**分类号：R575.1 单位代码：10183**

**研究生学号：200906100301419** 密 **级：公开**



吉林大学

硕士学位论文

**（专业学位）**

FcγRs 在 HBV 感染不同阶段中各免疫细胞上表达比例的差异

Differential expressionof FcγRs on immune cells in different status of HBV infection

**作 者 姓 名 ：高 娜**

**类** 别 **：临床医学硕士领域（方向）：内科学**

**指 导 教 师 ：牛俊奇** **教授 培 养 单 位 ：白求恩第一医院**

**2016 年 5 月**

FcγRs 在 HBV 感染不同阶段中各免疫细胞上表达比例的差异

Differential expressionof FcγRs on immune cells in different status of HBV infection

作 者 姓 名 ：高 娜领域（方向）：内科学

指 导 教 师 ：牛俊奇 教授 类 别 ：临床医学硕士 答 辩 日 期 ：2016 年 6 月 6 日

未经本论文作者的书面授权，依法收存和保管本论文书面版本、电子版本的任何单位和个人，均不得对本论文的全部或部分内容进行任何形式的复制、修改、发行、出租、改编等有碍作者著作权的商业性使用（但纯学术性使用不在此限）。否则，应承担侵权的法律责任。

吉林大学博士（或硕士）学位论文原创性声明

本人郑重声明：所呈交学位论文，是本人在指导教师的指导下， 独立进行研究工作所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外， 本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品成果。 对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式 标明。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

学位论文作者签名：

日期： 年 月 日

《中国优秀博硕士学位论文全文数据库》投稿声明

研究生院：

本人同意《中国优秀博硕士学位论文全文数据库》出版章程的内容， 愿意将本人的学位论文委托研究生院向中国学术期刊（光盘版）电子杂 志社的《中国优秀博硕士学位论文全文数据库》投稿，希望《中国优秀 博硕士学位论文全文数据库》给予出版，并同意在《中国博硕士学位论 文评价数据库》和 CNKI 系列数据库中使用，同意按章程规定享受相关权益。

论文级别：■硕士 □博士

学科专业：临床医学硕士（内科学）

论文题目：FcγRs 在 HBV 感染不同阶段中各免疫细胞上表达比例的差异作者签名： 指导教师签名：

年 月 日

作者联系地址（邮编）：吉林大学第一医院肝胆胰内科（130021） 作者联系电话：18799158344

**中文摘要**

**FcγRs在HBV感染不同阶段中各免疫细胞上表达比例的差异**

**背景及目的：**

为了区别慢性乙型肝炎免疫活化期及慢性乙型肝炎免疫耐受期，本课题组前期使用 HBV 不同阶段感染者的外周血单核细胞（PBMC）进行全基因组表达谱芯片分析，发现 HBV 感染者各组间 FcγRs 表达有显著统计学差异。随后的 PCR 实验验证了基因芯片的结果。本文旨在从蛋白表达水平研究活化型 FcγR 与抑制型 FcγR 在慢性乙型肝炎免疫清除期和免疫耐受期之间的差异。

**方法：**

采用多色流式细胞仪对31例慢性乙型肝炎免疫活化期患者，16例慢性乙型肝炎免疫耐受期患者，7例乙肝感染成功清除患者，20例健康者进行检测，主要检测外周血中NK细胞表面FcγR III(CD16)、B细胞表面FcγRII（CD32）、单核细胞表面FcγRI(CD64)、FcγRII(CD32)、FcγRIII（CD16）的比例以及辅助T淋巴细胞、细胞毒T淋巴细胞的比例。采用BD流式液相多重蛋白定量技术检测研究对象血浆中IL-1β、IL-10、MIP-1β、IL-12p70、TNF、IL-6因子水平。非正态分布计量资料使用秩和检验（Mann Whitney test）分析任意两组间数据。相关性分析采用Spearman法。

**结果：**

**1、**慢性乙型肝炎免疫活化期组CD3-CD56+CD16+NK细胞比例明显低于慢性乙型肝炎免疫耐受期组（中位数6% vs 13.22%, *P*=0.001）和健康对照（中位数6% vs 17.62%, *P*＜0.001）。乙肝感染成功清除组患者CD3-CD56+CD16+NK细胞亚群较健康对照组明显减少（中位数5.66% vs 17.62%, *P*=0.002）。

**2、**慢性乙型肝炎免疫活化期组患者CD3-CD19+CD32+B细胞较慢性乙型肝炎免疫耐受期组（中位数11.68% vs 7.28%, *P*=0.008）及健康对照组（中位数11.68% vs 7.28%, *P*=0.008）升高。免疫活化期组CD3-CD5+CD32+B细胞较健康对照组

I

（中位数3.37% vs 1.46%, *P*=0.002）升高。免疫活化期组CD3-CD19+CD5-CD32+B细胞比例较免疫耐受期组升高（中位数7.77% vs 5.22%, *P*=0.004）。免疫活化期组CD3-CD19+CD5+CD32+B细胞比例较健康对照组升高（中位数3.26% vs

1.34 %，*P*=0.006）。CD3-CD19+ B细胞、CD3-CD5+ B细胞、CD3-CD19+CD5-B

细胞、CD3-CD19+CD5+B表面的CD32表达百分比组间比较无统计学差异（*P*＞

0.0083)。

**3、**慢性乙型肝炎免疫活化期组CD14highCD16+单核细胞较免疫耐受期组（中位数8.04% vs 4.84%, *P*＜0.001）和健康对照组（中位数8.04% vs 3.59%, *P*＜0.001）升高，差异有显著统计学意义。CD14+CD32+、CD14+CD64+单核细胞在组间比较无明显统计学差异（*P*＞0.0083）。乙肝感染成功清除组患者CD14highCD16+单核细胞较健康对照组升高（中位数7.96% vs 3.59%, *P*=0.002），差异有统计学意义。

**4、**单核细胞亚群CD14highCD16+与ALT呈显著正相关（*r*=0.694, *P*＜0.001），与AST呈显著正相关（*r*=0.698, *P*＜0.001），与血清HBsAg呈显著负相关

（*r*=-0.614, *P*＜0.001），与血清HBV DNA低度负相关（*r*=-0.446, *P*=0.0017）。

**5、**细胞因子变化情况：免疫活化期组血清中IL-6、IL-10、IL-1β、TNF、MIP-1β、IL-12p70因子水平较免疫耐受期组（P＜0.001, P＜0.001, P＜0.001, P=0.001, P＜0.001, P＜0.001, ）和健康对照组（P=0.001，P＜0.001，P＜0.001，

P=0.001，P＜0.001，P＜0.001）明显升高。**结论：**

**1、**本实验证实了前期HBV不同感染时期全基因组表达谱芯片的结果和

FcγRs的RT-PCR实验—HBV感染不同免疫状态下FcγRs存在差异性表达。

**2、**FcγRs在慢性HBV感染不同时期的不同免疫细胞上的差异可能是反应免疫清除状态的指标之一。

**关键词：**

慢性乙肝清除期，单核细胞，NK细胞，B细胞，Fcγ受体

II

**Abstract**

**Differential expression of FcγRs on immune cells in different status of HBV infection**

**Background and aims:**

To identity immunological mechanisms that govern distinct clinical phases of a chronic HBV infection-immune tolerant and immune active, we used microarray to analyze the whole genome of PBMC that got from hepatitis B virus infected human. We found that FcγRs had a significant difference in different phases of chronic hepatitis B. After that we did PCR to verify the results of whole genome array techniques. The purpose of this paper is to explore FcγRs on different immune cells in different HBV immune status so that we can validate the results of previous experiments and know the value of FcγRs in distinguishing the phases of immune tolerance and immune clearance in hepatitis B.

**Methods:**

We used multicolour flowcytometry to detect FcγRIII (CD16) on NK cells and monocytes, FcγRII (CD32) on B cells and monocytes, FcγRI (CD64) on monocytes in different phases of hepatitis B (hepatitis B infection successfully clear group 7patients, hepatitis B clearance group 31 patients, hepatitis B tolerance group 16 patients and healthy controls 20 people). We use Cytometric Bead Array to detect IL-1β, IL-10, MIP-1β, IL-12p70, TNF, IL-6 level in plasma of subjects. The Mann-Whiney U test was used for comparison of continuous data between two groups. The Spearman correlation analysis was used for correlation analysis.

**Results:**

**1、**The patients of immune active group had a lower proportion of CD3-C D56+CD16+ NK cells than patients of immune tolerance (median 6.00% vs 13.

III

22%, *P*=0.001) and healthy controls (median 6.00% vs 17.62%, *P*＜0.001). The patie-nts of hepatitis B infection successfully cleared group also had a lower p erc-entage of CD3-CD56+CD16+ NK cells than healthy controls (median 5.66% vs 17.62%, *P*=0.002).

**2、**The proportion of CD3-CD19+CD32+ B cells in immune active group was

Higer than immune tolerance group (median 11.68% vs 7.28%, *P*=0.008). The percentage of CD3-CD5+CD32+ B cells in immune active groups was higher than healthy controls (median 3.37% vs 1.46%, *P*=0.002). The proportion of CD3-CD19+CD5-CD32+ B cells was higher in immune active group than immune tolerance group (median 7.77% vs 5.22%, *P*=0.004). The percentage of CD3-CD19+CD5+CD32+ B cells was higher in immune active group than healthy

Controls (median 3.26% vs 1.34%, *P*=0.006). The proportion of FcγR II on

CD3-CD19+ B cells, CD3-CD5+ B cells, CD3-CD19+CD5- B cells, CD3-CD19+CD5+

B cells has not significant difference (*P*> 0.0083) when compared any two groups.

**3、**The percentage of CD14highCD16+ monocytes was higher in immune clearance group than immune tolerance group (median 8.04% vs 4.84%, *P*＜0.001) and healthy

Controls (median 8.04% vs 3.59%, *P*＜0.001). The patients of hepatitis B infection successfully cleared groups also had a higer percentage of CD14highCD16+ monocytes than healthy controls (median 7.96% vs 3.59%, *P*=0.002). When comparing any two groups, there was not significant difference (*P*> 0.0083) in subsets of CD14+CD32+ monocytes and CD14+CD64+ monocytes.

**4、**The proportion of CD14highCD16+ monocytes had a positive correlation with

ALT level (*r*=0.694, *P*＜0.001). The percentage of CD14highCD16+ monocytes had a positive correlation with AST (*r*=0.698, *P*＜0.001). There was a negative correlation between the subsets of CD14highCD16+ monocytes and serum HBV DNA (*r*=-0.446,

*P*=0.0017). There was a negative correlation between the subsets of CD14highCD16+ monocytes and serum HBsAg (*r*=-0.614, *P*＜0.001).

5、The change of cytokine in four groups. The level of IL-6, IL-10, IL-1β, TNF, MIP-1βand IL-12p70 in immune active group(P＜0.001, P＜0.001, P＜0.001,

IV

P=0.001, P＜0.001, P＜0.001）were higher than immune tolerance group and healthy controls(P=0.001, P＜0.001, P＜0.001, P=0.001, P＜0.001, P＜0.001). **Conclusions:**

1**、**The results of this paper verify the conclusion in whole genome array techniques and Real time PCR of FcγRs. The expression of FcγRs is differential in different status of HBV infection.

2**、**The differential expression of FcγRs in different immune cells may be a

Marker to distinguish HBV immune tolerance and clearance phase.

**KEy words：**

Hepatitis B clearance, monocytes, NK cell, B cell, FcγRs

V

目 录

**[Abstract](#_Toc686524714)** 3

[第](#_Toc686524715)**[1](#_Toc686524715)**[章 绪 论](#_Toc686524715) 8

[2](#_Toc686524716) 9

[第](#_Toc686524717)**[2](#_Toc686524717)**[章 综 述](#_Toc686524717) 10

**[2.1](#_Toc686524718)****[HBV](#_Toc686524718)** [感染后机体免疫调节](#_Toc686524718) 10

**[2.1.1](#_Toc686524719)** [乙型病毒性肝炎感染的流行现状](#_Toc686524719) 10

**[2.1.2](#_Toc686524720)** [慢性乙型病毒性肝炎感染的自然史](#_Toc686524720) 10

[固有免疫及获得性免疫参与了病毒的清除过程。](#_Toc686524721) 10

[CD32（FcγR II）依据其编码基因的不同划分为FcγR IIa、FcγR IIb和FcγR IIc](#_Toc686524722) 11

[FcγR III存在胎盘屏障的最外层，体外分离培养的滋养层细胞也可检测到FcγR](#_Toc686524723) 11

[第](#_Toc686524724)**[3](#_Toc686524724)**[章 资料与方法](#_Toc686524724) 12

**[3.1](#_Toc686524725)** [研究对象](#_Toc686524725) 13

**[3.1.1](#_Toc686524726)** [研究对象来源](#_Toc686524726) 13

**[3.1.2](#_Toc686524727)** [慢性](#_Toc686524727)**[HBV](#_Toc686524727)**[感染者及健康对照入选标准及排除标准](#_Toc686524727) 13

**[3.1.3](#_Toc686524728)** [分组标准](#_Toc686524728) 13

**[3.2](#_Toc686524729)** [主要试剂及仪器](#_Toc686524729) 14

**[3.3](#_Toc686524730)** [实验方法](#_Toc686524730) 14

**[3.3.1](#_Toc686524731)** [各免疫细胞上](#_Toc686524731)**[FcγRs](#_Toc686524731)**[检测方案及](#_Toc686524731)**[T](#_Toc686524731)**[细胞检测方案](#_Toc686524731) 14

**[3.3.2](#_Toc686524732)** [细胞因子的检测](#_Toc686524732) 18

**[3.4](#_Toc686524733)** [统计方法](#_Toc686524733) 19

[第](#_Toc686524734)**[4](#_Toc686524734)**[章 结 果](#_Toc686524734) 19

**[4.1](#_Toc686524735)** [研究对象临床特点](#_Toc686524735) 19

**[4.2](#_Toc686524736)** [健康对照组不同年龄组](#_Toc686524736)**[FcγRs](#_Toc686524736)** [的表达情况](#_Toc686524736) 21

**[4.3](#_Toc686524737)** [不同免疫状态下](#_Toc686524737)**[FcγRs](#_Toc686524737)**[的表达情况](#_Toc686524737) 22

**[4.3.1](#_Toc686524738)** [各组间](#_Toc686524738)**[FcγR III](#_Toc686524738)**[（](#_Toc686524738)**[CD16](#_Toc686524738)**[）在](#_Toc686524738)**[NK](#_Toc686524738)**[细胞上表达情况](#_Toc686524738) 22

