

重型乙型肝炎患者外周血淋巴细胞穿孔素/颗粒酶的表达及临床意义

崔速南 汪明明 刘靓雯 张照华 于淑丽

【摘要】 目的 探讨外周血淋巴细胞穿孔素/颗粒酶的表达在重型乙型肝炎(乙肝)肝细胞损伤中的作用,及其与乙型肝炎病毒(HBV)-DNA 载量的关系。方法 取 38 例重型乙肝患者入院次日晨空腹静脉血备检;同期选择 20 例成年健康体检志愿者作为健康对照组;采用流式细胞仪测定外周血淋巴细胞穿孔素/颗粒酶的表达;采用荧光定量聚合酶链反应(PCR)测定血清 HBV-DNA 载量。结果 重型肝炎组外周血淋巴细胞穿孔素及颗粒酶阳性率均较健康对照组显著升高[穿孔素:(43.42±19.28)%比(19.65±9.27)%,颗粒酶:(40.35±12.26)%比(22.28±9.35)%, P 均<0.01],且血清 HBV-DNA 载量越高,重型乙肝患者外周血淋巴细胞穿孔素/颗粒酶表达强度越低,均呈明显负相关($r_{\text{穿孔素}}=-0.92$, $r_{\text{颗粒酶}}=-0.96$, P 均<0.01)。结论 外周血淋巴细胞穿孔素/颗粒酶的过度表达是造成重型肝炎肝细胞损伤的重要因素,这种表达作用与乙型肝炎患者的 HBV-DNA 清除有关。

【关键词】 肝炎,乙型; 穿孔素; 颗粒酶; 肝炎病毒,乙型; 脱氧核糖核酸; 流式细胞仪

Clinical implication of expression of perforin/granzyme in peripheral blood lymphocyte in severe hepatitis B
CUI Su-nan, WANG Ming-ming, LIU Jing-wen, ZHANG Zhao-hua, YU Shu-li. Jinan Infectious Diseases Hospital, Jinan 250021, Shandong, China

【Abstract】 Objective To explore role of perforin/granzyme expression of peripheral blood lymphocyte in injury of hepatocyte in severe hepatitis B, and evaluate relationship between perforin/granzyme expression levels and hepatitis B virus (HBV)-DNA load. **Methods** Thirty eight patients of severe hepatitis B were enrolled in the study. Fasting venous blood was collected on following morning of admission. Twenty adult healthy subjects served as healthy control group. Perforin/granzyme expression of peripheral blood lymphocyte was detected by flow cytometry, and serum HBV-DNA load was detected by fluorescence quantitative polymerase chain reaction (PCR). **Results** Positive rate of perforin/granzyme in peripheral blood lymphocyte in severe hepatitis B was higher than that of the healthy control group [perforin: (43.42±19.28)% vs. (19.65±9.27)%, granzyme: (40.35±12.26)% vs. (22.28±9.35)%, both $P<0.01$]. There was a significant negative correlation between the perforin/granzyme expression of peripheral blood lymphocyte and serum HBV-DNA load ($r_{\text{perforin}}=-0.92$, $r_{\text{granzyme}}=-0.96$, both $P<0.01$), the higher serum HBV-DNA load, the lower perforin/granzyme expression in severe hepatitis B. **Conclusion** Perforin/granzyme overexpression in peripheral blood lymphocyte is an important factor in injury of hepatocyte in patients with severe hepatitis B, and the expression may be involved in HBV-DNA cleanup.

【Key words】 hepatitis B; perforin; granzyme; hepatitis B virus; DNA; flow cytometry

乙型肝炎(乙肝)的发病机制尚不完全清楚,目前认为,乙肝病毒(HBV)感染所致的肝细胞损伤是由细胞免疫介导所导致的,涉及到细胞毒性 T 细胞(CLT)和自然杀伤(NK)细胞,重型肝炎的发生与 CLT 和 NK 细胞活性超强有关^[1]。CLT 和 NK 细胞主要通过穿孔素/颗粒酶发挥作用,穿孔素与颗粒酶共同诱导靶细胞凋亡,是介导细胞毒性最关键的效应分子。本研究旨在进一步探讨外周血淋巴细胞穿孔素/颗粒酶表达在重型乙肝患者肝细胞损伤中

