

DOI:10.13350/j.cjpb.220506

• 论著 •

# 不同类型 HBV 相关慢加急性肝衰竭患者外周血 Treg 和 CD8<sup>+</sup>T 细胞及其相关细胞因子变化

于明凯<sup>1</sup>, 朱玥洁<sup>2</sup>, 谢忻汝<sup>3</sup>, 麦尔哈巴·艾斯卡尔<sup>1</sup>, 张峰波<sup>3</sup>, 尹紫月<sup>1</sup>, 鲁晓攀<sup>4</sup>, 丁剑冰<sup>1\*\*</sup>

(1. 新疆医科大学基础医学院, 新疆乌鲁木齐 830011; 2. 新疆医科大学第一附属医院生殖助孕科;

3. 新疆医科大学第一附属医院检验科; 4. 新疆医科大学第一附属医院感染科)

**【摘要】** **目的** 探索调节性 T 细胞(Treg)和 CD8<sup>+</sup>T 细胞及其相关细胞因子在乙型肝炎病毒相关慢加急性肝衰竭(HBV-ACLF)患者中的表达变化及其临床意义。 **方法** 选取慢性乙型肝炎(CHB)患者 47 例, 乙肝肝硬化(HBC)患者 50 例, 慢性乙型肝炎相关 ACLF(CHB-ACLF)患者 42 例以及乙肝肝硬化相关 ACLF(HBC-ACLF)患者 45 例, 同时选取 20 例健康体检者作为健康对照(HC)。采用全自动生化分析仪测定研究对象的肝功指标, 流式细胞术(FCM)检测 Treg 以及 CD8<sup>+</sup>T 细胞比例, 采用酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测外周血中转化生长因子 β(TGF-β)、白介素 10(IL-10)、穿孔素(Perforin)和颗粒酶 B(Granzyme B)的表达水平, 采用 Pearson 法分析研究对象 Treg 和 CD8<sup>+</sup>T 细胞以及相关细胞因子与肝功指标的相关性。 **结果** CHB 组患者 Treg(8.84±0.77)% 及相关细胞因子 TGF-β(70.25±11.58) ng/mL 和 IL-10(6.03±1.40) pg/mL 水平显著高于 HC 组(均  $P<0.05$ ), 同时 CD8<sup>+</sup>T 细胞(32.64±5.26)% 及其相关细胞因子 Perforin(69.65±11.95) pg/mL 和 Granzyme B(37.51±3.71) pg/mL 水平亦显著高于 HC 组(均  $P<0.05$ ); 而 CHB-ACLF 组患者 Treg(5.52±0.69)% 及相关细胞因子 TGF-β(51.57±10.35) ng/mL 和 IL-10(3.28±1.05) pg/mL 水平显著低于 CHB 组(均  $P<0.05$ ), 但 CD8<sup>+</sup>T 细胞(36.94±4.94)% 及其相关细胞因子 Perforin(71.91±13.10) pg/mL 和 Granzyme B(97.53±8.93) pg/mL 水平显著高于 CHB 组(均  $P<0.05$ )。HBC 组患者 Treg(8.15±1.13)% 及相关细胞因子 TGF-β(75.19±15.54) ng/mL 和 IL-10(5.85±0.74) pg/mL 水平显著高于 HC 组(均  $P<0.05$ ), 同时 CD8<sup>+</sup>T 细胞(33.60±4.00)% 及其相关细胞因子 Perforin(60.10±9.21) pg/mL 和 Granzyme B(41.61±5.06) pg/mL 水平亦显著高于 HC 组(均  $P<0.05$ ); 而 HBC-ACLF 组患者 Treg(4.72±0.78)% 及相关细胞因子 TGF-β(46.84±7.80) ng/mL 和 IL-10(4.24±1.22) pg/mL 水平显著低于 HBC 组(均  $P<0.05$ ), 但 CD8<sup>+</sup>T 细胞(42.57±4.68)% 及其相关细胞因子 Perforin(74.21±12.51) pg/mL 和 Granzyme B(88.89±9.61) pg/mL 水平同样显著高于 HBC 组(均  $P<0.05$ )。相关性分析显示, Treg 及其细胞因子水平与 CD8<sup>+</sup>T 细胞及其细胞因子水平呈负相关, Treg 及其细胞因子水平与肝功指标成负相关, 而 CD8<sup>+</sup>T 细胞及其细胞因子水平与肝功指标成正相关(均  $P<0.05$ )。 **结论** Treg 和 CD8<sup>+</sup>T 细胞及其细胞因子在 HBV-ACLF 患者中发生显著改变, Treg 及其细胞因子水平与疾病严重程度成负相关, CD8<sup>+</sup>T 细胞及其细胞因子水平与疾病严重程度成正相关。HBV-ACLF 发生时, Treg 对 CD8<sup>+</sup>T 细胞功能的抑制作用减弱, 从而引起的机体促炎反应增强、抗炎反应减弱, 可能是介导 HBV-ACLF 发病的重要因素。

**【关键词】** 慢加急性肝衰竭; ACLF; Treg; CD8; 细胞因子**【中图分类号】** R373.21**【文献标识码】** A**【文章编号】** 1673-5234(2022)05-0526-06

[Journal of Pathogen Biology. 2022 May;17(5):526-531.]

