

Th17、Treg 细胞频数在核苷类似物抗 HBV 过程中的动态变化

余永勤, 李 毅, 陈谭昇, 吕其军, 周 芳
东营市胜利油田中心医院感染病科, 东营 257034

[摘要] **目的:**探讨辅助性 T 细胞 17(T helper 17 cells, Th17)及调节性 T 细胞(regulatory T cells, Treg)细胞频数在核苷类似物治疗慢性乙型肝炎患者过程中的动态变化。**方法:**选取 30 例乙型肝炎 e 抗原(hepatitis B e antigen, HBeAg)阳性的慢性乙型肝炎患者作为研究对象。所有患者均采用替比夫定治疗。分析所有患者治疗前及治疗第 4、8、12、24、36、48 周的 Treg 细胞、Th17 细胞频数及 Th17/Treg 比值。比较治疗前后患者血清总胆红素(total bilirubin in serum, TBIL)、血清直接胆红素(direct bilirubin in serum, DBIL)、丙氨酸氨基转移酶(alanine transaminase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)、乙型肝炎病毒 DNA(hepatitis B virus DNA, HBV-DNA)、HBeAg 水平,分析 Treg、Th17 细胞频数与 TBIL、DBIL、ALT、AST、HBV-DNA、HBeAg 的相关性。**结果:**替比夫定治疗后,Treg 细胞频数先下降后上升,于治疗第 8 周时达最低水平;Th17 细胞频数呈下降趋势;Th17/Treg 比值呈下降趋势,于治疗第 24、36、48 周时趋于稳定。与治疗前相比,治疗后患者 TBIL、DBIL、ALT、AST、HBV-DNA、HBeAg 水平均显著下降,差异有统计学意义($P<0.05$)。Treg 细胞频数与 HBV-DNA、HBeAg 水平正相关($P<0.05$);Th17 细胞频数与 TBIL、DBIL、ALT、AST 水平正相关($P<0.05$)。**结论:**核苷类似物治疗慢性乙型肝炎患者过程中,Treg、Th17 细胞频数及 Th17/Treg 比值呈现动态变化,且与治疗后肝功能指标水平相关,为临床治疗及预后评估提供了依据。

[关键词] 慢性乙型肝炎;替比夫定;Th17 细胞;Treg 细胞

[中图分类号] R 512.6 **[文献标志码]** A

Dynamic change of Th17 and Treg cells frequency in nucleoside analogues anti-HBV treatment

YU Yong-qin, LI Yi, CHEN Tan-sheng, LÜ Qi-jun, ZHOU Fang

Department of Infectious Diseases, Central Hospital of Dongying Shengli Oil Field, Dongying 257034, Shandong, China

[Abstract] **Objective:** To investigate dynamic change of T helper 17 cells (Th17) and regulatory T cells (Treg) frequency in hepatitis B e antigen (HBeAg) positive chronic hepatitis B patients receiving nucleoside analogues treatment. **Methods:** A total of 30 chronic hepatitis B patients with positive HBeAg were enrolled. All the patients received telbivudine antiviral treatment. The peripheral blood Treg cell frequency, Th17 cell frequency and Th17/Treg ratio were detected before treatment and at 4th, 8th, 12th, 24th, 36th, 48th weeks after treatment. The total bilirubin in serum (TBIL), direct bilirubin in serum (DBIL), alanine transaminase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), hepatitis B virus DNA (HBV-DNA) and HBeAg level were detected and compared between before and after treatment. The correlations of Treg cell frequency and Th17 cell frequency with the indexes of TBIL, DBIL, ALT, AST, HBV-DNA, HBeAg were analyzed, respectively. **Results:** Treg cell frequency was decreased then increased and reached the minimum point at 8th weeks after treatment. Th17 cell frequency decreased during treatment; and Th17/Treg ratio decreased and was stable at 24th, 36th, 48th week after treatment. The levels of TBIL, DBIL, ALT, AST, HBV-DNA and HBeAg were significantly decreased after treatment ($P<0.05$). Treg cell frequency was positively correlated with HBV-DNA and HBeAg levels ($P<0.05$). Th17 cell frequency was positively correlated with TBIL, DBIL, ALT and AST levels ($P<0.05$). **Conclusions:** Treg cell frequency, Th17 cell frequency and Th17/Treg ratio shows dynamic changes during nucleoside analogues treatment for HBeAg positive chronic hepatitis B patients. They are correlated with liver function indexes after treatment; they can provide evidence for clinical treatment and prognosis evaluation.

