

慢性 HBV 感染患者抗原表位特异性 CTL 与 ALT 水平无关

邓 洪¹, 韩晓燕², 陈幼明¹, 张富程², 彭晓谋¹, 高志良¹, 姚集鲁¹
(中山大学附属第三医院 1. 感染性疾病科; 2. 中心实验室, 广东 广州 510630)

摘 要:【目的】通过定量分析慢性乙型肝炎患者体内乙型肝炎病毒(HBV)特异性的细胞毒性 T 淋巴细胞, 探讨特异性细胞毒性 T 淋巴细胞水平与血清丙氨酸氨基转移酶水平和病毒复制状态的关系。【方法】从慢性乙型肝炎患者外周血分离外周血单个核细胞(PBMC), 用 HLA-A2 限制的 HBcAg 抗原表位肽-五聚体复合体及 CD8 单克隆抗体染色后, 用流式细胞仪检测 HBV 特异性的细胞毒性 T 淋巴细胞, 同时检测患者的肝功能和定量分析 HBV DNA。【结果】32 例 HLA-A2 阳性的慢性乙型肝炎患者外周血均可检测到 HBV 特异性的细胞毒性 T 淋巴细胞, 五聚体阳性细胞占 CD8 阳性细胞的比例为 1.3% \pm 1.1%, 统计分析抗原表位特异性细胞毒性 T 淋巴细胞频率与丙氨酸氨基转移酶水平相关性不显著 ($r=0.163$, $P=0.163$)。 分组对比发现病毒载量低者(HBV DNA 定量 $<10^5$ 拷贝/mL) 抗原表位特异性细胞毒性 T 淋巴细胞水平(1.96% \pm 1.26%) 高于病毒载量高者(0.82% \pm 0.52%, $P<0.05$)。【结论】慢性乙型肝炎患者外周血中存在抗原表位特异性细胞毒性 T 淋巴细胞, 抗原表位特异性细胞毒性 T 淋巴细胞可能与控制 HBV 的复制有关, 但主要肝损害并非直接由抗原表位特异性细胞毒性 T 淋巴细胞引起。

关键词: T 淋巴细胞, 细胞毒性; HLA 抗原; 肝炎, 乙型; MHC-五聚体

中图分类号: R512.36; Q784

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2006)04-0401-04

ALT Level was Independent to Antigen-specific Cytotoxic T Lymphocytes in Patients with Chronic Hepatitis B

DENG Hong¹, HAN Xiao-yan², CHEN You-ming¹, ZHANG Fu-cheng², PENG Xiao-mou²,
GAO Zhi-liang¹, YAO Ji-lu¹

(1. Department of Infectious Diseases, 2. Central Laboratory, The Third Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

Abstract:【Objective】 To detect HBV antigen specific cytotoxic T lymphocytes (CTL) and study their association with alanine aminotransferase (ALT) and viral replication in chronic hepatitis B patients. 【Methods】 The frequency of HBcAg-specific CTL cells in the peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from 32 patients persistent infection with HBV were quantified by flow cytometry using HLA-A2 restricted HBV peptide pentamers complex(Pro5TM MHC Pentamers). 【Results】 The HBcAg-specific CTL cells were detected in all individuals with chronic HBV infection, the average of the frequency of HBcAg-specific CTL cells were 1.3% \pm 1.1%. The frequency of HBcAg-specific CTL had no relationship with level of ALT ($r=0.163$, $P=0.163$). The patients with low virus load (HBV DNA $<10^5$ copies/mL) had more HBV-specific CTL cells (1.96% \pm 1.26%) than the patients with high virus load (0.82% \pm 0.52%, $P<0.05$). 【Conclusions】 The patients with chronic HBV infection had HBcAg-specific CTL in peripheral blood. HBcAg-specific CTL may play an important role in inhibiting viral replication of the patients with chronic hepatitis B. But major liver cell damage was not directly caused by antigen-specific CTL.

