

# 慢性乙型肝炎患者外周血 B 淋巴细胞亚群的变化特征及临床意义

汪海燕<sup>1,2</sup>, 鲍春梅<sup>3</sup>, 冯芷倩<sup>2,4</sup>, 王静<sup>1,2</sup>, 李亚群<sup>1,2</sup>, 李静<sup>2,5</sup>, 王红敏<sup>1,2</sup>, 唐莉莉<sup>2,5</sup>, 杨涛<sup>2</sup>, 徐若男<sup>2\*</sup>, 王福生<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>中国科学技术大学附属第一医院, 安徽合肥 230001; <sup>2</sup>解放军总医院第五医学中心感染病医学部, 国家感染性疾病临床医学研究中心, 北京 100039; <sup>3</sup>解放军总医院第五医学中心临床检验医学中心, 北京 100039; <sup>4</sup>南方医科大学第二临床医学院, 广东广州 510515; <sup>5</sup>北京大学 302 临床医学院, 北京 100039

[中图分类号] R512.62 [文献标志码] A [DOI] 10.11855/j.issn.0577-7402.0566.2024.0108

[声明] 本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文] 汪海燕, 鲍春梅, 冯芷倩, 等. 慢性乙型肝炎患者外周血 B 淋巴细胞亚群的变化特征及临床意义[J]. 解放军医学杂志, 2024, 49(5): 511-518.

[收稿日期] 2023-04-19 [录用日期] 2023-11-21 [上线日期] 2024-01-08

**[摘要]** **目的** 观察慢性乙型肝炎(CHB)患者外周血 B 淋巴细胞(B 细胞)亚群的变化特征, 并探讨其临床意义。**方法** 收集 2022 年 7—10 月在解放军总医院第五医学中心就诊的 37 例 CHB 未治疗患者的外周血标本, 同时收集 18 名接种过乙肝疫苗的健康人外周血标本作为健康对照(HC), 并收集研究对象的年龄、HBV DNA 病毒载量、HBsAg 定量、HBeAg 半定量、谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)及 AST/ALT 比值等临床指标。采用多色流式细胞术检测并比较两组外周血 B 细胞及各亚群的频率、表型及功能标志物的变化特征, 并探究其与临床指标之间的相关性。**结果** B 细胞各亚群频率分析显示, 与 HC 组比较, CHB 组整体 B 细胞、过渡 B 细胞及幼稚 B 细胞频率均降低( $P<0.05$ ), 而成熟 B 细胞、记忆 B 细胞、非典型记忆 B 细胞及激活记忆 B 细胞频率均升高( $P<0.01$ ); 两组静息记忆 B 细胞频率比较, 差异无统计学意义( $P>0.05$ )。B 细胞各亚群功能分析显示, 与 HC 组比较, CHB 组整体 B 细胞、成熟 B 细胞、记忆 B 细胞、幼稚 B 细胞、激活记忆 B 细胞、非典型记忆 B 细胞及静息记忆 B 细胞的 CD79b 表达水平平均升高( $P<0.05$ ); 此外, CHB 组非典型记忆 B 细胞的程序性死亡受体 1(PD-1)表达水平也高于 HC 组( $P<0.05$ )。相关性分析显示, CHB 组整体 B 细胞频率与年龄呈负相关( $r=-0.39$ ,  $P<0.05$ ), 且整体 B 细胞、成熟 B 细胞、过渡 B 细胞、记忆 B 细胞、幼稚 B 细胞的 PD-1 表达水平与年龄均呈正相关( $r>0.36$ ,  $P<0.05$ )。**结论** 慢性 HBV 感染导致 CHB 患者外周血部分 B 细胞的频率及功能发生耗竭, 而年龄是导致 CHB 患者体液免疫功能下降的潜在危险因素。

**[关键词]** 乙型肝炎病毒; 乙型肝炎, 慢性; B-淋巴细胞; 免疫, 体液; 外周血

## Characteristics and clinical significance of changes in peripheral blood B lymphocyte subsets in patients with chronic hepatitis B

Wang Hai-Yan<sup>1,2</sup>, Bao Chun-Mei<sup>3</sup>, Feng Zhi-Qian<sup>2,4</sup>, Wang Jing<sup>1,2</sup>, Li Ya-Qun<sup>1,2</sup>, Li Jing<sup>2,5</sup>, Wang Hong-Min<sup>1,2</sup>, Tang Li-Li<sup>2,5</sup>, Yang Tao<sup>2</sup>, Xu Ruo-Nan<sup>2\*</sup>, Wang Fu-Sheng<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>The First Affiliated Hospital of University of Science and Technology of China, Hefei, Anhui 230001, China

<sup>2</sup>Senior Department of Infectious Diseases, the Fifth Medical Center of PLA General Hospital, National Clinical Research Center for Infectious Diseases, Beijing 100039, China

<sup>3</sup>Clinical Laboratory Medical Center, the Fifth Medical Center of PLA General Hospital, Beijing 100039, China

<sup>4</sup>The Second School of Clinical Medicine, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510515, China

<sup>5</sup>Peking University 302 Clinical Medical School, Beijing 100039, China

[基金项目] 国家自然科学基金创新群体项目(81721002)

[作者简介] 汪海燕, 硕士研究生, 主要从事病毒性肝炎 B 淋巴细胞免疫学特点等方面的研究

[通信作者] 王福生, E-mail: fswang302@163.com; 徐若男, E-mail: xuruonan2004@aliyun.com

\*Corresponding author. Wang Fu-Sheng, E-mail: fswang302@163.com; Xu Ruo-Nan, E-mail: xuruonan2004@aliyun.com

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81721002)