**[4.3.2](#_Toc686524739)** [各组间Fcγ](#_Toc686524739)**[II](#_Toc686524739)**[（](#_Toc686524739)**[CD32](#_Toc686524739)**[）在](#_Toc686524739)**[B](#_Toc686524739)**[细胞上表达情况](#_Toc686524739) 24

**[4.3.3](#_Toc686524740)** [各组间](#_Toc686524740)**[FcγRs](#_Toc686524740)**[在单核细胞上表达情况](#_Toc686524740) 26

**[4.3.4](#_Toc686524741)** [各组间](#_Toc686524741)**[CD4+T](#_Toc686524741)**[细胞及](#_Toc686524741)**[CD8+T](#_Toc686524741)**[细胞差异](#_Toc686524741) 28

**[4.4](#_Toc686524742)** [慢性乙肝患者临床指标与](#_Toc686524742)**[FcγRs](#_Toc686524742)**[的相关性](#_Toc686524742) 29

**[4.5](#_Toc686524743)** [四组患者血浆细胞因子比较](#_Toc686524743) 30

[第](#_Toc686524744)**[5](#_Toc686524744)**[章 讨 论](#_Toc686524744) 32

[第](#_Toc686524745)**[6](#_Toc686524745)**[章 结 论](#_Toc686524745) 33

[参考文献](#_Toc686524746) 34

VII

**英文缩略词**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 英文缩写 | 英文全称 | 中文全称 |
| HBV | Hepatitis B virus | 乙型肝炎病毒 |
| HBsAg | Hepatitis B surface antigen | 乙型肝炎病毒表面抗原 |
| HBeAg | Hepatitis B e antigen | 乙型肝炎病毒 e 抗原 |
| AST | Aspartate transaminase | 天门冬氨酸氨基转移酶 |
| ALT | Alanine aminotransaminase | 丙氨酸氨基转移酶 |
| PBMC | Peripheral blood mononuclear cell | 外周血单个核细胞 |
| FcγRs | Fc gamma receptor | Fc 受体 |
| PCR | Polymerase chain reaction | 聚合酶链反应 |
| IFN-α/IFN-β | Interferonα/β | 干扰素α/β |
| NK | Natural killer cell | NK 细胞 |
| ITAM | Immunoreceptor tyrosine-based activation motif | 免疫受体络氨酸活化基序 |
| ITIM | Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif | 免疫受体络氨酸抑制基序 |
| LESC | Liver sinusoidal endothelial cells | 肝窦状内皮细胞 |
| GPI | Glycosyl phosphatidyl inositol | 糖基磷酰肌醇 |
| ADCC | Antibody-depentant cell-mediated Cytotoxicity | 抗体依赖的细胞毒性作用 |
| ADCP | Antibody-depentant cell-mediated Phagocytosis | 抗体依赖的细胞吞噬作用 |
| CTL | Cytotoxic T-lymphocyte | 细胞毒性 T 细胞 |
| HIV | Human immunodeficiency virus | 艾滋病病毒 |
| HCV | Hepatitis C virus | 丙型肝炎病毒 |
| BCR | B cell receptor | B 细胞受体 |
| IA | Immune active | 免疫活化期 |
| IT | Immune tolerant | 免疫耐受期 |

VIII

# 第**1**章 绪 论

HBV感染是全球主要健康问题之一，尽管有预防疫苗的使用，全世界仍有

3.5亿人感染。[[1](#_bookmark28)] HBV的持续感染是肝脏病程进展及肝细胞癌的主要原因。慢性乙型病毒性肝炎自然史包括免疫耐受期、免疫活化期、低复制期以及再活化期。

[[2](#_bookmark28)] HBV并不直接导致肝细胞损伤，而是在机体免疫清除反应中间接破坏肝细胞，

最终导致肝纤维化、肝硬化或肝癌的发生。因此在慢性乙型肝炎免疫活化期时进行有效的抗病毒治疗十分关键。[[3](#_bookmark28)]依据慢性乙型肝炎防治指南[[4](#_bookmark28)]，目前主要使用转氨酶大于等于正常上线2倍或转氨酶虽不足两倍，但肝组织学显示Knodell

HAI≥4，或炎症坏死≥G2，或纤维化≥S2。但肝脏组织学检查为有创检查，部分患者不能接受。因而寻找一种敏感的血清生物学标志物来区分慢性乙型肝炎免疫耐受期与免疫活化期的转折点十分重要。本课题组前期将感染HBV患者的外周血单个核细胞（peripheral blood mononuclear cell, PBMC）进行全基因组表达谱芯片分析，研究发现处于HBV自然史不同阶段的各组间FcγRs基因存在差异性表达。[[5](#_bookmark28)]随后其又进行一步深入的PCR验证实验发现FcγRs在HBV感染不同时期的患者组间及与健康对照组之间存在显著差异。[[6](#_bookmark28)]以上实验在分子水平上提出

FcγRs有望成为区分免疫耐受期与免疫清除期的转折点，我们将使用流式细胞仪分析NK细胞、B细胞、单核细胞中FcγRs的水平，并使用流式液相多重蛋白定量技术检测研究对象血浆中IL-1β、IL-10、MIP-1β、IL-12p70、TNF、IL-6因子水平。

FcγRs表达在多种外周血免疫细胞表面，其活化性受体与抑制性受体的平衡是机体维持免疫耐受的关键。FcγRs在抗原呈递、树突状细胞的成熟、B细胞活化方面起到重要作用，通过调节树突细胞的活化，FcγRs控制了是否产生免疫活化或免疫耐受反应。在识别了树突细胞表面抗原多肽的细胞毒性T细胞、Th细胞和调节T细胞，FcγRs参与调节了多种固有和获得性免疫。这使得他们成为了新颖的免疫治疗靶点。

本实验通过测定NK细胞、B细胞、单核细胞表面的FcγRs以及辅助T淋巴细胞、细胞毒T淋巴细胞来进一步探讨FcγRs在固有免疫及获得性免疫之中的作用。分析FcγRs与天门冬氨酸转氨酶（aspartate transaminase, AST）、丙氨酸氨基转

1

移酶（alanine aminotransaminase, ALT）、血清乙肝表面抗原（hepatitis B surface

antigen，HBsAg）及血清HBV DNA之间的相关性，以期能在蛋白表达水平进一步解释FcγRs与慢性乙型肝炎的关系。

# 2

# 第**2**章 综 述

## **2.1** **HBV** 感染后机体免疫调节

### **2.1.1** 乙型病毒性肝炎感染的流行现状

全球约有20亿人口曾感染HBV，超过3.5亿人为HBV携带者。[[7](#_bookmark28)]中国一项包含2亿人的大数据调查中发现有6%的人HBsAg阳性，9%的人Anti-HBcAg阳性，30%的人Anti-HBsAg阳性，HBsAg阳性的患者中有30%的患者HBeAg阳性。[[8](#_bookmark28)]虽然在过去20年HBV在中国农村的分布从高流行到中度流行，但HBV感染患者的数目依然很庞大。全世界的肝细胞癌中60%-80%是由乙型肝炎病毒引起。[[9](#_bookmark28)]在中国HBV感染是主要的肝脏疾病种类，宿主免疫反应是非常重要的因素，它决定了HBV是彻底清除还是持续感染。成人急性乙型肝炎多为自限性疾病，大多患者可以完全康复。然而发生在围生期感染，慢性化比例高达90%。在感染HBV后病毒在肝细胞内复制，在很长的一段时期血清中都可以检测到HBV DNA及HBsAg、HBeAg等病毒蛋白颗粒。

### **2.1.2** 慢性乙型病毒性肝炎感染的自然史

慢性HBV感染的自然史可以划分为四个阶段。第一阶段免疫耐受期：患者往往有较高水平的HBsAg和HBV DNA，此时患者e抗原阳性，转氨酶水平正常或轻度升高。第二阶段即免疫活化期，患者转氨酶水平升高，HBV DNA水平开始下降。在第三阶段，非活化携带者HBV DNA和HBsAg水平是最低的。然而20%-30%的非活化携带者可以进入“再活化”或“HBeAg阴性肝炎期”。[[10-12](#_bookmark28)] HBV并不直接破坏肝细胞而是在机体每一次清除HBV时间接的破坏肝细胞所致。反复的破坏以及机体的“瘢痕修复”导致了肝纤维化及肝硬化。目前最适抗病毒药物治疗时机为免疫活化期肝脏丙氨酸氨基转移酶升高大于等于两倍时，或转氨酶虽不足两倍，但肝组织学显示Knodell HAI≥4，或炎症坏死≥G2，或纤维化≥S2。当机体由免疫耐受期过度到免疫活化期时，原有的免疫耐受机制被打破，

3

### 固有免疫及获得性免疫参与了病毒的清除过程。

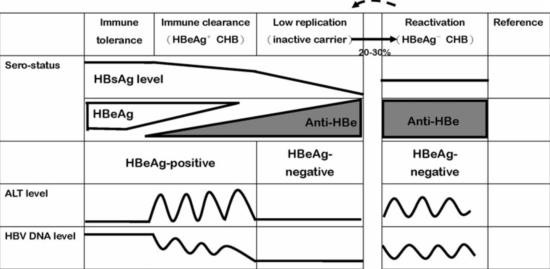


图2.1慢性HBV感染的不同阶段（摘引自[[2](#_bookmark28)]）

Fig 2.1 Different phases of chronic HBV infection

**2.1.3** **HBV感染发病机制**

乙型病毒性肝炎的主要临床表现是由宿主免疫调控紊乱引起，尤其是NK细胞及细胞毒性T细胞对HBV感染肝细胞的破坏。[[13](#_bookmark28)] HBV并不直接破坏肝细胞，如在猩猩早期感染HBV时，肝脏组织学检查及生化学检查并未提示有肝脏病变。[[14](#_bookmark28); [15](#_bookmark28)]当细胞免疫缺陷或药物抑制细胞免疫时，在小鼠的肝脏中HBV大量复制。

[[16](#_bookmark28)]既往认为HBV特异性CD8+T细胞是使得HBV感染肝细胞坏死的主要效应细胞，[[13](#_bookmark28)]但有学者提出在成年HBV感染病人中，HBV特异性CD8+T细胞数量与肝脏的炎症程度不成正比。[[17](#_bookmark28)]在急性HBV感染中并没有检测到外周血HBV特异性CD8+T细胞的升高。[[18](#_bookmark29)] IFN-α/IFN-β可以抑制HBV的复制。在转基因小鼠中刺激T细胞、NK细胞、NKT细胞可以增加IFN-α/IFN-β的分泌从而抑制病毒复制，[[19](#_bookmark29)]这提示多种免疫反应参加HBV感染的控制。HBV病毒复制后表达在肝细胞表面，当机体清除这些病毒时也间接的破坏了自身的肝细胞。

**2.2** **FcγRs在人类中的研究**

4

**2.2.1** **FcγRs的定义**

FcγRs为免疫球蛋白IgG Fc段的受体，是一种细胞表面糖蛋白分子，大多数属于免疫球蛋白超家族。在部分自身免疫性疾病、感染性疾病中FcγRs都扮演着重要的角色。当刺激传达至FcγRs，使其活化性受体占据优势时，细胞活化和促炎反应相继发生，从而清除病原微生物和病毒。当缺乏上述刺激时，细胞活化被阻断，抗炎反应相继发生。这些Fc依赖的促炎反应包括免疫细胞吞噬外来病原体，抗体依赖的细胞毒作用杀死病毒感染细胞或者病毒转化细胞，原位活化血小板，肥大细胞和中性粒细胞脱颗粒并释放炎症介质来影响组织微环境，通过细胞因子和趋化因子的释放向淋巴细胞传递信息。在系统性红斑狼疮中FcγRs与免疫球蛋白相关慢性炎症相关。FcγRs的多态性与炎症性肠病、类风湿性关节炎、血管炎、系统性红斑狼疮相关。

**2.2.2** **Fcγ受体分类及分布**

FcγRs依据其亲和性和结构分为CD64（FcγRⅠ）、CD32（FcγRⅡ）和CD16（FcγRⅢ）三类。其中FcγR I与IgG Fc段亲和力最强，FcγR II及FcγR III亲和力较弱。[[20](#_bookmark29); [21](#_bookmark29)] FcγR IIb为抑制性受体，剩余受体均为活化性受体。FcγRs表达在多种免疫细胞表面。在固有免疫细胞中FcγRs主要表达在单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞、嗜碱性粒细胞、肥大细胞表面。在获得性免疫细胞，B细胞表面仅表达抑制性受体FcγRⅡb. FcγR还可表达于内皮细胞、肾小球系膜细胞表面。[[22](#_bookmark29)]

CD64（FcγR I）胞外区所含Ig样结构域与IgG Fc具有高亲和力，但因FcγR

I胞质区氨基酸序列较短，需与胞质区中γ链二聚体非共价偶联后才能激活酪氨酸免疫受体活化基序（immunoreceptor tyrosine-based activation motif, ITAM）从而产生活化信号级联反应，其主要分布在单核细胞、巨噬细胞表面、中性粒细胞、树突状细胞和肥大细胞。[[22](#_bookmark29); [23](#_bookmark29)]动物实验研究发现它在抗体反应和针对T细胞免疫的抗原提呈之间有重要的桥梁作用。[[24](#_bookmark29); [25](#_bookmark29)]

5

### CD32（FcγR II）依据其编码基因的不同划分为FcγR IIa、FcγR IIb和FcγR IIc

三类。FcγR IIa和FcγR IIb的胞外区高度相似，但他们的胞质内区不相似。FcγR

IIa为活化性受体，其胞质区含ITAM基序列。它是分布最广泛的活化性IgG受体，表达在所有淋巴细胞表面，除了T细胞、B细胞和NK细胞。[[23](#_bookmark29); [26](#_bookmark29)] FcγR IIb是目前发现的Fcγ受体中唯一的抑制性受体，其自身分子胞质区含酪氨酸免疫受体抑制基序(immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif, ITIM). FcγR IIb1是在B细胞表面的主要表型，也低水平表达在单核细胞表面。它具有抑制性通路作用但并不介导免疫复合物的内化。人抑制性FcγR II-b1是抑制B细胞激活的关键受体。FcγR IIb2可介导内吞作用，主要分布于单核细胞、巨噬细胞、嗜碱性粒细胞、肥大细胞等表面[[27](#_bookmark29)]。中性粒细胞上是否表达FcγR IIb仍存在争议。[[23](#_bookmark29)]血小板和大多数T细胞表面不表达FcγR IIb，但近期有报道部分CD8+记忆T细胞表面表达FcγR IIb。[[28](#_bookmark29)]在肝脏中90%FcγR Ⅱb主要表达于肝窦状内皮细胞

