

• 临床检验研究论著 •

# 慢性乙型肝炎患者 HBeAg 特异性 T 细胞应答与血清 HBeAg 滴度变化的关系研究\*

林 芳<sup>1,2</sup>, 冯 霞<sup>3</sup>, 闫惠平<sup>3</sup>, 张国元<sup>1△</sup>

(1. 川北医学院附属医院检验科, 四川南充 637000; 2. 川北医学院医学检验系, 四川南充 637000;

3. 首都医科大学附属北京佑安医院感染与免疫研究中心, 北京 100069)

**摘要:**目的 分析慢性乙型肝炎(CHB)患者抗病毒治疗前后 HBeAg 特异性 T 细胞应答与血浆 HBeAg 滴度动态变化有无关系。方法 分别收集 22 例 CHB 患者抗病毒治疗前、治疗后 3、6、12 月的外周血共 88 份标本, 以 HBeAg 蛋白刺激外周血单个核细胞, 采用酶联免疫斑点技术(ELISPOT)检测产生 IFN- $\gamma$  的 HBeAg 特异性 T 细胞的频率, 并检测患者 HBV DNA、HBsAg、HBeAg 等病毒学指标。结果 患者抗病毒治疗前和治疗后 3、6、12 月总的 T 细胞反应阳性率分别为 31.8%(7/22)、50.0%(11/22)、77.3%(17/22)和 95.5%(21/22); 治疗后 12 月 T 细胞反应频率明显高于治疗前和治疗后 3 月, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 核苷类似物治疗组与干扰素治疗组治疗后 T 细胞反应频率比较, 差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。患者治疗后 12 月 T 细胞的平均反应强度明显高于治疗前、治疗后 3 月及治疗后 6 月, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 核苷类似物治疗组与干扰素治疗组均分别得出上述相同的结果。患者 T 细胞的平均反应强度与血浆 HBeAg COI 无相关性( $r = -0.107, P = 0.319$ )。结论 CHB 患者抗病毒治疗后 HBeAg 特异性 T 细胞的应答较治疗前有所增强, 但这种变化与血浆 HBeAg 滴度的动态变化无明显相关性。

**关键词:** 乙型肝炎, 慢性; 细胞免疫; 乙型肝炎 e 抗原

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.24.019

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)24-3312-02

## The relationship between HBeAg specific T cell immune responses and titer of serum HBeAg in chronic hepatitis B patients\*

Lin Fang<sup>1,2</sup>, Feng Xia<sup>3</sup>, Yan Huiping<sup>3</sup>, Zhang Guoyuan<sup>1△</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan 637000, China; 2. Department of Laboratory Medicine, North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan 637000, China;

3. Infection and Immunity Research Center, Beijing YouAn Hospital, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

**Abstract:** **Objective** To analyze the correlation between HBeAg specific T cell immune responses and titer of serum HBeAg in chronic hepatitis B patients accepting antiviral therapy. **Methods** 22 patients of chronic hepatitis B(CHB) accepting antiviral therapy were included in this study. The peripheral blood mononuclear cells(PBMCs) were separated from the whole blood collected before treatment and three months, six months and twelve months after treatment, respectively. ELISPOT assay was used to detect the frequency and strength of secreting IFN- $\gamma$  cells of PBMCs stimulated by HBeAg protein. HBV DNA, HBsAg, HBeAg in serum were detected at the same time. **Results** The frequency of T cell responses in patients to HBV specific proteins were 31.8%(7/22), 50.0%(11/22), 77.3%(17/22) and 95.5%(21/22) at the time of before treatment and three months, six months and twelve months after antiviral therapy, respectively. The frequency of HBeAg specific T cell responses in patients at twelve months after treatment were significantly higher than those of before and three months after treatment and responses in patients at six months after treatment were significantly higher than those of before treatment( $P < 0.05$ ). The strength of HBeAg specific T cell responses was expressed as spot forming cells(SFCs) per  $2 \times 10^5$  input cells. The SFCs of T cell responses in patients twelve months after treatment were significant higher than those of patients before treatment and three months and six months after treatment( $P < 0.05$ ). There was no significant correlation between SFCs of T cell responses to HBeAg with titer of HBeAg in serum,  $P > 0.05$ .

**Conclusion** The HBeAg specific T cell responses in chronic hepatitis B patients after treatment is higher than that before treatment, but there is no significant correlation between SFCs of T cell responses to HBeAg with titer of HBeAg in serum.

