

·临床研究·

慢性乙型肝炎患者外周单核细胞衍生的巨噬细胞的极化状态与HBV DNA的相关性及其动态变化

陈晓彤¹, 梁静¹, 刘相富², 顾玉荣¹, 张岩岩¹, 邬喆斌¹, 何秀婷³, 郑玉宝¹

(1. 中山大学附属第三医院感染科, 广东广州 510630; 2. 中山大学附属第三医院输血科, 广东广州 510630;
3. 广东轻工职业技术学院, 广东广州 510300)

摘要:【目的】为了研究慢性乙型肝炎(CHB)患者在核苷(酸)类(恩替卡韦(ETV)或替诺福韦(TDF))抗病毒治疗过程中外周单核细胞衍生的巨噬细胞(MDMs)的极化状态的动态变化以及与HBV DNA、HBeAg的相关性。【方法】共纳入101例CHB患者和20名健康人的外周血标本。通过外周血单核细胞技术(PBMC)分离培养获得86例CHB患者和12例健康人的MDMs。采用流式细胞技术检测MDMs的特异性标志物(CD80, HLA-DR, CD163和CD206)的表达,从而评估MDMs的极化状态(即M1型/M2型极化状态)。通过qPCR检测15例CHB患者和8例健康对照中MDMs的炎症因子的mRNA水平表达。【结果】我们发现在CHB患者外周血中CD163⁺CD206⁺MDMs(M2型MDMs)的比例较正常人群显著减少($P=0.030$)。同时,抑炎因子IL-10的mRNA水平表达也明显下降($P=0.040$)。随着核苷(酸)类似物抗病毒治疗的进展,CD163⁺CD206⁺MDMs(M2型)的比例逐渐增加($P<0.001$),而CD80⁺HLA-DR⁺MDMs(M1型)逐渐地降低($P=0.005$)。另外,M2型MDMs与HBeAg($P=0.019$),HBV DNA水平($P=0.002$),AST($P=0.048$)和ALT($P=0.030$)均呈负相关。ROC曲线分析表明M2型MDMs对CHB抗病毒治疗的病毒学应答率有一定的预测作用,可预测HBV DNA阴转率[ROC 95%CI为0.705(0.594,0.815)]和HBeAg的血清转化率[ROC 95%CI为0.740(0.634,0.847)]。【结论】CHB患者在核苷(酸)类抗病毒治疗过程中MDMs极化状态呈现规律动态变化,M2型MDMs与HBV DNA和HBeAg水平呈负相关,对CHB抗病毒治疗的病毒学应答率有一定预测作用。

关键词:慢性乙型肝炎;HBV DNA;HBeAg;巨噬细胞分型极化

中图分类号:R5 文献标志码:A 文章编号:1672-3554(2022)01-0086-10

DOI:10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).2022.0111

Correlation and Dynamic Changes between the Polarization of Monocyte-derived Macrophages and HBV DNA in Chronic Hepatitis B

CHEN Xiao-tong¹, LIANG Jing¹, LIU Xiang-fu², GU Yu-rong¹, ZHANG Yan-yan¹,
WU Zhe-bin¹, HE Xiu-ting³, ZHENG Yu-bao¹

(1. Department of Infectious Diseases, The Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China; 2. Department of Blood Transfusion, The Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China; 3. Guangdong Industry Polytechnic, Guangzhou 510300, China)

Correspondence to: ZHENG Yu-bao; E-mail: zhybao@mail.sysu.edu.cn

Abstract:【Objective】To investigate the dynamic change of monocyte-derived macrophages (MDMs) in chronic hepatitis B (CHB) during the treatment by ETV or TDF, and the association between the polarization of monocyte-derived

收稿日期:2021-07-22

基金项目:广东省基础与应用基础研究基金(2020A1515010052);国家自然科学基金(81974004);中山大学附属第三医院“五个五”工程项目(K00005);国家科技重大专项(2018ZX10302204)

作者简介:陈晓彤,医学硕士,研究方向:慢性乙型肝炎,E-mail: chenxt37@mail2.sysu.edu.cn;郑玉宝,通信作者,医学博士,博士生导师,主任医师,E-mail: zhybao@mail.sysu.edu.cn

macrophages (MDMs) and HBV DNA, HBeAg in CHB.【Methods】Peripheral blood of 101 patients with chronic hepatitis B and 20 healthy donors were enrolled. MDMs were purified from 86 patients with CHB and 12 healthy donors by peripheral blood mononuclear cell (PBMC). Flow cytometry was used to analyze the expression of specific markers on polarized macrophages to further evaluate the polarization of MDMs (M1/M2 MDMs), including CD80, HLA-DR, CD163 and CD206. Additionally, qPCR was used to evaluate the mRNA expression of inflammatory factors of MDMs in 15 patients with chronic hepatitis B and 8 healthy controls.【Results】The proportion of CD163⁺CD206⁺MDMs (M2 MDMs) were reduced in patients with CHB ($P = 0.030$), compared with healthy controls. Correspondingly, the mRNA expression of anti-inflammatory factor, IL-10, decreased significantly ($P = 0.040$). With the progress of nucleos(t)ide analogs (NAs) therapy, the proportion of CD163⁺CD206⁺MDMs (M2 MDMs) increased gradually ($P < 0.001$), while the proportion of CD80⁺HLA-DR⁺MDMs (M1 MDMs) decreased gradually ($P = 0.005$). In addition, M2 MDMs were negatively associated with both HBeAg ($P = 0.019$), HBV DNA ($P = 0.002$), AST ($P = 0.048$) and ALT ($P = 0.030$) in patients with CHB. ROC curve analysis showed that CD163⁺CD206⁺MDMs (M2 MDMs) had high predicting value for the virologic response of CHB during NA therapy, and could be used to predict undetectable HBV DNA [ROC 95% CI: 0.705 (0.594, 0.815)] and HBeAg seroconversion [ROC 95% CI: 0.740 (0.634, 0.847)].【Conclusions】There are dynamic changes of MDMs polarization in patients with CHB during NA therapy, and the negative correlation between the proportion of M2 MDMs and HBV DNA, HBeAg indicates that M2 MDMs could have a high predicting value in the virologic response of CHB during NA therapy.

