

不同病程的慢性乙型肝炎病毒感染者外周血中调节性T细胞和自然杀伤细胞的表达及相关性

张晓慧, 姜金丽, 段钟平, 陈煜

张晓慧, 段钟平, 陈煜, 首都医科大学附属北京佑安医院人工肝中心 北京市 100069

姜金丽, 首都医科大学附属北京佑安医院临检中心 北京市 100069

张晓慧, 副研究员, 主要从事肝纤维化的机制及免疫调节方面的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 81500472
北京市医院管理局临床医学发展专项基金资助项目, No. XM201308
北京市医院管理局“登峰”人才培养计划基金资助项目, No. DFL20151601
国家临床重点专科建设资助项目, No. WJWYA-2014-002
首都医科大学基础-临床合作基金资助项目, Nos. 14JL73, 14JL72

作者贡献分布: 此课题由张晓慧与段钟平设计; 流式细胞分析由姜金丽完成; 数据分析由张晓慧完成; 本文写作由张晓慧完成; 陈煜修改。

通讯作者: 陈煜, 教授, 主任医师, 100069, 北京市丰台区右安门外西头条8号, 首都医科大学附属北京佑安医院人工肝中心。
chybeyond@163.com
电话: 010-83997157

收稿日期: 2016-02-25
修回日期: 2016-03-16
接受日期: 2016-03-23
在线出版日期: 2016-04-28

Expression of regulatory T cells and natural killer cells in peripheral blood of patients in different stages of chronic hepatitis B virus infection

Xiao-Hui Zhang, Jin-Li Lou, Zhong-Ping Duan, Yu Chen

Xiao-Hui Zhang, Zhong-Ping Duan, Yu Chen, Artificial Liver Center, Beijing Youan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100069, China

Jin-Li Lou, Clinical Laboratory Center, Beijing Youan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100069, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81500472; Clinical Medicine Development Special Fund of Beijing Municipal Administration of Hospitals, No. XM201308; “Dengfeng” Talent Training Plan, No. DFL20151601; The National Key Clinical Specialist Construction Project, No. WJWYA-2014-002; Basic-Clinical Cooperation Project of Capital Medical University, Nos. 14JL73 and 14JL72

Correspondence to: Yu Chen, Professor, Chief Physician, Artificial Liver Center, Beijing Youan Hospital, Capital Medical University, 8 Xitoutiao, Youanmen Outside, Fengtai District, Beijing 100069, China. chybeyond@163.com

Received: 2016-02-25
Revised: 2016-03-16
Accepted: 2016-03-23
Published online: 2016-04-28

Abstract

AIM: To investigate the expression of regulatory T cells (Tregs) and natural killer (NK) cells in the peripheral blood of patients with chronic hepatitis B virus (HBV) infection.

METHODS: A total of 96 chronic HBV infected patients were enrolled, including 42 chronic hepatitis B patients, 30 cirrhosis patients, and 24 hepatitis B carriers. There were 21 healthy persons as controls. Peripheral blood was collected from subjects to detect the expression of Tregs and NK cells, by means of flow cytometry.

RESULTS: The expression of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs in peripheral blood was the highest in

背景资料

乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 慢性感染后, 人体外周血的Tregs和NK细胞表达都会发生变化。人体和动物的体外研究均发现Tregs对NK细胞的表达有抑制作用。而这一现象在HBV慢性感染患者体内是否存在, 是否与病程相关, 目前未见相关报道。

同行评议者

程书权, 教授, 主任医师, 研究生导师, 桂林医学院第三附属医院(桂林市传染病医院, 桂林市第三人民医院)肝病科; 杨江华, 副教授, 皖南医学院弋矶山医院感染科

■ 研究前沿

Tregs是一类具有免疫抑制性的T淋巴细胞, 在肿瘤的免疫逃逸方面发挥重要作用, 研究较为深入. NK细胞是固有免疫的重要组成部分, 在宿主抗病毒和抗肿瘤方面发挥关键作用. 近些年, 随着研究的深入, 发现两者在慢性肝病中都扮演重要角色.

the hepatitis B cirrhosis group, followed by chronic hepatitis B patients, HBV carriers and healthy controls. In contrast, the percentage of NK cells in the cirrhosis group was the lowest, followed by chronic hepatitis B patients and HBV carriers, but all of them had lower percentage of NK cells than healthy controls. Further analysis showed that the expression of Tregs was negatively correlated with NK cells ($r = -0.3280, P < 0.05$).

