

B/C 基因型的乙型肝炎病毒在不同丙氨酸氨基转移酶状态下对 Th17、Treg 细胞及其比率的影响

高 鹏¹, 刘燕玲¹, 李俊峰², 姚立琼^{1△}

(兰州大学第一医院 1. 医学检验中心, 2. 传染科, 兰州 730000)

[关键词] 乙肝; 基因型; 丙氨酸氨基转移酶; Th17 细胞; Treg 细胞

[中图分类号] R512.62 [文献标志码] A [文章编号] 1671-167X(2026)03-0674-04

doi:10.19723/j.issn.1671-167X.2026.03.031

患者感染乙型肝炎病毒后可处于不同的免疫状态,临床上通常根据丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)及感染者症状及体征将其分为乙型肝炎携带者和乙型肝炎患者,前者 ALT 多正常,后者 ALT 多为正常上限 2 倍及以上^[1-2]。乙型肝炎病毒分为许多亚型,在我国以 B 型和 C 型居多,相对于 B 型, C 型乙型肝炎更容易进展为肝硬化和肝癌^[3]。机体免疫功能失衡在乙型肝炎发生发展中是重要的环节,乙型肝炎患者 Th17、Treg 细胞及其比率的变化是目前研究的热点之一^[4-5]。本研究探讨 B/C 基因型的乙型肝炎病毒在不同 ALT 状态下对 Th17、Treg 细胞及其比率的影响,从免疫学角度进一步阐明临床以 ALT 分组诊治患者的理论意义。

1 资料与方法

1.1 病例选择

选择 2023 年 1 月至 12 月在兰州大学第一医院确诊为乙型肝炎的患者的病例资料进行回顾性分析,共入选患者 220 例,男 162 例,女 58 例,年龄 18~60 岁。同时排除急性乙型肝炎患者、中度和重度脂肪肝患者、酒精肝患者、自身免疫性肝损伤患者、药物性肝损伤患者、曾经接受过抗病毒治疗的患者、合并其他肝炎感染的患者,以及并发其他心血管、肾等重大脏器病变患者。本研究开始前已经兰州大学第一医院伦理委员会审查批准(LDYYL2023-346)。

1.2 仪器

荧光定量 PCR 分析仪购自德国 Lightcycler ROCH 公司,流式细胞仪(FACS Calibur)及配套试剂购自美国 BD 公司, AU400 型全自动生化分析仪购自日本 OLYMPUS 公司。

1.3 方法

1.3.1 乙肝病毒表面标志物的定量检测 采集患者空腹静脉血并分离血清,按罗氏 Cobas e 601 化学发光免疫分析仪的操作步骤进行定标及样本检测。

1.3.2 乙肝病毒 DNA 检测 采集患者空腹静脉血并分离血清,按乙肝病毒 DNA 定量检测试剂盒和基因扩增仪的操作步骤进行检测。

1.3.3 乙肝病毒基因型检测 采集患者空腹静脉血并分离血清,利用 ABI 377 基因分析测序仪进行基因型分析。

1.3.4 外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)的分离及培养 采集研究对象空腹外周血,肝素抗凝,以磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)等体积稀释后,应用聚蔗糖-泛影葡胺密度梯度离心法分离出外周血中单个核细胞,用含 10% (体积分数)标准胎牛血清的 RPMI1640 培养液重悬细胞得到 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 。向 PBMC 悬液加入佛波酯(12.5 mg/L)、离子霉素(0.25 g/L)、布雷菲德霉素 A(0.75 g/L)、莫能霉素(0.35 g/L)后于 37.0 °C 5% (体积分数) CO₂ 浓度培养箱中放置并培养 4 h。

