

乙肝患者外周血 Th17 与 Treg 细胞的表达与临床意义

朱轶晴¹,汪晓莺¹,汤伟^{2*},孙强²

(¹南通大学医学院免疫学系,江苏南通 226001;²南通大学附属医院感染科,江苏南通 226001)

[摘要] 目的:探讨乙肝患者外周血 Th17 与 Treg 细胞的表达情况及与临床指标的相关性。方法:采集 17 例慢性乙肝患者(CHB 组)、13 例急性乙肝患者(AHB 组)和 14 例健康者(对照组)外周血,流式细胞术分析 Th17 和 Treg 细胞的频率;酶联免疫吸附测定血清 IL-17 的水平,实时定量 PCR 法检测 HBV DNA 载量,速率法检测 ALT 水平。结果:AHB 组、CHB 组外周血 Th17 细胞频率和 IL-17 水平高于对照组($P < 0.05$);CHB 组外周血 Treg 细胞频率高于对照组($P < 0.01$),而 AHB 组和对照组之间差异无统计学意义($P > 0.05$);与对照组相比,AHB 组外周血 Th17/Treg 比值显著增高而 CHB 组明显降低($P < 0.05$);AHB 组、CHB 组外周血 Th17 细胞频率和 Th17/Treg 比值与 ALT 水平成正相关,Treg 细胞频率与 HBV DNA 载量成正相关。结论:乙肝患者外周血存在 Th17、Treg 细胞表达异常和 Th17/Treg 相对失衡,并与 ALT 水平、HBV DNA 载量具有一定的相关性,提示 Th17 和 Treg 细胞可能在乙型肝炎的发病机制中起着比较重要的作用。

[关键词] Th17 细胞;Treg 细胞;乙型肝炎

[中图分类号] R512.62

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)12-1702-05

doi:10.7655/NYDXBNS20131212

Expression levels and clinical significance of T helper type 17 and T regulatory cells in the peripheral blood from patients with hepatitis B

Zhu Yiqing¹, Wang Xiaoying¹, Tang Wei^{2*}, Sun Qiang²

(¹Department of Immunology, Medical College, Nantong University, Nantong 226001; ²Department of Infectious Disease, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the expression of T helper type 17 (Th17) cells and T regulatory (Treg) cells in the peripheral blood from patients with hepatitis B, and study the relationship between Th17, Treg cells, and clinical parameters. **Methods:** The frequencies of peripheral Treg and Th17 cells of seventeen chronic hepatitis B (CHB) patients, thirteen acute hepatitis B (AHB) patients and fourteen healthy controls (HC) were determined by flow cytometry. Serum concentration of cytokine interleukin (IL)-17 was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The HBV DNA loads were measured by Real-time PCR. The level of serum alanine aminotransferase (ALT) was measured by velocity method. **Results:** In the periphery of CHB and AHB patients, both Th17 frequency and serum level of IL-17 were significantly increased than those in HC subjects ($P < 0.05$). The peripheral Treg frequency in CHB patients was significantly higher compared with HC subjects ($P < 0.01$), whereas there was no significant difference between AHB patients and HC subjects ($P > 0.05$). Compared with HC subjects, the peripheral Th17/Treg ratio of CHB patients was dramatically lower whereas the ratio in AHB patients were significantly higher ($P < 0.05$). The peripheral Th17 frequency and Th17/Treg ratio were positively correlated with ALT level whereas Treg frequency was positively correlated with HBV-DNA load. **Conclusion:** In the periphery of patients with hepatitis B, the expression levels of Th17 and Treg cells were both abnormal, meanwhile, there was a relative Th17/Treg imbalance. Furthermore, the peripheral Th17 frequency, Treg frequency as well as the ratio of Th17/Treg were positively correlated with the level of ALT and HBV DNA load. It is suggested that Th17 and Treg cells may play an important role in the pathogenesis of hepatitis B.

