

慢性乙型肝炎患者滤泡辅助性 T 细胞相关表达分子与自身抗体的表达分析

梁淑慧 黄燕晓 李 翠 孙六娜 邓日辉 黄 惠 周迎春

摘 要 **目的** 探讨慢性乙型肝炎(CHB)患者外周血滤泡辅助性 T 细胞(Tfh)相关表达分子 CXCR5、CXCL13、IL-21 和 TGF- β_2 的表达水平,观察自身抗体出现的频率,分析其关联性。**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,间接免疫荧光法检测 ANA、LKM 抗体、LC1 抗体、ASMA 和 AMA 等自身抗体的效价,ANA 同时区分核型。**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($P < 0.01$),自身抗体阳性率也明显高于健康对照组($P < 0.05$),ANA 阳性荧光核型表现为核颗粒型 7 例,胞质颗粒型 1 例,胞质纤维型 1 例和 1 例混合核型(核仁型和核颗粒型),ASMA 阳性率为 6%,未检出 AMA 抗体、LC1 抗体和 LKM 抗体。CHB 患者自身抗体阳性组的 CXCL13、CXCR5、TGF- β_2 和 IL-21 表达与阴性组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** Tfh 细胞相关表达分子 CXCL13、CXCR5、TGF- β_2 和 IL-21 在 CHB 患者中高表达,CHB 患者体内存在明显自身免疫紊乱现象,但 CHB 患者体内自身抗体的出现与 CXCL13、CXCR5、TGF- β_2 和 IL-21 的关联性并不强,有待于更深入研究。

关键词 慢性乙型肝炎 滤泡辅助性 T 细胞 IL-21 TGF- β_2 自身抗体

中图分类号 R5 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2021.05.012

Analysis of Follicular Helper T Cell Related Expression Molecules and Autoantibodies in Patients with Chronic Hepatitis B. Liang Shuhui, Huang Yanxiao, Li Cui, et al. The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangdong 510405, China

Abstract **Objective** Investigate the expression levels of CXCR5, CXCL13, IL-21 and TGF- β_2 related expression molecules of peripheral blood Tfh cells in patients with chronic hepatitis B (CHB) and to analyze their correlation with autoantibodies. **Methods** Fifty CHB patients admitted to the First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine from October 2018 to March 2019 were selected. 30 healthy medical examiners during the same period were selected as the control group. The expression levels of CXCR5, CXCL13, IL-21 and TGF- β_2 were detected by ELISA method, and the titer of autoantibodies such as ANA, LKM, LC1, ASMA, AMA, and etc. are obtained by indirect immunofluorescence method. ANA are also distinguished karyotypes. **Results** The expression of CXCR5, CXCL13, IL-21 and TGF- β_2 in the CHB patient group was significantly higher than that of the healthy control group ($P < 0.01$), and the positive rate of autoantibodies was also significantly higher than that of the healthy control group ($P < 0.05$). Under ANA positive fluorescent karyotype, six cases of nuclear granular type and one case of cytoplasmic particle type, one case of cytoplasmic fiber type and one case of mixed karyotype (nuclear type and nuclear granular type) were present. The positive rate of ASMA was 6%, which had no AMA, LC1 and LKM presenting. CXCL13 and CXCR5 in the CHB patients' autoantibody positive group were slightly higher than the negative group, and IL-21 was slightly lower than the negative group. The differences of CXCL13, CXCR5, and IL-21 were not statistically significant ($P > 0.05$). **Conclusion** Tfh cells expression molecules CXCL13, CXCR5, TGF- β_2 and IL-21 were highly expressed in CHB patients. There were obvious autoimmune disorders in CHB patients. The correlation between the appearance of autoantibodies in CHB patients and the expression molecules of Tfh cells CXCL13, CXCR5, TGF- β_2 and IL-21 was not strong enough which requires further study.

