

# HBV 慢性感染患者免疫耐受期肝组织内 T、B 淋巴细胞的变化

邢汉前, 辛绍杰, 赵景民, 陈黎明, 李保森, 游绍莉, 赵军, 周光德, 潘登

邢汉前, 辛绍杰, 赵景民, 陈黎明, 李保森, 游绍莉, 赵军, 周光德, 潘登, 中国人民解放军第 302 医院感染三科 北京市 100039

邢汉前, 男, 1970-12-24 生, 湖北省武穴人, 汉族, 1995 年中国人民解放军第四军医大学本科毕业, 2005 年军医进修学院医学硕士研究生毕业, 主治医师, 主要从事病毒性肝炎的临床研究。

通讯作者: 辛绍杰, 100039, 北京市丰台路 26 号, 中国人民解放军第 302 医院感染三科。xsj302@263.net

电话: 010-66933423

收稿日期: 2005-06-15 接受日期: 2005-06-20

## Change of intrahepatic T and B lymphocyte contents in immune tolerant phase of patients with chronic hepatitis B virus infection

Han-Qian Xing, Shao-Jie Xin, Jing-Min Zhao, Li-Ming Chen, Bao-Sen Li, Shao-Li You, Jun Zhao, Guang-De Zhou, Deng Pan

Han-Qian Xing, Shao-Jie Xin, Jing-Min Zhao, Li-Ming Chen, Bao-Sen Li, Shao-Li You, Jun Zhao, Guang-De Zhou, Deng Pan, the Third Department of Infectious Diseases, the 302 Hospital of Chinese PLA, 26 Fengtai Road, Beijing 100039, China

Correspondence to: Shao-Jie Xin, the Third Department of Infectious Diseases, the 302 Hospital of Chinese PLA, 26 Fengtai Road, Beijing 100039, China. xsj302@263.net

Received: 2005-06-15 Accepted: 2005-06-20

### Abstract

**AIM:** To investigate the characteristics of intrahepatic CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> T lymphocytes and B cells in immune tolerant phase of patients with chronic hepatitis B virus infection, and to explore the relationship between intrahepatic immune competent cells and the status of immune tolerance in chronic HBV infection.

**METHODS:** Sixteen liver biopsies were selected from patients with HBV infection in immune tolerant phase for the immunohistochemical detection of T lymphocyte subsets, B lymphocytes and expression of HBsAg and HbcAg. Six normal liver biopsies and 17 liver biopsies of patients in immuneactive phase were employed to serve as control respectively.

**RESULTS:** CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> T lymphocyte subsets in the liver biopsies of patients in immune tolerant phase were all significantly increased as compared with those in the normal control ( $t = 4.504, 8.272, 4.742, \text{all } P < 0.01$ ), but significantly decreased as compared with those in biopsies of patients in immuneactive phase ( $t = 7.079,$

$6.866, 6.316, \text{all } P < 0.01$ ). The ratio of CD4/CD8 in portal tract was lower in immune tolerant phase than in immuneactive phase ( $t = 3.46, P < 0.01$ ), but it was not markedly different from that in the normal control. The number of intrahepatic B cells in immune phase was decreased statistically as compared with that in immuneactive phase ( $t = 4.76, P < 0.01$ ), but were almost the same as that in normal control ( $P > 0.05$ ). The rate of HBcAg expression in hepatocytes of patients at immune tolerant phase was significantly higher than that of patients at immuneactive phase ( $t = 8.76, P < 0.01$ ).

**CONCLUSION:** T and B lymphocytes may play important roles in the clearance of HBV as well as in liver inflammation and injury during chronic HBV infection. The fewer T and B lymphocyte infiltrations are associated with the status of immune tolerance.

**Key Words:** HBV infection; Immune tolerance; Immune competent cells; Immunohistochemistry

Xing HQ, Xin SJ, Zhao JM, Chen LM, Li BS, You SL, Zhao J, Zhou GD, Pan D. Change of intrahepatic T and B lymphocyte contents in immune tolerant phase of patients with chronic hepatitis B virus infection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(13):1529-1534

