

## 白细胞介素-17在慢性乙型病毒性肝炎及肝硬化患者中的表达及意义比较

## Expression and comparison of significance of interleukin-17 in patients with chronic hepatitis B and hepatitis B virus cirrhosis

郑吉顺<sup>1</sup>, 陈萌萌<sup>2</sup>, 周翔天<sup>2</sup>,  
刘艳艳<sup>2</sup>, 李家斌<sup>2</sup>

(1. 安徽医科大学第三附属医院消化内科与感染科, 合肥 230061; 2. 安徽医科大学第一附属医院感染性疾病科, 合肥 230022)

ZHENG Ji-shun<sup>1</sup>,  
CHEN Meng-meng<sup>2</sup>,  
ZHOU Xiang-tian<sup>2</sup>, LIU Yan-yan<sup>2</sup>,  
LI Jia-bin<sup>2</sup>

(1. Department of Infectious Diseases and Gastroenterology, the Third Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230061, China; 2. Department of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022, China)

收稿日期: 2015-11-17

修回日期: 2015-12-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81172737)

作者简介: 郑吉顺(1971-), 男, 副主任医师,  
主要从事肝病的肠道微生态研究

通信作者: 李家斌, 教授, 博士生导师

Tel: (0551) 62183519

E-mail: lijiaabin948@vip.sohu.com

**摘要:**目的 探讨白细胞介素-17(IL-17) A~F(IL-17A、IL-17B、IL-17C、IL-17D、IL-17E、IL-17F)在慢性乙型病毒性肝炎(乙肝)及肝硬化中的表达情况及临床意义。方法 收集66例慢性乙肝患者(慢性乙肝组)和50例乙肝肝硬化(肝硬化组)患者的血清及粪便,以及30例健康志愿者(对照组)的血清。用荧光定量PCR检测乙肝病毒(HBV)DNA,用酶联免疫吸附试验法(ELISA)检测IL-17A~F、IL-1 $\beta$ 、IL-6、趋化因子-13。比较3组IL-17A~F的表达情况及与细胞因子、肝功能、HBV DNA的相关性。结果 慢性乙肝组及肝硬化组的IL-17A~F均明显高于对照组( $P < 0.01$ ),但慢性乙肝组与肝硬化组间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。慢性乙肝组IL-17A~F与IL-1 $\beta$ 、IL-6、CXCL-13呈正相关,与总胆红素呈负相关;IL-17C与总胆汁酸呈正相关;IL-17B、IL-17D、IL-17E与粪便HBV DNA呈正相关。肝硬化组IL-17B与IL-1 $\beta$ 呈正相关;IL-17C与谷草转氨酶、碱性磷酸酶呈正相关,IL-17D与碱性磷酸酶呈正相关;IL-17A~F与血清及粪便HBV DNA均无相关性( $P > 0.05$ )。结论 慢性乙肝及肝硬化患者均存在IL-17A~F高表达,但临床意义不完全相同。

**关键词:**慢性乙型病毒性肝炎;乙型病毒性肝炎肝硬化;白细胞介素-17;乙型病毒性肝炎病毒DNA;细胞因子

DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2016.06.005

中图分类号: R512.62; R968 文献标志码: A

文章编号: 1001-6821(2016)06-0495-04

**Abstract: Objective** To investigate the expression and compare the significance of interleukin-17 (IL-17) A-F in patients with chronic hepatitis B (CHB) and hepatitis B virus (HBV) cirrhosis. **Methods** The stools and serum samples of 66 patients with CHB and 50 patients with HBV cirrhosis were collected, and the serum samples of 30 healthy volunteers were collected. HBV DNA in stool and serum were detected by real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR). IL-17A-F, IL-1 $\beta$ , IL-6 and CXC chemokine ligand 13 (CXCL-13) were detected by ELISA. Liver function was detected by automatic biochemical analyzer. **Results** The expression of serum IL-17A-F in patients with CHB or HBV cirrhosis were significantly higher than those in healthy volunteers ( $P < 0.01$ ), but no difference between patients with CHB and cirrhosis ( $P > 0.05$ ). In patients with CHB, IL-17A-F were positively correlated with IL-1 $\beta$ , IL-6 and CXCL-13, and negatively correlated with total bilirubin. IL-17C was positively correlated with total bile acid. IL-17B, IL-17D and IL-17E were positively

