

• 论 著 • DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2022.02.006

慢性乙型肝炎患者外周血 CD8⁺CD25⁺FoxP3⁺ 调节性 T 细胞比例的变化及临床意义^{*}

高夕雷¹, 赵广春^{2△}, 张雷鸣³, 于建秀²

1. 江苏省盐城市滨海县第二人民医院传染科, 江苏盐城 224500; 2. 江苏省盐城市滨海县人民医院检验科, 江苏盐城 224500; 3. 江苏省盐城市滨海县人民医院传染科, 江苏盐城 224500

摘 要:目的 探讨外周血 CD8⁺CD25⁺FoxP3⁺ 调节性 T 细胞(Treg)比例在慢性乙型肝炎(CHB)患者中的变化及临床意义。方法 选取 2018 年 3—11 月在滨海县第二人民医院传染科诊治的无症状乙型肝炎病毒(HBV)携带者 28 例为携带组, CHB 患者 28 例为 CHB 组。同时选取 28 例年龄、性别匹配的健康体检者作为对照组。采用流式细胞仪分析外周血 CD8⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg 比例。比较各组肝功能相关指标、HBV-DNA、外周血 CD8⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg 比例、外周血单个核细胞(PBMC)中叉头状转录因子 P3(FoxP3) mRNA 水平, 以及血清白细胞介素(IL)-10、IL-35、转化生长因子(TGF)-β1 水平。分析 CHB 患者外周血 CD8⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg 比例与肝功能相关指标、HBV-DNA、PBMC 中 FoxP3 mRNA 水平, 以及血清 IL-10、TGF-β1、IL-35 水平的相关性。结果 与对照组、携带组相比, CHB 组总胆红素(TBIL)、直接胆红素、丙氨酸氨基转移酶(ALT)和天门冬氨酸氨基转移酶水平均明显升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。与对照组相比, 携带组、CHB 组外周血 CD8⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg 比例、PBMC 中 FoxP3 mRNA 水平及血清 IL-10、TGF-β1、IL-35 水平均明显升高, 且 CHB 组均高于携带组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。CHB 患者外周血 CD8⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg 比例与 PBMC 中 FoxP3 mRNA 水平, 血清 IL-10、TGF-β1 及 IL-35 水平均呈正相关($r = 0.568, 0.537, 0.377, 0.484, P < 0.05$); CHB 患者外周血 CD8⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg 比例与 TBIL、HBV-DNA、ALT 水平呈正相关($r = 0.536, 0.570, 0.443, P < 0.05$)。结论 外周血 CD8⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg 比例升高可能在 CHB 患者疾病发展过程中发挥了重要作用。

关键词:慢性乙型肝炎; CD8⁺CD25⁺FoxP3⁺ 调节性 T 细胞; 白细胞介素-35

中图分类号: R512.6

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2022)02-0163-05

The change and clinical significance of CD8⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatory T cell ratio in peripheral blood of patients with chronic hepatitis B^{*}

GAO Xilei¹, ZHAO Guangchun^{2△}, ZHANG Leiming³, YU Jianxiu²

1. Department of Infectious Diseases, Binhai County Second People's Hospital, Yancheng, Jiangsu 224500, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Binhai County People's Hospital, Yancheng, Jiangsu 224500, China; 3. Department of Infectious Diseases, Binhai County People's Hospital, Yancheng, Jiangsu 224500, China

Abstract: **Objective** To investigate the change and clinical significance of CD8⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatory T cell (Treg) ratio in peripheral blood of patients with chronic hepatitis B (CHB). **Methods** Selected 28 asymptomatic hepatitis B virus (HBV) carriers who were diagnosed and treated in the Department of Infectious Diseases, Binhai County Second People's Hospital from March to November 2018 as the carrier group, and 28 patients with CHB as the CHB group. At the same time, 28 age and sex matched healthy subjects underwent physical examination were selected as the control group. The CD8⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg ratio in peripheral blood was analyzed by flow cytometry. Compared the liver function-related indicators, HBV-DNA, the peripheral blood CD8⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg ratio, the forkhead transcription factor P3 (FoxP3) mRNA level in peripheral blood mononuclear cells (PBMC), and serum interleukin (IL)-10, IL-35, transforming growth factor (TGF)-β1 levels. Analyzed the correlation between the CD8⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg ratio in peripheral blood of CHB patients and liver function-related indicators, HBV-DNA, FoxP3 mRNA level in PBMC, and serum IL-