### 摘要

**目的:** 了解 HBV 慢性感染免疫耐受期患者肝内 T、B 淋巴细胞的变化特点, 探讨肝内免疫活性细胞与 HBV 慢性感染免疫耐受的关系。

**方法:** 采用免疫组织化学方法检测 16 例 HBV 感染免疫耐受期患者肝组织内 T、B 淋巴细胞在肝内分布情况, 及 HBsAg、HBcAg 在肝细胞内表达状况, 并与 6 例正常肝组织、17 例免疫活动期患者进行比较。

**结果:** 免疫耐受期患者肝内浸润的 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞数明显多于正常肝组织 ( $t = 4.504, 8.272, 4.742, P \text{ 均} < 0.01$ ), 但明显少于免疫活动期患者 ( $t = 7.079, 6.866, 6.316, P \text{ 均} < 0.01$ ); 免疫耐受期患者肝脏汇管区 CD4/CD8 比值小于免疫活动期患者 ( $t = 3.46, P < 0.05$ ), 与正常肝组织比较无差异 ( $P > 0.05$ ); 免疫耐受期患者肝内 B 细胞数明显少于免疫活动期患者 ( $t = 4.76, P < 0.01$ ), 但与正常组比较均无差异 ( $P > 0.05$ ); 免疫耐受期患者肝细胞内 HBcAg 阳性表达明显高于免疫活动期患者 ( $t = 8.76, P < 0.01$ )。

**结论:** 肝组织内 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞及 B 淋巴细胞在慢性乙型肝炎的肝组织炎症损伤及肝内 HBV 清除中起重要作用;免疫耐受期患者肝组织内 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞浸润量低, 与免疫耐受有一定的关系。

**关键词:** HBV 感染; 免疫耐受; 免疫活性细胞; 免疫组化

邢汉前, 辛绍杰, 赵景民, 陈黎明, 李保森, 游绍莉, 赵军, 周光德, 潘登. HBV 慢性感染患者免疫耐受期肝组织内 T、B 淋巴细胞的变化. 世界华人消化杂志 2005;13(13):1529-1534

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1529.asp>

## 0 引言

我国 HBV 慢性感染者约有 30-50% 通过围产期感染, 且大多数是通过母婴垂直传播感染的. 导致 HBV 慢性感染者体内 HBV 持续存在的原因可能有两方面: 一是患者机体存在不同程度的免疫耐受, 机体不能建立完整的免疫清除功能; 二是肝细胞内的 HBV 共价闭合环状 DNA (cccDNA) 难以清除, 现今的抗病毒药物尚不能有效地作用于 cccDNA<sup>[1-2]</sup>. 目前 HBV 慢性感染免疫耐受期患者肝组织内免疫细胞应答的研究甚少, 而外周血淋巴细胞的免疫学特点不能完全反映肝组织内的免疫学特点. 一般认为 HBV 慢性感染者机体存在不同程度的 T、B 细胞免疫耐受. 我们采用免疫组织化学方法检测 16 例免疫耐受期患者肝组织内 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞及 B 淋巴细胞分布状况, 并与 6 例正常肝组织、17 例免疫活动期患者进行了比较.

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 标本 HBV 慢性感染患者肝穿刺标本 49 例, 其中免疫耐受期 16 例 (I 组)、免疫活动期 17 例 (II 组), 6 例正常肝组织做对照 (0 组), 标本来源于北京大学第一医院肝移植中心肝移植时的供肝.

1.1.2 免疫组化用主要试剂 肝组织免疫组化采用即用型二步法, 二步法试剂 PV-9000 购自北京中山金桥生物公司分装的美国 Zymed 公司产品, 鼠抗人 -CD3、鼠抗人 -CD20、鼠抗人 -CD8 单克隆抗体、EDTA 抗原修复液及 DAB 显色剂为购自北京中山金桥生物公司分装的美国 Zymed 公司产品, 鼠抗人 -CD4 单克隆抗体为购自福建福州迈新生物技术开发公司分装的美国 Zymed 公司产品, 用 PBS 代替一抗作阴性对照.

### 1.2 方法

1.2.1 HBV 慢性感染不同时期的诊断标准<sup>[2-3]</sup> 免疫耐受期 (I 组): 所有患者病史中均无肝功能异常病史, 且无保肝、降酶、免疫调节剂及抗病毒药物应用史, 外周血 HBsAg、HBeAg 和 HBeAb 均阳性, HBV DNA > 1.0 × 10<sup>8</sup> copies/L, 肝组织无或仅轻微损伤.

免疫活动期 (II 组): 全部病例均有肝功能持续异常半年以上, 外周血 HBsAg、HBeAg/HBeAb、HBcAb 阳性, HBV DNA > 1.0 × 10<sup>8</sup> copies/L, 肝组织炎症明显.

1.2.2 实验室检查 采用全自动生化分析仪器常规检测血清丙氨酸氨基转移酶 (ALT), 应用酶联免疫 (ELISA) 法及 PCR 法检测乙肝病毒抗原抗体五项及 HBV-DNA 定量.

1.2.3 肝组织病理学检查 肝穿刺活检组织用 40 g/L 甲醛固定, 石蜡包埋, 连续 4 μm 切片, 用苏木素 - 伊红 (HE) 染色, 光学显微镜下观察, 按 2000 年西安修订的《病毒性肝炎防治方案》标准进行炎症分级 (G0-4)<sup>[4]</sup>.