Key words: chronic hepatic B; HBV DNA; HBeAg; the palorization of monocyte-derived macrophages

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2022, 43(1): 86-95]

慢性乙型肝炎(chronic Hepatitis B, CHB)是由乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)引起的一种广泛的传染病^[1]。持久性HBV感染引起的慢性炎症可导致肝纤维化,肝硬化,甚至肝细胞癌^[2]。因此,及时给予CHB患者抗病毒治疗对阻断CHB疾病进程尤为重要,而HBsAg、HBeAg和HBV DNA是评价抗病毒治疗疗效的重要指标^[3-4]。目前,最新慢乙肝防治指南推荐一线核苷(酸)类似物(nucleos(t)ide analogue, NAs)抗HBV治疗药物为恩替卡韦(entecavir, ETV)和替诺福韦(tenofovir disoproxil fumarate, TDF)^[5-6]。多项研究比较了ETV和TDF在慢性乙型肝炎抗病毒治疗中的疗效和安全性^[7],但是这两种药物在慢性乙型肝炎中的免疫细胞功能的变化差别尚不清楚。巨噬细胞在CHB病程中促发或调节肝脏炎症方面发挥重要作用,可被分为M1型和M2型^[8-10],其中M1型巨噬细胞表达HLA-DR, CD80和CD86分子,产生促炎细胞因子,如IL-1 β , IL-6, TNF- α ; M2型巨噬细胞表达CD206, CD163分子^[8-9]。分泌炎和免疫调节细胞因子,如IL-10和TGF- β ^[10]。有研究表明,HBV感染可能触发肝脏的库普弗细胞活化,产生炎性细胞因子,诱导外周单核细胞浸润进入肝脏并分化为巨噬细胞,但这种外周单核细胞衍生的巨噬细胞(monocyte-derived macrophages, MDMs)^[11-12]在慢性乙型肝炎抗病毒治疗过程中动态变化尚不清楚。因此,本研

究旨在探明CHB患者MDMs的极化状态在抗病毒治疗过程中的动态变化及其与HBV DNA、HBeAg和HBsAg的关联性。

1 材料与方法

1.1 病例资料

本研究研究对象为慢性乙型肝炎患者,参照《慢性乙型肝炎防治指南(2015年更新版)》^[13],使用以下纳入标准:成人、HBsAg阳性的慢性乙型肝炎患者。排除标准包括:同时感染其他病毒性肝炎病毒或HIV、肝硬化和肝细胞癌。本研究共收集了101例慢性乙型肝炎患者(流式细胞技术纳入86例,qPCR纳入15例)和20例健康对照(流式细胞技术纳入12例,qPCR纳入8例)的外周血标本,所有CHB患者血标本均于2018年1月至2019年6月采集于中山大学附属第三医院感染科门诊及住院部,健康人血标本采集于中山大学附属第三医院献血站。所有患者均已签署知情同意书。本研究经中山大学伦理委员会第三附属医院批准([2018]02-432-01)。

1.2 实验方法

1.2.1 获取外周血单个核细胞 从供者获得外周血,去除血浆后,将血细胞用适量PBS(BOSTER,

AR0030)稀释成血细胞混悬液。将血混悬液:分离液比例为2:1的离心管进行离心(20℃,2 000 r/min, $r=15\text{cm}$, 20 min, 升5, 降0);离心后收集白膜层(单个核细胞),洗涤单个核细胞并重悬于含有10%热灭活胎牛血清(Gibco, 100991410)和1%含青霉素和链霉素的溶液(Gibco, 15070065%)的RP-MI-1640安全培养基(Gibco, C11875500BT)中,转移至T25培养瓶中,放入37℃,体积分数5%CO₂的培养箱孵育。

1.2.2 获取外周单核细胞衍生的巨噬细胞 PBMC实验孵育24 h后,光学显微镜下,观察贴壁细胞和未贴壁细胞形态。去除培养液中的未贴壁细胞。加入5 mL完全培养基,放入37℃,体积分数5%CO₂的培养箱孵育5 d,即可获得单核细胞衍生的巨噬细胞(MDMs)。

1.2.3 流式细胞技术 使用含有0.25% EDTA和胰蛋白酶(Gibco, 25200056)的PBS液从培养瓶中收获MDMs,洗涤并重悬在1 mL PBS中。加入PE偶联的抗CD80抗体(BDPharmingen, 美国)、FITC偶联的抗CD14抗体(BDPharmingen, 美国)、APC偶联的抗HLA-DR抗体(BDPharmingen, 美国)和PE-CF594偶联的抗CD163抗体(BD Horizon, 美国)进行胞外染色,在4℃下避光孵育45 min。分别添加40 g/L多聚甲醛(JETWAY, JTW003-500)和0.1% Triton X-100(KeyGEN, KGF011)进行固定和透化后,使用BV421偶联的抗CD206抗体(BD Horizon, 美国)进行胞内染色。在Beckman Gallios十色流式细胞分析仪上机检测(Beckman Gallios, 美国)。

1.2.4 实时荧光定量PCR 使用RNA快速提取盒(上海奕衫生物, 中国)从MDMs中提取RNA。并通过NanoDrop2000光谱仪(Thermo, 德国)评估RNA的浓度。加入1 000 ng RNA所需要的样本量,参照Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit(Roche, 德国)的说明书加入所需试剂,设定PCR扩增仪(GeneAmp PCR ABS-2720, 美国)的程序参数,将RNA逆转录成cDNA(20 μL体系)。每个样本做3个复孔,每个复孔为10 μL体系混合物,包括DEPC水(KeyGEN BioTECH, 中国)4 μL, LightCycler 480 SYBR Green I Master(Roche, 德国)5 μL, cDNA样本0.5 μL和正向及反向引物各0.25 μL(引物均已在NCBI验证过),充分混合后放入LightCycler480 II(Roche, 美国)中进行实时荧光定量qPCR检测。

1.3 观察指标

1.3.1 流式结果观察指标 首先圈出CD14表达阳性的细胞(即MDMs)^[14],并通过M1巨噬细胞的特异性表型分子(CD80和HLA-DR)和M2巨噬细胞的特异性表型分子(CD163和CD206)的表达分析MDMs的极化状态。观察CD80⁺HLA-DR⁺MDMs和CD163⁺CD206⁺MDMs在CD14⁺MDMs所占的比例。

1.3.2 入组病例临床基线资料 每个病例观察其病毒学指标(如HBsAg、HBeAg、HBV DNA)和对应的生化资料(如AST和ALT)。

1.3.3 抗病毒过程中MDMs的重复测量检测 本研究共随访观察了18例慢性乙型肝炎患者,每例患者在开始抗病毒治疗后的6个月内依次抽取3次外周血标本,分别是第0~59天、第60~119天和第120~180天各抽取1次。观察CD80⁺HLA-DR⁺MDMs和CD163⁺CD206⁺MDMs在CD14⁺MDMs所占的比例的动态变化,并观察其病毒学指标(如HBsAg、HBeAg、HBV DNA)和对应的生化资料(如AST和ALT)。

