

·临床研究·

不同病毒载量的乙型肝炎病毒在不同ALT状态下对肝星状细胞增殖、细胞周期及细胞分泌的影响

高 鹏¹, 刘才周¹, 朱陇东², 李俊峰², 于海涛¹, 姚立琼¹

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

摘 要:【目的】临床上经常以ALT是否正常等因素将乙型肝炎感染者分为乙型肝炎携带者或乙型肝炎患者, 并且以ALT $\geq$ 2UNL作为临床抗病毒治疗的适应症之一, 但是目前尚缺乏足够的文献阐明其理论学依据, 本文借助乙型肝炎病毒对肝星状细胞的影响对此进行探讨。【方法】分层随机选取不同ALT状态下不同病毒载量的慢性乙型肝炎的患者132例, 作为干扰血清。经干扰血清干预HSC后, 分别用MTT法检测HSC增殖, 流式细胞仪检测HSC细胞周期, RT-PCR和免疫印迹分别检测TGF- β 1、Smad3、Smad7、 α -SMA、collagen I、collagen III mRNA及蛋白的表达, 同时对ALT $\geq$ 2UNL的慢性乙肝患者抗病毒治疗随访24周, 对比分析治疗前后患者干扰血清对肝星状细胞的影响。【结果】在ALT正常状态下, 不同病毒载量的乙型肝炎病毒对肝星状细胞增殖、细胞周期及细胞分泌无差别性影响。而在ALT异常状态下, 特别是ALT $\geq$ 2UNL组中, 随着病毒载量的增加, HSC增殖加速, 处于G0/G1期的明显减少, 而处于S期, G2/M期的明显增多以及TGF- β 1、Smad3、Collagen I、Collagen III、 α -SMA mRNA及相应蛋白的表达明显增高, Smad7 mRNA及蛋白明显减少, 差异有统计学意义。与抗病毒治疗前相比抗病毒治疗后, 干扰血清对肝星状细胞的影响明显减弱。【结论】本文揭示了在不同ALT状态下乙型肝炎病毒对HSC的差异性影响, 并通过抗病毒治疗前后对比分析。补充说明了以ALT为节点抗病毒治疗乙型肝炎病毒的细胞学理论基础。

关键词: 乙型肝炎病毒; 病毒载量; 肝星状细胞; 细胞周期; 细胞增殖; 细胞分泌; 丙氨酸氨基转移酶

中图分类号: R512.62

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2024)06-1006-11

DOI: 10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).20241021.001

Effects of Hepatitis B Virus with Different Viral Loads at Different ALT Levels on Proliferation, Cell Cycle and Cell Secretion of Hepatic Stellate Cells

GAO Peng¹, LIU Caizhou¹, ZHU Longdong², LI Junfeng², YU Haitao¹, YAO Liqiong¹

(1. Department of Clinical Laboratory, First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, China; 2. Department of infectious disease, First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

Correspondence to: YAO Liqiong; E-mail: 2533761325@qq.com

Abstract: 【Objective】People infected with Hepatitis B are often divided into hepatitis B carriers and hepatitis B patients based on whether ALT is normal or not, and ALT $\geq$ 2UNL is one of the indications for clinical antiviral treatment, but no sufficient evidence to justify this. In order to explore the theoretical basis, the paper investigated the effects of hepatitis B virus (HBV) on hepatic stellate cells (HSCs). 【Methods】A total of 132 chronic hepatitis B patients with different viral loads and ALT levels were randomly selected as the study subjects. Of these patients, those with ALT $\geq$ 2UNL were treated with antiviral therapy and followed up for 24 weeks. The effects of HBV on HSCs before and after the treatment were compared and analyzed. HSCs proliferation was detected by MTT method, HSCs cell cycle by flow cytometry, and

收稿日期: 2024-04-17

录用日期: 2024-09-22

基金项目: 国家自然科学基金(81800528)

作者简介: 高鹏, 第一作者, 研究方向: 乙肝的免疫机制, E-mail: gp863@163.com; 姚立琼, 通信作者, 主任检验技师, 研究方向: 临床免疫方面的研究, E-mail: 2533761325@qq.com

expression of *TGF- β 1*, *Smad3*, *Smad7*, α -*SMA*, *collagen I*, *collagen III* mRNAs and corresponding proteins by RT-PCR and Western blotting, respectively.【Results】At the normal ALT level, HBV with different viral loads had no significant effect on the proliferation, cell cycle and cell secretion of the HSCs. At the abnormal ALT level, especially when ALT $\geq$ 2UNL, with the increase of virus loads, HSCs proliferation accelerated; cells in the G0 / G1 phase decreased significantly and cells in the S and G2 / M phases increased significantly; the expression of *TGF- β 1*, *Smad3*, α -*SMA*, *collagen I*, *collagen III* mRNAs and corresponding proteins increased significantly, but *Smad7* mRNA and protein expression decreased significantly, the differences were statistically significant. HBV showed a significantly lower effect on HSCs after the antiviral therapy than before.【Conclusions】This paper reveals the differential effects of HBV on HSCs at different ALT levels and presents a comparative analysis of the effects before and after the antiviral therapy, which provides a theoretical basis for identifying the ALT level as an indication for HBV antiviral therapy.

Key words: hepatitis B virus (HBV); viral loads; hepatic stellate cells (HSCs); cell proliferation; cell cycle; cell secretion; ALT

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2024, 45(6):1006-1016]

乙型肝炎病毒严重危害着人类的生命与健康,据估计,目前我国一般人群 HBsAg 流行率为 5%~6%^[1-3]。感染 HBV 后,肝脏可发生纤维化,继而进展为肝硬化,甚至肝癌。阻断肝纤维化是治疗乙肝的重要任务^[4-7]。肝星状细胞在肝纤维化的发生发展中起着关键作用。正常肝脏中 HSC 处于静止状态,位于肝细胞与肝窦内皮细胞之间的 Disse 间隙,当肝脏受损后,肝细胞、库普弗细胞(Kupffer cells, KC)、肝窦内皮细胞、血小板等分泌大量细胞因子,激活下游信号通路进而启动 HSC 核内促纤维化基因的转录,使 HSC 转化成为具有收缩性、增殖性及分泌性的肌成纤维细胞(myofibroblasts, MFB)^[8-9]。活化后的 MFB 可产生 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)以及 I、III 型胶原纤维(collagen I/III)等细胞外基质(extracellular matrix, ECM)成分,细胞外基质过度沉积与降解失衡所导致肝脏结构和功能异常改变的一种病理生理过程^[10]。HBV 感染人体后可处于不同免疫阶段,即免疫耐受期和免疫激活期。临床上常根据症状、体征以及实验室诊断特别是 ALT 正常与否加以区别对待,采用不同的治疗措施,即密切观察与积极抗病毒治疗^[11-12]。同时临床上也以 2 正常上限(Upper normal limit, UNL) $\leq$ ALT 作为抗病毒治疗的适应症之一。但是目前鲜有文献探讨在不同 ALT 状态下乙型肝炎病毒对肝星状细胞的影响,本文就此展开研究。

