

• 综 述 •

慢性乙型肝炎患者 HBV 感染外周血单个核细胞的研究进展*

张 浩 综述,管世鹤[△] 审校

(安徽医科大学第二附属医院检验科,安徽合肥 230032)

关键词:乙型肝炎病毒; 感染; 外周血单个核细胞

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.13.047

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)13-1915-03

乙型肝炎(简称乙肝)病毒(HBV)感染是一个全球性的公共卫生问题,全世界约 3.5 亿人受该病毒感染影响。近年来,国内外研究发现,HBV 不仅存在于肝细胞中,也可以存在于外周血单个核细胞(PBMC)。由于 PBMC 在机体免疫过程中发挥非常重要的作用,HBV 在 PBMC 中的发现,以及 HBV 对 PBMC 免疫功能的影响越来越受到国内外学者的关注。本文就慢性乙肝(CHB)患者中 PBMC 相关的研究进展作简要的综述。

1 乙肝患者 HBV 在 PBMC 中的分布

HBV 共价闭合环状 DNA(cccDNA)是 HBV 前基因组 RNA 复制的原始合成模板,是 HBV 持续感染的一个关键因素,也是 HBV 复制最特异的指标,如果 HBV cccDNA 检测结果阳性,通常认为存在 HBV 的复制。近年来国内外均有研究报道 HBV 可存在于 PBMC,并且 HBV 可以在 PBMC 中复制^[1]。沈薇^[2]以 67 例乙肝患者为检测对象,发现 PBMC 中 HBV DNA 检出阳性率为 67.2%(45/67),与血清的符合率为 80.7%,且与病情呈正相关。有研究者采用实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)检测患者血清、PBMC 及肝组织中 HBV cccDNA 的存在情况,结果 50 份标本中血清 HBV cccDNA 检出率为 56%,PBMC HBV cccDNA 检出率为 58%,肝组织中 HBV cccDNA 检出率为 88%^[3],说明 HBV cccDNA 主要在于乙肝患者的肝脏中,乙肝患者血清及 PBMC 中也有 HBV cccDNA 的存在但较肝组织中要少。

2 HBV 感染对 PBMC 免疫功能的影响

PBMC 是免疫活性细胞的集合体,在机体的免疫调节中起非常重要的作用。HBV 感染对 PBMC 免疫功能的影响已成为当前的研究热点。国内外学者研究报道 HBV 感染可以影响 PBMC 内一些免疫调节因子的表达,从而影响机体的免疫反应。Song 等^[3]研究发现,HBV 感染可以减少 PBMC 内 MOV10、A3G 和 干扰素- α (IFN- α)等几种重要免疫调节因子的基因表达,进而减弱机体的免疫功能。含 Toll-白细胞介素-1 受体结构域诱导干扰素接头分子(TRIF)是 Toll 样受体 3(TLR3)和 Toll 样受体 4(TLR4)信号途径中一种重要的接头蛋白,它的表达可以影响到机体的抗病毒免疫功能。Ayoobi 等^[4]研究表明,HBV 感染使慢性乙肝患者 PBMC 内 TRIF 蛋白的表达明显降低,可能会导致 TLR3 和 TLR4 信号途径受到抑制,这可能是 HBV 感染慢性化的一个原因。国内外学者研究指出免疫调节因子白细胞介素-17(IL-17),白细胞介素(IL-

18)的表达水平在 HBV 感染患者的 PBMC 中也明显升高,推测 IL-17、IL-18 在乙肝炎性反应,疾病的发生、发展及慢性化过程中扮演了角色^[5-6]。韩亚萍等^[7]发现 HBV 抗原成分乙型肝炎 e 抗原(HBeAg)可以使免疫细胞的功能改变,明显抑制辅助性 T 淋巴细胞 1(Th1)细胞因子干扰素- γ (IFN- γ)的产生,促进辅助性 T 淋巴细胞 2(Th2)细胞因子白细胞介素-6(IL-6)和白细胞介素-10(IL-10)分泌,上调外周血 PBMC 表面程序性死亡分子 1(PD-1)/程序性死亡配体 1(PD-L1)的表达,从而有利于形成对 HBV 感染的免疫耐受。且有报道指出 HBV 感染使 PBMC 中 T 淋巴细胞衰减子(BTLA)的表达明显增高,抑制 T 淋巴细胞的抗病毒免疫功能^[8]。由于 PBMC 对机体的免疫功能起着非常重要的作用,而在多数乙肝患者中又常常出现免疫功能紊乱的表现,因此以上发现不但证明了 PBMC 能够被 HBV 感染,而且提示这可能是致使乙肝患者免疫功能紊乱的原因之一。

