

论著·基础研究

小儿慢性乙型肝炎患者外周血 Th17 细胞/调节性 T 细胞失衡的研究

池小斌,陈光明
(南京军区福州总院全军儿科中心,福州 350025)

摘要:目的 探讨小儿慢性乙型肝炎(CHB)患者不同疾病进展状态下 Th17 细胞/调节性 T 细胞(Treg 细胞)的平衡特点。方法 入组 16 例健康对照(对照组)、60 例小儿 CHB 患者(CHB 组),采集外周血及血清,采用流式细胞仪检测 Fox3+Treg 细胞及 Th17 细胞的频率,并用酶联免疫吸附试验方法(ELISA)检测血清中 Th17/Treg 分化相关细胞因子。结果 CHB 组的 Treg 细胞、Th17 细胞频率及 Th17/Treg 比值显著高于对照组,Th17 频率与疾病进展呈正相关。CHB 组患者血清中 IL-17A、IL-22 及 IL-23 水平高于对照组($P<0.05$)。结论 小儿 CHB 组患者存在 Th17/Treg 的失衡。
关键词:T 淋巴细胞,调节性;肝炎,乙型,慢性;辅助性 Th17 细胞
doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.18.016 文献标识码:A 文章编号:1671-8348(2014)18-2305-03

Study on imbalance of peripheral blood Th17/Treg in children with chronic hepatitis B
Chi Xiaobin,Chen Guangming

(Pediatric Center,Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Region,Fuzhou,Fujian 350025,China)

Abstract: Objective To study the frequency of peripheral blood T helper 17(Th17) and regulatory T cells(Treg) and their associated cytokines level in child chronic hepatitis B(CHB) and to investigate the balance characteristics of Th17/Treg under different progression status in child CHB. **Methods** Peripheral blood and serum of 60 children with CHB and 16 healthy controls were collected for detecting the frequency of peripheral blood Fox3+Treg and Th17 by the flow cytometry and serum levels of Th17/Treg differentiation associated cytokine IL-17A, TGF- β , IL-22, IL-23, IL-6 and IL-1 β were detected by the enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA). **Results** The frequency of peripheral blood Th17 and Treg, and the ratio of Th17/Treg in the CHB group were significantly higher than those in the healthy controls, the frequency of Th17 was positively correlated with disease progression. In addition, serum IL-17A, IL-22 and IL-23 levels in the CHB children were higher than those in the healthy controls($P<0.05$). **Conclusion** Th17 and Treg play the important role in the mechanism of child CHB. The imbalance of Th17/Treg exists in child CHB.
Key words: T-lymphocytes, regulatory; hepatitis B, chronic; T helper 17

我国是乙型肝炎病毒(HBV)感染的高发区,感染者约 1.3 亿,每年因乙型肝炎死亡的人数达 30 万。我国在每年新发病例中,40%~50%来源于 HBV 母婴传播感染^[1]。婴儿或儿童感染 HBV,其中 15%~25% 将发展为慢性 HBV 携带者,是肝硬化和肝细胞癌的主要原因之一^[2]。慢性 HBV 感染定义为乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)阳性持续至少 6 个月,多数慢性 HBV 感染儿童处于免疫耐受期,表现为 HBeAg 阳性、高 HBV DNA 水平而丙氨酸氨基转移酶(ALT)正常,肝组织学正常或轻微炎症病变。小儿慢性 HBV 感染严重影响青少年的健康,给社会带来严重的经济压力。

人体免疫反应决定着 HBV 感染的疾病进展。CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞(regulatory T cells, Treg 细胞)是近年定义的一种特殊的 T 细胞亚群,特异性高表达 Foxp3。Treg 细胞在慢性乙型肝炎发病的免疫机制中发挥重要作用^[3]。Th17 细胞是最近发现的能分泌白细胞介素(IL)-17 的一类辅助性 T 细胞亚群,参与宿主防御、感染、肿瘤、自身免疫性疾病、移植排斥等病理过程。Th17 与慢性乙型肝炎的炎症程度相关,可能参与免疫介导的肝脏损伤^[4]。Treg 细胞与 Th17 细胞的分化和功能相互抑制,Th17/Treg 细胞平衡对维持免疫内环境的稳定起重要作用,失衡可引起全身或局部免疫应答异常,导致自身免疫性疾病、持续感染、肿瘤等疾病^[5]。本文主要研究 Th17/Treg 细胞平衡与小儿慢性 HBV 感染的相关性,现报道

