

慢性乙型肝炎病人外周血单个核细胞 HBV 感染后对其细胞免疫功能影响的研究

宣世英 孙 樱 张 健 李清华 吕维红 姜岭梅 吴树华 邹 波

摘要 应用聚合酶链(PCR)方法检测慢性乙型肝炎(乙肝)病人外周血单个核细胞(PBMC)内乙肝病毒 DNA(HBV DNA)。54 例 PBMC 内 HBV DNA(+)和 71 例 PBMC 内 HBV DNA(-)病例平行测定自然杀伤细胞(NK)活性、T 细胞亚群比值(CD₄/CD₈)和血清可溶性白细胞介素 2 受体(sIL-2R)。结果示慢性乙肝病人 PBMC 内 HBV DNA(+)组 NK、CD₄/CD₈ 和 sIL-2R 与正常对照组及 PBMC 内 HBV DNA(-)组病人相比差异均有非常显著性($P < 0.001$)。同时发现慢性乙肝 PBMC 内 HBV DNA(+)病人 NK 活性、CD₄/CD₈ 比值和 sIL-2R 水平有直线相关性(P 均 < 0.01),而 PBMC 内 HBV DNA(-)病人,仅 CD₄/CD₈ 比值和 sIL-2R 水平呈相关性($P < 0.001$) NK 活性尚未受到明显影响。结果表明,HBV 感染 PBMC 导致慢性乙肝病人细胞免疫功能紊乱,有助于阐明慢性乙肝的发病机制,并有可能为乙肝的防治提供理论依据。

关键词 慢性乙型肝炎 NK 细胞活性 T 细胞亚群比值 可溶性白细胞介素 2 受体 细胞免疫功能

The Influence to the Function of Cellular Immunity after Being Infected by HBV in the PBMC in Chronic Hepatitis B Xuan Shi-ying, Sun Ying, Zhang Jian, et al. Department of Infections Disease Qingdao Municipal Hospital, Qingdao 266011

Abstract In this study, HBV DNA was detected by PCR from PBMC of chronic hepatitis B. A total number of 54 cases were positive and 71 cases were negative. When detecting the competence of NK cells, the subgroup of T cells the ratio of CD₄/CD₈, the concentration of sIL-2R in three groups, and between the two CHB groups and a normal control group, the differences between HBV DNA positive group and HBV DNA negative group and between HBVDNA positive group and the normal control group were all dramatically significant ($P < 0.01$). We also found that a lineal correlation of the competence of NK cells, the ratio of CD₄/CD₈ and the concentration of sIL-2R ($P < 0.01$) in the positive group, whereas in the negative group only the ratio of CD₄/CD₈ was consistent with the concentration of sIL-2R ($P < 0.01$), and the competence of NK cells did not decrease obviously. The results indicated that it was the infection of HBV in PBMC which caused the disorder of the function of cellular immunity. This finding helped us to explain the pathogenesis of hepatitis B. It could also lay a theoretical ground for the prevention and the treatment of hepatitis B.

Key words Chronic hepatitis B NK cells Subgroup of T cells sIL-2R The function of cellular immunity

慢性乙型肝炎(乙肝)病人存在着多种免疫功能紊乱,而细胞免疫功能的异常与乙肝发病关系密切。外周血单个核细胞(perip-

heral blood mononuclear cell, PBMC)为免疫活性细胞的集合体,在机体的免疫应答中起着极为重要的作用。我们观察了 PBMC 内 HBV DNA 感染及其体内 NK 活性、CD₄/CD₈ 比值和 sIL-2R 水平的变化,以评价

HBV 感染免疫细胞后相应免疫细胞之某种特定的或总的功能改变,并探讨其在慢性乙肝发病机制中的作用。

材料与方法

一、研究对象:依 1990 年病毒性肝炎学术会议(上海)修订的“标准”,确诊为慢性乙肝病人 125 例,年龄 14~62 岁;含男 87 例、女 38 例。其中 PBMC 内 HBV DNA(+)54 例(男 40 例,女 14 例,平均年龄 37.6 岁);PBMC 内 HBV DNA(-)71 例(男 47 例、女 24 例,平均 40.3 岁)。所有被检测病例均未接受过抗病毒治疗,亦未用过糖皮质激素药物。

二、试剂与方法:

