

# HBV 感染外周血单个核细胞的研究进展

周永 史昌河 宣世英 董全江 周蓉蓉 孙蓬蓬 魏阳 刘金亭

外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)是指一群在机体的免疫应答中起至关重要作用的单个核白细胞,主要指T、B淋巴细胞、巨噬细胞、NK细胞(natural killer cell, NK)等免疫活性细胞。HBV属嗜肝DNA(deoxyribonucleic acid, DNA)病毒,主要侵犯肝脏组织,但在肝外组织和细胞中也发现了HBV DNA及其相关抗原。自1983年Lie-Injo等<sup>[1]</sup>首次报道在HBsAg阳性肝癌患者的外周血单个核细胞中分离出HBV DNA以后,陆续的研究发现在PBMC中还存在着多种形式的HBV,如HBV DNA、HBV ccc DNA(covalently closed circular DNA, ccc DNA)及其复制中间体RNA(ribonucleic acid, RNA)<sup>[2-5]</sup>,从而证实了PBMC是HBV肝外感染的重要靶器官。本文将从HBV感染PBMC的机制和对免疫功能的影响、HBV感染PBMC的临床意义两方面就HBV感染PBMC的研究进展作简要回顾综述。

## 一、HBV 感染 PBMC 的机制和对免疫功能的影响

HBV感染PBMC的机制目前仍未完全阐明。一般认为,HBV感染PBMC的机制与其感染肝细胞相似,HBV通过与PBMC表面的HBV特异性受体结合后进入细胞。Pontisso等<sup>[6]</sup>研究发现PBMC表面存在前-S1受体,HBV通过前-S1与PBMC结合。另有学者认为单核巨噬细胞吞噬病毒体可能导致HBV感染PBMC。HBV感染PBMC后,HBV DNA以游离型和整合型的形式存在于PBMC内,可在其中进行复制和转录,从而影响PBMC的功能,尤其干扰其免疫活性,主要表现为以下几个方面:①HBV感染PBMC使其成为特异细胞毒性T淋巴细胞(CTL)攻击的靶细胞,从而导致PBMC的数量减少,进而影响免疫功能;②CD<sub>4</sub><sup>+</sup>细胞减少、CD<sub>8</sub><sup>+</sup>细胞增高、CD<sub>4</sub><sup>+</sup>/CD<sub>8</sub><sup>+</sup>比值降低以及Th1和Th2免疫应答失衡<sup>[7-9]</sup>,导致多种细胞因子的表达受到影响,成为慢性乙型肝炎发作的重要机制之一。研究<sup>[10-12]</sup>显示,PBMC免疫功能失衡与血清HBV载量有明显关系。血清高载量HBV DNA水平可抑制IL-12诱导的干扰素-γ(interferon, IFN-γ)的生成,也可能导致肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor α, TNF-α)水平降低<sup>[13]</sup>。

## 二、HBV 感染 PBMC 的临床意义

1. HBV 感染 PBMC 在母婴垂直传播中的作用:目前认为宫内感染是母婴传播的重要方式,目前HBV宫内感染判定的公认标准为新生儿出生24 h内血清HBsAg和(或)血清HBV DNA阳性。近期研究<sup>[14]</sup>提出,应将HBsAg阳性

孕妇新生儿PBMC中HBV DNA水平作为血清HBV DNA的重要补充和HBV宫内感染的指标之一。Wang等<sup>[15]</sup>通过检测151例血清HBsAg和HBeAg(hepatitis B e antigen, HBeAg)均阳性的母亲及其新生儿血清和PBMC中HBV DNA后,发现PBMC中HBV DNA阳性是HBV宫内感染的风险因子,同时母亲PBMC中HBV DNA阳性可能是新生儿PBMC宫内感染的独立风险因子。已有研究指出母亲PBMC中HBV DNA阳性可导致新生儿PBMC的HBV感染<sup>[4,16-18]</sup>,也可导致HBV免疫接种失败<sup>[16-18]</sup>。王效军等<sup>[19]</sup>研究发现感染HBV的孕妇PBMC有可能穿过胎盘屏障进入胎儿血循环,从而导致引起HBV宫内传播。

