

肠源性内毒素血症对慢性乙型肝炎患者细胞免疫功能影响的研究

王坤铎 谢君

【摘要】 目的 探讨慢性乙型肝炎患者肠源性内毒素与细胞免疫功能的关系,以寻找控制慢性乙型肝炎进展的有效途径。方法 选取慢性乙型肝炎患者106例,健康对照组45例,检测血清内毒素、IL-2、TNF- α 、CD4⁺、CD8⁺细胞因子水平,运用统计学方法分析。结果 慢性乙型肝炎组 ET、TNF- α 水平明显升高,IL-2 水平明显降低,CD4⁺ 亚群明显降低,CD8⁺ 亚群明显升高,CD4⁺/CD8⁺ 比值明显降低($P < 0.01$)。结论 慢性乙型肝炎患者血清内毒素水平明显升高,同时细胞免疫功能低下且紊乱。

【关键词】 慢性乙型肝炎;肠源性内毒素;细胞免疫功能

Research of the influence on the intestinal endotoxemia to cellular immune function of the chronic hepatitis B patients WANG Kun-duo, XIE Jun. Department of Infectious Diseases, the Central Hospital of Xuchang, Xuchang 461000, China
Corresponding author: WANG Kun-duo, Email: longw001@126.com

【Abstract】 Objective To study the relationship between cellular immune function and intestinal endotoxin (IET) in chronic hepatitis B (CHB) patients and search an efficient therapy for controlling the development of CHB. **Methods** One hundred and six CHB cases and 45 controls were chosen to detect the levels of serum endotoxin, IL-2, TNF- α , CD4⁺ and CD8⁺, statistical method was used to analyze the results. **Results** In CHB patients, levels of ET, TNF- α and the percentages of CD4⁺ increased significantly, while levels of IL-2, the percentages of CD4⁺ and ratios of CD4⁺/CD8⁺ decreased markedly compared with normal control ($P < 0.01$). **Conclusions** In CHB patients, levels of ET increased significantly, while the cellular immune function decreased and disordered markedly compared with normal controls.

【Key words】 Chronic hepatitis B; Intestinal endotoxin; Cellular immune function

我国是世界上病毒性肝炎的高发地区,乙型肝炎病毒携带者多达1.3亿,每年乙型肝炎患者数多达1300多万。干扰素、核苷(酸)类似物等抗病毒药物在临

作者单位:461000 许昌市,河南省许昌市中心医院感染科
通讯作者:王坤铎 Email: longw001@126.com

床上已得到广泛应用,但部分慢性乙型肝炎仍进展为肝硬化、慢性重型肝炎。肝移植、人工肝治疗可显著降低肝硬化、慢性重型肝炎的病死率,但由于经济、技术、肝源等诸多因素的限制难以普及,慢性肝病发病机制及治疗方法的研究与探讨仍是摆在我们广大医务人员面前的重要课题。为了进一步探索肝病的发病机制,我们在借鉴有关专家经验的基础上,从2005年7月开始收集了大量的临床资料,利用先进的检测手段,经统计学分析初步证明了慢性乙型肝炎时高水平的内毒素血症与细胞免疫功能变化的相关性,为肝病有效治疗手段的建立提出了新的理论依据,现总结报告如下。

资料和方法

一、临床资料

本研究在选择临床资料时,建立正常对照组和慢性乙型肝炎组两组。正常对照组来自正常体检的健康人群(在校学生、在职职工、离退休人员等),其乙型肝炎病毒标志物的检测均为阴性。慢性乙型肝炎组的病例来自本院的门诊和住院患者,临床诊断均符合2000年9月全国第10届病毒性肝炎会议修订的慢性乙型肝炎诊断标准,两组在性别和年龄上均无特殊规定。

二、实验材料

人外周血淋巴细胞分离液,购于上海生物试剂公司。藻蛋白(PE)标记的抗人CD4⁺、异硫氰酸荧光素(FITC)标记的CD8⁺单克隆抗体以及PE或FITC标记的小鼠IgG对照抗体均购自美国BD Pharmingen公司。其它试剂如:PBS、3%多聚甲醛淋巴细胞固定液由郑州大学医学院第二附属医院消化研究所提供。流式细胞仪FACscan为美国BD公司生产。

