

· 临床论著 ·

IL-12在慢性HBV携带者肝脏组织中的表达及其意义

戴金津 郜玉峰 汤磊 李旭 邹桂舟

【摘要】 目的 探讨慢性HBV携带者肝脏组织中白细胞介素12 (IL-12) 的表达及其意义。**方法** 应用SP免疫组织化学法检测100例慢性HBV携带者肝脏组织中IL-12的表达情况, 并与HBeAg、HBV DNA定量分析比较。**结果** HBeAg阳性的携带者中IL-12阴性表达率高, HBeAg阴性者IL-12阳性表达率高 ($r = 0.324, P = 0.001$); HBV DNA水平低者IL-12阳性表达率高, HBV DNA水平高者IL-12阴性表达率高 ($r = -0.445, P = 0.000$); 免疫耐受者IL-12阴性表达率高, 低或非复制期者IL-12阳性表达率高 ($r = 0.569, P = 0.000$)。**结论** IL-12参与HBV感染的慢性化进展与转归。

【关键词】 免疫组织化学; 白细胞介素12; 肝炎, 乙型, 慢性

Expression and significance of IL-12 in liver tissues of HBV carriers DAI Jin-jin, GAO Yu-feng, TANG Lei, LI Xu, ZOU Gui-zhou. Department of Hepatology, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601, China

Corresponding author: ZOU Gui-zhou, Email: ayzouguizhou@sina.com.cn

【Abstract】 Objective To investigate the expression levels of IL-12 in the liver of HBV carriers and explore its significance. **Methods** IL-12 expression was detected by immunohistochemistry SP method in liver tissues of HBV carriers ($n = 100$). **Results** The levels of IL-12 in HBeAg positive HBV carriers were significantly lower than those patients with HBeAg negative ($r = 0.324, P = 0.001$). The levels of IL-12 in HBV carriers with high HBV DNA were significantly lower than those patients with low HBV DNA ($r = -0.445, P = 0.000$). The levels of IL-12 in immune-tolerance carriers were lower than inactive carriers ($r = 0.569, P = 0.000$). **Conclusion** IL-12 may be involved in the chronic infection of HBV, the progress and prognosis of the disease.

【Key words】 Immunohistochemistry; Interleukin-12; Hepatitis B chronic

目前, 全球约20亿人曾感染过乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV), 慢性感染人数已超过3.5亿, 其中约15%~40%将发展为肝功能衰竭、肝硬化、肝细胞癌^[1]。乙型肝炎的发病主要是免疫反应介导的肝脏损伤, 白细胞介素12 (interleukin-12, IL-12) 在特异性免疫反应和非特异性免疫反应中均起到重要作用。目前关于慢性乙型肝炎 (chronic hepatitis B, CHB) 发病机制的研究多集中在免疫清除期和再活动期, 而此时诸多因素参与HBV感染后机体复杂的免疫状态中, 采用单因素分析法研究多因素作用的过程, 常得到难以解释的结果。对于HBV感染免疫耐受期及非复制期的研究相对较少, 其研究内容主要为肝脏炎症及纤维化程度

的判断, 而更深入的免疫学研究报道甚少, 且患者外周血仅能部分反应发生在肝内的免疫过程, 肝内免疫细胞的种类、组成可能与外周血中并不相同。因此, 本研究拟以HBV携带者为对象, 采用免疫组织化学的半定量检测方法直接观察HBV携带者肝脏组织中IL-12的表达情况, 探讨IL-12参与HBV感染后疾病进展的机制。

资料与方法

一、研究对象

选取2010年1月至2011年12月于安徽医科大学第二附属医院肝病科住院的慢性HBV携带者共100例的肝脏活检组织, 其中男性68例, 女性32例; 年龄15~62岁, 平均年龄 (34.12 ± 11.40) 岁, 按照HBeAg状态及HBV DNA定量分析结果进行分组比较。组间性别、年龄无显著差异 ($P > 0.05$), 具

