述评

对乙型肝炎病毒感染天然免疫应答的新认识是对以往“隐形病毒”概念的挑战

Innate Response to Hepatitis B Virus Infection: Observations Challenging the Concept of a Stealth Virus

马世武 蒋小滔 译　侯金林 审校

见第 1773 页文章

乙型肝炎病毒 (HBV) 感染的结局就如同 HBV 诱导的肝病严重程度一样在不同的患者间变化很大。在感染 HBV 的成人患者中，大约 95% 会发展成为急性感染，迅速地康复而没有长期的影响；然而，剩下 5% 的患者因不能控制病毒而进展为慢性感染。慢性乙型肝炎 (CHB) 患者提高了发展为肝硬化、肝细胞癌等严重肝病的危险性 [1]。目前，HBV 被认为是非细胞致病性的病毒，HBV 相关的肝损害是长期细胞毒性免疫应答作用于受染肝细胞所致 [2,3]。一般来说，天然免疫和适应性免疫系统元件都参与了病毒感染的免疫应答。天然免疫对于感染后早期控制病毒复制和病毒扩散是非常重要的，同时它的重要性还在于对病毒特异性适应性免疫应答进行定时地组织 [4]。关于 HBV，已经清楚地显示适应性免疫作用对于有效和持续地控制病毒是必需的 [2,3]。然而，对于天然免疫作用则难以分析，这归因于 HBV 感染被诊断通常是在感染发病数周以后，而那时病毒水平已经很高。为此，对天然免疫应答在 HBV 感染免疫防御中作用的认识存在争议。

由于肝脏存在丰富的枯否氏细胞 (KCs；肝特异性巨噬细胞)、自然杀伤细胞 (NK) 和自然杀伤性 T 细胞 (NKT)，所以肝脏被认为是一个具有天然免疫特点的器官，在宿主对抗病原体的第一线防御中起到积极地作用 [5,6]。除了专职免疫细胞类型以外，其他实质性细胞 (如肝细胞) 和非实质性细胞也有免疫调节的功能，如通过分泌细胞因子和趋化因子对感染产生应答。另人惊奇地是，一项关于猩猩急性感染 HBV 的研究显示：HBV 不像其他嗜肝病毒 (丙型肝炎病毒、甲型肝炎病毒和戊型肝炎病毒) 一样，在感染早期并不影响宿主细胞的基因转录调控，因此看似不能诱导宿主天然抗病毒免疫应答 [7]。结果 HBV 看成是一个“隐形病毒”，有能力逃避宿主的免疫防线 [8]。在一项土拨鼠的研究中，NK 细胞和 NKT 细胞免疫应答在输注肝致病剂量的土拨鼠肝炎病毒几小时之后就被发动了，但是病毒并没有因为天然免疫系统应答而检测不到 [9]。这些免疫应答至少有部分限制病毒繁殖的能力 (如短暂病毒血症降低的出现)，但不能随后促发适应性免疫应答，因为它的发生延迟了 4-5 周。这些结果提示：天然免疫系统能够非常早地监测到土拨鼠肝炎病毒，但是土拨鼠肝炎病毒能够诱导免疫耐受，延迟适应性免疫应答。因此，肝 DNA 病毒是相当“隐形”的病毒，在感染后能非常有效的中和早期天然免疫应答。一项精巧设计的研究通过人体条件潜在地证实了近来的这些结果。在研究中，两个 HBsAg 血清学阴性献血员，后来发现 HBsAg 和 HBV DNA 阳性而不伴有丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 的升高，他们在 HBV 感染非常早的时期即被全程观察，研究说明：人体天然免疫系统真正有能力在感染早期感知 HBV，并有能力促发 NK 细胞和 NKT 细胞的应答，最后可以封闭 HBV 感染，并及时地诱导适应性免疫应答 [10]。

另外，我们间接的观察结果也提示天然免疫应答在自然控制 HBV 复制方面可能是很重要的。在干

Abbreviations: CHB, chronic hepatitis B; HBsAg, hepatitis B surface antigen; HBeAg, hepatitis B envelope antigen; HBV, hepatitis B virus; IFN, interferon; IL, interleukin; KC, Kupffer cell; NK, natural killer; NKT, natural killer T cell; NPC, nonparenchymal cell; pDC, plasmacytoid denditric cell; PHH, primary human hepatocyte; TLR, Toll-like receptor.

