

HIV 对 HIV/HCV 共感染患者丙型肝炎病程进展的影响

刘金花 孙焕芹 赵艳 孙焕焕 乔桂芳 徐杰 刘宁
覃岭 李昂 江娜 张永宏

【摘要】 目的 探讨 HIV 感染对 HIV/HCV 共感染患者病情进展的影响及免疫机制。方法 研究对象为 28 例 HIV/HCV 共感染者及 12 例 HCV 单独感染者。外周血生化检测及超声 Fibro-Scan 评估肝脏功能及纤维化程度,采用 PCR-荧光探针法检测外周血 HCV 病毒载量,运用流式细胞技术检测外周血 Treg/CD₄⁺T 淋巴细胞百分率。**结果** HIV/HCV 共感染组 ALT 及碱性磷酸酶(ALP)水平分别为(76.16±81.248)U/L、(24.507 1±8.194)g/L,明显高于 HCV 单独感染组 [(27.475 0±13.985) U/L、(16.966 7±7.189)g/L],差异具有统计学意义,*P* 值分别为 0.012、0.009。HIV/HCV 共感染组患者肝脏纤维化指标 *E* 值为 5.950 0~5.825 0 Kpa,与 HCV 单独感染者(5.150 0~1.050 0 Kpa)相比有升高趋势,*P*=0.077。HIV/HCV 共感染者、HCV 单独感染者 HCV 载量及病毒清除率分别为(6.476 8~5.343 4)lg copy/ml 及 32.14%、(1.699 0~2.681 5)lg copy/ml 及 75.00%,HIV/HCV 共感染组 HCV 载量明显高于 HCV 单独感染组,HCV 清除率低于 HCV 单独感染组,*P* 值分别为 0.012 及 0.032。HIV/HCV 共感染组 Treg/CD₄⁺T 淋巴细胞百分率为(7.460 0%~2.287 5%),高于 HCV 单独感染组(5.965 0%~2.105 0%),差异有统计学意义(*P*=0.032)。并且 Treg/CD₄⁺T 淋巴细胞百分率与 HCV 载量具有明显相关性($\rho=0.350, P=0.027$),而 HCV 载量与肝脏纤维化程度 *E* 值存在相关性($\rho=0.487, P=0.001$)。**结论** HIV/HCV 共感染加速丙型肝炎病情进展,而 Treg 细胞与丙型肝炎病情进展相关。

【关键词】 艾滋病病毒; 丙型肝炎病毒; 共感染; 肝内调节性 T 细胞

Influence of HIV infection on hepatitis C progress in patients co-infected with HIV/HCV Liu Jinhua, Sun Huanqin, Zhao Yan, Sun Huanhuan, Qiao Guifang, Xu Jie, Liu Ning, Qin Ling, Li Ang, Jiang Na, Zhang Yonghong. Beijing Youan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100069, China
Corresponding author: Zhang Yonghong, Email: 13810108505@163.com

This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (No. 81271842), Beijing Natural Science Foundation (No. 7132098), Beijing Municipal Health Bureau (No. 2011-2018-06) and Beijing Municipal Science and Technology Commission (No. D131100005315005).

【Abstract】 Objective To understand the influence of HIV infection on hepatitis C progress in patients co-infected with HIV and hepatitis C virus (HCV) and related immune mechanism. **Methods** Twenty eight patients co-infected with HIV/HCV and 12 patients with simplex HCV infection were enrolled. The liver function and hepatic fibrosis progress were evaluated by detecting peripheral blood and with Fibro-Scan. The viral load of HCV was detected by using real time quantitative PCR. And the percentage of Treg/CD₄⁺T lymphocyte cell was tested by using flow cytometry. **Results** The levels of ALT and ALP in HIV/HCV co-infection group were (76.16±81.248)U/L, (24.507 1±8.194) g/L respectively, higher than those of simplex HCV infection group [(27.475 0±13.985)U/L, (16.966 7±7.189)g/L], the differences were statistical significant. *P* value was 0.012 and 0.009 respectively. The liver fibrosis index in HIV/HCV co-infection group was 5.950 0~5.825 0 Kpa, higher than that in simplex HIV infection group (5.150 0~1.050 0 Kpa), and the