1.3.5 外周血 Th17 细胞检测 取培养后的细胞悬液 100 μL ,加入 CD3 抗体 10 μL 和 CD8 抗体 10 μL 进行细胞表面染色,于 4 °C 避光孵育 30 min。加 300 μL PBS 洗涤,混匀低速离心 5 min(1 500 r/min)弃上清液,然后加入 100 μL 固定液固定洗涤,于 4 °C 避光孵育 30 min,接着加入 300 μL PBS,混匀低速离心 5 min(1 500 r/min)弃上清液,再加入 100 μL 破膜液进行破膜洗涤,接着加入 IL-17 抗体 10 μL 进行细胞内染色,于 4 °C 避光孵育 30 min,加入 300 μL PBS 洗涤,混匀低速离心 5 min(1 500 r/min)弃上清液。

基金项目:国家自然科学基金(81800528) Supported by the National Science Foundation of China(81800528)

△ Corresponding author's e-mail, 2533761325@qq.com

网络出版时间:2026-04-23 10:14:30 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4691.R.20260422.1812.004.html>

min)弃上清液,最后加入 PBS 300μL 混匀细胞。用流式细胞仪(美国 BD Biosciences 流式细胞仪)对 CD3⁺CD8⁻IL-17⁺T 细胞进行检测。

1.3.6 外周血 Treg 细胞检测 取培养后的细胞悬液 100 μL,加入 CD4 抗体 10 μL 和 CD25 抗体 10 μL,进行细胞表面染色,于 4 ℃避光孵育 30 min 后,加 300 μL PBS 洗涤,混匀低速离心 5 min(1 500 r/min)弃上清液,加 100 μL 固定液固定洗涤,于 4 ℃避光孵育 30 min 后加入 300 μL PBS,混匀低速离心 5 min(1 500 r/min)弃上清液,再加入 100 μL 破膜液进行破膜洗涤,加入 Foxp3 抗体 10 μL 进行细胞内染色,于 4 ℃避光孵育 30 min,加入 300 μL PBS 洗涤,混匀低速离心 5 min(1 500 r/min)弃上清液,最后加入 PBS 300 μL 混匀细胞。用流式细胞仪(美国 BD Biosciences 流式细胞仪)对 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T 细胞进行检测。

1.4 统计学分析

采用 SPSS26.0 软件,计量资料经正态性检验,符合正态分布,以均数 ± 标准差表示。两组间均数比较采用独立样本的 *t* 检验,两组变量密切程度的分析采用 Pearson 相关分析,双侧检验,*P* < 0.05 为

差异有统计学意义。

2 结果

2.1 总人群中 Th17、Treg 细胞及其比率与 ALT 值的相关性分析

总人群中 Th17、Treg 细胞及其比率与 ALT 值的相关性分析发现,随着 ALT 的升高,Th17、Treg 细胞及其比率均明显升高,ALT 与三者之间有明显的正向相关性,相关系数分别为 0.808、0.749、0.717,均具有统计学意义(*P* < 0.001)。

2.2 ALT 正常组中不同基因型的乙型肝炎病毒对 Th17、Treg 细胞及其比率的影响

在 ALT 正常组中不同基因型的乙型肝炎病毒对 Th17、Treg 细胞及其比率的影响差异无统计学意义(表 1)。

2.3 ALT 大于正常上限且小于正常上限 2 倍组中不同基因型的乙型肝炎病毒对 Th17、Treg 细胞及其比率的影响

ALT 大于正常上限且小于正常上限 2 倍组中不同基因型的乙型肝炎病毒对 Th17、Treg 细胞及其比率的影响差异无统计学意义(表 2)。

表 1 ALT 正常组中不同基因型的乙型肝炎病毒对 Th17、Treg 细胞及其比率的影响
Table 1 Effects of different genotypes hepatitis B virus (HBV) on Th17 and Treg cells and their ratios in the normal alanine aminotransferase (ALT) group

Items	B type	C type	<i>t</i>	<i>P</i>
<i>n</i>	35	38		
HBV DNA	5.097 ± 1.116	5.279 ± 1.299	-0.637	0.526
Th17/%	1.818 ± 0.112	1.832 ± 0.123	-0.491	0.625
Treg/%	4.865 ± 0.196	4.918 ± 0.168	-1.242	0.218
Th17/Treg	0.374 ± 0.026	0.373 ± 0.02	-0.206	0.837

n = 73.

