

论著·临床研究

HCMV 感染患儿 HLA-DR、CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞及 IL-17、IL-27 表达水平与肝损害的相关性研究

朱莉莉 徐玲 王军

(徐州医科大学附属医院儿科, 江苏 徐州 221000)

[摘要] **目的** 探讨人巨细胞病毒(HCMV)感染患儿 HLA-DR、CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞(CD4⁺CD25⁺Treg)以及 IL-17、IL-27 的表达水平与肝损害的相关性。**方法** 以 21 例 HCMV 感染肝功能损害患儿和 21 例 HCMV 感染非肝功能损害患儿为研究对象。流式细胞术检测两组外周血 CD4⁺CD25⁺Treg、HLA-DR 细胞的表达; ELISA 检测血浆 IL-17 及 IL-27 表达。**结果** 与非肝损组比较, 肝损组患儿 CD4⁺CD25⁺Treg 比率较低, IL-17、IL-27 表达水平较高, 差异均有统计学意义($P<0.05$)。IL-17 及 IL-27 水平与 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞比率呈负相关($P<0.01$)。**结论** CD4⁺CD25⁺Treg 细胞介导的免疫耐受失衡及 IL-17、IL-27 等炎症因子过度激活可能参与 HCMV 感染肝功能损害发生。

[中国当代儿科杂志, 2018, 20(7): 554-558]

[关键词] 人巨细胞病毒; 肝功能损害; CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞; HLA-DR; 炎症因子; 儿童

Relationship between expression of peripheral blood HLA-DR, CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells, IL-17 and IL-27 with liver damage in children with human cytomegalovirus infection

ZHU Li-Li, XU Ling, WANG Jun. Department of Pediatrics, Affiliated Hospital, Xuzhou Medical University, Xuzhou, Jiangsu 221000, China (Wang J, Email: woyouyigelianai12@163.com)

Abstract: Objective To study the relationship between the expression of peripheral blood HLA-DR, CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells, IL-17 and IL-27 with liver damage in children with human cytomegalovirus (HCMV) infection. **Methods** Twenty-one HCMV children with liver damage and twenty-one HCMV children without liver damage were enrolled in this study. The expression of peripheral blood HLA-DR and CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells was detected by flow cytometry. Plasma levels of IL-17 and IL-27 were measured using ELISA. **Results** The plasma levels of IL-17 and IL-27 in children with liver damage were significantly higher than in those without liver damage, while the expression of peripheral blood CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells was lower than in those without liver damage ($P<0.05$). Plasma IL-17 and IL-27 levels were negatively correlated with the expression of peripheral blood CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells ($P<0.01$). **Conclusions** Immune imbalance mediated by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells and over-expression of IL-17 and IL-27 may be involved in the pathogenesis of liver damage in children with HCMV infection.

[Chin J Contemp Pediatr, 2018, 20(7): 554-558]

Key words: Human cytomegalovirus; Liver damage; CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell; HLA-DR; Inflammatory factor; Child

人巨细胞病毒(human cytomegalovirus, HCMV)感染多发生在婴儿期,可引起多脏器损伤,如进行性肝损害、胆道梗阻或胆道闭锁、听力障碍等,以肝损害较多见^[1]。体液免疫、细胞免疫及

炎症因子与 HCMV 肝炎的发生发展密切相关^[2-3]。CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 淋巴细胞(regulatory T cell, Treg)是介导免疫耐受的重要细胞群,在病毒性肝炎、自身免疫性肝炎等肝脏疾病的发病机制中起