1.2.4 免疫组化方法 操作流程均参照文献<sup>[5]</sup>: 采用 PV-9000 即用型二步法, 严格按照 PV-9000 说明书进行, 用脾组织切片做阳性对照, 用 PBS 替代第一抗体做阴性对照. 免疫组化步骤如下: (1) 常规脱蜡; (2) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的甲醇混合液去除内源酶; (3) 热修复: 鼠抗人 CD3、CD20、CD8 实验用切片均采用柠檬酸钠抗原修复液 (0.01 mol/L, pH6.0) 进行热修复, 鼠抗人 CD4 实验用切片采用 EDTA 抗原修复液 (0.01 mol/L, pH8.0) 进行热修复; (4) 滴加鼠抗人 CD3 (工作液)、CD4 (1:250)、CD8 (1:40) 抗体、CD20 (1:100) 抗体, 4℃ 过夜; (5) 滴加二抗: 兔抗鼠 PV-9000 法, 加试剂 1, 37℃ 20 min, PBS 洗 5 次, 每次 3 min, 再加试剂 2, 37℃ 20 min, PBS 洗 5 次, 每次 3 min; (6) DAB 显色, 显微镜下控制显色, 阳性信号为棕黄色; (7) 流水充分冲洗, 苏木素衬染约 2 min, 盐酸酒精分化 15 s, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片.

1.2.5 肝内 HBsAg、HBcAg 免疫组织化学检测采用改良 S-P 免疫组化法, 鼠抗人 -HBs 单抗 (1:100)、兔抗人 -HBc 多克隆抗体 (1:50) 及免疫组化 PV-9000 试剂盒购自北京中山生物技术有限公司进口分装, 按说明书严格操作, 取已知血清 HBsAg、HBeAg、HBcAb 均阳性, 且肝细胞 HBsAg、HBcAg 表达阳性患者肝组织做阳性对照, 用 PBS 代替第一抗体做阴性对照. DAB 显色, 中性树胶封片, 阳性染色为棕黄色.

1.2.6 免疫组化结果半定量计数 视肝组织标本大小分别在肝小叶和汇管区随机选取 5-8 个视野, CD3、CD4、CD8、CD20 均在 10 × 20 倍显微镜下计数阳性细胞数, 取其平均数表示每个患者肝组织内阳性细胞数.

**统计学处理** 数据资料以 mean ± SD 表示, 应用 SPSS10.0 统计软件进行方差分析及 t 检验.

## 2 结果

2.1 HBV 感染免疫耐受期患者肝内 CD3<sup>+</sup> 细胞浸润状况 正常肝组织肝小叶及汇管区见散在分布个别 CD3<sup>+</sup> 细胞 (图 1A); 免疫耐受期患者汇管区及肝小叶内 CD3<sup>+</sup> 细胞轻度增多 (图 1B); 免疫活动期患者肝组织可见 CD3<sup>+</sup> 阳

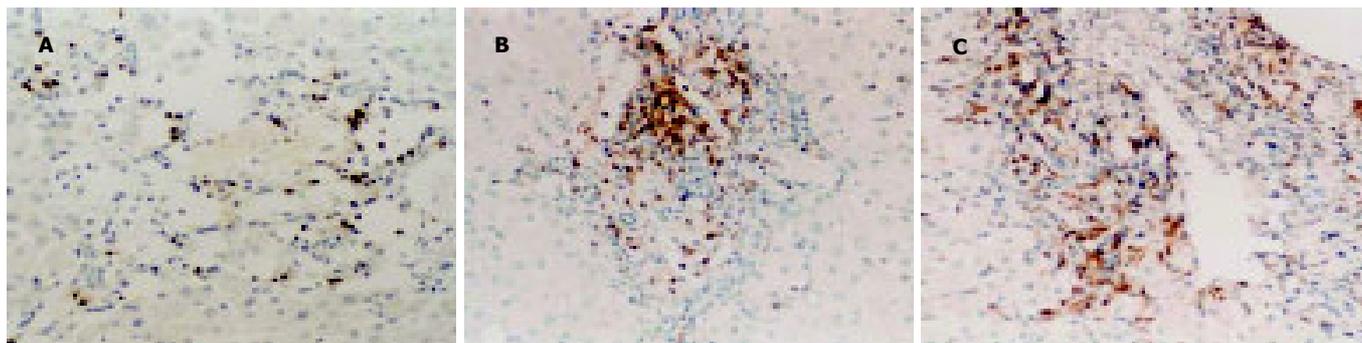


图1 肝组织内 CD3<sup>+</sup>T 淋巴细胞(免疫组化染色 × 200). A: 正常; B: 免疫耐受期; C: 免疫活动期.