Key words: T lymphocytes, cytotoxic; HLA antigens; hepatitis B; MHC-pentamers

[J SUN Yat-sen (Med Sci), 2006,27(4):401-404, 413]

乙型肝炎病毒 (hepatitis virus B, HBV) 是非直接致细胞病变病毒, 乙型肝炎的发病机制主要是

收稿日期: 2005-12-08

基金项目: 广东省科技计划项目(2005B31201004)

作者简介: 邓 洪(1972-), 男, 广东蕉岭人, 博士生, 主治医师. E-mail: denghong2@163.net

机体清除 HBV 而引发的细胞免疫病理改变,涉及病毒和机体两方面的因素^[1]。既往的研究发现急性乙型肝炎体内存在多特异性的和多克隆的细胞毒性 T 细胞(cytotoxic T lymphocytes, CTL),而慢性乙型肝炎患者体内的特异性 CTL 却很少^[2]。但慢性乙型肝炎病情急性加重时可以检测到 CTL 数量相应增加,同时常伴随有血清 HBV DNA 的波动和 HBeAg 血清学转换(HBeAg 抗-HBe),并且可能获得控制病毒的效果^[3]。有研究认为慢性乙型肝炎病情急性加重可能是受 HLA- 限制的针对 HBV 抗原的 CTL 作用的结果,免疫反应是慢性乙型肝炎病情急性加重的主要原因^[4,5]。研究抗原特异性 CTL 数量和功能的变化,不仅有利于阐明慢性乙型肝炎病情急性加重的免疫发病机制,而且还可能可以指导临床抗病毒治疗^[6,7]。我们采用在四聚体基础上改进的五聚体(MHC Pentamers)法结合流式细胞技术分析慢性乙型肝炎患者外周血抗原特异性 CTL 细胞出现频数及其与肝损害和病毒载量的关系。

1 对象和方法

1.1 对象

慢性乙型肝炎 56 例,其中男 50 例,女 6 例,男女比 8.4:1,年龄 20~62(36.8±1.1)岁,均来源于我科 2005 年 2 月至 2005 年 10 月的住院部和门诊患者,急性乙型肝炎 2 例作为对照组。所有患者的诊断标准均符合 2000 年第十次全国传染病与寄生虫病学会和肝病学会联合修订的病毒性肝炎诊断标准^[8]。慢性乙型肝炎诊断依据是乙型肝炎表面抗原(HBsAg)阳性超过 6 个月,且伴有丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)轻度以上的升高。急性乙型肝炎的诊断基于 ALT 升高(至少高于正常上限的 10 倍),既往没有乙型肝炎病史,HBsAg 阳性,同时血清中抗-HBc IgM 阳性,急性肝炎患者发病 6 个月内转氨酶恢复正常,从血清中清除 HBsAg 和 HBeAg。所有患者排除甲型肝炎病毒(hepatitis A virus, HAV)、丁型肝炎病毒(hepatitis D virus, HDV)、戊型肝炎病毒(hepatitis E virus, HEV)感染,无自身免疫性疾病,近半年未使用拉米夫定和干扰素等免疫调节剂。

1.2 方法

1.2.1 肝功能、肾功能生化指标 采用美国 Beckman 全自动生化仪及其配套试剂检测。

1.2.2 HBV 病毒学指标的检测 HBsAg、抗 HBs、HBeAg、抗 HBe、抗 HBc 采用微粒子酶联免疫法(MEIA)检测,试剂由美国 Abbott 公司提供;HBV DNA 定量采用荧光定量聚合酶链反应(PCR)检测,由广州达安基因诊断中心提供仪器和试剂盒,截止值为 10^3 拷贝/mL。

1.2.3 外周血单个核细胞(PBMC)的分离 所有研究对象取 10 mL 抗凝的静脉血缓慢加入等量的淋巴细胞分层液(Ficoll-paque™ PLUS)中,1500 r/min 室温离心 20 min,小心地取单核细胞层,磷酸盐缓冲液(PBS)洗 3 次。计数单个核细胞。

1.2.4 HLA-A2 等位型的鉴定 取 1×10^6 个 PBMC 与 100 μ L 鼠抗人 HLA-A2 单克隆抗体 4 共孵育 30 min, FITC 荧光标记二抗,4 再孵育 30 min,洗后,10 g/L 多聚甲醛固定,然后上流式细胞仪。每份标本均设阴性对照。试剂购自 Proimmune 公司。

