

· 临床论著 ·

白细胞介素-17A 表达水平与 HBV 相关肝病的相关性分析

汪美华 章幼奕 吴月平 邹美银 朱勇根 陈萍 沈娟 李雪梅 黄松平

【摘要】 目的 探讨不同类型的乙型肝炎病毒(HBV)相关性肝病患者外周血中白细胞介素(IL)-17A 的表达及其与 HBV 相关肝病的关系。**方法** 应用流式细胞术检测 93 例 HBV 相关肝病患者(慢性肝炎 21 例,肝硬化 21 例,肝衰竭 23 例,原发性肝癌 28 例)和 15 例健康对照者外周血中 IL-17A;分析 IL-17A 在不同类型 HBV 相关性肝病中的变化及其与 ALT、AST、TBil、ALB、PT、HBsAg、HBeAg、HBV DNA 等指标的相关性;分析 IL-17A 对患者预后的预测价值。**结果** 肝癌患者血清中 IL-17A 水平显著高于慢性肝炎、肝硬化、肝衰竭及健康对照组($P < 0.05$);肝衰竭组 IL-17A 水平显著高于肝硬化和健康对照组($P = 0.000$);轻、中、重慢性肝炎患者血清中 IL-17A 水平差异无统计学意义。失代偿期肝硬化组 IL-17A 水平显著高于代偿期肝硬化组($P = 0.000$);死亡患者血清 IL-17A 显著高于病情好转患者($P = 0.036$)。IL-17A 对死亡预测的 C-statistic 值为 0.726;IL-17A 与 AST、TBil 呈正相关;与 ALT、PT、ALB 无显著相关性;与 HBsAg 呈负相关,与 HBeAg 呈正相关;而与 HBV DNA 无显著相关性。**结论** IL-17A 在肝衰竭、失代偿期肝硬化、肝癌患者中显著升高,与相关反映炎症程度的指标及 HBsAg、HBeAg 存在相关性。IL-17A 可作为反映 HBV 相关性肝脏炎症损伤程度的指标之一,可预测患者的预后。

【关键词】 肝脏疾病;肝炎病毒,乙型;IL-17A

The correlation between serum interleukin-17A and hepatitis B virus related liver diseases WANG Mei-hua, ZHANG You-yi, WU Yue-ping, ZOU Mei-yin, ZHU Yong-gen, CHEN Ping, SHEN Juan, LI Xue-mei, HUANG Song-ping. Department of Infectious Diseases, The Third Hospital of Nantong, Nantong 226006, China

Corresponding author: WANG Mei-hua, Email: wmh85834876@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the expression of serum interleukin-17A (IL-17A) in hepatitis B virus (HBV) related liver diseases and explore the relationship between IL-17A and HBV related liver diseases. **Methods** Peripheral blood was collected from 93 patients with HBV related liver diseases, including 21 cases of chronic hepatitis (CH), 21 cases of liver cirrhosis (LC), 23 cases of liver failure (LF), 28 cases of primary hepatocyte cancer (HCC). Total of 15 healthy persons were recruited as controls. The levels of IL-17A were detected by flow cytometry. Changes of IL-17A in different HBV related liver diseases, the correlations between IL-17A and ALT, AST, TBil, ALB, PT, HBsAg, HBeAg, HBV DNA and the predictive value of IL-17A for prognosis were analyzed, respectively. **Results** The level of IL-17A in HCC was significantly higher than that in CH, LC, LF and controls groups ($P < 0.01$). The level of IL-17A in LF was significantly higher than that in LC and controls ($P = 0.000$). There was no significant difference among mild, middle or severe CH; IL-17A in decompensated LC was higher than that in compensated LC group ($P = 0.000$). In addition, the deaths' IL-17A was significantly higher than that in improved patients' ($P = 0.036$). The area of ROC for death predication was 0.726. Positive correlations were found between IL-17A and AST, TBil, HBeAg, respectively. Negative correlation was found between IL-17A and HBsAg. No correlation was found between IL-17A and ALT, PT, HBV DNA. **Conclusions** The levels of serum IL-17A in HBV related LF, decompensated LC, HCC increased significantly. It was correlated with some other markers of inflammation, HBsAg and HBeAg. Hence, IL-17A could become one kind of marker reflexing inflammation and injury of liver in HBV related liver diseases, which may be used to

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2012.03.012

基金项目:南通市社会发展项目(No. S2010046)

作者单位:226006 南通市,南通市第三人民医院感染科

通讯作者:汪美华,Email:wmh85834876@163.com

predict the prognosis of patients.

