

肝硬化患者中白细胞介素 17A 水平及临床意义

钱晓峰,谭忠明,孙倍成,王学浩*

(南京医科大学第一附属医院肝脏外科,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:研究肝硬化患者中白细胞介素(Interleukin, IL)-17A 的表达情况与其定位,并研究外周血和组织中 IL-17A 的含量与肝硬化发展的关系。方法:收集肝硬化患者外周血和肝组织,通过血清酶联免疫吸附法和免疫组织化学法,观察 IL-17A 在肝硬化患者血清、肝脏组织中的表达量,在肝硬化组织中的定位及其与肝硬化程度之间的关系。结果:肝硬化患者血清中的 IL-17A 水平明显高于正常对照者;肝硬化组织中,IL-17A 主要表达在肝星状细胞、浸润的中性粒细胞和淋巴细胞,以及胆管上皮细胞中,新鲜肝组织中 IL-17A 的含量与 Child-Pugh 分级之间存在正相关关系。结论:IL-17A 在肝硬化过程中起着重要的作用,且可一定程度反映肝硬化的进展。

[关键词] 白细胞介素 17A; 肝硬化; 临床分析

[中图分类号] R575.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)11-1561-04

Interleukin-17A level in patients with liver cirrhosis and its clinical significances

QIAN Xiao-feng, TAN Zhong-ming, SUN Bei-cheng, WANG Xue-hao*

(Department of Liver Surgery, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the expression and location of IL-17A in the liver fibrosis and evaluate the clinical significances of IL-17A. **Methods:** The peripheral blood and liver tissue was collected from the patients with liver fibrosis. The serum IL-17A level was assayed by ELISA, and the expression and location of IL-17A in the liver tissue was detected by immunohistochemistry. **Results:** Serum IL-17A level was significantly higher in cirrhotic patients than in control. IL-17A was mainly expressed in hepatic stellate cells, infiltrative neutrophil and lymphocyte, and bile ducts epithelium in the liver fibrosis tissue. The IL-17A expression in liver was correlated with Child-Pugh grades. **Conclusion:** IL-17A is critical in liver fibrosis, and the expression level of IL-17A may indicated the severity of liver fibrosis.

[Key words] interleukin -17A; liver fibrosis; clinical analysis

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(11): 1561-1564]

肝硬化作为临床上常见的各种难治性肝脏疾病的共同转归,严重威胁人类生命安全^[1]。白细胞介素(interleukin, IL)-17A 作为新近发现的一种细胞因子,能促进中性粒细胞向炎症组织中募集,在肝缺血再灌注损伤、自身免疫性肝炎、肺纤维化等多种特异性及非特异性炎症反应中发挥重要作用^[2-3]。本研究通过筛选南京医科大学第一附属医院 2011 年 3 月 20 日~2012 年 5 月 1 日就诊的 35 例肝硬化患者和 10 例健康志愿者,观察 IL-17A 在肝硬化患者血清与肝脏中的表达情况及其与 Child-Pugh 改良分级之

间的关系,为进一步研究炎症与肝硬化发生之间的关系提供研究基础,并为肝硬化肝损伤程度的辅助判断提供了一定思路。

1 对象和方法

1.1 对象

35 例肝硬化患者均经病史、临床生化、腹部 CT 确诊为肝硬化。其中,男 21 例,女 14 例,年龄 36~72 岁,平均 51 岁。酒精性肝硬化 4 例,乙型肝炎后肝硬化 19 例,丙型肝炎后肝硬化 6 例,血吸虫性肝硬化 6 例。Child-Pugh 改良分级法采用患者 5 个指标(一般状况、腹水、血清胆红素、血清白蛋白浓度及凝血酶原时间)的不同状态分 3 个层次,分别记为 1 分、2 分和 3 分,并将 5 个指标计分进行相加,总和最低

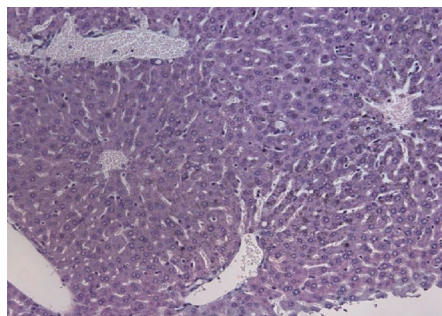
[基金项目] 江苏高校优势学科建设工程项目(JX10231081);江苏省研究生培养创新工程(CXZZ12_0578)

