

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.20.007

文章编号: 1005-8982(2016)20-0030-04

论著

慢性乙肝患者血中细胞毒性 T 淋巴细胞表面 PD-1/PD-L1 的表达与病情的相关性

孙立华, 朱斌, 王昕红

(新乡医学院第一附属医院 感染疾病科, 河南 新乡 453100)

摘要:目的 研究慢性乙型肝炎患者外周血中细胞毒性 T 淋巴细胞表面程序性死亡分子 -1(PD-1)/程序性死亡分子 -1 配体(PD-L1)的表达及其与病情的相关性。**方法** 选择慢性乙型肝炎患者 90 例和健康体检者 82 例进行研究。分别纳入慢性乙肝组和健康对照组,检测外周血细胞毒性 T 淋巴细胞表面 PD-1、PD-L1 的表达量以及血清生化指标。**结果** 慢性乙肝组患者外周血中细胞毒性 T 淋巴细胞表面 PD-1 和 PD-L1 的表达量显著高于健康对照组,乙型肝炎病毒载量越高、外周血中细胞毒性 T 淋巴细胞表面 PD-1 和 PD-L1 的表达量越高;慢性乙肝组患者血清中 ALT、AST、IL-6、IL-8 的含量均显著高于健康对照组且与外周血中细胞毒性 T 淋巴细胞表面 PD-1 和 PD-L1 的表达量呈正相关。**结论** 慢性乙型肝炎患者外周血中细胞毒性 T 淋巴细胞表面 PD-1 和 PD-L1 的表达量显著升高且与肝损伤程度、炎症反应程度相关。

关键词: 慢性乙型肝炎;细胞毒性 T 淋巴细胞;程序性死亡分子 -1;炎症反应

中图分类号: R512.62

文献标识码: A

Correlation of expression of PD-1/PD-L1 on cytotoxic T lymphocytes in the peripheral blood of patients with chronic hepatitis B and disease severity

Li-hua Sun, Bin Zhu, Xin-hong Wang

(Department of Infectious Disease, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical College, Xinxiang, Henan 453100, China)

Abstract: Objective To study the expression of PD-1/PD-L1 on cytotoxic T lymphocytes in the peripheral blood of patients with chronic hepatitis B and its correlation with disease severity. **Methods** A total of 90 cases of chronic hepatitis B patients and 82 cases of healthy subjects were respectively enrolled into the chronic hepatitis B group and the healthy control group. Expressions of PD-1 and PD-L1 on cytotoxic T lymphocytes in the peripheral blood and serum biochemical indices were determined. **Results** Expressions of PD-1 and PD-L1 on cytotoxic T lymphocytes in the peripheral blood of the chronic hepatitis B group were significantly higher than those in the healthy control group. Patients with higher HBV load also had a higher expression of PD-1 and PD-L1 on cytotoxic T lymphocytes in the peripheral blood. And serum ALT, AST, IL-6, IL-8 contents of chronic hepatitis B groups were significantly higher than those in healthy control group and positively correlated with PD-1 and PD-L1 expression on cytotoxic T lymphocytes in the peripheral blood. **Conclusions** The expression of PD-1 and PD-L1 on cytotoxic T lymphocytes in the peripheral blood of patients with chronic hepatitis B significantly elevates and correlates with the degree of liver injury and the degree of inflammation.