【Key words】 Liver disease; Hepatitis B virus; Interleukin-17A

全世界约 3.5 亿人口为慢性乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 感染者^[1]; 在中国, 随着疫苗接种等预防措施的实施, 感染人群较以往明显减少, 但 1~59 岁人群 HBsAg 阳性约为 7.18%^[2]。多项研究表明, HBV 感染致肝脏损伤过程中, 有 CD8⁺ T 淋巴细胞、树突状细胞、调节性 T 淋巴细胞、自然杀伤性细胞等多种免疫细胞参与其免疫应答过程^[3-7]。白细胞介素 (Interleukin, IL)-17A 是一种新近发现的细胞因子, 主要由辅助性 T 细胞 17 (T help cell 17, Th17) 分泌^[8-9], 有研究表明, IL-17A、Th17 细胞与 HBV 感染后引起的免疫反应损伤和组织损伤有关^[10], 但针对 HBV 相关性肝病患者中血清 IL-17A 水平变化, 国内报道尚少。本研究针对 HBV 相关性慢性肝炎 (chronic hepatitis, CH)、肝硬化 (liver cirrhosis, LC)、肝衰竭 (liver failure, LF)、肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 患者外周血中 IL-17A 的变化及其与反映肝脏损伤程度相关指标的关系进行了初步研究, 现报道如下。

资料与方法

一、研究对象

选择 2011 年 1 月至 2011 年 10 月本院住院的 HBV 相关性肝病患者 93 例, 其中男性 74 例, 女性 19 例, 年龄 23~66 岁, 中位年龄 45 岁。HBV 相关性 CH 患者 21 例; LC 患者 21 例; LF 患者 23 例; HCC 患者 28 例。入选病例经治疗后病情好转患者为 70 例, 死亡或病情恶化自动出院的为 23 例。所有病例诊断均符合《病毒性肝炎防治方案》^[11]、《肝衰竭诊疗指南》^[12] 和《慢性乙型肝炎防治指南》^[2], 同时排除合并 HCV、HIV、真菌、细菌等其他病原体感染以及自身免疫性肝病。随机抽取 15 例健康体检者作为对照组 (normal controls, NCs), 其中男性 9 例, 女性 6 例, 年龄 22~65 岁。

二、方法

1. 标本收集: 入选病例均于入院后第 2 天清晨自肘静脉采取空腹血标本约 1 ml, 分离血清置于

-70℃ 冰箱内, 集中用于检测 IL-17A。同步留取血清标本测定丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST)、总胆红素 (total bilirubin, TBil)、白蛋白 (albumin, ALB)、凝血酶原时间 (prothrombin time, PT)、HBsAg、HBeAg 和 HBV DNA 等指标。

2. IL-17A 的检测: IL-17A 细胞因子的检测使用 Eplcs-XL-4 流式细胞仪, 通过流式细胞术检测血清中 IL-17A 水平, 严格按照产品说明书的要求进行。调试仪器于最佳状态, 对珠子设门, 获取 10 个标准珠子, 应用产品配套软件分析数据。试剂盒及相关软件均由美国 BD 公司提供。

3. 肝功能、PT、HBsAg、HBeAg、HBV DNA 等指标检测: 采用 7170A 型全自动生化分析检测 ALT、AST、TBil、ALB 等肝功能指标, 试剂盒为上海科华公司产品; BE COMPACT-X 型血凝仪检测 PT, 试剂盒为 Biopool International 公司产品; AXSYM 化学发光仪检测 HBsAg、HBeAg, 试剂盒为 Abbott 公司产品; ABI7500 荧光 PCR 仪检测 HBV DNA, 试剂购自上海科华公司。

