

· 病毒性肝炎 ·

qAnti-HBc 与慢性乙型肝炎儿童抗病毒疗效的相关性分析及可能免疫机制探索

周英芝¹ 常宇南¹ 何怡¹ 王慧敏¹ 彭小蓉¹ 陈敏² 彭明利² 胡鹏² 任红²
许红梅¹

¹重庆医科大学附属儿童医院感染科 国家儿童健康与疾病临床医学研究中心 儿童发育疾病研究教育部重点实验室 儿童感染免疫重庆市重点实验室 400014; ²重庆医科大学附属第二医院感染科 教育部感染性疾病分子生物学重点实验室 重庆医科大学病毒性肝炎研究所 400010

通信作者: 许红梅, Email: xuhongm0095@sina.com

【摘要】 目的 比较行抗病毒治疗的 HBeAg 阳性慢性乙型肝炎 (CHB) 患儿无应答组和应答组间基线乙型肝炎核心抗体定量 (qAnti-HBc) 水平的差异, 以探讨不同 qAnti-HBc 水平患儿外周血 CD8⁺ 记忆 T 细胞亚群比例及其功能活性。**方法** 回顾性检测 2018 年 6 月至 2020 年 12 月于重庆医科大学附属儿童医院感染科就诊的 85 例 HBeAg 阳性 CHB 患儿基线 qAnti-HBc 水平。分析其中 37 例抗病毒治疗患儿基线 qAnti-HBc 水平与 HBeAg 血清学应答的关系。流式细胞检测 59 例患儿基线外周血 CD8⁺ 记忆 T 细胞亚群比例及干扰素 (IFN)- γ 、肿瘤坏死因子 (TNF)- α 分泌水平, 分析 qAnti-HBc 水平与 CD8⁺ 记忆 T 细胞亚群比例及其功能活性间的关系。计数资料比较采用 Pearson's Chi-square 检验, 两组或多组间计量资料比较采用 Mann-Whitney U 检验或 Kruskal-Wallis 检验, 连续性变量间的相关性采用 Spearman 秩相关分析。**结果** 在 37 例接受恩替卡韦 (ETV, 21/37) 或聚乙二醇干扰素 (Peg-IFN, 16/37) 治疗的患儿中, 有 18 例发生 HBeAg 血清学转换 (ETV 组 10/21, Peg-IFN 组 8/16), 应答组患儿基线 qAnti-HBc 水平 [4.71 (4.64 ~ 4.81) log₁₀IU/ml] 显著高于无应答组 [4.54 (4.45 ~ 4.64) log₁₀IU/ml, $Z = -3.316$, $P = 0.001$]。高 qAnti-HBc 组 CD8⁺Tem、CD38⁺CD8⁺Tem、CD38⁺CD8⁺Temra 细胞比例及 CD8⁺T 细胞分泌的 IFN- γ 、TNF- α 水平显著高于低 qAnti-HBc 组 ($P < 0.05$)。ALT > 1 × 正常值上限 (ULN) 组 CD8⁺Tem、CD38⁺CD8⁺Tem、CD38⁺CD8⁺Temra 细胞比例显著高于 ALT ≤ 1 × ULN 组 ($P < 0.05$), 但两组 CD8⁺T 细胞分泌的 IFN- γ 、TNF- α 水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。Spearman 相关分析显示, qAnti-HBc 与 CD8⁺Tem、CD38⁺CD8⁺Tem、CD38⁺CD8⁺Temra 细胞比例及 CD8⁺T 细胞分泌的 IFN- γ 水平呈正相关 ($P < 0.05$)。ALT 仅与 CD38⁺CD8⁺Tem、CD38⁺CD8⁺Temra 细胞比例呈正相关 ($P < 0.05$)。**结论** 较高的基线 qAnti-HBc 水平与 CHB 儿童患者抗病毒治疗 HBeAg 血清学应答相关; qAnti-HBc 较高的 CHB 患儿外周血效应 CD8⁺T 细胞表现出更强的表型及功能活化特点, 此研究可能对 CHB 儿童抗病毒治疗疗效相关的潜在免疫机制作出一定阐释。

【关键词】 慢性乙型肝炎; 乙型肝炎核心抗体定量; CD8 阳性 T 细胞; 儿童

基金项目: 十三五国家科技项目重大专项 (2017ZX10202203007008)

DOI: 10.3760/cma.j.cn501113-20210804-00376

Correlation of qAnti-HBc with antiviral efficacy in children with chronic hepatitis B and exploration of its possible immune mechanism Zhou Yingzhi¹, Chang Yunan¹, He Yi¹, Wang Huimin¹, Peng Xiaorong¹, Chen Min², Peng Mingli², Hu Peng², Ren Hong², Xu Hongmei¹

¹Department of Infectious Diseases, Children's Hospital of Chongqing Medical University, National Clinical Research Center for Child Health and Disorders, Ministry of Education Key Laboratory of Child Development



and Disorders, Chongqing Key Laboratory of Child Infection and Immunity, Chongqing 400014, China;

²Department of Infectious Diseases, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Key Laboratory of Molecular Biology for Infectious Diseases (Ministry of Education), Institute for Viral Hepatitis, Chongqing 400010, China