[Key words] Th17 cells; Treg cells; hepatitis B

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(12): 1702-1706]

[基金项目] 江苏省高校优势学科建设工程资助项目

*通信作者(Corresponding author), E-mail: tdfy16302@163.com

当感染乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 后,机体免疫系统在清除体内 HBV 的过程中,常引

起不同程度的炎症反应,这种炎症反应的强弱常与病情的转归密切相关;当炎症反应剧烈时,可发生较重的急性肝炎(acute hepatitis B,AHB)甚至急性或亚急性重型肝炎,但患者临床痊愈时常伴有 HBV 的彻底清除;如果炎症反应较弱,则可能仅引起轻微的肝损伤而患者可无明显的自觉症状,但往往体内的 HBV 不能彻底清除而病情迁延成为慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B,CHB)或无症状 HBV 携带者^[1]。机体抗病毒免疫应答主要依赖于特异性细胞免疫,其中 CD4⁺T 细胞发挥着关键作用。调节性 T 细胞(T regulatory cell,Treg)和 Th17 是新近发现的 2 个 CD4⁺T 细胞亚群。Treg 具有抑制作用,在维护机体免疫平衡和防止自身免疫性疾病发生方面发挥了极为重要的作用^[2]。Th17 能高水平分泌白细胞介素(interleukin,IL)-17,后者能够促进炎症反应,与感染、移植排斥反应以及自身免疫性疾病等有着重要的关系^[3]。Th17 细胞尽管在功能上与 Treg 细胞相互拮抗,但两者的分化过程却密切相关,两者作用的结果可以使机体的免疫状态保持相对的稳定。已有研究发现 Th17 或 Treg 细胞的频率和功能的改变、Th17/Treg 细胞比率的失衡等现象,与多种疾病的发生发展有关^[5-8]。以免疫病理为主要发病机制的乙型肝炎,是否也存在着 Th17 和 Treg 细胞的频率改变或 Th17/Treg 细胞比率的失衡,以及这些改变与疾病的发生、发展和转归之间的关系,均值得研究。

1 对象和方法

1.1 对象

选择 30 例南通大学附属医院感染科住院确诊的乙型肝炎患者,其中 AHB 患者 13 例,CHB 患者 17 例,均未经任何抗病毒或免疫调节药物治疗。30 例患者中男 18 例,女 12 例,年龄 18~55 岁,平均年龄为 38.6 岁,诊断标准参照 2005 年版《慢性乙型肝炎防治指南》^[9],CHB 患者均为血清 HBV DNA 载量 > 1 000 拷贝/ml 及血清丙氨酸氨基转移酶(ALT) > 1 × ULN。所有患者均排除药物性肝炎、自身免疫性肝病、酒精性肝病以及其他类型病毒性肝炎。健康对照组(HC)14 例为南通市献血者,其中男 8 例,女 6 例,年龄 18~51 岁,平均年龄 31.7 岁,肝功能均正常,肝炎病原学血清标志物检测均阴性。

PerCP-Cy5.5 标记鼠抗人 CD4 单克隆抗体、PE 标记鼠抗人 IL-17A 单克隆抗体、PE 标记 forkhead family transcription factor 3(FoxP3)单克隆抗体及同型对照(eBioscience 公司,美国)。佛波酯(phorbol-

12-myristate-13-acetate,PMA)、离子霉素、布雷菲德菌素 A(Brefeldin A,BFA)(Enzo 公司,美国)。固定液和破膜液(eBioscience 公司,美国),IL-17 酶联免疫吸附测定(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay,ELISA)试剂盒(上海依科赛生物制品有限公司),ALT 试剂盒(上海荣升生物技术公司)。流式细胞仪(BD 公司,美国),酶标仪 ELX-800(Biotek 公司,美国),Roto-Gene 3000 荧光定量聚合酶链反应(polymerase chain reaction,PCR)仪(Cotbett 公司,澳大利亚),7600 型全自动生化分析仪(日立公司,日本)。

1.2 方法

1.2.1 外周血 Th17 细胞频率的检测

取 100 μl 受试者新鲜外周全血(肝素抗凝),用 100 μl 含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养基稀释,加入 PMA(25 ng/ml)、离子霉素(1 μg/ml)、BFA(10 μg/ml)37℃培养 6 h;洗涤后加入 10 μl CD4-PerCP-Cy5.5 抗体进行细胞表面染色,室温避光温育 15 min;固定破膜后,加入 IL-17A-PE 10 μl 进行细胞内染色,设同型对照管,室温避光温育 15 min;洗涤,加入磷酸盐缓冲溶液 0.5 ml 重悬细胞,流式细胞仪检测。

