

## Th17 相关细胞因子在丙型肝炎患者血清中的变化及意义

孙 鹭<sup>1)</sup>, 黄 蓉<sup>2)</sup>, 牛 华<sup>1)</sup>, 张桂前<sup>1)</sup>, 高玉红<sup>1)</sup>

(1) 云南省第一人民医院检验科, 云南 昆明 650032; 2) 厦门长庚医院检验科, 福建 厦门 361028)

**[摘要]** **目的** 研究 Th17 细胞相关的主要细胞因子 IL-17、IL-6 和 TGF- $\beta$  在丙型肝炎患者外周血中的表达情况并分析与患者临床特征的相关性, 初步探讨 Th17 细胞在丙型肝炎病理过程中的作用. **方法** 收集 54 例丙型肝炎患者做为阳性组, 并以 40 例正常志愿者为对照组. 采用 ELISA 方法检测外周血血清中 IL-17、IL-6、TGF- $\beta$  的含量, 同时测定 HCV-RNA 和肝功能指标 ALT、AST、TBil、ALB 等. **结果** 研究发现, 丙型肝炎患者外周血中 IL-17、IL-6 和 TGF- $\beta$  水平明显高出对照组 ( $P=0.004$ ,  $P=0.018$ ,  $P=0.025$ ). IL-17 的升高与 IL-6 和 TGF- $\beta$  相关 ( $r=0.664$ ,  $P=0.00$ ,  $r=0.511$ ,  $P=0.00$ ). IL-17 水平与 ALT, AST 和 HCV-RNA 相关 ( $r=-0.52$ ,  $P=0.01$ ;  $r=-0.282$ ,  $P=0.005$ ,  $r=-0.209$ ,  $P=0.037$ ), 但是 TGF- $\beta$ 、IL-6 均与 ALT, AST 或 HCV-RNA 没有明显的相关性, IL-6 浓度与 TGF- $\beta$  有关 ( $r=0.807$ ,  $P=0.00$ ). **结论** 丙型肝炎患者外周血中 Th17 相关细胞因子表达增高, 特别是 IL-17 与患者 ALT、AST 以及病毒载量相关, 而且增高的 IL-17 与血清 IL-6、TGF- $\beta$  水平密切相关. 提示 Th17 细胞参与了丙型肝炎的免疫学发病机制.

**[关键词]** 慢性丙型肝炎; IL-17; IL-6; TGF- $\beta$

**[中图分类号]** R725 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2014) 08-0063-04

## Clinical Significance of Th17-associated Cytokines in Patients with Hepatitis C

SUN Yi<sup>1)</sup>, HUANG Rong<sup>2)</sup>, NIU Hua<sup>1)</sup>, ZHANG Gui-qian<sup>1)</sup>, GAO Yu-hong<sup>1)</sup>

(1) Dept. of Clinical Laboratory, The First People's Hospital of Yunnan Province, Kunming Yunnan 650032;

2) Dept. of Clinical Laboratory, The Changgeng Hospital of Fujian Province, Xiamen Xiamen 361028, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the expression of serum IL-17, IL-6 and TGF- $\beta$  in chronic hepatitis C virus infection patients and explore the correlation between IL-17, IL-6, TGF- $\beta$  and clinical characteristic of hepatitis C patients. **Methods** 54 cases of patients with chronic hepatitis C and 40 healthy volunteers were enrolled. The expression of IL-17, IL-6 and TGF- $\beta$  in serum were evaluated by ELISA; ALT, AST, ALB and TBil were determined by ABBOTT AEROSSET Ci16200 system, HCV-RNA were measured by RT-PCR respectively. **Results** Compared with healthy controls, the levels of IL-17, IL-6 and TGF- $\beta$  were all increased significantly in hepatitis C patients serum ( $P=0.004$ ,  $P=0.018$ ,  $P=0.025$ ). Correlation analysis showed the elevated IL-17 was related to IL-6 ( $r=0.664$ ,  $P=0.00$ ) and TGF- $\beta$  ( $r=0.511$ ,  $P=0.00$ ). IL-6 was also related to TGF- $\beta$  ( $r=0.807$ ,  $P=0.00$ ). Increased IL-17 was associated with ALT, AST and HCV-RNA ( $r=-0.52$ ,  $P=0.01$ ;  $r=-0.282$ ,  $P=0.005$ ,  $r=-0.209$ ,  $P=0.037$ ), But no obvious correlations between TGF- $\beta$  and ALT, AST or HCV-RNA ( $r=-0.104$ ,  $P=0.424$ ,  $r=-0.034$ ,  $P=0.871$ ,  $r=-0.167$ ,  $P=0.74$ ) were observed, It is similar to IL-6 and ALT, AST or HCV-RNA ( $r=-0.13$ ,  $P=0.951$ ,  $r=-0.118$ ,  $P=0.576$ ,  $r=-0.083$ ,  $P=0.694$ ). **Conclusion** All the results suggest that Th17 cells participate in the immunological pathogenesis of chronic hepatitis C.