1.2.5 MHC 五聚体和 CD8 染色 HLA-A2 限制 HBV 抗原表位肽-五聚体复合体(Pro5™ MHC Pentamers)购自英国 Proimmune 公司,所含 HBV 抗原表位肽为 HBcAg18-27,序列为 FLPSDFFPSV。单克隆抗体 FITC 结合的鼠抗人 CD8 单克隆抗体亦购自英国 Proimmune 公司。 1×10^6 个新鲜分离的 PBMC,用 PBS 洗 2 次,加入 1 μ L MHC 五聚体和 10 μ L CD8 单克隆抗体染色,4 共孵育 30 min,然后再用 PBS 洗 2 次,之后悬浮在 300 μ L PBS 中,4 保存,用于流式细胞仪检测。

1.2.6 流式细胞仪检测 抗原特异性 CTL 的检测采用 Becton Dickinson 公司流式细胞仪,数据分析采用 CELL QUEST 数据分析软件进行。以淋巴细胞设门,计数 10 000 个 CD8 阳性细胞,同时计数 CD8 和 pentamers 双阳性细胞为 HBV 特异性的 CTL 细胞,特异性 CTL 细胞的阳性率:五聚体⁺=五聚体⁺ CD8⁺/CD8⁺ $\times 100\%$ 。

1.3 统计学处理

用 SPSS11.0 统计分析软件。各组标准化的样本数值用 $\bar{x} \pm s$ 表示。对各组间数据进行方差分析,相关分析采用 Pearson 相关分析或 Spearman 等级相关分析, $P < 0.05$ 时有显著差异。

2 结果

2.1 HLA-A2 分型结果

56 例慢性乙型肝炎中,HLA-A2 阳性患者 32

例, HLA- A2 阳性率为 57%。2 例急性乙型肝炎患者 HLA- A2 阳性和阴性各 1 例。

2.2 ALT 水平与病毒载量的关系

56 例慢性乙型肝炎患者, 血清 ALT 从 8~1607 (212.5 ±336.2) U/L, 血清病毒拷贝数 0~1.2 ×10⁸ 拷贝/mL, 平均 7.3 ×10⁶ 拷贝/mL, 经统计分析 ALT 与病毒载量之间无显著相关性 (r=0.311, P=0.10)。

2.3 抗原肽五聚体阳性细胞的检测

检测了 32 例 HLA- A2 阳性慢性乙型肝炎患者, 1 例 HLA- A2 阳性的急性乙型肝炎, 10 例

HLA- A2 阴性慢性乙型肝炎患者和 1 例 HLA- A2 阴性急性乙型肝炎患者外周血中五聚体阳性细胞占 CD8 阳性细胞的比例。HLA- A2 阴性 HBV 患者外周血中很低, HBcAg 抗原特异性五聚体阳性细胞都不超过 0.02%, 因而, 选 0.02% 为阴性域值。在所有 HLA- A2 阳性慢性乙型肝炎患者外周血中可以检测到五聚体阳性细胞, 比例平均为 1.3% ± 1.1%。1 例 HLA- A2 阳性的急性乙型肝炎五聚体阳性细胞比例为 4.8%(图 1)。

2.4 抗原特异性 CTL 与血清 ALT 的关系

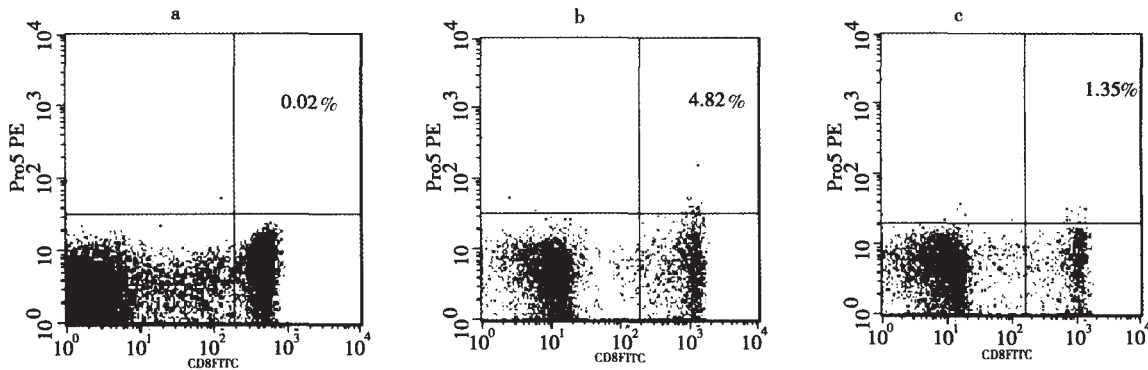


图 1 HBV 感染患者五聚体流式细胞仪检测结果

Fig. 1 Results of the pentamer⁺ cell frequencies in acute and chronic HBV infection.

