

# 探讨 $CD_4^+CD_{25}^+Foxp_3^+$ 调节性 T 淋巴细胞 在 HCV 早期感染的作用\*

黄启强, 黄丽庆, 周青, 肖寒, 黄伙荣, 胡淑燕

(遵义医学院第五附属(珠海)医院, 广东珠海 519100)

**摘要:**目的 研究 HCV 抗原阳性抗体阴性的早期感染者体内的  $CD_4^+CD_{25}^+Foxp_3^+$  调节性 T 淋巴细胞水平及其与疾病进展相关性, 观察  $CD_4^+CD_{25}^+Foxp_3^+$  调节性 T 淋巴细胞在 HCV 早期感染的作用。方法 20 例 HCV 抗原阳性抗体阴性的早期感染的病例, 22 例抗原阴性与抗体阳性 HCV 感染病例及 25 例抗原阳性与抗体阳性慢性 HCV 感染病例和 21 例健康人作对照组。应用流式细胞技术检测比较各组外周血中的有核细胞中的  $CD_4^+CD_{25}^+Foxp_3^+$  调节性 T 淋巴细胞; 并同时检测丙氨酸氨基转移酶(ALT)和天门冬氨酸氨基转移酶(AST), 分析与其的相关性。结果 HCV 感染病例的外周血中  $CD_4^+CD_{25}^+Foxp_3^+$  调节性 T 淋巴细胞表达率(百分率)较健康对照组高( $t$  值分别为 2.231, 3.764;  $P$  均  $<0.05$ ); 抗原阳性抗体阴性组与抗原阳性抗体阳性组比较差异有统计学意义( $t=2.180, P=0.035$ ); 抗原阴性抗体阳性组与健康对照组比较差异无统计学意义( $t=0.437, P=0.665$ ); 抗原阳性抗体阴性组  $CD_4^+CD_{25}^+Foxp_3^+$  调节性 T 淋巴细胞表达率与肝脏炎症指标的 ALT 和 AST 有相关性( $r_{ALT}=0.571, r_{AST}=0.521, P<0.05$ )。结论  $CD_4^+CD_{25}^+Foxp_3^+$  调节性 T 淋巴细胞水平及其与疾病进展有重要相关性, 可能是早期感染 HCV 并加速其慢性化的其中重要影响因素之一。

**关键词** 丙型肝炎; 早期感染; 调节性 T 淋巴细胞

中图分类号: R512.63; R392.11 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2015)06-064-03

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2015.06.018

## Study or Role of the $CD_4^+CD_{25}^+Foxp_3^+$ Regulatory T Lymphocytes in the Early Infection of HCV

HUANG Qi-qiang, HUANG Li-qing, ZHOU Qing, XIAO Han, HUANG Huo-rong, HU Shu-yan

(the Fifth Affiliated (Zhuhai) Hospital of Zunyi Medical University,

Guangdong Zhuhai 519100, China)

**Abstract: Objective** To study the correlation about the disease progression and the level of  $CD_4^+CD_{25}^+Foxp_3^+$  regulatory T lymphocytes in the infections with HCV positive antigen negative antibody, and to observe the function of  $CD_4^+CD_{25}^+Foxp_3^+$  regulatory T lymphocytes in the early HCV infected patients. **Methods** There were 20 cases of early infections with HCV core positive antigen negative antibody, 22 cases of infections with core negative antigen and positive antibody HCV, 25 cases with chronic HCV infection positive antigen and positive antibody and 21 cases of healthy people as control group. Used flow cytometry to measure and compare the peripheral blood nucleated cells  $CD_4^+CD_{25}^+Foxp_3^+$  regulatory T lymphocytes, simultaneous detected of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST), and analysed its correlation. **Results** The expression rate (percentage) of  $CD_4^+CD_{25}^+Foxp_3^+$  regulatory T lymphocytes in HCV infection peripheral blood was higher than healthy control group ( $t$  values were 2.231, 3.764; all  $P<0.05$ ). There was statistically significance to compared the difference in antigen-positive antibody-negative group with antigen-positive antibody-positive group ( $t=2.180, P=0.035$ ). There was no statistically significance to compared the difference in antigen-negative with antibody-positive group the healthy control group ( $t=0.437, P=0.665$ ). There were correlations in the expression rate of  $CD_4^+CD_{25}^+Foxp_3^+$  regulatory T Lymphocytes of antigen-positive antibody-negative group ALT and AST of liver inflammation indexes ( $r_{ALT}=0.571, r_{AST}=0.521, P<0.05$ ). **Conclusion** There are important relevance in the level of  $CD_4^+CD_{25}^+Foxp_3^+$  regulatory T lymphocytes and the disease progression. It may be one of the important influencing factors of early infected with HCV and accelerating its slowing down.