三、观察指标

正常对照组和慢性乙型肝炎组均检测血浆内毒素水平、T淋巴细胞的两个亚群CD4⁺和CD8⁺数目、白细胞介素-2(IL-2)和肿瘤坏死因子(TNF- α)。

四、方法

1. 血浆内毒素的检测:采用显色基质法鲎试验,试剂盒购自上海伊华科技公司。所用器材均作去热源处理。吸取样品0.1 ml与鲎试剂0.05 ml轻轻混匀,置于37℃水浴25 min。再加入鲎三肽0.05 ml,置于37℃水浴3 min,取出后加入亚硝酸钠溶液0.5 ml、氨基磺酸铵0.5 ml、萘乙二胺0.5 ml混匀,后于545 nm比色读数。按公式: $A = A_s - (A_b - A_{bb})$,求得吸光度A值,查对内毒素标准曲线求得内毒素含量。

2. IL-2和TNF- α 的检测:所有观察对象均于晨起空腹抽取静脉血3 ml离心分离出血清,使用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测IL-2和TNF- α 。试剂盒均由深圳晶美公司提供。

3. T淋巴细胞亚群CD4⁺和CD8⁺检测:(1)外周血淋巴细胞(PBMC)的分离:用聚蔗糖-泛影葡胺分离液分离细胞。分离细胞时,将肝素抗凝全血叠加在分层液上,使两者形成一个清晰的界面。水平离心后形成不同层次的液体和细胞区

带,从而分离出 PBMC。红细胞和粒细胞密度大于分层液,沉积于分层液的底部。PBMC 的密度在 1.076 ~ 1.090 之间,稍低于分层液,故位于血浆层和分层液的界面中,呈白膜状,吸出单个核细胞,苔盼蓝染色计数;(2)流式细胞仪检测:将 PBMC 调整至 $1.0 \times 10^6/\text{ml}$,取 100 μl 细胞悬液,加入 5 μl PE 或 FITC 标记的单克隆抗体,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光染色 30 min, PBS 洗涤两次,去除未结合的抗体,多聚甲醛固定细胞,流式细胞仪检测 CD4 $^{+}$ 和 CD8 $^{+}$ 的含量。

结 果

一、正常对照组与慢性乙型肝炎组血浆内毒素(ET)和 IL-2 及 TNF- α 比较

与正常组相比,慢性乙型肝炎组 ET、TNF- α 水平明显升高,IL-2 水平明显降低,均有显著统计学差异($P < 0.05$)(表 1)。说明慢性乙型肝炎患者存在着高水平的内毒素血症和 TNF- α ,且细胞免疫功能低下。

表 1 正常对照组与慢性乙型肝炎组 ET 和 IL-2 及 TNF- α 水平的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	内毒素(EU/ml)	IL-2(ng/ml)	TNF- α (ng/ml)
正常对照组	0.04 \pm 0.02	56.80 \pm 10.20	26.40 \pm 4.80
慢性肝炎组	0.29 \pm 0.21	20.75 \pm 5.70	62.58 \pm 14.90

二、正常对照组与慢性乙型肝炎组 T 淋巴细胞亚群的比较

与正常对照组相比,慢性肝炎患者存在着明显的细胞免疫功能紊乱,表现在 CD4 $^{+}$ 亚群的明显降低,CD8 $^{+}$ 的亚群的明显升高,CD4 $^{+}$ /CD8 $^{+}$ 比值的明显降低,且两组比较均有显著统计学差异($P < 0.05$)(表 2)。

表 2 正常对照组与慢性乙型肝炎组 T 淋巴细胞亚群的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	CD4 $^{+}$ (%)	CD8 $^{+}$ (%)	CD4 $^{+}$ /CD8 $^{+}$
正常对照组	43.10 \pm 7.60	31.20 \pm 5.40	1.40 \pm 0.40
慢性肝炎组	34.35 \pm 6.40	35.15 \pm 5.50	0.96 \pm 0.35

三、相关性分析

内毒素(ET)与 IL-2($r = -0.844, P < 0.01$), ET 与 CD4 $^{+}$ ($r = -0.94, P < 0.01$), ET 与 CD4 $^{+}$ /CD8 $^{+}$ ($r = -0.989, P < 0.01$)分别呈显著负相关,ET 与 TNF- α ($r = 0.789, P < 0.01$), ET 与 CD8 $^{+}$ ($r = 0.575, P < 0.01$)均呈显著正相关。

