

# PD-1表达与慢性乙型肝炎病毒感染病理的相关性分析

韦麒<sup>1</sup>, 苏明华<sup>1</sup>, 江建宁<sup>1</sup>, 刘志红<sup>1</sup>, 马韵<sup>2</sup> (1.广西医科大学第一附属医院 感染性疾病科, 南宁 530021; 2. 广西医科大学第一附属医院 病理科, 南宁 530021)

**摘要:** 目的 研究程序性死亡因子-1 (programmed death 1, PD-1) 与慢性乙型病毒性肝炎病理的相关性, 探讨PD-1在慢性HBV感染病情进展中的作用。方法 对84例慢性乙型病毒性肝炎患者行肝组织活检, 肝组织标本经10%福尔马林液固定、石蜡包埋切片后, 以HE染色评判肝组织炎症活动度(G)和肝纤维化程度(S)。采用免疫组织化学染色SP法检测肝组织中PD-1的表达, 以红色为阳性表达区域, 每张切片在高倍镜下(400 ×)选取5个不连续视野进行图像采集, 采用Image-Pro Plus 6.0图像分析系统进行测量分析, 以积分光密度(integral optical density, IOD)值表示PD-1在肝组织中的表达水平。结果 PD-1表达强度与肝组织炎症活动度及纤维化程度均呈正相关, 相关系数分别为0.898 ( $P < 0.001$ )、0.700 ( $P < 0.001$ )。肝组织炎症活动度G<sub>0</sub>~G<sub>4</sub>级组间, PD-1的表达差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。肝组织纤维化S<sub>2</sub>期与S<sub>3</sub>期、S<sub>3</sub>期与S<sub>4</sub>期间PD-1的表达, 差异无统计学意义( $P > 0.05$ ), 其余各纤维化分期之间PD-1的表达, 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论 肝组织内的PD-1表达水平与CHB患者肝脏炎症及纤维化发生、进展呈正相关。测定PD-1的IOD值有助于辅助评判肝组织炎症活动度及肝纤维化程度, 可以作为评判肝炎病理情况的参考指标。

**关键词:** 程序性死亡因子-1; 肝炎病毒, 乙型; 免疫组织化学

## Analysis on correlationship between PD-1 expression and pathology of chronic hepatitis B virus infection

WEI Qi<sup>1</sup>, SU Ming-hua<sup>1</sup>, JIANG Jian-ning<sup>1</sup>, LIU Zhi-hong<sup>1</sup>, Ma Yun<sup>2</sup> (1. Department of Infectious Disease, The First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 2. Department of Pathology, The First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

**Abstract: Objective** To study the correlationship between the expression of programmed death 1 (PD-1) and the pathology of chronic hepatitis B, and explore the role of PD-1 in chronic HBV infection. **Methods** Liver biopsies were performed in all 84 patients with

chronic hepatitis B, the liver tissues were fixed by 10% formalin and paraffin-embedded sections were stained by HE, and the hepatic inflammatory activity grade and fibrosis stages were evaluated. Immunohistochemical SP was applied to detect the expression of PD-1 in liver tissues. The positive expression means that red staining was found in five discontinuous visual fields under high magnification (400 ×). The results were analyzed by Image Pro Plus 6.0 software. The expression intensity of PD-1 in liver tissues were measured by integral optical density (IOD) titres. **Results** The expression of PD-1 was positively correlated with hepatic inflammatory activity grade and fibrosis stage, with correlation coefficient as 0.898 ( $P < 0.001$ ) and 0.700 ( $P < 0.01$ ) respectively. There were significant differences of PD-1 expression among the hepatic inflammatory activity grades of each groups ( $P < 0.05$ ). The expression of PD-1 were significantly different among the fibrosis stages of each group ( $P < 0.05$ ), except  $S_2$  and  $S_3$ ,  $S_3$  and  $S_4$  ( $P > 0.05$ ). **Conclusions** PD-1 expression in liver tissues are positively correlated with the hepatic inflammatory activity grade and fibrosis stage. Detection of PD-1 is worthy of evaluating hepatic inflammatory activity and fibrosis stages, meanwhile, it can provide valuable reference for assessment in hepatitic pathology.