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2015.07.016

基金项目:国家自然科学基金(81271842);北京市自然科学基金(7132098);首都卫生发展科研专项(首发2011-2018-06);北京市科技计划项目(D131100005315005)

作者单位:100069 北京,首都医科大学附属北京佑安医院

通信作者:张永宏, Email: 13810108505@163.com

difference was nearly statistical significant ($P=0.077$). The HCV viral load in HIV/HCV co-infection group was (6.476 8–5.343 4)lg copy/ml, higher than that in simplex HCV infection group [(1.699 0–2.681 5)lg copy/ml], and the rate of HCV clearance in HIV/HCV co-infection group was 32.14%, lower than that in simplex HCV infection group (75.00%). P value was 0.012 and 0.032 respectively. The percentage of Treg/CD₄⁺T lymphocyte cell in HIV/HCV co-infection group was (7.460 0%–2.287 5%), higher than that in simplex HCV infection group (5.965 0%–2.105 0%), and the difference was significant ($P=0.032$). The percentage of Treg/CD₄⁺T lymphocyte cell was significantly related with HCV viral load ($\rho=0.350, P=0.027$), and HCV viral load was significantly related with the liver fibrosis index ($\rho=0.487, P=0.001$). **Conclusion** HIV infection could accelerate the progress of hepatitis C, and Treg cells were involved in this progress.

【Key words】 HIV; Hepatitis C virus; Co-infection; Treg cells

HIV和HCV具有相似的传播途径,均可经静脉注射、使用血液制品传播,亦可通过性途径、母婴等方式传播。世界流行病学调查数据表明,HIV感染者合并HCV感染的现象普遍,HIV/HCV共感染已经成为全球性问题。全世界的HIV/AIDS感染者中约23%~75%为HIV/HCV共感染^[1],然而,在全国流调统查报道HIV感染者中HIV/HCV共感染率为56.9%^[1],经有偿献血途径感染HIV的人群中,HIV/HCV共感染率高达86.3%^[2],明显高于其他国家。国内外研究报道HIV/HCV共感染影响丙型肝炎的病情进展^[3-4],但是其免疫机制尚不清楚。研究表明,肝内调节性T细胞(regulatory T cell, Treg)在慢性丙型肝炎中起着重要作用^[5]。因此,本研究通过对HIV/HCV共感染患者及HCV单独感染患者外周血Treg的分析,从而探讨Treg的变化及临床意义。

对象与方法

1. 研究对象:以2013年12月到北京佑安医院进行随访的河南籍28例HIV/HCV共感染患者以及12例HCV单独感染患者为研究对象,采集患者病史及外周血,进行HIV对HIV/HCV共感染患者病情进展影响分析及免疫机制研究。28例HIV/HCV共感染患者均进行了抗-HIV治疗,所有研究对象均未进行抗-HCV治疗。入组病例一般情况,见表1。两组患者年龄、性别、HCV感染时间及感染方式均具有可比性。

2. 诊断标准:AIDS及HIV感染诊断参照美国疾病预防控制中心(CDC)修订,于1993年1月1日起实行的青年和成年人HIV/AIDS分类和扩大的AIDS定义^[3]。所有病例均经免疫印迹试验(WB)确认为HIV感染。丙型肝炎诊断参照文献^[4]。所有

丙型肝炎病例均为HCV RNA(+)和/或抗HCV(+),并选取HAV、HBV、HDV、HEV抗体阴性者,以排除HAV、HBV、HDV、HEV及其他原因引起的急慢性肝损害。

3. 抗-HIV抗体检测:抗-HIV抗体检测采用HIV 1+2型抗体检测试剂盒(WB,新加坡MP公司),严格按照说明书进行实验操作。

4. HCV载量及抗-HCV抗体检测:外周血HCV载量检测采用丙型肝炎病毒核酸定量检测试剂盒(PCR-荧光探针法,湖南圣湘生物),使用ABI7500荧光PCR仪,严格参照试剂操作规程进行。抗-HCV抗体检测采用罗氏Cobas e601全自动电化学发光免疫分析仪。