Key words Chronic hepatitis B; Follicular helper T cells; IL-21; TGF- β_2 ; Autoantibodies

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、李翠、孙六娜、邓日辉、黄惠、周迎春);510405 广州中医药大学第一附属医院治未病科(黄燕晓)

通讯作者:梁淑慧,电子信箱:liangsh_123@163.com

CD4⁺T 细胞是机体免疫系统发挥免疫应答功能的主要效应细胞之一,滤泡辅助性 T 细胞(T follicular helper cells, Tfh)是 CD4⁺T 细胞近年发现的又一新亚群,主要对 B 细胞诱发体液免疫和长寿命浆细胞的形成提供帮助。Tfh 细胞定位于淋巴滤泡生发中心,可持续的表达趋化因子受体 5(CXCR5)和高水平的诱导性协同刺激分子(ICOS)及程序性死亡分子-1(PD-1),产生效应因子 IL-21、B-淋巴细胞趋化因子(CXCL13)是其分化发育的关键转录因子^[1]。人转化生长因子 β_2 (TGF- β_2)能协助 IL-21 促进初始 B 细胞增殖和分化。已经有研究发现,Tfh 细胞及其相关表达分子在 RA 和 SLE 等自身免疫性疾病的发生、发展中有重要关系^[2-4]。慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)除有肝脏免疫病理损伤外,还存在由自身免疫反应引起的免疫损伤,其共同导致包括肝和肝外组织在内的机体免疫损伤,且与乙肝的临床类型、进程、病程相关,但具体的自身免疫应答机制未明^[5]。本研究主要探讨 CHB 患者外周血中 Tfh 细胞相关表达分子 CXCR5、CXCL13、IL-21 和 TGF- β_2 的表达水平,并观察 CHB 患者自身抗体出现的频率,分析其关联性。

对象与方法

1. 研究对象:(1)选取 2018 年 10 月~2019 年 3 月于笔者医院就诊的门诊或病房 CHB 患者共 50 例,其中男性 29 例,女性 21 例,患者年龄 20~65 岁,平均年龄为 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、自身免疫性肝病等其他肝炎。(2)选取来笔者医院体检中心做体检的健康人群共 30 例,其中男性 17 例,女性 13 例,年龄 20~60 岁,平均年龄为 35.80 ± 12.42 岁,既往体健,无肝脏、肾脏、胃、肠道疾病史,经实验室检测排除 HBV 感染和 ALT、AST 异常。

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℃ 冷冻保存待用。(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- β_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)采用间接免疫荧光法检测试剂盒[欧蒙医学诊断(中国)有限公司]分别测定 CHB 患者组和对照组 ANA、抗肝肾微粒体抗体(liver kidney mi-

croosomal antibody, LKM)、抗肝细胞溶质抗原 I 型(liver cytosolic 1, LC1)抗体、抗平滑肌抗体(anti-smooth muscle antibody, ASMA)和抗线粒体抗体(antimitochondrial antibody, AMA),Olympus 荧光显微镜下判断结果,ANA 同时区分核型。标本起始检测效价为 1:100,如细胞不显示特异性荧光,则判为阴性。如细胞显示特异性荧光模型,则继续做 1:320、1:1000 的稀释,至细胞不显示特异性荧光。

3. 统计学方法:采用 SPSS 22.0 统计学软件进行统计分析,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* 检验分析;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 组与对照组外周血 Tfh 细胞相关表达分子分析:CHB 组 CXCL13、CXCR5、TGF- β_2 和 IL-21 均明显高于对照组,两者比较差异有统计学意义($P < 0.05$),详见表 1。

表 1 CHB 组与对照组外周血 CXCL13、CXCR5、TGF- β_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- β_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, * $P < 0.05$

2. CHB 组与对照组外周血自身抗体测定:CHB 组自身抗体阳性率(26%)明显高于健康对照组(3.33%),差异有统计学意义($P < 0.05$),荧光强度以低效价(1:100)为主(占 76.9%)。ANA 阳性荧光核型表现为核颗粒型 7 例,胞质颗粒型 1 例,胞质纤维型 1 例和 1 例混合核型(核仁型和核颗粒型),对照组检测有 1 例 ANA 阳性,其荧光核型表现为核颗粒型(1:100)。CHB 组 ASMA 抗体阳性率为 6%,未检出 AMA 抗体、LC1 抗体和 LKM 抗体,对照组未检出此 4 种抗体,详见表 2。

