

· 临床研究 ·

慢性乙型肝炎患者外周血 Th17 细胞的表达及临床意义*

孙 强¹, 汤 伟^{1△}, 汪晓莺²

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

摘要:目的 探讨慢性乙型肝炎(CHB)患者外周血 Th17 细胞频率、血清 IL-17 水平及其与临床指标的相关性。方法 采集 29 例 CHB 患者(CHB 组)及 17 例健康体检者(对照组)外周血,采用流式细胞仪分析外周血 Th17 细胞频率;酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测血清 IL-17 水平及 HBV 标志物;荧光实时定量聚合酶链反应(RT-PCR)检测血清 HBV DNA 载量,同时进行肝功能检测。结果 CHB 组患者外周血 Th17 细胞频率、血清 IL-17 水平高于对照组($P < 0.05$);CHB 组患者外周血 Th17 细胞频率与其血清 ALT 水平正相关($r = 0.582, P < 0.01$),而与血清 HBV DNA 载量无明显相关($r = -0.213, P > 0.05$)。结论 Th17 细胞可能参与了 CHB 的发生、发展。

关键词:肝炎,乙型,慢性;T 淋巴细胞,辅助诱导;白细胞介素 17;丙氨酸转氨酶

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.07.012

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)07-0658-03

Exprsion of Th17 cells in peripheral blood of patients with chronic hepatitis B and its clinical significance*

Sun Qiang¹, Tang Wei^{1△}, Wang Xiaoying²

(1. Department of Infectious Diseases, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong, Jiangsu 226001, China;

2. Department of Immunology, Nantong University, Nantong, Jiangsu 226001, China)

Abstract: **Objective** To study the frequency of Th17 cells and serum IL-17 level in peripheral blood of patients with chronic hepatitis B(CHB) and their relation to clinical parameters. **Methods** Peripheral blood of 29 patients with CHB(CHB group) and 17 healthy people who underwent physical examination(control group) were collected. Flow cytometry was used to analyze the frequency of peripheral blood Th17 cell, enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) was adopted to detect the serum IL-17 level and HBV markers and fluorescence real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-PCR) was employed to measure the serum HBV DNA level. Liver function tests were performed simultaneously. **Results** The frequency of Th17 cells and serum IL-17 level in peripheral blood of patients in CHB group were both higher than those in control group($P < 0.05$). The frequency of Th17 cells in peripheral blood of patients in CHB group showed positive correlation with serum ALT level($r = 0.582, P < 0.01$), while it showed no correlation with serum HBV DNA level($r = -0.213, P > 0.05$). **Conclusion** Th17 cells may be involved in the occurrence and development of CHB.

Key words: hepatitis B, chronic; T-lymphocytes, helper-inducer; interleukin-17; alanine transaminase

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染呈世界性流行,但不同地区 HBV 感染的流行情况存在很大差异。据 WHO 报道,全球约 20 亿人曾感染过 HBV,其中 3.5 亿人为慢性 HBV 感染者,每年约有 100 万人死于 HBV 感染所致的肝衰竭、肝硬化及原发性肝细胞癌^[1]。HBV 体内持续感染导致慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)的机制尚未完全阐明,白细胞分化抗原(cluster of differentiation, CD)4 阳性 T 细胞与 CHB 的关系引起人们的注意,并发现辅助性 T 细胞(helper T cell, Th)1/Th2 平衡失调及调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg)功能异常可促进 CHB 的发生、发展及恶化^[2-3]。近年来研究人员发现了一群不同于 Th1、Th2 及 Treg 的细胞亚群,它们不表达白介素(interleukin)-4 或干扰素(interferon, IFN)- γ ,却大量分泌 IL-17,被命名为 Th17 细胞^[4-5]。新近研究报道, Th17 细胞在感染性疾病、自身免疫性疾病以及肿瘤中均发挥重要的调节作用。目前, Th17 细胞是否参与 HBV 感染后 CHB 的发生、发展,它与肝脏的炎症损伤是否存在内在联系等均未见报道。本研究拟通过观察 CHB 患者外周血 Th17 细胞频率、血清 IL-17 水平及其与临床指标的相关性,探讨 Th17 与 CHB 的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 29 例南通大学附属医院感染科门诊和住院确诊的 CHB 患者作为 CHB 组,其中,男 17 例,女 12 例;年龄 17~56 岁,平均 37.8 岁。诊断参照 2005 年中华医学会肝病学会、感染病学会修定的《慢性乙型肝炎防治指南》诊断标准。所有病例均除外其他病毒性肝炎、酒精性肝病、药物性肝炎、自身免疫性肝病及遗传性肝病等,且未经任何抗病毒或免疫调节药物治疗。另选 17 例健康体检者作为对照组,其中,男 10 例,女 7 例;年龄 18~51 岁,平均 32.9 岁;均无肝炎病史,肝炎病原学血清标志物检测为阴性,肝功能各项指标正常。