（liver sinusoidal endothelial cells, LESC），其余的表达在Kuffer细胞中。Fcγ活化性受体的γ链多表达于Kuffer细胞中，在LESC中并未见到[[29](#_bookmark29)]。FcγR IIb3是一种可溶性亚型，缺乏跨膜和第一个胞质域，它能抑制IgG复合抗原表达[[30](#_bookmark29)]。

CD16（FcγR III）在NK细胞表面和γδT细胞表面最丰富的Fcγ受体，主要介导ADCC作用。大部分血液循环中的CD14+单核细胞缺乏FcγR III的表达，然而有一小部分亚群表达FcγR IIIa。这部分单核胞亚群在吞噬作用方面扮演着重要角色正如在组织中的巨噬细胞一样。[[23](#_bookmark29)] FcγR III分为FcγRⅢa和FcγRⅢb两种亚型。FcγR IIIa为跨膜受体，其胞质区需与ITAM的γ链二聚体需与T细胞受体或自然杀伤细胞所含ζ链二聚体连接后，方可向胞内传导活化信号。FcγRⅢb并没有细胞质内区域，它通过GPI“锚”在中性粒胞表面[[22](#_bookmark29)]，它的活化信号功能主要依赖于SRC激酶。血液中可溶性的FcγRⅢ主要来自这种形式，中性粒细胞激活短时间处理后可明显降低FcγRⅢb的表达水平，可能与通过激活内源性蛋白酶切除GPI连接分子有关[[31](#_bookmark29)]。

**2.2.3** **FcγRs信号通路**

6

当免疫复合物与活化性FcγRs交联时通过SRC络氨酸激酶磷酸化FcγRs受体相关的γ链，这形成了SYK激酶结合位点，继而活化其他信号传导分子如：PI3K和SOS. PI3K裂解磷脂酰肌醇4，5二磷酸为磷脂酰肌醇3，4，5三磷酸，磷脂酰肌醇3，4，5三磷酸招募BTK和PLCγ，活化下游激酶并从内质网中释放Ca离子。当免疫复合物同时刺激了B细胞表面的BCR和FcγR IIb后通过LYN导致胞质内

ITIM序列磷酸化，招募激活含有SH2区域的磷酸酶，如SHIP，使得ITAM通路中的3，4，5三磷酸磷脂酰肌醇去磷酸化，抑制PTK和PLCγ的招募，降低胞内钙离子水平。单独激活FcγR IIb将会通过ITIM和SHIP依赖信号通路导致B细胞凋亡，这条通路中包含cABL激酶家族、BTK、JNK。（图2.2）



图2.2 FcγRs的信号传导通路（摘引自[[22](#_bookmark29)]）

Fig 2.2 signalling pathway triggered by activating and inhibitory FcγRs

7

**2.2.4** **FcγRs与其相关性疾病**

抗体Fc段与FcγRs结合可以通过ADCC(antibody-depentant cell-mediated

cytotoxicity，ADCC）及细胞活化引起级联信号放大招募炎症细胞等措施来有效清除病毒感染细胞和肿瘤细胞，但它同样可以通过自身免疫反应破坏自身健康正常的细胞。

在HIV感染的早期FcγR I就引起了促炎环境。巨噬细胞可以通过吞噬免疫复合物、介导ADCC、趋化因子等抑制HIV。[[32](#_bookmark29)]有人提出感染HIV的巨噬细胞表达FcγR I将会导致NAb的区域凝聚，然后NAb结合病毒并抑制细胞到细胞的播散。

[[33](#_bookmark29)]在HIV感染中，NK细胞的ADCC作用也许是FcγR IIIa调节的保护反应[[34](#_bookmark29); [35](#_bookmark29)]。

CD16+的单核细胞亚群对HIV感染很敏感，这使得CD16+的单核细胞亚群高表达

CCR5和低APOBEC3G活性。[[36](#_bookmark30)]

有学者对HCV感染患者外周血淋巴细胞表面FcγRs进行检测，发现FcγR I主要表达在单核细胞表面（80%），FcγR II表达在单核细胞、B淋巴细胞和中性粒细胞表面（＞90%），FcγR III表达在NK细胞（85%）和中性粒细胞表面（95%）。但是与健康对照相比，HCV患者FcγRs比例方面并未见差异。[[37](#_bookmark30)]在体外试验中

HCV免疫复合物或附着的IgG抗体损害HCV特异性CTL的诱导。Fcγ受体通过减少单核细胞B7-1和或增强TGF-β1的分泌来调节对CTL的抑制。[[38](#_bookmark30)]

FcγR III的基因多态性和炎性及自身免疫性疾病的发生及预后有明显相关性。有学者研究了丙型肝炎感染过程中混合冷球蛋白血症易感性与IgG Fc段受体

（FcγRs）的关系，发现FcγR的多肽变异体与免疫复合物亲和性减少相关并与肝癌和自身免疫性疾病相关[[39](#_bookmark30)]。另一方面Vassilopoulos及Gragnani分别对慢性丙型肝炎合并自身免疫紊乱或淋巴组织增生病人进行了队列研究，他们主要研究了冷球蛋白血症易感性与FcγRⅢ的基因多态性的关系，但他们并没有发现任何特定的等位基因频率增加，与对照组相比FcγR的基因型分布没有明显的不同[[40](#_bookmark30)]。

FcγR可能参与丙型肝炎病毒的母婴传播。有研究显示在胎盘绒毛组织中FcγR I主要分布于胎盘绒毛Hofbauer细胞，FcγR II主要分布于胎盘绒毛血管内皮细胞[[41](#_bookmark30)]，FcγR III仅分布于胎盘屏障最外层，即细胞滋养层[[41](#_bookmark30)]。国内有学者证实

8

### FcγR III存在胎盘屏障的最外层，体外分离培养的滋养层细胞也可检测到FcγR

III，他们推测HCV病毒颗粒IgG复合物由FcγR III介导进入胎盘滋养层细胞，从而感染胎儿[[42](#_bookmark30)]

类风湿性关节炎患者的滑液巨噬细胞、中性粒细胞、单核细胞和单核细胞源性的巨噬细胞中FcγR I、FcγR IIa、FcγR III升高。[[43](#_bookmark30)]有报道FcγR I与软骨破坏相关。[[44](#_bookmark30)] B细胞表面过多表达FcγR IIb不仅与胶原相关性关节炎的起始原因无关，而且它减少了关节的破坏并减少了胶原相关自抗身体。[[45](#_bookmark30)]在特发性血小板减少性紫癜、自身免疫性溶血[[46](#_bookmark30)]和系统性红斑狼疮等自身免疫性疾病中FcγRs都有重要作用，如：在自身免疫性溶血中巨噬细胞表面FcγR IIb减少使得红细胞的吞噬作用加强等。[[47](#_bookmark30); [48](#_bookmark30)]

**2.2.5** **FcγRs与HBV感染者免疫细胞的关系**

NK细胞为固有免疫的组成部分，在抗病毒的第一道防线中起重要作用。NK细胞不依赖预先活化就能就能够直接识别非特异性杀伤靶细胞，因此在慢性乙型肝炎抗病毒领域备受关注。除了其抗病毒的效应外，它还可以负向调节HBV特异性CD8+细胞。[[49](#_bookmark30)] NK细胞主要由骨髓干细胞发育而来。NK细胞约占外周血淋巴细胞的10%-15%，约占肝脏淋巴细胞的40-60%。有研究显示HBV慢性感染肝损伤患者肝组织中有大量非抗原特异性淋巴细胞浸润。NK细胞表面仅表达

FcγRs家族中的活化性受体FcγR III A(CD16)[[22](#_bookmark29)]，其需与NK细胞所含的ζ二聚体连接后向胞内传导活化信号，主要介导ADCC和脱颗粒作用。成熟的NK细胞依据CD56的强弱及是否表达CD16分为以下几个亚群：CD56dim亚群和

CD56bright. CD56dim亚群占总NK细胞的90%，表达高水平的CD16分子（CD16pos），

CD56dim亚群可分泌细胞因子，如IFN-γ、TNF-α等。CD56bright亚群约占总NK细胞的10%，通常是CD16neg或CD16dim. CD56bright亚群代表了成熟的早期阶段，主要通过穿孔素和诱导未被抗原致敏的细胞凋亡来发挥杀伤活性。在慢性HBV感染中，会导致NK细胞亚群比例的改变。有人指出CD56dimCD16pos NK细胞的减少也许会导致ADCC作用减少等，对病毒的持续感染有一定作用。[[50](#_bookmark30)]

9

B细胞依据其来源分为B1亚群和B2亚群。B细胞表面仅表达FcγR IIb

（CD32）[[22](#_bookmark29)]。B2细胞主要由骨髓多能造血干细胞分化而来，在体内出现较晚，定位于淋巴器官（如：脾脏、淋巴结等）。B2细胞产生高亲和力抗体，参与特异性体液免疫。B2细胞还具有抗原提呈和免疫调节功能。B1细胞是个体发育出现较早的“原始”B细胞，在人类胎儿及新生儿时期就有高比例的CD19+CD5+B细胞。[[51](#_bookmark31)] B1细胞多为非骨髓来源，进一步依据CD5表达情况分为B1a亚群

（CD19+CD5+）和B1b亚群（CD19+CD5-）。B1a亚群来源于胚胎肝脏，B1b亚群来源于围产期肝脏和骨髓。B1细胞BCR缺乏多样性，主要识别某些细菌表面共有多糖抗原及自身抗原，主要产生以IgM为主的低亲和力抗体。Casali和他的同事发现在初始抗病毒相关反应中，主要的Ｂ细胞克隆是CD5+B细胞并产生低亲和力的IgM抗体。[[52](#_bookmark31); [53](#_bookmark31)]在急性感染及自身免疫性疾病（如：干燥综合征、类风湿性关节炎）观察到CD5+的细胞升高。[[53](#_bookmark31)] CD19分布于除浆细胞以外的B细胞谱系发育的各个阶段。

FcγR IIb对调节B细胞活化机体液免疫耐受非常重要。FcγR IIb1优先表达在B淋巴细胞上，参与了负向调控抗体产物及B细胞增值。[[54](#_bookmark31); [55](#_bookmark31)]在控制应答B细胞活化波动范围方面，FcγR IIb1起了重要作用。特异性抗体与BCR接触，通过其Fab区域与BCR结合并通过其Fc段与B细胞表面FcγR IIb1相互作用向B细胞传递抑制性信号。这种抑制性信号代表了反馈抑制系统用来控制B细胞活化、激增及抗体产生。FcγR IIb在抗原依赖B细胞发展方面也很重要。在体外实验中，FcγR IIb受体信号刺激了淋巴细胞干细胞的生长和分化，在FcγR IIb缺陷小鼠中，B细胞隔间明显减少。[[56](#_bookmark31)] B细胞、巨噬细胞、肥大细胞表面FcγR IIb的减少与体液免疫增强和过敏反应相关，减少B细胞表面FcγR IIb会减少负向反馈作用，使得自身抗体持续产生。其他报道IL-4下调B细胞表面FcγR IIb和抑制功能。[[57](#_bookmark31); [58](#_bookmark31)]在脾脏的B细胞，IL-4减少了细胞表面的FcγR IIb和其他ITIM序列受体，这使得对B细胞的抑制功能减弱。[[57](#_bookmark31)]

肝纤维化是肝脏损伤及炎症的伤痕修复反应，巨噬细胞及浸润的单核细胞参与了炎症的发展。单核细胞表面表达FcγR I、FcγR II、FcγR III. FcγR III A（CD16）需与单核细胞所含的γ链连接后向胞内传导活化信号。依据CD16分子和CD14

10

分子，单核细胞大致分为两类。在人类血液中80%-90%单核细胞高表达CD14但不表达CD16（CD14highCD16-），这些细胞被称作经典的单核细胞，据报道这种细胞主要和高水平的IL-10和低水平的TNF相关。CD14+CD16+亚群属于非经典的单核细胞，主要产生高水平的促炎因子如：TNF、IL-1β。[[59-61](#_bookmark31)] CD14+CD16+进一步分为CD14highCD16+、CD14lowCD16+亚群。有研究提出在慢性炎症性肝脏疾病中浸润的CD14highCD16+细胞可能为血液中的单核细胞穿过肝窦内皮细胞迁徙到肝脏中。[[62](#_bookmark31); [63](#_bookmark31)]体内体外实验均显示单核细胞亚群在细胞因子分泌、粘附分子、趋化因子都有所区别。[[64](#_bookmark31)]有文献指出肝内的CD14highCD16+细胞有很强的吞噬能力、抗原呈递能力可以分泌促炎因子及促纤维化因子（IL-13）,在肝脏纤维化的过程中有很强的作用。[[62](#_bookmark31)]巨噬细胞表达FcγRs的所有种类。通过FcγR调节的吞噬作用，巨噬细胞有很大的潜力破坏肿瘤细胞。有实验表明加入IFN-γ培养的人单核细胞源性巨噬细胞通过FcγRs介导的ADCP（antibody-depentant cell-mediated

phagocytosis，ADCP）和ADCC裂解肿瘤细胞的能力强于未加入IFN-γ的人单核细胞源性巨噬细胞。[[65](#_bookmark31)]另有实验指出FcγR IIb缺陷小鼠展现出更多ADCC作用，并在给予治疗剂量辅助性抗肿瘤抗体时有更强的阻止肿瘤生长的作用。[[66](#_bookmark32)]

**2.2.6** **FcγRs与炎症细胞因子**

最近有研究指出FcγRs在控制组织和病原特异性抗体方面起重要作用。

[[67](#_bookmark32)] FcγRs不能直接诱导细胞因子本身，而是与其他受体合作，以扩大或抑制特定细胞因子的产生。FcγRs调节的细胞因子并不是一致的。FcγRs可能通过以下几个方面来调节细胞因子的产生。第一，FcγRs可以与特异性抗体合作从而产生细胞因子，如当识别了IgG调理的细菌后，FcγR IIa与TLRs交联，这增强了促炎因子TNF-α的产生。[[68](#_bookmark32)]与此相反，FcγRs不协同一些细胞因子受体，包括IL-6受体，IL-12和IL-23受体。[[69](#_bookmark32)]第二，FcγRs通过活化性和抑制性受体的平衡来调节细胞因子反应。如用IgG免疫复合物刺激树突状细胞可以通过活化性受体FcγR IIa传递炎症信号并通过FcγR IIb传递耐受性信号。[[70](#_bookmark32)]第三，FcγRs能区分聚合和可溶性抗体，从而增加了FcγRs介导的细胞因子调节的复杂性。虽然大免

