滤泡辅助性 T 细胞相关表达分子在慢性乙型肝炎患者中的表达及意义

梁淑慧 黄燕晓 朱 晔 时 光 庞志宇 黎家希 周迎春

摘要 目的 探讨慢性乙型肝炎(CHB)患者外周血 Tfh 细胞相关表达分子 CXCR5、CXCL13、IL-21 和 TGF- β 2 的表达水平,分析其在 CHB 发生、发展中的作用。**方法** 选取 2018 年 10 月~2019 年 3 月广州中医药大学第一附属医院收治的 CHB 患者 50 例,再选取同期健康体检人员 30 例作为对照组,采用 ELISA 法检测两组受试者外周血中 CXCR5、CXCL13、IL-21 和 TGF- β 2 的表达水平,荧光定量 PCR 检测 HBV DNA,化学发光法检测 HBsAg、HBeAg,酶速率法检测 AST 和 ALT 等指标。**结果** CHB 患者组 CXCR5、CXCL13、IL-21 和 TGF- β 2 表达明显高于健康对照组($P < 0.01$),但与 HBV DNA、HBsAg、AST、ALT 等之间无相关性($P > 0.05$)。CHB 患者中 HBeAg 阴性组 CXCR5、CXCL13、IL-21 和 TGF- β 2 的表达比 HBeAg 阳性组升高,差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** Tfh 细胞及其功能相关分子 IL-21 和 TGF- β 2 参与了 HBV 感染后相关的免疫应答反应,可以作为不同免疫状态下免疫损伤的预测指标。

关键词 慢性乙型肝炎 滤泡辅助性 T 细胞 IL-21 TGF- β 2

中图分类号 R512.6

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2020.11.015

Expression and Significance of Expression Molecule of T Follicular Helper Cells in Patients with Chronic Hepatitis B. Liang Shuhui, Huang Yanxiao, Zhu Ye, et al. The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangdong 510405, China

Abstract Objective To discuss the expression level of chronic-hepatitis-B-related expression molecule CXCR5, CXCL13, IL-21, and TGF- β 2 in peripheral blood of patients with chronic hepatitis B (CHB) and to analyze the function of expression molecule in the development of CHB. **Methods** The peripheral blood of 50 patients with CHB in The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine were chosen to be compared with the peripheral blood of 30 healthy individuals, controlled group, drawn from the physical examination. Expression levels of CXCR5, CXCL13, IL-21, and TGF- β 2 in peripheral blood of participating individuals were evaluated through ELISA. HBV DNA of the peripheral blood was tested through PCR. HBsAg and HBeAg were indicated through CLEIA. The levels of AST, ALT, etc. were accessed through continuous monitoring assay. **Results** The expression levels of CXCR5, CXCL14, IL-21, and TGF- β 2 in patients with CHB were significantly higher than the controlled group of healthy individuals ($P < 0.01$), but there was no critical correlation between expression levels and HBV DNA, HBsAg, AST, ALT, etc. ($P > 0.05$). The expression levels of CXCR5, CXCL13, IL-21, and TGF- β 2 in HBeAg negative group of patients with CHB were slightly higher than the expression levels of CXCR5, CXCL13, IL-21, and TGF- β 2 in HBeAg positive group of patients, but the difference of expression level in two groups had no statistical significance ($P > 0.05$). **Conclusion** Follicular helper T cells, IL-21, and TGF- β 2 are associated with the immune response of HBV infection. And they might be used as a predictor of immune damage in different immune states of patients with CHB.

Key words Chronic hepatitis B; T follicular helper cells; IL-21; TGF- β 2

滤泡辅助性 T 细胞(T follicular helper cells, Tfh)是一种高表达趋化因子受体 5(C-X-C chemokine receptor type5, CXCR5)的新型 CD4⁺ T 淋巴细胞亚

群,其在 B 淋巴细胞趋化因子(CXCL13)的趋化下使细胞定位于淋巴滤泡,进而对 B 淋巴细胞增殖、分化,诱发体液免疫和长寿命浆细胞的形成提供帮助。研究证实 Tfh 细胞过表达在自身免疫性疾病、免疫缺陷性疾病以及肿瘤的发生、发展有重要的关系^[1-3]。对于病毒感染性疾病,也有研究发现 Tfh 细胞与 CHB 患者的高球蛋白血症有关,也与 CHB 患者的免疫活性状态有关^[4,5]。本研究旨在探讨 CHB 患者外周血 Tfh 细胞相关表达分子 CXCR5、CXCL13、IL-21 和人