Corresponding author: Xu Hongmei, Email: xuhongm0095@sina.com

【Abstract】 Objective To compare the baseline difference in the quantitative hepatitis B core antibody levels (qAnti-HBc) between non-response and response group in children with HBeAg-positive chronic hepatitis B (CHB) who received antiviral therapy, and further explore the proportion and functional activity of CD8⁺ memory T lymphocyte subsets with different qAnti-HBc levels in peripheral blood of children. **Methods** The baseline anti-HBc quantification (qAnti-HBc) levels of 85 children with HBeAg-positive CHB who visited the Department of Infectious Diseases, Children's Hospital of Chongqing Medical University from June 2018 to December 2020 were detected retrospectively. The relationship between the baseline qAnti-HBc level and HBeAg serological response in 37 children who received antiviral therapy was analyzed. The proportion of CD8⁺ memory T lymphocyte subsets and the secretion levels of interferon (IFN) γ , and tumor necrosis factor (TNF) α in peripheral blood of 59 children at baseline were detected by flow cytometry. The relationship between qAnti-HBc level and the proportion and functional activity of CD8⁺ memory T lymphocyte subsets was analyzed. Pearson's Chi-square test was used to compare the count data. Mann-Whitney U test or Kruskal-Wallis test was used to compare measurement data between two or more groups, and Spearman's rank correlation analysis was used for the correlation between continuous variables. **Results** Among 37 children who received entecavir (ETV, 21/37 cases) or pegylated interferon (Peg-IFN, 16/37 cases), 18 cases had developed HBeAg seroconversion (10/ 21 cases in the ETV group, 8/16 cases in the Peg-IFN group). The baseline qAnti-HBc level was significantly higher in the response group [4.71 (4.64 ~ 4.81) log₁₀IU/ml] than the non-response group children [4.54 (4.45 ~ 4.64) log₁₀IU/ml, $Z = -3.316$, $P = 0.001$]. The proportion of CD8⁺ Tem, CD38⁺CD8⁺ Tem, CD38⁺CD8⁺ Temra cells and the levels of IFN γ and TNF α secreted by CD8⁺ T lymphocytes were significantly higher in the high-qAnti-HBc group than the low-qAnti-HBc group ($P < 0.05$). The proportion of CD8⁺ Tem, CD38⁺CD8⁺ Tem and CD38⁺CD8⁺ Temra cells was significantly higher in ALT $> 1 \times$ upper limit of normal value (ULN) group than ALT $\leq 1 \times$ ULN group ($P < 0.05$). However, there were no significant differences in the levels of IFN γ and TNF α secreted by CD8⁺ T lymphocytes between the two groups ($P > 0.05$). Spearman's correlation analysis showed that qAnti-HBc was positively correlated with the proportion of CD8⁺ Tem, CD38⁺CD8⁺ Tem, CD38⁺CD8⁺ Temra cells and the level of IFN γ secreted by CD8⁺ T lymphocytes ($P < 0.05$). Additionally, ALT was only positively correlated with the proportion of CD38⁺CD8⁺ TEM and CD38⁺CD8⁺ Temra cells ($P < 0.05$). **Conclusion** Raised baseline qAnti-HBc level is related to the HBeAg serological response to antiviral therapy in children with CHB. Peripheral blood effector CD8⁺ T lymphocytes of CHB children with higher qAnti-HBc show stronger phenotype and functional activation characteristics, which may shed some light on the underlying immune mechanism related to antiviral therapy efficacy in children with CHB.

【Key words】 Chronic hepatitis B; Quantitative hepatitis B core antibody; CD8 positive T lymphocytes; Children

Fund program: National Science and Technology Key Project (2017ZX10202203007008)

DOI: 10.3760/cma.j.cn501113-20210804-00376

据世界卫生组织 2017 年统计, 全球约有 2.57 亿慢性乙型肝炎 (chronic hepatitis B, CHB) 患者, 每年约 887 000 人死于 HBV 感染所致的肝硬化和肝细胞癌^[1]。尽管乙型肝炎疫苗已在全球大范围应用, 每年仍有 180 万儿童新发感染 HBV^[2]。持续的 HBV 抑制能降低终末期肝病发生的风险^[3], 干扰素 (interferon, IFN) 或核苷 (酸) 类抗病毒药物发生 e 抗原转换的有效率现仅为 21% ~ 25%、31% ~ 36%^[4], 故寻找可预测疗效的生物学指标,

对实现 CHB 治疗方案的优化甚为重要。

既往研究显示, 基线 HBV DNA、丙氨酸转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT) 及治疗早期 HBV DNA、HBsAg 和 HBeAg 水平可作为 IFN 或核苷 (酸) 类药物治疗效果的预测指标^[5-8]。在 HBV 感染者中, ALT 被认为是宿主抗 HBV 免疫力的间接替代指标, 但其本质上反映的是肝细胞的损伤, 易受其他因素影响。另外, 上述预测指标中的 HBV DNA、HBsAg 和 HBeAg 为病毒相关指标,

在临床常用,但均有一定的局限性。最近的研究显示乙型肝炎核心抗体定量(quantitative hepatitis B core antibody, qAnti-HBc)水平对CHB成人患者肝脏炎症程度和HBeAg血清学转换具有预测价值,并提示其可能作为反映CHB患者抗HBV免疫应答水平的新指标^[9-16];然而其在儿童患者中的应用价值及其免疫调控机制尚不清楚。

