

• 论 著 •

HBV 感染者调节性 T 淋巴细胞与细胞因子研究*

颜晓霞¹, 陈锡莲^{2△}, 李彩东², 吴斌², 段正军², 田鹏飞²

(1. 兰州市肺科医院, 甘肃兰州 730046; 2. 兰州市第二人民医院肝病研究所, 甘肃兰州 730046)

摘要:目的 探讨乙型肝炎病毒(HBV)e 抗原(HBeAg)阳性及阴性 HBV 感染者外周血 CD4⁺CD25⁺调节性 T 淋巴细胞(Treg)、白细胞介素-18、 γ -干扰素、转化生长因子 β 表达水平及临床意义。方法 将 175 例 HBV 感染患者分为慢性乙型肝炎(CHB)组和慢性无症状 HBV 携带者(ASC)组, 各组再分为 HBeAg(+)组和 HBeAg(-)组, 检测外周血 CD4⁺CD25⁺Treg、细胞因子及肝功能指标的水平。以健康者作为对照组。结果 HBeAg(+)与 HBeAg(-)ASC 组和 CHB 组 CD4⁺CD25⁺Treg 表达水平与对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$); HBeAg(+)与 HBeAg(-)ASC 组和 CHB 组细胞因子表达水平较对照组明显升高($P<0.05$); HBeAg(+)ASC 组外周血 CD4⁺CD25⁺Treg 表达水平与丙氨酸氨基转移酶、天冬氨酸氨基转移酶/血小板比值呈正相关($P<0.05$)。结论 CD4⁺CD25⁺Treg 和细胞因子在乙型肝炎慢性化过程中起重要作用; CD4⁺CD25⁺Treg 表达水平与肝炎的炎症反应程度有一定关系。

关键词:乙型病毒性肝炎; 调节性 T 淋巴细胞; 细胞因子; 乙肝 e 抗原

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.10.011

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)10-1346-03

Research of Treg and cytokines in patients with hepatitis B virus infection*

Yan Xiaoxia¹, Chen Xilian^{2△}, Li Caidong², Wu Bin², Duan Zhengjun², Tian Pengfei²

(1. Pulmonary Hospital, Lanzhou, Gansu 730046, China; 2. Liver Diseases Research Institute, Lanzhou Municipal Second People's Hospital, Lanzhou, Gansu 730046, China)

Abstract:Objective To investigate the value and clinical significance of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells (Treg), interleukin-18, interferon- γ and transforming growth factor- β in patients with hepatitis B virus (HBV) infection. **Methods** A total of 175 patients with HBV infection were divided into chronic type B hepatitis (CHB) group and chronic asymptomatic HBV carrier (ASC) group, which were further divided into hepatitis B e antigen (HBeAg) positive and negative groups. CD4⁺CD25⁺Treg, cytokines levels and liver function were measured. Healthy subjects were enrolled into control group. **Results** Proportion of CD4⁺CD25⁺Treg were without significant difference among healthy controls, HBeAg(+) and HBeAg(-) ASC groups, and HBeAg(+) and HBeAg(-) CHB groups ($P>0.05$). Compared with control group, cytokines levels were significant higher in CHB and ASC group ($P<0.05$). CD4⁺CD25⁺Treg level was significant positive correlation to alanine aminotransferase and ratio of aspartate aminotransferase to platelets in HBeAg(+)ASC group ($P<0.05$). **Conclusion** CD4⁺CD25⁺Treg and related cytokines could play important roles in the course of CHB, while CD4⁺CD25⁺Treg expressing might be correlated with inflammatory degree of hepatitis.