基金项目:广东省科技计划项目(2017ZC0142)

作者单位:510405 广州中医药大学第一附属医院检验科(梁淑慧、朱晔、庞志宇、黎家希、周迎春),治未病科(黄燕晓),普内科(时光)

通讯作者:梁淑慧,电子邮箱:liangsh_123@163.com

转化生长因子 $\beta 2$ (TGF - $\beta 2$) 的表达水平及其与病毒学、血清学和生化指标的关系,分析其在 CHB 发生、发展中的作用。

对象与方法

1. 研究对象:(1)选取 2018 年 10 月 ~ 2019 年 3 月笔者医院就诊的门诊或病房 CHB 患者共 50 例为患者组,其中男性 29 例,女性 21 例,患者年龄 20 ~ 65 岁,平均年龄 37.74 ± 11.63 岁,诊断符合慢性乙型肝炎诊断标准(2015 年版),同时排除合并甲、丙、丁、戊型等病毒性感染,以及药物性肝炎、酒精性肝炎、脂肪肝等其他肝炎。(2)选取来笔者医院体检中心做体检的健康人群共 30 例为对照组,其中男性 17 例,女性 13 例,年龄 20 ~ 60 岁,平均年龄 35.80 ± 12.42 岁,既往体健。

2. 方法:(1)所有入组对象均知情同意后留取空腹血 4ml,离心分离血清,置于 -70°C 冷藏待用。(2)采用 ELISA 定量检测试剂盒(上海一基实业有限公司)分别测定 CHB 患者组和对照组 CXCR5、CXCL13、IL - 21 和 TGF - $\beta 2$,严格按操作说明进行,在 ELX808 酶标仪(美国 BIO - RAD 公司)上比色,计算定量结果。(3)采用荧光定量 PCR 仪 Roche LightCycler 480(瑞士 Roche 公司)及其配套试剂测定 HBV DNA 载量。(4)采用全自动免疫分析仪 ARCHITECT i4000(美国 Abbott 公司)及其配套试剂测定 HBsAg 和 HBeAg, HBsAg $< 0.05\text{IU/ml}$ 判为阴性, HBeAg $\geq 1.0\text{S/CO}$ 值判为阳性。全自动生化分析仪 Cobas C 701(瑞士 Roche 公司)及其配套试剂测定 AST 和 ALT。

3. 统计学方法:应用 SPSS 22.0 统计学软件对数据进行统计分析,采用 Kolmogorov - Smirnov 检验检测数据正态性,符合正态分布的计量资料采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两样本组之间的比较采用 t 检验,用 Pearson 检验分析两变量的相关性,计数资料采用 χ^2 检验分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. CHB 组与对照组 HBV DNA、HBsAg、ALT 和 AST 等指标比较:CHB 组 HBV DNA、HBsAg 显著升高,对照组 HBV DNA 载量及 HBsAg 均为阴性。CHB 组 ALT、AST 较对照组升高,两者比较差异有统计学意义($P < 0.05$),详见表 1。

2. CHB 组与对照组外周血 Tfh 细胞相关表达分子分析:CHB 组 CXCL13、CXCR5、TGF - $\beta 2$ 和 IL - 21

表 1 两组 HBV DNA、HBsAg、ALT 和 AST 等指标比较($\bar{x} \pm s$)

项目	对照组	CHB 组
HBV DNA (log10)	-	4.94 ± 2.02
HBsAg (IU/ml)	-	13013.40 ± 26477.18
ALT (U/L)	14.77 ± 6.29	$91.48 \pm 105.42^*$
AST (U/L)	17.80 ± 4.33	$89.53 \pm 190.05^*$

与对照组比较, * $P < 0.05$

均明显高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),详见表 2。

表 2 两组外周血 CXCL13、CXCR5、TGF - $\beta 2$ 和 IL - 21 的比较($\bar{x} \pm s$)

项目	对照组	CHB 组
CXCL13 (ng/ml)	2.24 ± 0.75	$5.29 \pm 0.98^*$
CXCR5 (ng/ml)	2.64 ± 0.58	$5.37 \pm 0.64^*$
TGF - $\beta 2$ (pg/ml)	1642.76 ± 551.23	$5976.29 \pm 956.66^*$
IL - 21 (pg/ml)	208.73 ± 87.23	$2311.56 \pm 476.60^*$

与对照组比较, * $P < 0.05$

3. CHB 组 Tfh 细胞相关表达分子与临床指标的相关性分析:CHB 组的 CXCL13、CXCR5、TGF - $\beta 2$ 、IL - 21 与 HBV DNA、HBsAg、AST、ALT 之间均无相关性($P > 0.05$),详见表 3。

