

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00703

原发性胆汁性肝硬化患者血清中 Th17 相关细胞因子的表达

周运恒, 荣光华, 熊怡淞, 朱 焯, 耿红莲, 杨再兴, 仲人前*

第二军医大学长征医院实验诊断科, 全军医学免疫诊断中心, 全军临床免疫重点实验室, 上海 200003

[摘要] **目的:** 观察原发性胆汁性肝硬化(primary biliary cirrhosis, PBC)患者血清中 Th17 分化相关细胞因子(IL-1 β 、IL-6、IL-17、IL-23、TGF- β)的变化, 探讨 Th17 细胞在 PBC 发病过程中的作用。 **方法:** 采用酶联免疫吸附试验(ELISA)方法比较 PBC 患者($n=78$)、乙型肝炎后肝硬化患者(PHC, $n=30$), 健康对照(HC, $n=60$)血清中 Th17 分化相关细胞因子含量。 **结果:** 与 HC 组相比, PBC 患者血清 IL-1 β 、IL-6、IL-17A 和 IL-23 水平显著升高($P<0.05$), 而 TGF- β 水平差异无统计学意义; 与 PHC 组相比, PBC 患者血清 IL-1 β 、IL-6 和 TGF- β 水平显著降低, 而 IL-17 和 IL-23 水平显著升高($P<0.05$)。 **结论:** PBC 患者处于慢性炎症状态, Th17 细胞可能在 PBC 的发病和发展过程中发挥着重要的作用。

[关键词] 原发性胆汁性肝硬化; Th17 细胞; 细胞因子

[中图分类号] R 575.22

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2009)06-0703-03

Serum profile of Th17-related cytokines in patients with primary biliary cirrhosis

ZHOU Yun-heng, RONG Guang-hua, XIONG Yi-song, ZHU Ye, GENG Hong-lian, YANG Zai-xing, ZHONG Ren-qian*

Department of Laboratory Medicine, Key Laboratory and Clinical Immunology Center of PLA, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

[ABSTRACT] **Objective:** To observe the serum profile of Th17-related cytokines(IL-1 β , IL-6, IL-17A, IL-23, and TGF- β) in patients with primary biliary cirrhosis, so as to study the role of Th17 cells in the pathogenesis of primary biliary cirrhosis (PBC). **Methods:** Seventy-eight patients with PBC, 30 patients with HBV-related posthepatic cirrhosis(PHC), and 60 healthy controls (HC) were enrolled in this study. The serum levels of above five Th17-related cytokines were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results:** The levels of IL-1 β , IL-6, IL-17A, and IL-23 in PBC group were significantly higher than those in HC group ($P<0.05$); the levels of TGF- β were comparable between the PBC group and HC group. The levels of IL-1 β , IL-6, and TGF- β were significantly lower and IL-17A, IL-23 were significantly higher in the PBC group compared with those in the PHC group ($P<0.05$). **Conclusion:** Our findings indicate that PBC patients are in a status of chronic inflammation. Th17 subset may play an important role in the development and progression of PBC.

[KEY WORDS] primary biliary cirrhosis; Th17 cells; cytokines

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(6):703-705]

原发性胆汁性肝硬化(primary biliary cirrhosis, PBC)是一种慢性炎症性、进行性肝内胆汁淤积性自身免疫性肝病,以血清中出现抗线粒体抗体(AMA)和导致胆汁淤积性肝硬变的肝脏门脉周围淋巴细胞浸润、小胆管特异性破坏为特征,最终极易发展成肝硬化和肝衰竭^[1]。PBC的病因和确切发病机制至今尚不完全清楚,可能与遗传因素、病毒和细菌感染、自身免疫状态及环境因素等有关^[2-3]。

CD4⁺T细胞在PBC的免疫调控中具有重要作用。传统意义上根据产生细胞因子的不同将CD4⁺T细胞分为Th1和Th2型。既往关于PBC的研究^[4-5]认为Th1型细胞因子在PBC中起重要作用。最近,一种新的效应CD4⁺T细胞亚群Th17被广泛关注,它不同于Th1和Th2细胞,具有很强的促炎症作用,并与多种自身免疫病有关^[6]。多种细胞因子参与Th17的诱导和分化的调控,如白介素1(interleu-