[收稿日期] 2018-02-22; [接受日期] 2018-05-07

[基金项目] 江苏省六大人才高峰资助项目[2011-WS-075]。

[作者简介] 朱莉莉,女,硕士研究生。

[通信作者] 王军,男,主任医师,教授。

着重要作用。IL-17、IL-27 在固有免疫和适应性免疫中起调节作用，还可抑制 CD4⁺CD25⁺Treg 表达，共同参与肝脏炎症反应^[4-5]。HLA-DR 是单个核细胞活化的重要标志，可作为判断免疫抑制的重要指标，在自身免疫性肝炎、重症感染的发生机制中均有重要作用^[6]。但这些细胞及细胞因子是否与 HCMV 感染患儿肝损害发生相关尚不清楚。因此，本研究通过比较是否合并肝损害的 HCMV 感染患儿 CD4⁺CD25⁺Treg、HLA-DR 及 IL-17、IL-27 的表达差异，探索 HCMV 感染肝损害的可能发病机制，发现巨细胞病毒肝炎治疗的潜在靶点。

1 资料与方法

1.1 研究对象

以 2016 年 1 月至 2017 年 12 月徐州医科大学附属儿科医院确诊的 1 岁以内（不包括新生儿）的巨细胞病毒感染、且未进行规范抗病毒治疗的患儿为研究对象。根据肝功能损害的诊断标准^[7]，将 HCMV 感染患儿分为肝功能损害组及非

肝功能损害组，每组 21 例。两组在年龄、性别构成以及巨细胞病毒 DNA 含量的差异无统计学意义（ $P>0.05$ ），见表 1。HCMV 感染肝损组男 13 例、女 8 例，年龄为 2~10（ 5.9 ± 2.4 ）个月，表现为单纯肝功能损害的 12 例，合并肺炎 7 例，合并上呼吸道感染 2 例；而非肝损组男 14 例、女 7 例，年龄（ 5.3 ± 2.7 ）个月，表现为无症状感染的 10 例，合并肺炎的 8 例，合并上呼吸道感染的 3 例。巨细胞病毒感染诊断依据《儿童巨细胞病毒性疾病诊断和防治的建议》^[8]，尿液聚合酶链式反应巨细胞病毒 DNA 阳性，均无胆道畸形、代谢性肝病、药物中毒性肝炎等；肝炎病毒、EB 病毒、呼吸道病毒等常见病毒均阴性。肝损害诊断标准^[7]：血清丙氨酸转氨酶或结合胆红素升高至正常上限 2 倍以上；或血清天冬氨酸转氨酶、碱性磷酸酶和总胆红素同时升高，且其中至少 1 项升高至正常上限 2 倍以上。

本研究获医院临床伦理委员会批准及家长知情同意。

表 1 HCMV 感染患儿肝损组与非肝损组的一般资料比较

分组	例数	年龄 ($\bar{x} \pm s$, 月)	性别 (男/女)	尿 PCR-CMV-DNA 定量 [中位数(范围), IU/mL]
肝损组	21	5.9 ± 2.4	13/8	$1.08 \times 10^5(1.76 \times 10^3 \sim 5.09 \times 10^6)$
非肝损组	21	5.3 ± 2.7	14/7	$1.38 \times 10^5(1.38 \times 10^3 \sim 7.88 \times 10^8)$
$Z(\chi^2)[t]$ 值		[0.72]	(0.10)	-1.75
P 值		> 0.05	> 0.05	> 0.05

1.2 主要试剂及仪器

PE-CD4 抗体、FITC-CD25 抗体、PerCP/Cy5.5-HLA-DR 抗体购自美国 Biolegend 公司；抗人 IL-17、IL-27 ELISA 试剂盒购自徐州康美生物科技有限公司；FC500 型流式细胞仪（法国 Beckman Coulter 公司）由我院中心实验室提供。

1.3 流式细胞仪检测 CD4⁺CD25⁺Treg、HLA-DR 细胞含量

清晨空腹采集患儿外周血 2 mL，EDTA 抗凝，加入 2 mL 淋巴细胞分离液，密度梯度离心提取单个核细胞置于离心管，加入 2 mL 磷酸盐缓冲液（PBS）洗涤 2 次，弃上清液，分别加入相应的荧光标记抗体：PE-CD4 抗体、FITC-CD25 抗体或