**[Abstract] Objective** To analyze the changes of B lymphocyte (B cells) subsets in peripheral blood of patients with chronic hepatitis B (CHB) and to explore its clinical significance. **Methods** Peripheral blood samples were collected from 37 treatment-naïve CHB patients who were admitted to the Fifth Medical Center of PLA General Hospital from July 2022 to October 2022, and peripheral blood samples collected from 18 healthy individuals who have received the hepatitis B vaccine as healthy controls (HC). The study subjects' clinical indexes such as age, HBV DNA viral load, HBsAg quantification, HBeAg semi quantification, ALT, AST, and AST/ALT ratio were collected. The change characteristics of the frequency, phenotypic and functional markers of peripheral blood B lymphocytes and their subsets were compared between CHB and HC. Using multi-color flow cytometry, and the correlation between them and clinical indexes was analyzed. **Results** Frequency analysis of each subset of B cells showed that compared with HC, the frequency of total B cells, transitional B cells and naive B cells was decreased ( $P<0.05$ ), while the frequency of mature B cells, memory B cells, atypical memory B cells and activated memory B cells was increased in CHB patients ( $P<0.01$ ). And there was no significant difference in the frequency of resting memory B cells between the two groups ( $P>0.05$ ). The results of functional analysis showed that compared with HC, the expression levels of CD79b on total B cells, mature B cells, memory B cells, naive B cells, activated memory B cells, atypical memory B cells and resting memory B cells in CHB patients were increased ( $P<0.05$ ). The expression level of programmed cell death protein-1(PD-1) on atypical memory B cells in CHB patients was also higher than that in HC group ( $P<0.05$ ). The results of correlation analysis showed that the frequency of total B cells in CHB patients was slightly negatively correlated with age ( $r=-0.39, P<0.05$ ), while the expression of programmed death-1 (PD-1) on total B cells, mature B cells, transitional B cells, memory B cells and naive B cells were slightly positively correlated with age ( $r>0.36, P<0.05$ ). **Conclusions** Chronic HBV infection leads to depletion of the frequency and function of a portion of B cells in the peripheral blood of CHB patients, and age is a potential risk factor for the decline in humoral immune function in CHB patients.

**[Key words]** hepatitis B virus; hepatitis B, chronic; B-lymphocytes; immunity, humoral; peripheral blood

慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)是最常见的病毒性疾病之一,与肝硬化及肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的发生密切相关<sup>[1]</sup>。我国目前约有7000万慢性乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染者,其中CHB患者2000万~3000万<sup>[2-3]</sup>。调查发现,机体发生慢性HBV感染后,乙型肝炎表面抗原(hepatitis B surface antigen, HBsAg)自发清除的年发生率低于1%。核苷(酸)类似物单药或与干扰素(interferon, IFN)联合治疗能使部分患者实现HBsAg持续清除,即功能性治愈或临床治愈,但CHB患者经过连续5年以上的有效抗病毒治疗后,HBsAg转阴率仅有8%~10%<sup>[3-7]</sup>。HBsAg的持续存在是导致肝硬化及HCC的重要危险因素之一<sup>[3-7]</sup>。研究发现,使用利妥昔单抗治疗B淋巴细胞瘤合并HBV感染者可导致机体B淋巴细胞(B细胞)耗竭,从而使临床治愈患者发生HBV病毒再激活,导致与HBV感染相关的疾病再次进展<sup>[8]</sup>,提示B细胞介导的体液免疫反应对HBV的清除及预防再次感染发挥着重要作用,但目前CHB患者体液免疫的特征尚未完全阐明。

研究发现,CHB患者的外周B细胞过度活化,但体外增殖能力降低<sup>[9-10]</sup>。早期研究将记忆B细胞作为一个整体,然而近期在慢性感染或自身免疫性疾病患者中鉴定出一群CD27及CD21分子表达双重缺失的非典型记忆B细胞<sup>[11]</sup>。该细胞在急性及慢性

HBV感染者中呈高表达<sup>[12-14]</sup>,其频率随临床疾病的发展而下降,并与HBV DNA水平呈正相关<sup>[12]</sup>。这些研究在一定程度上对CHB患者体液免疫的特征进行了描述,但由于早期对记忆B细胞分型认识的局限性,对CHB患者B细胞各亚群特征变化的描述不够详尽,同时对CHB患者B细胞变化的临床意义也尚未完全阐明。本研究观察CHB患者外周血B细胞及其各细胞亚群的频率、表型及功能特征等变化,并分析这些变化与临床指标间的相关性,以阐明其临床意义。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 本研究为前瞻性研究。收集2022年7—10月于解放军总医院第五医学中心诊治的未治疗CHB患者的外周血标本,同期收集接种过乙肝疫苗的健康人外周血标本作为对照。CHB诊断标准参照《慢性乙型肝炎防治指南(2019年版)》<sup>[3]</sup>。纳入标准:HBsAg阳性持续时间为6个月以上,并且在入组前6个月内未接受过核苷类似物或IFN等抗病毒治疗的CHB患者定义为CHB未治疗患者;乙型肝炎核心抗体(hepatitis B core antibody, HBcAb)检测阴性者定义为健康对照。排除标准:已接受乙型肝炎抗病毒治疗;肝硬化或HCC;合并感染其他病毒,如甲、丙、丁、戊型肝炎病毒或人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)等;患有药物性肝损

伤、自身免疫性肝病及酒精性或非酒精性脂肪肝等其他肝脏疾病；患有其他严重疾病或未同意入组等。本研究通过解放军总医院第五医学中心伦理委员会批准(2020-053-D)，所有入组对象均知情同意并签署同意书。

**1.2 资料收集** 记录研究对象的年龄及性别等基本信息，同时记录研究对象的HBV DNA水平、HBsAg定量、血清学五项指标(HBsAg、HBsAb、HBeAg、HBeAb、HBcAb)、常规血液检查、生化、肝功能评估及既往史等临床资料。另外，使用EDTA抗凝真空采血管采集8~10 ml外周静脉血，用于单个核细胞分离。

### 1.3 方法

**1.3.1 外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)分离** 使用EDTA抗凝真空采血管无菌采集外周静脉血8~10 ml，2000 r/min室温离心10 min，吸取上层血浆保存于-80℃冰箱，下层加入等体积PBS，混匀后缓慢铺于淋巴细胞分离液(中国美德太平洋科技公司)上方，2500 r/min离心20 min，吸取中间白膜层细胞，PBS清洗1~2次，进行细胞计数后，加入细胞冻存液，于液氮中保存备用。

**1.3.2 B细胞亚群的多色流式细胞检测** 对液氮中存放的PBMCs进行复苏处理，37℃水浴锅中快速融化后，加入恢复室温的RPMI 1640完全培养基(美国Sigma公司)中，清洗细胞后将其重悬于RPMI 1640完全培养基，并置于37℃、含有5% CO<sub>2</sub>的培养箱中孵育6~8 h。孵育结束后，使用流式细胞分选(fluorescence activated cell sorting, FACS)缓冲液(添加2%胎牛血清的PBS缓冲液，胎牛血清购自美国Gibco公司)对PBMCs进行清洗，并将细胞浓度调整为 $5 \times 10^6$ 个/ml，每个流式检测管取 $5 \times 10^5$ 个细胞，并添加5  $\mu$ l的Fc受体阻断试剂及单核细胞阻断试剂(美国Biologend公司)，在4℃孵育20~30 min。孵育结束后，用FACS缓冲液清洗细胞并重悬，然后加入可固定死细胞的染料Fixable Viability Stain 510(美国BD Biosciences公司)、CD3 BV510、CD14 BV510、CD56 BV510、CD19 APC-Cy7、CD20 BV786、CD10 PerCP-Cy5.5、CD21 BUV496、CD27 PE-CF594、PD-1 FITC、CD79b APC等流式表面染色抗体(美国Biologend公司)，4℃避光孵育30 min，清洗细胞后加入300  $\mu$ l的1%多聚甲醛(美国Sigma公司)固定液重悬细胞，并于24 h内使用FACS Symphony A5流式细胞仪进行检测。

