

慢性乙型肝炎病毒感染对外周血单个核细胞中凋亡分子表达的影响及其与免疫功能的相关性

刘佳

(西安市第九医院感染科, 陕西 西安 710054)

摘要: **目的** 研究慢性乙型肝炎病毒(HBV)感染对外周血单个核细胞中凋亡分子表达的影响及其与免疫功能的相关性。**方法** 选择76例慢性乙型肝炎(CHB)患者和体检的54例健康志愿者,分别作为CHB组和对照组,采集血清并测定凋亡分子含量、采集外周血单个核细胞并测定凋亡分子表达量以及免疫细胞含量。**结果** CHB组患者血清中凋亡分子Fas、FasL、Caspase-3、Caspase-6、Caspase-8的含量以及外周血单个核细胞中Fas、FasL、Caspase-3、Caspase-6、Caspase-8的mRNA含量均显著高于对照组;CHB组患者外周血中CD3+CD4+T细胞、CD3+CD8+T细胞、CD16+CD56+NK细胞的百分比及CD4+/CD8+的比例均显著低于对照组;外周血单个核细胞中Fas、FasL、Caspase-3、Caspase-6、Caspase-8的mRNA含量与CD3+CD4+T细胞、CD3+CD8+T细胞、CD16+CD56+自然杀伤(NK)细胞的百分比呈负相关。**结论** 慢性HBV感染能够增加外周血单个核细胞中凋亡分子的表达,进而造成T淋巴细胞和NK细胞凋亡、抑制细胞免疫应答和非特异性免疫。

关键词: 乙型肝炎病毒;凋亡;T淋巴细胞;自然杀伤细胞

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2017.10.020

Effect of chronic HBV infection on the expression of apoptosis molecules in peripheral blood mononuclear cells and its correlation with immune function

LIU Jia

(Department of Infectious Diseases, The Ninth Hospital of Xi'an City, Xi'an, Shaanxi 710054, China)

Abstract: **Objective** To study the effect of chronic HBV infection on the expression of apoptosis molecules in peripheral blood mononuclear cells and its correlation with immune function. **Methods** 76 cases of chronic hepatitis B (CHB) patients and 54 healthy volunteers were separately enrolled in CHB group and control group. Serum was collected and apoptosis molecules contents were determined, peripheral blood mononuclear cells were collected and apoptosis molecules expression and immune cells contents were determined. **Results** Fas, FasL, Caspase-3, Caspase-6, Caspase-8 contents in serum and Fas, FasL, Caspase-3, Caspase-6, Caspase-8 mRNA contents in peripheral blood mononuclear cells of CHB group were significantly higher than control group; percentage of CD3+CD4+T cells, CD3+CD8+T cells, CD16+CD56+NK cells in the peripheral blood and ratio of CD4+/CD8+ of CHB group were significantly lower than control group; Fas, FasL, Caspase-3, Caspase-6, Caspase-8 mRNA contents in peripheral blood mononuclear cells were negatively correlated with percentage of CD3+CD4+T cells, CD3+CD8+T cells, CD16+CD56+NK cells. **Conclusions** Chronic HBV infection can increase the expression of apoptotic molecules in peripheral blood mononuclear cells, and then cause the apoptosis of T lymphocytes and NK cells, the inhibition of cellular immune response and non-specific immune response.

Key words: Hepatitis B virus; Apoptosis; T lymphocyte; NK cell

乙型肝炎是严重威胁人类健康的传染性疾病,我国是乙型肝炎病毒(HBV)感染的高发地区,慢性HBV感染会增加肝硬化以及肝癌的发生风险。HBV感染后,体内自然杀伤(NK)细胞所接到的非特异性免疫应答以及T淋巴细胞介导的细胞免疫应答是清除病毒的主要机制,有效的免疫应答能够清除病毒并控制肝炎病情;当机体免疫功能减退时,体内免疫应答机制不足以彻底清除病毒,进而造成HBV持续感染。近年来,越来越多的研究证实免疫功能减退、免疫细胞数目不足与HBV慢性感染的关系十分密