表 3 CHB 组 Tfh 细胞相关表达分子与临床指标的相关性

相关表达分子	临床指标	r	P
HBV DNA	CXCL13	-0.153	0.290
	CXCR5	0.114	0.431
	TGF - $\beta 2$	0.031	0.832
	IL - 21	0.017	0.907
HBsAg	CXCL13	-0.220	0.125
	CXCR5	-0.176	0.221
	TGF - $\beta 2$	0.358	0.011
	IL - 21	0.430	0.002
AST	CXCL13	-0.293	0.162
	CXCR5	0.095	0.518
	TGF - $\beta 2$	-0.293	0.756
	IL - 21	-0.432	0.718
ALT	CXCL13	-0.309	0.029
	CXCR5	0.077	0.597
	TGF - $\beta 2$	0.118	0.414
	IL - 21	0.109	0.451

4. HBeAg 阳性组与 HBeAg 阴性组 Tfh 细胞相关表达分子的表达差异:HBeAg 阳性组与 HBeAg 阴性组 CXCL13、CXCR5、TGF - $\beta 2$ 和 IL - 21 表达均明显

高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。HBeAg 阴性组的 CXCL13、CXCR5、TGF- β 2 和 IL-21 表达

均高于 HBeAg 阳性组,但差异无统计学意义($P > 0.05$),详见表 4。

表 4 HBeAg 阳性组与 HBeAg 阴性组 CXCL13、CXCR5、TGF- β 2、IL-21 表达的比较($\bar{x} \pm s$)

项目	对照组	HBeAg 阳性组	HBeAg 阴性组
CXCL13 (ng/ml)	2.24 $\pm$ 0.75	5.16 $\pm$ 1.17 *	5.32 $\pm$ 0.87 *
CXCR5 (ng/ml)	2.64 $\pm$ 0.58	5.31 $\pm$ 0.66 *	5.41 $\pm$ 0.62 *
TGF- β 2 (pg/ml)	1642.76 $\pm$ 551.23	5800.31 $\pm$ 1349.35 *	6065.38 $\pm$ 638.13 *
IL-21 (pg/ml)	208.73 $\pm$ 87.23	2295.39 $\pm$ 624.08 *	2311.39 $\pm$ 387.81 *

与对照组比较, * $P < 0.05$

讨 论

Tfh 细胞定位于淋巴滤泡生发中心,可持续的表达 CXCR5 和高水平的诱导性协同刺激分子(inducible costimulator, ICOS)及程序性死亡分子-1(programmed death 1, PD-1),产生效应因子 IL-21, B 细胞淋巴瘤转录因子-6(B cell lymphoma transcription factor-6, Bcl-6)是其分化发育的关键转录因子^[6,7]。效应 Tfh 细胞与高亲和力 B 细胞的相互作用促进了生发中心的形成和维持,促使 B 细胞增殖、抗体类别转换以及分化成为浆细胞和记忆性 B 细胞,导致某类高效价自身抗体的产生,机体体液免疫应答发生紊乱,因此, Tfh 细胞功能正常与否是决定机体抗体免疫应答发生的主要因素^[8-11]。

IL-21 是 Tfh 细胞执行效应功能的主要细胞因子。在人和小鼠中, IL-21 是诱导浆细胞分化的重要细胞因子,可诱导 B 细胞分化为免疫球蛋白分泌细胞分泌相应的免疫球蛋白^[12]。Tfh 细胞本身也表达 IL-21R, IL-21 可诱导 Tfh 细胞分化,促进其表面 CXCR5、ICOS 的表达。Tfh 及淋巴器官的其他细胞,如基质细胞、树突状细胞和 B 细胞本身都可以产生一定量的 TGF- β 2。TGF- β 2 协助 IL-21 促进初始 B 细胞增殖和分化。IL-21 促使 B 细胞发生 IgG 抗体类别转换,而 TGF- β 2 则协同 IL-21 发生 IgA 抗体类别转换。Tfh 及其细胞因子 IL-21 和 TGF- β 2 具有辅助 B 淋巴细胞增殖、成熟、发生抗体类别转换的作用^[13]。本研究主要检测了外周血中 Tfh 细胞的表面标志分子 CXCR5、CXCL13 以及效应因子 IL-21、TGF- β 2 的含量。

