

慢性乙型肝炎患者外周血CD14⁺细胞的功能状态

魏 然, 夏作理, 陈 彬, 韩纪举, 任道凌, 杨明峰

魏然, 夏作理, 山东大学医学院生理教研室 山东省济南市 250012
陈彬, 韩纪举, 任道凌, 杨明峰, 泰山医学院基础医学研究所
山东省泰安市 271000
魏然, 女, 1962-09-11 生, 江苏省徐州市人, 汉族, 美国加州大学旧金山医
学院博士后, 主要从事巨噬细胞在慢性炎症性疾病中作用研究。
项目负责人: 魏然, 250012, 山东省济南市, 山东大学医学院生理教研室。
jcyxys@tsmc.edu.cn
电话: 0538-6225075 传真: 0538-6222600
收稿日期: 2003-06-06 接受日期: 2003-10-12

CD14⁺ cell dysfunction in patients with chronic active hepatitis B

Ran Wei, Zuo-Li Xia, Bin Chen, Ji-Ju Han, Dao-Ling Ren,
Ming-Feng Yang

Ran Wei, Zuo-Li Xia, Department of Physiology, Shandong University
School of Medicine, Jinan 250012, Shandong Province, China
Bin Chen, Ji-Ju Han, Dao-Ling Ren, Ming-Feng Yang, Institute of Basic
Medical Science, Taishan Medical College, Taian 271000, Shandong
Province, China
Correspondence to: Dr. Ran Wei, Institute of Basic Medical Science,
Taishan Medical College, 2 East Yingsheng Road, Taian 271000, Shandong
Province, China. jcyxys@tsmc.edu.cn
Received: 2003-06-06 Accepted: 2003-10-12

Abstract

AIM: To study the functional states of CD14⁺ cells in peripheral blood mononuclear cell (PBMCs) by analyzing the expression of early active antigen, production of pro-inflammatory cytokines and phagocytosis with flow cytometry (FCM).

METHODS: PBMCs were isolated from 11 patients with chronic active hepatitis B and 10 healthy blood donors, and 4-colors flow cytometry and gate setting techniques were applied. The percentage of CD14⁺ cells and level of CD14 antigen were tested by FCM, after gate setting with CD14, side scatter (SSC) and activation-linked surface antigen (CD69) expression rate, percentage of TNF- α producing cells, level of intra-cellular TNF- α , the percentage of phagocytes and the ability of phagocytosis were investigated.

RESULTS: The SSC mean value of CD14⁺ cell of HBV patients was higher than that of health control ($P < 0.01$); There were no difference between two testing groups on the percentage of CD14⁺ cells and level of CD14 antigen, however the level of CD14 antigen was positively associated with the percentage of CD14⁺ cells. CD14/69 double expression rate was significantly higher than that of control group ($P < 0.01$); No difference was observed on CD14/TNF- α double stain cells between testing groups; In comparison with control group, the level of cellular TNF- α in HBV group was higher ($P < 0.05$). In control group, the percentage of TNF- α producing cells were correlated with SSC value and number of phagocytes that expressed CD14/69. There was no difference in phagocytes that expressed CD14/69 in two groups. As compared with the control

group, there was more phagocytotic CD14⁺ cells in HBV group ($P < 0.01$), but the mean phagocytosis amount was significantly lower in this group ($P < 0.05$), and the number of phagocyte was negatively correlated with the level of CD14 antigen; while the SSC value and number of TNF- α producing cells were negatively correlated with level of CD14 antigen.

CONCLUSION: CD14⁺ cells in PBMCs from chronic active hepatitis B patients are over activated in a dysfunction stage.

Wei R, Xia ZL, Chen B, Han JJ, Ren DL, Yang MF. CD14⁺ cell dysfunction in patients with chronic active hepatitis B. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(3):618-621

摘要

目的: 研究慢性乙型肝炎患者外周血CD14⁺细胞早期活化抗原分子表达、炎症因子生成和吞噬能力。

方法: 采用四色荧光分析方法, 运用流式细胞术检测正常对照人群(10例)、慢性活动性乙型肝炎患者(11例)外周血单个核细胞(PBMC)CD14⁺细胞率和CD14抗原量; 并行CD14设门, 检测CD14⁺细胞前向角(FSC)、侧向角(SSC)值、细胞早期活化抗原(CD69)的表达率、TNF- α 表达率、细胞内TNF- α 水平、细胞吞噬率及吞噬力。