有可比性;且诊断标准均符合2000年中华医学会肝病学会、中华医学会感染病分会联合制定的《病毒性肝炎防治方案》标准^[2],且在近6个月内均未经抗病毒和免疫调节剂治疗,并排除肝硬化、肝癌及合并其他病毒感染者。本研究经患者知情同意,经过医院伦理委员会审批符合医学伦理。

二、研究方法

收集上述所有患者的肝脏组织石蜡包埋标本,同时收集患者住院时的临床血清学检测结果和资料,肝功能采用常规生化检测方法,严格按说明书操作;HBV表面标志物应用ELISA法检测,严格按试剂盒说明书操作;HBV DNA检测采用荧光定量PCR法,试剂盒由Roche公司提供,严格按说明书操作。石蜡包埋标本进行4 μm 连续切片。

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公司)。常规脱蜡、水洗、抗原修复、室温下3%过氧化氢孵育10 min去除内源性过氧化氢酶,山羊血清封闭,滴加IL-12一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1:300),同时设阳性对照(福州迈新公司提供标准阳性片),以PBS代替一抗作为阴性对照。

三、结果判读

显微镜下观察肝脏实质细胞胞膜或胞浆内棕黄色颗粒为阳性结果。依据参考文献^[3]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。

四、统计学处理

采用SPSS 13.0统计软件进行数据分析,采用 χ^2 检验及Spearman等级相关检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、IL-12在肝脏组织的表达分布

IL-12在肝脏组织中以肝细胞胞浆表达为主,肝组织胞浆内可见黄色颗粒沉积,细胞核无着色,炎性细胞、巨噬细胞、淋巴细胞中均可见有少量表

达,见图1。

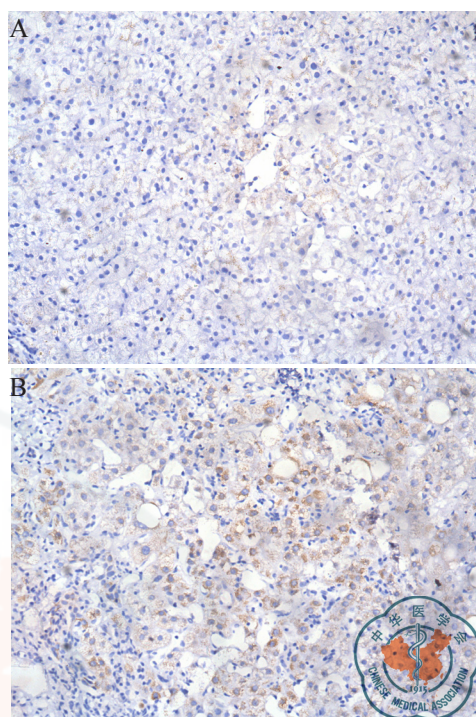


图1 CHB中弱阳性及阳性的表达情况

二、IL-12的表达与HBeAg及HBV DNA定量的相关性

1. 将研究对象分为HBeAg阳性组和HBeAg阴性组,比较两组患者肝内IL-12的表达情况,HBeAg阳性的HBV携带者IL-12阴性表达率高,HBeAg阴性者IL-12阳性表达率高,两组差异具有统计学意义(P 均 < 0.05),见表1。

2. 按照HBV DNA定量分析结果分组,HBV DNA载量高者IL-12阴性率高,HBV DNA阴性者IL-12阳性率高,两组差异具有统计学意义($P < 0.05$),见表2。

3. 进一步按照乙型肝炎病毒免疫学标记物和HBV DNA定量分析结果(AASLD制定标准)将患者分为免疫耐受期组(即HBsAg阳性、HBeAg阳性、HBeAb阳性,HBV DNA $> 10^5$ 拷贝/ml,ALT < 40 U/L)和低或非复制期组(即HBsAg阳性、HBeAb阳性、HBeAb阳性,HBV DNA $< 10^3$ 拷贝/ml,ALT < 40 U/L),免疫耐受者IL-12阴性表达率高,低或非复制期者IL-12阳性表达率高,两组差异具有统计学意义($P < 0.05$),见表3。