a: negative contrast; b: acute HBV infection; c: one chronic HBV infection

对 32 例 HLA- A2 阳性慢性乙肝患者的抗原特异性 CTL 阳性率与血清 ALT 水平进行相关分析, 经统计分析得到相关系数为 0.163, P=0.372> 0.05, 无显著相关性。外周血 pentamers /CD8 双阳性细胞频率及其与 ALT 的关系如图 2。

2.5 抗原特异性 CTL 与病毒载量的关系

将 32 例 HLA- A2 阳性慢性乙型肝炎患者按 HBV DNA 定量水平分为 2 组, 一组 HBV DNA 定量 10⁵ 拷贝/mL 15 例, 另一组 HBV DNA 定量 < 10⁵ 拷贝/mL 17 例, 抗原特异性 CTL 分别为 0.82% ±0.52% 和 1.96% ±1.26%, 两组间比较有统计学差异 (t=3.16, P=0.006)。

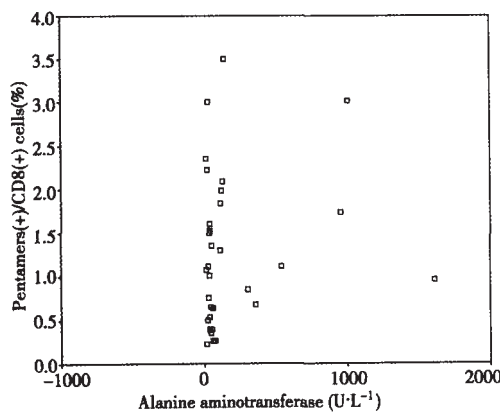


图 2 HBV 患者 pentamers /CD8 双阳性细胞频率及其与 ALT 关系

Fig.2 Frequency of pentamers/CD8 positive cells and association with ALT in HBV(n=32)

3 讨 论

细胞免疫应答在抗 HBV 感染中发挥主要作用, 并且与乙型肝炎的发病机制密切相关。其中, 针对 HBV 各类抗原表位的特异性 CTL 作为主要的效应细胞, 与清除病毒和损伤细胞直接有关, 是当前研究的热点。由于慢性乙型肝炎患者体内的特异性 CTL 很少^[2], 因此很长一段时间, 抗原特异性 CTL 是采用 ⁵¹Cr 释放分析法和有限稀释法等。它们是间接检测抗原特异性 CTL 功能的方法, 不能定量分析抗原特异性 CTL 和敏感性低, 从而大大影响了抗原表位特异性 CTL 在乙肝免疫发病中

的作用的研究。可溶性-MHC 肽四聚体法的出现使直接在体内定量检测抗原特异性 CTL 成为可能^[9]。本研究采用四聚体法基础上进一步改良的 MHC 五聚体法检测 HBV 感染者体内针对 HBcAg18-27 表位的特异性 CTL, 所有 HLA-A2 阳性患者体内均可检测到特异性 CTL, 1 例急性患者特异性 CTL 占 CD8⁺ 细胞比例为 4.8%, 而慢性乙型肝炎特异性 CTL 的比例为 1.3% ± 1.1%, 表明在慢性 HBV 感染时, 患者体内抗原特异性 CTL 与 HBV 并存, 特异性 CTL 的存在并不能代表机体的保护性反应。既往研究结果显示: 急性乙型肝炎患者特异性 CTL 占 CD8⁺T 细胞的 0.2%~7.4%, 慢性乙型肝炎患者一般为 0.05%~1.20%^[10]。本研究急性患者和慢性患者特异性 CTL 水平均高于文献的报道, 因国内外文献均采用四聚体方法检测特异性 CTL, 未见用 MHC 五聚体方法检测 HBV 感染者体内特异性 CTL 的报道。本研究所有 HLA-A2 阴性 HBV 患者外周血 HBcAg 抗原特异性 CTL 的比例都不超过 0.02%, 故考虑本研究的结果显示特异性 CTL 比例较高可能与 MHC 五聚体方法更为特异和敏感有关。