[Key Words] chronic hepatitis B; telbivudine; Th17 cell; Treg cell

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)作为非侵袭性嗜肝病毒,其诱导的特异性免疫反应对于控制 HBV 感染,消除 HBV 具有重要作用,且 HBV 诱导宿主产生的一系列特异性免疫细胞、因子均参与肝脏的免疫过程^[1-3]。对于乙型肝炎 e 抗原(hepatitis B e antigen, HBeAg)阳性慢性乙型肝炎患者,适当的免疫反应有利于病情的恢复及转归,而过度的免疫反应是肝功能衰竭的独立危险因素,可进一步恶化预后。

辅助性 T 细胞 17(T helper 17 cells, Th17)和调节性 T 细胞(regulatory T cells, Treg)均作为介导核苷类似物抗 HBV 过程中的 CD4⁺ T 细胞亚型,分别抑制及促进免疫炎症反应^[4-5]。Th17 及 Treg 细胞频数可能在核苷类似物抗 HBV 过程中存在不同程度的变化^[5-6],而 Th17/Treg 细胞免疫稳态可作为 HBeAg 阳性慢性乙型肝炎疗效判断及预后评估的潜在指标。因此,本研究探讨 Th17 及 Treg 细胞频数在核苷类似物治疗慢性乙型肝炎患者过程中的动态变化,为后续研究提供参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2013 年 5 月—2015 年 5 月,选取在我院治疗的 30 例 HBeAg 阳性慢性乙型肝炎患者作为研究对象。其中男性 18 例、女性 12 例;年龄 24~51 岁,平均(35.5±4.8)岁。纳入标准:(1) HBeAg 阳性慢性乙型肝炎初治患者;(2)丙氨酸氨基转移酶(alanine transaminase, ALT)>2 倍正常值上限;(3) HBV-DNA>10⁵ copies/mL。排除标准:(1)合并其他病毒性肝炎、重型肝炎、肝硬化、肝癌及肾功能不全者;(2)恶性肿瘤和妊娠者;(3)自身免疫性肝病、酒精性肝炎者。本研究通过医院医学伦理委员会审核;所有患者均知情同意并签署知情同意书。

1.2 治疗方法及观察指标 所有患者均采用替比夫定治疗,剂量 600 mg/d,持续治疗 48 周。在治疗前和治疗第 4、8、12、24、36、48 周时,采集外周静脉血 3 mL,分别用于检测 Treg、Th17 细胞与血清总胆红素(total bilirubin in serum, TBIL)、血清直接胆红素(direct bilirubin in serum, DBIL)、ALT、天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)、乙型肝炎病毒 DNA(hepatitis B virus DNA, HBV-DNA)、HBeAg 水平。

1.3 Treg 细胞的检测 取 100 μ L 静脉血,加入

CD4 和 CD25 单克隆抗体,各 10 μ L,混匀,避光放置 20 min;加入 2 mL 红细胞裂解液,混匀,避光放置 20 min;加入 2 mL 破膜缓冲液,离心,弃上清;加入 2.5 μ L Foxp3 抗体,避光放置 2 h。加入 1 mL 磷酸盐缓冲液(PBS),混匀,离心,弃上清。用 300 μ L 在流式细胞仪检测。

1.4 Th17 细胞的检测 取外周静脉血 3 mL,加入分离液,离心,分离吸出单个核细胞,0.9%氯化钠液多次洗涤,弃上清液,稀释细胞,于 5%CO₂ 温箱培养 5 h,分为测定管和对照管;各加入 2 mL PBS,离心,弃上清;加入各类型的单克隆抗体,混匀,避光放置 20 min;以 PBS 多次洗涤,于测定管和对照管加入 100 μ L 破膜剂,混匀,避光放置,离心,弃上清;于测定管、对照管加入 20 μ L 的 IL-17A-FITC 20 μ L,混匀,避光放置;加入 3 mL 的 PBS,混匀,避光放置,离心,弃上清;加入 0.5 mL 的 PBS,重悬细胞,混匀,避光放置,上机检测。采用全自动生化仪检测血清 TBIL、DBIL、ALT、AST 水平。

1.5 肝功能及病毒学指标的检测 采用荧光聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)定量核酸分析仪检测 HBV-DNA 水平;采用全自动发光免疫分析仪检测 HBeAg 水平;分析所有患者治疗第 4、8、12、24、36、48 周的 Treg 细胞频数、Th17 细胞频数及 Th17/Treg 比值。对比治疗前后的 TBIL、DBIL、ALT、AST、HBV-DNA、HBeAg,探讨 Treg 细胞频数、Th17 细胞频数与 TBIL、DBIL、ALT、AST、HBV-DNA、HBeAg 的相关性。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 12.0 统计软件,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验;计数资料以频数和百分比表示,采用 χ^2 检验;非正态分布的变量相关性分析采用 Spearman 检验。检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 治疗期间 Treg、Th17 细胞频数的变化 用替比夫定抗 HBV 过程中,患者 Treg 细胞频数呈先下降后上升趋势,于治疗第 8 周时达最低水平;Th17 细胞频数呈下降趋势;Th17/Treg 比值呈下降趋势,于治疗 24 周后趋于稳定(表 1)。

