

慢性乙型肝炎患者 CD8⁺记忆 T 细胞的检测分析

熊清芳 黄平 赵磊 赵红 王华利 冯晓宁 杨永峰

【摘要】 目的 探讨慢性乙型肝炎患者和急性乙型肝炎恢复期患者CD8⁺记忆T细胞的产生及分布特性,分析其临床意义。方法 流式细胞术检测16例急性乙型肝炎恢复期患者、26例慢性乙型肝炎患者和18名健康人的外周血CD8⁺记忆T细胞亚群,以初始T细胞、中心记忆T细胞(T_{CM})、效应记忆T细胞(T_{EM})、终末分化效应细胞(T_{TEM})占总计数CD8⁺细胞数的百分比表示。结果 与健康组、急性乙型肝炎恢复期组相比,慢性乙型肝炎组患者CD8⁺初始T细胞明显增加($P < 0.001$); T_{CM}、T_{EM}细胞亚群分布频率显著降低($P < 0.001$)。急性乙型肝炎恢复期组与健康组相比, T_{CM}升高($t = 2.34, P = 0.03$)。高病毒载量组慢性乙型肝炎T_{TEM}百分比比中低病毒载量高($t = 2.43, P = 0.02$)。无论肝炎活动期还是静止期,初始T细胞、T_{CM}、T_{EM}、T_{TEM}百分比差异均无统计学意义。结论 慢性乙型肝炎患者和急性乙型肝炎恢复期患者CD8⁺记忆T淋巴细胞亚群的比例存在明显差异,可能与体内抗原长期存在以及刺激的程度相关。从而导致清除病毒的能力下降,慢性化的形成。

【关键词】 肝炎,乙型,慢性; 免疫; CD8阳性T淋巴细胞; 记忆T细胞

Reciprocal changes of naive and effector/memory CD8⁺ T lymphocytes in chronic hepatitis B virus infection Xiong Qingfang*, Huang Ping, Zhao Lei, Zhao Hong, Wang Huali, Feng Xiaoning, Yang Yongfeng. *Department of Liver Disease, The Second Hospital of Nanjing, Affiliated to Medical School of South-East University, Nanjing 210003, China
Corresponding author: Yang Yongfeng, Email: tongxqf@163.com

【Abstract】 Objective To determine the production and frequencies of CD8⁺ memory T cells from patients with chronic infection of hepatitis B virus (HBV) and subjects recovering from acute hepatitis B. **Methods** A total of 26 patients with chronic hepatitis B who were hospitalized in the second Hospital of Nanjing from November 2011 to April 2014 and 16 subjects recovering from acute hepatitis B during same time period were recruited in the study. The CD8⁺ memory T cell subsets were analyzed by CD8, CD27, CCR7 and CD45RA staining and flow cytometry. **Results** In comparison to healthy subjects and patients recovering from acute hepatitis B, chronic hepatitis B patients showed higher percentages of naive CD8⁺ T lymphocytes, and lower percentages of Central memory T cell(T_{CM}), effector memory T cell(T_{EM}). The frequencies of CD8⁺ Central memory T cell (T_{CM}) subset were increased in patients recovering from acute hepatitis B, compared with healthy subjects. The frequencies of terminal effector memory was found to be significantly higher in patients with viral load (VL) greater than 10⁷ IU/ml than in those VL < 10⁷ IU/ml. The ability of CD8⁺ T cell differentiation showed a negative correlation with disease activity as measured by serum alanine aminotransferase(ALT). **Conclusion** There are significant difference in frequencies of antigen-specific CD8⁺ T_{CM} and T_{EM} among people with chronic hepatitis B and recovering from acute hepatitis B, which may be correlated with antigen load in vivo and antigen specific

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2014.16.008

基金项目:南京市医学重点科技发展项目(ZKX12039);中国肝炎防治基金会——天晴肝病研究基金资助课题(TQGB2011009)

作者单位:210003 南京,东南大学附属第二医院肝病科(熊清芳、黄平、赵红、王华利、冯晓宁、杨永峰),检验科(赵磊)

通讯作者:杨永峰, Email: tongxqf@163.Com

cellular immune responses. This may result in impairment of the generation of functionally competent memory cells, and an inability to achieve control of HBV replication.