**Key words:** chronic hepatitis B; cellular immunity; hepatitis B virus e antigen

乙型肝炎病毒(HBV)对肝脏的损伤主要是宿主免疫细胞介导产生的炎症细胞因子, 以及通过对病毒感染的肝细胞造成免疫损伤<sup>[1-2]</sup>。慢性 HBV 感染者获得 HBeAg 血清转换后, HBV DNA 水平常低于检测下限甚至检测不到, 同时丙氨酸氨基转移酶(ALT)也降至正常, 肝组织炎症消退, 这些临床现象提示 HBeAg 的免疫应答可能在 HBV 清除中起着关键性作用。但 HBeAg 特异性的细胞免疫在慢性乙型肝炎(CHB)患者抗病毒治疗中的作用及其与血浆 HBeAg 滴度的动态变化

关系, 目前未见此类报道。因此本研究采用 HBeAg 蛋白作为刺激物, 检测 CHB 患者抗病毒治疗前后 T 细胞对 HBeAg 蛋白的应答反应, 分析 HBeAg 特异性 T 细胞应答与血浆 HBeAg 临界值指数(COI)值相关性。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 本研究中所有患者均来自 2009 年 1 月至 2011 年 4 月于北京佑安医院住院的 CHB 患者, 男 17 例, 女 5 例; 平均年龄( $39.9 \pm 11.7$ )岁。所有患者均已接受抗病毒治疗

\* 基金项目: 北京市自然科学基金重点项目(7111004); 北京市科委资助项目(D09050703590904); 四川省卫生厅资助项目(110309)。

作者简介: 林芳, 女, 检验技师, 主要从事感染免疫的相关研究工作。△ 通讯作者, E-mail: zhangguoyuan9826@sina.com。

1 年,其中 7 例采用干扰素治疗,15 例采用核苷(酸)类似物治疗,分别留取治疗前、治疗后 3 月、治疗后 6 月和治疗后 12 月四个点的外周血。CHB 的诊断标准均符合 2005 年 12 月中华医学会肝病学分会和中华医学会感染病学分会联合制订的慢性乙型肝炎防治指南<sup>[3]</sup>。

1.2 方法

1.2.1 酶联免疫斑点技术(ELISPOT)检测 HBeAg 特异性 T 细胞免疫反应:常规分离外周血 PBMCs,加入已包被 IFN- $\gamma$  单克隆抗体的 ELISPOT 板。同时设立阴、阳性对照孔和实验孔,每组设 2 个重复孔。阳性对照孔每孔加入 2 mg/L 植物血凝素(PHA),阴性对照孔加细胞培养液,实验孔每孔加入 4 mg/L 的 HBeAg 蛋白作为刺激物,37℃、5%CO<sub>2</sub> 孵箱培养 18~24 h;随后加入生物素化的 IFN- $\gamma$  多克隆抗体及链霉亲和素,最后加入显色液,反应孔出现蓝色斑点时终止反应。ELISPOT 自动读板仪(champspotⅢ,由北京赛智公司提供)计数斑点形成细胞(SFC)。阳性反应设定为大于 2 倍阴性对照孔 SFCs。

1.2.2 血清标志物检测 所有标本均采用罗氏 e601 全自动电化学免疫分析仪检测患者血清中 HBsAg、抗-HBs、HBeAg、抗-HBe、抗-HBc 5 种标志物,试剂为 Roche 诊断试剂。

1.2.3 HBV DNA 定量检测 采用上海科华乙肝病毒核酸扩增(PCR)荧光定量检测试剂盒,严格按照说明书操作,仪器采用美国 ABI 7500,试剂盒检测下限为 5×10<sup>2</sup> copies/mL。

1.3 统计学处理 采用 SPSS16.0 软件进行统计分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 患者抗病毒治疗前后病原学指标检测结果 本实验 22 例患者抗病毒治疗前 18 例 HBsAg、HBeAg 均为阳性,4 例 HBsAg 阳性,HBeAg 阴性,HBV DNA 均大于 10<sup>4</sup> copies/mL,ALT 均大于正常上限。治疗 3 个月后,54.5%(12/22)的患者 HBV DNA 低于检测下限,54.5%(12/22)ALT 复常。治疗 6 个月后,59.1%(13/22)的患者 HBV DNA 低于检测下限;ALT 复常率为 68.2%(15/22)。治疗 12 个月后,86.4%(19/22)的患者 HBV DNA 低于检测下限;所有患者 ALT 均恢复至正常范围。