三、统计学处理

应用 SPSS 16.0 软件进行数据分析, 计量资料如呈正态分布或近似正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组均数比较用 *t* 检验, 多组均数比较用方差分析, 组间比较采用 LSD-L 法进行, 变量间相互关系采用 Pearson 直线相关分析; 计量资料如呈偏态分布, 以中位数 (最小值, 最大值) 表示, 多样本比较采用 Kruskal-Wallis H 检验, 变量间相互关系采用 Spearman 秩相关分析; 应用 MedCalc 9.5.5.0 统计软件绘制受试工作者曲线。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、入组患者的一般资料

入组 HBV 相关性肝病患者的一般资料详见表 1。

表 1 不同 HBV 相关性肝病组一般实验室检查指标比较

组别	例数	HBsAg (S/N)	HBeAg (S/Co)	HBV DNA (拷贝/ml)
CH 组	21	128.9 (34.7, 300.4)	93.8 (0.22, 345.7)	$3.84 \times 10^6 (1.8 \times 10^3, 1.3 \times 10^8)$
LC 组	23	189.6 (164.4, 221.6)	3.5 (0.9, 63.5)	$6.8 \times 10^3 (1.2 \times 10^3, 6.2 \times 10^7)$
LF 组	21	204.6 (159.3, 250.0)	60.3 (12.3, 320.4)	$9.1 \times 10^3 (1.4 \times 10^3, 1.2 \times 10^4)$
HCC 组	28	33.9 (2.5, 65.2)	287.9 (109.2, 466.6)	$2.4 \times 10^9 (2.8 \times 10^8, 4.6 \times 10^9)$
P		0.000	0.000	0.000

续表 1

组别	ALT(U/L)	AST(U/L)	TBil(μ mol/L)	ALB(g/L, $\bar{x} \pm s$)	PT(s)
CH 组	174(33,2624)	127(47,1120)	18.7(7.0,314.2)	39.7 \pm 3.4	13.05(11.1,19.4)
LC 组	52(24,78)	47(32,83)	13.5(6.6,73.7)	36.9 \pm 6.4	14.3(11.8,19.0)
LF 组	56(20,166)	75.5(47,420)	30.9(12.0,59.6)	36.2 \pm 1.8	13.0(11.4,17.8)
HCC 组	1224(604,2269)	1319(706,1929)	233.6(47.0,309.9)	36.2 \pm 1.8	22.9(20.5,33.0)
P	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注:表格中数据:中位数(最小值,最大值)

二、组间血清 IL-17A 水平的比较

不同 HBV 相关肝病之间,IL-17A 水平不完全相同($P = 0.000$)。研究发现 HCC 组外周血 IL-17A 显著高于其他肝病类型及对照组 ($P = 0.001$);LF 组患者显著高于肝硬化和对照组 ($P = 0.000$);虽 CH 组的 IL-17A 也高于对照组,但差异无统计学意义($P > 0.05$);肝硬化患者则与对照组比较无显著性差异(表 2,图 1)。

表 2 HBV 相关性肝病患者血清 IL-17A 的比较

组别	例数	血清 IL-17A(pg/ml, $\bar{x} \pm s$)
CH 组	21	3.1 \pm 1.1
LC 组	23	2.5 \pm 0.6
LF 组	21	3.7 \pm 0.5
HCC 组	28	4.4 \pm 1.6
对照组	15	2.5 \pm 0.5
F		15.5
P		0.000