1.3.4 实时荧光定量PCR的观察指标 目标基因数据均与内参数据对比进行标准化处理,从而获得目标基因的相对表达量,计算公式为 $2^{-\Delta Ct}$,其中 $\Delta Ct = Ct(\text{目标基因}) - Ct(\text{内参基因})$, Ct值(cycle threshold, Ct)为每个反应管内的荧光信号到达设定的阈值时所经历的循环数。

1.4 统计学方法

所有数据的统计描述表示为平均值±标准差,中位数(四分位数范围)或数字(百分比)。Shapiro-Wilk检验用于正态检验,Levene检验用于方差齐性检验。对于两个独立样本之间的差异,正态分布变量的差异使用 t 检验,非正态分布的数据使用Mann-Whitney U 检验。通过Spearman相关性分析评估了MDMs的分化状态与HBeAg, HBV DNA, AST, ALT之间的相关性。使用ROC曲线评估CD163⁺CD206⁺MDMs识别HBeAg血清转化和无法检测到的HBV DNA水平的能力,并使用ROC曲线下面积(area under ROC, AUROC)来量化诊断和预测价值。利用尤登指数确定最佳阈值(cut-off),此外,还使用敏感性(sensitivity),特异性(specificity),阳性预测值(positive predictive value, PPV)和阴性预测值(negative predictive value, NPV)进行辅助评估。Mauchly检验用于球形检验,而重复测量方差分析(analysis of variance, ANOVA)则用于分析核苷(酸)类似物抗病毒治疗过程中MDMs的动

态变化。检验水准 $\alpha = 0.05$, 双侧 $P < 0.05$ 被认为具有统计学意义。流式细胞技术结果使用 Flowjo Vx.0.7 软件进行分析, 统计学分析均通过 BMI SPSS 软件版本 23.0 和 GraphPad Prism 软件版本 8.0 进行。

2 结果

2.1 临床基线资料

研究纳入 101 例慢性乙型肝炎患者(流式细胞技术纳入 86 例, qPCR 纳入 15 例)和 20 例健康对照(流式细胞技术纳入 12 例, qPCR 纳入 8 例), 临床基线资料如表 2, 慢性乙型肝炎组(CHB)组和健康对照组(HC)的男女比例两组间无明显统计学差异($P = 0.40$)。同样, HC 组和 CHB 组的年龄亦无明显统计学差异($P = 0.69$)。入组 CHB 患者的肝功能、HBV 病毒学检查结果如下表 1 所示。

2.2 慢性乙型肝炎组中 CD163⁺CD206⁺MDMs 的比例较健康对照组降低

研究显示慢性乙型肝炎患者中 CD163⁺CD206⁺MDMs 的比例低于健康对照组($P = 0.004$; 图 1B), 两组间 CD80⁺HLA-DR⁺MDMs 的比例没有统计学差异($P = 0.082$; 图 1C)。为了进一步探讨慢性乙型肝炎巨噬细胞极化与 HBV 血清病毒学状态的关系, 我们比较研究了 HBeAg 阳性(HBeAg > 1 COI/mL), HBeAg 阴性(HBeAg < 1 COI/mL), HBV

DNA > 100 U/mL, HBV DNA < 100 U/mL 各个亚组中的 MDMs 的极化状态。研究显示 HBeAg 阳性组 CD163⁺CD206⁺MDMs 的比例低于 HBeAg 阴性组($P = 0.030$; 图 1D)。同样, HBV DNA > 100 U/L 组的 CD163⁺CD206⁺MDMs 的比例减少($P = 0.042$; 图 1E)。这些结果表明, 慢性乙型肝炎 MDMs 的分化状态与 HBV 血清病毒学密切相关(图 1)。

2.3 CD163⁺CD206⁺MDMs 与 AST、ALT、HBeAg 及 HBV DNA 水平均呈负相关

我们研究显示 CD163⁺CD206⁺MDMs 与 HBV DNA(r 95%CI 为 -0.357(-0.544, -0.137))、HBeAg(r 95%CI 为 -0.270(-0.473, -0.038))均呈负相关(图 2A、B)。此外, 研究显示 CD163⁺CD206⁺MDMs 与 AST($r = -0.228$; 95%CI(-0.437, 0.004; 图 2C)、ALT($r = -0.251$; 95%CI(-0.458, -0.019; 图 2D)均呈负相关。然而, CD80⁺HLA-DR⁺MDMs 与 HBeAg、HBV DNA、AST、ALT 的相关性均无统计学意义。值得注意的是, HBsAg 与 MDMs 的分化状态的相关性均无统计学意义。

