

## · 临床论著 ·

# 慢性HBV感染者HBV特异性CD8<sup>+</sup> T细胞Tim-3和PD-1的表达水平及其与IFN- $\gamma$ 产生的相关性研究

陈旭丹 刘琼 李新华 谢冬英

**【摘要】 目的** 研究免疫球蛋白黏蛋白分子-3 (Tim-3) 和程序性死亡受体-1分子 (PD-1) 在慢性乙型肝炎病毒 (HBV) 感染患者外周血HBV特异性CD8<sup>+</sup> T细胞表面的表达模式, 了解其与 $\gamma$ -干扰素 (IFN- $\gamma$ ) 产生的关系, 并探讨其临床意义。**方法** 采用流式细胞术检测主要组织相容性复合体-2 (HLA-A2) 阳性的78例临床类型不同的慢性HBV感染患者HBV特异性CD8<sup>+</sup> T细胞表面分子Tim-3和PD-1的表达, ELISA方法检测外周血单个核细胞 (PBMC) 培养上清液中IFN- $\gamma$ 的水平。**结果** 慢性HBV感染者Tim-3<sup>+</sup>/PD-1<sup>+</sup> HBV特异性CD8<sup>+</sup> T细胞比例占总的HBV特异性CD8<sup>+</sup> T细胞的58%, Tim-3<sup>+</sup>/PD-1<sup>+</sup>细胞比例为24%, Tim-3<sup>+</sup>/PD-1<sup>-</sup>比例16%, Tim-3<sup>-</sup>/PD-1<sup>-</sup>比例最低为2%。临床病情越严重的临床类型中, Tim-3<sup>+</sup>/PD-1<sup>+</sup> HBV特异性CD8<sup>+</sup> T细胞比例越高, 慢性乙型肝炎轻中度组为 (52.05  $\pm$  18.68) %, 重度肝炎组为 (59.66  $\pm$  19.25) %, 重型肝炎组最高为 (68.72  $\pm$  17.21) %; 各组与非活动性携带者组比较,  $P$ 值分别为0.007、0.009、0.000。重型组与轻中度组比较,  $P = 0.018$ 。Tim-3<sup>+</sup>/PD-1<sup>+</sup>在HBV特异性CD8<sup>+</sup> T细胞的表达与细胞培养上清液IFN- $\gamma$ 的水平呈负相关性 ( $r = -0.466$ ,  $P < 0.001$ )。**结论** 在HBV特异性CD8<sup>+</sup> T细胞中, Tim-3和PD-1共同表达是其主要表达模式, Tim-3和PD-1的高表达可能负性调控IFN- $\gamma$ 的产生, 从而影响慢性HBV感染的疾病进展和结局。

**【关键词】** 肝炎病毒, 乙型; HBV特异性CD8<sup>+</sup> T细胞; 免疫球蛋白粘蛋白分子-3; 程序性死亡受体-1分子;  $\gamma$ -干扰素

**The expression of Tim-3 and PD-1 on HBV specific CD8 T cells in chronic HBV infection patients and its correlation with the production of interferon gamma** CHEN Xu-dan, LIU Qiong, LI Xin-hua, XIE Dong-ying. Department of Infectious Diseases, The Third Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510630, China