*通讯作者, E-mail: wangxh@njmu.edu.cn

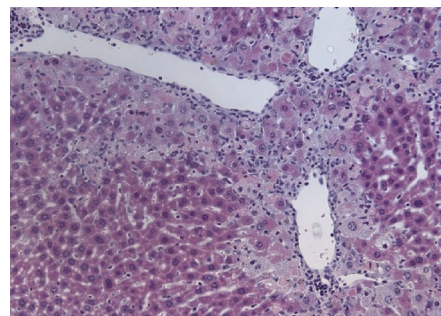
分为 5 分,最高分为 15 分,根据总分将肝脏储备功能分为 A、B、C 3 级。所有肝硬化患者根据 Child-Pugh 改良分级分为 3 组,A 级 11 例、B 级 12 例、C 级 12 例。上述肝硬化患者均因肝脏占位性病变而施以部分肝切除术。10 例健康者志愿者为正常对照组。正常肝脏取自肝血管瘤患者切除标本的远端肝组织。

1.2 方法

枸橼酸钠抗凝管采集空腹静脉血 4 ml,4 000 r/min 离心,分离血浆,置入-80℃冰箱。肝硬化患者部分肝脏切除后取其肿瘤远端的组织约 0.3 g,加入 1 ml 预冷 PBS 中,10 000 r/min 离心,取上清,置入-80℃冰箱。血清及肝脏匀浆上清 IL-17A 浓度检测,采用 IL-17A ELISA 检测试剂盒(美国 RayBio 公司)参照试剂盒说明书进行检测。新鲜肝组织经 4%多聚甲醛固定,常规石蜡包埋后切片,利用 IL-17A 抗体(ab-79056,美国 Abcam 公司)检测 IL-17A 在肝硬化组织中的表达情况,显微镜(DM4000B,德国 Leica 公司)拍照,图像利用 Photoshop CS5 进行处理。



正常肝脏



肝硬化

图 1 肝硬化患者肝脏形态学变化(HE,× 200)

Figure 1 Morphologic changes of liver in cirrhotic patients(HE,× 200)

2.2 IL-17A 在肝硬化患者血清中的表达

鉴于 IL-17A 在多种特异性及非特异性炎症反应中对炎症扩大、炎性细胞浸润、纤维组织增生的重要作用^[5],利用收集的肝硬化患者治疗前的外周血,获得血清并用 ELISA 试剂盒检测其中 IL-17A 的含量。结果显示,与 10 例健康志愿者相比,35 例肝硬化患者的血清中,IL-17A 的表达显著提高(图 2, $P < 0.05$),提示在肝硬化的状态中,IL-17A 过表达,可能与肝硬化的演变有关。

2.3 免疫组织化学法检测 IL-17A 在肝硬化组织中的分布

利用抗人 IL-17A 单克隆抗体,在肝硬化组织标本中研究 IL-17A 的表达分布,发现 IL-17A 在肝硬化组织中有着广泛的表达,特别是胆管上皮细胞、淋巴

1.3 统计学方法

所有数据均以平均值 ± 均数的标准误 ($\bar{x} \pm s_x$) 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 SNK-*q* 检验,并用 Graphpad Prism 5 软件进行相关分析, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肝硬化患者的肝组织形态学变化

肝硬化患者肝组织切片显示:肝脏汇管区大片肝细胞变性、凋亡、坏死;纤维组织增生并伸入肝实质,包绕相应脉管组织和肝细胞,形成桥接样纤维组织、假小叶形成;门静脉壁存在不同程度增厚,管腔扩大,内皮细胞完整性受损,中膜及外膜细胞明显增生;伴有大量淋巴细胞、中性粒细胞浸润进入肝组织。而对照正常肝组织则无明显变性坏死、纤维结缔组织增生等病理改变(图 1)。以上病理学改变说明炎性细胞浸润、纤维组织增生之间存在着内在关系^[4]。

细胞和中性粒细胞(图 3)。这些结果符合最近的相关报道^[6]。同时,本研究首次发现在新生成的胶原分隔中,活化的星状细胞胞浆中也有 IL-17A 的存在。

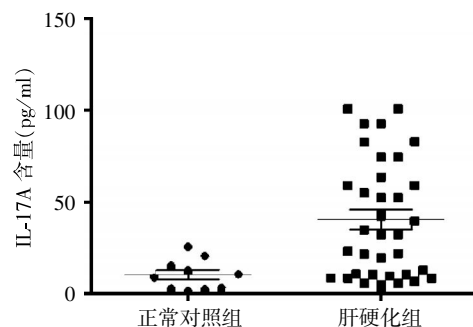
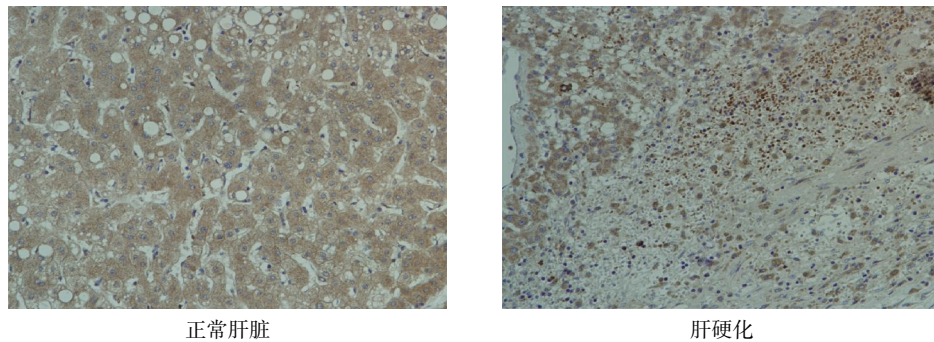