correlated with stool HBV DNA. In patients with HBV cirrhosis, IL-17B was positively correlated with IL-1 $\beta$ . IL-17C was positively correlated with aspartate aminotransferase and alkaline phosphatase. IL-17D was positively correlated with alkaline phosphatase. IL-17A-F had no correlation with serum HBV DNA and stool HBV DNA ( $P>0.05$ ). **Conclusion** There were high expressions of serum IL-17A-F in patients with CHB and HBV cirrhosis, but the clinical significance of IL-17A-F was different.

**key words:** chronic hepatitis B; hepatitis B virus cirrhosis; interleukin-17; hepatitis B virus DNA; cytokine

白细胞介素-17(IL-17)家族包括6个成员(IL-17A、IL-17B、IL-17C、IL-17D、IL-17E和IL-17F)和5个受体(IL-17RA、17RB、17RC、17RD和SEF)。IL-17A、IL-17F与Th1类细胞因子介导的炎性疾病有关,IL-17E与Th2类细胞因子介导的疾病有关,IL-17B~D目前功能尚不完全清楚<sup>[1]</sup>。IL-17A与IL-17F能通过趋化中性粒细胞、上调肝星状细胞分泌细胞因子等方式参与肝的炎症及纤维化进程<sup>[2-3]</sup>。IL-17B~E在肝病中作用尚不明确。慢性乙型病毒性肝炎(乙肝)以肝炎症活动为主,而肝硬化同时存在炎症活动及纤维化。本研究通过观察IL-17A~F在不同肝病阶段中的表达情况及与HBV DNA等指标间的关系来比较不同肝病阶段IL-17A~F的作用及临床意义。

## 材料与方法

### 1 病例选择

收集2009年1月至2015年1月安徽医科大学第三附属医院及第一附属医院收治的66例慢性乙肝患者和50例乙肝肝硬化患者的血清及粪便,30例健康志愿者的血清。本研究经安徽医科大学第三附属医院伦理委员会批准。患者均签署知情同意书。

**诊断与入选标准** 符合《慢性乙型肝炎防治指南2010年版》<sup>[4]</sup>中有关慢性乙肝及乙肝肝硬化的诊断标准。慢性乙肝入选标准:血清学乙肝标志物表面抗原阳性病史超过6个月,肝功能谷丙转氨酶(ALT)超过正常值2倍或肝穿刺发现肝有肝炎改变,影像学不支持存在肝硬化。乙肝肝硬化入选标准:既往血清学乙肝标志物表面抗原阳性,肝穿刺有假小叶形成,或腹部超声/CT提示肝硬化,代偿期Child-Pugh A级,无食管胃底静脉曲张出血等严重并发症,失代偿期Child-Pugh B、C级,存在食管胃底静脉曲张出血等严重并发症。健康志愿者入选标准:无心脏、肺、肝等器官疾病史,经临床检查排除肝病、免疫性疾病、肿瘤、病毒感染等,近

2周无感染性疾病史。

**排除标准** 实验室检查存在甲型病毒性肝炎病毒或丙型肝炎病毒、戊型肝炎病毒、巨细胞病毒、柯萨奇病毒、EB病毒等病毒感染者,近1个月内应用抗生素、抗病毒药物、干扰素及其他损伤肝药物的患者,既往确诊且治疗过的患者,合并其他感染性疾病、免疫性疾病等疾病的患者,近1周有消化道出血病史且采集粪便标本时同时粪便潜血检查阳性。

