

HBV 感染者外周血 T 淋巴细胞表面 IL-7 受体的表达与疾病进展相关性的研究

周立平 李妍 董西华 栾虹 周博 李异玲

作者单位:110001 沈阳市,中国医科大学附属第一医院检验科

通讯作者:周立平, E-mail:zhouliping750825@163.com

【摘要】 目的 通过检测乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 感染者外周血 T 淋巴细胞表面 CD127 的表达,探讨 T 淋巴细胞表面 IL-7 受体(CD127)与 HBV 感染后疾病进程的相关性。**方法** 选取 125 例 HBV 感染者及 40 例健康体检者,应用流式细胞仪技术检测外周血 T 淋巴细胞表面 CD127 的表达,结合 HBV 感染者血浆 IL-7 浓度及临床情况进行分析。**结果** 外周血 CD4⁺ T 淋巴细胞表面 CD127 的表达各组间差异均无统计学意义 ($P > 0.05$); CD8⁺ T 淋巴细胞表面 CD127 的表达各组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$),且各 HBV 感染组 CD127 水平均明显低于健康对照组 ($P < 0.01$);慢性重型乙肝组与慢性乙肝组外周血 CD8⁺ T 淋巴细胞表面 CD127 的表达差异有统计学意义 ($P < 0.05$);HBV 感染者血浆中 IL-7 水平明显高于健康对照组,差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$),且与 CD8⁺ T 淋巴细胞表面 CD127 的表达呈负相关 ($r = -0.341, P < 0.05$);HBV 病毒载量的对数值与外周血 CD8⁺ T 淋巴细胞表面 CD127 的表达存在负相关 ($r = -0.432, P < 0.01$)。**结论** HBV 感染者外周血 T 淋巴细胞表面 CD127 的表达水平与疾病进展密切相关,监测 CD127 的表达水平有望成为评价患者体内细胞免疫状态和了解疾病进展的有效细胞免疫指标。

【关键词】 乙型肝炎病毒;CD127;白细胞介素-7

The study on the correlation between the expression of IL-7 receptor on the T lymphocyte and the disease progression of HBV infected patients

ZHOU Li-ping, LI Yan, DONG Xi-hua, et al. Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, China

【Abstract】 Objective To investigate the correlation between the progression of HBV infection and the IL-7 receptor on the T lymphocyte by detecting the expression of the CD127 on the surface of T lymphocyte in HBV infected patients. **Methods** 125 HBV infected patients and 40 healthy controls were selected for the research. The expression of CD127 on the surface of T lymphocyte was detected by flow-cytometry, the level of IL-7 in the serum and the clinical data of HBV infected patients were considered. **Results** There was no statistical significance in the difference of CD127 on the surface of CD4⁺ T lymphocyte among the groups ($P > 0.05$). The expression rate of the CD127 on the surface of CD8⁺ T lymphocyte in HBV infected patients decreased obviously comparing with healthy controls ($P < 0.05$). Comparing with chronic severe hepatitis B, the difference had statistical significance ($P < 0.05$). The level of IL-7 in the serum of HBV infected patients was higher than that of healthy controls and the difference had statistical significance ($P < 0.05$), and had negative correlation with the expression rate of the CD127 on the surface of CD8⁺ T lymphocyte ($r = -0.341, P < 0.05$). The log value of HBV loading had negative correlation with the expression rate of the CD127 on the surface of CD8⁺ T lymphocyte ($r = -0.432, P < 0.01$). **Conclusion** The expression of the CD127 on the surface of CD8⁺ T lymphocyte is closely correlated with the progression of HBV infection. It proposed to be an immune indicator to evaluate the cellular immunity and disease progression of HBV patients.

【Key words】 Hepatitis B virus; CD127; Interleukin-7 (IL-7)

乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 是一种非细胞毒性病毒,其所致的肝细胞损坏是由机体针对 HBV 特异性抗原的免疫反应所引起,而且 HBV 感

染的发生、发展和转归与宿主的免疫状态密切相关。T 淋巴细胞是机体免疫的指挥中枢,在抗 HBV 感染的过程中起着关键作用。研究^[1,2]发现,IL-7 受体是

维持 T 淋巴细胞稳态的主要因素,能提高 T 淋巴细胞的存活能力。

CD127 是 IL-7 受体 α 链,T 淋巴细胞对 IL-7 的特异性应答主要通过 CD127 的表达实现。本研究通过流式细胞仪技术检测 HBV 感染者外周血 T 淋巴细胞表面 CD127 的表达水平,并结合患者血浆 IL-7 浓度、临床分期及病毒载量,探讨外周血 T 淋巴细胞表面 CD127 水平与 HBV 感染后疾病进程的相关性。