^{*} 基金项目: 江苏省盐城市医学科技发展项目(YK2017064)。

作者简介: 高夕雷, 男, 副主任技师, 主要从事传染病的临床研究。△ 通信作者, E-mail: 18961911998@163.com。

本文引用格式: 高夕雷, 赵广春, 张雷鸣, 等. 慢性乙型肝炎患者外周血 CD8⁺CD25⁺FoxP3⁺ 调节性 T 细胞比例的变化及临床意义[J]. 检验医学与临床, 2022, 19(2): 163-167.

10, TGF- β 1, and IL-35 levels. **Results** Compared with the control group and carrier group, the total bilirubin (TBIL), direct bilirubin, alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase levels in the CHB group were significantly increased, the differences were statistically significant ($P < 0.05$). Compared with the control group, the peripheral blood CD8⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg ratio, FoxP3 mRNA level in PBMC and serum IL-10, TGF- β 1 and IL-35 levels in the carrier group and CHB group increased significantly, and those in the CHB group were higher than the carrier group, the differences were statistically significant ($P < 0.05$). Peripheral blood CD8⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg ratio in CHB patients correlated positively with FoxP3 mRNA level in PBMC, serum IL-10, TGF- β 1 and IL-35 levels ($r = 0.568, 0.537, 0.377, 0.484, P < 0.05$). Peripheral blood CD8⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg ratio in CHB patients correlated positively with the levels of TBIL, HBV-DNA and ALT ($r = 0.536, 0.570, 0.443, P < 0.05$). **Conclusion** The increased CD8⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg ratio in peripheral blood of CHB patients may play an important role in the development of the disease.

Key words: chronic hepatitis B; CD8⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatory T cell; interleukin-35

慢性乙型肝炎病毒(HBV)感染是全球面临的严重公共卫生问题之一。据估计,在 2.57 亿慢性 HBV 感染者中,约 30% 患有慢性乙型肝炎(CHB)和存在病毒复制,部分患者可发生急性和慢性肝功能衰竭或发展为肝硬化和肝细胞癌^[1]。CHB 是 HBV 复制与宿主免疫系统相互作用的结果,CHB 患者全身免疫耐受导致 HBV 持续慢性感染^[2]。研究表明,CD8⁺CD25⁺FoxP3⁺调节性 T 细胞(Treg)是维持免疫抑制的核心细胞,可通过抑制机体抗病毒免疫应答参与疾病发生、发展过程^[3-4],其在感染性疾病(如结核病和丙型肝炎等)、自身免疫性疾病(如系统性红斑狼疮和多发性硬化症等)和肿瘤等疾病的发生、发展过程中发挥重要作用^[5],但 CD8⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg 在 HBV 感染患者疾病进展中的作用尚不明确。本研究通过检测 CHB 患者外周血 CD8⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg 比例,并分析其与血清细胞因子的相关性,以探讨其在 CHB 疾病进展中的作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2018 年 3—11 月在滨海县第二人民医院传染科诊治的无症状 HBV 携带者 28 例为携带组,CHB 患者 28 例为 CHB 组。同时选取 28 例年龄、性别匹配的健康体检者作为对照组。CHB 的诊断参照《慢性乙型肝炎防治指南(2015 更新版)》^[6]。纳入标准:至少 1 年未接受过核苷酸类似物、干扰素或免疫调节药物的治疗。排除标准:急性乙型肝炎、其他肝炎病毒感染、人类免疫缺陷病毒感染、酒精性肝炎、脂肪肝、自身免疫性疾病或肿瘤。各组研究对象年龄、性别比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

