

# 慢性乙型病毒性肝炎患者外周血 Th17 细胞 变化及其分化机制的研究<sup>①</sup>

陈晶<sup>1,2</sup>, 梁丽英<sup>1</sup>, 宋曦<sup>1</sup>

(1. 广西中医药大学第一附属医院医学分子生物学实验室, 广西南宁 530021

E-mail: 27907854@qq.com;

2. 广西医学科学实验中心, 广西南宁 530021)

**摘要:** **目的** 证实辅助性 T 细胞(Th17)在慢性乙型肝炎(CHB)疾病过程中的作用及其在 CHB 中可能的分化机制。**方法** 采用流式细胞术检测 44 例 CHB 患者和 23 例正常对照组 Th17 细胞频数和 CD3<sup>+</sup>IL-6<sup>+</sup>T 细胞频数。**结果** 随着 CHB 患者疾病严重程度加重, 其外周血 Th17 细胞频数、CD3<sup>+</sup>IL-6<sup>+</sup>T 细胞频数逐渐升高, 且 CD3<sup>+</sup>IL-6<sup>+</sup>T 细胞频数和 Th17 T 细胞之间存在正相关关系( $r=0.621$ )。**结论** Th17 细胞可能是 CHB 进展的原因之一, 体内 CD3<sup>+</sup>IL-6<sup>+</sup>T 细胞的变化与 Th17 细胞的变化密切相关, 可能是促进 Th17 细胞分化的因素之一。

**关键词:** 慢性乙型病毒性肝炎; Th17 细胞; CD3<sup>+</sup>IL-6<sup>+</sup>T 细胞

**中图分类号:** R512.62

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1001-5817(2016)06-0592-03

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2016.06.012

我国有 1.3 亿乙肝病毒携带者和 3 000 多万乙肝患者, 其中约有 20%~40% 的患者经过多年慢性炎症的反复发作可发展为肝硬化和肝癌。以往的研究认为慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)的发生和发展主要取决于感染的病毒量, 病毒毒力的大小和机体的反应性(抗病毒免疫或变态反应), 其免疫学特点表现为 Th1/Th2 型免疫应答紊乱。最近的研究表明, 人体感染乙型肝炎病毒(HBV)后, 可产生急性肝脏炎症、慢性肝脏炎症、病原携带无活动病变等表现, 与之相关的更重要的是机体的免疫状况。

辅助性 T 细胞 17 (Th<sub>17</sub>, Th17)是一群既不同于 Th1、Th2, 也不同于 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞的 T 细胞亚型<sup>[1]</sup>。有报道显示, Th17 具有独立的分化和发育调节机制, 与 IL-6 关系密切<sup>[2]</sup>。同时已有的研究结果证明 Th17 细胞可能在病毒性肝炎慢性化过程中具有重要作用<sup>[3-5]</sup>。因此, 有必要对 CHB 过程中 Th17 细胞水平、分泌 IL-6 的 T 细胞水平进行检测, 以期进一步证实 Th17 细胞在 CHB 疾病过程中的作用及其可能的分化机制。

## 1 资料和方法

1.1 一般资料 收集 2013 年 1 月—2014 年 12 月在我院肝病科门诊及住院患者 42 例资料, 其中轻中度 21 例, 女性 6 例, 男性 15 例, 年龄 19~58 岁, 平均 38.2 岁; 重度 21 例, 女性 9 例, 男性 12 例, 年龄 21~58 岁, 平均 40.9 岁。诊断标准参照《慢性乙型肝炎防治指

南》进行诊断。所有患者近半年来未用过抗病毒药物。排除合并其他肝炎病毒感染、合并代谢性肝病和免疫系统疾病。正常对照组人员均为我院健康体检者, 共 23 例, 其中女性 8 例, 男性 15 例, 年龄 27~60 岁, 平均 41.8 岁。各组人员年龄、性别比较, 差异无统计学意义( $P>0.05$ ), 具有可比性。

1.2 样本采集 采集各实验对象晨起空腹外周静脉血 5 ml, 肝素抗凝, 应用流式细胞术进行 Th17 细胞、表达 IL-6 的 T 细胞频数的检测。

## 1.3 实验室检查

1.3.1 细胞的分离和培养 取 5 ml 抗凝全血, 加入 5 ml 磷酸盐缓冲液(PBS), 混匀。将上述稀释血液缓慢加入等体积的淋巴细胞分离液(Solarbio 公司产品)中, 2 000 r/min, 离心 20 min, 分离出单个核细胞。PBS 洗涤两次。用含有 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液(Gibco 公司产品)调整细胞数为  $10 \times 10^6$ /ml, 接种于培养瓶内, 同时加入佛波酯、离子霉素、布雷菲德菌素 A(均为联科生物公司产品), 充分混匀后于 37 °C、5%CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养 6 h。阴性对照则用不加刺激剂的细胞。

