•基础研究 BASIC RESEARCH•

慢性 HBV 携带者外周血 T 细胞亚群的不同年龄变化

乔燕伟,游晶,庄林,陈红英,俞岚,高惠芸,吴国宾,曲俊彦

乔燕伟, 游晶, 陈红英, 俞岚, 高惠芸, 吴国宾, 曲俊彦, 昆明医学院第一 附属医院传染病科 云南省昆明市 650032

庄林, 昆明市第三人民医院肝病科 云南省昆明市 650032

万款伟,男,1978–12–24 生,汉族,山西省介休市人,2002 年昆明医学院内 科传染病学硕士生

云南省教育厅科研课题基金项目, No. 028Y213

项目负责人: 游晶, 650032, 云南省昆明市西昌路 295 号, 昆明医学院第一 附属医院传染病科.jingyoukm@163.com

电话: 0871-5352828

收稿日期: 2004-10-18 接受日期: 2004-11-04

Change in T cell subset of chronic HBV carriers with different ages

Yan-Wei Qiao, Jing You, Lin Zhuang, Hong-Ying Chen, Lan Yu, Hui-Yun Gao, Guo-Bing Wu, Jun-Yan Qv

Yan-Wei Qiao, Jing You, Hong-Ying Chen, Lan Yu, Hui-Yun Gao, Guo-Bing Wu, Jun-Yan Qv, Department of Infectious Diseases, First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650032, Yunnan Province, China

Lin Zhuang, Department of Hepatopathy, Third People's Hospital of Kunming, Kunming 650032, Yunnan Province, China

Supported by Scientific Research Foundation of Yunnan Education Office, No. 028Y213

Correspondence to: Dr. Jing You, Department of Infectious Diseases, First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, 295 Xichang Road, Kunming 650032, Yunnan Province, China. jingyoukm@163.com Received: 2004-10-18 Accepted: 2004-11-04

Abstract

AIM: To investigate the mechanism of the transition from immunological tolerance to immunological activation of chronic hepatitis B virus (HBV) carriers.

METHODS: T cell subsets were examined in chronic HBV carriers (n = 104) and health controls (n = 40). The carriers were divided into different groups at age intervals of 5, 10 and 20 years. The T cell subsets and the positive rate of HBeAg were comparatively analyzed between different groups.

RESULTS: In comparison with those in health controls, the levels of CD3, CD4, and CD4/CD8, in chronic HBV carriers were significantly lower (F = 5.976, P = 0.016, F = 46.244, P = 0.0001, and F = 254.357, P = 0.0001, for CD3, CD4, and CD4/CD8 respectively), but the level of CD8 was higher (F = 103.848, P = 0.0001). The number of CD8, T cells was significantly decreased in chronic carriers over 30 years old (F = 6.726, P = 0.011). Before 30 years old, the CD4 level in HBeAg positive group was lower than that in HBeAg negative group.

CONCLUSION: Human leukocyte antigen restriction and CD4 T cell nonresponsiveness as well as the HBeAg adjustment of immunological tolerance determine that the turning point of the illness state and cell immune function of chronic HBV carriers occurs at the age around 30 years old.

Key Words: HBV; T cell subset; Immune function

Qiao YW, You J, Zhuang L, Chen HY, Yu L, Gao HY, Wu GB, Qv JY. Change in T cell subset of chronic HBV carriers with different ages. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2005;13(1):35-38

摘要

目的:探明携带者随着年龄增长由免疫耐受期进入免疫激活期的机制.

方法: 慢性 HBV 携带者 104 例取外周血检测 T 细胞亚 群与健康对照 40 例作比较.分别以 5 岁、10 岁、20 岁为间隔将慢性 HBV 携带者分组,比较各年龄组之 间 HBeAg 阳性率及 T 细胞亚群.

结果: 慢性 HBV 携带者与健康对照比较 CD3 (F= 5.976, P = 0.016)、CD4 (F = 46.244, P = 0.0001)、CD4/ CD8 (F = 254.357, P = 0.0001)下降, CD8 (F = 103.848, P = 0.0001)升高. 慢性 HBV 携带者 CD8 (F = 6.726, P = 0.011)T 细胞 30 岁后明显下降. 慢性 HBV 携带者 30 岁前 e 抗原阳性组较阴性组 CD4 (F = 11.123, P = 0.001) 明显降低, 30 岁后则无显著差异.

结论: 机体(HLA限制性和CD4 T细胞无应答性)和病毒 (HBeAg的免疫耐受调节作用)两方面因素决定了 30 岁 左右为慢性 HBV 携带者病情及细胞免疫功能转折点.