**[Key words]** chronic hepatitis C; IL-17; IL-6; TGF- $\beta$

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目 (81100377); 云南省应用基础研究基金资助项目 (2013FB203, 2012FB096); 云南省教育厅科研基金资助项目 (2012Y548)

**[作者简介]** 孙鹭 (1976~), 女, 云南曲靖市人, 博士, 副主任医师, 主要从事分子诊断学临床工作.

丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV) 引起的肝炎是一种全球性流行性传染病, 与其他嗜肝病毒感染相比, 丙型肝炎病毒更容易导致肝炎慢性化, 继而发展为肝硬化和肝细胞癌。而且由于至今尚无可用的丙型肝炎疫苗, 因此丙型肝炎成为全球首要的病毒性肝炎。研究发现免疫因素在丙肝发病过程中起着重要作用。大量的实验已经证明, Th17/IL-17 在多种自身免疫性疾病, 如类风湿性关节炎<sup>[1]</sup>、系统性红斑狼疮<sup>[2]</sup>, 呼吸道疾病, 如支气管哮喘<sup>[3]</sup>, 变应性鼻炎<sup>[4]</sup>等疾病病理过程中发挥重要作用。同时国内外的研究相继发现 Th17 参与了不同肝病的发病过程并与疾病的预后密切相关, 如急性肝损伤<sup>[5]</sup>、酒精性肝病<sup>[6]</sup>、慢性乙型肝炎<sup>[7]</sup>、原发性肝癌<sup>[8]</sup>等。Th17 细胞在这些领域的研究日渐深入, 但是, 关于 Th17 细胞与丙型肝炎的作用关系尚不清楚。由于 IL-17 主要由 Th17 细胞分泌, IL-6 和 TGF- $\beta$  与 Th17 的分化增殖有密切关系, 本文拟通过探讨丙型肝炎患者 IL-17、IL-6、TGF- $\beta$  和患者临床特征之间的关系, 以期发现新的免疫指标, 用于丙型肝炎的预防及治疗。

## 1 资料与丙法

### 1.1 对象

2012 年 9 月至 2013 年 4 月云南省第一人民医院消化内科就诊的确诊慢性丙型肝炎患者 54 例, 男 29 例, 女 25 例, 年龄 22~64 岁, 平均 42 岁。诊断符合 2004 年中华医学会传染病和寄生虫病学分会肝病学分会联合制订的《丙型肝炎防治指南》<sup>[9]</sup>。血清 HCV-RNA 阳性, 排除甲、乙、丁、戊、庚型肝炎病毒、HIV、输血传播病毒、巨细胞病毒、EB 病毒感染及酒精性、药物性和自身免疫性等肝病。有严重心肺疾病、癫痫、精神病史、失代偿肝硬化的患者被剔除。健康对照者 40 例健康人为对照, 男 21 例, 女 19 例, 年龄 20~58 岁, 肝炎病毒标志物及抗 HIV 均为阴性。

### 1.2 丙法

**1.2.1 血清 IL-17A、IL-6 和 TGF- $\beta$  法度检测** 采用深圳达科为生物技术有限公司生产的 human IL-6, human IL-17A 和 human TGF- $\beta$  检测试剂盒利用酶联免疫吸附法分别检测血清 IL-17A、IL-6 和 TGF- $\beta$  浓度水平, 具体操作按照试剂盒说明书进行。每个样本和标准品均设 3 个复孔, 酶标测试仪进行检测读数, 通过标准曲线求得浓度。

