

DOI:10.13350/j.cjpb.241001

• 论著 •

不同时相 HBV-ACLF 患者外周血 Treg/Th17 细胞变化 及与 HBV-DNA 相关性研究*

杜珊¹, 谭年花², 彭杰¹, 曾孟晖², 陈斌^{1*}

(1. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南长沙 410007; 2. 湖南中医药大学)

【摘要】 目的 研究不同时相乙肝相关性慢加急性肝衰竭(HBV-ACLF)患者外周血 Treg/Th17 细胞表达差异, 以及 HBV-DNA 水平的相关性。**方法** 60 例 HBV-ACLF 患者分为不同时相, 即进展期(Adv-ACLF)28 例和平台期(Pla-ACLF)32 例, 同时纳入慢性乙型肝炎(CHB)患者、健康志愿者(NC)各 20 例作为对照。流式细胞仪检测各组受试者外周血 Treg、Th17 细胞频率并计算 Treg/Th17 比值, 流式细胞微球芯片捕获技术(CBA)检测细胞因子转化生长因子(TGF- β)、白介素-10(IL-10)、肿瘤坏死因子(TNF- α)、白介素-17A(IL-17A)、白介素-23(IL-23)水平, 实时荧光定量 RT-PCR 法检测 Treg、Th17 细胞特异性转录因子 FoxP3、ROR- γ t mRNA 表达; 进一步分析不同时相患者 Treg、Th17 细胞频率及 Treg/Th17 细胞比值与 HBV-DNA 水平的相关性。**结果** 与 NC 组、CHB 组比较, HBV-ACLF 进展期及平台期患者炎症指标 TNF- α 、IL-17A、IL-23 水平以及 ROR- γ t mRNA 表达明显升高($P < 0.01$), Th17 细胞频率升高、Treg/Th17 值下降($P < 0.01$), Treg/Th17 细胞失衡向 Th17 方向偏移, 与平台期比较进展期更严重($P < 0.05$); 进展期 HBV-ACLF 患者外周血 Treg、Th17 细胞频率与 HBV-DNA 水平呈正相关(Treg $r = 0.516$, $P = 0.005$; Th17 $r = 0.420$, $P = 0.026$), 但 Treg/Th17 比值与 HBV-DNA 水平无相关性。平台期 HBV-ACLF 患者外周血 Treg、Th17 细胞频率以及 Treg/Th17 比值均与 HBV-DNA 水平无相关性。**结论** HBV-ACLF 进展期、平台期患者均存在 Treg/Th17 细胞失衡, 进展期患者 Treg/Th17 失衡较平台期更严重。进展期 HBV-ACLF 患者 Treg、Th17 细胞频率与 HBV-DNA 水平呈正相关。

【关键词】 肝衰竭; Treg 细胞; Th17 细胞; 炎症反应

【文献标识码】 A **【文章编号】** 1673-5234(2024)10-1117-06

[Journal of Pathogen Biology. 2024 Oct.; 19(10):1117-1122.]

Changes in peripheral blood Treg/Th17 cells and their correlation with HBV-DNA in HBV-ACLF patients at different phase

DU Shan¹, TAN Nianhua², PENG Jie¹, ZENG Menghui², CHEN Bin¹ (1. First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China; 2. Hunan University of Chinese Medicine)***

【Abstract】 Objective This article explores the differential expression of Treg/Th17 cells in hepatitis B associated chronic and acute liver failure (HBV-ACLF) patients with different phase, and the correlation with the level of HBV-DNA. **Methods** 60 HBV-ACLF patients were divided into different phases, namely 28 patients with advanced-ACLF (Adv-ACLF) and 32 patients with plateau-ACLF (Pla-ACLF), while 20 patients with chronic hepatitis B (CHB) and 20 healthy volunteers (normal control, NC) were used as controls. Flow cytometry was used to detect the frequency of Treg and Th17 cells in the peripheral blood of each group of subjects and calculate the Treg/Th17 ratio. Cytometric Bead Array (CBA) was used to detect the levels of cytokines transforming growth factor- β (TGF- β), interleukin-10 (IL-10), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-17A (IL-17A), and interleukin-23 (IL-23). Real-time fluorescence quantitative PCR (real-time PCR) method to detect Treg, Th17 cell specific transcription factor Forkhead box protein P3 (FoxP3), Retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma t (ROR- γ t) mRNA expression. The correlation of Treg, Th17 cell frequency and Treg/Th17 cell ratio with HBV-DNA level was further analyzed. **Results** Compared with CHB and NC group, the levels of inflammatory markers TNF- α , IL-17A, IL-23, and ROR- γ t mRNA expression were significantly increased in patients with advanced and plateau stages of HBV-ACLF ($P < 0.01$), the frequency of Th17 cells increased and the ratio

