

文章编号 1006-8147(2016)02-0129-04

论 著

HBV 慢性感染者肝脏组织中 CD4⁺T、CD8⁺T 和 FoxP3⁺Tregs 细胞的表达水平

程婷婷^{1,2}, 王凤梅², 朱争艳³, 刘 辉³, 吕洪敏²

(1.天津医科大学第三中心临床学院消化(肝病)科,天津 300170;2.天津市第三中心医院消化(肝病)科,天津 300170;3.天津市第三中心医院,天津市肝胆疾病研究所,天津市人工细胞重点实验室,天津 300170)

摘要 目的:计数慢性乙型肝炎病毒(HBV)感染者肝脏组织中 CD4⁺T、CD8⁺T 和 FoxP3⁺Tregs 细胞,观察不同免疫状态下的肝脏组织中 CD4⁺T 和 CD8⁺T 细胞表达水平之间的差异,探索其临床意义。方法:选取慢性 HBV 感染者 68 例,健康对照组(非 HBV 感染组)30 例,运用免疫组织化学的方法进行检测。结果:慢性 HBV 感染组的 CD4⁺T、CD8⁺T 和 FoxP3⁺Tregs 细胞表达水平明显升高,与非 HBV 感染组相比, P 均 <0.001 ;在 HBV 感染组中,CD4⁺T 和 CD8⁺T 细胞在免疫耐受期患者肝脏组织中的表达水平最低,CD4⁺T、CD8⁺T 细胞在免疫清除期、再活动期中的表达水平与二者在免疫耐受期相比,均有增高趋势,然而 CD4⁺T、CD8⁺T 细胞的表达水平在免疫耐受期、免疫清除期、低复制期及再活动期任意两期之间比较, P 均 >0.05 。结论:CD4⁺T 和 CD8⁺T 细胞在免疫耐受期、免疫清除期、低复制期及再活动期患者肝脏组织中表达水平的变化趋势在一定程度上反应了各期肝脏的免疫状态;FoxP3⁺Tregs 细胞可能与 HBV 感染慢性化有关。

关键词 乙型肝炎病毒;CD4⁺T 细胞;CD8⁺T 细胞;FoxP3⁺Tregs 细胞;肝脏

中图分类号 R512.6⁺2

文献标志码 A

Level of CD4⁺T, CD8⁺T and FoxP3⁺Tregs in the liver tissues of patients with chronic HBV infection

CHENG Ting-ting^{1,2}, WANG Feng-mei², ZHU Zheng-yan³, LIU Hui³, Lü Hong-min²

(1. Department of Gastroenterology and Hepatology, The Third Central Clinical College, Tianjin Medical University, Tianjin 300170, China; 2. Department of Gastroenterology and Hepatology, The Third Central Hospital of Tianjin, Tianjin 300170, China; 3. The Third Central Hospital of Tianjin, Key Laboratory of Artificial Cell, Institute of Hepatobiliary Disease, Tianjin 300170, China)

Abstract **Objective:** To count the number of CD4⁺T, CD8⁺T and FoxP3⁺Tregs in the liver tissue of patients with chronic HBV infection and compare the expression levels of CD4⁺T and CD8⁺T cells in liver tissues in different immune status. **Methods:** The levels of CD4⁺T, CD8⁺T and FoxP3⁺Tregs were detected by the method of immunohistochemistry in 68 chronic HBV infection patients, and 30 individuals without HBV infection as healthy control. **Results:** Compared with the non-HBV infection group, the expression level of CD4⁺T, CD8⁺T and FoxP3⁺Tregs were significantly higher in the chronic HBV infection group ($P<0.001$); In chronic HBV infection group, the numbers of CD4⁺T and CD8⁺T in immune clearance and active period were higher than the ones in the immune tolerance, and the liver tissue from immune tolerance patients had lowest CD4⁺T and CD8⁺T levels, but $P>0.05$ respectively. **Conclusion:** To some extent, the expression levels of CD4⁺T and CD8⁺T cells in the immune tolerance, immune clearance phase, low copy phase and active period indicate the liver immune status; and maybe FoxP3⁺Tregs are associated with chronic HBV infection.