### 2 试剂与仪器

柱式粪便DNAout试剂盒,北京天恩泽基因科技有限公司生产;细胞因子酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒,武汉新启迪生物科技有限公司生产;乙肝病毒核酸测定(荧光定量PCR法)试剂盒,上海之江生物科技股份有限公司生产。

Mx3000p荧光实时定量PCR仪,美国Stratagene公司产品;7600-020全自动生化分析仪,日本日立公司产品;DNM-9606全自动酶标分析仪,购自北京普朗新技术有限公司。

### 3 实验方法

#### 3.1 标本采集

66例慢性乙肝患者作为慢性乙肝组,50例乙肝肝硬化患者作为肝硬化组,以及30例健康志愿者作为对照组。采集清晨粪便,于无菌容器中。将粪便搅匀后,称取(200.00 $\pm$ 5.61)mg装于EP管中,于-80℃保存,待测。采集患者空腹右肘部静脉血8mL,分离血清后分装EP管(每管100 $\mu$ L)中,-20℃保存,待测。

#### 3.2 标本提取和检测

**粪便总DNA提取** 按DNAout试剂盒说明书提取粪便总DNA,最终粪便DNA洗脱液总量为70 $\mu$ L。

**血清总DNA提取** 取患者血清40 $\mu$ L,加DNA提取液40 $\mu$ L,按乙肝病毒核酸测定(荧光定量PCR法)试剂盒说明书提取血清总DNA。

**粪便及血清来源HBV DNA定量检测** 用荧光定量PCR法,按试剂盒和仪器说明书进行操作。

结果  $>5 \times 10^2 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$  者为阳性结果,结果  $<5 \times 10^2 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$  者为阴性结果,记录阳性结果的数值。

IL-17A~F 及 IL-1 $\beta$ 、IL-6、趋化因子-13 (CXCL-13) 检测 用 ELISA 法检测,按试剂盒说明书进行操作,用酶标仪读取和记录结果。

肝功能的检测 用全自动生化分析仪进行肝功能检测,操作严格按仪器说明书进行。

#### 4 统计学处理

用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,血清及粪便 HBV DNA 予以 Log10 对数转化后符合正态分布,以  $\bar{x} \pm s$  表示,各组间均数比较采用单因素方差分析,组间两两比较用 Scheffe 检验;IL-17A~F 与 HBV DNA、细胞因子、肝功能指标间相关性分析用 Pearson 分析。

表 1 3 组间一般资料比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Comparison of the general information in three groups ( $\bar{x} \pm s$ )

Item	CHB (n=66)	HBV cirrhosis (n=50)	Control (n=30)
Sex (M/F)	46 / 20	44 / 6	14 / 16
Age (year)	42.50 $\pm$ 20.70	52.50 $\pm$ 20.50	36.50 $\pm$ 10.70
Stool wet weight (mg)	200.00 $\pm$ 5.61	200.00 $\pm$ 5.55	198.40 $\pm$ 13.19
TBIL ( $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	44.20 $\pm$ 41.66*	22.51 $\pm$ 12.64* #	12.70 $\pm$ 3.22
ALT ( $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$ )	695.61 $\pm$ 658.86*	117.08 $\pm$ 107.95* #	23.90 $\pm$ 5.80
AST ( $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$ )	518.60 $\pm$ 640.18*	105.30 $\pm$ 67.88* #	21.80 $\pm$ 4.02
ALP ( $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$ )	113.14 $\pm$ 59.81*	96.78 $\pm$ 46.60*	60.90 $\pm$ 9.75
TBA ( $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	73.43 $\pm$ 57.02*	56.51 $\pm$ 25.96*	8.56 $\pm$ 0.65
IL-1 $\beta$ ( $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	360.82 $\pm$ 34.56*	349.48 $\pm$ 51.12*	163.75 $\pm$ 4.02
IL-6 ( $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	64.63 $\pm$ 6.94*	65.18 $\pm$ 6.55*	19.65 $\pm$ 1.42
CXCL-13 ( $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	450.23 $\pm$ 40.20*	462.34 $\pm$ 67.98*	212.88 $\pm$ 10.23
Stool HBV DNA	5.88 $\pm$ 1.63	6.00 $\pm$ 1.08#	
Serum HBV DNA	6.05 $\pm$ 1.07	5.90 $\pm$ 1.63	