本研究发现, CHB 患者外周血中 CXCR5 和其配体 CXCL13 表达水平明显高于健康对照组,提示 HBV 感染人体后可引起 Tfh 细胞增殖,从而使外周血中 CXCR5、CXCL13 表达增加,并参与了 HBV 所介导的免疫反应。本研究中 CHB 组外周血中 Tfh 细胞分泌的细胞因子 IL-21 和 TGF- β 2 表达水平明显高于

健康对照组,表明 HBV 感染人体后引起 Tfh 细胞分泌 IL-21 增多,进一步诱导浆细胞的分化,分泌更多相应的免疫球蛋白,同时通过 Tfh 细胞自身表达的 IL-21R,也可诱导 Tfh 细胞分化,促进其表面 CXCR5、ICOS 的表达^[14]。TGF- β 是一种多功能的细胞因子,可以调节多种细胞的生长、分化及凋亡等,也可促进细胞外基质合成^[15]。TGF- β 可分为 TGF- β 1、TGF- β 2 和 TGF- β 3,有研究表明 TGF- β 2 有诱导晶状体上皮细胞凋亡、促进骨髓间充质干细胞成骨分化,辅助 B 淋巴细胞增殖,成熟,发生抗体类别转换等作用^[13,16,17]。本研究中 CHB 组外周血 TGF- β 2 表达水平明显增高,说明 HBV 感染人体后刺激机体细胞产生更多的 TGF- β 2,增多的 TGF- β 2 和 IL-21 协同作用促进初始 B 细胞增殖和分化,发挥机体免疫应答以及清除病毒的作用。

Hu 等^[14]研究发现, CHB 患者外周血 CD4⁺ CXCR5⁺ Tfh 细胞及 IL-21 的表达显著上调,并且与 ALT 和 AST 的水平呈正相关,但与 HBV-DNA 载量无相关性。李凤惠等^[18]研究发现, CHB 组 Tfh 细胞百分比高于 HBV 携带者。外周血 CD4⁺ CXCR5⁺ Tfh 占 CD4⁺ T 淋巴细胞的比例与 HBV DNA 载量呈负相关。也有研究发现 CHB 患者不同免疫分期的 Tfh 表达比较差异无统计学意义, HBsAg、HBeAg、HBV DNA 水平与 CD4⁺ ICOS⁺ CXCR5⁺ 亦未发现相关性。可见对 CHB 患者 Tfh 细胞是否与肝脏炎症程度及病毒载量高低有关研究不一。本研究对 CHB 组的 HBsAg、HBV DNA、AST、ALT 水平均分别与 CXCL13、CXCR5、TGF- β 2 和 IL-21 进行相关分析,结果显示, IL-21、CXCR5、CXCL13 与 HBV DNA、HBsAg、AST、ALT、HBV DNA 之间均无明显相关性,与 Hu 等^[14]及王燕等^[19]的研究基本相似,提示在 CHB 患者中 Tfh 细胞参与机体免疫应答,但与 HBV DNA 量的多少无关。

本研究将 CHB 患者中 HBeAg 阳性者与 HBeAg

阴性者的 CXCR5、CXCL13、IL-21 和 TGF-β2 含量进行比较,结果显示 HBeAg 阳性组与 HBeAg 阴性组 CXCR5、CXCL13、IL-21 和 TGF-β2 表达均明显高于健康对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),而 HBeAg 阴性组的 CXCR5、CXCL13、IL-21 和 TGF-β2 表达均高于 HBeAg 阳性组,但两者比较差异无统计学意义。有研究发现在治疗中获得 HBeAg 血清学转换组的 IL-21 和 IL-17 水平显著增高。可能是免疫激活期肝脏炎症活动活跃时 Tfh 细胞的高表达,有利于启动自身体液免疫系统,诱导 B 细胞分泌抗体,从而帮助实现 HBeAg 的血清学转换,但本研究中患者个体基础情况差异大,存在不同程度的免疫失调,且接受的治疗可能不一致,两组比较差异无统计学意义,有待于扩大样本量进一步研究。

综上所述,本研究显示在 CHB 患者中,Tfh 细胞及其功能相关分子 IL-21 和 TGF-β2 参与了 HBV 感染后相关的免疫应答反应,可以作为不同免疫状态下免疫损伤的预测指标,为慢性乙型肝炎的免疫治疗提供新思路。