讨 论

HBV感染的自然史一般可人为地划分为4期,即

表1 HBeAg阴性与阳性患者肝内IL-12表达水平比较 [例 (%)]

| 组别 | 例数 | IL-12 (-) | IL-12 (+) | IL-12 (2+) | IL-12 (3+) |
|----------|----|-----------|-----------|------------|------------|
| HBeAg阳性组 | 50 | 28 (56) | 8 (16) | 11 (22) | 3 (6) |
| HBeAg阴性组 | 50 | 9 (18) | 19 (38) | 15 (30) | 7 (14) |
| χ^2 | | | 13.448 | 4.059 | 7.315 |
| <i>P</i> | | | 0.000 | 0.044 | 0.007 |

注: 秩相关 $r = 0.324$, $P = 0.001$

表2 患者HBV DNA定量分析与肝内IL-12表达水平 [例 (%)]

| HBV DNA (拷贝/ml) | 例数 | IL-12 (-) | IL-12 (+) | IL-12 (2+) | IL-12 (3+) |
|------------------|----|-----------|-----------|------------|------------|
| $< 10^3$ | 27 | 2 (7.4) | 7 (25.9) | 13 (48.1) | 5 (18.5) |
| $10^3 \sim 10^5$ | 23 | 10 (43.5) | 5 (21.7) | 6 (26.1) | 2 (8.7) |
| $10^5 \sim 10^7$ | 22 | 6 (27.3) | 11 (50.0) | 3 (13.6) | 2 (9.0) |
| $> 10^7$ | 28 | 19 (67.9) | 4 (14.3) | 4 (14.3) | 1 (3.6) |
| χ^2 | | | 14.489 | 18.492 | 13.893 |
| <i>P</i> | | | 0.002 | 0.000 | 0.003 |

注: 秩相关 $r = -0.445$, $P = 0.000$

表3 免疫耐受期与低或非复制期患者肝内IL-12的表达水平 [例 (%)]

| 组别 | 例数 | IL-12 (-) | IL-12 (+) | IL-12 (2+) | IL-12 (3+) |
|----------|----|-----------|-----------|------------|------------|
| 免疫耐受期 | 26 | 16 (61.5) | 5 (19.2) | 4 (15.4) | 1 (3.8) |
| 低或非复制期 | 23 | 2 (8.7) | 5 (21.7) | 12 (52.2) | 4 (17.4) |
| χ^2 | | | 5.185 | 14.275 | 9.631 |
| <i>P</i> | | | 0.023 | 0.000 | 0.002 |

注: 秩相关 $r = 0.569$, $P = 0.000$

免疫耐受期、免疫清除期、非活动或低(非)复制期和再活动期^[4]。免疫耐受阶段的患者会出现肝功能异常发展为HBeAg阳性的慢性乙型肝炎, 经过免疫清除阶段, 一部分患者出现自发的HBeAg/HBeAb血清学转换, 部分患者则病情反复发作, 进展为肝硬化和肝癌。由于免疫耐受期无临床症状, 且抗病毒治疗效果不理想, 常被忽视, 故此类患者直接进展为肝硬化或原发性肝癌的问题日益受到关注^[5]。

IL-12是由巨噬细胞和B淋巴细胞产生的, 也称为Th1型细胞活化的第三信号, 是促进Th1型细胞增殖分化和产生Th1型细胞因子的关键^[6], 可直接或间接地刺激自然杀伤细胞、细胞毒性T细胞产生IFN- γ 、抑制Th2型细胞的增殖分化, IFN- γ 又可增强IL-12的产生, 协同促进Th1型细胞增殖, 有利于病毒的清除。慢性感染者不能针对HBV产生强而特异性的Th1反应, 不足以清除所有受感染细胞中的病毒, 但可以持续破坏所有受染肝细胞, 引起肝脏慢性炎症^[7]。有研究发现, 慢性HBV感染者体内的IL-12水平显著降低^[8]。

本研究结果表明, 不同HBeAg状态及HBV DNA病毒载量的HBV携带者肝脏组织内IL-12的表

达差异具有统计学意义。本研究发现HBeAg阴性患者中IL-12的表达阳性率高, HBeAg阳性组中IL-12的阴性者显著增多, 此前也有研究发现血清IL-12水平达峰值时常伴有HBeAb的产生及HBeAg的消失, 可能由于HBeAg抑制了抗原递呈细胞分泌IL-12的能力, 故导致感染者细胞免疫功能受到损伤。