Key words: viral hepatitis type B; T regulatory cells; cytokines; hepatitis B e antigen

乙型肝炎病毒(HBV)感染机体后,并不直接引起肝细胞损伤,而是诱导 T 淋巴细胞及部分细胞因子介导的免疫反应间接损伤肝细胞^[1]。CD4⁺CD25⁺调节性 T 淋巴细胞(Treg)是具有自身免疫功能和免疫抑制性的 CD4⁺T 淋巴细胞亚群,通过抑制 CD8⁺T 淋巴细胞的增殖及活化,调控机体对 HBV 的免疫应答^[2]。辅助性 T 淋巴细胞(Th 细胞)产生的 Th1/Th2 型细胞因子有可能参与了慢性乙型肝炎(CHB)的发病机制。Th1 型细胞因子有白细胞介素-18(IL-18)、 γ -干扰素(IFN- γ)等, Th2 型细胞因子有转化生长因子- β (TGF- β)、白细胞介素-10(IL-10)等^[3]。本研究旨在探讨 HBV e 抗原(HBeAg)阳性[HBeAg(+)]与 HBeAg(-)慢性 HBV 感染者 CD4⁺CD25⁺Treg、IL-18、IFN- γ 、TGF- β 表达水平及临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2012 年 7~12 月在兰州市第二人民医院就

诊的 HBV 感染者 175 例,男 95 例、女性 80 例,年龄 11~66 岁,平均(39.38 $\pm$ 12.72)岁,符合《慢性乙型肝炎诊治指南》中的诊断标准^[4];所有患者均未接受免疫调节和抗病毒治疗,6 个月内未接受保肝治疗,排除甲、丙、丁、戊等肝炎病毒感染,排除自身免疫性肝炎、酒精性肝炎、药物性肝炎等疾病。175 例患者中,CHB 患者 63 例(CHB 组),其中 HBeAg(+)30 例, HBeAg(-)33 例;慢性无症状 HBV 携带者(ASC)112 例(ASC 组),其中 HBeAg(+)24 例, HBeAg(-)88 例。同期体检健康者 50 例纳入对照组,男 25 例、女 25 例,年龄 23~58 岁,平均(38.68 $\pm$ 13.01)岁。

1.2 方法

1.2.1 CD4⁺CD25⁺Treg 检测 采集受试者乙二胺四乙酸二钾抗凝空腹外周血 2 mL,取 50 μ L 抗凝血,加入 20 μ L 单抗(CD4FITC/CD8PE/CD3PerCP),振荡混匀,室温避光孵育 20

* 基金项目:甘肃省兰州市科技局科技发展指导性计划项目(2013-ZD-06)。 作者简介:颜晓霞,女,副主任医师,主要从事呼吸内科研究。

△ 通讯作者,Email:tracychen2006@126.com。

min;加入 2 mL 溶血素,振荡混匀,室温避光放置 15 min;1 500 r/min 离心 5 min,弃上清液;加入 2 mL 磷酸盐缓冲液(PBS),1 500 r/min 离心 5 min,弃上清液,重复一次;加入 500 μ L PBS,采用美国 BD 公司流式细胞仪、配套试剂进行细胞标记物检测,采用 FAC Suite 软件获取和分析荧光参数。

1.2.2 细胞因子检测 采集受试者外周血,常规方法分离血清标本,采用美国 RD 公司酶联免疫法试剂盒及科华公司 ST-360 酶标仪进行 IL-18、IFN- γ 、TGF- β 检测。操作步骤参照试剂盒及仪器说明书。

1.2.3 外周血其他指标检测 采集受试者外周血,常规方法分离血清标本,采用美国贝克曼公司 AU-680 全自动生化分析仪及配套试剂进行丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、总胆红素(TBIL)检测。常规方法进行血小板(PLT)检测。操作步骤参照试剂盒及仪器说明书。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行数据处理和统计学分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,组内相关性分析采用 Pearson 相关分析。 $P<0.05$ 为比较差异有统计学意义。

表 1 ASC 患者、健康者外周血 CD4⁺CD25⁺Treg、细胞因子检测结果($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg(%)	IL-18(ng/mL)	IFN- γ (ng/mL)	TGF- β (ng/mL)
HBeAg(+)	24	26.18 $\pm$ 15.86	590.39 $\pm$ 80.98*	190.92 $\pm$ 55.49*	359.43 $\pm$ 76.19*
HBeAg(-)	88	28.72 $\pm$ 13.06	506.56 $\pm$ 91.68*	208.75 $\pm$ 48.89*	329.63 $\pm$ 67.82*
对照组	50	27.30 $\pm$ 14.59	49.79 $\pm$ 14.68	14.41 $\pm$ 4.75	42.28 $\pm$ 13.50