有研究认为, HBV 感染者特异性 CTL 水平高低与病毒清除和 ALT 水平之间有一定的联系, 这可能更证明了特异性 CTL 在体内直接发挥清除病毒的作用^[11]。但也有人认为尽管 HBV 特异性的 CTL 在慢性活动性肝炎的外周血中容易被检测到, 但与病毒载量和 ALT 水平没有直接的关系^[12]。本研究发现慢性乙型肝炎患者 ALT 水平与 HBV 特异性的 CTL 没有明确的相关性, 但与病毒载量有一定的关系, 即病毒载量较高者体内 HBV 特异性的 CTL 水平较低。在乙型肝炎转基因小鼠实验中, 肝损伤仅见于非特异性的 CD8 阳性细胞浸润者中, 而且是在抗原特异性反应后。在输入特异性 CTL 细胞的 HBV 转基因小鼠中, CTL 通过分泌 INF- γ 激活肝细胞内干扰素诱导蛋白 [(Crg2)IP210] 和单核因子等对趋化因子的反应活性而表达增强, 而通过体内封闭这些趋化因子, 可以显著减轻肝内淋巴-单核细胞的浸润和肝细胞损伤, 而不影响 CTL 通过分泌 INF- γ 发挥的抗病毒活性^[13]。这些结果和本研究结果提示, HBV 感染者早期的肝细胞损害可能由特异性的 CTL 引起的, 但大量的肝细胞坏死是由非特异性 CTL 引起的。

大量临床研究显示, 慢性乙型肝炎患者治疗

前 ALT 水平和病毒载量是预测干扰素疗效的重要因素^[14], 治疗前 ALT 水平也是预测拉米夫定疗效的重要因素^[15,16]。但即使是治疗前 ALT 水平高和病毒载量低的慢性乙型肝炎患者, 亦有部分患者抗病毒疗效欠佳。治疗前 HBV 特异性的 CTL 水平是不是抗病毒治疗疗效预测更好的指标值得进一步研究。

总之, 本研究表明, 采用 HLA-A2 限制的 HBV 抗原表位肽-五聚体方法, 在慢性乙型肝炎患者体内可检测到 HBV 特异性 CTL, 这些细胞可能与控制乙型肝炎病毒的复制有关, 但主要的肝细胞损害并非直接由 HBV 特异性 CTL 引起的。

参考文献:

- [1] CHISARI F V, FERRARI C. Hepatitis B virus immunopathogenesis[J]. *Ann Rev Immunol*, 1995,13(1): 29-60.
- [2] MAINI M K, BONI C, LEE C K, et al. The role of virus-specific CD8⁺ cells in liver damage and viral control during persistent hepatitis B virus infection[J]. *J Exp Med*, 2000, 191(8): 1269-1280.
- [3] LIAW Y F. Hepatitis flare and hepatitis B e antigen seroconversion: implication in anti-hepatitis B virus therapy[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2003,18(18):246-252.
- [4] SHIMADA N, YAMAMOTO K, KURODA M J, et al. HBcAg-specific CD8 T cells play an important role in virus suppression, and acute flare-up is associated with the expansion of activated memory T cells [J]. *J Clin Immunol*, 2003,23(3):223-232.
- [5] TSAI S L, SHEEN I S, CHIEN R N, et al. Activation of Th1 immunity is a common immune mechanism for the successful treatment of hepatitis B and C: tetramer assay and therapeutic implications[J]. *J Biomed Sci*, 2003, 10 (1):120-135.
- [6] GANEM D, PRINCE A M. Hepatitis B virus infection-natural history and clinical consequences [J]. *N Engl J Med*, 2004, 350(11) :1118-1129.
- [7] 张晓红, 马会慧, 崇雨田, 等. 慢性乙肝患者停用拉米夫定后出现肝功能衰竭的危险因素[J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2005,26(3):329-332.
- [8] 中华医学会传染病与寄生虫病分会、肝病学会. 病毒性肝炎防治方案[J]. *中华传染病杂志*, 2001, 19(1): 56-62.
- [9] WU Y Z, ZHANG J, CHEN S Y, et al. Frequencies of