结果: HB组CD14⁺细胞SSC值高于对照组($P < 0.01$); HB组和对照组间外周血CD14⁺细胞比例、CD14抗原水平无统计学意义差别, 抗原水平与CD14⁺细胞率呈正相关; HB组CD14/CD69双表达细胞明显多于对照组($P < 0.01$); HB组CD14/TNF- α ⁺(细胞内)双染细胞与对照组间无差别, HB组CD14⁺细胞TNF- α 水平高于正常对照组($P < 0.05$); 对照组TNF- α ⁺细胞率与细胞颗粒度呈正相关, 与CD14/69双表达并发生吞噬细胞率一致。HB组CD69/CD14双阳性细胞荧光球吞噬率与对照组无差别($P > 0.05$); HBV组CD14⁺细胞荧光球吞噬率显著高于对照组($P < 0.01$), 吞噬力低于对照组($P < 0.05$), 荧光微球吞噬率与CD14抗原表达的量负相关; CD14⁺细胞SSC, TNF- α ⁺细胞率同CD14抗原表达的量也呈负相关。

结论: 慢性乙肝患者外周血存在过度活化CD14⁺单核细胞, 细胞吞噬力弱、胞内TNF- α 生成增多。

魏然, 夏作理, 陈彬, 韩纪举, 任道凌, 杨明峰. 慢性乙型肝炎患者外周血CD14⁺细胞的功能状态. *世界华人消化杂志* 2004;12(3):618-621
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/618.asp>

0 引言

慢性乙型肝炎是 HBV 在体内持续感染引起的^[1-6]。HBV 慢性感染相关的发病机制包括病毒因素、宿主免疫因素和遗传因素^[7-12]。T 细胞在慢性乙型肝炎发病机制中的作用研究较多^[13-15]，单核 - 巨噬细胞系统、树突细胞的作用也有报告^[16-17]，一般认为单个核细胞释放淋巴因子，可使细胞内病毒失活，既清除了病毒又避免了感染细胞破坏^[18]。另外，病毒抑制抗原处理和呈递，对病毒抗原的免疫耐受、病毒变异、是导致病毒感染持续存在的原因^[11]。我们研究慢性乙型肝炎患者外周血 CD14⁺ 细胞的功能状态，探讨活化单核 - 巨噬细胞在慢性乙型肝炎发病中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 住院慢性乙型肝炎 11 例，男 8 例，女 3 例，年龄 43.7±0.9 岁，其中 6 例乙型肝炎慢性轻度、4 例乙型肝炎慢性中度，符合 1995-05 北京全国第 5 次传染病与寄生虫病学术会议修订的诊断标准；体检正常 10 例，无肝炎及慢性炎性疾病 HBsAg(-)，血清 LAT 正常，男 7 例，女 3 例，平均年龄 28.0±6.3 岁。FACSCalibur 流式细胞仪；异硫氰酸荧光素(FITC)标记的人免疫球蛋白 G(MIgG₁-FITC)，FITC 标记的 TNF-α；藻红蛋白(PE)标记的鼠免疫球蛋白 G(MIgG₁-PE)；藻红蛋白标记的 CD69；PerCP 标记荧光微球(PerCP-Beads)、APC 标记的巨噬细胞表面抗原 CD14。以上均为 Becton-Dickinson (B-D)-PharMingen 公司产品。10 g/L 多聚甲醛(PFA)，分析纯，天津博迪化工有限公司产品；流式细胞仪四色校准微球(CaliBRITE Beads)、溶血素(FACS lysing solution)和破膜剂(FACS Perm2)为美国 B-D 公司产品；洗液为含 1 g/L 牛血清白蛋白(BSA，上海伯奥生物科技有限公司)的生理盐水。取正常对照及慢性活动性乙型肝炎患者空腹静脉血，用肝素钠抗凝。