*: $P<0.05$,与对照组比较。

表 2 CHB 患者、健康者外周血 CD4⁺CD25⁺Treg、细胞因子检测结果($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg(%)	IL-18(ng/mL)	IFN- γ (ng/mL)	TGF- β (ng/mL)
HBeAg(+)	30	30.48 $\pm$ 19.12	425.67 $\pm$ 83.47*	177.91 $\pm$ 28.13*	315.69 $\pm$ 70.95*
HBeAg(-)	33	31.42 $\pm$ 18.58	469.27 $\pm$ 77.89*	202.76 $\pm$ 29.65*	345.33 $\pm$ 62.28*
对照组	50	27.30 $\pm$ 17.59	49.79 $\pm$ 15.68	14.41 $\pm$ 8.75	42.28 $\pm$ 13.50

*: $P<0.05$,与对照组比较。

表 3 ASC 患者外周血 CD4⁺CD25⁺Treg 表达水平与肝功能相关性($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	ALT(U/L)		AST(U/L)		TBIL(μ mol/L)		A/P	
HBeAg(+)	24	29.12 $\pm$ 7.57		33.50 $\pm$ 23.42		17.08 $\pm$ 8.44		1.68 $\pm$ 1.62	
HBeAg(-)	88	25.52 $\pm$ 9.46		31.82 $\pm$ 12.55		30.75 $\pm$ 69.69		0.52 $\pm$ 0.60	
<i>r</i>	—	0.49*	0.11 [#]	0.03*	0.05 [#]	-0.08*	-0.14 [#]	1.00*	0.07 [#]
<i>P</i>	—	<0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	<0.05	>0.05

*:与 HBeAg(+)患者 CD4⁺CD25⁺Treg 表达水平的相关系数;[#]:与 HBeAg(-)患者 CD4⁺CD25⁺Treg 表达水平的相关系数;—:无数据。

表 4 CHB 患者外周血 CD4⁺CD25⁺Treg 表达水平与肝功能相关性($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	ALT(U/L)		AST(U/L)		TBIL(μ mol/L)		A/P	
HBeAg(+)	30	366.70 $\pm$ 95.94		318.93 $\pm$ 82.45		71.09 $\pm$ 44.55		3.31 $\pm$ 2.63	
HBeAg(-)	33	180.94 $\pm$ 59.16		111.64 $\pm$ 59.24		61.09 $\pm$ 34.94		1.32 $\pm$ 1.01	
<i>r</i>	—	0.12*	0.33 [#]	0.17*	0.30 [#]	0.09*	0.14 [#]	0.01*	0.02 [#]
<i>P</i>	—	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05

*:与 HBeAg(+)患者 CD4⁺CD25⁺Treg 表达水平的相关系数;[#]:与 HBeAg(-)患者 CD4⁺CD25⁺Treg 表达水平的相关系数;—:无数据。

2 结 果

2.1 CD4⁺CD25⁺Treg、细胞因子检测结果 (1)HBeAg(+)和 HBeAg(-)ASC 患者外周血 CD4⁺CD25⁺Treg 表达水平与对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$),IL-18、IFN- γ 及 TGF- β 水平则明显升高($P<0.05$),见表 1。(2)HBeAg(+)与 HBeAg(-)CHB 患者外周血 CD4⁺CD25⁺Treg 表达水平变与对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$),IL-18、IFN- γ 及 TGF- β 水平则明显升高($P<0.05$),但 HBeAg(+)与 HBeAg(-)组间 IL-18、IFN- γ 和 TGF- β 水平比较差异无统计学意义($P>0.05$),见表 2。

2.2 CD4⁺CD25⁺Treg 表达水平与肝功能相关性分析 (1)HBeAg(+)ASC 组外周血 CD4⁺CD25⁺Treg 表达水平与 ALT、AST/PLT(A/P)呈正相关($P<0.05$);HBeAg(-)ASC 组外周血 CD4⁺CD25⁺Treg 表达水平与 ALT、AST、TBIL、A/P 均无相关性($P>0.05$),见表 3。(2)HBeAg(+)及 HBeAg(-)CHB 组外周血 CD4⁺CD25⁺Treg 表达水平与 ALT、AST、TBIL、A/P 均无相关性($P>0.05$),见表 4。