* **【基金项目】** 国家中医药管理局高水平中医药重点学科建设项目(zyyzdxk-2023146); 国家自然科学基金面上项目(No. 81673959); 湖南省高层次卫生人才“225”工程学科带头人培养项目(湘卫函[2019]196号); 湖南省中医药科研计划项目重点课题(No. C2022005); 湖南中医药大学学院联合基金项目(No. 2022XYLH003)。

** **【通讯作者】** 陈斌, E-mail: chenbin0410@126.com

【作者简介】 杜珊(1991-), 女, 陕西商洛人, 博士, 主治医师, 从事中医药防治肝病研究。E-mail: 260555054@qq.com

of Treg/Th17 decreased ($P < 0.01$), the imbalance of Treg/Th17 cells shifted towards the Th17 direction, and the advanced stage group was more severe than the plateau stage group ($P < 0.05$). Correlation analysis found that the peripheral blood Treg and Th17 cell frequencies of patients with advanced HBV-ACLF were positively correlated with HBV-DNA level (Treg $r = 0.516$, $P = 0.005$; Th17 $r = 0.420$, $P = 0.026$), but Treg/Th17 ratio has no correlation with HBV-DNA level. The peripheral blood Treg and Th17 cell frequency and Treg/Th17 ratio of patients with HBV-ACLF plateau stage had no correlation with HBV-DNA level. **Conclusion** Treg/Th17 cell imbalance exists in patients with advanced and the plateau phases of HBV-ACLF, which is more serious in advanced phase patients. The frequency of Treg and Th17 cells was positively correlated with HBV-DNA level in patients with advanced HBV-ACLF.

【Keywords】 liver failure; Treg cell; Th17 cell; inflammatory response.

慢加急性肝衰竭(Acute-on-chronic liver failure, ACLF)是在慢性肝病基础上发生的急性肝功能衰竭,出现以黄疸、凝血功能障碍、肝肾综合征、肝性脑病、腹水等为主要表现的一组临床症候群^[1-2]。ACLF可导致多系统器官衰竭,具有高发病率和短死亡率,预后极差^[3-5]。在我国引起肝衰竭的主要病因是肝炎病毒,尤其是乙型肝炎病毒(Hepatitis B virus, HBV),乙肝相关性慢加急性肝衰竭(HBV-ACLF)的发病机制十分复杂,至今尚未完全清楚,但越来越多的研究表明免疫细胞介导的炎症反应在其发病中起至关重要的作用^[6-7]。

肝衰竭的免疫学发病机制涉及先天免疫和适应性免疫。在肝衰竭的发病中,以单核细胞、树突状细胞、中性粒细胞、巨噬细胞为主的先天免疫系统功能失调。CD4⁺ T细胞亚群辅助性17 T细胞(T helper 17 cells, Th17)、调节性T细胞(Regulatory T cell, Treg)是适应性反应免疫的重要组成部分,在协调适应性免疫应答中发挥着重要作用。Treg细胞具有强大的免疫调节功能,具有抑制炎症反应、维持免疫平衡的作用^[8]; Th17细胞介导炎症细胞募集,促进炎症因子释放,导致组织损伤。Treg与Th17细胞在功能上相互拮抗,已有多项研究^[9-10]表明Th17与Treg细胞的比值与ACLF患者肝损伤严重程度呈正相关,与患者生存率呈负相关。

T淋巴细胞在对持续性HBV感染的免疫反应中起着至关重要的作用^[11]。因此,探讨T细胞介导的免疫应答与HBV-ACLF发病机制的关系尤为重要。目前针对Treg/Th17细胞失衡与HBV-ACLF炎症反应的研究颇多,课题组前期研究发现肝衰竭早、中、晚期患者均存在不同程度的Treg/Th17细胞失衡^[12],但是关于不同时相HBV-ACLF中Treg/Th17细胞的表达并不清楚。因此,本研究拟通过分析HBV-ACLF不同时相(进展期、平台期)患者外周血Treg、Th17细胞频率及比值、Treg、Th17细胞特异性转录因子、相关细胞因子的表达差异,以及与HBV-DNA相关性,以期阐明Treg/Th17细胞失衡在HBV-ACLF不同时相的作用机制。