CD8⁺T细胞作为特异性免疫的重要效应细胞,可在一定程度上反映CHB患者的免疫状态,故本研究拟比较抗HBV治疗患儿无应答组和应答组间基线qAnti-HBc水平,进一步探讨不同qAnti-HBc水平患儿外周血CD8⁺记忆T细胞亚群比例及功能活性的差异,以了解基线qAnti-HBc水平与CHB患儿疗效的相关性,探索qAnti-HBc在预测疗效中的潜在免疫机制,为CHB儿童抗病毒治疗的疗效预测及治疗方案的优化奠定基础。

资料与方法

1. 研究对象:选取2018年6月至2020年12月于重庆医科大学附属儿童医院就诊的CHB患儿。纳入标准:(1)年龄<16岁;(2)HBsAg阳性超过6个月;(3)HBeAg阳性;(4)纳入时尚未接受抗病毒治疗。排除标准:(1)合并获得性免疫缺陷综合征或其他病毒性肝炎(甲、丙、丁、戊型肝炎等);(2)患有自身免疫或代谢性肝病;(3)患有失代偿性肝硬化、肝癌或其他恶性肿瘤;(4)6个月内接受过免疫抑制药物治疗。本研究共纳入85例CHB患儿。本研究遵循医学伦理标准并获得重庆医科大学附属儿童医院伦理委员会批准[审批号[2019]40号],标本采集获得患儿家长(监护人)书面知情同意。

2. 实验材料:CD3-PerCP-Cy5.5、CD8-APC、CD8-FITC、CD27-PE、CD45RA-BV421、IFN- γ -BV421等流式抗体购自美国BD Biosciences公司,CD38-PE-Cy7、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF) α -PE-Cy7等流式抗体、佛波酯/离子霉素混合物(250 $\times$)、细胞固定破膜液购自美国Biolegend公司,蛋白转运抑制剂莫能霉素溶液(1 000 $\times$)购自美国eBioscience公司;胎牛血清购自美国Gibco公司,qAnti-HBc检测试剂盒购自中国万泰公司。红细胞裂解液、磷酸盐缓冲液(PBS)均为本儿童发育疾病研究教育部重点实验室自配。

3. 肝功能及HBV病毒学检测:使用自动生物化学分析仪Beckman LX-20(购自美国

Beckman公司)检测ALT、天冬氨酸转氨酶(aspartate transaminase, AST)及 γ -谷氨酰转氨酶(γ -glutamyl transpeptidase, GGT)等生化指标水平。使用实时荧光定量聚合酶链反应(中国圣湘生物科技有限公司)测量血清HBV DNA水平,最低检测限为400 IU/ml。用化学发光微粒免疫分析试剂盒(购自德国雅培公司)检测血清HBsAg和HBeAg水平,HBsAg $\geq$ 0.05 IU/ml、HBeAg $\geq$ 1 S/CO定义为阳性。

4. 流式细胞术检测细胞表型及功能:在85例患儿中,59例在基线时完成流式细胞检测。

(1)细胞表型检测:采集患儿的空腹外周静脉血2 ml,混匀后取200 μ l全血于EP管中,裂解红细胞并经PBS洗涤后加入CD3、CD8、CD27、CD45RA、CD38等流式抗体4 $^{\circ}$ C避光染色30 min;经PBS清洗后加入200 μ l PBS重悬转入流式管,用CytoFLEX流式细胞仪进行检测,用FlowJo软件(V10)进行数据分析。

(2)细胞功能检测:取250 μ l肝素抗凝全血加入至96孔细胞培养板,同时加1 μ l佛波酯/离子霉素混合物,置于37 $^{\circ}$ C孵箱刺激1 h后向培养孔中加入0.25 μ l莫能霉素溶液,4 h后刺激完毕。裂解红细胞并经PBS洗涤后加入CD3、CD8等流式抗体4 $^{\circ}$ C避光染色30 min;经PBS清洗后加入固定剂避光孵育20 min,经破膜液洗涤2次后加入IFN- γ 、TNF- α 等流式抗体室温避光染色1 h;再经破膜液洗涤2次后加入200 μ l PBS重悬转入流式管,用CytoFLEX流式细胞仪进行检测,用FlowJo软件(V10)进行数据分析。

5. qAnti-HBc检测:采集患儿基线及随访12、24、52周空腹静脉血2 ml,室温静置30 min,450 $\times g$ 离心10 min,用移液枪取上层血清至EP管,编号记录并保存于-80 $^{\circ}$ C低温冰箱。检测前冰上冻融血清,涡旋混匀并分装200 μ l血清于新的EP管,室温复温等待上机检测。使用双抗原夹心法(中国万泰公司)进行qAnti-HBc检测。

6. 统计学方法:连续性数据及其变化范围以中位数和四分位数表示[M(P25~P75)],使用SPSS v.27.0软件进行统计学分析;计数资料比较采用Pearson's Chi-square检验,两组或多组间计量资料比较采用Mann-Whitney U检验或Kruskal-Wallis检验比较,连续性变量间的相关性采用Spearman秩相关分析。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

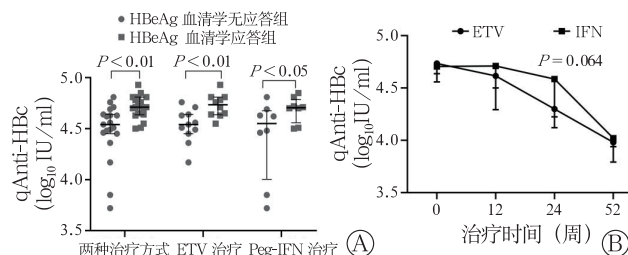


结 果

1. CHB 患儿基本信息：85 例患儿中，男孩 43 例 (43/85, 50.6%)，年龄为 6.65 (0.75 ~ 15.42) 岁；均行基线 qAnti-HBc 检测，其中 59 例同时行流式细胞检测；目前 37 例患儿达到抗病毒指征行抗 HBV 治疗并完成了至少 52 周随访，根据治疗 52 周是否发生 HBeAg 血清学转换将患儿分为应答组和无应答组，且检测了基线与治疗 12、24、52 周等时间点的 qAnti-HBc 水平。