Corresponding author: XIE Dong-ying, Email: xdy-gz@163.com

**【Abstract】 Objective** To study the patterns of expression of T-cell immunoglobulin and mucin domain-containing molecule 3 (Tim-3) and programmed death1 (PD-1) on HBV specific CD8<sup>+</sup> T cells in chronic hepatitis B virus infection patients (CHB). Investigate the correlation between Tim-3 and PD-1 and production of interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) and its clinical meanings. **Methods** The expression of Tim-3 and PD-1 on HBV specific CD8<sup>+</sup> T cells in 78 major histocompatibility complex-2 (HLA-A2) positive HBV patients with different clinical types were detected by flow cytometry. The level of IFN- $\gamma$  in the supernatant of culture of peripheral blood mononuclear cell (PBMC) were detected by double antibody sandwich ELISA. **Results** In chronic HBV infection patients, 58% of HBV-specific CD8<sup>+</sup> T cells are Tim-3<sup>+</sup>/PD-1<sup>+</sup> cells, 24% are Tim-3<sup>+</sup>/PD-1<sup>-</sup> cells. The ratio of Tim-3<sup>+</sup>/PD-1<sup>-</sup> cells was 16% and the Tim-3<sup>-</sup>/PD-1<sup>-</sup> cells are the lowest with 2%. The proportion of Tim-3<sup>+</sup>/PD-1<sup>+</sup> HBV-specific CD8<sup>+</sup> T cells increased consistent with the clinical severity. The ratio of Tim-3<sup>+</sup>/PD-1<sup>+</sup> HBV-specific CD8<sup>+</sup> T cells is (33.93  $\pm$  10.80)% in the inactive HBsAg carriers. The ratio of Tim-3<sup>+</sup>/PD-1<sup>+</sup> cells in mild and moderate chronic hepatitis patients are (52.05  $\pm$  18.68)%, (59.66  $\pm$  19.25)% are Tim-3<sup>+</sup>/PD-1<sup>+</sup> cells in severe hepatitis, and (68.72  $\pm$  17.21)% are Tim-3<sup>+</sup>/PD-1<sup>+</sup> cells in hepatic

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2013.05.009

基金项目: 新药临床研究技术平台建设-抗慢性乙型病毒性肝炎新药临床评价研究平台构筑 (NO.2008ZX09312-007-006)

作者单位: 510630 广州市, 中山大学附属第三医院感染科

通讯作者: 谢冬英, Email: xdy-gz@163.com

failure, which is the highest. Compared with inactive HBsAg carriers,  $P = 0.007, 0.009, 0.000$ . Compare hepatic failure and mild and moderate chronic hepatitis,  $P = 0.018$ . The percentage of Tim-3<sup>+</sup>/PD-1<sup>+</sup> HBV-specific CD8<sup>+</sup> T cells negatively correlate with the level of IFN- $\gamma$  in culture supernatant. **Conclusions** sCo-expression of Tim-3 and PD-1 on HBV-specific CD8<sup>+</sup> T cells is the main pattern in HBV patients. High expression of Tim-3 and PD-1 may negatively control the production of IFN- $\gamma$ , which may influence the outcomes and disease progression in chronic HBV infection.

**【Key words】** Hepatitis B virus; HBV specific CD8<sup>+</sup> T cells; Tim-3; PD-1; IFN- $\gamma$

慢性乙型肝炎是我国常见的一种慢性传染病,严重危害着人民的身体健康。目前HBV持续感染及发病机制仍不十分明确,HBV特异性CD8<sup>+</sup> T细胞功能低下可能是HBV感染慢性化的主要原因之一<sup>[1,2]</sup>。负性调控分子与HBV特异性CD8<sup>+</sup> T细胞功能耗竭及病毒持续感染密切相关<sup>[3]</sup>。程序性死亡受体1(programmed death 1, PD-1)及T细胞免疫球蛋白粘蛋白分子3(T-cell immunoglobulin and mucin domain-containing molecule 3, Tim-3)是目前研究较多的负性调节分子。细胞因子介导的免疫应答在免疫机制中起重要作用,在T细胞杀灭病毒感染的肝细胞机制中具有重要作用,HBV感染可抑制免疫细胞的功能,导致IFN- $\gamma$ 诱发不足,使病毒不能被清除,造成感染的慢性化<sup>[4]</sup>。在慢性HCV、HIV、LMCV感染中,分别有研究显示Tim-3、PD-1表达上调,并参与T细胞功能耗竭<sup>[5-8]</sup>。PD-1在HBV感染中的作用及抗病毒治疗过程中的动态变化已有文献报道<sup>[9]</sup>。但是,慢性HBV感染者Tim-3与PD-1共表达水平与病情的关系并未见相关报道。

通过研究Tim-3/PD-1在慢性HBV感染者HBV特异性CD8<sup>+</sup> T细胞的表达模式及与免疫功能的关系,探讨其临床意义,进一步增加对慢性乙型肝炎病毒持续感染及炎症活动的发病机制的认识,并为免疫调控治疗慢性乙型肝炎及肝衰竭提供新的理论依据。