2.2 ELISPOT 检测抗病毒前后患者对 HBeAg 蛋白的反应结果

2.2.1 患者抗病毒前后 T 细胞对 HBeAg 蛋白的反应阳性率比较 22 例 CHB 患者抗病毒治疗前和治疗后 3、6、12 月总的 T 细胞反应阳性率见表 1。

表 1 CHB 患者抗病毒治疗前后 T 细胞对 HBeAg 蛋白的反应频率

时间	阴性例数(n)	阳性例数(n)	阳性率(%)	总例数(n)
治疗前	15	7	31.8	22
治疗后 3 月	11	11	50.0	22
治疗后 6 月	5	17	77.3*	22
治疗后 12 月	1	21	95.5*#	22

\*: $P<0.05$ ,与治疗前比较;#: $P<0.05$ ,与治疗 3 月比较。

2.2.2 患者抗病毒前后 T 细胞对 HBeAg 蛋白的平均反应强度 平均反应强度用每 2×10<sup>5</sup> 个 PBMCs 斑点形成细胞(SFC)表示,即 SFC/2×10<sup>5</sup> PBMCs。图 1 为 2 例患者 ELISPOT 结果图(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。ELISPOT 结果显示,治疗后患者 T 细胞对 HBeAg 蛋白的平均反应强于治疗前,且随着治疗时间的延长,患者 T 细

胞对 HBeAg 蛋白的平均反应强度有所增加,见图 2(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

2.3 患者抗病毒前后 T 细胞对 HBeAg 蛋白的反应强度变化与血清 HBeAg COI 值动态变化的相关性分析 本实验患者抗病毒前后 T 细胞对 HBeAg 蛋白的平均反应强度为 0~608 SFCs/2×10<sup>5</sup> PBMCs,血清 HBeAg COI 值为 0.07~1 139,将患者抗病毒前后 T 细胞对 HBeAg 蛋白的平均反应强度与血清 HBeAg COI 值做相关性分析, $r=-0.107$ , $P=0.319$ , $P>0.05$ ,认为患者抗病毒前后 T 细胞对 HBeAg 蛋白的平均反应强度变化与血清 HBeAg COI 值动态变化无明显相关性。

3 讨 论

目前导致 HBV 慢性感染的确切机制尚不清楚,但许多研究都指出患者 HBV 特异性 T 细胞应答在乙肝感染控制和疾病进展方面具有非常重要的作用。而 CHB 患者由于病毒抗原持续存在导致 HBV 特异性 T 细胞功能障碍,最后甚至出现病毒特异性 T 细胞缺失<sup>[4-6]</sup>。

在慢性 HBV 感染时 HBeAg 是最重要的免疫耐受因子,大部分情况下其存在表示患者处于高感染低复制期<sup>[7]</sup>。陈瑾等<sup>[8]</sup>的实验发现经 HBeAg 刺激激活的 T 细胞可以有效地抑制 HBsAg、HBeAg 的合成,证明 HBeAg 特异性免疫反应对病毒的清除有重要作用。本研究中,患者抗病毒治疗前对 HBV 特异性的细胞免疫状态严重低下,68.2%(15/22)的患者对 HBeAg 蛋白的刺激无反应,部分患者表现出弱反应性,这可能是机体不能有效清除病毒的主要原因之一。

随着抗病毒药物干扰素和核苷(酸)类似物在 CHB 治疗中的应用,人类在抗 HBV 治疗方面有了巨大进步。目前国内外的研究均表明 CHB 患者抗病毒治疗后 HBV 特异性细胞免疫功能有一定的改善或恢复<sup>[9-10]</sup>。Chen 等<sup>[11]</sup>提出 HBeAg 可致 MHC-II 限制的 Th 细胞功能性缺失或无能,导致对 HBcAg/HBeAg 的耐受。本实验 22 例 CHB 患者抗病毒治疗前 HBV DNA 均大于 10<sup>4</sup> copies/mL,ALT 均大于正常上限。治疗后患者 HBV DNA 低于检测下限的患者比例随着治疗时间延长增加,同时 ALT 复常率也增加,说明患者抗病毒治疗后病毒水平下降,肝功能指标恢复较好。有研究发现聚乙二醇干扰素治疗能增强 CHB 患者 HBV 特异性 CD8<sup>+</sup> T 细胞免疫应答<sup>[12]</sup>。由表 1 可见,治疗后 T 细胞对 HBeAg 蛋白的反应阳性率高于治疗前,且随着治疗时间延长,T 细胞对 HBeAg 蛋白的反应阳性率增加;而图 1 和图 2 显示,患者治疗后对 HBeAg 蛋白刺激引起的特异性 T 细胞反应平均反应强度较治疗前也有一定程度的增强,说明抗病毒治疗可以改善 HBeAg 特异性 T 细胞应答。本实验也发现 HBeAg 特异性 T 细胞应答在 HBeAg 阳性和阴性患者间差异无统计学意义,可能与 HBeAg 阴性患者例数太少有关。目前检测 HBeAg 的试剂多是半定量分析法,即用 S/CO 或 COI 值表示,由此分析了患者抗病毒治疗前后对 HBeAg 蛋白的特异性 T 细胞反应强度变化与血浆中 HBeAg COI 值动态变化的相关性, $r=-0.107$ , $P=0.319$ , $P>0.05$ ,结果显示两者间无明显相关性,但患者 HBeAg 特异性 T 细胞反应强度有随着血浆中 HBeAg COI 值降低而增强的趋势。