2. 抗病毒治疗 CHB 患儿无应答组和应答组间基线 qAnti-HBc 比较：37 例患儿行抗病毒治疗且定期随访至 52 周。其中恩替卡韦组 (ETV) 21 例、聚乙二醇干扰素组 (Peg-IFN) 16 例；治疗至 52 周有 18 例患儿发生 HBeAg 血清学转换 (ETV 组 10 例，Peg-IFN 组 8 例)。比较两组间基线 qAnti-HBc 水平显示：抗病毒 (ETV 或 Peg-IFN) 应答组基线 qAnti-HBc 水平 [4.71 (4.64 ~ 4.81) $\log_{10}$ IU/ml] 显著高于无应答组 [4.54 (4.45 ~ 4.64) $\log_{10}$ IU/ml, $Z = -3.316$, $P = 0.001$ ；图 1A]；进一步横向比较 ETV 治疗应答组和 Peg-IFN 治疗应答组同时间点 qAnti-HBc 水平，发现两组在基线及治疗 52 周 qAnti-HBc 水平均无明显差异，虽治疗 24 周 Peg-IFN 治疗应答组 qAnti-HBc 水平高于 ETV 治疗应答组，但差异无统计学意义 ($P = 0.064$ ，表 1，图 1B)。纵向比较 ETV 治疗应答组和 ETV 治疗无应答组各自组内不同时间点 qAnti-HBc 水平，显示 ETV 治疗应答组中治疗 24 周和 52 周显著低于基线 (P 值均 < 0.05)，而 ETV 治疗无应答组随访各时间点 qAnti-HBc 水平差异无统计学意义 (表 1)。

3. CHB 患儿 qAnti-HBc 水平与血清 HBV DNA、GGT、ALT 和 AST 的关系及相关性分析：根据 Yuan 等^[12] 研究结果 (qAnti-HBc ≥ 4.46 $\log_{10}$ IU/ml 时抗病毒治疗效果更好) 及考虑组间样本量均衡，本研究将 4.46 作为 qAnti-HBc 分组的界值水平，分为低 qAnti-HBc 组 29 例、高 qAnti-HBc 组 30 例。低 qAnti-HBc 组中，男孩 15 例，



注：CHB：慢性乙型肝炎；qAnti-HBc：乙型肝炎核心抗体定量；ETV：恩替卡韦；Peg-IFN：聚乙二醇干扰素；A：无应答组和应答组 CHB 患儿基线 qAnti-HBc 水平；B：ETV 应答组和 Peg-IFN 应答组患儿 qAnti-HBc 水平纵向变化

图 1 抗病毒治疗 CHB 患儿无应答组和应答组间基线 qAnti-HBc 水平及纵向变化比较

女孩 14 例，年龄 6.24 (0.75 ~ 13.08) 岁；高 qAnti-HBc 组中，男孩 12 例，女孩 18 例，年龄 7.45 (1.75 ~ 13.67) 岁，两组患儿性别、年龄差异无统计学意义。

高 qAnti-HBc 组患儿 HBV DNA 水平 [7.81 (7.05 ~ 8.45) $\log_{10}$ IU/ml] 显著低于低 qAnti-HBc 组 [8.40 (8.13 ~ 8.71) $\log_{10}$ IU/ml, $Z = -2.578$, $P = 0.010$]；高 qAnti-HBc 组 GGT 水平 [16.9 (12.2 ~ 23.3) U/L]、ALT 水平 [2.11 (1.43 ~ 4.11) $\times$ ULN]、AST 水平 [1.56 (1.11 ~ 2.33) $\times$ ULN] 显著高于低 qAnti-HBc 组 [GGT、ALT、AST 分别为：13.1 (11.0 ~ 15.7) U/L, $Z = -2.615$, $P = 0.009$ ；0.78 (0.66 ~ 1.14) $\times$ ULN, $Z = -5.267$, $P < 0.001$ ；0.80 (0.63 ~ 1.09) $\times$ ULN, $Z = -4.637$, $P < 0.001$]。进一步行相关性分析发现，qAnti-HBc 水平与 ALT ($r = 0.750$, $P < 0.001$)、AST ($r = 0.693$, $P < 0.001$)、GGT ($r = 0.336$, $P < 0.05$) 等生化指标呈正相关，而与 HBV DNA 病毒学指标呈负相关 ($r = -0.289$, $P < 0.05$)。

4. 不同 qAnti-HBc 及 ALT 水平患儿 CD8⁺ 记忆 T 细胞亚群比例比较：分析上述 59 例患儿 CD8⁺T 细胞及其记忆亚群细胞 (初始 T 细胞 Tnaive、中心记忆 T 细胞 Tcm、效应记忆 T 细胞 Tem、终末分化效应 T 细胞 Temra) 的百分比。结果显示：高 qAnti-HBc 组 CD8⁺T、CD8⁺Tnaive、CD8⁺Tcm、CD8⁺Temra 细胞的比例 (26.8%、

