

IL-18在慢性HBV感染后不同转归患者 肝脏组织中的表达及意义

郜玉峰, 汤磊, 潘高峰, 殷宏娟, 叶珺, 邹桂舟, 李旭 (安徽医科大学第二附属医院 肝病科, 合肥 230601)

摘要: 目的 探讨白细胞介素-18 (IL-18) 的表达与慢性HBV感染后不同疾病转归患者的相关性及其临床意义。方法 收集230例慢性HBV感染后不同疾病患者肝脏组织和临床资料, 采用半定量SP免疫组织化学法检测HBV感染者肝组织中IL-18的表达情况, 并与患者的临床生物化学指标、肝脏炎症分级和纤维化分期进行比较, 分析肝组织中IL-18表达与上述指标的相关性。结果 IL-18在肝组织中以肝细胞胞质表达为主, 半定量分析结果显示, 在健康者、CHB、肝硬化、HBV相关性肝癌患者肝组织中的IL-18表达, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); IL-18在HBV感染者肝组织中的表达与ALT水平、肝脏炎症及纤维化程度均呈正相关 ($r = 0.184, 0.169, 0.085, P = 0.015, 0.021, 0.032$)。结论 IL-18表达强弱与HBV感染的免疫发病机制有关, IL-18参与了HBV感染的慢性化和疾病的转归。

关键词: 白细胞介素-18; 乙型肝炎病毒; 免疫组织化学; 疾病进展

Expression and clinical significance of interleukin-18 in the liver tissues of CHB patients with different prognosis

GAO Yu-feng, TANG Lei, PAN Gao-feng, YIN Hong-juan, YE Jun, ZOU Gui-zhou, LI Xu (Department of Hepatopathy, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601, China)

Abstract: Objective To investigate the relationship and clinical significance between interleukin 18 (IL-18) expression in liver tissues and CHB patients with different prognosis. **Methods** Total of 230 CHB patients in the Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University were enrolled. The tissue specimens were obtained by liver biopsy from all patients, and 21 normal liver specimens were also collected as controls. The liver function and liver inflammation grades and fibrosis stages were assessed. Immunohistochemical method was used to detect the expression of IL-18 in liver tissues. Spearman rank correlation was used to analyze the correlations between IL-18 expression and the above indicators. **Results** IL-18 was mainly expressed in the cytoplasm of hepatocytes. The difference of IL-18 expression level between CHB patients and healthy people has statistically significance ($P < 0.05$). In patients with HBV infection, the expressions of IL-18 are gradually increased with elevated levels of alanine aminotransferase, aggravating the degrees of inflammation and fibrosis ($r = 0.184, 0.169, 0.085$, all $P < 0.05$). **Conclusions** The expression of IL-18 may be involved in liver injury and disease progression in CHB.

Key words: Interleukin-18; Hepatitis B virus; Immunohistochemistry; Disease progression

乙型肝炎病毒感染后不同疾病转归的机制一直是国内外肝病研究领域的热点。免疫反应导致的病理损伤始终贯穿于HBV感染的发生、发展及转归, 在这个过程中涉及多种免疫细胞及其分泌的细胞因

子, 白细胞介素-18 (interleukin-18, IL-18) 是其中重要的一种。在慢性HBV感染者血清的研究中发现, IL-18表达的水平高低与疾病进展快慢、病情严重程度及转归有着重要作用, 但其尚不能真实反映IL-18在肝脏组织中的表达水平。本研究采用免疫组化的半定量检测方法直接观察IL-18在HBV感

染者肝组织中的表达情况,探讨IL-18在HBV感染不同疾病阶段的表达及意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择2010年1月至2013年6月本院肝病科行肝组织活检的慢性HBV感染者196例和在普外科行肝癌手术患者34例,共230例,记录入组患者的各项临床资料。入组患者按照临床诊断类型分为CHB组147例、肝硬化组49例、肝癌组34例。230例患者包括男性153例,女性77例,年龄13~70岁,平均年龄(32.15 ± 10.24)岁。另选择本院同期行手术切除的肝血管瘤患者21例为对照组。各组患者性别、年龄等一般资料差异均无统计学意义,具有可比性。