Address reprint requests to: Fabien Zoulim, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), U871 151 Cours Albert Thomas, 69003 Lyon, France. E-mail: fabien.zoulim@inserm.fr; fax: 33 472 681971.

Copyright © 2009 by the American Association for the Study of Liver Diseases.
Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).
DOI 10.1002/hep.23361
Potential conflict of interest: Nothing to report.

扰素 α 受体 1(IFNAR1)、RNA 依赖的蛋白激酶 (PKR) 或是干扰素调控因子 1(IRF1) 等天然免疫应答元件缺陷的 HBV 转基因小鼠模型中，观察到 HBV 复制高于野生型 HBV 转基因小鼠 [11]。近来，通过人体标本研究宿主的基因发现一些 IFNAR1 的基因多态性是与提升 HBV 的易感性相关的 [12]。这一观察结果在另一个单核苷酸多态性变异与高慢性 HBV 感染率关联的研究中得到证实和提练 [13]。而且，不断积累的证据提示：HBV 也能抑制慢性 HBV 感染者天然免疫应答，特别是通过 Toll 样受体 (TLRs) 完成，因为 TLRs 对于免疫专职细胞 (如枯否细胞、树突状细胞 [DC] 和浆性 DC) 和非免疫专职细胞 (如肝细胞) 来说都是病毒感染的主要感受器 [14]。在 CHB 患者中，TLR2 表达水平的确在外周血单个核细胞 (PBMC)、枯否细胞和肝细胞被下调，它受到抑制与 HBeAg 阳性是相关的，这提示在此过程中分泌性包膜蛋白发挥了重要的作用 [15]。在其它研究中显示：CHB 患者外周血单核细胞 TLR1、TLR2、TLR4 和 TLR6 的 mRNA 转录物表达水平明显低于健康对照者，这进一步地证实和延伸了前面初步的研究结果 [16]。近来，Wu 等应用 HBV 转基因鼠模型，证明纯化的 HBV 病毒颗粒、HBeAg 或是 HBsAg 都可以抑制通过刺激肝细胞和非实质肝脏细胞的 TLR3 和 TLR4 引出的天然免疫应答 [17]。在 PBMC 中，浆性 DC 是主要的 I 型干扰素分泌细胞和病毒感染的感受器，因为它即表达 TLR3，又表达 TLR9，这些 TLR 即使在没有病毒复制的情况下也可以分别识别单链的 RNA 和非甲基化的胞嘧啶鸟嘌呤二核苷酸 (CpG) 基序 [18]。近来一项研究报道 CHB 患者浆性 DC 表达 TLR9 水平下降，与浆性 DC 细胞分泌 α 型干扰素 (IFN-α) 受损有关 [19]。这也说明 HBV 能够抑制 TLR9，但不能通过 TLR7 抑制体外培养的浆性 DC 剂量依赖的 IFN-α 分泌水平 [20]。总而言之，这些数据提示 HBV 感染能够通过下调 TLR 的功能性表达，改变由专职细胞和肝细胞触发的天然免疫应答，从而导致 HBV 慢性感染的建立和维持。