关键词: HBV; T细胞亚群; 免疫功能

乔燕伟, 游晶, 庄林, 陈红英, 俞岚, 高惠芸, 吴国宾, 曲後彦. 慢性HBV携带者 外周血 T 细胞亚群的不同年龄变化. 世界华人消化杂志 2005;13(1):35–38 http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/35.asp

0 引言

人体外周T淋巴细胞由不同的亚群组成.T淋巴细胞 是宿主抗病毒、抗肿瘤免疫反应中起主导作用的免 疫活性细胞,构成了免疫系统的主要部分,并由T 淋巴细胞各亚群的比例来调节和维持人体免疫内环境 的稳定^[1].一般认为,各种免疫细胞特别是T细胞 亚群之间的调节紊乱,不论原因来自宿主还是缘于 病毒,是体内不能清除病原体及HBV在肝内持续复制的主要原因. 我国的慢性HBV携带主要是于婴幼儿期感染建立的免疫耐受性,随着年龄增长耐受性逐渐减弱,对病毒复制的抑制也逐渐加强,经漫长的病毒携带后,大多可以缓慢自发性清除^[2].实验采用流式细胞仪检测慢性HBV携带者外周血T细胞亚群,并通过分析不同年龄慢性HBV携带者外周血T细胞各亚群变化的规律,探明携带者随着年龄增长由免疫耐受期进入免疫激活期的机制.

1 材料和方法

1.1 材料选择 慢性 HBV 携带者 104 例, 男 62 例, 女 42 例, 年龄 13-50 岁. HBsAg 阳性, 但无肝炎 症状和体证, 各项肝功能检查正常, 经半年观察无变 化^[3]. 其中 HBsAg(+), HBeAg(+), HBcAb(+)59 例, HBsAg(+), HBeAb(+), HBcAb(+)41例, HBsAg (+), HBcAb(+)4例. 10-20岁 18例, 21-30岁 52 例, 31-40岁 24 例, 41-50岁 10例. 全部患者排除 甲、丙、丁、成型肝炎, 6 mo内无应用免疫制剂史. 健康对照组(Health group)40名. 年龄 16-46岁, 均 为健康体检合格人员, 无肝病病史及肝病证据. 10-

表1 慢性 HBV 携带者 T 细胞亚群

30岁30例,31-50岁10例.

1.2 方法 取全血(EDTA 抗凝)100 µL 加三色 mAb (CD3-PE-CY5/CD4-FITC/CD8-PE由苏州生物基因公司提供) 20 µL, 混匀, 室温放置 20 min. 放入 Muti-Q-Prep 处理仪处理(由美国Coulter 公司提供)后,用流 式细胞仪(Coulter Epics-XL型流式细胞仪)进行检测. 阴 性对照取全血100 µL加20 µL小鼠IgG-PE-CY5/IgG-FITC/ IgG-PE(由苏州生物基因公司提供) 20 µL, 其余步骤同 上. 血清乙肝标志物(HbsAg, HbsAb, HbeAg, HbeAb, HbcAb, Anti-HBcAbIgM)检测用 ELISA 法, 血清 HBV DNA 检测用 PCR 法. 操作严格按试剂盒使用说明进行.

统计学处理 采用 SPSS 11.0软件包对各组间检测结果进行方差分析检验.

2 结果

慢性 HBV 携带者与健康对照比较T 细胞亚群不同. 慢性 HBV 携带者较健康人 CD3, CD4, CD4/CD8 下降, CD8升高(表1). 以年龄分组慢性 HBV 携带者T 细胞亚 群不同. 以5岁, 10岁为间隔分组, T 细胞各亚群均 未见显著差异. 扩大为以 20岁为间隔分组, CD8T 细 胞 30岁后明显下降(表2). 10-30岁和 31-50岁组

分组	n	CD3	CD4	CD8	CD4/CD8
ASC	104	67.39 ± 8.99 ^a	32.92 ± 6.64^{b}	34.07 ± 8.48 ^b	1.04 ± 0.36 ^b
Health	40	70.98 ± 3.52	40.32 ± 2.85	20.24 ± 1.91	2.01 ± 0.19

^aP <0.05, ^bP<0.001 vs Health group.