## 材料与方法

### 一、主要试剂

IFN- $\gamma$ 试剂盒、PE mouse anti human HLA-A2、PD-1-PerCP-eFluor 710、TIM3-APC、CD8-FITC 来自美国 eBioscience公司; PE Pro5TM human MHC Pentamer1来自英国的Proimmune公司; Recombinant Human IL-2来自美国Peprotech公司,流式细胞仪FC500 MPL来自美国Beckman公司; ELISA试验自动检测ELX800美国BioTek公司。

### 二、研究对象

选择2010年3月至2011年7月中山大学第三附属

医院感染科住院或门诊慢性HBV感染者160例,其中男性141例,女性19例,年龄17~64岁,平均年龄 $(40 \pm 10)$ 岁。160例患者中,主要组织相容性复合体-2(HLA-2)阳性患者(通过流式细胞检测筛选)78例,包括病毒性肝炎(乙型)慢性(轻、中度)28例,重度18例,重型26例,非活动性HBsAg携带者6例。疾病诊断标准参照2000年《病毒性肝炎防治方案》<sup>[10]</sup>和2010年《慢性乙型肝炎防治指南》<sup>[11]</sup>,排除合并其他肝炎病毒感染和重叠HIV感染者、自身免疫性肝病,合并严重心、肺、肾、脑等疾病、孕期及哺乳期妇女、肿瘤患者。同时半年内未使用任何抗病毒药物。上述78例患者检测HBV特异性CD8<sup>+</sup> T细胞PD-1和Tim-3表达水平和细胞培养上清液中IFN- $\gamma$ 浓度。

### 三、检测方法

1. 标本的采集: 入组病例均用含有EDTA2K2抗凝剂的真空采血管采血10 ml。

2. PBMC的分离和HLA-2检测: 采用外周血Ficoll梯度离心法分离患者的外周血单个核细胞(PBMC),取一部分PBMC,加入HLA-2抗体孵育,选出HLA-2阳性患者。

3. HBV特异性CD8<sup>+</sup> T细胞培养: 取HLA-A2阳性的PBMC以 $1 \times 10^6$ 个/孔密度接种于12孔板,并加入重组人白细胞介素-12(interleukin-12, IL-12)(100 pg/ml)及HBV core 18-27抗原肽段(10  $\mu$ l/ml), 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>共同孵育;于第三天再加入上述IL-12及HBV core 18-27抗原肽段,同时添加重组人白细胞介素-2(interleukin-2, IL-2)(50 U/ml), 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>共同孵育。第7天收集培养细胞,计数;培养上清液收集置于-20  $^{\circ}$ C冰箱保存。

4. HBV特异性CD8<sup>+</sup> T细胞表面Tim-3及PD-1的检测: 收集上述培养细胞 $1 \times 10^6$ 个,加入PE标记HBV 抗原表位肽-五聚体复合体(Pro5TM MHC Pentamer, 所含 HBV 抗原表位肽为 HBcAg18-27, 序列为FLPSDFFPSV) 10  $\mu$ l, 室温避光孵育10 min, PBS洗涤1次,加入异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记anti-human CD8a, anti-Tim-3-APC和anti-PD1-PerCP-eFluor 710

抗体各5  $\mu$ l, 4  $^{\circ}$ C避光孵育20 min, 上流式细胞仪检测, 每份标本设同型对照。以特异性CTL细胞的阳性细胞为对象, 检测其表面Tim-3、PD-1表达。

5. IFN- $\gamma$ 的检测: 取PBMC培养第7天的上清液, -20  $^{\circ}$ C保存, ELISA法检测IFN- $\gamma$ 浓度。

#### 四、统计学处理

资料采用GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA) 统计软件分析。正态分布计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 描述, 组间比较采用独立样本 $t$ 检验或方差分析; 非正态分布计量资料采用中位数(M)与四分位间距(inter-quartile range,  $Q_L$ - $Q_U$ )描述, 采用秩和检验; 相关性分析采用 Pearson 相关分析或 Spearman 等级相关分析, 设双侧检验 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

### 结 果

#### 一、慢性HBV感染者HBV特异性CD8 $^{+}$ T细胞Tim-3和PD-1的表达模式

在所有HBV特异性CD8 $^{+}$  T细胞中, Tim-3 $^{+}$ /PD-1 $^{+}$ 双阳性的HBV特异性CD8 $^{+}$  T细胞比例最高为