1 资料与方法

1.1 临床资料 选择 2008 年 6 月至 2008 年 12 月在我院消化病房住院的 HBV 感染者 125 例,男 66 例,女 59 例,年龄 27~65 岁。其中慢性乙肝患者 41 例,慢性重型乙肝患者 45 例,乙肝后肝硬化患者 39 例,无重叠或混合感染。所有病例均符合 2000 年西安会议修订的《病毒性肝炎防治方案》诊断分型标准^[9]。选择 40 例健康查体者为对照组,无急慢性心、肝、肾等疾病。

1.2 主要试剂 FITC 标记的鼠抗人 CD4 单抗(CD4-FITC)、PerCP 标记的鼠抗人 CD8 单抗(CD8-PerCP)、APC-cy7 标记的鼠抗人 CD3 单抗(CD3-APC-cy7)、PE 标记的鼠抗人 CD127 单抗(CD127-PE)、溶血素等均为美国 BD 公司产品;IL-7 检测试剂盒(Quantikine ELISA Kit,R & D Systems)购自美国 Minncapolis 公司;HBV DNA 检测试剂选用深圳匹基公司生产的 HBV 核酸扩增(PCR)检测试剂盒。

1.3 外周血 T 淋巴细胞表面 CD127 水平的检测 采集患者及健康者静脉血 2 ml,EDTA 抗凝(1:9),混匀,取 100 μ l 全血放入另一试管,分别加入 CD4-FITC、CD8-PerCP、CD3-APC-cy7、CD127-PE,混匀后室温避光放置 30 min,然后加入溶血素 3 ml,室温避光 10 min,离心半径 18 cm,1200 r/min 离心 5 min,弃上清。加入 3 ml PBS 悬浮,室温,离心半径

18 cm,1200 r/min 离心 5 min,弃上清,洗涤 2 次。加入 1 %多聚甲醛的 PBS 200 ul 悬浮,BD FACSDiVa™ 软件进行检测。

1.4 血浆 IL-7 水平检测 采用 ELISA 法,按照试剂盒说明书进行检测,所有实验均重复 2 次检测,结果取平均值。

1.5 HBV 病毒载量的检测 病毒载量采用 real-time 荧光定量 PCR 方法,用美国 Roche 公司的 LightCycler 自动载量仪测定 HBV-DNA。

1.6 统计学处理 所有资料采用 SPSS11.5 进行统计学分析。计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。不同组间外周血 T 淋巴细胞表面 CD127 水平比较采用方差分析,LSD 法进行两两比较;采用 Pearson 相关系数表示不同变量间的相关性。

2 结果

2.1 不同临床分期的 HBV 感染者外周血 T 淋巴细胞表面 CD127 表达和血浆 IL-7 水平 表 1 所示,不同临床分期的 HBV 感染者外周血 CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞表面 CD127 的表达率均低于健康对照组。经统计学分析,HBV 感染者 CD4⁺ T 淋巴细胞表面 CD127 的表达各组间差异无统计学意义 ($F=2.53, P>0.05$),但慢性乙肝组、重型乙肝组、乙肝后肝硬化组 CD8⁺ T 淋巴细胞表面 CD127 的表达率较对照组明显减低,且差异有统计学意义 ($F=94.06, P<0.05$),而且慢性乙肝组外周血 CD8⁺ T 淋巴细胞表面 CD127 的表达率与慢性重型乙肝组相比差异有统计学意义 ($P<0.05$)。乙肝后肝硬化组 CD8⁺ T 淋巴细胞表面 CD127 的表达率虽低于慢性乙肝组,但差异无统计学意义 ($P>0.05$)。HBV 感染者血浆 IL-7 水平均明显高于健康对照组,差异有统计学意义 ($P<0.05$),且与 CD8⁺ T 淋巴细胞表面 CD127 的表达率呈负相关($r=-0.341, P<0.05$)。

2.2 HBV 感染者外周血 T 淋巴细胞表面 CD127 的

表 1 不同临床分期的 HBV 感染者外周血 T 淋巴细胞表面 CD127 的表达和 IL-7 水平比较($\bar{x}\pm s$)