1.2 方法 每份样本取荧光微球 20 μL，用人血清 200 μL (AB 型)于 37 °C 调理 30 min，用 PBS 洗 2 次，恢复原浓度，制备荧光微球(Beads)备用。四色流式细胞术分析 PBMC 活化 CD14⁺ 细胞及其功能状态^[19]：试管 1: IgG1-FITC/IgG1-PE/CD14-APC；试管 2: TNF-α-FITC/CD69-PE/PerCP-Beads/CD14-APC。用四色荧光微球校准流式细胞仪后，用 CellQuest 软件获取与分析，将流式细胞仪的 FSC 和 SSC 设置为线性放大，四色荧光的检测信号设置为对数放大，以 SSC/CD14-APC 双参数设门(图 1)，分别检测各管中 CD14⁺ 巨噬细胞的光散射、吞噬率及荧光强度，每测试管分析门内 5000 个细胞。数据分析时应用阴性对照管(试管 1)确定阴性界限。以流式细胞仪测定的分子平均荧光强度(mean fluorescence intensities)表示。

统计学处理 用 mean±SD 表示。显著性分析采用 t 检验，相关性分析采用秩和检验，使用 SPSS 软件在计算机上完成。

2 结果

2.1 PBMC CD14⁺ 细胞功能 实验人群 CD14⁺ 细胞占 PBMC 总量的 2.1-5.8%，两组间无显著差别，CD14 抗原表达水平亦无不同；采用 CD14-SSC 设门技术，测得 HB 组和对照组间 CD14⁺ 细胞 FSC 值没有明显差别；HB 组 CD14⁺ 细胞 SSC 值(778 ± 172 道)高于正常对照组 SSC(546 ± 74 道)(P < 0.01，表 1)；HB 组 CD14/CD69 双表达(图 2)细胞率(10.5 ± 8.2%)明显高于正常对照组(1.7 ± 1.2%) (P < 0.01)；HB 组 CD14 细胞 TNF-α⁺ (图 3)细胞率与对照组间无差别，细胞 TNF-α 水平(图 4) (22.7 ± 13.6)高于对照组(3.9 ± 3.9)(P < 0.05)；荧光球吞噬实验 HB 组 CD14⁺ 细胞荧光微球吞噬率(31.64 ± 14.93%)显著高于对照组(5.8 ± 2.2%) (P < 0.01)，然而吞噬的量(26.7 ± 6.0)明显少于对照组(22.3 ± 6.4%) (P < 0.05)；HB 组 CD14/CD69 双表达细胞荧光球吞噬率与对照组无差别(P > 0.05)。

表 1 慢性肝炎患者外周血 CD14⁺ 细胞功能

	对照组 n=11 mean±SD	HB 组 n=10 mean±SD	P 值
FSC (道)	683 ± 81	652.90 ± 27.99	0.360
SSC (道)	546 ± 74	778 ± 172	0.001
CD14-Percent(%)	3.6 ± 1.5	4.2 ± 1.6	0.290
CD14-Median (道)	472 ± 92	365 ± 78	0.290
CD69 ⁺ (%)	1.7 ± 1.2	10.5 ± 8.2	0.0017
TNF-α ⁺ (%)	0.8 ± 1.4	2.4 ± 3.2	0.020
TNFα-Median (道)	80.3 ± 53.4	51.3 ± 16.0	0.105
PerCP-Beads 吞噬率(%)	5.8 ± 2.2	31.6 ± 14.9	0.002
CD14/69PerCP-Beads-Median (道)	26.7 ± 6.0	22.3 ± 6.4	0.023
CD14+CD69+ PerCP-Beads positive (%)	4.2 ± 4.8	1.8 ± 2.1	0.127