Key words hepatitis B virus CD4⁺T cells; CD8⁺T cells; FoxP3⁺T cells; liver

慢性乙型肝炎病毒(HBV)感染是临床常见的慢性肝病之一,其感染进程受病毒、宿主及外界环境等因素的影响,被划分为免疫耐受期、免疫清除期、低复制期以及再活动期 4 个时期^[1]。机体的特异和非特异性免疫反应在防御外界病原体、维持机体免疫平衡的过程中发挥重要作用,尤其是特异性免疫反应,其作用的发挥亦贯穿了 HBV 感染的整个过

程^[2],之前已有学者对 HBV 感染者外周血及肝脏组织中的 CD4⁺T 和 CD8⁺T 细胞进行了大量研究^[3-5],但关于二者在免疫耐受期、免疫清除期、低复制期以及再活动期患者肝脏组织中含量差异的研究尚少。CD4⁺Treg 具有无反应和免疫抑制性两大功能,对多种 T 细胞具有调节功能,与慢性 HBV 感染的发生发展密切相关,FoxP3 是调节性 T 细胞特异性的核转录因子,对其分化及功能的发挥具有重要作用。因此本研究主要观察慢性 HBV 感染者肝脏组织中 CD8⁺T 和 CD4⁺T 细胞及 FoxP3⁺Tregs 的表达水平,并进一步观察 HBV 感染者各期肝脏组织中 CD8⁺T 和

基金项目 天津市应用基础与前沿技术研究计划项目基金资助(13JCYBJC22500),天津市卫生局科技基金(2010KZ123)

作者简介 程婷婷(1987-),女,硕士在读,研究方向:肝脏相关疾病;

通信作者:吕洪敏,E-mail: lvhongmin58@163.com。

CD4⁺T 细胞的含量差异,探索其临床意义。

1 资料和方法

1.1 组织样本 98 例共 294 个组织样本均取自天津市第三中心医院病理科,HBV 感染组 68 例,男 44 例,女 24 例,平均年龄(44±12)岁,其中免疫耐受期 13 例,免疫清除期 11 例,低复制期 37 例,再活动期 7 例[分期依据:免疫耐受期:血清 HBsAg 和 HBeAg 阳性,HBV DNA>10⁷ cs/mL,血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)正常,肝组织无明显异常;免疫清除期:ALT 升高,HBV DNA>10⁴ cs/mL,肝组织有坏死、炎症或纤维化;低复制期:HBeAg 阴性,抗-HBe 阳性,HBV DNA<10⁴ cs/mL,ALT 正常,肝组织学无或有轻度炎症;再活动期:患者表现为 HBeAg 阴性,抗-HBe 阳性,ALT 升高,且 HBV DNA 由阴性转为阳性或者持续增高]。另选 30 例取自肝血管瘤周围的正常肝组织作为健康对照组(非 HBV 感染组),男 5 例,女 25 例,平均年龄(48±9)岁,对照组成员外周血肝功能完全正常,病毒标志全阴性。凡伴有其它病毒性肝炎或 HIV 感染、酒精性肝病、脂肪性肝病或自身免疫性肝病以及药物性肝损伤的肝病者均排除在外。慢性 HBV 感染自然史分期参照慢性乙型肝炎防治指南(2010 年版)。该研究经天津市第三中心医院伦理委员会批准,每份样本的取得均获得患者的知情同意。

1.2 免疫组化步骤 福尔马林固定、石蜡包埋的肝脏组织以 4 μm 的厚度切片。所有组织切片在 70 ℃ 的烤箱中加热 50 min 后均经脱蜡水化,高温高压下于 pH 6.0 的磷酸盐缓冲液或 pH 8.0 的 EDTA 中进行抗原修复,单克隆抗体 FoxP3(236A/E7, ab20034, 1:100)、鼠抗人 CD8 抗体(144B, ab17147, 1:50)、鼠抗人 CD4 抗体(ZM-0418, 即用型)和二抗 PV-9000(北京中杉金桥生物技术有限公司)用于染色,DAB 显色后,苏木素复染。树脂干燥后在显微镜下观察,照相。