11

疫复合物可以增强细胞因子的产生，但当在稳定状态下用可溶性IgG刺激FcγRs时会产生抑制性信号。[[71](#_bookmark32); [72](#_bookmark32)]第四，FcγRs激活诱导细胞内细胞因子合成发生变化，从而引起相应细胞和组织发生反应。如FcγRs-TRLs交联增强了树突状细胞或巨噬细胞IL-10细胞因子的产生，它削弱了单核细胞IL-10的产生。[[69](#_bookmark32)]

在病毒感染中主要研究抗体与FcγRs的作用，如病毒的中和作用、ADCC作用、抗体依赖性感染增强、吞噬作用。而在病毒感染的情况下的FcγRs介导的细胞因子应答的数据是有限和有争议的。最近的研究表明登革热病毒在FcγRIIa作用下使得单核细胞、树突状细胞和巨噬细胞强烈上调TNF-α因子和IL-6产生。[[73](#_bookmark32)；

[74](#_bookmark32)]这也许是因为FcγR IIa与TLR3和TLR7/8交联分别识别了病毒相关的单链或双链RNA。[[69](#_bookmark32)]在人单核细胞系受血清调理的登革热病毒在mRNA和蛋白水平上调了IL-6和IL-10. [[75-77](#_bookmark32)]另一方面有文献报道FcγRs相关通路抑制了TNF-α和IL-12的转录和翻译。[[75](#_bookmark32)]总之FcγR IIa在特异性细胞因子及趋化因子中的作用很少被研究。这仍需要我们进一步深入研究。

**2.2.7** **FcγRs在慢性HBV感染中的作用**

固有免疫及获得性免疫均参与清除HBV的过程，本课题组前期人外周血

PBMC全基因组芯片结果显示FcγRs在HBV感染的免疫应答、炎症反应过程中有重要作用。后期外周血PBMC的PCR验证实验提示FcγRs的mRNA在免疫清除期与免疫耐受期中存在差异。目前多以丙氨酸氨基转移酶、门冬氨酸氨基转移酶的数值及肝脏穿刺检查来确定免疫活化期的开始并给与抗病毒治疗。但肝脏穿刺检查为有创操作，有一定的安全风险，部分病人拒绝接受。寻找有效的生物学标志物来区别慢性HBV感染的免疫耐受期及免疫活化期是目前的研究热点。依据前期的实验结果我们在分子水平发现FcγRs在免疫耐受期及免疫活化期患者之间有明显差异，现研究NK细胞、B细胞、单核细胞表面研究FcγRs的表达差异，探讨FcγRs在不同免疫细胞表面的表达对于临床诊治的指导意义。

12

# 第**3**章 资料与方法

## **3.1** 研究对象

### **3.1.1** 研究对象来源

吉林大学第一医院肝胆胰内科门诊及住院的HBV感染者。健康对照来源于健康体检者。

### **3.1.2** 慢性**HBV**感染者及健康对照入选标准及排除标准

#### 1、纳入标准

##### （1) HBV感染者

①乙型病毒性肝炎血清学标志物显示：HBsAg（+）半年以上，诊断符合《慢性乙型肝炎防治指南》[[4](#_bookmark28)]。

②乙型肝炎病史：家族史、输血史、接触史、药物治疗史。

③肝脏超声或肝胆CT及肝脏核磁、Fibroscan等：肝脏有实质性病变，但未提示肝硬化。

④既往无长期酗酒史，无家族遗传病史。

⑤从未接受抗HBV治疗（核苷类似物或干扰素治疗）。

⑥无其他脏器疾病，如冠状动脉粥样硬化性心脏病、高血压、糖尿病、恶性肿瘤等。

##### （2）健康对照

①年龄18-65岁。

②既往未感染过乙型肝炎病毒。

③入组时检测乙肝血清学标志物提示各项指标（-）或仅有HBsAb（+）。

④无甲型、丙型、戊型肝炎病毒的感染。

⑤既往无长期饮酒史。

⑥影像学检查未提示肝脏器质性病变。

13

⑦无其他脏器疾病，如冠状动脉粥样硬化性心脏病、高血压、糖尿病、恶性肿瘤等。

#### 2、排除标准

（1）合并HBV以外其他类型病毒性肝炎。

（2）有原发性肝癌或其他恶性肿瘤疾病者。

（3）排除由药物性、脂肪性、自身免疫性等其他因素引起的转氨酶升高。

#### 3、入选时检查项目

##### （1）检查项目：包括乙型病毒性肝炎血清学标志物5项、HBV DNA、HBsAg、甲型、丙型、戊型病毒性肝炎抗体、HIV抗体、肝功。

##### （2）肝脏超声或肝胆脾CT及MRI检查。

##### （3）签署知情同意书：符合入组标准的患者经过沟通后，均签署了知情同意书。

### **3.1.3** 分组标准

将患者分为三组：乙肝感染成功清除组、慢性乙型病毒性肝炎免疫活化组、慢性乙型病毒性肝炎免疫耐受组。慢性乙型病毒性肝炎诊断标准参考2009年美

国肝病年会《慢性乙型肝炎防治指南》。[[4](#_bookmark28); [78](#_bookmark32)]急性乙型病毒性肝炎诊断依据第 7

版传染病学诊断标准进行诊断。

1、急性乙肝感染成功清除诊断标准：急性起病，HBsAg(+)，HBcAb（+），可以有黄疸、肝区不适等症状及体征，但无慢性肝病及肝硬化及其并发症的体征，如脾大、腹水等。患者无既往HBV相关慢性肝病病史。近期可以有HBV暴露史。随访患者发现HBsAg转阴，未检测到HBV DNA。

2、慢性乙型肝炎活化期诊断标准：HBsAg和HBV DNA阳性大于6个月；血清ALT、AST水平持续或间断性升高；肝活检显示慢性肝炎，中或重度坏死性炎症。

#### 3、慢性乙型肝炎免疫耐受期诊断标准：HBsAg或HBV DNA阳性大于6个月，

HBeAg阳性，血清ALT、AST在1年内连续三次以上在正常范围内。

14

## **3.2** 主要试剂及仪器

1、流式细胞仪检测相关试剂：CD3—PE-Cy7(美国BD公司)；CD56—APC（美国BD公司）；

CD16—FITC（美国BD公司）；

CD19—APC（美国BD公司）；

CD5—PE（美国BD公司）；

CD32—FITC（美国BD公司）；

CD3—APC（美国BD公司）；

CD4—PE-Cy7（美国BD公司）；

CD8—PE（美国BD公司）；

CD14—PE（美国BD公司）；

CD16—FITC（美国BD公司）；

CD64—FITC（美国BD公司）；

红细胞裂解液（美国BD公司）；生理盐水（四川科伦）；

2%多聚甲醛（北京化学试剂公司）；流式试管（美国BD公司）。

2、患者血液学检查相关试剂及仪器：乙肝血清学标志物使用美国雅培公司ARCH I2000 PLUS全自动化学发光仪检测，由雅培公司提供配套试剂，检测范围为0.05～125000 IU/mL. HBV DNA定量使用ABI 7300实时PCR扩增仪检测，试剂盒有塞尔奇生物技术有限公司提供，检测下限为500IU/ml。

3、BD公司CBA Flex Set试剂盒：Human IL-1βFlex Set、Human IL-6 Flex Set、Human IL-10 Flex Set、Human IL-12p70 Flex Set、Human TNF Flex Set、Human MIP-1βFlex Set。

15

## **3.3** 实验方法

### **3.3.1** 各免疫细胞上**FcγRs**检测方案及**T**细胞检测方案

#### 1、取六份新鲜EDTA抗凝血各100ul。

#### 2、分别加入下列六组荧光标记抗体：①CD3—PE-Cy7、CD56—APC 、

CD16—FITC各2ul②CD3—PE-Cy7、CD19—APC、CD5—PE、CD32—FITC 各

2ul③CD3—APC、CD4—PE-Cy7、CD8—PE各2ul④CD14—PE、CD16—FITC

各2ul⑤CD14—PE、CD32—FITC各2ul⑥CD14—PE、CD64—FITC各2ul。

#### 3、各管震荡混匀后避光,室温孵育30min。

#### 4、在上述流式样品管内加入红细胞裂解液1ml,震荡,室温避光3min。

#### 5、将六支流式上样管置之于离心机中,1600r离心8min,倒弃上清液,加入2ml

生理盐水洗涤一次。

#### 6、每管加入2%的多聚甲醛进行固定。

#### 7、上机前充分混匀细胞悬液，仪器参数设定后，每管样本获取15万个有核细胞的荧光和散射光信号。各细胞设门策略见图3.1、图3.2、图3.3、图3.4。

16

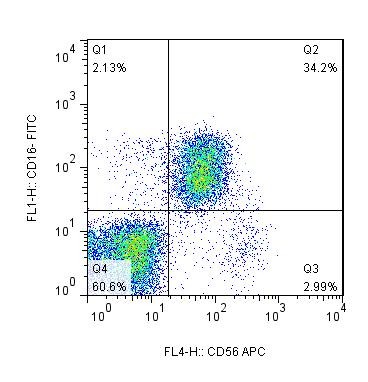
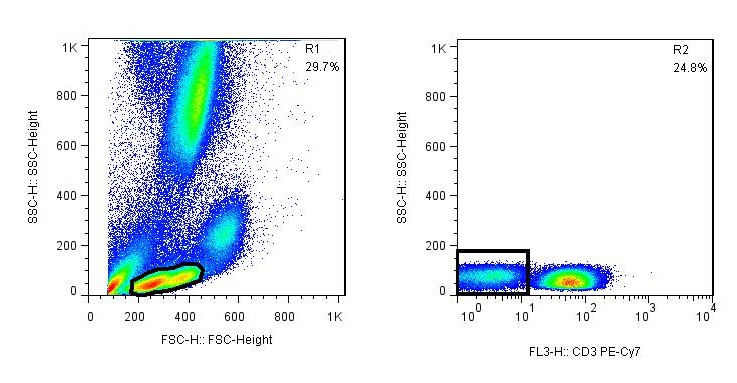


图3.1 外周血NK细胞亚群设门示意图

注：通过FSC及SSC设定淋巴细胞区（椭圆形圈定）；进一步通过CD3分子区分CD56+CD16-、CD56+CD16+、CD56-CD16+淋巴细胞亚群

17



R3

R4

R5

阴性对照

R6

图3.2.1 外周血B细胞表面FcγR II设门策略

18



图3.2.2 外周血B细胞表面FcγR II设门策略 B

注：图3.2.1通过FSC及SSC设定单核细胞区（椭圆形圈定）确定淋巴细胞亚群，而后通过CD3分子圈门确定CD19+CD5+及CD19+CD5+B细胞亚群，进一步圈出相应细胞检测其表面CD32分子表达情况。图3.2.2通过FSC及SSC设定单核细胞区（椭圆形圈定）确定淋巴细胞亚群，而后通过CD3分子圈门确定

CD19+CD32+及CD5+CD32+B细胞亚群。

19



图3.3 外周血单核细胞表面FcγRs设门策略

注：通过FSC及SSC设定单核细胞区（椭圆形圈定），而后一步确定CD14highCD16+、CD14+CD32+、

CD14+CD64+单核细胞亚群。

20



图3.4 外周血T细胞设门策略

注：通过FSC及SSC设定淋巴细胞区（椭圆形圈定）依据CD3分子圈门确定CD8+T细胞、CD4+T细胞

### **3.3.2** 细胞因子的检测

#### 1、制备细胞因子标准品

##### （1）打开冻干的IL-1β、IL-10、MIP-1β、IL-12p70、TNF、IL-6标准品各一管，将标准品小球转移到一支15 mL锥形离心管中，并标记该管为最高浓度标准品。

##### （2）用4 mL Assay Diluent重悬标准品。

##### （3）重悬后的标准品溶液需室温下平衡至少15分钟。用吸头轻轻混匀标准

品。

21

##### （4）取出9根12×75mm流式上样管，分别标记梯度稀释的倍数1: 2、1:4、1:8、

1:16、1:32、1:64、1:128、1:256.

##### （5）每管各加Assay Diluent 500ul。

##### （6）梯度稀释标准品

#### 2、混合人细胞因子捕获微球

（1）确定实验管数（包括标准品和对照管），计算捕获微球需要量，计算微球稀释液的需要量。

（2）混合前每种捕获微球需充分涡旋3-5秒。

（3）将所有6种捕获微球都装入一根流式管中，标记为“混合微球”。

（4）充分涡旋混匀。

#### **3**、 重悬微球

（1）加入0.5ml的wash buffer并200g离心5min。

（2）小心吸去上清液，避免吸去微球沉积

（3）使用微球稀释剂重悬微球，保证每个标本50ul/test的量

（4）重悬微球室温孵育15min

#### 4、 可溶性蛋白PE检测试剂的制备（避光）

（1）计算PE Detection reagent工作浓度的需要量，PE Detection reagent原液需要量，Detection reagent Diluent的需要量。

（2）将Detection reagent和Detection reagent Diluent移入一个离心管内标记混合PE Detection reagent，4℃避光保存。

#### 5、 流式细胞仪的调整：用流式仪器调整微球进行实验条件的设置

#### 6、 实验操作

实验前，需准备好标准品、混合捕获微球。

（1）涡旋混匀混合好的捕获微球，每个实验管都加入50ul。

（2）标准品管中每管加入50ul梯度稀释好的标准品

（3）样本管中每管加入50ul待测样本。

（4）室温避光孵育1小时

（5）加50ul混合PE Detection reagent至待测样品管中，轻轻混匀流式上样管。

22

（6）室温孵育2h

（7）加1ml洗液在每个待测样品管中，200g离心5min。

（8）小心吸去上清液

（9）加入300ul的wash buffer在每个样品管中，涡旋样品管重悬微球。

（10）上机检测样品

（11）使用FCAP Array软件进行数据分析。

## **3.4** 统计方法

采用SPSS18.0统计软件进行数据处理。非正态分布计量资料使用秩和检验

（Mann Whitney test）分析任意两组间数据。四组间数据比较*P*＜0.0083为有统计学意义。血清HBsAg及HBV DNA数据进行对数转换。相关性分析采用

Spearman法，检验水准经Banferryoni法矫正，P＜0.002有统计学差异。

23

# 第**4**章 结 果

## **4.1** 研究对象临床特点

依据前述入组标准，共收集样本74例，依据HBV病毒感染自然史的变化，处于免疫耐受期的患者年龄偏小。乙肝感染成功清除组患者年龄偏大。（表1）

表1 研究对象的一般信息和临床特点

Table 1 The characteristics of patients and healthy controls

| Paraments | HBISC | IT | IA | HC |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Individual | 7 | 16 | 31 | 20 |
| Age | 39.86±11.70 | 30.69±4.98 | 33.68±9.88 | 28.35±7.20 |
| Gender，number(%) |  |  |  |  |
| Male | 1(14.3) | 7(43.8) | 25(80.6) | 14(0.7) |
| Female | 6(85.7) | 9(56.2) | 6(19.4) | 6(0.3) |
| HBV DNA | 4.83±1.96 | 8.33±0.18 | 6.58±1.94 | — |
| (Log10 copies/ml) |  |  |  |  |
| HBsAg  (Log10 IU/ml) | 2.21±1.30 | 4.78±0.21 | 3.56±0.90 | — |
| ALT(U/L) | 599.2 | 38.5 | 588.8 | 24.5 |
| median(range) | (110.3-1685.6) | （23.0-45.0） | （172.5-2248） | （3.0-49.0） |
| AST(U/L) | 160.4 | 30.5 | 245.6 | 21.5 |
| median(range) | （59.9-1352.8） | (11.0-46.0) | (64.3-1384.0) | (13.0-36.0) |

注：Normal values: ALT≤40U/L; AST≤46U/L; HBV≤500IU/ml. HBISC: Hepatitis B successfully cleared; IT: Immune tolerant phase; IA: Immune active phase; HC: healthy controls; HBsAg: Hepatitis B surface antigen; AST: Aspartate transaminase; ALT Alanine aminotransaminase.

