

原发性胆汁性肝硬化外周血及肝组织中 Th17/IL-17 轴的初步研究

杨 婧, 杨晋辉, 王海霞, 李 艳, 李 雯
(昆明医科大学第二附属医院肝胆胰内科, 云南昆明 650101)

[摘要] **目的** 探讨 PBC 患者外周血和肝组织中 Th17/CD4⁺T 细胞及其表达的特异细胞因子 IL-17 与肝脏损伤的关系. **方法** 收集 26 例 PBC 患者 (PBC 组), 20 例 HBV 患者 (HBV 组) 和 20 例健康人群 (HC 组) 的外周血和肝组织, 采用流式细胞术 (flow cytometry, FCM) 测定 Th17/CD4⁺T 细胞的比值, 酶联免疫吸附法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 测定血清 IL-17 水平, 比较 3 组间的表达情况, 并分析血清 IL-17 与 ALP、GGT 的相关性. 同时对比 Th17/CD4⁺T、IL-17 在 PBC 不同病理学分期表达的水平. **结果** PBC 患者外周血、肝组织中 Th17/CD4⁺T 和血清 IL-17 明显高于 HBV 患者和健康对照组 ($P < 0.05$), 血清 IL-17 表达水平与 ALP、GGT 均呈正相关 ($P < 0.05$), PBC III ~ IV 期外周血、肝组织中 Th17/CD4⁺T 细胞水平高于 PBC I ~ II 期 ($P < 0.05$). **结论** Th17/CD4⁺T 细胞及其分泌的特异细胞因子 IL-17 可能在 PBC 免疫发病和肝脏的炎症纤维化中起着关键作用.

[关键词] 原发性胆汁性肝硬化; Th17/CD4⁺T 细胞; 白介素-17

[中图分类号] R575.2¹ [文献标识码] A [文章编号] 2095-610X (2014) 09-0083-05

Preliminary Study of Th17/IL-17 Axis in the Peripheral Blood and Liver Tissue of Patients with Primary Biliary Cirrhosis

YANG Jing, YANG Jin-hui, WANG Hai-xia, LI Yan, LI Wen
(Hepatology Center, The 2nd Affiliated Hospital of Kunming Medical University,
Kunming Yunnan 650101, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the relationship between hepatic impairment and Th17/CD4⁺T cells and IL-17 in the peripheral blood and hepatic tissues of patients with primary biliary cirrhosis (PBC). **Methods** Peripheral blood and liver specimens of 26 PBC patients, 20 HBV infected patients and 20 healthy subjects were collected. The ratio of Th17 cells/CD4⁺T cells was measured by flow cytometry (FCM). Serum levels of IL-17 were tested by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and compared between different groups. Correlations of IL-17 with ALP and GGT were also analyzed. The levels of Th17/CD4⁺T and IL-17 in different pathological stages were compared. **Results** Th17/CD4⁺T cells in peripheral blood and liver tissue and serum IL-17 of patients with PBC were significantly higher than those of patients infected by HBV or healthy control group ($P < 0.05$). There were positive correlations of serum IL-17 with ALP and GGT ($P < 0.05$). The level of Th17/CD4⁺T cells in the peripheral blood and hepatic tissue of patients with stage III-IV PBC were significantly higher than that of patients with stage I-II PBC. **Conclusion** Th17/CD4⁺T cells and specific cytokine IL-17 secreted by Th17/CD4⁺T cells may play a critical role in the immuno-pathogenesis and hepatic fibrosis of patients with PBC.

[Key words] Primary biliary cirrhosis; Th17/CD4⁺T cells; Interleukin-17

原发性胆汁性肝硬化 (primary biliary cirrhosis, PBC) 是一种进行性胆汁淤积性、自身免疫性肝病, 以肝内中小胆管破坏和门脉区肝细胞损伤为主, 好发于中老年女性, 最终可进展为肝硬化、

[基金项目] 云南省卫生厅卫生科技计划项目 (2011ws0106)

[作者简介] 杨婧 (1974~), 女, 云南大理市人, 医学硕士, 副主任医师, 主要从事消化内科、慢性肝病临床及科研工作.

