

# HBcAg特异性CTL在急性乙型肝炎与慢性乙型肝炎急性发作患者外周血中的数量差异

闫杰, 谢雯, 冯鑫, 蔺亚辉, 王蓓蓓, 肖江, 欧蔚妮, 王艳斌, 成军

## ■背景资料

HBV特异性CTL应答在乙型肝炎发病机制中的作用已受到广泛关注。急性乙型肝炎的自限性经过与强烈的特异性CTL反应密切相关, 而CHB急性发作时多为非特异性CTL反应。

闫杰, 谢雯, 冯鑫, 王蓓蓓, 肖江, 欧蔚妮, 王艳斌, 成军, 首都医科大学附属北京地坛医院 北京市 100015  
蔺亚辉, 中国医学科学院基础医学研究所 北京市 100005  
首都医学发展科研基金资助项目, No. 2003-3066  
作者贡献分布: 此课题由闫杰、谢雯、成军设计; 实验研究过程由冯鑫、蔺亚辉、王蓓蓓及肖江操作完成; 数据分析由闫杰、欧蔚妮及王艳斌完成; 本论文写作由闫杰与谢雯完成。  
通讯作者: 谢雯, 主任医师, 100015, 北京朝阳区京顺东街8号, 首都医科大学附属北京地坛医院。xiuwen6218@163.com  
收稿日期: 2010-11-05 修回日期: 2011-01-12  
接受日期: 2011-01-21 在线出版日期: 2011-02-08

## Difference in the frequency of peripheral blood HBcAg-specific cytotoxic T cells between patients with acute hepatitis B and those with acute episodes of chronic hepatitis B

Jie Yan, Wen Xie, Xin Feng, Ya-Hui Lin, Bei-Bei Wang, Jiang Xiao, Wei-Ni Ou, Yang-Bin Wang, Jun Cheng

Jie Yan, Wen Xie, Xin Feng, Bei-Bei Wang, Jiang Xiao, Wei-Ni Ou, Yang-Bin Wang, Jun Cheng, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China  
Ya-Hui Lin, Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100005, China  
Supported by: the Capital Medical Science Foundation, No. 2003-3066

Correspondence to: Wen Xie, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, 8 East Jingshun Avenue, Chaoyang District, Beijing 100015, China. jieyan@bnn.cn  
Received: 2010-11-05 Revised: 2011-01-12  
Accepted: 2011-01-21 Published online: 2011-02-08

## Abstract

**AIM:** To compare the difference in the frequency of peripheral blood HBcAg-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) between patients with acute hepatitis B and those with acute episodes of chronic hepatitis B.

**METHODS:** Seventeen HLA-A2-positive patients with acute hepatitis B and 13 patients with acute episodes of chronic hepatitis B were included in the study. The frequency of peripheral blood HBcAg-specific CTLs was determined by HLA-A2/peptide tetramer staining.

**RESULTS:** The frequency of peripheral blood HBcAg-specific CTLs ranged from 0.071% to 31.610%. There was a significant difference in the frequency of peripheral blood HBcAg-specific CTLs between patients with acute hepatitis B and those with acute episodes of chronic hepatitis B ( $9.601\% \pm 10.425\%$  vs  $0.259\% \pm 0.193\%$ ,  $P = 0.002$ ).

**CONCLUSION:** There is a significant difference in the frequency of peripheral blood HBcAg-specific CTLs between patients with acute hepatitis B and those with acute episodes of chronic hepatitis B. The frequency of peripheral blood HBcAg-specific CTLs might be a useful parameter to distinguish the above two types of illness.

**Key Words:** Acute hepatitis B; Chronic hepatitis B; Cytotoxic T lymphocyte; MHC class I-peptide tetramer

Yan J, Xie W, Feng X, Lin YH, Wang BB, Xiao J, Ou WN, Wang YB, Cheng J. Difference in the frequency of peripheral blood HBcAg-specific cytotoxic T cells between patients with acute hepatitis B and those with acute episodes of chronic hepatitis B. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(4): 404-406

