

慢性HBV感染产妇胎儿脐带血单核细胞PD-L1的表达

于贤杰, 刘敏, 杨慧霞, 朱曼华, 陈姬, 吴学杰, 王贵强

于贤杰, 朱曼华, 陈姬, 吴学杰, 王贵强, 北京大学第一医院感染疾病科 北京市 100034

刘敏, 北京地坛医院妇产科 北京市 100011

杨慧霞, 北京大学第一医院产科 北京市 100034

国家自然科学基金资助项目, No. 30771905

作者贡献分布: 此课题由于贤杰与王贵强设计; 研究过程由于贤杰、刘敏、杨慧霞、朱曼华、陈姬及吴学杰操作完成; 数据分析由于贤杰与王贵强完成; 本论文写作由于贤杰完成; 王贵强指导。通讯作者: 王贵强, 100034, 北京市, 北京大学第一医院感染疾病科暨肝病中心, wangggq@hotmail.com

收稿日期: 2008-02-18 修回日期: 2008-05-07

PD-L1 expression in umbilical cord blood monocytes of neonates born from chronic HBV-infected mothers

Xian-Jie Yu, Min Liu, Hui-Xia Yang, Man-Hua Zhu, Ji Chen, Xue-Jie Wu, Gui-Qiang Wang

Xian-Jie Yu, Man-Hua Zhu, Ji Chen, Xue-Jie Wu, Gui-Qiang Wang, Department of Infectious Diseases, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China

Min Liu, Department of Gynecology and Obstetrics, Ditan Hospital, Beijing 100011, China

Hui-Xia Yang, Department of Obstetrics, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30771905

Correspondence to: Gui-Qiang Wang, Department of Infectious Diseases, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China. wangggq@hotmail.com

Received: 2008-02-18 Revised: 2008-05-07

Abstract

AIM: To detect PD-L1 expression in umbilical cord blood monocytes of neonates born from chronic HBV-infected mothers and to determine relationship between serum HBeAg and PD-L1 expression.

METHODS: Cord blood mononuclear cells (CBMC) were collected from umbilical cord of cesarean-delivered neonates born from 31 HBsAg-positive mothers and 10 healthy mothers. CBMC were stained with CD14-FITC and PD-L1-APC to detect the expression rate of PD-L1 using flow cytometry. Cord blood serum HBeAg was detected using microparticle enzyme immunoassay (MEIA).

RESULTS: There was no significant difference

with PD-L1 expression in cord blood monocytes between neonates born from HBeAg-negative mothers and those born from healthy mothers. In three cases of chronic HBV carrier mothers with high HBeAg level, PD-L1 expression in cord blood monocytes was significantly higher than that of other groups (22.0 ± 1.6 vs 2.55 ± 3.1 , 1.3 ± 1.2 , 1.5 ± 0.8 , all $P = 0.00$). Compared with the PD-L1 expression of low HBeAg levels, there were no significant difference between HBeAg-negative mother group and healthy mother group.

CONCLUSION: High HBeAg levels in umbilical cord blood may be related to up-regulation of PD-L1 in cord blood monocytes of neonates born from HBeAg-positive mothers. It might be related to neonatal persistent HBV infection.

Key Words: PD-L1; Chronic HBV infection; Cord blood monocyte; HBeAg; Virus persistence

Yu XJ, Liu M, Yang HX, Zhu MH, Chen J, Wu XJ, Wang GQ. PD-L1 expression in umbilical cord blood monocytes of neonates born from chronic HBV-infected mothers. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(18): 2061-2064

摘要

目的: 检测慢性HBV感染产妇胎儿脐带血单核细胞PD-L1表达情况, 探讨脐血清HBeAg与PD-L1表达的关系。

方法: 采用流式细胞仪技术检测31例HBsAg阳性产妇和10例健康产妇胎儿脐带血单核细胞PD-L1的表达, 微粒子免疫荧光法(MEIA)检测脐血清HBeAg。

结果: HBeAg阴性产妇组胎儿脐带血单核细胞PD-L1表达与健康产妇组无显著差异, 而HBeAg阳性组中, 3例脐血清HBeAg高水平患者, 脐带血单核细胞PD-L1表达显著高于HBeAg低水平组、HBeAg阴性组及健康产妇组(22.0 ± 1.6 vs 2.55 ± 3.1 , 1.3 ± 1.2 , 1.5 ± 0.8 , 均 $P = 0.00$); HBeAg量处于低水平者, 其单核细胞PD-L1表达与HBeAg阴性者及健康产妇组比较无显著差异。