2.4 CD163⁺CD206⁺MDMs 对慢性乙型肝炎 HBV DNA 检测不到率和 HBeAg 血清学转换率的预测

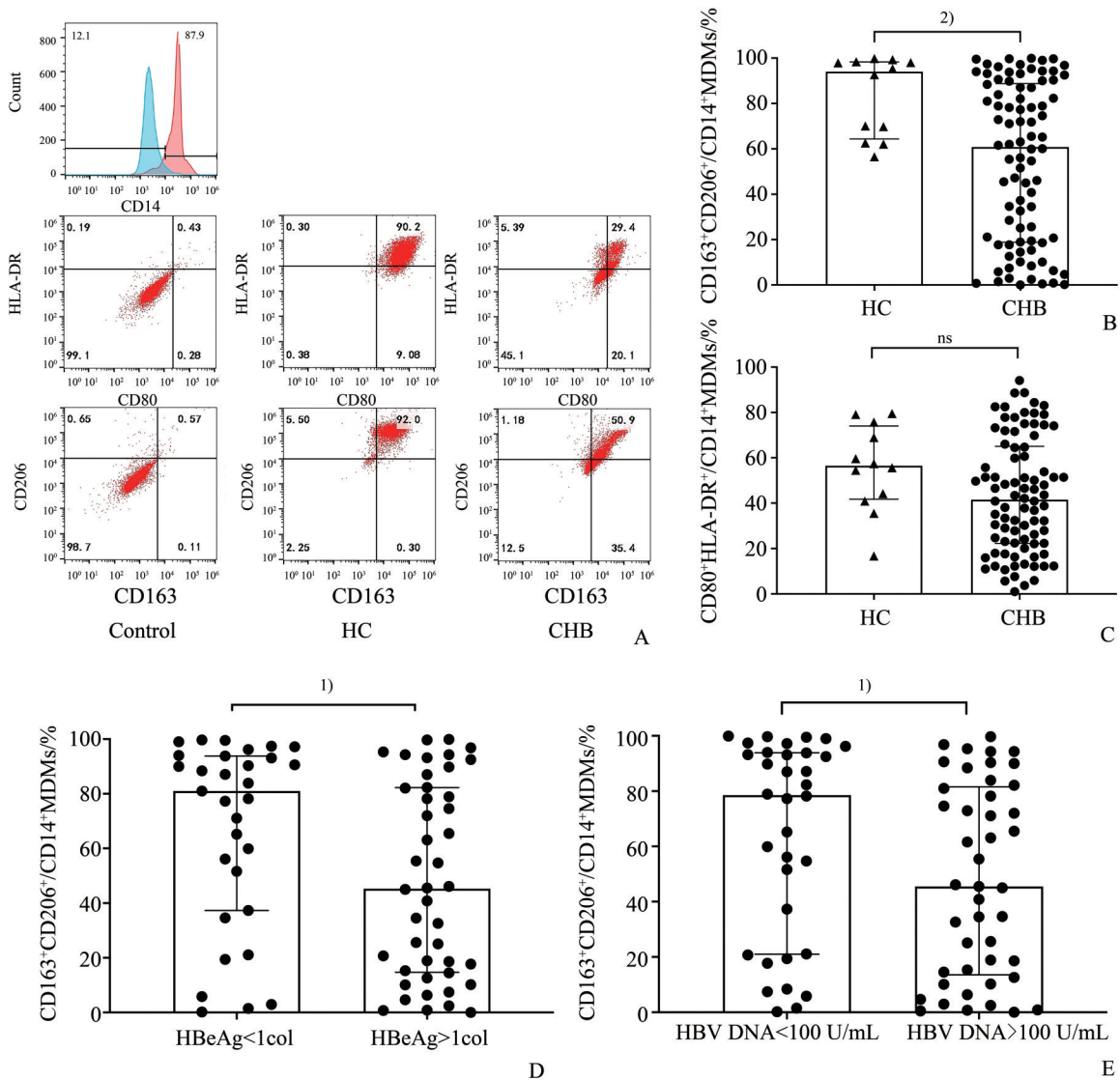
研究显示 ROC 曲线评估 CD163⁺CD206⁺MDMs 比例对 HBeAg 血清转化、HBV DNA 检测不到的诊断价值, 分别为 ROC95%CI 为 0.740(0.634, 0.847)(图 3A)和 0.705(0.594, 0.815)。设尤登指数为最佳诊断临界值, CD163⁺CD206⁺MDMs 诊断 HBeAg 血

表 1 临床基线资料

Table 1 Baseline characteristics of patients

Characteristics	HC ($n = 20$)	CHB ($n = 101$)	Test statistic	P
Sex (Female/Male)	7/13	26/75	0.72	0.40
Age /years	37 (24~50)	35 (29~40)	0.40	0.69
ALT/(U/L)	NA	40.00 (28.00~88.25)	NA	NA
AST/(U/L)	NA	32.00 (27.00~44.00)	NA	NA
γ GGT/(U/L)	NA	24.00 (19.00~42.50)	NA	NA
TBA/(μ mol/L)	NA	4.80 (2.75~8.38)	NA	NA
AFP/(μ g/L)	NA	3.81 (2.10~4.93)	NA	NA
MONO/%	NA	7.30 (6.48~8.53)	NA	NA
HBsAg/(U/mL)	NA	2746.50 (1314.50~8019.75)	NA	NA
HBeAg/(COI/mL)	NA	5.14 (0.12~1039.00)	NA	NA
HBV DNA/(U/mL)	NA	250.00 (50.00~47500.00)	NA	NA

Data are shown as medians (interquartile range) for non-normally distributed variables. $P < 0.05$ was considered statistically significant. ALT: alanine transferase; AST: aspartate transaminase; γ GGT: γ -glutamyl transpeptidase; TBA: total bile acid; MONO%: the rate of monocyte; AFP: alpha fetoprotein; HBeAg: Hepatitis B e antigen; HBsAg: Hepatitis B surface antigen. NA: not available



A: Schematic diagram of the polarization of MDMs in undyed control, HC and CHB. B-C: The polarization of MDMs between patients with CHB and HC; D-E: The polarization of MDMs in patients with HBeAg-positive, HBeAg-negative, HBV DNA > 100 U/L, HBV DNA < 100 U/mL. 31 patients with HBeAg-negative and 44 patients HBeAg-positive were included. 34 patients with HBV DNA < 100 U/mL and 45 patients with HBV DNA > 100 U/mL were included. The Mann-Whitney test was used for statistical analysis. "ns": not statistically significant; 1) $P < 0.05$; 2) $P < 0.01$; HC: healthy control; CHB: chronic hepatitis B.