切^[1],但是关于引起免疫细胞数目减少的机制尚未明确。细胞凋亡分子Fas、FasL以及Caspase家族是调节免疫细胞增殖、凋亡的重要机制。为了明确凋亡分子表达对免疫功能及免疫细胞的影响,笔者在本研究中分析了慢性HBV感染对外周血单个核细胞中凋亡分子表达的影响及其与免疫功能的相关性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择2013年5月—2015年12月期间在西安市第九医院就诊的76例慢性乙型肝炎(CHB)患者作为研究的慢性乙型肝炎组(CHB组),所有患者均符合2010年《慢性乙型肝炎防治指南》中慢

性乙型肝炎的诊断标准^[2],排除甲、丙、丁、戊型肝炎病毒感染患者以及合并肝硬化的患者。选择同期在西安市第九医院体检的 54 例健康志愿者作为对照组,经体检确认身体健康、无传染性疾病病史。CHB 组中男性 45 例、女性 31 例,年龄(43.5 ± 6.9)岁;对照组中男性 32 例、女性 22 例,年龄(42.9 ± 7.1)岁。两组受试者一般资料的比较差异无统计学意义。

1.2 临床标本采集方法 CHB 组患者于确诊后采集空腹外周静脉血 10 mL,对照组于体检时采集空腹外周静脉血 10 mL,EDTA 抗凝后取 3 mL 抗凝血、以 2 000 r · min⁻¹ 离心 10 min,分离血清后 -80 ℃ 保存;另 7 mL 抗凝血中加入淋巴细胞分离液,密度梯度离心后抽取外周血单个核细胞,离心后 -80 ℃ 保存。

1.3 临床指标检测方法 取血清标本,采用酶联免疫吸附试剂盒测定 Fas、FasL、Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9 的含量;取外周血单个核细胞,采用 RNA 抽提试剂盒及 cDNA 第一链合成试剂盒进行实验,提取细胞中的总 RNA 并反转录为 cDNA,而后设计目的基因 Fas、FasL、Caspase-3、Caspase-6、Caspase-8 以及内基因 GAPDH 的引物并进行荧光定量 PCR 扩增,读取循环阈值(Ct)后按照公式 2^{-ΔΔCt} 计算目的基因的相对表达量。ΔCt = 目的基因 Ct 值 - 内参基因 Ct 值,ΔΔCt = CHB 组 ΔCt - 对照组 ΔCt;另取外周血单个核细胞,分别避光孵育 CD3、CD4、CD8、CD16、CD56 的荧光抗体 15 min,PBS 缓冲液洗

涤、离心 2 遍后在流式细胞仪上检测 CD3 + CD4 + T 细胞、CD3 + CD8 + T 细胞、CD16 + CD56 + NK 细胞的含量。

1.4 统计学方法 采用 SPSS20.0 软件录入并分析数据,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示、两组间的比较采用 *t* 检验;两计量资料间的相关性分析采用 Pearson 检验。按照 *P* < 0.05 判断差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清中凋亡分子的含量 CHB 组患者血清中凋亡分子 Fas、FasL、Caspase-3、Caspase-6、Caspase-8 的含量均显著高于对照组。两组间血清中 Fas、FasL、Caspase-3、Caspase-6、Caspase-8 含量差异有统计学意义(*P* < 0.05)。见表 1。

2.2 外周血单个核细胞中凋亡分子的表达量 CHB 组患者外周血单个核细胞中 Fas、FasL、Caspase-3、Caspase-6、Caspase-8 的 mRNA 含量均显著高于对照组。两组间外周血单个核细胞中 Fas、FasL、Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9 mRNA 含量差异有统计学意义(*P* < 0.05)。见表 2。

2.3 外周血中 T 淋巴细胞和 NK 细胞的含量 CHB 组患者外周血中 CD3 + CD4 + T 细胞、CD3 + CD8 + T 细胞、CD16 + CD56 + NK 细胞的百分比以及 CD4 + /CD8 + 的比例均显著低于对照组。两组间外周血中 CD3 + CD4 + T 细胞、CD3 + CD8 + T 细胞、CD16 + CD56 + NK 细胞百分比以及 CD4 + /CD8 + 比例的差异有统计学意义(*P* < 0.05)。见表 3。