结论: 慢性HBV感染产妇胎儿脐血高水平

■背景资料

一直以来HBV感染慢性化的机制并不十分明确, 但与感染时的年龄和机体免疫状态密切相关。母婴传播是HBV最常见的传播方式, 而通过这种方式感染的新生儿90%以上会发生HBV感染慢性化。新生儿感染HBV易发生慢性化一直是人们关注的谜团。

■同行评议者

刘正稳, 教授, 西安交通大学医学院第一附属医院传染科

■相关报道

新近众多研究提示PD-1/PD-L通路在HIV、HCV、HBV等病毒感染慢性化中发挥重要作用,成为慢性感染疾病领域内的一大的热点。

HBeAg可能和单核细胞PD-L1高表达有关,可能和新生儿HBV感染慢性化机制有关。

关键词: 程序性细胞死亡分子1; 慢性HBV感染; 脐带血单核细胞; HBeAg; 感染慢性化

于贤杰, 刘敏, 杨慧霞, 朱曼华, 陈姬, 吴学杰, 王贵强. 慢性HBV感染产妇胎儿脐带血单核细胞PD-L1的表达. 世界华人消化杂志. 2008; 16(18): 2061-2064

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2061.asp>

0 引言

慢性乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染严重危害人类健康,在我国慢性HBV感染者约1.2亿. 母婴传播是最常见的传播方式,而通过这种方式感染的婴幼儿90%以上会发生慢性化. 有关HBV慢性化机制尚不清楚,可能和婴幼儿期抗原递呈细胞尤其是树突状细胞功能低下^[1]、机体特异性细胞免疫功能低下^[2]以及分泌型HBeAg^[3]等有关. 新近研究表明,活化T细胞上表达的程序性细胞死亡分子1(PD-1)和相应配体-程序性细胞死亡分子配体1(PD-L1)相互作用,可致使T细胞功能耗竭^[4];而成人慢性HBV感染中单核细胞和髓系树突状细胞的PD-L1表达明显上调,提示PD-L1在HBV逃避免疫、导致持续感染中有一定作用^[5-6]. 我们对慢性HBV感染产妇胎儿脐带血单核细胞PD-L1的表达情况作了初步研究.

1 材料和方法

1.1 材料 HBsAg阳性产妇胎儿脐带血31例来自北京地坛医院妇产科剖宫产患者,健康产妇胎儿脐带血10例来自北京大学第一医院产科剖宫产患者. 患者诊断参照2000年第10次全国病毒性肝炎及肝病学术会议制定的《病毒性肝炎防治方案》和2005年发布的《中国慢性乙型肝炎防治指南》. 所有病例孕期末进行抗病毒治疗和应用乙肝免疫球蛋白注射. 病毒血清学指标(HBsAg、HBsAb、HBeAg、HBeAb和HBcAb),均经ELISA方法检测;血清ALT、AST水平用化学发光法检测. 排除产妇病理产科情况(如胎膜早破)、其他慢性或急性感染,如HCV、HAV、HDV、HEV、HIV、CMV等感染,健康产妇同时排除HBV感染(表1).

1.2 方法 剖宫产术中获取EDTA抗凝血9 mL,利用Ficoll-Paque Plus淋巴细胞分层液[美国Amersham Biosciences(GE)]分离CBMC. 1×10^6 个CBMC与CD14-FITC、PD-L1-APC(美国

表1 研究对象产妇的临床资料

	HBeAg阴性	HBeAg阳性	健康产妇
<i>n</i>	8	23	10
年龄(岁)	29.3 ± 4.0	28.0 ± 3.0	28.4 ± 3.0
ALT(U/L)	26-38	28-40	29-40
HBsAg	阳性	阳性	阴性
抗HBs	阴性	阴性	阴性
HBeAg	阴性	阳性	阴性
抗HBc	阳性	阳性	阴性

表2 胎儿脐带血单核细胞PD-L1的表达 (mean ± SD)

分组	<i>n</i>	脐血清 HBeAg含量	单核细胞PD- L1表达率(%)	产妇产HBV DNA Log值
慢性HBV携带 HBeAg低水平	20	20.9 ± 18.6	2.55 ± 3.1	7.1 ± 0.8
慢性HBV携带 HBeAg高水平	3	154.3 ± 4.7	22.0 ± 1.6 ^a	7.2 ± 0.9
HBeAg阴性	8	<1.0	1.3 ± 1.2	<5
健康对照	10	<1.0	1.5 ± 0.8	阴性