表2	以5,	10.20 岁为间	隔分组慢性 HB\	/ 携帯者 T	细胞亚群检测约	課

年龄(岁)	n	HBVM	CD3	CD4	CD8	CD4/CD8
11–15	2	1.5 ± 0.70	61.25 ± 10.11	32.05 ± 1.34	28.85 ± 9.26	1.16 ± 0.32
16–20	16	1.06 ± 0.25	68.95 ± 6.83	31.56 ± 7.79	37.32 ± 7	0.89 ± 0.32
21–25	19	1.42 ± 0.50	67.12 ± 8.15	33.2 ± 4.69	34.21 ± 7.63	1.01 ± 0.26
26–30	33	1.39 ± 0.55	69.16 ± 10.08	33.18 ± 7.02	35.82 ± 9.12	1.00 ± 0.37
31–35	14	1.57 ± 0.51	66.2 ± 8.03	33.55 ± 6.08	31.71 ± 6.67	1.10 ± 0.30
36–40	10	1.70 ± 0.67	62.1 ± 4.24	31.5 ± 7.63	28.7 ± 8.15	1.18 ± 0.52
41–45	5	2.20 ± 0.44	63.3 ± 10.4	35.8 ± 6.24	26.94 ± 5.26	1.36 ± 0.44
46-50	5	1.8 ± 0.83	71.8 ± 15.51	32.92 ± 8.29	38.02 ± 11.08	0.94 ± 0.35
10-20	18	1.11 ± 0.32	68.10 ± 7.30	31.62 ± 7.33	36.38 ± 7.47	0.92 ± 0.32
21–30	52	1.40 ± 0.53	68.41 ± 9.39	33.19 ± 6.22	35.32 ± 8.56	1.01 ± 0.33
31–40	24	1.62 ± 0.57	64.56 ± 6.91	32.69 ± 6.69	30.45 ± 7.31	1.13 ± 0.39
41-50	10	2.00 ± 0.66	67.58 ± 13.22	34.36 ± 7.94	32.48 ± 10.45	1.15 ± 0.44
10–30	70	1.32 ± 0.50 ^b	68.33 ± 8.85°	32.79 ± 6.5°	35.53 ± 8.26^{a}	0.98 ± 0.33ª
31-50	34	1.73 ± 0.61	65.45 ± 9.11	33.18 ± 7.00	31.05 ± 8.24	1.14 ± 0.40
健10–30	30		70.90 ± 3.49	40.19 ± 2.58	20.31 ± 2.10	1.99 ± 0.18
康31-50	10		71.21 ± 3.81	40.71 ± 3.67	20.00 ± 1.22	2.04 ± 0.24

 分组	n	CD3	CD4	CD8	CD4/CD8
<30大三阳	48	68.83 ± 8.99ª	31.15 ± 6.03 ^b	37.73 ± 8.07 ^b	0.878 ± 0.29^{b}
小三日	22	67.24 ± 8.64	36.36 ± 6.17	30.71 ± 6.55	1.22 ± 0.28
>30大三阳	12	$68.54 \pm 9.68^{\circ}$	$30.4 \pm 6.28^{\circ}$	36.54 ± 9.64^{b}	0.89 ± 0.32^{b}
小三阳	22	63.76 ± 8.53	34.7 ± 7.04	28.05 ± 5.61	1.28 ± 0.38

表3 <30 和. >30 岁 HBeAg (+)慢性 HBV 携带者 T 细胞亚群

°P>0.05, ^bP<0.01 vs 小三阳组.

HBeAg(+)慢性HBV携带者T细胞亚群不同. 慢性HBV 携带者 30 岁前 e 抗原阳性组较阴性组 CD4 明显降低, 30 岁后则无显著差异(表 3).

3 讨论

HBV 不能从人体内清除就形成 HBV 感染慢性化,慢性 化可表现为 HBV 慢性携带者,也可表现为慢性肝炎. 对 HBV 呈完全免疫耐受则表现为慢性携带者,对 HBV 免疫功能低下,即对 HBV 抗原有一定识别和清除能 力,从而导致一定的肝细胞损害,则表现为慢性肝 炎.慢性 HBV 携带与慢性肝炎的区别,主要是病情 发展极为缓慢,活动性极为微弱.

