

IL-17在慢性乙型肝炎患者血清中的表达及其与肝炎肝硬化的相关性研究

杜文军, 陈士俊, 邢直直, 秦来英 (济南市传染病医院, 济南 250021)

摘要: 目的 研究IL-17在慢性乙型肝炎患者血清中的表达并探讨其与肝炎肝硬化的相关性。方法 用双抗体夹心ELISA法测定34例慢性乙型肝炎、32例肝炎肝硬化、26例慢性重型乙型肝炎患者及20例健康对照者血清中的IL-17水平, 同时检测不同Child-Pugh分级肝炎肝硬化患者血清IL-17的表达。结果 各组患者与健康对照者血清IL-17的浓度均有显著性差异。肝硬化和慢性乙型肝炎组、重型肝炎组有显著差异 ($P < 0.01$), 慢性乙型肝炎组与重型肝炎组之间无显著统计学差异 ($P = 0.348$); Child-Pugh B级、C级患者与A级患者相比, 血清中IL-17的表达差异有显著统计学意义 ($P < 0.01$)。结论 IL-17与慢性乙型肝炎的发生以及肝纤维化之间可能有密切关系。
关键词: 慢性乙型肝炎; 白细胞介素-17; 肝硬化; 肝纤维化

The expression of IL-17 in patients with chronic HBV infection and its relation to liver cirrhosis

DU Wen-jun, CHEN Shi-jun, XING Zhi-zhi, QIN Lai-ying (Jinan Infectious Diseases Hospital, Jinan 250021, China)

Abstract: Objective To study the expression of IL-17 in patients with chronic HBV infection and its relationship to liver cirrhosis. **Methods** IL-17 in sera of 34 cases of liver cirrhosis, 32 cases of chronic hepatitis B, 26 cases of chronic severe hepatitis and 20 cases of healthy control were measured by double antibody sandwich ELISA, respectively. The expression of IL-17 in patients with liver cirrhosis based on score of Child-Pugh were also measured. **Results** The expression of IL-17 in patients with chronic HBV infection was higher than those in healthy controls ($P < 0.01$). The expressions of IL-17 in patients with liver cirrhosis showed statistical significant among different groups based developing on score of Child-Pugh. **Conclusions** IL-17 may play an important role in chronic HBV infection and development of liver fibrosis.
Key words: Chronic hepatitis B; IL-17; Liver cirrhosis; Liver fibrosis

IL-17是一种主要由活化的CD4⁺ T细胞产生的致炎细胞因子, 具有强大的免疫致病性, 可以促进T细胞激活和刺激成纤维细胞、内皮细胞、巨噬细胞、上皮细胞产生多种致炎因子(包括IL-1、IL-6、TNF- α 、NOS-2、金属蛋白酶和化学趋活素), 导致炎症的发生^[1,2]。本研究通过测定慢性乙型肝炎(HBV)、肝硬化、慢性重型肝炎患者以及不同Child-Pugh分级的肝硬化患者血清中IL-17水平来探讨IL-17与慢性HBV感染的关系及其在肝硬化过程中的可能的作用。

1 资料和方法

1.1 研究对象

所有病例均为济南市传染病医院

通讯作者: 陈士俊 Email: crbdwj@126.com

2006年11月至2007年2月的住院患者, 共92例, 其中慢性乙型肝炎患者34例, 男26例, 女8例, 平均年龄(30.65 ± 14.26)岁, 轻度慢性乙型肝炎患者6例, 中度慢性乙型肝炎患者26例, 重度慢性乙型肝炎患者2例、肝硬化患者32例, 男22例, 女10例, 平均年龄(52.06 ± 11.39)岁、慢性重型乙型肝炎患者26例, 男22例, 女4例, 平均年龄(46.08 ± 7.48)岁。健康对照者20例, 男12例, 女8例, 平均年龄(33.8 ± 11.68)岁, 均为本院健康体检者。乙型肝炎肝硬化患者Child-Pugh A级8例, 男6例, 女2例, 平均年龄(49.08 ± 8.41)岁, Child-Pugh B级12例, 男8例, 女4例, 平均年龄(51.24 ± 9.25)岁, Child-Pugh C级12例, 男8

例,女4例,平均年龄(55.86 ± 7.59)岁。诊断均依据2000年(西安)中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学会联合修订的《病毒性肝炎防治方案》^[3]的诊断标准,所有病例在3个月内均未经免疫调节剂及抗病毒治疗、未接受长时间保肝治疗,并排除合并其他肝炎病毒感染、酒精性肝炎、免疫性疾病。