1.2 仪器与试剂 异硫氰酸荧光素(FITC)鼠抗人-CD3 单克隆抗体(mAb)、叶绿素蛋白偶联物(PerCP-cy5.5)鼠抗人-CD8 mAb、别藻青蛋白(APC)鼠抗人-CD25 mAb、藻红蛋白(PE)鼠抗人-叉头状转录因子 P3(FoxP3) mAb 及同型对照、红细胞裂解液及流式细胞仪均购自美国 BD 公司;血清细胞因子白细胞介素(IL)-10、IL-35 和转化生长因子(TGF)- β 1 检测试

剂盒购自美国 Bio-Rad 公司;cDNA 反转录试剂盒及 ABI 7300 实时荧光定量 PCR 分析仪购自美国 ABI 公司;Trizol 试剂购自美国 Invitrogen 公司;Ficoll-HyPaque 分离液购自上海恒信试剂有限公司;AU2700 全自动生化分析仪及配套试剂购自日本奥林巴斯公司;Luminex 200 流式荧光检测仪购自美国 Luminex 公司。

表 1 各组一般资料比较

组别	<i>n</i>	年龄($\bar{x} \pm s$, 岁)	男/女(<i>n/n</i>)
CHB 组	28	38.7 $\pm$ 3.0	14/14
携带组	28	37.9 $\pm$ 3.2	13/15
对照组	28	37.2 $\pm$ 2.8	15/13
<i>F</i> / χ^2		1.747	0.285
<i>P</i>		0.181	0.867

1.3 方法

1.3.1 肝功能相关指标及 HBV-DNA 检测 采集 3 组研究对象外周血 4 mL 置于分离胶管,离心,收集上层血清用于检测。采用奥林巴斯 AU2700 全自动生化分析仪检测总胆红素(TBIL)、直接胆红素(DBIL)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)和天门冬氨酸氨基转移酶(AST)水平。采用 ABI 7300 实时荧光定量 PCR 分析仪检测 HBV-DNA 水平。

1.3.2 外周血 CD8⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg 比例检测 采用流式细胞仪进行检测。具体步骤如下,取肝素抗凝静脉血 100 μ L,加入 FITC 鼠抗人-CD3 mAb、PerCP-cy5.5 鼠抗人-CD8 mAb、APC-鼠抗人 CD25 mAb 及同型对照各 10 μ L,避光孵育 30 min。加红细胞裂解液 1 mL 破坏红细胞,经磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤,离心弃上清液。每管加入 250 μ L 1 $\times$ Fix/Perm buffer 涡旋约 3 s,避光孵育 40 min,加入 300 μ L 1 $\times$ Perm/wash buffer 洗涤,离心弃上清液。用 100 μ L Perm/wash buffer 重悬细胞,加入 10 μ L PE 鼠抗人-FoxP3 mAb,室温避光孵育 40 min,洗涤离心,弃上清液。最后加入 400 μ L PBS 重悬细胞,上机检测。以淋巴细胞设门,先分选 CD3⁺CD8⁺T 细胞,再分选

CD8⁺CD25⁺T 细胞,最终分析 CD8⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg 占外周血淋巴细胞的比例。