**Keywords:** HCV; early infection; regulatory T lymphocytes

丙型肝炎是严重危害人类健康的疾病之一, 具有慢性化程度高(75%~80%), 肝损害严重, 与肝癌关系密切<sup>[1]</sup>等特点, 丙型肝炎病毒(hepatitis C virus HCV)感染者机体免疫功能紊乱, 细胞免疫

应答在丙型肝炎的发病机制中起重要的作用。 $CD_4^+CD_{25}^+$ 调节性 T 淋巴细胞(Regulatory T cell, Treg)可以控制机体损伤的免疫反应, 对于维持免疫耐受及平衡具有重要作用<sup>[2]</sup>。具有抑制活

\* 基金项目: 广东省医学科研基金立项课题(A2013647)。

作者简介: 黄启强(1973-), 男, 本科学历, 副主任检验师, 研究方向: 临床免疫微生物学检验学, Tel: 13570620982, E-mail: cgdzh@qq.com。

性且有标志性分子 CD<sub>4</sub><sup>+</sup>CD<sub>25</sub><sup>+</sup>Foxp<sub>3</sub><sup>+</sup> 调节性 T 淋巴细胞在细胞免疫中起核心作用,对于维持免疫耐受及免疫平衡具有重要作用,病毒在体内不能彻底清除,组织损伤迁延不愈等都与机体的免疫耐受息息相关,因此检测 CD<sub>4</sub><sup>+</sup>CD<sub>25</sub><sup>+</sup>Foxp<sub>3</sub><sup>+</sup> 调节性 T 淋巴细胞的水平可以较好地反映患者的免疫功能状态<sup>[2]</sup>。本研究以比较感染 HCV 后不同阶段的外周血 CD<sub>4</sub><sup>+</sup>CD<sub>25</sub><sup>+</sup>Foxp<sub>3</sub><sup>+</sup> 调节性 T 淋巴细胞,并分析与有肝脏炎症指标的丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)和反映肝脏损伤程度的天门冬氨酸氨基转移酶(aspartic acid aminotransferase, AST)的相关性,探讨 CD<sub>4</sub><sup>+</sup>CD<sub>25</sub><sup>+</sup>Foxp<sub>3</sub><sup>+</sup> 调节性 T 淋巴细胞水平及其与疾病进展的相关性。

1 材料与方法

1.1 研究对象 收集 20 例 HCV 抗原阳性抗体阴性的早期感染的病例,22 例抗原阴性与抗体阳性 HCV 曾经感染病例及 25 例抗原阴性与抗体阳性慢性 HCV 感染病例和 21 例健康人作对照组;各组对象的年龄、性别都具有可比性。

1.2 酶联免疫吸附试验(ELISA)方法筛选 HCV 抗原和抗体 采用双抗体(抗原)夹心酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)法。HCV 抗原试剂由湖南景达生物工程有限公司生产,HCV 抗体试剂由珠海丽珠生物工程有限公司生产。

1.3 测定肝脏炎症指标的 ALT 和 AST 用罗氏 P800 全自动生化仪及配套试剂,用离心机分离血清,上机后仪器自动分析获得 ALT,AST 的结果。

1.4 流式细胞技术检测 CD<sub>4</sub><sup>+</sup>CD<sub>25</sub><sup>+</sup>Foxp<sub>3</sub><sup>+</sup> 调节性 T 淋巴细胞百分率 用 EDTA 抗凝管(美国 BD

公司)采集全血,密度梯度离心机分离 HCV 感染者及健康对照外周血中单个核细胞(PBMC)。Foxp<sub>3</sub><sup>+</sup> 细胞的检测按试剂盒说明应用异硫氰酸荧光素(FITC)抗人 Foxp<sub>3</sub> 染色试剂盒(美国 eBioscience 公司)进行细胞染色,用 BD 公司的 FACS-Calibur 流式细胞仪检测各组中 CD<sub>4</sub><sup>+</sup>CD<sub>25</sub><sup>+</sup>Foxp<sub>3</sub><sup>+</sup> 调节 T 淋巴细胞的百分数。

