

慢性HBV感染免疫耐受期T淋巴细胞研究进展

涂燕云¹, 甘龙禹², 高鑫², 罗婷², 汪涛², 杨文凤² (1. 广西中医药大学附属瑞康医院 肝病科, 南宁 530001; 2. 广西中医药大学, 南宁 530001)

摘要: 在慢性HBV感染自然史中, 免疫耐受期是疾病发展的早期阶段, 对疾病的监测及治疗起决定性作用。为探索免疫耐受机制, 寻找有效的治疗方法, 以HBV为基点, 辐射至宿主的大量列队研究不断地涌出。宿主的免疫紊乱可能是免疫耐受的主要原因, T细胞参与的免疫反应在慢性HBV感染的免疫耐受期起着重要的作用。

关键词: 肝炎, 乙型, 慢性; 免疫耐受; T淋巴细胞

Developments of T lymphocytes in immune tolerance phase in patients with chronic hepatitis B virus infection

TU Yan-yun¹, GAN Long-yu², GAO Xin², LUO Ting², WANG Tao², YANG Wen-feng² (1. Department of Hepatology, Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China; 2. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China)

Abstract: In the natural history of chronic hepatitis B virus (HBV) infection, the immune tolerance (IT) phase represents the classical early phase of infection, which plays a decisive role in the monitoring and treatment. In order to explore the mechanism of IT and find effective treatment methods, a large numbers of studies have been published based on the connection between the virus and the host. The immunodeficiency of host may act as a significant mechanism of IT, that is why T cells involved in the immune response plays an important role in CHB infection of IT.

Key words: Hepatitis B, chronic; Immune tolerance; T-lymphocyte

HBV感染的不同阶段与宿主年龄密不可分。免疫耐受期是疾病发展的早期阶段, 主要认为是HBV经母婴垂直传播后, 利用新生儿不成熟的免疫系统, 建立一个低水平或缺乏特异性免疫反应的状态, 从而导致病毒持续感染^[1]。这种以儿童或青少年为人群基础, HBeAg阳性, 高水平的HBV DNA载量及无肝脏炎症的无症状疾病状态, 被定义为免疫耐受^[2]。数据显示90%的新生儿HBV感染后转为慢性, 1~5岁儿童30%转为慢性, 而仅有1%~5%的成人感染HBV后转为慢性^[3]。因此机体细胞免疫功能失调是病毒持续感染及免疫耐受的关键。处在免疫耐受期的HBV感染者, 均存在HBV感染特有的T淋巴细胞免疫反应低下的情况, 其与肝脏复杂的结构及独特的免疫调节作用有关, 本文就肝组织固有的抗原提呈细胞、调节性T淋巴细胞及抑制细胞因子对免疫耐受的作用机制进行综述。

1 肝固有免疫对T淋巴细胞的影响

肝组织内存在很多固有的抗原提呈细胞(APCs), 如肝窦内皮细胞(LSECs)、树突状细胞(DCs)、枯否细胞(KCs)、肝星状细胞(HSCs)等。肝窦内皮细胞(LSECs)是唯一的器官定居性抗原提呈细胞, 是肝非实质细胞的主要细胞群, 具有交叉呈递作用。LSECs可表达MHC-I、MHC-II、CD80、CD86、CD40等表面分子, 并通过交叉呈递外源性抗原激活初始的CD8⁺T细胞, 促使B7-H1与T细胞表面的PD-1/PD-L1受体结合, 传递抑制性信号, 从而使CD8⁺T细胞呈现出免疫耐受而非免疫应答^[4], 同时还通过Notch信号途径诱导Th1细胞IL-10的表达, 从而抑制肝脏炎症免疫反应^[5], 说明LSECs诱导的免疫耐受是一个活跃的动态的过程。枯否细胞(KCs)是肝内固有的巨噬细胞, 它不仅具有强力的吞噬作用, 还具有抗原提呈及特殊的免疫调节能力, 可释放IL-1、IL-6、IL-12和TNF- α 等促炎症细胞因子参与炎症反应^[6]; 同时也分泌前列腺素、一氧化氮、IL-10、PD-L1等抑制免疫细胞因子, 诱导T细胞的免疫耐受