PerCP/Cy5.5-HLA-DR 抗体，室温下震荡混匀，避光孵育约 20 min；加入 PBS 2 mL，1500 r/min 离心 5 min，弃上清，再次加入 PBS 液，重复以上步骤后离心，弃上清，加 PBS 重悬细胞，取 200 μ L 细胞进行流式细胞学检测，以 CellQuest 软件计算 CD4⁺CD25⁺Treg、HLA-DR 细胞的表达。

1.4 ELISA 方法检测 IL-17、IL-27 水平

所有患儿均清晨空腹采集外周血 2 mL，EDTA 抗凝，加入 2 mL 淋巴细胞分离液，1500 r/min 离心 15 min，吸取血浆分装于 EP 管，-80℃ 冰箱冻存。应用 IL-17、IL-27 ELISA 试剂盒，采用酶联免疫吸附法检测 IL-17、IL-27 水平，操作按试剂盒说明书进行，并通过标准曲线计算 IL-17、IL-27 浓度。

1.5 统计学分析

采用 SPSS 16.0 软件进行数据处理。正态分布的计量资料采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组比较采用独立样本 t 检验; 非正态分布计量资料采用中位数范围表示, 两组比较采用 Mann-Whitney U 非参数检验。采用 Pearson 相关分析法对各项参数的相关性进行分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组 HLA-DR、CD4⁺CD25⁺Treg、IL-17 及 IL-27 的表达水平比较

与 HCMV 感染非肝损组比较, 肝损组 Treg 表达减低, IL-17、IL-27 表达增高 ($P < 0.05$), 两组间 HLA-DR 水平的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2、图 1~2。

表 2 HCMV 感染患儿肝损组与非肝损组 HLA-DR、CD4⁺CD25⁺Treg、IL-17 及 IL-27 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

分组	<i>n</i>	HLA-DR (%)	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg (%)	IL-17 (pg/mL)	IL-27 (pg/mL)
非肝损组	21	32 $\pm$ 11	3.9 $\pm$ 1.6	19 $\pm$ 5	38 $\pm$ 16
肝损组	21	32 $\pm$ 10	2.7 $\pm$ 1.4	23 $\pm$ 5	50 $\pm$ 12
<i>t</i> 值		0.26	2.58	-2.55	-2.73
<i>P</i> 值		>0.05	<0.05	<0.05	<0.01

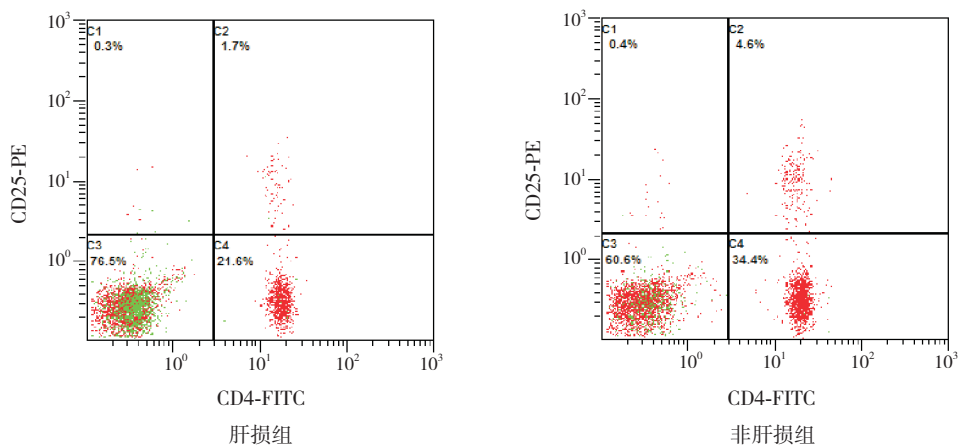


图 1 HCMV 感染患儿外周血 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞的表达 HCMV 感染肝损组的 Treg 细胞表达 (右上象限区域代表 Treg 细胞表达) 低于非肝损组。