3 HBV 感染 PBMC 与隐性 HBV 感染的关系

隐性 HBV 感染是指乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)阴性,而肝组织、PBMC 中持续检测到低水平 HBV DNA 的存在^[9]。近年来普遍认为隐性 HBV 感染具有一定的临床意义,它不仅具有通过血液、器官移植和母婴传播等途径传播病毒的潜在危险性,甚至在免疫抑制或化疗后促进急性或爆发性肝炎的激活中扮演了重要角色^[10-11],所以近年来受到人们的广泛关注。Cassini 等^[12]用定量 PCR 技术检测肝组织、血清及 PBMC 内 HBV DNA,发现在血清学 HBV DNA 检测阴性的患者中,肝组织的检出率为 7/24 (29%),而 PBMC 中 HBV DNA 的检出率在隐匿性感染患者中达到 6/7 (86%)。该研究提示 PBMC 中 HBV DNA 可能与隐匿性感染相关,且可能成为监测隐匿性感染的指标之一,这也与研究报道相符^[11]。Vakili Ghartavol 等^[13]检测了 50 例表面抗原阴性、丙型肝炎阳性且未接受过治疗的患者 HBV DNA,其中 18 例检测呈阳性(36%),且在 18 例阳性患者中,血清和 PBMC 中同时呈阳性者 7 例(38.9%),只在 PBMCs 中检测到的有 8 例(44.4%),而只在血浆标本中检测到的有 3 例(16.7%)。此研究进一步印证了 PBMC 中 HBV DNA 可能与隐匿性感染相关,且进一步表明 PBMC 中 HBV DNA 可能会在监测隐匿性感染中发挥重要作用。

4 HBV 感染 PBMC 与 HBV 宫内感染的关系

母婴传播是 HBV 感染的一种重要途径^[14-15]。在中国,大

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81171662)。 作者简介:张浩,男,检验技师,主要从事病毒免疫研究。 [△] 通讯作者, E-mail:shiheguan@126.com。

约 1/3 HBsAg 阳性的携带者是由母婴传播途径感染的,而母亲 HBsAg 阳性的新生儿的感染率为 50%^[16]。HBV 宫内感染是 HBV 母婴传播的主要途径,近年来随着主、被动免疫联合应用,提高了母婴传播的阻断成功率,但仍有相当数量的阻断失败者^[17]。HBV 宫内感染的机制并不完全清楚,但 PBMC 感染学说受到国内外学者的关注并得到越来越多的认可。冯永亮等^[18]用选择性 PCR 扩增研究对象 PBMC 中 HBV cccDNA,并对 1 例阳性产物进行直接测序鉴定,测序结果进行同源性比较,发现 HBsAg 阳性孕妇 PBMC 中 HBV cccDNA 的检出率为 9.93%,新生儿 PBMC 中 HBV cccDNA 的检出率为 4.58%,且 HBV cccDNA 的同源性为 100%。该研究提示 PBMC 为 HBV 肝外复制的场所,且 PBMC 感染很有可能是 HBV 宫内感染的传播机制之一。Shao 等^[19]以 30 例 HBsAg 阳性孕妇和她们的流产胎儿作研究对象,分别检测了外周血的 HBsAg,血清及 PBMC 中的 HBV DNA。研究发现流产胎儿中 HBV 宫内感染率为 43.33%,而外周血、血清和 PBMC 中 HBV 阳性率分别是 10% (3/30)、23.33% (7/30) 和 33.33% (10/30),且母婴 PBMC 传播与流产胎儿的 PBMC 内 HBV DNA 载量呈正相关。该研究进一步印证了 HBV 感染 PBMC 很可能是 HBV 宫内感染的重要原因之一。由于 HBV 感染 PBMC 很大可能与围产期母婴传播有关,因此,对 HBsAg 阳性孕妇所分娩的新生儿,不仅需要常规检测 HBsAg 和血清 HBV DNA,而且应该要检测 PBMC 中的 HBV DNA,并要积极寻找有效的预防措施,以减少慢性 HBV 携带状态的发生。