Keywords: chronic hepatitis B; cytotoxic T lymphocyte; programmed death-1; inflammatory response

收稿日期:2016-04-05

慢性乙型肝炎是由乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 感染引起的消化系统传染性疾病, 细胞免疫应答是机体清除 HBV 病毒的重要机制, 机体的免疫功能决定了慢性乙型肝炎的临床预后和转归。T 淋巴细胞是介导细胞免疫最主要的细胞群, 慢性乙型肝炎患者存在不同程度的 T 淋巴细胞质量低下、数量不足, 机体无法通过自身的细胞免疫功能来清除 HBV 病毒^[1]。T 淋巴细胞免疫应答功能的强弱受到了多种共刺激信号分子的调节, 其中程序性死亡分子 -1 (programmed death-1, PD-1) 是决定 T 细胞数目和功能最关键的负性共刺激信号分子, PD-1 与其配体程序性死亡分子 -1 配体 (programmed death ligand-1, PD-L1) 结合能够诱导 T 细胞凋亡^[2]。在下列研究中, 笔者分析慢性乙型肝炎患者外周血中细胞毒性 T 淋巴细胞表面 PD-1/PD-L1 的表达及其与病情的相关性。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2012 年 8 月 -2015 年 1 月于新乡医学院第一附属医院接受治疗的慢性乙型肝炎患者 90 例纳入研究的慢性乙肝组。其中, 男性 51 例, 女性 39 例, 年龄 34 ~ 67 岁, 平均 (47.12 ± 8.05) 岁, 均符合世界卫生组织对于慢性乙型肝炎的诊断标准且未接受过抗病毒治疗, 入组患者在了解研究过程后签署知情同意书。取同期在本院进行健康体检、不伴有肝功能异常的正常人群 82 例作为健康对照组。其中, 男性 43 例, 女性 39 例, 年龄 30 ~ 71 岁, 平均 (45.84 ± 8.31) 岁。本次研究经医院伦理委员会审核并批准, 入组研究对象的基线资料比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 可以进行进一步比较。

1.2 血清生化指标的检测

取新鲜外周血 10 ml, 离心得到血清后, 采用全自动生化分析仪测定谷氨酸 - 丙酮酸转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate transaminase, AST) 含量, 采用酶联免疫吸附试剂盒测定白细胞介素 6 (interleukin 6, IL-6)、白细胞介素 8 (interleukin 8, IL-8) 的含量。

1.3 外周血细胞毒性 T 淋巴细胞表面 PD-1/PD-L1 表达

取新鲜外周血 10 ml, 采用密度梯度法分离单个核细胞, 用磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffer saline, PBS) 调节细胞密度为 $1 \times 10^7/\text{ml}$ 。在每个反应管中加

入上述细胞悬液 100 μl , 而后避光孵育 APC 标记的 CD3、PerCP 标记的 CD8、FITC 标记的 PD-1、FITC 标记的 PD-L1 抗体 20 min, PBS 洗涤 2 次后弃上清液, 加入 1% 多聚甲醛 300 μl 固定, 在流式细胞仪上以 CD3⁺ T 细胞为门, 计数 CD3⁺CD8⁺, 测定 PD-1、PD-L1 阳性细胞占 CD3⁺CD8⁺ 细胞的比例。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计软件进行数据分析, 计量数据用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 用 t 检验。多组间计量资料的比较用方差分析, 两两比较用 LSD- t 检验, 两指标间的相关性用 Pearson 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 外周血中细胞毒性 T 淋巴细胞表面 PD-1/PD-L1 的表达

慢性乙肝组患者外周血中细胞毒性 T 淋巴细胞表面 PD-1 和 PD-L1 的表达量显著高于健康对照组, 两组间的差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 不同 HBV 载量患者外周血中细胞毒性 T 淋巴细胞表面 PD-1/PD-L1 的表达

不同 HBV 载量患者外周血中细胞毒性 T 淋巴细胞表面 PD-1 和 PD-L1 的表达量有差异; HBV 载量越高, 外周血中细胞毒性 T 淋巴细胞表面 PD-1 和 PD-L1 的表达量越高。见表 2。

表 1 两组受试者外周血中细胞毒性 T 淋巴细胞表面 PD-1/PD-L1 的表达 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	PD-1	PD-L1
慢性乙肝组 ($n=90$)	39.42 ± 5.95	47.26 ± 6.61
健康对照组 ($n=82$)	14.52 ± 3.22	27.62 ± 3.64
t 值	17.493	9.126
P 值	0.001	0.005