2. HBV 感染 PBMC 可能与 HBV 隐性感染、HBV 感染复发有关:HBV隐性感染的特征是HBV感染而血清HBsAg阴性,但肝组织和PBMC中HBV DNA阳性,血清HBV DNA < 10<sup>4</sup> 拷贝/ml。Shi等<sup>[18]</sup>指出HBV感染PBMC后的相当长的时期内血清HBsAg和血清HBV DNA可阴性。Murakami等<sup>[20]</sup>研究也发现血清HBsAg低于检测下限后,PBMC中仍存在着整合状态的HBV基因组,其中HBV DNA可能存在长达数年,均可作为HBV隐性感染和HBV感染复发的证据。长期以来一直将血清HBsAg清除和血清HBV DNA低于检测下限作为HBV感染的治愈标准,但在血清HBV DNA阴性、PBMC中HBV DNA阳性的患者肝移植后,即使应用乙型肝炎高效价免疫球蛋白进行被动免疫,PBMC中HBV DNA阳性仍是此类患者肝移植后HBV感染复发的高度危险因素<sup>[21]</sup>,因此随着血液透析和组织、器官移植的不断增多,HBV感染PBMC可能导致病毒传播的潜在危险性受到越来越多的关注。

3. HBV 感染 PBMC 与 HBV 感染持续有关:Trippler等<sup>[22]</sup>通过检测急、慢性HBV感染患者的B细胞、CD<sub>4</sub><sup>+</sup>T细胞、CD<sub>8</sub><sup>+</sup>T细胞、NK细胞内HBV DNA滴度后指出HBV感染PBMC可能参与HBV感染持续。另外Mazet-Wagner等<sup>[3]</sup>通过检测血清和PBMC中的HBV DNA和ccc DNA后发现PBMC中HBV DNA和ccc DNA阳性与HBV感染持续有关。国内张凯宇等<sup>[2]</sup>和张平等<sup>[5]</sup>先后研究指出PBMC中HBV DNA不易被清除而长期存在与HBV感染易慢性化有关。

4. HBV 感染 PBMC 与患者病情轻重和变化有关:目前越来越多的研究显示,血清与PBMC内HBV DNA阳性率存在明显的相关性<sup>[5,23-24]</sup>,PBMC中HBV DNA水平的检测及复制状态的评价是血清HBV DNA定量检测的重要补充。崔鲂等<sup>[25]</sup>报道应用荧光PCR定量检测了各型HBV感染患者PBMC和血清中HBV DNA的水平后,PBMC内HBV DNA阳性率随着患者病情加重而逐渐增高,而血清HBV DNA阳性率的变化则与此无关,从而提出PBMC中HBV DNA较血清HBV DNA检测能更好反映肝细胞内

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2013.05.041

基金项目:青岛市公共领域科技支撑计划[项目编号12-1-3-1-(8)-nsh]

作者单位:266033,青岛市,青岛市传染病医院(周永、史昌河);青岛市市立医院(宣世英、董全江、周蓉蓉);青岛市海慈医疗集团(孙蓬蓬);青岛大学医学院(魏阳);济宁市金乡人民医院(刘金亭)

通讯作者:周蓉蓉, Email: sch43@126.com

HBV DNA 的存在情况,从而对慢性乙型肝炎患者 HBV 的复制状态有更准确的评价。周蓉蓉等<sup>[26]</sup>研究发现 HBV 逆转录酶可在 PBMC 中复制,其表达水平与乙型肝炎的慢性化、重度化相关。近年来许鸣等<sup>[27]</sup>一系列关于 PBMC 白蛋白基因 mRNA (messenger RNA, mRNA) 的研究发现其阳性表达与肝细胞的损伤相关,可作为慢性乙型肝炎病情进展的辅助指标。

5. HBV 感染 PBMC 在疾病诊治中的意义:①高应林等在研究肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 患者 PBMC 中 HBV DNA 整合情况时发现 PBMC 中 HBV DNA 含量的检测可作为临床预测 HCC 发生的风险指标<sup>[28]</sup>。周蓉蓉等<sup>[29]</sup>通过研究 HBV 相关肝细胞癌患者 HBV 反转录酶 mRNA 表达情况后发现 HBV 可在 PBMC 中独立存在并复制, HCC 患者 PBMC 中 HBV 反转录酶表达活跃,提示 HBV 肝外感染的持续存在可能与 HCC 相关;②在应用干扰素抗 HBV 治疗过程中研究发现 PBMC 中 HBV DNA 如持续阳性则干扰素的治疗效果差<sup>[30]</sup>,核苷类似物的抗 HBV 治疗研究<sup>[31]</sup>中也发现拉米夫定抗治疗不仅可以抑制血清 HBV DNA,也可以有效抑制 PBMC 中 HBV DNA, PBMC 中 HBV DNA 水平和 ccc DNA 水平可作为预测拉米夫定疗效的指标<sup>[32]</sup>。近期周永等<sup>[33]</sup>在恩替卡韦治疗 HBeAg 阳性的慢性乙型肝炎的过程中发现 PBMC 中 HBV DNA 低于检测下限对预测 HBeAg 的血清转换有一定的价值。