**Key words:** Programmed death 1; Hepatitis B virus; Immunohistochemistry

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染的临床转归与机体免疫状态密切相关<sup>[1-3]</sup>, 特异性T淋巴细胞的活化作为细胞免疫的重要组成部分, 在清除病毒的免疫应答过程中扮演重要角色, 当特异性T淋巴细胞出现衰竭和凋亡时, 机体免疫功能下降, 导致体内病毒不能被有效清除<sup>[5]</sup>。近期研究发现, 程序性死亡因子-1(programmed death 1, PD-1)作为抑制因子参与了T淋巴细胞的活化过程并发挥负性调控作用<sup>[7,8]</sup>, 且外周血淋巴细胞表面PD-1的表达情况与HBV慢性感染病情进展显著相关<sup>[9]</sup>, 这提示PD-1对HBV感染的慢性迁延有密切联系。为进一步探讨PD-1与慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)患者肝组织病理的关系, 本研究应用免疫组织化学SP染色法, 对肝组织中PD-1的表达进行检测, 探索PD-1在HBV慢性感染进展过程中的作用。

## 1 资料与方法

1.1 一般资料 选择2009年2月至2011年12月本院感染性疾病科临床诊断为CHB患者84例, 其中男性72例, 女性12例, 年龄17~65岁, 平均年龄(36.8 ± 10.0)岁, 疾病诊断标准依据2000年《病毒性肝

炎防治方案》<sup>[11]</sup>, 并排除其他病毒性肝炎、肝癌、酒精性肝病、药物性肝病、肝豆状核变性、HIV感染。

1.2 标本处理及病理分期 全部病例均在超声引导下经皮肝组织活检术, 吸取肝组织条长度>1.5 cm, 用10%甲醛溶液固定24小时, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明、石蜡包埋, 石蜡切片机连续切片, 切片厚度4~5 μm。进行常规HE染色后, 由两名病理科医生独立阅片, 进行组织学诊断, 按照2000年《病毒性肝炎防治方案》<sup>[11]</sup>中的组织病理学诊断标准, 根据标本组织中肝细胞的变性、坏死和炎性细胞浸润程度, 间质增生、细胞再生及纤维分隔的病理改变, 将肝组织炎症活动度(G)分为 $G_0 \sim G_4$ 级, 纤维化分期(S)分为 $S_0 \sim S_4$ 期。

1.3 主要试剂 一抗: 鼠抗人PD-1单克隆抗体; 二抗: 生物素标记山羊抗小鼠IgG; ABC显色试剂盒、免疫组织化学染色试剂盒(辣根酶标记链霉白素工作液)均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。阳性标本切片购自福州迈新生物技术开发有限公司。

1.4 方法 PD-1检测采用免疫组织化学染色SP法。使用阳性标本切片作为阳性对照, 用PBS液替换一

抗孵育已知的阳性肝组织切片作为阴性对照，ABC染色按照试剂盒说明操作。

1.5 结果判读 所有切面照片均在同一显微镜条件下拍摄，使用相同的曝光设置，每张切片在高倍镜下（400 ×）选取5个不连续视野进行图像采集，红色区域为阳性表达。采用Image-Pro Plus 6.0图像分析系统对阳性表达区域进行测量分析，进行光密度校正后转换为灰度图片，记录代表PD-1表达强度的积分光密度IOD值。

1.6 统计学处理 PD-1表达强度与肝组织炎症活动度及肝纤维化分期的相关性采用Spearman秩相关分析，对不同炎症及纤维化程度肝组织的PD-1表达强度以秩和检验法进行两两比较，所有统计采用SPSS 13.0软件进行分析， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CHB患者肝组织病理学检查结果 84例CHB的肝组织炎症活动度按G<sub>0</sub>~G<sub>4</sub>分级，纤维化程度按S<sub>0</sub>~S<sub>4</sub>分级，其分布大致符合正态分布，具体分布情况见表1。

2.2 CHB患者PD-1表达情况 84例患者中，除4例G<sub>0</sub>S<sub>0</sub>期、1例G<sub>1</sub>S<sub>0</sub>期、1例G<sub>0</sub>S<sub>1</sub>期以外，其余78例患者肝组织中均可见PD-1阳性表达细胞（PD-1表达于淋巴细胞上，染色呈红色），不同炎症及纤维化程度的肝组织中PD-1阳性表达细胞的分布较一致，主要分布在炎性细胞浸润的汇管区及坏死区，见图1~5。