表1 各组患者肝小叶及汇管区内 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞计数

分组	<i>n</i>	小叶 CD3	汇管区 CD3	小叶 CD4	汇管区 CD4
正常组(0)	6	34.7 ± 4.6	24.1 ± 5.9	2.86 ± 0.92	2.78 ± 1.02
免疫耐受组(Ⅰ)	16	53.7 ± 16.6 <sup>b</sup>	23.7 ± 6.1 <sup>d</sup>	8.56 ± 1.43 <sup>f</sup>	7.83 ± 2.14 <sup>h</sup>
免疫活动组(Ⅱ)	17	151.3 ± 62.1	85.8 ± 45.2	17.42 ± 4.3	31.9 ± 19.7

$F = 28.83$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 0组, Ⅱ组;  $F = 26.73$ , <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs Ⅱ组;  $F = 72.15$ , <sup>f</sup> $P < 0.01$  vs 0组, Ⅱ组;  $F = 21.98$ , <sup>h</sup> $P < 0.01$  vs 0组, Ⅱ组.

性细胞明显聚集, 肝小叶及汇管区内 CD3<sup>+</sup> 阳性细胞明显增多, 尤以界面炎、炎性坏死灶及窦周炎等部位增多明显, 偶见淋巴滤泡样结构形成(图 1C).

免疫耐受期患者肝小叶及汇管区内 CD3<sup>+</sup> 细胞明显少于免疫活动期患者 ( $P < 0.01$ ), 肝小叶内 CD3<sup>+</sup> 细胞均明显多于正常肝组织 ( $P < 0.01$ ) (表 1).

**2.2 HBV 感染免疫耐受期患者肝内 CD4<sup>+</sup> 细胞浸润状况**  
正常肝组织肝小叶及汇管区内见零星分布 CD4<sup>+</sup> 细胞(图 2A); 免疫耐受组期患者肝小叶内及汇管区少数散在分布 CD4<sup>+</sup> 细胞, 在汇管区内 CD4<sup>+</sup> 细胞略多(图 2B); 免疫活动期患者肝汇管区 CD4<sup>+</sup> 细胞明显增多, 肝小叶内增多不明显, 但在界面炎、炎性坏死灶及窦周炎等部位增多明显(图 2C).

免疫耐受期患者肝内 CD4<sup>+</sup> 主要分布在汇管区, 肝小叶内仅零星分布几个, 均稍多于正常肝组织 ( $P < 0.05$ ), 但明显少于免疫活动期患者 ( $P < 0.01$ ) (表 1).

**2.3 HBV 感染免疫耐受期患者肝内 CD8<sup>+</sup> 细胞浸润状况**  
正常肝组织汇管区及小叶内见少量散在分布 CD8<sup>+</sup> 细胞

(图 3A). 免疫耐受期患者肝内 CD8<sup>+</sup> 细胞主要分布在肝小叶, 汇管区稍多(图 3B). 免疫活动期患者肝小叶内及汇管区内 CD8 阳性细胞明显增多, 尤以界面炎、炎性坏死灶及窦周炎等肝小叶内增多明显(图 3C).

免疫耐受期患者肝小叶内及汇管区 CD8<sup>+</sup> 细胞明显少于免疫活动期患者 ( $P < 0.01$ ), 但明显多于正常肝组织 ( $P < 0.01$ ) (表 2).

表2 各组患者肝小叶及汇管区内 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞

分组	<i>n</i>	小叶 CD8	汇管区 CD8	肝组织内 CD20
正常组(0)	6	18.63 ± 1.93	11.16 ± 1.78	7.46 ± 1.53
免疫耐受组(Ⅰ)	16	26.57 ± 2.89 <sup>b</sup>	13.24 ± 4.25 <sup>d</sup>	10.34 ± 5.13 <sup>f</sup>
免疫活动组(Ⅱ)	17	94.47 ± 44.23	46.96 ± 29.42	22.78 ± 9.53

$F = 24.76$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 0组, Ⅱ组;  $F = 15.24$ , <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs Ⅱ组;  $F = 24.13$ , <sup>f</sup> $P < 0.01$  vs Ⅱ组.