图 2 免疫组化法检测 IL-17A 在患者血清中的表达

Figure 2 IL-17A expression in serum from normal individuals and cirrhotic patients



正常肝脏
肝硬化
图 3 IL-17A 在肝硬化组织中的表达(IHC, × 200)

Figure 3 IL-17A expression in cirrhotic liver (IHC, × 200)

2.4 肝组织中 IL-17A 浓度与 Child-Pugh 分级之间的关系

由于 Child-Pugh 分级为临床上最常用的可综合反映患者肝损伤程度的指标。因此,结合 IL-17A 的浓度,有助于辅助判断肝损伤情况。通过对 35 例肝硬化患者的研究,图 4 显示,Child-Pugh 分级为 B、C 的患者,其肝脏内的 IL-17A 含量显著高于 Child-Pugh A 级的患者,且差异具有统计学意义(q 值分别为 5.143、6.618)。而 B、C 级之间,差异无统计学意义(q 值为 1.508)。

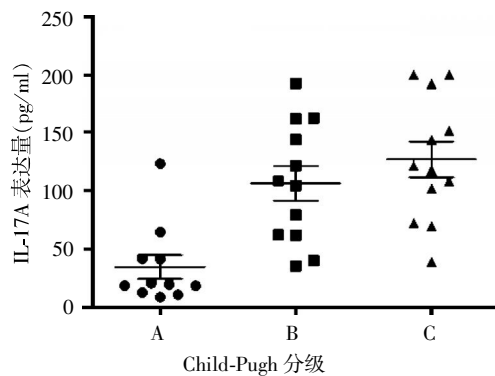


图 4 肝组织中 IL-17A 浓度与 Child-Pugh 分级之间的关系
Figure 4 IL-17A concentration in normal or fibrotic liver from patients with different Child-Pugh grades

3 讨论

肝硬化作为肝炎病毒感染、药物滥用、酒精成瘾等多种慢性肝脏疾病的共同转归,易导致门静脉高压、肝功能衰竭甚至肝癌,严重危害国人生命质量和生活质量^[7]。而 IL-17A 及其下游信号通路已被证明与中性粒细胞浸润和血管生成相关,并在哮喘、肺纤维化、溃疡性结肠炎等多种疾病中起着重要的作用^[8]。不过,关于 IL-17A 与肝硬化的关系却尚未有报道。此项研究旨在证实肝硬化组织中 IL-17A 存在过表达,IL-17A 主要来源于活化的肝星状细胞、

浸润的中性粒细胞和淋巴细胞,且肝脏中 IL-17A 的浓度可反映肝损伤程度。因此本文猜测,IL-17A 可能通过某种途径,激活了静止的星状细胞,进而促进细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的分泌,并且为未来进一步研究 IL-17A 与 ECM 产生机制之间的关系提供理论依据。

静止的肝星状细胞(贮脂细胞)在多种炎症因子刺激下大量分泌 ECM,过多的纤维组织挤压肝窦、肝外管道,甚至破坏正常肝小叶结构,引起一系列症状发生。肝星状细胞表面表达多种受体,如 IL-1 受体,转化生长因子 β 受体等,这些信号通路被激活后,包括细胞外信号调节激酶 1/2、p38 在内的促分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)级联激酶连续活化^[9],以及 Jun 氨基末端激酶等的活化,共同促进了星状细胞的生物学功能的转变^[10]。有文献报道,IL-17A 可能通过抑制 MAPK 磷酸酶 1 而激活 MAPK,并促进心肌纤维化^[11]。而本研究也发现 IL-17A 在肝硬化患者血清及肝组织中存在过表达,提示 IL-17A 可能通过招募炎症细胞扩大炎症反应,同时也可能作为独立因素刺激肝星状细胞转变,促进纤维组织的生成。