**1.4 统计学处理** 采用SPSS 25.0软件进行统计分析，使用GraphPad Prism 9.0软件(美国GraphPad Software公司)作图，流式原始数据采用FlowJo 10.8.1软件(美国BD Biosciences公司)分析。符合正态分布

的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，两组间比较采用 $t$ 检验；非正态分布的计量资料以 $M(Q_1, Q_3)$ 表示，两组间比较采用Mann-Whitney  $U$ 检验。计数资料以例(%)表示，两组间比较采用 $\chi^2$ 检验。相关性分析采用Spearman秩相关检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 临床资料** 共纳入18名接种过乙型肝炎疫苗的健康对照个体(HC组)及37例CHB未治疗患者(CHB组)。两组研究对象的性别、年龄及AST/ALT比值差异无统计学意义( $P > 0.05$ )，HBsAg、HBsAb、HBeAg、HBeAb、HBcAb阳性及阴性例数比较，差异有统计学意义( $P < 0.001$ )；CHB组患者ALT及AST均高于HC组，差异有统计学意义( $P < 0.001$ )，表1)。

**2.2 外周整体B细胞及各亚群频率分析** 外周B淋巴细胞亚群流式细胞术分析的设门策略如图1A所示。在圈定淋巴细胞并去除粘连体后，利用CD3、CD14、CD56分子及可固定死细胞的染料排除T淋巴细胞、单核细胞、NK细胞及死细胞；再利用CD19及CD20分子排除CD19<sup>-</sup>、CD20<sup>-</sup>的非B细胞后，从而圈定整体B细胞亚群；最后以CD10分子的表达与否区分成熟B细胞(CD10<sup>-</sup>)及过渡B细胞(CD10<sup>+</sup>) (图1A)。结果显示，与HC组比较，CHB组整体B细胞频率降低(4.08% vs. 5.69%， $Z = -2.018$ ， $P = 0.044$ )，同时在整体B细胞中过渡B细胞频率也降低(3.89% vs. 4.53%， $Z = -3.086$ ， $P = 0.002$ )，而成熟B细胞频率升高(96.10% vs. 95.45%， $Z = -3.010$ ， $P = 0.003$ ) (图1B)。

**2.3 外周记忆B细胞及不同记忆表型频率分析** 利用CD21及CD27分子的表达差异将成熟B细胞区分为记忆B细胞(CD21<sup>-</sup> C27<sup>-</sup>，CD21<sup>-</sup> C27<sup>+</sup>及CD21<sup>+</sup> C27<sup>+</sup>)及幼稚B细胞(CD21<sup>+</sup> C27<sup>-</sup>) (图2A)。分析慢性HBV感染对记忆B细胞及幼稚B细胞频率的影响，结果显示，CHB组整体B细胞中记忆B细胞的频率较HC组升高(27.85% vs. 18.15%， $Z = -3.059$ ， $P = 0.002$ )，而幼稚B细胞的频率较HC组降低(69.05% vs. 76.95%， $Z = -3.067$ ， $P = 0.002$ ) (图2B)。此外，根据CD21及CD27分子的表达量差异，进一步将记忆B细胞区分为非典型记忆B细胞(CD21<sup>-</sup> C27<sup>-</sup>)、激活记忆B细胞(CD21<sup>-</sup> C27<sup>+</sup>)及静息记忆B细胞(CD21<sup>+</sup> C27<sup>+</sup>)等3种记忆表型，流式细胞分析的设门策略如图2C所示。与HC组比较，CHB组非典型记忆B细胞的频率明显升高(9.09% vs. 3.71%， $Z = -4.960$ ， $P < 0.0001$ )，同时激活记忆B细胞的频率较HC组也升高(1.05% vs. 0.59%， $Z = -2.987$ ， $P = 0.003$ )，而两组静息记忆B细胞的频率比较，差异无统计学意义(15.85% vs. 14.15%， $Z = -0.350$ ， $P = 0.726$ ) (图2D)。