## 摘要

**目的:** 研究急性乙型肝炎(AHB)与慢性乙型肝炎(CHB)急性发作患者外周血中HBcAg特异性细胞毒性T淋巴细胞(CTL)的数量差异。

**方法:** 选择HLA-A2阳性的AHB患者17例和CHB患者13例作为研究对象, 应用Tetramer流式细胞技术检测其外周血单个核细胞(PBMC)中的HBcAg特异性CTL细胞频率。

**结果:** 30份PBMC标本中测得HBcAg特异性CTL为0.071%-31.610%, 而阴性对照的健康者PBMC标本检测值仅为0.003%。AHB患者的HBcAg特异性CTL显著高于CHB患者( $9.601\% \pm 10.425\%$  vs  $0.259\% \pm 0.193\%$ ,  $P = 0.002$ )。

**结论:** 外周血中HBcAg特异性CTL的数量在AHB与CHB急性发作患者之间存在显著性差异, 有望成为早期鉴别上述两种疾病状态的实验方法。

## ■同行评议者

陈建杰, 主任医师, 上海中医药大学附属曙光医院(东部)肝病科

**关键词:** 急性乙型肝炎; 慢性乙型肝炎; 细胞毒性T淋巴细胞; MHC-I-肽四聚体

闫杰, 谢雯, 冯鑫, 鞠亚辉, 王蓓蓓, 肖江, 欧蔚妮, 王艳斌, 成军. HBcAg特异性CTL在急性乙型肝炎与慢性乙型肝炎急性发作患者外周血中的数量差异. 世界华人消化杂志 2011; 19(4): 404-406 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/404.asp>

## 0 引言

一般认为, 在免疫力正常的急性乙型肝炎(acute hepatitis B, AHB)患者体内存在适度的特异性细胞免疫水平; 这是乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)急性感染得以清除的关键. 而在慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)患者, 往往存在T淋巴细胞的低反应<sup>[1,2]</sup>, 使病毒清除相当困难; 现有研究结果提示, CHB患者体内的高病毒载量和高抗原量的抑制作用可能是其重要原因之一<sup>[3]</sup>. 但如何检测针对HBV的特异性细胞免疫状态, 成为证实以上假说的技术障碍. 本文拟采用了MHC-I限制的HLA-A2病毒抗原表位的四聚体技术, 建立体外直接检测特异性细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)的方法, 并用该方法研究AHB与CHB急性发作患者外周血中HBcAg特异性CTL的数量差异.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 50例AHB患者和50例CHB急性发作患者为2006-2009年北京地坛医院肝病中心住院患者, 诊断符合2000年《病毒性肝炎防治方案》中AHB和CHB的诊断标准<sup>[4]</sup>. 每例患者均保留入院次日晨起采集的空腹静脉全血标本(肝素抗凝)4 mL, 用于特异性CTL检测.

### 1.2 方法

**1.2.1 外周血单个核细胞的分离:** 将临床采集的全血标本在4 h内用淋巴细胞分离液分离外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC), 于-80℃保存, 待测.

**1.2.2 HLA-A2型别鉴定:** 应用顺序特异引物聚合酶链反应技术(polymerase chain reaction-sequence special primer, PCR-SSP)<sup>[5]</sup>对全部病例进行筛选, 将鉴定获得的HLA-A2阳性患者的PBMC用于特异性CTL检测.

**1.2.3 Tetramer流式细胞技术检测HBcAg特异性CTL:** HBcAg特异性HLA-肽四聚体(Tetramer)购自美国Sanquin生物技术有限公司, 其特异性肽段为HBVcore18-27短肽(氨基酸序列为FLPS-DFFPSV), 以藻红蛋白(PE)标记, 用于流式细胞术检测. 将每份PBMC标本融化复苏后, 用PE标记的Tetramer和APC标记的CD8抗体(BD公司产

品)双染色后应用流式细胞仪进行检测, 以淋巴细胞设门, 计数50 000个CD8+阳性细胞, 同时计数CD8+和Tetramer双阳性细胞为特异性CD8+细胞, 并以占总计数CD8+细胞的百分比表示. 为进行质量控制, 应用健康人PBMC标本作为阴性对照.

**统计学处理** 数据以mean±SD表示, 治疗前后均数比较采用独立样本t检验, 使用SPSS10.0软件进行统计学分析.

## 2 结果

**2.1 人口学及临床资料** 50例AHB患者中鉴定获得HLA-A2型17例, 其中男12例, 女5例, 平均年龄32(19-46)岁; 50例CHB患者中鉴定获得HLA-A2型13例, 其中男9例, 女4例, 平均年龄36(23-44)岁. HBV血清标志物、HBV病毒载量及肝功能情况见表1.