1.2 主要试剂与仪器 主要试剂:IL-17A-PE、CD4-PerCP-Cy5.5 抗体及同型对照购自美国 eBioScience 公司,佛波醇酯、离子霉素及布雷菲德菌素 A(Brefeldin A, BFA)购自瑞士 Alexis 公司,Fix&Perm(Reagent A, Reagent B)为美国 Invitrogen 公司产品,IL-17 酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒购自上海依科赛生物制品有限公司,HBV 血清标志物 ELISA 试剂盒购自厦门英科新创科技有限公司,HBV 核酸扩增荧光定量检测试剂盒购自中山达安

生物技术有限公司,丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)试剂盒为日本协和医药株式会社产品。主要仪器:流式细胞仪(美国 BD 公司)、Rotor-Gene 荧光实时定量聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)仪及 7600 型全自动生化分析仪(日本日立公司)。

1.3 外周血 Th17 细胞频率的检测 采集健康人和 CHB 患者全血 100 μ L(新鲜肝素钠抗凝),用 RPMI 1640 培养基 100 μ L 稀释,加入 1 μ g/mL 佛波醇酯工作液 5 μ L, 50 μ g/mL 离子霉素工作液 4 μ L 及 0.5 mg/mL BFA 工作液 4 μ L。37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱培养 6 h。加入 CD4-PerCP-Cy5.5 抗体 10 μ L,室温避光温育 15 min。将其分为 2 管,每管 100 μ L,编号为 a 和 b。分别加入 Fix&Perm 中的 Reagent A(即固定液)100 μ L,室温、避光温育 15 min,分别加入磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffered solution, PBS) 3 mL,离心 5 min(离心半径 8 cm, 1 200 r/min),弃除上清液。分别加入 Fix&Perm 中的 Reagent B(即破膜和溶血液)100 μ L,同时在 a 管中加 10 μ L 鼠 IgG, b 管中加入 10 μ L IL-17A-PE,室温、避光温育 15 min。每管加 PBS 3 mL,离心 5 min(离心半径 8 cm, 1 200 r/min),弃除上清液。加入 0.5 mL PBS 重悬细胞,采用流式细胞仪检测。

1.4 血清细胞因子 IL-17 水平的检测 采用 ELISA 法检测 CHB 患者和健康人外周血血清 IL-17 的水平,严格按试剂盒说明书进行检测。

1.5 血清 HBV DNA、HBV 标志物、ALT 的检测 采用荧光实时定量 PCR 法检测患者血清 HBV DNA 水平;ELISA 法检测 HBV 标志物;采用速率法检测血清 ALT(日立 7600 型全自动生化分析仪)。

1.6 统计学处理 应用 SPSS11.5 软件进行统计学分析,计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间 Th17 细胞频率、IL-17 水平的比较采用两独立样本的 *t* 检验;血清 ALT 水平与 Th17 细胞,HBV DNA 与 Th17 细胞的相关分析采用 Pearson 相关检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 外周血 Th17 细胞频率的检测 采用流式细胞术多色荧光分析法检测外周血 Th17 细胞频率,CHB 组患者和对照组健康体检者外周血 Th17 细胞频率比较,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。将 CHB 患者分为 HBV e 抗原(HBV e antigen, HBeAg)阳性组与 HBeAg 阴性组,两组患者外周血 Th17 细胞频率比较,差异无统计学意义(*P* > 0.05),结果见表 1。对照组中 1 例健康体检者和 CHB 组中 1 例 CHB 患者外周血 Th17 细胞频率分别为 9.20% 和 12.11%,见图 1、2。

表 1 各组人员外周血 Th17 细胞频率、血清 IL-17 水平的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	Th17 频率(%)	IL-17(ng/mL)
对照组	17	9.18 \pm 1.20	4.15 \pm 1.59
CHB 组	29	11.58 \pm 1.85*	6.32 \pm 2.44*
HBeAg 阳性组	16	12.17 \pm 1.62	6.26 \pm 2.68
HBeAg 阴性组	13	10.85 \pm 1.92	6.38 \pm 2.20

* :*P* < 0.05,与对照组比较。

2.2 外周血中血清 IL-17 水平的检测 CHB 组患者和对照组健康体检者外周血血清 IL-17 水平比较,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。将 CHB 患者分为 HBeAg 阳性组与 HBeAg 阴性组,两组患者外周血血清 IL-17 水平比较,差异无统计学意义

