

慢性乙型肝炎患者 MoDCs 表面 PD-L1 分子的表达及其对 T 淋巴细胞功能的影响

杨帆 潘修成 陈明 郭忠胜 李丽 冯霞 张言超

【摘要】 目的 探讨慢性乙型肝炎(CHB)患者外周血单核细胞来源的树突状细胞(MoDCs)表面PD-L1的表达水平及其对MoDCs诱导的HBV特异性T淋巴细胞功能的影响。**方法** 采用流式细胞术检测CHB患者、慢性乙型肝炎病毒携带者(ASC组)、健康对照者(NC组)外周血MoDCs表面PD-L1的表达,采用全自动生化分析仪检测ALT(正常参考值<40 U/L)和荧光定量聚合酶链反应测定HBV DNA水平。替比夫定抗病毒治疗前后分别体外培养CHB患者的MoDCs。流式细胞术检测MoDCs表面PD-L1表达的变化;负载HBsAg的MoDCs和异体T淋巴细胞混合培养,以PD-L1单克隆抗体阻断PD-L1/PD-1途径后,MTT法检测HBV特异性T淋巴细胞增殖能力;酶联免疫吸附试验(ELISA)测定混合淋巴细胞反应(MLR)上清液中IL-12、IFN- γ 和IL-10的浓度。**结果** CHB患者外周血MoDC表面PD-L1的表达高于ASC组和NC组,且与患者ALT、HBV DNA水平呈正相关。随抗病毒时间的延长,MoDCs表面PD-L1水平下降,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。封闭PD-L1途径后,MoDCs诱导的T淋巴细胞的增殖能力及MLR中IL-12、IFN- γ 水平均升高,IL-10水平降低的程度大于相应的未封闭PD-L1途径组。**结论** CHB患者外周血MoDCs表面PD-L1表达水平的升高,降低了HBV特异性T淋巴细胞免疫功能;替比夫定抗病毒治疗对MoDCs表面PD-L1的表达无显著影响;阻断PD-L1/PD-1途径能够提高MoDCs诱导的HBV特异性T淋巴细胞免疫反应。

【关键词】 髓样树突状细胞;T淋巴细胞;肝炎,乙型,慢性;替比夫定

The expression of PD-L1 on monocyte derived dendritic cells and its effect on immune function of T lymphocytes in patients with chronic hepatitis B YANG Fan, PAN Xiu-cheng, CHEN Ming, GUO Zhong-sheng, LI Li, FENG Xia, ZHANG Yan-chao. Department of Infectious Diseases, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002, China

Corresponding author: PAN Xiu-cheng, Email: xzpxc68@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the expression of PD-L1 on monocyte derived dendritic cells (MoDCs) and its effect on immune function of HBV-specific T lymphocytes in patients with chronic hepatitis B. **Methods** The levels of PD-L1 on MoDCs in CHB patients, asymptomatic carrier (ASC) and health controls were detected by fluorescence activated cell sorter (FACS). Before and during telbivudine treatment, MoDCs generated from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were cultured in vitro. The expression of PD-L1 was detected by flow cytometry simultaneously. Followed by mature MoDCs cocultured with xenogenic T cells, in presence or absence of anti-PD-L1 monoclonal antibody, MTT assay was applied to determine the proliferation of HBV-specific xenogenic T cells and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was applied to test the concentrations of IL-12, IFN- γ and IL-10 in the supernatants of mixed lymphocytes reaction (MLR). **Results** PD-L1 expression was up-regulated on MoDCs in CHB patients, compared to that of ASC and control groups ($P < 0.05$). The level of PD-L1 was positively correlated with serum ALT and HBV DNA. During antiviral treatment, the level of PD-L1 decreased, but with no significant changes ($P > 0.05$). Blocking of PD-L1 signaling with anti-PD-L1 monoclonal antibody enhanced the proliferation of MoDCs mediated xenogenic T cells and the levels of IL-12 and IFN- γ , but the level of IL-10 reduced. **Conclusions** Increasing PD-L1 on MoDCs could decrease the immune function of T cell in patients with

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2012.04.003

基金项目:徐州市科委科研基金(No. XM08C079);江苏省重点学科建设基金(No. 苏教研[2006]4号)

作者单位:221002 徐州市,徐州医学院附属医院感染病科(潘修成、陈明、郭忠胜、李丽、冯霞、张言超);解放军第264医院感染病科(杨帆)

通讯作者:潘修成,Email: xzpxc68@126.com

CHB. The effect of telbivudine treatment on the level of PD-L1 on MoDCs is not significant. Blockage of the PD-L1 pathway may enhance the MoDCs mediating HBV specific T cells immune function.