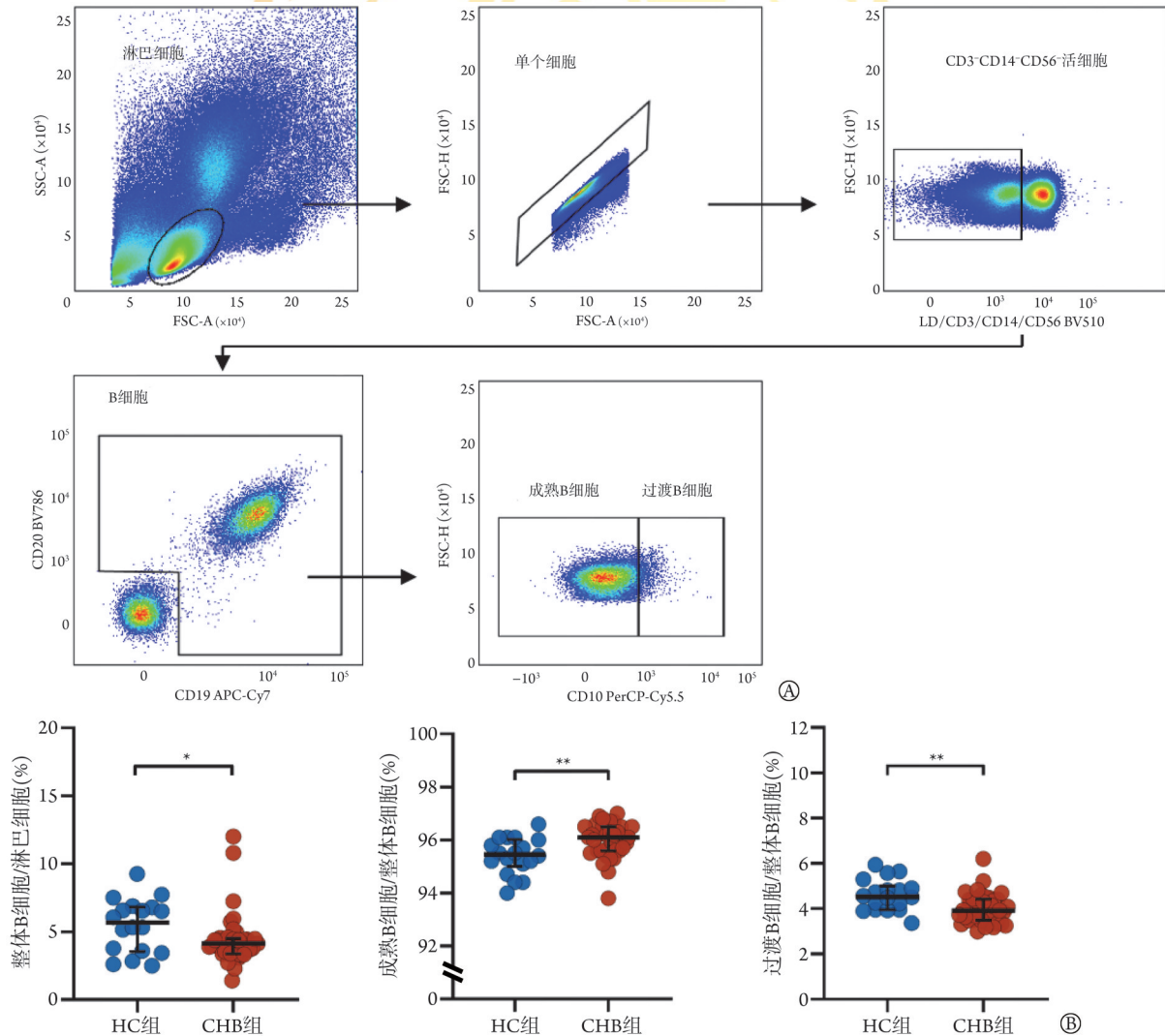
**2.4 外周B细胞各亚群功能分析** 为了探究慢性

表1 两组研究对象临床资料比较

Tab.1 Comparison of clinical data of enrolled subjects

类别	HC组(n=18)	CHB组(n=37)	$\chi^2/t/Z$	P
性别(男/女,例)	7/11	19/18	0.755	0.385
年龄(岁, $\bar{x}\pm s$ )	36.0 $\pm$ 12.5	37.7 $\pm$ 12.1	1.530	0.133
HBV DNA[log <sub>10</sub> IU/ml, M(Q <sub>1</sub> , Q <sub>3</sub> )]	-	4.8(3.1, 7.8)	-	-
HBsAg定量[log <sub>10</sub> IU/ml, M(Q <sub>1</sub> , Q <sub>3</sub> )]	-	3.7(2.7, 4.6)	-	-
HBsAg(P/N, 例)	0/18	37/0	55.000	<0.001
HBsAb(P/N, 例)	18/0	0/37	55.000	<0.001
HBeAg(P/N, 例)	0/18	21/16	16.526	<0.001
HBeAb(P/N, 例)	0/18	22/15	17.838	<0.001
HBcAb(P/N, 例)	0/18	37/0	55.000	<0.001
ALT[U/L, M(Q <sub>1</sub> , Q <sub>3</sub> )]	23.5(18.3, 27.8)	64.0(30.0, 291.0)	-3.922	<0.001
AST[U/L, M(Q <sub>1</sub> , Q <sub>3</sub> )]	20.5(15.3, 25.0)	42.0(30.0, 160.0)	-4.721	<0.001
AST/ALT[M(Q <sub>1</sub> , Q <sub>3</sub> )]	1.0(0.8, 1.1)	0.7(0.6, 1.1)	-1.345	0.178

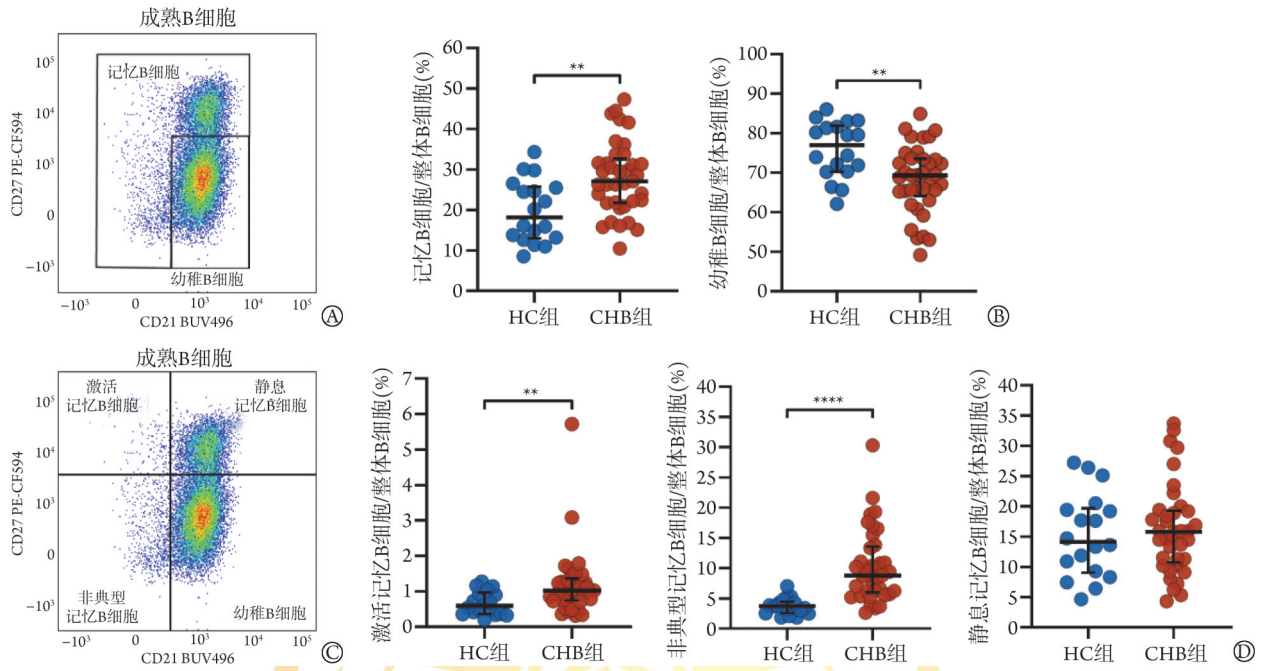
HC. 健康对照; CHB. 慢性乙型肝炎; HBV. 乙型肝炎病毒; HBsAg. 乙型肝炎表面抗原; HBsAb. 乙型肝炎表面抗体; HBeAg. 乙型肝炎e抗原; HBeAb. 乙型肝炎e抗体; HBcAb. 乙型肝炎核心抗体; ALT. 谷丙转氨酶; AST. 谷草转氨酶; P/N. 阳性/阴性; -. 示未检测