5. 血生化检测:采用富士700全自动干生化分析仪,操作按说明书进行。

6. 肝脏纤维化评估:采用瞬时弹性扫描仪FibroScan测定肝脏硬度值,以评估患者肝纤维化程度。评估标准参照瞬时弹性成像技术诊断肝纤维化专家意见^[6]。

7. Treg百分率检测:CD₄⁺CD₂₅⁺CD₁₂₇^{dim/-}Treg检测^[7-8],试剂采用BD公司CD₃-PE-Cy7抗体、CD₄-Alexa Fluor 488抗体、CD₂₅-AmCyan抗体及CD₁₂₇-DAPI抗体,仪器采用BD公司LSRFortessa流式细胞仪。实验方法严格参照仪器及试剂规程操作。采集患者肘静脉血,肝素抗凝,取100 μl置于待检管,同时加入5 μl CD₃-PE-Cy7抗体、5 μl CD₄-Alexa Fluor 488抗体、5 μl CD₂₅-AmCyan抗体及5 μl CD₁₂₇-DAPI抗体荧光抗体,充分混匀,室温,避光30 min。加入1 ml溶血素,室温,避光15 min。加入1 ml PBS,1 500 r/min,离心5 min,弃上清,加入300 μl PBS,上机。

表1 HIV/HCV共感染患者及HIV单独感染患者一般情况

组别	病例数	性别(男/女)	平均年龄(岁)	HCV感染时间	抗-HCV IgG(+)	抗-HIV IgG(+)
HIV/HCV共感染组	28	8/20	51	1994—1995年	28	28
HCV单独感染组	12	3/9	53	1994—1995年	12	0

8. 统计学分析:数据录入 SPSS 13.0 统计软件包,图像处理采用 GraphPad Prism 5.0 专业软件。两组计量资料经 Kolmogorov-Smirnov 检验,正态分布资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较采用独立样本 t 检验,非正态分布计量资料以中位数和四分位数间距表示,采用 Mann-Whitney U 检验,两组计数资料比较采用 χ^2 检验,相关性分析采用 Spearman 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. HIV/HCV 共感染患者与 HCV 单独感染者肝功能指标比较:ALT、总胆红素(TBil)、直接胆红素(DBil)、白蛋白(ALB)、ALP 及谷氨酰转氨酶(γ -GT)水平在 HIV/HCV 共感染组患者中与在 HCV 单独感染组患者中的两组比较,HIV/HCV 共感染患者 ALT 及 ALP 水平明显高于 HCV 单独感染组,AST/ALT 比值低于 HCV 单独感染组, P 值分别为 0.012、0.009、0.024,见表 2。

表 2 HIV/HCV 共感染组与 HCV 单独感染组肝功能生化指标

项目	HIV/HCV 共感染	HCV 单独感染	t 值	P 值
ALT(U/L)	53.746 4 ± 48.118	27.475 0 ± 13.985	-0.641	0.012
AST(U/L)	71.735 7 ± 31.530	64.450 0 ± 14.694	-0.762	0.451
AST/ALT	1.936 8 ± 0.993	2.871 7 ± 1.468	2.355	0.024
TBil(μ mol/L)	14.389 3 ± 8.049	15.150 0 ± 9.916	0.255	0.800
DBil(μ mol/L)	3.050 0 ± 2.385	2.166 7 ± 1.182	-1.214	0.232
ALB(g/L)	45.203 6 ± 3.334	47.691 7 ± 2.302	2.348	0.024
ALP(g/L)	24.507 1 ± 8.194	16.966 7 ± 7.189	-2.761	0.009
γ -GT(U/L)	93.457 1 ± 106.972	53.433 0 ± 38.175	-1.254	0.217

2. HIV/HCV 共感染患者与 HCV 单独感染者肝脏纤维化指标比较:采用 FibroScan 无创评估 HIV/HCV 共感染患者及 HCV 单独感染者肝脏纤维化程度。HIV/HCV 共感染组患者肝脏纤维化指标 E 值为 5.950 0 ~ 5.825 0 Kpa,高于 HCV 单独感染患者 E 值为 5.150 0 ~ 1.050 0 Kpa,两者比较,差异无统计学意义($P=0.117$)。