【Key words】 Monocyte derived dendritic cells (MoDCs); T lymphocyte; Chronic hepatitis B; Telbivudine

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)持续感染的机制尚不完全清楚,研究认为树突状细胞(dendritic cells, DCs)功能障碍可能是慢性乙型肝炎患者 HBV 特异性免疫功能低下的主要原因之一^[1]。人体外周血 DC 主要分两类:髓样树突状细胞(monocyte derived dendritic cells, MoDCs)和浆样树突状细胞(plasmacytoid dendritic cells, pDCs)。MoDCs 在活化初始 T 细胞形成足够特异性免疫应答反应的过程中起着关键作用^[2]。然而,引起 DCs 功能障碍的确切机制目前尚不清楚。

PD-L1 是近年来新发现的 B7 家族的重要成员,主要表达于活化的抗原提呈细胞(antigen presenting cell, APC)、淋巴细胞及单核细胞等淋巴组织以及心、肺、肾及肝脏等非淋巴组织^[3],其受体 PD-1 则主要表达于活化的 T 细胞和 B 细胞^[4-6]。PD-L1 与 PD-1 结合对 T 淋巴细胞具有负性调节作用,包括抑制其增殖、细胞因子的分泌及诱导 T 细胞的凋亡等^[7-11]。

目前,国内外在慢性乙型肝炎的报道中对 DCs 表面 PD-L1 分子研究较少,尤其是抗病毒治疗过程中 MoDCs 表面 PD-L1 的动态变化及其对 T 淋巴细胞功能的影响,尚无相关报道。本研究观察在替比夫定抗病毒治疗过程中慢性乙型肝炎患者 MoDCs 表面 PD-L1 表达的动态变化及其对 HBV 特异性 T 淋巴细胞功能的影响,以期进一步明确 HBV 持续感染的分子机制,为免疫调节治疗慢性乙型肝炎提供新的理论依据。

资料与方法

一、研究对象及治疗方法

1. 临床资料:收集 2008 年 6 月至 2009 年 4 月于本院确诊的 CHB 患者 25 例和乙型肝炎病毒携带者(ASC)患者 20 例的临床资料,进行回顾性分析。入组患者诊断符合《慢性乙型肝炎防治指南》标准^[12]。所有病例排除其他肝炎病毒感染及合并自身免疫性、酒精性肝病等,且入组前半年内未进行任

何形式抗病毒或免疫调节治疗。另选取年龄和性别与患者相匹配的 20 名健康志愿者作为对照组(NC 组)。各组受试者均签署知情同意书。

2. 治疗方法和病例选择:对接受替比夫定(600 mg/d)抗病毒治疗的 8 例 CHB 患者随访 6 个月,其 ALT 水平为(83 ~ 596) U/L, HBV DNA 水平为($5.44 \times 10^5 \sim 2.06 \times 10^8$) 拷贝/ml。

研究对象基本资料见表 1,其中 CHB 组中接受替比夫定抗病毒治疗的患者共 8 例的基线资料,见表 2。

表 2 8 例接受替比夫定抗病毒治疗的患者资料

患者	性别	年龄 (岁)	ALT (U/L)	HBV DNA(拷贝/ml)
1	男	43	163	8.22×10^6
2	男	25	83	6.46×10^7
3	男	63	94	5.44×10^5
4	男	47	224	3.0×10^7
5	男	62	449	2.35×10^6
6	男	33	596	1.0×10^8
7	男	38	272	9.56×10^5
8	男	24	348	2.06×10^8

3. 抗病毒治疗前后生物化学指标、临床病毒学和免疫学指标的动态检测:抗病毒治疗后分别于 3 个月、6 个月检测各组患者的 ALT、HBV 表面标志物、HBV DNA 定量及进行外周血 MoDCs 培养。

