

# 多色流式细胞术检测CHB患者外周血多重细胞因子分泌的Th细胞亚群

姜钰<sup>1,2</sup>, 王蓓蓓<sup>1,2</sup>, 孔雅娴<sup>1,2</sup>, 李玉鑫<sup>3</sup>, 汪笛<sup>1,2</sup>, 宋洋子<sup>1,2</sup>, 王宪波<sup>3</sup>, 曾辉<sup>1,2</sup> (1.首都医科大学附属北京地坛医院传染病研究所, 北京 100015; 2.新发突发传染病研究北京市重点实验室, 北京 100015; 3.首都医科大学附属北京地坛医院 中西医结合中心, 北京 100015)

**摘要:** 目的 建立多色流式胞内细胞因子检测方法, 明确慢性乙型肝炎 (chronic hepatitis B, CHB) 免疫清除期患者外周血Th淋巴细胞亚群细胞因子的分泌特点, 探讨CHB患者多重细胞因子的表达模式。方法 选取2017年3月至2017年4月就诊于首都医科大学附属北京地坛医院的CHB免疫清除期患者10例及健康对照者10例为研究对象。根据多色流式荧光搭配原则, 确立外周血T淋巴细胞CD3、CD4、CD8及细胞因子GM-CSF、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 的六色流式细胞配色方案。利用健康对照者外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC) 调节最适检测电压及荧光补偿, 明确PMA-Ionomycin的体外刺激方案。分离10例CHB患者外周血PBMC细胞, PMA-Ionomycin体外刺激5小时后, 行多重流式细胞因子染色, 利用多色流式细胞仪LSR Fortessa获取细胞, Flowjo10.0流式细胞软件分析健康对照者及CHB患者外周血Th细胞亚群胞内细胞因子共表达水平。采用GraphPadPrism 7.0对所得数据进行统计分析。结果 建立了多重细胞因子的胞内染色方案, 明确了GM-CSF、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 在Th细胞上的共表达分析策略, 确认存在分泌双重细胞因子GM-CSF<sup>+</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>、GM-CSF<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>的Th细胞亚群。通过检测CHB患者外周血样本, 发现CHB患者分泌GM-CSF、GM-CSF<sup>+</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>、GM-CSF<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>的Th细胞亚群百分率均显著高于健康对照组, 差异具有统计学意义 ( $t = 2.576$ 、 $4.208$ 、 $2.671$ ,  $P$ 均  $< 0.05$ )。结论 建立的多色流式细胞因子胞内染色方案可用于明确CHB患者外周血分泌双重细胞因子的Th细胞亚群的分布模式; 双重细胞因子分泌的Th细胞亚群的检测可能为临床上CHB患者免疫状态的评估提供可靠依据。

**关键词:** 肝炎, 乙型, 慢性; 多色流式细胞术; 细胞因子; Th细胞亚群

## Measurement of multiple cytokine producing T helper cells in the peripheral blood of patients with chronic hepatitis B by multi-color flow cytometry

JIANG Yu<sup>1,2</sup>, WANG Bei-bei<sup>1,2</sup>, KONG Ya-xian<sup>1,2</sup>, LI Yu-xin<sup>3</sup>, WANG Di<sup>1,2</sup>, SONG Yang-zi<sup>1,2</sup>, WANG Xian-bo<sup>3</sup>, ZENG Hui<sup>1,2</sup> (1.Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China; 2.Beijing Key Laboratory of Emerging Infectious Diseases, Beijing 100015, China; 3.Center of Integrative Medicine, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China)

**Abstract: Objective** To evaluate the expression pattern and levels of multiple cytokines among T helper cells in the peripheral blood of patients with chronic hepatitis B (CHB) in immune clearance stages by multi-color flow cytometry analysis. **Methods** Total of 10 cases with CHB in immune clearance stages and 10 healthy donors in Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University from March 2017 to April 2017 were selected. Monoclonal antibodies CD3, CD4, CD8, GM-CSF, TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  were used to establish the six-color flow cytometry analysis panel. The peripheral blood mononuclear cell (PBMC) sample from one healthy donor was applied to adjust the optimal detection voltage, fluorescence compensation and FMO control. Compared with anti-CD3/28 mAbs, the PMA-Ionomycin was identified as an ideal stimulant for intracellular cytokine staining. PBMCs were isolated from 10 CHB patients and cultured with PMA-Ionomycin for 5 hours. Targeting cells were stained via intracellular cytokines staining procedure. The cells were acquired by multi-color flow cytometre LSR Fortessa and were analyzed by Flowjo 10.0 cytometry analysis software. The positive proportions were compared between CHB patients and healthy donors by Graph Pad Prism7.0 software. **Results** The multi-color flow cytometry