^a $P < 0.01$ vs HBeAg低水平组、HBeAg阴性、健康组.

eBioscience)在室温下共孵育15 min,以CD14-FITC, PD-L1- IgG1(美国eBioscience)标记作为阴性对照,以培养7 d来源于健康产妇胎儿脐带血单核细胞的树突状细胞(dendritic cell, DC)标记PD-L1-APC作为阳性对照. 利用BD FACS Calibur流式细胞仪(美国BD)检测,最终用WinMDI2.9软件分析. 非抗凝脐血4 mL得血清-20℃冻存,统一解冻后通过试剂盒(MEIA, 微粒子免疫荧光法, 美国雅培公司)在AxSYM全自动免疫分析仪(美国雅培)检测出脐血清HBeAg含量. HBsAg阳性产妇血清HBV DNA水平应用荧光定量PCR方法检测(试剂为上海科华生物产品, PCR扩增仪为罗氏LightCycler[®]480, 检测下限为 5×10^5 拷贝/L).

统计学处理 结果以mean ± SD和百分比表示,采用SPSS12.0统计软件进行分析,组间比较用 t 检验,并进行相关分析, $P < 0.05$ 有统计学意义.

2 结果

PD-L1在健康产妇胎儿脐带血单核细胞中的表达率为 $1.5\% \pm 0.8\%$, HBeAg阴性慢性HBV携带产妇组为 $1.3\% \pm 1.2\%$,独立样本 t 检验显示两组之间差异无显著性($P = 0.68$, 表2). 脐血HBeAg的含量与脐带血单核细胞PD-L1表达有一定相

■应用要点

本文通过研究PD-L1在慢性HBV携带产妇胎儿脐带血单核细胞的表达情况及其影响因素,探讨PD-L1在新生儿HBV感染慢性化中可能的作用,为深入发病机制的研究和免疫治疗方法的开发提供依据.

关性. 故按照脐血清HBeAg的含量将慢性HBV携带产妇分成两组: HBeAg高水平组和HBeAg低水平组(表2), *t*检验提示两组产妇产前脐带血单核细胞PD-L1的表达差异具有显著性($P = 0.00$); 两组之间产妇产前HBV DNA水平差异没有显著性($P = 0.99$, 表2).

独立样本*t*检验显示, HBeAg低水平组脐血单核细胞PD-L1的表达与HBeAg阴性慢性HBV携带产妇组和健康产妇对照组相比均无显著差异($P = 0.117, 0.137$); HBeAg高水平组脐血单核细胞PD-L1的表达与HBeAg阴性慢性HBV携带产妇组和健康产妇对照组均有显著差异($P = 0.00$).

此外, 仅能在HBeAg阳性的慢性HBV携带产妇产前脐带血中检测到HBeAg, 但统计学相关分析发现脐带血HBeAg水平与HBeAg阳性慢性HBV携带产妇产前HBV DNA水平无明显相关性($P = 0.17$).

3 讨论

近年来, PD-1/PD-L1通路在自身免疫性疾病、肿瘤、感染疾病中的作用受到广泛关注, 成为研究热点. 在感染性疾病领域内, 已发现许多病原体, 特别是病毒, 能够通过上调该通路的表达而抑制特异性T细胞的功能, 逃避免疫系统的攻击^[4]. 人鼻病毒能够通过上调DC本身PD-L1的表达而下调DC活化T细胞的能力^[7]. 新近研究表明, PD-1/PD-L1通路与慢性病毒感染疾病中的T细胞功能耗竭和机体免疫系统不能有效控制病毒直接相关. 美国学者Barber *et al*^[8]通过慢性病毒感染的动物模型淋巴细胞脉管丛脑膜炎病毒感染的小鼠首次揭示PD-1/PD-L1通路在慢性病毒感染中的至关重要的角色. 在慢性HBV感染中, 美国Chisari实验室发现, PD-1/PD-L1通路与HBV转基因小鼠肝脏内特异性CD8⁺ T功能低下密切相关^[9]. Mühlbauer *et al*^[10]发现, PD-L1在能够分泌HBV病毒颗粒的HepG2-2.2.15的表达明显高于HepG2细胞, 本研究室也得到类似结果. 最近, Chen *et al*^[15]和Geng *et al*^[16]研究结果分别显示, 成人慢性HBV感染者外周血MDC和单核细胞PD-L1表达均明显上调, 可能是HBV逃避免疫、导致HBV感染慢性化的原因.