慢性HBV 携带者与健康对照比较 CD4, CD4/CD8 下降, CD8 升高^[4-9]. 而 CD3 的检测结果各不相同, 如有研究发现 CD3 较健康对照降低^[8]、高^[6],或正 常组比较无显著差异.本研究支持CD3较健康对照降 低的结论, 检测结果的差异应与病例选择和检测方法 的不同有关. 有研究指出新生儿感染90%,小儿感染 20-40%,成人感染 5-10%为慢性携带^[10],而 HBeAg (+)携带者母亲的新生儿形成慢性感染的危险性最大. 提示HBeAg 在这一过程中起关键作用. 首先, HBeAg 起耐受原的作用. 起始于宫内的HBeAg特异T细胞耐 性,偏向Th2亚型,在HBV垂直传播中消耗Th1 细胞, 从而形成 Th2 对 Th1 细胞的优势性. 这种优势性进一 步抑制机体的细胞免疫功能,导致病毒不能被机体清 除,形成出生后的慢性感染. 30岁左右为慢性HBV携 带者病情及细胞免疫功能转折点,慢性 HBV 携带者 CD8T 细胞 30 岁后明显下降. 骆抗先 et al 研究发现 83 例病毒高复制的慢性 HBV 携带者年龄中位数为 25 岁,而45 例免疫活动的携带者年龄中位数为31 岁, 133例活动应答后感染低落携带者年龄中位数为32岁. 而且慢性HBV携带者在30岁前HBeAg阳性率23-34%, 感染状态较稳定; 30岁以后 HBeAg 阴性率较高, 且 逐年升高. 据此推测30岁左右为慢性HBV携带者病情 转折点. 本实验先以5岁为间隔分组, 各组之间T细 胞各亚群均未见显著差异. 再合并相邻两组, 扩大 为以10岁为间隔分组,各组之间T细胞各亚群仍未

见显著差异.提示以5岁直至以10岁为间隔分组时各 个年龄段之间细胞免疫功能变化不大.当再次合并相 邻两组、扩大为以20岁为间隔分组,即将全部患者分 为30岁前后两组时,发现慢性HBV携带者 CD8T 细胞 30岁后明显下降,且30岁后HBVM(相当于HBeAg 阴性 率)显著升高.而健康人20-50岁之间包括T细胞亚群 在内的主要免疫指标相对恒定,没有明显变化^[11].本 实验中40名健康对照同样以20岁为间隔分为30岁前 后两组,CD3,CD4,CD8等T细胞各亚群均未见显著 差异,证明30岁后CD8T细胞明显下降为慢性HBV携 带者特有表现.提示30岁左右为慢性HBV携带者病情 及细胞免疫功能转折点.

慢性HBV携带者30岁前CD8T细胞(主要是Tc细胞) 克隆增生、较健康对照升高,但未能清除病毒控制 感染,其原因可能为:(1)Tc细胞克隆不充分,不足以 杀灭全部病毒. (2)Tc细胞受病毒和机体内其他因素 (如HLA限制性)制约,自身功能低下,不能有效杀灭 病毒.本研究中,慢性HBV携带者30岁后病毒清除、 病情好转,但未发现Tc有先克隆增值、比例升高,清 除病毒后再下降的现象, 而是直接下降. 提示慢性 HBV 携带者 30 岁前病毒未能有效清除与 Tc 细胞克隆 不充分关系不大,其主要原因应为Tc细胞受内外因素 影响,自身细胞免疫功能低下.这些因素包括病毒和 机体两个方面. 病毒方面主要为HBeAg的免疫耐受调 节作用. 肝细胞膜表达的HBcAg是CTL识别和攻击的 主要靶抗原,而CTL 在免疫识别上并不能区分 HBeAg 和HBcAg,在血液中HBeAg与HBe/cAg特异性CTL结 合,通过启动Fas途径诱导CTL 凋亡,缓和CTL 对 感染肝细胞的免疫攻击. 而且 HBeAg 能够干扰 HBcAg 的装配,从而影响HBcAg 在肝细胞膜上的正常表达. 所以HBeAg是干扰CTL免疫识别和造成免疫耐受的主 要因素^[12]. 机体方面包括 HLA 限制性和 CD4T 细胞无 应答性等因素.

慢性HBV携带者30岁前e抗原阳性组较阴性组CD4 明显降低,30岁后则无显著差异.HBeAg致敏的Th细 胞高效产生IL-4和较低量的IFN-γ,而HBeAg免疫 高效诱导IL-2、IFNγ和低水平的IL-4.HBeAg优势 诱导Th2样细胞,HBcAg优势诱导Th1样细胞.HBeAg 诱导的Th2对Th1细胞优势性导致CD4(主要是Th1细 胞)下降.所以30岁前慢性HBV携带者e抗原阳性组 较阴性组CD4明显降低主要原因应为HBeAg的免疫耐 受调节作用.而30岁后在宿主长期免疫压力下HBV病 毒发生基因组前C区变异,e抗原阳性组患者多混合 感染变异株与野生株,而且随着病程的增长,变异株 在感染毒株群体中的比例逐步增加.由于变异株不能 合成HBeAg,变异株在感染毒株群体中比例的增加无 疑会减弱HBV合成HBeAg的能力,从而减弱HBeAg的 免疫耐受调节作用.所以30岁后e抗原阳性和阴性组 CD4T细胞没有同30岁前一样前者明显低于后者,而 是二者之间无显著差异.