**1.2.2 血清 HCV-RNA 定量检测** 采用实时荧光定量 PCR 方法利用上海科华生物工程股份有限公司提供的丙型肝炎病毒核酸定量检测试剂盒测定血清中 HCV-RNA, 试剂盒定量下限为 1 000 IU/mL。

**1.2.3 血浆 ALT、AST、TBIL 和 ALB 检测** 荧光定量 PCR 检测系统 SLAN (上海宏石医疗科技有限公司) 美国雅培全自动生化仪 CA16200 吸取适量慢性丙型肝炎患者血清样本由本院检验科检测。

### 1.3 统计学处理

计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 数据分析采用 SPSS 统计软件进行配对  $t$  检验和相关分析, IL-6、HCV-RNA、TBIL 非正态分布, 采用 Spearman 相关分析,  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 丙型肝炎患者 ALT、AST、TBIL 和 ALB 检测结果

丙肝患者和健康对照组的血清肝功能检测结果见表 1。检测结果显示, 丙型肝炎患者外周血中的 ALT、AST、TBIL 水平明显高于健康对照组。丙型肝炎患者的 AST 和 ALT 较正常人高出 2 倍以上, 疾病组外周血血清中的 ALT 和 AST 的增高趋势没有明显的相关性。

### 2.2 丙型肝炎患者 Th17 相关细胞因子检测结果

丙肝患者和健康对照组的血清 IL-17、IL-6 和 TGF- $\beta$  检测结果见表 2, 细胞因子浓度均远高于对照组。进一步的分析得出 IL-17 的升高与 IL-6 和 TGF- $\beta$  相关 ( $r = 0.664$ ,  $P = 0.00$ ,  $r = 0.511$ ,  $P = 0.00$ ), IL-6 浓度与 TGF- $\beta$  有关 ( $r = 0.807$ ,  $P = 0.00$ )。

### 2.3 丙肝患者外周血 Th17 细胞相关细胞因子与患者临床指标的相关性

将丙型肝炎患者外周血中的 IL-17、IL-6、TGF- $\beta$  和 HCV-RNA 载量等资料进行相关分析, 结果发现, IL-17 水平与 ALT, AST 和 HCV-RNA 相关 ( $r = -0.52$ ,  $P = 0.01$ ;  $r = -0.282$ ,  $P = 0.005$ ,  $r = -0.209$ ,  $P = 0.037$ ), 但是 IL-6 与 ALT, AST 或 HCV-RNA 没有明显的相关性 ( $r = -0.13$ ,  $P = 0.951$ ,  $r = -0.118$ ,  $P = 0.576$ ,  $r = -0.083$ ,  $P = 0.694$ ), TGF- $\beta$  与 ALT, AST 或 HCV-RNA 也没有明显的相关性 ( $r = -0.104$ ,  $P = 0.424$ ,  $r = -0.034$ ,  $P = 0.871$ ,  $r = -0.167$ ,  $P = 0.74$ )。

表 1 入选对象临床资料比较

Tab. 1 Clinical data of enrolled subjects

Group	n	ALT (U/L)	AST (U/L)	TBIL(umol/L)	ALB(g/L)
CHC	54	111.32 ± 54.59	91.86 ± 42.36	19.92 ± 12.43	33.88 ± 4.50
对照组	40	18.75 ± 6.06	23.12 ± 8.38	11.71 ± 2.78	38.57 ± 3.75

表 2 丙型肝炎患者 IL-17A、IL-6 和 TGF-β 检测结果 (pg/mL)

Tab. 2 Comparison of IL-17A, IL-6 and TGF-β levels in serum in CHC patients and control group (pg/mL)

Group	IL-17A	TGF-β	IL-6
CHC	308.67 ± 153.33*	693.21 ± 452.11*	344.88 ± 245.32*
对照组	65.05 ± 14.58	95.38 ± 17.44	90.12 ± 21.84

与对照组比较, \* $P < 0.05$ .

### 3 讨论

Th17 细胞一个显著的特征就是通过分泌 IL-17A、IL-17F 及 IL-22 等炎性因子而参与机体抗感染作用<sup>[10]</sup>. 在 Th17 细胞相关细胞因子中, 目前认为其中最主要的是 IL-17A, 即笔者常说的 IL-17<sup>[11]</sup>. 它在许多诸如某些病毒细菌等感染性疾病、恶性肿瘤中起着重要的调节作用<sup>[12]</sup>. 而且 IL-17 可通过诱导固有免疫炎症细胞因子 IL-6 在适应性免疫反应和固有免疫之间构成联系. IL-17 可作为急性肝损伤严重程度的指标<sup>[9]</sup>, 本研究发现丙型肝炎患者外周血血清中 IL-17 水平高于健康对照人群, 而且增加的 IL-17 与 ALT、AST 相关, 结果提示 Th17 细胞参与了丙型肝炎的炎症损伤过程.

