

## 慢性乙型肝炎患者外周血 Th17 细胞的变化及意义

苏莹<sup>1)</sup>, 赵朝<sup>2)</sup>

(1) 西安市第八医院, 陕西 西安 710061; 2) 西安市第一医院, 陕西 西安 710002)

**[摘要]** **目的** 探讨慢性乙型肝炎 (chronic hepatitis B, CHB) 患者外周血辅助性 T 细胞亚群 17 (Th17) 的变化及临床意义. **方法** 选择 45 例中度 CHB 患者、26 例重度 CHB 患者和 25 例门诊健康体检者为研究对象. 细胞内染色检测外周血 Th17 细胞的频率. 荧光定量 PCR 法检测视黄醇类孤核受体 (retinoid-related orphan receptor, ROR) c mRNA 的表达. ELISA 法检测外周血 IL-17A 的水平. **结果** 中度 CHB 患者和重度 CHB 患者外周血中 Th17 细胞的频率、RORc mRNA 的表达和血浆 IL-17A 浓度明显高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 而中度 CHB 组和重度 CHB 组之间无统计学差异 ( $P > 0.05$ ). **结论** CHB 患者存在 Th17 细胞的活化, Th17 细胞活化可能参与了 HBV 感染慢性化的过程.

**[关键词]** 慢性乙型肝炎; Th17 细胞; IL-17; 炎症

**[中图分类号]** R512.6\*2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2013) 07-0062-04

## The Changes and Clinical Significance of Th17 Cell in Patients with Chronic Hepatitis B

SU Ying<sup>1)</sup>, ZHAO Zhao<sup>2)</sup>

(1) The Eighth Hospital of Xi'an, Xi'an Shanxi 710061; 2) The First Hospital of Xi'an, Xi'an Shanxi 710002, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the changes and clinical significance of Th17 cells in patients with chronic hepatitis B (CHB). **Methods** 45 patients with moderate CHB, 26 patients with severe CHB and 25 for physical examinations were selected as the objects of study. The frequency of Th17 cells, the expression of retinoid-related orphan receptor (ROR) c mRNA, and the level of plasma IL-17A were measured by intracellular staining, real-time quantitative PCR and ELISA, respectively. **Results** The frequency of Th17 cells, RORc mRNA expression and the level of plasma IL-17A were significantly higher in the moderate CHB group and severe CHB group than those in the control group ( $P < 0.05$ ), whereas there was no statistically significant difference between the moderate CHB group and severe CHB group ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** The activation of Th17 cells has been in existence in CHB patients, and such activation may participate in the development of CHB.

**[Key words]** Chronic hepatitis B; T helper cell 17 (Th17); Interleukin 17; Inflammation

慢性乙型肝炎 (chronic hepatitis B, CHB) 在我国发病率高, 是危害公共健康的重大问题, 免疫细胞尤其是 T 细胞在 HBV 感染后病毒的清除以及对肝细胞的后续损伤中发挥重要作用. 众多研究显示 Th1 细胞数量和 / 或功能的变化在 CHB 发病中起重要作用<sup>[1]</sup>. 近年来新发现的一种辅助性 T 细胞 (T helper, Th) 亚群 -Th17 细胞, 主要分泌 IL-17, 与 Th1 细胞作用明显不同, 其研究主要集

中于自身免疫性疾病<sup>[2]</sup>, 但在 CHB 的发病中研究较少. 因此, 本研究通过观察 CHB 患者外周血中 Th17 细胞的变化, 初步探讨 Th17 细胞与 CHB 发病的关系.

### 1 对象与方法

**[基金项目]** 陕西省科技攻关基金资助项目 (2011k-08-14)

**[作者简介]** 苏莹 (1977~), 女, 陕西西安市人, 医学学士, 主治医师, 主要从事肝病临床工作.

### 1.1 研究对象

依据2001版病毒性肝炎的防治方案<sup>[1]</sup>,入选2012年3月至2012年7月在西安市第八医院肝病科住院的CHB患者71例,男性39例,女性32例,年龄20~58岁,平均 $(35.1 \pm 9.8)$ 岁,其中中度CHB患者45例(中度CHB组),重度CHB患者26例(重度CHB组).对照组为来自同期本院门诊的健康查体者25例,其中男性14例,女性11例,年龄22~60岁,平均 $(37.2 \pm 11.4)$ 岁. CHB组和对照组在年龄、性别上差异无统计学意义( $P > 0.05$ ).

排除标准:HAV、HCV、HDV、HEV和HIV感染者;酒精性肝病;恶性肝脏肿瘤患者;半年内接受抗病毒治疗患者;慢性肾衰患者.所有患者和健康体检者均签署知情同意书.