## **4.2** 健康对照组不同年龄组**FcγRs** 的表达情况

24

将健康度对照患者依据年龄分组，第一组平均年龄25.07±1.23岁，第二组平均年龄38.2±8.90岁。对这两组FcγRs的表达情况进行分析，发现无统计学差异

（图4.1）。这提示在此次实验中年龄可能对FcγRs在各免疫细胞上的表达影响较小。



图4.1 健康对照组中1组和2组各细胞表面FcγRs表达无差异

注：1组表示小年龄组，2组表示大年龄组

25

## **4.3** 不同免疫状态下**FcγRs**的表达情况

### **4.3.1** 各组间**FcγR III**（**CD16**）在**NK**细胞上表达情况

（1）外周血中NK细胞比例变化：免疫活化期患者外周血淋巴细胞中总NK细胞比例较免疫耐受期患者（中位数7.80% vs 15.13%, *P*＜0.001）和健康对照组减少（中位数7.80% vs 18.69%, *P*=0.001））。乙肝感染成功清除组患者总NK细胞比例较健康对照组明显减少（中位数6.67% vs 18.69%, *P*=0.002）。余组间比较未见明显统计学意义。（见表2，图4.7）

(2)外周血中CD3-CD56+CD16+NK细胞比例变化：免疫活化期组患者中

CD3-CD56+CD16+NK细胞比例明显低于免疫耐受期组患者（中位数6.00% vs

13.22%，*P*=0.001）和健康对照（中位数6.00% vs 17.62%, *P*＜0.001）。乙肝感染成功清除组患者CD3-CD56+CD16+NK细胞比例较健康对照组明显减少（中位数5.66% vs 17.62%, *P*=0.002）。乙肝感染成功清除组较免疫耐受期组比较差异无统计学意义，但可见乙肝感染成功清除组CD3-CD56+CD16+NK细胞比例较免疫耐受期组有下降趋势。（见表2，图4.2，图4.7）

（3）外周血中CD3-CD56-CD16+NK细胞及CD3-CD56+CD16-NK细胞比例变

化：组间比较未见明显统计学意义（*P*＞0.0083）。

26

表2 四组总NK细胞及其亚群细胞占外周血淋巴细胞比例

Table 2 Total NK cell and its subsets in peripheral blood’s lymphocytes

Groups HC HBISC IA IT

Total NK cells (%)

18.69

（13.55,23.73）

6.67

（5.72,9.16）

7.80

(5.41, 11.56)

15.13

（9.81,18.80）

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| CD3-CD56+ | 18.31 | 6.26 | 7.16 | |
| (%) | （12.22,22.97） | （5.28,7.98） | （4.57,10.10） |  |
| CD3- CD16+ | 17.99 | 6.07 | 7.11 | 14.49 |
| (%) | （12.99,22.80） | （5.12,8.59） | （4.23,10.12） | （8.62,18.14） |
| CD3-CD56+CD16- | 0.73 | 0.60 | 1.04 | 0.71 |
| （%） | （0.59,0.99） | (0.57,0.63) | （0.52,1.45） | （0.56,0.83） |
| CD3-CD56+CD16+ | 17.62 | 5.66 | 6.00 | 13.22 |
| （%） | （11.69,22.29） | (4.71,7.42） | (3.61,9.13) | (7.94,16.57) |
| CD3-CD56-CD16+ | 0.65 | 0.45 | 0.71 | 1.05 |
| (%) | (0.44,0.87) | （0.41,1.18） | (0.45,0.89) | (0.55,1.44) |

13.74(9.34,17.22)

注：HC代表健康对照；HBISC代表乙肝感染成功清除组；IT代表免疫耐受期；IA代表免疫活化期。

27





HC IT



IA HBISC

图4.2 四组间 CD3-CD56+CD16+NK细胞亚群表达差异

28

### **4.3.2** 各组间Fcγ**II**（**CD32**）在**B**细胞上表达情况

（1）外周血中CD3-CD5+-B细胞比例及CD3-CD19+B细胞比例变化：免疫活化期患者CD3-CD5+-B细胞比例较健康对照组患者升高（中位数3.95% vs 2.22%，

*P*=0.005）。CD3-CD19+B细胞比例与其他组比较未见明显统计学差异。（见表

3）

(2)外周血中CD3-CD19+CD5-B细胞比例变化：免疫活化期组患 者

CD3-CD19+CD5-B细胞比例较免疫耐受期组升高（中位数8.10% vs 5.34%，

*P*=0.006）。余组间比较未见统计学差异。（见表3，图4.3，图4.8）

(3)外周血中CD3-CD19+CD5+B细胞比例变化：免疫活化期患者CD3-CD19+CD5+B细胞比例较健康对照组升高，差异有统计学意义（中位数3.35% vs 1.45%, *P*=0.006）。余组间比较未见统计学差异。（见表3，图4.3，图4.8）

(4)外周血中CD3-CD19+CD32+细胞比例变化：免疫活化期组CD3-CD19+CD32+B细胞比例较免疫耐受期组（中位数11.68% vs 7.28%, *P*=0.008）及健康对照组（中位数11.68% vs 7.28%, *P*=0.008）升高。余组间比较未见统计学意义。（见表4，图4.4，图4.9）

(5)外周血中CD3-CD5+CD32+B细胞比例变化：免疫活化期组CD3-CD5+CD32+B细胞比例较健康对照组（中位数3.37% vs 1.46%, *P*=0.002）升高。余组间比较未见统计学意义。（见表4，图4.5，图4.9）

（6）外周血中CD3-CD19+CD5-CD32+B细胞比例变化：免疫活化期组患者

CD3-CD19+CD5-CD32+B细胞比例较免疫耐受期组患者升高（中位数7.77% vs

5.22%，*P*=0.004）。余组间比较未见统计学意义。（见表4，图4.9）

（7）外周血中CD3-CD19+CD5+CD32+B细胞比例变化：免疫活化期组患者

CD3-CD19+CD5+CD32+B细胞比例较健康对照组升高（中位数3.26% vs 1.34%，

*P*=0.006）。余组间比较未见统计学意义（P＞0.0083）。（见表4，图4.9）(8) CD3-CD19+ B细胞、CD3-CD5+ B细胞、CD3-CD19+CD5-B细胞 、

CD3-CD19+CD5+B表面的CD32表达百分比组间比较无统计学差异（P＞0.0083）。

29

表3 四组患者各B细胞亚群比例的比较

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Groups HC | HBISC | IA | IT |
| 7.72 | 6.75 | 12.40 | 7.91 |
| (6.31,11.20) | (5.75,9.92) | (8.12,17.20) | (6.73,9.95) |
| 2.22  CD3-CD5+ (%) | 1.82 | 3.95 | 2.73 |
| (1.51,3.54) | (1.55,3.22) | (2.49,5.93) | (1.80,4.35) |
| 5.95  CD3-CD19+CD5- (%) | 5.78 | 8.10 | 5.34 |
| （4.27，7.05） | （3.40,6.95） | （6.18,12.21） | （4.66,6.99） |
| 1.45 | 1.57 | 3.35 | 1.85 |
| (1.14,2.71) | (0.87,2.93) | (1.63,5.49) | (1.20,3.27) |

Table 3 The percent of different subsets of B cells

CD3-CD19+ (%)

CD3-CD19+CD5+(%)

注：HC代表健康对照；HBISC代表乙肝感染成功清除组；IT代表免疫耐受期；IA代表免疫活化期。

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Groups HC | HBISC | IA | IT |
| 7.09 | 6.64 | 11.68 | 7.28 |
| (5.42,9.84) | (4.99,9.09) | (7.84,16.49) | (6.06，9.49) |
| 1.46 | 1.7 | 3.37 | 1.98 |
| (1.26,2.64) | 1(0.97,2.63) | (1.94,5.18) | (1.26,2.52) |
| 5.81 | 5.47 | 7.77 | 5.22 |
| (4.18,6.85) | (3.22,6.13) | (5.82,10.59) | (4.41,6.68) |
| 1.34 | 1.49 | 3.26 | 1.58 |
| (1.04,2.57) | (0.73,2.70) | (1.58,5.09) | (1.12,3.17) |

表4研究对象B细胞亚群细胞及其表面CD32在外周血淋巴细胞中的比例Table 4 The percent of CD32 on different subsets of B cell in peripheral blood's lymphocytes

CD3-CD19+CD32+ (%)

CD3-CD5+CD32+ (%)

CD3-CD19+ CD5-CD32+ (%)

CD3-CD19+ CD5+ CD32+ (%)

注：HC代表健康对照；HBISC代表乙肝感染成功清除组；IT代表免疫耐受期；IA代表免疫活化期。

30





HC IT



IA HBISC

图4.3 四组间 CD3-CD19+CD5-B细胞、CD3-CD19+CD5+B细胞表达差异

31



HC IT



IA HBISC

图4.4 四组间 CD3-CD19+CD32+B细胞表达差异

32



HC IT



IA HBISC

图4.5 四组间 CD3-CD5+CD32+B细胞表达差异

33

### **4.3.3** 各组间**FcγRs**在单核细胞上表达情况

（1）免疫活化期组CD14highCD16+非经典单核细胞较免疫耐受期组（中位数8.04% vs 4.84%, *P*＜0.001）和健康对照组（中位数8.04% vs 3.59%, *P*＜0.001）升高，差异有显著统计学意义。乙肝感染成功清除组患者CD14highCD16+单核细胞较健康对照组升高（中位数7.96% vs 3.59%, *P*=0.002），差异有统计学意义。

（见表5，图4.6，图4.10）CD14highCD16-经典单核细胞及CD14-CD16+非经典单核细胞组间比较未见明显统计学差异（P＞0.0083）。

（2）免疫活化期组、免疫耐受期患者、乙肝感染成功清除组患者、健康对照组单核细胞CD14+CD32+、CD14+CD64+细胞比例在任意两组间比较无明显差异

（P＞0.0083）。

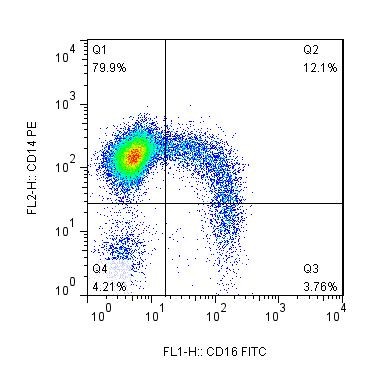
表5 四组单核细胞表面FcγRs比例

Table 5 The percent of Fcγreceptors on monocytes

| Subset of monocytes |  | | |
| --- | --- | --- | --- |
|  | CD14highCD16+ | CD14+CD32+ | CD14+CD64+ |
| （%） |  |  |  |
| HC | 3.59(2.89,5.49) | 24.08(2.11.86.83) | 84.15(75.40.88.88) |
| HBISC | 7.96(4.64,12.00) | 3.39(1.79,76.00) | 83.70(77.10,90.40) |
| IA | 8.04(5.82,10.80) | 79.4(3.18,87.00) | 86.60(79.70,90.20) |
| IT | 4.84(2.46,6.71) | 73.65(2.16,84.93) | 83.75(79.80,88.25) |

注：HC代表健康对照；HBISC代表乙肝感染成功清除组；IT代表免疫耐受期；IA代表免疫活化期。

34



HC IT

IA HBISC

图4.6 四组间 CD14highCD16+单核细胞表达差异

### **4.3.4** 各组间**CD4+T**细胞及**CD8+T**细胞差异

35

慢性乙型病毒性肝炎活化期患者、免疫耐受期患者、乙肝感染成功清除组患者、健康对照组CD3-CD4+T和CD3-CD8+T细胞比例及CD3-CD4+/CD3-CD8+比例组间比较未见明显统计学差异。