研究表明, Th17 细胞的分化成熟离不开 IL-6 与 TGF-β, 两者是 Th17 细胞分化的最强促进剂, 但是单独存在的 IL-6 或单独存在的 TGF-β 均不能诱导初始型 T 细胞向 Th17 细胞分化, 只有与二者协同才诱导 Th17 细胞的分化<sup>[13]</sup>. TGF-β 是初始 CD4<sup>+</sup>T 细胞分化成 Th17 细胞的始动因素<sup>[13-15]</sup>. 外源性给予 TGF-β 可以阻断 Th1 和 Th2 细胞, 促进 Th17 细胞发育和分化<sup>[16]</sup>. IL-6 是调节自身免疫和慢性炎症的关键因子<sup>[17]</sup>, 在协同 TGF-β 共同诱导 Th17 分化方面发挥关键作用. IL-6 可以上调 IL-23 受体表达, 上调初始 T 细胞分泌的细胞因子促进 Th17 细胞表型的 IL-23R 及 IL-21 的分泌<sup>[18]</sup>.

ALT、AST、TBil 是目前临床判定肝脏炎症水平的最常用指标, 笔者对 ALT 和 AST 及 TBil 等与 IL-17、IL-6、TGF-β 相关性进行分析, 发现丙型肝炎患者各细胞因子浓度都比健康对照组明显升高, 揭示丙型肝炎患者 Th17 细胞的增加与肝脏炎症有关. 同时, 本实验结果表明, 无论是 AST、

ALT 还是 HCV-RNA 均与 IL-17 有显著相关性, 但是 IL-6 或 TGF-β 均与 AST、ALT 以及 HCV-RNA 无关, 说明 IL-6 和 TGF-β 增加的始发因素并非病毒的复制或肝细胞的损伤, 可能受到其他通路的调节因素. 但是 IL-17 细胞的增加不仅与病毒复制过程中引起对肝细胞的直接损伤有关, 而且与病毒复制活跃后引起的免疫反应有关, 同时受到 IL-6 和 TGF-β 双重因素刺激而分泌增加. 本研究初步证实了 Th17 细胞参与了丙型肝炎的病理过程, 尤其与炎症程度密切相关.

### [参考文献]

- [1] HONORATI M C, NERI S, CATTINI L, et al. Interleukin-17, a regulator of angiogenic factor release by synovial fibroblasts [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2006, 14 (4): 344 - 352.
- [2] WONG C K, LIT L C, TAN L S, et al. Hyperproduction of IL-23 and IL-17 in patients with systemic lupus erythematosus: implication for Th17-mediated inflammation in auto-immunity [J]. Clin Immunol, 2008, 127 (3): 385 - 393.
- [3] SCHNYDER - CANDRIAN S, TOGBE D, COUILLIN I, et al. Interleukin-17 is a negative regulator of established allergic asthma [J]. J Exp Med, 2006, 203 (12): 2 715 - 2 725.
- [4] 黄雪琨, 陈玉莲, 张革化, 等. IL-17和IL-23在变应性鼻炎患者血清中的表达及意义[J]. 中山大学学报(医学科学版), 2011, 32(2): 91 - 93.
- [5] YASUMI Y, TAKIKAWA Y, ENDO R, et al. Interleukin-17 as a new marker of severity of acute hepatic injury [J]. Hepatology Research, 2007, 37(4): 248 - 254.
- [6] ARNAUD L, CHRISTOPHE M. The Interleukin-17 pathway is involved in human alcoholic liver disease [J].