总之,HBeAg 虽不是病毒装配、感染或复制所必需的,但其在病毒的免疫耐受中起着重要作用,HBeAg 可能作为一种免疫调节蛋白导致 HBV 感染慢性化。因此,监测抗病毒治疗和临床免疫治疗过程中 HBeAg COI 值及 HBeAg 特异性细胞免疫的动态变化有重要的意义。

(下转第 3315 页)

表 2 主要病原菌对重要抗菌药物耐药率的变化

药敏试验		2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
金黄色葡萄球菌-苯唑西林	阳性数( <i>n</i> )	131	123	157	192	211	239	233	225	259	281	321	348	293
	菌株数( <i>n</i> )	227	224	291	229	333	344	350	352	369	455	456	526	482
	耐药率(%)	47.2	54.9	53.9	64.2	63.3	69.4	66.5	63.9	70.1	61.7	70.3	66.1	60.7
铜绿假单胞菌-亚胺培南	阳性数( <i>n</i> )	16	18	56	39	78	86	111	155	110	108	137	246	244
	菌株数( <i>n</i> )	131	131	159	145	187	224	260	341	306	349	349	499	507
	耐药率(%)	12.2	13.7	35.2	26.8	41.7	38.3	42.6	45.4	35.9	30.9	39.2	49.2	48.1
鲍曼不动杆菌-亚胺培南	阳性数( <i>n</i> )	5	5	17	9	15	40	53	79	124	134	188	305	392
	菌株数( <i>n</i> )	21	79	95	42	70	118	143	188	218	266	313	414	494
	耐药率(%)	23.8	6.3	17.8	21.4	21.4	33.8	37.0	42.0	56.8	50.3	60.0	73.6	79.3

3 讨 论

13 年来本院病原菌结构发生了明显变化,鲍曼不动杆菌构成比持续升高,铜绿假单胞菌在较高水平上波动,金黄色葡萄球菌达到高点后大幅度下降,从最受关注的病原菌变成最受关注的几种病原菌之一,这一点充分体现了物极必反这一自然界的普遍规律,对于临床抗感染治疗也具有重要参考价值。此外,金黄色葡萄球菌和鲍曼不动杆菌构成比的变化同步,方向相反,接近对称。提示不同种属细菌之间拮抗、互补的复杂关系是维持临床感染病原菌此消彼长和动态平衡最重要的因素之一。国内权威机构每年发布全国或地区病原菌监测结果,在鲍曼不动杆菌和铜绿假单胞菌构成比的变化,包括 2011 年度金黄色葡萄球菌的构成比与本研究的结果基本一致。但这些文献报道 2003 年以来金黄色葡萄球菌构成比多在 9%~11% 之间波动,没有明显的下降趋势<sup>[1-3]</sup>。

亚胺培南是治疗革兰阴性细菌感染最重要的抗菌药物之一,细菌对该药耐药率很大程度上反映了该菌整体耐药水平,苯唑西林在药敏试验中具有标志性意义,所以重点关注了病原菌对这些药物的耐药情况。结果表明,鲍曼不动杆菌和铜绿假单胞菌对亚胺培南的耐药率的上升趋势明显,金黄色葡萄球菌对苯唑西林的耐药率始终处于高位。与同期文献报道相比,国外相应病原菌耐药水平明显低于本院<sup>[4-6]</sup>,国内文献报道全国范围内金黄色葡萄球菌对苯唑西林的耐药水平总体呈下降趋势<sup>[1-3,7]</sup>,本院病原菌耐药水平变化趋势与全国范围内的病原菌耐药水平变化趋势基本一致,但上述 3 种主要病原菌的耐药水平均高于全国平均水平,提示本院病原菌耐药的形势更加严峻。