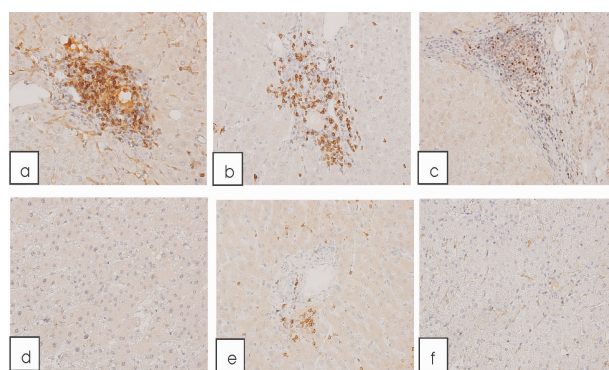
1.3 结果判定 免疫组化结果判定由两名资深病理医师在不知道临床诊断的前提下独立阅片。图像采集用日本奥林巴斯 BX51 显微镜高倍镜像下 (HPF,×400)随机选取 5 个视野,固定拍摄条件下统一进行拍摄图片。再使用 IPP5.1 软件编制宏,运用宏程序对拍摄图片中的 CD4⁺T、CD8⁺T 和 FoxP3⁺Tregs 细胞进行批量计数,然后用标本中所取的 5 个视野的计数总和除以 5,得到的平均数作为每个标本的 CD4⁺T、CD8⁺T 和 FoxP3⁺Tregs 细胞的最终数目。

1.4 统计学处理 所有统计学分析均使用 SPSS 20.0 软件处理。正态分布的计量资料以均数±标准

差表示;非正态分布的计量资料以中位数和四分位数间距 Median (IQR) 表示。两组间比较采用 Kruskal-Wallis *U* 检验,多组间比较采用 Kruskal-Wallis *H* 检验。相关性分析采用 Spearman 检验。均为双侧检验,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CD4⁺T、CD8⁺T、FoxP3⁺Tregs 细胞在慢性 HBV 感染者肝脏组织中的表达情况 CD4⁺T、CD8⁺T、FoxP3⁺Tregs 细胞在肝脏组织中的表达情况见图 1。与非 HBV 感染组相比,慢性 HBV 感染组肝脏组织中 CD4⁺T、CD8⁺T 和 FoxP3⁺Tregs 细胞表达水平明显升高,且 *P* 均<0.001,见表 1。



a-c 为 CD4⁺T、CD8⁺T 和 FoxP3⁺Tregs 在慢性 HBV 感染组的表达情况;d-f 为 CD4⁺T、CD8⁺T 和 FoxP3⁺Tregs 在对照组中的表达情况

图 1 CD4⁺T、CD8⁺T 和 FoxP3⁺Tregs 细胞在慢性 HBV 感染组和对照组中的表达情况(HPF,×400)

Fig 1 Expressions of CD4⁺T, CD8⁺T and FoxP3⁺Tregs in the chronic HBV infection group and healthy control group (HPF,×400)

表 1 两组肝脏组织中 CD4⁺T、CD8⁺T、FoxP3⁺Tregs 细胞表达水平
Tab 1 Levels of CD4⁺T, CD8⁺T and FoxP3⁺Tregs in the chronic HBV infection group and non-HBV infection

组别	<i>n</i>	CD4 ⁺ T	CD8 ⁺ T	FoxP3 ⁺ Tregs
非 HBV 组	30	1.2(0.2-3.1)	5.6(2.3-13.5)	0.0(0.0-0.0)
HBV 组	68	23.6(10.8-44.9)*	38.2(26.9-59.0)*	5.7(2.4-9.2)*

与非 HBV 组相比,**P*<0.001

2.2 处于 HBV 感染自然史不同阶段的肝脏组织中 CD4⁺T 和 CD8⁺T 细胞表达水平 HBV 感染者肝脏组织中的 CD4⁺T 细胞在 4 期之间的表达水平由高到低依次为免疫清除期、再活动期、低复制期、免疫耐受期;然而 CD4⁺T 细胞在免疫耐受期、免疫清除期、低复制期及再活动期任意两期之间比较,其表达水平均无统计学差异。CD8⁺T 细胞在 4 期之间的表达水平由高到低依次为免疫清除期、低复制期、再活动期、免疫耐受期;其表达水平在免疫耐受期、免疫清除期、低复制期及再活动期任意两期之间比

较, P 均 >0.05 , 见表 2。

表 2 不同 HBV 感染阶段的肝脏组织中 CD4⁺T、CD8⁺T 细胞表达水平比较

Tab 2 Levels of CD4⁺T, CD8⁺T cells in the liver tissue at the different stages of chronic HBV infection