CHB: Chronic hepatitis B; TBIL: Total bilirubin; ALT: Alanine aminotransferase; AST: Aspartate aminotransferase; ALP: Alkaline phosphatase; TBA: Total bile acid; IL: Interleukin; HBV: Hepatitis B virus; CXCL-13: CXC chemokine ligand-13; Compared with control group, \*  $P < 0.01$ ; Compared with CHB group, #  $P < 0.01$ ; CHB group: Patients with chronic hepatitis B; HBV cirrhosis group: Patients with hepatitis B cirrhosis; Control group: Healthy volunteer

表 2 3 组间细胞因子的比较 ( $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1} \bar{x} \pm s$ )

Table 2 Comparison of the cytokines in three groups ( $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1} \bar{x} \pm s$ )

Indexes	CHB (n=66)	HBV cirrhosis (n=50)	Control (n=30)
IL-17A	233.46 $\pm$ 32.40*	239.09 $\pm$ 13.56*	58.65 $\pm$ 5.45
IL-17B	282.67 $\pm$ 40.91*	279.95 $\pm$ 26.11*	67.75 $\pm$ 11.98
IL-17C	241.61 $\pm$ 31.23*	248.12 $\pm$ 10.39*	63.53 $\pm$ 4.35
IL-17D	242.20 $\pm$ 34.43*	239.45 $\pm$ 15.54*	66.75 $\pm$ 5.71
IL-17E	267.74 $\pm$ 33.83*	271.91 $\pm$ 16.67*	61.91 $\pm$ 6.50
IL-17F	215.78 $\pm$ 29.22*	271.91 $\pm$ 16.67*	49.68 $\pm$ 3.34

Compared with control group, \*  $P < 0.01$

## 结 果

### 1 一般资料

与对照组比较,慢性乙肝组及肝硬化组血清总胆红素(TBIL)、ALT、谷草转氨酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、总胆汁酸(TBA)、IL-1 $\beta$ 、IL-6、CXCL-13 均明显升高,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。与慢性乙肝组比较,肝硬化组 TBIL、ALT、AST 明显偏低,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。但 ALP、TBA、IL-1 $\beta$ 、IL-6、CXCL-13 均无明显变化,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表 1。

### 2 3 组细胞因子的结果

与对照组比较,慢性乙肝组及肝硬化组血清 IL-17A~F 均明显升高,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。与慢性乙肝组比较,肝硬化组 IL-17A~F 均无明显变化,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表 2。

### 3 IL-17A~F 与 IL-1 $\beta$ 、IL-6、CXCL-13 间相关性分析

慢性乙肝组: IL-17A 与 IL-1 $\beta$ 、IL-6、CXCL-13, IL-17B 与 IL-1 $\beta$ 、IL-6、CXCL-13, IL-17C 与 IL-1 $\beta$ 、IL-6、CXCL-13, IL-17D 与 IL-1 $\beta$ 、IL-6、CXCL-13, IL-17E 与 IL-1 $\beta$ 、IL-6、CXCL-13, IL-17F 与 IL-1 $\beta$ 、IL-6、CXCL-13 均呈正相关( $P < 0.01$ )。肝硬化组: IL-17B 与 IL-1 $\beta$  呈正相关,与 IL-6、CXCL-13 无相关性( $P > 0.05$ )。IL-17A、C~F 与 IL-1 $\beta$ 、IL-6、CXCL-13 间均无相关性( $P > 0.05$ )。