1.5 统计学分析 采用 SPSS18.0 统计软件进行分析。计量资料用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组资料比较采用 *t* 检验,两个变量间的相互关系应用直线相关分析。*P* ≤ 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HCV 感染病例的外周血中 CD<sub>4</sub><sup>+</sup>CD<sub>25</sub><sup>+</sup>Foxp<sub>3</sub><sup>+</sup> 调节性 T 淋巴细胞表达率(百分率)

HCV 感染病例的外周血中 CD<sub>4</sub><sup>+</sup>CD<sub>25</sub><sup>+</sup>Foxp<sub>3</sub><sup>+</sup> 调节性 T 淋巴细胞表达率(百分率)较健康对照组高,差异有统计学意义(*t* 值分别为 3.764,2.231;*P* 值分别为 0.001,0.031);抗原阳性抗体阴性组与抗原阳性抗体阳性组比较差异有统计学意义(*t* = 2.180, *P* = 0.035);抗原阴性抗体阳性组与健康对照组比较,差异无统计学意义(*t* = 0.437, *P* = 0.665),见表 1。

2.2 HCV 早期 HCV 感染 CD<sub>4</sub><sup>+</sup>CD<sub>25</sub><sup>+</sup>Foxp<sub>3</sub><sup>+</sup> 调节性 T 淋巴细胞表达率与 ALT,AST 有相关性

抗原阳性抗体阴性组(*r*<sub>ALT</sub> = 0.571, *r*<sub>AST</sub> = 0.521; *P* < 0.05);ALT 和 AST 的抗原阳性抗体阴性组和抗原阳性抗体阳性组分别与健康对照组比较均增高,差异有统计学意义(*t*<sub>ALT</sub> 值分别为 4.586, 3.416; *t*<sub>AST</sub> 值分别为 4.791, 3.608; *P* 均 < 0.05)。

3 讨论 HCV 感染后一般检测以肝脏炎症指标

表 1 四组 CD<sub>4</sub><sup>+</sup>CD<sub>25</sub><sup>+</sup>Foxp<sub>3</sub><sup>+</sup> 调节性 T 淋巴细胞抗表达率,ALT 和 AST 结果

组别	<i>n</i>	年龄(岁)	性别(男/女)	ALT(U/L)	AST(U/L)	淋巴计数百分数(%)*
抗原阳性抗体阴性	20	31±9	13/7	89.2±61.6	50.7±22.5	4.60±2.09
抗原阳性抗体阳性	25	29±10	18/7	56.1±38.3	40.1±16.9	3.52±1.50
抗原阴性抗体阳性	22	30±10	12/10	26.4±9.6	26.8±9.5	2.78±1.31
健康对照组	21	29±9	16/5	25.8±9.9	25.4±8.7	2.62±1.17

注:\* 与对照组比较 *t* 值分别为 3.764,2.231,0.437;*P* 值分别为 0.001,0.031,0.667。

的丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)和反映肝脏损伤程度的天门冬氨酸氨基转移酶(aspartic acid aminotransferase, AST)。目前尚无特效药及疫苗对丙型肝炎进行预防或治疗。HCV 感染的发生、发展和转归又与宿主的免疫状态密切相关,细胞免疫应答在丙型肝炎的发病机制中起重要作用,由于 CD<sub>4</sub><sup>+</sup>CD<sub>25</sub><sup>+</sup>Foxp<sub>3</sub><sup>+</sup> 调节性 T

淋巴细胞可以控制机体损伤的免疫反应<sup>[3]</sup>。近年来,CD<sub>4</sub><sup>+</sup>CD<sub>25</sub><sup>+</sup>Foxp<sub>3</sub><sup>+</sup> 调节性 T 淋巴细胞在 HCV 感染发病机制中的作用越来越受到重视,一方面 CD<sub>4</sub><sup>+</sup>CD<sub>25</sub><sup>+</sup>Foxp<sub>3</sub><sup>+</sup> 调节性 T 淋巴细胞抑制机体的过度免疫损伤,另一方面 CD<sub>4</sub><sup>+</sup>CD<sub>25</sub><sup>+</sup>Foxp<sub>3</sub><sup>+</sup> 调节性 T 淋巴细胞也可能有利于 HCV 持续的感染。HCV 持续感染时 CD<sub>4</sub><sup>+</sup>CD<sub>25</sub><sup>+</sup>Foxp<sub>3</sub><sup>+</sup>