材料与方法

1 材料

1.1 研究对象 入组病例为2018年3月-2020年12月期间在本院肝病研究所住院的60例HBV-ACLF患者,同时纳入慢性乙型肝炎患者(chronic hepatitis B, CHB)、健康志愿者(normal control, NC)各20例作为对照。诊断符合肝衰竭诊治指南(2018版)和慢性乙型肝炎防治指南(2019版)诊断标准。根据HBV-ACLF患者7 d内总胆红素平均每日上升是否 $\geq 17.1 \mu\text{mol/L}$ 划分不同时相,将60例患者分为进展期28例和平台期32例。本研究经各受试者签署知情同意书,并通过湖南中医药大学第一附属医院医学伦理委员会讨论批准,批号伦审[2017]0720。

1.2 病例纳入标准 (1)符合HBV-ACLF、CHB诊断标准的患者及健康志愿者;(2)年龄在18~65岁之间;(3)自愿参加本研究并签署知情同意书者。

1.3 病例排除标准 (1)合并其他病毒感染、自身免疫性肝病、药物性肝损伤、酒精性肝病、Wilson病等;(2)合并严重并发症、心肺肾等器官衰竭、恶性肿瘤患者;(3)妊娠或哺乳期妇女;(4)近三月服用免疫抑制剂的患者。

1.4 试剂及仪器 anti-human CD3 PerCp-Cy5.5、CD8 PE、CD25 PE、CD4 FITC、叉状头(或)翅膀状螺旋转录因子P3(Forkhead box protein P3, FoxP3) Alexa 647、白介素-17A(Interleukin-17A, IL-17A) PE、Human转化生长因子(Transforming growth factor- β , TGF- β)、白介素-10(Interleukin-10, IL-10)、肿瘤坏死因子- α (Tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白介素-17A(Interleukin-17A, IL-17A)、白介素-23(Interleukin-23, IL-23)、流式细胞仪均购自BD公司; SYBR定量PCR KIT购自KAPA Biosystems公司; SYBR Green PCR Master购自MIXPromega公司; 荧光定量PCR仪购自Applied Biosystems; DNA热循环仪购自美国Perkin Elmer公司。

2 方法

2.1 流式细胞仪检测外周血Treg、Th17细胞比例

收集 HBV-ACLF、CHB 患者、健康对照者的清晨空腹外周静脉血，分离外周血单个核细胞（Peripheral blood mononuclear cell, PBMC），用于下一步检测。Treg、Th17 细胞染色参照试剂盒操作，进行表面、胞内染色、固定破膜等步骤，最后使用流式细胞仪上机检测，CD4⁺CD25⁺PoxP3⁺ 为 Treg 细胞，CD4⁺IL-17⁺ 为 Th17 细胞。

2.2 细胞因子微球检测技术（CBA） 检测 TGF-β、IL-10、TNF-α、IL-17A、IL-23 细胞因子含量分离新鲜外周血血浆，收集上清液用于 CBA 检测 Treg 细胞因子（TGF-β、IL-10）、Th17 细胞因子（TNF-α、IL-17A、IL-23）。

2.3 RT-PCR 检测 Treg 特异性转录因子 FoxP3、Th17 特异性转录因子 收集细胞，RT-PCR 检测 Treg 特异性转录因子 FoxP3、Th17 特异性转录因子视黄酸受体相关孤儿受体 γt（Retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma t, ROR-γt）的基因表达，采用仪器自带软件 qbase plus，分析数据，以 2^{-ΔΔCt} 表示 mRNA 相对表达。引物为 β-actin 正向：5'-GCACTCTTCCAGCCTTCCTTCC-3'，反向：5'-GCGGATGTCCACGTCACACTTC-3'；FoxP3 正向：5'-AAGAACGCCATCCGCCACAAC-3'，反向：5'-TCCAGCTCATCCACGGTCCAC-3'；ROR-γt 正向：5'-AGCG

GCAACAGCAGCAACAG-3'，反向 5'-CAGGCAGGTCAGGCGAGGAG-3'。

2.4 终末期肝病评分 MELD 评分（Model for End-Stage Liver Disease score, MELD）= 3.8 × ln[胆红素（mg/dl）] + 11.2 × ln(INR) + 9.57 × ln[血肌酐（mg/dl）] + 6.43 × （病因：胆汁性或酒精性为 0，其他为 1）

3 统计分析

所有数据采用 SPSS21.0 软件进行数据统计处理，计量资料以(̄x±s)表示。进行正态性检验及方差齐性检验，符合正态性分布和方差齐性采用 LSD 多重比较分析；不符合正态性分布和方差齐性，采用 Kruskal-WallisH 检验进行多组间比较分析，P<0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 参与者的临床特征及实验室参数