讨 论

本研究发现,慢性乙型肝炎患者血浆内毒素水平明显升高,同时伴有细胞免疫功能低下且紊乱^[1]。正常情况下,由肠道细菌产生的内毒素进入肝脏后经肝脏库费氏细胞解毒而清除。慢性肝病时,肠道菌群紊乱和肠杆菌科细菌过度生长以及肠黏膜的瘀血,使肠道内毒素的产生和吸收增加;同时由于肝脏炎症损伤使清除解毒功能降低,故致血液中内毒素水平升高^[2]。内毒素不仅与肝损伤互为

因果,而且与机体细胞免疫功能障碍密切相关^[3]。内毒素在激活肝脏库费氏细胞时产生的大量氧自由基,及由其引起的脂质过氧化对机体细胞免疫功能有重要调控作用:其减弱淋巴细胞对有丝分裂原刺激的反应,引起抑制型淋巴细胞和辅助型淋巴细胞比例的改变,降低自然杀伤细胞的活性以及 IL-2 的含量,从而影响机体的细胞免疫功能^[4]。内毒素通过刺激单核巨噬细胞产生多种细胞因子,其中包括 TNF- α ,不仅能介导内毒素的多种生物学作用,而且通过肝脏其它炎症介质协同作用,从不同的环节对肝脏产生炎症反应与组织损伤^[5]。

在正常机体内,T淋巴细胞亚群保持适当的比例,并发挥相应作用,维持着机体正常的免疫功能。当T淋巴细胞亚群的数量和功能发生异常时,可导致机体免疫功能紊乱并产生一系列的病理生理变化。CD4⁺亚群的降低,说明辅助性T细胞明显下降,使免疫应答的正反馈作用减弱;CD8⁺值上升,说明抑制性T细胞相对增多,使免疫应答的负反馈作用增强,从而导致细胞免疫功能下降。IL-2是由Th1细胞分泌的细胞因子,是机体免疫应答的网络中心,在机体免疫应答与调节中起重要作用。IL-2不仅能促进免疫活性细胞的增生,激活NK细胞的活性,诱发细胞因子激活杀伤细胞(LAK)的杀伤作用,提高Th细胞的数量和功能来增强机体的免疫功能,并与其他细胞因子如TNF- α 形成动态免疫调节网络,维持正常的免疫调节功能。因此,IL-2水平在一定程度上反映了机体的细胞免疫功能状态,其分泌减少直接影响到T细胞的增殖及肝炎病毒的清除。由此可见,肠源性内毒素血症(IETM)通过刺激靶细胞释放细胞因子和炎性介质来影响肝炎患者的细胞免疫功能,决定着肝炎的发生与发展。因此,在肝病的治疗中,从源头上降低高水平的内毒素血症,可提高肝病患者的细胞免疫功能,必将有利于肝炎病毒的清除和损伤肝脏的修复。

肠源性内毒素血症对慢性乙型肝炎患者细胞免疫功能影响的研究结果,证明了慢性乙型肝炎患者高水平的内毒素血症与IL-2、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺呈显著的负相关;与CD8⁺、TNF- α 呈显著的正相关。提示了慢性肝病时高水平的内毒素血症与细胞免疫功能之间的相关性,为慢性乙型肝炎的临床治疗提出了新的理论依据。在保肝治疗的同时要注重降低患者血中的内毒素水平来调节机体的免疫功能,减轻肝脏的炎症损伤,延缓肝纤维化的进程。

参 考 文 献

- 1 赵龙凤,李红,王勤英,等.慢性肝炎患者内毒素血症与免疫功能的关系.中华传染病杂志,2003,21:275-276.
- 2 李兰娟,吴仲文,马伟杭,等.慢性重型肝炎患者肠道菌群的变化.中华传染病杂志,2001,19:345-347.
- 3 赵龙凤,李红,王勤英,等.慢性肝炎患者内毒素血症与免疫功能的关系.中华传染病杂志,2004,22:45-46.
- 4 Jung MC, Pape GR. Immunology of hepatitis B infection. Lancet Infect Dis, 2002, 2:43-50.
- 5 范志明.微生态调节剂治疗肝硬化对病人内毒素及肿瘤坏死因子的影响.中华实验和临床病毒学杂志,1994,8:361-363.

(收稿日期:2007-02-29)

(本文编辑:王丹静)

王坤铎,谢君.肠源性内毒素血症对慢性乙型肝炎患者细胞免疫功能影响的研究[J/CD].中华实验和临床感染病杂志:电子版,2008,2(2):48-51.