

• 论 著 •

# 乙型肝炎患者 e 抗原转换与外周血 $\gamma\delta$ T 和 Tc17 的关系\*

尹凌凡,王梦洁,熊建辉,孙黎辉

(深圳市龙岗区中医院/北京中医药大学深圳医院检验科,广东深圳 518111)

**摘要:**目的 探讨乙型病毒性肝炎患者 e 抗原(HBeAg)转换与外周血  $\gamma\delta$ T、白细胞介素(IL)-17、 $\gamma$ 干扰素(IFN- $\gamma$ )等的相关性及临床意义。方法 随机选取 2017 年 10 月至 2018 年 4 月在该院就诊的乙型肝炎患者 90 例作为研究组,选取同期 30 例健康人作为对照组。然后在研究组内根据 HBeAg 表达与否进一步分为 3 个亚组:HBeAg<sup>+</sup>/Ab<sup>-</sup>组( $n=30$ )、HBeAg<sup>+</sup>/Ab<sup>+</sup>组( $n=30$ )、HBeAg<sup>-</sup>/Ab<sup>+</sup>组( $n=30$ )。运用流式细胞仪检测受试者外周血中的  $\gamma\delta$ T 细胞、IL-17<sup>+</sup>  $\gamma\delta$ T 细胞、IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>  $\gamma\delta$ T 细胞、IL-17<sup>+</sup> CD8 细胞在外周血单个核细胞(PBMCs)中的比例,对比上述指标在研究组及对照组间、以及乙型肝炎患者 HBeAg/Ab 不同表达组内的差异。进一步分析乙型肝炎患者 HBeAg/Ab 不同表达组及不同血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)水平下,血清内 HBV-DNA 水平的差异。结果 研究组 IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>  $\gamma\delta$ T 细胞、 $\gamma\delta$ T 细胞水平、IL-17<sup>+</sup> CD8 细胞要明显高于对照组( $P<0.05$ )。研究组中,HBeAg<sup>+</sup>/Ab<sup>-</sup>组和 HBeAg<sup>+</sup>/Ab<sup>+</sup>组患者 PBMCs 内总  $\gamma\delta$ T 细胞水平要显著高于 HBeAg<sup>-</sup>/Ab<sup>+</sup>组( $P<0.05$ );HBeAg<sup>+</sup>/Ab<sup>+</sup>组乙型肝炎患者 IL-17<sup>+</sup> CD8 细胞明显高于 HBeAg<sup>+</sup>/Ab<sup>-</sup>组和 HBeAg<sup>-</sup>/Ab<sup>+</sup>组( $P<0.05$ )。HBeAg<sup>+</sup>/Ab<sup>-</sup>组慢性乙型肝炎患者血清内 HBV-DNA 水平要明显高于 HBeAg<sup>+</sup>/Ab<sup>+</sup>组和 HBeAg<sup>-</sup>/Ab<sup>+</sup>组( $P<0.05$ )。结论  $\gamma\delta$ T 细胞在 HBeAg/Ab 血清转换中可能发挥一定作用。IL-17<sup>+</sup> CD8 细胞在慢性乙型肝炎良性转归中起重要作用,对于抗病毒治疗的效果可能具有预测意义。

**关键词:**乙型肝炎患者; 细胞毒性 T 细胞 17;  $\gamma$ 干扰素; 白细胞介素 17;  $\gamma\delta$ T; HBeAg/HBeAb; 血清转换

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2020.02.012 中图法分类号:R612.6+2;R446  
文章编号:1673-4130(2020)02-0176-05 文献标识码:A

## Relationship between e antigen conversion and peripheral blood $\gamma\delta$ T, Tc17 in patients with hepatitis Be antigen\*

YIN Lingfan, WANG Mengjie, XIONG Jianhui, SUN Lihui

(Department of Clinical Laboratory, Shenzhen Hospital of Beijing University of Traditional Chinese Medicine/Longgang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shenzhen, Guangdong 518111, China)