2018 年 3 月-2020 年 12 月在湖南中医药大学第一附属医院肝病研究所住院治疗的 HBV-ACLF 患者 60 例（其中进展期 28 例，平台期 32 例），同时纳入健康志愿者 20 例，CHB 活动期患者 20 例作为对照，总计 100 名受试者纳入本次研究。各组受试者临床基线情况见表 1。

表 1 参与者的临床特征及实验室参数
Table 1 Clinical characteristics and laboratory parameters of study participants

临床特征 Characteristics	健康志愿者 NC	慢乙肝患者 CHB	HBV-ACLF 进展期 Adv-ACLF	HBV-ACLF 平台期 Pla-ACLF
例数	20	20	28	32
性别(M/F)	16/4	17/3	24/4	27/5
年龄(year)	31.30±5.09	44.75±13.02	43.32±12.27	45.38±10.55
AST(U/L)	23.25(17.90,27.30)	54.90(22.08,265.43)	109.65(58.20,301.95)	81.55(63.65,298.20)
ALT(U/L)	18.45(15.30,26.90)	81.35(27.15,371.05)	121.20(58.08,395.85)	79.95(44.20,480.28)
TBIL(μmol/L)	13.85(11.75,15.63)	10.65(5.50,15.20)	320.70(205.23,479.75)	248.30(156.23,328.93)
ALB(g/L)	47.24±2.79	41.69±3.78	33.98±4.73	36.02±5.78
INR	N.D	1.00(0.95,1.08)	2.27(1.83,2.65)	1.81(1.52,2.22)
PT(s)	N.D	12.30(11.63,13.30)	27.60(23.10,32.29)	21.65(18.4,28.08)
MELD	N.D	N.D	27.52±2.82	24.54±2.26
HBV 感染时长(年)				
≤10	N.D	4	16	14
10-20	N.D	5	6	13
>20	N.D	11	6	5
HBeAg (+/-)	N.D	9/11	12/16	5/27
HBV-DNA(IU/mL)				
≤2×10 ⁵	N.D	14	10	26
>2×10 ⁵	N.D	6	18	6

注：NC,normal control,健康对照者；CHB,chronic hepatitis B,慢性乙型肝炎患者；Adv-ACLF,advanced stage of ACLF,HBV-ACLF 进展期患者；Pla-ACLF,Plateau stage of ACLF,HBV-ACLF 平台期患者；N.D.,not determined,未确定。

2 Treg、Th17 细胞频率及 Treg/Th17 细胞比值

与对照组相比，慢乙肝组、HBV-ACLF 进展期及平台期组患者外周血 Treg 及 Th17 细胞频率升高、

Treg/Th17 细胞比值明显下降，除平台期 Treg 细胞频率外，其余各组比较差异有统计学意义(P<0.01)，其中慢乙肝组 Treg 细胞频率最高，HBV-ACLF 进展

期组 Th17 细胞频率最高、Treg/Th17 细胞比值最低；与 HBV-ACLF 进展期组比较，HBV-ACLF 平台期组患者 Treg 及 Th17 细胞频率下降，Treg/Th17 细胞比值升高，差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)，见表 2，图 1。

表 2 各组外周血 Treg、Th17 细胞频率及 Treg/Th17 比值 ($\bar{x} \pm s$)
Table 2 Frequency of Treg and Th17 cells and Treg/Th17 ratio in peripheral blood of each group

分组 Group	n	Treg(%)	Th17(%)	Treg/Th17
NC	20	3.76±0.81	2.18±0.72	1.82±0.36
CHB	20	6.58±1.53 ^{△△}	6.82±1.55 ^{△△}	1.03±0.35 ^{△△}
Adv-ACLF	28	4.85±1.26 ^{△△*}	9.06±1.55 ^{△△*}	0.54±0.12 ^{△△*}
Pla-ACLF	32	3.96±1.50 ^{**#}	4.30±1.73 ^{△△*}	0.96±0.29 ^{△△#}

注：与 NC 组比较，[△] $P < 0.05$ ，^{△△} $P < 0.01$ ；与 CHB 组比较，^{*} $P < 0.05$ ，^{**} $P < 0.01$ ；与 Adv-ACLF 组比较，[#] $P < 0.05$ ，^{##} $P < 0.01$ 。

3 Treg/Th17 相关细胞因子表达水平

与健康对照组比较，慢乙肝组、HBV-ACLF 进展期组患者外周血 Treg 相关细胞因子 TGF- β 、IL-10 水平平均升高，差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)，慢乙肝组、HBV-ACLF 进展期、平台期组患者外周血 Th17 相关细胞因子 TNF- α 、IL-17A、IL-23 水平明显升高，