1.3.3 RNA 提取及 RT-PCR 检测 FoxP3 mRNA

采集 3 组研究对象外周血置于肝素钠抗凝管中,用等量 Hank's 液稀释全血;取 10 mL 玻璃管 3 支,每管加 3 mL 比重为 1.007 的淋巴细胞分离液 (Ficoll-HyPaque 分离液),然后将稀释的全血 6 mL 慢慢加在分离液面上,液层界面不能打乱。2 000 r/min 离心 20 min,离心后液体分为 3 层,上中下层分别为血浆和 Hank's 液、淋巴细胞分离液、粒细胞和红细胞,在上层与中层交界处,有 1 层白膜即为目标细胞。毛细吸管慢慢插入白膜层,轻轻抽吸外周血单个核细胞 (PBMC),放入另一管中,再加 10 mL Hank's 液,1 500 r/min 离心 10 min,离心 3 次,洗去抗凝物质、血小板和分离介质。用 Trizol 试剂提取总 RNA。用 cDNA 反转录试剂盒进行 cDNA 合成,用 QuantiTect SYBR Green PCR 试剂盒进行扩增。引物序列: FoxP3 上游引物 5'-CACAACATGCGACCCCTTTCACC-3';下游引物 5'-AGGTTGTGGCGGATGGCGTTCTTC-3'; β -actin 上游引物 5'-TGGCACCCAGCACAATGAA-3',下游引物 5'-CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA-3'。热循环条件:95

℃ 15 min,95 ℃ 15 s,40 个循环,72 ℃ 30 s。根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算标本中 FoxP3 mRNA 相对表达水平。

1.3.4 血清细胞因子水平检测 采用 Luminex 液相芯片检测血清细胞因子水平。采集研究对象外周血 3 mL,1 500 r/min 离心 5 min,收集血清,储存于 -80 ℃ 冰箱,避免反复冻融。按试剂盒说明书检测 IL-10、IL-35 和 TGF- β 1 水平,每份标本检测两次,结果取均值。

1.4 统计学处理 采用 Grapd prism7.0 软件进行数据分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,多组间两两比较采用 LSD-*t* 检验;不符合正态分布的计量资料以 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示,多组间比较采用 Kruskal-Wallis *H* 检验;计数资料以例数或率表示,组间比较采用 χ^2 检验。采用 Spearman 相关进行相关性分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 3 组肝功能相关指标及 HBV-DNA 水平比较 CHB 组 ALT、AST、TBIL、DBIL 水平均高于携带组与对照组,HBV-DNA 水平高于携带组,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 3 组肝功能相关指标及 HBV-DNA 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	ALT(U/L)	AST(U/L)	TBIL(μ mol/L)	DBIL(μ mol/L)	HBV-DNA
CHB 组	28	172.1 $\pm$ 44.6 ^{*Δ}	92.1 $\pm$ 23.4 ^{*Δ}	98.3 $\pm$ 35.7 ^{*Δ}	57.4 $\pm$ 15.3 ^{*Δ}	7.6 $\pm$ 2.1 Δ
携带组	28	32.7 $\pm$ 8.6	23.7 $\pm$ 5.4	12.6 $\pm$ 2.3	5.8 $\pm$ 1.6	5.1 $\pm$ 1.2
对照组	28	30.8 $\pm$ 7.1	22.2 $\pm$ 3.6	11.7 $\pm$ 2.8	5.5 $\pm$ 1.3	—
<i>F</i>		261.0	227.1	161.4	314.6	5.7
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:—表示无数据;与携带组比较, $\Delta P < 0.05$;与对照组比较,^{*} $P < 0.05$;HBV-DNA 水平为实际值取 log10。

2.2 3 组外周血 CD8⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg 比例及 PBMC 中 FoxP3 mRNA 水平比较 与对照组相比,携带组、CHB 组外周血 CD8⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg 比例及 PBMC 中 FoxP3 mRNA 水平均明显升高,且 CHB 组均高于携带组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 3 组外周血 CD8⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg 比例及 PBMC 中 FoxP3 mRNA 水平比较

组别	<i>n</i>	CD8 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ Treg 比例 [$M(P_{25}, P_{75})$, %]	FoxP3 mRNA ($\bar{x} \pm s$)
CHB 组	28	4.22(2.31, 6.15) ^{*Δ}	0.83 $\pm$ 0.37 ^{*Δ}
携带组	28	2.64(1.12, 3.11) [*]	0.64 $\pm$ 0.31 [*]
对照组	28	1.56(0.83, 1.94)	0.52 $\pm$ 0.28
<i>H/F</i>		60.51	6.591
<i>P</i>		<0.001	0.002