3 讨 论

CHB 发病机制极其复杂,目前普遍认为宿主免疫调节紊乱是其发病及病理损伤的主要原因^[5]。在免疫反应过程中,各种免疫细胞和细胞因子参与免疫应答,形成免疫调节网络,是宿主抵御病毒感染的重要因素。

CD4⁺CD25⁺Treg 是具有免疫抑制功能的抑制性 T 淋巴细胞群^[6],在健康者体内,生理性 CD4⁺CD25⁺Treg 约占 CD4⁺T 淋巴细胞总数的 5%~10%,以免疫负向调节的方式抑制自身反应性 T 淋巴细胞的作用,对多种刺激呈低反应状态,对于维持免疫系统稳态及免疫耐受具有重要作用,可通过非抗原特异性方式抑制免疫系统的功能,但具体的作用机制尚不完全清楚^[7]。Stoop 等^[8]发现,CHB 患者外周血 CD4⁺CD25⁺Treg 数量较健康者增多,去除 CD4⁺CD25⁺Treg 后,HBV 特异性增殖反应增强。本研究发现,与健康者相比,HBeAg(+)与 HBeAg(-)ASC 患者和 HBeAg(+)与 HBeAg(-)CHB 患者外周血 CD4⁺CD25⁺Treg 表达水平差异均无统计学意义($P>0.05$)。同时,HBeAg(+)与 HBeAg(-)CHB 患者外周血 CD4⁺CD25⁺Treg 表达水平较健康者有升高趋势,提示 CD4⁺CD25⁺Treg 可通过抑制效应细胞的增殖,调控机体对 HBV 感染的免疫应答,增强抗病毒免疫反应,促进病毒的清除。

细胞因子作为宿主产生的重要炎性反应调节介质,在清除 HBV 的免疫应答过程中发挥重要的作用。Th1/Th2 型细胞因子具有相互调节、相互制约的作用,共同调节机体的免疫状态。正常情况下,Th1/Th2 处于动态平衡状态,如果 Th1/Th2 失衡,可能导致免疫功能紊乱,影响免疫防御功能。与健康者相比,HBeAg(+)与 HBeAg(-)ASC 患者和 HBeAg(+)与 HBeAg(-)CHB 患者外周血 IL-18、IFN- γ 及 TGF- β 水平明显升高($P<0.05$),提示 IL-18、IFN- γ 及 TGF- β 可能参与了 CHB 的发病过程,与何登明等^[9]的报道一致。此外,HBeAg(+)ASC 患者外周血 TGF- β 水平高于 HBeAg(-)ASC 患者,原因可能是 TGF- β 表达增加,促进受损肝细胞、内皮细胞对 PLT 的聚集作用,进而释放更多的 TGF- β 。

关于 CD4⁺CD25⁺Treg 表达水平与 ALT 水平的关系,Lin 等^[10]认为肝细胞损伤可增强 CHB 患者 CD4⁺CD25⁺Treg 的抑制活性,其研究显示,外周血 CD4⁺CD25⁺Treg 表达水平与 ALT 水平呈正比,去除 CD4⁺CD25⁺Treg 后,ALT 水平较高的患者 HBV 特异性 CD8⁺T 淋巴细胞的增殖反应明显高于 ALT 水平较低的患者。但国内有研究显示,外周血 CD4⁺CD25⁺Treg 表达水平与血清 ALT 水平无相关性^[11]。本研究发现,HBeAg(+)ASC 患者 CD4⁺CD25⁺Treg 与 A/P 呈正相关($P<0.05$),提示 ASC 患者体内 HBV 的增殖激活了细胞免疫,通过攻击自身被感染了 HBV 的肝细胞,引起肝细胞损伤,