随着肝脏炎症及纤维化程度的加重，PD-1阳性表达细胞的数量增多，PD-1表达强度增强，所测量

的积分光密度（IOD）值随之增高。经Spearman等级相关分析显示，IOD值与肝组织炎症活动度及纤维化程度均呈正相关，相关系数分别为0.898（ $P < 0.001$ ）和0.700（ $P < 0.001$ ）。采用秩和检验法对不同炎症及纤维化程度的IOD值进行两两比较，G<sub>0</sub>~G<sub>4</sub>期各组间比较，PD-1表达的IOD值差异均有统计学意义（ $P < 0.05$ ）；S<sub>2</sub>期与S<sub>3</sub>期、S<sub>3</sub>期与S<sub>4</sub>期之间IOD值差异无统计学意义（ $P > 0.05$ ），其余各纤维化分期之间的IOD值差异均有统计学意义（ $P < 0.05$ ），见表2。

3 讨论

HBV感染的结局与机体的免疫应答状态密切相关。当免疫机能下降，特异性T淋巴细胞受到抑制时，IFN- $\gamma$ 、IL-2等细胞因子分泌减少，细胞免疫应答随之减弱，导致HBV长期复制及持续感染，病情迁延进展。调节免疫应答的机制错综复杂，特异性效应T细胞的成熟表达除需要T细胞表面受体TCR-CD3复合体与识别抗原递呈细胞（APC）递呈的抗原肽交连产生的抗原特异性TCR信号外，还需要第二信号，即协同刺激分子的辅助调节信号，该信号决定受抗原刺激的T细胞是增殖分化为效应细胞或是进入凋亡状态<sup>[4]</sup>。从发生程序性细胞死亡的肿瘤组织中发现的PD-1即属于诱导淋巴细胞耐受的协同刺激分子。

人PD-1是一种属于CD28/CTLA-4免疫球蛋白超家族的I型跨膜蛋白<sup>[6]</sup>，主要表达于活化的CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T细胞、B细胞、单核巨噬细胞及树突细胞（DC）表面<sup>[12]</sup>。PD-1与其配体PD-L1结合后，通过

表 1 肝组织炎症活动度及纤维化程度病例分布情况

		例数（例）	百分比（%）
炎症活动度（n = 84）	G <sub>0</sub>	5	6.0
	G <sub>1</sub>	25	29.8
	G <sub>2</sub>	31	36.9
	G <sub>3</sub>	17	20.2
	G <sub>4</sub>	6	7.1
纤维化程度（n = 84）	S <sub>0</sub>	11	13.1
	S <sub>1</sub>	18	21.4
	S <sub>2</sub>	21	25.0
	S <sub>3</sub>	18	21.4
	S <sub>4</sub>	16	19.0



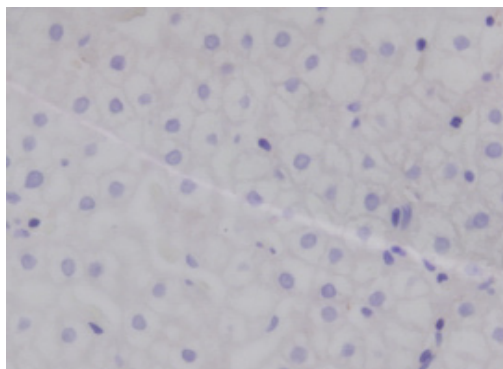


图 1 肝组织G<sub>0</sub>S<sub>1</sub>期 (SP染色, 400 ×)

注: 肝组织中基本未见PD-1阳性表达细胞

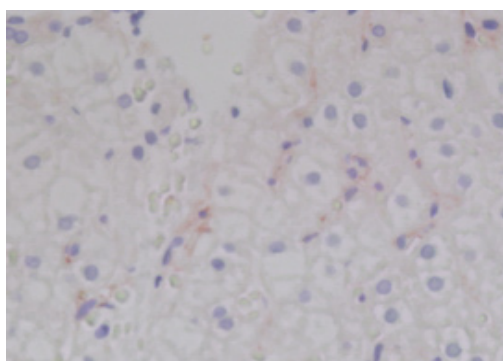


图 2 肝组织G<sub>0</sub>S<sub>0</sub>期 (SP染色, 400 ×)