[通讯作者] 杨晋辉. E-mail: yangjing_dl@163.com

肝衰竭^[1-3]。PBC 的病因和发病机制尚不完全清楚,与外界环境、自身免疫状态、遗传因素有关,随着检验技术的提高和医生对该病认识增加,该病发病率也在逐年增加^[4]。CD4⁺T 细胞亚群 Th17 是一种不同于 Th1 和 Th2 的免疫细胞,具有很强的促炎症作用,与多种自身免疫性疾病有关。但 Th17/CD4⁺T 及相关细胞因子与 PBC 发病的关系,目前尚未明确。故本研究观察 26 例 PBC 患者、20 例 HBV 患者和 20 例健康人外周血、肝组织中 Th17/CD4⁺T、血清 IL-17 表达水平,探讨 Th17/IL-17 轴在 PBC 发病中的作用。

1 资料和方法

表 1 研究对象基本资料 ($\bar{x} \pm s$)
Tab. 1 Clinical data of patients ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	年龄	性别		ALT(μ /L)	AST(μ /L)	ALP(μ /L)	GGT(μ /L)	TBIL(μ mol/L)
			男	女					
参考值	-	-	-	-	7~40	13~35	50~135	7~45	5.5~25
PBC	26	51 \pm 9.76	7	19	146.23 \pm 130.79	141.80 \pm 165.94	346.10 \pm 216.59	527.54 \pm 471.51	72.48 \pm 57.78
HBV	20	39.75 \pm 12.37	11	9	40.45 \pm 28.45	36.2 \pm 12.5	95.15 \pm 37.03	33.75 \pm 26.60	14.7 \pm 5.72
HC	20	50.8 \pm 15.4	9	11	25.2 \pm 2.86	28.4 \pm 3.8	78.25 \pm 19.31	24.9 \pm 2.77	10.8 \pm 2.44

1.2 研究方法

征得研究对象同意,彩超引导下肝脏穿刺活检术,收集肝组织 2 条,1 条送昆明医科大学病理教研室采用统一标准阅片,1 条送昆明医科大学第三附属医院采用统一方法行流式细胞术检测 Th17/CD4⁺T 细胞比值。

采集研究对象外周静脉血 5 mL,采用流式细胞术检测研究对象血 Th17/CD4⁺T 细胞的比值,及 ELISA 方法检测 IL-17 表达水平。常规检测研究对象外周血清中的 ALP、GGT 值。

1.3 统计学处理

应用 SPSS 软件包进行统计分析。计量资料以表示,两组间比较采用非参数 Mann-whitney U 检验;多组独立样本比较采用非参数 H 检验,相关性分析采用 Spearman 分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组研究对象间外周血、肝组织 Th17/CD4⁺T

1.1 一般资料

2012 年 1 月至 2013 年 5 月昆明医科大学第二附属医院住院 PBC 患者 26 例 (OBC 组),诊断均符合 2000 年美国肝病学会的推荐的 PBC 诊断指南^[5],均未使用过糖皮质激素、熊去氧胆酸或其他免疫抑制剂,增强剂治疗。慢性乙型肝炎患者 20 例 (HBV 组),诊断符合 2000 年全国传染病与寄生虫学术会议修订的慢性肝炎诊断标准^[6]。健康对照组 20 例 (HC 组),为昆明医科大学第二附属医院肝胆外科行肝部分切除的肝血管瘤者,同时排外酒精性肝病和病毒性肝病等慢性肝病。各组临床资料详见表 1。

及血清 IL-17 水平比较

PBC 组外周血、肝组织 Th17/CD4⁺T% 值及 IL-17 表达量均高于 HBV 和 HC 组 ($P < 0.05$),并且 HBV 和 HC 比较,HBV 组外周血、肝组织 Th17/CD4⁺T% 值及 IL-17 表达量高 ($P < 0.05$),见表 2 及图 1~3。