3. HIV/HCV 共感染对 HCV 复制及清除的影响:HIV/HCV 共感染组及 HCV 单独感染组 HCV 载量分别为 6.476 8 ~ 5.343 4 lg copy/ml 及 1.699 0 ~ 2.681 46 lg copy/ml,两组病毒载量比较,HIV/HCV 共感染组高于 HCV 单独感染组,差异有统计学意义($P=0.012$)。HIV/HCV 共感染组 HCV 清除率为 32.14%(9/28),低于 HCV 单独感染组[75%(9/12)],差异有统计学意义($P=0.032$)。

4. HIV/HCV 共感染患者与 HCV 单独感染者

Treg 百分率比较:HIV/HCV 共感染组与 HCV 单独感染组 $CD_3^+CD_4^+CD_{25}^+CD_{127}^{dim-}$ Treg 百分率分别为 7.460 0% ~ 2.287 5%、5.965 0% ~ 2.105 0%,HIV/HCV 共感染组 Treg 百分率高于 HCV 单独感染组,差异有统计学意义($P=0.019$),见图 1。

5. Treg 百分率与 HCV 载量相关性、HCV 载量与肝脏纤维化指标 E 值相关性分析:在 HIV/HCV 共感染者及 HCV 单独感染者中,Treg 百分率与 HCV 载量呈显著正相关($\rho=0.350, P=0.027$),HCV 载量与肝脏纤维化程度 E 值存在相关性($\rho=0.487, P=0.001$),如图 2 所示,而 Treg 百分率与肝脏纤维化指标 E 值不具有明显相关性($\rho=0.228, P=0.158$)。

讨 论

目前,普遍认为在 HIV/HCV 共感染者中,HIV 感染加速丙型肝炎的病情进展,促进肝硬化及并发症的进程^[9]。既往研究表明,与 HCV 单独感染者相比,HIV/HCV 共感染者由急性丙型肝炎发展为慢性肝炎的概率更高^[10],HCV 载量更高,进展为失代偿性肝病及肝硬化的危险性更高^[11]。上述研究发现与本研究结果一致,与 HCV 单独感染组相比,HIV/HCV 共感染组肝功能指标 ALT、ALP 水平明显增高,而 ALB 水平降低,肝脏纤维化指标 E 值有增高趋势,提示 HIV/HCV 共感染者肝脏受损更加严重。HIV/HCV 共感染组 HCV 载量高于 HCV 单独感染组,而 HCV 清除率明显低于 HCV 单独感染组,即 HIV/HCV 共感染者进展为慢性丙型肝炎的概率更高。可见,HIV/HCV 共感染促进 HCV 病毒繁殖,抑制 HCV 清除,加重肝脏纤维化,从而加速丙型肝炎病程进展。因本研究病例数偏少,为进一步确证结论,将扩大样本量继续后续研究。

研究结果发现,HIV/HCV 共感染组 Treg 百分率高于 HCV 单独感染组,并且 Treg 百分率与 HCV 载量具有显著正相关性,HCV 载量与肝脏纤维化指标 E 值呈正相关,而 Treg 百分率与肝脏纤维化没有明显相关性。可见,HCV 载量影响肝脏纤维化程度,而 Treg 促进 HCV 复制,但是目前数据不支持 Treg 直接影响肝脏纤维化程度。Treg 是不同于 Th1 和 Th2 细胞的一种 CD_4^+ T 淋巴细胞亚群,可抑制 CD_4^+ 、 CD_8^+ 效应 T 细胞及自然杀伤细胞(natural killer cell, NK) 功能。既往研究表明,在慢性丙型肝炎中,Treg 抑制 HCV 特异性 CD_8^+ T 淋巴细胞增殖^[12],细胞免疫反应受损,HCV 特异性 CD_8^+ T 淋巴细胞增殖能力、细胞因子分泌及细胞毒性效应功能受损^[13],从而抑制