分组	例数	CD127(%)		IL-7 (pg/ml)
		CD4 ⁺ T 淋巴细胞	CD8 ⁺ T 淋巴细胞	
慢性乙肝组(1)	41	89.65 $\pm$ 7.65	43.26 $\pm$ 4.51 ^{*Δ}	6.55 $\pm$ 1.56 ^{Δ}
慢性重型乙肝组(2)	45	85.55 $\pm$ 6.81	34.81 $\pm$ 4.54 [*]	9.65 $\pm$ 2.18 [*]
乙肝后肝硬化组(3)	39	87.99 $\pm$ 5.54	39.58 $\pm$ 4.18 [*]	7.26 $\pm$ 2.03 [*]
健康对照组(4)	40	90.45 $\pm$ 9.44	51.24 $\pm$ 5.21	3.58 $\pm$ 1.37
F 值		2.53	94.06	79.13
P 值		>0.05	<0.05	<0.05

注:CD8⁺ T 淋巴细胞 CD127 表达:1 与 4 比较 $q=2.10, P<0.05$;2 与 4 比较 $q=4.33, P<0.01$;3 与 4 比较 $q=3.08, P<0.01$;1 与 2 比较 $q=2.23, P<0.05$ 。IL-7 表达:1 与 4 比较 $q=2.03, P<0.05$;2 与 4 比较 $q=7.62, P<0.01$;3 与 4 比较 $q=2.46, P<0.05$;1 与 2 比较 $q=2.54, P<0.05$ 。^{*}与健康对照组相比, $P<0.05$; ^{Δ} 与慢性重型乙肝组相比, $P<0.05$

水平与 HBV 病毒载量的相关性 125 例 HBV 患者均进行了 HBV-DNA 含量的检测,检测结果为 $5.0 \times 10^2 \sim 5.0 \times 10^7$ copy/ml。HBV 病毒载量的对数值与外周血 CD8⁺T 淋巴细胞表面 CD127 的表达率之间存在负相关($r = -0.432, P < 0.01$)。

3 讨论

目前研究认为 HBV 感染引起的慢性肝炎主要是免疫损伤所致,HBV 感染免疫状态研究对于进一步分析 HBV 感染的发病机制有重要的作用^[4]。IL-7 受体可引起 Jak 和 Src 相关激酶酪氨酸磷酸化及 PI-3K 激酶活化诱导信号转导,使促进 T 细胞生存的基因高表达,并增强抗凋亡分子生成,但其免疫抑制机制尚不完全清楚^[5]。目前尚未见到有关外周血 T 淋巴细胞表面 CD127 表达与 HBV 感染后疾病进展相关性的报道。

本文研究结果表明,HBV 感染者外周血 CD8⁺T 淋巴细胞表面 CD127 表达率较健康对照组显著减低,这与国外文献报道相一致^[6,7],提示 HBV 感染者体内与 IL-7 受体有关的免疫功能受抑制,不能及时有效的清除病毒,从而促进疾病慢性化。本文研究还发现外周血 CD8⁺T 淋巴细胞表面 CD127 表达率与 HBV 感染的临床分期相关。与慢性重型乙肝组相比,慢性乙肝组外周血 CD8⁺T 淋巴细胞表面 CD127 表达率较高且差异有统计学意义 ($P < 0.05$),提示 HBV 感染者外周血 CD8⁺T 淋巴细胞表面 IL-7 受体的表达和 HBV 感染后疾病进展程度密切相关。因此,外周血 CD8⁺T 淋巴细胞表面 CD127 的表达率可能是一个较好的反应细胞免疫功能的参考指标,可以在临床上用于免疫功能的监测,同时该指标亦可判断 HBV 感染后疾病的进展及预后。分析其机制可能是:T 淋巴细胞表面 IL-7 受体(CD127)与 IL-7 特异性结合后,可诱导 STAT5 活化,促进 Bcl-2 生成^[8],后者是一种抗凋亡分子,它能够提高 T 细胞的存活能力。在 HBV 感染中,IL-7 受体低表达可引起 T 细胞内 Bcl-2 表达下降,使细胞凋亡增加,存活能力降低^[9,10],导致疾病进展。

本文研究结果显示:HBV 感染后血浆 IL-7 水平较对照组明显升高,且差异具有统计学意义 ($P < 0.05$),推测 IL-7 的升高可能会负反馈影响 IL-7 受体的表达。在 HBV 感染过程中,虽然 IL-7 水平升高了,但是 IL-7 受体 CD127 表达降低,导致大部分 IL-7 不能发挥作用,所以在 HBV 感染中 IL-7 的受体 CD127 作用还是降低了。

本文研究结果还显示 HBV 感染后其病毒载量

的对数值与外周血 CD8⁺T 淋巴细胞表面 CD127 的表达率之间存在负相关 ($r = -0.432, P < 0.01$),提示 HBV 感染后,外周血 CD8⁺T 淋巴细胞表面 CD127 表达下调,促进 HBV 复制。其机制可能是 IL-7 受体的低表达导致控制病毒复制的 T 淋巴细胞凋亡增多。因此,如果我们能够增加 HBV 感染者外周血 CD8⁺T 淋巴细胞表面 IL-7 受体的表达,或许能够增强其免疫功能,同时降低其体内 HBV 复制,这将为慢性 HBV 感染的治疗寻找一条新途径。