### 1.2 方法

**1.2.1 主要试剂及仪器** 藻红蛋白标记的IL-17A抗体、多甲藻叶绿素蛋白标记的CD4抗体、同型对照抗体和莫能霉素购自美国BD公司;佛波酯和离子霉素(Calbiochem公司);RPMI1640培养液(Gibco公司);总RNA提取试剂Trizol(Invitrogen公司);DNA荧光染料(自TaKaRa公司);引物由TaKaRa公司设计和合成;IL-17A的ELISA试剂盒(上海ExCell公司);FACS Calibur型流式细胞仪(美国BD公司).

**1.2.2 外周血单个核细胞的分离** 入选CHB患者和对照组采集空腹静脉血3 mL,肝素抗凝,2 000 r/min离心20 min,分离的血浆在 $-80^{\circ}\text{C}$ 冻存,以备检测IL-17A的水平,Ficoll密度梯度离心法分离外周血单个核细胞.

**1.2.3 Th17细胞频率的检测** PBMC用RPMI1640培养液重悬,加入佛波酯( $50\ \mu\text{g/L}$ )、离子霉素( $500\ \mu\text{g/L}$ )和莫能霉素( $0.67\ \text{mL/L}$ ),置 $37^{\circ}\text{C}$ 、 $5\%\text{CO}_2$ 的细胞培养箱中孵育4 h,加入PBS洗液,500 g离心5 min弃上清液,加入 $20\ \mu\text{L}$  CD4-PerCP单克隆抗体, $4^{\circ}\text{C}$ 避光孵育30 min,重复洗涤步骤,加入 $250\ \mu\text{L}$ 固定/破膜液进行细胞打孔,以利于细胞因子染色, $4^{\circ}\text{C}$ 避光孵育20 min.用1 ml破膜/洗液洗涤并重悬PBMC,然后平均分为测定管和对照管,分别加入 $20\ \mu\text{L}$  IL-17A-PE和 $20\ \mu\text{L}$ 同型对照抗体,室温避光孵育30 min,破膜/洗液洗涤2次,应用流式细胞仪检测Th17细胞频率.

**1.2.4 RORc mRNA的检测** 根据试剂盒的说明书,采用Trizol一步法裂解PBMCs提取总RNA,逆转录成cDNA;SYBGreen荧光染料检测RORc mRNA的相对表达,RORc的上下游引物分别为

5'-GCTGTGATCTTGCCCAGAACC-3'和5'-CTGCCATCATTTGCTGTTAATCC-3';GAPDH作为内参,上下游引物分别为5'-GCACCGTCAAGGCTGA-GAAC-3'和5'-TGGTGAAGACGCCAGTGG-3', $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 比较mRNA的相对表达.

**1.2.5 血浆IL-17A浓度的检测** 根据IL-17A ELISA试剂盒的说明书进行,IL-17A检测的灵敏度为4 ng/L.

### 1.3 统计学处理

采用SPSS软件对数据进行分析,计量资料用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,Th17细胞的频率和血浆IL-17A浓度符合正态分布,组间的比较用单因素方差分析,RORc mRNA的表达不符合正态分布,组间的比较用Mann-Whitney U检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

## 2 结果

### 2.1 外周血Th17细胞频率

对照组、中度CHB组和重度CHB组患者Th17细胞的频率分别为 $(0.99 \pm 0.33)\%$ 、 $(1.39 \pm 0.57)\%$ 和 $(1.62 \pm 0.58)\%$ .与对照组相比,中度CHB组和重度CHB组患者Th17细胞的频率明显升高( $P < 0.05$ ),而不同程度的CHB 2组之间Th17细胞的频率相比,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ).

### 2.2 RORc mRNA表达

中度CHB组和重度CHB组患者的RORc mRNA的表达明显高于对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),中度和重度CHB组患者之间的比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见图2.

### 2.3 血浆IL-17A浓度变化

中度CHB组和重度CHB组患者血浆IL-17A浓度较对照组明显升高( $P < 0.05$ ),而CHB组间的比较差异并无统计学意义( $P > 0.05$ ),见表1.

## 3 讨论

CHB发病与细胞免疫失调有关,T淋巴细胞在机体清除感染的HBV的过程中发挥重要作用.曹创杰等<sup>[4]</sup>的研究表明CHB患者存在 $\text{CD4}^+\text{T}$ 细胞的数量和/或功能缺陷,通过治疗使 $\text{CD4}^+\text{T}$ 细胞数量的恢复,能有效的抑制HBV复制,改善患者的免疫功能.初始的 $\text{CD4}^+\text{T}$ 细胞在不同条件下可分化为Th1、Th2、Th17、Treg和Th22细胞,CHB患者树突状细胞IL-12分泌下降,使Th1细胞的分