注:与携带组比较, $\Delta P < 0.05$;与对照组比较,^{*} $P < 0.05$ 。

2.3 CHB 患者外周血 CD8⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg 比例与 PBMC 中 FoxP3 mRNA 水平的相关性 CHB 患者外周血 CD8⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg 比例与 PBMC 中 FoxP3 mRNA 水平呈正相关 ($r = 0.568$, $P < 0.05$)。见图 1。

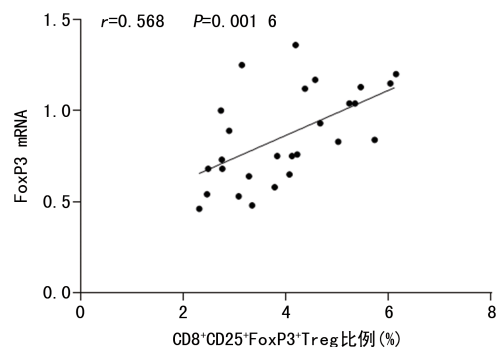


图 1 CHB 患者外周血 CD8⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg 比例与 PBMC 中 FoxP3 mRNA 水平的相关性分析

2.4 3 组血清细胞因子水平比较 与对照组相比,

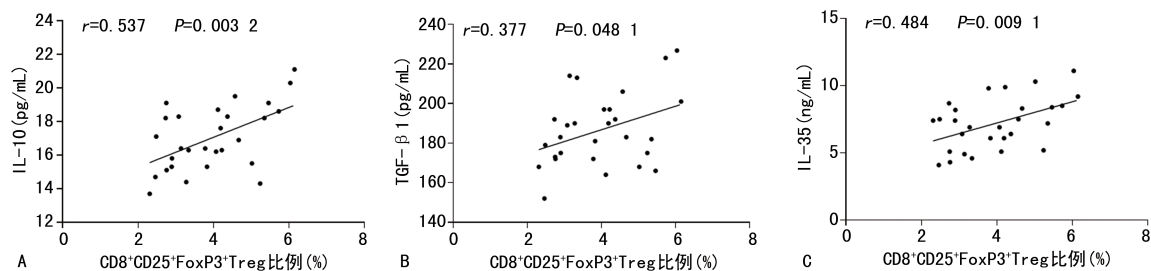
CHB 组和携带组血清 IL-10、TGF- β 1 和 IL-35 水平明显升高,且 CHB 组高于携带组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 3 组血清细胞因子水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	IL-10(pg/mL)	TGF- β 1(pg/mL)	IL-35(ng/mL)
CHB 组	28	17.4 $\pm$ 3.7 $^{*\Delta}$	189.4 $\pm$ 37.4 $^{*\Delta}$	7.6 $\pm$ 3.5 $^{*\Delta}$
携带组	28	13.6 $\pm$ 3.1 *	124.1 $\pm$ 30.1 *	5.2 $\pm$ 2.3 *
对照组	28	7.3 $\pm$ 2.5	92.3 $\pm$ 24.9	3.4 $\pm$ 1.2

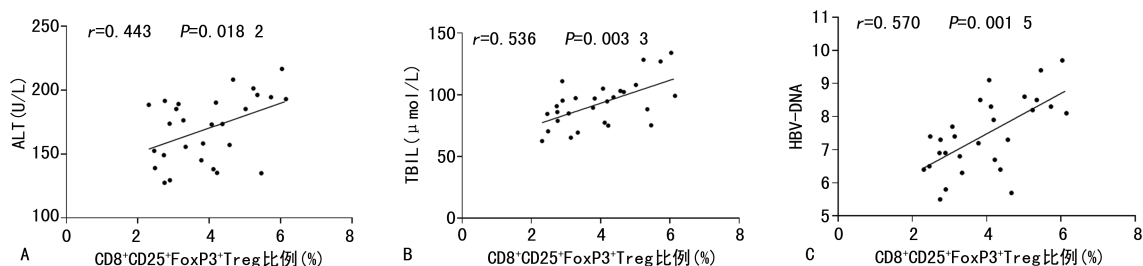
注:与携带组比较, $\Delta P < 0.05$;与对照组比较, $^* P < 0.05$ 。