【Key words】 Hepatitis B, chronic; Immunity; CD8-positive T-lymphocytes; Memory T cells

HBV特异性T细胞免疫应答是双刃剑,过强的免疫应答引起机体病理损害,免疫应答低下又不能完全清除病毒感染,导致感染慢性化^[1]。随着免疫学的发展,根据不同的细胞表面分子,界定CD8⁺记忆T细胞的不同功能亚群,结合趋化因子受体CCR7以及CD45RA可以将CD8⁺T细胞分为初始T细胞(naive T cell, CD27⁺CD45RA⁻CCR7⁺),中心记忆T细胞(central memory T cell, T_{CM}, CD27⁺CD45RA⁻CCR7⁺),效应记忆T细胞(effector memory T cell, T_{EM}, CD27⁻CD45RA⁻CCR7⁺)和终末分化效应细胞(terminal effector memory, T_{TEM}, CD45RA⁺CD27⁻CCR7⁻)^[2-4]。相较于初始T细胞,记忆T细胞具有较低的活化阈值和较强的效应功能,因此在防止病原菌的再感染过程中,记忆T细胞反应迅速,功能强大,发挥重要作用^[5]。近年来逐步发现慢性病毒感染可能改变记忆T细胞的分化状态,或者阻碍记忆T细胞的分化进程,从而影响记忆T细胞的效应功能^[6-7]。但关于急性、慢性乙型肝炎病毒感染时外周血CD8⁺记忆T细胞分化是否有改变尚不清楚,本文观察急性乙型肝炎恢复期、慢性乙型肝炎患者外周血CD8⁺记忆T细胞亚群的频率,并分析其与疾病进展的关系。

资料与方法

一、研究对象

选取自2011年1月至2014年4月南京市第二医院收治的16例急性乙型肝炎恢复期患者、26例慢性乙型肝炎患者以及18名健康对照。诊断、排除标准参照2010年中华医学会肝病学会、感染病学分会联合修订的《慢性乙型肝炎防治指南》^[8]。检测期间,急性乙型肝炎患者均处在急性恢复期,肝功能正常,表面抗体阳性,慢性乙型肝炎患者均未接受抗病毒治疗。

二、主要试剂和仪器

美国BD FACS Aria型流式细胞仪。荧光标记小鼠抗人单克隆抗体CD3-APC/cy7, CD8-PerCP; CD45RA-FITC, CCR7-PE和biotinylated anti-CD27, 红细胞裂解液购自美国BD PHarMingen公司;流式洗涤液为含5 g/L BSA, 1 g/L NaN₃的PBS。肝功能由日本Olympus生化分析仪检测。HBV血清标记物

ELISA检测试剂盒购自上海科华科技有限公司。

HBV DNA检测用试剂盒购自Roche公司。

三、细胞表面分子染色流式细胞仪分析

肝素抗凝的全血200 μl加2 ml PBS洗涤, 1 000 r/min离心5 min;用吸头小心移弃上清液;加入10 pentarner, 37 °C避光孵育15 min;流式洗涤液洗涤2次;通过CD8、CD27、CCR7、CD45RA抗体共染色,并设置同型对照,混匀;冰上避光孵育30 min;洗涤1次;加红细胞裂解液,37 °C孵育10 min;待细胞悬液变成真性溶液后洗涤2次;10 g/L多聚甲醛200 μl重悬固定, FACS Aria流式细胞仪检测。

四、统计学分析

采用SPSS 15.0统计软件储存和分析数据。常规进行方差齐性检验和正态性检验,计量资料数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组资料之间的比较采用单因素方差分析,两组之间比较采用独立样本t检验,以P<0.05为差异有统计学意义。

结 果

一、人口学及临床资料

26例慢性乙型肝炎患者,其中男15例,女11例,平均年龄33.6(19~46)岁;16例急性乙型肝炎病毒感染恢复期患者,男10例,女6例,平均年龄35.5(20~55)岁;18例健康对照者,男11例,女7例,平均年龄28.9(18~40)岁;三组的性别(P=0.89)、年龄(F=1.65, P=0.16)差异无统计学意义,具有可比性。HBV DNA及肝功能情况见表1。

表1 各组患者的临床资料比较

组别	例数	性别 (男/女)	年龄 (岁)	ALT(IU/L, $\bar{x} \pm s$)	HBV DNA ($\times 10^6$ IU/ml, $\bar{x} \pm s$)
慢性乙型肝炎组	26	15/11	33.6	80.46±73.59	2.3±0.0
急性乙型肝炎恢复组	16	10/6	35.5	30.94±7.57	
健康对照组	18	11/7	28.9	30.11±8.25	

二、各组记忆T细胞亚群分布频率的比较

与健康组、急性乙型肝炎恢复组相比,慢性乙型肝炎组CD8⁺初始T细胞明显增加,差异有统计学意义(P<0.001);T_{CM}、T_{EM}细胞亚群分布频率显

表2 各组 CD8⁺记忆 T 细胞亚群分布频率比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	初始T细胞	T _{CM}	T _{EM}	T _{TEM}
慢性乙型肝炎组	26	60.77±6.83	10.65±2.86	11.58±3.43	23.69±3.59
急性乙型肝炎恢复期	16	45.38±4.80	26.25±5.13	29.63±3.85	23.13±3.72
健康对照组	18	46.17±6.81	24.89±3.31	31.72±2.65	21.22±3.15
F值		40.9	137.3	244.1	2.7
P值		<0.001	<0.001	<0.001	0.078