表 3 各组 Treg/Th17 相关细胞因子的表达 ($\bar{x} \pm s$, pg/mL)
Table 3 Expression of Treg/Th17 related cytokines in each group

分组 Group	Treg		Th17		
	TGF- β	IL-10	TNF- α	IL-17A	IL-23
NC	61.43±25.83	3.27±1.22	1.16±0.29	1.44±0.38	19.47±5.84
CHB	146.85±50.01 ^{△△}	7.36±3.48 ^{△△}	2.84±0.88 ^{△△}	4.31±1.91 ^{△△}	54.77±22.12 ^{△△}
Adv-ACLF	106.64±39.62 ^{△*}	4.96±1.63 ^{△*}	3.98±0.83 ^{△△*}	5.82±1.03 ^{△△*}	72.32±16.03 ^{△△*}
Pla-ACLF	75.48±31.53 ^{**#}	3.79±1.33 ^{**#}	2.13±0.87 ^{△△*}	2.92±1.18 ^{△△*}	36.54±15.77 ^{△△*}

注：与 NC 组比较，[△] $P < 0.05$ ，^{△△} $P < 0.01$ ；与 CHB 组比较，^{*} $P < 0.05$ ，^{**} $P < 0.01$ ；与 Adv-ACLF 组比较，[#] $P < 0.05$ ，^{##} $P < 0.01$ 。

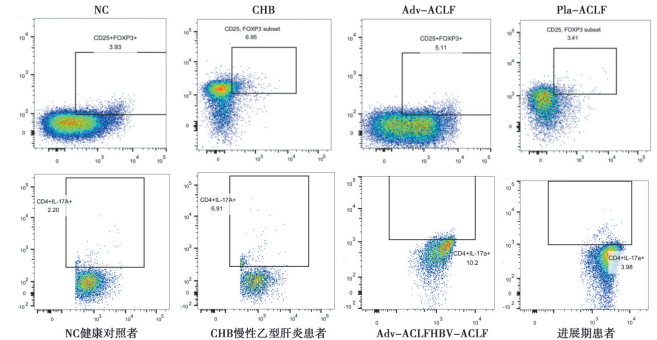
4 Treg/Th17 细胞特异性转录因子 mRNA 表达

与健康对照组比较，慢乙肝组、HBV-ACLF 进展期组 Treg 细胞特异性转录因子 FoxP3 明显升高，慢乙肝组、HBV-ACLF 进展期及平台期组 Th17 细胞特异性转录因子 ROR- γ t mRNA 表达均明显升高，差异有统计学意义 ($P < 0.01$)，其中慢乙肝组 FoxP3 mRNA 表达最高，HBV-ACLF 进展期组 ROR- γ t mRNA 表达最高，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)；与 HBV-ACLF 进展期组比较，平台期组患者 FoxP3、ROR- γ t mRNA 表达均有所下降，差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)，见表 4。

5 Treg/Th17 细胞失衡与 HBV-DNA 水平相关性分析

为了进一步分析不同时相 HBV-ACLF 患者外周血 Treg、Th17 细胞频率及 Treg/Th17 细胞比值与血清 HBV-DNA 水平的关系，我们进行了相关性分析。

差异有统计学意义 ($P < 0.01$)，其中慢乙肝组 TGF- β 、IL-10 水平均最高，HBV-ACLF 进展期组 TNF- α 、IL-17A、IL-23 水平最高；与 HBV-ACLF 进展期组比较，HBV-ACLF 平台期患者 TGF- β 、IL-10、TNF- α 、IL-17A、IL-23 水平均明显降低，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，见表 3。



NC 健康对照组 CHB 慢性乙型肝炎患者 Adv-ACLF HBV-ACLF 进展期患者 Pla-ACLF HBV-ACLF 平台期患者

图 1 各组 Treg 细胞 (CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺)、Th17 细胞 (CD4⁺ IL-17A⁺) 频率流式图

NC Normal control CHB Patients with chronic hepatitis B Adv-ACLF Advanced stage of HBV-ACLF patients Pla-ACLF Platform stage of HBV-ACLF patients