3. CHB 患者自身抗体阳性者与阴性者 Tfh 细胞相关表达分子表达差异:对 13 例自身抗体阳性的 CHB 患者与其余 37 例自身抗体阴性的 CHB 患者的 CXCL13、CXCR5、TGF- β_2 和 IL-21 进行比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$),详见表 3。

表 2 CHB 组与对照组自身抗体结果比较[n(%)]

项目		对照组 (n = 30)	CHB 组 (n = 50)
阴性		29 (96.67)	37 (74.00)
ANA	1:100	1 (3.33)	7 (14.00)
	1:320	0 (0)	3 (6.00)
ASMA	1:100	0 (0)	3 (6.00)
AMA	1:100	0 (0)	0 (0)
LC1	1:100	0 (0)	0 (0)
LKM	1:100	0 (0)	0 (0)

$\chi^2 = 6.672, P = 0.010$

表 3 CHB 患者自身抗体阳性者与阴性者 Tfh 细胞相关表达分子的表达差异($\bar{x} \pm s$)

项目	自身抗体阳性组	自身抗体阴性组
CXCL13 (ng/ml)	5.43 ± 1.15	5.24 ± 0.91
CXCR5 (ng/ml)	5.67 ± 1.46	5.54 ± 1.73
TGF-β ₂ (pg/ml)	5975.60 ± 748.06	5974.02 ± 1042.84
IL-21 (pg/ml)	2247.87 ± 443.91	2320.56 ± 490.77

讨 论

目前认为,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^[6,7]。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]。在本研究中,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 HBV 所介导的免疫反应。Liu 等^[9]研究还发现,CXCL13 的水平与替比西林治疗期间 HBV 的免疫控制有关。CHB 患者组外周血中 IL-21 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,其能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,并促进其表面 CXCR5、ICOS 的表达^[10]。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^[11]。TGF-β 可分为 TGF-β₁、TGF-β₂ 和 TGF-β₃,有研究表明,TGF-β₂ 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 细胞增殖、成熟,发生抗体类别转换等作用^[12-14]。本研究中 CHB 组外周血 TGF-β₂ 表达水平也明显增高,显示 HBV 感染人体后能刺激机体细胞产生更多的 TGF-β₂,增多的 TGF-β₂ 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^[14]。

HBV 感染常伴随自身免疫表现和(或)自身免疫性疾病,患者体内出现自身抗体,从而可能引起肝外和肝内组织的免疫损伤,加重患者的临床表现。但目前报道的自身抗体出现的频率不一,检测到的自身抗体种类也不尽相同^[15-18]。本研究中 CHB 患者 ANA 的阳性率与 Li 等^[17]研究结果基本一致,ASMA 阳性率则略高于谭朝霞等^[18]的研究结果,其余 AMA、LC1 抗体和 LKM 抗体阳性率与其研究基本一致。CHB 组和对照组之间的自身抗体阳性率比较,差异有统计学意义,可见这些自身抗体的频率增加与 HBV 的慢性感染有关,患者体内免疫功能已出现紊乱。自身抗体总阳性率较 Acay 等^[15]和 Sener 等^[16]的研究结果略高,较 Li 等^[17]的研究结果低,可能与入组 CHD 患者所处的感染不同状态以及检测的自身抗体类型与数量不同有关。Li 等^[17]研究的 CHB 患者中抗 Ro52 抗体就有 28% 的阳性率,也有报道在干扰素等药物治疗后 CHB 患者体内自身抗体的检出率更高,而且自身抗体的检出率也有随病情发展而增高的趋势,与肝功能损害的程度及 HBV 病毒复制水平相关^[19-23]。