调节性 T 淋巴细胞的增强与 HCV-RNA 含量呈正相关性<sup>[4]</sup>;调节性 T 淋巴细胞(regulatory T cell, Treg)是维持机体平衡的重要因素,与 HCV 感染早期,病毒进展情况的关系备受关注,但研究的结果并不一致。HCV 感染早期,病毒与宿主的相互作用已决定了疾病的预后,这一时期的免疫应答对于了解其在 HCV 感染疾病进程发挥的作用有重要意义。我们的研究结果显示,HCV 感染早期 CD<sub>4</sub><sup>+</sup>CD<sub>25</sub><sup>+</sup>Foxp<sub>3</sub><sup>+</sup>调节性 T 淋巴细胞较其它组高,慢性感染组较健康对照组高,提示 CD<sub>4</sub><sup>+</sup>CD<sub>25</sub><sup>+</sup>Foxp<sub>3</sub><sup>+</sup>调节性 T 淋巴细胞是影响丙型肝炎发展的一个因素,是由于 Treg 可以抑制多种效应功能<sup>[5]</sup>,因此我们推测感染 HCV 后 CD<sub>4</sub><sup>+</sup>CD<sub>25</sub><sup>+</sup>Foxp<sub>3</sub><sup>+</sup>调节性 T 淋巴细胞百分率升高,使 CD<sub>4</sub><sup>+</sup>细胞群中抑制性细胞比例升高,对效应细胞有抑制作用。

有研究认为 HCV 感染后的病毒复制对肝功能有影响,但对 HCV-RNA 含量的高低与 ALT, AST 的水平无关<sup>[6]</sup>。HCV 感染后的肝脏损伤对免疫应答的情况又如何,研究以 HCV 感染早期(HCV 抗原阳性抗体阴性组)CD<sub>4</sub><sup>+</sup>CD<sub>25</sub><sup>+</sup>Foxp<sub>3</sub><sup>+</sup>调节性 T 淋巴细胞表达率与肝功指标的相关性,分析 HCV 感染早期的免疫调节作用,了解机体感染 HCV 后对肝脏损伤情况及肝炎慢性化进程,探讨其在疾病进展中发挥的作用。ALT 是反映肝脏组织损伤的最敏感的指标之一,ALT 存在于肝细胞的胞质中,在肝细胞损伤时通过细胞膜释放入血中,造成血清 ALT 升高。AST 在慢性肝炎中由于肝细胞的坏死和肝脏硬化中肝细胞的线粒体中释放大量的 AST-m,在胞浆中释放出 AST-s,致使 AST 明显升高,因此 AST 是肝脏损伤程度的指标。在 CD<sub>4</sub><sup>+</sup>CD<sub>25</sub><sup>+</sup>Foxp<sub>3</sub><sup>+</sup>调节性 T 淋巴细胞百分率较高的抗原阳性抗体阴性组的 ALT 和 AST 相对较高(抗原阳性抗体阳性组 CD<sub>4</sub><sup>+</sup>CD<sub>25</sub><sup>+</sup>Foxp<sub>3</sub><sup>+</sup>调节性 T 淋巴细胞表达率与 ALT, AST 有相关性  $r_{ALT}=0.469$ ,  $r_{AST}=0.521$ ,  $P<0.05$ ),肝脏的损伤与 CD<sub>4</sub><sup>+</sup>CD<sub>25</sub><sup>+</sup>Foxp<sub>3</sub><sup>+</sup>调节性 T 淋巴细胞有一定的相关性,肝脏的损伤很大可能是 CD<sub>4</sub><sup>+</sup>CD<sub>25</sub><sup>+</sup>Foxp<sub>3</sub><sup>+</sup>调节性 T 淋巴细胞高度表达,对效应细胞有抑制作用,抑制病毒有效应答,病毒对脏器的损伤得以持续。故检测 CD<sub>4</sub><sup>+</sup>CD<sub>25</sub><sup>+</sup>Foxp<sub>3</sub><sup>+</sup>调节性 T 淋巴细胞了解肝脏的损伤有间接的临床意义,这一观点与 Bolacchi 等<sup>[8]</sup>的研究相同。在 HCV 感染的早期,病毒与宿主的相互作用决定疾病的预后,这一时期免疫应答的研究对于了解其在 HCV 感染进程中发挥的作用有重要意义,HCV 早期感染者外周血中 CD<sub>4</sub><sup>+</sup>CD<sub>25</sub><sup>+</sup>Foxp<sub>3</sub><sup>+</sup>调节性 T