**Abstract: Objective** To investigate the correlation between hepatitis Be antigen (HBeAg) conversion and peripheral blood  $\gamma\delta$ T, interleukin 17 (IL-17) and interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) in patients with hepatitis B virus and its clinical significance. **Methods** Totally 90 patients with hepatitis B who were admitted to hospital from October 2017 to April 2018 were randomly selected as the study group, 30 healthy persons were selected as the control group. The study group was further divided into three groups according to the expression of HBeAg: HBeAg<sup>+</sup>/Ab<sup>-</sup> group ( $n=30$ ), HBeAg<sup>+</sup>/Ab<sup>+</sup> group ( $n=30$ ) and HBeAg<sup>-</sup>/Ab<sup>+</sup> group ( $n=30$ ). Flow cytometry was used to detect the proportion of  $\gamma\delta$ T cells, IL-17<sup>+</sup>  $\gamma\delta$ T cells, IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>  $\gamma\delta$ T cells and IL-17<sup>+</sup> CD8 cells in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in peripheral blood of subjects. Compare the differences between the above indicators in the study group and the control group, and in the different expression groups of HBeAg/Ab in patients with hepatitis B. Further analysis of the difference in serum HBV-DNA levels in different expression groups of HBeAg/Ab in patients with hepatitis B and different serum alanine aminotransferase (ALT) levels. **Results** The levels of IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>  $\gamma\delta$ T cells,  $\gamma\delta$ T cells and IL-17<sup>+</sup> CD8 cells in the study group were significantly higher than those in the control group ( $P<0.05$ ). In the study group, the total  $\gamma\delta$ T cells in the PBMCs of the HBeAg<sup>+</sup>/Ab<sup>-</sup> group and the HBeAg<sup>+</sup>/Ab<sup>+</sup> group were significantly higher than those of the

\* 基金项目:北京中医药大学青年教师项目(2017-JYB-JS-145)。  
作者简介:尹凌凡,女,副主任医师,主要从事免疫检验相关研究。  
本文引用格式:尹凌凡,王梦洁,熊建辉,等.乙型肝炎患者 e 抗原转换与外周血  $\gamma\delta$ T 和 Tc17 的关系[J].国际检验医学杂志,2020,41(2): 176-179.

HBeAg<sup>-</sup>/Ab<sup>+</sup> group ( $P < 0.05$ ); the HBeAg<sup>+</sup>/Ab<sup>+</sup> group of patients with hepatitis B IL-17<sup>+</sup>CD8 cells significantly higher than the other two groups ( $P < 0.05$ ). The serum HBV-DNA level of HBeAg<sup>+</sup>/Ab<sup>-</sup> group patients with chronic hepatitis B was significantly higher than that of HBeAg<sup>+</sup>/Ab<sup>+</sup> group and HBeAg<sup>-</sup>/Ab<sup>+</sup> group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion**  $\gamma\delta$ T cells may play a role in HBeAg/Ab seroconversion. IL-17<sup>+</sup>CD8 cells play an important role in the benign outcome of chronic hepatitis B, and may have predictive effects on antiviral therapy.

**Key words:** patients with hepatitis B; cytotoxic T cell 17; interferon  $\gamma$ ; interleukin 17;  $\gamma\delta$ T; HBeAg/HBeAb; seroconversion

乙型病毒性肝炎是一种世界性的传染病,其发病机制极为复杂,病变主要由细胞免疫异常所致,与体内多种免疫细胞的相互作用有关。在病毒清除和肝脏的炎性反应中,乙型肝炎病毒(HBV)特异性 T 淋巴细胞是主要的效应细胞,而 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞在控制 HBV 复制和免疫介导的肝损伤中发挥重要作用<sup>[1]</sup>。其中, $\gamma\delta$ T 和细胞毒性 T 细胞 17(Tc17)细胞群在乙型肝炎的发病、转归和治疗中起到的作用,在近年来逐渐引起重视。乙型病毒性肝炎的治疗,目前主要通过抑制病毒复制和改变机体免疫状态 2 个方面来进行<sup>[2]</sup>。机体免疫细胞的免疫状态对于慢性乙型肝炎 e 抗原(HBeAg)转换方向及预后有很大的影响,HBeAg 是 HBV 在体内活跃复制的标志之一,HBeAg 的血清学转换标志病毒复制减少,免疫耐受性减弱或病变静息等变化<sup>[3]</sup>。本研究通过观察慢性乙型肝炎患者外周血  $\gamma\delta$ T 和 Tc 等细胞群免疫指标与 HBeAg 转换之间的关系,来了解慢性乙型肝炎患者的细胞免疫状态及在疾病转归方面的作用。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选取 2017 年 12 月至 2018 年 4 月 90 例在本院肝病门诊就诊的乙型肝炎患者作为研究组,选取同期体检的 30 例健康者作为对照组。研究组患者中男 47 例,女 43 例,年龄 26~61 岁,平均年龄为(45.7±5.6)岁。对照组中男 16 例,女 14 例,年龄 25~60 岁,平均年龄(45.9±5.1)岁。本研究已通过本院伦理委员会批准。2 组研究对象自愿参与本研究,并同意对其进行随访。研究组纳入、排除标准:患者年龄在 18 岁以上,临床诊断均符合 2015 年中华医学会肝脏病分会制订的《慢性乙型肝炎防治指南》<sup>[4]</sup>,既往乙型肝炎病史或 HBsAg 阳性超过 6 个月,现乙型肝炎表面抗原(HBsAg)、HBV-DNA 阳性,HBeAg 为持续阴性或阳性,丙氨酸氨基转移酶(ALT)持续或反复异常或肝组织学检查有肝炎病变;同时排除合并其他类型的病毒性肝炎、HIV 感染、酒精性肝病、自身免疫性疾病等,无既往病史。健康对照组排除标准:无糖尿病、结核病、自身免疫性疾病和近期感染史;无肝炎症状和体征,血压正常,心肺功能正常;HBsAg 阴性,抗丙型肝炎病毒(HCV)阴性。研究组亚组分析:乙型肝炎患者 HBeAg 转换,即 HBeAg 的血清学转换定义为 HBeAg 转阴且 HBeAb 转阳<sup>[2]</sup>。进一步