#### 4 IL-17A~F与肝功能指标间相关性分析

慢性乙肝组: IL-17A与TBIL、IL-17B与TBIL、IL-17C与TBIL、IL-17D与TBIL、IL-17E与TBIL、IL-17F与TBIL均呈负相关( $P < 0.05$ ),与ALT、AST、ALP、TBA均无相关性( $P > 0.05$ )。肝硬化组: IL-17C与AST、ALP均呈正相关( $P < 0.05$ ),与TBIL、ALT、ALP、TBA均无相关性( $P > 0.05$ ); IL-17D与ALP( $P < 0.01$ )呈正相关( $P < 0.01$ ),与TBIL、ALT、AST、TBA均无相关性( $P > 0.05$ ); IL-17A、IL-17B、IL-17E、IL-17F与TBIL、ALT、AST、ALP、TBA均无相关性( $P > 0.05$ )。

#### 5 IL-17A~F与血清/粪便HBV DNA间相关性分析

慢性乙肝组: IL-17A~F与血清HBV DNA均无相关性( $P > 0.05$ ); IL-17B、IL-17D、IL-17E与粪便HBV DNA均呈正相关( $P < 0.05$ ), IL-17A、IL-17C、IL-17F与粪便HBV DNA均无相关性( $P > 0.05$ )。肝硬化组: IL-17A~F与血清HBV DNA及粪便HBV DNA均无相关性( $P > 0.05$ )。

### 讨 论

本研究结果发现,与对照组比较,慢性乙肝组及肝硬化组血清IL-17A~F均明显升高,说明IL-17A~F均参与慢性乙肝、肝硬化发病。同时,在慢性乙肝患者中IL-17A~F含量与IL-1 $\beta$ 、IL-6、CXCL-13含量呈明显正相关,但肝硬化患者中两者无相关性,提示IL-17A~F参与慢性乙型肝炎与肝硬化发病的机制可能存在差异。在慢性乙肝患者中IL-17A~F与ALT、AST无相关性,与TBIL、TBA存在弱相关性;肝硬化患者中IL-17A~F与ALT、AST也无相关性,但与TBIL、ALP存在较强的相关,说明IL-17A~F表达水平与肝细胞损伤程度

不一定相关,但可能与胆道系统损伤相关,同时,进一步说明IL-17A~F在不同肝病阶段的临床意义不同。

HBV感染与血IL-17表达水平间关系报道不一,相关与不相关均有报道<sup>[5-6]</sup>。本研究结果发现,慢性乙肝及肝硬化患者中两者均无相关性,提示血HBV复制与IL-17表达不相关。在慢性乙肝患者中粪便HBV DNA与IL-17B~E存在弱的正相关,但肝硬化患者两者无相关性,提示IL-17表达对肠道乙肝病毒的复制的影响在不同肝病阶段中存在差异。

慢性乙肝、肝硬化患者IL-17家族各成员均高表达,但其在两者发病中的作用不完全相同。因本研究存在样本量小、缺乏病理及免疫组化佐证等不足,有待大样本、结合病理进一步分析。

#### 参考文献:

- [1] 施沛青,朱书,钱友存. IL-17的信号传导及功能研究[J]. 中国细胞生物学学报, 2011, 33(4): 345-357.
- [2] WANG B, ZHAO X P, FAN Y C, et al. IL-17A but not IL-22 suppresses the replication of hepatitis B virus mediated by over-expression of MxA and OAS mRNA in the HepG2. 2. 15 cell line [J]. *Antiviral Research*, 2013, 97(3): 285-292.
- [3] TAN Z, QIAN X, JIANG R, et al. IL-17A plays a critical role in the pathogenesis of liver fibrosis through hepatic stellate cell activation [J]. *J Immunol*, 2013, 191(4): 1835-1844.
- [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) [J]. 中华肝脏病杂志, 2011, 19(1): 13-24.
- [5] 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]. 中华实验和临床感染病杂志, 2012, 6(3): e225-e230.
- [6] ZHANG J Y, ZHANG Z, LIN F, et al. Interleukin-17-producing CD4(+) T cells increase with severity of liver damage in patients with chronic hepatitis B [J]. *Hepatology*, 2010, 51(1): 81-91.

(本文编辑 戴荣源)