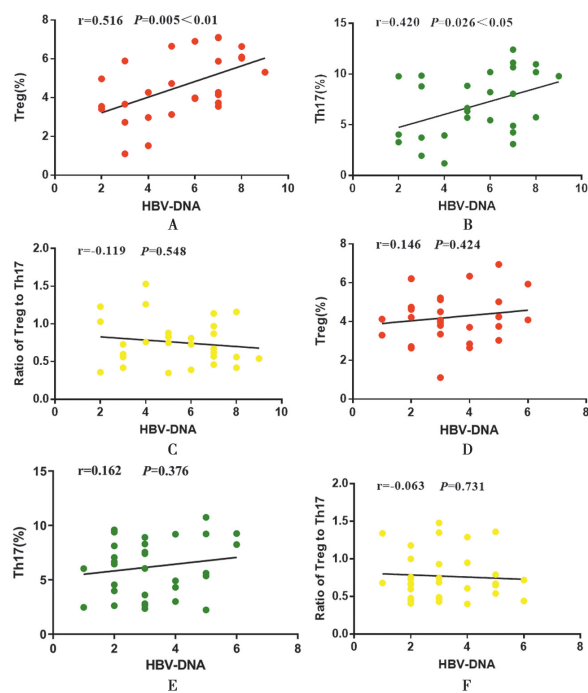
Fig. 1 Flow cytometry of frequency of Treg cells (CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺) and Th17 cells (CD4⁺ IL-17A⁺) in each group

结果显示，进展期 HBV-ACLF 患者外周血 Treg、Th17 细胞频率与 HBV-DNA 水平呈正相关 (Treg 细胞, $r = 0.516$, $P < 0.05$; Th17 细胞, $r = 0.420$, $P = 0.026$)，但 Treg/Th17 细胞比值与 HBV-DNA 水平无相关性。平台期 HBV-ACLF 患者外周血 Treg、Th17 细胞频率以及 Treg/Th17 细胞比值均与 HBV-DNA 水平无相关性。结果见图 2。

表 4 各组 Treg/Th17 细胞特异性转录因子 mRNA 表达
Table 4 Expression of Treg/Th17 cell specific transcription factors mRNA in each group

分组 Group	FoxP3	ROR- γ t
NC	22.51±3.07	13.91±2.62
CHB	31.88±3.43 ^{△△}	25.45±3.06 ^{△△}
Adv-ACLF	25.01±2.44 ^{△△*}	27.85±4.26 ^{△△*}
Pla-ACLF	23.61±2.09 ^{**#}	22.35±3.65 ^{△△*}

注：与 NC 组比较，[△] $P < 0.05$ ，^{△△} $P < 0.01$ ；与 CHB 组比较，^{*} $P < 0.05$ ，^{**} $P < 0.01$ ；与 Adv-ACLF 组比较，[#] $P < 0.05$ ，^{##} $P < 0.01$ 。



注: A、B、C 为 HBV-ACLF 进展期结果; D、E、F 为 HBV-ACLF 平台期结果

图 2 不同时相 HBV-ACLF 患者 Treg、Th17 细胞频率及比值与 HBV-DNA 水平相关性分析

Note: A. B and C are the results of Adv-ACLF; D. E and F are the results of Pla-ACLF

Fig. 2 Correlation analysis between Treg and Th17 cell frequency and ratio and HBV-DNA level in HBV-ACLF patients at different phases

讨论

HBV-ACLF 的发病机制十分复杂,涉及先天免疫系统和适应性免疫系统的功能改变^[13]。首先以单核细胞/巨噬细胞、中性粒细胞、树突状细胞为代表的先天免疫系统功能严重失调,通过释放炎症介质、提呈抗原,招募并刺激 CD4⁺ T 细胞活化和增殖,启动适应性免疫应答。Treg 和 Th17 起源于初始的 CD4⁺ T 细胞,是最具代表性的 T 细胞亚群。Treg 细胞受 FoxP3 调控,通过分泌 TGF- β 、IL-10 等抑炎细胞因子,发挥抑制炎症作用;Th17 细胞在 ROR- γ t 的调控下,通过分泌 TNF- α 、IL-17A、IL-23 等促炎细胞因子,加重炎症反应。二者在功能上相互拮抗,共同维持免疫平衡。Treg/Th17 细胞平衡的变化不仅在 HBV 持续感染中起重要作用,还影响炎症反应转归,与病毒性肝炎、肝硬化、肝衰竭、肝癌等疾病密切相关^[14-15]。

肝衰竭“三重打击”学说与四个时相的病理机制相对应,上升前期消化道症状出现,肝功能及凝血功能逐渐受损,处于免疫“潮”期,T 细胞募集大量炎症因子至肝脏,在清除 HBV 的同时亦使肝细胞受到严重损伤;上升期消化道症状进一步加重,“炎症因子风暴”后,肝细胞面临缺血缺氧打击,大量坏死;上升后期临床症状持续加重,肝功能及凝血功能持续恶化,炎症细胞与因