的作用,以及与 HBV-DNA 载量的关系。

1 对象与方法

1.1 研究对象:本院住院的重型乙肝患者 38 例,男 32 例,女 6 例;年龄 32~53 岁,平均 42.5 岁;其中慢性重型 30 例,亚急性重型 6 例,急性重型 2 例。患者均符合 2000 年(西安)第十次全国病毒性肝炎学术会议修订的病毒性肝炎的诊断和分型标准^[2];正在接受 α -干扰素、核苷类药物或胸腺肽抗病毒治疗;除外并发恶性肿瘤者。同期选择 20 例健康体检志愿者作为健康对照组,其中男 12 例,女 8 例;年龄 25~48 岁,平均 31.6 岁。

1.2 检测指标及方法

1.2.1 标本采集:患者入院后次日晨采集空腹静脉

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2009.02.005

基金项目:山东省济南市卫生课题项目(2005-36)

作者单位:250021 山东,济南市传染病医院肝病科

Email:wmmcsn@163.com

血 5 ml, 其中 3 ml 用于检测 HBV-DNA、肝功能、生化指标, 2 ml 注入肝素抗凝试管中, 用于穿孔素/颗粒酶检测。所有检测项目在标本采集后 4 h 内进行, 8 h 内完成。

1.2.2 血清 HBV-DNA、肝功能、生化指标检测: HBV-DNA 载量检测用 ABI5700 型荧光定量聚合酶链反应(PCR)系统; 最低检测值 1×10^3 拷贝/ml; 肝功能、生化检测用美国 CX-7 贝克曼全自动生化分析仪, 按产品使用说明书操作。

1.2.3 穿孔素/颗粒酶检测: 取抗凝静脉血 100 μ l 加入溶血素, 室温下放置 10 min, 离心 5 min, 弃上清液, 加入 2 ml 磷酸盐缓冲液(PBS)洗 1 次; 加入 4 $^{\circ}$ C 固定液 500 μ l, 室温放置 10 min; 离心 5 min, 弃上清液, 用 PBS 洗 1 次; 加入破膜剂 1.5 ml, 室温放置 10 min, 离心 5 min, 弃上清液, 加入 2 ml PBS 洗 1 次; 加入穿孔素抗体-异硫氰酸荧光素(FITC)和颗粒酶抗体-FITC(法国 Immnotech 公司产品, 购自山东晶美公司), 混匀, 室温避光反应 30 min; 加入 PBS 2 ml, 离心 5 min, 弃上清液; 再加入 PBS 500 μ l, 采用流式细胞仪分析。

1.3 统计学处理: 外周血淋巴细胞穿孔素/颗粒酶的表达阳性率取百分数, 血清 HBV-DNA 载量取对数值, 数据均以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用 *t* 检验或相关性分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组外周血淋巴细胞穿孔素/颗粒酶表达流式细胞仪检测结果(图 1~2; 表 1): 在下列每一曲线图中, 左侧峰为阴性淋巴细胞的百分数峰值, 右侧峰为阳性淋巴细胞的百分数峰值。健康对照组穿孔素表达阴性峰值为 88.2%, 阳性峰值为 12.8%, 颗粒酶表达阴性峰值为 80.1%, 阳性峰值为 19.9%; 重型肝炎组穿孔素表达阴性峰值为 59.3%, 阳性峰值为 41.7%, 颗粒酶表达阴性峰值为 56.5%, 阳性峰值为 43.5%。在淋巴细胞分布区圈定被检淋巴细胞, 用流式细胞仪自动分检阳性细胞, 计算阳性细胞率。表 1 结果显示, 重型肝炎组穿孔素/颗粒酶表达阳性细胞率较健康对照组均显著升高(P 均 < 0.01)。