2.2 PBC 患者外周血和肝组织 Th17/CD4⁺T 及血清 IL-17 水平与 ALP、GGT 相关性分析

研究发现血清 IL-17 表达水平与 ALP、GGT 呈正相关 ($r = 0.708$, $P < 0.001$)、($r = 0.561$, $P = 0.003$),外周血和肝组织 Th17/CD4⁺T 与 ALP、GGT 无明显相关性,见表 3 及图 4、5。

2.3 PBC I ~ II 期和 PBC III - IV 期 2 组 Th17/CD⁺T、IL-17 的差异

PBC 患者 PBC I ~ II 期和 PBC III ~ IV 期肝组织和外周血 Th17/CD4⁺T 值差异有统计学意义 ($P < 0.05$),而 PBC I ~ II 期和 PBC III ~ IV 期血清 IL-17 表达量差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见表 5、图 6。

表 2 3 组研究对象各指标组间结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Comparison of various parameters among three groups ($\bar{x} \pm s$)

指 标	PBC (n = 26)	HBV (n = 20)	HC (n = 20)	P		
				PBC 和 HBV	PBC 和 HC	HBV 和 HC
外周血 Th17/CD4 ⁺ T (%)	36.53 ± 8.38	29.85 ± 14.27	19.51 ± 5.34	P = 0.044	P = 0.000	P = 0.023
肝组织Th17/CD4 ⁺ T (%)	44.44 ± 15.13	28.62 ± 11.68	18.78 ± 5.15	P = 0.001	P = 0.000	P = 0.009
血清 IL-17 (pg/mL)	28.37 ± 5.37	20.79 ± 4.22	17.13 ± 4.29	P = 0.000	P = 0.000	P = 0.004

3 组组间相同指标比较, P < 0.05.

表 3 PBC 患者外周血和肝组织 Th17/CD4⁺T 及血清 IL-17 水平与 ALP、GGT 相关性分析

Tab. 3 Correlations of Th17/CD4⁺T in patients' peripheral blood, liver tissue and serum IL-17 with ALP and GGT

PBC 患者	外周血 Th17/CD4 ⁺	IL-17	肝组织 Th17/CD4 ⁺ T
ALP			
r	0.058	0.708	0.043
P	0.779	0.000	0.836
GGT			
r	0.274	0.561	0.245
P	0.176	0.003	0.229

表 4 PBC I ~ II 期和 PBC III ~ IV 期 2 组间比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 4 Comparison between patients with PBC I - II and PBC III - IV ($\bar{x} \pm s$)

	PBC I ~ II 期 (8 人)	PBC III ~ IV 期 (18 人)	P
外周血Th17/CD4 ⁺ T(%)	31.17 ± 8.30	38.91 ± 7.45	0.017
肝组织Th17/CD4 ⁺ T(%)	34.24 ± 10.35	48.99 ± 14.89	0.023
血清IL-17(Pg/mL)	27.05 ± 4.14	28.77 ± 5.56	0.636

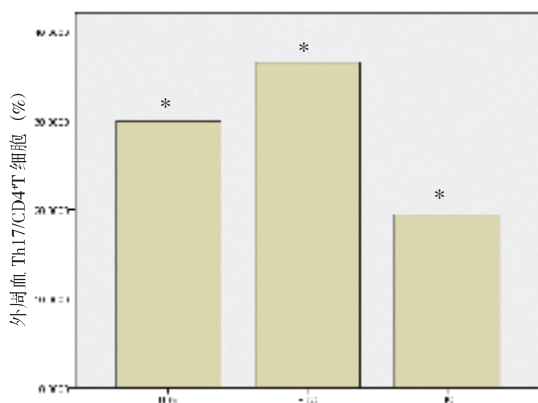


图 1 3 组研究对象外周血 Th17/CD4⁺T 细胞的比较

Fig. 1 Comparison of peripheral Th17/CD4⁺T cells among three groups

3 组间两两比较, *P < 0.05.