1.2.2 外周血 Treg 细胞频率的检测

取 200 μl 受试者新鲜外周全血(肝素抗凝),加入 CD4-PerCP-Cy5.5 抗体及同型对照各 20 μl,室温避光孵育 15 min;加入红细胞裂解液,洗涤;固定破膜后,加入 FoxP3-PE 20 μl 及同型对照,室温避光孵育 15 min;洗涤,以 1%多聚甲醛 200 μl 重悬细胞,流式细胞仪检测。

1.2.3 血清 IL-17 HBV DNA 和 ALT 的检测

采用 ELISA 法检测受试者外周血血清 IL-17 的水平,操作严格按照试剂盒说明书进行。采用荧光实时定量 PCR 法检测患者血清 HBV DNA 水平;采用速率法检测血清 ALT。

1.3 统计学方法

数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用 SPSS12.0 软件进行数据处理,采用单因素方差分析、*t* 检验和 Pearson 相关检验分析。*P* ≤ 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 乙肝患者外周血 Th17 与 Treg 细胞的频率

采用流式细胞术检测 CHB、AHB 患者和健康者各组外周血 CD4⁺IL-17⁺细胞(即为 Th17 细胞)和 CD4⁺FoxP3⁺细胞(即为 Treg 细胞),两者分别占 CD4⁺

T细胞的百分率即为Th17细胞和Treg细胞的频率(图1)。结果显示,CHB组Th17细胞的频率为(11.12 ± 1.84)%,AHB组为(13.27 ± 2.23)%,健康对照组为(9.62 ± 0.78)%,CHB低于AHB组($P < 0.05$),但两组均高于健康对照组($P < 0.05$);CHB组Treg细胞的频率为(11.74 ± 1.29)%,AHB组为(8.52 ± 1.24)%,健康对照组为(8.00 ± 1.12)%,CHB组较健康对照组和AHB组均明显升高($P <$

0.05),但AHB组与健康对照组之间的差异无统计学意义。为进一步了解乙肝患者外周血中是否存在Th17细胞和Treg细胞的失衡,计算了各组Th17/Treg的比值。结果表明,CHB组的Th17/Treg比值为0.98 ± 0.24,AHB组为1.59 ± 0.41,健康对照组为1.23 ± 0.25,CHB组的Th17/Treg比值明显低于AHB组和健康对照组($P < 0.05$),但AHB组的Th17/Treg比值显著高于健康对照组($P < 0.05$)。