intracellular cytokine staining procedure was established for the functional evaluation of T cells. We first set up the gating strategy to analyze the co-expression pattern of GM-CSF, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and therefore confirmed the presence of GM-CSF<sup>+</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>, GM-CSF<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Th cells subsets. Simultaneously, the proportion of GM-CSF<sup>+</sup>, GM-CSF<sup>+</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> and GM-CSF<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>Th cells were significantly higher in CHB patients compared with healthy donors ( $t = 2.576, 4.208, 2.671; P < 0.05$ ). **Conclusions** The multi-color intracellular cytokine staining procedure with flow cytometry technique can be used to analyze the multiple cytokine producing pattern among Th cells subsets in CHB patients. The proportion of GM-CSF<sup>+</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> and GM-CSF<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Th cells subsets might be a potential predictor for the immune status of CHB patients

**Key words:** Hepatitis B, chronic; Muti-color flow cytometry; Cytokines; Th cells subsets

慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)是由乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)持续感染引起的慢性肝脏炎症性疾病<sup>[1]</sup>。全球约有2.4亿CHB患者,其中20%~30%会发展为肝硬化或肝细胞癌,每年因CHB死亡的患者约65万。CHB仍是威胁人们身体健康的重要公共卫生问题<sup>[2]</sup>。

CHB发病机制复杂,肝细胞、病毒及宿主免疫系统间的相互作用决定CHB疾病的进展及转归<sup>[3]</sup>。HBV作为非细胞病变性的DNA病毒,并不直接引起肝细胞损伤,其感染后引起的宿主免疫应答是CHB疾病进展的关键<sup>[4]</sup>。辅助性T细胞(helper T cell, Th)作为人体免疫系统的重要组成部分,在HBV感染后的病毒清除及肝组织损伤中发挥免疫调节作用<sup>[5]</sup>。研究表明,CHB患者体内多种Th细胞亚群(如Th1、Th2、Th9、Th17、Th22等)通过分泌各自主要效应细胞因子(如IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-4、IL-9、IL-17、IL-22等)促进炎症进展<sup>[6,7]</sup>,同时其分泌细胞因子的水平可以反映其功能状态。新近发现分泌GM-CSF的Th细胞亚群即Th-GM也参与慢性炎症进展<sup>[8]</sup>。既往对于上述细胞因子的研究多停留在单一细胞因子检测水平,而多种细胞因子在同一细胞亚群的共表达情况及其在CHB中的作用则鲜有关注。已有文献报道分泌双重细胞因子的Th细胞亚群其免疫功能优于单一细胞因子分泌的Th细胞亚群,对于此双重分泌细胞因子Th细胞亚群进行研究,有可能更好地评价CHB患者机体免疫功能<sup>[9]</sup>。

随着多色流式细胞染色技术的迅猛发展,通过标记Th细胞表面标记物及胞内蛋白可区分不同Th细胞亚群,并可在单细胞水平上同时检测多种胞内分子的表达水平<sup>[10]</sup>,从而对机体免疫功能的概况进行全面客观的评估,已成为评价免疫细胞功能的经典技术。据此,本研究建立了六色流式胞内细胞因子染色方案,同时进行胞内多种细胞因子染色,检测CHB患者外周血中分泌双重细胞因子的Th细胞亚群,为CHB患者免疫状态的评估提供可靠的方法学依据。

## 1 材料与方法

1.1 研究对象 选取就诊于首都医科大学附属北京地坛医院中西医结合一科的CHB免疫清除期男性患者10例为研究对象,年龄18~35岁。CHB清除期患者的诊断均符合2015年中华医学会肝病学分会及感染病学分会联合修订的《慢性乙型肝炎防治指南》中对慢性乙型肝炎免疫清除期的诊断标准<sup>[1]</sup>。招募性别、年龄匹配的健康对照者10例。本研究经首都医科大学附属地坛医院医学伦理委员会批准,所有研究对象均知情同意。