1.3.2 细胞打孔和染色 在上述已完成刺激的细胞混悬液中各取 100  $\mu$ l, 分别加入 CD3-FITC 抗体 20  $\mu$ l、CD3-PC5 抗体 10  $\mu$ l(均为贝克曼公司产品), 避光孵育 15 min。随后加入破膜剂 A 液 100  $\mu$ l, 避光孵育 15 min, 加 PBS 1 ml 洗涤两次。加打孔剂 B 液 100  $\mu$ l(破

① 基金项目: 广西医学科学实验中心开放基金资助项目(KFJJ2010-68)

膜剂打孔剂均为联科生物公司产品),同时分别加入 IL-17A-PE 抗体(eBioscience 公司产品)5  $\mu$ l 和 IL-6-FITC 抗体(eBioscience 公司产品)5  $\mu$ l 避光孵育 20 min。最后加入 PBS 洗涤两次,加入 PBS 0.5 ml 重悬,待上机检测。阴性对照管中加入相应的同型对照抗体。

1.3.3 细胞的检测 染色好的细胞悬液用贝克曼公司 EPI-CSXL 型流式细胞仪检测。以 CD3<sup>+</sup>T 细胞设门,至少计数 10 000 个细胞,其中标记 CD3<sup>+</sup>IL-17A<sup>+</sup> 的 T 细胞为 Th17 细胞,CD3<sup>+</sup>IL-6<sup>+</sup> 为表达 IL-6 的 T 细胞。

1.4 统计学方法 所得数据使用 SPSS 17.0 软件包进行分析。结果以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,各检测指标先进行方差齐性检验,然后采用非参数 Kruskal-Wallis 进行分析,最后对 Th17 细胞和表达 IL-6 的 T 细胞进行相关性分析,获得 Spearman 相关系数。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 各实验组 Th17 细胞、CD3<sup>+</sup>IL-6<sup>+</sup>T 细胞频数的比较 正常组 Th17 T 细胞频数最低,不到 1%。数据统计结果显示,CHB 重度患者较正常组 Th17 T 细胞频数明显增高,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。CHB 轻中度患者的 Th17 T 细胞频数比正常组略有增高,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。此外 CHB 重度患者 Th17 T 细胞频数比 CHB 轻中度患者明显增高。

类似的比较结果出现在 CD3<sup>+</sup>IL-6<sup>+</sup>T 细胞中。正常组 CD3<sup>+</sup>IL-6<sup>+</sup>T 细胞频数最低,分别显著低于 CHB 轻中度组和 CHB 重度组,差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。单独比较 CHB 轻中度组和 CHB 重度组,也发现 CHB 重度组 CD3<sup>+</sup>IL-6<sup>+</sup>T 细胞频数更高,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

表 1 各实验组 Th17 T 细胞和 CD3<sup>+</sup>IL-6<sup>+</sup>T 细胞频数比较 ( $\bar{x} \pm s, \%$ )

组别	n	Th17 T 细胞	CD3 <sup>+</sup> IL-6 <sup>+</sup> T 细胞
正常组	23	0.94 $\pm$ 0.25	0.75 $\pm$ 0.23
轻中度组	21	1.25 $\pm$ 0.41 <sup>a</sup>	1.04 $\pm$ 0.41 <sup>a</sup>
重度组	21	2.29 $\pm$ 0.70 <sup>a</sup>	3.49 $\pm$ 0.94 <sup>a</sup>

注:与正常组比较,a:  $P < 0.05$

2.2 Th17 细胞与 CD3<sup>+</sup>IL-6<sup>+</sup>T 细胞频数相关性分析 为了理清 CD3<sup>+</sup>IL-6<sup>+</sup>T 细胞频数和 Th17 T 细胞之间是否存在相关关系,以 CD3<sup>+</sup>IL-6<sup>+</sup>T 细胞频数为横坐标,以 Th17 T 细胞为纵坐标,各组细胞频数所形成的散点图。并对两组数据进行 Spearman 等级相关性分析,得到 Spearman 的相关系数 ( $r = 0.621, P <$

$0.05$ )。分析结果表明 CD3<sup>+</sup>IL-6<sup>+</sup>T 细胞频数和 Th17 细胞之间存在正相关关系,相关分析有统计学意义,见图 1。