表 1 慢性乙型肝炎患儿抗病毒治疗中 qAnti-HBc 动力学变化 [M (P25 ~ P75)]

组别	例数	qAnti-HBc 水平 ($\log_{10}$ IU/ml)			
		基线	12 周	24 周	52 周
ETV 应答组	10	4.77 (4.65 ~ 4.81)	4.62 (4.29 ~ 4.81)	4.25 (3.92 ~ 4.42)	4.03 (3.95 ~ 4.51)
Peg-IFN 应答组	8	4.70 (4.51 ~ 4.81)	4.71 (4.50 ~ 4.76)	4.60 (4.14 ~ 4.65)	3.89 (3.78 ~ 4.43)
ETV 无应答组	11	4.54 (4.41 ~ 4.65)	4.57 (4.40 ~ 4.74)	4.39 (4.01 ~ 4.67)	4.34 (4.04 ~ 4.57)

注：ETV：恩替卡韦；Peg-IFN：聚乙二醇干扰素；qAnti-HBc：乙型肝炎核心抗体定量；由于 Peg-IFN 治疗早期应答不佳患儿建议及时换药，Peg-IFN 治疗无应答组不随访至 52 周患儿较少，故未分析该组患儿 qAnti-HBc 水平纵向变化情况

71.5%、12.3%、10.8%)与低 qAnti-HBc 组 (26.2%、68.7%、13.6%、15.7%) 的差异无统计学意义 ($P > 0.05$);高 qAnti-HBc 组 CD8⁺Tem 细胞的比例 (4.4%) 明显高于低 qAnti-HBc 组 (1.6%, $Z = -2.631$, $P = 0.009$; 图 2A)。

以 ALT 升高程度分组也得到相似结果, ALT $> 1 \times$ 正常值上限 (ULN) 组 CD8⁺T、CD8⁺Tnaive、CD8⁺Tcm、CD8⁺Temra 细胞的比例 (28.0%、71.6%、13.3%、9.7%)与 ALT $\leq 1 \times$ ULN 组 (26.5%、64.4%、13.8%、21.5%) 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 而 ALT $> 1 \times$ ULN 组 CD8⁺Tem 细胞的比例 (4.4%) 高于 ALT $\leq 1 \times$ ULN 组 (1.6%, $Z = -2.464$, $P = 0.014$; 图 2B)。

5. 不同 qAnti-HBc 及 ALT 水平患儿 CD8⁺ 记忆 T 细胞表面活化水平比较: 进一步分析 T 淋巴细胞膜表面活化标志物 CD38 的表达水平, 结果显示, 高 qAnti-HBc 组患儿 CD8⁺T、CD8⁺Tnaive、CD8⁺Tcm 细胞表面 CD38 的表达水平 (71.4%、73.6%、54.0%) 与低 qAnti-HBc 组 (65.0%、72.4%、51.8%) 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 高 qAnti-HBc 组 CD8⁺Tem、CD8⁺Temra 细胞表面 CD38 的表达水平 (74.5%、79.4%) 则显著高于低 qAnti-HBc 组 (53.4%, $Z = -2.461$, $P = 0.014$; 64.0%, $Z = -2.310$, $P = 0.021$; 图 2C)。

对 ALT 升高程度患儿 CD8⁺ 记忆 T 细胞表面活化水平比较, 得出类似结果。ALT $> 1 \times$ ULN 组 CD8⁺T、CD8⁺Tnaive、CD8⁺Tcm 细胞表面 CD38 的表达水平 (69.5%、73.9%、51.8%) 与 ALT $\leq 1 \times$ ULN 组 (61.6%、71.9%、52.0%) 差异无统计学意义; 而 ALT $> 1 \times$ ULN 组 CD8⁺Tem、CD8⁺Temra 细胞表面 CD38 的表达水平 (72.4%、78.1%) 则显著高于 ALT $\leq 1 \times$ ULN 组 (55.3%, $Z = -2.306$, $P = 0.021$; 64.0%, $Z = -2.158$, $P = 0.031$; 图 2D)。

6. 不同 qAnti-HBc 及 ALT 水平患儿 CD8⁺T 细胞的功能活性比较: IFN- γ 及 TNF- α 是 CD8⁺T 细胞靶向杀伤 HBV 感染肝细胞的功能因子, 分析患儿 CD8⁺T 细胞分泌 IFN- γ 及 TNF- α 水平, 结果显示: 高 qAnti-HBc 组 CD8⁺T 细胞分泌 IFN- γ 及 TNF- α 水平 (10.9%、3.7%) 显著高于低 qAnti-HBc 组 (IFN- γ : 6.0%, $Z = -2.599$, $P = 0.009$; TNF- α : 2.0%, $Z = -2.379$, $P = 0.017$; 图 2E); 而 ALT $> 1 \times$ ULN 组 CD8⁺T 细胞分泌 IFN- γ 及 TNF- α 水平 (9.4%、2.8%) 与 ALT $\leq 1 \times$ ULN