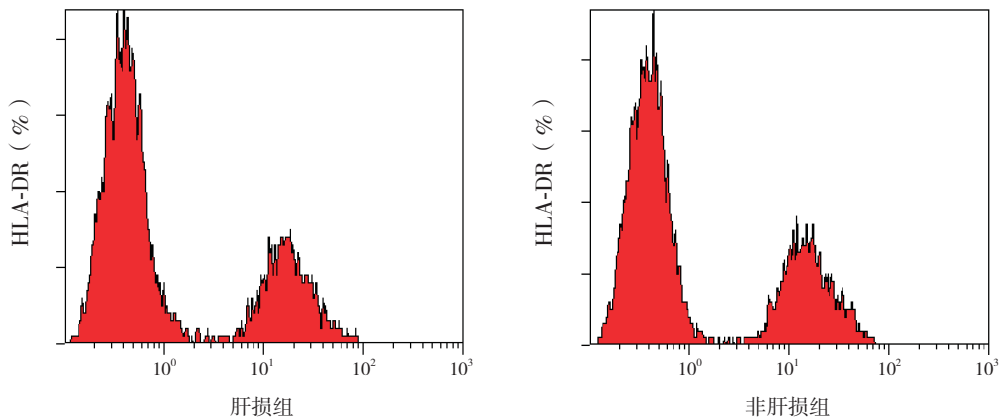


图 2 HCMV 感染肝损与非肝损患儿外周血 HLA-DR 的表达 第二波形区域即为 HLA-DR 细胞阳性表达区域。

2.2 HCMV 感染肝损患儿 IL-17、IL-27 水平与 CD4⁺CD25⁺Treg 表达的相关性分析

Pearson 相关分析显示, HCMV 感染肝损患儿

外周血 IL-17、IL-27 水平与 CD4⁺CD25⁺Treg 表达呈负相关, $P<0.05$ 。见图 3。

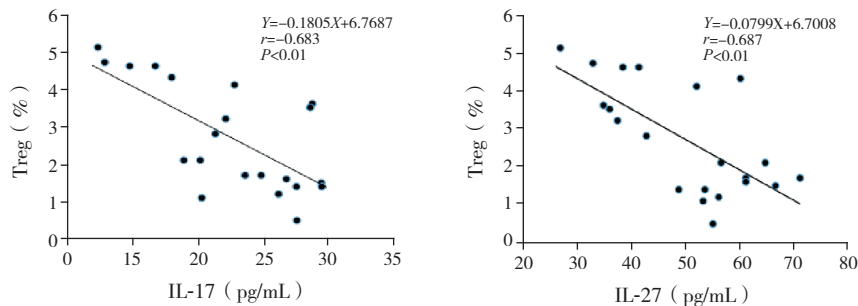


图3 HCMV 感染肝损患儿外周血 IL-17、IL-27 水平与 Treg 表达的相关性分析

3 讨论

HCMV 感染可引起多脏器损伤, 尤其以肝损害多见。目前 HCMV 感染肝损发生机制仍未完全明确, 研究表明 HCMV 并不直接损伤肝细胞, 感染后的免疫炎症反应可能是 HCMV 感染肝细胞损伤的重要因素^[3]。

CD4⁺CD25⁺Treg 细胞具有突出的免疫负调控作用, 与感染性疾病关系密切, 是维持机体免疫耐受的重要调控者^[9]。有研究发现: CMV 感染急性期 Treg 细胞比率下降, 而恢复期 Treg 细胞比例增多^[10]。郭声等^[11]发现, 乙肝患者 Treg 细胞表达随着肝损加重而降低, 表明 Treg 细胞能抑制炎症反应、减轻肝细胞损伤。郭荻等^[12]在自身免疫性肝炎患者中证明, Treg 细胞表达下降与肝损进展密切相关。本研究中巨细胞病毒感染肝损组的 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞表达较非肝损组明显降低, 与文献相符。