组别	<i>n</i>	CD4 ⁺ T	CD8 ⁺ T
免疫耐受期	13	19.2(9.2–41.8)	33.3(27.4–37.8)
免疫清除期	11	28.4(13.2–48.8) [#]	46.0(32.0–90.0) [#]
低复制期	37	23.6(9.2–42.4) ^{**}	45.2(22.3–59.8) ^{**}
再活动期	7	24.2(8.1–32.8) ^{**Δ}	37.8(13.2–69.0) ^{**Δ}

与免疫耐受期相比, [#] $P>0.05$; 与免疫清除期相比, ^{*} $P>0.05$; 与低复制期相比, ^Δ $P>0.05$

2.3 慢性 HBV 感染者肝脏组织中 FoxP3⁺Tregs 细胞与 CD8⁺T 细胞的关系 慢性 HBV 感染者肝脏组织中 FoxP3⁺Tregs 细胞表达水平随 CD8⁺T 细胞的上升而有所上升($r=0.397$, $P<0.01$), 见图 2。

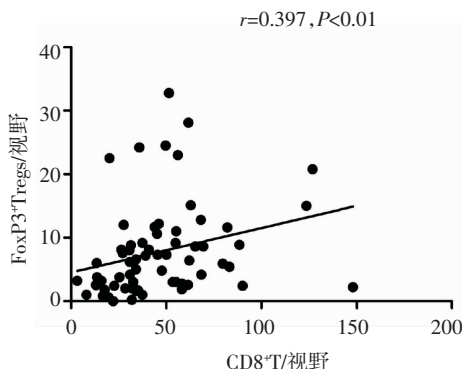


图 2 FoxP3⁺Tregs 细胞与 CD8⁺T 细胞之间的关系

Fig 2 Correlation between FoxP3⁺Tregs and CD8⁺T

3 讨论

T 淋巴细胞亚群及其相关细胞因子, 尤其是 CD4⁺T 和 CD8⁺T 细胞在慢性 HBV 感染的发生发展中发挥重要作用。CD4⁺T 细胞是一类辅助性细胞, 能够协助 CD8⁺T 细胞识别感染的肝细胞, 通过细胞溶解或非溶机制抑制 HBV 的复制^[6], 慢性 HBV 感染过程中, 抗原的长期刺激会导致患者体内 T 淋巴细胞的慢性消耗, 影响病毒的清除。然而本研究结果显示, 与非 HBV 感染组相比, HBV 感染组的 CD4⁺T 和 CD8⁺T 细胞均有明显增加, 但增加的 CD8⁺T 细胞并未有效地清除 HBV 病毒, 原因可能是: HBV 清除过程中真正起作用的是细胞毒性 T 细胞, 即活化的 CD8⁺T 细胞^[7]; 慢性乙型肝炎患者体内乙型肝炎 e 抗原(HBeAg)的高表达诱导 CD8⁺T 细胞产生免疫耐受; 同时 CD4⁺T 细胞分化的特异性 T 辅助细胞水平有所降低^[5]。因此我们得知 T 淋巴细胞数量上的变化并不能完全反映其功能的改变。另外我们还发现

HBV 感染者肝脏组织中的 FoxP3⁺Tregs 细胞的表达水平会随 CD8⁺T 细胞的上升而相应上升, 众所周知, FoxP3⁺Tregs 细胞作为一类具有免疫抑制作用的 T 淋巴细胞亚群, 能够抑制 CD8⁺T 等细胞的功能^[8–9], Furuichi 等^[10]的研究发现剔除外周血的 CD25⁺Tregs 细胞能够增强 CD8⁺T 细胞的反应强度, 因此可以认为是 FoxP3⁺Tregs 细胞在一定程度上抑制了 CD8⁺T 细胞的功能, 从而造成机体真正参加免疫反应的活性细胞不足, 导致了感染的迁延, 进一步提示其与 HBV 感染慢性化有关^[11]。