58%, Tim-3 $^{-}$ /PD-1 $^{+}$ 细胞比例为24%, Tim-3 $^{-}$ /PD-1 $^{-}$ 细胞比例为16%, 而Tim-3 $^{+}$ /PD-1 $^{-}$ 细胞比例最低, 为2%, 见图1。

#### 二、不同临床类型慢性HBV感染者HBV特异性CD8 $^{+}$ T细胞Tim-3/PD-1的表达

慢性HBV感染者临床病情越严重的患者, Tim-3 $^{+}$ /PD-1 $^{+}$ 双阳性的HBV特异性CD8 $^{+}$  T细胞的比例越高, 非活动性HBsAg携带者比例为(33.93  $\pm$  10.80)%, 慢性乙型肝炎轻中度组为(52.05  $\pm$  18.68)%, 重度肝炎组为(59.66  $\pm$  19.25)%, 重型肝炎组最高为(68.72  $\pm$  17.21) %。重型组、重度组、轻中度组明显高于携带者组( $P = 0.000$ ,  $Z = -3.38$ ;  $P = 0.009$ ,  $Z = -2.533$ ;  $P = 0.007$ ,  $Z = -2.620$ )。重型组与轻中度比较, 差异具有统计学意义( $P = 0.018$ ,  $Z = -2.363$ ), 重型组与重度组、重度组与轻中度组比较, 差异无统计学意义, 见图2。

#### 三、HBV特异性CD8 $^{+}$ T细胞Tim-3 $^{+}$ /PD-1 $^{+}$ 的表达与IFN- $\gamma$ 产生的相关性

采用Spearman秩相关分析可以发现, Tim-3 $^{+}$ /PD-1 $^{+}$ 在HBV特异性CD8 $^{+}$  T细胞的表达与PBMC

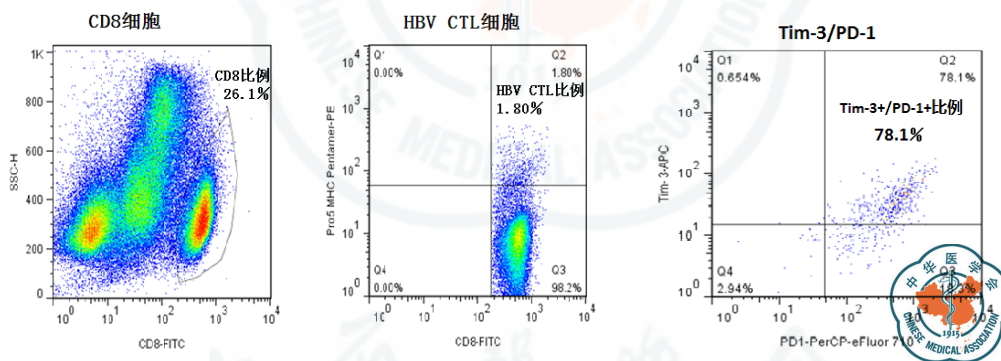
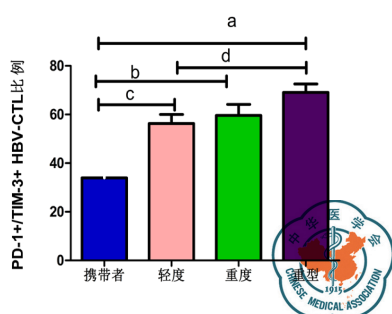
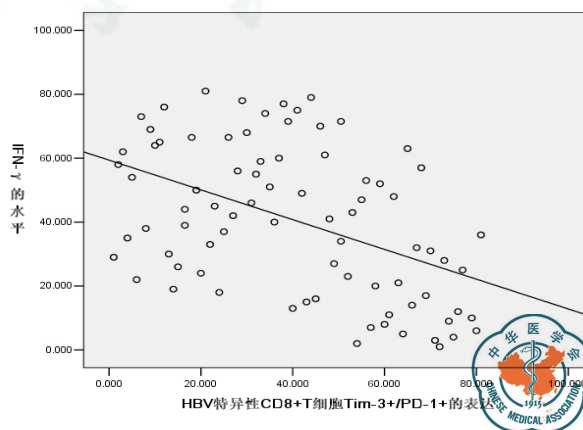


