

· 临床论著 ·

PD-1 和 PD-L1 表达与慢性 HBV 感染者 肝脏病变程度的相关性

谢冬英 陈凤娟 林炳亮 邓洪 崇雨田 张晓红 高志良

【摘要】 目的 研究程序性死亡分子-1(programmed death-1, PD-1)及其主要配体(programmed death-1 ligand, PD-L1)表达与肝脏病变程度的关系,并探讨其临床意义。**方法** 不同临床类型慢性 HBV 感染者 137 例,含慢性乙型肝炎(CHB)患者 102 例,活动性肝硬化(LC)患者 25 例,慢加急性肝衰竭(ACLF)患者 10 例。其中,102 例 CHB 患者中有 22 例行肝组织活检,炎症分级为 G1~G4,纤维化程度分为 S0~S4。健康对照 10 例。取新鲜血液分离外周血单个核细胞(PBMCs),流式细胞仪检测 PBMCs 表面 PD-1 和 PD-L1 阳性细胞比例以及人白细胞抗原(HLA)型别;对 HLA-A2 阳性者的 PBMCs 加入重组 HBcAg 体外培养 7 d,加入 PE 标记的 HBV 抗原表位肽-五聚体复合体(含 HBV 抗原表位肽为 HBcAg18-27),流式细胞仪计数 CD8⁺ T 细胞数以及 CD8 和 PD-1 双阳性细胞。ELISA 检测 PBMCs 培养上清液中 IFN- γ 。比较 CHB、LC、ACLF 三组间以及不同肝组织病变程度患者间 PD-1、PD-L1、CD8⁺ 细胞数量和 PD-1 表达水平、IFN- γ 水平的差异。**结果** 在 CHB、LC 和 ACLF 组 PD-1 在 PBMCs 表面的表达阳性率分别为(55.4 \pm 16.5)%、(54.3 \pm 21.9)%、(45.5 \pm 26.5)%,与健康对照组比较,*P* 值分别为 0.000、0.001、0.071;三组 PD-L1 表达阳性率分别为(41.7 \pm 17.7)%、(33.4 \pm 17.9)%、(26.6 \pm 11.8)%,和对照组比较,*P* 值分别为 0.006、0.252、0.854。62 例 HLA-A2 阳性患者的 CD8⁺ T 细胞比例分别为(1.6 \pm 1.0)%、(3.1 \pm 1.6)%和(3.3 \pm 1.7)%,LC 组和 ACLF 组明显高于 CHB 组(*P* < 0.05);PD-1 阳性细胞占 CD8⁺ T 细胞的比例各组间比较无统计学差异;三组 PBMCs 培养上清液中 IFN- γ 含量比较无统计学差异。不同肝组织炎症和纤维化程度的 CHB 患者间 PD-1、PD-L1 表达虽无明显统计学差异,但 PD-L1 在炎症 G1 和纤维化 S0 的患者中的表达较其他组患者高。**结论** 慢性 HBV 感染者 PD-1 和 PD-L1 表达明显上调。肝脏病变程度与 PD-1 表达水平无关,但与 HBV 特异性 CD8⁺ T 细胞数量及 PD-L1 表达相关。

【关键词】 慢性乙型肝炎;肝硬化;慢加急性肝衰竭;程序性死亡分子 1

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2010.03.009

基金项目:广东省科技计划项目(2008B030301062)

作者单位:510630 广州市,中山大学附属第三医院感染病科

通讯作者:谢冬英,Email:xdy-gz@163.com

The expressions of PD-1 and PD-L1 and the correlation with the degree of liver damage in HBV chronic infection XIE Dong-ying, CHEN Feng-juan, LIN Bing-liang, DENG Hong, CHONG Yu-tian, ZHANG Xiao-hong, GAO Zhi-liang. Department of Infectious Diseases, The Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China