及凋亡^[7]。树突状细胞(DCs)为最专业的APCs,拥有最强的抗原提呈作用,可刺激初始CD8⁺T细胞的活化及增值。DCs的作用要取决于它的成熟阶段,肝内定植的DCs主要分布在中央静脉和门静脉周围,相比淋巴组织内的DCs,肝内定植的DCs具有较低的免疫活性,呈现出“不成熟”的表型,并在肝脏内表达低水平的MHC-I和共刺激分子,如CD40、CD80、CD83、CD86等,不能刺激初始T细胞的活化,而使肝脏处于免疫耐受状态^[6,8,9]。相比健康人,慢性HBV感染者的免疫耐受期及免疫清除期阶段,DCs功能会明确受损,而IFN- λ 1作为近期发现的III型干扰素,具有诱导DCs成熟、促进共刺激分子的表达从而增强免疫能力的作用^[9]。肝星状细胞(HSCs)被激活后可转化为肌成纤维细胞样细胞,为肝纤维化效应细胞,参与肝纤维化的形成和肝内结构的重构^[10]。在非炎症情况下,HSCs表面表达低水平的主要组织相容性复合体(MHC)及共刺激分子,因此仅表现出低效的抗原提呈作用^[11];在炎症情况下,随着炎症细胞因子的增多,HSCs的表型改变,从而增加其抗原提呈作用。但在接触炎症性细胞因子(如IFN- γ)或活化的T细胞时,活化的HSCs改变为纤维表型,表达PD-L1通路,并分泌抑制性细胞因子(如IL-10、TGF- β),也表现出强大的T细胞抑制作用^[12]。

综上,LSECs和HSCs在维护局限性及系统性免疫耐受方面起重要的作用,在以肝血窦为单位的微环境中,其建立了一种障碍机制,避免了肝细胞遭受免疫介质的损害,还通过减少DCs的抗原提呈作用干扰T细胞的活化,并诱导抑制性调节T细胞和髓源性抑制细胞(MDSCs)。相比之下,HSCs缺乏明显的抗原提呈作用,而LSECs利用其抗原交叉提呈诱导免疫耐受,说明肝血窦表面是具有强力免疫调节的实体^[13]。

2 调节性免疫细胞

2.1 CD4⁺CD25⁺T淋巴细胞 CD4⁺CD25⁺T淋巴细胞起源于胸腺,具有免疫抑制性及免疫无能性。叉头螺旋转录因子(Forkhead box p3, Foxp3)是CD4⁺CD25⁺调节性T淋巴细胞的特征性分子标志,CD4⁺CD25⁺调节性T细胞相对CD4⁺CD25⁺T细胞有着更高的Foxp3表达水平^[14]。研究发现无症状的HBV携带者(AsC)和慢性乙型肝炎活动期(CAH)患者外周血的CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性T细胞数量及Foxp3 mRNA水平显著高于健康人及乙型肝炎病毒清除的患者,同时与HBeAg、HBeAb及HBV DNA水平也均存在一定的联系^[15,16];Aalaei-Andabili等^[14]对调节性T细胞的系统回顾及Meta分析得出的结果一致。慢性乙型肝炎患者体内CD4⁺CD25⁺调节性T细胞水平显著高于健康人,当HBV DNA > 10⁷拷贝/ml,CD4⁺CD25⁺调节性T细

胞水平升高的程度更加明显。当调节性T细胞受损害后,CD8⁺T细胞活性显著增长,且 α 干扰素治疗的无应答状态伴随着更高水平的调节性T细胞,减少调节性T细胞可激起抗病毒治疗反应。此外,调节性T细胞的升高还增加了肝癌发生的风险。调节性T细胞影响HBV感染者的每个阶段,其可导致病毒感染的进展及影响免疫反应,决定疾病的预后,因此在HBV感染的免疫治疗中,调节性T细胞是靶向治疗剂。Shrivastava等^[17]研究发现HBsAg阳性、阴性及正常的新生儿外周血及脐带血中的CD4⁺T淋巴细胞及CD8⁺T淋巴细胞的频率无显著差异,但HBsAg阳性的新生儿Foxp3表达的调节性T细胞显著增加,且CD8⁺T淋巴细胞存在明显的功能缺陷,表现为IFN- γ 分泌的减少及CD107A的低表达,这些CD8⁺T淋巴细胞缺陷可能是胚胎期HBV抗原早期持久性子宫内暴露导致HBsAg阳性新生儿免疫耐受的一种结果,其可能与调节性T细胞的扩张及TCR-zeta链的下降表达相关。