**2.4 HBV 感免疫耐受期患者肝小叶内 CD4/CD8 比值**

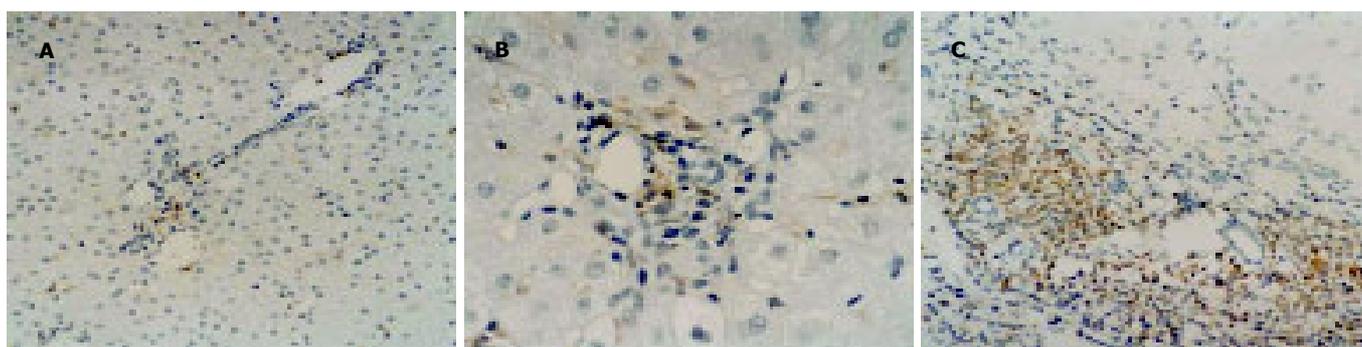


图2 肝组织内 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞(免疫组化染色). A: 正常(× 200); B: 免疫耐受期(× 400); C: 免疫活动期(× 200).

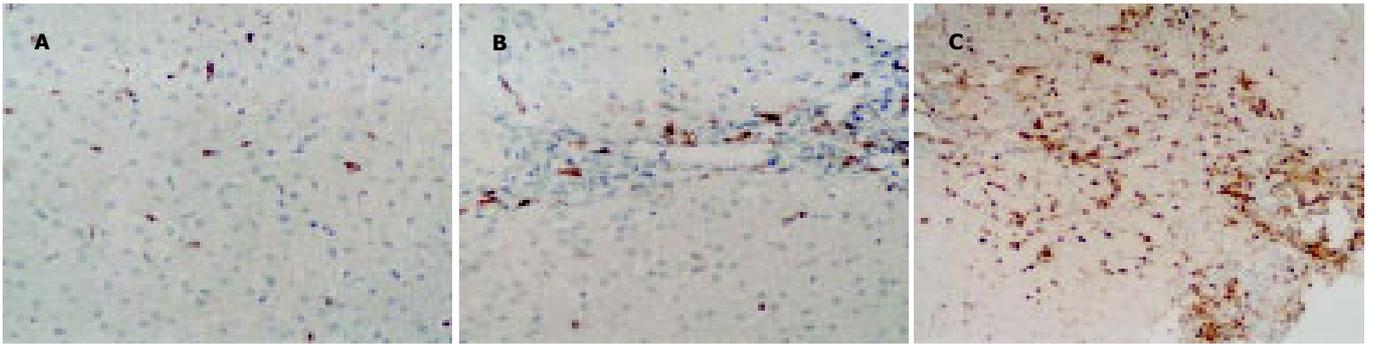


图3 肝组织内 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞(免疫组化染色). A: 正常(× 200); B: 免疫耐受期(× 200); C: 免疫活动期(× 100).

免疫耐受组期患者肝小叶内 CD4/CD8 比值与免疫活动期及正常肝组织比较均无显著性差异 ( $P>0.05$ ) (表3).

2.5 HBV 感染免疫耐受期患者肝汇管区内 CD4/CD8 比值  
免疫耐受期患者肝汇管区内 CD4/CD8 比值明显低于免疫活动期患者, 有显著性差异 ( $P<0.01$ ), 与正常肝组织比较无显著性差异 ( $P>0.05$ ) (表3).

表3 各组患者肝小叶及汇管区内 CD4/CD8 比值

分组	n	肝小叶 CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> T	汇管区 CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> T
正常组(0)	6	0.153 ± 0.038	0.231 ± 0.089
免疫耐受组(II)	16	0.247 ± 0.061 <sup>a</sup>	0.383 ± 0.167 <sup>b</sup>
免疫活动组(III)	17	0.208 ± 0.064	0.886 ± 0.573

$F = 2.858$ , <sup>a</sup> $P>0.05$  vs 0组, II组;  $F = 6.53$ , <sup>b</sup> $P<0.01$  vs 0组, II组.

2.6 HBV 感染免疫耐受期患者肝内 CD20<sup>+</sup> 细胞浸润状况  
正常肝组织汇管区及肝小叶内零星分布 CD20<sup>+</sup> 细胞 (图4A). 免疫耐受期患者肝小叶及汇管区内少数分布 CD20<sup>+</sup> 细胞 (图4B); 免疫活动期患者肝小叶及汇管区内 CD20<sup>+</sup> 细胞明显增多, 可见 CD20<sup>+</sup> 细胞聚集, 尤以界面炎、炎性坏死灶及窦周炎等部位增多明显 (图4C).