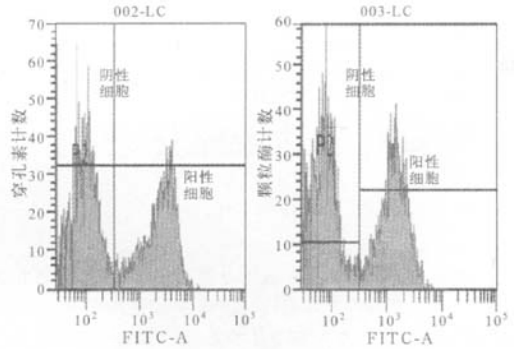


图 1 健康对照者外周血淋巴细胞中穿孔素/颗粒酶的表达

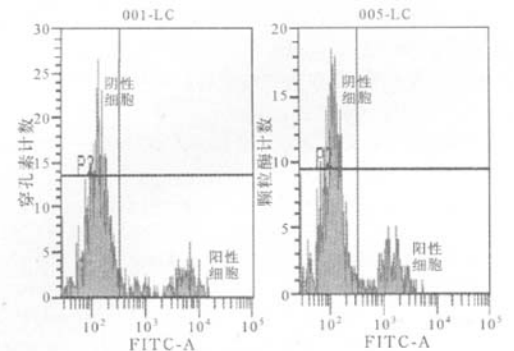


图 2 重型乙肝患者外周血淋巴细胞中穿孔素/颗粒酶的表达

2.2 重型乙肝患者外周血淋巴细胞穿孔素/颗粒酶表达强度与血清 HBV-DNA 载量的关系(表 2): 重型肝炎组患者血清 HBV-DNA 载量平均为 $\lg(4.35 \pm 2.43)$ 。HBV-DNA 载量越高, 患者外周血淋巴细胞穿孔素/颗粒酶的表达强度越弱, 二者呈明显负相关($r_{\text{穿孔素}} = -0.92, r_{\text{颗粒酶}} = -0.96, P$ 均 < 0.01)。

表 2 不同血清 HBV-DNA 载量重型肝炎患者的穿孔素/颗粒酶表达强度($\bar{x} \pm s$)

HBV-DNA 载量(lg)	例数	穿孔素阳性细胞率(%)	颗粒酶阳性细胞率(%)
<3.0	6	47.45 \pm 20.36	45.23 \pm 19.14
3.0~4.0	9	42.57 \pm 19.25	40.36 \pm 21.34
5.0~6.0	15	37.48 \pm 20.12	32.69 \pm 19.47
7.0~8.0	6	29.25 \pm 10.87	33.26 \pm 12.36
>9.0	2	32.89 \pm 11.65	27.98 \pm 9.47

表 1 重型乙肝患者及健康对照者外周血淋巴细胞中穿孔素/颗粒酶的表达($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	穿孔素		颗粒酶			
		被检细胞数(个)	阳性细胞数(个)	阳性细胞率(%)	被检细胞数(个)	阳性细胞数(个)	阳性细胞率(%)
重型肝炎组	38	2 796 \pm 1 845	1 425 \pm 975*	43.42 \pm 19.28*	2 548 \pm 1 725	1 285 \pm 629*	40.35 \pm 12.26*
健康对照组	20	2 674 \pm 1 706	395 \pm 159	19.65 \pm 9.27	2 804 \pm 1 694	452 \pm 189	22.28 \pm 9.35

注: 与健康对照组比较, * $P < 0.01$

3 讨论

穿孔素/颗粒酶主要由 CTL 和 NK 细胞表达,是 CTL 和 NK 细胞的重要效应物质,与细胞凋亡有关^[3-4]。在淋巴细胞介导的细胞毒作用中,穿孔素以及其他介质从细胞内释放出来后,在 Ca^{2+} 存在和中性 pH 值条件下,以单聚体的形式与靶细胞膜结合,并嵌入膜内,形成一个中空的多聚体,导致膜的完整性受损,形成 5~20 nm 大小的膜孔,发生膜电位改变、膜去极化,水分子、离子以及其他的小分子随之进入靶细胞内,使细胞内渗透压改变而造成细胞死亡^[3,5]。颗粒酶在穿孔素协同作用下通过颗粒胞吐作用(granule exocytosis)释放进入 NK 细胞和靶细胞之间形成的免疫突触中,然后进入靶细胞的细胞质,并在细胞核聚集,诱导一种叫天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶(caspases)的非依赖性细胞死亡。颗粒酶的外泌可使机体的免疫系统迅速清除细胞内的病原体和有病变的细胞,在胞质和胞核中作用于底物,破坏 DNA 和细胞核的完整性^[6-7]。

本研究中采用流式细胞技术检测重型乙肝患者外周血淋巴细胞穿孔素/颗粒酶的表达情况,结果显示重型乙肝患者外周血淋巴细胞穿孔素和颗粒酶的表达均同步显著升高,同时发现患者外周血淋巴细胞穿孔素/颗粒酶表达强度与血清 HBV-DNA 载量呈明显负相关,穿孔素/颗粒酶表达强度越高,血清 HBV-DNA 载量越低。CTL 是介导慢性乙肝患者免疫损伤的基础,有文献报告,暴发性肝炎患者外周血人白细胞抗原-DR⁺CD8⁺淋巴细胞增加,同时伴有 HLA-DR(hi)淋巴细胞出现。暴发性肝炎患者 CD8⁺淋巴细胞的表型大多数是外周血效应 T 细胞的表型,而 CD45RA⁻CCR7⁻表型的淋巴细胞主要局限在患者的肝脏内^[7]。分析本研究中重型乙肝患者外周血淋巴细胞穿孔素/颗粒酶表达增强的可能原因是 HBV 在肝细胞内复制、表达所产生的抗原以