ANA 免疫荧光核型可分为多种,常见包括核均质型、核颗粒型、核仁型、核点型、核膜型、着丝点型、胞质颗粒型、胞质纤维型等,不同的核型对应的靶抗原不同。本研究 CHB 患者的核型表现以核颗粒型为主(70%),另有混合核型(核仁型和核颗粒型)占 10%,且荧光效价为 1:320,Sener 等^[16]的研究中荧光核型也以核仁型(37.5%)和核颗粒型(25%)为主。核仁型有随病情的衍变而增高的趋势,提示在慢性肝病衍变过程中自身免疫的变化可能多集中在与细胞增殖、分裂有关的核仁成分上^[18]。

本研究表明,CHB 患者体内存在自身免疫紊乱现象,其 Tfh 细胞相关表达分子 CXCL13、CXCR5、TGF-β₂ 和 IL-21 也明显高于对照组,因此对自身抗体阳性的 CHB 患者和自身抗体阴性的 CHB 患者的 CXCL13、CXCR5、TGF-β₂ 和 IL-21 分别进行比较分析,差异无统计学意义,表明本研究中 CHB 患者体内自身抗体的出现与 Tfh 细胞相关表达分子 CXCL13、CXCR5、TGF-β₂ 和 IL-21 的关联性并不强。但本研究只观察了 CHB 患者中 ANA、ASMA、AMA、LC1 抗体和 LKM 抗体等 6 种与肝脏疾病有较大关联的自身抗体,而且 CHB 患者中自身抗体阳性组只有 13 例,例数偏少,尚不能代表总体数据,有待于进一

步扩大样本量,同时观察其他更多种类的自身抗体进行深入地研究。

参考文献

- Nurieva RI, Chung Y, Martinez GJ, *et al.* Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells[J]. *Science*, 2009, 325(5943): 1001 – 1005
- 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
- Armas – González E, Domínguez – Luis MJ, Díaz – Martín A, *et al.* Role of CXCL13 and CCL20 in the recruitment of B cells to inflammatory foci in chronic arthritis[J]. *Arthritis Res Ther*, 2018, 20(1): 114
- 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
- 温先勇,林江,李宝林,等. 乙型肝炎患者的自身免疫损伤探讨[J]. *中国现代医学杂志*, 2015, 25(14): 46 – 49
- 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
- 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
- Ma CS, Deenick EK, Batten M, *et al.* The origins, function, and regulation of T follicular helper cells[J]. *J Expe Med*, 2012, 209(7): 1241 – 1253
- Liu C, Huang X, Werner M, *et al.* Elevated expression of chemokine CXCL13 in chronic hepatitis B patients links to immune control during antiviral therapy[J]. *Front Immunol*, 2017, 8: 323
- 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 Bcl – 6[J]. *J Immunol*, 2004, 173(9): 5361 – 5371
- Travis MA, Sheppard D. TGF – beta activation and function in Immunity[J]. *Annu Rev Immunol*, 2014, 32: 51 – 82
- 常晓朋,陈涛,赵寅,等. 骨形态发生蛋白 2 和转化生长因子