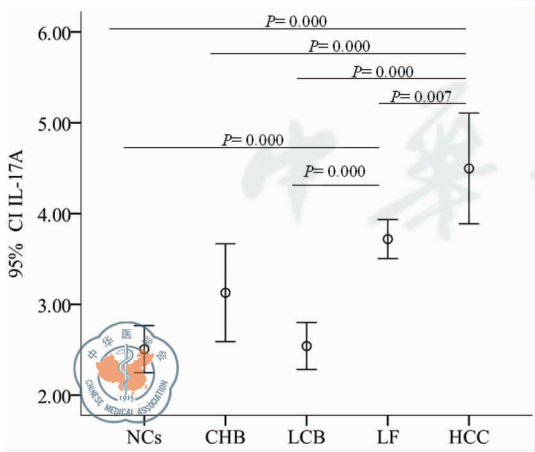


图 1 各组患者外周血 IL-17A 水平的比较

三、HBV 相关 CH 患者不同分度之间血清 IL-17A 水平的比较

轻、中、重度 CH 患者的 IL-17A 水平与对照组相比差异无统计学意义,不同分度之间差异也无统计学意义,见表 3。

表 3 HBV 相关性 CH 不同分度患者血清 IL-17A 水平的比较

组别	例数	血清 IL-17A(pg/ml, $\bar{x} \pm s$)
轻度 CH	10	3.05 \pm 1.2
中度 CH	7	2.9 \pm 1.0
重度 CH	4	3.5 \pm 1.5
对照组	15	2.5 \pm 0.5
F		1.56
P		0.209

四、HBV 相关性肝硬化患者不同分期血清 IL-17A 水平的比较

失代偿期肝硬化患者血清 IL-17A 较代偿期、对照组显著升高($P = 0.000$),见表 4、图 2。

表 4 HBV 相关性肝硬化患者不同分期血清 IL-17A 水平的比较

组别	例数	血清 IL-17A(pg/ml, $\bar{x} \pm s$)
代偿期 LC 组	12	2.3 \pm 0.5
失代偿期 LC 组	11	4.5 \pm 1.1
对照组	15	2.5 \pm 0.5
F		35.3
P		0.000

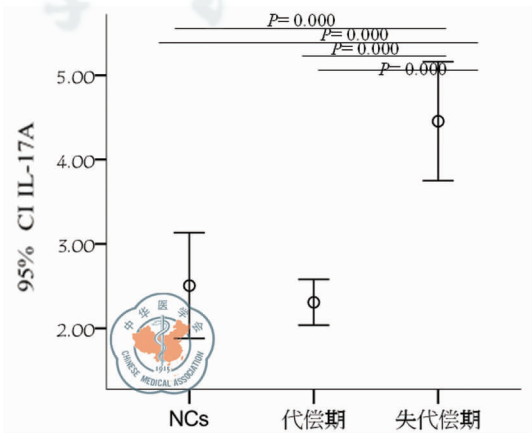


图 2 不同肝硬化分期患者血清 IL-17A 水平对比

五、HBV 相关性肝病不同预后患者血清 IL-17A 水平的比较

70 例病情好转的患者血清 IL-17A 水平平均值为 (3.4 ± 1.4) pg/ml, 23 例死亡患者血清 IL-17A 水平平均值为 (3.8 ± 0.5) pg/ml, 差异具有统计学意义 ($t = 2.12, P = 0.036$)。IL-17A 对死亡预测的 C-statistic 值为 0.726 (95% CI: 0.627 ~ 0.824, $Z: 3.446, P = 0.0006$, 最佳预测值为 3.29 pg/ml), 见图 3~4。