慢性 HBV 感染史一般分为 4 个时期, 处于免疫耐受期的患者其机体免疫反应不足以清除病毒; 低复制期患者对病毒有一定的控制; 免疫清除期和再活动期患者, 其机体正处于识别、清除病毒的过程, 是病毒与宿主免疫抗衡的结果, 各期都有独特的病毒学、生物化学特点, 对患者进行自然史分期, 了解肝脏的免疫状态, 有助于制定治疗方案及判断预后, 而目前关于慢性 HBV 感染史不同阶段免疫状况的研究尚缺乏, 且已有的研究大都局限于外周血, 对肝脏组织免疫微环境的研究不足。因此笔者对此进行了相应探索。结果显示 CD4⁺T 和 CD8⁺T 细胞在免疫耐受期的表达水平最低, 在机体清除病毒的免疫清除期和再活动期均有升高的趋势, 且在免疫清除期的表达水平最高, 一定程度上能够反应出各期患者免疫反应之间的差异, 有助于临床上指导治疗, 评判患者的免疫能力。然而与 Sprengers 等^[12]的研究结果基本一致, CD4⁺T 和 CD8⁺T 细胞在免疫耐受期、免疫清除期、低复制期和再活动期中的表达水平均无统计学差异。邢汉前等^[13]对 HBV 感染者免疫耐受期、免疫清除期、低复制期的研究则发现, 免疫耐受期患者肝内浸润的 CD4⁺T 和 CD8⁺T 淋巴细胞明显少于免疫活动期患者, 造成该差异的原因可能是: 试验入组成员的病情严重程度不同, 临床生化学指标和病毒学指标之间存在差异; 另一方面, 当特异性的 CD8⁺T 和 CD4⁺T 细胞不足以清除病毒时, 会征召非特异性的 T 淋巴细胞入肝^[3], 这也会影响 CD8⁺T 和 CD4⁺T 细胞的含量。因此为更加明确 CD4⁺T 和 CD8⁺T 细胞在各期之间表达水平的差异尚需进行大样本多中心的研究, 并且对每个 HBV 感染者在不同时期的肝脏组织样本, 进行纵向观察分析, 这对慢性 HBV 感染者的个体化治疗及判断临床预后与转归是至关重要的。

综上, CD4⁺T 和 CD8⁺T 细胞在免疫耐受期、免疫清除期、低复制期及再活动期患者肝脏组织中表达水平的变化在一定程度上反映了各期肝脏的免

疫状态,同时我们的研究进一步证实 FoxP3⁺Tregs 细胞可能与 HBV 感染慢性化有关。

参考文献:

- [1] 中华医学会肝病学分会, 中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2010 年版)[J]. 中华肝脏病杂志, 2011, 19(1): 13
- [2] 华忠, 顾锡炳, 汤琴, 等. 慢性乙型肝炎患者不同 HBV DNA 水平诱导细胞免疫不同及意义[J]. 实用医学杂志, 2013, 29(22): 3718
- [3] 梁劲松, 邓鑫, 文彬, 梁娟英. 不同临床类型乙型肝炎患者淋巴细胞亚群的差异性分析[J]. 医学研究杂志, 2015, 2: 75
- [4] 田瑛, 邱志峰, 李太生. 慢性乙型肝炎患者和乙型肝炎病毒携带者外周血 T 细胞亚群的变化和意义[J]. 中华医学杂志, 2005, 85(47): 3354
- [5] 裴豪, 印永祥, 陆以农, 等. 慢性乙肝患者肝组织内 CD4⁺、CD8⁺和 CD25⁺T 淋巴细胞的表达和研究[J]. 临床肝胆病杂志, 2006, 22(06): 412
- [6] Trautmann T, Kozik J H, Carambia A, et al. CD4⁺T-cell help is required for effective CD8⁺T cell-mediated resolution of acute viral hepatitis in mice[J]. PLoS One 2014, 9(1): e86348
- [7] 张敏, 杨丽莎, 彭德珍, 等. 慢性 HBV 感染不同免疫状态及乙型肝炎肝硬化外周血 T、B 细胞亚群和 NK 细胞的变化及意义[J]. 实用医学杂志, 2014, 30(20): 3233
- [8] Chen M L, Pittet M J, Gorelik L. Regulatory T cells suppress tumor-specific CD8⁺T cell cytotoxicity through TGF- β signals in vivo[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(2): 419
- [9] Stoop J N, van der Molen R G, Baan C C, et al. Regulatory T cells contribute to the impaired immune response in patients with chronic hepatitis B virus infection[J]. Hepatology, 2005, 41(4): 771
- [10] Furuichi Y, Tokuyama H, Ueha S, et al. Depletion of CD25⁺CD4⁺T cells (Tregs) enhanced the HBV-specific CD8⁺T cell response primed by DNA immunization[J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(24): 3772
- [11] 巫翠萍, 覃西, 王华民, 等. 慢性乙型肝炎患者外周血 CD4⁺CD25⁺Treg 与 CD4⁺和 CD8⁺T 淋巴细胞亚群的相关研究[J]. 中国免疫学杂志, 2010, 26(03): 273
- [12] Sprengers D, van der Molen R G, Kusters J G, et al. Different composition of intrahepatic lymphocytes in the immune-tolerance and immune-clearance phase of chronic hepatitis B[J]. J Med Virol, 2006, 78(5): 561
- [13] 邢汉前, 辛绍杰, 赵景民, 等. HBV 慢性感染患者免疫耐受期肝组织内 T、B 淋巴细胞的变化[J]. 世界华人消化杂志, 2005, 13(13): 1529