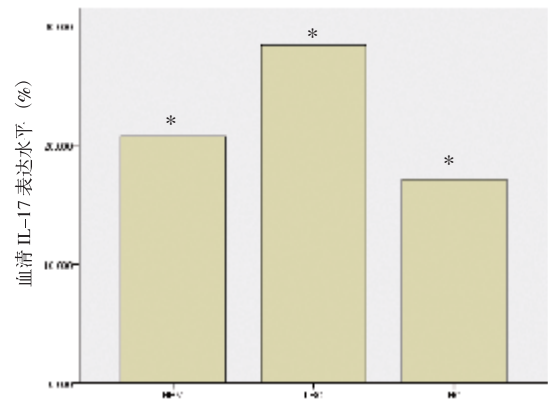


图 2 3 组研究对象血清 IL-17 表达水平的比较

Fig. 2 Comparison of serum IL-17 among three groups

3 组间两两比较, *P < 0.05.

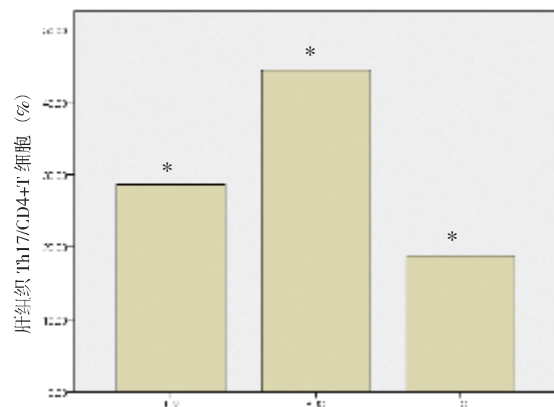


图 3 3 组研究对象肝组织 Th17/CD4⁺T 细胞的比较

Fig. 3 Comparison of Th17/CD4⁺T cells in liver tissue among three groups

3 组间两两比较, *P < 0.05.

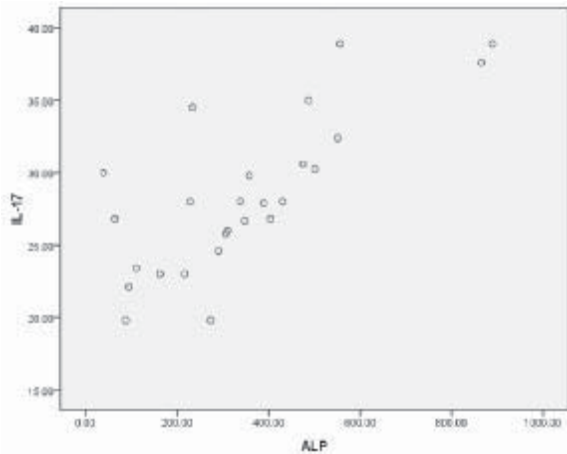


图 4 ALP 与血清 IL-17 呈正相关性 ($r=0.708$; $P=0.000$)
Fig. 4 Positive correlation between ALP and serum IL-17 ($r=0.708$; $P=0.000$)

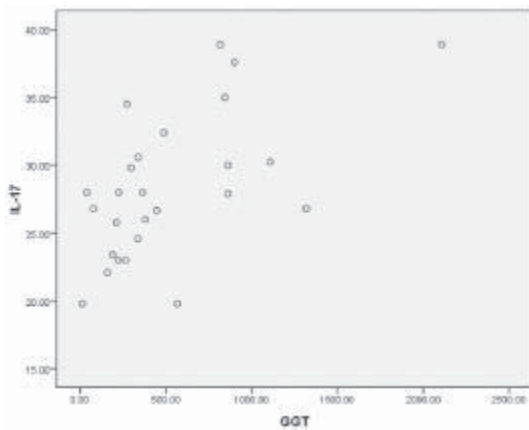


图 5 GGT 和血清 IL-17 呈正相关 ($r=0.561$; $P=0.003$)
Fig. 5 Positive correlation between GGT and serum IL-17 ($r=0.561$; $P=0.003$)