1 材料与方法

1.1 干扰血清的获取

分层随机选取 2023 年 1 月至 2023 年 12 月在兰州大学第一医院门诊和住院的确诊为慢性乙型肝炎的患者 132 例,男 64 例,女 26 例,年龄 18~60 岁,所选患者病例完整。经临床和实验数据分析后,确诊为乙型肝炎携带者并且 ALT 正常的 44 例(ALT < 40 U/L),其中低复制组(HBV DNA < 4.0 lg copies/mL) 14 例,中复制组(4.0 lg copies/mL $\leq$ HBV DNA < 6.0 lg copies/mL) 15 例,高复制组(HBV DNA $\geq$ 6.0 lg copies/mL) 15 例; UNL $\leq$ ALT < 2 UNL 的慢性乙型肝炎患者 43 例(40 U/L $\leq$ ALT < 80 U/L),其中低复制组(HBV DNA < 4.0 lg copies/mL) 15 例,中复制组(4.0 lg copies/mL $\leq$ HBV DNA < 6.0 lg copies/mL) 13 例,高复制组(HBV DNA $\geq$ 6.0 lg copies/mL) 15 例; ALT $\geq$ 2UNL 的慢性乙型肝炎患者 45 例(ALT $\geq$ 80 U/L),其中低复制组(HBV DNA < 4.0 lg copies/mL) 14 例,中复制组(4.0 lg copies/mL $\leq$ HBV DNA < 6.0 lg copies/mL) 16 例,高复制组(HBV DNA $\geq$ 6.0 lg copies/mL) 15 例。同时对 ALT $\geq$ 2UNL 的慢性乙型肝炎患者给予恩替卡韦(每天 0.5 mg)治疗,随访 24 周,对比分析抗病毒治疗前后患者干扰血清对肝星状细胞的影响。各组病人禁食 12 h 后,抽取血液 5 mL,离心后提取血清,保存在 -20 °C 冰箱内,作为

干扰血清留存。慢性乙型肝炎的诊断标准符合2019年慢性乙型肝炎防治指南《病毒性肝炎防治方案》。同时排除妊娠期妇女、中度和重度脂肪肝患者、酒精肝患者、药物性肝损伤患者、自身免疫性肝损伤患者、曾经接受过抗病毒治疗的患者,以及合并其他肝炎感染的患者和并发其他心血管、肾脏等重大脏器病变患者。研究对象包括患者和健康人均签署知情同意书,本试验获得兰州大学第一医院伦理委员会批准(LDYILL2023-346)。

1.2 主要仪器

荧光倒置显微镜(日本 Olympus 公司),酶标分析仪 550(美国 Bio-rad 公司),流式细胞仪 FACSCalibur(美国 Becton Dickinson 公司)荧光定量 PCR 分析仪(德国 Lightcycler ROCH 公司)

1.3 细胞株

HSC LX-2 为永生化人肝星状细胞株,由美国西奈山 Friedman 教授惠赠。

1.4 基因片段

肿瘤坏死因子 $\beta 1$ (*Tgf- $\beta 1$*)、*Smad3*、*Smad7*、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、胶原蛋白 I 型(*collagen I*)、胶原蛋白 III 型(*collagen III*),相关片段由中国上海捷瑞医用试剂有限公司合成。

1.5 主要试剂

DMEM 培养基(美国 Sigma 公司);胎牛血清(中国兰州民海生物工程有限公司);碘化丙啶(美国 Sigma 公司);考马斯亮蓝 R250(Sigma 公司);细胞周期检测试剂盒,(美国 BD 公司);

1.6 人 HSC LX-2 的培养

将 HSC LX-2 复苏后常规培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,置 37 °C, CO₂ 体积分数为 5% 的厌氧培养箱中,每 2 d 换液一次,待其融合至 85% 左右时, PBS 冲洗,胰酶消化传代培养,备后续实验用。

1.7 细胞处理及实验分组

将实验分为 9 组:(1,2,3) ALT 正常低、中、高复制组,(4,5,6) UNL $\leq$ ALT < 2 UNL 低、中、高复制组,(7,8,9) 2 UNL $\leq$ ALT 低、中、高复制组。

1.8 MTT 法检测干扰血清对 HSC 增殖的影响

选择对数生长期的细胞、弃去培养液,加入 500 μ L 2.5 g/L 的胰酶进行消化,加入等量培养液中和胰酶并离心,弃上清液,制备单细胞悬液,调整细胞浓度为 1×10^3 个/mL 后接种 96 孔板,每孔 100 μ L,12 h 贴壁后,吸去上清液,加入不同组别的

干扰血清,每孔 100 μ L,每个浓度设 3 个复孔。将各组细胞放置于 37 °C、5% 体积分数 CO₂ 饱和湿度培养箱内培养 24、48、72、96 h 后加入 5 mg/mL 的 MTT 20 μ L,4 h 后吸去上清加入 150 μ L DMSO,振荡 15 min,使用全自动酶标仪检测 490 nm 处的吸光度。

细胞增殖率 = $(D_{\text{实验组}} - D_{\text{调零组}}) / (D_{\text{对照组}} - D_{\text{调零组}}) \times 100\%$ 。

1.9 流式细胞仪分析细胞周期

将 HSC 和不同组别的干扰血清培养 72 h,倒去培养液,胰酶消化贴壁细胞,DMEM 清洗,然后加入体积分数为 70% 预冷的乙醇 5 mL 悬浮固定细胞,4 °C 过夜。加入等量的 DMEM 再洗 3 次,加入碘化丙啶试剂盒染液 200 μ L,室温避光 30 min,流式细胞仪检测,数据用美国 Verity Software House 公司设计的 MODFIT3.0 软件分析。