表 2 不同 HBV 载量患者外周血中细胞毒性 T 淋巴细胞表面 PD-1/PD-L1 的表达 (% , $\bar{x} \pm s$)

HBV-DNA/(拷贝/ml)	PD-1	PD-L1
<3 lg ($n=21$)	24.22 ± 4.52	35.58 ± 5.22
3 ~ 6 lg ($n=38$)	35.58 ± 5.71	45.29 ± 6.38
>6 lg ($n=31$)	48.51 ± 7.74	58.25 ± 8.14
F 值	8.395	7.614
P 值	0.006	0.009

2.3 血清中生化指标

慢性乙肝组患者血清中 ALT、AST、IL-6、IL-8 的含量均显著高于健康对照组,两组间的差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 3。

2.4 PD-1/PD-L1 表达量与血清生化指标的相关性

外周血中细胞毒性 T 淋巴细胞表面 PD-1 和 PD-L1 的表达量与血清 ALT、AST、IL-6 和 IL-8 的含量呈正相关。见表 4。

表 3 两组受试者的血清生化指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

HBV-DNA/(拷贝/ml)	ALT/(u/L)	AST/(u/L)	IL-6/(pg/L)	IL-8/(pg/L)
慢性乙肝组($n=90$)	93.69 ± 12.51	76.61 ± 10.33	204.51 ± 34.86	273.69 ± 41.36
健康对照组($n=82$)	18.92 ± 2.62	12.48 ± 1.85	24.68 ± 5.14	48.52 ± 7.42
<i>t</i> 值	35.595	42.911	71.398	58.592
<i>P</i> 值	0.002	0.001	0.004	0.003

表 4 PD-1/PD-L1 表达量与血清生化指标的相关性

组别	PD-1			PD-L1		
	相关系数	统计值	<i>P</i> 值	相关系数	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
ALT	0.671	15.591	0.002	0.586	9.292	0.011
AST	0.738	12.765	0.009	0.733	14.567	0.004
IL-6	0.715	20.336	0.000	0.801	17.692	0.001
IL-8	0.693	17.123	0.001	0.664	10.385	0.010

3 讨论

目前的研究认为,造成慢性乙型肝炎患者体内 HBV 持续感染的关键病理环节是细胞免疫功能低下,尤其是细胞毒性 T 细胞所介导的细胞免疫应答低下。但是,关于细胞毒性 T 细胞功能低下的原因尚未明确。细胞毒性 T 细胞的功能不仅受到辅助性 T 细胞、调节性 T 细胞的影响,细胞毒性 T 细胞本身表达多种共刺激分子并且能够影响细胞的数目和功能。在诸多共刺激信号分子中,PD-1/PD-L1 是最关键的负性共刺激信号^[8]。笔者对慢性乙肝患者外周血中细胞毒性 T 淋巴细胞表面 PD-1/PD-L1 表达量的分析也证实,慢性乙肝组患者外周血中细胞毒性 T 淋巴细胞表面 PD-1 和 PD-L1 的表达量显著高于健康对照组。这就说明慢性乙型肝炎患者体内存在 PD-1/PD-L1 所介导的负性共刺激信号过度激活的现象。

PD-1 是 CD28/B7 家族的成员之一,主要表达活化的 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞、B 细胞,其配体 PD-1L 主要表达与 B 细胞、T 细胞和巨噬细胞。PD-1 与 PD-L1 以配体 - 受体方式结合后能够诱导靶细胞发生凋亡、造成细胞功能减退。细胞毒性 T 淋巴细胞表面的 PD-1 和 PD-L1 主要与细胞凋亡有关^[4-5]。为了进一步明确外周血中细胞毒性 T 淋巴细胞表面 PD-1/PD-L1 与 HBV 感染的关系,笔者分析了不同