IL-17 由 Th17 细胞产生, 可刺激巨噬细胞、成纤维细胞、内皮细胞释放多种炎症细胞因子, 从而促进炎症发生; IL-17 的水平可反映 Th17 细胞的功能状态^[13]。Zhang 等^[14]发现慢性乙肝患者血清和肝组织的 IL-17 与 HBV-DNA、ALT 水平呈正相关, 提示 IL-17 参与了肝脏炎症反应, 诱导炎症环境下肝脏的病理损伤。另一项研究表明, HCMV 肝炎肝组织 IL-17 的表达强度与肝脏纤维化程度密切相关^[15]。而 Th17 细胞与 Treg 细胞相互抑制、相互拮抗, 抑制免疫耐受, 导致免疫失衡^[16-17]。本研究 HCMV 感染肝损组患儿的血浆 IL-17 明显高

于非肝损组, 并且 IL-17 与 Treg 细胞表达呈负相关, 与文献相符, 表明 Th17 细胞介导肝脏免疫反应增强, Th17 细胞与 Treg 细胞相互拮抗促进 HCMV 感染患儿肝损害发生。

IL-27 是 IL-6/IL-12 细胞因子家族成员之一, 是抗原提呈细胞分泌的促炎因子。IL-27 可以增强 Th1 型免疫反应, 抑制 Th2 型免疫反应, 诱导 B 细胞分化, 促进辅助性 T 细胞分化, 增强杀伤性 T 淋巴细胞活性, 增强抗病毒作用^[18-19]。IL-27 还能抑制 Treg 细胞分化, 减少 Treg 细胞数量, 抑制其免疫调节作用^[20]。有研究发现, 慢性乙肝患者 IL-27 增高程度与肝损坏的严重程度正相关, IL-27 促进乙肝病毒清除的同时可以增强肝脏的炎症反应^[21]。本研究 HCMV 感染肝损患儿血浆 IL-27 水平高于非肝损组, 而且表达水平与 Treg 细胞表达呈负相关, 提示 IL-27 抑制 Treg 细胞分化, 导致免疫耐受失衡、肝脏炎症反应增强, 促使肝损发生。

HLA-DR 作为单个核细胞活化的重要标志, 与抗原提呈能力直接相关。HLA-DR 的表达是判断免疫抑制的重要指标。有研究发现, 自身免疫性肝病患者肝组织的 HLA-DR 表达减少, 且其减低程度与转氨酶增高密切相关^[22-23]。但本研究肝损组 HLA-DR 表达水平与非肝损组的差异无统计学意义, 因此对于 HLA-DR 与 HCMV 感染肝损的关系还有待进一步研究。