1.2 疾病诊断标准 疾病诊断均符合《病毒性肝炎防治方案》^[1]。入组条件包括①HBV感染>6个月;②TBil < 34.2 $\mu\text{mol/L}$;③HBV DNA定量>1000拷贝/ml;④既往无抗病毒治疗;⑤排除其他嗜肝病毒感染、酒精性肝病、非酒精性脂肪性肝病及自身免疫性肝病;⑥入组前3个月未使用任何抗病毒药物及甘草酸类、双环醇和五味子类降酶药物等。

1.3 临床指标检测 采用罗氏Cobas全自动电化学发光免疫分析系统检测乙型肝炎病毒标志物,试剂由罗氏诊断试剂有限公司提供;采用实时荧光定量PCR法检测HBV DNA,试剂由上海复兴生物高科技有限公司提供,HBV DNA最低下限为 1×10^3 拷贝/ml;采用美国Beckman BX 800全自动生化仪及其试剂检测肝功能。

1.4 病理组织检查 肝组织活检采用1秒钟快速穿刺活检术,肝组织长度一般在1.5~2 cm,样本先用4%甲醛溶液固定,酒精脱水、石蜡包埋以及常规组织切片,苏木精-伊红(HE)及网状纤维染色,光学显微镜多视野观察,依据2011年《慢性乙型肝炎防治指南》^[2]的诊断标准进行病理分级。

1.5 IL-18表达的检测 石蜡包埋样本进行4 μm 连续切片,作HE、Mason、VG、网状纤维染色,显微镜下观察。免疫组织化学染色采用SP方法进行,按照试剂盒说明书操作(SP试剂盒购自福州迈新生物技术开发公司)。设阳性对照(福州迈新公司提供标准阳性

片),以磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作为阴性对照。IL-18一抗为兔抗人单克隆抗体(购自美国Santa Cruz生物技术有限公司,工作浓度为1:200)。

1.6 结果判断 在显微镜下观察,肝脏实质细胞胞膜或细胞质内棕黄色颗粒为阳性结果。依据参考文献^[3]根据染色深度及阳性细胞数,按下列方法进行综合半定量分析:染色强度(以多数细胞的呈色反应为判断依据)的计分标准按阴性0分,弱阳性染色为1分,阳性(中等强度)染色为2分,强染色为3分;阳性细胞计分按阴性(未见阳性细胞)为0分,<50%为1分,50%~80%为2分,>80%为3分。两者综合判断将表达分为4级,即阴性为(-)为0分,弱阳性(+)为1~2分,阳性(2+)为3~4分,强阳性(3+)为5~6分。

1.6 统计学处理 采用SPSS 16.0软件和Excel 2003进行统计处理,分类资料采用 χ^2 检验及Spearman秩相关分析。各检验水平中 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IL-18在HBV感染者肝组织中的表达特点 IL-18在肝脏组织中以肝细胞的细胞质表达为主,在CHB中以弱阳性表达为主,肝硬化以弱阳性、阳性表达为主,肝癌的阳性、强阳性及阴性表达者较CHB和肝硬化均有所增多,差异有统计学意义($P < 0.05$);其中CHB组与对照组比较,IL-18表达差异更显著($P < 0.01$),见图1、表1。

2.2 不同炎症分级HBV感染者肝组织中IL-18表达 随着炎症程度的加重,IL-18在患者肝组织中的表达逐渐增强($r = 0.169$, $P = 0.021$),呈明显正相关关系,见表2。

2.3 不同纤维化分级HBV感染者肝组织中IL-18表达 同炎症分级一致,IL-18在HBV感染者肝组织中的表达随着纤维化程度加重而逐渐增强($r = 0.085$, $P = 0.032$),见表3。

2.4 不同ALT水平HBV感染者肝组织中IL-18的表达 Pearson相关性分析显示,IL-18表达与ALT水平呈正相关,随着ALT升高,IL-18的表达明显增强, $r = 0.184$, $P = 0.015$,见表4。