HC. 健康对照; CHB. 慢性乙型肝炎; SSC-A. 侧向散射光-面积; FSC-A. 前向散射光-面积; FSC-H. 前向散射光-高度; A. 细胞亚群流式分析设门策略图; B. 各亚群频率变化; \*P<0.05, \*\*P<0.01

图1 两组人群外周整体B细胞及各亚群频率分析

Fig.1 Frequency analysis of peripheral B cells and their subsets in two groups of population



HC. 健康对照; CHB. 慢性乙型肝炎; A. 记忆 B 细胞和幼稚 B 细胞流式分析设门策略图; B. 整体 B 细胞中记忆 B 细胞与幼稚 B 细胞频率变化; C. 记忆 B 细胞不同记忆表型流式分析设门策略图; D. 整体 B 细胞中激活记忆 B 细胞、非典型记忆 B 细胞及静息记忆 B 细胞频率变化; \*\* $P < 0.01$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$

图 2 两组人群外周记忆 B 细胞及不同记忆表型频率分析

Fig.2 Frequency analysis of peripheral memory B cells and their different phenotypes in two groups of population

HBV 感染对 B 细胞各亚群功能产生的影响, 本研究分别检测了两组人群不同 B 细胞亚群表面功能标志物 CD79b 及 PD-1 表达的平均荧光强度 (mean fluorescent intensity, MFI), 典型图分别如图 3A 及图 4A 所示 (以整体 B 细胞为例)。CD79b 表达水平分析显示, 与 HC 组比较, CHB 组整体 B 细胞及成熟 B 细胞表面 CD79b 的表达水平升高 (整体 B 细胞: 2214 vs. 1853,  $Z = -2.736$ ,  $P = 0.006$ , 图 3B; 成熟 B 细胞: 2158 vs. 1789,  $Z = -2.816$ ,  $P = 0.005$ , 图 3C), 同时成熟 B 细胞中记忆 B 细胞及幼稚 B 细胞表面 CD79b 的表达水平也升高 (记忆 B 细胞: 2275 vs. 1976,  $Z = -2.215$ ,  $P = 0.027$ , 图 3D 左; 幼稚 B 细胞: 2028 vs. 1736,  $Z = -2.269$ ,  $P = 0.023$ , 图 3D 右)。进一步分析发现, CHB 组激活记忆 B 细胞、非典型记忆 B 细胞及静息记忆 B 细胞这 3 种表型的记忆 B 细胞表面 CD79b 的表达水平均较 HC 组升高 (激活记忆 B 细胞: 2198 vs. 1496,  $Z = -3.695$ ,  $P < 0.001$ ; 非典型记忆 B 细胞: 1590 vs. 1040,  $Z = -4.413$ ,  $P < 0.0001$ ; 静息记忆 B 细胞: 2701 vs. 2250,  $Z = -2.161$ ,  $P = 0.031$ , 图 3E)。PD-1 表达水平分析显示, CHB 组非典型记忆 B 细胞表面 PD-1 的表达水平较 HC 组升高 (329 vs. 279,  $Z = -1.964$ ,  $P = 0.049$ ), 而两组其余 B 细胞亚群表面 PD-1 的表达水平比较, 差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ , 图 4B-E)。

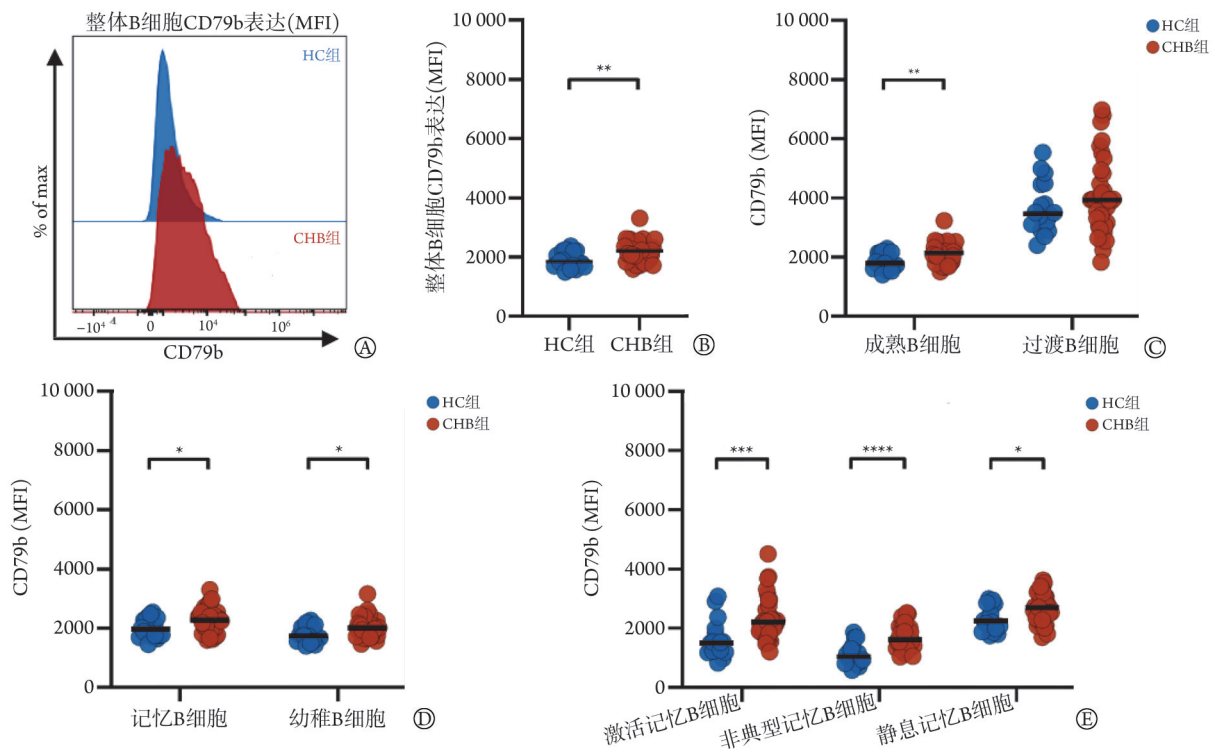
### 2.5 CHB 患者 B 细胞各亚群频率及功能标志物表达

水平与临床指标的相关性分析 CHB 患者淋巴细胞中整体 B 细胞频率与年龄呈负相关 ( $r = -0.39$ ,  $P < 0.05$ , 图 5A); 而 B 细胞各亚群表面 CD79b 的表达水平与临床指标之间的相关性分析, 相关性均无统计学意义 ( $P > 0.05$ , 图 5B); 整体 B 细胞、成熟 B 细胞、过渡 B 细胞、记忆 B 细胞、幼稚 B 细胞表面 PD-1 的表达水平与 CHB 患者的年龄均呈正相关 ( $P < 0.05$ , 图 5C)。