将研究组根据 HBeAg 血清学转换情况分为 3 组: HBeAg<sup>+</sup>/Ab<sup>-</sup>组( $n=30$ ),即未出现 e 抗原转换者; HBeAg<sup>+</sup>/Ab<sup>+</sup>组( $n=30$ ),即处于转归中间态者; HBeAg<sup>-</sup>/Ab<sup>+</sup>组,即 e 抗原转换者( $n=30$ )。

**1.2 主要试剂材料** APC- $\gamma\delta$ T 抗体、APC-H7-CD3 抗体、PerCP-Cy5-CD8 抗体、PE-IL17 抗体、FITC-IFN- $\gamma$  抗体、FITC-CD4 抗体、PE-CD4 抗体、PE-CD25 抗体、AF647-CD127 抗体、刺激剂 BD Golgiplug 及相匹配的对照抗体均购自 BD Pharmigen 公司。流式细胞仪 BD FACS Canto II 购自美国 BD 公司。全自动生化分析仪贝克曼 AU5800 购自美国贝克曼库尔特公司。

**1.3 细胞培养、染色和流式分析** 所有受试者空腹 8 h 以上,次日清晨抽取外周静脉血分别注入无菌普通管和肝素抗凝管,普通管静脉血半个小时内离心(3 600 r/min,10 min,25 °C)取上清,PCR 方法检测血清内 HBV-DNA 含量。取 2 mL 肝素抗凝全血与 2 mL PBS 混合,缓缓注入装有 2 mL Ficol 分离液的试管中,进行密度梯度离心(2 000 r/min,20 min,20 °C),吸取单个核细胞层细胞加入 10 mL PBS 充分洗涤(1 500 r/min,5 min,20 °C),用 RPMI1640 完全培养液调整外周血单个核细胞(PBMC)水平为  $2 \times 10^9$ /L。在培养基中加入 BD 刺激剂 4  $\mu$ L/管,置于 CO<sub>2</sub> 培养箱 37 °C 培养 6 h。刺激后的 PBMCs 重悬成 15  $\mu$ L 反应体系,加入 APC-H7-CD3 抗体 2.5  $\mu$ L、PerCP-Cy5-CD8 抗体 8  $\mu$ L、APC- $\gamma\delta$ T 抗体 5  $\mu$ L,经胞外染色、破膜,以 50  $\mu$ L 反应体系加入 PE-IL17 抗体 10  $\mu$ L、FITC-IFN- $\gamma$  抗体 1  $\mu$ L 进行胞内染色,后在流式细胞仪(BD FACS Canto II)上对  $\gamma\delta$ T 细胞、IL-17<sup>+</sup> $\gamma\delta$ T 细胞、IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> $\gamma\delta$ T 细胞、IL-17<sup>+</sup>CD8 细胞等进行分析。

**1.4 血清 ALT 水平检测** 所有受试者空腹 8 h 以上,次日清晨采集静脉血约 10 mL,采用贝克曼 AU5800 全自动生化分析仪及其配套试剂检测受试者血清 ALT 水平。ALT 水平正常值为 <40 U/L;反之则提示 ALT 异常。

**1.5 统计学处理** 应用 SPSS19.0 软件进行统计分析。其中计数资料以例数及率描述,组间比较采用  $\chi^2$  检验。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  描述,两组间比较采用两独立样本  $t$  检验,多组间比较则采用单因素方差分析,