研究证实, IL-12分泌不足时Th2型细胞占优势, 机体清除HBV能力下降, 感染易慢性化^[9], 血清IFN- γ 水平与HBV DNA呈负相关, 低病毒载量的患者可能会实现细胞免疫并增强病毒清除^[10]。我们也发现病毒载量越高、IL-12的阳性表达率越低, 病毒阴性者、IL-12阳性表达率显著增高。可能的原因有: IL-12可能恢复了一些被HBV抑制的细胞毒性T细胞的功能及其它细胞杀伤途径, 清除HBV感染的靶细胞, 使HBV复制水平降低; IL-12可加强IFN- γ 产生抗HBV抗原的能力^[11]; IL-12促进Th1分化及应答, 使其由原来不能分泌IFN- γ 的Th0细胞变成能分泌IFN- γ 的Th1型细胞, 协同HBV特异性抗原T淋巴细胞活化, 从而参与HBV的清除过程^[12]; 当HBV处于高水平或复制状态时, 机体免疫系统紊乱, Th1型细胞免疫反应被抑制、同时也抑制Th1型细胞分

泌细胞因子,因此IL-12表达明显减少。

He等^[10]按照AASLD的标准进一步将慢性乙型肝炎患者分类后发现血清IL-12的水平与ALT相关,且IL-12的高水平预示着高的e抗原血清学转换率。因此,也按此标准将HBV携带者进一步分组研究。有研究提出慢性HBV感染的临床状态与HBV感染自然病程相关^[13]。第一阶段的性质是无症状的免疫耐受性阶段,其特征HBeAg阳性、血清HBV DNA水平高,ALT正常。IL-12水平升高可能是一个免疫激活的标志,也可能与自发性HBeAg血清学转换相关。免疫耐受者中自发的HBeAg血清学转换率很低(每年<5%)。本研究数据与此前大多数的实验结果是一致的,即大多数该阶段的患者肝内IL-12无或弱表达,这可能是解释免疫耐受阶段抗病毒(α 干扰素或核苷类似物)治疗反应不佳的原因。自然史的第二阶段为免疫激活期,即慢性乙型肝炎^[14]。第三阶段的自然史非活动性HBsAg携带状态,为临床抗病毒治疗的理想终止状态。本研究患者IL-12水平阳性表达率显著上升,表明宿主的免疫应答能力增强,尤其是幼稚T细胞分化成Th1细胞的能力,机体免疫应答中Th1占优势,这也可以解释此时病毒载量低于检测下限的机制,从免疫学角度分析,此种状态可对患者终止抗病毒治疗。新近一项研究发现,较高水平血清IL-10和IL-12在HBeAg阳性患者与早期、自发的HBeAg血清学转换相关^[15]。有研究发现应用IFN- α 治疗的儿童慢性HBV感染,应答者肝组织内IL-12的水平治疗后较治疗初始阶段显著升高;无应答者亦无明显的变化。超过50%的1年内自发性HBeAg血清学转换者血清ALT水平超过正常上限的5倍,仅小于10%者ALT水平低于正常值的5倍^[13]。上述结果提示,IL-12水平升高是HBeAg血清学转换率较高的影响因素之一。本研究发现耐受者与携带者之间肝内IL-12的表达具有显著差异($P < 0.05$);抗病毒治疗可以将HBeAg血清学转换率提高到30%~50%,有效地提高肝内IL-12的表达可能加速抗病毒治疗患者进入携带者状态,达到抗病毒治疗的免疫学终点。

综上所述,本研究认为IL-12的缺乏或参与了免疫耐受期患者自然病程中的免疫启动过程,但其具体的机制尚待进一步研究。这提示,IL-12参与HBV的清除、而HBeAg抑制IL-12的分泌,因此,检测肝内IL-12的水平对于正确评价机体的免疫功能状态,检测病情发展和判断预后有一定的临床价值^[16],研究将IL-12作为佐剂以增加机体免疫应答的强度从而