### 3 讨论

体液免疫反应在清除 HBV 及预防再次感染方面发挥重要作用<sup>[3-6,8,15-16]</sup>, 但由于早期对 B 细胞各亚群分型的认识存在局限性, 针对 CHB 患者外周 B 细胞的特征变化及其临床意义的描述不够充分<sup>[9-10]</sup>。为此, 本研究全面分析了 CHB 患者 B 细胞各亚群的频率、表型及功能特征, 并与重要的临床指标进行了相关性分析。结果显示, 与 HC 组比较, CHB 组患者外周整体 B 细胞、幼稚 B 细胞频率降低, 记忆 B 细胞频率升高; 记忆 B 细胞中非典型记忆 B 细胞及激活记忆 B 细胞频率明显升高; 非典型记忆 B 细胞表面 PD-1 及 CD79b 的表达水平升高; 年龄是影响 B 细胞频率及 PD-1 表达水平的重要因素。

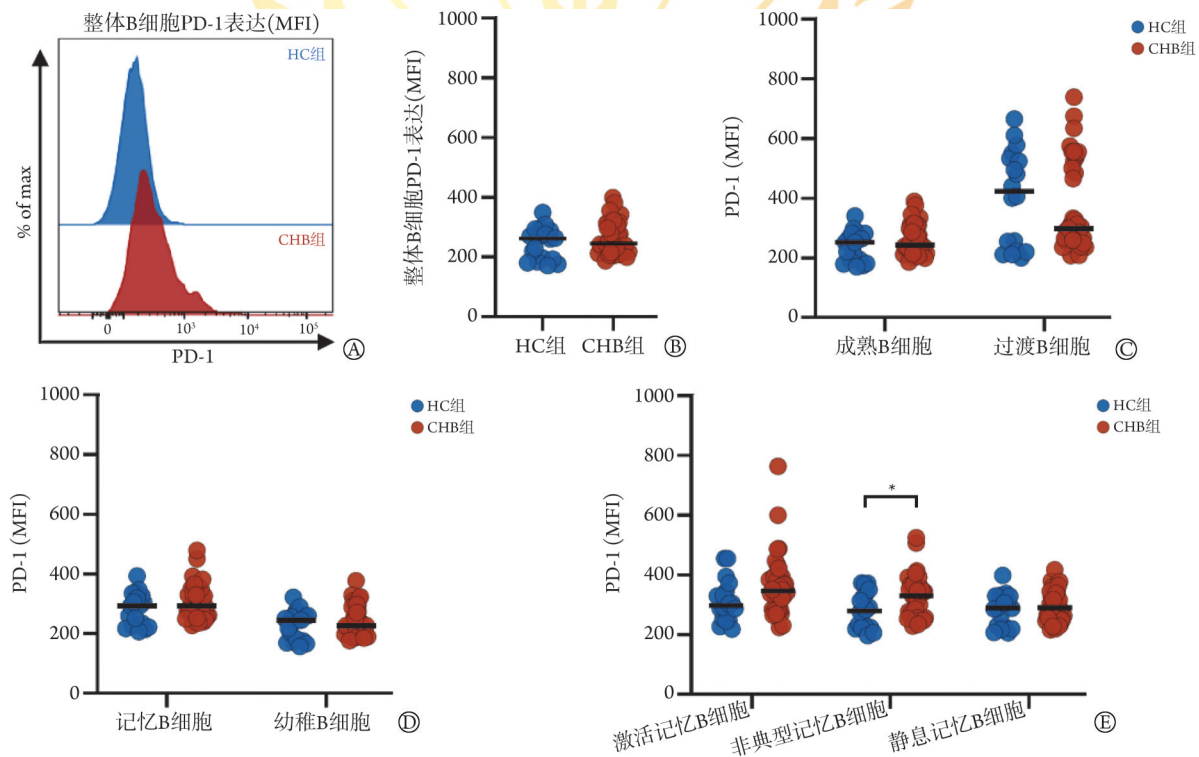
美国的一项研究报道, 与 HC 人群相比, CHB 患者的整体 B 细胞、浆母细胞及浆细胞频率上调, 而整体 B 细胞中记忆 B 细胞的频率差异无统计学意义<sup>[17]</sup>。然而本研究的结果显示, 慢性 HBV 感染导致



MFI. 平均荧光强度; HC. 健康对照; CHB. 慢性乙型肝炎; A. CD79b 表达的平均荧光强度比较流式典型图; B. 整体B细胞表面CD79b表达水平差异; C. 成熟B细胞及过渡B细胞表面CD79b表达水平差异; D. 记忆B细胞及幼稚B细胞表面CD79b表达水平差异; E. 激活记忆B细胞、非典型记忆B细胞及静息记忆B细胞表面CD79b表达水平差异; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$