发病后，关于早期感知 HBV 还有许多问题亟待解答：(1) 有哪些细胞参与了早期感知 HBV，它们是如何将 HBV 存在的信号传给免疫系统其他细胞的？(2) 这些细胞能以自分泌或旁分泌的形式通过产生细胞因子而直接抗病毒吗？ (3) 参与感知 HBV 的宿主的感应器是什么？ (4) 在急性期以及建立慢性感染的过程中，HBV 是如何抵抗这些天然应答的？要回答这些问题，我们可以使用两个模型在体外研究 HBV 的复制：原代肝细胞 (PHHs)[21] 和肝癌细胞系 (如 HepaRG[22])。Hösel 等用第一个模型探讨了实质细胞和 / 或非实质细胞 (NPCs) 能否感知 HBV，如何感知的，并分析了感知后下游的一些事件 [23]。他们用从手术切除肝组织中分离的 PHHs 和 NPCs 进行体外实验。值得注意的是 PHHs 中含有 3%-5% 的 NPCs(如枯否细胞、肝窦内皮细胞)。结果显示：PHHs 感染 HBV 后，虽然枯否细胞不能复制病毒，但可以识别 HBV。十分有趣的是，HBV 感染后数小时，枯否细胞对 HBV 的识别会活化 NF-κB，并随后引起 IL-6 和其他炎症细胞因子 (IL-8、TNF-α、IL-1β) 的释放。在 Hösel 的实验中，没有观察到 I 型干扰素 (IFN-β) 表达或产生。这些细胞因子的激活是对于之后攻击的瞬时的和抑制性的反应。在 NF-κB 激活后，枯否细胞产生的 IL-6 可以在感染后的短时间内控制 HBV 基因在肝细胞中复制和转录。对于机制的分析揭示：IL-6 激活了丝裂原活化的蛋白激酶 ERK1/2(胞外信号调节蛋白酶 1/2) 和 JNK(c-Jun 基因 N 末端激酶)，这两个蛋白激酶依次抑制肝细胞中对 HBV 复制和转录非常关键的肝细胞核转录因子 -1α 和肝细胞核转录因子 -4α 两个转录因子的表达。因此，文章作者认为 IL-6 确保了对 HBV 复制的早期控制，限制了适应性免疫应答的激活，阻止了受感染肝细胞在感染早期死亡。这个假说与 IL-6 在肝衰竭中有保护性作用是一致的 [24]。或者也可以说，IL-6 的产生是宿主尝试控制病毒复制和清除病毒感染的一个标志。有趣的是，HBV 感染后 IL-6 及其他细胞因子的产生似乎是瞬时的，感染 3-4 天后，IL-6 水平会下降，并维持在基线水平，之后 HBV 的复制水平又会增强，说明了 HBV 可能具有主动地抵抗 IL-6 的作用。所以，HBV 与人巨细胞病毒相似 [25]，有可能进化出一套调节 IL-6 表达或信号通路的机制，并成为 HBV 免疫逃逸策略的组成部分。

奇怪的是，不知何故，HBV 并不能使受染的原代肝细胞诱生 I 型干扰素，即使 I 型干扰素常是由已受 HBV 感染的细胞产生和分泌的 [26-28]。Hösel 等 [23] 的研究结果提示：IFN-β 在转录水平的表达并不是由 HBV 感染引起的。看一下诱导 IFN-β 信使 RNA 翻译的过程是否在暴露 HBV 感染后快速发生将会是很有趣的。在另一项实验中，Lucifora 等用携带完整 HBV 基因组的杆状病毒 (Bac-HBV) 转染 HepaRG 细胞，使细胞系能高水平复制 HBV[29]，结果显示：在没有

NPCs 的情况下，肝细胞可诱导天然抗病毒免疫应答，进而以非细胞病变性的方式清除 HBV DNA[30]。细胞基因表达分析显示：转染了 Bac-HBV 的 HepaRG 细胞其 IFN-β 基因及干扰素刺激基因表达上调，而转染空载体的细胞则没有。当使用中和性抗体或针对 I 型 IFN 受体的 RNAi 抑制 IFN-β 的活性时，病毒复制又得以恢复，从而证实了 IFN-β 在其间的关键作用。这些结果表明：在受感染细胞中，HBV 的大量复制能激发 I 型干扰素反应。