并用 LSD-*t* 法进行组间两两比较。以  $P<0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1** 研究组和对照组 PBMCs 中 IFN- $\gamma^+$   $\gamma\delta$ T 细胞、IL-17 $^+$   $\gamma\delta$ T 细胞、IL-17 $^+$  CD8 细胞及  $\gamma\delta$ T 细胞水平对比 研究组 IFN- $\gamma^+$   $\gamma\delta$ T 细胞、 $\gamma\delta$ T 细胞水平、IL-17 $^+$  CD8 细胞要明显高于对照组 ( $P<0.05$ ), 而 IL-17 $^+$   $\gamma\delta$ T 细胞与对照组比较, 差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ), 见表 1。

**2.2** 慢性乙型肝炎患者 HBeAg/Ab 不同表达组 PBMCs 内 IFN- $\gamma^+$   $\gamma\delta$ T 细胞、IL17 $^+$   $\gamma\delta$ T 细胞、IL-17 $^+$  CD8 细胞及  $\gamma\delta$ T 细胞水平对比 单因素方差分析结果显示, IFN- $\gamma^+$   $\gamma\delta$ T 细胞、IL-17 $^+$  CD8 细胞、 $\gamma\delta$ T 细胞 3 个指标整体差异有统计学意义 ( $P<0.05$ )。两两比较结果显示, 研究组中, HBeAg $^+$ /Ab $^-$  组和

HBeAg $^+$ /Ab $^+$  组患者 PBMCs 内总  $\gamma\delta$ T 细胞水平要显著高于 HBeAg $^-$ /Ab $^+$  组 ( $P<0.05$ ), 而在 HBeAg $^+$ /Ab $^+$  和 HBeAg $^+$ /Ab $^-$  组之间差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ); HBeAg $^+$ /Ab $^+$  组乙型肝炎患者 IL-17 $^+$  CD8 细胞明显高于另外 2 组 ( $P<0.05$ )。见表 2。

**2.3** 慢性乙型肝炎患者 HBeAg/Ab 不同表达组血清内 HBV-DNA 水平对比 单因素方差分析结果显示, HBeAg/Ab 不同表达组中, ALT 正常者、ALT 异常者 2 个亚组及汇总合计的 HBV-DNA 水平比较, 差异均有统计学意义 ( $P<0.05$ )。两两比较结果显示, HBeAg $^+$ /Ab $^-$  组慢性乙型肝炎患者血清内 HBV-DNA 水平要明显高于 HBeAg $^+$ /Ab $^+$  组和 HBeAg $^-$ /Ab $^+$  组 ( $P<0.05$ )。见表 3。

表 1 研究组和对照组的  $\gamma\delta$ T 细胞及其亚群的对比结果( $\bar{x}\pm s$ )

| 组别       | <i>n</i> | IFN- $\gamma^+$ $\gamma\delta$ T 细胞 | IL-17 $^+$ $\gamma\delta$ T 细胞 | IL-17 $^+$ CD8 细胞 | $\gamma\delta$ T 细胞 |
|----------|----------|-------------------------------------|--------------------------------|-------------------|---------------------|
| 对照组      | 30       | 43.66 $\pm$ 1.14                    | 1.60 $\pm$ 0.66                | 0.97 $\pm$ 0.68   | 7.25 $\pm$ 2.51     |
| 研究组      | 90       | 79.28 $\pm$ 3.48                    | 1.80 $\pm$ 0.73                | 1.49 $\pm$ 0.96   | 14.27 $\pm$ 4.86    |
| <i>t</i> |          | 84.456                              | 1.330                          | 3.247             | 10.213              |
| <i>P</i> |          | 0.000                               | 0.186                          | 0.002             | 0.000               |

表 2 研究组中不同 HBeAg/Ab 表达组间  $\gamma\delta$ T 细胞和 CD8 细胞及其亚群的对比结果( $\bar{x}\pm s$ )