注: 少量PD-1阳性表达细胞散在分布于肝脏汇管区

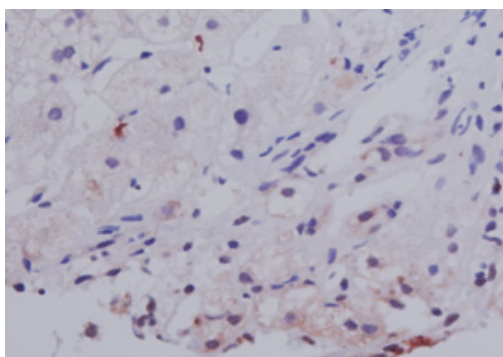


图 3 肝组织G<sub>2</sub>S<sub>2</sub>期 (SP染色, 400 ×)

注: 肝脏坏死区PD-1阳性表达细胞及炎性细胞增多

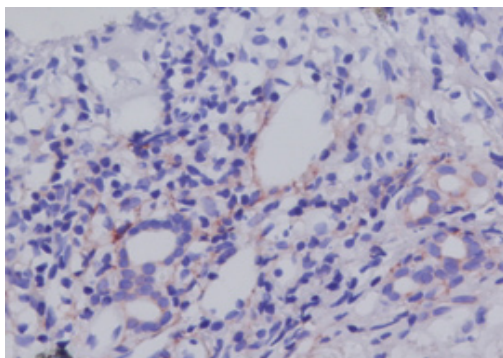


图 4 肝组织G<sub>3</sub>S<sub>3</sub>期 (SP染色, 400 ×)

注: PD-1阳性表达细胞广泛分布于肝脏汇管区内, 伴有较多淋巴细胞浸润

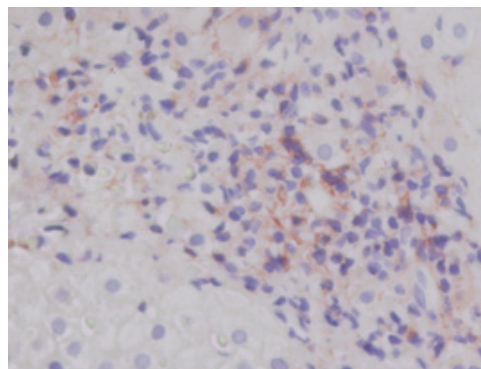


图 5 肝组织G<sub>4</sub>S<sub>4</sub>期 (SP染色, 400 ×)

注: 肝硬化小叶内可见大量PD-1阳性表达细胞及淋巴细胞浸润

磷酸化接头蛋白传递负性刺激信号, 抑制早期激活的T细胞及其抗原受体信号, 影响CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞功能, 减少Th1细胞增殖<sup>[13]</sup>, 同时干扰细胞周期, 使之停留在G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期<sup>[14]</sup>, 提高细胞凋亡敏感性, 导致其功能衰竭甚至诱导活化的T淋巴细胞发生凋亡<sup>[15]</sup>。

研究证实活动性CHB患者外周血淋巴细胞、单个核细胞和树突状细胞表面PD-1的表达均出现上调<sup>[9,10,16]</sup>, 同时肝组织内T淋巴细胞表面表达的PD-1明显高于正常肝组织<sup>[17,18]</sup>, PD-1表达的上调与肝脏炎症活动度呈显著相关, 还有研究提示高表达的PD-1与丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 水平及HBV载量呈正相关<sup>[10]</sup>, 与CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞数量呈负相关<sup>[16]</sup>。

本研究通过检测PD-1在肝组织中的表达强度, 发现当炎症活动度为G<sub>0</sub>期, 即未出现炎症活动时, 肝组织内PD-1的表达十分微弱; 当炎症活动度为G<sub>1~4</sub>期时, PD-1在肝组织内均出现不同程度的阳性表达, 随着炎症活动度的加重, PD-1的表达也更为显著。PD-1表达的IOD值与肝组织炎症活动度分期呈正相关, 且不同炎症程度分期的IOD值比较, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 与上述研究结果相一致。IOD值也与纤维化G分期呈显著正相关, 而S<sub>2</sub>期与S<sub>3</sub>期、S<sub>3</sub>期与S<sub>4</sub>期IOD值比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 可能与肝脏纤维化的复杂机制有关, 在反复持续的肝脏炎性坏死引起纤维结缔组织增生的同时, 纤维组织降解的减少以及肝组织正常结构的塌陷也起着重要作用。