1. PCR 扩增:HBV DNA PCR 试剂购自华美生物工程公司。PBMC 内 DNA 提取方法参照 Pasquinelli^[1]方法,标本处理参照试剂盒说明进行。取经处理好的标本 2 μ l,加入 1 μ l Taq DNA 聚合酶、28 μ l PCR 反应液充分混匀后离心,94 $^{\circ}$ C 预变性 5 分钟,继分别以 94 $^{\circ}$ C、55 $^{\circ}$ C、72 $^{\circ}$ C 循环 35 个周期,72 $^{\circ}$ C 最终延伸 5 分钟。结果观察:取 10 μ l 反应产物于 2% 琼脂糖凝胶内电泳,80V 20~30 分钟,然后在紫外灯下观察,以与阳性标本同一位置

有明显条带为阳性。

2. T 细胞亚群和 NK 测定:采用碱性磷酸酶抗碱性磷酸酶法(APAAP),试剂由军事医学科学院基础医学科学院基础医学研究所提供。

3. sIL-2R 测定:采用单克隆与多克隆双抗体夹心法,试剂由白求恩医科大学基础医学院免疫学教研室提供。

三、数据处理:各组间的均数比较采用 *t* 检验,NK、CD₄/CD₈ 比值和 sIL-2R 之间的关系采用直线相关分析。

结 果

一、慢性乙肝病人 NK 活性、CD₄/CD₈ 比值和 sIL-2R 水平比较:见附表。NK 活性在 PBMC 内 HBV DNA(+)病例低于正常人对照组($P < 0.01$);PBMC 内 HBV DNA(-)病人与正常对照组比较也有所下降($P < 0.05$)。CD₄/CD₈ 比值慢性乙肝病人均低于正常对照组($P < 0.01$);sIL-2R 水平与正常组比较增高($P < 0.01$)。PBMC 内 HBV DNA(+)组与(-)组的 NK 细胞活性、CD₄/CD₈ 比值和 sIL-2R 水平比较差异有显著性($P < 0.01$)。

附表 慢性乙肝病人 NK 活性、T 细胞亚群和 sIL-2R 水平比较

组 别	病例数	NK	CD ₄	CD ₈	CD ₄ /CD ₈	sIL-2R
正常人	50	15.79 \pm 2.95	43.62 \pm 4.71	25.43 \pm 2.54	1.80 \pm 0.45	250.04 \pm 96.98
PBMC 内 HBV DNA(+)	54	10.13 \pm 2.07	29.86 \pm 1.95	29.56 \pm 2.10	1.01 \pm 0.13	635.28 \pm 110.24
PBMC 内 HBV DNA(-)	71	14.83 \pm 1.20	32.81 \pm 2.50	26.32 \pm 2.56	1.28 \pm 0.19	366.53 \pm 80.35

二、慢性乙肝病例 NK 活性、CD₄/CD₈ 比值和 sIL-2R 水平相关性比较:对 54 例 PBMC 内 HBV DNA(+)病人 NK 细胞活性、CD₄/CD₈ 比值和 sIL-2R 水平进行直线相关分析,NK 与 CD₄/CD₈、sIL-2R 与 CD₄/CD₈ 和 NK 与 sIL-2R 之间相关系数分别为 0.6699、-0.5957 和 -0.7439,经显著性检验, $P < 0.001$ 。而 PBMC 内 HBV DNA(-)慢性乙肝病例组(7 例)仅 CD₄/CD₈ 比值及 sIL-2R 水平呈相关性($r = -0.589$, $P <$

0.001),NK 活性与 CD₄/CD₈ 比值及 sIL-2R 水平无相关性(r 分别为 0.219 和 0.199, P 均 > 0.05)。

讨 论

HBV 感染 PBMC 并在其中复制增殖,无疑会对其正常功能产生影响。为此,我们用 PCR 方法检测了 125 例慢性乙肝病人 PBMC 内 HBV DNA,并平行测定 NK 活性、CD₄/CD₈ 比值和 sIL-2R 水平。结果 54 例