转化生长因子- β (TGF- β)可促进CD4⁺CD25⁺T淋巴细胞转换为CD4⁺CD25⁺T淋巴细胞,起到抑制T淋巴细胞增值的作用。Yang等^[16]研究发现TGF- β 在慢性HBV携带者(AsC)及慢性活动性肝炎患者(CAH)血清水平中均有不同程度的增高,其中以CAH患者较为明显,并且与CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性T细胞数量及CD4⁺CD25⁺T细胞上Foxp3的mRNA表达频率显著相关。由此推断AsC和CAH的病毒清除异常及免疫耐受机制可能的部分原因为TGF- β 增高介导Foxp3表达及CD4⁺CD25⁺调节性T细胞上调,但这种情况也无法排除HBV DNA编码的病毒性抗原诱导Foxp3高表达的可能。正因为CD4⁺CD25⁺T细胞对HBV特异性T淋巴细胞有一定的抑制作用,其一直被认为是免疫耐受的部分原因^[18]。

2.2 髓源性抑制细胞(MDSCs) MDSCs是一群来自骨髓的异质性细胞,具有免疫抑制的作用,在病理状态如肿瘤、感染、外伤、自身免疫性疾病等情况下会大量增殖,并在免疫应答中起负向调控作用。Kong等^[19]在携带HBV小鼠模型研究中发现,CD8⁺T淋巴细胞除了增加HBV诱导的体液反应外,还增加了 $\gamma\delta$ T淋巴细胞,随着CD8⁺T淋巴细胞的减少,HBV感染的持续性亦逐渐恢复,因此CD8⁺T淋巴细胞在打破HBV持续感染方面起决定性的作用;其还发现在无IL-17及 $\gamma\delta$ T淋巴细胞的情况下,减少MDSCs的浸润会导致CD8⁺T淋巴细胞的增加及加快HBV的清除,故而 $\gamma\delta$ T淋巴细胞通过分泌IL-17招募肝脏MDSCs的聚集浸润,间接促进CD8⁺T淋巴细胞功能障碍程度,从而维持嗜肝性病毒诱导肝脏耐受。

2.3 低相对分子质量蛋白酶体(LMP) LMP能够水解

抗原成为适合的肽段,经转运后与MHC-I类分子连接,表达于细胞表面,被CD8⁺ T细胞识别,对于机体免疫应答有极其重要的作用。LMP基因多态性与一些免疫相关性疾病的发生有着密切关联,LMP2能够将内源性抗原分解,降解为抗原肽;TAP1转运至内质网腔与新合成的HLA-I类分子抗原肽结合槽结合,并经高尔基体表达于细胞表面,由CD8⁺ T淋巴细胞识别,并被CTL杀死,因此LMP2和TAP1在清除HBV的细胞免疫中占重要地位。研究者发现相对免疫清除期及正常人而言,在免疫耐受期患者体内LMP2和TAP1均为低表达,可能与T淋巴细胞低反应有关系,高水平的INF- γ 和TNF- α 不足以清除病毒,反而进一步造成肝损害^[20]。LMP7基因Codon145位点多态性在无症状HBV携带者和正常人群之间、进展性肝炎患者和正常人群之间的频率分布差异均有统计学意义,提示LMP7可能是无症状HBV携带和进展性肝炎的易感基因^[21]。