子逐渐耗竭,肠道菌群易位,肠源性内毒素血症发生,内源性感染机率增加,约有 30%-70% 的患者在上升期死亡;进入平台期后,临床症状逐渐缓解,机体从免疫耗竭状态逐渐转为免疫重建,免疫细胞趋于平衡,肝细胞再生功能有所恢复;最终在恢复期,症状基本缓解,肝功能及凝血功能逐渐恢复正常,机体处于免疫平稳状态,肝脏各项功能趋于恢复^[16,17]。由此可见,HBV-ACLF 不同时相机体免疫状态有所不同。但目前关于 HBV-ACLF 不同时相患者免疫细胞表达差异的研究较少,仅研究了自然杀伤细胞(natural killer cell,NK)在 HBV-ACLF 不同时相患者中外周血中的表达。结果提示,HBV-ACLF 进展期、平台期患者 NK 细胞比例均较正常人低,且进展期患者较平台期患者更低^[18]。这种改变与肝衰竭患者不同时相免疫状况有关,对于免疫治疗策略的制定具有重要的指导意义。Treg/Th17 细胞作为适应性免疫中的重要细胞群,研究其在 HBV-ACLF 不同时相患者中的表达差异,对于探索肝衰竭的免疫调节新方法同样具有重要的意义。

本实验研究结果发现,HBV-ACLF 患者均存在 Treg/Th17 细胞失衡,且失衡向 Th17 方向偏移。与健康对照者比较,CHB、HBV-ACLF 进展期患者 Treg 细胞频率升高,CHB、HBV-ACLF 进展期及平台期患者 Th17 细胞升高,尤其是 Th17 细胞升高更明显,Treg/Th17 细胞比值明显下降。Treg/Th17 细胞相关细胞因子及特异性转录因子表达水平方面,与健康对照者比较,CHB 及 HBV-ACLF 进展期患者 TGF- β 、IL-10 及 FoxP3 mRNA 升高,CHB 组、HBV-ACLF 进展期及平台期患者 TNF- α 、IL-17A、IL-23 及 ROR- γ t mRNA 表达明显升高,与 Treg/Th17 细胞变化基本符合。Treg 细胞在 CHB 患者中表达最高,而 Th17 细胞在 HBV-ACLF 进展期患者中表达最高。有研究表明 Treg 细胞免疫抑制主要发生在 CHB 阶段,Th17 细胞介导的炎症损伤主要发生在 HBV-ACLF 阶段^[19]。肝衰竭时 Th17 细胞过度活化,募集各种炎症因子引起机体过度的免疫反应,导致肝细胞损伤加重,而 Treg 细胞的增加可能是机体由于促炎因子的升高而产生的反馈,以避免过强的免疫反应造成肝细胞大量坏死,但其数量不足以抑制强大的免疫反应。但在疾病进程中 Treg/Th17 轴始终以 Th17 细胞为优势,失衡向 Th17 细胞方向倾斜,并且 Treg、Th17 细胞的这种改变受到其特异性转录因子的调控,FoxP3、ROR- γ t 表达增多,进而导致 Treg、Th17 细胞增殖、分化,TGF- β 、IL-10、TNF- α 、IL-17A、IL-23 细胞因子分泌水平增加,最终导致炎症反应加剧。

有研究表明 HBV-ACLF 患者外周血 Th17 细胞、

Treg/Th17 细胞比值与血清 HBV-DNA 载量呈正相关^[19]。为了进一步研究不同时相 HBV-ACLF 患者外周血 Treg、Th17 细胞频率及 Treg/Th17 细胞比值与血清 HBV-DNA 水平的关系,相关性分析结果提示,进展期 HBV-ACLF 患者外周血 Treg、Th17 细胞频率与 HBV-DNA 水平呈正相关,但 Treg/Th17 细胞比值与 HBV-DNA 水平无相关性,平台期患者外周血 Treg、Th17 细胞频率及 Treg/Th17 细胞比值均与 HBV-DNA 水平无相关性。进展期 HBV-ACLF 患者血清 HBV-DNA 水平明显高于平台期患者,进展期 Treg、Th17 细胞频率与 HBV-DNA 水平呈正相关,表明 Treg/Th17 细胞失衡与 HBV 感染有关。有研究证明 Treg/Th17 细胞的免疫失衡明显存在于 CHB 患者的免疫活动期,Treg/Th17 细胞失衡可能与患者高病毒载量有关^[19]。进展期 HBV-ACLF 患者 Treg/Th17 细胞失衡除与 HBV 复制相关外,还可能与缺血缺氧导致的微循环障碍及 IETM 有关,而平台期这种结果可能与患者经过了 2~4 周的进展期阶段,HBV-DNA 清除以及核苷酸类似物的抗病毒治疗有关。因此,尽早进行抗病毒治疗可以减轻炎症反应。