5 抗病毒药物疗效与 HBV 感染 PBMC 的关系

HBV 除在肝脏组织复制外,还存在于 PBMC 等多种组织细胞中,PBMC 内的 HBV 可作为潜在的病毒库,成为抗病毒治疗或肝脏移植后肝细胞再次发生感染的病毒来源,是抗病毒治疗后复发的根源。而 PBMC 是 T、B 淋巴细胞,单核细胞等各种免疫活性细胞的集合体,在抗病毒治疗的免疫反应中发挥非常重要的作用。HBV 感染了 PBMC,不仅影响 PBMC 的免疫功能,而且也削弱了抗病毒药物的疗效。抗病毒药物如拉米夫定等对乙肝患者 PBMC 的作用的研究越来越受到国内外学者的关注。龚钰清等^[20]检测了替比夫定治疗前后 CHB 轻、中、重度 3 组患者血清和 PBMC 内 HBV DNA 载量,并同健康对照组作比较,发现替比夫定治疗可以迅速降低病毒载量,但 PBMC 内病毒载量的下降要明显晚于血清 HBV DNA 水平的下降,并推测 PBMC 内病毒池的持续存在可能是 HBV 抗病毒治疗失败的原因之一。杜以真等^[21]以 90 例经抗病毒治疗后达到停药标准的 CHB 患者为研究对象,其中应用 IFN 的 44 例,应用核苷类药物的 46 例。在患者停药时检测 PBMC 内 HBV DNA 载量,发现 90 例 CHB 患者停药时,PBMC 内 HBV DNA 阴性组 67 例,阳性组 23 例,且 CHB 患者血清 HBV DNA 阳转率在 PBMC 内 HBV DNA 阴性组为 13.4% (9/67),明显低于阳性组的 73.9% (17/23)。该研究提示经抗病毒治疗后达到停药标准的 CHB 患者,其停药时的 PBMC 内 HBV DNA 水平可能是预测抗病毒疗效持久性的重要因素之一。而患者 PBMC 内仍有 HBV DNA 存在,可能的原因是:(1)CHB 患者存在不同程度细胞免疫功能的紊乱,采用抗病毒药物治疗后,病毒处于低复制状态,只有当人体抗病毒免疫功能恢复,才能获得持久疗效。(2)体内的 HBV 在抗病毒药物作用下发生了变异(如 YMDD 变异),变异的病毒株一方面对抗病毒药物

产生耐药性,另一方面使其致病性、复制能力有不同程度的下降,成为选择性保留的优势病毒株。(3)侵入 PBMC 内的 HBV 逃避免疫监视,产生免疫耐受。在判断抗病毒治疗的效果时,PBMC 内 HBV DNA 载量、存在状态应作为判定标准之一。

6 PBMC 内 HBV DNA 的检测

目前乙肝患者 PBMC 内 HBV cccDNA 的检测受到越来越多的关注。文献报道中常用于检测乙肝患者 PBMC 内 HBV cccDNA 的方法是巢式 PCR 技术,具有敏感、快速、特异性强等优点,已被广泛用于 HBV DNA 的相关检测与研究^[19-22]。而实时荧光定量 PCR 的出现,极大地简化了定量检测的过程,而且真正实现了绝对定量,且反应快速、重复性好、灵敏度高、特异性强、结果清晰。随着生物芯片技术和荧光探针定量技术的结合,荧光定量 PCR 在 PBMC 内 HBV DNA 的检测中也越来越受到青睐,是国内外文献报道中最常用的 HBV cccDNA 检测方法之一^[23-24]。有学者成功建立了 HBV cccDNA 巢式-荧光定量 PCR 的检测方法,线性范围为 $5.0 \times 10^2 \sim 3.9 \times 10^7$ copies/mL,为 HBV cccDNA 检测提供了新的路径。另外蛋白免疫印迹法,PCR-微流芯片法都可以用于 PBMC 中 HBV cccDNA 的检测。