1.10 RT-PCR 检测 *TGF- $\beta 1$* 、*Smad3*、*Smad7*、 α -SMA、*collagen I*、*collagen III* mRNA 的表达

将 HSC 和不同组别的干扰血清培养 72 h,倒去培养液,用 DMEM 培养液洗涤 3 遍,然后再加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基继续培养 48 h。在细胞中加入 1 mL TR Izol 试剂,提取总的 RNA。弃上清,加入无 RNase 的 75% 乙醇 1 mL,离心 5 min。弃上清,干燥 RNA 沉淀 10 min,将沉淀溶于 20 μ L DEPC 水中。用逆转录试剂盒得到 cDNA,用 RT-PCR 检测相应分子的表达, *TGF- $\beta 1$* 、*Smad3*、*Smad7*、 α -SMA、*Collagen I*、*Collagen III* 和 β -actin 上下游引物见表 1。

反应体系:95 °C 1 min;95 °C 10 s,60 °C 30 s,40 个循环,以 β -actin 作为内参对照。

1.11 免疫印迹检测 *TGF- $\beta 1$* 、*Smad3*、*Smad7*、 α -SMA、*Collagen I*、*Collagen III* 蛋白的表达

将 HSC 和不同组别的干扰血清培养 72 h,倒去培养液,用 DMEM 培养液洗涤 3 遍,然后再加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基继续培养 48 h。提取细胞总蛋白测定各组细胞蛋白浓度,然后进行 SDS-PAGE 电泳、转膜,用 TBST 液室温摇床封闭 2 h,然后加入 *TGF- $\beta 1$* 、*Smad3*、*Smad7*、 α -SMA、*Collagen I*、*Collagen III*、 β -actin 抗体 4 °C 过夜,使 PVDF 膜浸泡于二抗孵育液中,通过 ECL 显色系统显色,用 BandScan 分析胶片灰度值。

1.12 统计学方法

采用 IBM SPSS 26.0 统计学软件对数据进行分

析,定量资料经正态性检验,符合正态分布数据以均数±标准差表示。采用Dunnett T3方差分析进行

统计学处理。两配对样本均数的比较采用配对样本 t 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

表1 引物序列
Table 1 Primer sequence

Gene	Forward	Reverse
<i>TGF-β1</i>	5'-TAGATGGAGGATTCCC-3' ,	5'- GATACATTCCCTGGCCTGATCCAC-3'
<i>Smad3</i>	5'- AAGTTGCGTCCTACA-3'	5'-TACTATACGTCTGATCGTATGCAG-3'
<i>Smad7</i>	5'-TGGAGAGACCCGG-3'	5'- TAGATACTTGTTAGCCTGATCCAC-3'
α -SMA	5'-GTGATGAGGATTCAGC-3' ,	5'- GATACTGTCTTGCTGATCCAC-3'
<i>Collagen I</i>	5'- AGTCAGATGTCTACATG-3'	5'-CTATATTCCATTGTCGTATGCAG-3'
<i>Collagen III</i>	5'-GTTGGAGGACCTTG-3'	5'- GCGACAACACGATCCTGAG-3'
β -actin	5'- GCATGATCAGGGTCCG-3'	5'-GCCTAACATACGACTCGACGCA-3'

2 结果

2.1 乙型肝炎病毒对HSC增殖的影响

用干扰血清干预HSC后测定4个时间段的细胞增殖率(24、48、72、96 h),以此判断干扰血清对HSC

细胞增殖的作用,结果表明ALT正常组中不同病毒载量的HBV对HSC无明显影响。而在ALT异常组中,有显著影响,在 $UNL \leq ALT < 2 UNL$ 组中,这种差异在72 h后出现,而在 $2 UNL \leq ALT$ 组中,这种差异在48 h就已出现,均具有统计学意义($P < 0.05$;表2)。

表2 乙型肝炎病毒对HSC增殖的影响
Table 2 Effects of Hepatitis B Virus on HSC Proliferation

		($\bar{x} \pm s$)				
Group		n	24 h	48 h	72 h	96 h
ALT normal	Low replication group	14	1.03±0.18	1.05±0.17	1.12±0.16	1.21±0.16
	Medium replication group	15	1.02±0.14	1.06±0.13	1.12±0.14	1.24±0.22
	High replication group	15	1.02±0.21	1.06±0.20	1.14±0.18	1.28±0.25
	F value	/	0.008	0.017	0.045	0.419
	P value	/	0.992	0.983	0.956	0.661
$UNL \leq ALT < 2 UNL$	Low replication group	15	1.09±0.15	1.19±0.16	1.65±0.25	2.16±0.47
	Medium replication group	13	1.10±0.14	1.23±0.18	1.84±0.42	3.03±0.81 [*]
	High replication group	15	1.11±0.16	1.33±0.23	2.15±0.69 [*]	4.12±1.60 ^{*#}
	F value	/	0.068	1.989	3.929	12.271
	P value	/	0.934	0.150	0.028	0.000
$2 UNL \leq ALT$	Low replication group	14	1.24±0.22	1.63±0.35	1.97±0.33	2.41±0.39
	Medium replication group	16	1.28±0.28	1.82±0.61	2.48±0.77	3.59±0.53 [*]
	High replication group	15	1.38±0.21	2.12±0.73 [*]	2.93±0.95 [*]	4.13±1.19 ^{*#}
	F value	/	1.330	2.521	6.186	18.049
	P value	/	0.275	0.092	0.004	0.000

Compared with Low replication group, ^{*} $P < 0.05$, Compared with Medium replication group [#] $P < 0.05$.