图1 慢性乙型肝炎患者不同疾病阶段中MDMs的分化差异

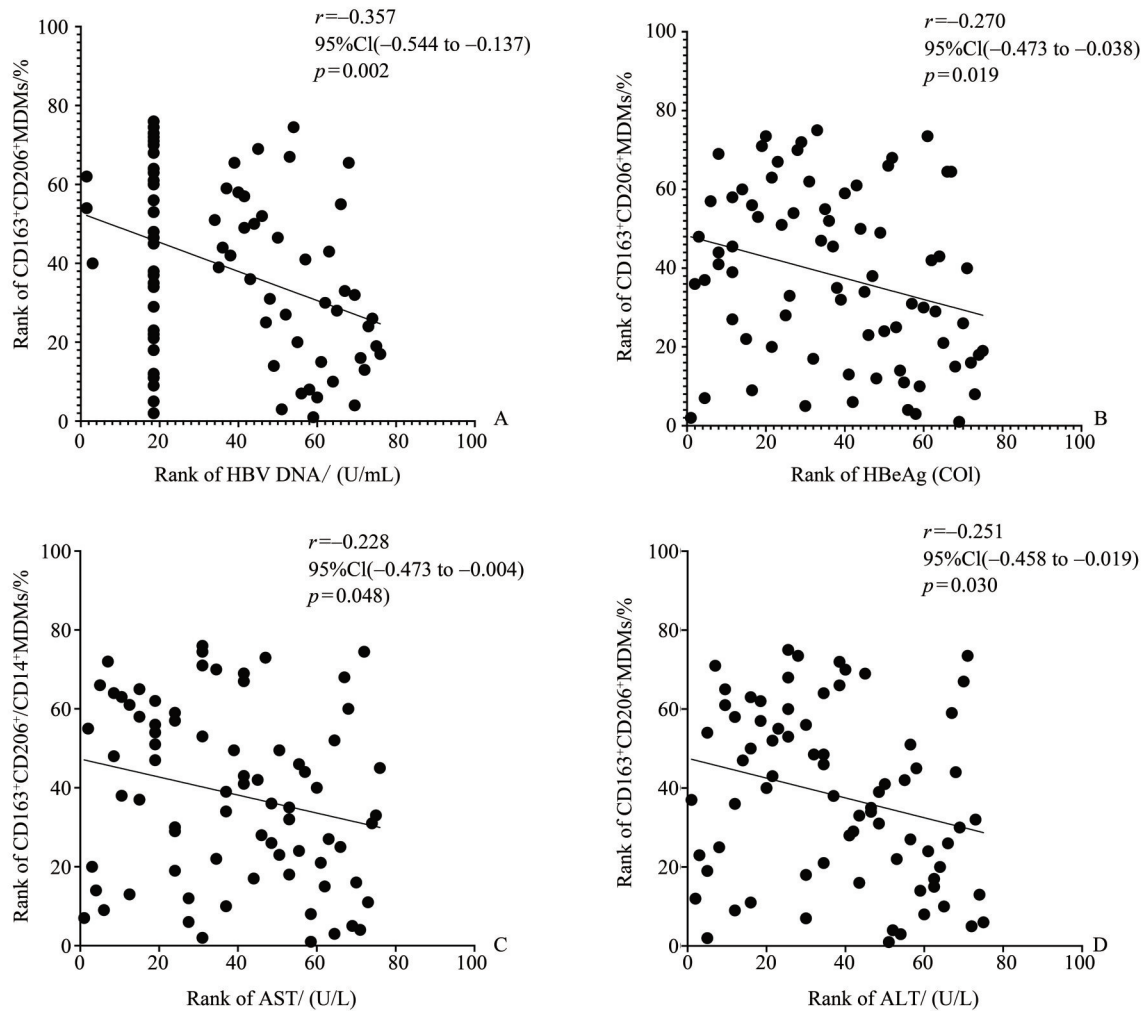
Fig. 1 Polarization of MDMs in CHB patients with different virological states

清转化、HBV DNA水平检测不到率的阈值分别为56%和49%。基于诊断临界值的敏感性、特异性、阳性预测值和阴性预测值如表2所示。ROC曲线分析显示,CD163⁺CD206⁺MDMs对慢性乙型肝炎HBV DNA水平检测不到和HBeAg血清转化率具有一定预测价值。

2.5 慢性乙型肝炎患者核苷(酸)类似物抗病毒治疗过程中MDMs极化状态的动态变化

我们研究显示,在CHB核苷(酸)类似物抗病

毒治疗前6个月中,随着抗病毒治疗的进行,CD163⁺CD206⁺MDMs比例在逐渐增加($F_{(2,34)} = 16.756, P < 0.001$)。相反,CD80⁺HLA-DR⁺MDMs比例逐渐降低($F_{(2,34)} = 6.141, P = 0.005$;图4A)。与此对应,血清HBsAg($F_{(2,34)} = 3.283, P = 0.0496$)和HBV DNA也逐渐下降($F_{(2,34)} = 16.416, P < 0.001$;图4B)。这些结果提示CHB抗病毒治疗过程中,M1型与M2型巨噬细胞比例随着HBV DNA的降低呈现动态的变化。



A-B: Correlation between CD163⁺CD206⁺MDMs and HBV DNA, HBeAg. C-D: Correlation between CD163⁺CD206⁺MDMs and AST, ALT. 76 patients with CHB were enrolled. The Spearman's correlation test was used for statistical analysis, and $P < 0.05$ was considered as statistically significant. "r": Spearman's product-moment correlation coefficient; 95%CI: 95% confidence interval.

图2 CD163⁺CD206⁺MDMs与HBeAg、HBV DNA、AST、ALT之间的相关性

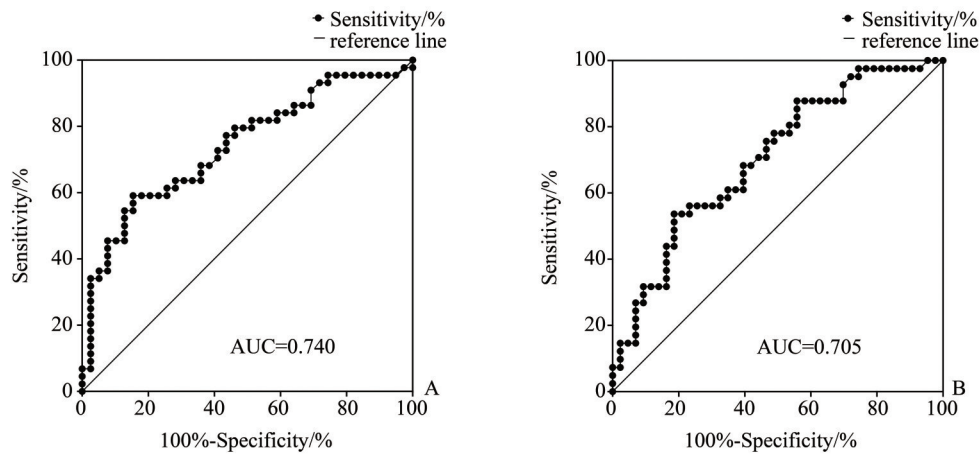
Fig. 2 Correlation between CD163⁺CD206⁺MDMs and HBeAg, HBV DNA, AST, ALT

2.6 ETV和TDF抗HBV治疗过程中对MDMs极化状态的动态变化

研究显示随着抗病毒治疗的进行,HBsAg和HBV DNA水平均逐渐下降,ETV组和TDF组间HBsAg ($F_{(1,16)} = 1.074, P = 0.315$;图5A)和HBV DNA ($F_{(1,16)} = 0.924, P = 0.351$;图5B)的下降幅度的差异均无统计学意义。此外,我们研究发现,在慢性乙型肝炎的抗病毒治疗前6个月,ETV组和TDF组间MDMs分化状态的动态变化无统计学意义 ($F_{(1,16)} = 0.020, P = 0.890$ 和($F_{(1,16)} = 0.165, P = 0.690$;图5C-D)。研究结果提示ETV和TDF在慢性乙型肝炎的早期抗病毒治疗中对MDMs的影响和抗HBV效果的差异均无统计学意义。

2.7 慢性乙型肝炎患者MDMs中的炎症因子的表达

为了研究慢性乙型肝炎患者MDMs中的炎症因子的表达情况,采用qPCR分析了从15例慢性乙型肝炎患者和7名健康供体中获得的MDMs。与流式细胞仪检测结果一致的是,慢性乙型肝炎患者MDMs的抑炎因子IL-10的mRNA水平低于正常对照组 ($P = 0.040$;图6D)。然而,两组间促炎因子TNF- α , IL-1 β , IL-6和抑炎因子TGF- β 的差异均无统计学意义。这些发现使我们了解了慢性乙型肝炎患者MDMs中炎症因子的多种表达。



A: ROC curve for CD163⁺CD206⁺ MDMs in predicting HBeAg seroconversion. B: ROC curve for CD163⁺CD206⁺ MDMs in predicting undetectable HBV DNA level. 86 patients with CHB were enrolled in the study. AUROC: area under ROC curve.