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

【Abstract】 Objective To study the expression of programmed death-1 (PD-1) and programmed death-1 ligand (PD-L1) on PBMCs in chronic HBV patients with different clinical types and pathological changes. **Methods** All of 137 chronic HBV infection subjects including 102 with chronic hepatitis B (CHB), 25 with liver cirrhosis (LC) and 10 with acute on chronic liver failure (ACLF) were enrolled in this study. Histology features of 22 CHB patients have been demonstrated by liver biopsy. PBMCs were isolated from fresh blood samples. HBV-specific T cells were expanded in vitro in 64 patients with HLA-A2 positive. Flow cytometry was used to detect the HLA-A2 type, the expression of PD-1 and PD-L1 on PBMCs and PD-1 on HBV specific CD8⁺ T cells. IFN- γ was assayed by ELISA. **Results** In groups of CHB, LC and ACLF, PD-1 expression on PBMCs were $(55.4 \pm 16.5)\%$, $(54.3 \pm 21.9)\%$ and $(45.5 \pm 26.5)\%$, compared with control, P values were 0.000, 0.001 and 0.071, respectively; PD-L1 were $(41.7 \pm 17.7)\%$, $(33.4 \pm 17.9)\%$ and $(26.6 \pm 11.8)\%$, compared with control, P values were 0.006, 0.252 and 0.854, respectively. Sixty four cases were HLA-A2 positive. The proportions of HBV-specific T cells were $(1.6 \pm 1.0)\%$, $(3.1 \pm 1.6)\%$ and $(3.3 \pm 1.7)\%$, respectively. In CHB, LC and ACLF subjects of HLA-A2 positive, significant differences were found between LC and control, ACLF and control ($P < 0.05$); There were no significant differences in PD-1 expression on HBV-specific cells and IFN- γ levels in cell culture medium. PD-1 expressions on PBMCs were similar in CHB patients with different degrees of liver pathological changes, but PD-L1 expressions were higher in G1 and S0 patients than that in other patients. **Conclusions** PD-1 and PD-L1 expressions were up-regulated in patients with HBV chronic infection. The degree of liver damage may be correlated with HBV-specific cells and PD-L1 expression but not correlated with PD-1 expression.

【Key words】 Chronic hepatitis B; Liver cirrhosis; Acute on chronic liver failure; Programmed death-1

慢性乙型肝炎的临床转归与机体免疫密切相关,其中细胞免疫特别是 HBV 特异性 T 细胞免疫在病毒清除过程中起着重要作用。但是,慢性 HBV 感染者体内 HBV 特异性 T 细胞存在数量和质量上的缺陷,不能有效清除病毒,其机制并不

十分明确。程序性死亡分子-1(programmed death-1, PD-1)及其主要配体 PD-L1 是近年来发现的负性共刺激信号之一,其高表达与 T 细胞免疫缺陷密切相关,是导致病毒持续感染及肿瘤免疫逃逸的重要机制之一。PD-1、PD-L1 表达与慢性 HBV 感染者肝脏病变程度的关系尚不清楚。本研究目的在于通过检测不同临床类型慢性 HBV 感染者以及不同肝组织病变程度的普通慢性乙型肝炎患者外周血总 T 细胞 PD-1、PD-L1 的表达、HBV 特异性 CD8⁺ T 细胞数量及其 PD-1 表达的差异,探讨 PD-1、PD-L1 表达与肝脏病变程度的关系及意义。

资料与方法

一、研究对象

137 例慢性 HBV 感染者为 2008 年 6 月至 2009 年 3 月中山大学附属第三医院感染科就诊患者,年龄 17~65 岁,其中慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)患者 102 例,肝硬化(liver cirrhosis, LC)患者 25 例,慢加急性肝衰竭(acute on chronic liver failure, ACLF)患者 10 例。诊断标准符合《慢性乙型肝炎防治指南》并排除合并其他肝炎病毒、HIV 感染、自身免疫性肝病等。

二、方法

1. PBMCs 分离:取肝素锂抗凝的新鲜静脉血 10 ml, PBS 等量稀释,缓慢加入 10 ml 淋巴细胞分层液中,2000 r/min 室温离心 20 min,小心吸取单个核细胞层, PBS 洗涤 3 次后重悬,计数单个核细胞。

2. HLA-A2 型别鉴定:取 1×10^6 个 PBMCs 与 10 μ l 藻红蛋白(phycoerythrin, PE)标记抗-HLA-A2,室温下避光孵育 20 min, PBS 洗涤一次,加入 200 μ l PBS 重悬后上流式细胞仪。每份标本均设空白对照。

3. PBMCs 表面 PD-1、PD-L1 检测:取 1×10^6 个 PBMCs,依次加入 PE 标记的抗-PD-L1 及藻青蛋白(allophycocyanin, APC)标记的抗-PD-1 20 μ l,室温避光孵育 20 min, PBS 液洗涤 1 次,加入 PBS 200 μ l 重悬后上流式细胞仪检测,每份标本设空白对照。