CONCLUSION: The expression of Tregs and NK cells in the peripheral blood of chronic HBV infected patients is different with the disease course, and they are negatively correlated.

© 2016 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Regulatory T cells; Natural killer cells; Chronic hepatitis B virus infection

Zhang XH, Lou JL, Duan ZP, Chen Y. Expression of regulatory T cells and natural killer cells in peripheral blood of patients in different stages of chronic hepatitis B virus infection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2016; 24(12): 1885-1890 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/24/1885.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v24.i12.1885>

摘要

目的: 观察乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)慢性感染者外周血中调节性T细胞(regulatory T cells, Tregs)和自然杀伤(natural killer, NK)细胞的表达及相关性.

方法: 选取HBV慢性感染患者共96例, 其中慢性乙型肝炎患者42例, 乙型肝炎肝硬化患者30例, HBV携带者24例, 抽取外周血用流式细胞分析技术检测其Tregs和NK细胞的表达情况. 同时选取健康者21例作为对照组.

结果: HBV慢性感染者外周血 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Tregs占 $CD4^+$ T细胞的比例整体高于健康对照组, 其中乙型肝炎肝硬化患者外周血 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Tregs占 $CD4^+$ T细胞的比例最高, 其次为慢性乙型肝炎患者, 最后为HBV携带者和健康对照组. 相反, NK细胞占淋巴细胞的比例在HBV慢性感染者外周血中整体较健康对照组低, 其中乙型肝炎肝硬化组表达最低, 其次为慢性乙型肝炎组, 最后为HBV携带者, 但都低于健康对照组. 进一步分析显示NK细胞的表达与Tregs呈负相关性($r = -0.3280, P < 0.05$).

结论: 不同阶段的HBV慢性感染患者外周血中Tregs和NK细胞表达不同, 且两者呈明显的负相关性.

© 2016年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词: 调节性T细胞; 自然杀伤细胞; 乙型肝炎病毒慢性感染

核心提示: 本文首次发现在乙型肝炎病毒(hepatitis B virus)慢性感染患者外周血NK细胞的表达与Tregs存在着此消彼长的现象, 进一步发现两者存在负相关性.

张晓慧, 娄金丽, 段钟平, 陈煜. 不同病程的慢性乙型肝炎病毒感染者外周血中调节性T细胞和自然杀伤细胞的表达及相关性. *世界华人消化杂志* 2016; 24(12): 1885-1890 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/24/1885.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v24.i12.1885>

0 引言

慢性乙型肝炎是由乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)引起的全世界范围内流行的感染性疾病, 可发展为肝硬化、肝癌. 我国是HBV感染的高发区, 约有9300万慢性HBV感染者. HBV对肝脏的损伤主要是通过机体免疫系统与病毒的相互作用而诱发的免疫损伤导致^[1]. 自然杀伤细胞(natural killer, NK)和调节性T细胞(regulatory T cells, Tregs)是肝脏免疫系统中起重要作用的两类细胞^[2]. NK细胞表型为 $CD56^+CD3^-$, 作为机体抵抗病毒感染的一个重要的成员, 主要通过直接杀伤被感染的靶细胞, 或者通过分泌大量的炎性细胞因子[如干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ)]介导抗病毒效应. 临床研究表明感染HBV或丙型肝炎病毒后, NK细胞的活性和分泌的IFN- γ 明显降低^[3-5]. 而Tregs是一类具有免疫抑制性作用的淋巴细胞, 主要标志为叉头分子Foxp3. 临床研究^[6]发现慢性乙型肝炎患者的Tregs水平明显高于健康人. 体外实验证实Tregs可以抑制NK细胞的活性^[2,7], 那么HBV感染患者体内Tregs和NK表达是否也有这样的趋势, 目前未见报道. 本研究通过对慢性HBV感染患者外周血的检测, 观察Tregs和NK的表达及两者相关性.