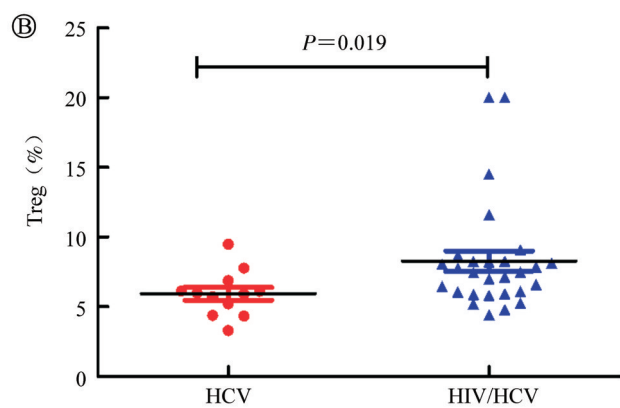
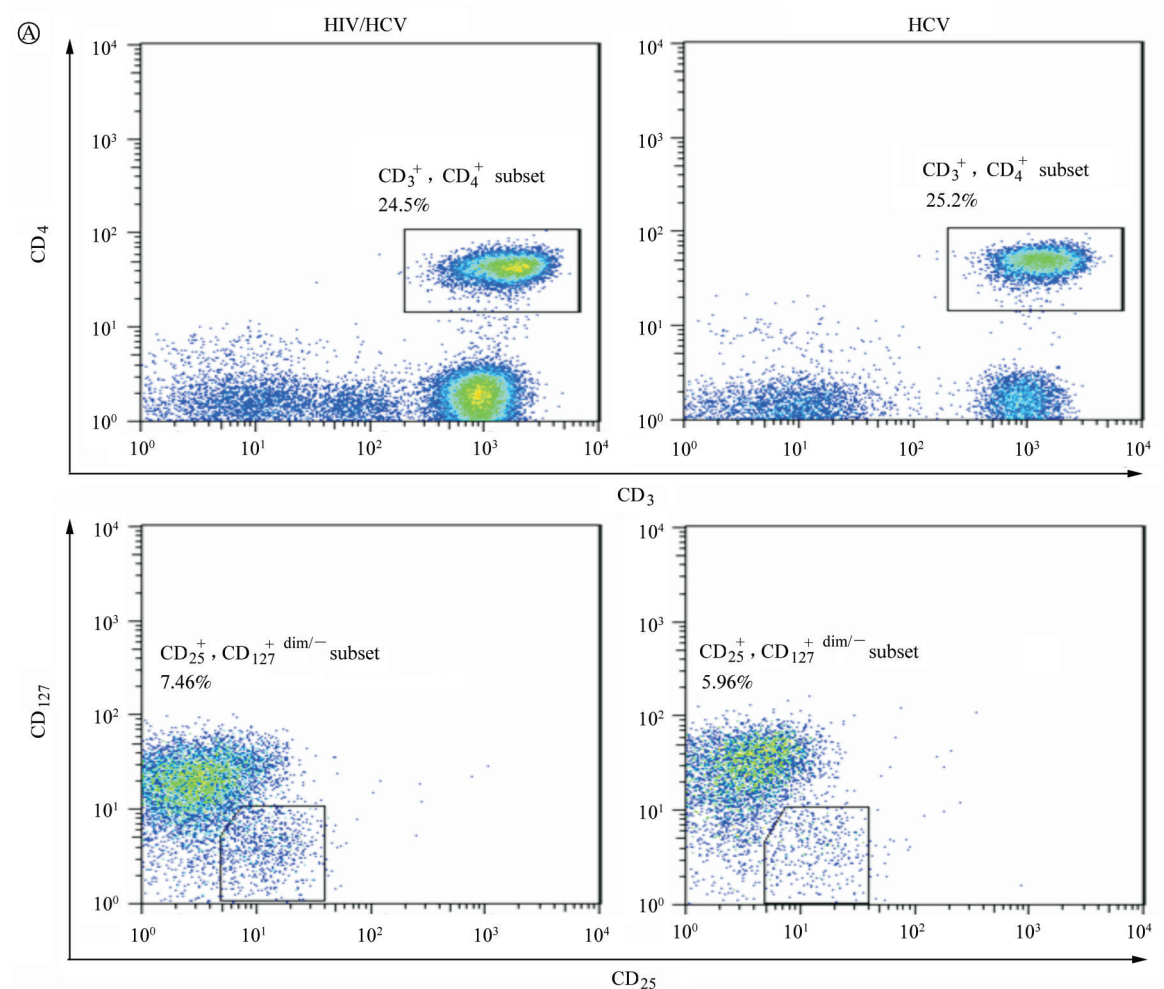