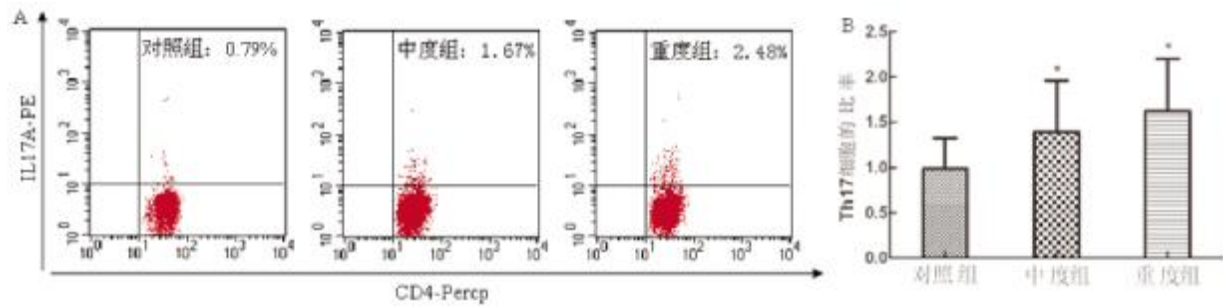


图 1 3 组患者 Th17 细胞频率比较

Fig. 1 Comparison of the frequency of Th17 cells in the three groups  
与对照组比较, \* $P < 0.05$ .

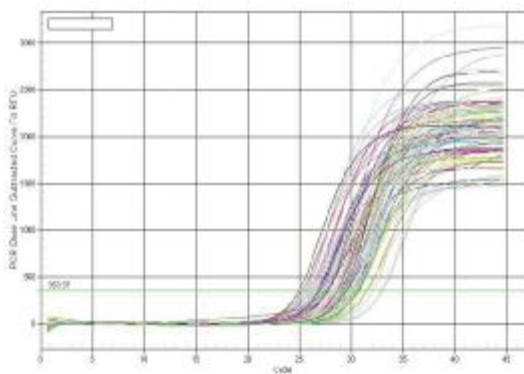


图 2 3 组患者 RORc mRNA PCR 扩增曲线

Fig. 2 Amplification curves of RORc mRNA in the three groups

表 1 3 组患者 RORc mRNA 表达和血浆 IL-17A 浓度的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 1 Comparison of RORc mRNA expression and plasma IL-17 in the three groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	RORc mRNA 表达	血浆 IL-17A 浓度 (ng/L)
对照组	25	3.40 $\pm$ 0.85	21.24 $\pm$ 9.18
中度 CHB 组	45	9.51 $\pm$ 2.32*	29.20 $\pm$ 13.41*
重度 CHB 组	26	15.44 $\pm$ 4.70**	32.79 $\pm$ 11.28*

与对照组比较, \* $P < 0.05$ ; 与中度 CHB 组比较, #  $P < 0.05$ .

化成熟能力减弱, 加之 HBV 对 PBMCs 的直接破坏, 使 Th1 细胞数量减少和 / 或功能下降<sup>[5,6]</sup>。宋春辉等研究发现: CHB 患者存在 Th2 细胞的主要细胞因子 IL-4 的反应相对增强<sup>[7]</sup>。

Th17 细胞是近年发现的一种新 CD4<sup>+</sup>T 细胞亚群, 主要分泌 IL-17A 和 IL-22 等细胞因子, RORc 是其分化成熟关键的核转录因子, 研究证实 Th17 细胞和 IL-17A 在多发性硬化症、类风湿性关节炎、慢性炎症性肠病等自身免疫性疾病和炎症性

疾病中发挥一定的作用<sup>[8-10]</sup>。为进一步研究 Th17 细胞在 CHB 中的作用, 本研究通过细胞内染色、实时定量 PCR 和 ELISA 的方法检测 CHB 患者外周血中 Th17 细胞的频率、RORc mRNA 的表达和血浆 IL-17A 的水平, 结果发现: CHB 患者中 Th17 细胞的频率、RORc mRNA 的表达和血浆 IL-17A 水平较对照组明显增高 ( $P < 0.05$ ), 但在中度 CHB 和重度 CHB 组并无差异 ( $P > 0.05$ ), 提示 Th17 细胞活化可能参与了 CHB 的发病。Th17 细胞活化可能通过以下四个方面诱发 CHB 的发生, 第一, IL-17A 作为一种致炎性细胞因子, 诱导内皮细胞、树突状细胞和上皮细胞合成和分泌 IL-6、IL-1 $\beta$ 、IL-23 和 TNF- $\alpha$  等炎症分子<sup>[11]</sup>, 促进 HBV 感染中肝脏损害的进展; 第二, 以上分泌的炎症分子募集中性粒细胞到肝脏, 加重肝损害; 第三, IL-17A 直接与肝脏中多种细胞上的 IL-17R 结合, 直接促进炎症反应; 第四, CHB 患者 Th17 细胞分泌 IL-22 的能力减弱, 而 IL-22 在肝细胞抗病毒感染和抗炎性损伤中发挥重要作用<sup>[12]</sup>。