所有这些新近的发现对于我们理解 HBV 感染的生物学特点都有一定的意义，因为病毒复制、表达、肝内扩散和天然免疫应答及适应性免疫应答之间必须达到精确的平衡，HBV 才可能建立慢性感染，否则就会被宿主的免疫应答所控制。

总之，Hösel 等 [23] 以及其他最近的一些体内、体外研究结果为我们提供了新的证据，表明肝脏细胞有可能感知 HBV 感染，并发动抗病毒反应。这种反应可能引起对 cccDNA 转录活性的表观遗传学调控，也可能引起其他下调病毒表达和复制的基因转录和翻译效应。之后，HBV 为了建立慢性感染可能会逃避这种天然免疫应答，或下调某些抗病毒通路，这可以解释已发表文章中一些看上去相互矛盾的结果。实验条件、时间、分析类型不同作为主要的变量因素有可能导致不一样的结果。所有这些发现因可能对于 IFN 反应的恢复或增强有重要临床意义，所以我们要用合适的模型开展更多的研究，以阐明 HBV 诱导天然免疫应答的感受器和效应器、参与诱导天然免疫应答的病毒决定性因素，以及阐明病毒抵抗多种细胞免疫应答建立持续性感染和对外源性 IFN-α 耐药的机制。

(HEPATOLOGY 2009;50:1692-1695)
DAVID DURANTEL
FABIEN ZOULIM
Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), U871, Lyon, France
Université de Lyon, IFR62 Lyon-Est, Lyon, France
Hospices Civils de Lyon, Hôtel Dieu, Service d'Hépatologie et de Gastroentérologie, Lyon, France

参考文献

1. Dienstag JL. Hepatitis B virus infection. N Engl J Med 2008;359:1486-1500.
2. Bertoletti A, Gehring AJ. The immune response during hepatitis B virus infection. J Gen Virol 2006;87:1439-1449.
3. Rehermann B, Nascimbeni M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. Nat Rev Immunol 2005;5:215-229.
4. Biron CA, Sen GN. Innate responses to viral infections. In: Knipe DM, Howley PM, eds. Fields Virology. Volume 1. 5th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2007:249-278.
5. Kanto T. Virus associated innate immunity in liver. Front Biosci 2008;13: 6183-6192.
6. Dong Z, Wei H, Sun R, Tian Z. The roles of innate immune cells in liver injury and regeneration. Cell Mol Immunol 2007;4:241-252.
7. Wieland S, Thimme R, Purcell RH, Chisari FV. Genomic analysis of the host response to hepatitis B virus infection. Proc Natl Acad Sci U S A 2004;101:6669-6674.
8. Wieland SF, Chisari FV. Stealth and cunning: hepatitis B and hepatitis C viruses. J Virol 2005;79:9369-9380.
9. Guy CS, Mulrooney-Cousins PM, Churchill ND, Michalak TI. Intrahepatic expression of genes affiliated with innate and adaptive immune responses immediately after invasion and during acute infection with woodchuck hepadnavirus. J Virol 2008;82:8579-8591.
10. Fisicaro P, Valdatta C, Boni C, Massari M, Mori C, Zerbini A, et al. Early kinetics of innate and adaptive immune responses during hepatitis B virus infection. Gut 2009;58:974-982.
11. Guidotti LG, Morris A, Mendez H, Koch R, Silverman RH, Williams BR, et al. Interferon-regulated pathways that control hepatitis B virus replication in transgenic mice. J Virol 2002;76:2617-2621.
12. Zhou J, Lu L, Yuen MF, Lam TW, Chung CP, Lam CL, et al. Polymorphisms of type I interferon receptor 1 promoter and their effects on chronic hepatitis B virus infection. J Hepatol 2007;46:198-205.
13. Zhou J, Smith DK, Lu L, Poon VK, Ng F, Chen DQ, et al. A nonsynonymous single nucleotide polymorphism in IFNAR1 affects susceptibility to chronic hepatitis B virus infection. J Viral Hepat 2009;16:45-52.
14. Barton GM. Viral recognition by Toll-like receptors. Semin Immunol 2007;19:33-40.
15. Visvanathan K, Skinner NA, Thompson AJ, Riordan SM, Sozzi V, Edwards R, et al. Regulation of Toll-like receptor-2 expression in chronic hepatitis B by the precore protein. HEPATOLOGY 2007;45:102-110.
16. Chen Z, Cheng Y, Xu Y, Liao J, Zhang X, Hu Y, et al. Expression profiles and function of Toll-like receptors 2 and 4 in peripheral blood mononuclear cells of chronic hepatitis B patients. Clin Immunol 2008;128:400-408.
17. Wu J, Meng Z, Jiang M, Pei R, Trippler M, Broering R, et al. Hepatitis B virus suppresses toll-like receptor-mediated innate immune responses in murine parenchymal and nonparenchymal liver cells. HEPATOLOGY 2009; 49:1132-1140.
18. Fitzgerald-Bocarsly P, Dai J, Singh S. Plasmacytoid dendritic cells and type I IFN: 50 years of convergent history. Cytokine Growth Factor Rev 2008; 19:3-19.
19. Xie Q, Shen HC, Jia NN, Wang H, Lin LY, An BY, et al. Patients with chronic hepatitis B infection display deficiency of plasmacytoid dendritic cells with reduced expression of TLR9. Microbes Infect 2009;11:515-523.
20. Vincent IE, Hasan U, Lucifora J, Trepo C, Chemin I. Hepatitis B virus inhibits TLR-g mediated interferon alpha secretion in plasmacytoid dendritic cells. In: 58th Annual Meeting of the American-As-