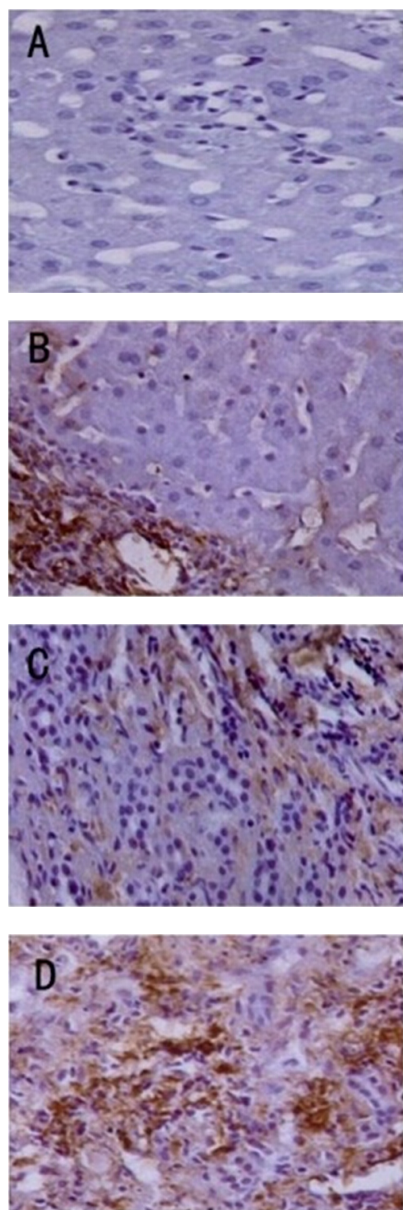


图1 IL-18在CHB肝脏组织的表达情况(DAB染色, 400×)

注: A: IL-18阴性表达的肝组织; B: IL-18弱阳性表达的肝组织;
C: IL-18阳性表达的肝组织; D: IL-18强阳性表达的肝组织

3 讨论

HBV感染后, 体内若能诱发强烈的免疫反应则可加快病毒的清除, 表现为急性活动或自限性治愈倾向; 反之免疫反应较弱, 不能够彻底清除病毒或者部分清除, 则病毒形成慢性持续性感染^[4]。IL-18是一种强有力的免疫调节因子, 之所以能够导致肝脏发生免疫损伤, 主要通过Th1细胞因子组成的细胞因子级联。人体感染HBV后, IL-18参加Th1和Th2免疫应答受到某些条件的限制, 其中机体的免疫环境起到主导作用, 如其他相关细胞因子水平

等。Li等^[5]发现IL-12水平下降时, IL-18倾向于参与体内的Th2免疫应答, 清除HBV能力明显降低, 从而表现为慢性感染。除了体内IL-12以及IL-18的水平降低因素外, 还有如HBV发生变异等, 均使体内的Th1/Th2应答中的Th2反应明显上调, 极大程度的抑制机体的细胞免疫功能, 抗病毒能力必然下降, 形成HBV的持续感染以及最终的一系列不同的转归结果。

有研究^[6]表明, 外在与内在的相关因素导致肝脏屏障功能损害是慢性重型乙型肝炎的重要发病机制。一旦肝脏屏障保护受到破坏, 极容易形成内毒素血症。尤其来自肠源性, 能够明显诱发机体产生大量的细胞因子及炎症介质, 常见有IL-6、IL-18、内皮素及NO、TNF- α 等, 由于TNF- α 又可以使得IL-6和IL-18产生增加, 彼此形成相互不断增强的正反馈效应, 从而导致肝脏炎症程度不断加重, 病情持续恶化。另一方面对于重型肝炎患者肝脏合成及代谢功能明显下降, 对这些细胞因子的清除减少, 最后结局为体内的细胞因子水平升高^[7,8]。研究发现^[9]在健康人群、慢性乙型肝炎患者、慢性重型乙型肝炎患者血清中IL-18的表达水平逐渐升高, 而且3组相比较差异均有统计学意义。刘曦东等^[10]研究发现, 血清IL-18水平与肝脏炎症程度密切相关, 与ALT、AST和TBil水平均呈正相关。说明炎症程度越重, IL-18水平越高。本实验结果与上述血清结果具有一致性。

HBV感染后期常伴有严重的内毒素血症, IL-18可能会借助内毒素为中间媒介使得体内的Th1型细胞因子产生增加, 如IFN- γ 、IL-8、TNF- α 等, 肝脏炎症进一步加重, 直至形成肝硬化^[11]。在小鼠模型研究中, 亦得出IL-18能够诱发Con-A诱导的肝纤维化。王淑琴等^[12]通过研究表明, 肝硬化患者其IL-18的表达明显高于健康者及慢性乙型肝炎者, 且在肝硬化病程的不同阶段中, 其表达也具有明显差异。在Child-Pugh A、Child-Pugh B、Child-Pugh C级3组肝硬化患者血清IL-18水平差异亦有统计学意义(P 均 < 0.05)^[13]。Fimotto等^[14]通过转基因技术, 将转基因的IL-18小鼠和野生型小鼠进行观