如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取本院 2012 年 3 月至 2013 年 3 月收治的 60 例小儿慢性乙型肝炎(CHB)患者(CHB 组),其中男 38 例,女 22 例,平均年龄(8.0 \pm 4.0)岁;ALT 50~788 U/L,平均 141.5 U/L;HBV DNA(4.85~1.55) $\times 10^8$,平均 1.07 $\times 10^8$ 。同时选取健康对照者 16 例(对照组),其中男 11 例,女 5 例,平均年龄(7.6 \pm 3.4)岁;ALT 8~20 U/L,平均 12.8 U/L。CHB 及乙型肝炎肝硬化诊断标准:符合我国 2010 年制定的《慢性乙型肝炎防治指南》,CHB 患者根据临床指标分为轻度组和中重度组。CHB 组入组标准:年龄 1~12 岁,HBsAg 阳性大于或等于 6 个月,HBV DNA 阳性(对于 CHB 患者 e 抗原阳性者 HBV DNA $\geq 2 \times 10^4$ IU/mL,e 抗原阴性者 HBV DNA $\geq 2 \times 10^3$ IU/mL),无核苷类似物和或干扰素抗病毒治疗史、或核苷类似物抗病毒治疗停用半年以上。排除标准:合并严重细菌感染、其他嗜肝病毒感染、自身免疫性、酒精性、药物性、脂肪性等其他因素肝损害、原发性肝癌、其他严重的全身性疾病和精神病患者。研究经伦理委员会许可,患者监护人签署知情同意书。根据病理分级(Scheuer 评分系统)将患者分为无纤维化组(S₀期)、轻度肝纤维化组(S_{1~2}期)和中度及重度肝纤维化组(S_{3~4}期)^[6]。CHB 组患者中 S_{0~2}38 例,S_{3~4}22 例。

1.2 方法

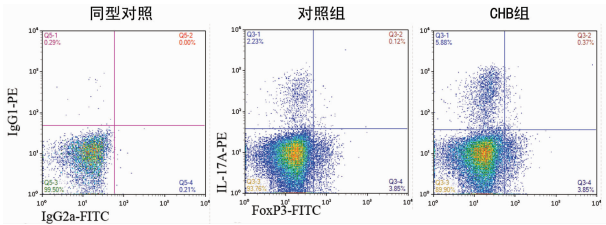
1.2.1 流式细胞仪检测 抗 Foxp3-异硫氰酸荧光素(FITC)、IL-17A-藻红蛋白(PE)破膜剂、破膜稀释液、破膜洗剂购自ebioscience 公司,抗 CD4-别藻蓝蛋白(APC)、抗 CD3-多甲藻叶绿素蛋白(PerCP)等购自美国 BD 公司,淋巴细胞分离液购自天津灏洋生物公司,PBS 液为自制。Th17 细胞检测:取新采集肝素抗凝外周血 200 μ L,加入 200 μ L 含 10%胎牛血清的 RP-MI-1640,用 50 ng/mL 佛波酯(PMA)和 1 mg/mL 离子霉素(Ionomycin)(购自 Sigma-Aldrich 公司)刺激 6 h,并用 Monensin(BD PharMingen)阻断细胞因子的分泌。染色方法:CD3 和 CD4 进行表型染色,然后进行溶血、破膜,进行细胞内 FoxP3 和 IL-17 染色。数据用 FACSCalibur(美国 BD 公司)获取并用 FlowJo 软件(美国 Tristar 公司)分析。

1.2.2 细胞因子检测 采用酶联免疫吸附试验方法(ELISA)检测血清中 IL-17A、TGF- β 、IL-22、IL-23、IL-6 及 IL-1 β 。细胞因子检测试剂盒均购自 R&D 公司,按照说明书步骤进行操作,用酶标仪(美国 BIO-RAD 公司)进行检测。

1.3 统计学处理 所有资料均应用 SPSS13.0 统计分析软件,组间数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均数比较使用 *t* 检验、方差分析或秩和检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