## Changes of Treg and CD8<sup>+</sup>T cells and their related cytokines in peripheral blood of patients with different types of HBV related acute-on-chronic liver failure

YU Ming-kai<sup>1</sup>, ZHU Yue-jie<sup>2</sup>, XIE Xin-ru<sup>3</sup>, Maierhaba Aisikaer<sup>1</sup>, ZHANG Feng-bo<sup>3</sup>, YIN Zi-yue<sup>1</sup>, LU Xiao-bo<sup>4</sup>, DING Jian-bing<sup>1</sup> (1. Department of Immunology, School of Basic Medical Sciences, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China; 2. Reproductive Medicine Center, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University; 3. Department of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University; 4. Department of Infectious Disease, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University) \*\*\*

**【Abstract】** **Objective** To explore the expression changes and clinical significance of regulatory T cells (Treg), CD8<sup>+</sup>T cells and their related cytokines in patients with hepatitis B virus associated chronic and acute liver failure (HBV-ACLF).

**Methods** 47 patients with chronic hepatitis B (CHB), 50 patients with hepatitis B cirrhosis (HBC), 42 patients with

\* **【基金项目】** 国家自然科学基金项目(No. 82060115, 81960373)。\*\* **【通讯作者】** 丁剑冰, E-mail: 1601379937@qq.com**【作者简介】** 于明凯(1998-), 男, 山东聊城人, 硕士研究生。主要研究方向: 感染免疫学。E-mail: 152709927@qq.com

chronic hepatitis B related ACLF (CHB-ACLF) and 45 patients with hepatitis B cirrhosis related ACLF (HBC-ACLF) were selected, and 20 healthy persons were selected as healthy controls (HC). The liver function indexes of the subjects were measured by automatic biochemical analyzer, the proportion of Treg and CD8<sup>+</sup> T cells were detected by flow cytometry (FCM), and the expression levels of transforming growth factor (TGF- $\beta$ ), interleukin-10 (IL-10), Perforin and Granzyme B in peripheral blood were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Finally, the Pearson method was used to analyze the correlation between Treg, CD8<sup>+</sup> T cells and related cytokines and liver function indexes.

**Results** Treg (8.84 $\pm$ 0.77)% and its related cytokines TGF- $\beta$  (70.25 $\pm$ 11.58)ng/mL and IL-10 (6.03 $\pm$ 1.40)pg/mL in CHB group were significantly higher than those in HC group (all  $P$ <0.05). At the same time, the levels of CD8<sup>+</sup> T cells (32.64 $\pm$ 5.26)% and its related cytokines Perforin (69.65 $\pm$ 11.95)pg/mL and Granzyme B (37.51 $\pm$ 3.71)pg/mL were also significantly higher than those in HC group (all  $P$ <0.05); Treg (5.52 $\pm$ 0.69)% and related cytokines TGF- $\beta$  (51.57 $\pm$ 10.35)ng/mL and IL-10 (3.28 $\pm$ 1.05)pg/mL in CHB-ACLF group were significantly lower than those in CHB group (all  $P$ <0.05), but the levels of CD8<sup>+</sup> T cells (36.94 $\pm$ 4.94)% and related cytokines Perforin (71.91 $\pm$ 13.10)pg/mL and Granzyme B (97.53 $\pm$ 8.93)pg/mL were significantly higher than those in CHB group (all  $P$ <0.05). Treg (8.15 $\pm$ 1.13)% and related cytokines TGF- $\beta$  (75.19 $\pm$ 15.54)ng/mL and IL-10 (5.85 $\pm$ 0.74)pg/mL in HBC group were significantly higher than those in HC group (all  $P$ <0.05). At the same time, the levels of CD8<sup>+</sup> T cells (33.60 $\pm$ 4.00)% and related cytokines Perforin (60.10 $\pm$ 9.21)pg/mL and Granzyme B (41.61 $\pm$ 5.06)pg/mL were also significantly higher than those in HC group (all  $P$ <0.05); Treg (4.72 $\pm$ 0.78)% and related cytokines TGF- $\beta$  (46.84 $\pm$ 7.80)ng/mL and IL-10 (4.24 $\pm$ 1.22)pg/mL in HBC-ACLF group were significantly lower than those in HBC group (all  $P$ <0.05), but the levels of CD8<sup>+</sup> T cells (42.57 $\pm$ 4.68)% and related cytokines Perforin (74.21 $\pm$ 12.51)pg/mL and Granzyme B (88.89 $\pm$ 9.61)pg/mL were also significantly higher than those in HBC group (all  $P$ <0.05). Correlation analysis showed that the levels of Treg and its cytokines were negatively correlated with the levels of CD8<sup>+</sup> T cells and its cytokines, the levels of Treg and its cytokines were negatively correlated with liver function indexes, while the levels of CD8<sup>+</sup> T cells and its cytokines were positively correlated with liver function indexes (all  $P$ <0.05). **Conclusion** Treg and CD8<sup>+</sup> T cells and their cytokines changed significantly in patients with hbv-aclf. The levels of Treg and its cytokines were negatively correlated with the severity of the disease, and the levels of CD8<sup>+</sup> T cells and its cytokines were positively correlated with the severity of the disease. When HBV-ACLF occurs, the inhibitory effect of Treg on the function of CD8<sup>+</sup> T cells is weakened, resulting in the enhancement of pro-inflammatory response and the weakening of anti-inflammatory response, which may be an important factor mediating the pathogenesis of HBV-ACLF.