- Hepatology, 2009, 49(2): 646 – 657.
- [7] WEI W U, JIE L I, FENG CHEN, et al. Circulating Th17 cells frequency is associated with the disease progression in HBV infected patients [J]. Gastroenterol Hepatol, 2010, 25(4): 750 – 757.
- [8] JING – PING Z, JING Y. Increased intratumoral IL-17 producing cells correlate with poor survival in hepatocellular carcinoma patients [J]. Journal of Hepatology, 2009, 50(3): 980 – 989.
- [9] 中华医学会肝病学会, 传染病和寄生虫学会. 丙型肝炎防治指南 [J]. 中华肝脏病杂志, 2004, 12(4): 194 – 198.
- [10] 李婕, 陈智. Th17细胞亚群与病毒感染性疾病[J]. 国际流行病学传染病学杂志, 2009, 36(6): 395 – 398.
- [11] 廖卓君, 徐建华. Th17细胞及其相关细胞因子在自身免疫病中的研究 [J]. 中华风湿病学杂志, 2009, 13(11): 789 – 791.
- [12] WEAVER C T, HATTON R D, MANGAN P R, et al. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages [J]. Annu Rev Immunol, 2007, 25(8): 21 – 852.
- [13] VELDHONEN M, HOCKING R J, ATKINS C J, et al. TGF- $\beta$  in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells [J]. Immunity, 2006, 24(8): 179 – 189.
- [14] BELTELLI E, CARRIER Y, GAO W, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells [J]. Nature, 2006, 441(7090): 235 – 238.
- [15] MANGAN P R, HARRINGTON L E, O'OUINN D B, et al. Transforming growth factor- $\beta$  induces development of the T (H)17 lineage [J]. Nature, 2006, 441(7090): 231 – 234.
- [16] KIMURA A, NAKA T, KISHIMOTO T. IL-6-dependent and independent pathways in the development of interleukin17-producing T helper cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(29): 12099 – 12104.
- [17] KORN T, MITSUDOERFFER M, CROXFORD A L, et al. IL-6 controls Th17 immunity in vivo by inhibiting the conversion of conventional T cells into Foxp3+ regulatory T cells [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(47): 18460 – 18465.
- [18] IVANOV II, MCKENZIE B S, ZHOU L, et al. The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$  directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells [J]. Cell, 2006, 126(6): 1121 – 1133.
- (201 – 04 – 21 收稿)

(上接第 36 页)

- Neuroscience Research, 2001, 63(6): 509 – 515.
- [6] 陈雪, 孙婧霞, 蒋常文. Bcl-2, Caspase-3与阿尔茨海默病关系的研究进展 [J]. 临床医学工程, 2013, 20(9): 1177 – 1179.
- [7] GONG CX, LIDSKY T, WEGIEL J, et al. Metabolically active rat brain slices as a model to study the regulation of protein phosphorylation in mammalian brain [J]. Brain Res Brain Res Protoc, 2001, 32(6): 134 – 140.
- [8] 王润生. 黄皮酰胺的抗细胞凋亡作用及其作用机制研究 [D]. 北京: 中国协和医科大学, 2000.
- [9] 蔡高梅, 毕建忠. TRAIL在A $\beta$  25-35诱导的大鼠海马组织中的表达 [J]. 医学临床研究, 2008, 10(4): 1856 – 1858.
- [10] 王新玲, 李月彩, 侯颖春. 自由基、细胞凋亡与衰老关系的研究进展 [J]. 中国老年学杂志, 1999, 11(4): 62 – 63.
- [11] 吕仁花, 索爱琴, 张杰文, 等. 缺血预处理对大鼠皮质神经元缺血耐受性和Bcl-2表达的影响 [J]. 实用诊断与治疗杂志, 2007, 4(18): 278 – 279.
- [12] 李玺, 张英泽, 张智燕, 等. 脑尔康对Alzheimer病小鼠脑细胞凋亡相关基因表达的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2004, 5(24): 433 – 434.
- [13] COHEN P, HOLMES C F, TSUKITANI Y. Okadaic acid: a new probe for the study of cellular regulation [J]. Trends Biochem Sci, 1990, 15(3): 98 – 102.
- [14] TIAN Q, ZHANG J, WANG Q, et al. Hyperphosphorylation of tau and decrease of ach level in the meynert nuclells bas alis of rat brain induced by OA [J]. Hua Zhong Ke Ji Da Xue Xue Bao (Zi Ran Ke Xue Ban), 2004, 32(12): 94 – 96.
- [15] 李玺, 刘颖, 袁海峰, 等. 人参皂苷Rg1对冈田酸所致大鼠脑Tau蛋白磷酸化的影响 [J]. 中西医结合学报, 2010, 8(10): 955 – 960.
- [16] 徐爱华, 孙永新, 商秀丽. 外源性脑源性神经营养因子通过抑制tau蛋白磷酸化减少细胞凋亡 [J]. 中国医科大学学报, 2013, 10(4): 296 – 300.
- (2014 – 03 – 19 收稿)