

· 综述 ·

乙型肝炎病毒感染不同阶段患者 T 细胞应答状况

金蕾 张振华 李旭

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)是一种非细胞病变性 DNA 病毒,感染人体后,机体对病毒免疫应答的差异决定了 HBV 感染后的不同转归。国内外研究显示,宿主细胞免疫功能特别是 HBV 特异性的 CD4⁺ T 和 CD8⁺ T 细胞反应对 HBV 清除和疾病转归有重要影响^[1]。Thimme 等^[2]通过对黑猩猩 HBV 感染模型研究发现,CD8⁺ T 细胞是决定 HBV 清除的关键细胞亚群,细胞溶解或非溶解机制是 CD8⁺ T 细胞清除 HBV 的主要方式,而 CD4⁺ T 细胞主要通过分泌 Th1 细胞因子来抑制 HBV 复制。根据近年文献报道,本文就 HBV 感染的不同阶段患者的 CD4⁺ T 及 CD8⁺ T 细胞应答状况作一综述。

一、急性乙型肝炎患者的 T 细胞应答

众多研究显示,在急性乙型肝炎患者体内能够检测到强烈的、多克隆多表位的、针对 HBcAg 和 HBeAg 的 CD4⁺ T 细胞应答和 CD8⁺ T 细胞应答,并且这种 HBV 特异性 T 细胞应答可在感染恢复后持续存在^[2,3]。近期,Sprengers 等^[4]运用四聚体等技术分析了 HLA-A2 阳性的急性乙型肝炎患者在感染初期、血清转换期以及血清转换 3 个月之后肝细胞内以及外周血中表达 HLA-DR 的特异性 CTL 细胞的数量,结果再次证实 CTL 细胞不但存在于急性乙型肝炎感染的各个时相,而且在血清转换 3 个月之后仍然高浓度地表达,还发现特异性 CTL 细胞在肝细胞内的表达要高于外周血中。机体针对病毒所产生的特异性细胞免疫应答可能是清除机体内 HBV 的重要因素。机体内病毒特异性 T 淋巴细胞清除 HBV 的过程是通过胞毒途径和非溶细胞途径实现。Guidotti 等^[5]发现黑猩猩发生急性 HBV 感染后,在肝脏淋巴细胞浸润高峰前就出现肝组织 HBV DNA 及血清中 Dan 颗粒的清除,而肝脏损伤不明显;还发现其主要通过耗竭 HBV 复制过程中的 RNA 中间产物及清除肝细胞中共价闭合环状 DNA (ccc DNA) 来清除 HBV,非特异性 NK、NK T 细胞产生 IFN 和 TNF 介导这一过程。Maini 等^[6]经过进一步研究同样发现,HBV 的清除和肝细胞的损伤是两个不同过程,HBV 清除在肝细胞损伤前即完成,并发现当特异性 CTL 缺乏使病毒复制不能得到有效控制时,可引起大量非特异性炎性细胞,特别是非特异性 CD8⁺ T 细胞在细胞因子的趋化作用下对肝组织的大量浸润,这是造成肝组织广泛损伤的基础。因此,及时有效的特异性 CTL 反应是控制 HBV 感染并减轻肝组织损伤的关键。

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2010.02.017

基金项目:国家自然科学基金(30771907);安徽高校省级自然科学基金项目(KJ2008B300)

作者单位:230022 合肥市,安徽医科大学第一附属医院感染病科

通讯作者:李旭,Email: aylixu@yahoo.com.cn

可以看出,HBV 的清除需要针对不同表位的多克隆 CTL 反应,急性乙型肝炎患者正是凭借这种强有效的 T 细胞应答,主要通过非溶细胞途径抑制着 HBV 基因的表达和复制,并通过释放细胞因子而招募大量非特异性炎性细胞而造成肝组织损伤。

二、慢性乙型肝炎患者的 T 细胞应答

与急性乙型肝炎不同,HBV 特异性 T 细胞应答在慢性乙型肝炎患者中很弱或检测不到,但当慢性乙型肝炎患者经历自发缓解或干扰素诱导缓解时,可以检测到和急性乙型肝炎恢复患者同样强烈的 T 细胞应答^[2,3,7]。Urban 等^[8]对急性自限性 HBV 感染患者与 HBV 持续感染患者外周血 CD4⁺ T 细胞及 CD8⁺ T 细胞反应进行了比较分析,结果亦再次证实这种 HBV 特异性 CD4⁺ T 细胞功能的下降及 CD8⁺ T 细胞反应的下调与 HBV 持续感染有关。