(*P* > 0.05),结果见表 1。

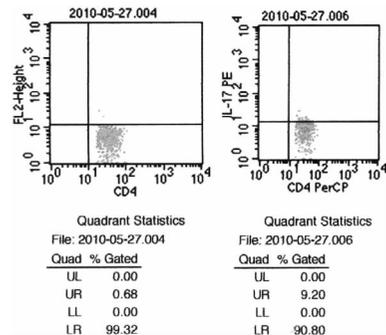


图 1 对照组(1例)外周血 Th17 细胞频率

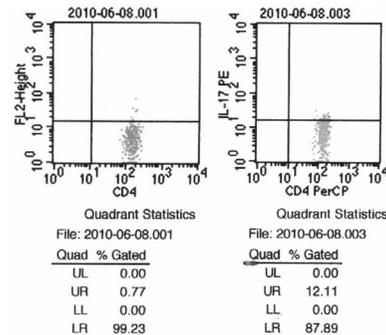


图 2 CHB 组(1例)外周血 Th17 细胞频率

2.3 CHB 患者 Th17 细胞频率与 HBV DNA 载量、血清 ALT 的直线相关性分析 CHB 组患者外周血 Th17 细胞频率与血清 ALT 水平正相关(*r* = 0.582, *P* < 0.01),而 Th17 细胞频率与 HBV DNA 载量无明显相关性(*r* = -0.213, *P* > 0.05)。

3 讨 论

HBV 在机体持续性感染所致 CHB 发生的机制尚未完全阐明。HBV 是一种非细胞毒性病毒,当其进入机体后常可引起一系列复杂的免疫反应,而机体产生免疫应答的强弱又与 HBV 感染所致的不同临床结果密切相关。在这一系列免疫应答中,细胞免疫应答是决定 HBV 感染后疾病转归的重要因素,不同 T 细胞亚群对病毒抗原的反应不同,即对病情轻重及疾病转归的影响不同。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^[6],效应 CD4⁺ T 细胞是机体免疫应答的重要成员,并在免疫调节中发挥关键作用。效应 CD4⁺ T 细胞只有在应答恰当时,才能建立有效的宿主免疫体系并维持免疫记忆。但如果效应 CD4⁺ T 细胞失调,则会导致机体产生严重的炎症性损伤,如自身免疫疾病和自身炎症性疾病等。

根据细胞的功能,将 CD4⁺ T 细胞分为 Th1、Th2 细胞及 Treg 细胞 3 个亚群^[7-8]。最近人们发现一群不同于 Th1、Th2 及 Treg 的细胞亚群,它们不表达 IL-4 或 IFN- γ ,却高表达 IL-17,因此,命名为 Th17 细胞。Th17 细胞主要通过其分泌的细胞因子 IL-17A、IL-17F、IL-6、IL-22 及肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor alpha, TNF- α)等发挥作用,其中最主要是 IL-17A,也称为 IL-17,其受体在体内广泛表达。IL-17 是一种重要的炎症介质,它可通过诱导其他炎症细胞因子,如 IL-6、TNF- α 及趋化因子等的表达介导炎症细胞的局部浸润及组织损伤;IL-17 也参与中性粒细胞、树突状细胞的增殖、成熟及趋化过程^[9]。Th17 细胞在多种疾病中发挥着重要的效应作用。在感染性疾病中,Luzza 等^[10]发现胃、十二指肠幽门螺旋杆菌

感染后外周血 IL-17 水平增加;牙周炎也出现血清 IL-17 表达水平的升高,这些提示 IL-17 参与了细菌感染后的炎症反应^[10-11];在肿瘤方面,有学者发现胃癌患者外周血 Th17 细胞及其相关因子 IL-23、IL-17 明显高于健康人,且外周血 Th17 细胞频率与胃癌的分期有关,晚期胃癌患者频率较高^[12];在自身免疫性疾病中,研究人员发现溃疡性结肠炎和克罗恩病患者炎症急性期的肠黏膜内有大量 Th17 细胞存在;在类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、多发性硬化症以及炎症性疾病中 Th17 细胞发挥了重要的调节作用;同时 Th17 细胞也与自身免疫性血液病如再生障碍性贫血有密切关系。另外,有研究发现急性冠状动脉综合征患者外周血 Th17 细胞频率增加,IL-17、IL-23 水平升高,Th17 细胞可能参与不稳定动脉粥样斑块和急性冠状动脉综合征的发病^[13-16]。