**2.2 流式细胞术检测效果** 自上述AHB患者中筛得HLA-A2阳性17例, CHB患者为13例; 故本次实验共检测PBMC标本30份, 测得HBcAg特异性CTL范围为0.071%-31.610%; 而作为阴性对照的健康人PBMC标本检测值仅为0.003%(图1).

**2.3 AHB与CHB急性发作患者外周血中HBcAg特异性CTL的数量** 17例AHB患者的HBcAg特异性CTL(%)为9.601±10.425, 13例CHB患者为0.259±0.193; 二者存在显著性差异( $P=0.002$ ).

## 3 讨论

AHB同CHB首次急性发作在临床表现、生化检查方面极为相似, 只有借助病史、流行病学史、既往史以及HBV血清学标志物和血清病毒载量的动态变化进行鉴别. 但两者的临床预后大不相同, 且CHB的抗病毒治疗时机, 尤其是应用干扰素α的治疗效果同急性发作关系密切, 因此早期鉴别对于CHB意义重大.

通常认为, 特异性CTL应答是机体清除肝细胞内HBV的主要途径; 但是不充分的特异性CTL应答不仅不能清除病毒, 反而却通过介导非特异性T淋巴细胞应答引起肝脏损害<sup>[6-11]</sup>. 因此, 检测CHB患者特异性CTL水平可能是鉴别AHB与CHB急性发作的一种有效手段. 但是由于HBV感染者外周血中特异性CTL水平极低, 应用传统免疫学研究技术难以进行准确检测. 1992年Garboczi等<sup>[12]</sup>建立了MHC-抗原肽四聚体技术, 并将该技术同流式细胞术相结合, 使得准确检测PBMC中极低细胞频率的特异性CTL成为可能. 我们选用已经证实为MHC I类分子关键结合序列的HBcAg18-27肽段<sup>[13]</sup>与HLA-A2构建四聚体, 用于PBMC中HBV特异性CTL细胞频

## ■研发前沿

HBV体内清除很大程度上依赖于活化表位肽特异性CTL, CTL通过T细胞受体特异性识别病毒肽段并通过MHC-I类分子提呈引起感染细胞融解, 是宿主清除HBV的关键.

## ■相关报道

王洪等应用HLA-表位肽四聚体技术直接检测慢性HBV感染患者外周血中抗原特异性CTL, 发现: 在CHB患者肝炎突发时抗原特异性CTL数量明显增加; 陈小华等应用PTD-HBcAg融合蛋白免疫HBV转基因小鼠, 检测其在体内诱导特异性CTL及抑制HBV复制的能力, 为慢性乙型肝炎患者的免疫治疗提供了新的思路.

## ■同行评价

本文能较好的反映我国在胃肠病临床和基础研究的先进水平,为鉴别AHB和CHB奠定实验基础。

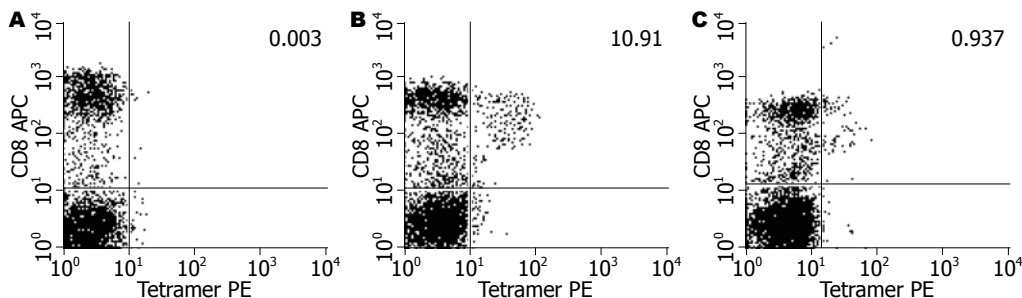


图1 各组HBcAg特异性CTL检测结果. A: 健康人PBMC(tetramer/CD8 = 0.003%); B: AHB患者(tetramer/CD8 = 10.91%); C: CHB患者(tetramer/CD8 = 0.937%).