2.2 乙型肝炎病毒对HSC细胞周期的影响

用干扰血清干预HSC72h后测定不同组别细胞周期的变化,以此判断干扰血清对HSC细胞增殖周期的作用,结果表明在ALT正常组别及 $UNL \leq ALT <$

2 UNL组别中,不同病毒载量的乙型肝炎病毒对HSC细胞周期无明显影响,而对 $2 UNL \leq ALT$ 组别中,随着病毒载量的增加,处于G0/G1期的明显减少,而处于S期,G2/M期的明显增多(表3)。

表3 乙型肝炎病毒血清对HSC细胞周期的影响

Table 3 Effects of Hepatitis B Virus Serum on HSC Cell Cycle

($\bar{x} \pm s$)

Group		<i>n</i>	G0/G1	S	G2/M
ALT normal	Low replication group	14	30.62±3.06	49.41±4.54	16.36±2.29
	Medium replication group	15	29.70±3.66	48.82±5.19	17.59±2.17
	High replication group	15	28.27±3.51	50.42±4.50	17.15±2.26
	<i>F</i> value	/	1.736	0.436	1.129
	<i>P</i> value	/	0.189	0.650	0.333
$UNL \leq ALT < 2 UNL$	Low replication group	15	24.54±3.48	50.15±5.71	19.49±2.89
	Medium replication group	13	23.40±2.17	52.42±5.34	20.12±3.96
	High replication group	15	22.27±3.25	53.28±4.11	21.82±4.59
	<i>F</i> value	/	2.074	1.510	1.440
	<i>P</i> value	/	0.139	0.233	0.249
$2 UNL \leq ALT$	Low replication group	14	19.98±3.82	50.53±3.17	19.76±3.51
	Medium replication group	16	11.73±1.73*	53.66±1.60*	23.65±3.44*
	High replication group	15	7.17±1.66**	57.09±2.60**	29.40±4.54#
	<i>F</i> value	/	94.515	12.827	22.991
	<i>P</i> value	/	0.000	0.000	0.000

Compared with Low replication group, * $P < 0.05$, Compared with Medium replication group, # $P < 0.05$.

2.3 乙型肝炎病毒对肝星状细胞 *TGF-β1*、*Smad3*、*Smad7*、*Collagen I*、*Collagen III*、 α -SMA mRNA 表达的影响

用干扰血清干预HSC 72 h,换液DMEM 培养液继续培养48 h后测定不同组别细胞 *TGF-β1*、*Smad3*、*Smad7*、*Collagen I*、*Collagen III*、 α -SMA mRNA 的表达。结果表明:在ALT正常组别不同病毒载量的HBV对HSC *TGF-β1*、*Smad3*、*Smad7*、*Collagen I*、*Collagen III*、 α -SMA mRNA 表达无明显影响,而在ALT异常组中,随着病毒载量的增加 *TGF-β1*、*Smad3*、*Collagen I*、*Collagen III*、 α -SMA mRNA 的表达明显增高,*Smad7* mRNA 的表达明显下降(表4)。

2.4 乙型肝炎病毒对肝星状细胞细胞 *TGF-β1*、*Smad3*、*Smad7*、*Collagen I*、*Collagen III*、 α -SMA 蛋白表达的影响

用干扰血清干预HSC 72 h,换液DMEM 培养液继续培养48 h后测定不同组别细胞 *TGF-β1*、

Smad3、*Smad7*、*Collagen I*、*Collagen III*、 α -SMA 蛋白表达差异的影响。结果表明:在ALT正常组别不同病毒载量的HBV对肝星状细胞 *TGF-β1*、*Smad3*、*Smad7*、*Collagen I*、*Collagen III*、 α -SMA 蛋白表达无明显影响,而在ALT异常组中,随着病毒载量的增加 *TGF-β1*、*Smad3*、*Collagen I*、*Collagen III*、 α -SMA 蛋白的表达明显增加,*Smad7* 蛋白的表达明显下降,差异有统计学意义(表5)。

2.5 恩替卡韦抗病毒治疗前后乙型肝炎病毒学指标的变化

对ALT $\geq 2UNL$ 的45例慢性乙肝患者给予恩替卡韦(0.5 mg/d)治疗,随访24周,观察抗病毒治疗前后乙型肝炎病毒学指标的变化,结果表明:HBV DNA明显下降,由 5.07 ± 1.36 下降为 3.79 ± 1.11 ,具有统计学意义($P < 0.05$)。HBV-DNA完全应答率为71.11%,部分应答率为82.22%,HBeAg血清学转换率为22.22%,有1例病人发生HBsAg的阴转,阴转率为2.22%(表6)。

表4 乙型肝炎病毒对肝星状细胞 *TGF-β1*、*Smad3*、*Smad7*、*Collagen I*、*Collagen III*、 α -SMA mRNA 表达的影响Table 4 Hepatitis B virus induced hepatic stellate cells *TGF-β*, *Smad3*, *Smad7*, *Collagen I*, *Collagen III*, α -SMA mRNA expression

		mRNA expression							($\bar{x} \pm s$)
Group		<i>n</i>	<i>TGF-β1</i>	<i>Smad3</i>	<i>Smad7</i>	<i>Collagen I</i>	<i>Collagen III</i>	α -SMA	
ALT normal	Low replication group	14	5.81±1.46	4.74±1.07	6.59±2.04	3.66±0.71	4.28±0.80	2.61±0.58	
	Medium replication group	15	5.45±1.51	4.70±1.25	6.66±1.91	3.74±0.61	4.31±1.03	2.81±0.49	
	High replication group	15	5.87±1.39	4.99±1.24	7.32±1.76	3.76±0.54	4.59±0.73	2.73±0.82	
	<i>F</i> value	/	0.355	0.253	0.650	0.094	0.577	0.349	
	<i>P</i> value	/	0.703	0.777	0.527	0.911	0.566	0.708	
UNL≤ALT <2 UNL	Low replication group	15	5.74±0.90	5.18±0.66	5.89±0.54	5.57±0.88	7.42±1.11	3.83±0.93	
	Medium replication group	13	7.59±1.02*	6.22±1.20*	5.20±0.39*	6.69±0.60*	8.43±1.57*	5.30±1.17*	
	High replication group	15	8.94±0.86*#	7.28±1.25*#	4.49±0.53*#	7.89±1.27*	9.48±1.07*#	7.39±1.06*#	
	<i>F</i> value	/	45.511	14.596	30.236	21.477	10.078	43.177	
	<i>P</i> value	/	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
2 UNL≤ALT	Low replication group	14	10.07±1.86	8.36±1.59	4.58±0.82	12.17±2.44	13.03±2.32	10.37±1.19	
	Medium replication group	16	13.11±3.16*	11.07±1.81*	3.53±1.10*	16.45±3.11*	18.75±5.33*	14.63±2.68*	
	High replication group	15	15.65±3.96*#	14.08±2.71*#	2.40±0.75*#	22.93±4.15*#	24.22±4.23*#	19.10±3.16*#	
	<i>F</i> value	/	11.426	27.08	20.687	38.738	25.471	43.733	
	<i>P</i> value	/	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	