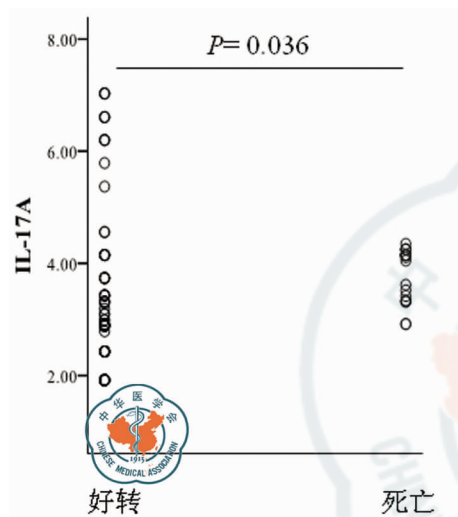


图3 不同预后患者血清 IL-17A 水平比较

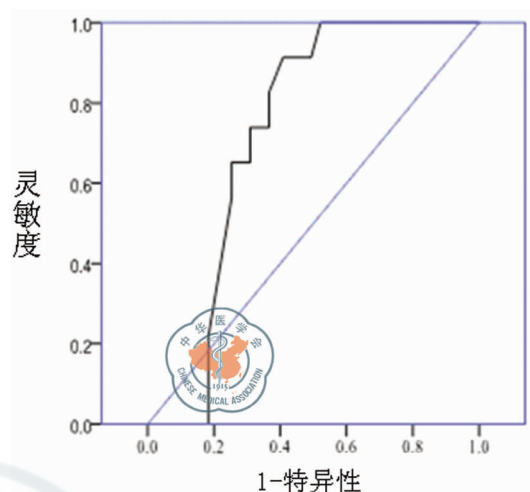


图4 HBV 相关性肝病患者血清 IL-17A 水平对预后的判断

六、HBV 相关性肝病患者血清 IL-17A 与 ALT、AST、TBil、ALB、PT 相关性分析

IL-17A 与 AST、TBil 呈正相关 ($r_s = 0.349, 0.266, P = 0.001, 0.009$); 与 ALT、PT 之间无显著相关性 ($r_s = 0.174, 0.127, P = 0.094, 0.266$); 与 ALB 也无相关性 ($r = -0.005, P = 0.959$), 见图 5。