表 1 两组受试者血清中凋亡分子的含量比较/(pmol · L⁻¹, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	Fas	FasL	Caspase-3	Caspase-6	Caspase-8
对照组	54	24.58 ± 3.58	33.48 ± 3.59	32.59 ± 5.48	48.79 ± 7.80	37.69 ± 4.92
CHB 组	76	109.52 ± 12.38	83.95 ± 9.38	214.58 ± 32.49	479.65 ± 65.29	368.61 ± 51.39
<i>t</i> 值		22.581	16.473	41.382	74.581	65.329
<i>P</i> 值		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

表 2 两组受试者外周血单个核细胞中凋亡分子的 mRNA 含量比较/(pmol · L⁻¹, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	Fas	FasL	Caspase-3	Caspase-6	Caspase-8
对照组	54	1.09 ± 0.13	0.95 ± 0.11	1.03 ± 0.17	0.92 ± 0.12	1.13 ± 0.20
CHB 组	76	3.38 ± 0.41	2.97 ± 0.32	5.49 ± 0.73	4.29 ± 0.55	2.28 ± 0.39
<i>t</i> 值		22.382	16.584	35.591	29.358	11.392
<i>P</i> 值		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

表 3 两组受试者外周血中 T 淋巴细胞和 NK 细胞的含量比较/(pmol · L⁻¹, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	CD3 + CD4 + T 细胞	CD3 + CD8 + T 细胞	CD4 + /CD8 +	CD16 + CD56 + NK 细胞
对照组	54	40.14 ± 5.58	25.68 ± 3.19	1.56 ± 0.19	20.36 ± 3.31
CHB 组	76	27.94 ± 3.42	22.14 ± 3.32	1.26 ± 0.16	12.14 ± 2.18
<i>t</i> 值		7.068	5.684	6.029	8.695
<i>P</i> 值		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

2.4 凋亡分子表达量与 T 淋巴细胞、NK 细胞含量的相关性 Pearson 相关性分析显示:外周血单个核细胞中 Fas、FasL、Caspase-3、Caspase-6、Caspase-8 的 mRNA 含量与外周血中 CD3 + CD4 + T 细胞、CD3 + CD8 + T 细胞、CD16 + CD56 + NK 细胞的百分比呈负相关。见表 4。

凋亡分子	CD3 + CD4 + T 细胞		CD3 + CD8 + T 细胞		CD16 + CD56 + NK 细胞	
	r 值	P 值	r 值	P 值	r 值	P 值
	Fas	-0.712 <0.05	-0.627 <0.05	-0.663 <0.05	-0.663 <0.05	-0.663 <0.05
FasL	-0.665 <0.05	-0.761 <0.05	-0.594 <0.05	-0.594 <0.05	-0.594 <0.05	-0.594 <0.05
Caspase-3	-0.614 <0.05	-0.595 <0.05	-0.714 <0.05	-0.714 <0.05	-0.714 <0.05	-0.714 <0.05
Caspase-6	-0.596 <0.05	-0.618 <0.05	-0.673 <0.05	-0.673 <0.05	-0.673 <0.05	-0.673 <0.05
Caspase-8	-0.689 <0.05	-0.648 <0.05	-0.661 <0.05	-0.661 <0.05	-0.661 <0.05	-0.661 <0.05

3 讨论

T 淋巴细胞介导的细胞免疫应答以及 NK 细胞介导的非特异性免疫应答是机体杀伤 HBV 的主要机制。T 淋巴细胞中的 CD3 + CD4 + 亚群和 CD3 + CD8 + 亚群是体内最重要的成熟 T 淋巴细胞,前者主要是辅助性 T 细胞,能够辅助进行抗原递呈并促进细胞毒性 T 细胞以及 B 细胞的活化;后者主要是细胞毒性 T 细胞,具有特异性杀伤靶细胞、抗感染的作用^[3-5]。NK 细胞通过穿孔素、颗粒酶等能够直接杀伤病原体、限制病毒的复制^[6-7]。近年来,越来越多的研究发现,免疫功能低下会导致机体不能有效清除 HBV 并造成病毒长期慢性感染^[8-9]。我们通过分析 CHB 患者外周血中 T 淋巴细胞和 NK 细胞的含量发现:CHB 组患者外周血中 CD3 + CD4 + T 细胞、CD3 + CD8 + T 细胞、CD16 + CD56 + NK 细胞的百分比以及 CD4 + /CD8 + 的比例均显著降低。这就说明 CHB 患者体内的免疫功能处于抑制状态,T 淋巴细胞和 NK 细胞的数目均显著减少,机体无法通过细胞免疫应答和非特异性免疫应答来清除 HBV。