**【Key words】** Acute-on-chronic liver failure; ACLF; Treg; CD8; cytokine

慢加急性肝衰竭 (acute-on-chronic liver failure, ACLF) 是指在各种慢性肝病基础上发生急性肝功能失代偿, 可伴肝外器官的功能衰竭, 患者 90 d 内病死率可达 60%~70%, 是一种病情极凶险的临床独立综合征<sup>[1]</sup>。根据疾病基础的不同, 又可分为非肝硬化或肝硬化相关 ACLF。在我国, ACLF 是所有肝衰竭中最常见的类型, 其中以 HBV 相关 ACLF (HBV-ACLF) 尤为常见, 约占所有肝衰竭发病率的 70% 以上<sup>[2]</sup>。目前, 我国慢性乙型肝炎 (chronic hepatitis B, CHB) 患者基数庞大, 防治乙型肝炎重症化的临床工作十分严峻<sup>[3]</sup>, 积极探索 HBV-ACLF 发病机制具有十分重要的临床意义。关于 ACLF 的发病机制尚未得到系统阐明, 但值得肯定的是免疫失衡在 ACLF 的发病中具有重要始动效应<sup>[4]</sup>。研究表明, 具有免疫负调控作用的 Treg 和细胞免疫杀伤作用的 CD8<sup>+</sup> T 细胞与 ACLF 的发病具有相关性, 但这两种细胞在不同 HBV 相关疾病进展阶段所致 ACLF 中的研究尚少<sup>[5-7]</sup>。本研究通过检测 Treg 和 CD8<sup>+</sup> T 细胞及其细

胞因子在 CHB 相关 ACLF (CHB-ACLF) 和乙型肝炎肝硬化 (hepatitis B cirrhosis, HBC) 相关 ACLF (HBC-ACLF) 两种类型患者外周血中的改变, 以探索 Treg 和 CD8<sup>+</sup> T 细胞及其细胞因子在 HBV-ACLF 中可能介导的发病作用。

## 对象与方法

### 1 研究对象

选取 2020 年 12 月至 2022 年 1 月于新疆医科大学第一附属医院确诊的 CHB 患者 47 例, HBC 患者 50 例, CHB-ACLF 患者 42 例以及 HBC-ACLF 患者 45 例。纳入标准: 前期未接受系统化治疗的确诊 CHB、HBC 以及 ACLF 患者。排除标准: 合并糖尿病、甲亢、甲减等代谢性疾病者; 患有血液系统疾病者; 患有各类癌症者; 合并妊娠、腹膜炎以及其他严重感染者; 抗-HIV 阳性或合并非 HBV 感染者等。同时选取 20 例健康体检者作为健康对照 (HC)。本研究获新疆医科大学第一附属医院伦理委员会的批准 (审批号: 20200320-21), 同时已获得全部患者的知情同意。

## 2 方法

**2.1 标本采集** 患者入院后,详细收集病历资料,并于次日清晨使用紫头真空采血管空腹采集患者外周抗凝静脉血 5 mL,其中抽取 2 mL 全血用于当日内作流式细胞术检测,剩余 3 mL 全血以 2 000 r/min 离心 10 min 后取血浆置于 -20 °C 保存。

**2.2 流式细胞术检测** 分别抽取 100  $\mu$ L 上述流式用血加入两支流式管中,各加入人 2  $\mu$ g FcR 阻断剂(Hu Fc Block, 564219, BD Pharmingen),室温孵育 10 min;分别加入 Anti-human CD3-PerCP-Cy5. 5、CD4-FITC、CD25-APC 和 CD127-PE 抗体检测 Treg 亚群,加入 Anti-human CD3-PerCP-Cy5. 5 和 CD8-APC-Cy7 抗体检测 CD8<sup>+</sup>T 细胞亚群,室温孵育 20 min;加入红细胞裂解液(Absin)室温裂红细胞 5 min,清洗一次后用流式细胞仪(FACSCanto, BD)检测,最终定义 CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> 细胞为 Treg 细胞,CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> 细胞为 CD8<sup>+</sup>T 细胞,所有流式抗体均购自美国 BD 公司。

**2.3 细胞因子检测** 采用酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测血清 TGF- $\beta$ 、IL-10、Perforin 和 Granzyme B 等细胞因子水平,细胞因子检测试剂盒均购自北京旷博生物。通过酶标仪(Thermo Fisher, FI-01620 Vantaa, Finland)检测 A<sub>450</sub> 值,根据标准曲线计算细胞因子相对浓度。

**2.4 肝功能检测** 采用全自动罗氏 Cobas8000 生化分析仪检测血清谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)、总胆红素(total Bilirubin, TBil)等肝功能指标。

**2.5 统计学分析** 采用 SPSS 26.0 软件进行统计学分析。计量资料呈正态分布且方差齐时用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,进行两独立样本的 *t* 检验或方差分析。计数资料采用例数(*n*)进行描述,组间比较采用  $\chi^2$  检验。分析不同组别 Treg 与 CD8<sup>+</sup>T 细胞及其细胞因子差异和相关性,以及 HBV 及 ACLF 患者 Treg 和 CD8<sup>+</sup>T 及其细胞因子与各肝功指标之间的相关性,以 *P*<0.05 为差异具有统计学意义。