源性抗原途径呈递,激活了特异的 CD8⁺ CTL。活化的 CTL 大量表达和释放包括穿孔素/颗粒酶等在内的多种细胞毒素,以便对 HBV-DNA 产生清除作用。所以,外周血淋巴细胞穿孔素/颗粒酶的表达在一定程度上是 CTL 功能状态的体现,穿孔素/颗粒酶表达越强,血清 HBV-DNA 载量越低,反映机体细胞免疫对病毒的清除能力增强。但是穿孔素/颗粒酶过度表达,在有效清除 HBV-DNA 的同时也可造成严重的肝细胞损伤,形成临床上所见的各种重型肝炎。所以,穿孔素/颗粒酶的过度表达是造成重型肝炎肝细胞损伤的重要因素,如何避免这种损伤,同时又能积极发挥细胞免疫的作用是值得进一步研究的课题。

参考文献

- [1] Tang TJ, Kwekkeboom J, Laman JD, et al. The role of intrahepatic immune effector cells in inflammatory liver injury and viral control during chronic hepatitis B infection. *J Viral Hepat*, 2003, 10(3): 159-167.
- [2] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会, 肝病学会. 病毒性肝炎防治方案. *中华传染病杂志*, 2001, 19(1): 56-62.
- [3] Li M, Zhang Y. The effect of anti-human CD134 monoclonal antibody on phytohemagglutinin-induced mRNA expression of perforin in peripheral blood mononuclear cells. *Cell Mol Immunol*, 2005, 2(6): 467-471.
- [4] 温韬, 任峰, 刘焱, 等. 急性肝损伤大鼠肝脏 Fas 和 FasL 的表达及其意义. *中国危重病急救医学*, 2006, 18(7): 417-420.
- [5] Laforge M, Bidere N, Carmona S, et al. Apoptotic death concurrent with CD3 stimulation in primary human CD8⁺ T lymphocytes: a role for endogenous granzyme B. *J Immunol*, 2006, 176(7): 3966-3977.
- [6] Qin HY, Mukherjee R, Lee-Chan E, et al. A novel mechanism of regulatory T cell-mediated down-regulation of autoimmunity. *Int Immunol*, 2006, 18(7): 1001-1015.
- [7] Kondo Y, Kobayashi K, Asabe S. Vigorous response of cytotoxic T lymphocytes associated with systemic activation of CD8 T lymphocytes in fulminant hepatitis B. *Liver Int*, 2004, 24(6): 561-567.

(收稿日期: 2008-04-29 修回日期: 2008-10-25)

(本文编辑: 李银平)

• 科研新闻速递 •

呼吸性酸中毒通过非中性粒细胞依赖性机制减轻严重急性细菌性肺炎诱导的肺损伤

有研究报道,人工诱导的呼吸性酸中毒对非脓毒性肺损伤具有保护作用。最近爱尔兰科学家研究了严重脓毒性肺损伤时呼吸性酸中毒的作用,观察其是否由中性粒细胞介导。他们向肺内滴入大肠杆菌诱导严重急性肺损伤(ALI),通过增加 CO_2 造成呼吸性酸中毒,研究其保护作用和中性粒细胞在此效应中的作用。实验 1: 气管内滴入内毒素 [(0.5~3.0) × 10⁹ cfu] 产生严重 ALI 后,分别用正常 CO_2 [用力吸入 CO_2 量 (Fi CO_2) 0] 和高 CO_2 量 (Fi CO_2 0.05) 通气 6 h。实验 2: 分别用中性粒细胞缺失和非中性粒细胞缺失大鼠进行实验 1 的内容,分为正常 CO_2 组、正常 CO_2 且中性粒细胞排除组、呼吸性酸中毒且中性粒细胞排除组。结果发现,呼吸性酸中毒能减轻肺炎引起的 ALI,降低气道压力,改善肺顺应性,提高动脉氧分压,但对组织学损伤无明显改善。进一步用中性粒细胞缺失大鼠研究发现,在无中性粒细胞存在的情况下,呼吸性酸中毒仍能抑制肺炎诱导的 ALI,减轻肺损伤引起的生理学和组织学指标变化。因此研究者认为,呼吸性酸中毒能通过非中性粒细胞依赖性机制减轻气管内滴入大肠杆菌诱导的肺损伤。

李响,周国勇,编译自《Crit Care Med》,2008-10-17(电子版);胡森,审校