| HBeAg/Ab 表达组        | <i>n</i> | IFN- $\gamma^+$ $\gamma\delta$ T 细胞 | IL17 $^+$ $\gamma\delta$ T 细胞 | IL-17 $^+$ CD8 细胞            | $\gamma\delta$ T 细胞           |
|---------------------|----------|-------------------------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| HBeAg $^+$ /Ab $^-$ | 30       | 81.42 $\pm$ 6.63                    | 1.69 $\pm$ 0.45               | 1.32 $\pm$ 1.09              | 17.22 $\pm$ 5.77              |
| HBeAg $^+$ /Ab $^+$ | 30       | 80.34 $\pm$ 5.78                    | 1.97 $\pm$ 0.58               | 2.20 $\pm$ 1.16 <sup>a</sup> | 15.61 $\pm$ 6.55              |
| HBeAg $^-$ /Ab $^+$ | 30       | 76.06 $\pm$ 8.70 <sup>ab</sup>      | 1.73 $\pm$ 0.56               | 0.96 $\pm$ 0.78 <sup>b</sup> | 9.98 $\pm$ 4.49 <sup>ab</sup> |
| <i>F</i>            |          | 4.722                               | 2.433                         | 11.649                       | 13.510                        |
| <i>P</i>            |          | 0.011                               | 0.094                         | 0.000                        | 0.000                         |

注: 与 HBeAg $^+$ /Ab $^-$  组比较, <sup>a</sup> $P<0.05$ ; 与 HBeAg $^+$ /Ab $^+$  组比较, <sup>b</sup> $P<0.05$ 。

表 3 研究组中不同 HBeAg/Ab 表达组 HBV-DNA 水平对比 (拷贝/毫升,  $\bar{x}\pm s$ )

| 组别                  | ALT 正常者  |                               | ALT 异常者  |                               | 合计       |                               |
|---------------------|----------|-------------------------------|----------|-------------------------------|----------|-------------------------------|
|                     | <i>n</i> | HBV-DNA                       | <i>n</i> | HBV-DNA                       | <i>n</i> | HBV-DNA                       |
| HBeAg $^+$ /Ab $^-$ | 17       | 6.58 $\pm$ 1.55               | 13       | 6.80 $\pm$ 1.69               | 30       | 6.68 $\pm$ 1.63               |
| HBeAg $^+$ /Ab $^+$ | 13       | 1.86 $\pm$ 0.27 <sup>a</sup>  | 17       | 1.75 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>  | 30       | 1.80 $\pm$ 0.52 <sup>a</sup>  |
| HBeAg $^-$ /Ab $^+$ | 10       | 3.26 $\pm$ 1.19 <sup>ab</sup> | 20       | 3.55 $\pm$ 1.22 <sup>ab</sup> | 30       | 3.45 $\pm$ 1.19 <sup>ab</sup> |
| <i>F</i>            |          | 62.474                        |          | 70.849                        |          | 127.259                       |
| <i>P</i>            |          | 0.000                         |          | 0.000                         |          | 0.000                         |

注: 与 HBeAg $^+$ /Ab $^-$  组比较, <sup>a</sup> $P<0.05$ ; 与 HBeAg $^+$ /Ab $^+$  组比较, <sup>b</sup> $P<0.05$ 。

## 3 讨 论

根据《慢性乙型肝炎防治指南》(2015 版)<sup>[4]</sup>, 以 HBeAg $^+$  转化为 HBeAb $^+$  的血清学转换作为临床慢性乙型肝炎患者治疗有效的满意状态, 说明乙型肝炎病毒的病变及免疫清除呈现静止状态, 同时患者血清内的 HBV-DNA 含量能够反映乙型肝炎病毒复制的程度。慢性乙型肝炎发病机制目前仍未完全阐明, 一

般认为, HBV 虽未直接杀伤肝细胞, 但却可以引发异常的免疫应答, 导致肝细胞的损伤和炎症的发生。研究表明, 淋巴细胞介导的免疫功能紊乱、免疫调节细胞及其相应的细胞因子的产生在这一病理损伤过程发挥重要的作用<sup>[5]</sup>。一方面, 这种免疫应答过程对疾病的恢复及病毒的清除有一定的促进作用; 另一方面, 因为调节因子的不平衡又可以导致免疫系统对