[收稿日期] 2009-01-06 **[接受日期]** 2009-04-17

[基金项目] 国家高科技研究发展计划(“863”计划, 2006AA02Z496), 上海市科学技术委员会优秀学科带头人基金(07XD14013). Supported by National High-Tech R&D Program (863 Program, 2006AA02Z496) and Funds for Leading Scientist of Science and Technology Commission of Shanghai Municipality(07XD14013).

[作者简介] 周运恒, 博士生. E-mail: hongniwan@gmail.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81886071, E-mail: rqzhong@yahoo.com

kin 1, IL-1)、IL-6、IL-17、IL-23 和转化生长因子(transforming growth factor β , TGF- β)等^[7-8]。而 PBC 与 Th17 相关细胞因子的关系目前仍未明确。为此,本研究观察了 PBC 患者 Th17 相关细胞因子的变化,以探讨 Th17 细胞在 PBC 发病过程中的作用。

1 资料和方法

1.1 一般资料 2007~2008 年第二军医大学长征医院被确诊为 PBC 的住院和门诊患者 78 例,均符

合美国肝病学会 2000 年推荐的 PBC 诊断指南^[9]: (1)肝内淤胆的临床症状和体征,肝功能指标异常,特别是胆汁淤积的证据;(2)腹部 B 超、CT 或逆行胰胆管造影排除其他胆道梗阻因素;(3)血清抗线粒体抗体(AMA) $\geq 1:40$ 或 AMA-M2 阳性。30 例乙型肝炎后肝硬化患者(HBV-related posthepatic cirrhosis, PHC); 60 例健康对照(healthy control, HC),健康对照组均无肝病史。各组临床资料详见表 1。

表 1 受试对象的基本资料
Tab 1 Clinical data of patients

Index	Min-Max	PBC(n=78)	PHC(n=30)	HC(n=60)
Average age	-	55±15	53±13	52±10
Sex (male : female)	-	13 : 65	11 : 19	17 : 43
AST $\bar{x}_B/(U \cdot L^{-1})$	0-40	111±164	71±45	20±5.1
ALT $\bar{x}_B/(U \cdot L^{-1})$	0-50	99±111	68±62	19±7.5
TBA $\bar{x}_B/(\mu\text{mol} \cdot L^{-1})$	0-15	47±54	63±80	4.08±1.73
GGT $\bar{x}_B/(IU \cdot L^{-1})$	0-40	229±232	103±92	25±11
ALP $\bar{x}_B/(IU \cdot L^{-1})$	15-112	225±127	132±113	53±17
IgM $\rho_B/(g \cdot L^{-1})$	0.5-2.5	3.2±2.0	1.31±0.66	1.43±0.50
Child-Pugh(A/B/C)	-	43/15/20	16/6/8	-

1.2 血清标本 Th17 相关细胞因子及其他指标的测定

1.2.1 Th17 相关细胞因子的测定 血清标本收集后分装,-80℃冻存,测定时只解冻 1 次。采用酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)法检测血清中 Th17 相关细胞因子 IL-6、IL-1 β 、IL-17、IL-23、TGF- β (均为 eBioscience 公司产品)的变化,其灵敏度如下:IL-1 β 4 pg/ml, IL-6 2 pg/ml, IL-17A 4 pg/ml, IL-23(p19/p40) 15 pg/ml, TGF- β 60 pg/ml; TGF- β 测定之前,血清需要 1:5 稀释,酸化和碱中和处理。

1.2.2 其他指标的测定 谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)、谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、 γ -谷氨酰转肽酶(gamma-glutamyl-transpeptidase, GGT)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、总胆汁酸(total bile acid, TBA)、血清胆红素(TBIL)和 IgM 的测定采用罗氏 Modular P800 生化自动分析仪常规生化检测。疾病严重程度根据