HBeAg是HBV病毒颗粒组装、复制及感染非必需的一种小分子蛋白, 因HBV复制伴随着他的转录和翻译, 所以被认为是HBV复制的一个标志, 然而其具体生物学功能一直不明. 以往研究发现分泌型HBeAg具有独特的免疫学反应特点,

如诱导Th细胞增殖能力降低且主要以Th2型为主、具有调节HBeAg特异性Th细胞、诱导Th1细胞凋亡等免疫调节功能^[3,11]. 研究已明确HBeAg可以通过胎盘进入胎儿体内^[12-13], 并且这些来源于母体的HBeAg会在胎儿出生后的体内存留较长时间(平均6 mo, 长者达1年)^[13-14]. 因此, HBeAg被认为是免疫耐受原, 并已得到某些动物实验的支持^[11,15]. 此外, 还发现HBeAg阴性母亲所生婴儿易发生急性肝炎而不易出现HBV感染慢性化^[16-17]. Wang *et al*^[13]也发现发生HBV病毒学反弹的患儿出生时血清HBeAg水平明显高于未发生反弹的新生儿, 这些都提示HBeAg在新生儿HBV感染慢性化中的作用, 但具体机制尚不明确.

我们发现HBeAg阴性产妇产前脐带血中单核细胞PD-L1的表达与健康产妇对照组无明显差异, 而HBeAg阳性产妇产前脐带血单核细胞PD-L1表达明显增加, 且其表达与脐血清中HBeAg水平明显有关. 当HBeAg处于高水平时, 脐带血单核细胞PD-L1的表达率明显升高, 与HBeAg阴性产妇产前脐带血单核细胞PD-L1的表达有显著差异; 但当HBeAg处于低水平时, 单核细胞PD-L1的表达与HBeAg阴性产妇产前脐带血单核细胞PD-L1的表达无明显差异. 这提示脐血清高水平HBeAg与慢性HBV携带产妇产前脐带血单核细胞PD-L1的表达上调有关; 提示HBeAg具有免疫调节作用, 介导免疫耐受发生, 即高水平HBeAg可能通过上调新生儿单核细胞PD-L1的表达, 与T细胞上的PD-1相互作用而抑制其功能. 但是本研究样本量相对较少, 尚需进一步验证. 新近也有研究发现成人慢性乙型肝炎患者单核细胞PD-L1表达上调与HBeAg的存在有相关性^[6].

新生儿体内的HBeAg来自母体, 但研究已发现其含量与母亲HBeAg水平无关^[13], 然而目前并不清楚什么因素会影响HBeAg透过胎盘屏障进入胎儿体内, 值得深入研究, 能否通过阻断HBeAg进入胎儿体内而避免发生免疫耐受也是值得探讨的课题.

致谢: 感谢北京地坛医院杨玉英主任医师、白玉清老师, 北京大学第一医院产科张立博士, 北京大学医学部医药分析中心吴后男副研究员以及北京大学第一医院感染疾病科病毒实验室各位老师给予本研究的帮助.

4 参考文献

- 1 Zhang HH, Yang HX, Xi HL, He Y, Piao WH, Zhao H, Yu M, Wang GQ. Study of phenotypes and

■名词解释

PD-1/PD-L1: 两者分别是CD28家族和共刺激分子B7家族的成员, 其中后者包括PDL-1, PDL-2. 两者结合后抑制T细胞活化, 在机体的免疫耐受中起重要作用.