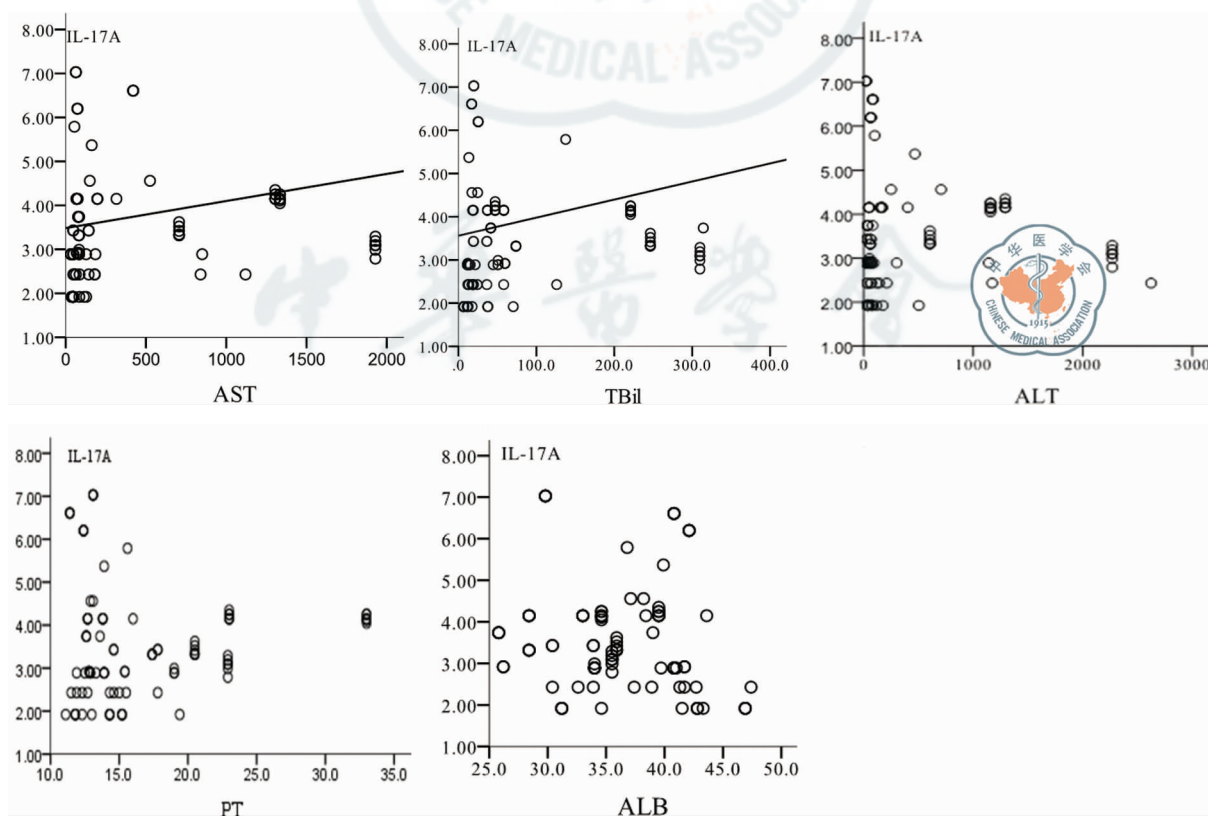


图5 HBV 相关性肝病患者血清 IL-17A 水平对预后的判断

七、HBV 相关性肝病患者血清 IL-17A 与 HBsAg、HBeAg、HBV DNA 相关性分析

IL-17A 与 HBsAg 呈负相关($r_s = -0.582, P = 0.000$); 与 HBeAg 呈正相关($r_s = 0.715, P = 0.000$); 而与 HBV DNA 无显著相关性($r_s = 0.059, P = 0.662$), 见图 6。

讨 论

到目前为止, HBV 相关性肝病仍是危害公共卫生健康的一大原因, 全球每年约有 100 万人死于 HBV 感染所致的 LF、LC 和 HCC^[13-14]。但 HBV 引起肝损伤的确切机制尚未完全阐明, 对该类疾病的诊疗带来了很大的困难, 研究和明确 HBV 感染和疾病进展相关的机制具有重要的临床意义。

Th17 细胞能分泌 IL-17A、IL-17F、IL-21、IL-22 和肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- α , 以上细胞因子通过诱导其他炎性介质和白细胞(尤其是中性粒细胞)聚集在炎症部位, 从而加重炎症^[15-16]。IL-17 还具有促炎症作用, 诱导促炎细胞因子(如 IL-6、TNF)、趋化因子和基质金属蛋白酶的表达, 引发组织细胞通透性增加、甚至坏死; 既往研究表明, IL-17A 在多种肝脏疾病中起到了重要作用。

本研究表明, 在 HBV 相关性肝病患者外周血中, 虽然 CH 组 IL-17A 升高较对照组差异无统计学意义, 但 HCC、LF 患者组 IL-17A 较健康对照组、肝硬化组有明显的升高, 提示其在 HBV 相关性肝病的发生、发展中起到一定的作用, 尤其是肝脏发生严重炎症时, 大量的细胞因子(尤其是 TGF- β 、IL-23、IL-1 β)释放, Th17 细胞被活化, 通过分泌 IL-17A 并与表面表达 IL-17R 的巨噬细胞和单核细胞结合后, 使其活化, 上调 CD86、B7H1、B7DC、CD83 和相关细胞因子, 如 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IL-23p19、IL-12p35 等^[17], 上述细胞因子进一步加重肝脏的炎症反应和损伤。虽然 LC 患者 IL-17A 水平与健康对照人群无显著差异, 但进一步分析发现, 失代偿期 LC 患者 IL-

17A 显著高于代偿期 LC 和健康对照组, 考虑失代偿性肝硬化患者除了存在慢性炎症外, 还存在急性损伤过程, 导致能刺激 Th17 活化的相关细胞因子释放进一步增多。