图1 HBV特异性CD8 $^{+}$  T细胞Tim-3/PD-1的表达流式图



注: a为 $Z = -3.380$ ,  $P < 0.001$ ; b为 $Z = -2.533$ ,  $P < 0.01$ ; c为 $Z = -2.620$ ,  $P < 0.01$ ; d为 $Z = -2.362$ ,  $P < 0.05$

图2 不同临床类型慢性HBV感染者HBV特异性CD8 $^{+}$  T细胞Tim-3/PD-1的表达



注:  $r = -0.466$ ,  $P < 0.001$

图3 HBV特异性CD8 $^{+}$  T细胞Tim-3 $^{+}$ /PD-1 $^{+}$ 的表达与IFN- $\gamma$ 产生的相关性



上清液IFN- $\gamma$ 的水平呈负相关 ( $r = -0.466$ ,  $P < 0.001$ ), 见图3。

## 讨 论

HBV特异性CD8<sup>+</sup> T细胞在乙型肝炎病毒清除及肝脏炎症活动中起重要作用。慢性HBV患者体内HBV特异性CD8<sup>+</sup> T细胞存在数量和质量上的缺陷, PD-1或Tim-3表达升高是T细胞功能耗竭的主要原因。有研究<sup>[12]</sup>发现, 自身免疫性疾病、肿瘤免疫逃逸、病毒持续感染和炎症反应等均与PD-1及Tim-3表达相关。

在慢性HBV感染中, 已证实PD-1表达上调, 并与肝脏炎症损伤及病毒持续相关<sup>[13]</sup>。近年有研究显示, 慢性HBV感染者NK细胞、CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup> T细胞Tim-3的表达上调, 且表达在CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup> T细胞的Tim-3与肝脏炎症程度相关<sup>[14-15]</sup>。Tim-3和PD-1的共表达可能导致更加明显的T细胞功能衰竭, 从而影响病毒的清除和疾病的发生发展。本研究发现慢性HBV感染者中, 半数以上患者HBV-特异性CD8<sup>+</sup> T细胞同时表达Tim-3和PD-1, 单表达Tim-3的细胞很少。Tim-3<sup>+</sup>/PD-1<sup>+</sup>双阳性的HBV特异性CD8<sup>+</sup> T细胞比例最高为58%, Tim-3<sup>+</sup>/PD-1<sup>-</sup>细胞比例为24%, Tim-3<sup>-</sup>/PD-1<sup>-</sup>细胞比例为16%, 而Tim-3<sup>-</sup>/PD-1<sup>+</sup>细胞比例最低(2%)。随着临床病情严重程度增加, Tim-3<sup>+</sup>/PD-1<sup>+</sup>HBV特异性CD8<sup>+</sup> T细胞比例也逐渐增加。Jin等<sup>[16]</sup>发现, 在病毒的持续感染中, 同时阻断PD-1和Tim-3可以协同性地提高CD8<sup>+</sup> T细胞的功能以及提高其对病毒的抑制能力。本研究显示, 随着HBV特异性CD8<sup>+</sup> T细胞表面PD-1/Tim-3双表达水平越高, PBMC培养上清液IFN- $\gamma$ 的水平逐渐降低, 这与Jin等<sup>[16]</sup>的结果是一致的。IFN- $\gamma$ 是反应T细胞功能的重要指标。机体存在两种清除病毒的免疫方式, 非细胞损伤性病毒清除机制和靶细胞损伤性清除病毒机制, IFN- $\gamma$ 的产生是非细胞损伤性病毒清除的重要的细胞因子<sup>[17]</sup>。本研究发现, Tim-3和PD-1可能协同负性调节CTL细胞的功能, 从而抑制IFN- $\gamma$ 的产生, IFN- $\gamma$ 的降低可导致非溶细胞性清除病毒能力减弱, HBV病毒不能得到有效的清除, 机体即调控增强了另一种清除病毒的方式, 即溶细胞性的病毒清除反应, 从而使肝脏的炎症程度增加。本研究显示, 随着Tim-3和PD-1在HBV特异性CD8<sup>+</sup> T细胞的表达水平的升高, 患者的临床病情程度也随着增加, 因本研究未选取患者肝脏组织标本, 故Tim-3和PD-1的表达水平与慢性HBV感染者肝组织的病变程度是否相关及Tim-3和PD-1的表达水平与