## 结 果

### 1 不同类型 HBV-ACLF 患者的肝功能指标比较

HC、CHB、HBC、CHB-ACLF 和 HBC-ACLF 5 组患者比较,ALT、AST 及 TBil 等肝功指标差异均具有统计学意义(均 *P*<0.01);与 CHB 组相比,CHB-ACLF 组 ALT、AST 及 TBil 均显著增高(均 *P*<0.01);与 HBC 组相比,HBC-ACLF 组 ALT、AST 及 TBil 显著增高(均 *P*<0.01)(表 1)。

表 1 不同类型 HBV-ACLF 患者肝功能指标比较

Table 1 Liver function indexes in patients with different types of HBV-ACLF

组别 Group	例数 No.		年龄 Age ( $\bar{x}\pm s$ , 岁)	ALT ( $\bar{x}\pm s$ , U/L)	AST ( $\bar{x}\pm s$ , U/L)	TBil ( $\bar{x}\pm s$ , $\mu$ mol/L)
	男 Male	女 Female				
HC	10	10	28.87 $\pm$ 3.08	26.28 $\pm$ 13.26	20.12 $\pm$ 8.26	12.83 $\pm$ 5.70
CHB	35	12	34.43 $\pm$ 8.23	215.46 $\pm$ 45.62	135.85 $\pm$ 37.94	143.27 $\pm$ 29.79
HBC	40	10	37.72 $\pm$ 5.66	264.90 $\pm$ 42.06	179.11 $\pm$ 29.83	136.92 $\pm$ 12.20
CHB-ACLF	37	5	47.21 $\pm$ 11.23	689.56 $\pm$ 156.73	447.33 $\pm$ 85.43	342.37 $\pm$ 97.26
HBC-ACLF	38	7	47.33 $\pm$ 8.29	682.13 $\pm$ 154.27	461.04 $\pm$ 68.91	354.77 $\pm$ 120.47

注:a)5 组间比较, $\chi^2_{\text{性别}}=13.346, P<0.05; t_{\text{年龄}}=33.523, t_{\text{ALT}}=275.200, t_{\text{AST}}=439.478, t_{\text{TBil}}=135.309, \text{均 } P<0.01. \text{ b)CHB 和 CHB-ACLF 两组间比较, } \chi^2_{\text{性别}}=2.665, P>0.05; t_{\text{年龄}}=-6.171, t_{\text{ALT}}=-18.902, t_{\text{AST}}=-21.787, t_{\text{TBil}}=-12.744, \text{均 } P<0.01. \text{ c)HBC 和 HBC-ACLF 两组间比较, } \chi^2_{\text{性别}}=0.318, P>0.05; t_{\text{年龄}}=-6.658, t_{\text{ALT}}=-17.565, t_{\text{AST}}=-25.387, t_{\text{TBil}}=-12.075, \text{均 } P<0.01.$

### 2 不同类型 HBV-ACLF 患者外周血 Treg 和 CD8<sup>+</sup>T 细胞水平比较

HC、CHB、HBC、CHB-ACLF 和 HBC-ACLF 5 组患者比较,外周血 Treg 和 CD8<sup>+</sup>T 细胞水平差异具有统计学意义(均 *P*<0.01);与 CHB 组相比,CHB-ACLF 组 Treg 细胞水平显著下降,CD8<sup>+</sup>T 细胞水平显著上升(均 *P*<0.01);与 HBC 组相比,HBC-ACLF 组 Treg 细胞水平显著下降,CD8<sup>+</sup>T 细胞水平显著上升(均 *P*<0.01)(图 1,图 2,表 2)。

表 2 不同类型 HBV-ACLF 患者外周血 Treg 及 CD8<sup>+</sup>T 细胞水平

Table 2 Levels of Treg and CD8<sup>+</sup>T cells in peripheral blood of patients with different types of HBV-ACLF

组别 Group	Treg ( $\bar{x}\pm s, \%$ )	CD8 <sup>+</sup> T ( $\bar{x}\pm s, \%$ )
HC	6.78 $\pm$ 1.51	26.76 $\pm$ 3.83
CHB	8.84 $\pm$ 0.77	32.64 $\pm$ 5.26
HBC	8.15 $\pm$ 1.13	33.60 $\pm$ 4.00
CHB-ACLF	5.52 $\pm$ 0.69	36.94 $\pm$ 4.94
HBC-ACLF	4.72 $\pm$ 0.78	42.57 $\pm$ 4.68

注:a)5 组间比较, $t_{\text{Treg}}=152.571, t_{\text{CD8}^+\text{T}}=51.267, \text{均 } P<0.01. \text{ b)CHB 和 CHB-ACLF 两组间比较, } t_{\text{Treg}}=21.218, t_{\text{CD8}^+\text{T}}=-3.966, \text{均 } P<0.01. \text{ c)HBC 和 HBC-ACLF 两组间比较, } t_{\text{Treg}}=17.423, t_{\text{CD8}^+\text{T}}=-10.082, \text{均 } P<0.01.$