综上所述, CHB 患者体内存在 Th17 细胞的活化, 尽管本研究不能肯定 Th17 细胞活化是 CHB 发生的使动因素, 但 Th17 细胞的激活可能加剧了肝脏局部和全身的炎症反应, 促进了 HBV 感染的慢性化过程, 抑制 Th17 细胞可能为临床治疗 CHB 提供新的思路。

#### [参考文献]

- [1] SHIMIZU Y. T cell immunopathogenesis and immunotherapeutic strategies for chronic hepatitis B virus infection [J]. World J Gastroenterol, 2012, 18(20):2 443 - 2 451.
- [2] MADDUR M S, MIOSECC P, KAVERI S V, et al. Th17 cells: biology, pathogenesis of autoimmune and inflammatory diseases, and therapeutic strategies [J]. Am J Pathol,

- 2012,181(1):8-18.
- [3] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学会.病毒性肝炎的防治方案[J].中华传染病杂志,2001,19(1):56-62.
- [4] 曹创杰,杜文军,窦橙云,等.替比夫定治疗初治慢性乙型肝炎患者T淋巴细胞亚群的变化与早期应答的关系[J].中华传染病杂志,2012,30(3):170-174.
- [5] BECKBAUM S,CICINNATI VR,ZHANG X,et al. Hepatitis B virus-induced defect of monocyte-derived dendritic cells leads to impaired T helper type 1 response in vitro: mechanisms for viral immune escape [J]. Immunology, 2003,109(4):487-495.
- [6] CHANG J J,LEWIN S R. Immunopathogenesis of hepatitis B virus infection [J]. Immunol Cell Biol,2007,85(1):16-23.
- [7] 宋春辉,杨斌,陈黎明,等.恩替卡韦抗病毒治疗与慢性乙型肝炎患者外周血Th1及Th2细胞变化的研究[J].解放军医学杂志,2010,35(12):1465-1467.
- [8] FITZGERALD D C,FONSECA-KELLY Z,CULLIMORE M L,et al. Independent and interdependent immunoregulatory effects of IL-27, IFN- $\beta$ , and IL-10 in the suppression of human Th17 cells and murine experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. J Immunol,2013,190(7):3225-3234.
- [9] MIOSSEC P,KOLLS J K. Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation [J]. Nat Rev Drug Discov,2012,11(10):763-776.
- [10] LEPPKES M,BECKER C,IVANOV II,et al. ROR $\gamma$ -expressing Th17 cells induce murine chronic intestinal inflammation via redundant effects of IL-17A and IL-17F[J]. Gastroenterology,2009,136(1):257-267.
- [11] ZHANG J Y,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.
- [12] 宋春辉,杨斌,陈黎明,等.恩替卡韦治疗慢性乙型肝炎患者过程中血清白细胞介素17及白细胞介素22变化的研究[J].胃肠病学和肝病杂志,2010,19(11):1047-1049.

(2013-05-10收稿)

(上接第51页)

### [参考文献]

- [1] MOMMAERTS M Y,CASSELMAN J W. Assessment of the damages by orbital blow-out fractures [J]. Acta Chir Belg,1993,93(5):201-206.
- [2] 张纯妍,刘磊,王舒婷,等.颧-眶复合体骨折修复重建的临床观察[J].临床口腔医学杂志,2009,25(7):422-424.
- [3] NG S G,MADILL S A,INKSTER C F,et al. Medpor porous polyethylene implants in orbital blowout fracture repair[J]. Eye,2001,15(5):578-582.
- [4] 任为,时德.膨体聚四氟乙烯补片修复胆管缺损的实验研究[J].中国修复重建外科杂志,2001,15(5):305-307.
- [5] 游晓波,曹文安,傅荣,等.应用膨体聚四氟乙烯治疗面颊凹陷并同侧面瘫[J].中国修复重建外科杂志,1999,13(2):95-98.
- [6] 尚小英,李春明.高密度多孔聚乙烯移植修复面部外伤所致眶底骨缺损18例[J].南通医学院学报,2003,23(4):497-499.
- [7] ANTHONY S. Clinical and histologic behaviour of exposed porous high-density polyethylene implants [J]. Plast Reconstruction Surgery,1997,99(1):41.
- [8] 白萍,刘和荣,郝月军. Medpor在眼眶重建和眼球内陷复位手术中的应用[J].中国美容医学,2004,13(3):353-354.
- [9] 詹志松,姚隆浩,徐兵. Medpor种植体在口腔颌面外科的应用[J].口腔材料器械杂志,2001,10(3):160-162.

(2013-04-05收稿)