针对 Th17 在肝细胞癌患者外周血中的表达, 既往研究结果有相悖之处, Hou 等^[18]研究表明, Th17 细胞有抗凋亡的作用, 有利于肿瘤组织生长; 而 Zhang 等^[19]研究认为 Th17 分泌 CXCL-9、CXCL-10 等趋化因子, 诱导 Th1、CD8⁺ T、自然杀伤细胞等效应性细胞聚集于肿瘤组织中, 杀伤肿瘤细胞, 从而发挥间接杀瘤效应。此外, CXCL-9 和 CXCL-10 还有抗肿瘤血管生成的作用, 故认为 Th17 对肿瘤生长有一定抑制作用。本研究表明, HCC 患者血清 IL-17A 水平显著高于其他组, 这可能与肿瘤细胞能分泌调节趋化因子、膜辅因子蛋白, 诱导活化 Th17 有关^[20]。另外, 本组 HCC 患者均存在失代偿性肝硬化, 也影响 HCC 患者血清 IL-17A 水平。

针对不同预后患者血清 IL-17A 表达的研究表明, 死亡或病情恶化自动出院患者的血清 IL-17A 水平显著高于病情好转者, 且 IL-17A 预测死亡的受试工作者曲线下面积为 0.726 ($P = 0.0006$), 提示 IL-17A 能反映肝脏炎症的损伤程度, 并能作为 HBV 相关性肝病患者预后的判断指标。可能是由于机体的特异性免疫反应被强烈激活, 肝细胞坏死严重, 肝脏的坏死组织进一步引起炎性细胞因子释放从而加重肝脏炎症损害^[21], 而这些细胞因子对 Th17 的活化起到启动作用。

上述研究表明, IL-17A 参与了 HBV 相关性肝病的炎症发生, 但血清 IL-17A 与其他反映肝脏炎症指标的相关性分析发现, 其与 AST、TBI 呈正相关, 进一步证实 Th17 参与肝脏炎症的发生发展; 而与 ALT、ALB、PT 无相关性, 考虑可能与分泌的细胞、机制不尽相同有关。

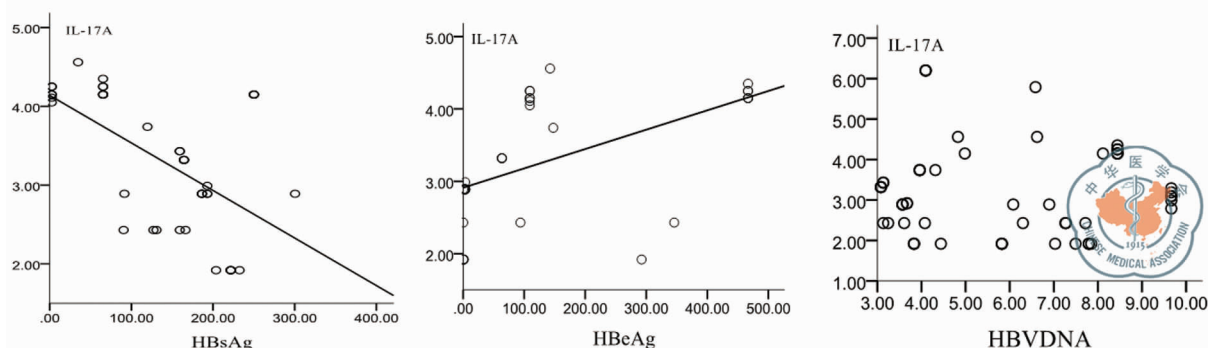


图 6 血清 IL-17A 与 HBsAg、HBeAg、HBV DNA 相关性分析

有关 HBV 感染与血清 IL-17 表达的研究表明, HBeAg 是 Th17 重要诱导抗原, 可使 IL-17A 表达上调, 但 HBsAg、HBeAg、HBV DNA 与 IL-17 的相关性研究, 目前尚未有报道。本研究结果表明, HBsAg 与 IL-17 呈负相关; HBeAg 与 IL-17 呈现正相关, 而与 HBV DNA 之间无相关性, 提示 Th17 与 HBsAg、HBeAg 存在一定关系, 其确切机制及其之间如何相互影响有待进一步探讨。