7 小结与展望

HBV 可以感染 PBMC,而 PBMC 的感染有利于病毒免疫逃逸,不被免疫细胞攻击,从而使机体清除 HBV 的能力下降。在 HBV 感染 PBMC 内存在 cccDNA,是病毒持续感染久治不愈的原因之一。PBMC cccDNA 是评价 HBV 感染状态及抗病毒疗效的一个重要指标。乙肝患者 PBMC 内 HBV DNA 持续存在,提供 HBV 使肝细胞反复感染,形成慢性肝损害,可能是乙肝的慢性化原因之一。可以看出,PBMC 已成为 HBV 的仅次于肝细胞的一个重要靶细胞,研究 PBMC 内感染 HBV 有助于阐明 HBV 的致病机制,了解 HBV 在体内的传播途径,并为 HBV 患者的病情诊断提供更充足的依据,为乙肝患者的治疗提供新的思路和方法。

参考文献

- [1] Torii N, Hasegawa K, Joh R, et al. Configuration and replication-competence of hepatitis B virus DNA in peripheral blood mononuclear cells from chronic hepatitis B patients and patients who have recovered from acute self-limited hepatitis[J]. *Hepatol Res*, 2003, 25(3): 234-243.
- [2] 沈薇. 乙型肝炎患者外周血单个核细胞和血清中 HBV-DNA 含量与 HBVM 间关系的探讨[J]. *医学检验与临床*, 2012, 23(1): 4-6.
- [3] Song ZW, Ma YX, Fu BQ, et al. Altered mRNA levels of MOV10, A3G, and IFN- α in patients with chronic hepatitis B[J]. *J Microbiol*, 2014, 52(6): 510-514.
- [4] Ayoobi F, Hassanshahi G, Zainodini N, et al. Reduced expression of TRIF in chronic HBV infected Iranian patients[J]. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 2013, 37(5): 491-495.
- [5] Du WJ, Zhen JH, Zeng ZQ, et al. Expression of interleukin-17 associated with disease progression and liver fibrosis with hepatitis B virus infection; IL-17 in HBV infection[J]. *Diagn Pathol*, 2013, 8(40): 1130-1142.
- [6] 马清峰, 王威, 李丽, 等. 慢性乙型肝炎患者血清和外周血单个核细胞 IL-18 水平与 HBV 感染的关系[J]. *肝脏*, 2007, 12(2): 112-