$\beta 2$ 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

- 景瑞花,齐甜甜,张明,等. TGF – $\beta 2$ 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
- 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
- Acay A, Demir K, Asik G, *et al.* Assessment of the frequency of autoantibodies in chronic viral hepatitis[J]. *Pak J Med Sc*, 2015, 31(1): 150 – 154
- Sener AG, Aydın N, Ceylan C, *et al.* Investigation of antinuclear antibodies in chronic hepatitis B patients[J]. *Mikrobiyol Bul*, 2018, 52(5): 425 – 430
- Li BA, Liu J, Hou J, *et al.* Autoantibodies in Chinese patients with chronic hepatitis B: prevalence and clinical associations[J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(1): 283 – 291
- 谭朝霞,唐玉兰,高燕,等. 自身抗体在乙型病毒性肝炎和自身免疫性肝炎中的特点分析[J]. *第三军医大学学报*, 2016, 38(15): 1762 – 1766
- 杨国敬. 干扰素治疗慢性乙型肝炎对血清自身抗体的影响[J]. *临床合理用药*, 2019, 1(12): 35 – 36
- Pop TL, Ștefănescu A, Samașca G, *et al.* Clinical significance of the antinuclear antibodies in chronic viral hepatitis B in children[J]. *Clin Lab*, 2014, 60(6): 931 – 939
- 王妙婵,徐爱芳,刘苑,等. 慢性乙肝进展过程中自身抗体检测的临床意义[J]. *中国卫生检验杂志*, 2015, 25(6): 852 – 859
- 王波,丁楠,常波,等. 乙型肝炎后肝硬化自身抗体检测及其对肝功能影响的研究[J]. *中国实验诊断学*, 2013, 17(11): 2022 – 2025
- 王云萍,张琳,赵华明,等. 慢性乙型肝炎患者相关自身抗体与血清乙型肝炎病毒 DNA 含量的相关性研究[J]. *山西医药杂志*, 2011, 40(5): 506 – 507

(收稿日期: 2020 – 11 – 21)

(修回日期: 2020 – 12 – 14)

(接第 70 页)

- Zhu DY, Song SR, Xie LJ, *et al.* Identification of mutations associated with coronary artery lesion susceptibility in Kawasaki disease by targeted enrichment of genomic region sequencing technique[J]. *Zhonghua ErKeZaZhi*, 2017, 55(7): 529 – 533
- Zha L, Li S, Liu X, *et al.* Association of miR – 146a gene polymorphism at loci rs2910164 G/C, rs57095329 A/G, and rs6864584 T/C with susceptibility to Kawasaki disease in Chinese children[J]. *Pediatr Cardiol*, 2019, 40(3): 504 – 512
- 陈秋月,肖纯. 髓过氧化物酶与动脉粥样硬化及冠心病关系的研究进展[J]. *山东医药*, 2017, 57(33): 104 – 106
- Panasenko OM, Gorudko IV, Sokolov AV. Hypochlorous acid as a precursor of free radicals in living systems[J]. *Biochemistry: Mosc*, 2013, 78(13): 1466 – 1489
- Shamova EV, Gorudko IV, Grigorieva DV, *et al.* The effect of myeloperoxidase isoforms on biophysical properties of red blood cells[J]. *Mol Cell Biochem*, 2020, 464(1 – 2): 119 – 130
- Khan AA, Alsahli MA, Rahmani AH. Myeloperoxidase as an active disease biomarker: recent biochemical and pathological perspectives

[J]. *Med Sci:Basel*, 2018, 6(2): 33

- Zhang R, Brennan ML, Fu X, *et al.* Association between myeloperoxidase levels and risk of coronary artery disease[J]. *JAMA*, 2001, 286(17): 2136 – 2142
- 彭宇,段焰,王智,等. 实验室常见指标对川崎病早期诊断的价值[J]. *重庆医学*, 2020, 49(1): 43 – 48
- 张娟,高雪红,马景,等. 实验室指标在儿童不典型川崎病早期诊断中的价值[J]. *新疆医学*, 2020, 50(4): 386 – 388
- Chu H, Wang M, Wang M, *et al.* The MPO – 463G > A polymorphism and cancer risk: a Meta – analysis based on 43 case – control studies[J]. *Mutagenesis*, 2010, 25(4): 389 – 395
- Yang WJ, Wang MY, Pan FZ, *et al.* Association between MPO – 463G > A polymorphism and cancer risk: evidence from 60 case – control studies[J]. *World J Surg Oncol*, 2017, 15(1): 144
- Yang JP, Wang WB, Yang XX, *et al.* The MPO – 463G > A polymorphism and lung cancer risk: a Meta – analysis based on 22 case – control studies[J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): 657 – 678

(收稿日期: 2020 – 11 – 21)

(修回日期: 2020 – 12 – 03)