2.5 CHB 患者外周血 CD8 $^{+}$ CD25 $^{+}$ FoxP3 $^{+}$ Treg 比



注:A 为外周血 CD8 $^{+}$ CD25 $^{+}$ FoxP3 $^{+}$ Treg 比例与血清 IL-10 水平的相关性分析;B 为外周血 CD8 $^{+}$ CD25 $^{+}$ FoxP3 $^{+}$ Treg 比例与血清 TGF- β 1 水平的相关性分析;C 为外周血 CD8 $^{+}$ CD25 $^{+}$ FoxP3 $^{+}$ Treg 比例与血清 IL-35 水平的相关性分析。

图 2 CHB 患者外周血 CD8 $^{+}$ CD25 $^{+}$ FoxP3 $^{+}$ Treg 比例与血清细胞因子水平的相关性分析



注:A 为外周血 CD8 $^{+}$ CD25 $^{+}$ FoxP3 $^{+}$ Treg 比例与 ALT 水平的相关性分析;B 为外周血 CD8 $^{+}$ CD25 $^{+}$ FoxP3 $^{+}$ Treg 比例与 TBIL 水平的相关性分析;C 为外周血 CD8 $^{+}$ CD25 $^{+}$ FoxP3 $^{+}$ Treg 比例与 HBV-DNA 水平的相关性分析;HBV-DNA 水平为实际值取 log10。

图 3 CHB 患者外周血 CD8 $^{+}$ CD25 $^{+}$ FoxP3 $^{+}$ Treg 比例与 TBIL、HBV-DNA、ALT 水平的相关性分析

3 讨 论

HBV 感染慢性化的机制主要与机体免疫应答能力低下有关,抑制性 T 细胞受体、免疫调节细胞和细胞因子等多种免疫抑制因子参与 CHB 患者的免疫应答降低,另一方面,抗病毒 T 细胞缺失或凋亡导致机体抗病毒免疫功能下降^[1]。T 细胞根据功能和表面标志物不同可分为 Treg、细胞毒性 T 细胞和辅助性 T 细胞等,其中 Treg 属于免疫调节细胞,可以通过抑制树突状细胞和自然杀伤细胞(NK 细胞)等多种免疫细胞的增殖和功能来调节免疫反应^[7]。Treg 根据表面标志物不同分为 CD4 $^{+}$ Treg 和 CD8 $^{+}$ Treg 两种主要细胞亚型,两者有相似的免疫抑制功能。较多研究证实 CHB 患者 CD4 $^{+}$ Treg 明显增多^[1-2,8],导致患者体内形成免疫抑制微环境,从而参与 CHB 的免疫耐受过程。

CD8 $^{+}$ CD25 $^{+}$ FoxP3 $^{+}$ Treg 可降低机体对病原体的免疫应答能力,从而防止机体因对病原体产生免疫应答而引起组织损伤,同时,这也导致了病原体的免

疫与血清细胞因子水平的相关性 CHB 患者外周血 CD8 $^{+}$ CD25 $^{+}$ FoxP3 $^{+}$ Treg 比例与血清 IL-10、TGF- β 1 及 IL-35 水平均呈正相关($r = 0.537, 0.377, 0.484, P < 0.05$)。见图 2。

2.6 CHB 患者外周血 CD8 $^{+}$ CD25 $^{+}$ FoxP3 $^{+}$ Treg 比例与肝功能相关指标及 HBV-DNA 水平的相关性 CHB 患者外周血 CD8 $^{+}$ CD25 $^{+}$ FoxP3 $^{+}$ Treg 比例与 TBIL、HBV-DNA、ALT 水平呈正相关($r = 0.536, 0.570, 0.443, P < 0.05$);与 DBIL、AST 水平无相关性($r = 0.302, 0.343, P > 0.05$)。见图 3。