1 材料和方法

1.1 材料 选取从2014-09/2015-06在北京佑安医院人工肝中心治疗的HBV感染患者96例, 其

表 1 入组对象的一般资料

一般情况	正常对照	慢性乙型肝炎	乙型肝炎肝硬化	HBV携带
性别(男/女)	12/9	25/17	20/10	17/7
年龄(岁)	31.1 ± 5.0	36.8 ± 2.1	48.7 ± 2.8	28.3 ± 1.7
ALT(U/L)	19.2 ± 11.4	83.6 ± 12.8	54.3 ± 12.7	23.3 ± 5.1
HBV DNA logs(IU/mL)	—	5.2 ± 0.5	3.1 ± 0.6	7.6 ± 0.2

ALT: 谷丙转氨酶; HBV: 乙型肝炎病毒。

表 2 HBV慢性感染患者外周血Tregs和NK的表达 (mean ± SD, %)

分组	Tregs(CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ /CD4 ⁺)	NK(CD3 ⁺ CD56 ⁺ /CD45 ⁺)
慢性乙型肝炎	6.7 ± 0.4 ^c	11.4 ± 0.9 ^{bc}
乙型肝炎肝硬化	9.2 ± 1.4 ^b	8.2 ± 0.9 ^b
HBV携带	4.7 ± 1.0 ^d	15.2 ± 1.7 ^{af}
健康对照	4.6 ± 0.5	20.96 ± 3.9

^b*P*<0.01 vs 健康对照; ^c*P*<0.05; ^d*P*<0.01 vs 乙型肝炎肝硬化; ^f*P*<0.01 vs 慢性乙型肝炎。Tregs: 调节性T细胞; NK: 自然杀伤细胞; HBV: 乙型肝炎病毒。

中包括慢性乙型肝炎患者42例, 乙型肝炎肝硬化患者30例, HBV携带者24例。诊断标准符合2010年版《慢性乙型肝炎防治指南》^[8]。排除标准: (1)肝癌和其他免疫系统疾病和病毒性疾病; (2)合并其他病因(包括自身免疫性、酒精性或药物性)导致的慢性肝病; (3)除肝脏损伤外伴有其他严重的活动性身心疾病, 包括未被控制的原发性肾脏、心脏、肺脏、血管性、神经性、消化性、代谢性疾病; (4)入组最近6 mo内曾接受抗病毒药物或免疫治疗; (5)妊娠和哺乳期妇女; (6)各种原因引起的肝衰竭。正常对照组21例, 为健康献血者, 肝功能均在正常范围。所有入组人员均签署知情同意书。入组人员基本情况如表1。

1.2 方法

1.2.1 分组: 符合入组要求的患者按照疾病分类进行分组, 主要检测和观察项目为Tregs和NK细胞的流式细胞分析检测。同时收集记录患者抽血当时1 wk内的肝功能(包括转氨酶、总胆红素、白蛋白)、血常规、甲胎蛋白和B超结果。

1.2.2 血标本采集: 所有入组患者均早晨抽取外周血5.0 mL, 其中EDTA抗凝血2.0 mL, 随即进行血浆提取, 准备进行流式细胞分析检测; 其余血静置半小时后离心提取血清, -80 °C保存。

1.2.3 Tregs和NK细胞的检测: Tregs和NK细胞均

由流式细胞分析仪检测(由医院临床检验中心完成)。其中Tregs的标志为CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T细胞, 所用抗体及试剂来自Beckman公司。NK细胞的标志为CD3⁺CD56⁺细胞, 所用抗体均来自BD公司。