图4.7 四组间总NK细胞比例比较

注：\*表示*P*＜0.05，\*\*表示*P*＜0.01，\*\*\*表示*P*＜0.001



图4.8 四组间总CD3-CD5+、CD3-CD19+CD5-B细胞、CD3-CD19+CD5+B细胞比例比较

注：\*表示*P*＜0.05，\*\*表示*P*＜0.01，\*\*\*表示*P*＜0.001

36



图4.9 四组间总 CD3-CD19+ CD32+、CD3-CD5+ CD32+B细胞比例比较

注：\*表示*P*＜0.05，\*\*表示*P*＜0.01，\*\*\*表示*P*＜0.001



图4.10 四组 CD14highCD16+单核细胞比例比较

注：\*表示*P*＜0.05，\*\*表示*P*＜0.01，\*\*\*表示*P*＜0.001

37

## **4.4** 慢性乙肝患者临床指标与**FcγRs**的相关性

HBV DNA和HBsAg是反应病毒复制的良好指标。随着慢性乙型肝炎自然史的进展，血清HBsAg水平变化贯穿于慢性乙型肝炎感染的不同时期。血清

HBsAg水平在慢性乙型肝炎免疫耐受期时较高，随着进入免疫清除期开始下降。

[[2](#_bookmark28)]有文献报道指出低水平的血清HBsAg水平与肝脏组织纤维化进展程度相关。

[[79](#_bookmark32)] HBsAg水平与肝内cccDNA水平、血清HBVDNA、ALT及高炎症评分相关。

[[80](#_bookmark32)]目前国内使用ALT、AST来判断免疫分期。ALT主要由肝细胞膜破坏从肝细胞释放入血液中。AST主要为肝细胞内线粒体膜破坏后释放入血。现分析血清

HBsAg、HBV DNA、ALT、AST等临床指标与各细胞FcγRs进行相关性分析，检验水准经Banferryoni法矫正后为0.002。

##### （1）NK细胞CD3-CD56+CD16+亚群与ALT、AST、血清HBsAg、血清HBV DNA

无明显相关性（P＞0.002）。（见图4.11）

##### （2）单核细胞亚群CD14+CD16+与ALT呈显著正相关（*r*=0.694，*P*＜0.001），与AST呈显著正相关（*r*=0.698，*P*＜0.001），与血清HBsAg呈显著负相关

（*r*=-0.614, *P*＜0.001），与血清HBV DNA低度负相关（*r*=-0.446, *P*=0.0017）。

(3) B细胞 CD3-CD19+CD32+ 亚 群 、CD3-CD5+CD32+ 亚 群 、

CD3-CD19+CD5-CD32+亚群、CD3-CD19+CD5+CD32+亚群与ALT、AST、血清

HBsAg、血清HBV DNA无明显相关性（*P*＞0.002）。

38



图4.11 CD14highCD16单核细胞与临床指标的相关性

## **4.5** 四组患者血浆细胞因子比较

（1）免疫活化期组IL-6水平为（4.52±4.09 pg/mL）较免疫耐受期组（2.01±0.45

pg/mL，*P*＜0.001）和健康对照组（2.40±1.14 pg/mL, *P*=0.001）明显升高。

（2）免疫活化期组IL-1β水平（11.25±5.76 pg/mL）较免疫耐受期组（8.28±0.67

pg/mL，*P*＜0.001）和健康对照组（2.40±1.14 pg/mL, *P*＜0.001）明显升高。

##### （3）免疫活化期组IL-10水平（9.82±4.50 pg/mL）较免疫耐受期组（6.87±0.65

pg/mL，*P*＜0.001）和健康对照组（6.43±0.4 pg/mL, *P*＜0.001）明显升高。乙肝感染成功清除组IL-10水平（7.72±0.76 pg/mL, *P*=0.001）较健康对照组（6.43±0.4

pg/mL，*P*=0.002）升高。

##### （4）免疫活化期组TNF水平（8.55±5.14 pg/mL）较免疫耐受期组（5.82±0.56

pg/mL，*P*=0.001）和健康对照（5.95±1.06 pg/mL, *P*=0.001）组明显升高。

39

##### （5）免疫活化期组MIP-1β水平（29.32±17.96 pg/mL）较免疫耐受期组

（12.84±4.64 pg/mL, *P*＜0.001）和健康对照（13.81±4.64 pg/mL, *P*＜0.001）组明显升高。

##### （6）免疫活化期组IL-12p70水平（8.13±6.96 pg/mL）较免疫耐受期组

（5.41±0.39 pg/mL, *P*＜0.001）和健康对照（5.65±0.64 pg/mL, *P*＜0.001）组明显升高。乙肝感染成功清除组（6.06±0.52 pg/mL）较免疫耐受期组（5.41±0.39

pg/mL，*P*=0.007）升高。

表6 四组患者的细胞因子

Table 6 Cytokine in different groups

| Groups | IL-6  (pg/mL) | IL-1β  (pg/mL) | IL-10  (pg/mL) | TNF  (pg/mL) | MIP-1β  (pg/mL) | IL-12p70  (pg/mL) |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| HBISC | 2.55±0.88 | 8.38±0.40 | 7.72±0.76 | 6.10±0.41 | 16.27±3.41 | 6.06±0.52 |
| IT | 2.01±0.45 | 8.28±0.67 | 6.87±0.65 | 5.82±0.56 | 12.84±4.64 | 5.41±0.39 |
| IA | 4.52±4.09 | 11.25±5.76 | 9.82±4.50 | 8.55±5.14 | 29.32±17.96 | 8.13±6.96 |
| HC | 2.40±1.14 | 8.49±1.02 | 6.43±0.47 | 5.95±1.06 | 13.81±4.64 | 5.65±0.64 |

注：HC代表健康对照；HBISC代表乙肝感染成功清除组；IT代表免疫耐受期；IA代表免疫活化期。

40





图4.12 四组细胞因子的比较

41

# 第**5**章 讨 论

NK细胞是固有免疫中重要的大颗粒淋巴细胞，它们不仅能直接杀伤细胞还能分泌免疫调节因子，如：IFN-γ等。NK细胞可以通过杀死未成熟的树突状细胞和分泌炎性细胞因子、趋化因子招募其他免疫细胞到感染部位 。

[[81](#_bookmark33)] CD3-CD56+CD16+主要为细胞毒细胞，可以激活抗病毒感染细胞[[82](#_bookmark33)]。FcγR

III(CD16)是FcγRs家族中的活化性受体，当抗体的Fc段与FcγR III对接后，其与NK细胞所含的ζ二聚体连接后向胞内传导活化信号，这时NK细胞就会执行抗体依赖的细胞毒作用，从而破坏靶细胞。95%CD56dimNK细胞表达FcγR III，有执行ADCC的能力，50%-70%的CD56brightNK细胞缺乏FcγR III或仅仅表达低密度的FcγR III,很少参与ADCC作用。我们的研究发现免疫活化期患者总NK细胞比例及CD3-CD56+CD16+亚群细胞较慢性乙型肝炎免疫耐受期患者及健康对照组减少，这可能会导致执行ADCC的能力减弱。有学者提出CD3-CD56+CD16+细胞数量减少会导致HBV 持久性感染。[[50](#_bookmark30)]在慢性乙型肝炎感染的不同时期，

NK细胞的活化程度也不同。[[83](#_bookmark33)]但有研究显示虽然在慢性乙型肝炎免疫活化期CD3-CD56+CD16+NK亚群比例下降，但NK细胞杀伤能力却增强了。[[84](#_bookmark33)]乙肝感染成功清除组患者总NK细胞比例及CD3-CD56+CD16+亚群较健康对照组患者降低。虽然CD3-CD56+CD16+亚群细胞下降，这也许会影响NK细胞的ADCC作用，但有文献报道在急性乙型病毒性肝炎时NK细胞毒性是增强的，对靶细胞—NK细胞敏感K562细胞的细胞毒性增强。[[85](#_bookmark33)]。

有学者提出慢性乙型病毒性肝患者的体液免疫相对亢进。[[86](#_bookmark33)]我们的实验结果发现在免疫活化期组患者CD3-CD19+CD5-B细胞比例较免疫耐受期组患者升高。CD3-CD19+CD5-B细胞比例在免疫活化期时升高，同样可能提示了体液免疫的亢进。

在本实验中慢性乙型病毒性肝炎免疫活化期患者CD3-CD19+CD5+B细胞比例较健康对照组升高。免疫活化期组CD3-CD19+CD5+B细胞比例与免疫耐受期组比较时虽无统计学意义但其有升高趋势。既往有学者提出在HBV感染的不同时期CD19+CD5+ B细胞表达不同，提示CD19+CD5+ B细胞可能与乙型肝炎的慢性化进展相关。[[87-89](#_bookmark33)]另一方面有国内学者提出CD19+CD5+B细胞在病毒性肝炎

42

中具有保护作用。[[90](#_bookmark33)]有文献指出破坏CD5+B细胞数量的正常调节多与自身免疫性疾病及慢性淋巴细胞白血病相关。[[91](#_bookmark33)]近期有研究显示慢性乙型肝炎患者与非霍奇金淋巴瘤、弥漫大B细胞淋巴瘤、滤泡淋巴细胞瘤、T细胞淋巴细胞瘤相关。

[[92-94](#_bookmark33)]在慢性乙型病毒性肝炎的发展过程中，许多患者都有病毒特异性免疫受损和

免疫系统一些缺陷，CD5+B细胞像一把双刃剑，而具体CD5+B细胞如何影响人体免疫系统有待于我们进一步研究。有研究提出在大鼠肝切除术后的外周血和再生肝组织中检测到CD5+B细胞明显升高[[95](#_bookmark33)]，这提示CD5+B细胞与肝脏组织再生相关，这为我们进一步研究提供了新的思路。乙肝感染成功清除组患者B细胞亚群较健康对照组及免疫耐受期组无明显变化，这可能提示乙肝感染成功清除组患者与免疫活化期组患者的发病机制不同，有待于我们进一步分析。

FcγR IIb（CD32）是B细胞表面唯一的Fcγ家族受体。慢性乙型病毒性肝炎免疫活化期CD3-CD19+CD32+B细胞较免疫耐受期及健康对照组明显升高，CD3-CD5+CD32+B细胞较健康对照组升高。FcγR IIb是固有免疫及获得性免疫的负向调控因子。慢性乙型病毒性肝炎免疫活化期时患者体液免疫亢进，我们猜想这可能会使得CD32+的B细胞增多来控制B细胞过分活化及增值，但在CD3-CD19+CD5+、CD3-CD19+CD5+B细胞表面CD32比例与其他组比较无明显统计学差异。本课题组前期PCR实验提示在慢性乙型病毒性肝炎免疫活化期

FcγRIIb表达水平低于慢性乙型肝炎免疫耐受期。[[6](#_bookmark28)]本实验研究发现CD3-CD19+、CD3- CD5+、CD3-CD19+CD5+、CD3-CD19+CD5+B细胞表面CD32比例与其他组

比较无明显统计学差异。这说明在免疫活化期时PBMC中FcγR IIb mRNA水平是下降的，这提示可能在其他免疫细胞上表达的FcγR IIb是下降的，这有待我们进一步研究。

慢性乙型病毒性肝炎免疫活化期单核细胞表面FcγR III（CD16）较慢性乙型病毒性肝炎免疫耐受期及将抗对照组升高。FcγR III与ALT及AST呈显著正相关，与HBsAg呈显著负相关，与HBV DNA呈低度负相关。有国外学者在体外实验发现单核细胞可以识别并回应HBsAg，产生多种促炎因子。[[96](#_bookmark33)]结合我们的实验结果CD14highCD16+细胞与HBsAg呈显著负相关，这可能提示CD14highCD16+单核细胞可能参与肝脏炎症反应并参与清除HBsAg。肝脏中的CD14highCD16+细

43

胞可以从血液中CD14highCD16+招募而来也可由肝脏CD14highCD16-细胞分化而来。[[62](#_bookmark31)]因此我们通过研究血中CD14highCD16+细胞的比例间接反映肝脏内炎症状况。我们发现慢性乙型肝炎免疫活化期患者血液循环中CD14highCD16+单核细胞增多，但CD14+CD32+及CD14+CD64+单核细胞与其他组相比无统计学意义。有学者提出CD14highCD16+细胞与整个慢性乙型肝炎疾病进程相关，CD14highCD16+细胞功能与肝脏持续炎症及纤维化肝内星状细胞活化相关。[[64](#_bookmark31); [97-99](#_bookmark33)]有趣的是，

NK细胞表面FcγR III减少而单核细胞表面FcγR III增多，这可能是由于在NK细胞和单核细胞FcγR III基因转录的差异。[[100](#_bookmark34)]本课题组前期人外周血PBMC中FcγRs的PCR实验结果提示慢性乙型肝炎免疫活化期患者FcγR IIIa及FcγR IIIb比慢性乙型病毒性肝炎免疫耐受期表达高。[[6](#_bookmark28)]这说明了基因转录水平上FcγR III是升高的。乙肝感染成功清除组患者的CD14highCD16+单核细胞也增多，这提示在HBV感染急性期CD14highCD16+单核细胞可能参与了清除HBV的免疫反应。

CD14highCD16+细胞的比例升高与慢性乙型肝炎疾病进展相关，与肝脏炎症存在相关并与促纤维化星状细胞活化相关。[[64](#_bookmark31)]肝硬化患者病情越重，则单核细胞及

CD14highCD16+单核细胞频率越高。[[101](#_bookmark34)]这可能提示CD14highCD16+单核细胞在整个

HBV感染的自然进程中有重要作用。

我们的研究显示CD3-CD4+T细胞及CD3-CD8+T细胞在各组间没有统计学差异，这可能是由我们入组病人尚少所致。一项包含422个患者的研究显示免疫耐受期的患者CD8+T细胞较免疫活化期明显高，在免疫耐受期和免疫活化期CD8+T细胞较CD4+T细胞多。[[102](#_bookmark34)]另一方面有文献指出在成年HBV感染病人中，HBV特异性CD8+T细胞数量与肝脏的炎症程度不成正比。[17]在急性HBV感染中并没有检测到外周血HBV特异性CD8+T细胞的升高。[18]这与既往认为HBV特异性CD8+T细胞是使得HBV感染肝细胞坏死的主要效应细胞的概念不一致。

我们的研究结果发现免疫活化期的IL-6、IL-10、IL-1β、TNF、MIP-1β、IL-12p70因子水平较免疫耐受期组升高。IL-1β由单核/巨噬细胞、中性粒细胞、肝细胞合成，具有广泛生物学效应。有文献报道IL-1β、TNF-α可以通过氧化应激抑制HBV复制。[[103](#_bookmark34)]印度报道IL-1β基因多态性与乙肝病毒相关并发症相关。[[104](#_bookmark34)] IL-10可以抑制炎症，并可以通过诱导Bcl-2和BclxL的表达作为一个肝