4 参考文献

1 陈慰峰. 医学免疫学. 第3版. 北京: 人民卫生出版社, 2001:92-97

- 2 骆抗先. 乙型肝炎基础和临床. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 2001:188-189,315-318
- 3 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝脏学分会联合修订. 病毒性肝炎防治方案.中华肝脏病杂志 2000;8:324-329
- 4 辛永宁, 孙樱, 张健, 吕维红, 张梅, 初蕾蕾, 李宁, 孙珍娟. 拉米夫 定对慢性乙肝患者 T 细胞亚群影响的研究. 临床肝胆病杂志 2002;6:192-193
- 5 王九平, 连建奇, 王爱莲, 吕维红, 张梅, 初蕾蕾, 李宁, 孙珍娟. 慢 性乙型肝炎患者 T 细胞亚群、sIL-2 R, TNF-α, IL-6变化及 意义. 第四军医大学学报 2000;21:814-816
- 6 李鸣,林蔚.慢性乙型肝炎患者外周血T淋巴细胞亚群的变化.现代临床生物医学工程杂志 2002;8:36-39
- 7 蔡莉静, 薛容, 姜长林. 乙型肝炎儿童T细胞亚群的改变. 东南大 学学报(医学版) 2003;22:49-50
- 8 王克霞,朱玉霞,许礼发,杨庆贵.乙肝患者外周血T细胞亚群和 m IL -2 R 表达水平的研究.中国基层医药 2002;9:589-591
- 9 刘映霞, 胡国龄, 何淑雅, 李红梅. 慢性乙肝患者 PBMC 中 HBV 感 染及其对 T 细胞亚群的影响. 中国现代医学杂志 2002;12:70-73
- 10 Juszczyk J. Clinical course and consequences of hepatitis B infection. *Vaccine* 2000;18:S23-25
- 11 周振英,朱月清,吴晓柳,张军妮,沈宗丽.年龄和性别对健康人 外周血细胞流式细胞术检测参数的影响.实用癌症杂志 2000; 15:397-399
- 12 顾长海, 王宇明. 肝功能衰竭. 北京: 人民卫生出版社, 2002:170

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息•

世界华人消化杂志 2005年由月刊改为学月刊

本刊讯 中国科技期刊引证报告(2003年版): 2002年度世界华人消化杂志总被引频次4151,影响因子1.926,即年指标0.424,他引总引比0.45,引用刊数173,扩散因子4.2,被引半衰期2.99,地区分布数26,机构数138,国际论文比0.03,基金论文比0.27.2002年度各学科影响因子较高的3种期刊排名:世界华人消化杂志影响因子1.926,临床医学排名第2位.2002年度总被引频次较高的20种期刊排名:世界华人消化杂志总被引频次4151,排名第1位.世界华人消化杂志被评为中国科技核心期刊,《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊,中国科技论文统计源期刊,2001年度第一届中国百种杰出学术期刊.世界华人消化杂志的英文摘要被美国《化学文摘》,荷兰《医学文摘库/医学文摘》,俄罗斯《文摘杂志》收录.为适应我国消化病学专业基础与临床研究的快速发展,从2005年开始,世界华人消化杂志将由月刊改为半月刊,大16开,160页,每月1,15日出版,50元/期,全年24期,邮发代号82-262,北京报刊发行局发行.(世界胃肠病学杂志2004-06-15)

Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology & & World Iournal of Gastroenterology

本刊讯 在 2004 年 11 月, Nature Publishing Group 将会出版一系列杂志,题为自然临床实践,包括肿瘤、心血管、泌尿、胃肠病学和肝脏病学,这些文章会应用于临床患者和医生. Nature Publishing Group 收录非常有影响的杂志, World Journal of Gastroenterology 也被收录. Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology 为非常繁忙的胃肠病学家和肝脏病学家提供 其专业的概况和其领域的所有的关键的进展,更重要的是这些进展会为他们的患者提供进一步的帮助. Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology 提供电子和印刷版,其主编为 Stephen Hanauer. (世界胃肠病学杂志 2004-06-15)