组 (9.1%、4.2%) 的差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 图 2F)。

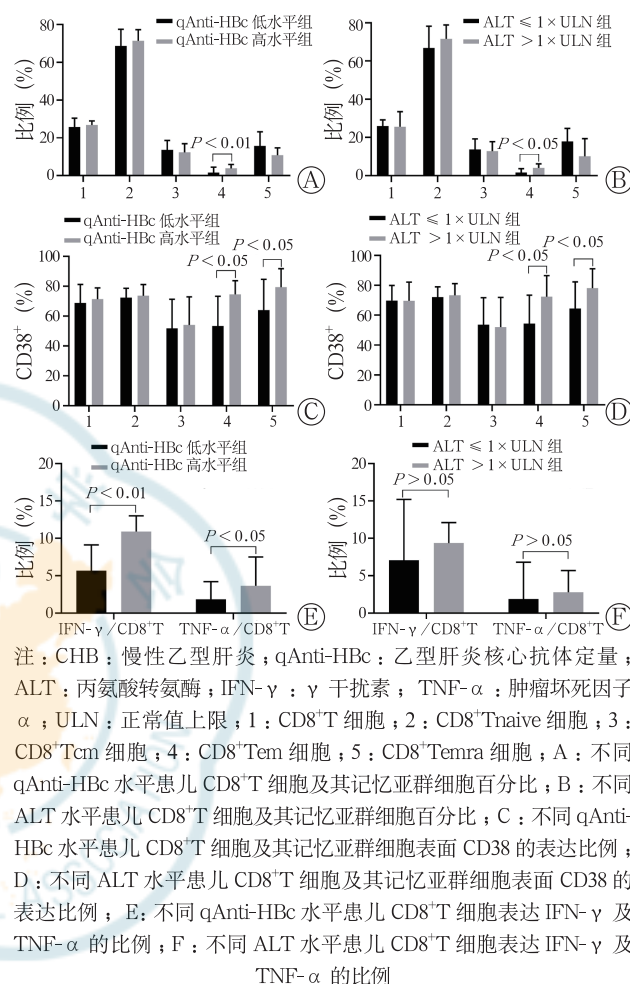


图2 不同 qAnti-HBc 及 ALT 水平 CHB 患儿 CD8⁺ 记忆 T 细胞亚群比例及分子表达比较

7. CHB 患儿 qAnti-HBc、ALT 与 CD8⁺ 记忆 T 细胞亚群比例、活化表型及功能活性的相关性分析: 在 CHB 患儿中, qAnti-HBc 水平与 CD8⁺Tem 细胞比例 ($r = 0.323$, $P = 0.021$)、CD8⁺Tem 和 CD8⁺Temra 细胞表面 CD38 的表达水平 ($r = 0.380$, $P = 0.006$; $r = 0.349$, $P = 0.0012$)、CD8⁺T 细胞分泌的 IFN- γ 水平 ($r = 0.311$, $P = 0.025$) 呈正相关; ALT 水平与 CD8⁺Tem、CD8⁺Temra 细胞表面 CD38 的表达水平呈正相关 ($r = 0.335$, $P = 0.017$; $r = 0.355$, $P = 0.011$), 但与 CD8⁺T 细胞分泌的 IFN- γ 、TNF- α 水平未见明显相关性 ($P > 0.05$)。

讨 论

新生儿和婴儿感染 HBV 后约 90% 以上为慢性感染, 成人感染后慢性化者不到 5% [17]。因此, 监测慢性 HBV 感染儿童病情进展并及时开始抗病毒



治疗十分重要。然而,关于 CHB 患儿抗病毒治疗时机及治疗方案的选择缺乏充分的循证依据。

2013 年 Yuan 等^[12]发现在 HBsAg、HBV DNA、ALT 及 qAnti-HBc 等基线指标中,仅 qAnti-HBc 与 HBeAg 血清学转换显著相关。随后陆续有 CHB 成人患者队列研究发现:较高的基线 qAnti-HBc 水平与 HBeAg 血清学应答有关^[9-11],而本研究在儿童患者中亦得到了同样的结果。

本研究结果显示在 CHB 儿童患者中 qAnti-HBc 水平与 ALT、AST、GGT 等生化指标呈正相关,而与 HBV DNA 病毒学指标呈负相关,提示 qAnti-HBc 水平可能与 CHB 患儿肝炎活动及病毒清除有关。在以往 CHB 成人患者的相关研究中,均发现了类似结果。Jia 等^[13]研究结果显示免疫清除期患者 qAnti-HBc 水平高于免疫控制期及免疫耐受期的患者,qAnti-HBc 水平与 ALT ($\leq 5 \times \text{ULN}$) 呈显著正相关。Li 等^[16]研究发现肝活检呈中、重度炎症的 CHB 患者的 qAnti-HBc 水平显著升高。

目前,qAnti-HBc 水平与 HBeAg 血清学应答相关的潜在机制尚不清楚。因 HBV 通过机体的免疫应答导致肝细胞损伤及肝脏炎症^[18],而 CD8⁺T 细胞作为免疫应答的关键效应细胞^[19],可发生各种表型和功能的改变^[20]。在 HBV 感染中,效应 CD8⁺T 细胞 (CD8⁺Tem 和 CD8⁺Temra) 起重要作用,其可通过识别 HBV 感染的实质细胞,在急性 HBV 感染清除病毒时通过分泌穿孔素、颗粒酶 B 等效应分子杀伤被 HBV 感染的肝细胞,并分泌 IFN- γ 、TNF- α 等抗病毒细胞因子,在病毒清除和组织免疫病理方面发挥着关键作用^[21-24]。故而本研究进一步研究 CHB 儿童 qAnti-HBc 水平与外周血 CD8⁺ 记忆 T 细胞亚群比例及功能活性的关系。