图3 两组人群外周B细胞各亚群CD79b的表达水平差异分析

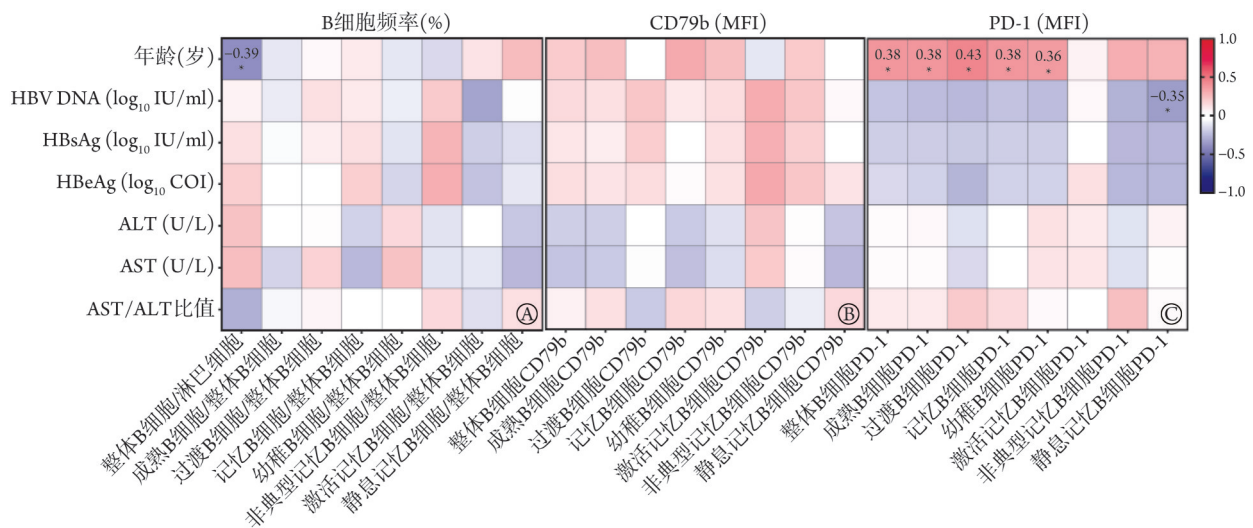
Fig.3 CD79b expression levels on peripheral B cells and their subsets in two groups of population



MFI. 平均荧光强度; HC. 健康对照; CHB. 慢性乙型肝炎; PD-1. 程序性死亡受体; A. PD-1 表达的平均荧光强度比较流式典型图; B. 整体B细胞表面PD-1表达水平差异; C. 成熟B细胞和过渡B细胞表面PD-1表达水平差异; D. 记忆B细胞和幼稚B细胞表面PD-1表达水平差异; E. 激活记忆B细胞、非典型记忆B细胞和静息记忆B细胞表面PD-1表达水平差异; \* $P < 0.05$

图4 两组人群外周B细胞各亚群PD-1的表达水平差异分析

Fig.4 PD-1 expression levels on peripheral B cells and their subsets in two groups of population



CHB. 慢性乙型肝炎; MFI. 平均荧光强度; HBV. 乙型肝炎病毒; HBsAg. 乙型肝炎表面抗原; HBeAg. 乙型肝炎e抗原; ALT. 谷丙转氨酶; AST. 谷草转氨酶; PD-1. 程序性死亡受体1; A. B细胞各亚群频率与临床指标的相关性; B. B细胞各亚群CD79b(MFI)与临床指标的相关性; C. B细胞各亚群PD-1(MFI)与临床指标的相关性; \* $P < 0.05$

图5 CHB患者B细胞各亚群频率及功能状态与临床指标的相关性分析

Fig.5 Correlation analysis between the frequency and functional status of each subsets of B cells and clinical index in CHB patients

淋巴细胞中整体B细胞频率下降, 而B细胞中成熟B细胞及记忆B细胞频率却明显升高, 与上述研究结果不一致。导致该差异的主要原因可能包括: (1)本研究在B细胞的流式设门策略中增加了排除T细胞、单核细胞及NK细胞的步骤, 使用了CD19及CD20两个表面分子标志物共同定义整体B细胞, 提高了B细胞在整体淋巴细胞中的分辨率; (2)在记忆B细胞的流式圈定中, 使用CD21表面分子与CD27分子共同定义记忆B细胞, 避免CD21及CD27双阴性的非典型记忆B细胞被归为幼稚B细胞; (3)CHB患者感染的HBV基因型不同也可能是导致结果差异的重要原因。调查显示, 欧美人群感染HBV病毒多以A基因型为主, 而我国以B、C基因型为主, 基因型差异导致CHB患者对IFN的应答能力、肝硬化及HCC的进展风险均存在差异, 且影响临床预后<sup>[18]</sup>。因此, 不同基因型HBV感染患者的B细胞特征可能存在差异。另外, B细胞在分化成浆细胞的过程中发生CD19及CD20的表达下调甚至缺失, 也可能是导致B细胞频率降低的重要原因<sup>[19]</sup>。

CD79b分子是B细胞抗原受体(B cell receptor, BCR)的组成亚基之一, 与BCR的表达水平高度一致<sup>[20-21]</sup>。BCR在B细胞的发育、存活及活化中发挥着重要作用<sup>[22-23]</sup>。本研究发现, CHB患者成熟B细胞及其中的记忆B细胞频率均明显上调, 并且各B细胞亚群上CD79b的表达水平也普遍升高。尽管CHB患者的年龄、HBV DNA病毒载量、HBsAg定量水平及HBeAg半定量水平与B细胞各亚群上CD79b的表达水平呈较为一致的正相关趋势, 但差异并无统计

学意义。该结果提示, 慢性HBV感染可能影响B细胞表面BCR的表达水平, 然而具体的临床意义及可能的作用机制目前尚不清楚, 仍需要扩大样本量进行进一步验证。

研究报道, CHB患者外周存在非典型记忆B细胞的富集, 这群细胞高表达Fc受体样家族成员(Fc receptor-like, *FcRL*)、*T-bet*、*CD11c*及*Siglec6*等抑制性基因, 并且与其他记忆B细胞比较, 非典型记忆B细胞分化成浆细胞的能力降低, 产生的抗病毒细胞因子较少, 提示非典型记忆B细胞处于功能耗竭状态, 这是导致病毒特异性免疫应答缺陷的重要原因<sup>[12-14]</sup>。本研究同样发现, CHB患者外周记忆B细胞中非典型记忆B细胞富集, 同时非典型记忆B细胞高表达耗竭标志物PD-1, 提示慢性HBV感染导致部分B细胞功能耗竭, 而靶向PD-1分子可能使B细胞功能恢复。该结果与Salimzadeh等<sup>[12]</sup>的观点一致。他们认为: PD-1阻断能够部分恢复CHB患者功能障碍的病毒特异性B细胞。这些证据均为慢性HBV感染的临床治疗提供了新思路, 且目前PD-1阻断剂的治疗作用已经在HBV及HBV相关HCC的临床试验中进行了测试<sup>[24]</sup>。

一项关于HBsAg对CHB患者特异性及整体T细胞影响的研究发现, HBsAg特异性T细胞的数量减少只与CHB患者的年龄密切相关, 即CHB患者暴露HBsAg的持续时间与HBsAg特异性T细胞数量呈负相关, 而HBsAg的定量水平与HBsAg特异性T细胞数量减少并无显著关联<sup>[25]</sup>。此外, 国内一项淋巴细胞频率的调查研究发现, 只有CHB患者的B细胞频