CD4⁺ T 细胞是调节免疫应答的一类重要调节性细胞,具有细胞免疫和辅助体液免疫的功能。根据其产生的细胞因子不同,分为 Th1 和 Th2 两种亚型,其中 Th1 分泌 IFN γ 、IL-2、TNF β 等细胞因子,主要参与细胞介导的免疫应答;Th2 亚群分泌 IL-4、IL-5、IL-6 等主要促进体液免疫应答的细胞因子。近年来认为 Th1/Th2 细胞比例失衡可能是制约机体能否有效清除病毒和病毒感染细胞的主要因素之一。Th1 细胞占优势,活化的 Th1 优势反应可以充分强化 HBV 特异性 CTL 反应,倾向于发生急性自限性感染和 HBV 清除;而 Th2 细胞占优势,细胞免疫下降,倾向于发生持续的慢性 HBV 感染^[9]。另外,机体天然免疫机能的降低,也可以影响包括 CTL 反应在内的特异性免疫应答的能力^[10]。Bertoletti 等^[11]对急性自限性乙型肝炎患者和 HBV 活跃复制、肝细胞持续损伤的慢性活动性乙型肝炎患者二组人群进行比较,结果发现,前组人群表现为特异性 CTL 多克隆、多特异性,能识别多个抗原靶位,而且识别范围广、应答强。而在后组人群中,特异性 CTL 往往只能识别单一抗原位点,应答范围窄且弱。而且,如果这些位点存在突变,如核心区 18~27 肽段关键氨基酸改变,使 21 位的 SER 突变为 ASN,可导致与 CTL 的 TCR 亲和力下降;27 位的 VAL 突变为 ALA,可导致肽段与 HLA-I 类分子抗原结合槽结合力下降,从而致使 CTL 应答减弱,影响病毒的有效清除。对于慢性乙型肝炎患者 CTL 反应低下的原因目前尚未完全阐明,多种因素可能引起 CTL 反应低下,包括特异性 T 细胞耗竭^[12]和 Th2 型反应偏离、天然免疫功能降低、T 细胞无反应性、DC 功能障碍及免疫忽视等。

病毒特异性 T 淋巴细胞应答反应的强弱直接影响着慢性 HBV 感染者的血清转换率以及抗病毒药物的疗效。近来 Yuen 等^[13]用体外合成的多肽诱导 HBV 特异性 T 细胞增殖培养后,再以 ELISPOT 技术检测 HBV 特异性 T 细胞 IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-10 等细胞因子的分泌,发现 B 基因型比 C 基因型更能诱导出 Th1 淋巴细胞应答反应,而较少诱导出 Th2 淋巴细胞应答反应,这可能对于解释 HBV B 基因型患者 HBeAg 血清自然转阴率要高于感染 C 基因型的患者,以及 B 基因型患者较 C 基因型患者对抗病毒药物有更好应答的现象^[14]提供重要的细胞免疫学线

索。

由此可见,慢性乙型肝炎相比较于急性乙型肝炎,HBV 特异性 CTL 表现出单克隆性和寡特异性,功能低下,HBV 的持续感染与这种低下的细胞免疫应答息息相关。

三、慢性 HBV 携带者的 T 细胞应答

研究发现^[15],对于慢性 HBV 携带者,体内 HBV 特异性 T 细胞应答很弱甚至检测不到,即使检测到,特异性 CTL 往往只能识别单一抗原位点,应答范围窄且弱。Hasebe 等^[16]将 HBV 转基因小鼠(慢性 HBV 携带的动物模型)的离体 DC 和正常小鼠的离体 DC 进行比较,结果发现 HBV 转基因小鼠的肝脏 DC 诱导机体产生先天免疫应答和适应性免疫应答的能力都明显低于正常小鼠的肝脏 DC,由此得出慢性 HBV 携带者 DC 功能障碍可能是其病毒特异性 T 细胞应答低下的原因之一。此外,慢性 HBV 携带者体内表面抗原特异性 Th1 细胞比例下降也可能引起机体病毒特异性免疫应答的能力减弱^[17]。Milich 等^[18]研究发现 HBeAg 在 HBV 感染的垂直传播中起到耐受原的作用,造成免疫耐受。目前,对于慢性 HBV 携带者体内病毒特异性免疫反应低下的具体机制研究不多且未完全阐明。总之,慢性 HBV 携带者体内的病毒特异性 T 细胞应答不能很好的启动,感染者未发生免疫清除反应,亦未发生免疫介导的肝细胞病变,因而无肝细胞炎症或仅有轻微炎症。