HBV 感染细胞的应答而致使肝脏损伤<sup>[6]</sup>。固有免疫在 HBV 感染初期发挥作用,而特异性免疫应答在感染持续过程中发挥主要作用。

$\gamma\delta$ T 细胞是参与固有免疫应答和诱导特异性免疫应答的重要细胞群<sup>[7]</sup>,其可直接识别蛋白质或抗原肽,具有迅速激活的动力学特征,可快速、有效地发挥免疫调节和应答作用。根据结构的不同, $\gamma\delta$ T 细胞可分为  $V\gamma 1$ 、 $V\gamma 2$  和  $V\gamma 3$  这 3 个亚型。根据功能的差异,又可将  $\gamma\delta$ T 细胞划分成 IFN- $\gamma$  的  $\gamma\delta$ T 细胞(IFN- $\gamma^+$  $\gamma\delta$ T)、产生 IL-17 的  $\gamma\delta$ T 细胞(IL-17 $^+$  $\gamma\delta$ T)和调节性  $\gamma\delta$ T 细胞等亚群<sup>[8]</sup>。IFN- $\gamma^+$  $\gamma\delta$ T 细胞可以生成 IFN- $\gamma$ ,介导细胞毒效应,在抗细胞内病原体感染中发挥重要作用。IL-17 $^+$  $\gamma\delta$ T 细胞可以分泌 IL-17,刺激细胞产生多种细胞因子,清除病原体并介导炎症反应。CONROY 等<sup>[9]</sup>的研究显示,与对照组相比,无症状的慢性持续性乙型肝炎患者具有较高的  $V\gamma 1$ 、 $V\gamma 2$ 。另外,无症状患者组的  $V\gamma 2$  细胞表达更高水平的 IFN- $\gamma$ ,提示 IFN- $\gamma^+$  $V\delta 2$  细胞可能在慢性乙型肝炎病情控制中发挥重要作用。

本研究显示, $\gamma\delta$ T 细胞在慢性乙型肝炎患者 PBMC 中的比例显著增高,提示  $\gamma\delta$ T 细胞的异常表达参与慢性乙型肝炎疾病的发生发展。另外,实验数据也显示,研究组 IFN- $\gamma^+$  $\gamma\delta$ T 明显高于对照组,但 IL-17 $^+$  $\gamma\delta$ T 在研究组和对照组差异不明显。提示  $\gamma\delta$ T 细胞可能主要通过 IFN- $\gamma$  的细胞免疫应答调节作用参与慢性乙型肝炎的进程,考虑可能的机制为 IFN- $\gamma^+$  $\gamma\delta$ T 细胞通过生成 IFN- $\gamma$ ,诱导机体细胞免疫反应,促进效应细胞活化和增殖,对乙型肝炎病毒的清除具有种重要作用<sup>[10-11]</sup>。此外,在患者研究组内可以观察到  $\gamma\delta$ T 在 HBeAg $^+$ /Ab $^+$  组与 HBeAg $^-$ /Ab $^+$  组表达具有显著差异,而在 HBeAg $^+$ /Ab $^+$  和 HBeAg $^+$ /Ab $^-$  组间多无显著性差异,提示  $\gamma\delta$ T 细胞在慢性乙型肝炎中 HBeAg 的血清学转换作用,且其效应可能发生在血清转换过程的后期。而 IFN- $\gamma^+$  $\gamma\delta$ T 在研究组之间并无差异,提示  $\gamma\delta$ T 细胞在 HBeAg 转换的作用并非 IFN- $\gamma^+$  $\gamma\delta$ T 亚群引起的,可能有其他机制,考虑  $\gamma\delta$ T 细胞可能通过其分泌的其他细胞因子或参与的信号通路对 HBeAg 进行血清学转换,这需要进一步的研究。

既往研究显示,产生 IL-17 的细胞在多种疾病的发病机理中发挥着重要作用<sup>[12]</sup>。除了 CD4 细胞(Th17)外,CD8 细胞也可以分泌 IL-17,此类细胞被称为“Tc17”细胞<sup>[13]</sup>。Tc17 的主要功能是通过分泌 IL-17、TNF 和 IL-22 等细胞因子发挥促炎作用。与 Th17 细胞相似,Tc17 也是一种可塑性极强的细胞,可转化为分泌 IFN- $\gamma$  的类似 Tc1 细胞,发挥细胞毒作用<sup>[14]</sup>。

王娟华等<sup>[15]</sup>的研究显示,重度肝损伤患者组的 Tc17 明显低于轻度和无肝损伤患者组。此外,在对丙型肝炎患者的研究中也发现,在低炎症活动的丙型

肝炎患者的 IL-17 $^+$ CD8 细胞明显高于高活动性的患者,提示 IL-17 $^+$ CD8 细胞,即 Tc17 细胞可能对肝炎患者起着某种保护作用<sup>[16]</sup>。本研究进一步对研究组不同分组进行比较,发现在处于转归中间态的 HBeAg $^+$ /Ab $^+$  组中可以观察到 IL-17 $^+$ CD8 水平与转化前后的 HBeAg $^+$ /Ab $^-$  和 HBeAg $^-$ /Ab $^+$  组有显著性差异,提示 HBeAg/Ab 的系统转化过程与 Tc17 这一具有细胞毒性的 T 淋巴细胞密切相关。IL-17 $^+$ CD8 细胞的升高,提示 Tc17 细胞可能通过分泌相关细胞因子,如 IL-17 等募集、激活效应细胞至炎症部位,促进乙型肝炎保护性抗体的产生,清除病原体,对肝炎患者肝脏进行保护。Tc17 细胞的升高预示 HBeAg/Ab 的正向转换的可能性增大,从而对乙型肝炎的病情具有一定的动态监测作用。