表4 肝炎免疫状态与 CD8⁺记忆 T 细胞亚群分布频率比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

肝炎免疫状态	例数	初始T细胞	T _{CM}	T _{EM}	T _{TEM}
肝炎活动期	11	58.63±6.87	11.45±3.44	12.18±3.54	23.00±3.84
肝炎静止期	15	62.33±6.57	10.06±2.28	11.13±3.39	24.20±3.63
t值		1.390	1.237	0.763	0.812
P值		0.177	0.228	0.453	0.425

著降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$), 三组 T_{TEM} 百分率差异无统计学意义。急性乙型肝炎恢复组与健康组相比, T_{CM} 百分率升高, 差异有统计学意义 ($t = 2.34, P = 0.03$), 健康组、急性乙型肝炎恢复组初始 T 细胞、T_{EM}、T_{TEM} 百分率差异皆无统计学意义。见表2。

三、外周血 CD8⁺记忆 T 细胞亚群频率与 HBV DNA 病毒载量的关系

根据国内外文献^[9-10], 以 HBV DNA $\leq 10^7$ IU/ml 为中低病毒载量组, $> 10^7$ IU/ml 为高病毒载量组, 高病毒载量组 T_{TEM} 百分率比中低病毒载量高, 差异有统计学意义 ($t = 2.43, P = 0.02$)。而两组 T_{CM}, T_{EM} 百分率差异皆无统计学意义。见表3。

表3 HBV DNA 病毒载量高低与 CD8⁺记忆 T 细胞亚群分布频率比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	初始T细胞	T _{CM}	T _{EM}	T _{TEM}
中低病毒载量组	17	61.29±6.59	11.4±2.9	11.17±3.26	22.53±3.41
高病毒载量组	9	59.77±7.55	9.33±2.29	12.33±3.81	25.89±3.33
t值		0.53	1.79	0.81	2.43
P值		0.61	0.08	0.42	0.02

四、慢性乙型肝炎组外周血 CD8⁺ T 记忆 T 细胞亚群频率与肝功能的关系

国内外学者以是否有肝脏受损, 血清转氨酶增高将慢性乙型肝炎患者分为肝炎活动期(免疫清除期)或者静止期(免疫耐受期)^[8], 故根据 ALT 是否 > 40 IU/L 分为肝炎活动期或静止期, 26 例慢性乙型肝炎患者处于活动期为 11 例, 静止期的为 15 例, 两组初始 T 细胞、T_{CM}、T_{EM}、T_{TEM} 百分率差异均无统计学意义, 见表4。

讨论

在我国慢性乙型肝炎是导致肝硬化、原发性肝癌最常见的病因。慢性乙型肝炎形成的原因复杂, 其中主要原因之一可能是机体免疫功能低下, 不能产生有效的针对 HBV 的特异性细胞毒 T 淋巴细胞 (CTL) 反应, 从而不能及时、有效地彻底清除 HBV, 使 HBV 得以不断复制增殖, 导致 HBV 感染慢性化、持续化, 病变进行性发展^[2-3]。记忆 T 细胞是近年新发现的 T 细胞亚群, 研究证实急性感染时记忆细胞获得归巢受体后会回归淋巴组织, 而慢性感染中大量的病毒抗原特异性 T 淋巴细胞聚积在炎症局部, 不但影响了记忆细胞的形成, 而且导致 T 细胞功能耗竭, 从而影响 T 细胞的效应功能^[11-13]。急性、慢性乙型肝炎病毒感染对 CD8⁺ T 细胞的分化影响以及免疫变化时分化的影响并不清楚。

本研究采用流式细胞技术检测急性乙型肝炎恢复期、慢性乙型肝炎和健康人外周血 CD8⁺ T 记忆 T 细胞各亚群, 结果显示慢性乙型肝炎患者外周血 CD8⁺ T 细胞的分化停滞在未分化阶段(初始 T 细胞), 具有较强杀伤能力的 T_{EM} 和再次接触相同抗原时能分化成 T_{EM} 的 T_{CM} 都明显减少, 导致不能发挥有效的特异性 CTL 反应, 致使 HBV 感染慢性化。以往的研究证实自限性 HBV 急性感染患者有较强的 HBV 特异性 T 细胞反应^[14-15], 那么 CD8⁺ 记忆 T 细胞是否也有分化异常? 本研究发现: 与正常人相比, 急性乙型肝炎恢复期 T_{CM} 百分率明显增加, 初始 T 细胞、T_{EM}、T_{TEM} 百分率无明显变化, 说明在乙型肝炎病毒急性感染状态下抗原特异性初始 T 细胞或者 T_{CM} 迅速活化分化为 T_{EM}, 发挥细胞毒效应控制乙型肝炎病毒的感染, 并产生保护性