慢性乙肝 PBMC 内 HBV DNA(+)病人与 71 例慢性乙肝 PBMC 内 HBV DNA(-)病人的 NK 活性、CD₄/CD₈ 比值和 sIL-2R 水平差异有非常显著性($P < 0.01$)。PBMC 内 HBV DNA(+)组病人 NK 活性低于 HBV DNA(-)组病人。NK 细胞对病毒感染细胞产生细胞毒作用,在清除病毒、抵御感染方面起着重要作用。但由于 PBMC 内感染 HBV 后,使免疫细胞活性表达障碍, NK 活性也随之降低,其清除病毒能力下降及细胞免疫功能减弱是造成 HBV 感染慢性化的原因之一。有报道^[2],外周血 CD₄ 及 CD₈ 细胞对 HBV 易感,与我们测得在慢性乙肝 PBMC 内 HBV DNA(+)病人 CD₄ 百分率下降,而 CD₈ 百分率上升其 CD₄/CD₈ 比值明显减低一致。新近的研究^[3]也证实了上述改变,提示 HBV 通过对 PBMC 的破坏作用或干扰这些细胞的代谢而影响功能。sIL-2R 在慢性乙肝时升高,推测与 HBV 感染刺激淋巴细胞释放较多的 sIL-2R 及慢性肝损害时肝廓清功能不全有关。叶红军等^[4]认为, sIL-2R 仅与膜性白细胞介素 2 受体(mIL-2R)竞相与白细胞介素 2(IL-2)结合,中和活化 T 细胞周围的 IL-2,以减弱淋巴细胞的自分泌效应,加重宿主的免疫调节功能紊乱,而使 HBV 感染持续化。

本实验结果示 PBMC 感染 HBV 的慢性乙肝病人 NK 活性、CD₄/CD₈ 比值降低,同时 sIL-2R 升高,且三者两两之间具有直线相关性。据文献报道^[5],慢性乙肝患者肝脏内存在大量的淋巴细胞浸润,以 CD₈ 细胞为主,使表达 IL-2R 阳性细胞百分率增高,标志着免疫系统正受到 HBV 抗原的激活^[6]。血循环中增高的 sIL-2R 阻断了 IL-2 直接增强 NK 细胞活性和对 NK 细胞增殖的促进作用,形成负反馈调节,这是 HBV 感染 PBMC 导致机体细胞免疫功能紊乱的依据。而在 PBMC 内未检出 HBV DNA 的慢性乙肝病人 sIL-2R 水平增高及 CD₄/CD₈ 比值

有所下降时, NK 细胞活性未受到影响,这是否与 Chemin^[7]测定的 HBV 感染 PBMC 其 NK 细胞所占百分率偏高有关。故我们认为 PBMC 内 HBV(+)病人 NK 细胞活性的减低,除受 sIL-2R 的封闭阻止影响外,更重要的是乙肝病毒在 NK 细胞中复制乃至与宿主细胞染色体整合,使受染细胞自身功能发生障碍或单个核细胞群体之间相互调节作用紊乱有关,最终导致细胞免疫应答在机体抗 HBV 感染过程中难以发挥相应功能。

因此,平行检测慢性乙肝病人 NK 活性、CD₄/CD₈ 比值和 sIL-2R 水平,揭示了 HBV 感染 PBMC 呈现出的细胞免疫缺陷,对研究乙肝发病机制有重要意义。

参 考 文 献

- 1 Pasquinelli C, Melegari M, Villa E, et al. Hepatitis B virus infection of peripheral blood mononuclear cells is common acute and chronic hepatitis. *J Med Virol*, 1990, 31:135.
- 2 郑江, 李梦东, 顾长海. 慢性乙型肝炎患者外周血单核细胞、B 及 CD₄、CD₈、T 细胞内 HBV DNA 的存在状态. *中华传染病杂志*, 1991, 9:133.
- 3 Yang PM, Su IJ, Lai MY, et al. Immunohistochemical studies on intrahepatic lymphocyte infiltrates in chronic type B hepatitis, with special emphasis on the activation status of the lymphocytes. *AM J Gastroenterol*, 1988, 83:948.
- 4 叶红军, 扬世忠, 邵建, 等. 乙型肝炎患者淋巴细胞转化功能和可溶性白细胞介素 2 受体的观察. *临床肝胆病杂志*, 1995, 11:75.
- 5 白岚, 孔宪涛, 李石, 等. 可溶性白介素 2 受体在慢性乙型肝炎中的意义及其升高机制初探. *中华消化杂志*, 1994, 14:86.
- 6 Mo shed SA, Fukuma H, Kimura Y, et al. Interferon α interleukin (IL-2) and IL-2 receptor expressions in hepatitis C virus infected liver. *Gastroenterol JPN*, 1993, 28:59.
- 7 Chemin I, Vermot Desroches C, Baginski I, et al. Selective detection of human hepatitis B virus surface and core antigens in some peripheral blood mononuclear cell subsets by flow cytometry. *J Clin Lab Immunol*, 1992, 38:63.

(收稿:1996-08-28 修回:1996-09-27)