二、方法

1. MoDCs 的培养:细胞培养方法于文献^[13]的基础上稍作改进。淋巴细胞分离液分离并收集 PBMCs,于 37℃、5% CO₂ 孵箱中温育 2 h,去除未贴壁细胞后,加入含 rhGM-CSF(200 ng/ml)和 IL-4(50 ng/ml)的完全 RPMI 1640 继续培养。第 6 天加 HBsAg(20 μg/ml),24 h 后加 TNF-α(1000 U/ml)促进细胞成熟,继续培养 48 h 后收集细胞。

表 1 各组研究对象的基本资料

组别	例数	性别(男/女)	年龄(岁, $\bar{x} \pm s$)	ALT (U/L, $\bar{x} \pm s$)	HBV DNA(拷贝/ml)
乙型肝炎病毒携带组	20	12/8	28.90 ± 8.19	30.19 ± 8.12	$2.57 \times 10^6 (4.38 \times 10^4 \sim 7.63 \times 10^7)$
慢性乙型肝炎组	25	16/9	33.72 ± 13.94	215.6 ± 150.6	$8.0 \times 10^7 (9.79 \times 10^3 \sim 9.00 \times 10^8)$
健康对照组	20	11/9	30.85 ± 10.64	—	—

注:“—”表示未检测

2. 成熟 MoDCs 表面 PD-L1 分子表达检测:所收集的 MoDCs 加入 PD-L1 及同型对照抗体,室温避光孵育 20 min 后采用流式细胞仪进行检测。

3. 异体 T 淋巴细胞的收集:NC 组 PBMCs 采用 RPMI 1640 重悬细胞,置培养箱中孵育 2 h,取未贴壁细胞继续培养 3 d。

4. 异体混合淋巴细胞反应 (MLR):用丝裂霉素处理过的 MoDCs 与异体 T 细胞 (10^5 个/孔) 分别按 1:5、1:10、1:20 和 1:40 的比例于 96 孔板内混合培养,终体积为 200 μ l。未封闭、单克隆抗体封闭和免疫球蛋白封闭 3 种实验条件下分别加入含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640、10 μ g/ml 的 anti-human PD-L1 Functional Grade Purified 和人 mIgG。培养 4 d 后每孔加入 MTT 20 μ l (5 mg/ml),继续培养 4 h 后弃上清,每孔加入 150 μ l DMSO,于 492 nm 波长处测定吸光度值(A)。加入 MTT 前,收集部分培养液上清用于细胞因子的检测。

五、统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示;组内样本两个指标进行 Spearman 相关分析,相关系数用 r 表示;组间比较采用单因素方差分析 (ANOVA),以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、各组患者外周血 MoDCs 表面 PD-L1 分子的表达

NC 组、ASC 组和 CHB 组患者外周血 MoDCs 表面 PD-L1 表达率分别为 $(2.97 \pm 1.74)\%$ 、 $(14.68 \pm 14.69)\%$ 和 $(17.89 \pm 20.96)\%$,CHB 组患者 MoDCs 表面 PD-L1 的水平明显高于 NC 组和 ASC 组,且与 NC 组比较差异具有统计学意义 ($P = 0.002$)。3 组患者外周血 MoDCs 表面 PD-L1 分子表达流式图如图 1~3 所示。