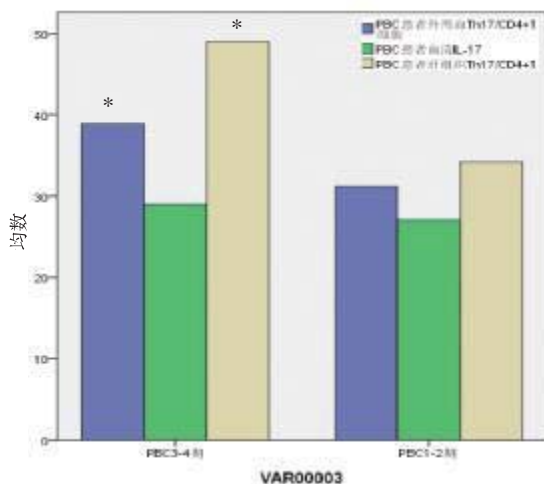


图 6 PBC I ~ II 期和 PBC III ~ IV 期两组间比较
Fig. 6 Comparison between patients with PBC I ~ II and PBC III ~ IV
 与同指标 PBC I ~ II 期比较, $*P < 0.05$.

3 讨论

CD4⁺T 细胞在 PBC 的免疫致病过程中具有重要作用. 根据产生细胞因子的不同, 可以将 CD4⁺T 细胞分为 Th1 和 Th2 型. 以往许多研究认为 Th1 型细胞及其细胞因子在 PBC 中起着重要作用. Th17 是一种新发现的 CD4⁺T 细胞亚群, 现已发现在一些自身免疫性疾病的发生发展过程中, Th17 细胞发挥重要调节作用. 但 Th17 与 PBC 的具体关系如何目前仍未明确.

很多研究表明, IL-17 是 Th17 细胞分泌的特异性效应因子, 其作为一种促炎因子, 引起炎症细胞浸润、中性粒细胞的趋化, 并通过促使多种其他炎症因子的分泌、释放和趋化到炎症部位, 引起组织损伤, 参与自身免疫性疾病的发生发展^[7,8]. 本研究结果发现 PBC 患者外周血、肝组织中 Th17/CD4⁺T 细胞水平和血清 IL-17 水平均较慢性乙型肝炎组和正常对照组表达增高, 慢性乙型肝炎组外周血、肝组织中 Th17/CD4⁺ 细胞水平和血清 IL-17 水平较正常对照组表达增高, 差异有统计学意义, 与 Rong^[9]和 Ge^[10]等的研究类似. 由此可推测肝细胞在炎症损伤的微环境下更易诱导 Th17 细胞的产生并释放到血液循环中, 同时分泌炎症细胞因子参与肝组织炎症的发生、介导自身免疫反应. 有研究发现 PBC 患者肝组织中增多的 IL-17 细胞主要聚集在炎症损伤的胆管周围, 主要通过攻击胆管上皮细胞 (biliary epithelial cells, BEC), 引起其凋亡, 导致慢性进行性中小胆管的破坏消失、胆汁淤积, 最终发生肝硬化和肝功能衰竭^[11]. 但为何 PBC 的 Th17 与 IL17 表达强于慢性乙型肝炎组, 其具体机制如何, 尚待进一步的研究.

胆汁淤积时, 肝细胞生成 GGT 和 ALP 明显增加, 经淋巴管和肝血窦进入血流, 导致血清中 GGT 和 ALP 增高, 故二者是反映胆汁淤积慢性肝病严重程度的重要实验指标, GGT 还与肝组织炎症呈明显的相关性, 反映肝脏病理损伤的严重程度^[12,13]. 笔者的研究发现 PBC 患者外周血中 IL-17 水平增高, 且血清 IL-17 与 ALP 和 GGT 水平呈正相关, 表明 IL-17 与 PBC 患者胆管上皮细胞损伤的严重程度及纤维化的形成和进展有一定的关系. 笔者推测 IL-17 通过参与机体病理性免疫应答和加强细胞毒性反应, 释放出自身抗原, 最终导致 PBC 中胆管上皮细胞和肝细胞炎症破坏.