表 1 HBV感染后不同阶段肝组织内IL-18的表达[例(%)]

疾病谱	IL-18在肝内组织的表达强度			
	-	+	2+	3+
CHB组 (n = 147)	36 (24.5)	98 (66.7)	10 (6.8)	3 (2.0)
肝硬化组 (n = 49)	6 (12.2)	28 (57.1)	10 (20.4)	5 (10.2)
肝癌组 (n = 34)	2 (5.9)	11 (32.3)	15 (44.1)	6 (17.6)
对照组 (n = 21)	4 (19.5)	4 (19.5)	5 (23.8)	8 (38.1)

表 2 肝组织内IL-18的表达与肝脏炎症分级的关系[例(%)]

炎症分级	IL-18在肝内组织的表达强度		
	-	+	2+ ~ 3+
G ₀ ~ G ₁ (n = 147)	29 (19.7)	103 (70.1)	15 (10.2)
G ₂ (n = 65)	14 (21.5)	22 (33.8)	29 (44.6)
G ₃ ~ G ₄ (n = 18)	1 (5.6)	12 (66.7)	5 (27.8)

表 3 肝组织内IL-18的表达与肝脏纤维化分期的关系[例(%)]

纤维化分期	IL-18在肝内组织的表达强度		
	-	+	2+ ~ 3+
S ₀ ~ S ₁ (n = 164)	24 (14.6)	109 (66.5)	31 (18.9)
S ₂ (n = 53)	18 (40.0)	22 (41.5)	13 (24.5)
S ₃ ~ S ₄ (n = 13)	2 (15.4)	6 (46.2)	5 (38.5)

表 4 HBV感染者肝组织内IL-18的表达与ALT水平的关系[例(%)]

ALT	IL-18在肝内组织的表达强度		
	-	+	2+ ~ 3+
< 40 U/L (n = 99)	22 (22.2)	55 (55.6)	22 (22.2)
≥ 40 U/L且≤ 80 U/L (n = 81)	17 (21.0)	51 (63.0)	13 (16.0)
> 80 U/L (n = 50)	5 (10.0)	31 (62.0)	14 (28.0)

察, 经过一段时间观察后, 评估两组小鼠的一般情况, 得出转基因的IL-18小鼠很快出现严重的肝功能损害, 机体抵抗力进行性下降, 生存时间较野生型小鼠明显缩短。同时进一步研究发现, 在这些经过转基因的IL-18小鼠肝脏组织中, 汇管区以及间质发生了程度较重的纤维化和大量的胶原增生。这与本研究的实验结果一致。这些研究结果均进一步证实了IL-18在肝硬化的发生发展过程中起着重要的作用。

HBV慢性感染后病情持续进展, 最终部分患者肝脏细胞癌变, 导致HCC。IL-18是一种具有多种生物学功能的细胞因子, 尤其具有重要的抗肿瘤作用。IL-18能通过促进体内NK细胞的增殖和活化进行抑制肿瘤生长, 当效应细胞的FasL与靶细胞的Fas相结合时, 则会导致靶细胞的快速凋亡, 抑

制肿瘤细胞的复制^[15-16]。张鲁勤等^[17]通过在恶性肿瘤患者化疗后补充血浆内的IL-18, 观察到体内的IL-2及IFN- γ 等细胞因子表达明显上调, NK细胞杀伤肿瘤细胞的活性明显增强, 一定程度上抑制肿瘤的生长及转移。本研究发现, IL-18在肝癌组织中明显呈强阳性表达, 与上述研究结果一致。因此, IL-18表达水平与肝癌的形成可能密切相关。

本研究显示, 对于IL-18在慢性乙型肝炎、肝炎肝硬化及原发性肝癌患者的肝脏组织中的表达差异有显著统计学意义, 提示HBV感染后的慢性进展过程中, IL-18通过直接或间接的途径发挥着重要作用。本研究的不足之处在于 IL-18只是许多参与免疫反应的细胞因子之一, IL-18与其他相关细胞因子如IL-12、IL-10在肝脏组织中表达的相互关系有待于深入的研究。