(下转第 413 页 to page 413)

基因型个体携带的骨密度值比不含酶切位点的组有统计学意义升高。本次检测结果还显示,含有酶切位点的个体在其他部位也携带了较高的骨密度值,尽管它们没有统计学意义上的差别,这是否意味着,CTR 基因编码第 447 位为亮氨酸的降钙素,比该位点为脯氨酸的降钙素分子,对防止钙的丢失,维持骨量更为有利。关于这点,仍需要通过扩大检测人群范围及进行更深入的研究证实。

参考文献:

- [1] POCOOCK N A, EISMAN J A, HOPPER J L, et al. Genetic determinants of bone mass in adults[J]. *J Clin Invest*, 1987,80(3):706-710.
- [2] MORRISON N A, QIJC, TOKITA A, et al. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles [J]. *Nature*, 1994,367(6460):284-287.
- [3] SHYU J F, INOUE D, BARON R, et al. The deletion of 14 amino acids in the seventh transmembrane domain of a naturally occurring calcitonin receptor isoform alters ligand binding and selectively abolishes coupling to phosphodiesterase[J]. *Biol Chem*, 1996,271(49):31127-31134.
- [4] 章振林,孟迅吾,周学瀛,等.北京地区汉族妇女维生素 D 受体基因和降钙素受体基因多态性与骨密度的关系[J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2003, 18(2): 90-94.
- [5] 赵红燕,刘建民,宁光,等.钙素受体基因多态性与上海地区妇女骨密度的关系[J]. *中国医学科学院学报* 2003, 25(3):258-261.
- [6] NAKAMURA M, MORIMOTO S, ZHANG Z, et al. Calcitonin receptor gene polymorphism in Japanese women: correlation with body mass and bone mineral density[J]. *Calcif Tissue Int*, 2001, 68(4):211-215.
- [7] MASI L, BECHERINI L, GENNARI L, et al. Allelic variants of human calcitonin receptor: distribution and association with bone mass in postmenopausal Italian women[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 245(2): 622-626.
- [8] 李东风,吴文,蔡雪珍,等.降钙素受体基因多态性与广州地区绝经后妇女骨密度关系研究[J]. *华南预防医学*, 2005, 31(6):12-14.
- (编辑 张敏瑞)
-
- (上接第 404 页 from page 404)
- epitope-specific cytotoxic T lymphocytes in active chronic viral hepatitis B infection by using MHC class I peptide tetramers[J]. *Immunity Lett*, 2004, 92(3):253-258.
- [10] 朴文花,何豫,席宏丽,等. HLA-A2 肽四聚体的构建及其在乙、丙型肝炎中的初步应用[J]. *中华医学杂志*, 2004,84(21): 1818-1822.
- [11] 范振平,王福生,徐东平,等.乙型肝炎患者 HBcAg 特异性细胞毒性 T 细胞的检测及其与临床疾病状态的关系[J]. *中华医学杂志*, 2004, 84(24): 2073-2076.
- [12] 王洪,周吉军,夏杰,等. MHC-表位肽四聚体技术在病毒性肝炎研究中的应用[J]. *世界华人消化杂志*, 2004,12(6):1432-1436.
- [13] KAKIMI K, LANE T E, WIELAND S, et al. Blocking chemokine responsive to γ -IFN-inducible protein and monokine induced by IFN- γ activity in vivo reduces the pathogenesis but the antiviral potential of hepatitis B virus specific cytotoxic T lymphocytes [J]. *J Exp Med*, 2001,194(12):1755-1766.
- [14] LIN S M, SHEEN I S, CHIEN R N, et al. Long-term beneficial effect of interferon therapy in patients with chronic hepatitis B virus infection[J]. *Hepatology*, 1999, 29(3):971-975.
- [15] 林炳亮,黄桂梅,林潮双,等.胸腺肽 α_1 促进拉米夫定抗乙型肝炎病毒的疗效[J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2003,24(5):488-3491.
- [16] LAU D T, KHOKHAR M F, DOO E, et al. Long-term therapy of chronic hepatitis B with lamivudine [J]. *Hepatology*, 2000,32(4 Pt1):828-834.
- (编辑 黄小延)