表 2 ALT 高于正常上限且小于正常上限 2 倍组中,不同基因型的乙型肝炎病毒对 Th17、Treg 细胞及其比率的影响
Table 2 Effects of different genotypes hepatitis B virus (HBV) on Th17 and Treg cells and their ratios in the alanine aminotransferase (ALT) < 2 times the normal upper limit group (the ALT > normal upper limit)

Items	B type	C type	<i>t</i>	<i>P</i>
<i>n</i>	37	35		
HBV DNA	5.330 ± 1.139	5.247 ± 1.260	0.290	0.773
Th17/%	2.560 ± 0.347	2.525 ± 0.348	0.426	0.671
Treg/%	5.501 ± 0.404	5.513 ± 0.356	-0.134	0.893
Th17/Treg	0.468 ± 0.073	0.461 ± 0.074	0.435	0.665

n = 72.

2.4 ALT ≥ 2 倍上限组中不同基因型的乙型肝炎病毒对 Th17、Treg 细胞及其比率的影响

在 ALT ≥ 2 倍上限组中不同基因型的乙型肝炎

病毒对 Th17、Treg 细胞及其比率的影响有显著性差别,C 型基因型较 B 型基因型的乙型肝炎患者 Th17、Treg 细胞及其比率均明显增高(*P* < 0.05,表 3)。

表 3 ALT≥2 倍上限组中不同基因型的乙型肝炎病毒对 Th17、Treg 细胞及其比率的影响
Table 3 Effects of different genotypes hepatiti B virus (HBV) on Th17 and Treg cells and their ratios in the alanine aminotransferase (ALT) ≥ 2 fold upper limit group

Items	B type	C type	<i>t</i>	<i>P</i>
<i>n</i>	38	37		
HBV DNA	5.331 ± 1.190	5.451 ± 1.145	-0.445	0.658
Th17/%	3.970 ± 0.537	4.718 ± 0.591	-5.733	<0.001
Treg/%	5.967 ± 0.320	6.543 ± 0.416	-6.724	<0.001
Th17/Treg	0.667 ± 0.095	0.724 ± 0.102	-2.506	0.014

n = 75.

3 讨论

乙型肝炎是由乙型肝炎病毒引起的以肝脏病变为主的传染病^[6]。乙型肝炎病毒在我国广为流行,严重影响着国人的健康与生活质量^[7]。乙型肝炎病毒感染人体后可处于不同的免疫阶段,即乙型肝炎携带者和乙型肝炎患者。乙型肝炎携带者通常转氨酶正常或轻度增高,肝活检肝组织大多正常或有轻度肝纤维化,临床上对这期患者多以观察为主,以防病情演变。而乙型肝炎患者肝功能大多异常,特别是 ALT 大多大于等于 2 倍正常上限,肝活检可见有肝纤维化,甚至肝硬化的表现,对这期患者若不及时治疗,病情可进展为肝硬化甚至肝癌^[8-9]。病理免疫损伤在慢性乙型肝炎的发生发展中起着重要的作用。既往研究表明,与同属 CD4⁺ T 细胞亚群的 Th17、Treg 细胞和慢性乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 感染有关,故 Th17 /Treg 的失衡与慢性乙型肝炎患者病情发展及病毒清除关系更为密切^[10-11]。Th17 细胞作为典型的促炎细胞,在 HBV 感染患者中,促进炎症反应及肝细胞损伤,Treg 细胞在免疫调节中主要起抑制免疫作用,在 HBV 感染后免疫应答中 Treg 细胞主要是抑制机体清除病毒防止免疫应答过于激烈,无论是 Th17 还是 Treg 细胞,在病情的进展过程中,常相互制约共同发挥作用,而 Th17/Treg 比值常维持在一定范围内,平衡这两者关系,既能有效地清除病毒,又不至于免疫应答过于激烈。本课题组既往研究中已发现在不同 ALT 状态下,不同载量的乙型肝炎病毒对 Th17、Treg 细胞及其比率的影响是不同的,从而揭露出在不同免疫状态下乙型肝炎病毒对机体的免疫损伤不同^[12],但是目前鲜见文献探讨不同基因型的乙型肝炎病毒对 Th17、Treg 细胞及其比率的影响,本课题组就此进行探讨,为精准治疗提供实验依据。