1.2 IL-17检测 采用双抗体夹心ELISA法进行,所用试剂为R&D公司生产的人IL-17 ELISA试剂盒(敏感度 > 15 pg/ml)。采集患者及正常人外周血1000转/分钟离心15分钟,取血清冻存于 -70°C 。实验前,准备好血清、不同浓度的标准品(31.25 pg/ml倍增至 500 pg/ml及 1000 pg/ml),从冰箱中取出试剂盒平衡至室温。准备好板条,先向每孔中加入 100 μl 实验缓冲液RD1-36,然后将标准品或血清标本(100 μl)连续不间断地加入相应孔内(时间控制在15分钟内),封板、常温下反应3小时后洗板4次;按先前的加入顺序依次向每孔加入 200 μl 酶标记的IL-17结合物,封板、常温下反应1小时后,洗板4次,再向每孔加入 200 μl 酶的作用底物,封板常温下反应30分钟(避光),然后洗板4次;每孔再加入 50 μl 终止液,当孔中液体颜色由蓝变黄后,测量 A_{450} 值(30分钟内)。每个标准品和标本的A值都减去零浓度孔的A值,根据标准品的浓度和A值绘出标准曲线,求出标准方程,然后通过每个标本的A值计算出其浓度。

1.3 统计学处理 采用SPSS 11.0软件对数据进行

t 检验、方差分析,所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

各组患者与健康对照者血清IL-17的浓度均有显著性差异。肝硬化和慢性乙型肝炎组、重型肝炎组有显著差异($P < 0.01$),慢性乙型肝炎组与慢性重型肝炎组之间($P = 0.348$)无统计学差异(表1)。Child-Pugh B级、C级患者与A级患者相比,血清中IL-17的表达差异有显著统计学意义($P < 0.01$)(表2)。

3 讨论

IL-17通过诱导NF- κB 的产生促进炎症细胞因子的转录^[4],促进IL-1、IL-6、TNF- α 、NOS-2、PGE-2、金属蛋白酶和化学趋活素、IL-8、MCP-1、Gro- α 的产生,并可刺激造血细胞因子G-CSF和GM-CSF的产生,引起粒单核细胞系的增生,诱导ICAM-1在细胞表面的表达,促进炎症的发生^[5,6]。大量研究发现上述IL-17介导免疫反应都与慢性乙型肝炎患者的肝脏炎症有相当密切的关系。慢性乙型肝炎及肝硬化患者IL-6、TNF- α 、IL-8、ICAM-1等炎症因子的表达都是增加的,并与乙型肝炎肝脏损伤程度密切相关,血清水平随着肝损程度加重^[7-9],提示IL-17可能与慢性乙型肝炎的炎症发生有密切关系。

IL-17在慢性乙型肝炎患者中表达增高的可能原因如下:病毒性肝炎发生时,对病毒的清除主要依靠Tc细胞,而Tc细胞需依赖Th1细胞的辅佐

表1 慢性HBV感染者血清中IL-17的表达

组别	IL-17 (pg/ml)	P值(与对照组相比)	P值(与肝硬化组相比)
对照	27.63 ± 8.54	-	0.00**
慢性乙型肝炎	38.97 ± 11.45	0.01*	0.00**
肝硬化	63.32 ± 21.34	0.00**	-
重型肝炎	46.16 ± 14.99	0.00**	0.00*

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

表2 不同肝硬化分级的患者血清中IL-17的表达

Child-Pugh分级	IL-17 (pg/ml)	P(与A级比较)	P(与B级比较)
A级	50.64 ± 8.66		0.00
B级	62.75 ± 8.13	0.00	
C级	76.57 ± 8.09	0.00	0.00

才能充分发挥作用。慢性HBV感染时Tc细胞应答弱, Th1、Th2总量和Th1/Th2的比率低下, 使HBV不能得到清除, 导致持续感染。IL-17主要由活化的一种新发现的CD4⁺ T细胞亚群——Th17细胞产生, IL-17是该群细胞的特征细胞因子, 血清中的IL-17从一定程度上反映了Th17细胞的数量与功能情况^[10-12]。慢性乙型肝炎患者体内Th1、Th2数量少, 功能低下^[13], 对Th17的抑制减弱^[11, 12], 慢性乙型肝炎患者由于肝组织的炎性反应, 被激活的肝脏间质细胞大量表达TGF- β , TGF- β 对IL-17的分化发育具有非常重要的作用。TGF- β 与IL-6共同作用可启动CD4⁺初始T细胞向Th17细胞的迅速分化^[14-16], 在TGF- β 存在的情况下, IFN- γ 、IL-4产生不足、不能有力地抑制Th17细胞的分化成熟, 从而导致Th17细胞的大量分化成熟, 进而产生IL-17A (IL-17)、IL-17F、IL-6促进肝脏慢性炎症反应, 并易导致其他器官免疫疾病的发生。