表1 AHB与CHB患者的人口学资料及临床情况

	AHB(n = 17)	CHB(n = 13)	P值
性别(男/女)	12/5	9/4	0.936
年龄(岁)	32.0 ± 12.2	36.0 ± 9.6	0.339
ALT(U/L)	583.00 ± 498.45	574.45 ± 473.15	0.962
AST(U/L)	490.46 ± 550.37	546.36 ± 443.07	0.767
TBIL(μmol/L)	227.63 ± 233.73	216.56 ± 177.26	0.888
ALB(g/L)	44.22 ± 6.87	46.96 ± 5.23	0.242
eAg <sup>+</sup> /eAb <sup>+</sup> (n)	5/12	9/4	0.030
IgHBV DNA(Ig10)	4.59 ± 1.84	7.04 ± 1.26	<0.001

率的检测. 结果显示, 该方法可检测到细胞频率低至0.071%的HBcAg特异性CTL, 而阴性对照(未受HBV感染的健康人PBMC标本)结果仅为0.003%, 表明四聚体技术联合流式细胞术检测CHB患者特异性CTL的灵敏度和特异度均较高, 适于低水平细胞频率的检测.

以往研究揭示, 急性乙型肝炎的自限性经过与强烈的特异性CTL反应密切相关<sup>[2]</sup>, 而CHB急性发作时多为非特异性CTL反应<sup>[14]</sup>, 故而难以清除HBV, 只会造成反复肝脏损伤<sup>[15]</sup>. 本研究对17例AHB和13例CHB的PBMC进行Tetramer流式细胞术的检测结果显示, AHB患者外周血中的HBcAg特异性CTL数量远高于CHB患者, 与既往研究结果一致, 表明该技术有望成为早期鉴别AHB与CHB急性发作的一种实验方法.

#### 4 参考文献

- Chisari FV, Ferrari C. Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Annu Rev Immunol* 1995; 13: 29-60
- Rehermann B, Nascimbeni M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 215-229
- Jung MC, Pape GR. Immunology of hepatitis B infection. *Lancet Infect Dis* 2002; 2: 43-50
- 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案. *中华肝脏病杂志* 2000; 8: 324-329
- 谭建明, 唐孝达, 谢桐. 人类白细胞抗原-I类抗原的DNA分型与临床应用. *中华医学杂志* 1998; 78: 763-767
- 闫杰, 谢雯, 蔺亚辉, 冯鑫, 王蓓蓓, 肖江, 欧蔚妮, 王

艳斌, 成军. 阿德福韦酯对慢性乙型肝炎患者外周血HBcAg特异性CTL的影响. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 1996-1999

- 张恒辉, 郭芳, 费然, 马慧, 王雪艳, 丛旭, 魏来, 陈红松. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性T细胞在慢性乙型肝炎患者免疫发病机制中的作用. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 2225-2230
- 王洪, 周吉军, 夏杰, 王宇明. 慢性HBV感染肝炎患者外周血病毒抗原表位特异性CTL的数量研究. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 85-88
- 张静波, 陈思源, 杨志清, 李廷荣, 陈安, 吴玉章. 慢性乙型肝炎患者表位特异性CTL定量检测的评价. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 1069-1072
- 王洪, 周吉军, 夏杰, 王宇明. 抗原表位特异性CTL在慢性HBV感染肝损伤和抗病毒中的作用研究. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 1030-1033
- 陈小华, 潘庆春, 汤正好, 余永胜, 臧国庆. PTD-HBcAg融合蛋白诱导特异性CTL抑制转基因小鼠HBV复制. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 2972-2977
- Garboczi DN, Hung DT, Wiley DC. HLA-A2-peptide complexes: refolding and crystallization of molecules expressed in *Escherichia coli* and complexed with single antigenic peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 3429-3433
- Penna A, Chisari FV, Bertoletti A, Missale G, Fowler P, Giuberti T, Fiaccadori F, Ferrari C. Cytotoxic T lymphocytes recognize an HLA-A2-restricted epitope within the hepatitis B virus nucleocapsid antigen. *J Exp Med* 1991; 174: 1565-1570
- 黄晓刚, 苏毅, 林世德, 龙骏, 陈应华, 刘士荣. 慢性HBV感染者外周血Vα24 NKT细胞数量变化及其与肝脏损害程度的关系. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 601-605
- Maini MK, Boni C, Lee CK, Larrubia JR, Reignat S, Ogg GS, King AS, Herberg J, Gilson R, Alisa A, Williams R, Vergani D, Naoumov NV, Ferrari C, Bertoletti A. The role of virus-specific CD8<sup>+</sup> cells in liver damage and viral control during persistent hepatitis B virus infection. *J Exp Med* 2000; 191: 1269-1280