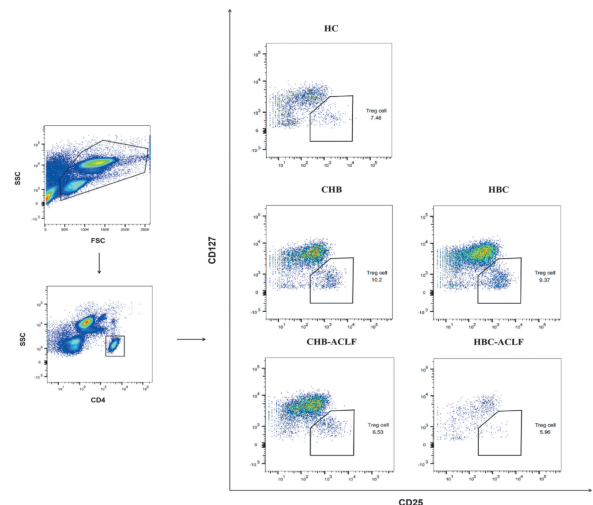


图 1 流式细胞术检测不同类型 HBV-ACLF 患者外周血 Treg 细胞水平  
Fig. 1 Detection of Treg cells in peripheral blood of patients with different types of HBV-ACLF by flow cytometry

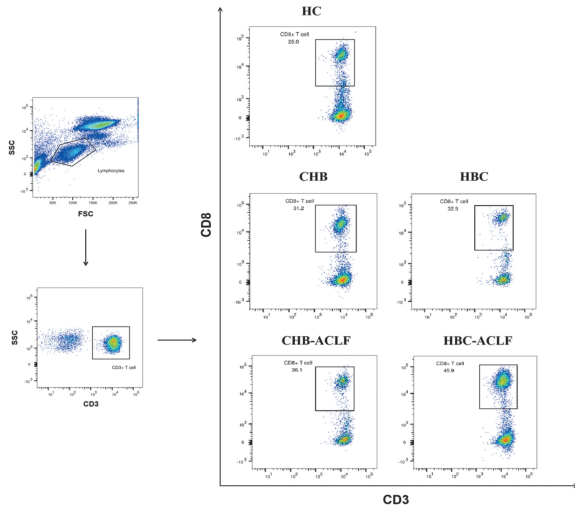


图2 流式细胞术检测不同类型HBV-ACLF患者外周血CD8<sup>+</sup>T细胞水平  
Fig. 2 Detection of CD8<sup>+</sup>T cells in peripheral blood of patients with different types of HBV-ACLF by flow cytometry

### 3 不同类型HBV-ACLF患者外周血Treg和CD8<sup>+</sup>T相关细胞因子水平比较

HC、CHB、HBC、CHB-ACLF和HBC-ACLF 5组患者比较,外周血TGF-β、IL-10、Perforin和Granzyme B水平差异具有统计学意义(均 $P < 0.01$ );与CHB组相比,CHB-ACLF组TGF-β和IL-10水平显著降低,Perforin和Granzyme B水平显著增高(均 $P < 0.01$ );与HBC组相比,HBC-ACLF组TGF-β和IL-10水平显著降低,Perforin和Granzyme B水平显著增高( $P < 0.05$ )(表3)。

表3 不同类型ACLF患者外周血Treg及CD8<sup>+</sup>T相关细胞因子水平  
Table 3 Levels of Treg and CD8<sup>+</sup>T-related cytokines in peripheral blood of patients with different types of HBV-ACLF

组别 Group	TGF-β (ng/mL)	IL-10 (pg/mL)	Perforin (pg/mL)	Granzyme B (pg/mL)
HC	15.22±3.22	3.38±1.15	54.32±13.84	26.81±4.49
CHB	70.25±11.58	6.03±1.40	69.65±11.95	37.51±3.71
HBC	75.19±15.54	5.85±0.74	60.10±9.21	41.61±5.06
CHB-ACLF	51.57±10.35	3.28±1.05	71.91±13.10	97.53±8.93
HBC-ACLF	46.84±7.80	4.24±1.22	74.21±12.51	88.89±9.61

注:a)5组间比较, $t_{TGF-β} = 129.138$ , $t_{IL-10} = 54.789$ , $t_{Perforin} = 16.287$ , $t_{Granzyme B} = 825.061$ ,均 $P < 0.01$ 。b)CHB和CHB-ACLF两组间比较, $t_{TGF-β} = 7.984$ , $t_{IL-10} = 10.406$ , $t_{Perforin} = -0.850$ , $t_{Granzyme B} = -40.561$ ,均 $P < 0.01$ 。c)HBC和HBC-ACLF两组间比较, $t_{TGF-β} = 11.402$ , $t_{IL-10} = 7.699$ , $t_{Perforin} = -6.301$ , $t_{Granzyme B} = -29.534$ ,均 $P < 0.01$ 。

### 4 HBV和ACLF患者Treg及其细胞因子与CD8<sup>+</sup>T及其细胞因子的相关性

Person相关性分析显示,HBV-ACLF患者外周血Treg与CD8<sup>+</sup>T细胞水平成中等负相关,相关性强度为中等程度( $r = -0.587$ , $P < 0.05$ )。TGF-β与Perforin成负相关,相关性强度为弱相关( $r = -0.239$ , $P < 0.05$ );与Granzyme B成负相关,相关性强度为强相关( $r = -0.677$ , $P < 0.05$ )。IL-10与

Perforin成负相关,相关性强度为弱相关( $r = -0.241$ , $P < 0.05$ );与Granzyme B成负相关,相关性强度为强相关( $r = -0.679$ , $P < 0.05$ )(图3)。