■同行评价

本文内容虽为初步研究结果,但有一定的创新性,学术价值较好。

- 2 于贤杰,王贵强.慢性HBV感染的免疫治疗.世界华人消化杂志 2007; 15: 1835-1840
- 3 Milich D, Liang TJ. Exploring the biological basis of hepatitis B e antigen in hepatitis B virus infection. *Hepatology* 2003; 38: 1075-1086
- 4 Sharpe AH, Wherry EJ, Ahmed R, Freeman GJ. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nat Immunol* 2007; 8: 239-245
- 5 Chen L, Zhang Z, Chen W, Zhang Z, Li Y, Shi M, Zhang J, Chen L, Wang S, Wang FS. B7-H1 up-regulation on myeloid dendritic cells significantly suppresses T cell immune function in patients with chronic hepatitis B. *J Immunol* 2007; 178: 6634-6641
- 6 Geng L, Jiang G, Fang Y, Dong S, Xie H, Chen Y, Shen M, Zheng S. B7-H1 expression is upregulated in peripheral blood CD14⁺ monocytes of patients with chronic hepatitis B virus infection, which correlates with higher serum IL-10 levels. *J Viral Hepat* 2006; 13: 725-733
- 7 Kirchberger S, Majdic O, Steinberger P, Blüml S, Pfistershammer K, Zlabinger G, Deszcz L, Kuechler E, Knapp W, Stöckl J. Human rhinoviruses inhibit the accessory function of dendritic cells by inducing sialoadhesin and B7-H1 expression. *J Immunol* 2005; 175: 1145-1152
- 8 Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, Zhu B, Allison JP, Sharpe AH, Freeman GJ, Ahmed R. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* 2006; 439: 682-687
- 9 Maier H, Isogawa M, Freeman GJ, Chisari FV. PD-1: PD-L1 interactions contribute to the functional suppression of virus-specific CD8⁺ T lymphocytes in the liver. *J Immunol* 2007; 178: 2714-2720
- 10 Mühlbauer M, Fleck M, Schütz C, Weiss T, Froh M, Blank C, Schölmerich J, Hellerbrand C. PD-L1 is induced in hepatocytes by viral infection and by interferon-alpha and -gamma and mediates T cell apoptosis. *J Hepatol* 2006; 45: 520-528
- 11 Chen MT, Billaud JN, Sällberg M, Guidotti LG, Chisari FV, Jones J, Hughes J, Milich DR. A function of the hepatitis B virus precore protein is to regulate the immune response to the core antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 14913-14918
- 12 Wang JS, Zhu QR. Infection of the fetus with hepatitis B e antigen via the placenta. *Lancet* 2000; 355: 989
- 13 Wang Z, Zhang J, Yang H, Li X, Wen S, Guo Y, Sun J, Hou J. Quantitative analysis of HBV DNA level and HBeAg titer in hepatitis B surface antigen positive mothers and their babies: HBeAg passage through the placenta and the rate of decay in babies. *J Med Virol* 2003; 71: 360-366
- 14 Selton D, Andre M, May T, Hascoët JM. Hepatitis B e antigen positive mother hepatitis B e antigen long persistence in her non-infected baby. *Acta Paediatr* 2007; 96: 314-316
- 15 Milich DR, Jones JE, Hughes JL, Price J, Raney AK, McLachlan A. Is a function of the secreted hepatitis B e antigen to induce immunologic tolerance in utero? *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87: 6599-6603
- 16 Chen HL, Chang CJ, Kong MS, Huang FC, Lee HC, Lin CC, Liu CC, Lee IH, Wu TC, Wu SF, Ni YH, Hsu HY, Chen DS, Chang MH. Pediatric fulminant hepatic failure in endemic areas of hepatitis B infection: 15 years after universal hepatitis B vaccination. *Hepatology* 2004; 39: 58-63
- 17 Terazawa S, Kojima M, Yamanaka T, Yotsumoto S, Okamoto H, Tsuda F, Miyakawa Y, Mayumi M. Hepatitis B virus mutants with precore-region defects in two babies with fulminant hepatitis and their mothers positive for antibody to hepatitis B e antigen. *Pediatr Res* 1991; 29: 5-9

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志中文摘要要求

本刊讯 本刊中文摘要必须在350字左右,内容应包括目的(应阐明研究的背景和设想、目的),方法(必须包括材料或对象、应描述课题的基本设计,双盲、单盲还是开放性,使用什么方法,如何进行分组和对照,数据的精确程度,研究对象选择条件与标准是否遵循随机化、齐同化的原则,对照组匹配的特征,如研究对象是患者,应阐明其临床表现,诊断标准,如何筛选分组,有多少例进行过随访,有多少例因出现不良反应而中途停止研究),结果(应列出主要结果,包括主要数据,有什么新发现,说明其价值和局限,叙述要真实、准确、具体,所列数据经用何种统计学方法处理;应给出结果的置信区间和统计学显著性检验的确切值;概率写 P ,后应写出相应显著性检验值),结论(全文总结,准确无误的观点及价值)。(常务副总编辑:张海宁 2008-06-28)