淋巴细胞数量及其百分率与 ALT,AST 肝功能指标结合分析,CD<sub>4</sub><sup>+</sup>CD<sub>25</sub><sup>+</sup>Foxp<sub>3</sub><sup>+</sup>调节性 T 淋巴细胞在 HCV 早期感染中起免疫调节作用,HCV 感染后肝脏损伤不是病毒直接损伤,可能是患者的细胞免疫功能与其发生、发展有密切相关性,患者的细胞免疫功能决定了疾病预后及 HCV 慢性化的进程。CD<sub>4</sub><sup>+</sup>CD<sub>25</sub><sup>+</sup>Foxp<sub>3</sub><sup>+</sup>调节性 T 淋巴细胞通过抑制细胞免疫功能,从免疫耐受方面分析其肝脏损伤程度及其慢性化的原因,为临床有效防治丙型肝炎提出新思路 and 线索提供实验室数据,有助于评估 HCV 感染后的转归还是慢性化发展提供依据,为临床有效治疗和预防丙型肝炎病毒感染提供新的线索和方法。

#### 参考文献:

- [1] Moriishi K, Matsuura Y. Pathogenesis of hepatitis C virus[J]. *Uirusu*, 2007, 57(2):141-149.
- [2] Sakaguchi S, Wing K, Yamaguchi T. Dynamics of peripheral tolerance and immune regulation mediated by Treg[J]. *Eur J Immunol*, 2009, 39(9):2331-2336.
- [3] Elpek KG, Yolcu ES, Franke DD, et al. Ex vivo expansion of CD<sub>4</sub><sup>+</sup>CD<sub>25</sub><sup>+</sup>Foxp<sub>3</sub><sup>+</sup> T regulatory cells based on synergy between IL-2 and 4-1BB signaling[J]. *J Immunol*, 2007, 179(11):7295-7304.
- [4] 彭明喜, 张 哲, 许德义, 等. HCV 感染者外周血 CD<sub>4</sub><sup>+</sup>CD<sub>25</sub><sup>+</sup>Foxp<sub>3</sub><sup>+</sup>调节性 T 细胞的检测及意义[J]. *浙江检验医学*, 2009, 7(2):38-40.  
Peng MX, Zhang Z, Xu DY, et al. Relationship between CD<sub>4</sub><sup>+</sup>CD<sub>25</sub><sup>+</sup>Foxp<sub>3</sub><sup>+</sup> regulatory T cells hepatitis C virus infection in peripheral blood mononuclear cells[J]. *Zhejiang Journal of Laboratory Medicine*, 2009, 7(2):38-40.
- [5] Fazekas de St Groth B, Landay AL. Regulatory T cells in HIV infection: pathogenic or protective participants in the immune response? [J]. *AIDS*, 2008, 22(6):671-683.
- [6] 陈继梅, 许叶红, 丁雪芳. 慢性丙型肝炎感染者多项指标动态监测结果分析[J]. *中华疾病控制杂志*, 2013, 17(6):548-550.  
Chen JM, Xu YH, Ding XF, et al. Comprehensive analysis on multiple experimental detection indexes for HCV chronic Hepatitis C[J]. *Chinese Journal of Disease Control Prevention*, 2013, 17(6):548-550.
- [7] Bolacchi F, Sinistro A, Ciaprini C, et al. Increased hepatitis C virus(HCV)-specific CD<sub>4</sub><sup>+</sup>CD<sub>25</sub><sup>+</sup> regulatory T lymphocytes and reduced HCV-specific CD<sub>4</sub><sup>+</sup>T cell response in HCV-infected patients with normal versus abnormal alanine aminotransferase levels[J]. *Clin Exp Immunol*, 2006, 144(2):188-196.