四、隐匿性 HBV 感染者 T 细胞应答

多项研究^[19,24]表明,隐匿性 HBV 感染者体内虽然不能用常规血清学方法检测到 HBsAg,而应用 PCR 尤其是巢式 PCR 却能检测出 HBV DNA,且肝组织中 HBV DNA 的滴度相对较高,提示这些隐匿性 HBV 感染者主要是由于 HBV 低水平复制而致其不易被检出。对于隐匿性 HBV 感染者体内 HBV 低复制水平原因的解釋,目前文献中提到的有:

1. 基因变异:HBsAg 的第 124 ~ 147 位氨基酸序列相对保守,构成“a”决定簇,是不同基因型和血清型的共同表位,S 基因的变异如 T126N、Q129N、G130R、G145R、C147F/R 等可能导致 HBsAg 与单克隆抗体的亲和力下降或消失,从而导致现有的试剂难以检测到。据报道^[20],部分隐匿性 HBV 感染的发生与 X 基因的突变致使转录受抑制也有关。但最近的研究倾向于认为 HBV 基因变异不是典型隐匿性 HBV 感染病毒复制被强抑制的主要原因^[21]。

2. 伴随其他嗜肝病毒感染的干扰:如 HCV,宿主可通过 HCV 特异性 T 细胞应答释放细胞因子,如 IFN 和 TNF α 而抑制 HBV 复制^[22]。

3. 宿主免疫应答:近期,学者们研究发现宿主免疫应答在控制隐匿性 HBV 感染者体内病毒低水平复制方面起到重要作用^[23]。实际上,之前就有报道 HIV 阳性合并隐匿性 HBV 感染者体内 CD4⁺ T 细胞计数低于单纯 HIV 阳性者,但都未对低剂量病毒感染所致的隐匿性 HBV 感染者体内是否存在细胞介导的抗病毒应答以及究竟发生了何种类型的应答予以很好的定义^[24]。直至 Zerbini 等^[23]通过

四聚体及 ELISPOT 技术发现隐匿性 HBV 感染者体内确实存在 HBV 特异性 T 细胞应答,并发现在这些人群中按血清中 HBcAb 的有无可分为两种不同类型的 HBV 特异性 T 细胞应答。HBcAb 阳性的患者会出现典型的有保护性的记忆性 T 细胞应答,表明在这种情况下出现了免疫介导的病毒控制。相比之下,HBcAb 阴性患者的 HBV 特异性 T 细胞就不容易活化且不易产生 IFN- γ ,表明小剂量感染可能不足以使保护性的记忆细胞成熟。由此推测 HBcAb 阳性的隐匿性 HBV 感染与之前已恢复的 HBV 感染有相同的生物学本质,只是病毒控制的效率不同,而 HBcAb 阴性的隐匿性 HBV 感染则未产生保护性的记忆细胞应答。

血清中 HBcAb 阳性和阴性的隐匿性 HBV 感染者不同的细胞免疫应答表现是否使其具有不同的临床意义,如各自发展成肝细胞癌的可能性以及抗病毒治疗的反应性仍有待进一步研究。

五、小结与展望

HBV 感染的结果主要取决于病毒复制的动态作用和宿主免疫反应的平衡。综上所述,急性乙型肝炎患者、慢性乙型肝炎患者、慢性 HBV 携带者、隐匿性 HBV 感染者体内病毒特异性 T 细胞应答强度存在着显著差异,这种差异可能是造成 HBV 感染后不同临床转归的主要因素之一。这也提示了有效改善 HBV 特异性细胞免疫功能也许是解决 HBV 感染的关键问题,在慢性 HBV 感染者体内诱导出强烈的多克隆多表位的 HBV 特异性 T 细胞应答将是打破免疫耐受、清除病毒的有效措施。