总之,13 年来本院烧伤感染病原菌的结构发生了明显变

化,3 种最主要的病原菌耐药水平也达到了非常高的水平。因此,应当密切关注临床感染病原菌结构及耐药水平的变化,合理使用抗菌药物,将抗感染治疗的重心适当向革兰阴性菌倾斜,提高抗感染治疗的针对性。

参考文献

[1] 朱任媛,张小江,赵颖,等. CHINET 2011 年北京协和医院细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志,2012,12(6):428-434.

[2] 朱德妹,张婴元,汪复,等. 2011 年上海地区细菌耐药性监测[J]. 中国抗感染化疗杂志,2012,12(6):401-411.

[3] 张小江,杨启文,孙宏莉,等. 2005~2010 年北京协和医院细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志,12(5):330-339.

[4] Nordmann P, Picazo JJ, Mutters R, et al. Comparative activity of carbapenem testing; the COMPACT study[J]. Antimicrob Chemother, 2011, 66(5):1070-1078.

[5] Miliiani K, L' Hériveau F, Lacavé L, et al. Imipenem and ciprofloxacin consumption as factors associated with high incidence rates of resistant *Pseudomonas aeruginosa* in hospitals in northern France [J]. J Hosp Infect, 2011, 77(4):343-347.

[6] Elstrøm P, Kacelnik O, Bruun T, et al. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Norway, a low-incidence country, 2006-2010 [J]. J Hosp Infect, 2012, 80(1):36-40.

[7] 王丽春,李大江,熊中华,等. 金黄色葡萄球菌医院感染的临床及耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志,2008,18(10):1485-1488.

(收稿日期:2013-08-25)

(上接第 3313 页)

参考文献

[1] Chisari FV, Isogawa M, Wieland SF. Pathogenesis of hepatitis B virus infection[J]. Pathol Biol, 2010, 58(4):258-266.

[2] Hao C, Wang J, Kang W, et al. Kinetics of th17 cytokines during telbivudine therapy in patients with chronic hepatitis B[J]. Viral Immunol. 2013, 26(5):336-342.

[3] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南[J]. 中华肝脏病杂志, 2005, 13(12):881-891.

[4] Ishikawa T. Immunoregulation of hepatitis B virus infection—rationale and clinical application[J]. Nagoya J Med Sci, 2012, 74(3/4):217-232.

[5] Tan AT, Koh S, Goh V, et al. Understanding the immunopathogenesis of chronic hepatitis B virus: An Asian prospective[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2008, 23(6):833-843.

[6] 顾锡炳,杨小娟,王栋,等. 慢性乙型肝炎患者 HBV 特异性 CTL、非特异性 CTL 的变化和意义[J]. 免疫学杂志, 2010, 21(5):442-443, 451.

[7] 韩亚萍,李军蒋,龙凤,等. HBeAg 导致慢性乙型肝炎患者外周血

Th1/Th2 型细胞因子失衡[J]. 中华肝脏病杂志, 2013, 21(8):584-589.

[8] 陈瑾,吴金明,林贤凡,等. HBeAg 特异性细胞免疫反应体外抗乙型肝炎病毒作用[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2010, 19(4):313-316.

[9] Wang GQ, Ding YP, Dong YH. Telbivudine treatment is associated with high hepatitis B e antigen seroconversion and immune modulatory effects in chronic hepatitis B patients[J]. J Viral Hepat, 2013, 20(Suppl 1):S9-17.

[10] 周玉麟,王学才,吴寅涛,等. 阿德福韦酯对慢性乙型肝炎患者 HBV 特异性 CTL 的影响[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2010, 24(5):362-363.

[11] Chen M, Sällberg M, Hughes J, et al. Immune tolerance split between hepatitis B virus precore and core proteins[J]. J Virol, 2005, 79(5):3016-3027.

[12] Chen J, Wang Y, Wu XJ, et al. Pegylated interferon  $\alpha$ -2b up-regulates specific CD8<sup>+</sup> T cells in patients with chronic hepatitis B[J]. World J Gastroenterol, 2010, 16(48):6145-6150.

(收稿日期:2013-08-08)