本研究探讨了总人群中 ALT 与 Th17、Treg 细胞及其比率的相关性,结果显示随着 ALT 的升高, Th17、Treg 细胞及其比率均明显升高,差异有统计学意义。乙型肝炎的发生发展与炎症及病理性免疫反应密切相关。在机体处于免疫耐受状态时, Th17 细胞对病毒清除并不激烈,机体与病毒处于相互平衡状态,而与之相对应的 Treg 细胞也不是很高, Th17/Treg 比值增高也不明显,同时 ALT 也大多正常或轻微增高。而在免疫应答阶段,机体识别并清除病毒,表现为 Th17 细胞明显增加,而为了减缓这种免疫损伤,Treg 细胞也随之增加。同时 Th17/Treg 细胞也随之增加,表明机体在此时的免疫反应以清除病毒为主^[13-14]。同时此时 ALT 也为正常上限 2 倍及以上。

本研究重点讨论了 B/C 基因型的乙型肝炎病毒对 Th17、Treg 细胞及其比率的影响,结果显示在不同的 ALT 状态下,B/C 基因型的乙型肝炎病毒对 Th17、Treg 细胞及其比率的影响是不同的,在 ALT 正常或轻度增高的状态下,B/C 基因型的乙型肝炎病毒对 Th17、Treg 细胞及其比率的影响差异无统计学意义,而在 ALT≥2 倍上限组中不同基因型的乙型肝炎病毒对 Th17、Treg 细胞及其比率的影响有显著差别,C 基因型较 B 基因型的乙型肝炎患者 Th17、Treg 细胞及其比率均明显增高,差异有统计学意义。乙型肝炎病毒为 DNA 病毒。基因组是双链、环形、不完全闭合 DNA,其有四个部分重叠的开放读框区,为 S、C、P 和 X 基因区,分别编码外膜蛋白 HBsAg、核壳蛋白 HBcAg /HBeAg、DNA 聚合酶和 HBxAg。根据 HBV 全基因序列差异 ≥8%,或 S 基因序列差异 ≥4%,将 HBV 分为 A ~ J 十种基因型,我国主要基因型为 C 型和 B 型^[15-16]。据文献报道,相对于 B 型,C 型乙型肝炎被称为难治性乙型肝炎,C 型乙型肝炎病毒更难清除,更难发生 HBeAg

转换,HBsAg 更难清除,C 型乙型肝炎更难发生病毒应答和血清学应答,更容易进展为肝纤维化、肝硬化甚至肝癌^[17-18]。在免疫耐受阶段,乙型肝炎病毒与机体相互适应,无明显的免疫应答,此时尽管乙型肝炎病毒基因型不同,但病毒对机体的免疫损伤无明显差别,此时 ALT 也大多正常或轻度增高。而在免疫应答阶段,机体对乙型肝炎病毒发生了明显的免疫反应,此时 C 型基因型较 B 型基因型的乙型肝炎患者 Th17、Treg 细胞及其比率均明显增高,Th17 对机体的免疫反应增强,机体对病毒的病理性免疫反应增强,机体为了平衡这种免疫应答,Treg 细胞数量也明显增多,而 Th17/Treg 细胞比值明显增加,反映此时机体对病毒以免疫清除能力为主,机体也表现为免疫损伤。本研究从 Th17、Treg 细胞的角度阐明相对于 B 型,C 型乙型肝炎被称为“难治性乙型肝炎”,此时 ALT 也大多明显增高。

综上所述,在不同 ALT 状态下,B/C 基因型的乙型肝炎病毒对机体的损伤不同,所以在不同 ALT 状态下,乙型肝炎病毒对机体的损伤机制可能是不同的,可以为临床精准治疗提供理论依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突。

作者贡献声明 高鹏:设计研究方案,实验操作和撰写论文;刘燕玲:数据分析,统计处理;李俊峰:设计研究方案,实验指导,临床支持;姚立琼:总体把关和审定论文。所有作者均参与论文修改,并对最终文稿进行审读和确认。

参考文献

[1] Zamor PJ, Lane AM. Interpretation of HBV serologies[J]. Clin Liver Dis, 2021, 25(4): 689 – 709.