表现为 ALT、AST、TBIL、A/P 升高,而长期的慢性炎症导致肝细胞不断被破坏与修复,逐渐出现肝纤维化,进而可能发展为肝硬化和肝癌。本研究还发现,HBeAg(+)ASC 患者 CD4⁺CD25⁺Treg 表达水平与外周血 ALT 水平呈正相关($P<0.05$),说明 CD4⁺CD25⁺Treg 表达水平与肝炎的炎性反应程度有一定关系,CD4⁺CD25⁺Treg 对免疫稳态具有重要的调节作用。

综上所述,各种 T 淋巴细胞和细胞因子之间的作用不是相互孤立的,而是协调、有序的整体,构成统一的网络,相互协调又相互拮抗,保护机体,抵抗侵袭,维持正常的免疫应答。因此,监测 IL-18、IFN- γ 、TGF- β 水平的变化在判断 CHB 患者病毒复制活跃程度、病情进展、预后及指导治疗方面具有一定意义。

参考文献

[1] 肖光明,姚细安,连粤湘,等. 乙型肝炎患者外周血 T 淋巴细胞亚群的变化[J]. 实用肝脏病杂志,2005,8(1):22-24.

[2] 庄勤建,邱隆敏,姚新生,等. CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞与乙型肝炎病毒感染的研究进展[J]. 世界华人消化杂志,2012,20(24):2248-2253.

[3] 曾志励,吴健林,吴继周. 乙型肝炎患者外周血 T 淋巴细胞亚群比例和 Th1/Th2 细胞因子水平检测及其临床意义[J]. 吉林大学学报,2012,38(3):555-558.

[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[J]. 临床肝胆病杂志,2011,27(1):88-89.

[5] 巫翠萍,覃西,王华民,等. 慢性乙型肝炎患者外周血 CD4⁺CD25⁺Treg 与 CD4⁺和 CD8⁺T 淋巴细胞亚群的相关研究[J]. 中国免疫学杂志,2010,26(4):273-277.

[6] 张政,王福生. 慢性乙型肝炎免疫致病机制和免疫治疗现状[J]. 临床肝胆病杂志,2012,28(11):801-804.

[7] 吴银亚,谭善忠. CD4⁺CD25⁺调节性 T 淋巴细胞在慢性乙型肝炎发病机制中的作用[J]. 中华传染病杂志,2012,30(9):563-565.

[8] Stoop JN, van der Molen RG, Baan CC, et al. Regulatory T cells contribute to the impaired immune response in patients with chronic hepatitis B virus infection [J]. Hepatitis, 2005, 41(4):771-778.

[9] 何登明,毛青,王宇明. 乙型肝炎病毒感染者血清 Th1/Th2 型细胞因子水平及意义[J]. 免疫学杂志,2004,20(5):408-409.

[10] Lin CY, Tsai MC, Huang CW, et al. Liver injury is associated with enhanced regulatory T-cell activity in patients with chronic hepatitis B[J]. J Viral Hepat, 2007, 14(7):503-511.

[11] 刘俊英,杨京,贾红云. 不同临床类型 HBV 感染者外周血 T 细胞亚群的差异[J]. 世界华人消化杂志,2009,17(29):3038-3042.

(收稿日期:2015-03-02)

(上接第 1345 页)

[7] Minoia F, Davi S, Horne A, et al. Clinical features, treatment, and outcome of macrophage activation syndrome complicating systemic juvenile idiopathic arthritis: a multinational, multicenter study of 362 patients[J]. Arthritis Rheumatol, 2014, 66(11):3160-3169.

[8] Yokota S, Kikuchi M, Nozawa T, et al. Pathogenesis of systemic inflammatory diseases in childhood: "Lessons from clinical trials of anti-cytokine monoclonal antibodies for Kawasaki disease, system-

ic onset juvenile idiopathic arthritis, and cryopyrin-associated periodic fever syndrome[J]. Mod Rheumatol, 2014, 5(20):1-10.

[9] 李瑞娟,唐雪梅,刘玮,等. 幼年特发性关节炎白介素 6、 γ 干扰素诱导蛋白 10 和白介素 17 的表达及意义[J]. 中华儿科杂志,2013, 51(6):472-476.

(收稿日期:2015-01-11)