打破免疫耐受的方法^[17-18],值得进一步探索。

参 考 文 献

- 1 Kim SU, Han KH, Nam CM, et al. Natural history of hepatitis B virus-related cirrhotic patients hospitalized to control ascites. *J Gastroenterol Hepatol*,2008,23(11):1722-1727.
- 2 中华医学会传染病与寄生虫病分会、中华医学会肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案. *中华肝病杂志*,2008,8(6):324-334.
- 3 Assy N, Hochberg Z, Enat R, et al. Prognostic value of generation of growth hormone-stimulated insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and its binding protein-3 in patients with compensated and decompensated liver cirrhosis. *Dig Dis Sci*,1998,43(6):1317-1321.
- 4 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). *中国肝病杂志:电子版*,2011,3(1):40-56.
- 5 Yim HJ, Lok AS. Natural history of chronic hepatitis B virus infection: what we knew in 1981 and what we know in 2005. *Hepatology*,2006,43(Suppl 1):S171-S181.
- 6 Hamza T, Barnett JB, Li B. Interleukin 12 a key immunoregulatory cytokine in infection applications. *Int J Mol Sci*,2010,11(3):789-806.
- 7 李声方, 赵登蕴, 刘贵章, 等. 慢性乙型肝炎树突状细胞抗原递呈功能状态的初步研究. *医学信息*,2011,24(2):385-386.
- 8 Op den Brouw ML, Binda RS, van Roosmalen MH, et al. Hepatitis B virus surface antigen impairs myeloid dendritic cell function: a possible immune escape mechanism of hepatitis B virus. *Immunology*,2009,126(2):280-289.
- 9 Wang H, Su X, Zhang P, et al. Recombinant heat shock protein 65 carrying PADRE and HBV epitopes activates dendritic cell and elicits HBV-specific CTL response. *Vaccine*,2011,29(12):2328-2335.
- 10 He D, Yan G, Wang Y. Serum levels of interleukin-12 in various clinical states with hepatitis B virus infection. *Cell Immunol*,2012,272(2):162-165.
- 11 Ozakan TB, Budak F, Erdemir G, et al. Do liver IL-12 levels predict sustained response to IFN- α therapy in children with chronic hepatitis B? *J Interferon Cytokine Res*,2010,30(6):433-438.
- 12 林炳亮, 谢东英, 谢俊强, 等. HBV特异性抗原对HBV携带者T淋巴细胞免疫功能的影响. *中华肝病杂志*,2011,19(3):186-190.
- 13 Rizzetto M, Ciancio A. Chronic HBV-related liver disease. *Mol Aspects Med*,2008,29(1-2):72-84.
- 14 Tong MJ, Hsu L, Chang PW, et al. Evaluation of current treatment recommendations for chronic hepatitis B: a 2011 update. *J Gastroenterol Hepatol*,2011,26(5): 829-835.
- 15 Wu JF, Wu TC, Chen CH, et al. Serum levels of interleukin-10 and interleukin-12 predict early spontaneous hepatitis B virus e antigen seroconversion. *Gastroenterology*,2010,138(1):165-172.
- 16 Del Vecchio M, Bajetta E, Canova S, et al. Interleukin-12: biological properties and clinical application. *Clin Cancer Res*,2007,13(16):4677-4685.
- 17 Li R, Deng F, Fu Y, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics

of subcutaneous injection and intravenous infusion of recombinant human interleukin-12 and recombinant human interleukin-12 combined with hepatitis B surface antigen in cynomolgus monkeys. Pharmacology, 2010, 85(6): 319-327.

替比夫定治疗期间外周血Th1/Th2型细胞因子水平的动态变化情况. 中华肝病杂志, 2009, 17(3): 175-179.

(收稿日期: 2012-11-26)

(本文编辑: 孙荣华)

18 张林, 张大志, 陈敏, 等. 乙型肝炎e抗原阳性慢性乙型肝炎患者在

戴金津, 郜玉峰, 汤磊, 等. IL-12在慢性HBV携带者肝脏组织中的表达及其意义[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2013, 7(3): 345-349.