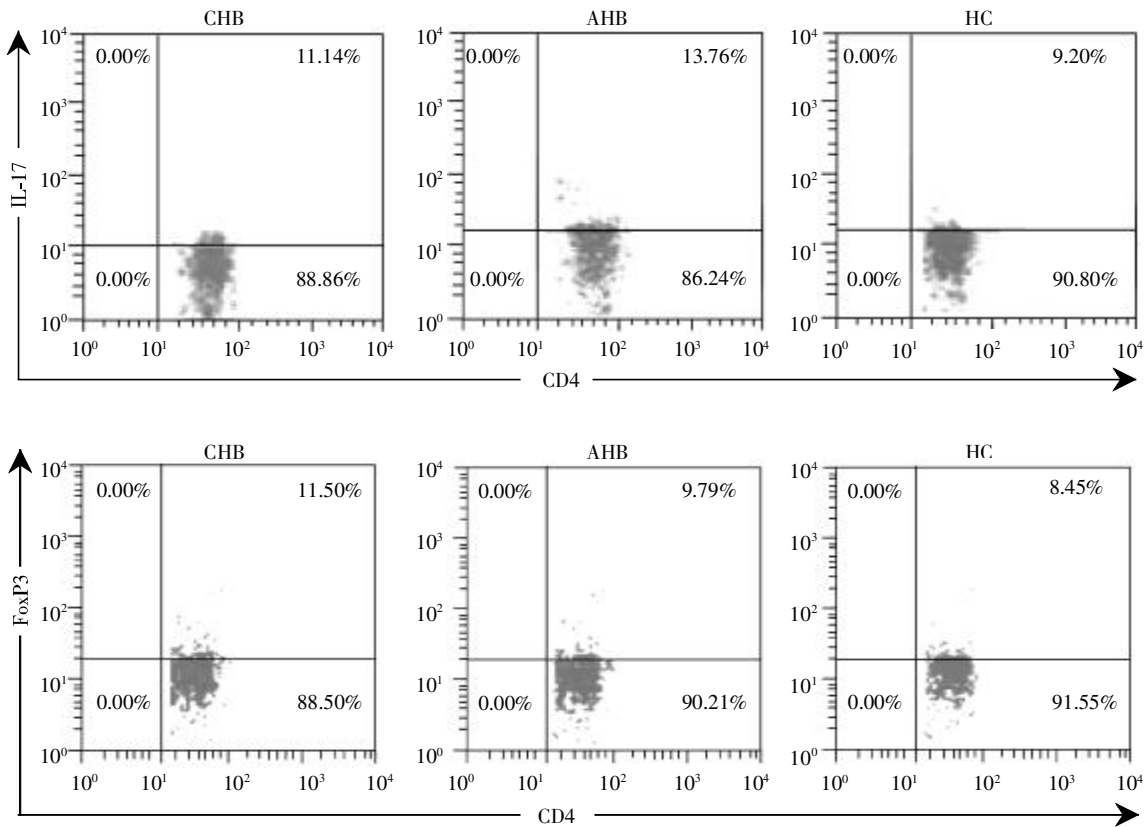


图1 各组(各1例)外周血Th17与Treg细胞的频率

Figure 1 Representative frequencies of Th17 and Treg cells in the peripheral blood of CHB patient,AHB patient and HC subject (one case)

2.2 乙肝患者外周血血清IL-17水平

采用ELISA法检测各组外周血血清中IL-17含量。结果表明,CHB组IL-17含量为(636 ± 2.74)ng/ml,AHB组为(7.58 ± 2.99)ng/ml,健康对照组为(4.20 ± 2.28)ng/ml,CHB组和AHB组外周血血清中IL-17含量均明显高于健康对照组($P < 0.05$),但CHB组和AHB组之间的差异无统计学意义。

2.3 乙肝患者外周血Th17、Treg细胞频率及Th17/Treg比值与ALT、HBV DNA载量的相关性分析

对CHB组和AHB组患者的外周血Th17、Treg细胞频率及Th17/Treg比值与ALT、HBV DNA载量进行了Pearson相关检验分析。结果显示,CHB组与

AHB组Th17细胞频率和Th17/Treg比值均与其ALT水平之间呈显著正相关,但Treg细胞频率与ALT水平之间无显著相关性(表1);CHB组与AHB组Treg细胞频率与其HBV DNA载量之间呈显著正相关,但Th17细胞频率及Th17/Treg比值与HBV DNA载量之间均无显著相关性(表1)。

3 讨论

目前的研究认为,HBV造成的肝损害及其转归与机体的细胞免疫关系密切,其中T淋巴细胞作为主要的效应细胞,与病毒的清除和肝细胞的损伤直接相关^[10]。Treg细胞是具有免疫抑制作用的一类

表 1 外周血 Th17、Treg 细胞频率及 Th17/Treg 比值与 ALT 及 HBV DNA 载量的相关性

Table 1 Correlation between peripheral Th17 frequencies, Treg frequencies, Th17/Treg ratios and ALT, HBV-DNA levels (r)

临床指标	组别	Th17 频率	Treg 频率	Th17/Treg
ALT	CHB	0.506*	0.283	0.504*
	AHB	0.642*	-0.144	0.678*
HBV DNA	CHB	0.460	0.616*	-0.476
	AHB	0.225	0.679*	0.591

* : $P < 0.05$.