抗体(表面抗体),抵抗病毒的再次入侵作用。

有研究报道乙型肝炎高病毒载量容易并发肝硬化、肝癌,其原因可能是在无外源性抗病毒措施干预时,高载量的HBV所致高浓度的蛋白抗原结合在肝细胞膜上形成新的免疫攻击靶位,导致肝组织内其他吞噬细胞如库弗氏细胞等的免疫攻击所致^[10]。我们也分析了高病毒载量是否影响慢性乙型肝炎患者CD8⁺记忆T细胞分化,发现仅T_{TEM}百分率增加,其余细胞亚群与中低病毒载量无差别,说明高病毒载量导致长期的高抗原刺激使CD8⁺记忆T细胞处于一种无效应功能的终末分化阶段(T_{TEM}),从而更易出现HBV持续感染。进一步观察处于免疫清除期和免疫耐受期慢性乙型肝炎患者的CD8⁺记忆T细胞变化,发现两组各亚群之间并无明显差异,说明此时免疫攻击与记忆T细胞亚群数量无明显关系,是否与样本量较小,或与其功能有关,值得进一步深入探讨。

总之,慢性乙型肝炎CD8⁺记忆T细胞主要是初始T淋巴细胞,并与病毒载量有关,可能与体内抗原长期存在以及刺激的程度强弱,会导致机体对乙型肝炎病毒清除能力下降,慢性化的形成。但引起慢性乙型肝炎记忆T细胞分化异常的机制还不清楚。

参 考 文 献

- [1] 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): 61-66.
- [2] Gehring AJ, Xue SA, Ho ZZ, et al. Engineering virus-specific T cells that target HBV infected hepatocytes and hepatocellular carcinoma cell lines[J]. *J Hepatol*, 2011, 55(1): 103-110.
- [3] Zhang EY, Parker BL, Yankee TM. Gads regulates the expansion phase of CD8⁺ T cell-mediated immunity[J]. *J Immunol*, 2011, 186(8): 4579-4589.
- [4] Grenningloh R, Tai TS, Frahm N, et al. Ets-1 maintains IL-7 receptor expression in peripheral T cells[J]. *J Immunol*, 2011, 186(2): 969-976.
- [5] Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance[J]. *Annu Rev Immunol*, 2004, 22: 745-763.
- [6] Wingate PJ, McAulay KA, Anthony IC, et al. Regulatory T cell activity in primary and persistent Epstein-Barr virus infection[J]. *J Med Virol*, 2009, 81(5): 870-877.
- [7] Kaech SM, Wherry EJ. Heterogeneity and cell-fate decisions in effector and memory CD8 T cell differentiation during viral infection[J]. *Immunity*, 2007, 27(3): 393-405.
- [8] 中华医学会肝病学会, 中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2010年版)[J]. *中华肝脏病杂志*, 2011, 19(1): 13-24.
- [9] Cai SH, Lv FF, Zhang YH, et al. Dynamic comparison between Daan real-time PCR and Cobas TaqMan for quantification of HBV DNA levels in patients with CHB[J]. *BMC Infect Dis*, 2014, 14: 85.
- [10] Chan HL, Chan CK, Hui AJ, et al. Effects of tenofovir disoproxil fumarate in hepatitis B e antigen-positive patients with normal levels of alanine aminotransferase and high levels of hepatitis B virus DNA[J]. *Gastroenterology*, 2014, 146(5): 1240-1248.
- [11] Seder RA, Ahmed R. Similarities and differences in CD4 and CD8 effector and memory T cell generation[J]. *Nat Immunol*, 2003, 4: 835-842.
- [12] Canaday DH, Burant CJ, Jones L, et al. Preserved MHC-II antigen processing and presentation function in chronic HCV infection[J]. *Cell Immunol*, 2011, 266(2): 187-191.
- [13] Catalfamo M, Wilhelm C, Tcheung L, et al. CD4 and CD8 T cell immune activation during chronic HIV infection: roles of homeostasis, HIV, Type I IFN, and IL-7[J]. *J Immunol*, 2011, 186(4): 2106-2116.
- [14] Lai CL, Ratzin V, Yuen MF, et al. Viral hepatitis B[J]. *Lancet*, 2003, 362: 2089-2094.
- [15] Suneetha PV, Pischke S, Schlaphoff V, et al. Hepatitis E virus (HEV)-specific T-cell responses are associated with control of HEV infection[J]. *Hepatology*, 2012, 55(3): 695-708.

(收稿日期: 2014-05-23)

(本文编辑: 马超)