Compared with Low replication group, * $P < 0.05$, Compared with Medium replication group # $P < 0.05$.表5 乙型肝炎病毒对肝星状细胞 *TGF-β1*、*Smad3*、*Smad7*、*Collagen I*、*Collagen III*、 α -SMA 蛋白表达的影响Table 5 Hepatitis B virus induced hepatic stellate cells *TGF-β1*, *Smad3*, *Smad7*, *Collagen I*, *Collagen III*, α -SMA protein expression

		protein expression							($\bar{x} \pm s$)
Group		<i>n</i>	<i>TGF-β1</i>	<i>Smad3</i>	<i>Smad7</i>	<i>Collagen I</i>	<i>Collagen III</i>	α -SMA	
ALT normal	Low replication group	14	6.51±1.06	4.73±1.03	6.72±1.36	3.93±1.17	4.60±0.96	2.77±0.82	
	Medium replication group	15	7.06±1.23	4.70±1.07	6.47±1.65	4.15±1.84	5.01±1.19	2.71±0.86	
	High replication group	15	6.89±0.92	4.73±1.26	6.52±1.47	4.04±1.28	4.70±1.54	3.23±1.12	
	<i>F</i> value	/	0.976	0.003	0.117	0.087	0.416	1.362	
	<i>P</i> value	/	0.385	0.997	0.890	0.917	0.663	0.268	
UNL≤ALT <2 UNL	Low replication group	15	7.48±1.16	5.62±0.98	6.58±1.02	6.03±1.28	7.76±1.25	3.39±1.02	
	Medium replication group	13	9.89±1.98*	7.58±1.36*	5.17±1.08*	8.20±1.70*	8.99±1.19*	5.70±1.51*	
	High replication group	15	11.44±2.04*#	9.84±1.37*#	3.76±1.01*#	9.93±1.89*#	10.67±1.56*#	7.08±1.54*#	
	<i>F</i> value	/	19.255	43.401	27.871	21.349	17.552	27.527	
	<i>P</i> value	/	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
2 UNL≤ ALT	Low replication group	14	11.30±2.04	9.67±1.55	4.21±0.73	11.74±3.48	12.03±2.39	11.24±1.90	
	Medium replication group	16	14.70±2.60*	11.94±1.81*	3.44±1.08*	16.17±4.19*	16.70±5.21*	14.65±3.46*	
	High replication group	15	18.72±1.64*#	16.26±2.75*#	2.54±0.88*#	20.92±6.22*#	21.89±6.33*#	20.92±5.93*#	
	<i>F</i> value	/	43.659	37.013	12.064	13.336	14.211	20.632	
	<i>P</i> value	/	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	

Compared with Low replication group, * $P < 0.05$, Compared with Medium replication group, # $P < 0.05$.

表 6 恩替卡韦抗病毒治疗前后乙型肝炎病毒学指标的变化					
Table 6 Changes in Virological Indicators of Hepatitis B before and after Antiviral Treatment with Entecavir					
(n=45, $\bar{x} \pm s$)					
Group	HBV DNA (lg copies/mL)	HBV-DNA Complete response rate (%, n)	HBV-DNA Partial response rate (%, n)	HBeAg Seroconversion rate (%, n)	HBsAg Negative conversion rate(%, n)
Before treatment	5.07±1.36	—	—	—	—
After Treatment	3.79±1.11	71.11(32)	82.22(37)	22.22(4/18)	2.22(1)
t value	7.364	—	—	—	—
P value	0.000	—	—	—	—

2.6 抗病毒治疗前后干扰血清对HSC增值的影响

对ALT≥2UNL的45例慢性乙肝患者给予恩替卡韦(每天0.5 mg)治疗,随访24周,对比分析抗病毒治疗前后患者干扰血清对肝星状细胞增殖的影响。结果表明,在培养的4个时间段(24、48、72、96 h)治疗后的干扰血清对HSC的增殖效应均小于治疗前的干扰血清,差异有统计学意义($P<0.05$;表7)。

2.7 抗病毒治疗前后干扰血清对HSC细胞周期的影响

用抗病毒治疗前后患者干扰血清干预HSC72 h后测定治疗前后细胞周期的变化,以此判断干扰血清对HSC细胞增周期的作用,结果表明经抗病毒治疗后,更多的细胞处于G0/G1期,而处于S期,G2/M期的细胞明显减少,差异有统计学意义($P<0.05$;表8)。

表 7 抗病毒前后干扰血清对HSC增值的影响				
Table 7 Effects of serum interference before and after antiviral treatment on HSC proliferation (n=45, $\bar{x} \pm s$)				
Group	24 h	48 h	72 h	96 h
Before treatment	1.30±0.24	1.86±0.61	2.47±0.82	3.40±1.05
After treatment	1.16±0.13	1.36±0.22	1.56±0.24	2.08±0.50
t value	5.197	6.443	8.732	13.637
P value	0.000	0.0000	0.0000	0.000

表 8 抗病毒前后干扰血清对HSC细胞周期的影响			
Table 8 Effects of serum interference before and after antiviral treatment on HSC cell cycle (n=45, $\bar{x} \pm s$)			
Group	G0/G1	S	G2/M
Before treatment	12.64±5.85	53.82±3.62	24.36±5.46
After treatment	16.75±4.43	47.97±3.36	17.05±3.01
t value	-8.968	10.157	10.364
P value	0.000	0.000	0.0000

2.8 抗病毒治疗前后干扰血清对肝星状细胞TGF-β1、Smad3、Smad7、Collagen I、Collagen III、α-SMA mRNA表达的影响

用抗病毒治疗前后患者干扰血清干预

HSC72 h后,换液DMEM培养液继续培养48 h后测定不同组别细胞TGF-β1、Smad3、Smad7、Collagen I、Collagen III、α-SMA mRNA的表达。结果表明:经抗病毒治疗后,细胞TGF-β1、Smad3、Collagen

I、Collagen III、 α -SMA mRNA 的表达明显下降, Smad7 mRNA 的表达明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$;表9)。