图1 HIV/HCV 共感染患者与HCV 单独感染者 Treg 百分率比较

HCV 清除, 进展为慢性丙型肝炎。研究发现, 在 HIV 感染者中, Treg/CD4⁺T 淋巴细胞百分率增高^[14], HIV 感染导致 CD4⁺T 淋巴细胞减少, Treg 增殖能力增强, 从而 Treg 百分率增高^[15]。因此, HIV/HCV 共感染者 Treg 百分率增高与 HIV 感染有关。

1995 年在小鼠模型中第一次发现, 表达 IL-2 受体 α 链分子 (CD25) 的 CD4⁺T 淋巴细胞, 下调 T 细胞免疫反应, 保持自身免疫耐受^[16]。随后, 在人体中发

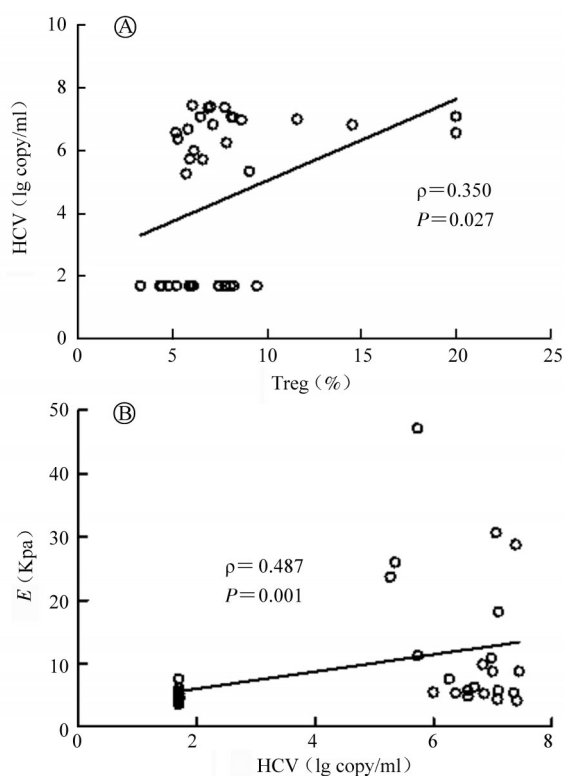


图2 ①Treg 百分率与HCV 载量相关性分析; ②HCV 载量与肝纤维化指标E 值相关性分析

现, $CD_4^+CD_{25}^+$ T 淋巴细胞具有抑制性 T 细胞亚群即 Treg 特性^[17-18]。但是, T 细胞激活过程中也表达 CD_{25} , 因此, CD_{25} 分子不能作为 Treg 特异性标记分子。Hori 等^[19]发现, 在鼠中, Foxp3 (forkhead box P3) 转录因子是鉴定 Treg 必要及特异性分子。但是, 在人体中, $CD_4^+CD_{25}^+$ T 淋巴细胞也表达 Foxp3^[20]。研究发现, $CD_4^+CD_{25}^+$ Foxp3+ 细胞低表达 CD_{127} 分子 (IL-7 受体 α 链分子), CD_{25} 及 CD_{127} 共表达可用于鉴定 CD_4^+ Treg。

综上所述, HIV/HCV 共感染加速丙肝病程进展, Treg 促进 HCV 繁殖, 而 HCV 载量影响肝脏纤维化程度。Treg 影响 HCV 复制的免疫机制有待深入研究。但抑制 Treg 可能为丙型肝炎治疗提供新思路。