图3 CD163⁺CD206⁺MDMs对HBeAg血清转化率、HBV DNA检测不到率的预测

Fig. 3 ROC curve for CD163⁺CD206⁺ MDMs in predicting HBeAg seroconversion and undetectable HBV DNA

表2 CD163⁺CD206⁺MDMs对HBeAg血清转化率、HBV DNA检测不到率的预测统计结果

Table 2 The predicting value of CD163⁺CD206⁺ MDMs in HBeAg seroconversion and undetectable HBV DNA

Parameters	Cut-off	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
HBeAg seroconversion	56%	85%	59%	81%	65%
Undetectable HBV DNA	49%	81%	54%	73%	65%

3 讨论

3.1 主要发现

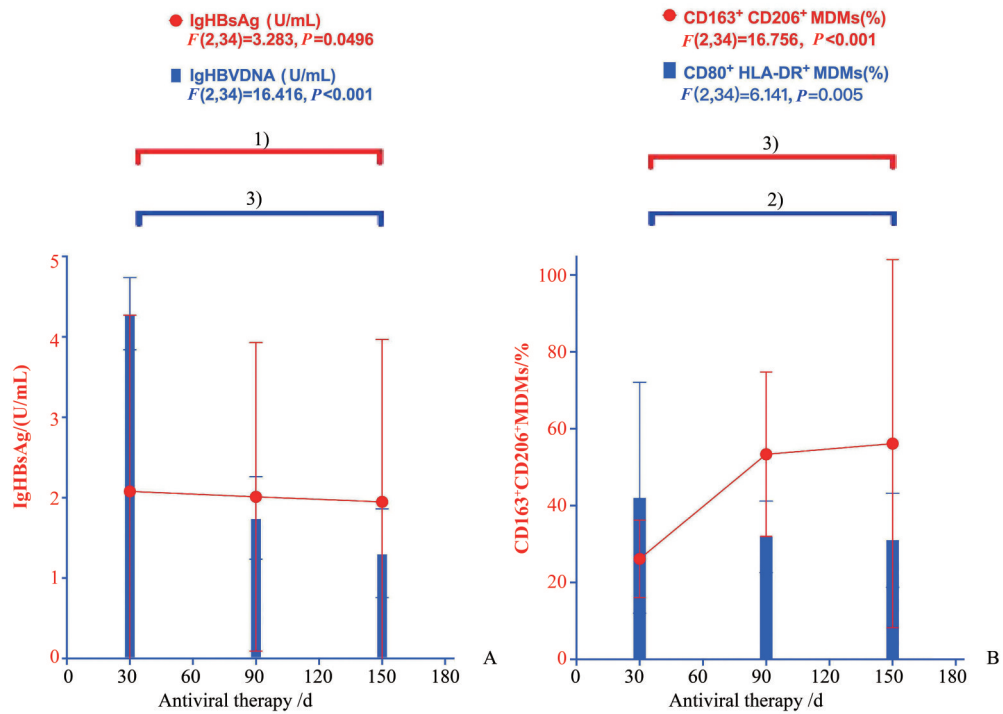
我们的结果表明,慢性乙型肝炎患者中CD163⁺CD206⁺MDMs的比例下降,并与HBeAg、HBV DNA、AST和ALT均呈负相关。与之对应的是,我们发现抑炎细胞因子IL-10在慢性乙型肝炎患者的MDMs中的mRNA水平表达减少。在核苷(酸)类似物抗病毒治疗的早期,CD163⁺CD206⁺MDMs的减少得到明显改善,而CD80⁺HLA-DR⁺MDMs的比例却对应地下降。但不同抗病毒药物(ETV和TDF)间的抗HBV疗效和对MDMs的影响的差异均无统计学意义。另外,ROC曲线分析提示CD163⁺CD206⁺MDMs可以预测HBeAg血清学转化率和HBV DNA检测不到率。

3.2 创新点与意义

Yi等^[15]报道,乙型肝炎核心抗原可以选择性抑制M2型巨噬细胞。Zhang等^[16]指出,HCV感染抑制了单核细胞向M1型和M2型巨噬细胞极化,从而导致了炎性细胞因子(比如IL-10)的表达降低。

总的来说,在慢性病毒性肝炎中,CD163⁺CD206⁺MDMs的极化功能和分泌功能均是受损,这种受损可通过抗病毒治疗修复免疫功能障碍来获得部分恢复^[16-17]。这个结果和我们的研究发现慢性乙型肝炎患者中CD163⁺CD206⁺MDMs的比例下降的结果一致,也可以解释CD163⁺CD206⁺MDMs在抗病毒治疗中的动态变化。

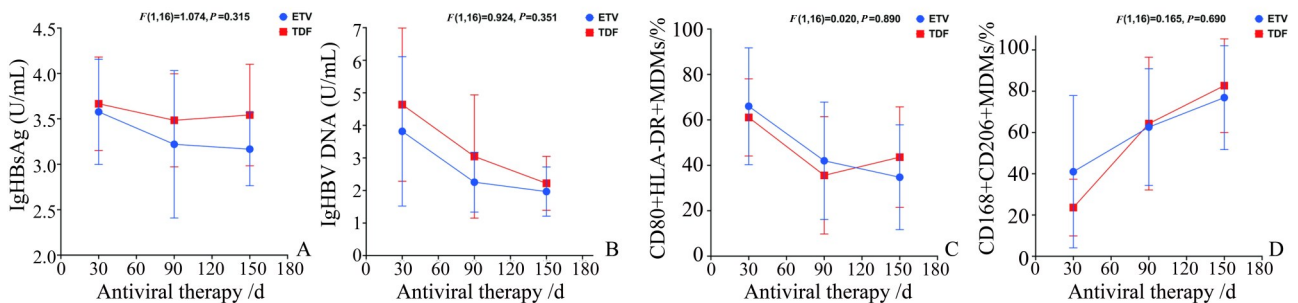
然而,我们研究的部分结果与既往的研究也有不同之处。比如,Laursen等^[18]报道,慢性乙型肝炎患者的血清sCD163(soluble CD163, sCD163),sMR(soluble mannose receptor, sMR)和肝脏巨噬细胞表达的CD163显著升高,经过抗病毒治疗后上述指标均降低。造成我们研究与他人研究的差异可能有两个方面原因。一方面是使用不同方法检测巨噬细胞产生的特异性标志物,Laursen等^[18]使用免疫组化技术检测肝脏CD163的表达,并使用酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)测定血清sCD163和sMR。与此不同的是,我们直接检测了MDMs中的生物标志物。另一方面可能是统计方法的不同,我们实验将CD163⁺CD206⁺巨噬细胞定义为抑炎巨噬细胞,将CD80⁺HLA-