2.9 抗病毒治疗前后干扰血清对肝星状细胞 TGF- β 1、Smad3、Smad7、Collagen I、Collagen III、 α -SMA 蛋白表达的影响

用抗病毒治疗前后患者干扰血清干预

HSC 72 h 后,换液 DMEM 培养液继续培养 48 h 后测定不同组别细胞 TGF- β 1、Smad3、Smad7、Collagen I、Collagen III、 α -SMA 蛋白的表达。结果表明:经抗病毒治疗后,细胞 TGF- β 1、Smad3、Collagen I、Collagen III、 α -SMA 蛋白的表达明显下降,Smad7 蛋白的表达明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$;表10)

表9 抗病毒治疗前后干扰血清对肝星状细胞 TGF- β 1、Smad3、Smad7、Collagen I、Collagen III、 α -SMA mRNA 表达的影响

Table 9 Interference serum on hepatic stellate cell before and after antiviral therapy TGF- β 1, Smad3, Smad7, Collagen I, Collagen III α -SMA mRNA expression (n=45, $\bar{x} \pm s$)

Group	TGF- β 1	Smad3	Smad7	Collagen I	Collagen III	α -SMA
Before treatment	13.01 $\pm$ 3.81	11.23 $\pm$ 3.10	3.48 $\pm$ 1.25	17.27 $\pm$ 5.47	18.80 $\pm$ 6.13	14.79 $\pm$ 4.31
After treatment	10.32 $\pm$ 2.26	8.46 $\pm$ 2.09	4.48 $\pm$ 1.19	12.03 $\pm$ 2.85	12.19 $\pm$ 3.04	8.32 $\pm$ 3.17
t value	7.529	11.845	-11.687	10.241	11.907	23.460
P value	0.000	0.000	0.0000	0.000	0.000	0.000

表10 抗病毒治疗前后干扰血清对肝星状细胞 TGF- β 1、Smad3、Smad7、Collagen I、Collagen III、 α -SMA 蛋白表达的影响

Table 10 Interference serum on hepatic stellate cell before and after antiviral therapy TGF- β 1, Smad3, Smad7, Collagen I, Collagen III, α -SMA proteins expression (n=45, $\bar{x} \pm s$)

Group	TGF- β 1	Smad3	Smad7	Collagen I	Collagen III	α -SMA
Before treatment	14.98 $\pm$ 3.67	12.67 $\pm$ 3.41	3.38 $\pm$ 1.12	16.380 $\pm$ 5.98	16.98 $\pm$ 6.30	15.68 $\pm$ 5.69
After treatment	10.74 $\pm$ 3.03	8.03 $\pm$ 3.03	4.81 $\pm$ 0.97	10.56 $\pm$ 4.45	10.74 $\pm$ 4.70	8.94 $\pm$ 3.88
t value	23.166	27.897	-16.707	18.211	19.823	19.144
P value	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

3 讨论

乙型肝炎病毒感染是一个全球性健康问题。感染 HBV 后,肝脏可发生纤维化,肝纤维化是慢性肝病向肝硬化进展的中间环节。如不及时治疗,肝纤维化反复进展,可发生肝硬化甚至肝癌^[13-15]。纤维化是肝损伤过程中细胞外基质过度沉积与降解失衡所导致肝脏结构和功能异常改变的一种病理生理过程^[16-18]。肝星状细胞活化是肝纤维化发生发展的核心环节。HSC 活化成具有收缩、分泌以及增殖活性的肌成纤维细胞(myofibroblast, MFB),表达 α -SMA 以及 Collagen I/III 等细胞外基质成分^[179-20]。ECM 的过度沉积使肝脏组织的原有结构被破坏,最终引起以肝功能失代偿和门脉高压为表

现的肝硬化。一般认为早期 HF 是一个可逆的过程,但是当其持续进展产生肝硬化及肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)时,肝脏结构和功能会发生不可逆损害,甚至威胁患者的生命^[21-22]。

同时乙型肝炎病毒感染人体后,可处于不同的免疫阶段,即免疫抑制期和免疫激活期。在免疫抑制期,病毒与机体达成一种平衡,患者多无明显临床症状与体征,肝脏活检多显示肝脏炎症轻微,肝脏汇管区及其周围仅有轻度的或不明显的炎症坏死和纤维化。生化指标多为正常或轻度增高,ALT 多为正常或轻度增高。对该期病人,临床上多以密切观察为主,而不采用抗病毒治疗^[23-25]。而在免疫激活期,病毒与机体反复斗争,机体病理性免疫反应强烈,患者多出现厌食,乏力,恶心、腹胀、肝区疼

痛等症状。肝脏活检多显示肝脏炎症明显,肝脏汇管区及其周围有中度甚至重度的炎症坏死和纤维化。生化指标多出现明显异常,ALT多为异常甚至2倍以上增高。对该期病人,临床上多以积极抗病毒治疗为主,并取得了明显的疗效^[26-28]。同时临床上也以ALT $\geq$ 2 UNL作为抗病毒治疗的适应症之一^[29]。

但是目前就不同ALT状态下乙型肝炎病毒对肝星状细胞的生理功能的影响尚缺乏相关的研究,本文就此研究分析。结果可见在ALT正常状态下,不论载量高低,乙型肝炎病毒干扰血清对肝星状细胞的影响无明显差别,结合当前文献大致认为,在此阶段,机体免疫系统对病毒大致控制与耐受,此时免疫细胞未活化,细胞因子,内毒素等活性介质与毒素释放不多,对机体损害不大,故而在此阶段即使病毒水平很高,但是并未使肝星状细胞活化,肝星状细胞无明显增殖,细胞多数停留在G0/G1期,处于静止期,释放出的胶原蛋白也无明显差别。故而也支持临床上对此类病人采用密切观察,而不进行积极抗病毒治疗^[30-32]。而对于ALT异常病人,特别是ALT $\geq$ 2 UNL的病人,本文研究结果显示,随着病毒载量的增加,乙型肝炎病毒对肝星状细胞的影响有差异性的表现,随着病毒载量的增加,肝星状细胞明显被活化,表现为增殖活跃,更多的细胞处于复制分裂期,释放出更多的胶原蛋白,TGF- β /smads通路明显被激活,表示肝星状细胞活化的指标 α -SMA明显增高。结合当前文献大致认为如下:①T淋巴细胞失衡,CD4+T淋巴细胞数量下降,CD8+T淋巴细胞数量增加,Th1细胞数量及其分泌的细胞因子IL-2, IFN- γ 明显增加,Th2细胞数量及其分泌的细胞因子IL-4, IL-10明显减少,并且这种免疫失衡与病毒载量成相关性联系,表明病毒载量越高,机体的T淋巴细胞与之对抗越强烈,机体损伤越强烈^[33-34]。②B淋巴细胞失衡,有文献报道在此阶段,病毒载量越高,B淋巴细胞释放的免疫性介质如IgG, IgM, IgA等越多,故而对机体造成的病理性免疫损伤越强烈^[35]。③自然杀伤性细胞、树突状细胞大量被激活,释放出大量免疫活性物质从而对机体造成损害,并且这种释放与病毒载量高低有密切联系^[36]。④肠道中内毒素等血管活性物质大量进入血液对肝脏也造成损伤。同时随着病毒载量的增加,这些炎性介质,免疫介质,内毒素等的大量释放也对肝细胞、库普弗细胞、肝窦内皮细