### 1.2 研究方法

1.2.1 主要试剂 RPMI1640培养基、磷酸盐缓冲溶液(PBS)购自美国Corning公司;淋巴细胞分离液(lymphoprep)购自加拿大STEM CELL公司;胎牛血清(FBS)购自美国Gibco公司;细胞刺激剂Cell Stimulation Cocktail (plus protein transport inhibitors) 500X、anti human CD3mAb和CD28mAb均购自美国eBioscience公司;GolgiPlug Protein Transport inhibitor (BFA)、GolgiStop Protein Transport inhibitor (monensin)、小鼠抗人单克隆抗体细胞表面标记物CD3-BV786、CD4-APC-Fire750、CD8-BV510、细胞因子抗体GM-CSF-PE-CF594、TNF- $\alpha$ -BV421、IFN- $\gamma$ -AF700及InstraSure™Kit (Regant A、B)均购自美国BD公司。

1.2.2 外周血单个核细胞的分离 空腹静脉采集外周血标本5 ml。将5 ml RPMI 1640培养基与5 ml EDTA抗凝血混匀,沿管壁缓慢加入到5 ml淋巴细胞分离液上层,室温2000 r/min离心20分钟(离心半径 $r = 11.5$  cm);离心缓慢停止后,轻轻吸取上、中层界面相交处白色云雾状外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)层,加入10 ml RPMI1640培养基,润洗所得PBMC,经室温1500 r/min离心10分钟( $r = 11.5$  cm),去除淋巴细胞分离液;再次润洗PBMCs;R10培养基(含10%FBS的1640培养基)重悬细胞,细胞计数,调整单细胞悬液浓度为 $2 \times 10^6$ /ml,取500  $\mu$ l均分入流式管待用,每管细胞

数为 $1 \times 10^6$ 个。

**1.2.3 PBMC细胞的体外检测方案的建立** 设计如下3组：PMA刺激组（A组）、CD3/28混合单克隆抗体刺激组（B组）和空白对照组（C组）。分别按照各自刺激方案（见表1）刺激健康对照者PBMCs，于5% CO<sub>2</sub>培养箱培养（美国Thermo Fisher公司）37℃培养5小时。A组所用细胞刺激剂为混合成品制剂，包含PMA，Ionomycin和蛋白转运抑制剂GolgiPlug（BFA）、GolgiStop（monensin）；B组所用为CD3/28混合抗体刺激剂，包含CD3、CD28单克隆抗体和蛋白转运抑制剂GolgiPlug、GolgiStop；C组为只加R10及蛋白转运抑制剂GolgiPlug、GolgiStop，不加任何刺激剂的空白对照。于装有单细胞悬液的流式管中加入R10培养基至总体积为500 μl，加入细胞刺激剂10 μl/管，种入96孔板，于5% CO<sub>2</sub>培养箱培养37℃培养5小时后收集细胞。

**1.2.4 PBMC细胞表面抗原和胞内细胞因子染色** 设计流式六色荧光抗体染色方案，即小鼠抗人单克隆抗体：CD3-BV786、CD4-APC-Fire750、CD8-BV510、GM-CSF-PE-CF594、TNF-α-BV421和IFN-γ-AF700。实验管及FMO管加入CD3-BV786、CD4-APC-F750和CD8-BV510各5 μl，室温避光孵育30分钟；10倍体积PBS润洗细胞，室温1200 r/min离心5分钟（ $r = 11.5 \text{ cm}$ ），弃上清重悬；加入100 μl Reagent A固定，重悬细胞后，室温避光孵育15分钟；10倍体积PBS润洗细胞，室温1200 r/min离心5分钟（ $r = 11.5 \text{ cm}$ ），弃上清重悬细胞；每管加入50 μl Reagent B破膜，实验管加入细胞因子抗体GM-CSF-PE-CF594 5 μl、TNF-α-BV421 2 μl、IFN-γ-AF700 3 μl，FMO管加入相应的抗体，重悬细胞后室温避光孵育30分钟，10倍体积PBS润洗细胞，室温1200 r/min离心5分钟（ $r = 11.5 \text{ cm}$ ），弃上清重悬细胞待测。

**1.2.5 流式细胞仪检测细胞因子** 多色流式细胞仪LSR Fortessa（美国BD公司）进行检测，利用BD FACSDiva™ software调节仪器电压、补偿及获取细胞样品，每管获取 $2 \times 10^5$ 个细胞。采用Flowjo 10.0对所得细胞亚群及细胞因子流式数据进行分析。