统计学处理 所有数据采用GraphPad Prism 5.0软件进行处理。计数资料的比较采用 χ^2 检验; 计量资料数据用mean ± SD表示, 组间比较采用One-way ANOVA分析。相关性采用Pearson直线相关性分析, *P*<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 外周血Tregs细胞的表达 HBV慢性感染者外周血CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Tregs(以下简称为Tregs)占CD4⁺T细胞的百分比为7.6% ± 0.6%, 整体高于健康对照者(5.0% ± 0.5%)(*P*<0.05)。其中乙型肝炎肝硬化组外周血Tregs表达最高, 明显高于慢性乙型肝炎组和HBV携带组, 差异有统计学意义(*P*<0.01)(表2, 图1A); 慢性乙型肝炎组略高于HBV携带组和健康对照组; 而HBV携带组与健康对照组相比无明显差别(表2, 图1A)。

2.2 外周血NK细胞的表达 HBV慢性感染者外周血NK细胞即CD3⁺CD56⁺/CD45⁺细胞占淋巴细胞的比例为11.9% ± 0.7%, 明显低于健康对

■ 相关报道

Tregs是一群有免疫抑制性的T淋巴细胞, 最新研究报道通过HBV转基因小鼠的实验, 证明了Tregs通过细胞与细胞接触的方式抑制NK细胞的活性。

■ 创新亮点

通过对从未抗病毒治疗或半年内未抗病毒治疗HBV慢性感染患者外周血的检测,首次发现Tregs和NK细胞的表达存在负相关性,排除了药物干扰,结果更接近真实的机体免疫情况。