CD4⁺T 细胞亚群^[2],目前已证实 FoxP3 的 mRNA 特异性表达于 Treg 细胞,并直接影响细胞表型和活性的发挥,为 Treg 细胞的转录因子,故现已将 FoxP3 作为 Treg 细胞的特异性标志。Treg 细胞通过发挥抑制免疫应答的功能和诱导自身免疫耐受,在维护机体免疫平衡方面发挥了极为重要的作用^[11]。Th17 细胞是具有促炎作用的一类 CD4⁺T 细胞亚群,其发挥生物学作用主要是通过分泌的细胞因子 IL-17。IL-17 作为一种重要的炎症介质,可以诱导炎症细胞浸润及损伤局部组织^[12]。研究表明,Treg 和 Th17 细胞在自身免疫性疾病、肿瘤以及感染性疾病等发生发展中均发挥着重要的作用^[13-16]。

为了解 Th17 和 Treg 细胞在 HBV 感染后的表达情况和在乙型肝炎发病机制中的作用,本研究对 AHB 组、CHB 组和健康对照组受试者外周血中 Th17 和 Treg 细胞的频率及血清中 IL-17 的水平进行了检测。观察到 AHB、CHB 组患者外周血 Th17 细胞频率和血清 IL-17 水平明显高于健康人群;CHB 组患者外周血 Treg 细胞频率较健康对照组和 AHB 组明显升高,但 AHB 组与健康对照组相比,差异无统计学意义。此结果表明,AHB、CHB 患者外周血中均存在 Th17 细胞的分化增加及表达其细胞因子 IL-17 能力的增强;在 CHB 患者外周血中还存在着 Treg 细胞的高表达,而 AHB 患者的 Treg 细胞表达状况则与健康人无明显差异。由此可以推测:乙肝患者体内,Th17 细胞增加并通过大量分泌 IL-17 等促炎细胞因子发挥生物学作用,参与和增强因 HBV 特异性免疫应答而引起的炎症反应;CHB 患者体内的 Treg 细胞高表达可下调细胞免疫功能对 HBV 的清除能力,故可能成为引起 HBV 慢性持续性感染的原因之一;而 AHB 患者体内基本正常的 Treg 细胞表达对免疫反应尤其是细胞免疫反应无明显影响,特异性细胞免疫反应可有效地清除体内的病毒,使 HBV 感染多为急性、自限性。本研究同步对乙肝患

者的肝脏损伤标志物 ALT 和血清 HBV DNA 载量进行了检测,以分析乙肝患者外周血 Th17 和 Treg 细胞频率与其之间的相关性。结果显示:AHB 和 CHB 组患者外周血 Th17 细胞频率与其血清 ALT 水平成正相关,与 HBV DNA 载量无明显相关性;AHB 和 CHB 组患者外周血 Treg 细胞频率与其血清 HBV DNA 载量成正相关,但与 ALT 水平无明显相关。这一现象提示:在乙型肝炎的发病过程中,患者体内 Th17 细胞参与介导的炎症反应,在清除 HBV 感染的肝细胞的同时加重了肝脏的炎症损害,其本身与 HBV 的清除无直接关系;Treg 细胞高表达可降低机体的特异性抗病毒免疫力而影响 HBV 的清除,但其本身可能对肝脏内炎症反应无明显影响。

有研究表明,促炎性 Th17 细胞在分化及功能上与介导免疫耐受的 Treg 相互抑制^[4],两者之间的平衡对维持免疫内环境的稳定起重要作用,失衡则可引起全身或局部免疫应答异常,或导致感染的持续。本实验结果显示,在乙型肝炎患者外周血中存在着 Th17 和 Treg 细胞数量的异常,为了进一步了解乙型肝炎患者是否还存在着 Th17/Treg 的异常,计算了每位受试者外周血 Th17/Treg 细胞频率的比值,并将 CHB、AHB 组患者 Th17/Treg 比值与其 HBV DNA 载量和血清 ALT 水平进行了相关性分析。结果显示,与健康对照组相比,AHB 组的 Th17/Treg 比值显著增高,而 CHB 组则明显降低,差异均有统计学意义;AHB、CHB 组患者 Th17/Treg 比值与其外周血血清 ALT 水平成正相关,与 HBV DNA 载量无明显相关。此结果提示:在 AHB 患者外周血中,Th17 细胞的分化能力超过了 Treg 细胞,出现了 Th17 细胞强势表达而 Treg 细胞相对弱势的失衡倾向;而在 CHB 患者外周血中,则 Treg 细胞的分化能力超过了 Th17 细胞,出现了 Treg 细胞强势表达而 Th17 细胞相对弱势的失衡倾向。这说明 HBV 感染后,如体内 Th17/Treg 的平衡偏向于 Th17,可使机体特异性抗病毒免疫的炎症反应增强,有利于清除乙肝病毒,从而可以避免发生 HBV 感染的慢性化;如出现 Th17/Treg 的平衡偏向于 Treg,则可降低机体特异性抗病毒免疫力,使机体免疫系统在清除 HBV 的过程中不能产生充分的炎症反应,甚至导致机体免疫耐受,从而引起 HBV 的持续感染或慢性乙型肝炎的发生;;Th17/Treg 可以从一定程度上反映肝脏炎症损伤的程度,Th17/Treg 平衡的变化有可能在 HBV 感染及乙型肝炎的发病过程中起着比较重要的作用。