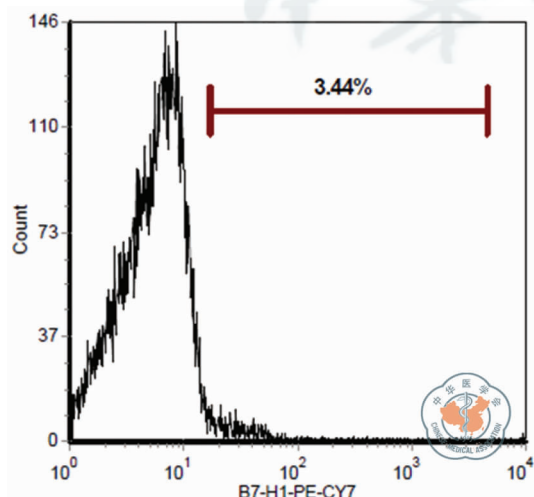


图 1 NC 组患者外周血 MoDCs 表面 PD-L1 表达率流式图

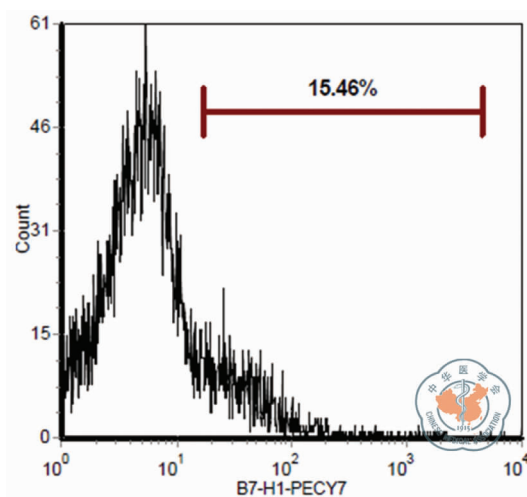


图 2 NSC 组患者外周血 MoDCs 表面 PD-L1 表达率流式图

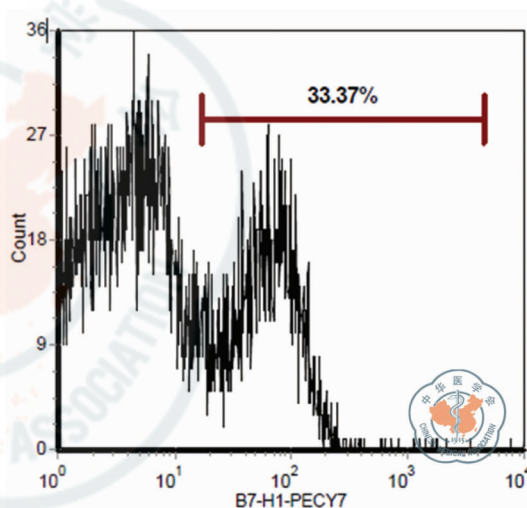


图 3 CHB 组患者外周血 MoDCs 表面 PD-L1 表达率流式图

二、CHB 组患者 PD-L1 表达与 ALT、HBV DNA 的相关性

MoDC 表面 PD-L1 的表达与 CHB 组患者 ALT 和 HBV DNA 水平均呈正相关 ($r = 0.629, P < 0.01$; $r = 0.548, P < 0.01$),见图 4~5。

三、阻断 PD-L1/PD-1 信号转导通路对 MoDCs 诱导 T 细胞增殖的影响

抗病毒治疗前后,与未封闭和免疫球蛋白封闭实验条件下相比,封闭实验条件下 T 淋巴细胞增殖能力显著增强 ($P < 0.05$, F 分别为 3.44 和 2.91),且 T 淋巴细胞的增殖能力随 MoDCs 比例增加而增强,见图 6。