免疫耐受组患者肝组织内 CD20<sup>+</sup> 细胞明显少于免疫活动期 ( $P<0.01$ ), 与正常肝组织比较无显著性差异 ( $P>0.05$ ) (表2).

2.7 肝组织内 HBsAg、HBcAg 免疫组化半定量表达状况(表4) 免疫耐受期、免疫活动期者肝细胞内 HBsAg

阳性表达均无显著性差异 ( $P>0.05$ ); 免疫耐受组患者肝细胞内 HBcAg 阳性表达明显高于免疫活动期者, 有非常显著性差异 ( $P<0.01$ ).

表4 各组患者肝细胞内 HBsAg、HBcAg 表达状况比较

分组	n	HBsAg	HBcAg
免疫耐受组(II)	16	13.17 ± 11.02 <sup>a</sup>	59.96 ± 39.52 <sup>b</sup>
免疫活动组(III)	17	8.05 ± 7.67	12.97 ± 17.15

$F = 2.36$ , <sup>a</sup> $P>0.05$  vs II组;  $F = 14.49$ , <sup>b</sup> $P<0.01$  vs II组.

### 3 讨论

3.1 HBV 慢性感染免疫耐受期患者肝组织内 T 淋巴细胞的免疫特点  
目前国内有关 HBV 慢性感染患者外周血淋巴细胞亚群及树突状细胞方面研究较多, 也是研究热点. 但 HBV 慢性感染免疫耐受期患者外周血及肝组织 CD3<sup>+</sup>T 淋巴细胞、CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞、CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞、CD4/CD8 比值、B 淋巴细胞、NK 细胞、Kupffer 细胞方面研究甚少, 免疫耐受期患者肝内免疫细胞与免疫活动期患者及正常肝组织间比较研究尚未见报道.

我们研究发现 HBV 慢性感染者肝内 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞主要浸润于肝小叶, 在小叶内炎性坏死灶及窦周炎部位增多明显, 而 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞主要浸润在汇管区, 与国内外报道的慢性乙肝的 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞、CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞肝内浸润状况基本一致<sup>[6-7]</sup>. 免疫耐受期患者肝小叶内 CD3<sup>+</sup>T 淋巴细胞、CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞、



图4 肝组织内 CD20<sup>+</sup> 细胞(免疫组化染色 × 200). A: 正常; B: 免疫耐受期; C: 免疫活动期.

CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞及汇管区 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞数均明显高于正常肝组织 ( $P < 0.01$ ), 而外周血及肝细胞内 HBV 高复制, 肝组织无炎症或轻微炎症损伤, 提示免疫耐受期患者肝内浸润的 T 淋巴细胞数量虽增多, 但不足以产生有效的免疫应答以清除 HBV 病毒, 可能与 T 淋巴细胞浸润的数量还不够多有关, 或与免疫耐受期患者肝组织内 Th1/Th2 细胞比例失调有关. 由 HBeAg 诱导的免疫应答侧重于 Th1 细胞, 而 HBeAg 是非颗粒性分泌抗原, 分泌性 HBeAg 诱导的免疫应答侧重于 Th2<sup>[8]</sup> 细胞, 免疫耐受期患者外周血中有大量 HBeAg 抗原, 而 HBeAg 抗原作为耐受原, 优先清除外周血对 HBeAg 特异的 Th1 细胞, 从而阻碍了 Th1 细胞对细胞免疫应答的辅佐作用, 而使免疫应答转为 Th2 亚类<sup>[9]</sup>, Th2 细胞占优势时倾向于发生持续性的 HBV 感染<sup>[10]</sup>, 因此免疫耐受期患者肝组织内 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞增多可能是以 Th2 类为主.

免疫耐受期患者肝内 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞数虽明显多于正常对照组, 但肝组织无明显损伤, HBV 未被清除, 提示 CD8<sup>+</sup> CTL 细胞杀伤感染肝细胞的细胞毒作用未发挥, 其原因可能是: (1) 免疫耐受期患者体内 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 调节性 T 淋巴细胞抑制 CD8<sup>+</sup> CTL 细胞的功能. Franzese *et al*<sup>[11]</sup> 研究发现 HBV 慢性感染者外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 调节性 T 淋巴细胞在体外抑制 HBV- 特异的 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞增殖反应及其功能, 因此 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 调节性 T 淋巴细胞在 HBV 慢性感染耐受期患者肝内的分布及功能特点有待进一步研究; (2) 免疫耐受期患者肝组织内浸润的 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞数量还是不足够多, 其分泌极低水平的抗病毒细胞因子  $\gamma$  干扰素、TNF- $\alpha$  不足以清除 HBV 病毒; (3) 免疫耐受期患者肝内 HBeAg 高表达, 血清 HBeAg 含量高, HBeAg、HBcAg 可能诱导 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞免疫耐受, 不攻击 HBV 感染的肝细胞. 免疫耐受期患者肝内 CD3<sup>+</sup>T 淋巴细胞、CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞、CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞与非活动 HBV 携带状态者比较无显著性差异 ( $P > 0.05$ ).