**1.3 统计学处理** 利用GraphPad Prism 7.0软件进行统

计分析，首先运用Kolmogorov-Simrnov对所得数据进行正态性检验。两组刺激方案不同细胞因子阳性率差异比较时，若数据为正态分布，则用 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用配对样本 $t$ 检验；若数据为偏态分布，则用中位数（ $M$ ）表示，两组间采用Wilcoxon秩和检验。CHB患者及健康对照者不同细胞因子阳性率及双重细胞因子分泌的Th细胞比例差异比较进行正态性检验后，若为正态分布，则数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用两独立样本 $t$ 检验；若数据为偏态分布，则用中位数（ $M$ ）表示，采用Mann-Whitney检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 人外周血流式检测刺激方案的确定** 取未染色PBMC，将各通道荧光信号的最大值控制在X轴的前1/4内<sup>[11]</sup>，调节样本最适电压。本研究选用CompBeads进行各荧光通道抗体标记，应用机器自动调节，同时结合相应单色抗体标记的PBMC手动调节，以排除不同荧光间的光谱重叠干扰<sup>[12]</sup>。根据细胞表面CD3、CD4、CD8分子的表达水平，利用流式细胞术区分辅助性T淋巴细胞亚群（CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Th细胞）和细胞毒性T淋巴细胞亚群（CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T细胞）（图1A）。分析CD4<sup>+</sup> Th细胞亚群内各细胞因子表达阳性率，以FMO对照管圈定细胞因子的阴性群位置。

如图1B所示，与空白对照组不同，在PMA-  
ionomycin和CD3/28混合单克隆抗体刺激下，10例健康对照者Th细胞均可检测到上述细胞因子的表达。但不同的刺激剂对其表达的诱导效率不同。10例健康对照者PBMCs经PMA-ionomycin体外刺激5小时后，Th细胞表达GM-CSF、TNF-α及IFN-γ百分率分别为（ $6.32 \pm 2.76$ ）%、（ $11.90 \pm 7.35$ ）%和（ $26.50 \pm 13.81$ ）%，而Th细胞经CD3/28抗体体外刺激后，其GM-CSF、TNF-α和IFN-γ的阳性率分别为（ $0.45 \pm 0.78$ ）%、（ $8.27 \pm 4.06$ ）%和（ $3.96 \pm 1.91$ ）%，上述差异均具有统计学意义（ $t = 5.560$ ， $P < 0.001$ ； $t = 4.306$ ， $P = 0.003$ ； $t = 5.283$ ， $P < 0.001$ ）（图1C）。PMA-ionomycin刺激效果显著优于CD3/28抗体刺激效果，其刺激产生的细胞因子表达量可升高数倍，较为理想地反应了Th细胞分泌上述细胞因子的潜能。因此选定PMA-ionomycin刺激

表1 各组 PBMC 细胞的体外刺激方案

组别	刺激方案
A组（PMA组）	PMA工作液（溶于R10，终浓度为2 μl/ml）
B组（CD3/28抗体刺激组）	CD3/28混合抗体（溶于R10，CD3抗体终浓度为2 μg/ml；CD28抗体终浓度为5 μg/ml；BFA终浓度为1 μl/ml）
C组（空白对照组）	R10

方案对CHB患者PBMC进行体外培养。

**2.2 CHB患者多重细胞因子共表达分析策略的确立** 通过对10例CHB患者和健康对照者流式结果进行上述4种细胞因子两两共表达比例分析发现,在健康对照者的诸多配对分析结果中GM-CSF<sup>+</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>Th细胞亚群占GM-CSF<sup>+</sup>Th细胞亚群的比例为(91.96  $\pm$  11.21)%,分泌IFN- $\gamma$ 的Th细胞占GM-CSF<sup>+</sup>Th细胞的(55.64  $\pm$  11.50)%。在CHB患者中,GM-CSF<sup>+</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>Th细胞亚群占GM-CSF<sup>+</sup>Th细胞亚群的比例为(89.48  $\pm$  6.79)%,分泌IFN- $\gamma$ 的Th细胞占GM-CSF<sup>+</sup>Th细胞的(53.22  $\pm$  12.72)%。即无论是健康对照者还是CHB患者,分泌GM-CSF的Th细胞约90%同时分泌TNF- $\alpha$ ,分泌GM-CSF的Th细胞约有2/3同时分泌IFN- $\gamma$ (图2)。