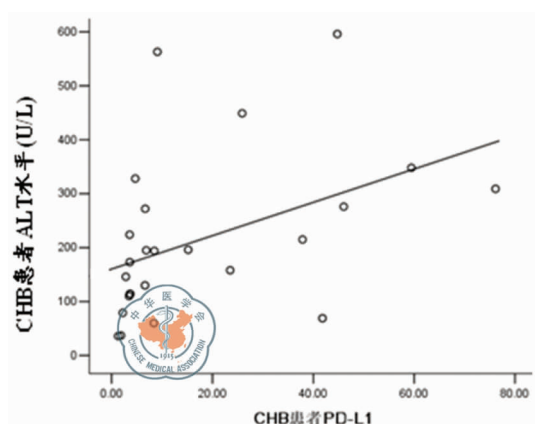


图4 MoDCs 细胞表面 PD-L1 的表达与患者 ALT 水平的关系

注: $r = 0.629, P = 0.001$; 回归方程: $y = 160.36 + 3.09x$

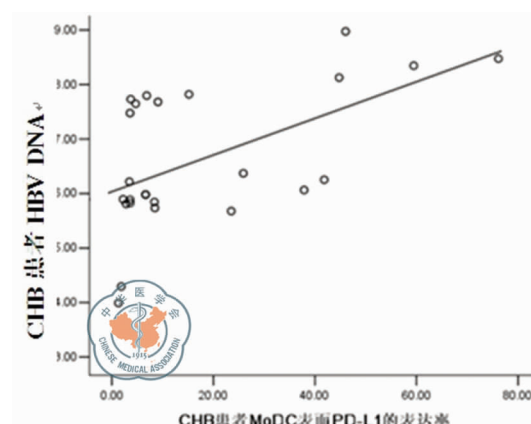


图5 MoDCs 细胞表面 PD-L1 表达与患者 HBV DNA 的关系

注: $r = 0.548, P = 0.001$; 回归方程: $y = 6.035 + 0.034x$

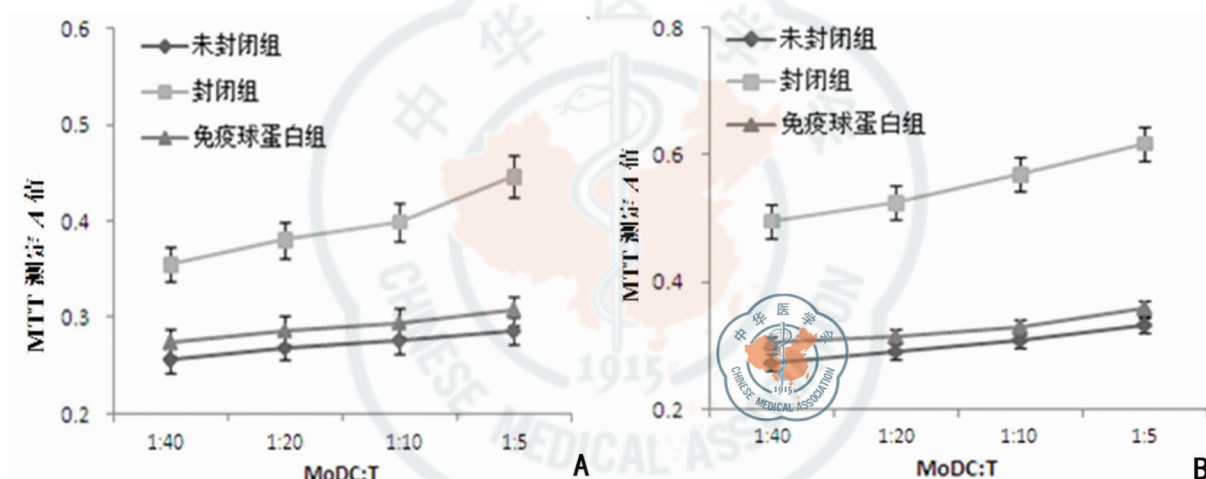


图6 阻断 PD-L1 信号通路对 T 细胞增殖的影响

注: A 图: 抗病毒治疗前, 封闭组患者 T 淋巴细胞增殖能力高于未封闭组和免疫球蛋白组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); B 图: 抗病毒治疗 6 个月时, 封闭组 T 淋巴细胞增殖能力高于未封闭组和免疫球蛋白组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)

四、阻断 PD-L1/PD-1 信号转导通路对 MLR 上清液中细胞因子的影响

治疗前, 封闭实验条件下患者 IL-12 和 IFN- γ 的水平均高于未封闭和免疫球蛋白封闭实验条件下患者相应指标水平, 但仅与未封闭条件下相比差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 封闭条件下患者 IL-10 水平与其他两组差异无统计学意义。治疗后, 封闭实验条件下患者的 IL-12 和 IFN- γ 浓度高于未封闭者, 其水平基本接近健康组, 其中 IL-12 升高较为显著 ($P < 0.05$); 封闭条件下 IL-10 水平较未封闭条件显著降低 ($P < 0.05$), 见表 3~5。

五、抗病毒治疗过程中 CHB 组患者 MoDCs 表面 PD-L1 的变化

抗病毒治疗前、治疗后 3 个月和 6 个月, MoDCs 表面 PD-L1 表达率分别为 $(47.54 \pm 18.47)\%$ 、 $(46.90 \pm 19.0)\%$ 和 $(37.16 \pm 15.05)\%$, 组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

讨 论

目前, DCs 功能障碍的具体机制尚未明确, 已知负性调控因子 PD-L1 的表达与 DCs 在特异性免疫应答过程中的作用密切相关。有报道显示, 慢性乙型肝炎患者体内 MoDCs 表面高表达的 PD-L1 分子能够抑制 HBV 特异性 T 淋巴细胞功能, 而阻断 PD-L1/PD-1 信号转导通路后能增强 T 淋巴细胞增殖及其分泌细胞因子的能力^[2,11]。