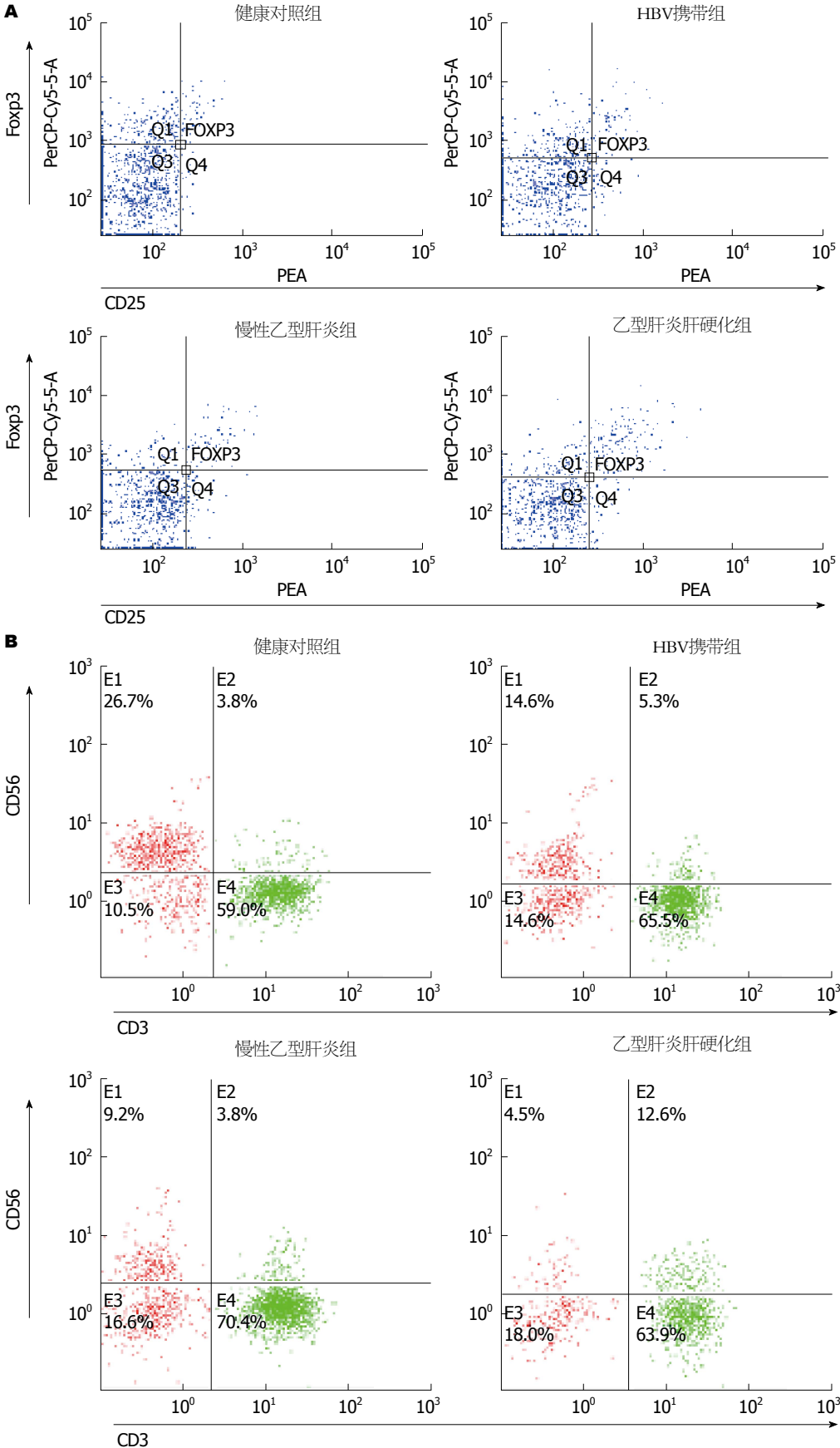


图 1 HBV慢性感染者外周血Tregs与NK细胞的流式表达图. A: 不同组的调节性T细胞(CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T细胞)的表达; B: 不同组的NK细胞(CD3⁺CD56⁺)的表达. Tregs: 调节性T细胞; NK: 自然杀伤细胞.

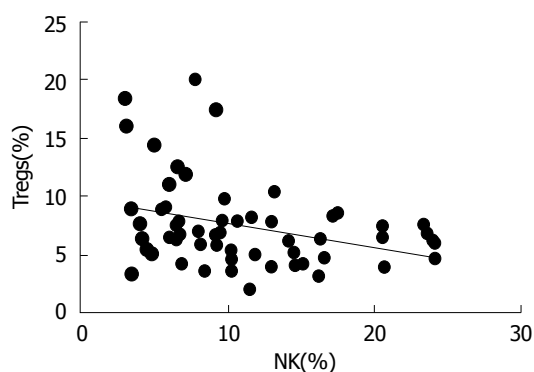


图2 Tregs和NK细胞表达的相关性. Tregs: 调节性T细胞; NK: 自然杀伤细胞.

照组($20.96\% \pm 3.9\%$)($P < 0.01$). 其中乙型肝炎肝硬化组外周血Tregs表达最低, 明显低于慢性乙型肝炎组和HBV携带组, 差异有统计学意义($P < 0.01$)(表2, 图1B); 慢性乙型肝炎组又低于HBV携带组, 差异具有统计学意义($P < 0.01$)(表2, 图1B); HBV携带组与健康对照组相比无明显差异(表2, 图1B).

2.3 HBV感染患者外周血中Tregs和NK细胞表达的相关性 在HBV慢性感染者中, 我们发现不同分组的外周血Tregs和NK细胞的表达频数呈相反的变化, 进一步用Pearson直线相关性分析结果显示, NK细胞和Tregs的表达频数成负相关性($r = -0.3280$, $P = 0.0105$)(图2).

3 讨论

Tregs是一群具有免疫抑制作用的淋巴细胞, 其数量和功能的紊乱可导致多种免疫介导的肝脏疾病发生^[9]. 一些研究表明慢性HBV感染可致体内Tregs水平高于正常健康人^[10], 肝癌发生时Tregs水平也显著升高^[11]. 国内学者进一步发现Tregs介导的免疫耐受与HBV感染后的病程密切相关, 表现为慢性乙型肝炎组外周血CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Tregs的表达率明显低于慢性重型乙型肝炎组^[12]. 我们的研究也发现, 乙型肝炎肝硬化和慢性乙型肝炎患者外周血Treg水平平均高于正常对照组, 但更重要的是乙型肝炎肝硬化组患者的Tregs水平明显高于慢性乙型肝炎组, 且有统计学意义, 更进一步表明Tregs的表达与不同程度的HBV感染密切相关. 结合我们前期的动物实验结果, 急性肝损伤中小鼠肝脏内Tregs水平明显低于慢性肝损伤(肝硬化)^[13], 且高水平的Tregs对肝纤维化的维持起重要作用^[14]; 提示Tregs可以作为

判断HBV感染后疾病的进展及预后的潜在免疫指标.