参 考 文 献

- [1] Luo RD. Lecture of infectious diseases [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2002: 114-122. (in Chinese)
罗端德. 传染病讲座 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 114-122.
- [2] Liu Z, Xing WG, Zhang YH, et al. Study on the epidemiology and HCV genotype distribution of HIV/HCV co-infection among HIV infected blood donors in China [J]. Chin J Hepatol, 2006, 14 (6): 464-465. (in Chinese)
刘震, 邢文革, 张永宏, 等. 既往有偿献血(浆)人群中艾滋病毒与丙型肝炎病毒共感染研究 [J]. 中华肝脏病杂志, 2006, 14 (6): 464-465.
- [3] Lin WY, Weinberg EM, Chung RT. Pathogenesis of accelerated fibrosis in HIV/HCV co-infection [J]. J Infect Dis, 2013, 207 Suppl 1: S13-18.
- [4] Neukam K, García-Rey S, Cifuentes C, et al. HIV-coinfection leads to a modest increase in plasma HCV-RAN load in patients with chronic HCV infection [J]. Antiviral Res, 2012, 95(3): 212-215.
- [5] Ward SM, Fox BC, Brown PJ, et al. Quantification and localisation of FOXP3+ T lymphocytes and relation to hepatic inflammation during chronic HCV infection [J]. J Hepatol, 2007, 47(3): 316-324.
- [6] Review Panel for Liver Stiffness Measurement. Recommendations for the clinical application of transient elastography in liver fibrosis assessment [J]. Chin J Hepatol, 2013, 21 (6): 420-424. (in Chinese)
肝脏硬度评估小组. 评估标准参照瞬时弹性成像技术诊断肝纤维化专家意见 [J]. 中华肝脏病杂志, 2013, 21(6): 420-424.
- [7] Liu WH, Putnam AL, Zhou XY, et al. CD_{127} expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD_4^+ Treg cells [J]. J Exp Med, 2006, 203(7): 1701-1711.
- [8] Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J, et al. Expression of interleukin (IL) -2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells [J]. J Exp Med, 2006, 203 (7): 1693-1700.
- [9] Hernandez MD, Sherman KE. HIV/HCV coinfection natural history and disease progression, a review of the most recent literature [J]. Curr Opin HIV AIDS, 2011, 6(6): 478-482.
- [10] Singal AK, Anand BS. Management of hepatitis C virus infection in HIV/HCV co-infected patients: clinical review [J]. World J Gastroenterol, 2009, 15(30): 3713-3724.
- [11] López-Díéguez M, Montes ML, Pascual-Pareja JF, et al. The natural history of liver cirrhosis in HIV/HCV coinfection patients [J]. AIDS, 2011, 25(7): 899-904.
- [12] Boettler T, Spangenberg HC, Neumann-Haefelin C, et al. T cells with a $CD_4^+CD_{25}^+$ regulatory phenotype suppress in vitro proliferation of virus-specific CD_8^+ T cells during chronic hepatitis C virus infection [J]. J Viral, 2005, 79(12): 7860-7867.
- [13] Wedemeyer H, He XS, Nascimbeni M, et al. Impaired effector function of hepatitis C virus-specific CD_8^+ T cells in chronic hepatitis C virus infection [J]. J Immunol, 2002, 169(6): 3447-3458.
- [14] Tsunemi S, Iwasaki T, Imado T, et al. Relationship of $CD_4^+CD_{25}^+$ regulatory T cells to immune status in HIV-infected patients [J]. AIDS, 2005, 19(9): 879-886.
- [15] Bi XQ, Suzuki Y, Gatanaga H, et al. High frequency and proliferation of CD_4^+ FOXP3+ Treg in HIV-1-infected patients with low CD_4 counts [J]. Eur J Immunol, 2009, 39(1): 301-309.
- [16] Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, et al. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -chains (CD_{25}) [J]. J Immunol, 1995, 155(3): 1151-1164.
- [17] Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, et al. $CD_4^+CD_{25}^+$ high regulatory cells in human peripheral blood [J]. J Immunol, 2001, 167(3): 1245-1253.
- [18] Ng WF, Duggan PJ, Ponchel F, et al. Human $CD_4^+CD_{25}^+$ cells: a naturally occurring population of regulatory T cells [J]. Blood, 2001, 98(9): 2736-2744.
- [19] Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3 [J]. Science, 2003, 299(5609): 1057-1061.
- [20] Allan SE, Crome SQ, Crellin NK, et al. Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production [J]. Int Immunol, 2007, 19(4): 345-354.

(收稿日期: 2014-12-02)

(本文编辑: 王岚)