44

损伤的保护因素[[105](#_bookmark34); [106](#_bookmark34)]。在Li Wang的文章中提到IL-10与ALT有较好的相关性

[[107](#_bookmark34)]. 另一篇文章中也提到HBV相关的慢加急性肝衰竭中IL-10可以作为早期预测因子并与ALT有很好的相关性。[[108](#_bookmark34)]产生IL-6的细胞主要有单核/巨噬细胞、成纤维细胞、Th2细胞和B细胞等，肝细胞表面表达有IL-6R,有文献报道在IL-6可以在转录水平抑制HBV复制，在慢性乙型肝炎急性爆发中与ALT呈正相关，可能与肝细胞损害程度成正相关。[[109-112](#_bookmark34)]肝癌细胞中HBV的X蛋白可以活化IL-6的基因。[[113](#_bookmark34)] MIP-1β又称作巨噬细胞炎症蛋白-β是CC趋化因子家族中的成员，能特异性的趋化淋巴细胞、单核细胞向炎症部位迁移。IL-12由树突状细胞、巨噬细胞、B细胞产生，其次为T细胞。IL-12可能在HBV的感染中起防御作用，IL-12的水平可以象征着肝炎的恢复。[[112](#_bookmark34); [114](#_bookmark35)]。TNF-α可以减少肝细胞内的

cccDNA。[[115](#_bookmark35)]细胞因子水平升高可能与清除HBV相关。乙肝感染成功清除组的细胞因子水平升高不明显，可能是此组人数少，年龄偏大，免疫反应不活跃。也可能为HBV清除过程中只存有较少的刺激源，因此细胞因子水平不高。

在FcγRs家族中，我们发现表达FcγR III的NK细胞减少，表达FcγR III的单核细胞增多，B细胞表面FcγR IIb表达组间无差异，免疫系统是一个复杂而精细的结构，它通过多种方式调控我们的各种免疫细胞来维持机体的免疫平衡。一旦这种免疫平衡被打破就会让让机体处于免疫紊乱状态。乙型肝炎病毒（HBV）的复制本身并不造成肝脏损伤，当机体进入免疫清除阶段时间接破坏了肝脏细胞，反复的机体清除反应会导致肝纤维化、肝硬化的发生。寻找敏感有效的生物学标志物来区分免疫耐受期和免疫活化期，及时进行抗病毒治疗，是减缓肝脏损伤的方法。目前本实验纳入组的病例数尚少，我们仍需扩大样本量进行过进一步验证。FcγRs可能会成为区分免疫耐受期及免疫活化期的标志物，这需要我们进行更深一步的研究。

45

# 第**6**章 结 论

#### **1**、本实验证实了前期HBV不同感染时期全基因组表达谱芯片的结果和

FcγRs的RT-PCR实验—HBV感染不同免疫状态下FcγRs存在差异性表达。

#### **2**、FcγRs在慢性HBV感染不同时期的不同免疫细胞上的差异可能是反应免疫清除状态的指标之一。

46

参考文献

[1] Honer Zu Siederdissen C, Cornberg M. The role of HBsAg levels in the current management of chronic HBV infection[J]. Ann Gastroenterol, 2014, 27(2): 105-112.

[2] Tseng T C, Kao J H. Clinical utility of quantitative HBsAg in natural history and nucleos(t) ide analogue treatment of chronic hepatitis B: new trick of old dog[J]. J Gastroenterol, 2013, 48(1): 13-21.

[3] 翁心华. 乙型肝炎的自然史: 对抗病毒治疗的启示[J]. 中华传染病杂志, 2005, (S1): 16-18.

[4] 贾继东, 李兰娟. 慢性乙型肝炎防治指南(2010年版)[J]. 临床肝胆病杂志, 2011, (01): 113-128.

[5] 金晶兰. 联合分析HBV感染相关表达谱和DNA甲基化谱[D]. 吉林大学, 2012.

[6] 吴娜. Fcγ受体在HBV感染的不同免疫状况下表达水平的变化[D]. 吉林大学, 2015.

[7] Trepo C, Chan H L, Lok A. Hepatitis B virus infection[J]. Lancet, 2014, 384(9959): 2053-63.

[8] Liu J, Zhang S, Wang Q, et al. Seroepidemiology of hepatitis B virus infection in 2 million men aged 21-49 years in rural China: a population-based, cross-sectional study[J]. Lancet Infect Dis, 2016, 16(1): 80-6.

[9] Parkin D M, Bray F, Ferlay J, et al. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000[J]. Int J Cancer, 2001, 94(2): 153-6.

[10] Chu C M, Liaw Y F. Predictive factors for reactivation of hepatitis B following hepatitis B e antigen seroconversion in chronic hepatitis B[J]. Gastroenterology, 2007, 133(5): 1458-65.

[11] Chen Y C, Chu C M, Liaw Y F. Age-specific prognosis following spontaneous hepatitis B e antigen seroconversion in chronic hepatitis B[J]. Hepatology, 2010, 51(2): 435-44.

[12] Tseng T C, Liu C J, Chen C L, et al. Serum hepatitis B virus-DNA levels correlate with long-term adverse outcomes in spontaneous hepatitis B e antigen seroconverters[J]. J Infect Dis, 2012, 205(1): 54-63.

[13] Chisari F V, Isogawa M, Wieland S F. Pathogenesis of hepatitis B virus infection[J]. Pathol Biol (Paris), 2010, 58(4): 258-66.

[14] Guidotti L G, Rochford R, Chung J, et al. Viral clearance without destruction of infected cells during acute HBV infection[J]. Science, 1999, 284(5415): 825-9.

[15] Thimme R, Wieland S, Steiger C, et al. CD8(+) T cells mediate viral clearance and disease pathogenesis during acute hepatitis B virus infection[J]. J Virol, 2003, 77(1): 68-76.

[16] Guidotti L G, Matzke B, Schaller H, et al. High-level hepatitis B virus replication in transgenic mice[J]. J Virol, 1995, 69(10): 6158-69.

[17] Bertoletti A, Maini M, Williams R. Role of hepatitis B virus specific cytotoxic T cells in liver damage and viral control[J]. Antiviral Res, 2003, 60(2): 61-6.47

[18] Tan A T, Koh S, Goh W, et al. A longitudinal analysis of innate and adaptive immune profile during hepatic flares in chronic hepatitis B[J]. J Hepatol, 2010, 52(3): 330-9.

[19] Kakimi K, Guidotti L G, Koezuka Y, et al. Natural killer T cell activation inhibits hepatitis B virus replication in vivo[J]. J Exp Med, 2000, 192(7): 921-30.

[20] Hulett M D, Hogarth P M. Molecular basis of Fc receptor function[J]. Adv Immunol, 1994, 57: 1-127.

[21] Ravetch J V, Kinet J P. Fc receptors[J]. Annu Rev Immunol, 1991, 9: 457-92.

[22] Nimmerjahn F, Ravetch J V. Fcgamma receptors as regulators of immune responses[J]. Nat Rev Immunol, 2008, 8(1): 34-47.

[23] Hogarth P M, Pietersz G A. Fc receptor-targeted therapies for the treatment of inflammation, cancer and beyond[J]. Nat Rev Drug Discov, 2012, 11(4): 311-31.

[24] Gavin A L, Tan P S, Hogarth P M. Gain-of-function mutations in FcgammaRI of NOD mice: implications for the evolution of the Ig superfamily[J]. EMBO J, 1998, 17(14): 3850-7.

[25] Barnes N, Gavin A L, Tan P S, et al. FcgammaRI-deficient mice show multiple alterations to inflammatory and immune responses[J]. Immunity, 2002, 16(3): 379-89.

[26] Hogarth P M. Fc receptors are major mediators of antibody based inflammation in autoimmunity[J]. Curr Opin Immunol, 2002, 14(6): 798-802.

[27] Nimmerjahn F, Ravetch J V. Fcgamma receptors: old friends and new family members[J]. Immunity, 2006, 24(1): 19-28.

[28] Starbeck-Miller G R, Badovinac V P, Barber D L, et al. Cutting edge: Expression of FcgammaRIIB tempers memory CD8 T cell function in vivo[J]. J Immunol, 2014, 192(1): 35-9.

[29] Ganesan L P, Kim J, Wu Y, et al. FcgammaRIIb on liver sinusoidal endothelium clears small immune complexes[J]. J Immunol, 2012, 189(10): 4981-8.

[30] Esposito-Farese M E, Sautes C, De La Salle H, et al. Membrane and soluble Fc gamma RII/III modulate the antigen-presenting capacity of murine dendritic epidermal Langerhans cells for IgG-complexed antigens[J]. J Immunol, 1995, 155(4): 1725-36.

[31] 丁雄. FcγRⅢ研究进展[J]. 国际免疫学杂志, 2006, (06): 373-376.

[32] Holl V, Hemmerter S, Burrer R, et al. Involvement of Fc gamma RI (CD64) in the mechanism of HIV-1 inhibition by polyclonal IgG purified from infected patients in cultured monocyte-derived macrophages[J]. J Immunol, 2004, 173(10): 6274-83.

[33] Peressin M, Proust A, Schmidt S, et al. Efficient transfer of HIV-1 in trans and in cis from Langerhans dendritic cells and macrophages to autologous T lymphocytes[J]. AIDS, 2014, 28(5): 667-77.

[34] Forthal D N, Landucci G, Phan T B, et al. Interactions between natural killer cells and antibody Fc result in enhanced antibody neutralization of human immunodeficiency virus type 1[J]. J Virol, 2005, 79(4): 2042-9.

[35] Forthal D N, Moog C. Fc receptor-mediated antiviral antibodies[J]. Curr Opin

48

HIV AIDS, 2009, 4(5): 388-93.

[36] Ellery P J, Tippett E, Chiu Y L, et al. The CD16+ monocyte subset is more permissive to infection and preferentially harbors HIV-1 in vivo[J]. J Immunol, 2007, 178(10): 6581-9.

[37] Peinado M, Conesa A, Davila L, et al. [Expression of Fc receptors for IgG in peripheral blood leucocytes from hepatitis C virus infected individuals] [J]. Invest Clin, 2007, 48(2): 175-85.

[38] Kanto T, Hayashi N, Takehara T, et al. Cross-linking of Fc(gamma) -receptor on monocytes inhibits hepatitis C virus-specific cytotoxic T-lymphocyte induction in vitro[J]. Immunology, 1998, 94(4): 461-8.

[39] Gragnani L, Fognani E, Piluso A, et al. Hepatitis C virus-related mixed cryoglobulinemia: is genetics to blame[J]. WorldJGastroenterol, 19(47): 8910-5.

[40] Vassilopoulos D, Younossi Z M, Hadziyannis E, et al. Study of host and virological factors of patients with chronic HCV infection and associated laboratory or clinical autoimmune manifestations[J]. Clin Exp Rheumatol, 2003, 21(6 Suppl 32): S101-11.

[41] Sedmak D D, Davis D H, Singh U, et al. Expression of IgG Fc receptor antigens in placenta and on endothelial cells in humans. An immunohistochemical study[J]. Am J Pathol, 1991, 138(1): 175-81.

[42] 程勇前. 丙型病毒性肝炎母婴传播机制研究[D]. 第四军医大学, 2002.

[43] Blom A B, Radstake T R, Holthuysen A E, et al. Increased expression of Fcgamma receptors II and III on macrophages of rheumatoid arthritis patients results in higher production of tumor necrosis factor alpha and matrix metalloproteinase[J]. Arthritis Rheum, 2003, 48(4): 1002-14.

[44] El Bannoudi H, Ioan-Facsinay A, Toes R E. Bridging autoantibodies and arthritis: the role of Fc receptors[J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2014, 382: 303-19.

[45] Brownlie R J, Lawlor K E, Niederer H A, et al. Distinct cell-specific control of autoimmunity and infection by FcgammaRIIb[J]. J Exp Med, 2008, 205(4): 883-95.

[46] Clynes R, Ravetch J V. Cytotoxic antibodies trigger inflammation through Fc receptors[J]. Immunity, 1995, 3(1): 21-6.

[47] Shibata T, Berney T, Reininger L, et al. Monoclonal anti-erythrocyte autoantibodies derived from NZB mice cause autoimmune hemolytic anemia by two distinct pathogenic mechanisms[J]. Int Immunol, 1990, 2(12): 1133-41.

[48] Pritchard N R, Cutler A J, Uribe S, et al. Autoimmune-prone mice share a promoter haplotype associated with reduced expression and function of the Fc receptor FcgammaRII[J]. Curr Biol, 2000, 10(4): 227-30.

[49] Peppa D, Gill U S, Reynolds G, et al. Up-regulation of a death receptor renders antiviral T cells susceptible to NK cell-mediated deletion[J]. J Exp Med, 2013, 210(1): 99-114.

[50] Kanchan V, Panda A K. Interactions of antigen-loaded polylactide particles with macrophages and their correlation with the immune response[J]. Biomaterials,

49

2007, 28(35): 5344-57.

[51] Antin J H, Emerson S G, Martin P, et al. Leu-1+ (CD5+) B cells. A major lymphoid subpopulation in human fetal spleen: phenotypic and functional studies[J]. J Immunol, 1986, 136(2): 505-10.

[52] Casali P, Notkins A L. CD5+ B lymphocytes, polyreactive antibodies and the human B-cell repertoire[J]. Immunol Today, 1989, 10(11): 364-8.

[53] Raveche E S. Possible immunoregulatory role for CD5 + B cells[J]. Clin Immunol Immunopathol, 1990, 56(2): 135-50.

[54] Rigley K P, Harnett M M, Klaus G G. Co-cross-linking of surface immunoglobulin Fc gamma receptors on B lymphocytes uncouples the antigen receptors from their associated G protein[J]. Eur J Immunol, 1989, 19(3): 481-5.

[55] Van Den Herik-Oudijk I E, Westerdaal N A, Henriquez N V, et al. Functional analysis of human Fc gamma RII (CD32) isoforms expressed in B lymphocytes[J]. J Immunol, 1994, 152(2): 574-85.

[56] De Andres B, Hagen M, Sandor M, et al. A regulatory role for Fc gamma receptors (CD16 and CD32) in hematopoiesis[J]. Immunol Lett, 1999, 68(1): 109-13.

[57] Rudge E U, Cutler A J, Pritchard N R, et al. Interleukin 4 reduces expression of inhibitory receptors on B cells and abolishes CD22 and Fc gamma RII-mediated B cell suppression[J]. J Exp Med, 2002, 195(8): 1079-85.

[58] Snapper C M, Hooley J J, Atasoy U, et al. Differential regulation of murine B cell Fc gamma RII expression by CD4+ T helper subsets[J]. J Immunol, 1989, 143(7): 2133-41.

[59] Li H J, Zhai N C, Song H X, et al. The Role of Immune Cells in Chronic HBV Infection[J]. J Clin Transl Hepatol, 2015, 3(4): 277-83.