表 3 健康组和 CHB 患者治疗前后在三种不同实验条件下 MLR 上清液中 IL-12 的变化

组别	例数	IL-12 浓度 (pg/ml, $\bar{x} \pm s$)			$F_{\text{组间}}$
		未封闭	单克隆抗体封闭	免疫球蛋白封闭	
健康组	8	61.93 \pm 9.94	74.80 \pm 11.90	65.25 \pm 11.62	1.174
CHB 患者	8				
治疗前		35.83 \pm 9.92	58.15 \pm 16.18 ^a	46.69 \pm 16.62	4.696
治疗 6 个月		50.77 \pm 12.32	73.66 \pm 14.92 ^a	68.01 \pm 19.56 ^b	4.509

注:与未封闭实验条件下相比^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$ 表 4 健康组和 CHB 患者治疗前后在三种不同实验条件下 MLR 上清液中 IFN- γ 的变化

组别	例数	IFN- γ (pg/ml, $\bar{x} \pm s$)			$F_{\text{组间}}$
		未封闭	单克隆抗体封闭	免疫球蛋白封闭	
健康组	8	564.6 \pm 75.5	722.7 \pm 112.6 ^a	596.6 \pm 81.3 ^a	4.195
CHB 患者	8				
治疗前		323.5 \pm 119.5	438.0 \pm 31.3 ^b	369.2 \pm 54.4	4.377
治疗 6 个月		574.3 \pm 240.4	761.8 \pm 385.7	651.7 \pm 276.8	0.752

注:与未封闭实验条件下相比^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$ 表 5 健康组和 CHB 患者治疗前后在三种不同实验条件下 MLR 上清液中 IL-10 的变化 (pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	IL-10 浓度 (pg/ml, $\bar{x} \pm s$)			$F_{\text{组间}}$
		未封闭	单克隆抗体封闭	免疫球蛋白封闭	
健康组	8	37.34 \pm 20.47	21.18 \pm 11.24	32.42 \pm 20.08	1.085
CHB 患者	8				
治疗前		86.84 \pm 52.13	56.28 \pm 27.41	72.02 \pm 36.18	1.173
治疗 6 个月		58.06 \pm 27.94	28.10 \pm 18.06 ^a	46.85 \pm 23.67	3.297

注:与未封闭实验条件下相比^a $P < 0.05$

本研究发现 CHB 组患者 PD-L1 表达水平显著高于健康对照组,且与 ALT(反映肝脏炎症程度指标)和病毒载量呈正相关,与以往所报道的炎症因子可促进 PD-L1 表达的观点相一致^[14]。HBV 感染人体后,可激活体内免疫系统来攻击受感染的肝细胞,导致炎症的发生,从而引起患者 ALT 水平升高,机体可能出于保护性机制致使 PD-L1 水平上调,以减轻肝脏的免疫损伤;但这种负性调控同时限制了 HBV 特异性 T 淋巴细胞的免疫杀伤作用,形成高水平的病毒复制,造成感染持续存在。本研究结果还发现,抗病毒治疗后,CHB 患者外周血 MoDCs 表面 PD-L1 的表达并未因 ALT 水平或 HBV DNA 载量的下降而改变,提示替比夫定有效抗病毒治疗对 PD-L1 表达可能无显著影响。

本研究应用特异性抗体封闭 DCs 与 T 细胞之间的 PD-1/PD-L1 信号转导通路后发现,抗病毒治疗前后封闭组患者 T 淋巴细胞增殖能力均显著强于未封闭组和免疫球蛋白组,且这种增殖作用与 MoDCs 的

数量存在剂量依赖性关系;另外,细胞因子 IL-12 和 IFN- γ 分泌增加,IL-10 分泌减少。IL-12 和 IFN- γ 属于 Th1 细胞因子,主要参与细胞免疫的发生,促进细胞毒性 T 淋巴细胞 C(cytotoxicity T lymphocyte, CTL)成熟并增强其活性。IL-10 属于 Th2 细胞因子,能抑制巨噬细胞的抗原提呈功能和 Th1 细胞的应答。Th1 水平的升高和 Th2 水平的降低可增强机体对 HBV 的清除能力,与以往研究结果一致^[15]。上述结果均提示封闭该信号转导通路后 DCs 诱导抗 HBV 免疫反应显著增强。