3 细胞因子及细胞分子

3.1 转化生长因子- β (TGF- β) 及白细胞介素-10 (IL-10) TGF- β 是具有多重生物活性的细胞因子,它在监管免疫反应及维持免疫平衡中起重要作用。TGF- β 可促进CD4⁺ T淋巴细胞转换为CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T淋巴细胞,起到增殖调节性T淋巴细胞的作用,还能抑制INF- γ 及IL-12等细胞因子的分泌,下调Toll样受体的表达来抑制DCs的免疫活性^[16,22]。因此使用TGF- β 1诱导的Foxp3⁺ T细胞的免疫疗法是用来治疗自身免疫性疾病的一大热点^[23]。IL-10是一种多功能负性调节因子,KCs、LSECs、DCs及CD4⁺CD25⁺ T细胞均能分泌IL-10来诱导免疫耐受。IL-10能下调MHC-II、CD80、CD86等分子的表达,从而抑制CD4⁺ T细胞的活化^[24],还能诱导PD-L1的表达来监控炎症反应,促使调节性T细胞及APCs调节免疫耐受,避免免疫炎症反应造成的肝损害^[25]。

3.2 肿瘤坏死因子- α 诱导蛋白-8样分子2 (TIPE2) TIPE2是一种近期发现的蛋白分子,TIPE2通过负向调节天然免疫及固有免疫来维持体内免疫平衡^[26]。Zhang等^[27]发现慢性乙型肝炎组TIPE2蛋白表达的CD8⁺ T细胞较正常对照组有更低的表达水平,而CD4⁺ T细胞频率无明显差别。CHB外周血单核细胞TIPE2蛋白水平也明显下调,其程度与ALT、AST及HBV DNA值成负相关。由此可见TIPE2主要是抑制CD8⁺ T细胞而不是CD4⁺ T细胞,CD8⁺ T细胞的低TIPE2水平进一步刺激穿孔素、颗粒酶及 γ 干扰素的高水平表达,导致细胞毒性活性上调。其还发现HBc₁₈₋₂₇多肽刺激能减少外周血单核细胞中TIPE2的表达,同时也增加了细胞溶解的活性。TIPE2通过负向细胞免疫来维持体内免疫平衡,在乙型肝炎发病机制中有着重要的作用。

4 小结及展望

HBV感染免疫耐受期的患者,因缺乏管理,他们成为HBV传染的高危因素。当HBV感染转为慢性,辅助性及细胞毒性T细胞的缺陷即凸显出来,并很有可能被高水平的病毒抗原、肝脏的特异性免疫功能、调节性T细胞及树突细胞缺陷等因素的共同作用维持着^[28]。慢性HBV感染者的免疫耐受是一种肝脏免疫介导的疾病状态,却以临床方式、病毒学及无肝脏损害来定义,因此遭到一些学者的质疑^[29,30]。Kennedy等^[30]收集了不同年龄组免疫耐受型HBV感染者的T细胞,并通过流动细胞计数测量效应及炎症细胞因子发现儿童及青少年组的T细胞具有更强的HBV特异性T细胞的能力来增殖及产生细胞因子,这种状态不应被称为免疫耐受。

正是由于免疫耐受机制的多元化因素,HBV特异性免疫反应的多链、多方位的发生发展,未来对于抑制及清除HBV的平衡在不断地向免疫治疗方面发展。比如外周血INF- γ 的水平可反映细胞免疫水平,免疫耐受期中的低细胞免疫与IL-12低水平及其直接或间接刺激自然杀伤细胞和细胞毒性T细胞分泌INF- γ 减少有关,在HBV携带者的外周单核细胞培养物中添加IL-12和特有的HBV抗原(HBsAg或HBcAg)可恢复HBV特有的细胞免疫反应,说明IL-12配合HBV特异性抗原可促进慢性HBV感染者的抗原特异性T细胞的激活,为未来的基因疫苗预防及治疗HBV寻找出路^[31]。IL-22主要由活化的Th1细胞、Th17细胞和NK细胞分泌,有促进抗菌性、促炎性及组织重构等作用。研究^[32]发现IL-22可以增强细胞毒性T细胞IL-17水平的表达,从而打破HBsAg转基因小鼠的免疫耐受,因此在HBsAg DNA疫苗接种治疗过程中,IL-22可能用作一种佐剂来增强细胞免疫。浆细胞样树突状细胞(pDCs)通过呈递、加工病毒抗原来诱导适应性免疫,利用pDCs为基础的免疫治疗有可能恢复HBV特异性细胞免疫反应,从而达到加速清除病毒的效果^[33]。Toll样受体(TLRs)配体能通过与其相应TLRs结合而激活免疫细胞,调节适应性免疫反应的强度。在模拟人类慢性HBV感染状态的转基因小鼠中,使用含有TLR7/8受体激动剂的HBV抗原疫苗能打破机体特异性免疫耐受状态,促进抗原特异性免疫应答的产生^[34]。打破HBV感染者T淋巴细胞中CD4⁺ T淋巴细胞质变及CD8⁺ T淋巴细胞质变与量变的局面,消弱调节性T细胞的负向调控作用,阻断免疫耐受期肝内cccDNA的复制,激起自身的体液及细胞免疫,同时给予肝细胞足够的保护,避免或减轻免疫反应引起的肝细胞炎症,在切断传播途径的同时,把HBV感染抑制在疾病发展的源头,为清除病毒、极大地降低肝硬化及肝癌的风险奠定基础。