复制病毒与宿主之间免疫损伤的反应为肝损伤,患者体内的 HBV-DNA 含量能够反映患者体内病毒的复制情况,就本研究结果来看,HBeAg $^+$ /Ab $^-$  组慢性乙型肝炎患者血清内 HBV-DNA 水平要明显高于 HBeAg $^+$ /Ab $^+$  组和 HBeAg $^-$ /Ab $^+$  组,而 HBeAg $^+$ /Ab $^+$  组的 HBV-DNA 也低于 HBeAg $^-$ /Ab $^+$  组,但差异无统计学意义。提示随着 HBeAg 血清学转换的进程,HBV 的复制程度及传染性强度随之下落; $\gamma\delta$ T 和 Tc17 的水平在一定程度上能够预测患者体内 HBV 的复制情况。

本研究仍然存在样本数量较少,研究不够透彻等缺点和其他待解决的问题, $\gamma\delta$ T 细胞对 HBeAg 血清学转换的作用机制尚不明确,为此,笔者将会继续进行大样本详细分析,争取进一步深入研究乙型肝炎患者 PBMC 中 IFN- $\gamma^+$  $\gamma\delta$ T 细胞、IL17 $^+$  $\gamma\delta$ T 细胞数量及  $\gamma\delta$ T 其他亚群与血清中 HBeAg/Ab 之间的相关性及其临床意义。

#### 4 结 论

综上所述,血清中呈现 HBeAg $^+$ /Ab $^+$  的慢性乙型肝炎患者外周血内  $\gamma\delta$ T 和 Tc17 的水平较高,其理论在临床上能够帮助乙型肝炎患者进行早期、及时的诊断,患者能受到更有效的治疗。乙型肝炎患者体内 Tc17 的频率变化对抗病毒治疗的应答具有预测意义,对临床上乙型肝炎的治疗起到一定的促进作用。

#### 参考文献

- [1] TERRAULT N A, LOK A S F, MCMAHON B J, et al. Update on prevention, diagnosis, and treatment of chronic hepatitis B: AASLD 2018 hepatitis B guidance[J]. Hepatology, 2018, 67(4): 1560-1599.
- [2] 赵晓春, 郭熙清, 刘书宏, 等. 慢性乙型病毒性肝炎患者抗病毒治疗中细胞免疫功能的改变[J]. 安徽医药, 2015, 19(1): 108-110.
- [3] NATHANSON M H, TERRAULT N. Hepatitis B surface antigen loss; not all that we hoped it would be[J]. Hepatology, 2016, 64(2): 328-329. (下转第 183 页)

FSL 试剂时,实验室检测 APTT 及Ⅷ因子时应修改或重新建立新的生物参考区间,并进行验证。

参考文献

[1] ÖZÇAY F, KARADAĞÖNCEL E, BARIS Z, et al. Etiologies, outcomes, and prognostic factors of pediatric acute-liver failure: a single center's experience in Turkey[J]. Turk J Gastroenterol, 2016, 27(5): 450-457.

[2] FANGTHAM M, PETRI M. 2013 update: hopkins lupus cohort[J]. Curt Rheumatol Rep, 2013, 15(9): 360.

[3] NOWAK GOETTL U, LIMPERGER V, BAUER A A, et al. Bleeding issues in neonates and infants-update 2015 [J]. Thromb Res, 2015, 135(1): 41-43.

[4] 吴秀继,唐爱国,邓碧兰,等.凝血四项及 AT-Ⅲ、D-二聚体在肝硬化患者中的变化及临床意义[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(6): 755-756.

[5] JENKINS P V, RAWLEY O, SMITH O P, et al. Elevated factor Ⅷ levels and risk of venous thrombosis[J]. Br J Haematol, 2012, 157(6): 653-663.

[6] 周文宾,李臣宾,张海鹏,等.凝血因子Ⅷ和Ⅸ活性检测参考物质的互通性研究[J]. 中华医学杂志, 2015, 95(34): 2754-2759.

[7] 李小佩,王建新,施秀英,等. Bootstrap 方法建立生物参考区间的研究[J]. 检验医学与临床, 2016, 13(9): 1161-1163.