综上所述,乙肝患者体内存在着 Th17、Treg 细胞频率的变化和 Th17/Treg 细胞比例的失衡,此种变化和失衡可能在乙型肝炎的发病机制中发挥着重要的作用。进一步研究对 Th17、Treg 细胞表达和 Th17/Treg 细胞平衡的调控,将有可能为乙肝患者的治疗提供新的方法。

[参考文献]

- [1] Wang FS,Zhang Z. Host immunity influences disease progression and antiviral efficacy in humans infected with hepatitis B virus [J]. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2009,3(5):499-512
- [2] Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, et al. Regulatory T cells and immune tolerance[J]. *Cell*, 2008, 133(5):775-787
- [3] Bettelli E, Korn T, Oukka M, et al. Induction and effector functions of T(H)17 cells[J]. *Nature*, 2008, 453(7198): 1051-1057
- [4] Weaver CT, Hatton RD. Interplay between the TH17 and TReg cell lineages: a (co-)evolutionary perspective [J]. *Nat Rev Immunol*, 2009, 9(12):883-889
- [5] Rong G, Zhou Y, Xiong Y, et al. Imbalance between T helper type 17 and T regulatory cells in patients with primary biliary cirrhosis: the serum cytokine profile and peripheral cell population[J]. *Clin Exp Immunol*, 2009, 156(2):217-225
- [6] Jia S, Li C, Wang G, et al. The T helper type 17/regulatory T cell imbalance in patients with acute Kawasaki disease[J]. *Clin Exp Immunol*, 2010, 162(1):131-137
- [7] Wang W, Shao S, Jiao Z, et al. The Th17/Treg imbalance and cytokine environment in peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis [J]. *Rheumatol Int*, 2012, 32(4):887-893
- [8] Wei B, Zhang H, Li L, et al. T Helper 17 Cells and Regulatory T-cell Imbalance in Paediatric Patients with Asthma[J]. *J Int Med Res*, 2011, 39(4):1293-1305
- [9] 中华医学会肝病学会, 感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南[S]. *中华肝脏病杂志*, 2005, 13(12):881-891
- [10] Zhang Z, Zhang JY, Wang LF, et al. Immunopathogenesis and prognostic immune markers of chronic hepatitis B virus infection [J]. *Gastroenterol Hepatol*, 2012, 27(2): 223-230
- [11] Sakaguchi S, Wing K, Onishi Y, et al. Regulatory T cells: how do they suppress immune responses [J]. *Int Immunol*, 2009, 21(10):1105-1111
- [12] Pappu R, Ramirez-Carrozzi V, Sambandam A. The interleukin-17 cytokine family: critical players in host defence and inflammatory diseases [J]. *Immunology*, 2011, 134(1):8-16
- [13] Jadidi-Niaragh F, Mirshafiey A. The deviated balance between regulatory T cell and Th17 in autoimmunity [J]. *Immunopharmacol Immunotox*, 2012, 34(5):727-739
- [14] Zhang B, Rong G, Wei H, et al. The prevalence of Th17 cells in patients with gastric cancer[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 374(3):533-537
- [15] Hartigan-O'Connor DJ, Hirao LA, McCune JM, et al. Th17 cells and regulatory T cells in elite control over HIV and SIV [J]. *Curr Opin HIV AIDS*, 2011, 6(3): 221-227
- [16] Yue FY, Merchant A, Kovacs CM, et al. Virus-specific interleukin-17-producing CD4⁺ T cells are detectable in early human immunodeficiency virus type 1 infection [J]. *J Virol*, 2008, 82(13):6767-6771

[收稿日期] 2013-06-03