综上,不同时相 HBV-ACLF 患者均存在 Treg/Th17 细胞失衡,进展期患者 Treg/Th17 失衡较平台期更严重。进展期 HBV-ACLF 患者 Treg/Th17 细胞失衡与 HBV-DNA 水平呈正相关。不同时相 HBV-ACLF 患者 Treg/Th17 细胞表达或可成为评估患者免疫状态的依据,为肝衰竭患者的个体化免疫调节提供参考。

【参考文献】

- [1] Liu FF, Zou ZS, Shen LJ, et al. A prediction model for outcome in patients with HBV-ACLF based on predisposition, injury, response and organ failure[J]. *Sci Rep*, 2020, 10:20176.
- [2] 中华医学会感染病学分会肝衰竭与人工肝学组, 中华医学会肝病学会重型肝病与人工肝学组. 肝衰竭诊治指南(2012 年版)[J]. *中华肝脏病杂志*, 2013, 21(3):177-183.
- [3] Sundaram V, Jalan R, Wu T, et al. Factors associated with survival of patients with severe acute-on-chronic liver failure before and after liver transplantation[J]. *Gastroenterology*, 2019, 156(5):1381-1391.
- [4] Mahmud N, Kaplan DE, Taddei TH, et al. Incidence and mortality of acute-on-chronic liver failure using two definitions in patients with compensated cirrhosis[J]. *Hepatology*, 2019, 69(5):2150-2163.
- [5] Hernaez R, Kramer JR, Liu Y, et al. Prevalence and short-term mortality of acute-on-chronic liver failure: a national cohort study from the USA[J]. *J Hepatol*, 2019, 70(4):639-647.
- [6] 张耿林, 高志良. 乙型肝炎相关慢加急性肝衰竭的免疫学特征及治疗策略[J]. *中国病毒病杂志*, 2011, 1(1):5-8.
- [7] 叶一农, 高志良. 乙型肝炎肝衰竭发生机制中的三重打击[J]. *中华肝脏病杂志*, 2009, 17(7):638-640.
- [8] Bernal W, Jalan R, Quaglia A, et al. Acute-on-chronic liver failure[J]. *Lancet*, 2015, 86:1576-1587.
- [9] Li J, Liang X, Jiang J, et al. PBMC transcriptomics identifies immune-metabolism disorder during the development of HBV-ACLF[J]. *Gut*, 2021;0:1-13. doi:10.1136/gutjnl-2020-323395
- [10] Norlander AE, Bloodworth MH, Toki S, et al. Prostaglandin I2 signaling licenses Treg suppressive function and prevents pathogenic reprogramming[J]. *J Clin Invest*, 2021, 131(7):e140690.
- [11] Vierling JM. The immunology of hepatitis B[J]. *Clin Liver Dis*, 2007, 11(4):727-759.
- [12] 谭年花, 陈斌, 彭杰, 等. 乙肝相关性慢加急性肝衰竭“阳黄-阴黄-阴黄”不同证候分型患者 Treg/Th17 的表达[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(2):33-38.
- [13] 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.
- [14] Lan YT, Wang ZL, Tian P, et al. Treg/Th17 imbalance and its clinical significance in patients with hepatitis B-associated liver cirrhosis[J]. *Diagn Pathol*, 2019, 14:114.
- [15] Li K, Liu H, Guo T. Th17/Treg imbalance is an indicator of liver cirrhosis process and a risk factor for HCC occurrence in HBV patients[J]. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 2017, 41(4):399-407.
- [16] Song QT, Li L, Lin C, et al. Co-administration of N-acetylcysteine and dexmedetomidine plays a synergistic effect on protection of LPS-induced acute lung injury via correcting Th1/Th2/Th17 cytokines imbalance[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2020, 47:294-301.
- [17] Yuan DHi, Jia Y, Hassan OM, et al. LPS-Treated Podocytes Polarize Naive CD4 T Cells into Th17 and Treg Cells[J]. *Biomed Res Int*, 2020, 2020:8587923.
- [18] 翁伟镇, 熊静, 曹会娟, 等. 不同时相慢加急性乙肝肝衰竭患者外周血 NK 细胞及其受体分析[J]. *中山大学学报(医学版)*, 2018, 39(1):87-92.
- [19] Wu T, Li J, Shao L, et al. Development of diagnostic criteria and a prognostic score for hepatitis B virus-related acute-on-chronic liver failure[J]. *Gut*, 2018, 67(12):2181-2191.

【收稿日期】 2024-04-21 【修回日期】 2024-07-11