NK细胞是免疫系统中最主要的细胞组成之一, 在宿主抗病毒和抗肿瘤方面发挥关键作用. 研究发现HBV慢性感染患者的NK细胞绝对数与健康人相比减少^[4], 且不同程度肝损伤的NK细胞表达也不同^[5]. 我们的研究发现乙型肝炎肝硬化组外周血的NK细胞比例最少, 慢性乙型肝炎患者的NK细胞比例居中, HBV携带者最多. 在肝纤维化小鼠的外周血和肝脏中也发现NK细胞比例低于正常对照小鼠^[15], 表明NK细胞的活动参与肝脏病变的不同阶段.

本研究虽然发现不同阶段HBV感染, 患者外周血Tregs和NK细胞的表达不同, 但最重要的贡献是首次发现在HBV慢性感染患者外周血NK细胞的表达与Tregs存在着此消彼长的现象, 进一步发现两者存在负相关性. 已有研究^[7]证明Tregs与NK细胞之间存在相互作用: Tregs可抑制NK细胞的活性已得到证实; Chen等^[16]首次用HBV转基因小鼠证明了Tregs通过细胞与细胞接触的方式抑制NK细胞的活性. 我们以前的动物实验中也发现肝纤维化小鼠的Tregs较正常小鼠高, 而NK细胞却低于正常小鼠^[15], 当下调纤维化小鼠体内Tregs后, 肝内NK细胞表达上升, 进一步证明了Tregs对NK细胞的抑制作用^[17]. 因此我们推测, 在HBV慢性感染病程中, Tregs对NK细胞的调节可能参与疾病慢性化的过程, 同时参与肝硬化发展的过程; 特别在疾病发展的后期(肝硬化), 大量的Tregs形成免疫抑制微环境, 同时具有免疫监控和杀伤能力的NK细胞又减少, 有利于癌细胞的生长, 这也可能是肝硬化容易发展为肝癌的原因之一. 当然, 慢性乙型肝炎患者外周血NK细胞的变化受很多因素影响, Tregs只是众多调节因素之一, 我们的发现为深入了解HBV慢性感染的发病和进展机制提供一定的实验依据.

应用要点

本研究在HBV慢性感染的不同病程中, 发现了Tregs与NK细胞表达的相反性, 为深入了解HBV慢性感染的发病和进展机制提供一定的实验依据.

4 参考文献

- 1 Jung MC, Pape GR. Immunology of hepatitis B infection. *Lancet Infect Dis* 2002; 2: 43-50 [PMID: 11892495 DOI: 10.1016/S1473-3099(01)00172-4]
- 2 Pedroza-Pacheco I, Madrigal A, Saudemont A. Interaction between natural killer cells and regulatory T cells: perspectives for immunotherapy. *Cell Mol Immunol* 2013; 10: 222-229 [PMID: 23524654 DOI: 10.1038/cmi.2013.2]
- 3 Cheent K, Khakoo SI. Natural killer cells and hepatitis C: action and reaction. *Gut* 2011; 60: 268-278 [PMID: 20876777 DOI: 10.1136/gut.2010.212555]