2.2 治疗前后各项指标的对比 结果(表 2)表明:核苷类似物治疗 48 周后, TBIL、DBIL、ALT、AST、HBV-DNA、HBeAg 水平均显著下降,差异有统计学意义($P<0.05$)。

表 1 治疗过程中 Treg、Th17 细胞频数与 Th17/Treg 比值的变化 n=30, $\bar{x}\pm s$			
时间点	Treg(%)	Th17(%)	Th17/Treg
治疗前	5.87±1.71	2.38±0.56	0.49±0.15
治疗 4 周	5.31±1.49	4.18±0.85	0.84±0.21
治疗 8 周	4.78±1.25	3.36±0.97	0.74±0.25
治疗 12 周	5.24±0.86	3.28±0.98	0.68±0.17
治疗 24 周	5.39±0.59	3.14±0.82	0.62±0.27
治疗 36 周	5.53±0.60	2.95±0.69	0.57±0.11
治疗 48 周	5.68±0.57	2.72±0.57	0.51±0.12

表 2 治疗前后各项指标的比较 n=30, $\bar{x}\pm s$				
指标	治疗前	治疗 48 周后	t 值	P 值
TBIL/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	125.8±75.8	19.6±6.85	8.965	<0.05
DBIL/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	73.5±42.5	13.5±8.96	10.741	<0.05
ALT/ ($\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$)	625.8±25.8	56.7±45.8	12.542	<0.05
AST/ ($\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$)	385.6±79.6	36.8±20.7	11.685	<0.05
HBV-DNA (lg copies/mL)	5.86±0.87	3.12±1.54	8.126	<0.05
HBeAg (lg S/CO)	1.46±1.06	1.12±0.87	9.565	<0.05

2.3 Treg、Th17 细胞与临床疗效指标的相关性分析 Th17/Treg 比值在治疗第 4 周开始下降,在第 12 周达最低值(表 1)。在治疗第 12 周时,Treg 细胞频数与 HBV-DNA、HBeAg 水平正相关($P<0.05$),Th17 细胞频数与 TBIL、DBIL、ALT、AST 水平正相关($P<0.05$;表 3)。

表 3 Treg、Th17 细胞与临床疗效指标的相关系数 n=30, $\bar{x}\pm s$						
指标	TBIL	DBIL	ALT	AST	HBV-DNA	HBeAg
Treg 细胞	0.276	0.214	0.236	0.158	0.712*	0.685*
Th17 细胞	0.745*	0.686*	0.692*	0.714*	0.185	0.153

* $P<0.05$

3 讨论

HBeAg 阳性慢性乙型肝炎的损伤性免疫反应中有多种免疫细胞、细胞因子参与,其中 Treg/Th17 平衡状态被打破是 HBV 感染发病的关键^[6-7]。Th17、Treg 细胞均作为 CD4⁺ T 细胞亚型在 HBeAg 阳性慢性乙型肝炎中发挥重要的免疫损

伤作用。在病情发展的不同阶段,存在不同水平的 Th17 及 Treg 细胞频数,Treg/Th17 失衡程度也不同。有研究^[8]认为,Treg/Th17 失衡作为免疫功能紊乱的重要指标,会导致 HBV 的持续感染,使病情持续发展及恶化。

研究^[9]表明,Treg 细胞作为导致免疫耐受的主要细胞,可维持机体的免疫耐受和免疫平衡,参与 HBeAg 阳性慢性乙型肝炎的免疫耐受。Th17 细胞作为导致免疫炎症损伤的主要细胞,可分泌多种因子,激发组织炎症,导致肝损伤。有研究^[10-11]认为,HBeAg 阳性慢性乙型肝炎患者 Treg/Th17 失衡,Th17 及 Treg 细胞显著增加,以 Treg 细胞增加为主。对此,维持 Treg/Th17 平衡,维持 Th17 及 Treg 细胞频数处于合理水平,有利于提高对 HBV-DNA、HBeAg 的清除率,改善肝功能,促进 HBeAg 阳性慢性乙型肝炎的转归。

替比夫定作为强效的核苷类似物,广泛用于抗 HBV,具有强效抑制 HBV 复制及 HBeAg 血清转换率高的特点。本研究中,治疗后 TBIL、DBIL、ALT、AST、HBV-DNA、HBeAg 水平均显著下降,提示核苷类似物抗 HBV 的效果确切,可显著改善肝功能、抑制病毒复制及清除病毒。有报道^[12-13]指出,核苷类似物抗 HBV 过程中,快速抑制病毒复制与 Treg 细胞频数下降密切相关。由于 Treg 细胞频数与 Th17 细胞频数负相关,持续性 Treg 细胞频数下降,可导致 Th17 细胞频数出现短暂性升高,有利于进一步增强对 HBV 的消除能力。