参 考 文 献

- 1 Jung MC, Pape GR. Immunology of hepatitis B infection. *Lancet Infect Dis*,2001,2:43-50.
- 2 Thimme R, Wieland S, Steiger C, et al. CD8(+) T cell mediate viral clearance and disease pathogenesis during acute hepatitis B virus infection. *J Virol*,2003,77:68-76.
- 3 Barboza L, Salmen S, Peterson DL, et al. Altered T cell costimulation during chronic hepatitis B infection. *Cell Immunol*,2009,257:61-68.
- 4 Sprengers D, van der Molen RG, Kusters JG, et al. Analysis of intrahepatic HBV-specific cytotoxic T-cells during and after acute HBV infection in humans. *J Hepatol*,2006,45:182-189.
- 5 Guidotti LG, Rochford R, Chung J. Viral clearance without destruction of infected cells during acute HBV infection. *Science*,1999,284:825-829.
- 6 Maini MK, Boni C, Lee CK, et al. The role of virus-specific CD8(+) cells in liver damage and viral control during persistent hepatitis B virus infection. *J Exp Med*,2000,191:1269-1280.
- 7 Rehmann B, Lau D, Hoofnagle JH, et al. Cytotoxic T lymphocyte responsiveness after resolution of chronic hepatitis B virus infection. *J Clin Invest*,1996,97:1655-1665.
- 8 Urbani S, Boni C, Amadei B, et al. Acute phase HBV-specific T cell responses associated with HBV persistence after HBV/HCV coinfection. *Hepatology*,2005,41:826-831.
- 9 Lee M, Lee M, Lee SK, et al. Expression of Th1 and Th2 type cytokines responding to HBsAg and HBxAg in chronic hepatitis B patients. *J Korean Med Sci*,1999,14:175-181.
- 10 Boonstra A, Woltman AM, Janssen HL. Immunology of hepatitis B and hepatitis C virus infections. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*,2008,22:1049-1061.
- 11 Bertoletti A, Costanzo A, Chisari FV, et al. Cytotoxic T lymphocyte response to a wild type hepatitis B virus epitope in patients chronically infected by variant viruses carrying substitutions within the epitope. *J Exp Med*,1994,180:933-943.

- 12 Reignat S, Webster GJ, Brown D, et al. Escaping high viral load exhaustion: CD8 cells with altered tetramer binding in chronic hepatitis B virus infection. *J Exp Med*, 2002, 195:1089-1101.
- 13 Yuen MF, Wong DK, Zheng BJ, et al. Difference in T helper responses during hepatitis flares in hepatitis B e antigen (HBeAg)-positive patients with genotypes B and C: implication for early HBeAg seroconversion. *J Viral Hepat*, 2007, 14:269-275.
- 14 Janssen HL, van Zonneveld M, Senturk H, et al. Pegylated interferon alfa-2b alone or in combination with lamivudine for HBeAg-positive chronic hepatitis B: a randomized trial. *Lancet*, 2005, 365:123-129.
- 15 Chisari FV, Ferrari C. Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Annu Rev Immunol*, 1995, 13:29-60.
- 16 Hasebe A, Akbar SM, Furukawa S, et al. Impaired functional capacities of liver dendritic cells from murine hepatitis B virus (HBV) carriers: relevance to low HBV-specific immune responses. *Clin Exp Immunol*, 2005, 139:35-42.
- 17 Böcher WO, Galun E, Marcus H, et al. Reduced hepatitis B virus surface antigen-specific Th1 helper cell frequency of chronic HBV carriers is associated with a failure to produce antigen-specific antibodies in the trimera mouse. *Hepatology*, 2000, 31:480-487.
- 18 Milich D, Liang TJ. Exploring the biological basis of hepatitis B e antigen in hepatitis B virus infection. *Hepatology*, 2003, 38:1075-1086.
- 19 Conjeevaram HS, Lok AS. Occult hepatitis B virus infection: A hidden menace? *Hepatology*, 2001, 34:204-206.
- 20 Takaguchi K, Satou A, Ando M, et al. Detection of hepatitis B virus DNA in the liver and serum of patients with hepatitis B surface antigen and hepatitis C virus antibody negative chronic liver disease. *Hepatol Res*, 2002, 22:139-144.
- 21 Pollicino T, Raffa G, Costantino L, et al. Molecular and functional analysis of occult hepatitis B virus isolates from patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 2007, 45:277-285.
- 22 Schüttler CG, Fiedler N, Schmidt K, et al. Suppression of hepatitis B virus enhancer 1 and 2 by hepatitis C virus core protein. *J Hepatol*, 2002, 37:855-862.
- 23 Zerbini A, Pilli M, Boni C, et al. The characteristics of the cell-mediated response identify different profiles of occult hepatitis B virus infection. *Gastroenterology*, 2008, 134:1470-1481.
- 24 Tsui JJ, French AL, Seaberg EC, et al. Prevalence and long-term effects of occult hepatitis B virus infection in HIV-infected women. *Clin Infect Dis*, 2007, 45:736-740.

(收稿日期:2009-07-17)

(本文编辑:孙荣华)

金蕾,张振华,李旭. 乙型肝炎病毒感染不同阶段患者T细胞应答状况[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志:电子版, 2010, 4(2):197-201.