(2015-10-12 收稿)

+++++

(上接第 128 页)

组织中高表达,高表达的 HOTAIR 与膀胱癌病理分期、分级密切相关,可以作为膀胱癌恶性程度判断的辅助指标,高表达的 HOTAIR 可以作为膀胱癌预后监测重要分子标志物。

参考文献:

- [1] Siegel R, Ma J, Zou Z, et al. Cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2013, 310(9): 982
- [2] 韩苏军, 张思维, 陈万青, 等. 中国膀胱癌发病现状及流行趋势分析[J]. 癌症进展, 2013, 11(1): 89
- [3] van Rhijn B W, Burger M, Lotan Y, et al. Recurrence and progression of disease in non-muscle-invasive bladder cancer: from epidemiology to treatment strategy[J]. Eur Urol, 2009, 56(3): 430
- [4] Babjuk M, Burger M, Zigeuner R, et al. EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: update 2013 [J]. Eur Urol, 2013, 64(4): 639
- [5] Yeung C, Dinh T, Lee J. The health economics of bladder Cancer: an updated review of the published literature[J]. Pharmacoeconomics, 2014, 32(11): 1093
- [6] Kaufman D S, Shipley W, Feldman A S. Bladder cancer[J]. Lancet, 2009, 374(9685): 239
- [7] Jacobs B L, Lee C T, Montie J E. Bladder cancer in 2010 how far have we come[J]. CA Cancer J Clin, 2010, 60(4): 244
- [8] Cheetham S W, Gruhl F, Mattick J S, et al. Long noncoding RNAs and the genetics of cancer[J]. Br J cancer, 2013, 108(12): 2419
- [9] Gupta R A, Shah N, Wang K C, et al. Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis [J]. Nature, 2010, 464(7291): 1071
- [10] ENCODE Project Consortium, Birney E, Stamatoyannopoulos J A, et al. Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project[J]. Nature, 2007, 447(7146): 799
- [11] Pennisi E. Shining a light on the genome's 'dark matter' [J]. Science, 2010, 330(6011): 1614
- [12] Rinn J L, Kertesz M, Wang J K, et al. Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs[J]. Cell, 2007, 129(7): 1311
- [13] Ishibashi M, Kogo R, Shibata K, et al. Clinical significance of the expression of long non-coding RNA HOTAIR in primary hepatocellular carcinoma[J]. Oncol Rep, 2013, 29(3): 946
- [14] Niinuma T, Suzuki H, Nojima M, et al. Upregulation of miR-196a and HOTAIR drive malignant character in gastrointestinal stromal tumors[J]. Cancer Res, 2012, 72(5): 1126
- [15] Kim K, Jutooru I, Chandalapaka G, et al. HOTAIR is a negative prognostic factor and exhibits pro-oncogenic activity in pancreatic Cancer[J]. Oncogene, 2013, 32(13): 1616
- [16] Yan T H, Lu S W, Huang Y Q, et al. Upregulation of the long noncoding RNA HOTAIR predicts recurrence in stage Ta/T1 bladder cancer[J]. Tumour Biol, 2014, 35(10): 10249
- [17] Hussain S A, James N D. Molecular markers in bladder cancer[J]. Semin Radiat Oncol, 2005, 15(1): 3

(2015-09-16 修稿)