本研究显示,HBeAg 阳性慢性乙型肝炎患者采用替比夫定抗 HBV 过程中,Treg 细胞频数呈先下降,后上升趋势,于治疗第 8 周时达最低水平;Th17 细胞频数呈下降趋势;Th17/Treg 比值呈下降趋势,于治疗 24 周后趋于稳定,提示核苷类似物治疗使患者机体免疫状态激活,而病情稳定后机体进入免疫控制状态。TBIL、DBIL、ALT、AST 均为肝功能指标。HBeAg 阳性慢性乙型肝炎患者的 TBIL、DBIL、ALT、AST 水平均高于健康者。HBV-DNA、HBeAg 为 HBeAg 阳性慢性乙型肝炎的预后指标。在核苷类似物抗 HBV 治疗前后,HBV-DNA、HBeAg 水平的差异有统计学意义。本研究中 TBIL、DBIL、ALT、AST、HBV-DNA、HBeAg 治疗前后的变化与研究^[14-15]相似。在本研究中,Treg 细胞频数与 HBV-DNA、HBeAg 水平正相关($P<0.05$),Th17 细胞频数与 TBIL、DBIL、ALT、AST

水平正相关($P<0.05$),进一步提示 Treg 细胞参与免疫耐受状态,与病情严重程度正相关,而 Th17 细胞参与免疫损伤过程。

综上所述,核苷类似物抗 HBV 的效果确切,可显著改善肝功能、抑制病毒复制及清除病毒。Th17/Treg 比值作为肝功能监测指标,为慢性乙型肝炎的治疗及预后评估提供了依据。

参考文献

- [1] Chen Y, Fang J, Chen X, et al. Effects of the Treg/Th17 cell balance and their associated cytokines in patients with hepatitis B infection[J]. *Exp Ther Med*, 2015, 9(2): 573-578.
- [2] Liang XS, Li CZ, Zhou Y, et al. Changes in circulating Foxp3 (+) regulatory T cells and interleukin-17-producing T helper cells during HBV-related acute-on-chronic liver failure[J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(26): 8558-8571.
- [3] Li J, Shi J, Ren W, et al. Regulatory role of CD4 (+) CD25 (+) Foxp3 (+) regulatory T cells on IL-17-secreting T cells in chronic hepatitis B patients[J]. *Dig Dis Sci*, 2014, 59(7): 1475-1483.
- [4] Niu YH, Yin DL, Liu HL, et al. Restoring the Treg cell to Th17 cell ratio may alleviate HBV-related acute-on-chronic liver failure [J]. *World J Gastroenterol*, 2013, 19 (26): 4146-4154.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] Zhai S, Zhang L, Dang S, et al. The ratio of Th-17 to Treg cells is associated with survival of patients with acute-on-chronic hepatitis B liver failure[J]. *Viral Immunol*, 2011, 24 (4): 303-310.
- [8] Cheng LS, Liu Y, Jiang W. Restoring homeostasis of CD4⁺ T cells in hepatitis-B-virus-related liver fibrosis [J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(38): 10721-10731.
- [9] Li J, Qiu SJ, She WM, et al. Significance of the balance between regulatory T (Treg) and T helper 17 (Th17) cells during hepatitis B virus related liver fibrosis[J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): e39307.
- [10] Li J, Wang FP, She WM, et al. Enhanced high-mobility group box 1 (HMGB1) modulates regulatory T cells (Treg)/T helper 17 (Th17) balance via toll-like receptor (TLR)-4-interleukin (IL)-6 pathway in patients with chronic hepatitis B[J]. *J Viral Hepat*, 2014, 21(2): 129-140.
- [11] Su ZJ, Yu XP, Guo RY, et al. Changes in the balance between Treg and Th17 cells in patients with chronic hepatitis B[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2013, 76(4): 437-444.
- [12] Li J, Wu W, Peng G, et al. HBcAg induces interleukin-10 production, inhibiting HBcAg-specific Th17 responses in chronic hepatitis B patients[J]. *Immunol Cell Biol*, 2010, 88 (8): 834-841.
- [13] Zhang L, Wang Q, Zhao P, et al. Effects of entecavir on peripheral blood lymphocyte profiles in chronic hepatitis B patients with suboptimal responses to adefovir[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2014, 41(7): 514-523.
- [14] Ge J, Wang K, Meng QH, et al. Implication of Th17 and Th1 cells in patients with chronic active hepatitis B[J]. *J Clin Immunol*, 2010, 30(1): 60-67.
- [15] Wu W, Li J, Chen F, et al. Circulating Th17 cells frequency is associated with the disease progression in HBV infected patients[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2010, 25(4): 750-757.

[本文编辑] 叶 婷, 晓 璐