综上,HBV 感染者外周血 CD8⁺T 淋巴细胞表面 CD127 的水平与疾病进展密切相关,检测其表达有望成为评价患者体内细胞免疫状态和了解疾病进展程度的有效细胞免疫指标。本研究初步探讨了不同临床分期的 HBV 感染者外周血 T 淋巴细胞表面 CD127 水平,为进一步阐明外周血 T 淋巴细胞表面 IL-7 受体在 HBV 感染后发病机制及治疗中的作用奠定了基础。

4 参考文献

- 1 Di Carlo E, D'Antuono T, Pompa P, et al. The lack of epithelial Interleukin-7 and BAFF/BLYS gene expression in prostate cancer as a possible mechanism of tumor escape from immunosurveillance. *Clin Cancer Res*, 2009, 15: 2979-2987.
- 2 Durum SK, Mazzucchelli RI. Live from the liver: hepatocyte IL-7. *Immunity*, 2009, 30: 320-321.
- 3 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分. 病毒性肝炎防治方案. *中华传染病杂志*, 2001, 19: 56-62.
- 4 Von Boehmer H. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat Immunol*, 2005, 6: 338-344.
- 5 Harari A, Enders FB, Cellerai C, et al. Distinct profiles of cytotoxic granules in memory CD8 T cells correlate with function, differentiation stage, and antigen exposure. *J Virol*, 2009, 83: 2862-2871.
- 6 Lopes AR, Kellam P, Das A, et al. Bim-mediated deletion of antigen-specific CD8 T cells in patients unable to control HBV infection. *J Clin Invest*, 2008, 118: 1835-1845.
- 7 Boettler T, Panther E, Bengsch B, et al. Expression of the interleukin-7 receptor alpha chain (CD127) on virus-specific CD8⁺ T cells identifies functionally and phenotypically defined memory T cells during acute resolving hepatitis B virus infection. *J Virol*, 2006, 80: 3532-3540.
- 8 Ilano A, Barretina J, Gutiérrez A, et al. Interleukin-7 in plasma correlates with CD4 T-cell depletion and may be associated with emergence of syncytium-inducing variants in human immunodeficiency virus type1-positive individuals. *J Virol*, 2001, 75: 10319-10325.
- 9 Rethi B, Fluor C, Atlas A, et al. Loss of IL-7Ralpha is associated with

CD4 T-cell depletion, high interleukin-7 levels and CD28 down-regulation in HIV infected patients. AIDS, 2005, 19: 2077-2086.

10 Kaech SM, Tan JT, Wherry EJ, et al. Selective expression of the inter-

leukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. Nat Immunol, 2003, 4: 1191-1198.

(收稿日期: 2010-04-26)

(本文编辑: 陈淑莲)

(上接第 250 页)

入院后应用各项检查进行了病毒性肝炎、肝硬化、自身免疫性肝病和肿瘤等可造成肝功异常和铁蛋白异常的相关疾病的鉴别, 结合病史最后诊断为“药物性肝损伤”。经过有效的针对性治疗, 患者转氨酶恢复正常, 铁蛋白及维生素 B₁₂ 亦恢复正常出院。

4 病例分析

患者主因肝功异常入院, 可引起肝功异常的病因包括胆流异常、自身免疫性疾病、代谢和遗传性肝病、病毒性肝炎、酒精性肝病、血流动力学改变(低血压、休克、心力衰竭、脉管闭塞)等^[1]。该患者入院后经腹部超声、抗核抗体、抗平滑肌抗体、抗 HAV IgM、HBsAg、抗 HCV、抗 HEV 等检查, 均未提示异常, 基本排除胆流异常疾病、自身免疫性疾病及病毒性肝炎。结合患者既往病史、饮酒史、家族史等基本可排除酒精性肝病、代谢遗传性肝病, 同时患者有明确的服用“安坦”、“立普妥”等可造成肝损伤药物的病史, 故结合检验结果初步诊断为“药物性肝损伤”。

根据 1989 年国际医学科学组织理事会确立的药物性肝损伤标准^[2], 药物性肝损伤可分为肝细胞性、胆汁淤积性和混合性。最近, 食品药品监督管理局药物肝毒性指导委员会修订的上述三型诊断标准如下^[3]: 肝细胞损伤型: ALT ≥ 3 ULN (3 倍正常上限) 且 ALT/ULN 与 ALP/ULN 比值 ≥ 5。胆汁淤积型: ALP ≥ 2 ULN 且 ALT/ULN 与 ALP/ULN 比值 ≤ 2; 混合型: ALT ≥ 3 ULN, ALP ≥ 2 ULN 且 2 < ALT/ULN 与 ALP/ULN 的比值 < 5。