参考文献

- [1] Prendergast AJ, Klenerman P, Goulder PJ. The impact of differential antiviral immunity in children and adults[J]. *Nat Rev Immunol*,2012,12:636-648.
- [2] Hui CK, Leung N, Yuen ST, et al. Natural history and disease progression in Chinese chronic hepatitis B patients in immune-tolerant phase[J]. *Hepatology*,2007,46:395-401.
- [3] Yim HJ, Lok AS. Natural history of chronic hepatitis B virus infection: what we knew in 1981 and what we know in 2005[J]. *Hepatology*,2006,43:173-181.
- [4] Diehl L, Schurich A, Grochtmann R, et al. Tolerogenic maturation of liver sinusoidal endothelial cells promotes B7-homolog 1-dependent CD8⁺ T cell tolerance [J]. *Hepatology*,2008,47:297-305.
- [5] Neumann K, Rudolph C, Neumann C, et al. Liver sinusoidal endothelial cells induce immunosuppressive IL-10-producing Th1 cells via the Notch pathway[J]. *J Immunol*,2015,45:2008-2016.
- [6] Tiegs G, Lohse WA. Immune tolerance: What is unique about the liver[J]. *J Autoimmun*,2010,34:1-6.
- [7] You Q, Cheng L, Kedl RM, et al. Mechanism of T cell tolerance induction by murine hepatic Kupffer cells[J]. *Hepatology*,2008,48:978-990.
- [8] Pillarisetty VG, Shah AB, Miller G, et al. Liver dendritic cells are less immunogenic than spleen dendritic cells because of differences in subtype composition[J]. *J Immunol*,2004,172:1009-1017.
- [9] Sun H, Bi L, Zhou J, et al. Modulation of the function of dendritic cells in adolescents with chronic HBV infection by IFN- λ 1[J]. *Int J Clin Exp Pathol*,2015,8:1743-1751.
- [10] Mederacke I, Hsu CC, Troeger JS, et al. Fate tracing reveals hepatic stellate cells as dominant contributors to liver fibrosis independent of its aetiology[J]. *Nat Commun*,2013,4:2823.
- [11] Ichikawa S, Mucida D, Tyznik AJ, et al. Hepatic stellate cells function as regulatory bystanders[J]. *J Immunol*,2011,186:5549-5555.
- [12] Bomble M, Tacke F, Rink L, et al. Analysis of antigen-presenting functionality of cultured rat hepatic stellate cells and transdifferentiated myofibroblasts[J]. *Bioc Biop R*,2010,396:342-347.
- [13] Schildberg FA, Sharpe AH, Turley SJ. Hepatic immune regulation by stromal cells[J]. *Curr Op Im*,2015,32:1-6.
- [14] Aalaei-Andabili SH, Alavian SM. Regulatory T cells are the most important determinant factor of hepatitis B infection prognosis: A systematic review and meta-analysis[J]. *Vaccine*,2012,30:5595-5602.
- [15] Stoop JN, van der Molen RG, Baan CC, et al. Regulatory T cells contribute to the impaired immune response in patients with chronic hepatitis B virus infection[J]. *Hepatology*,2005,41:771-778.
- [16] Yang G, Liu A, Guo TB, et al. Association of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells with chronic activity and viral clearance in patients with hepatitis B[J]. *Int Immunol*,2006,2:133-140.
- [17] Shrivastava S, TrehanPati N, Patra S, et al. Increased regulatory T cells and impaired functions of circulating CD8 T lymphocytes is associated with viral persistence in Hepatitis B virus-positive newborns[J]. *J Viral Hep*,2013,20:582-591.