当免疫介导的肝组织炎症反应趋于严重时, 肝内淋巴细胞表面的PD-1表达随之上调, T淋巴细胞

表 2 PD-1在不同炎症及纤维化程度的肝组织中表达的比较

		例数 (例)	IOD ( $\bar{x} \pm s$ )
炎症活动度 (n = 84)	G <sub>0</sub>	5	0.00
	G <sub>1</sub>	25	1.97 ± 0.84
	G <sub>2</sub>	31	4.03 ± 1.70
	G <sub>3</sub>	17	7.98 ± 1.55
	G <sub>4</sub>	6	11.71 ± 0.96
纤维化程度 (n = 84)	S <sub>0</sub>	11	0.84 ± 0.28
	S <sub>1</sub>	18	2.38 ± 0.97
	S <sub>2</sub>	21	4.64 ± 2.58 <sup>a</sup>
	S <sub>3</sub>	18	6.09 ± 2.59 <sup>b</sup>
	S <sub>4</sub>	16	7.55 ± 3.98

注：不同炎症活动度分别比较， $P$ 均 < 0.05。不同纤维化程度分别比较：<sup>a</sup>与S<sub>3</sub>比较， $P$  > 0.05；<sup>b</sup>与S<sub>3</sub>比较， $P$  > 0.05；其余各期分别比较， $P$ 均 < 0.05

免疫功能受到抑制，以避免持续活化的免疫应答导致肝脏过度受损而引发功能衰竭，但同时也使T细胞功能低下而不利于病毒的清除，导致感染的慢性持续<sup>[19]</sup>。有学者对服用替比夫定或拉米夫定抗病毒治疗的CHB患者体内PD-1表达水平进行随访，结果显示治疗后患者体内总CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞及HBV特异性CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞上的PD-1表达明显下调，发生HBeAg血清学转换患者的PD-1表达下降更为明显，同时PD-1表达的减少与HBV载量下降显著相关<sup>[20,21]</sup>，这提示通过抗病毒治疗直接抑制HBV的复制能介导PD-1表达下降，增加HBV特异性淋巴细胞的数量和功能，恢复机体正常免疫功能。在动物模型和体外研究中阻断PD-1与其配体的结合后，也发现病毒特异性T淋巴细胞再生和IFN-α、IL-2等细胞因子分泌增加，为清除病毒创造了良好的免疫应答环境<sup>[22,23]</sup>。

综上所述，PD-1在清除HBV的免疫应答和免疫介导的肝组织损伤中具有重要的平衡作用。因此，控制PD-1及其配体的表达对于治疗HBV慢性感染具有巨大的潜力和价值，可能成为CHB抗病毒治疗的免疫干预手段。

参考文献

[1] Yao S, Chen L. Reviving exhausted T lymphocytes during chronic virus infection by B7-H1 blockade[J]. Trends Mol Med,2006,12:244-246.

[2] Raziorrouh B, Schraut W, Gerlach T, et al. The immunoregulatory role of CD244 in chronic hepatitis B infection and its inhibitory potential on virus - specific CD8+ T - cell function[J]. Hepatology,2010,52:1934-1947.

[3] Das A, Hoare M, Davies N, et al. Functional skewing of the global CD8 T cell population in chronic hepatitis B virus infection[J]. J Exp Med,2008,205:2111-2124.

[4] Chambers CA, Allison JP. Co-stimulation in T cell responses[J]. Curr Opin Immunol,1997,9:396-404.

[5] Chemnitz JM, Parry RV, Nichols KE, et al. SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation[J]. J Immunol,2004,173:945-954.

[6] Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, et al. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death[J]. EMBO J,1992,11:3887-3895.

[7] Keir ME, Latchman YE, Freeman GJ, et al. Programmed death-1 (PD-1): PD-ligand 1 interactions inhibit TCR-mediated positive selection of thymocytes[J]. J Immunol,2005,175:7372-7379.

[8] Fife BT, Pauken KE, Eagar TN, et al. Interactions between PD-1 and PD-L1 promote tolerance by blocking the TCR induced stop signal[J]. Nat Immunol,2009,10:1185-1192.