目前,关于 CHB 患者体内 T 淋巴细胞、NK 细胞含量变化的研究已经较为成熟,但是引起上述免疫细胞含量改变的调控机制尚不明确。细胞凋亡通路是调节细胞数目及功能的重要机制,其中 Fas/FasL 所介导的死亡受体途径凋亡是重要的外源性凋亡途径,与细菌、病毒等外界刺激密切相关^[10-12]。Fas 与 FasL 通过配体-受体的形式结合后能够激活凋亡分子 Caspase-8,进而通过下游 Caspase-6、Caspase-7 等分子所介导的级联放大反应来激活

Caspase-3,最终由 Caspase-3 直接介导细胞凋亡的过程^[13-15]。我们通过分析血清中死亡受体途径凋亡分子的含量可知:CHB 组患者血清中凋亡分子 Fas、FasL、Caspase-3、Caspase-6、Caspase-8 的含量均显著高于对照组。这就说明 CHB 患者体内存在 Fas/FasL 所介导的死亡受体途径凋亡增强,Fas、FasL 及下游信号分子的高表达可能通过诱导 NK 细胞、T 淋巴细胞凋亡来造成 HBV 的持续感染。

为了进一步明确 HBV 持续感染是否直接通过 Fas/FasL 通路来造成 NK 细胞、T 淋巴细胞的凋亡,我们分离了外周血单个核细胞并对细胞中 Fas、FasL 及下游信号分子的表达量进行了检测。外周血单个核细胞的主要成分包括 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞、NK 细胞以及单核细胞,通过分析单个核细胞中 Fas、FasL 及下游信号分子的表达可知:CHB 组患者外周血单个核细胞中 Fas、FasL、Caspase-3、Caspase-6、Caspase-8 的 mRNA 含量均显著高于对照组。进一步分析外周血单个核细胞中 Fas/FasL 信号分子与免疫细胞的相关性可知:外周血单个核细胞中 Fas、FasL、Caspase-3、Caspase-6、Caspase-8 的 mRNA 含量与 CD3 + CD4 + T 细胞、CD3 + CD8 + T 细胞、CD16 + CD56 + NK 细胞的百分比呈负相关。这就说明 HBV 感染会通过增加外周血单个核细胞中 Fas、FasL 及下游 Caspase 表达的方式来诱导 T 淋巴细胞和 NK 细胞凋亡;T 淋巴细胞和 NK 细胞凋亡后数目显著减少,又会抑制机体的细胞免疫应答和非特异性免疫,不利于 HBV 的清除并造成 HBV 持续慢性感染。

综上所述,慢性 HBV 感染能够增加外周血单个核细胞中凋亡分子 Fas、FasL 以及 Caspase 的表达,进而造成 T 淋巴细胞和 NK 细胞凋亡、抑制细胞免疫应答和非特异性免疫。

参考文献

[1] LIU H,GENG S,WANG B,et al. Immuno-potentiating pathway of HBsAg-HBIG immunogenic complex visualized[J]. Hum Vaccin-Immunother,2016,12(1):77-84.

[2] 贾继东,李兰娟. 慢性乙型肝炎防治指南(2010 年版)[J]. 临床肝胆病杂志,2011,27(1):113-128.

[3] 刘晓利,王丽佳,张栓,等. HBV 相关原发性肝癌患者外周血 T、NK、B 细胞及胸腺功能特征[J]. 世界华人消化杂志,2016,24(22):3381-3390.

[4] 覃羽华,岑光旅,王俊利,等. 慢性乙型肝炎患者外周血 T 细胞亚群的表达及意义[J]. 中国老年学杂志,2015,35(2):475-476.

[5] ZHENG M,SUN R,WEI H,et al. NK cells help induce anti-hepatitis b virus CD8 + T cell immunity in mice[J]. J Immunol,2016,196(10):4122-4131.