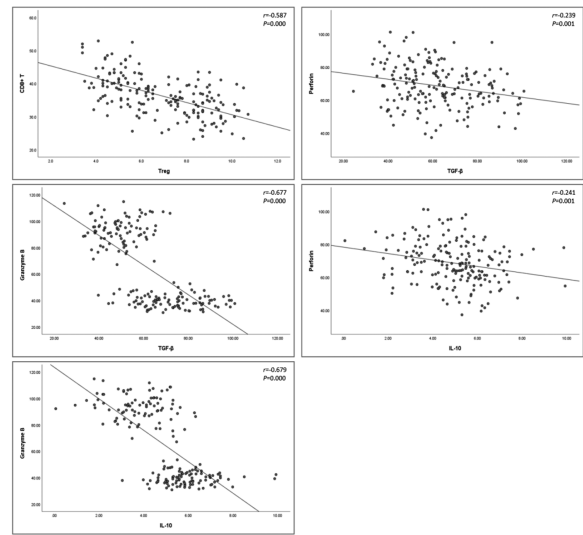


图3 HBV及ACLF患者外周血Treg和CD8<sup>+</sup>T及其细胞因子相关性

Fig. 3 Correlation between Treg, CD8<sup>+</sup>T and cytokines in peripheral blood of patients with HBV and ACLF

### 5 HBV和ACLF患者Treg、CD8<sup>+</sup>T及其细胞因子与肝功指标的相关性

HBV和ACLF患者外周血Treg、CD8<sup>+</sup>T及其相关细胞因子与各肝功指标的相关性分析显示,CD8<sup>+</sup>T细胞及其相关细胞因子与各肝功指标成正相关,Treg及其细胞因子与各肝功指标成负相关(均 $P < 0.05$ )。其中,Granzyme B水平与各肝功指标的正相关强度最大( $r > 0.7$ ),Treg细胞水平与各肝功指标负相关强度最大( $r < 0.7$ )(图4)。

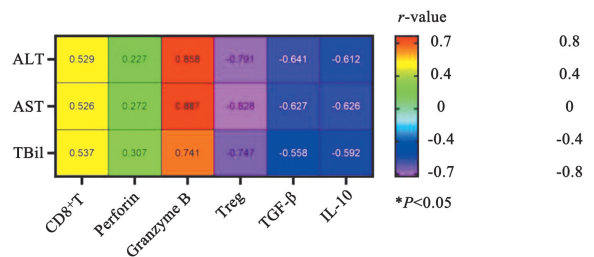


图4 Treg、CD8<sup>+</sup>T细胞及其细胞因子与肝功指标的相关性  
Fig. 4 Correlation between Treg, CD8<sup>+</sup>T cells and their cytokines and liver function indexes

## 讨论

ACLF是一种具有严重且复杂临床症候的肝脏系统疾病。目前,东西方国家所阐释的ACLF疾病的发病机制不同,主要是因为不同国家和地区间ACLF的疾病基础存在差异<sup>[8]</sup>。在亚太国家和地区,ACLF的

疾病基础主要是 HBV 感染。Li 等<sup>[9]</sup>的研究表明, HBV 再激活是 HBV-ACLF 发病的关键原因。作为人体最大的实质性脏器,肝脏是一个区域免疫器官<sup>[10]</sup>,多种固有和适应性免疫细胞如 M $\phi$ 、DC 和 T 细胞等均参与 ACLF 的疾病进程<sup>[11]</sup>。已有研究证实,在 HBV 感染患者中,具有特异性杀伤作用的 CD8<sup>+</sup> T 细胞可介导机体对 HBV 的清除,而 Treg 则负责对炎症反应的控制和调节,两种细胞水平及功能可调控肝脏炎症平衡,在 HBV 感染和 ACLF 发生中具有重要作用<sup>[6,12]</sup>。

在研究 HBV 的发病机制中发现,机体针对 HBV 产生的特异性 CD8<sup>+</sup> T 细胞在清除 HBV 的同时产生的自身免疫病理损伤对正常肝组织结构的影响不容忽视<sup>[13]</sup>。随着 HBV 的持续性复制,部分非特异性淋巴细胞会在肝脏组织内浸润,导致肝脏器官纤维化与炎症反应加重<sup>[14]</sup>。有研究指出,高水平 HBV 病毒载量可能诱导和加重细胞免疫功能紊乱<sup>[15]</sup>,特别是 CD8<sup>+</sup> T 细胞过度活化会导致肝脏炎症反应过强,这与 HBC 的发生、发展有着重要关系<sup>[16]</sup>。本研究中与 CHB 患者相比,CHB-ACLF 患者 CD8<sup>+</sup> T 细胞水平显著上升,在 HBC 与 HBC-ACLF 患者中也存在相同的变化,提示可能在 HBV-ACLF 发生时由于肝脏 HBV 病毒载量的升高,诱发了机体促炎反应的增强。在感染性疾病中,Treg 受各种炎症和代谢因子的调节,可分泌抗炎细胞因子以及通过细胞接触依赖方式发挥抑制功能,从而平衡机体的炎症反应,发挥抗炎功能,以实现机体的免疫平衡和稳态<sup>[17]</sup>。本研究中 CHB-ACLF 与 CHB 患者相比,外周血 Treg 细胞水平显著下降,在 HBC 与 HBC-ACLF 患者中也存在类似变化。提示 HBV-ACLF 发生时 Treg 对肝脏炎症反应抑制作用减弱,从而间接促进了肝脏炎症反应。此外,与 CHB 患者相比,CHB-ACLF 患者循环中 Treg 相关细胞因子 TGF- $\beta$  和 IL-10 水平也显著降低,而 CD8<sup>+</sup> T 细胞相关细胞因子 Perforin 和 Granzyme B 显著升高,同样在 HBC 与 HBC-ACLF 患者中也存在细胞因子水平的类似变化。已有研究表明,在慢性 HBV 感染者中,TGF- $\beta$  和 IL-10 表达水平均显著升高,主要是由于 CHB 患者机体 Treg 水平的增高<sup>[18]</sup>。在病毒感染中,Perforin 和 Granzyme B 主要是由激活的 CD8<sup>+</sup> T 细胞分泌<sup>[19-20]</sup>,因此推测在 HBV-ACLF 中 Treg 和 CD8<sup>+</sup> T 细胞功能因子的减少可能是由于细胞水平的降低导致的。相关性分析显示,Treg 与 CD8<sup>+</sup> T 细胞水平存在负性相关关系,同时 Treg 相关细胞因子 TGF- $\beta$  和 IL-10 水平与 CD8<sup>+</sup> T 细胞相关细胞因子 Perforin 和 Granzyme B 亦存在负性相关关系。Luan 等<sup>[21]</sup>的研究提示 Treg 在 ACLF 疾病中具有抗炎作