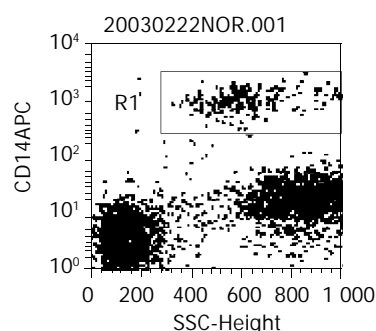


图 1 SSC-CD14 设门。

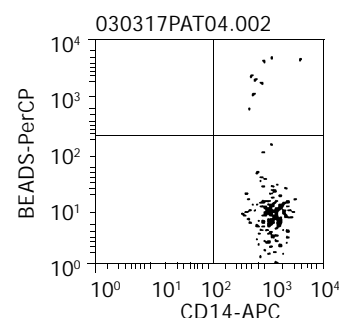
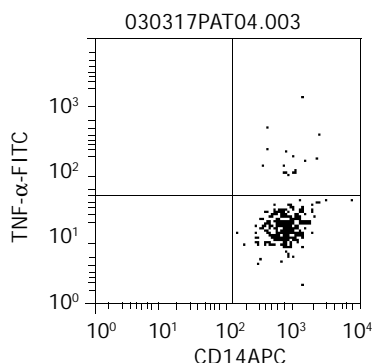
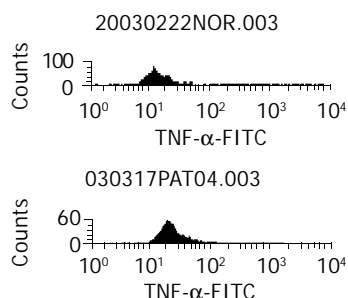


图 2 患者 CD14⁺ /CD69⁺ 细胞吞噬率。

图3 患者CD14和TNF- α 表达.图4 对照和患者TNF- α 水平.

2.2 CD14⁺细胞功能指标间相关性(表2) HB组和对照组PBMC CD14抗原水平与CD14⁺细胞率呈正相关;对照组TNF- α ⁺细胞率与细胞颗粒度、CD14/CD69双表达细胞荧光球吞噬率有正相关关系. HB组PBMC细胞CD14抗原表达的量与CD14⁺细胞SSC、荧光球吞噬率、TNF- α ⁺细胞率呈负相关.

表2 慢性肝炎患者外周血CD14⁺细胞观测指标间相关性分析

分组	观测指标	P值
对照组	SSC vs TNF- α	0.040 (+)
	TNF- α vs CD69/14 PerCP-beads positive	0.041 (+)
	CD14 median vs CD14 percent	0.011 (+)
HBV组	CD14 median vs SSC	0.026 (-)
	CD14 median vs 吞噬率	0.010 (-)
	CD14 median vs TNF- α	0.047 (-)
	CD14 median vs CD14 percent	0.023 (+)

3 讨论

对慢性乙肝细胞免疫状况的研究中, T细胞的研究报告较多, 树突细胞、巨噬细胞研究可见少量报道^[20-21]. 大量数据表明, 慢性的、广泛的、重度的HIV感染和非感染巨噬细胞系激活形成巨噬细胞功能异常的自主激活持续状态, 分泌大量细胞毒物质, 尽管中枢神经系统内病毒感染是始发因素, 过度激活巨噬细胞的数量而非病毒的含量是造成神经损伤的主要原因^[22-24]. 巨噬细胞系及其产生的炎症因子在细胞损伤中发挥重要作用^[25-27]. 鉴于巨噬细胞在慢性炎症疾病中的作用逐渐

受到重视, 我们从多方面观察了慢性活动性肝炎患者外周血CD14⁺细胞功能状态.

采用流式细胞术检测的CD14⁺细胞外周血占2.1-5.8%, 平均5.09%, 与常规PBMC单个核细胞分布相同. 实验组和对照组间PBMC CD14⁺细胞的大小、占PBMC比例、CD14抗原水平无明显差别; 无论实验组还是对照组CD14抗原表达量与CD14⁺细胞在PBMC中的比率均一致. 不同的是HB组CD14/CD69活化抗原双表达细胞数增多、HB组发生吞噬的CD14⁺细胞百分率高达31.6%, 高于对照组(5.8%). CD69表达、吞噬功能都是吞噬细胞活化的标志, 本实验HB组CD14⁺细胞增高的CD69表达率和高吞噬率表明HB组患者PBMC单核巨噬细胞活化率增高. 但是荧光强度显示的CD14⁺细胞吞噬量显示患者CD14⁺细胞吞噬力降低, 患者组高表达CD14抗原者荧光球吞噬率降低; CD14抗原表达量上调与CD69活化抗原表达一样也是单核-巨噬细胞活化的标志, 但在慢活肝患者两种途径相关的活化或表现吞噬率低、或吞噬率不变, 与患者组整体CD14⁺细胞吞噬率升高不一致. 过度活化巨噬细胞也称炎症巨噬细胞, 此状态细胞以产生大量炎症因子为特征, 如IL-1、IL-6、TNF- α , 炎症巨噬细胞吞噬力降低^[20]. 实验结果表明所检测肝炎慢性轻度、中度患者外周血CD14⁺细胞活化率高, 且存在过度活化状态. 血液中的单个核细胞表达强的CD14, 依据其表达程度将血液中的单核细胞分成两个亚群, CD14 bright (CD14⁺)和CD14 dim(CD14⁺), 正常时血液中CD14⁺亚群占主导地位. 两个亚群的单核细胞除CD14表达不同外, 还有其他抗原成分不同, 形态上也存在差异. LPS、葡萄球菌细胞壁提取物、双链RNA等通过CD14的途径激活细胞. 感染时CD14水平的升高程度与疾病的严重程度相关. 机体可通过对CD14的调节作用而影响细胞因子的释放, 从而影响整个炎症反应进程. 从CD14水平角度分析本实验患者组高表达CD14抗原者荧光球吞噬率低. 同样支持慢活肝患者外周血存过度活化的单核细胞.