- 114.
- [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] Cai G, Nie X, Li L, et al. B and T lymphocyte attenuator is highly expressed on intrahepatic T cells during chronic HBV infection and regulates their function[J]. J Gastroenterol, 2013, 48(12): 1362-1372.
- [9] Br  chot C, Thiers V, Kremsdorf D, et al. Persistent hepatitis B virus infection in subjects without hepatitis B surface antigen: clinically significant or purely "occult"[J]. Hepatology, 2001, 34(1): 194-203.
- [10] Mulrooney-Cousins PM, Michalak TI. Persistent occult hepatitis B virus infection: experimental findings and clinical implications [J]. World J Gastroenterol, 2007, 13(43): 5682-5686.
- [11] Hu KQ. Occult hepatitis B virus infection and its clinical implications[J]. J Viral Hepat, 2002, 9(4): 243-257.
- [12] Cassini R, De Mitri MS, Gibellini D, et al. A novel stop codon mutation within the hepatitis B surface gene is detected in the liver but not in the peripheral blood mononuclear cells of HIV-infected individuals with occult HBV infection[J]. J Viral Hepat, 2013, 20(1): 42-49.
- [13] Vakili Ghartavol Z, Alavian SM, Amini S, et al. Prevalence of occult hepatitis B virus in plasma and peripheral blood mononuclear cell compartments of patients with chronic hepatitis C infection in tehran-iran[J]. Hepat Mon, 2013, 13(5): e10134.
- [14] Giles ML, Grace R, Tai A, et al. Prevention of mother-to-child transmission of hepatitis B virus (HBV) during pregnancy and the puerperium: current standards of care[J]. Aust N Z J Obstet Gynaecol, 2013, 53(3): 231-235.
- [15] Kumar A. Hepatitis B virus infection and pregnancy: a practical approach[J]. Indian J Gastroenterol, 2012, 31(2): 43-54.
- [16] Chang MH. Natural history and clinical management of chronic hepatitis B virus infection in children[J]. Hepatol Int, 2008, 2(1): 28-36.
- [17] 赵隼, 邱申熊, 杨李, 等. 阻断乙肝病病毒宫内感染失败的原因与对策[J]. 中国临床医生, 2013, 41(4): 58-60.
- [18] 冯永亮, 王素萍, 史晓红, 等. PBMc 中 HBV cccDNA 与 HBV 宫内感染关系的研究[J]. 现代预防医学, 2005, 32(3): 192-194.
- [19] Shao Q, Zhao X, Yao Li MD. Role of peripheral blood mononuclear cell transportation from mother to baby in HBV intrauterine infection[J]. Arch Gynecol Obstet, 2013, 288(6): 1257-1261.
- [20] 龚钰清, 盛国光. 替比夫定对慢性乙型肝炎患者血清和外周血单个核细胞 HBV DNA 含量及 IL-18 水平的影响[J]. 中西医结合肝病杂志, 2010, 20(5): 272-273.
- [21] 杜以真, 张纵, 徐皖苏, 等. 慢性乙型肝炎抗病毒疗效与外周血单个核细胞内乙型肝炎病毒 DNA 水平的关系[J]. 中华传染病杂志, 2011, 29(3): 158-163.
- [22] Coffin CS, Mulrooney-Cousins PM, Osiowy C, et al. Virological characteristics of occult hepatitis B virus in a North American cohort of human immunodeficiency virus type 1-positive patients on dual active anti-HBV/HIV therapy[J]. J Clin Virol, 2014, 60(4): 347-353.
- [23] Cassini R, De Mitri MS, Gibellini D, et al. A novel stop codon mutation within the hepatitis B surface gene is detected in the liver but not in the peripheral blood mononuclear cells of HIV-infected individuals with occult HBV infection[J]. J Viral Hepat, 2013, 20(1): 42-49.
- [24] 朱圣涛, 谢琴秀, 张亚飞, 等. 乙型肝炎患者外周血单个核细胞中共价闭合环状 DNA 的检测及其临床意义[J]. 中华传染病杂志, 2014, 32(4): 214-218.
- (收稿日期: 2015-05-18)

(收稿日期:2015-05-18)

• 综 述 •

结核分枝杆菌 PPE36、TB10.4 蛋白的研究进展

黄焕源¹综述,居 军^{2△}审校

(1. 兰州大学第一临床医学院, 甘肃兰州 730000; 2. 甘肃省人民医院检验科, 甘肃兰州 730000)

关键词:结核分枝杆菌; PPE36; TB10.4

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.13.048

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)13-1917-03

结核杆菌全称结核分枝杆菌(MTB),于1882年由德国细菌学家罗伯特科赫发现并证明是结核病的病原菌,其繁殖时有分支生长趋势,故得此名。因为菌体本身含有大量分支菌酸,进行细胞染色时不易着色,加温或者延长着色时间后能抵抗盐酸乙醇的脱色,因此又称为抗酸杆菌^[1-2]。这种细菌能够逃避宿主免疫系统的防御,在体内持续多年,感染后几十年被激活引起疾病^[3]。20世纪80年代以来,由于对结核病疫情控制过于乐观,结核病与人类免疫缺陷病毒合并感染和多重耐药性的发生,结核病发病率和死亡率有所增加且令人担忧。MTB感染仍然是一个威胁人类健康的主要因素,全球估计有二十亿人感染MTB。每年大约有150万人因结核病而丧生,目前唯一

可用的疫苗卡介苗 (BCG) 显然是失败的^[1], 只有极少数的界定的亚单位疫苗已被证明在暴露后的动物模型中具有显著的保护作用^[4-6]。因此需要加强活动性结核的控制措施, 尽早发现并予以治疗。现有的结核病实验室诊断方法因为检测时间长、特异度与灵敏度低、费用较高等原因, 在结核病的防治工作中会受到限制。尽管有许多已经商业化的结核病血清学检测方法, 但这些方法都不能单独使用或取代其他的检测方法^[7-8]。因此, 建立快速、灵敏、特异的检测方法对结核病的诊断和预防意义重大。而寻找特异的抗原成分是解决结核病早期、快速诊断的关键。近年来, MTB 的 PPE 蛋白家族和早期分泌靶抗原-6 (ESAT-6) 家族作为候选抗原应用于各种检测方法已有所