4. HBV 特异性 CD8⁺ T 细胞富集及其 PD-1 检测:取 HLA-A2 阳性患者新鲜分离的 PBMCs,加入培养基(RPMI-1640 与 10% 胎牛血清按 9:1 比例混匀配制)重悬,以 1×10^6 个/孔密度接种于 24 孔板,并加入重组人白细胞介素-12(interleukin-12, IL-12)(100 pg/ml)及重组 HBcAg(10 μ l/ml,纯度 > 99%), 37℃、5% CO₂ 共同孵育 7 d,于第 3 天加入重组人白细胞介素-2(interleukin-2, IL-2)(50 U/ml)。收集 1×10^6 个悬浮细胞,加入 PE 标记 HBV 抗原表位肽-五聚体复合体(所含 HBV 抗原表位肽为 HBcAg18-27,序列为 FLPSDFFPSV)10 μ l,避光孵育 10 min, PBS 洗涤 1 次,加入异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记抗-CD8a 10 μ l 和 APC 标记抗-PD-1 20 μ l 冰上避光孵育 20 min, PBS 液洗涤 1 次,加入 PBS 200 μ l 重悬后上流式细胞仪,设空白对照。以淋巴细胞设门,计数 10 000 个 CD8⁺ 细胞,同时计数 CD8 和 HBV 抗原表位肽-五聚体复合体双阳性细胞为

HBV 特异性的 CD8⁺ T 细胞,特异性 CD8⁺ T 细胞的阳性率 = 五聚体与 CD8 共阳性的 T 细胞/CD8⁺ 细胞 × 100%。以特异性 CTL 细胞的阳性细胞为对象,检测其 PD-1 表达。

5. 肝组织活检及病理学检查:采用超声引导快速行肝组织活检,抽取足够肝组织,送常规病理及网状纤维染色,根据《病毒性肝炎防治方案》进行炎症分级和纤维化分期。

三、统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计分析软件进行各项指标分析,实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。对多组间结果差异采用单因素方差分析,组间均数差异采用两独立样本 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为有统计学差异。

结 果

一、不同临床类型患者 PBMCs 表面 PD-1、PD-L1 的表达比较

不同临床类型的慢性 HBV 感染者之间 PD-1 和 PD-L1 表达比较无统计学意义,但 CHB 组和 LC 组患者的 PD-1 表达分别高于对照组,而 ACLF 组与健康对照组无明显统计学差异。CHB 组 PD-L1 表达明显高于对照组,LC 组和 ACLF 组与对照组比较无统计学意义(见表 1)。

表 1 患者一般情况及其 PBMCs 表面 PD-1 和 PD-L1 表达比较($\bar{x} \pm s$)

	例数	性别(男/女)	年龄(岁)	ALT(U/L)	AST(U/L)	PD-1(%)	PD-L1(%)
CHB	102	85/17	33 ± 10	264 ± 357	227 ± 547	55.4 ± 16.5 ^a	41.7 ± 17.7 ^a
LC	25	25/0	40 ± 10	185 ± 278	166 ± 169	54.3 ± 21.9 ^a	33.4 ± 17.9 ^b
ACLF	10	9/1	39 ± 13	568 ± 646	522 ± 799	45.5 ± 26.5 ^b	26.6 ± 11.8 ^b
对照组	10	6/4	27 ± 5	-	-	26.1 ± 18.0	25.1 ± 22.0

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$; ^b $P > 0.05$;“-”代表未检测

二、HBV 特异性 CD8⁺ T 细胞 PD-1 表达及 IFN- γ 测定

进一步对 137 例慢性 HBV 感染者中的 64 例 HLA-A2 阳性患者进行 PBMCs 培养,检测 HBV 特异性 CD8⁺ 细胞数量和 PD-1 表达水平,并检测细胞培养上清液中 IFN- γ 水平。结果 LC 组和 ACLF 组 HBV 特异性 CD8⁺ T 细胞数量明显高于 CHB 组, P 值分别为 0.003($t = 3.1$, 95% CI 0.5 ~ 2.4)和 0.002($t = 3.2$, 95% CI 0.6 ~ 2.7)。三组 HBV 特异性 CD8⁺ T 细胞表面 PD-1 的表达无统计学差异,ACLF 组 IFN- γ 水平虽高于 CHB 组和 LC 组,但无统计学意义(见表 2)。

表 2 HLA-A2 阳性患者 HBV 特异性 CD8⁺ T 细胞、PD-1 表达及 IFN- γ 水平比较($\bar{x} \pm s$)