本实验对 CHB 患者外周血 Th17 细胞频率及其分泌的 IL-17 变化进行研究,结果表明 CHB 患者外周血 Th17 细胞频率明显高于健康人群,同时 CHB 患者外周血 IL-17 水平也明显高于健康人群,提示 CHB 患者体内存在较多的 Th17 细胞及其相关分泌因子的高表达。为探讨 Th17 细胞及其细胞因子在 CHB 发病过程中的作用,本实验进一步对 CHB 患者组外周血血清 HBV DNA 载量、ALT 进行检测,发现 CHB 患者组外周血 Th17 细胞频率与血清 ALT 水平正相关($P < 0.01$),这一现象提示 CHB 患者 Th17 细胞通过大量分泌 IL-17 发挥生物学作用,诱导中性粒细胞、巨噬细胞的聚集,加重肝脏损害。而 CHB 患者外周血 Th17 细胞频率与 HBV DNA 载量无明显相关性,提示 Th17 细胞的多少与病毒含量的直接关系并不大,但其与病毒感染后引起的免疫反应或组织损伤有关。

综上所述,本研究初步表明 Th17 细胞可能在 CHB 的发生、发展中发挥重要作用,但 Th17 细胞的功能、分布特点及其与 CHB 持续感染的免疫机制还有待进一步探讨。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] 福军亮,徐东平,赵平,等.急性慢性乙型肝炎患者外周血调节性 T 细胞鉴定与临床意义分析[J].中华医学杂志,2006,86(22):1522-1525.
- [3] 辛永宁,宣世英,孙樱.慢性乙型肝炎 Th1/Th2 细胞的免疫功能研究进展[J].临床肝胆病杂志,2005,21(3):182-184.
- [4] 李佳,陈小平.Th 效应细胞家族的新成员——Th17[J].中国免疫学杂志,2007,23(11):1048-1051.
- [5] Park H,Li Z,Yang XO,et al.A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17[J].Nat Immunol,2005,6(11):1133-1141.
- [6] Rehermann B,Nascimbeni M.Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection[J].Nat Rev Immunol,2005,5(3):215-229.
- [7] Murphy KM,Reiner SL.The lineage decisions of helper T cells[J].Nat Rev Immunol,2002,2(12):933-944.
- [8] Reiner SL.Development in motion: helper T cells at work[J].Cell,2007,129(1):33-36.
- [9] Kolls JK,Lindén A.Interleukin-17 family members and inflammation[J].Immunity,2004,21(4):467-476.
- [10] Luzzza F,Parrello T,Monteleone G,et al.Up-regulation of IL-17 is associated with bioactive IL-8 expression in Helicobacter pylori-infected human gastric mucosa[J].J Immunol,2000,165(9):5332-5337.
- [11] Johnson RB,Wood N,Serio FG.Interleukin-11 and IL-17 and the pathogenesis of periodontal disease[J].J Periodontol,2004,75(1):37-43.
- [12] 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.
- [13] Chabaud M,Durand JM,Buchs N,et al.Human interleukin-17: A T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium[J].Arthritis Rheum,1999,42(5):963-970.
- [14] 郭宁红,石庆之.Th17 细胞与自身免疫性血液病[J].重庆医学,2010,39(18):2533-2535.
- [15] 余娴,程翔,廖玉华,等.急性冠状动脉综合征患者 Th17 细胞检测及意义[J].临床心血管病杂志,2008,24(2):145-148.
- [16] Röhn TA,Jennings GT,Hernandez M,et al.Vaccination against IL-17 suppresses autoimmune arthritis and encephalomyelitis[J].Eur J Immunol,2006,36(11):2857-2867.

(收稿日期:2011-09-02 修回日期:2011-11-25)

(上接第 657 页)

- [9] Shishehbor MH,Brennan ML,Aviles RJ,et al.Statins promote potent systemic antioxidant effects through specific inflammatory pathways [J].Circulation,2003,108(4):426-431.
- [10] Nissen SE,Tuzcu EM,Schoenhagen P,et al.Statin therapy, LDL cholesterol, C-reactive protein, and coronary artery disease[J].N Engl J Med,2005,352(1):29-38.
- [11] Di Napoli P,Taccardi AA,Oliver M,et al.Statins and stroke: evidence for cholesterol-independent effects[J].Eur Heart J,2002,23(24):1908-1921.
- [12] John S,Schneider MP,Delles C,et al.Lipid-independent effects of statins on endothelial function and bioavailability of nitric oxide in hypercholesterolemic patients[J].Am Heart J,2005,149(3):473.
- [13] Chandrasekar B,Valente AJ,Freeman GL,et al.Interleukin-18 induces human cardiac endothelial cell death via a novel signaling pathway involving NF-kappaB-dependent PTEN activation [J].Biochem Biophys Res Commun,2006,339(3):956-963.
- [14] 李泽林,孙华保,宁丹霞,等.大剂量阿托伐他汀对急性冠状动脉综合征患者血清抗氧化能力的影响[J].中国动脉硬化杂志,2006,14(8):701-704.
- [15] Ovbiagele B,Saver JL.Intensive statin therapy after stroke or transient ischemic attack: a SPARCLing success[J].Stroke,2007,38(3):1110-1112.

(收稿日期:2011-11-18 修回日期:2012-01-05)