由于 T 淋巴细胞中 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞在抗原刺激下可分化为特异性 T 辅助细胞 (Th), 促进特异性 CTL 和抗体产生, 并对维持 CTL 活性、产生持续性特异性细胞免疫起重要作用. HBV 特异性 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞在 HBV 特异性 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞的产生、维持, 启动树突状细胞 (dendritic cell) 激活 CD8<sup>+</sup> 效应 T 淋巴细胞起重要作用<sup>[12-13]</sup>. 王敏 *et al* 报道外周血 CD4/CD8 比值在慢性乙型肝炎轻中度、重度及肝硬化患者间比较均无显著性差异<sup>[14]</sup>. 徐志强 *et al*<sup>[15]</sup> 报道 HBV 慢性感染者肝脏炎症明显组与不明显组比较外周血 CD4/CD8 比值显著升高. 本研究显示: HBV 慢性感染免疫耐受期患者肝组织汇管区 CD4/CD8 比值明显低于免疫活动期患者, 有显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 这与免疫活动增强时肝内 CD4<sup>+</sup>T

淋巴细胞、CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞均明显增多, 且汇管区 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞增多比 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞更明显, 推测二者可能在 HBV 清除及肝细胞病理损伤中存在协同作用.

3.2 HBV 慢性感染免疫耐受期患者肝组织内 B 淋巴细胞的免疫特点 CD20 是 B 细胞的表面标记物, 在肝组织 CD20 主要表达于肝内成熟 B 细胞及活化 B 细胞, 具有提呈抗原及体液免疫调节功能. 王敏 *et al*<sup>[14]</sup> 报道慢性乙型肝炎轻中度和重度患者外周血 B 淋巴细胞百分比明显低于肝硬化患者. 刘源 *et al*<sup>[16]</sup> 报道 CHB 患者外周血 B 淋巴细胞百分比与正常对照组比较无显著性差异, 目前肝组织内 B 淋巴细胞浸润状况国内尚无报道. 我们实验结果显示: 免疫耐受期患者肝内 B 淋巴细胞明显少于免疫活动期患者 ( $P < 0.01$ ), 免疫耐受期患者肝内 B 淋巴细胞与正常对照者比较无显著性差异, 说明免疫耐受期患者肝内 B 淋巴细胞浸润太少, 未产生免疫应答, 相反免疫活动明显时, 肝内 B 淋巴细胞浸润明显增多, 在 HBV 清除过程中起一定作用.

3.3 HBV 慢性感染免疫耐受期患者肝内 HBsAg、HBcAg 表达特点 HBV 慢性感染患者, 肝组织内 HBcAg 是靶抗原, 而 HBsAg 不一定是靶抗原, 因此 HBcAg 是评价 HBV 复制程度较可靠指标. 本研究结果显示: 免疫耐受期、免疫活动期及非活动 HBV 携带状态患者肝细胞内 HBsAg 表达量均无显著性差异 ( $P > 0.05$ ), 而免疫耐受期患者肝细胞内 HBcAg 表达量明显高于免疫活动期患者, 有非常显著性差异 ( $P < 0.01$ ), 免疫耐受期患者血清及肝细胞内均有高水平 HBV 复制, 肝组织无炎症损伤或仅有轻微炎症损伤, 原因可能是机体对 HBV 病毒抗原呈免疫耐受状态, 不杀伤 HBV 感染的肝细胞所致.

HBV 慢性感染患者免疫耐受期肝组织内 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞及 B 淋巴细胞明显少于免疫活动期患者, 说明上述免疫活性细胞参与了慢性乙型肝炎的炎症损伤; 与免疫活动期相比, 免疫耐受期患者肝细胞内 HBcAg 表达率高, 然而肝组织内 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞及 B 淋巴细胞浸润量低, 提示肝组织内 T、B 淋巴细胞在肝内 HBV 清除中起重要作用; 免疫耐受期患者肝组织内免疫活性细胞浸润量低, 与免疫耐受有一定的关系.