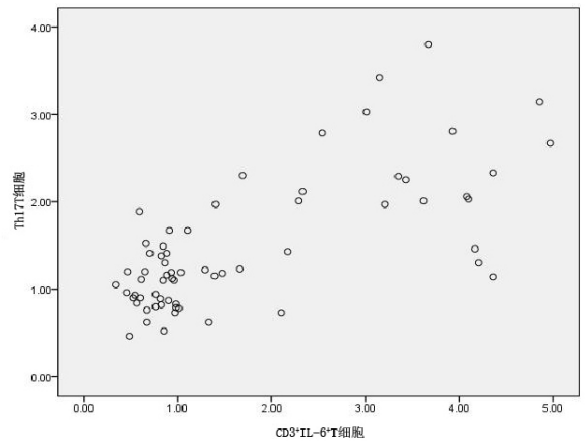


图 1 各实验组 Th17 T 细胞和 CD3<sup>+</sup>IL-6<sup>+</sup>T 细胞频数散点图

## 3 讨论

长期以来人们根据 T 细胞被激活以后产生细胞因子和生物功能的不同,将 T 细胞分为 Th1 和 Th2 细胞亚群。Th1 细胞通过分泌 IFN- $\gamma$  和 IL-2 等细胞因子介导细胞免疫;Th2 细胞产生 IL-4、IL-5 和 IL-13,激活 B 细胞产生免疫球蛋白 E 等抗体介导体液免疫。Th1 型免疫反应失调,出现组织损坏和慢性炎症,而 Th2 型免疫反应失调,则导致过敏和哮喘。而近年来发现的新型的效应 T 细胞 Th17,它不产生 IFN- $\gamma$  或 IL-4 等细胞因子,却能特异性地产生白介素 17(interleukin 17, IL-17) 效应因子,从而发挥重要免疫调节作用<sup>[1,6]</sup>。

人体感染 HBV 后,可产生急性肝脏炎症、慢性肝脏炎症、病原携带无活动病变等表现,这些除了与 HBV 数量、毒力有关外,更重要的是机体的免疫状况。可以说,CHB 也是一种由 T 淋巴细胞介导的炎症性疾病,它与 Th 细胞亚群关系密切。而 Th17 细胞作为一种新型的辅助性 T 细胞,很可能与 CHB 的发生和发展有关。丁庆莉等<sup>[7]</sup>的研究表明,与正常对照组相比,CHB 患者外周血 Th17 细胞比例明显升高,且随着疾病的加重,Th17 细胞的比例也随之上升。本研究采用流式细胞术检测外周血 Th17 细胞频数,发现随着 CHB 患者疾病严重程度加重,其外周血 Th17 细胞频数逐渐升高,这个结果与丁庆莉等的研究结果相似,表明 Th17 细胞可能是造成肝脏炎症、促进肝细胞损伤的原因之一。

此外,目前对 CHB 患者体内 Th17 的分化机制的研究极少。如已确知 Th17 细胞是 CHB 患者体内促

进肝细胞损伤的原因之一,那么抑制其在 CHB 患者体内的分化则有可能成为一个潜在的治疗靶点。陈松林等<sup>[8]</sup>的研究表明中药组方鳖甲煎丸治疗 CHB 疗效确切,其作用机理可能与 Th17 细胞降低有关。是否存在可能,抑制 Th17 细胞在体内的分化可以抑制 CHB 的发展?

在一些体外研究发现 TGF- $\beta$  和 IL-6 可以取代活化 DC 培养液,诱导 Th17 细胞的分化<sup>[9]</sup>。而体内的 IL-6 主要是由 CD3<sup>+</sup>T 细胞分泌,因此 CD3<sup>+</sup>T 细胞可能可以通过分泌 IL-6 来诱导 Th17 的分化,进而可能参与了 CHB 的发生发展。为此本研究同时检测了各研究对象外周血中 CD3<sup>+</sup>IL-6<sup>+</sup>T 细胞频数。结果表明 CD3<sup>+</sup>IL-6<sup>+</sup>T 细胞频数同样随着 CHB 患者疾病严重程度增加而增加。与此同时,通过相关分析也发现,CD3<sup>+</sup>IL-6<sup>+</sup>T 细胞频数也与 Th17 细胞频数呈正相关关系。这提示,CD3<sup>+</sup>IL-6<sup>+</sup>T 细胞频数可能可以通过分泌 IL-6 来影响 Th17 细胞在体内的分化,进而参与 CHB 的进程。

综上所述,Th17 细胞可能是 CHB 进展的原因之一。此外,Th17 细胞频数与 CD3<sup>+</sup>IL-6<sup>+</sup>T 细胞频数存在正相关关系,提示 CD3<sup>+</sup>IL-6<sup>+</sup>T 细胞可能通过诱导 Th17 的分化来影响 CHB 进程。