胞、血小板等造成活化,他们通过释放大量细胞因子或以旁分泌等的方式激活肝星状细胞^[37-38],故而在本实验中表现为随着病毒载量的增加,肝星状细胞被大量活化,细胞增殖活跃,G0/G1的细胞明显减少而S期G2/M期的细胞明显增加。TGF- β /smads通路明显被激活,TGF- β 蛋白对肝星状细胞有明显的激活效应,它的生成增加一方面反映了肝星状细胞的活化,另一方面它又刺激了肝星状细胞的进一步活化。而Smad3是TGF- β /smads家族中的正性调节因子,它的增多又进一步促进了肝星状细胞的活化,而Smad7 TGF- β /smads家族中的负性调节因子,它的减少削弱了对肝星状细胞活化的抑制作用。胶原蛋白Collagen I Collagen III生成增多,表明更多的细胞外基质生成加速了肝纤维化的进程^[39-40]。

同时本文对ALT $\geq$ 2UNL的45例慢性乙肝患者给予恩替卡韦(每天0.5 mg)治疗,随访24周,对比分析抗病毒治疗前后患者干扰血清对肝星状细胞的影响。结果表明恩替卡韦有很好的抗病毒作用,同时抗病毒治疗前后患者干扰血清对肝星状细胞的影响有明显差异。相对于治疗前,治疗后的干扰血清对肝星状细胞的影响更小,细胞增殖变慢,更多的细胞处于G0/G1期,处于S期G2/M期的细胞明显减少,细胞活化指标 α -SMA明显降低,信息通路TGF- β /smads的活化减弱,胶原蛋白Collagen I Collagen III的生成减少。以上均表明通过抗病毒治疗,可以减弱机体的病理性免疫反应,从而明显减弱乙型肝炎病毒对肝星状细胞的活化作用,减弱肝纤维化的进展,同时本文从ALT分组和对ALT $\geq$ 2UNL的病人随访治疗两个方面进行实验观察进一步阐明了以ALT为节点抗病毒治疗乙型肝炎的理论意义。

同时应该指出的是,结合本文实验数据与当前文献研究。随着ALT的增高,肝星状细胞被活化,增殖活跃,更多的细胞处于复制分裂期,释放出更多的胶原蛋白,TGF- β /smads通路明显被激活,表示肝星状细胞活化的指标 α -SMA明显增高。这是因为乙型肝炎病毒反复攻击肝脏细胞,肝脏炎症反应明显,细胞破坏过多,释放出更多的炎性介质,内毒素等,这些物质促进肝星状细胞活化。在同一层次的ALT状态下比较乙型肝炎病毒对肝星状细胞的影响才更有意义。