4.1 主管医生分析 患者老年男性, 主因肝功异常 2 月入院。入院后经各类检查并结合病史初步诊断为药物性肝损伤。患者同时有铁蛋白和维生素 B₁₂ 的显著升高, 为鉴别诊断拟进行影像学及肿瘤标志物相关检查, 并与相关科室会诊, 以鉴别患者铁蛋白及维生素 B₁₂ 显著升高是否伴有其他肿瘤发生。

4.2 会诊医生分析 普外会诊医生: 根据患者甲状腺结节的质地及活动度, 考虑结节性质为肿瘤可能性不大, 建议可进一步行甲状腺亲肿瘤显像排除肿瘤。内分泌会诊医生: 患者甲状腺超声检查虽提示甲状腺单发结节伴钙化性质待查, 但临床上铁蛋白升高与甲状腺肿瘤一般无相关性。

4.3 检验医师分析 铁蛋白升高可见于肝脏病变、部分血液病(急性和慢性粒细胞性白血病、淋巴细胞性白血病、单核细胞性白血病)、白细胞增多症、真性红细胞增多症及部分恶性细胞肿瘤(多见于肝癌、肺癌、胰癌)等^[4]。

肝脏含铁蛋白约占体内贮存铁的 1/3, 而血液循环中的铁蛋白又被肝细胞清除, 所以肝病可造成血清铁蛋白升高。铁蛋白与肝损伤情况密切相关, 其在肝损伤评估中有重要的临床意义。姚中吉等^[5]在评价甲型、乙型病毒性肝炎及药物性肝损伤中铁蛋白和转氨酶变化情况时发现, 高水平的血清铁蛋白可作为肝损害存在的证据, 特别是药物性肝损伤初期铁蛋白可比参考人群升高 5~10 倍, 表明血清铁蛋白是肝损害的敏感指标。血清铁蛋白在这些疾病状态下异常增高的可能机理为^[6]: (1) 铁蛋白是参与炎性反应的协同因子, 由于肝细胞炎性反应, 使铁蛋白合成明显增加。(2) 由于部分肝细胞坏死, 使胞浆内铁蛋白释放入血。(3) 肝细胞炎性反应时对循环血中铁蛋白清除能力的下降, 导致血清铁蛋白含量升高。

同时恶性肿瘤时, 如患肝癌、肺癌、胰癌、白血病等时, 癌细胞合成的铁蛋白增加, 亦可使血清铁蛋白升高, 故而铁蛋白也可作为恶性肿瘤的标志物之一^[5]。可结合其他肿瘤标志物及患者的临床症状、体征和影像学资料加以鉴别。

5 小结

铁蛋白升高与肝细胞的受损有密切关系, 肿瘤、药物、病毒性肝炎等所致肝损伤都可出现铁蛋白升高, 而肿瘤中以肝癌、肺癌、胰癌等多见。该患者肝功异常同时出现铁蛋白的明显升高, 经鉴别诊断排除其他疾病, 确诊为“药物性肝损伤”, 经一系列保肝治疗后, 肝功能、铁蛋白、维生素 B₁₂ 等逐渐恢复正常, 痊愈出院。

6 参考文献

- 1 Navarro VJ, Senior JR. Drug-related hepatotoxicity. N Engl J Med, 2006, 354: 731-739.
- 2 Larrey D. Epidemiology and individual susceptibility to adverse drug reactions affecting the liver. Semin Liver Dis, 2002, 22: 145-155.
- 3 Navarro V. Hepatic adverse event nomenclature document [EB/OL]. 2005.
- 4 Yao DF, Huang ZW, Chen SZ, et al. Diagnosis of hepatocellular carcinoma by quantitative detection of hepatoma-specific bands of serum gamma-glutamyltransferase. Am J Clin Pathol, 1998, 110: 743-749.
- 5 姚中吉, 夏吉荣. 检测血清铁蛋白在肝损伤评估中的意义. CHINA TROPICAL MEDICINE, 2004, 3: 336-338.
- 6 李立青, 董振南, 田亚平. 血清铁蛋白及其他四种肿瘤标志物检测对肺癌的诊断价值标记. 免疫分析与临床, 2009, 2: 68-70.

(收稿日期: 2010-10-09)

(本文编辑: 陈淑莲)