不同程度的血浆 hs-CRP 水平升高,且 hs-CRP 水平的高低在一定程度上能够预测患者的预后^[7],但对于慢性肾功能不全合并心脑血管疾病高危因素患者,其血浆 hs-CRP 水平与 Ccr 间的关系目前尚未完全明确。本研究结果提示,对于慢性肾功能不全患者,随着内生肌酐清除率的降低,其血浆 hs-CRP 水平呈逐渐升高趋势,两者间呈负相关($r=-0.816, P<0.05$)。作者认为,这可能与如下机制有关^[8-10]:(1)慢性肾功能不全患者多合并代谢紊乱如高脂血症等,血脂容易沉积在血管内皮细胞,从而导致内皮细胞功能障碍及慢性炎症,表现为血浆 hs-CRP 水平的升高;(2)慢性肾功能不全患者容易丢失各种体液免疫因子,造成免疫功能的下降以及容易并发各种感染,因此,其血浆 hs-CRP 水平也容易升高;(3)慢性肾功能不全患者由于各种营养物质如白蛋白的丢失,导致肝脏功能的下降,从而导致血浆 hs-CRP 水平的升高,hs-CRP 水平的升高又激活体内各种炎症反应以及氧化应激,导致 hs-CRP 水平的进一步升高。

综上所述,作者认为,对于慢性肾功能不全患者,其血浆 hs-CRP 水平与患者 Ccr 具有较好的相关性。因此,检测血浆 hs-CRP 水平联合其他相关指标能够更好地评估慢性肾功能不全患者的总体状况。

参考文献

[1] 郭凤玲,张卫东,刘章锁,等.厄贝沙坦治疗慢性肾功能不全合并高血压的效果评价[J].医药论坛杂志,2011,32(17):166-167.
 [2] 张继强,陈卫东,张燕,等.慢性肾衰竭患者不同分期及原发病血脂变化临床研究[J].中华全科医学,2011,9(1):14-16.
 [3] 张丙雨,马礼坤,余华,等.瑞舒伐他汀对动脉粥样硬化模型兔血清高敏 C 反应性蛋白和热休克蛋白 70 的影响[J].中国临床保健杂志,2011,14(3):290-291.
 [4] 盛春平,杨文东,孙传芳.C 反应蛋白浓度与冠心病的关系及氟伐他汀干预治疗的临床研究[J].实用医技杂志,2008,15(9):1134-1135.
 [5] 韩雅玲,荆全民,王冬梅.冠心病合并慢性肾功能不全介入诊疗围术期的肾功能保护[J].介入放射学杂志,2003,12(增刊):108.
 [6] 苗冬梅,曹瑞华,刘源,等.老年人慢性肾功能不全对冠心病预后的影响[J].中华老年多器官疾病杂志,2010,9(2):127-130.
 [7] 沙永红,周智广,熊濮.高敏 C-反应蛋白与 2 型糖尿病早期大血管病变的相关研究[J].中国实用内科杂志,2005,25(10):890-892.
 [8] 刘玉梅,张秀艳.急性脑梗死患者血浆同型半胱氨酸和氧化低密度脂蛋白的意义[J].中国实用医药,2009,4(24):21-22.
 [9] 李东贤,李冬青,刘雪梅,等.依达拉奉与急性脑梗死患者血清高敏 C-反应蛋白浓度的相关性研究[J].中风与神经疾病杂志,2008,25(3):370-371.
 [10] 崔炯,张振花,万建新,等.阿托伐他汀对慢性肾衰竭大鼠外周血内皮祖细胞的影响[J].中国药理学通报,2010,26(12):1591-1594.

(收稿日期:2012-03-06)

(上接第 2445 页)

参考文献

[1] 邹志强,于吉广,林治辉.e 抗原阴性的慢性乙型肝炎患者 T 淋巴细胞 CD 与免疫耐受的关系[J].中国医师进修杂志,2007,30(11):28-29.
 [2] 孙学华,刘巧丽,李曼,等.慢性乙型肝炎患者外周血 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞亚群的研究[J].细胞与分子免疫学杂志,2011,27(5):545-547.
 [3] 刘红.慢性乙型肝炎患者 CD28 的表达及 CTL、Ts 的研究[J].国际消化杂志,2008,28(6):507-509.
 [4] 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].临床肝胆病杂志,2011,27(1):I-XV.
 [5] 范振平,王福生,徐东平,等.乙型肝炎患者 HBeAg 特异性细胞毒性 T 细胞的检测及其与临床疾病状态的关系[J].中华医学杂志,2004,84(24):2073-2076.

[6] 张静波,陈思源,杨志清,等.慢性乙肝患者表位特异性 CTI 定量检测的评价[J].世界华人消化杂志,2004,12(5):1069-1072.
 [7] 朴文花,何豫,席宏丽,等.HLA-A2 肽四聚体的构建及其在乙、丙型肝炎中的初步应用[J].中华医学杂志,2004,84(24):1818-1822.
 [8] 裴豪,杨小娟,钱金娟,等.流式细胞术细胞因子分析法检测乙型肝炎患者特异性细胞免疫功能的初步研究[J].检验医学,2008,23(2):179-182.
 [9] 蔡洁,刘源,韩亚萍,等.慢性乙型肝炎患者外周血 T 淋巴细胞表面 CD28 的表达[J].放射免疫学杂志,2008,21(5):467-468.
 [10] 王洪,周吉军,夏杰,等.MHC-表位肽四聚体技术在病毒性肝炎研究中的应用[J].世界华人消化杂志,2004,12(6):1432-1436.

(收稿日期:2012-03-09)