综上所述,本文从①肝星状细胞增殖,②细胞

周期,③活化指标 α -SMA,④TGF- β /smads 信息通路,⑤胶原蛋白的产生5个角度阐明了在不同ALT状态下乙型肝炎病毒对肝星状细胞的影响,从而补

充说明了以ALT为节点抗病毒治疗乙型肝炎的细胞学理论机制,从而为临床诊治乙型肝炎提供了理论补充。

参考文献

- [1] Wang FS, Fan JG, Zhang Z. The global burden of liver disease: the major impact of China[J]. *Hepatology*, 2014, 60(6): 2099-2118.
- [2] Cooke GS, Andrieux-Meyer I. Accelerating the elimination of viral hepatitis: a Lancet Gastroenterology & Hepatology Commission [J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2019, 4(2): 135-184.
- [3] Liu LZ, Sun J, Hou J, et al. Improvements in the management of chronic hepatitis B virus infection [J]. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2018, 12(11):1153-1166.
- [4] Liu J, Liang W, Jing W, et al. Countdown to 2030: eliminating hepatitis B disease [J]. *Chin Bull World Health Organ*, 2019, 97(3):230-238.
- [5] Seto WK, Lo YR, Pawlotsky JM, et al. Chronic hepatitis B virus infection[J]. *Lancet*, 2018, 39(10):2313-2324.
- [6] Sarin SK, Kumar M. Asian-Pacific clinical practice guidelines on the management of hepatitis B: a 2015 update [J]. *Hepatol Int*, 2016, 10(1):1-98.
- [7] 时克,张群,黄云义,等.抗肝纤维化治疗对乙型肝炎肝硬化患者发生肝癌的影响[J]. *中华肝脏病杂志*, 2021, 29(7): 685-689.
Shi K, Zhang Q, Huang YY, et al. Effects of anti-liver fibrosis treatment on the occurrence of liver cancer in patients with hepatitis B-related liver cirrhosis[J]. *Chin J Hepatol*, 2021, 29(7):685-689.
- [8] Chen HY, Chen ZX, Huang RF. Hepatitis B virus X protein activates human hepatic stellate cells through upregulating TGF β 1[J]. *Genet Mol Res*, 2014, 13(4):8645-8656.
- [9] Feng G, Zhang JY, Zeng QL. Interleukin-21 mediates hepatitis B virus-associated liver cirrhosis by activating hepatic stellate cells [J]. *Hepatol Res*, 2014, 44(10): 198-205.
- [10] Zan Y, Zhang Y, Tien P. Hepatitis B virus e antigen induces activation of rat hepatic stellate cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 435(3):391-396.
- [11] Ferrari C. HBV and the immune response [J]. *Liver Int*, 2015, 35(8):121-128.
- [12] Wu J, Han M, Li J, et al. Immunopathogenesis of HBV Infection[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2020, 1179(33):71-107.
- [13] Ginzberg D, Wong RJ, Gish R. Global HBV burden: guesstimates and facts [J]. *Hepatol Int*, 2018, 12(4): 315-329.
- [14] Shouval D, Shibolet O. Immunosuppression and HBV reactivation [J]. *Semin Liver Dis*, 2013, 33(2): 67-77.
- [15] 朱亭亭,李正鑫,袁杰,等.慢性肝病不同肝纤维化阶段的肝脏体积及其病理变化特点[J]. *中华肝脏病杂志*, 2024, 32(6):517-524.
Zhu TT, Li ZX, Yuan J, et al. Characteristics of liver volume and pathological changes with different stages of liver fibrosis in chronic liver disease [J]. *Chin J Hepatol*, 2024, 32(6): 517-524.
- [16] Boeijen LL, Hoogveen RC, Boonstra A, et al. Hepatitis B virus infection and the immune response: The big questions [J]. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2017, 31(3): 265-272.
- [17] Tseng TC, Kao JH. Treating Immune-tolerant Hepatitis B [J]. *Viral Hepat*, 2015, 22(2):77-84.
- [18] Rehmann B, Thimme R. Insights from antiviral therapy into immune responses to hepatitis B and C virus infection [J]. *Gastroenterology*, 2019, 156(2): 369-383.
- [19] Shi J, Zhao J, Zhang X, et al. Activated hepatic stellate cells impair NK cell anti-fibrosis capacity through a TGF- β -dependent emperipolesis in HBV cirrhotic patients [J]. *Sci Rep*, 2017, 22(7): 523-535.
- [20] Yu G, Mu H, Zhou H, et al. MicroRNA-361 suppresses the biological processes of hepatic stellate cells in HBV-related hepatic fibrosis by NF- κ B p65 [J]. *Cells Dev*, 2021, 67(18): 3711-382.
- [21] Bai Q, An J, Wu X, et al. HBV promotes the proliferation of hepatic stellate cells via the PDGF-B/PDGFR- β signaling pathway in vitro [J]. *Int J Mol Med*, 2012, 30(6): 43-50.
- [22] Liu X, Tu Y, Deng X, et al. The S protein of hepatitis B virus promotes collagen type I expression in hepatic stellate cells by virtue of hepatocytes [J]. *Biomed Rep*, 2014, 2(1):97-100.
- [23] Chang KM, Liu M. Chronic hepatitis B: immune pathogenesis and emerging immunotherapeutics [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2016, 21(6): 93-105.
- [24] Godbert B, Petitpain N, Lopez A. Hepatitis B reactivation and immune check point inhibitors [J]. *Dig Liver Dis*, 2021, 53(4):452-455.
- [25] Mazzaro C, Adinolfi LE. Extrahepatic manifestations of chronic HBV infection and the role of antiviral therapy [J]. *J Clin Med*, 2022, 11(21):247-258.
- [26] Gogoi D, Borkakoty B, Biswas D, et al. Activation and

- exhaustion of adaptive immune cells in hepatitis B infection [J]. *Viral Immunol*, 2015, 28(7): 348–353.
- [27] Vyas AK, Lslam M, Garg G. Humoral immune responses and hepatitis B infection [J]. *Dig Dis*, 2021, 39(5): 516–525.
- [28] Lee HW, Chan HL. Unresolved issues of immune tolerance in chronic hepatitis B [J]. *J Gastroenterol*, 2020, 55(4): 383–389.
- [29] Vyas AK, Jindal A, Hissar S. Immune balance in hepatitis B infection: present and future therapies [J]. *Scand J Immunol*, 2017, 86(1):4–14.
- [30] Zhang YY, Hu KQ. Rethinking the pathogenesis of hepatitis B virus (HBV) infection [J]. *J Med Virol*, 2015, 87(12): 1989–1999.
- [31] Kuipery A, Gehring AJ, Isogawa M. Mechanisms of HBV immune evasion [J]. *Antiviral Res*, 2020, 179(21): 816–825.
- [32] Pierra Rouviere C, Dousson CB, Tavis JE. HBV replication inhibitors[J]. *Antiviral Res*, 2020, 181(33): 565–572.
- [33] You J, Zhuang L, Zhang YF. Peripheral T-lymphocyte subpopulations in different clinical stages of chronic HBV infection correlate with HBV load[J]. *World J Gastroenterol*, 2009, 85(27): 82–93.
- [34] Gao P, Luo Y, Chen L, et al. The effect of hepatitis B virus on T lymphocyte and its subsets in chronic hepatitis B patients in different ALT stages: a new concept ALT in HBV infection [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 105(12):301–312
- [35] Tan L, Wu ZQ, Zhao C. A perspective of the relationship of serum HBV DNA and HBsAg apportioned by the same hepatic parenchyma cell volume with inflammation in the natural history of chronic hepatitis B [J]. *Ann Palliat Med*, 2021, 10(2): 1388–1395.
- [36] Wu JF, Chang MH. Natural history of chronic hepatitis B virus infection from infancy to adult life – the mechanism of inflammation triggering and long-term impacts [J]. *J Biomed Sci*, 2015, 18(10), 312–321.
- [37] Stănculeț N, Grigoraș A, Avădanei R. Relationship between Kupffer cells, inflammation, and fibrosis in chronic hepatitis B and C[J]. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi*, 2013, 117(4): 880–889.
- [38] Mou H, Wu S, Zhao G, et al. Changes of Th17/Treg ratio in the transition of chronic hepatitis B to liver cirrhosis and correlations with liver function and inflammation [J]. *Exp Ther Med*, 2019, 17(4): 2963–2968.
- [39] Martín-Vílchez S, Sanz-Cameno P. The hepatitis B virus X protein induces paracrine activation of human hepatic stellate cells[J]. *Hepatology*, 2008, 47(6):1872–1883.
- [40] Chu CM, Shyu WC, Liaw YF. Comparative studies on expression of alpha-smooth muscle actin in hepatic stellate cells in chronic hepatitis B and C [J]. *Dig Dis Sci*, 2008, 53(5):1364–1369.

(编辑 孙慧兰)