Th17细胞在乙肝肝硬化患者中的免疫致病机制研究

金磊, 张纪元, 孙红启, 王立峰, 张政, 王福生

[摘要] 目的 探讨IL-17-CD4+ T细胞(Th17细胞)在乙肝肝硬化患者中的免疫致病机制。方法 选择2008年7月-2011年12月收治的乙肝肝硬化患者60例及健康对照30名, 采用流式细胞仪检测外周血Th17细胞频率及IL-17受体表达情况, ELISA法检测外周血血浆中IL-17水平, 并检测IL-17刺激后人肝星状细胞LX-2中α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)及细胞因子IL-6、IL-8和IL-23p19的表达情况。结果 与健康对照相比, 乙肝肝硬化患者外周血Th17细胞频率和血浆IL-17浓度均显著升高(P<0.01), Th17细胞频率随肝功能损害程度的加重而增高, Child分级C级患者体内Th17频率最高, 与A级患者相比差异有统计学意义(P<0.05)。LX-2细胞在IL-17刺激后IL-17受体表达上调, 同时α-SMA表达也明显上调(P<0.05), 并产生了炎症相关细胞因子IL-6、IL-8和IL-23p19。结论 Th17细胞的增加不但与乙肝肝硬化患者肝功能损害程度密切相关, 而且通过分泌IL-17促进了肝星状细胞的活化, 加快了肝硬化的疾病进程。

关键词 T淋巴细胞亚群; 肝炎; 乙型; 慢性; 肝硬化

Immunopathogenesis of Th17 cells in patients with HBV-associated liver cirrhosis

JIN Lei, ZHANG Ji-yuan, SUN Hong-qi, WANG Li-feng, ZHANG Zheng, WANG Fu-sheng

Research Center of hepatopathy for Biological Therapy, 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China(81072424, 30801039) and the National Key Basic Research Program of China(2007CB512805)

Abstract Objective To explore the immunopathogenesis of IL-17-CD4+ T cells (Th17 cells) in patients with HBV-associated liver cirrhosis (HBV-LC). Methods Sixty patients with HBV-LC admitted from Jul. 2008 to Dec. 2011 were enrolled in present study. Thirty matched individuals served as control. The frequencies of circulating Th17 cells and IL-17 receptor expression were detected by flow cytometry. The IL-17 level in plasma was determined by ELISA. The expression of smooth muscle actin (α-SMA) in human hepatic stellate cells (HSCs) LX-2 stimulated by IL-17 (1ng/ml) was detected by flow cytometry, while the inflammation-associated cytokines, including IL-6, IL-8 and IL-23p19, were determined by ELISA. Results Both the frequency of circulating Th17 cells and the concentration of IL-17 in plasma increased significantly in HBV-LC patients when compared with those in healthy controls (P<0.01). In HBV-LC patients, Th17 frequency increased along with the severity of liver disease. The highest level of Th17 cells appeared in Child-Pugh C patients, and it showed a statistically significant difference when compared with that in Child-Pugh A patients (P<0.05). In addition, when LX-2 cells were stimulated with IL-17, not only were the expressions of IL-17R and α-SMA up-regulated (P<0.05), but also more inflammation-associated cytokines, including IL-6, IL-8 and IL-23p19, were produced. Conclusion Increase of peripheral Th17 cells may be closely associated with progression of severity of disease in HBV-LC patients, promote HSCs activation by secretion of IL-17, and accordingly accelerate the disease progression.

Keywords T-lymphocyte subsets; hepatitis B, chronic; liver cirrhosis
另外一方面激活肝内天然免疫细胞，造成持续的慢性炎症[10]。本研究探讨Th17细胞与乙肝肝硬化患者疾病严重程度之间的关系，以及IL-17在疾病进展中的作用。

1 表格数据

<table>
<thead>
<tr>
<th>Item</th>
<th>Healthy controls (n=30)</th>
<th>HBV-associated liver cirrhosis patients (n=60)</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Male/Female (n)</td>
<td>20/10</td>
<td>45/15</td>
</tr>
<tr>
<td>Age (year)</td>
<td>44.0 ± 16.2</td>
<td>48.0 ± 10.2</td>
</tr>
<tr>
<td>ALT (U/L)</td>
<td>23.0 ± 2.0</td>
<td>37.8 ± 16.3</td>
</tr>
<tr>
<td>AST (U/L)</td>
<td>20.3 ± 1.7</td>
<td>52.8 ± 28.5</td>
</tr>
<tr>
<td>TBIL (μmol/L)</td>
<td>14.1 ± 3.2</td>
<td>27.8 ± 19.7</td>
</tr>
<tr>
<td>HBV DNA</td>
<td>No detection below the detection limit</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Child-Pugh (A/B/C)</td>
<td>No detection</td>
<td>20/20/20</td>
</tr>
</tbody>
</table>