本研究发现肝硬化组IL-17水平显著升高, 提示IL-17可能在肝纤维化的发生发展中起重要作用。TGF- β_1 、TNF- α 及IL-6均参与了肝纤维化的形成过程, 并相互相互作用形成正反馈循环, 加剧肝纤维化的进程^[17-20]。IL-17与TGF- β 、TNF- α 、IL-6、IL-1等与肝纤维化相关的细胞因子之间存在密切关系, 结合本研究结果可以推断IL-17可能在促进肝纤维化进展中具有重要作用。有研究发现IFN- γ 有抗肝纤维化的作用^[20], 这与IFN- γ 抑制Th17的分化、表达的发现一致。

从本研究可以推断, IL-17与慢性乙型肝炎炎症的发生、尤其是肝纤维化的发生发展之间可能存在密切关系, 通过对其之间关系的研究可有助于进一步了解慢性乙型肝炎的发病机制、预测肝脏病变的进展、并寻找新的治疗靶点。

参考文献

- [1] Kolls JK, Lindén A. Interleukin-17 family members and inflammation [J]. *Immunity*, 2004, 21: 467-476.
- [2] Nakae S, Saijo S, Horai R, et al. IL-17 production from activated T cells is required for the spontaneous development of destructive arthritis in mice deficient in IL-1 receptor antagonist [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 5986-5990.
- [3] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案[S]. *中华肝病杂志*, 2000, 8: 324-329.
- [4] Hata K, Andoh A, Shimada M, et al. IL-17 stimulates inflammatory responses via NF-kappaB and MAP kinase pathways in human colonic myofibroblasts [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2002, 282: 1035-1044.
- [5] Jovanovic DV, Di Battista JA, Martel-Pelletier J, et al. IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-1b-eta and TNF-alpha, by human macrophages [J]. *J Immunol*, 1998, 160: 3513-3520.
- [6] Hata K, Andoh A, Shimada M, et al. IL-17 stimulates inflammatory responses via NF-kappaB and MAP kinase pathways in human colonic myofibroblasts [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2002, 282: 1035-1044.
- [7] 季伟, 王惠芬, 冯传前, 等. 慢性乙型肝炎患者血清及外周血单个核细胞培养上清细胞因子-10的检测及临床意义[J]. *中华传染病杂志*, 1999, 7: 211-213.
- [8] 罗清逢, 彭希琳, 高孝慈, 等. 慢性乙型肝炎患者血清 ICAM-1、TNF- α 和 IL-8 水平的检测及意义[J]. *中国现代医学杂志*, 2002, 12: 39-40.
- [9] 邵祥稳, 李克勤, 王秀卿, 等. 慢性重型肝炎患者肠道菌群、血浆内毒素相关性研究与微生态制剂的调节[J]. *中国现代医学杂志*, 2002, 12: 54-55.
- [10] Infante-Duarte C, Horton HF, Byrne MC, et al. Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells [J]. *J Immunol*, 2000, 165: 6107-6115.
- [11] Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, et al. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages [J]. *Nat Immunol*, 2005, 6: 1123-1132.
- [12] Park H, Li Z, Yang XO, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17 [J]. *Nat Immunol*, 2005, 6: 1133-1141.
- [13] Freeman AJ, Marinos G, French RA, et al. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection [J]. *Immunol Cell Biol*, 2001, 79: 515-536.
- [14] Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, et al. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage [J]. *Nature*, 2006, 441: 231-234.
- [15] Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, et al. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells [J]. *Immunity*, 2006, 24: 179-189.
- [16] Bettelli E, Carrier Y, Gao W, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells [J]. *Nature*, 2006, 441: 235-238.
- [17] Weiner FR, Giambrone MA, Czaja MJ, et al. Ito-cell gene expression and collagen regulation [J]. *Hepatology*, 1990, 11: 111-117.
- [18] 高春芳, 孔宪涛, 范列英, 等. 细胞因子对3T3细胞、肝细胞及脂肪细胞增殖的影响[J]. *中国免疫学杂志*, 1994, 10: 114.
- [19] Roeb E, Graeve L, Hoffmann R, et al. Regulation of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 gene expression by cytokines and dexamethasone in rat hepatocyte primary cultures [J]. *Hepatology*, 1993, 18: 1437-1442.
- [20] 沈建中, 张复春, 易俊卿. 干扰素- γ 与干扰素- α 治疗慢性乙型肝炎中抗肝纤维化作用的对比研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2003, 15: 1207-1209.

收稿日期: 2007-12-26