**2.3 CHB患者外周血Th细胞多重细胞因子共表达模式的评价** 应用上述刺激方案及流式染色方法对CHB

患者及健康对照者外周血PBMC细胞行流式胞内细胞因子检测,通过已确立共表达分析策略分析CHB患者和健康对照者Th细胞因子表达模式的差异。如图3所示,与健康对照者相比,CHB患者Th细胞内表达GM-CSF的比例显著增高[(20.22  $\pm$  6.13)% vs (6.32  $\pm$  2.76)%],差异有统计学意义( $t=2.576$ ,  $P=0.019$ )。更为重要的是,CHB患者外周血中GM-CSF<sup>+</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>双阳性Th细胞[(15.89  $\pm$  7.40)%]和GM-CSF<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>双阳性Th细胞[(9.14  $\pm$  5.19)%]比例均显著高于健康对照者[(5.61  $\pm$  2.22)%、(3.41  $\pm$  1.83)%],差异有统计学意义( $t=4.208$ ,  $P<0.001$ ;  $t=2.671$ ,  $P=0.016$ )。

### 3 讨论

本研究应用多色流式胞内细胞因子染色方案,通过PMA-Ionomycin活化后健康对照者及CHB患者外周血PBMC细胞的六色流式染色方案检测TNF- $\alpha$