参考文献

- 1 Greisen SR, Rasmussen TK, Stengaard - Pedersen K, et al. Increased soluble programmed death - 1 (sPD - 1) is associated with disease activity and radiographic progression in early rheumatoid arthritis[J]. Scand J Rheumatol, 2014, 43(2): 101 - 108
- 2 赵珊,俞娟,张虹. SLE 患者外周血滤泡辅助性 T 细胞的检测及其临床意义[J]. 重庆医学, 2016, 45(5): 636 - 638
- 3 Shi W, Li X, Cha Z, et al. Dysregulation of circulating follicular helper T cells infiltration predicts breast cancer[J]. DNA Cell Biol, 2014, 33(6): 355 - 358
- 4 马志远,谢玉梅,王宇,等. 外周血 CD4⁺ CXCR5⁺ 滤泡辅助性 T 细胞与慢性乙型肝炎患者高球蛋白血症相关[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2013, 29(5): 515 - 521
- 5 Feng J, Lu L, Hua C, et al. High frequency of CD4⁺ CXCR5⁺ Tfh cells in patients with immune - active chronic hepatitis B[J]. PLoS One, 2011, 6(7): e21698
- 6 Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4 T cell

- populations[J]. Annu Rev Immunol, 2010, 28: 445 - 489
- 7 King C, Tangye SG, Mackay CR. T follicular helper (TFH) cells in normal and dysregulated immune responses[J]. Annu Rev Immunol, 2008, 26: 741 - 766
- 8 Kroenke MA, Eto D, Locci M, et al. Bcl6 and Maf cooperate to instruct human follicular helper CD4 T cell differentiation[J]. J Immunol, 2012, 188(8): 3734 - 3744
- 9 Takemori T, Kaji T, Takahashi Y, et al. Generation of memory B cells inside and outside germinal centers[J]. Eur J Immunol, 2014, 44(5): 1258 - 1264
- 10 Ma CS, Deenick EK, Batten M, et al. The origins, function, and regulation of T follicular helper cells[J]. J Exp Med, 2012, 209(7): 1241 - 1253
- 11 骆菲菲,储以微. TFH: 抗体免疫应答的真正辅助者[J]. 国际免疫学杂志, 2009, 32(6): 435 - 437
- 12 Ozaki K, Spolski R, Ettinger R, et al. Regulation of B cell differentiation and plasma cell generation by IL - 21, a novel inducer of Blimp - 1 and Bel - 6[J]. J Immunol, 2004, 173(9): 5361 - 5371
- 13 Junt T, Fink K, Forster R, et al. CXCR5 - dependent seeding of follicular niches by B and Th cells augments antiviral B cell responses [J]. J Immunol, 2005, 175(11): 7109 - 7116
- 14 Hu H, Wu X, Jin W, et al. Noncanonical NF - kappaB regulates inducible costimulator (ICOS) ligand expression and T follicular helper cell development[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108(31): 12827 - 12832
- 15 Travis MA, Sheppard D. TGF - beta activation and function in Immunity[J]. Annu Rev Immunol, 2014, 32: 51 - 82
- 16 常晓朋,陈涛,赵寅,等. 骨形态发生蛋白 2 和转化生长因子 β2 协同促进骨髓间充质干细胞成骨分化[J]. 中国组织工程研究, 2019, 23(1): 1 - 6
- 17 景瑞花,齐甜甜,张明,等. TGF - β2 诱导晶状体上皮细胞凋亡的机制[J]. 西安交通大学学报: 医学版, 2019, 40(5): 728 - 731
- 18 李凤惠,吕洪敏,王芳,等. 慢性 HBV 感染者外周血 CXCR5⁺ CD4⁺ Tfh 细胞的测定及其与 FoxP3⁺ Treg 细胞的相关性[J]. 世界华人消化杂志, 2012, 20(13): 1100 - 1106
- 19 王燕,黄友英,马燕,等. 慢性乙型肝炎患者外周血中滤泡辅助性 T 淋巴细胞的表达特征[J]. 临床肝胆病杂志, 2018, 34(1): 58 - 62

(收稿日期: 2020 - 05 - 25)

(修回日期: 2020 - 06 - 15)

关于审稿专家及作者提供银行卡号的启事

应上级单位财务要求,稿费及审稿费发放必须完整、准确提供收款人姓名、身份证号码、单位、银行卡号、开户行行号(12 位数字,建设银行不必提供)、开户行支行名称、手机号,否则无法正常发放,请审稿专家和作者及时登录医学研究杂志稿件处理系统(www.yxyjzz.cn),自行填写相关信息,或者通过电话、邮件告知编辑部。联系电话:010 - 52328694、52328692。电子信箱:yxyjzz@ imicams. ac. cn。如未进行银行卡号登记则无法发放稿费及审稿费。特此告知。

《医学研究杂志》编辑部