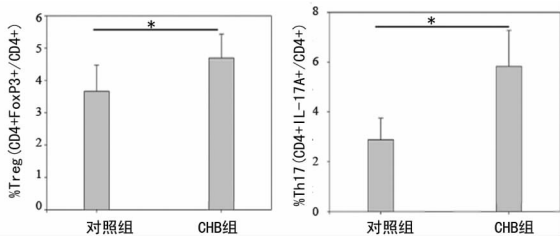
2 结 果

2.1 Th17 细胞与 Treg 细胞流式细胞仪检测 采集小儿 CHB 患者及健康者外周血,用 PMA 和离子霉素刺激后,进行 CD3-PerCP、CD4-APC、FoxP3-FITC 及 IL-17A-PE 染色,用流式细胞仪进行检测。两组对象 Treg 及 Th17 典型图如图 1 所示。对两组对象 Treg 及 Th17 频率进行比较,CHB 患者 Treg 频率略高于对照组,而 Th17 频率显著高于对照组,见图 1。



* : $P < 0.05$,与组间相比差异有统计学意义。
图 1 Treg 细胞及 Th17 细胞的流式检测典型图

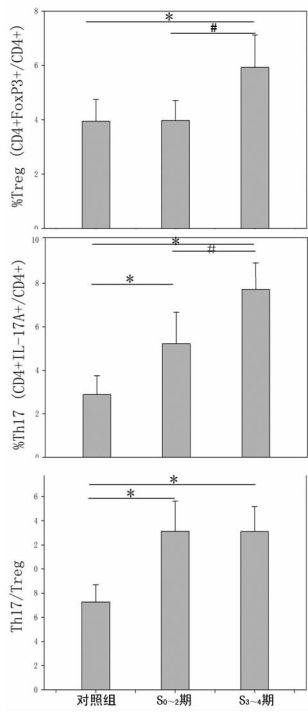
2.2 两组对象外周血 Th17 与 Treg 细胞频率比较 CHB 组患者外周血 Th17 细胞及 Treg 细胞频率高于对照组。Th17 细胞频率随疾病的严重程度增加而升高。炎症较轻的 CHB 患者($S_{0\sim 2}$ 期)Treg 频率与对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);炎症较重的患者($S_{3\sim 4}$ 期)Treg 频率显著升高。Th17/Treg 比值 CHB 组患者高于对照组,见图 2、3。



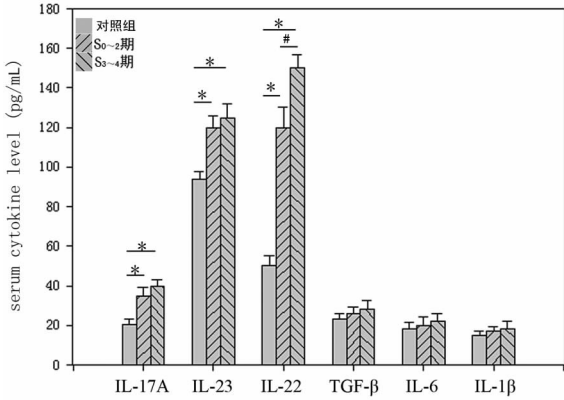
* : $P < 0.05$,与对照组比较。
图 2 Treg 细胞和 Th17 细胞在两组患者外周血中频率的比较

2.3 两组对象血清中细胞因子水平比较 CHB 组患者血清中诱导 Th17 分化的细胞因子水平高于对照组。与对照组相比,CHB 组患者血清中 TGF- β 、IL-6、IL-1 β 差异均无统计学意

义($P > 0.05$)。CHB 组患者 IL-17A、IL-23 及 IL-22 水平高于对照组($P < 0.05$)。血清中 IL-17A 及 IL-23 的水平与疾病严重程度无相关性,IL-22 随炎症程度增加而升高,见图 4。



* : $P < 0.05$,与对照组比较;# : $P < 0.05$,与 $S_{0\sim 2}$ 期比较。
图 3 Treg、Th17 频率及 Th17/Treg 在不同组之间的比较