用。因此认为,Treg 通过抑制 CD8<sup>+</sup> T 细胞的增殖及功能发挥,或可起到抑制肝脏炎症并进行免疫调节的作用。分析 Treg 和 CD8<sup>+</sup> T 细胞及其细胞因子与各肝功指标的关系,Treg 及其细胞因子与各肝功指标成负相关,而 CD8<sup>+</sup> T 细胞及其细胞因子与各肝功指标是成正相关。值得肯定的是,在 ACLF 中患者,ALT、AST 及 TBil 等肝功指标伴随疾病的加重而分泌增加<sup>[22-23]</sup>,提示 Treg 水平与功能与疾病严重程度成负相关。而 CD8<sup>+</sup> T 细胞水平与功能与疾病严重程度成正相关,Treg 的免疫抑制功能与 CD8<sup>+</sup> T 细胞的特异性杀伤功能的平衡在 ACLF 的发病中具有关键作用,并推测在 CHB 和 HBC 向 ACLF 进展过程中,Treg 和 CD8<sup>+</sup> T 细胞水平与功能的急剧改变可能介导 ACLF 疾病的发生。

综上所述,依据 ACLF 疾病基础的差异,本研究通过分析不同类型 HBV-ACLF 中 Treg 和 CD8<sup>+</sup> T 细胞及其相关细胞因子的变化特点,发现无论在 CHB-ACLF 还是 HBV-ACLF 中都有 Treg 数量和功能下降和 CD8<sup>+</sup> T 细胞及其相关细胞因子升高,在 HBV 感染的 ACLF 发生中可能存在 Treg 对 CD8<sup>+</sup> T 细胞抑制作用减弱,加重了肝衰竭发生。因此认为在 ACLF 发生早期,上调 Treg 细胞及功能可能会通过缓解肝脏组织炎症反应减缓 ACLF 疾病进程,为以扭转 Treg/CD8<sup>+</sup> T 细胞及其功能失衡作为治疗 HBV-ACLF 靶点的探索提供了实验依据,为 ACLF 的临床精准治疗提供了新的研究方向。

#### 【参考文献】

- [1] 中华医学会感染病学分会肝衰竭与人工肝学组,中华医学会肝病学分会重型肝病与人工肝学组.肝衰竭诊治指南(2018年版)[J].临床肝胆病杂志,2019,35(1):38-44.
- [2] 张辉,贾雷,姚士伟,等. MELD-Na 评分对我国 HBV 相关慢加急性肝衰竭短期预后预测价值的 Meta 分析[J].临床肝胆病杂志,2018,34(9):1950-1955.
- [3] 钱建丹,赵鸿,王贵强.慢性乙型肝炎肝纤维化/肝硬化的治疗现状[J].临床肝胆病杂志,2021,37(12):2909-2913.
- [4] Moreau R, Gao B, Papp M, et al. Acute-on-chronic liver failure: A distinct clinical syndrome[J]. J Hepatol, 2021(75):S27-S35.
- [5] Zhang SW, Gang XK, Yang S, et al. The alterations in and the role of the Th17/Treg balance in metabolic diseases [J]. Front Immunol, 2021(12):678355.
- [6] 李彦霖,杨雪亮,刘小静,等.免疫细胞在慢加急性肝衰竭中的调控作用[J].中国肝病杂志,2020,12(2):42-46.
- [7] 常乐,张鑫,张彦萍,等.慢加急性肝衰竭患者外周血 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞功能障碍与程序性死亡受体 1 表达的关系[J].中华肝病杂志,2021,29(11):1101-1105.
- [8] 王福生,张政,吴娟,等.慢加急性肝衰竭的定义与临床诊断:东西方的异同[J].中华肝病杂志,2014,22(7):481-483.
- [9] Li J, Liang X, Jiang J, et al. PBMC transcriptomics identifies immune-metabolism disorder during the development of HBV-