A: The dynamic processes of polarization of MDMs. B: Both serum HBV DNA and HBsAg gradually decreased during antiviral therapy. 18 patients with CHB were serially enrolled for three times in the first 6 months of antiviral therapy, Day30, Day90 and Day150. ANOVA repeated measures was used to perform the data analysis. “ns”: not statistically significant; 1): $P < 0.05$; 2): $P < 0.01$; 3): $P < 0.001$.

图 4 抗病毒治疗过程中 MDMs 和乙肝病毒血清学的动态变化

Fig. 4 Dynamic changes of antiviral treatments on MDMs and virology over time



A-B: There was no significant difference in the efficacy of ETV and TDF on both HBeAg and HBV DNA. C-D: There was no significant difference in the efficacy of ETV and TDF on the polarization of MDMs. Eight patients treated with ETV and 10 patients treated with TDF were enrolled. ANOVA repeated measures was used to perform the data analysis, and $P < 0.05$ was considered as statistically significant.

图 5 ETV 和 TDF 抗病毒治疗 CHB 前 6 个月的对 MDMs 的极化状态的动态变化的比较

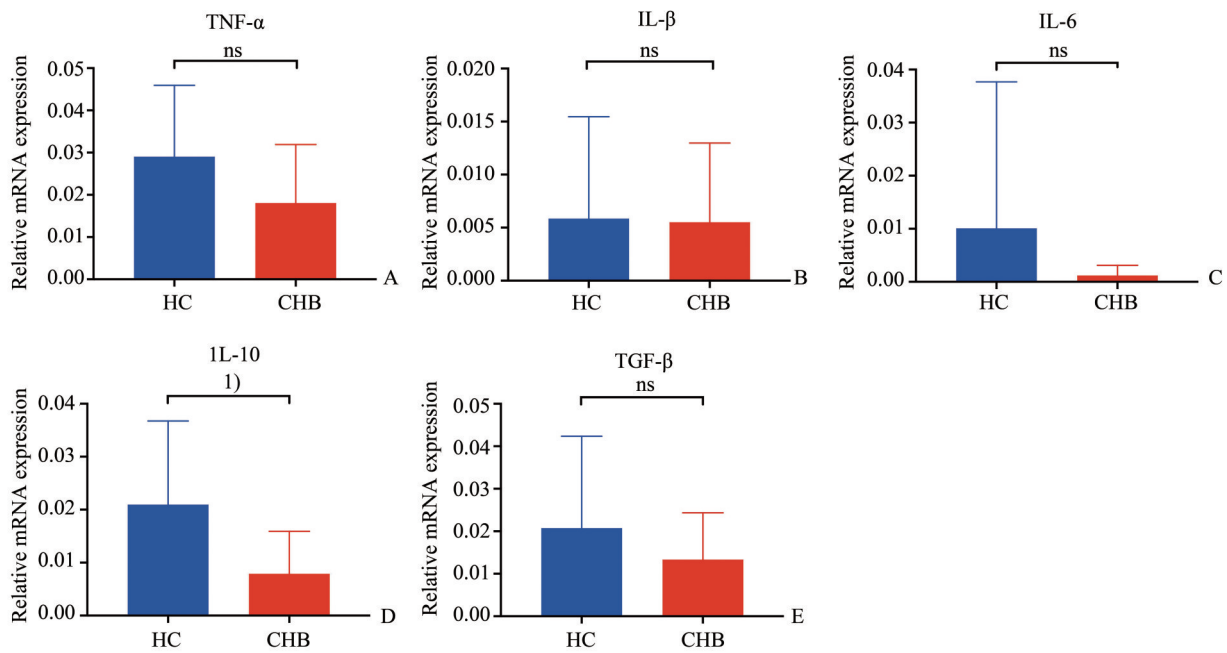
Fig. 5 Comparison of the dynamic processes of polarization of MDMs of CHB in the treatment by ETV and TDF

DR⁺巨噬细胞定义为促炎巨噬细胞,并将双阳性极化巨噬细胞占总成熟巨噬细胞的百分比用于统计(图 1)。但是,Laursen 等^[18]直接使用血清浓度和肝脏表达量用于统计分析。

我们研究也有一些局限性。首先,上述的二分类(M1 型/M2 型)过于单一,可能无法完全说明巨噬细胞的可塑性和异质性^[19-20],不同分化的巨噬细胞的表型仍需要进一步研究。第二,我们发现

CD80+HLA-DR⁺MDMs 在慢性乙型肝炎患者中有明显下降的趋势($P=0.082$),但无统计学意义,可能需要更大的样本量来探索。最后,尽管我们发现感染患者的 IL-10 降低的证据,但对于其他炎症细胞因子,qPCR 的样本量可能不足以产生如此小的 P 值,因此有必要进行进一步研究。

我们研究的主要优势是探索了慢性乙型肝炎不同疾病阶段中 MDMs 的极化状态的差异与抗病



A-E: The mRNA of MDMs derived inflammatory cytokines of including TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 and TGF- β . "ns": not statistically significant; 1) $P < 0.05$. HC: healthy control; CHB: chronic hepatitis B.