HBV 载量患者外周血中细胞毒性 T 淋巴细胞表面 PD-1/PD-L1 的表达,结果显示:HBV 载量越高,外周血中细胞毒性 T 淋巴细胞表面 PD-1 和 PD-L1 的表达量越高。这就说明细胞毒性 T 淋巴细胞表面 PD-1/PD-L1 表达量的增加与 HBV 感染加重、载量增加有关。

HBV 持续感染会造成慢性乙型肝炎患者肝功能损伤,表现为肝细胞破裂、胞浆中多种转氨酶释放入血^[6]。ALT 和 AST 是临床上评价肝功能损伤最常用的生化指标,笔者的分析证实,慢性乙肝组患者血清中 ALT、AST 的含量显著高于健康对照组且与外周血中细胞毒性 T 淋巴细胞表面 PD-1 和 PD-L1 的表达量呈正相关。HBV 感染所激活的炎症反应是造成肝细胞损伤的重要环节,IL-6 和 IL-8 是介导炎症反应关键的细胞因子^[7-9]。笔者对血清炎症因子含量的分析证实,慢性乙肝组患者血清中 IL-6、IL-8 的含量显著高于健康对照组且与外周血中细胞毒性 T 淋巴细胞表面 PD-1 和 PD-L1 的表达量呈正相关。由此说明外周血中细胞毒性 T 淋巴细胞表面 PD-1 和 PD-L1 的表达量与慢性乙肝患者肝功能损伤程度、炎症反应程度等病情密切相关。

综上所述,慢性乙型肝炎患者外周血中细胞毒性 T 淋巴细胞表面 PD-1 和 PD-L1 的表达量显著升高且与肝损伤程度、炎症反应程度相关。

参 考 文 献:

- [1] YE B, LIU X, LI X, et al. T-cell exhaustion in chronic hepatitis B infection: current knowledge and clinical significance [J]. *Cell Death Dis*, 2015, 19(6): DOI: 10.1038/cddis.2015.42.
- [2] 谢冬英, 陈凤娟, 邓洪, 等. 慢性乙型肝炎病毒感染者外周血单个核细胞表达程序性死亡分子 -1 及其配体与血清乙型肝炎病毒 DNA 水平的相关性[J]. *中华传染病杂志*, 2011, 29(4): 216-220.
- [3] 王栋, 顾锡炳, 朱银芳, 等. 乙型肝炎肝硬化患者 HBVDNA 水平与细胞毒性 T 淋巴细胞表面程序性死亡受体 -1 表达及肝功能的关系[J]. *实用医学杂志*, 2015, 31(7): 1072-1075.
- [4] CHENG H Y, KANG P J, CHUANG Y H, et al. Circulating programmed death-1 as a marker for sustained high hepatitis B viral load and risk of hepatocellular carcinoma[J]. *PLoS One*, 2014, 9(11): DOI: 10.1371/journal.pone.0095870.
- [5] FENG C, CAO L J, SONG H F, et al. Expression of PD-L1 on CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells of patients with chronic HBV infection and its correlation with clinical parameters[J]. *Viral Immunol*, 2015, 28(8): 418-424.
- [6] 郑智鑫, 陈黎明, 孔霜焯. 慢性重型乙肝血清病毒水平与病情及预后关系研究[J]. *中国医药导报*, 2013, 10(3): 55-57.
- [7] WU H L, KAO J H, CHEN T C, et al. Serum cytokine/chemokine profiles in acute exacerbation of chronic hepatitis B: clinical and mechanistic implications[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2014, 29(8): 1629-1636.
- [8] FANG Z, LI J, YU X, et al. Polarization of monocytic myeloid-derived suppressor cells by hepatitis B surface antigen is mediated via ERK/IL-6/STAT3 signaling feedback and restrains the activation of T cells in chronic hepatitis B virus infection[J]. *J Immunol*, 2015, 195(10): 4873-4883.

(张蕾 编辑)