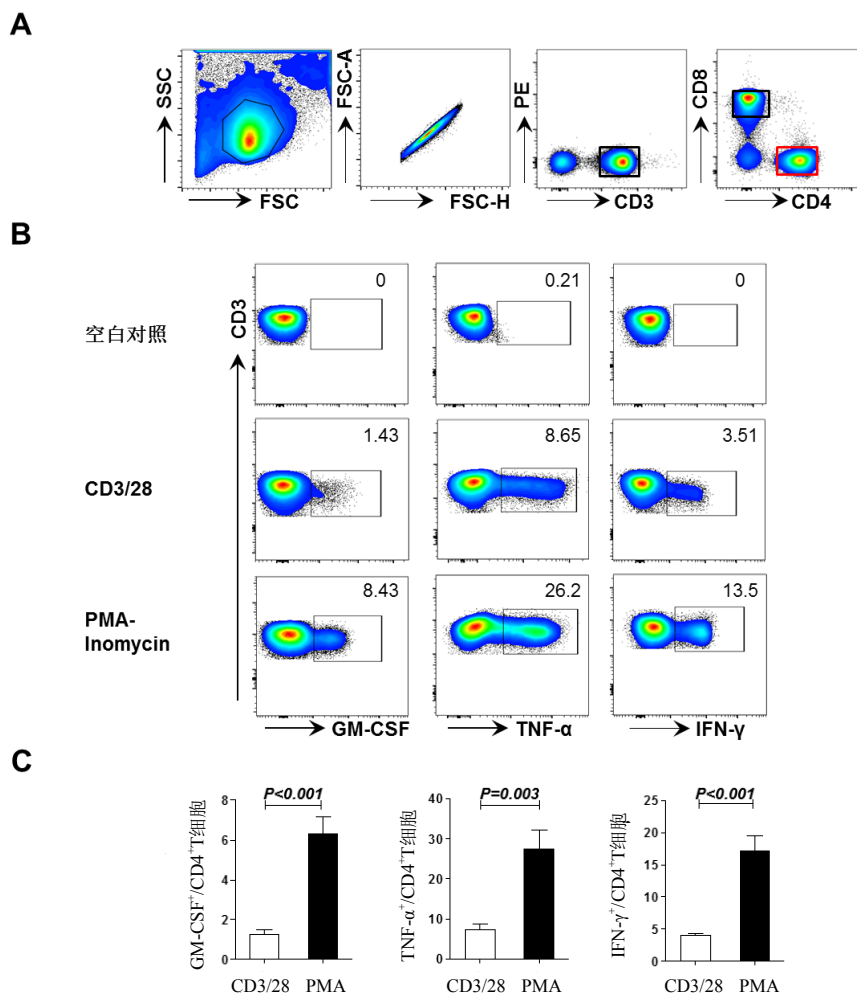


图1 PMA- ionomycin 与 CD3/28 抗体刺激方案对不同 Th 细胞的细胞因子表达的影响

注: A: 首先以流式前向角(FSC)和侧向角(SSC)于散射光散点图中圈定淋巴细胞群体,通过FSC-H和FSC-A圈定单细胞群体,随后圈定CD3<sup>+</sup>T淋巴细胞群体,并根据细胞表面CD4、CD8分子表达水平区分Th细胞和CTL细胞;B:以10例健康对照者中1例为例,不同活化方案下,CD4<sup>+</sup>Th细胞中,GM-CSF、TNF- $\alpha$ 和IFN- $\gamma$ 在Th细胞亚群中的流式细胞染色;C:10例健康对照者PBMCs在两种刺激系统下,GM-CSF、TNF- $\alpha$ 和IFN- $\gamma$ 阳性Th细胞百分率的比较( $t=5.560$ ,  $P<0.001$ ;  $t=4.306$ ,  $P=0.003$ ;  $t=5.283$ ,  $P<0.001$ )

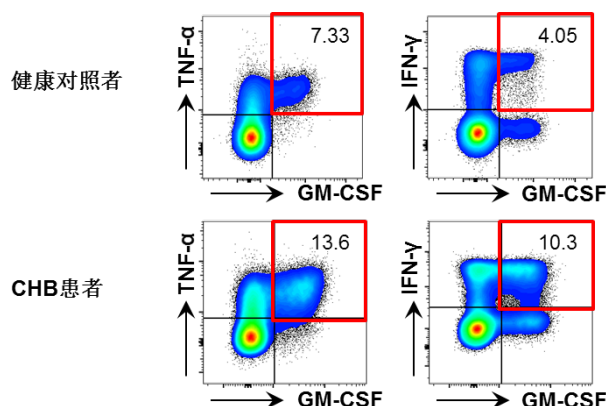


图2 人外周血 Th 细胞细胞因子共表达分析策略

注：以 GM-CSF 为横轴，TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  分别为纵轴，圈定 GM-CSF<sup>+</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> 和 GM-CSF<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> 双重细胞因子分泌的亚群，分析在 CD4<sup>+</sup>Th 细胞中 GM-CSF 与 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  的共表达情况

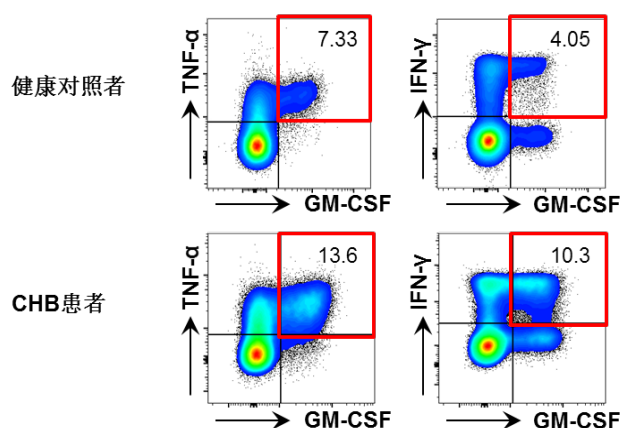


图3 CHB 患者及健康对照者分泌 GM-CSF 及双重细胞因子 Th 细胞亚群的比例差异

注：A 为 CHB 患者及健康对照者中，GM-CSF<sup>+</sup>、GM-CSF<sup>+</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> 和 GM-CSF<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> 在 Th 细胞亚群的流式细胞染色；B 为 10 例 CHB 患者及 10 例健康对照者 GM-CSF<sup>+</sup>、GM-CSF<sup>+</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> 和 GM-CSF<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> 阳性细胞百分率的比较 ( $t=2.576$ 、 $P=0.019$ ； $t=4.208$ 、 $P<0.001$ ； $t=2.671$ 、 $P=0.016$ )。

和 IFN- $\gamma$  与 GM-CSF 的共表达水平，发现 CHB 患者 GM-CSF、GM-CSF<sup>+</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> 及 GM-CSF<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> 双重细胞因子分泌的 Th 细胞亚群比例显著高于健康对照组，提示双重细胞因子分泌的 Th 细胞亚群可能参与 CHB 患者免疫调节过程，其在 CHB 患者肝损伤过程中的确切作用机制尚需进一步研究证实。