疫逃逸。结核分枝杆菌感染患者外周血 CD8 $^{+}$ CD25 $^{+}$ FoxP3 $^{+}$ Treg 在结核分枝杆菌增殖过程中处于较高水平,能够抑制辅助性 T 细胞的增殖^[9]。本研究发现,CHB 患者外周血 CD8 $^{+}$ CD25 $^{+}$ FoxP3 $^{+}$ Treg 比例明显升高。FoxP3 是 Treg 的关键转录因子,FoxP3 表达对 Treg 发育和功能的发挥起着关键作用。本研究发现,CHB 组患者 PBMC 中 FoxP3 mRNA 水平明显升高,且与外周血 CD8 $^{+}$ CD25 $^{+}$ FoxP3 $^{+}$ Treg 比例呈正相关($r = 0.568, P < 0.05$)。此外,CHB 患者外周血 CD8 $^{+}$ CD25 $^{+}$ FoxP3 $^{+}$ Treg 比例与 TBIL、HBV-DNA、ALT 水平也呈正相关($r = 0.536, 0.570, 0.443, P < 0.05$)。

CD8 $^{+}$ CD25 $^{+}$ FoxP3 $^{+}$ Treg 可通过释放可溶性细胞因子发挥免疫抑制作用^[5,10]。TGF- β 1 是一种多功能细胞因子,可抑制免疫细胞的增殖、分化和激活,在调节病毒复制和宿主对病原体的反应中起双重作用。TGF- β 1 通过刺激 Treg 的分化诱导针对 HBV 抗原的免疫耐受,在肝癌和肝硬化发生、发展中发挥重要

作用。有研究表明, TGF- β 1 可以通过调节肝细胞中微小 RNA 的表达改变肝细胞功能, 并下调 NK 细胞中 NKG2D/DAP10 和 2B4/SAP 的表达, 从而介导 HBV 持续感染^[11]。本研究也发现, CHB 组血清 TGF- β 1 水平明显高于携带组与对照组, 且与外周血 CD8⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg 比例呈正相关($r=0.377$, $P<0.05$)。IL-35 是一种新发现的细胞因子, 属于 IL-12 家族, 是 Treg 分泌的主要效应细胞因子之一, 具有诱导免疫耐受的作用。在病毒感染性疾病中, 如甲型流感病毒感染可导致 PBMC 中 IL-35 的表达增加^[12]。IL-35 在慢性丙型肝炎病毒感染中具有免疫抑制作用, 在维持病毒持续性感染和抑制炎症反应方面发挥着相反的作用^[13]。本研究发现, 与对照组相比, CHB 组血清 IL-35 水平明显升高, 与 ZHOU 等^[14]的研究结果一致。此外, 本研究还发现血清 IL-35 水平与外周血 CD8⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg 比例呈正相关($r=0.484$, $P<0.05$)。IL-10 是重要的免疫调节细胞因子, 具有抑制免疫应答的能力, 对肝脏疾病的预后具有重要影响^[15]。研究表明, IL-10 参与 HBV 感染的免疫耐受过程, 导致机体对 HBV 的免疫应答能力降低^[16]。IL-10 通过抑制宿主的抗 HBV 活性, 使 HBV 在体内持续复制和表达。IL-10 水平的升高与 HBV 表达水平和肝脏炎症程度相关^[17]。本研究发现, CHB 组血清 IL-10 水平明显高于携带组及对照组, 并与外周血 CD8⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg 比例呈正相关($r=0.537$, $P<0.05$)。

综上所述, CHB 患者外周血 CD8⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg 比例升高, 并与 HBV 感染过程中 Treg 相关免疫抑制细胞因子(IL-10、TGF- β 1、IL-35)、肝功能相关指标(TBL、ALT)及 HBV-DNA 呈正相关。外周血 CD8⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg 可能通过抑制机体对 HBV 的特异性免疫应答, 造成机体的免疫反应低下, 从而导致 HBV 感染的持续存在。因此, 调控 CHB 患者外周血 CD8⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg 比例, 可能是防治乙型肝炎慢性化的新途径。