本研究结果显示高 qAnti-HBc 组 CD8⁺Tem 细胞的比例显著高于低 qAnti-HBc 组;此外,高 qAnti-HBc 组 CD8⁺Tem、CD8⁺Temra 细胞表面 CD38 的表达水平显著高于低 qAnti-HBc 组。除此之外,高 qAnti-HBc 组患儿 CD8⁺T 细胞分泌的 IFN- γ 、TNF- α 水平显著高于低 qAnti-HBc 组。有趣的是,在以 ALT 正常值上限为界值分组分析显示,尽管 ALT $> 1 \times \text{ULN}$ 组患儿 CD8⁺Tem、CD8⁺Temra 细胞表面 CD38 的表达水平显著高于 ALT $\leq 1 \times \text{ULN}$ 组,但两组患儿 CD8⁺T 细胞分泌的 IFN- γ 、TNF- α 水平差异无统计学意义。虽有研究结果显示肝炎活动 CHB 患者的 CD8⁺T 细胞表面活化分子 CD38 高表达可能与病毒清除相关^[25-26],

但如果 CD8⁺T 细胞仅仅是持续高表达 CD38,产生 IFN- γ 、TNF- α 等抗病毒细胞因子存在障碍,也可能引起患儿免疫耗竭而导致病毒清除失败。由此,通过本研究可发现 ALT 升高倾向于反映炎症相关的免疫活化,而 qAnti-HBc 升高可能更能反映宿主 HBV 特异性免疫活化。

综上所述,基线 qAnti-HBc 水平较高的 CHB 患儿外周血效应 CD8⁺T 细胞表现出更强的表型及功能活化特点,且与抗病毒治疗 HBeAg 血清学应答相关。因 qAnti-HBc 水平可反映宿主抗 HBV 免疫力,且其检测方法简便易行,故该标志物的应用可为临床判断患者免疫状态及疾病进展提供重要补充,利于为 CHB 患儿治疗时机的抉择及治疗方案的优化提供一定依据。HBV 特异性 T 细胞在 HBV 感染中发挥着至关重要的作用,但因其慢性感染中其频数较低,且儿童血液标本采集困难,故本研究未行 HBV 特异性 T 细胞检测,并分析与 qAnti-HBc 的关系,今后需进一步扩大样本进行探讨。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 周英芝: 酝酿和设计实验,实施研究,采集数据,分析/解释数据,起草文章,统计分析;常宇南: 酝酿和设计实验,实施研究,分析/解释数据,对文章的知识性内容作批评性审阅,统计分析;何怡、王慧敏、彭小蓉: 实施研究,采集数据,分析/解释数据,对文章的知识性内容作批评性审阅;陈敏: 酝酿和设计实验,实施研究,分析/解释数据,对文章的知识性内容作批评性审阅,统计分析,行政、技术或材料支持,指导,支持性贡献;彭明利、胡鹏: 酝酿和设计实验,分析/解释数据,对文章的知识性内容作批评性审阅,统计分析,行政、技术或材料支持,指导,支持性贡献;任红: 酝酿和设计实验,分析/解释数据,对文章的知识性内容作批评性审阅,统计分析,获取研究经费,行政、技术或材料支持,指导,支持性贡献;许红梅: 酝酿和设计实验,分析/解释数据,起草文章,对文章的知识性内容作批评性审阅,统计分析,获取研究经费,行政、技术或材料支持,指导,支持性贡献

参 考 文 献

- [1] WHO. Global hepatitis report[EB/OL]. 2017, <https://www.who.int/hepatitis/publications/global-hepatitis-report2017/en/>.
- [2] Polaris Observatory Collaborators. Global prevalence, treatment, and prevention of hepatitis B virus infection in 2016: a modelling study[J]. Lancet Gastroenterol Hepatol, 2018, 3(6): 383-403. DOI: 10.1016/S2468-1253(18)30056-6.
- [3] Sokal EM, Paganelli M, Wirth S, et al. Management of chronic hepatitis B in childhood: ESPGHAN clinical practice guidelines: consensus of an expert panel on behalf of the European Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition[J]. J Hepatol, 2013, 59(4): 814-829. DOI: 10.1016/j.jhep.2013.05.016.
- [4] 中华医学会肝病学分会, 中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南 (2015 更新版) [J]. 中华肝病杂志, 2015, 23(12): 888-905. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1007-3418.2015.12.002.