#### 参考文献:

- [1] Roark CL, Huang Y, Jin N, et al. A canonical V $\gamma$ 4V $\delta$ 4 +  $\gamma\delta$  T cell population with distinct stimulation requirements which promotes the Th17 response[J]. Immunol
- [4] Pajavand H, Alvandi A, Mohajeri P, et al. High Frequency of vacA s1m2 Genotypes Among Helicobacter pylori Isolates From Patients With Gastrointestinal Disorders in Kermanshah, Iran[J]. Jundishapur J Microbiol, 2015,8(11):e25425.
- [5] Vinagre ID, Queiroz AL, Silva Júnior MR, et al. Helicobacter pylori infection in patients with different gastrointestinal diseases from Northern Brazil[J]. Arq Gastroenterol, 2015,52(4):266-271.
- [6] Figueroa G, Troncoso M, Toledo MS, et al. Prevalence of serum antibodies to Helicobacter pylori VacA and CagA and gastric diseases in Chile[J]. J Med Microbiol, 2002,51(4):300-304.
- [7] Souod N, Kargar M, Doosti A, et al. Genetic Analysis of cagA and vacA Genes in Helicobacter Pylori Isolates and Their Relationship with Gastrointestinal Diseases in

Res, 2013,55(1-3):217-230.

- [2] Torchinsky MB, Blander JM. T helper 17 cells: discovery, function, and physiological trigger[J]. Cell Mol Life Sci, 2010,67(9):1407-1421.
- [3] Yang W, Ding X, Deng J, et al. Interferon-gamma negatively regulates Th17-mediated immunopathology during mouse hepatitis virus infection[J]. Mol Med (Berl), 2011,89(4):399-409.
- [4] Wu WL, Li J, Chen F, et al. Circulating Th17 cells frequency is associated with the disease progression in HBV infected patients[J]. Gastroenterol Hepatol, 2010,25(4):750-757.
- [5] Bian ZL, Guo Y, Ha B, et al. Regulation of the inflammatory response: enhancing neutrophil infiltration under chronic inflammatory conditions[J]. Immunol, 2012,188(2):844-853.
- [6] 徐文鑫,梅序桥. 支气管哮喘患者外周血 Th17 细胞及相关趋化因子表达水平检测[J]. 右江民族医学院学报, 2015,37(4):533-535.
- [7] 丁庆莉,唐古生,贺铮雯,等. 慢性乙型肝炎患者外周血 Th17 细胞比例和 IL-17 表达水平的临床意义[J]. 检验医学, 2014,29(1):15-20.
- [8] 陈松林,林英辉,杨德芬,等. 鳖甲煎丸对淤血阻络型慢性乙型肝炎患者外周血 Th17 细胞表达水平的影响[J]. 中医药导报, 2016,22(4):24-26.
- [9] 张康. 调节性 T 细胞在肿瘤免疫治疗中的研究进展[J]. 右江民族医学院学报, 2015,37(4):635-637.

收稿日期:2016-08-09;修回日期:2016-11-24

(上接第 585 页)

- [4] Pajavand H, Alvandi A, Mohajeri P, et al. High Frequency of vacA s1m2 Genotypes Among Helicobacter pylori Isolates From Patients With Gastrointestinal Disorders in Kermanshah, Iran[J]. Jundishapur J Microbiol, 2015,8(11):e25425.
- [5] Vinagre ID, Queiroz AL, Silva Júnior MR, et al. Helicobacter pylori infection in patients with different gastrointestinal diseases from Northern Brazil[J]. Arq Gastroenterol, 2015,52(4):266-271.
- [6] Figueroa G, Troncoso M, Toledo MS, et al. Prevalence of serum antibodies to Helicobacter pylori VacA and CagA and gastric diseases in Chile[J]. J Med Microbiol, 2002,51(4):300-304.
- [7] Souod N, Kargar M, Doosti A, et al. Genetic Analysis of cagA and vacA Genes in Helicobacter Pylori Isolates and Their Relationship with Gastrointestinal Diseases in

the West of Iran[J]. Iran Red Crescent Med J, 2013,15(5):371-375.

- [8] 胡伏莲,周殿元. 幽门螺杆菌感染的基础与临床[M]. 3版. 北京:中国科学技术出版社, 2013:108-109.
- [9] Lin CS, He PJ, Tsai NM, et al. A potential role for Helicobacter pylori heat shock protein 60 in gastric tumorigenesis[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010,392(2):183-189.
- [10] Iizumi T, Yamanishi S, Kumagai Y, et al. Augmentation of Helicobacter pylori urease activity by its specific IgG antibody: implications for bacterial colonization enhancement[J]. Biomed Res, 2005,26(1):35-42.
- [11] 唐艳波,林中,张剑波,等. 桂林地区幽门螺杆菌的耐药性分析[J]. 右江民族医学院学报, 2014,36(2):211-212.

收稿日期:2016-07-26;修回日期:2016-11-10