既往对于 CHB 患者进行细胞因子的检测手段主要为酶联免疫法、ELISPOT 法、荧光定量法及原位杂交法等<sup>[13]</sup>，然而上述手段只能对单一细胞因子表达进行检测，且无法明确单细胞水平多种细胞因子的共表达水平，无法对双重乃至多重细胞因子分泌的 Th 细胞亚群进行分析。近年来，随着多色流式技术的迅速发展，利用多色流式细胞术可在单个细胞水平上同时分析多种细胞因子的分泌潜能，该方法具有特异性强、敏感度高、快速省时及易于操作等特点，在科研中已广泛应用。

由于 Th 细胞在静息状态下较少分泌细胞因子，在进行 Th 细胞细胞因子的体外研究时，需加入特定刺激剂以模拟体内炎症微环境，活化 Th 细胞，从而评价其分泌细胞因子的潜能。因而，Th 细胞体外刺激方案的选择在一定程度上决定了结果的可信度。PMA-ionomycin 和 CD3/28 混合单克隆抗体是目前较为常用的两种 T 淋巴细胞激活剂，但由于其活化 T 淋巴细胞的机制不同，诱导的细胞因子在种类和水平上均存在不同程度的差异，故在选择时需考虑研究对象和实验目的，在最大限度上减小结果的偏差，尽量客观地反映 T 淋巴细胞活化后的各种功能变化<sup>[14,15]</sup>。本研究通过对上述两种活化方案诱导细胞因子表达水平的比较，发现两种刺激剂对 GM-CSF、TNF- $\alpha$  及 IFN- $\gamma$  的诱导作用确有差异。PMA-ionomycin 刺激后，Th 细胞表达 GM-CSF、TNF- $\alpha$  及 IFN- $\gamma$  的诱导表达效果显著优于 CD3/28 混合抗体的

刺激效果,能够更充分地反映表达量较低的细胞因子的分泌潜能。因此在研究多重细胞因子共表达的Th细胞亚群功能时,PMA-ionomycin不失为一个更为理想的刺激方案。

根据细胞表面标记、产生的细胞因子、转录因子及组织定位等的不同,Th细胞可进一步分为Th1型、Th2型、Th17型等亚群<sup>[16,17]</sup>。除以上Th亚群外,新近还发现了可分泌GM-CSF的Th-GM亚群<sup>[18]</sup>。目前研究发现,Th细胞可以通过分泌不同细胞因子(如IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 等)激活炎症相关细胞,调节机体免疫应答,可能造成乙型肝炎的慢性化发生,其分泌水平可以反映在慢性乙型肝炎时机体免疫功能的基本状况及肝组织状态<sup>[19]</sup>。已有文献报道,慢性乙型肝炎患者TNF- $\alpha$ 及IFN- $\gamma$ 水平升高,其水平高低与肝炎活动及所造成肝组织损伤密切相关,同时与疾病进展为肝硬化和肝癌有关<sup>[20]</sup>。通过检测慢性乙型肝炎患者这两种细胞因子的水平,可为临床监测患者病情严重程度及预测疾病进展提供依据。GM-CSF作为一种重要的细胞因子,在自身免疫病及慢性炎症中发挥重要促炎作用,但其与慢性乙型肝炎的关系尚未见文献报道。本研究发现具有GM-CSF分泌潜能的Th细胞亚群比例在CHB患者中较健康对照组显著升高,提示GM-CSF在CHB患者的免疫调节中发挥了重要作用。

已有文献报道GM-CSF可由Th1细胞分泌<sup>[21]</sup>,本研究结果与文献报道一致,在健康对照者中存在GM-CSF与Th1细胞主要细胞因子的共表达情况,即存在GM-CSF<sup>+</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>、GM-CSF<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>的Th细胞亚群。除此之外还发现CHB患者中也存在GM-CSF<sup>+</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>、GM-CSF<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>的Th细胞亚群,且这两群细胞在CHB患者中的比例均显著高于健康对照者,提示分泌双重细胞因子的Th细胞亚群可能参与CHB的发病机制,对此分泌双重细胞因子的Th细胞亚群进行分析,可以更加准确地评估CHB患者机体细胞免疫状态。