综上所述,慢性乙型患者外周血 MoDCs 表面高表达的 PD-L1 分子可能参与诱导和维持外周 HBV 特异性 T 细胞的低反应性。而应用单克隆抗体阻断 PD-L1 介导的抑制性信号途径能够提高 MoDCs 诱导的 HBV 特异性 T 淋巴细胞免疫反应。PD-L1 封闭剂的使用有望成为抗 HBV 免疫治疗的有效策略之一。但目前对于该封闭剂的研究仅局限于动物模型及体外实验,要将其应用于人体内还存在有许多问

题,如不同个体封闭剂最适剂量的掌握,使用时机及疗程,能否与现有抗病毒治疗方法联合及其应用的不良反应等。另外,本研究中例数尚少,有必要扩大样本量以进一步深入研究。

参 考 文 献

- 1 Bohm W, Schirmbeck R, Elbe A, et al. Exogenous hepatitis B surface antigen particles processed by dendritic cells or macrophages prime murine MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocytes in vivo. *J Immunol*, 1995, 155(7):3313-3321.
- 2 Chen LG, Zhang Z, Wang FS, et al. B7-H1 up-regulation on myeloid dendritic cells significantly suppresses T cell immune function in patients with chronic hepatitis B. *Immunology*, 2007, 178(10):6634-6641.
- 3 Wang S, Bajorath J, Flies DB, et al. Molecular modeling and functional mapping of B7-H1 and B7-DC uncouple costimulatory function from PD-1 interaction. *J Exp Med*, 2003, 197(9):1083-1091.
- 4 Christian B, Andeas M. Contribution of the PD-L1/PD-1 pathway to T-cell exhaustion: an update on implications for chronic infection and tumor evasion. *Cancer Immunol Immunother*, 2007, 56(5):739-745.
- 5 Norde WJ, Maas F, Hobo W, et al. PD-1/PD-L1 interactions contribute to functional T-Cell impairment in patients who relapse with cancer after allogeneic stem cell transplantation. *Cancer Res*, 2011, 71(20):5111-5122.
- 6 彭国平, 孙雯, 吴炜, 等. 慢性乙型肝炎患者外周血树突状细胞 PD-L1 表达的相关研究. *浙江大学学报(医学版)*, 2008, 37(4):364-372.
- 7 Watanabe T, Bertolotti A, Tanoto TA. PD-1/PD-L1 pathway and T-cell exhaustion in chronic hepatitis virus infection. *J Viral Hepat*, 2010, 17(7):453-458.
- 8 Guoping P, Shuping L, Wei W, et al. PD-1 upregulation is associated with HBV-specific T cell dysfunction in chronic hepatitis B patients. *Mole Immunol*, 2008, 45(2):963-970.
- 9 Maier H, Isogawa M, Freeman GJ, et al. PD-1/PD-L1 interactions contribute to functional suppression of virus-specific CD8⁺ T lymphocytes in the liver. *J Immunol*, 2007, 178(5):2714-2720.
- 10 Gołabek V, Wozniakowska-Gesicka T. Role of the PD-1/PD-L1 pathway in immunopathology of HBV infection as the chance on the new therapeutic strategy. *Przegl Epidemiol*, 2010, 64(4):485-489.
- 11 滕晓英, 王鹏, 周新刚, 等. 慢性乙型肝炎病毒感染者肝组织中程序性死亡分子-1 及其配体的表达. *中华肝脏病杂志*, 2011, 19(5):345-348.
- 12 中华医学会肝病学会、感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南. *中华感染病杂志*, 2005, 13(12):881-891.
- 13 Romani N, Gruner S, Brang D, et al. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med*, 1994, 180(1):83-93.
- 14 Ihlbauer M, Fleck M, Schfi C, et al. PD-L1 is induced in hepatocytes by viral infection and by interferon-alpha and gamma and mediates T cell apoptosis. *J Hepatol*, 2006, 45(4):520-528.
- 15 Jeong HY, Lee YJ, Seo SK, et al. Blocking of monocyte-associated B7-H1 (CD274) enhances HCV-specific T cell immunity in chronic hepatitis C infection. *J Leukoc Biol*, 2008, 83(3):755-764.

(收稿日期:2011-10-11)

(本文编辑:孙荣华)

杨帆, 潘修成, 陈明, 等. 慢性乙型肝炎患者 MoDCs 表面 PD-L1 分子的表达及其对 T 淋巴细胞功能的影响[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志:电子版*, 2012, 6(4):272-277.