	例数	年龄	HBV CD8 ⁺ T 细胞(%)	CD8 ⁺ T PD-1(%)	IFN- γ (pg/ml)
CHB	52	(33 ± 10)	1.6 ± 1.0	76.1 ± 9.8	98.8 ± 84.2
LC	6	40 ± 10 ^a	3.1 ± 1.6 ^a	77.7 ± 8.2	67.2 ± 115.1
ACLF	5	39 ± 13	3.3 ± 1.7 ^a	68.2 ± 19.8	140.7 ± 97.5

注:^a与 CHB 组比较, $P < 0.05$

三、肝组织病变程度与 PBMCs 表面 PD-1、PD-L1 表达的相关性

对 22 例患者行肝组织活检,按炎症活动度(G)分为 1、2、3、4 四个级别,按纤维化程度(S)分为 0、1、2、3、4 五期。不同炎症及纤维化程度患者 PBMCs 表面 PD-1 表达差异无统计学意义,PD-L1 表达在 G1 和 S0 患者中较其他患者高,但无统计学意义(表 3)。进一步对其中 6 例 HLA-A2 阳性患者检测了 HBV 特异性 CD8⁺ T 细胞数量及其 PD-1 的表达,亦无统计学意义。

表 3 不同肝组织病理变化患者 PBMCs 表面 PD-1、PD-L1 表达比较($\bar{x} \pm s$)

	例数	性别(男/女)	年龄(岁)	PD-1(%)	PD-L1(%)
炎症活动度(G)					
1	3	3/0	38 ± 12	59.5 ± 13.5	53.4 ± 17.4
2	9	9/0	29 ± 9	56.9 ± 15.0	37.7 ± 21.8
3	6	6/0	31 ± 9	56.9 ± 3.5	29.0 ± 8.1
4	4	2/2	36 ± 8	59.7 ± 8.8	34.9 ± 14.4
纤维化程度(S)					
0	3	3/0	36 ± 11	52.4 ± 16.4	50.1 ± 20.6
1	4	4/0	29 ± 12	58.9 ± 3.4	44.4 ± 4.5
2	6	6/0	28 ± 5	56.5 ± 14.6	34.4 ± 26.4
3	7	5/2	32 ± 8	58.2 ± 7.8	29.5 ± 2.5
4	2	2/0	42 ± 4	67.3 ± 1.6	39.4 ± 23.3

注:各区间比较,PD-1 和 PD-L1 表达水平无统计学差异

讨 论

研究表明,在小鼠慢性淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒(LMCV)感染、人 HIV 感染、人慢性 HCV 感染中,PD-1 和 PD-L1 在病毒特异性 T 细胞上均有较高的表达,并可导致病毒特异性 T 细胞数量减少和功能衰竭。HBV 感染人体后病毒的消长和疾病的转归取决于免疫应答的性质、强度和范围,但免疫反应在清除病毒的同时也导致不同程度的肝组织损伤。慢性 HBV 感染者常不能彻底清除病毒,致使肝脏炎症反复活动和纤维化形成,临床上表现为不同类型的疾病状态,如慢性 HBV 携带状态、慢性活动性肝炎、肝衰竭、肝硬化等。目前有研究显示,HBV 感染持续状态与 PD-1/PD-L1 通路相关,在急性乙型肝炎患者,HBV 特异性 CD8⁺ T 细胞 PD-1 的表达较慢性肝炎患者低,PD-1/PD-L1 高表达使慢性 HBV 感染者特异性 CD8⁺ T 细胞数量减少和功能下降,是导致机体不能有效清除 HBV 和感染慢性化的重要原因之一。

本研究应用流式细胞术检测慢性 HBV 感染不同临床类型患者 PBMCs 表面 PD-1/PD-L1 的表达差异,结果显示慢性 HBV 感染者 PD-1、PD-L1 表达较健康对照组明显升高,与国内其他研究结果一致。提示 PD-1 表达上调与 HBV 感染慢性化相关。但是,在慢性 HBV 感染的不同临床类型患者之间 PBMCs 表面及 HBV 特异性 CD8⁺ T 细胞表面 PD-1 的表达水平并无明显差异,说明 PD-1 表达水平与