慢性病毒感染状态常发生TH1到TH2的漂移, 产生过量炎症递质、炎症因子, 促进肝内炎症反应, 介导肝细胞损伤, 诱导各类细胞分化增生, 从而使慢性肝脏炎症持续存在, 引起一系列免疫病理损伤^[28, 32]. 近年来, 由内毒素诱导的以TNF- α 为核心的炎症反应, 在重型肝炎患者肝细胞继发性损伤中的作用引起人们高度重视^[21, 29]. 肿瘤坏死因子是由单核巨噬细胞系统产生的一种重要的细胞调节因子, 具有多种生物学功能. 有研究报告TNF- α 能吸引和激活免疫细胞损害肝细胞^[31]. 多篇文献报道肝炎患者外周血TNF- α 水平升高, 慢性乙型肝炎患者外周血炎症因子IL-2, IL-10 and TNF- α 与HBeAg肝炎的活动度有关^[29, 30]. 本研究HB组CD14⁺细胞TNF- α ⁺检出率与对照组间无差别, 但是患者CD14⁺细胞内TNF- α 水平显著增高; 对照组CD14⁺细胞活化、TNF- α 产生、与吞噬率是一致的. HB组CD14

抗原水平上调途径活化的单个核细胞 TNF- α 水平低, 是否由于释放增多引起有待研究.

致谢: 感谢 Dr. M. McGrath 对完成本课题给予的指导和帮助.