6. HBV 感染 PBMC 在临床研究中的价值:目前研究证实,HBV 感染 PBMC 后不仅 HBV 可以整合到 PBMC 基因组中,而且在 PBMC 中也可以找到多种形式的 HBV 及其抗原形式,因此通过构建 PBMC 体外培养系可以了解 HBV 感染 PBMC 的机制及 HBV 在其中复制和分泌的过程<sup>[34]</sup>,从而为慢性乙型肝炎发病机制、临床药物研究和药物作用的评价等提供依据。

综上所述, PBMC 作为 HBV 感染机体的重要肝外靶器官, HBV 感染 PBMC 后不仅影响机体免疫功能,而且 HBV 感染 PBMC 与 HBV 母婴垂直传播、HBV 隐性感染、HBV 感染复发、器官移植后 HBV 再发、慢性乙型肝炎的病情变化及抗病毒治疗效果的评估有关。随着对其研究的不断深入及 PBMC 和不同亚群体体外培养系统的建立,必将为慢性乙型肝炎及 HBV 感染相关疾病的诊断、预防和临床治疗提供理论依据。

## 参 考 文 献

- Lie-Injo LE, Balasegaram M, Lopez CG, et al. Hepatitis B virus DNA in liver and white blood cells of patients with hepatoma. *DNA*, 1983, 2:301-308.
- 张凯宇, 蔡艳俊, 王峰, 等. 乙肝患者外周血单个核细胞中乙肝病毒复制中间体 RNA 与乙肝病毒 DNA 相关性的研究. *临床肝胆病杂志*, 2001, 17(3):149-151.
- Mazet-Wagner AA, Baclet MC, Loustand-Ratti V, et al. Real-time PCR quantitation of hepatitis B virus total DNA and covalently closed circular DNA in peripheral blood mononuclear cells from hepatitis B virus-infected patients. *J Virol Methods*, 2006, 138(1-2):70-79.
- 李淑红, 岳亚飞, 张树林, 等. 乙型肝炎病毒感染孕妇的外周血单个核细胞在宫内感染中的作用. *中华肝脏病杂志*, 2006, 14(4):264-267.
- 张平, 曹宁芬, 袁迎春, 等. 乙型肝炎患者外周血单个核细胞中 HBV-DNA 检测的临床意义. *宁夏医科大学学报*, 2009, 31(3):315-316.
- Pontisso P, Morsica G, Ruvoletto MG, et al. Hepatitis B virus binds to peripheral blood mononuclear cells via the pre S1 protein. *J Hepatol*, 1991, 12(2):203-206.
- 宣世英, 孙樱, 张健, 等. 慢性乙型肝炎病人外周血单个核细胞 HBV 感染后对其细胞免疫功能影响的研究. *中华流行病学杂志*, 1997, 18(2):80-82.
- 黄重发, 朱清, 付启梅, 等. 慢性乙型肝炎患者外周血单个核细胞细胞因子检测意义. *华南国防医学杂志*, 2009, 23(1):41-42.
- 钟艳丹, 谭德明, 李涛, 等. 外周血单个核细胞中 HBV DNA 与 HBV cccDNA 对慢性乙型肝炎患者免疫功能的影响. *中华实验和临床感染病杂志:电子版*, 2007, 1(1):55-60.
- Kondo Y, Asabe S, Kobayashi K, et al. Recovery of functional cytotoxic T lymphocytes during lamivudine therapy by acquiring multi-specificity. *J Med Virol*, 2004, 74(3):425-433.
- Fischler B, Nystrom J, Bjomsdottir T, et al. Virus specific T cell immune response in children and adolescents with chronic hepatitis B virus infection. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2007, 45(1):75-83.
- Rehermann B. Chronic infections with hepatotropic viruses: mechanisms of impairment of cellular immune responses. *Semin Liver Dis*, 2007, 27(2):152-160.
- Tang YM, Chen MH, Chen GH, et al. Kinetics of phytohemagglutinin induced IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  expression in peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic hepatitis B after liver transplantation. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(29):4574-4578.
- 史晓红, 王素萍, 李淑珍, 等. 太原市 HBsAg 阳性孕妇新生儿 HBV 感染状况的研究. *山西医科大学学报*, 2004, 35(1):18-19, 24.
- 王素萍, 李铁刚, 魏俊妮, 等. 乙型肝炎病毒宫内感染相关因素的研究. *中华妇产科杂志*, 2005, 40(10):670-672.
- Pontisso P, Vidalino L, Quarta S, et al. Biological and clinical implications of HBV infection in peripheral blood mononuclear cells. *Autoimmun Rev*, 2008, 8(1):13-17.
- 韩晓兵, 岳亚飞, 白桂芹, 等. 新生儿外周血单个核细胞乙型肝炎病毒 DNA 检测的临床意义. *中华儿科杂志*, 2005, 43(6):434-437.
- 石磊, 岳亚飞, 张树林, 等. 新生儿外周血单个核细胞感染乙型肝炎病毒的机制及意义. *中华儿科杂志*, 2006, 44(11):855-858.
- 王效军, 王素萍, 李铁钢, 等. PBMC 转运与乙型肝炎病毒宫内传播关系. *中国公共卫生*, 2007, 23(5):571-572.
- Murakami Y, Minami M, Daimon Y, et al. Hepatitis B virus DNA in liver, serum, and peripheral blood mononuclear cells after the clearance of serum hepatitis B virus surface antigen. *J Med Virol*, 2004, 72(2):203-214.
- Roche B, Feray C, Gigou M, et al. HBV DNA persistence 10 years after liver transplantation despite successful anti-HBs passive immunoprophylaxis. *Hepatology*, 2003, 38(1):86-95.
- Trippler M, Meyer zum Büschenfelde KH, Gerken G. HBV viral load within subpopulations of peripheral blood mononuclear cells in HBV infection using limiting dilution PCR. *J Virol Methods*, 1999, 78(1-2):129-147.
- 宓余强, 梁树人, 张弘. 慢性乙型肝炎外周血单个核细胞内 HBV-DNA 与血清 HBV-DNA 及 HBeAg 表达关系的研究. *中华实验和临床感染病杂志*, 2007, 21(3):261-263.
- Lu L, Zhang HY, Yueng YH, et al. Intracellular levels of hepatitis B virus DNA and pregenomic RNA in peripheral blood mononuclear cells of chronically infected patients. *J Viral Hepat*, 2009, 16(2):104-112.
- 崔鲂, 王东平. 荧光定量检测乙型肝炎患者外周血单个核细胞中 HBV-DNA 的含量及其意义. *临床肝胆病杂志*, 2006, 22(2):97-98.
- 周蓉蓉, 王静, 钱冬萌, 等. PBMCs HBV 逆转录酶 mRNA 表达与乙型肝炎的临床关系. *中华实验和临床感染病杂志:电子版*, 2009, 3(4):383-390.