■ 同行评价

本研究探讨不同病程的慢性HBV感染者外周血中调节性T细胞和自然杀伤细胞的表达及相关性, 有一定创新性和意义。

- 4 Tjwa ET, van Oord GW, Hegmans JP, Janssen HL, Woltman AM. Viral load reduction improves activation and function of natural killer cells in patients with chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2011; 54: 209-218 [PMID: 21095036 DOI: 10.1016/j.jhep.2010.07.009]
- 5 Zhang Z, Zhang S, Zou Z, Shi J, Zhao J, Fan R, Qin E, Li B, Li Z, Xu X, Fu J, Zhang J, Gao B, Tian Z, Wang FS. Hypercytolytic activity of hepatic natural killer cells correlates with liver injury in chronic hepatitis B patients. *Hepatology* 2011; 53: 73-85 [PMID: 21254163 DOI: 10.1002/hep.23977]
- 6 El-Badawy O, Sayed D, Badary MS, Abd-Alrahman ME, El-Feky MA, Thabit AG. Relations of regulatory T cells with hepatitis markers in chronic hepatitis B virus infection. *Hum Immunol* 2012; 73: 335-341 [PMID: 22342871 DOI: 10.1016/j.humimm.2012.01.014]
- 7 Ghiringhelli F, Ménard C, Terme M, Flament C, Taieb J, Chaput N, Puig PE, Novault S, Escudier B, Vivier E, Lécésne A, Robert C, Blay JY, Bernard J, Caillat-Zucman S, Freitas A, Tursz T, Wagner-Ballon O, Capron C, Vainchencker W, Martin F, Zitvogel L. CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner. *J Exp Med* 2005; 202: 1075-1085 [PMID: 16230475 DOI: 10.1084/jem.20051511]
- 8 中华医学会肝病学会, 中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2010年版). 中华肝脏病学杂志 2011; 19: 13-24
- 9 张宏伟, 姚冬梅. FOXP3与慢性肝病的研究进展. 中华肝脏病杂志 2013; 21: 792-795
- 10 Feng H, Yin J, Han YP, Zhou XY, Chen S, Yang L, Yan JR, Zhang GX. Regulatory T cells and IL-17(+) T helper cells enhanced in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Int J Clin Exp Med* 2015; 8: 8674-8685 [PMID: 26309519]
- 11 Fu J, Xu D, Liu Z, Shi M, Zhao P, Fu B, Zhang Z, Yang H, Zhang H, Zhou C, Yao J, Jin L, Wang H, Yang Y, Fu YX, Wang FS. Increased regulatory T cells correlate with CD8 T-cell impairment and poor survival in hepatocellular carcinoma patients. *Gastroenterology* 2007; 132: 2328-2339 [PMID: 17570208 DOI: 10.1053/j.gastro.2007.03.102]
- 12 周立平, 陈昕, 巴静, 赵连爽, 李异玲. HBV感染后外周血CD4+CD25+Foxp3+调节性T细胞与疾病进展的相关性. 世界华人消化杂志 2007; 15: 2366-2369
- 13 张晓慧, 刘新, 白丽, 陈煜, 段钟平. 肝脏CD4+CD25+Foxp3+调节性T细胞在小鼠急、慢性肝损伤中的表达差异及意义. 首都医科大学学报 2014; 35: 483-487
- 14 Zhang X, Feng M, Liu X, Bai L, Kong M, Chen Y, Zheng S, Liu S, Wan YJ, Duan Z, Han YP. Persistence of cirrhosis is maintained by intrahepatic regulatory T cells that inhibit fibrosis resolution by regulating the balance of tissue inhibitors of metalloproteinases and matrix metalloproteinases. *Transl Res* 2016; 169: 67-79.e2 [PMID: 26613891 DOI: 10.1016/j.trsl.2015.10.008]
- 15 刘新, 姜金丽, 白丽, 张晓慧, 丁美, 段钟平. 流式细胞术分析小鼠肝纤维化时机体免疫细胞的变化. 首都医科大学学报 2013; 34: 540-544
- 16 Chen Y, Sun R, Wu X, Cheng M, Wei H, Tian Z. CD4+CD25+ Regulatory T Cells Inhibit Natural Killer Cell Hepatocytotoxicity of Hepatitis B Virus Transgenic Mice via Membrane-Bound TGF-β and OX40. *J Innate Immun* 2016; 8: 30-42 [PMID: 26067079 DOI: 10.1159/000431150]
- 17 张晓慧, 白丽, 刘新, 严艳, 陈煜, 段钟平. 调节性T细胞对肝纤维化小鼠肝脏免疫细胞的影响. 北京医学 2015; 37: 1167-1170

编辑: 郭鹏 电编: 闫晋利





Published by **Baishideng Publishing Group Inc**
8226 Regency Drive, Pleasanton,
CA 94588, USA
Fax: +1-925-223-8242
Telephone: +1-925-223-8243
E-mail: bpgoffice@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>



ISSN 1009-3079