* : $P < 0.05$,与对照组比较;# : $P < 0.05$,与 $S_{0\sim 2}$ 期比较。
图 4 血清中细胞因子水平检测

3 讨 论

Treg 及 Th17 细胞在 CHB 患者肝脏损伤中发挥重要的作用。本研究中 CHB 组患者,通过检测外周血 Treg 及 Th17 细胞频率和相关细胞因子水平,分析小儿 CHB 患者外周血 Th17/Treg 的平衡特点。研究首次发现小儿 CHB 患者外周血 Th17 细胞频率升高,Th17/Treg 失衡与小儿 CHB 患者疾病进展相关。小儿 CHB 患者血清中细胞因子 IL-22、IL-23 及 IL-17A 水平升高,表明 CHB 感染促进 Th17 的分化,导致 Th17/Treg 的失衡。

CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg 细胞主要通过接触依赖的方式抑制机体炎症反应,从而维持免疫平衡。在慢性 HBV 感染过程中,Treg 发挥重要的免疫调节作用^[7]。Treg 抑制炎症反应,从而降低肝脏损伤。另一方面,Treg 抑制特异性免疫反应,有利于疾病的进展^[8]。本研究发现与对照组相比,炎症较轻的小

儿 CHB 患者外周血 Treg 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。这一结果与成人 CHB 患者一致^[9]。进一步分析发现肝损伤较重的 CHB 患者 Treg 高于对照组,表明机体可能需要诱导 Treg 的产生以抑制炎症反应。

辅助性 Th17 细胞能够分泌 IL-17,是新发现的一群不同于 Th1、Th2 及 Treg 等的 CD4⁺ 辅助性 T 细胞亚群。Th17 主要分泌 IL-17A,在机体炎症反应和微生物免疫过程中发挥重要作用^[10]。研究发现,成人 CHB 患者及肝硬化患者外周血 Th17 细胞频率增加,并且与疾病的严重程度相关^[11-13]。CHB 患者外周血 Th17 频率与血清中转氨酶水平呈正相关,且与肝脏部位 IL-17A 的聚集显著相关^[14]。另外研究发现,小儿 CHB 患者 Th17 频率也升高^[15]。本研究发现小儿 CHB 患者外周血 Th17 细胞频率升高,并且随着肝脏损伤程度的增加而增加。结果验证了 Th17 在小儿 CHB 患者体内的促炎症作用,可能介导肝脏损伤。外周血 Th17 频率与小儿 CHB 患者的临床指标的关系尚不明确,需要大样本量的数据研究。

Th17/Treg 的平衡在维持机体正常的免疫反应中发挥重要作用。成人 CHB 患者, Th17/Treg 的平衡出现异常^[16-17]。在成人 CHB 患者中, Th17/Treg 比值升高与肝脏损伤的严重程度正相关^[17]。干扰素治疗 CHB 患者能够恢复 Th17/Treg 的平衡^[16]。上述研究表明, Th17/Treg 平衡在 CHB 感染中的重要性,同时提示其与疾病进展的相关性,从而提供 CHB 进展及治疗的免疫学指标。本研究首次检测小儿 CHB 患者 Th17/Treg 的平衡特点,发现小儿 CHB 患者 Th17/Treg 比值高于对照组,出现 Th17/Treg 失衡。

Treg 和 Th17 细胞从相同的前体细胞分化而来,不同的免疫微环境调节细胞的分化。Th17/Treg 失衡的受体内微环境影响,在慢性 HBV 感染过程中的调节 Treg 及 Th17 分化的细胞因子存在异常^[18]。TGF- β 诱导 Treg 的形成,而 IL-23 及 IL-6 等有利于 Th17 的分化^[5]。IL-23/IL-17 通路在 CHB 发病过程中发挥重要作用,可能参与肝脏炎症损伤^[19]。本研究对 IL-17A 及 Th17/Treg 分化相关细胞因子的血清水平进行检测发现,小儿 CHB 患者 IL-17A 水平升高,与之相对应的是 IL-22、IL-23 水平升高,表明小儿 CHB 患者体内免疫微环境有利于 Th17 的分化。