1.4 LX-2细胞α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)的表达及细胞因子IL-6、IL-8和IL-23p19的检测 将人肝星状细胞LX-2接种至24孔板[12]，待细胞全部贴壁展开后，加入1ng/ml IL-17(美国R&D Systems公司)孵育24h，分别收集上清及细胞，取上清检测上述细胞因子，取细胞进行流式抗体染色并通过流式细胞仪检测α-SMA的表达，以不加IL-17的细胞作为对照。IL-6、IL-8和IL-23p19的测定采用ELISA法。

1.5 统计学处理 采用SPSS 13.0软件对数据进行分析。不同组间的多重比较采用Kruskal-Wallis H非参数检验，组间两两比较采用Mann-Whitney U检验。P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 外周血Th17细胞频率检测 乙肝肝硬化患者Th17细胞频率明显高于健康人(P<0.01)，且随乙肝肝硬化病情的加重进一步升高，肝硬化Child分级C级患者体内Th17频率最高，与Child A级患者相比差异有统计学意义(P<0.05，图1)。

2.2 外周血IL-17水平检测 与健康人相比，乙肝肝硬化患者血浆IL-17浓度显著升高(P<0.05)，但在不同分级的乙肝肝硬化患者之间无明显差异(图2)。

![图1 外周血Th17细胞频率检测](image1)

![图2 外周血IL-17浓度检测](image2)
2.3 IL-17对肝星状细胞的作用 由图3可见，IL-17刺激后，LX-2细胞IL-17R表达上调，α-SMA的表达也明显上调，且产生了炎症相关细胞因子IL-6，IL-8和IL-23p19(图4)。

3 讨论

Th17细胞是最近发现的CD4辅助性T细胞的一个亚群，可分泌细胞因子IL-17。IL-17家族有6个成员(A、B、C、D、E、F)和5种受体(RA、RB、RC、RD、RE)，其中最紧密相关的两个成员是IL-17和IL-17F。IL-17在对抗特异性病原体的感染中具有重要作用。在针对某些病原体的免疫应答中，尤其是在抗革兰阴性菌和抗真菌感染中，IL-17除了可以通过募集单核细胞及中性粒细胞促进炎症外，还可通过诱导产生IL-6促进T细胞浸润，进一步激活和放大促炎症效应。

目前的证据显示，Th17细胞参与了各种肝脏疾病的炎症进程，包括酒精性肝损伤、非酒精性肝炎、病毒性肝炎、原发性胆汁性肝硬化和自身免疫性肝炎等[10-13]。然而，Th17细胞在乙肝肝硬化的治疗中尚不十分清楚。本研究测定了Th17细胞在乙肝肝硬化患者中的频率，发现外周血内Th17细胞数量的增加与乙肝肝硬化的疾病进展密切相关，并且Th17细胞的效应细胞因子IL-17在患者外周血中是显著增加的。本课题组前期研究发现，与健康对照相比，慢性乙肝患者外周血中Th17细胞的数量及Th17相关细胞因子(IL-23、IL-1β、IL-17等)水平明显升高，进一步分析发现升高的Th17细胞频率与患者ALT水平、病毒载量明显正相关。重要的是，慢性乙肝患者肝脏中Th17细胞大量浸润，与肝脏病理分级呈显著正相关。体外实验中，IL-17能激活单核细胞和mDC细胞，并能促进二者分泌大量促炎症细胞因子。上述研究提示，Th17细胞在慢性乙肝患者的肝脏损伤中起着重要作用，可通过激活表达IL-17R的天然免疫细胞来加剧肝脏的炎症和损伤[14]。

本研究发现，肝星状细胞系LX-2可表达IL-17R，且在受到IL-17刺激后被激活能分泌IL-6、IL-8和IL-23p19，提示Th17细胞可通过IL-17/IL-17R信号途径直接激活肝星状细胞，从而加速肝纤维化的进程。另一方面激活的肝星状细胞可通过分泌促炎症因子进一步加速肝脏的炎症。

综上所述，本研究提示Th17细胞对于肝脏纤维化和肝硬化后的疾病进展具有促进作用，并可作为预测肝硬化患者疾病进程的免疫学标志。这些发现拓展了对Th17细胞在肝脏疾病中作用的认识，有助于后续的干预措施及治疗靶点研究。

【参考文献】