慢性 HBV 感染者的炎症和纤维化程度可能并无直接相关性。慢性肝炎组患者 PBMCs 表面 PD-L1 表达明显高于健康对照组,但活动性肝硬化患者以及慢加急性肝衰竭患者 PD-L1 表达低于慢性肝炎组,与健康对照组相比无统计学意义,提示 PBMCs 表面 PD-L1 表达水平可能与肝脏炎症和(或)纤维化程度相关。同时,LC 组以及 ACLF 组患者 HBV 特异性 CD8⁺ T 细胞数量明显高于 CHB 组,提示 HBV 特异性细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)反应更为活跃是活动性肝硬化和 ACLF 患者肝脏炎症坏死程度更明显的原因之一。

为进一步阐明 PD-1 和 PD-L1 与肝脏病情严重程度的关系,本研究比较了肝组织不同炎症活动度及纤维化程度慢性乙型肝炎患者 PBMCs 表面 PD-1、PD-L1 的表达。结果显示肝组织炎症和纤维化程度的轻重不同,PD-1 表达无显著性差异,但 PD-L1 的表达在炎症和纤维化较明显的患者中相对较低,在病变较轻的 G1 和 S0 患者中较高,与前述肝硬化和慢加急性肝衰竭患者中 PD-1 表达相同而 PD-L1 表达较低的现象相符合,进一步提示 PD-L1 表达可能与肝脏炎症和纤维化严重程度有关。PD-L1 是机体调控 T 细胞聚集及消减的最主要蛋白,其高表达有利于减轻肝脏的免疫损伤,是机体对 HBV 所致免疫损伤的一种保护性调节。PD-1 和其主要配体 PD-L1 表达失衡与慢性 HBV 感染者肝组织病变程度是否有关?由于本研究肝脏活检的病例数较少,PD-1/PD-L1 的表达水平与慢性 HBV 感染者肝脏炎症及纤维化程度的关系有待进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Klenerman P, Hill A. T cells and viral persistence: lessons from diverse infections. *Nat Immunol*,2005,6:873-879.
- 2 Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol*,2005,23:515-548.
- 3 Liang SC, Latchman YE, Buhlmann JE, et al. Regulation of PD-1, PD-L1, and PD-L2 expression during normal and autoimmune responses. *Eur J Immunol*,2003,33:2706-2716.
- 4 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. *中华肝脏病杂志*,2005,13:881-891.
- 5 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学会. 病毒性肝炎防治方案. *中华肝脏病杂志*,2000,8:324-329.
- 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*,2006,443:350-354.
- 7 Trautmann L, Janbazian L, Chomont N, et al. Up-regulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8⁺ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nat Med*,2006,12:1198-1202.
- 8 Freeman GJ, Wherry EJ, Ahmed R, et al. Reinvigorating exhausted HIV-specific T cells via PD-1-PD-1 ligand blockade. *J Exp Med*,2006,203:2223-2227.
- 9 Nakamoto N, Kaplan DE, Coleclough J, et al. Functional restoration of HCV-specific CD8⁺ T cells by PD-1 blockade is defined by PD-1 expression and compartmentalization. *Gastroenterology*,2008,134:2168-2171.
- 10 Urbani S, Amadei B, Tola D, et al. PD-1 expression in specific CD8 exhaustion. *J Virol*,2006,80:11398-11403.
- 11 Peng G, Li S, Wu W, et al. PD-1 up-regulation is associated with HBV-specific T cell dysfunction in chronic hepatitis B patients. *Mol Immunol*,2008,45:963-970.
- 12 Zhang Z, Zhang JY, Wherry EJ. Dynamic programmed death 1 expression by virus-specific CD8⁺ T cells correlates with the outcome of acute hepatitis B. *Gastroenterology*,2008,134:1938-1949.
- 13 Ye P, Weng ZH, Zhang SL, et al. Programmed death-1 expression is associated with the disease status in hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol*,2008,14:4551-4557.
- 14 Bertolotti A, Maini M, Williams R. Role of hepatitis B virus specific cytotoxic T cells in liver damage and viral control. *Antiviral Res*,2003,60:61-66.

- 15 彭国平, 孙雯, 孙箴, 等. HBV 感染患者外周血 T 细胞 PD-1 基因表达水平的变化和意义. 浙江大学学报, 2007, 36: 553-560.

(收稿日期: 2010-01-06)

(本文编辑: 孙荣华)

谢冬英, 陈凤娟, 林炳亮, 等. PD-1 和 PD-L1 表达与慢性 HBV 感染者肝脏病变程度的相关性[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2010, 4(3): 287-293.