综上所述,本研究利用多色流式细胞术及胞内细胞因子染色技术,明确了外周血Th细胞亚群多重细胞因子的共表达分析策略,建立了六色流式人外周血细胞因子检测方案。应用此方案可较精准地确定CHB患者分泌双重细胞因子的Th细胞亚群比例及功能改变,对于研究疾病的发生、进展及转归给予提示,同时为疾病治疗提供可能的靶点。

## 参考文献

- [1] 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年版)[J/CD].中国肝脏病杂志(电子版),2015,7(3):1-18.
- [2] Organization WH. Guidelines for the prevention, care and treatment of persons with chronic hepatitis B infection[J]. World Health Organization, 2015.
- [3] Zhang JY, Zhang Z, Lin F, et al. Interleukin-17-producing cd4<sup>+</sup> T cells increase with severity of liver damage in patients with chronic hepatitis B[J]. Hepatology,2010,51(1):81-91.
- [4] Christian T, Chan HLY, Anna L. Hepatitis B virus infection[J]. Lancet, 2014,384(9959):2053-2063.
- [5] Park JJ, Wong DK, Wahed AS, et al. HBV-specific and global T-cell dysfunction in chronic hepatitis B[J]. Gastroenterology, 2015,150(3):684-695.
- [6] Bertolotti A, Ferrari C. Innate and adaptive immune responses in chronic hepatitis B virus infections: towards restoration of immune control of viral infection[J]. Gut,2012,61(12):1754-1764
- [7] Cheng LS, Liu Y, Jiang W. Restoring homeostasis of cd4<sup>+</sup> T cells in hepatitis B virus-related liver fibrosis[J]. World J Gastroenterol, 2015,21(38):10721-10731.
- [8] Shiomi A, Usui T. Pivotal roles of GM-CSF in autoimmunity and inflammation[J]. Mediators Inflamm,2015:568543.
- [9] Kannanganat S, Ibegbu C, Chennareddi L, et al. Multiple-cytokine-producing antiviral cd4 t cells are functionally superior to single-cytokine-producing cells[J]. J Virol,2007,81(16):8468-8476.
- [10] 韩捷,陈海燕,李扬,等.慢性HBV感染者中Th细胞的检测及其临床意义[J].细胞与分子免疫学杂志,2006,22(4):475-476.
- [11] 陈朱波,曹雪涛.流式细胞术:原理、操作及应用[J].2010:62-65.
- [12] 王辉,高颖.应用流式细胞仪的常见问题及解决对策[J].现代仪器与医疗,2012,18(1):64-65.
- [13] 刘莉,张军,方超平,等.流式细胞术检测人和小鼠Th细胞亚群[J].第三军医大学学报,2004,26(20):1845-1848.
- [14] 韩作宁,张志欣. PMA对外周血T细胞和CD4<sup>+</sup>T细胞表型影响的研究[J].中华微生物学和免疫学杂志,1994:176-179.
- [15] 骆群,吕明,于鸣,等.抗CD28抗体协同刺激增强抗CD3抗体体外激活T淋巴细胞并降低TGF- $\beta$ 的表达[J].中国实验血液学杂志,2006,14(3):547-551.
- [16] Ryan ES, Micci L, Fromentin R, et al. Loss of function of intestinal IL-17 and IL-22 producing cells contributes to inflammation and viral persistence in siv-infected rhesus macaques[J]. Plos Pathogens,2016,12(2):e1005412.
- [17] Korn T, Bettelli E, Oukka M, et al. IL-17 and Th17 cells[J]. Annu Rev Immunol,2009,27(1):485-517.
- [18] Sheng W, Yang F, Zhou Y, et al. STAT5 programs a distinct subset of GM-CSF-producing T helper cells that is essential for autoimmune neuroinflammation[J]. Cell Res,2014,24(12):1387-1402.
- [19] 邢同京,章廉,骆抗先,等. Th1/Th2类细胞因子在慢性乙型肝炎患者的表达及其临床意义[J].解放军医学杂志,2000,25(4):235-237.
- [20] 杨炼,管小琴,肖明. HBV感染对人T细胞免疫及细胞因子TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 2的影响[J].世界华人消化杂志,2005,13(6):729-733.
- [21] McWilliams IL, Rajbhandari R, Nozell S, et al. STAT4 controls GM-CSF production by both Th1 and Th17 cells during EAE[J]. J Neuroinflammation,2015,12:128.

收稿日期:2017-08-10