[9] 谢冬英, 陈凤娟, 林炳亮, 等. PD-1 和 PD-L1 表达与慢性 HBV 感染者肝脏病变程度的相关性[J]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版),2010,4:287-292.

[10] 叶翩, 翁志宏, 张淑玲, 等. 慢性乙型肝炎患者外周血 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞表面程序性死亡受体-1 表达上调的意义[J]. 中华肝脏病杂志,2008,16:706-707.

[11] 中华医学会肝病学会, 感染病学分会. 病毒性肝炎防治方案[J]. 中华肝脏病杂志,2000,8:324-329.

[12] Agata Y, Kawasaki A, Nishimura H, et al. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes[J]. Int Immunol,1996,8:765-772.

[13] Chen L. Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity[J]. Nat Rev Immunol,2004,4:336-347.

[14] Sakuishi K, Apetoh L, Sullivan JM, et al. Targeting Tim-3

- and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity[J]. J Exp Med 2010,207:2187-2194.
- [15] Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. The B7 family revisited[J]. Annu Rev Immunol,2005,23:515-548.
- [16] Chen L, Zhang Z, Chen W, et al. B7-H1 up-regulation on myeloid dendritic cells significantly suppresses T cell immune function in patients with chronic hepatitis B[J]. J Immunol,2007,178:6634-6641.
- [17] Kassel R, Cruise MW, Iezzoni JC, et al. Chronically inflamed livers up-regulate expression of inhibitory B7 family members[J]. Hepatology,2009,50:1625-1637.
- [18] Xie Z, Chen Y, Zhao S, et al. Intrahepatic PD-1/PD-L1 up-regulation closely correlates with inflammation and virus replication in patients with chronic HBV infection[J]. Immunol Invest,2009,38:624-638.
- [19] Isogawa M, Furuichi Y, Chisari FV. Oscillating CD8<sup>+</sup> T cell effector functions after antigen recognition in the liver[J]. Immunity,2005,23:53-63.
- [20] Evans A, Riva A, Cooksley H, et al. Programmed death 1 expression during antiviral treatment of chronic hepatitis B: Impact of hepatitis B e-antigen seroconversion[J]. Hepatology,2008,48:759-769.
- [21] 谢冬英, 林炳亮, 陈凤娟,等. 慢性乙型肝炎患者抗病毒治疗过程中程序性死亡分子 1 及其配体表达的变化[J]. 中华肝脏病杂志,2010,18:646-650.
- [22] Peng G, Li S, Wu W, et al. PD-1 upregulation is associated with HBV-specific T cell dysfunction in chronic hepatitis B patients[J]. Mol Immunol,2008,45:963-970.
- [23] Fisicaro P, Valdatta C, Massari M, et al. Antiviral intrahepatic T-cell responses can be restored by blocking programmed death-1 pathway in chronic hepatitis B[J]. Gastroenterology,2010,138:682-693.e1-4.

收稿日期: 2012-12-18

## · 消息 ·

## 本刊对来稿中表格的要求

文内表格的设置应有助于简洁、明了、直观地表达结果。若表中的内容简单,仅少数几个统计数字,用简洁文字可表达清楚的,可删去表格,选用文字描述;若文字叙述冗长繁琐,而用表格表达便于理解,则建议作者选用表格。表、图、文字描述三者之间应无重复。

表格设计的基本原则是重点突出、简单明了,主谓分明、层次清楚,结构完整、有自明性。自明性即只看表,不阅读正文,即可理解统计或对比的意义。

表格一律采用三线表,即以表顶线、表头线、表底线3条横线为基本线条构架的表。每个表均应有序号和表题,居中排印在表的上方。表的序号一律用阿拉伯数字。全文只有一个表时,表序号为“表1”。表题说明表的内容,应简明扼要,突出中心。

表头由主语横标目和谓语纵标目组成,表明表格内的项目。所谓主语、谓语,是根据表格所要表达的内容划分的。被研究的事物的主要标志,或者说是分组标志,一般作为主语;而各类统计指标,一般作为谓语。主语一般安排在表的左侧,谓语一般安排在表的右侧。尽量避免主谓语倒置,影响表格的表达效果。

本刊编辑部