- [5] Fried MW, Piratvisuth T, Lau GK, et al. HBeAg and hepatitis B virus DNA as outcome predictors during therapy with peginterferon alfa-2a for HBeAg-positive chronic hepatitis B[J]. *Hepatology*, 2008, 47(2): 428-434. DOI: 10.1002/hep.22065.
- [6] Liaw YF, Jia JD, Chan HL, et al. Shorter durations and lower doses of peginterferon alfa-2a are associated with inferior hepatitis B e antigen seroconversion rates in hepatitis B virus genotypes B or C[J]. *Hepatology*, 2011, 54(5): 1591-1599. DOI: 10.1002/hep.24555.
- [7] Moucari R, Mackiewicz V, Lada O, et al. Early serum HBsAg drop: a strong predictor of sustained virological response to pegylated interferon alfa-2a in HBeAg-negative patients[J]. *Hepatology*, 2009, 49(4): 1151-1157. DOI: 10.1002/hep.22744.
- [8] Zeuzem S, Gane E, Liaw YF, et al. Baseline characteristics and early on-treatment response predict the outcomes of 2 years of telbivudine treatment of chronic hepatitis B[J]. *J Hepatol*, 2009, 51(1): 11-20. DOI: 10.1016/j.jhep.2008.12.019.
- [9] Fan R, Sun J, Yuan Q, et al. Baseline quantitative hepatitis B core antibody titre alone strongly predicts HBeAg seroconversion across chronic hepatitis B patients treated with peginterferon or nucleos(t)ide analogues[J]. *Gut*, 2016, 65(2): 313-320. DOI: 10.1136/gutjnl-2014-308546.
- [10] Xu JH, Song LW, Li N, et al. Baseline hepatitis B core antibody predicts treatment response in chronic hepatitis B patients receiving long-term entecavir[J]. *J Viral Hepat*, 2017, 24(2): 148-154. DOI: 10.1111/jvh.12626.
- [11] Hou FQ, Song LW, Yuan Q, et al. Quantitative hepatitis B core antibody level is a new predictor for treatment response in HBeAg-positive chronic hepatitis B patients receiving peginterferon[J]. *Theranostics*, 2015, 5(3): 218-226. DOI: 10.7150/thno.10636.
- [12] Yuan Q, Song LW, Liu CJ, et al. Quantitative hepatitis B core antibody level may help predict treatment response in chronic hepatitis B patients[J]. *Gut*, 2013, 62(1): 182-184. DOI: 10.1136/gutjnl-2012-302656.
- [13] Jia W, Song LW, Fang YQ, et al. Antibody to hepatitis B core antigen levels in the natural history of chronic hepatitis B: a prospective observational study[J]. *Medicine*, 2014, 93(29): e322. DOI: 10.1097/MD.0000000000000322.
- [14] Song LW, Liu PG, Liu CJ, et al. Quantitative hepatitis B core antibody levels in the natural history of hepatitis B virus infection[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2015, 21(2): 197-203. DOI: 10.1016/j.cmi.2014.10.002.
- [15] Zhou J, Song L, Zhao H, et al. Serum hepatitis B core antibody as a biomarker of hepatic inflammation in chronic hepatitis B patients with normal alanine aminotransferase[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 2747. DOI: 10.1038/s41598-017-03102-3.
- [16] Li MR, Lu JH, Ye LH, et al. Quantitative hepatitis B core antibody level is associated with inflammatory activity in treatment-naïve chronic hepatitis B patients[J]. *Medicine*, 2016, 95(34): e4422. DOI: 10.1097/MD.0000000000004422.
- [17] McMahon BJ. The natural history of chronic hepatitis B virus infection[J]. *Hepatology*, 2009, 49(5 Suppl): S45-55. DOI: 10.1002/hep.22898.
- [18] Yuen MF, Chen DS, Dusheiko GM, et al. Hepatitis B virus infection[J]. *Nat Rev Dis Prim*, 2018, 4: 18035. DOI: 10.1038/nrdp.2018.35.
- [19] Benechet AP, Iannacone M. Determinants of hepatic effector CD8+ T cell dynamics[J]. *J Hepatol*, 2017, 66(1): 228-233. DOI: 10.1016/j.jhep.2016.07.011.
- [20] Jung MC, Schraut W, Santantonio T, et al. Increased frequency of CD8+ CD45RO+ memory T lymphocytes in acute hepatitis B virus infection[J]. *J Hepatol*, 1993, 18(3): 295-300. DOI: 10.1016/s0168-8278(05)80273-9.
- [21] Sobao Y, Tomiyama H, Sugi K, et al. The role of hepatitis B virus-specific memory CD8 T cells in the control of viral replication[J]. *J Hepatol*, 2002, 36(1): 105-115. DOI: 10.1016/s0168-8278(01)00264-1.
- [22] Tang TJ, Kwekkeboom J, Mancham S, et al. Intrahepatic CD8+ T-lymphocyte response is important for therapy-induced viral clearance in chronic hepatitis B infection[J]. *J Hepatol*, 2005, 43(1): 45-52. DOI: 10.1016/j.jhep.2005.01.038.
- [23] Fioravanti J, Di Lucia P, Magini D, et al. Effector CD8+ T cell-derived interleukin-10 enhances acute liver immunopathology[J]. *J Hepatol*, 2017, 67(3): 543-548. DOI: 10.1016/j.jhep.2017.04.020.
- [24] 罗雅焯, 李婷婷, 王嘉悦, 等. 慢性 HBV 感染不同临床阶段患者外周血 T 细胞免疫状态的研究 [J]. *中国免疫学杂志*, 2020, 36(12): 1494-1498. DOI: 10.3969/j.issn.1000-484.2020.12.018.
- [25] 于海滨, 马丽娜, 柳雅立, 等. 非活动性 HBsAg 携带者聚乙二醇干扰素 α -2a 治疗过程中的 CD8⁺38⁺/CD8⁺ 变化及其临床意义 [J]. *中华肝病杂志*, 2013, 21(12): 895-898. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1007-3418.2013.12.004.
- [26] Fang J, Zhuge L, Rao HR, et al. Increased levels of miR-155 are related to higher T-cell activation in the peripheral blood of patients with chronic hepatitis B[J]. *Genet Test Mol Biomarkers*, 2019, 23(2): 118-123. DOI: 10.1089/gtmb.2018.0092.

(收稿日期: 2021-08-04)

(本文编辑: 朱红梅)