本研究发现 IL-17A 可作为反映肝脏炎症损伤程度的指标之一, 在 HBV 相关性肝病的发生、发展过程中起到重要作用, 密切监测该指标的变化, 对判断患者的预后以及对治疗决策的确定有着重要意义。

参 考 文 献

- Rehermann B, Nascimbeni M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat Rev Immunol*, 2005, 5(3): 215-229.
- 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(2010年版). 中华肝脏病杂志, 2011, 19(1): 13-24.
- Sitia G, Isogawa M, Iannacone M, et al. MMPs are required for recruitment of antigen-nonspecific mononuclear cells into the liver by CTLs. *J Clin Invest*, 2004, 113(8): 1158-1167.
- Dunn C, Brunetto M, Reynolds G, et al. Cytokines induced during chronic hepatitis B virus infection promote a pathway for NK cell-mediated liver damage. *J Exp Med*, 2007, 204(3): 667-680.
- Zhang Z, Chen D, Yao J, et al. Increased infiltration of intrahepatic DC subsets closely correlate with viral control and liver injury in immune active pediatric patients with chronic hepatitis B. *Clin Immunol*, 2007, 122(2): 173-180.
- Zhang Z, Zou ZS, Fu JL, et al. Severe dendritic cell perturbation is actively involved in the pathogenesis of acute-on-chronic hepatitis B liver failure. *J Hepatol*, 2008, 49(3): 396-406.
- Xu D, Fu J, Jin L, et al. Circulating and liver resident CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells actively influence the antiviral immune response and disease progression in patients with hepatitis B. *J Immunol*, 2006, 177(1): 739-747.
- 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. *Nat Immunol*, 2005, 6(11): 1123-1132.
- Park H, Li Z, Yang XO, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol*, 2005, 6(11): 1133-1141.
- Ge J, Wang K, Meng QH, et al. Implication of Th17 and Th1 cells in patients with chronic active hepatitis B. *J Clin Immunol*, 2009, 30(1): 60-67.
- 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. 中华内科杂志, 2001, 40(1): 62-58.
- 中华医学会感染病学分会肝衰竭与人工肝学组、中华医学会肝病学分会重型肝病与人工肝学组. 肝衰竭诊疗指南. 中华肝脏病杂志, 2006, 14(9): 643-646.
- Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection——natural history and clinical consequences. *N Engl J Med*, 2004, 350(11): 1118-1129.
- World Health Organization. Hepatitis B. (Revised August 2008). 2010-12-91. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en>.
- Ouyang W, Kolls JK, Zheng Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity*, 2008, 28(4): 454-467.
- Dong C. Regulation and pro-inflammatory function of interleukin-17 family cytokines. *Immunol Rev*, 2008, 226(1): 80-86.
- Zhang JY, Zhang Z, Wang FS, et al. Interleukin-17-producing CD4⁺ T cells increase with severity of liver damage in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology*, 2010, 51(1): 81-91.
- Hou W, Kang HS, Kim BS. Th17 cells enhance viral persistence and inhibit T cell cytotoxicity in a model of chronic virus infection. *J Exp Med*, 2009, 206(2): 313-328.
- Zhang JP, Yan J, Xu J, et al. Increased intratumoral IL-17-producing cells correlate with poor survival in hepatocellular carcinoma patients. *J Hepatol*, 2009, 50(5): 980-989.
- Su X, Ye J, Hsueh EC, et al. Tumor microenvironments direct the recruitment and expansion of human Th17 cells. *J Immunology*, 2010, 184(3): 1630-1641.
- 高峰, 陈永平, 刘锦堂, 等. 重型肝炎患者血清内毒素与细胞因子及细胞免疫相关性研究. 山东医药, 2006, 46(7): 52.

(收稿日期: 2012-01-01)

(本文编辑: 孙荣华)

汪美华, 章幼奕, 吴月平, 等. 白细胞介素-17A 表达水平与 HBV 相关肝病的相关性分析[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2012, 6(3): 225-230.