- [18] Franzese O, Kennedy PT, Gehring AJ, et al. Modulation of the CD8⁺T cell response by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in patients with hepatitis B virus infection[J]. *J Viro*,2005,79:3322-3328.
- [19] Kong X, Sun R, Chen Y, et al. $\gamma\delta$ T cells drive myeloid-derived suppressor cell-mediated CD8⁺ T cell exhaustion in hepatitis B virus-induced immunotolerance[J]. *J Immunol*,2014,193:1645-1653.
- [20] Sukriti S, Pati NT, Bose S, et al. Impaired antigen processing and presentation machinery is associated with immunotolerant state in chronic hepatitis B virus infection[J]. *J Clin Immunol*,2010,30:419-425.
- [21] 施超, 刘黎, 钱燕华, 等. LMP2/LMP7基因多态性与乙型肝炎病毒感染结局的关系[J]. *世界华人消化杂志*,2010,18:1664-1668.
- [22] Lüth S, Huber S, Schramm C, et al. Ectopic expression of neural autoantigen in mouse liver suppresses experimental autoimmune neuroinflammation by inducing antigen-specific Tregs[J]. *J Clin Invest*,2008,118:3403-3410.
- [23] Hadaschik EN, Enk AH. TGF- β 1-induced regulatory T cells[J]. *Human Immun*,2015,76:561-564.
- [24] Knolle PA, Germann T, Treichel U, et al. Endotoxin down-regulates T cell activation by antigen-presenting liver sinusoidal endothelial cells[J]. *J Immunol*,1999,162:1401-1407.
- [25] Sharpe AH, Wherry EJ, Ahmed R, et al. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection[J]. *Nat Immunol*,2007,8:239-245.
- [26] Freundt EC, Bidere N, Lenardo MJ. A different TIPE of immune homeostasis[J]. *Cell*,2008,133:401-402.
- [27] Zhang W, Zhang J, Zhao L, et al. TIPE2 protein negatively regulates HBV-specific CD8⁺T lymphocyte functions in humans[J]. *Mol Immunol*,2015,64:204-209.
- [28] Bertoletti A, Gehring A. Immune response and tolerance during chronic hepatitis B virus infection[J]. *Hepatol Res*,2007,37:331-338.
- [29] Bertoletti A, Kennedy PT. The immune tolerant phase of chronic HBV infection: new perspectives on an old concept[J]. *Cell Mol Immunol*,2014,1-6.
- [30] Kennedy PT, Sandalova E, Jo J, et al. Preserved T-cell function in children and young adults with immune-tolerant chronic hepatitis B[J]. *Gastroent*,2012,143:637-645.
- [31] Xiong SQ, Lin BL, Gao X, et al. IL-12 promotes HBV-specific central memory CD8⁺ T cell responses by PBMCs from chronic hepatitis B virus carriers[J]. *Int Immuno*,2007,7:578-587.
- [32] Wu B, Zou Q, Hu Y, et al. Interleukin-22 as a molecular adjuvant facilitates IL-17-producing CD8⁺T cell responses against a HBV DNA vaccine in mice[J]. *Hum Vacc Immunother*,2013,9:2133-2141.
- [33] Martinet J, Leroy V, Dufeu-Duchesne T, et al. Plasmacytoid dendritic cells induce efficient stimulation of antiviral immunity in the context of chronic hepatitis B virus infection[J]. *Hepatology*,2012,5:1706-1718.
- [34] Wang Y, Chen K, Wu Z. Immunizations with hepatitis B viral antigens and a TLR7/8 agonist adjuvant induce antigen-specific immune responses in HBV-transgenic mice[J]. *Int J Infect Dis*,2014,29:31-36.

收稿日期: 2015-01-25