[8] 邹琛,高原. 0~3 岁婴幼儿凝血功能参考区间的建立[J]. 检验医学, 2018, 33(2): 106-109.

[9] 中华人民共和国卫生部. 临床实验室检验项目参考区间

的制定: WS/T402—2012[S]. 北京: 中国标准出版社, 2013.

[10] Clinical and Laboratory Standards Institute. Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory; approved guideline-third edition: C28-A3[S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2008: 28-61.

[11] KHAIRY G, AL GHUMLAS A, AL DOHAYAN A, et al. Haemostatic changes in laparoscopic cholecystectomy: a comparison between upper and lower limb measurements[J]. Surgical Surg Laparosc Endosc Percutan Tech, 2010, 20(2): 79-83.

[12] 官燕飞,彭建明,刘树沅,等. STA-R 凝血分析仪检测 D-二聚体的性能验证[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(14): 1875-1877.

[13] CATFORD K, MUTHUKUMAR P, REDDY C, et al. Routine neonatal coagulation testing increases use of fresh-frozen plasma[J]. Transfusion, 2014, 54(5): 1444-1445.

[14] ZAREBA P, WU C, AGZARIAN J, et al. Meta-analysis of randomized trials comparing combined compression and anticoagulation with either modality alone for prevention of venous thromboembolism after surgery[J]. Br J Surg, 2014, 101(9): 1053-1062.

[15] CHRISTENSEN R D, BAER V L, LAMBERT D K, et al. Reference intervals for common coagulation tests of preterm infants[J]. Transfusion, 2014, 54(3): 627-632.

(收稿日期: 2019-05-18 修回日期: 2019-09-25)

(上接第 179 页)

[4] 中华医学会肝病学会, 中华医学会感染病学会. 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.

[5] LI X, LIU X, TIAN L, et al. Cytokine-Mediated Immunopathogenesis of hepatitis B Virus Infections[J]. Clin Rev Allergy Immunol, 2016, 50(1): 41-54.

[6] ZHANG Y Y, HU K Q. Rethinking the pathogenesis of hepatitis B virus (HBV) infection[J]. J Med Virol, 2015, 87(12): 1989-1999.

[7] WANG X, TIAN Z.  $\gamma\delta$ T cells in liver diseases[J]. Front Med, 2018, 12(3): 262-268.

[8] CHEN X, SHANG W, XU R, et al. Distribution and functions of gammadelta T cells infiltrated in the ovarian cancer microenvironment[J]. J Transl Med, 2019, 17(1): 144.

[9] CONROY M J, MAC NICHOLAS R, TAYLOR M, et al. Increased frequencies of circulating IFN-gamma-producing vdelta1(+) and vdelta2(+) gammadelta T cells in patients with asymptomatic persistent hepatitis B virus infection[J]. Viral Immunol, 2015, 28(4): 201-208.

[10] 胡辛,胡春松,黄保军. 自然杀伤细胞分泌干扰素  $\gamma$  促进乙型肝炎病毒的清除[J]. 安徽医科大学学报, 2017, 52

(2): 215-220.

[11] 王芳,谢梅. 白细胞介素-1b、10、13 和干扰素- $\gamma$  对慢性乙型肝炎患者乙型肝炎表面抗原和血清学转换的影响[J]. 肝脏, 2018, 23(9): 806-809.

[12] MCGEACHY M J, CUA D J, GAFFEN S L. The IL-17 family of cytokines in health and disease[J]. Immunity, 2019, 50(4): 892-906.

[13] 薛春雪,温铭杰,刘萌,等.  $\gamma\delta$ T17/Th17/Tc17 细胞在 H1N1 重症感染小鼠肺脏中的分布及其与肺脏免疫损伤的关系[J]. 中国免疫学杂志, 2017, 33(4): 563-568.

[14] SANDHU A, AHMAD S, KAUR P, et al. Methotrexate preferentially affects Tc1 and Tc17 subset of CD8 T lymphocytes[J]. Clin Rheumatol, 2019, 38(1): 37-44.

[15] 王娟华,胡敏涛,吴杭源,等. 慢性乙型肝炎患者 Th17/Tc17 影响病毒复制和肝细胞损伤[J]. 世界华人消化杂志, 2014, 22(30): 4638-4641.

[16] GRAFMUELLER S, BILLERBECK E, BLUM H E, et al. Differential antigen specificity of hepatitis C virus-specific interleukin 17 and interferon gamma-producing CD8 (+) T cells during chronic infection[J]. J Infect Dis, 2012, 205(7): 1142-1146.

(收稿日期: 2019-05-29 修回日期: 2019-10-13)