**致谢:** 解放军 302 医院病理科孙艳玲、周光德、潘登、赵雨来老师在实验指导及论文撰写方面提供了大量的帮助, 在此表示衷心的感谢.

#### 4 参考文献

- 1 Fattovich G. Natural history and prognosis of hepatitis B. *Seminars Liver Dis* 2003;23:47-58
- 2 McMahan BJ. The natural history of chronic hepatitis B virus infection. *Seminars Liver Dis* 2004;24:17-21

- 3 Lok AS, Heathcote EJ, Hoofnagle JH. Management of hepatitis B: 2000-summary of a workshop. *Gastroenterology* 2001; 120:1828-1853
- 4 中华医学会传染病与寄生虫病学分会. 肝病学会联合修订. 病毒性肝炎防治方案. 中华肝病杂志 2000;8:324-329
- 5 纪小龙, 施作霖. 诊断免疫组织化学. 北京: 军事医学科学出版社, 1997:14-20
- 6 曲春枫, 吕世军, 玄恩余, 苗乃法, 梁秀珍, 李左连. HDV 感染后在肝细胞损伤中的作用探讨. 临床肝胆病杂志 1999;15:113-115
- 7 Mosnier JF, Pham BN, Walker F, Dubois S, Degos F, Erlinger S, Degott C. Relationship between composition of lymphoid cell infiltrates in the liver and replication status in chronic hepatitis B: an immunohistochemical study. *Am J Clin Pathol* 1996;106:625-633
- 8 Burk RD, Hwang LY, Ho GY, Shafritz DA, Beasley RP. Outcome of perinatal hepatitis B virus exposure is dependent on maternal virus load. *J Infect Dis* 1994;170:1418-1423
- 9 Level D, Block S. Mechanisms of immune escape in viral hepatitis. *Review Gut* 1999;44:759-764
- 10 Lok ASF, Lai CL, Wu PC. Spontaneous hepatitis B virus e antigen to antibody seroconversion and reversion in Chinese patients with chronic hepatitis B virus infection. *Gastroenterology* 1987;92:1839-1843
- 11 Franzese O, Kennedy PT, Gehring AJ. Modulation of the CD8+ T cell response by CD4+CD25+regulatory T cells in patients with hepatitis B virus infection. *J Virol* 2005;79:3322-3328
- 12 Ridge JP, Di Rosa F, Matzinger P. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell. *Nature* 1998;393:474-478
- 13 Sigal LJ, Crotty S, Andino R, Rock KL. Cytotoxic T-cell immunity to virus-infected non-haematopoietic cells requires presentation of exogenous antigen. *Nature* 1999;398:77
- 14 王敏, 王福生, 刘敬超. 慢性乙型肝炎患者外周血淋巴细胞亚群与病程相关性的研究. 中华肝病杂志 2003;8:18-20
- 15 徐志强, 张鸿飞, 杨晓晋, 杨斌, 王福生. 小儿慢性乙型肝炎外周血 T 淋巴细胞亚群和临床病理关系的研究. 中华实验和临床病毒学杂志 2004;18:142-144
- 16 刘源, 韩亚萍, 李军, 黄祖瑚. 慢性乙型肝炎患者外周血淋巴细胞亚群的测定分析. 南通医学院学报 2004;24:140-141

编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

## 汤钊猷院士当选美国外科学会名誉会员

本刊6月27日讯 在125届美国外科学会年会的开幕式上, 复旦大学医学院中山医院肝癌研究所所长、中国工程院院士汤钊猷教授当选为该学会2004年度名誉会员。这是汤钊猷院士继2002年获中国香港外科学院名誉院士和2004年全国“白求恩奖章”后获得的又一殊荣。

据介绍, 美国外科学会建于1880年, 是美国历史最长、最有声望的外科协会。“名誉会员”是该学会给予外国学者的最高荣誉, 迄今共选出23个国家的67位名誉会员, 除英国最多外, 多数国家仅有1-2位, 在我国仅香港大学的John Wong和汤钊猷院士获此荣誉。

美国外科学会主席Polk教授指出: “汤钊猷教授是一位世界广泛公认的肝癌专家, 他在实验室和手术室的贡献, 拓宽了有关肝癌的基础知识, 并提高了治疗水平; 尤其在小肝癌的研究和不能切除肝癌的缩小后切除方面做出了贡献。作为中国工程院院士、中华医学会副会长以及上海医科大学校长, 对国家的公共事业也做出了显著贡献。作为一位对人民无私奉献以及在外科学术上有极高境界的医生, 汤钊猷毫无疑问值得当选为美国外科学会名誉会员。”

汤钊猷院士在致答谢辞时说, 他的当选不仅仅是个人荣誉, 也是美国外科医生和中国外科医生间友谊的象征, 希望通过他的当选, 有助于加强两国外科界的学术交流与友谊。