Child-Pugh 分级的 5 个临床指标(血清胆红素、腹水、血清白蛋白浓度、凝血酶原时间及肝性脑病)进行评分。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 15.0 软件(SPSS, Chicago, IL, USA), 计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用非参数方法 Mann-Whitney U 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

结果(表 2)表明:与 HC 组相比,PBC 患者血清 IL-1 β 、IL-6、IL-17A 和 IL-23 水平显著升高($P < 0.05$), TGF- β 差异无统计学意义;但与 PHC 组相比,PBC 患者血清 IL-1 β 、IL-6 和 TGF- β 水平显著降低($P < 0.05$), IL-17A、IL-23 水平显著升高($P < 0.05$);与 HC 组相比,PHC 患者血清 IL-1 β 、IL-6 和 TGF- β 水平显著升高;但两组间 IL-17A、IL-23 差异无统计学意义。

表 2 各组患者血清 Th17 相关细胞因子水平的比较
Tab 2 Serum levels of Th17-related cytokines in each group

Cytokines $\rho_B/(pg \cdot ml^{-1})$	PBC(n=78)	PHC(n=30)	HC(n=60)	P value		
				PBC vs PHC	PBC vs HC	PHC vs HC
IL-1 β	42.1±53.2	115±108	20.4±18.0	0.001	0.004	0.000
IL-6	23.4±22.7	69.5±73.5	2.93±2.90	0.000	0.000	0.000
IL-17A	22.5±14.8	19.4±4.6	18.0±1.4	0.036	0.000	0.106
IL-23	228±254	104±56	95.9±49.6	0.000	0.000	0.321
TGF- β	3.324±1.496	5.052±2.956	3.564±1.450	0.001	0.364	0.018

3 讨论

Th17 细胞分泌的细胞因子除 IL-17(IL-17A) 外,还包括 IL-17F、IL-22、IL-6、TNF- α ^[7,10]。IL-17 作为一种促炎细胞因子在人类和小鼠的许多慢性感染性疾病和自身免疫性疾病中起重要作用。本研究发现 PBC 患者的 IL-17A 和 IL-23 水平显著高于 PHC 组与 HC 组,且后两者间差异无统计学意义。这可能与 PBC 和 PHC 的发病机制不同有关,与肝炎肝硬化相比,IL-17 和 IL-23 在 PBC 的发病过程中可能发挥着更重要的作用^[11-12]。IL-23 是由 p19 和 IL-12 的 p40 亚单位通过二硫键相连组成的异二聚体,是一种广泛参与体内免疫过程,对多种免疫细胞的分化发育、增殖及炎症反应的调节起重要作用的细胞因子。IL-23 可以通过上调促炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-17 的分泌间接促进炎症的发生。虽然 IL-23 不是 Th17 细胞分化的诱导因子,但在分化起始后 Th17 细胞存活、功能维持以及之后介导的免疫应答中发挥不可或缺的作用^[13]。

除了 IL-23 外,IL-1 β 、IL-6 和 TGF- β 也是促进 Th17 分化的重要细胞因子。Acosta-Rodriguez 等^[14]研究发现,TGF- β 和 IL-6 可以诱导 Th17 细胞的分化;IL-1 β 虽然能够促进 TGF- β 和 IL-6 诱导 Th17 细胞的分化,但不能取代 TGF- β 和 IL-6 的作用^[15]。而 Chen 等^[16]的体内实验发现,TGF- β 可能对 Th17 的分化不起作用,甚至可能抑制 Th17 的分化。另外 Bettelli 等^[17]在 TGF- β 缺陷的小鼠中发现 Th17 细胞数量减少,而过高表达 TGF- β 的小鼠 Th17 细胞的数量也相应增加,从而加重自身免疫疾病的病情。结果提示 TGF- β 在人类和动物 Th17 细胞分化过程中的作用并不一致,所以 TGF- β 与 Th17 之间的关系仍待进一步研究。本研究结果表明,与促进 Th17 分化有关的细胞因子 IL-1 β 、IL-6 和 IL-23 的血清学水平都显著高于健康人,尤其是 IL-1 β 和 IL-6 作为体内重要的促炎细胞因子,其水平的显著升高还可以反映机体的炎症状态,所以由这些促炎细胞因子的升高可以推测 PBC 患者处于慢性炎症状态。