肝脏炎症及纤维化程度的关系有待进一步研究。

总之, 在HBV-特异性CD8<sup>+</sup> T细胞中, Tim-3和PD-1共同表达是Tim-3和PD-1的主要表达模式, PD-1表达水平高于Tim-3, Tim-3单表达的细胞很少。Tim-3和PD-1共表达水平与T细胞功能密切相关, 从而影响慢性HBV感染的疾病进展和结局。

## 参 考 文 献

- 1 Chang JJ, Lewin SR. Immunopathogenesis of hepatitis B virus infection. *Immunol Cell Biol*, 2007, 85(1):16-23.
- 2 Bertolotti A, Maini M, Williams R. Role of hepatitis B virus specific cytotoxic T cells in liver damage and viral control. *Antiviral Res*, 2003, 60(2):61-66.
- 3 Wherry EJ, Ha SJ, Kaech SM, et al. Molecular signature of CD8<sup>+</sup> T cell exhaustion during chronic viral infection. *Immunity*, 2007, 27(4):670-684.
- 4 Hyodo N, Tajimi M, Ugajin T, et al. Frequencies of interferon-gamma and interleukin-10 secreting cells in peripheral blood mononuclear cells and liver infiltrating lymphocytes in chronic hepatitis B virus infection. *Hepatol Res*, 2003, 27(2):109-116.
- 5 Urbani S, Amadei B, Tola D, et al. PD-1 expression in acute hepatitis C virus (HCV) infection is associated with HCV-specific CD8 exhaustion. *J Virol*, 2006, 80(22):11398-11403.
- 6 Day CL, Kaufmann DE, Kiepiela P, et al. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature*, 2006, 443(7109):350-354.
- 7 Jin HT, Anderson AC, Tan WG, et al. Cooperation of Tim-3 and PD-1 in CD8 T-cell exhaustion during chronic viral infection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(33):14733-14738.
- 8 Golden-Mason L, Palmer BE, Kassam N, et al. Negative immune regulator Tim-3 is overexpressed on T cells in hepatitis C virus infection and its blockade rescues dysfunctional CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. *J Virol*, 2009, 83(18):9122-9130.
- 9 夏娟, 许林, 刘勇, 等. 恩替卡韦治疗后慢性乙型肝炎患者外周血T淋巴细胞表面程序性死亡受体1表达与HBeAg血清学转换的关系. *中华肝病杂志*, 2011, 19(2):93-97.
- 10 中华医学会传染病与寄生虫病学分会, 肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案. *中华肝病杂志*, 2000, 8(6):324-329.
- 11 中华医学会肝病学分会, 中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2010年版). *中国肝病杂志:电子版*, 2011, 3(1):40-56.
- 12 Zhu C, Anderson AC, Kuchroo VK. TIM-3 and its regulatory role in immune responses. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2011, 350(2):1-15.
- 13 Crawford A, Wherry EJ. The diversity of costimulatory and inhibitory receptor pathways and the regulation of antiviral T cell responses. *Curr Opin Immunol*, 2009, 21(2):179-186.
- 14 Wu W, Shi Y, Li J, et al. Tim-3 expression on peripheral T cell subsets correlates with disease progression in hepatitis B infection. *Virol J*, 2011, 8(1):113.
- 15 Ju Y, Hou N, Meng J, et al. T cell immunoglobulin- and mucin-domain-containing molecule-3 (Tim-3) mediates natural killer cell suppression in chronic hepatitis B. *J Hepatol*, 2010, 52(3):322-329.
- 16 Jin HT, Anderson AC, Tan WG, et al. Cooperation of Tim-3 and PD-1 in CD8 T-cell exhaustion during chronic viral infection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(33):14733-14738.

- 17 邹晓毅, 姚云清. 机体清除乙型肝炎病毒免疫机制研究新进展. 国外医学·病毒学分册, 2005, 14(2): 42-45.

(收稿日期: 2013-05-14)

(本文编辑: 李卓)

陈旭丹, 刘琼, 李新华, 等. 慢性HBV感染者HBV特异性CD8<sup>+</sup>T细胞Tim-3和PD-1的表达水平及其与IFN- $\gamma$ 产生的相关性研究[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2013, 7(5): 665-669.



中华医学会