按照肝组织病理学检查结果, 笔者对比了 PBC I ~ II 期和 PBC III ~ IV 期患者的外周血、肝组织

Th17/CD4⁺T 细胞和血清 IL-17 表达水平, 结果发现 Th17/CD4⁺T 细胞在 PBC III ~ IV 期外周血和肝组织的表达显著高于 PBC I ~ II 期, 提示在 PBC 患者的胆管损伤和肝脏的纤维化进展中 Th17/CD4⁺T 发挥了重要作用, 且随肝脏损伤和纤维化加重, Th17/CD4⁺T 水平增高, 故可通过检测患者外周血、肝组织 Th17/CD4⁺T 细胞来判断疾病进展和提示预后。

本研究中 PBC 外周血和肝组织 Th17/CD4⁺T 与 ALP、GGT 无明显相关性, PBC I ~ II 期和 PBC III ~ IV 期 2 组血清 IL-17 表达水平差异无统计学意义, 其原因考虑病例数过少所致, 可增加病例数后再进一步分析。

综上所述, 笔者的研究提示 Th17/IL-17 轴在 PBC 患者肝脏的慢性损伤过程中起着重要作用, 但其具体机制仍需深入研究, 如 Th17 与其它免疫细胞的关系、Th17 的调控, 以及参与调控的关键细胞因子等。相信随着对 Th17 细胞的认识不断深入, 将对 PBC 的临床诊疗提供指导作用。

[参考文献

- [1] INVERNIZZI P, SELMI C, GERSHWIN M E. Update on primary biliary cirrhosis [J]. *Dig Liver Dis*, 2010, 42(6): 401 - 408.
- [2] CARBONE M, NEUBERGER J M. Autoimmune liver disease, autoimmunity and liver transplantation [J]. *Journal of hepatology*, 2014, 60(1): 210 - 223.
- [3] FARRELL G C. Primary biliary cirrhosis in asians: less common than in Europeans, but just as depressing [J]. *Gastroenterol Hepatol*, 2008, 23(4): 508 - 511.
- [4] LIU H. Prevalence of primary biliary cirrhosis in adults referring hospital for annual health check-up in southern China [J]. *BMC Gastroenterol*, 2010, 10: 100.
- [5] HEATHEOTE E J. Management of primary biliary cirrhosis. the ameri can association for the study of liver diseases practice guidelines [J]. *Hepatology*, 2000, 4: 1 005 - 1 013.
- [6] 中华传染病寄生虫学分会, 肝脏病学分会, 病毒性肝炎防治方案 [J]. *中华肝脏病杂志*, 2000, 8(6): 324 - 329.
- [7] CECILE KING, STUART G, TANG Y E, et al. T follicular helper (TFH) cells in normal and dysregulated immune responses [J]. *Annu R ev Immunol*, 2008, 26: 741 - 766.
- [8] KORN T, BETTELLI E, OUKKA M, et al. IL-17 and Th17 cells [J]. *Annu Rev Immunol*, 2009, 27: 485 - 517.
- [9] RONG G, ZHOU Y, XIONG Y, et al. Imbalance between T helper type 17 and T regulatory cells in patients with primary biliary cirrhosis: the serum cytokine profile and peripheral cell population [J]. *J Clin Exp Immunol*, 2009, 156 (2): 217 - 225.
- [10] GE J, WANG K, MENG Q H, et al. Implication of Th17 and Th1 cells in patients with chronic active hepatitis B [J]. *J Clin Immunol*, 2010, 30 (1): 60 - 67.
- [11] Immunological diseases of the pancreatico-hepatobiliary system: update on etiopathogenesis and cross-sectional imaging findings [J]. *Abdominal imaging*, 2012, 37 (2): 261 - 274.
- [12] 沈宏辉, 赵景民, 辛绍杰, 等. 慢性乙型肝炎患者血清生化指标对肝组织炎症程度的评估价值 [J]. *中华肝脏病杂志*, 2009, 17(1): 12 - 15.
- [13] RUTH Y, CHENG CM, LIAN Z X, et al. Liver-targeted and peripheral blood Alterations of regulatory T cells in primary biliary cirrhosis [J]. *Liver Failure and Liver Disease*, 2006, 43(4): 729 - 737.

(2014-06-02 收稿)