4 参考文献

- Xie Y, Zhao H, Dai WS, Xu DZ. HBV DNA level and antigen concentration in evaluating liver damage of patients with chronic hepatitis B. *Hepatobil Pancreat Dis Int* 2003;2:418-422
- Jiang YG, Wang YM, Liu TH, Liu J. Association between HLA class II gene and susceptibility or resistance to chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2003;9:2221-2225
- 施红, 王福生. 影响 HBV 感染慢性化的宿主因素及其在乙型肝炎防治中的意义. *世界华人消化杂志* 2001;9:66-69
- Wang JY, Liu P. Abnormal immunity and gene mutation in patients with severe hepatitis-B. *World J Gastroenterol* 2003;9:2009-2011
- 成军. 慢性病毒性肝炎发病机制的分子生物学研究. *世界华人消化杂志* 2002;10:125-128
- Jin YM, Yun C, Park C, Wang HJ, Cho H. Expression of hepatitis B virus X protein is closely correlated with the high periportal inflammatory activity of liver diseases. *J Viral Hepat* 2001;8:322-330
- Fattovich G. Natural history and prognosis of hepatitis B. *Semin Liver Dis* 2003;23:47-58
- Lee MO, Choi YH, Shin EC, Kang HJ, Kim YM, Jeong SY, Seong JK, Yu DY, Cho H, Park JH, Kim SJ. Hepatitis B virus X protein induced expression of interleukin 18 (IL-18): a potential mechanism for liver injury caused by hepatitis B virus (HBV) infection. *J Hepatol* 2002;37:380-386
- Wu CH, Ouyang EC, Walton C, Promrat K, Forouhar F, Wu GY. Hepatitis B virus infection of transplanted human hepatocytes causes a biochemical and histological hepatitis in immunocompetent rats. *World J Gastroenterol* 2003;9:978-983
- Jung MC, Pape GR. Immunology of hepatitis B infection. *Lancet Infect Dis* 2002;2:43-50
- Wang FS. Current status and prospects of studies on human genetic alleles associated with hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* 2003;9:641-644
- Koziel MJ. The immunopathogenesis of HBV infection. *Antivir Ther* 1998;3(Suppl 3):13-24
- Bertoletti A, Maini M, Williams R. Role of hepatitis B virus specific cytotoxic T cells in liver damage and viral control. *Antiviral Res* 2003;60:61-66
- Jiang R, Feng X, Guo Y, Lu Q, Hou J, Luo K, Fu N. T helper cells in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Chin Med J (Engl)* 2002;115:422-424
- Wang KX, Peng JL, Wang XF, Tian Y, Wang J, Li CP. Detection of T lymphocyte subsets and mIL-2R on surface of PBMC in patients with hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2003;9:2017-2020
- Wang FS, Xing LH, Liu MX, Zhu CL, Liu HG, Wang HF, Lei ZY. Dysfunction of peripheral blood dendritic cells from patients with chronic hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* 2001;7:537-541
- Tang TJ, Kwekkeboom J, Laman JD, Niesters HG, Zondervan PE, de Man RA, Schalm SW, Janssen HL. The role of intrahepatic immune effector cells in inflammatory liver injury and viral control during chronic hepatitis B infection. *J Viral Hepat* 2003;10:159-167
- 成军, 李莉. 清除乙型肝炎病毒的非细胞裂解机制. *世界华人消化杂志* 2002;10:73-76
- 魏然, 陈彬, 甘田福, 韩继举, 周秀梅, 张玉琦, 任道凌. 流式细胞术检测外周血 CD14⁺ 细胞的活化程度. *中华检验医学杂志* 2003;26:22-24
- McGrath SM, Kodelja V. Balanced macrophage activation hypothesis: A biological model for development of drugs targeted at macrophage function states. *Pathobiology* 1999;67:277-281
- Guidotti LG. The role of cytotoxic T cells and cytokines in the control of hepatitis B virus infection. *Vaccine* 2002;20(Suppl 4):A80-82
- Williams KC, Hickey WF. Central nervous system damage, monocytes and macrophages and neurological disorders in AIDS. *Annu Rev Neurosci* 2002;25:537-562
- Boven LA, Middel J, Breij EC, Schotte D, Verhoef J, Soderland C, Nottet HS. Interactions between HIV infected monocyte-derived macrophages and human brain microvascular endothelial cells result in increased expression of CC chemokines. *J Neurovirol* 2000;6:382-389
- Gartner S. HIV infection and dementia. *Science* 2000;287:602-604
- Yin M, Bradford BU, Wheeler MD, Uesugi T, Froh M, Goyert SM, Thurman RG. Reduced early alcohol-induced liver injury in CD14-deficient mice. *J Immunol* 2001;166:4737-4742
- Glass JD, Wesselingh SL. Microglia in HIV-associated neurological diseases. *Microsc Res Tech* 2001;54:95-105
- Williams K, Alvarez X, Lackner AA. Central nervous system perivascular cells are immunoregulatory cells that connect the CNS with the peripheral immune system. *Glia* 2001;36:156-164
- Schlaak JF, Tully G, Lohr HF, Gerken G, Meyer zum Buschenfelde KH. HBV-specific immune defect in chronic hepatitis B (CHB) is correlated with a dysregulation of pro- and anti-inflammatory cytokines. *Clin Exp Immunol* 1999;115:508-514
- Bozkaya H, Bozdayi M, Turkyilmaz R, Sarioglu M, Cetinkaya H, Cinar K, Kose K, Yurdaydin C, Uzunalimoglu O. Circulating IL-2, IL-10 and TNF-alpha in chronic hepatitis B: their relations to HBeAg status and the activity of liver disease. *Hepatogastroenterology* 2000;47:1675-1679
- 邵沂, 宋家骏, 刘平. 肿瘤坏死因子与乙型病毒性肝病病情的探讨. *临床消化病杂志* 2000;12:118-119
- Hsu HY, Chang MH, Ni YH, Lee PI. Cytokine release of peripheral blood mononuclear cells in children with chronic hepatitis B virus infection. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1999;29:540-545
- Monsalve-De Castillo F, Romero TA, Estevez J, Costa LL, Atencio R, Porto L, Callejas D. Concentrations of cytokines, soluble interleukin-2 receptor, and soluble CD30 in sera of patients with hepatitis B virus infection during acute and convalescent phases. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002;9:1372-1375