之前的报道指出,CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞、NKT 细胞均有可能是 IL-17A 的来源^[12-13],而在非特异性免疫方面,帕内特细胞分泌的 IL-17A 可能在全身系统性炎症反应中起重要作用^[14-15],中性粒细胞分泌的 IL-17A 也介导了肾缺血再灌注损伤^[16]。在此,本研究通过免疫组织化学法发现中性粒细胞、淋巴细胞、激活的肝星状细胞等均为 IL-17A 的来源,这与 Kolls 等^[17]研究相呼应的同时,也提出了新的假设:IL-17A 刺激中性粒细胞浸润,但是同时中性粒细胞也可通过 IL-17A 招募更多的炎症细胞,加重炎症反应,突出了中性粒细胞在肝脏急、慢性炎症中的重要地位。而中性粒细胞表达 IL-17A

所依赖的信号通路仍不清楚,还需要在未来的实验中进一步研究。

临床上,常用 Child-Pugh 分级来评估肝硬化后肝脏功能代偿的水平,指导用药及确定手术指征,而本研究首次发现肝脏匀浆中 IL-17A 的水平与 Child-Pugh 分级之间具有相关性,提示了肝脏炎症与肝硬化之间的紧密关系。激励进一步研究肝星状细胞的活化及 IL-17A 对其的调节机制。而 IL-17A 本身,也可能为辅助判断肝功能提供新的诊断指标。

此项研究,旨在揭示肝硬化组织中 IL-17A 的来源、功能及其与肝功能之间的对应关系,为进一步研究肝硬化发生机制、肝脏代偿功能的判断提供了研究基础。

[参考文献]

- [1] Friedman SL. Liver fibrosis: from bench to bedside[J]. *J Hepatol*, 2003, 38(Suppl 1): S38-53
- [2] Hammerich L, Heymann F, Tacke F. Role of IL-17 and Th17 cells in liver diseases[J]. *Clin Dev Immunol*, 2011, 2011: 345803
- [3] Gasse P, Riteau N, Vacher R, et al. IL-1 and IL-23 mediate early IL-17A production in pulmonary inflammation leading to late fibrosis[J]. *PLoS One*, 2011, 6(8): e23185
- [4] Goodman ZD. Grading and staging systems for inflammation and fibrosis in chronic liver diseases[J]. *J Hepatol*, 2007, 47(4): 598-607
- [5] Lemmers A, Moreno C, Gustot T, et al. The interleukin-17 pathway is involved in human alcoholic liver disease[J]. *Hepatology*, 2009, 49(2): 646-657
- [6] Cua DJ, Tato CM. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system[J]. *Nat Rev Immunol*, 2010, 10(7): 479-489
- [7] 朱颖炜, 范丽, 吴梦颖, 等. 肝硬化患者血浆中纤溶酶原激活物抑制 1 的变化及其意义[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2011, 31(3): 447-448
- [8] Numasaki M, Fukushi J, Ono M, et al. Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth[J]. *Blood*, 2003, 101(7): 2620-2627
- [9] Cortez DM, Feldman MD, Mummidi S, et al. IL-17 stimulates MMP-1 expression in primary human cardiac fibroblasts via p38 MAPK- and ERK1/2-dependent C/EBP-beta, NF-kappaB, and AP-1 activation [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007, 293(6): H3356-3365
- [10] Cassiman D, Roskams T. Beauty is in the eye of the beholder; emerging concepts and pitfalls in hepatic stellate cell research[J]. *J Hepatol*, 2002, 37(4): 527-535
- [11] Valente AJ, Yoshida T, Gardner JD, et al. Interleukin-17A stimulates cardiac fibroblast proliferation and migration via negative regulation of the dual-specificity phosphatase MKP-1/DUSP-1 [J]. *Cell Signal*, 2012, 24(2): 560-568
- [12] Edgerton C, Crispin JC, Moratz CM, et al. IL-17 producing CD4⁺ T cells mediate accelerated ischemia/reperfusion-induced injury in autoimmunity-prone mice[J]. *Clin Immunol*, 2009, 130(3): 313-321
- [13] Miossec P, Korn T, Kuchroo VK. Interleukin-17 and type 17 helper T cells [J]. *N Engl J Med*, 2009, 361(9): 888-898
- [14] Pappu R, Ramirez-Carrozzi V, Ota N, et al. The IL-17 family cytokines in immunity and disease [J]. *J Clin Immunol*, 2010, 30(2): 185-195
- [15] 王敏, 姚欣, 黄茂. 雷公藤甲素对外周血单个核细胞白细胞介素 17A 分泌的影响 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2010, 30(3): 316-318
- [16] Li L, Huang L, Vergis AL, et al. IL-17 produced by neutrophils regulates IFN-gamma-mediated neutrophil migration in mouse kidney ischemia-reperfusion injury [J]. *J Clin Invest*, 2010, 120(1): 331-342
- [17] Kolls JK, Linden A. Interleukin-17 family members and inflammation [J]. *Immunity*, 2004, 21(4): 467-476

[收稿日期] 2012-07-17