- ACLF[J]. Gut, 2022, 71(1):163-175.
- [10] Wang QX, Ma X. Liver: a unique immune organ[J]. Chinese J Hepatol, 2021, 29(6):497-499.
- [11] 王鑫, 张国民, 牛兴杰, 等. 外周血 CD14+CD16+单核细胞亚群在肝衰竭继发感染患者中的检测价值[J]. 中国免疫学杂志, 2020, 36(9):1124-1127, 1130.
- [12] 曾丹, 王卫政. Th17 和 Treg 细胞在慢加急性乙型肝炎肝衰竭患者外周血中的表达及临床价值[J]. 肝脏, 2020, 25(4):419-422.
- [13] Hoh A, Heeg M, Ni Y, et al. Hepatitis B virus-infected HepG2hNTCP cells serve as a novel immunological tool to analyze the antiviral efficacy of CD8<sup>+</sup> T cells *in vitro* [J]. J Virol, 2015, 89(14):7433-7438.
- [14] Sun T, Zhang J. ETV4 mediates the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway through transcriptional activation of ANXA2 to promote hepatitis B virus-associated liver hepatocellular carcinoma progression[J]. J Biochem, 2021, 170(5):663-673.
- [15] 李妍淳, 张宏, 胡志东. 乙型肝炎病毒基因型检测的临床价值探讨[J]. 中国病原生物学杂志, 2019, 14(7):844-847.
- [16] Zhang Z, Shi B, Lu W, et al. Quantitative HBcAg and HBcAb versus HBsAg and HBV DNA in predicting liver fibrosis levels of chronic hepatitis B patients [J]. Gastroenterología y Hepatología, 2020, 43(9):526-536.
- [17] 张改君, 龙细雨, 靳露露, 等. Treg/Th7 平衡与脓毒症的关系研究进展[J]. 中国免疫学杂志, 2021, 37(19):2411-2415.
- [18] 杨勇卫, 陈锡莲, 曲人亮, 等. 慢性 HBV 感染者 Th17/Treg 细胞因子、VEGF、GP73 表达水平差异与临床意义研究[J]. 国际医药卫生导报, 2021, 27(23):3639-3643.
- [19] Liu R, Kong W, Deng M, et al. Association between hepatitis B virus infection and colorectal liver metastasis: a meta-analysis [J]. Bioengineered, 2021, 12(1):736-744.
- [20] 唐建华, 陈富强, 孙晓军, 等. 乙肝患者血清 lncRNA NEAT1 表达与 HBV-DNA 载量、肝功及 T 淋巴细胞亚群的相关性[J]. 中国病原生物学杂志, 2021, 16(5):582-585, 589.
- [21] Luan YL, Kong XN, Feng Y. Mesenchymal stem cells therapy for acute liver failure: Recent advances and future perspectives [J]. Liver Res, 2021, 5(2):53-61.
- [22] Yuan HX, Su JR, Zhang QY, et al. Characterization of the clinical features in HBV-related acute-on-chronic liver failure[J]. Altern Ther Health Med, 2022, 28(2):65-69.
- [23] Xue R, Zhu Y, Liu H, et al. The clinical parameters for the diagnosis of hepatitis B virus related acute-on-chronic liver failure with sepsis[J]. Sci Rep, 2019, 9(1):2558.

【收稿日期】 2022-01-18 【修回日期】 2022-03-22

(上接 525 页)

- [10] Zhou X, Wang W, Cui F, et al. Extracellular vesicles derived from *Echinococcus granulosus* hydatid cyst fluid from patients: isolation, characterization and evaluation of immunomodulatory functions on T cells[J]. Intern J Parasitol, 2019, 49(null):1029-1037.
- [11] 王慧. 棘球蚴囊液蛋白质组学及主要分泌蛋白对宿主免疫调节的影响[D]. 乌鲁木齐:新疆医科大学, 2015.
- [12] Rigano R, Buttari B, Profumo E, et al. *Echinococcus granulosus* antigen B impairs human dendritic cell differentiation and polarizes immature dendritic cell maturation towards a Th2 cell response[J]. Infect Immun, 2007, 75(4):1667-1678.
- [13] Bailey CC, Kondur HR, Huang I, et al. Interferon-induced transmembrane protein 3 is a type II transmembrane protein[J]. J Biol Chem, 2013, 288(45):32184-32193.
- [14] Bailey CC, Zhong G, Huang I, et al. IFITM-Family Proteins: The Cell's First Line of Antiviral Defense[J]. Annu Rev Virol, 2014, 1(1):261-283.
- [15] Rajamanickam A, Munisankar S, Bhootra Y, et al. Elevated systemic and parasite-antigen stimulated levels of type III IFNs in a Chronic helminth infection and reversal following anthelmintic treatment[J]. Front Immunol, 2018, 9(9):2353.
- [16] 马远林, 吕芳丽. I 型干扰素在原虫感染中的作用[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2018, 36(4):399-404.
- [17] Lima TS, Lodoen MB. Mechanisms of human innate immune evasion by *Toxoplasma gondii* [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2019, 9(9):103.
- [18] He X, Xia L, Tumas KC, et al. Type I interferons and malaria: a double-edge sword against a complex parasitic disease[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2020(10):594621.
- [19] Affinass N, Zhang HW, Lohning M, et al. Manipulation of the balance between Th2 and Th2/1 hybrid cells affects parasite nematode fitness in mice[J]. Eur J Immunol, 2018, 48(12):1958-1964.

【收稿日期】 2022-01-18 【修回日期】 2022-03-20