综上所述, CD4⁺CD25⁺Treg 细胞介导的免疫耐受失衡及 IL-17、IL-27 等炎症因子过度激活可能参与 HCMV 感染肝功能损害的发生。

【参考文献】

- [1] 卢光全,李儒贵,谭华炳,等. 85例巨细胞病毒感染婴幼儿的临床特征[J]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版), 2017, (3): 282-286.
- [2] Zheng Q, Tao R, Gao H, et al. HCMV-encoded UL128 enhances TNF- α and IL-6 expression and promotes PBMC proliferation through the MAPK/ERK pathway in vitro[J]. Viral Immunol, 2012, 25(2): 98-105.
- [3] Griffiths P, Baraniak I, Reeves M. The pathogenesis of human cytomegalovirus[J]. J Pathol, 2015, 235(2): 288-297.
- [4] Monin L, Gaffen SL. Interleukin 17 family cytokines: Signaling mechanisms, biological activities, and therapeutic implications[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2018, 10(4): a028522.
- [5] 郭月英,李国忠. 白细胞介素-27研究进展[J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2013, 7(21): 131-133.
- [6] Vester H, Dargatz P, Huberwagner S, et al. HLA-DR expression on monocytes is decreased in polytraumatized patients[J]. Eur Med Res, 2015, 20: 84.
- [7] 中华医学会肝病学会药物性肝病学组. 药物性肝损伤诊治指南[J]. 肝脏, 2015, 20(10): 750-762.
- [8] 中华医学会儿科学分会感染学组,全国儿科临床病毒感染协作组,《中华儿科杂志》编辑委员会. 儿童巨细胞病毒性疾病诊断和防治的建议[J]. 中华儿科杂志, 2012, 50(4): 290-292.
- [9] Costantino CM, Baecher-Allan CM, Hafler DA. Human regulatory T cells and autoimmunity[J]. Eur J Immunol, 2008, 38(4): 921-924.
- [10] 李亚男,周玉峰,舒赛男,等. MCMV感染对小鼠脾细胞调节性T细胞比率和Th1/Th2转录因子T-bet/GATA-3表达的影响[J]. 中华医学杂志, 2008, 88(42): 2999-3002.
- [11] 郭声,程娜,葛善飞,等. Th17/Treg平衡在乙型肝炎重症化过程中的作用及临床意义[J]. 中华肝脏病杂志, 2016, 24(5): 341-346.
- [12] 郭荻. CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺调节性T细胞在自身免疫性肝炎中的作用研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2016.
- [13] Hemdan NY, Birkenmeier G, Wichmann G, et al. Interleukin-17-producing T helper cells in autoimmunity[J]. Autoimmun Rev, 2010, 9(11): 785-792.
- [14] Zhang JY, Zhang Z, Lin F, et al. Interleukin-17-producing CD4(+) T cells increase with severity of liver damage in patients with chronic hepatitis B[J]. Hepatology, 2010, 51(1): 81-91.
- [15] 吴海沁,赵娟娟,李捍卫,等. 肝硬化患者Th1/Th2失衡特点及其与病程进展的关系[J]. 中华肝脏病杂志, 2017, 25(10): 738-743.
- [16] Kleinewietfeld M, Hafler DA. The plasticity of human Treg and Th17 cells and its role in autoimmunity[J]. Semin Immunol, 2013, 25(4): 305-312.
- [17] Lee GR. The balance of Th17 versus Treg cells in autoimmunity[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(3): E730.
- [18] Villegas-Mendez A, de Souza JB, Lavelle SW, et al. IL-27 receptor signalling restricts the formation of pathogenic, terminally differentiated Th1 cells during malaria infection by repressing IL-12 dependent signals[J]. PLoS Pathog, 2013, 9(4): e1003293.
- [19] Lucas S, Ghilardi N, Li J, et al. IL-27 regulates IL-12 responsiveness of naïve CD4⁺ T cells through Stat1-dependent and -independent mechanisms[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(25): 15047-15052.
- [20] Hall AO, Beiting DP, Tato C, et al. The cytokines interleukin 27 and interferon- γ promote distinct Treg cell populations required to limit infection-induced pathology[J]. Immunity, 2012, 37(3): 511-523.
- [21] 左维泽,张丽丽. 乙型肝炎患者血清IL-27的检测及其意义[J]. 世界华人消化杂志, 2009, 17(3): 333-335.
- [22] Antoniadis CG, Khamri W, Abeles RD, et al. Secretory leukocyte protease inhibitor: a pivotal mediator of anti-inflammatory responses in acetaminophen-induced acute liver failure[J]. Hepatology, 2014, 59(4): 1564-1576.
- [23] 杨洋,冷静,彭丽珊,等. 慢性HBV感染者CD8⁺T细胞CD95、CD38、HLA-DR表达的变化和意义[J]. 广东医学, 2016, 37(20): 3043-3045.

(本文编辑: 俞燕)