[2] Pollicino T, Caminiti G. HBV-integration studies in the clinic: Role in the natural history of infection[J]. Viruses, 2021, 13(3): 368.

[3] Bello KE, Mat Jusoh TNA, Irekeola AA, et al. A recent prevalence of hepatitis B virus (HBV) genotypes and subtypes in Asia: A systematic review and meta-analysis[J]. Healthcare, 2023, 11(7): 1011 – 1018.

[4] Gu Y, Li X, Gu L, et al. An immuno-clinic score model for evaluating T cell immunity and predicting early antiviral therapy effectiveness in chronic hepatitis B[J]. Aging, 2020, 12(24):

26063 – 26079.

[5] 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.

[6] Jose-Abrego A, Roman S, Laguna-Meraz S, et al. Host and HBV interactions and their potential impact on clinical outcomes[J]. Pathogens, 2023, 12(9): 1146 – 1152.

[7] Nicolini LA, Orsi A, Tatarelli P, et al. A global view to HBV chronic infection: Evolving strategies for diagnosis, treatment and prevention in immunocompetent individuals[J]. Int J Environ Res Public Health, 2019, 16(18): 3307.

[8] Hogan S, Page A, Dixit S, et al. HBV prevalence in Sub-continental countries: A systematic review and meta-analysis[J]. PLoS One, 2023, 18(12): e0295670.

[9] Chen J, Li L, Yin Q, et al. A review of epidemiology and clinical relevance of hepatitis B virus genotypes and subgenotypes[J]. Clin Res Hepatol Gastroenterol, 2023, 47(7): 102180.

[10] Wang L, Zeng X, Wang Z, et al. Recent advances in understanding T cell activation and exhaustion during HBV infection[J]. Virol Sin, 2023, 38(6): 851 – 859.

[11] Wan Z, Zhou Z, Liu Y, et al. Regulatory T cells and T helper 17 cells in viral infection[J]. Scand J Immunol, 2020, 91(5): e12873.

[12] 高鹏, 雒艳萍. 乙型肝炎病毒在不同丙氨酸氨基转移酶状态下对 Th17、Treg 细胞及其比率的影响[J]. 北京大学学报(医学版), 2022, 54(2): 272 – 277.

[13] Beňová K, Hancková M, Kočí K, et al. T cells and their function in the immune response to viruses[J]. Acta Virol, 2020, 64(2): 131 – 143.

[14] Cui D, Jiang D, Yan C, et al. Immune checkpoint molecules expressed on CD4⁺ T cell subsets in chronic asymptomatic hepatitis B virus carriers with hepatitis B e antigen-negative[J]. Front Microbiol, 2022, 13: 887408.

[15] Xu J, Zhan Q, Fan Y, et al. Human genetic susceptibility to hepatitis B virus infection[J]. Infect Genet Evol, 2021, 87: 104663.

[16] Revill PA, Tu T, Netter HJ, et al. The evolution and clinical impact of hepatitis B virus genome diversity[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2020, 17(10): 618 – 634.

[17] Fernandes da Silva C, Keeshan A, Cooper C. Hepatitis B virus genotypes influence clinical outcomes: A review[J]. Can Liver J, 2023, 6(3): 347 – 352.

[18] Likhitsup A, Lok AS. Understanding the natural history of hepatitis B virus infection and the new definitions of cure and the endpoints of clinical trials[J]. Clin Liver Dis, 2019, 23(3): 401 – 416.

(2024-07-05 收稿)
(本文编辑:王 蕾)