参考文献

- [1] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会, 肝病学会联合修订. 病毒性肝炎防治方案[J]. 中华肝脏病学杂志, 2000, 8: 324-329.
- [2] 中华医学会肝病学会, 中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2010年版)[J]. 中国肝脏病杂志(电子版), 2011, 3: 40-56.
- [3] Chia CS, Ban K, Ithnin H, et al. Expression of interleukin-18, interferon-gamma and interleukin-10 in hepatocellular carcinoma[J]. Immunol Lett, 2002, 84: 163-172.
- [4] Chen Z, Cao J, Liao X, et al. Plasmids enriched with CpG motifs activate human peripheral blood mononuclear cells in vitro and enhance Th-1 immune responses to hepatitis B surface antigen mice[J]. Viral Immunol, 2011, 24: 199-209.
- [5] Li W, Kubo S, Okuda A, et al. Effect of IL-18 on expansion of ganmulelta T cells stimulated by zoledronate and IL-12[J]. J Immunother, 2010, 33: 287-296.
- [6] 杨朝晖, 高峰, 张培会. 重型肝炎内毒素与细胞因子及细胞免疫的相关性[J]. 实用医药杂志, 2006, 23: 516-519.
- [7] Zou Z, Li B, Zhang Z, et al. Imbalanced intrahepatic cytokine expression of interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-10 in patients with acute-on-chronic liver failure associated with Hepatitis B virus infection[J]. J Clin Gastroenterol, 2009, 43: 182-190.
- [8] Burra P, Martin ED, Senzolo M. Evaluation of graft and recipient risk factors in liver transplantation[J]. Digest Liver Dis, 2009, 3: 108-111.
- [9] Leifeld L, Nattermann J, Fielenbach M, et al. Intrahepatic activation of caspases in human fulminant hepatic failure[J]. Liver Int, 2006, 26: 872-879.
- [10] 刘曦东. 乙肝患者外周血IL-18、TGF- β_1 、ALT、TBIL、HBV DNA定量测定及分析[J]. 山东医药, 2011, 51: 66-67.
- [11] 冯冰, 龙尧, 罗清逢. HBV感染者血清IL-18、IL-18BP水平及外周血单个核细胞mRNA的表达[J]. 广东医学院学报, 2007, 28: 232-234.
- [12] 王淑琴, 王建勇, 陈永谦, 等. 乙型肝炎后肝硬化患者血清IL-18和IL-10水平检测的临床意义[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2013, 34: 1894-1895.
- [13] 郭娜, 贾德兴, 王万鹏, 等. 乙型肝炎肝硬化患者血清中IL-18, IL-18BP和IFN的水平变化及临床意义[J]. 潍坊医学院学报, 2010, 32: 342-344.
- [14] Finolo S, Siebler J, hausding M, et al. Severe hepatic injury in interleukin 18 transgenic mice: a key role for IL-18 in regulating hepatocyte apoptosis in vivo[J]. Gut, 2004, 53: 392-400.
- [15] Tamura T, Nishi T, Goto T. Combination of IL-12 and IL-18 of electrogene therapy synergistically inhibits tumor growth[J]. Anticancer Res, 2003, 23: 1173-1179.
- [16] Moore MB, Kurago ZB, Fullenkamp CA, et al. Squamous cell carcinoma cells differentially stimulate NK cell effector functions: the role of IL-18[J]. Cancer Immunol Immunother, 2003, 52: 107-115.
- [17] 张鲁勤, 郭玉琳, 姜岩. 恶性肿瘤患者血浆白介素-18的变化及临床意义[J]. 中国临床医学, 2003, 10: 327-328.

收稿日期: 2014-04-14

· 消息 ·

本刊关于论文著作权的说明

《中国肝脏病杂志(电子版)》为中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会主管、人民卫生出版社主办、人民卫生电子音像出版社出版的国家级医学科技期刊。为了保护作者和杂志的合法权益, 避免引起著作权纠纷, 根据《中华人民共和国著作权法》和相关法律法规, 遵照人民卫生出版社相关规定, 在本刊刊登文章的作者(著作权人)必须在文章刊登前签署《人民卫生出版社系列杂志论文著作权转让协议书》, 否则不予采用。特此声明。

本刊《人民卫生出版社系列杂志论文著作权转让协议书》详见<http://zggbzz.j-ditan.com/> 下载专区栏目。

本刊编辑部