综上所述,本研究首次调查小儿 CHB 患者外周血 Th17 及 Treg 的频率,并分析其在不同疾病进展下的平衡特点,初步探讨 CHB 感染的炎症环境对 Th17 分化的诱导作用。本研究为小儿 CHB 感染过程中 Th17/Treg 的作用提供新的参考,有助于进一步了解免疫介导的肝脏损伤。Treg 及 Th17 细胞在小儿 CHB 患者不同进展阶段的作用及临床意义仍需进一步研究。

参考文献:

- [1] 张波,苏婷婷. 小儿慢性乙型肝炎的流行病学特点及治疗进展[J]. 中西医结合肝病杂志, 2012, 22(3): 188-190.
- [2] 俞惠. 小儿乙型肝炎的流行病学及诊治进展[J]. 临床肝胆病杂志, 2011, 27(7): 687-689.
- [3] Billerbeck E, Thimme R. Regulatory T cells in viral hepatitis[J]. World J Gastroenterol, 2007, 13(36): 4858-4864.
- [4] Bauer T, Protzer U. Immune control of hepatitis B virus[J]. Dig Dis, 2011, 29(4): 423-433.

- [5] Zhao L. Th17 cells: the emerging reciprocal partner of regulatory T cells in the liver[J]. J Dig Dis, 2010, 11(3): 126-133.
- [6] 刘卫平, 许德军, 赵连荣. 慢性乙型肝炎肝纤维化无创检测模型建立及应用价值验证[J]. 2008, 47(4): 308-312.
- [7] Nebbia G. Hepatitis B infection: current concepts and future challenges[J]. QJM, 2012, 105(2): 109-113.
- [8] Xu D, Fu J, Jin L, et al. Circulating and liver resident CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells actively influence the antiviral immune response and disease progression in patients with hepatitis B[J]. J Immunol, 2006, 177(1): 739-747.
- [9] Zhang JY, Song CH, Shi F, et al. Decreased ratio of Treg cells to Th17 cells correlates with HBV DNA suppression in chronic hepatitis B patients undergoing entecavir treatment[J]. PLoS One, 2010, 5(11): e13869.
- [10] Korn T. IL-17 and Th17 Cells[J]. Annu Rev Immunol, 2009, 27(1): 485-517.
- [11] Ye Y, Xie X, Yu J, et al. Involvement of Th17 and Th1 effector responses in patients with Hepatitis B[J]. J Clin Immunol, 2010, 30(4): 546-555.
- [12] Sun HQ, Zhang JY, Zhang H, et al. Increased Th17 cells contribute to disease progression in patients with HBV-associated liver cirrhosis[J]. J Viral Hepat, 2012, 19(6): 396-403.
- [13] 孙强, 汤伟, 汪晓莺. 慢性乙型肝炎患者外周血 Th17 细胞的表达及其意义[J]. 重庆医学, 2012, 41(7): 658-660.
- [14] Zhang JY, Zhang Z, Lin F, et al. Interleukin-17-producing CD4(+) T cells increase with severity of liver damage in patients with chronic hepatitis B[J]. Hepatology, 2010, 51(1): 81-91.
- [15] Zhu S, Zhang H, Dong Y, et al. The correlation between T helper type 17 cells and clinical characters in Chinese paediatric patients with chronic hepatitis B[J]. Clin Exp Immunol, 2013, 171(3): 307-312.
- [16] Xue-Song L, Cheng-Zhong L, Ying Z, et al. Changes of Treg and Th17 cells balance in the development of acute and chronic hepatitis B virus infection[J]. BMC Gastroenterol, 2012, 12: 43.
- [17] Zhang GL, Xie DY, Lin BL, et al. Imbalance of interleukin-17-producing CD4 T cells/regulatory T cells axis occurs in remission stage of patients with hepatitis B virus-related acute-on-chronic liver failure[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2013, 28(3): 513-521.
- [18] Huang Z, van Velkinburgh JC, Ni B, et al. Pivotal roles of the interleukin-23/T helper 17 cell axis in hepatitis B[J]. Liver Int, 2012, 32(6): 894-901.
- [19] Wang Q, Zheng Y, Huang Z, et al. Activated IL-23/IL-17 pathway closely correlates with increased Foxp3 expression in livers of chronic hepatitis B patients[J]. BMC Immunol, 2011, 12(3): 25.

(收稿日期: 2013-12-28 修回日期: 2014-01-29)