图6 慢性乙型肝炎中单核细胞衍生的巨噬细胞炎症细胞因子的RNA水平表达

Fig. 6 mRNA expression of inflammatory cytokines of MDMs in CHB

毒治疗期间MDMs极化状态的动态变化,从而阐明了MDMs在慢性乙型肝炎的免疫炎症反应中的关键作用。为了研究不同核苷(酸)类似物抗病毒药物对巨噬细胞极化状态的影响,我们比较研究了ETV和TDF对MDMs极化状态的影响,研究提示不同核苷(酸)类似物抗病毒药物(ETV和TDF)在抗病毒治疗早期对MDMs极化状态的影响的差异无统计学意义。同时我们研究提示MDMs的极化状态与CHB的病毒血清学之间密切相关,检测MDMs的极化可能可以预测慢性乙型肝炎在抗HBV治疗过程中的HBV DNA检测不到率和HBeAg血清学转化率。

3.3 结论

总而言之,我们研究发现慢性乙型肝炎患者中CD163⁺CD206⁺MDMs减少,这与慢性乙型肝炎的病

毒学以及肝炎严重性呈负相关。在核苷(酸)类似物抗病毒治疗过程中CD163⁺CD206⁺MDMs的动态变化,可能预测慢性乙型肝炎在抗HBV治疗过程中的HBV DNA检测不到率和HBeAg血清学转化率。

目前,巨噬细胞在慢性乙型肝炎中的重要作用越来越明显,各种研究已经研究了巨噬细胞活化与HBV感染疾病进程之间的联系^[21-23],例如,Kazankov等^[24]人阐述了血清sCD163的升高与肝纤维化的组织学分级密切相关,此外,在肝硬化甚至急性肝损伤中,sCD163和sMR均显著升高^[22-23]。因此,我们推测巨噬细胞的极化状态与慢性乙型肝炎相关的肝硬化和肝衰竭的预后相关,探索巨噬细胞极化在肝硬化以及急性肝衰竭中的作用仍需进一步研究。

参考文献

- [1] Dandri M, Locarnini S. New insight in the pathobiology of hepatitis B virus infection[J]. Gut, 2012, 61 Suppl 1: i6-17.
- [2] Seeger C, Mason WS. Molecular biology of hepatitis B virus infection[J]. Virology, 2015, 479-480: 672-86.
- [3] Wu YL, Shen CL, Chen XY. Antiviral treatment for chronic hepatitis B: Safety, effectiveness, and prognosis[J]. World J Clin Cases, 2019, 7(14): 1784-1794.
- [4] Yim HJ, Kim JH, Park JY, et al. Comparison of clinical practice guidelines for the management of chronic

- hepatitis B: When to start, when to change, and when to stop[J]. *Clin Mol Hepatol*, 2020, 26(4): 411-429.
- [5] Pol S, Lampertico P. First-line treatment of chronic hepatitis B with entecavir or tenofovir in 'real-life' settings: from clinical trials to clinical practice[J]. *J Viral Hepat*, 2012, 19(6): 377-386.
- [6] Han SH, Tran TT. Management of chronic hepatitis B: an Overview of Practice Guidelines for Primary Care Providers [J]. *J Am Board Fam Med*, 2015, 28(6): 822-837.
- [7] Ke W, Liu L, Zhang C, et al. Comparison of efficacy and safety of tenofovir and entecavir in chronic hepatitis B virus infection: a systematic review and meta-analysis [J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e98865.
- [8] Trombetta AC, Soldano S, Contini P, et al. A circulating cell population showing both M1 and M2 monocyte/macrophage surface markers characterizes systemic sclerosis patients with lung involvement [J]. *Respir Res*, 2018, 19(1): 186.
- [9] Mily A, Kalsum S, Loreti MG, et al. Polarization of M1 and M2 human monocyte-derived cells and analysis with flow cytometry upon mycobacterium tuberculosis infection [J]. *J Vis Exp*, 2020, (163): 10.3791/61807.
- [10] Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(9): 6425-6440.
- [11] Davies LC, Jenkins SJ, Allen JE, Taylor PR. Tissue-resident macrophages [J]. *Nat Immunol*, 2013, 14(10): 986-995.
- [12] Li TY, Yang Y, Zhou G, Tu ZK. Immune suppression in chronic hepatitis B infection associated liver disease: a review [J]. *World J Gastroenterol*, 2019, 25(27): 3527-3537.
- [13] 王贵强, 王福生, 成军, 等. 慢性乙型肝炎防治指南(2015年版)[J]. *实用肝脏病杂志*, 2016, 19(3): 389-400.
- Wang GQ, Wang FS, Cheng J, et al. The guideline of prevention and treatment for chronic hepatitis B: a 2015 update [J]. *J Clin Hepat*, 2016, 19(3): 389-400.
- [14] Zarif JC, Hernandez JR, Verdone JE, et al. A phased strategy to differentiate human CD14+ monocytes into classically and alternatively activated macrophages and dendritic cells[J]. *Biotechniques*, 2016, 61(1): 33-41.
- [15] Yi H, Zhang Y, Yang X, et al. Hepatitis B core antigen impairs the polarization while promoting the production of inflammatory cytokines of M2 macrophages via the TLR2 pathway [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 535.
- [16] Zhang Q, Wang Y, Zhai N, et al. HCV core protein inhibits polarization and activity of both M1 and M2 macrophages through the TLR2 signaling pathway [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 36160.
- [17] Wu J, Han M, Li J, et al. Immunopathogenesis of HBV Infection [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2020, 1179: 71-107.
- [18] Laursen TL, Wong GL, Kazankov K, et al. Soluble CD163 and mannose receptor associate with chronic hepatitis B activity and fibrosis and decline with treatment [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2018, 33(2): 484-491.
- [19] Tacke F, Zimmermann HW. Macrophage heterogeneity in liver injury and fibrosis [J]. *J Hepatol*, 2014, 60(5): 1090-1096.
- [20] Gantzel RH, Kjær MB, Laursen TL, et al. Macrophage activation markers, soluble CD163 and mannose receptor, in liver fibrosis [J]. *Front Med (Lausanne)*, 2021, 7: 615599.
- [21] Kazankov K, Barrera F, Møller HJ, et al. Soluble CD163, a macrophage activation marker, is independently associated with fibrosis in patients with chronic viral hepatitis B and C [J]. *Hepatology*, 2014, 60(2): 521-530.
- [22] Waidmann O, Brunner F, Herrmann E, et al. Macrophage activation is a prognostic parameter for variceal bleeding and overall survival in patients with liver cirrhosis [J]. *J Hepatol*, 2013, 58(5): 956-961.
- [23] Rainer F, Horvath A, Sandahl TD, et al. Soluble CD163 and soluble mannose receptor predict survival and decompensation in patients with liver cirrhosis, and correlate with gut permeability and bacterial translocation [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2018, 47(5): 657-664.
- [24] Kazankov K, Rode A, Simonsen K, et al. Macrophage activation marker soluble CD163 may predict disease progression in hepatocellular carcinoma [J]. *Scand J Clin Lab Invest*, 2016, 76(1): 64-73.