Th17 细胞的发现是对 Th1/Th2 平衡理论的补充和发展,本研究仅简单地检测了几个促 Th17 分化的细胞因子,它们的血清学水平升高可能提示 Th17 细胞参与了 PBC 的发病,但 Th17 细胞及 Th1 细胞在发挥效应中的关系以及 Th17 细胞在 PBC 发病过程中的具体作用机制仍待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Jones D E. Pathogenesis of primary biliary cirrhosis[J]. *J Hepatol*, 2003, 39: 639-648.
- [2] Selmi C, Mayo M J, Bach N, Ishibashi H, Invernizzi P, Gish R G, et al. Primary biliary cirrhosis in monozygotic and dizygotic twins: genetics, epigenetics, and environment[J]. *Gastroenterology*, 2004, 127: 485-492.
- [3] Gershwin M E, Mackay I R. The causes of primary biliary cirrhosis: Convenient and inconvenient truths [J]. *Hepatology*, 2008, 47: 737-745.
- [4] Golovanova E V, Il'chenko L Iu, Tsaregoro dtseva T M, Serova T I, Gudkova R B. Cytokines in primary biliary cirrhosis (diagnostic and prognostic value)[J]. *Ter Arkh*, 2004, 76: 8-11.
- [5] Nagano T, Yamamoto K, Matsumoto S, Okamoto R, Tagashira M, Ibuki N, et al. Cytokine profile in the liver of primary biliary cirrhosis[J]. *J Clin Immunol*, 1999, 19: 422-427.
- [6] Stockinger B, Veldhoen M. Differentiation and function of Th17 T cells[J]. *Curr Opin Immunol*, 2007, 19: 281-286.
- [7] Park H, Li Z, Yang X O, Chang S H, Nurieva R, Wang Y H, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17[J]. *Nat Immunol*, 2005, 6: 1133-1141.
- [8] Volpe E, Servant N, Zollinger R, Bogiatzi S I, Hupé P, Barillot E, et al. A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T (H)-17 responses [J]. *Nat Immunol*, 2008, 9: 650-657.
- [9] Heathcote E J. Management of primary biliary cirrhosis. The American Association for the Study of Liver Diseases practice guidelines[J]. *Hepatology*, 2000, 31: 1005-1013.
- [10] Chen Z, Laurence A, O'Shea J J. Signal transduction pathways and transcriptional regulation in the control of Th17 differentiation[J]. *Semin Immunol*, 2007, 19: 400-408.
- [11] Fattovich G, Bortolotti F, Donato F. Natural history of chronic hepatitis B; special emphasis on disease progression and prognostic factors[J]. *J Hepatol*, 2008, 48: 335-352.
- [12] Baio P, Brucato A, Buskila D, Gershwin M E, Giacomazzi D, Lopez L R, et al. Autoimmune diseases and infections; controversial issues[J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2008, 26(1 Suppl 48): S74-S80.
- [13] Izcue A, Hue S, Buonocore S, Arancibia-Cárcamo C V, Ahern P P, Iwakura Y, et al. Interleukin-23 restrains regulatory T cell activity to drive T cell-dependent colitis[J]. *Immunity*, 2008, 28: 559-570.
- [14] Acosta-Rodriguez E V, Napolitani G, Lanzavecchia A, Sallusto F. Interleukins 1 beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells[J]. *Nat Immunol*, 2007, 8: 942-949.
- [15] Wilson N J, Boniface K, Chan J R, McKenzie B S, Blumenschein W M, Mattson J D, et al. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells[J]. *Nat Immunol*, 2007, 8: 950-957.
- [16] Chen Z, O'Shea J J. Th17 cells: a new fate for differentiating helper T cells[J]. *Immunol Res*, 2008, 41: 87-102.
- [17] Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom T B, Oukka M, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells[J]. *Nature*, 2006, 441: 235-238.