- 27 许鸣, 张智, 张珍, 等. 慢性肝病患者外周血单个核细胞白蛋白基因表达的临床意义. 新医学, 2010, 41(8): 536-538.
- 28 高应林, 赵友云, 王春香, 等. 原发性肝细胞癌患者外周血单个核细胞中HBV-DNA含量检测的意义. 现代肿瘤医学, 2007, 15(11): 1634-1635.
- 29 周蓉蓉, 李文利, 许琳, 等. 乙型肝炎病毒反转录酶mRNA表达与乙型肝炎病毒相关肝细胞癌的关系. 中华传染病杂志, 2012, 30(5): 305-308.
- 30 戴伟, 冯筱榕, 郭亚兵. 动态观察外周血单个核细胞中乙型肝炎病毒DNA变化与干扰素治疗应答的关系. 实用肝脏病杂志, 1999, 5(4): 65-66.
- 31 Ke CZ, Chen Y, Gong ZJ, et al. Dynamic changes of HBV DNA in serum and peripheral blood mononuclear cells of chronic hepatitis patients after lamivudine treatment. World J Gastroenterol, 2006, 12(25): 4061-4063.
- 32 太永日, 朴红心, 尹明实, 等. 外周血单个核细胞内乙型肝炎病毒DNA评估拉米夫定治疗慢性乙型肝炎预后的研究. 中国现代医学杂志, 2007, 17(18): 2237-2239.
- 33 周永, 魏仁东, 强中强, 等. PBMC中HBV-DNA在恩替卡韦治疗HBeAg阳性慢乙肝中的价值. 实用医学杂志, 2012, 28(10): 1656-1658.
- 34 邢益平, 黄祖瑚, 唐保元, 等. 筛选抗HBV药物的外周血单个核细胞体外培养系统的建立. 南京医科大学学报, 2000, 20(5): 399-400.

(收稿日期: 2013-05-18)

(本文编辑: 李卓)

周永, 史昌河, 宣世英, 等. HBV感染外周血单个核细胞的研究进展 [J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2013, 7(5): 769-771.