sociation-for-the-Study-of-Liver-Diseases; 2007 Nov 02-06; Boston, MA: John Wiley and Sons Inc, 2007. p. 926.
21. Gripon P, Diot C, Theze N, Fourel I, Loreal O, Brechot C, et al. Hepatitis B virus infection of adult human hepatocytes cultured in the presence of dimethyl sulfoxide. J Virol 1988;62:4136-4143.
22. Gripon P, Rumin S, Urban S, Le Seyec J, Glaise D, Cannie I, et al. Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. Proc Natl Acad Sci U S A 2002;99:15655-15660.
23. Hösel M, Quasdorff M, Wiegmann K, Webb D, Zedler U, Broxtermann M, et al. Not interferon, but IL-6 controls early gene expression in HBV infection. HEPATOLOGY 2009;50:1773-1782.
24. Luedde T, Trautwein C. Intracellular survival pathways in the liver. Liver Int 2006;26:1163-1174.
25. Gealy C, Denson M, Humphreys C, McSharry B, Wilkinson G, Caswell R. Posttranscriptional suppression of interleukin-6 production by human cytomegalovirus. J Virol 2005;79:472-485.
26. Randall RE, Goodbourn S. Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. J Gen Virol 2008;89:1-47.
27. Samuel CE. Antiviral actions of interferons. Clin Microbiol Rev 2001;14: 778-809.
28. Martinon F, Mayor A, Tschopp J. The inflammasomes: guardians of the body. Annu Rev Immunol 2009;27:229-265.
29. Lucifora J, Durantel D, Belloni L, Barraud L, Villet S, Vincent IE, et al. Initiation of hepatitis B virus genome replication and production of infectious virus following delivery in HepG2 cells by novel recombinant baculovirus vector. J Gen Virol 2008;89:1819-1828.
30. Lucifora J, Durantel D, Testoni B, Hantz O, Levrero M, Zoulim F. Control of hepatitis B virus replication by innate response of HepaRG cells. HEPATOLOGY 2009; doi:10.1002/hep.23230.