参考文献

- [1] ROADE L, RIVEIRO-BARCIELA M, ESTEBAN R, et al. Long-term efficacy and safety of nucleos(t)ides analogues in patients with chronic hepatitis B[J]. *Ther Adv Infect Dis*, 2021, 8: 204-209.
- [2] ZHAO H J, HAN Q J, WANG G, et al. Poly I:C-based rHBVvac therapeutic vaccine eliminates HBV via generation of HBV-specific CD8⁺ effector memory T cells[J]. *Gut*, 2019, 68(11): 2032-2043.
- [3] CHOI Y S, LEE J, LEE H W, et al. Liver injury in acute hepatitis A is associated with decreased frequency of regulatory T cells caused by fas-mediated apoptosis[J]. *Gut*, 2015, 64(8): 1303-1313.
- [4] TSAI Y G, LEE C Y, LIN T Y, et al. CD8⁺Treg cells associated with decreasing disease activity after intravenous

- methyprednisolone pulse therapy in lupus nephritis with heavy proteinuria[J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e81344.
- [5] VIEYRA-LOBATO M R, VELA-OJEDA J, MONTIEL-CERVANTES L, et al. Description of CD8⁺ regulatory T lymphocytes and their specific intervention in graft-versus-host and infectious diseases, autoimmunity, and cancer[J]. *J Immunol Res*, 2018, 2018: 3758713.
- [6] 中华医学会肝病学分会, 中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2015 更新版)[J]. *中华肝脏病杂志*, 2015, 23(12): 888-905.
- [7] OHL K, TENBROCK K. Regulatory T cells in systemic lupus erythematosus[J]. *Eur J Immunol*, 2015, 45(2): 344-355.
- [8] LIU B, GAO W, ZHANG L, et al. Th17/Treg imbalance and increased interleukin-21 are associated with liver injury in patients with chronic severe hepatitis B[J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 46: 48-55.
- [9] BOER M C, PRINS C, VAN MEIJGAARDEN K E, et al. Mycobacterium bovis BCG vaccination induces divergent proinflammatory or regulatory T cell responses in adults[J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2015, 22(7): 778-788.
- [10] LANGHANS B, NISCHALKE H D, KRÄMER B, et al. Role of regulatory T cells and checkpoint inhibition in hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2019, 68(12): 2055-2066.
- [11] PARK S O, KUMAR M, GUPTA S. TGF- β and iron differently alter HBV replication in human hepatocytes through TGF- β /BMP signaling and cellular microRNA expression[J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): e39276.
- [12] WANG L, ZHU S, XU G, et al. Gene expression and antiviral activity of interleukin-35 in response to influenza A virus infection[J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(32): 16863-16876.
- [13] LIU S, ZHANG Q, SHAO X, et al. An immunosuppressive function of interleukin-35 in chronic hepatitis C virus infection[J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 50: 87-94.
- [14] ZHOU Y, ZHANG H, LI Y. IL-35 expression in peripheral blood CD4(+) T cells from chronic hepatitis B virus-infected patients directly correlates with virus load[J]. *Cytokine*, 2015, 73(1): 169-175.
- [15] RYBICKA M, WOZIOWDZKA A, SZNARKOWSKA A, et al. Genetic variation in IL-10 influences the progression of hepatitis B infection[J]. *Int J Infect Dis*, 2020, 96: 260-265.
- [16] QIN S K, LI Q, MING X J, et al. Icaritin-induced immunomodulatory efficacy in advanced hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: immunodynamic biomarkers and overall survival[J]. *Cancer Sci*, 2020, 111(11): 4218-4231.
- [17] WU J F, WU T C, CHEN C H, et al. Serum levels of interleukin-10 and interleukin-12 predict early, spontaneous hepatitis B virus e antigen seroconversion[J]. *Gastroenterology*, 2010, 138(1): 165-172.