率与年龄呈负相关,而在健康人群中没有这种相关性<sup>[26]</sup>。本研究将CHB患者B细胞的特征与重要临床指标进行相关性分析发现,淋巴细胞中整体B细胞频率与CHB患者的年龄同样呈负相关,而整体B细胞及各亚群B细胞表面耗竭标志物PD-1的表达水平与年龄亦呈正相关。尽管在本研究中均只表现出较弱的相关性,但该结果提示CHB患者暴露HBsAg的持续时间可能是导致CHB患者体液免疫功能下降的潜在危险因素之一。由此可见,提倡早发现、早诊断、早治疗的策略对于CHB患者的病毒控制,甚至临床治愈均极为重要。与此同时,B细胞作为体液免疫的重要效应细胞,其频率及功能与年龄的相关性也部分解释了慢性HBV感染的老年人群免疫力下降,且容易发生合并感染的原因。

综上所述,慢性HBV感染后记忆B细胞的功能耗竭与HBV感染时长有关,这可能是导致HBV持续存在的重要原因。本研究进一步完善了对CHB患者体液免疫特征的理解,但由于入组患者病例数较少,且缺乏动态的随访观察,所以对于不同自然史分期的CHB患者体液免疫特征的详细描述有所欠缺。因此,后续仍需扩大样本量,并增加动态随访样本,详细解析B细胞的动态变化特征及临床意义,以期阐明慢性HBV感染的发病机制提供更多的参考信息。

#### 【参考文献】

- [1] WHO. Hepatitis B [EB/OL]. [2023-3-24]. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b>.
- [2] Liu J, Liang WN, Jing WZ, et al. Countdown to 2030: eliminating hepatitis B disease, China[J]. Bull World Health Organ, 2019, 97(3): 230-238.
- [3] 王贵强,王福生,庄辉,等.慢性乙型肝炎防治指南(2019年版)[J].临床肝胆病杂志,2019,35(12):2648-2669.
- [4] Lau GKK, Wang FS. Uncover the immune biomarkers underlying hepatitis B e antigen (HBeAg) seroconversion: a need for more translational study[J]. J Hepatol, 2012, 56(4): 753-755.
- [5] European Association for the Study of the Liver. EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection[J]. J Hepatol, 2017, 67(2): 370-398.
- [6] Terrault NA, Lok ASF, McMahon BJ, et al. Update on prevention, diagnosis, and treatment of chronic hepatitis B: AASLD 2018 hepatitis B guidance[J]. Hepatology, 2018, 67(4): 1560-1599.
- [7] Chu CM, Hung SJ, Lin J, et al. Natural history of hepatitis B e antigen to antibody seroconversion in patients with normal serum aminotransferase levels[J]. Am J Med, 2004, 116(12): 829-834.
- [8] Dervite I, Hober D, Morel P. Acute hepatitis B in a patient with antibodies to hepatitis B surface antigen who was receiving rituximab[J]. N Engl J Med, 2001, 344(1): 68-69.
- [9] Oliviero B, Cerino A, Varchetta S, et al. Enhanced B-cell differentiation and reduced proliferative capacity in chronic hepatitis C and chronic hepatitis B virus infections[J]. J Hepatol, 2011, 55(1): 53-60.
- [10] Xu XS, Shang QH, Chen XY, et al. Reversal of B-cell hyperactivation and functional impairment is associated with HBsAg seroconversion in chronic hepatitis B patients[J]. Cell Mol Immunol, 2015, 12(3): 309-316.
- [11] Weisel F, Shlomchik M. Memory B cells of mice and humans[J]. Annu Rev Immunol, 2017, 35: 255-284.
- [12] Salimzadeh L, Le Bert N, Dutertre CA, et al. PD-1 blockade partially recovers dysfunctional virus-specific B cells in chronic hepatitis B infection[J]. J Clin Invest, 2018, 128(10): 4573-4587.
- [13] Burton AR, Pallett LJ, McCoy LE, et al. Circulating and intrahepatic antiviral B cells are defective in hepatitis B[J]. J Clin Invest, 2018, 128(10): 4588-4603.
- [14] Poonia B, Ayithan N, Nandi M, et al. HBV induces inhibitory FcRL receptor on B cells and dysregulates B cell-T follicular helper cell axis[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 15296.
- [15] Lo CM, Fung JTK, Lau GKK, et al. Development of antibody to hepatitis B surface antigen after liver transplantation for chronic hepatitis B[J]. Hepatology, 2003, 37(1): 36-43.
- [16] Luo Y, Lo CM, Cheung CK, et al. Identification of hepatitis B virus-specific lymphocytes in human liver grafts from HBV-immune donors[J]. Liver Transpl, 2007, 13(1): 71-79.
- [17] Khanam A, Ayithan N, Tang L, et al. IL-21-deficient T follicular helper cells support B cell responses through IL-27 in patients with chronic hepatitis B[J]. Front Immunol, 2020, 11: 599648.
- [18] Lin CL, Kao JH. The clinical implications of hepatitis B virus genotype: recent advances[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2011, 26(Suppl 1): 123-130.
- [19] Halliley JL, Tipton CM, Liesveld J, et al. Long-lived plasma cells are contained within the CD19 (-) CD38(hi)CD138(+) subset in human bone marrow[J]. Immunity, 2015, 43(1): 132-145.
- [20] Benschop RJ, Cambier JC. B cell development: signal transduction by antigen receptors and their surrogates[J]. Curr Opin Immunol, 1999, 11(2): 143-151.
- [21] Schamel WW, Reth M. Monomeric and oligomeric complexes of the B cell antigen receptor[J]. Immunity, 2000, 13(1): 5-14.
- [22] Neuberger MS. Antigen receptor signaling gives lymphocytes a long life[J]. Cell, 1997, 90(6): 971-973.
- [23] Gauld SB, Dal Porto JM, Cambier JC. B cell antigen receptor signaling: roles in cell development and disease[J]. Science, 2002, 296(5573): 1641-1642.
- [24] Maini MK, Pallett LJ. Defective T-cell immunity in hepatitis B virus infection: why therapeutic vaccination needs a helping hand[J]. Lancet Gastroenterol Hepatol, 2018, 3(3): 192-202.
- [25] Le Bert N, Gill US, Hong M, et al. Effects of hepatitis B surface antigen on virus-specific and global T cells in patients with chronic hepatitis B virus infection[J]. Gastroenterology, 2020, 159(2): 652-664.
- [26] 张政,福军亮,周春保,等.中国乙型肝炎患者外周血淋巴细胞亚群频率参考值范围[J].传染病信息,2011,24(4):206-210.

(责任编辑:熊晓然)