[60] Peng C, Liu B S, De Knegt R J, et al. The response to TLR ligation of human CD16(+) CD14(-) monocytes is weakly modulated as a consequence of persistent infection with the hepatitis C virus[J]. Mol Immunol, 2011, 48(12-13): 1505-11.

[61] Auffray C, Sieweke M H, Geissmann F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells[J]. Annu Rev Immunol, 2009, 27: 669-92.

[62] Liaskou E, Zimmermann H W, Li K K, et al. Monocyte subsets in human liver disease show distinct phenotypic and functional characteristics[J]. Hepatology, 2013, 57(1): 385-98.

[63] Aspinall A I, Curbishley S M, Lalor P F, et al. CX(3) CR1 and vascular adhesion protein-1-dependent recruitment of CD16(+) monocytes across human liver sinusoidal endothelium[J]. Hepatology, 2010, 51(6): 2030-9.

[64] Zimmermann H W, Seidler S, Nattermann J, et al. Functional contribution of elevated circulating and hepatic non-classical CD14CD16 monocytes to inflammation and human liver fibrosis[J]. PLoS One, 2010, 5(6): e11049.

[65] Keler T, Wallace P K, Vitale L A, et al. Differential effect of cytokine treatment on Fc alpha receptor I- and Fc gamma receptor I-mediated tumor cytotoxicity by monocyte-derived macrophages[J]. J Immunol, 2000, 164(11): 5746-52.50

[66] Clynes R A, Towers T L, Presta L G, et al. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets[J]. Nat Med, 2000, 6(4): 443-6.

[67] Vogelpoel L T, Baeten D L, De Jong E C, et al. Control of cytokine production by human fc gamma receptors: implications for pathogen defense and autoimmunity[J]. Front Immunol, 2015, 6: 79.

[68] Den Dunnen J, Vogelpoel L T, Wypych T, et al. IgG opsonization of bacteria promotes Th17 responses via synergy between TLRs and FcgammaRIIa in human dendritic cells[J]. Blood, 2012, 120(1): 112-21.

[69] Vogelpoel L T, Hansen I S, Visser M W, et al. FcgammaRIIa cross-talk with TLRs, IL-1R, and IFNgammaR selectively modulates cytokine production in human myeloid cells[J]. Immunobiology, 2015, 220(2): 193-9.

[70] Boruchov A M, Heller G, Veri M C, et al. Activating and inhibitory IgG Fc receptors on human DCs mediate opposing functions[J]. J Clin Invest, 2005, 115(10): 2914-23.

[71] Aloulou M, Ben Mkaddem S, Biarnes-Pelicot M, et al. IgG1 and IVIg induce inhibitory ITAM signaling through FcgammaRIII controlling inflammatory responses[J]. Blood, 2012, 119(13): 3084-96.

[72] Ben Mkaddem S, Hayem G, Jonsson F, et al. Shifting FcgammaRIIA-ITAM from activation to inhibitory configuration ameliorates arthritis[J]. J Clin Invest, 2014, 124(9): 3945-59.

[73] Boonnak K, Dambach K M, Donofrio G C, et al. Cell type specificity and host genetic polymorphisms influence antibody-dependent enhancement of dengue virus infection[J]. J Virol, 2011, 85(4): 1671-83.

[74] Boonnak K, Slike B M, Burgess T H, et al. Role of dendritic cells in antibody-dependent enhancement of dengue virus infection[J]. J Virol, 2008, 82(8): 3939-51.

[75] Chareonsirisuthigul T, Kalayanarooj S, Ubol S. Dengue virus (DENV) antibody-dependent enhancement of infection upregulates the production of anti-inflammatory cytokines, but suppresses anti-DENV free radical and pro-inflammatory cytokine production, in THP-1 cells[J]. J Gen Virol, 2007, 88(Pt 2): 365-75.

[76] Modhiran N, Kalayanarooj S, Ubol S. Subversion of innate defenses by the interplay between DENV and pre-existing enhancing antibodies: TLRs signaling collapse[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2010, 4(12): e924.

[77] Ubol S, Phuklia W, Kalayanarooj S, et al. Mechanisms of immune evasion induced by a complex of dengue virus and preexisting enhancing antibodies[J]. J Infect Dis, 2010, 201(6): 923-35.

[78] Lok A S, Mcmahon B J. Chronic hepatitis B: update 2009[J]. Hepatology, 2009, 50(3): 661-2.

[79] Cheng P N, Tsai H W, Chiu Y C, et al. Clinical significance of serum HBsAg levels and association with liver histology in HBeAg positive chronic hepatitis B[J]. J Clin Virol, 2013, 57(4): 323-30.

[80] Larsson S B, Eilard A, Malmstrom S, et al. HBsAg quantification for

51

Identification of liver disease in chronic hepatitis B virus carriers[J]. Liver Int, 2014, 34(7): e238-45.

[81] Rehermann B. Natural Killer Cells in Viral Hepatitis[J]. Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2015, 1(6): 578-588.

[82] Farag S S, Vandeusen J B, Fehniger T A, et al. Biology and clinical impact of human natural killer cells[J]. Int J Hematol, 2003, 78(1): 7-17.

[83] Ono K, Yamanaga Y, Yamamoto K, et al. Natural killing activities in chronic liver diseases and hepatocellular carcinoma[J]. J Clin Immunol, 1996, 16(1): 41-5.

[84] 范荣. 慢性乙型肝炎患者NK细胞的特征及其与肝脏病变相关性的研究[D]. 中国人民解放军军医进修学院, 2010.

[85] Echevarria S, Casafont F, Miera M, et al. Interleukin-2 and natural killer activity in acute type B hepatitis[J]. Hepatogastroenterology, 1991, 38(4): 307-10.

[86] 陈胜, 肖杰生. 病毒性肝炎患者外周血淋巴细胞亚群的变化及其免疫学意义[J]. 广东医学, 2001, (12): 1127-1128.

[87] 杨瑞宁, 李芳秋, 江淑芳, 等. 乙型肝炎患者外周血B淋巴细胞CD5mRNA表达水平的研究[J]. 临床检验杂志, 2002, (03): 142-144.

[88] 韩聚强, 任永强, 曹建彪. B1细胞与乙型肝炎病毒及丙型肝炎病毒的感染[J]. 医学综述, 2011, (21): 3240-3242.

[89] 秦浩歌. 慢性乙肝病毒携带者和慢性乙型肝炎患者外周血B淋巴细胞亚群的变化[D]. 中国医科大学, 2004.

[90] 徐莉, 陆玉蕾, 孙颖, 等. 病毒性肝炎时肝B1-a细胞对肝脏保护作用的实验研究[J]. 内科急危重症杂志, 2012, (05): 295-297.

[91] Swisher E M, Shawler D L, Collins H A, et al. Expression of shared idiotypes in chronic lymphocytic leukemia and small lymphocytic lymphoma[J]. Blood, 1991, 77(9): 1977-82.

[92] Dalia S, Chavez J, Castillo J J, et al. Hepatitis B infection increases the risk of non-Hodgkin lymphoma: a meta-analysis of observational studies[J]. Leuk Res, 2013, 37(9): 1107-15.

[93] Wu T W, Lin H H, Wang L Y. Chronic hepatitis B infection in adolescents who received primary infantile vaccination[J]. Hepatology, 2013, 57(1): 37-45.

[94] Persico E, De Renzo A, La Mura V, et al. Occult hepatitis B virus infection in patients with non-Hodgkin lymphoma: the need for early diagnosis in anti-Hbc positive patients[J]. Gut, 2007, 56(10): 1470-1.

[95] Sato Y, Farges O, Buffello D, et al. Intra- and extrahepatic leukocytes and cytokine mRNA expression during liver regeneration after partial hepatectomy in rats[J]. Dig Dis Sci, 1999, 44(4): 806-16.

[96] Boltjes A, Groothuismink Z M, Van Oord G W, et al. Monocytes from chronic HBV patients react in vitro to HBsAg and TLR by producing cytokines irrespective of stage of disease[J]. PLoS One, 2014, 9(5): e97006.

[97] Karlmark K R, Weiskirchen R, Zimmermann H W, et al. Hepatic recruitment of the inflammatory Gr1+ monocyte subset upon liver injury promotes hepatic fibrosis[J]. Hepatology, 2009, 50(1): 261-74.

[98] Seki E, De Minicis S, Osterreicher C H, et al. TLR4 enhances TGF-beta

52

Signaling and hepatic fibrosis[J]. Nat Med, 2007, 13(11): 1324-32.

[99] Tacke F. Functional role of intrahepatic monocyte subsets for the progression of liver inflammation and liver fibrosis in vivo[J]. Fibrogenesis Tissue Repair, 2012, 5(Suppl 1): S27.

[100] Stefanescu R N, Olferiev M, Liu Y, et al. Inhibitory Fc gamma receptors: from gene to disease[J]. J Clin Immunol, 2004, 24(4): 315-26.

[101] 张国民, 王鑫, 康富标, 等. 流式细胞术检测肝炎肝硬化患者外周血单核细胞表型的表达[J]. 现代预防医学, 2011, (22): 4687-4690.

[102] You J, Zhuang L, Zhang Y F, et al. Peripheral T-lymphocyte subpopulations in different clinical stages of chronic HBV infection correlate with HBV load[J]. World J Gastroenterol, 2009, 15(27): 3382-93.

[103] Togashi H, Ohno S, Matsuo T, et al. Interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin 1-beta suppress the replication of hepatitis B virus through oxidative stress[J]. Res Commun Mol Pathol Pharmacol, 2000, 107(5-6): 407-17.

[104] Biswas A, Panigrahi R, Pal M, et al. Association of Interleukin-1beta and Gene Polymorphisms with Liver Pathogenesis in Hepatitis B Virus Infection among Eastern Indian Population[J]. J Clin Exp Hepatol, 2013, 3(4): 281-7.

[105] Gao B. Hepatoprotective and anti-inflammatory cytokines in alcoholic liver disease[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2012, 27 Suppl 2: 89-93.

[106] Hong F, Kim W H, Tian Z, et al. Elevated interleukin-6 during ethanol consumption acts as a potential endogenous protective cytokine against ethanol-induced apoptosis in the liver: involvement of induction of Bcl-2 and Bcl-x(L) proteins[J]. Oncogene, 2002, 21(1): 32-43.

[107] Wang L, Qiu J, Yu L, et al. Increased numbers of CD5+CD19+CD1dhighIL-10+ Bregs, CD4+Foxp3+ Tregs, CD4+CXCR5+Foxp3+ follicular regulatory T (TFR) cells in CHB or CHC patients[J]. J Transl Med, 2014, 12: 251.

[108] Wang K, Wu Z B, Ye Y N, et al. Plasma Interleukin-10: A Likely Predictive Marker for Hepatitis B Virus-Related Acute-on-Chronic Liver Failure[J]. Hepat Mon, 2014, 14(7): e19370.

[109] Sidorkiewicz M, Jozwiak B, Sulowska Z, et al. The effect of interleukin-6 on hepatitis B virus replication in peripheral blood mononuclear cells in vitro[J]. Acta Virol, 2004, 48(3): 153-8.

[110] Neurath A R, Strick N, Li Y Y. Cells transfected with human interleukin 6 cDNA acquire binding sites for the hepatitis B virus envelope protein[J]. J Exp Med, 1992, 176(6): 1561-9.

[111] Kakumu S, Shinagawa T, Ishikawa T, et al. Serum interleukin 6 levels in patients with chronic hepatitis B[J]. Am J Gastroenterol, 1991, 86(12): 1804-8.

[112] Liu Q, Feng G X, Lin Y L, et al. Detection of interleukin-6 and -12 in of hepatitis B patients and its clinical significance[J]. Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2001, 21(11): 858-859.

[113] Lee Y, Park U S, Choi I, et al. Human interleukin 6 gene is activated by hepatitis B virus-X protein in human hepatoma cells[J]. Clin Cancer Res, 1998, 4(7):

53

1711-7.

[114] Rossol S, Marinos G, Carucci P, et al. Interleukin-12 induction of Th1 cytokines is important for viral clearance in chronic hepatitis B[J]. J Clin Invest, 1997, 99(12): 3025-33.

[115] Xia Y, Stadler D, Lucifora J, et al. Interferon-gamma and Tumor Necrosis Factor-alpha Produced by T Cells Reduce the HBV Persistence Form, cccDNA, Without Cytolysis[J]. Gastroenterology, 2016, 150(1): 194-205.

54

##### 作者简介及在学期间所取得的科研成果

**作者简介**

高娜，生于1991年1月8日，汉族，祖籍天津，新疆医科大学七年制，2014

年9月交流至吉林大学第一医院肝胆胰内科，硕士研究生。

**科研成果**

高娜,吴瑞红,王晓美,牛俊奇. HBsAg定量检测对慢性重型乙型肝炎患者预后的预测价值[J]. 临床肝胆病杂志,2016,04:695-699.

55

致**谢**

时间如白驹过隙，转眼两年的研究生生涯即将结束，感谢帮助我的老师、同学们，谨向各位引导我、帮助我的人表达我最真挚的谢意。

首先衷心感谢我的导师牛俊奇教授，在我迷茫时充当我的灯塔。牛老师幽默儒雅，工作认真充满热情，给我树立了很好的榜样，记得一次深夜发邮件给老师，老师一会儿就回复给我了，不得不感慨老师的认真。老师每每站在台上演讲我都能感受到他的自信和学识，在心里每次都会鼓励自己做一个像老师那样的人。

在科里轮转期间蔡艳俊副教授、齐月副教授、李婉玉老师给予我了很多指引，让我一生受用。齐月老师幽默认真，生活中充满了热情，每每感到疲倦时，听她讲一些有趣的奇闻异事，我的疲倦一扫而空，您积极的生活态度感染了我。蔡艳俊老师温柔热情，李婉玉老师认真努力，都是我学习的榜样。在转化医学院期间金晶兰老师、王晓美老师、吴瑞红老师、徐洪琴老师、高修竹老师给了我很多帮助，无论是课题的构思和设计还是实验工作的技术难题或论文的撰写，她们都给了我很多的指导。

衷心感谢师兄、师姐及师妹们给予我学习、生活上的关心和鼓励，是你们让研究生的学习生活变得丰富多彩。

最后，深深感谢默默在我身边一直为我付出的父母、家人、朋友，有了你们的关心、支持和帮助，我才能一直向前，朝着自己的前方无所顾忌的行走。大家的关心和照顾让我永远铭记，衷心的祝愿你们身体健康，幸福快乐。

56