

• 临床检验研究 •

慢性乙型病毒性肝炎患者检测肽抗菌药物 Cathelicidin hCAP18/LL-37 的临床意义

夏春祥,曾东晓,陈丽华,韩春云,李雨松,纪小亭
(江苏省淮安市第四人民医院检验科 223002)

摘要:目的 探讨肽抗菌药物 hCAP18/LL-37 在慢性乙型病毒性肝炎(乙型肝炎)中的临床意义。方法 将 90 例慢性乙型肝炎患者分成轻、中、重 3 组,每组 30 例,用微孔法酶联免疫吸附实验分别检测患者血浆 LL-37 水平,并与健康对照组($n=30$)比较,同时进行组间比较。结果 慢性乙型肝炎患者血浆的 LL-37 水平显著低于健康对照组($P<0.01$)。患者血浆中 LL-37 水平在慢性乙型肝炎轻、中、重组中均值分别是 38.93、33.11、12.87 ng/mL,随病情加重而逐渐降低,组间比较差异有统计学意义($P<0.01$)。结论 LL-37 检测可作为慢性乙型肝炎患者临床判断病情和预后的一个标志物。

关键词:肝炎病毒,乙型; 肽抗菌药物; LL-37; 血浆
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.01.011 文献标识码:A 文章编号:1673-4130(2012)01-0027-02

Clinical value of detecting plasma cathelicidin hCAP18/LL-37 in patients with chronic hepatitis B

Xia Chunxiang, Zeng Dongxiao, Chen Lihua, Han Chunyun, Li Yusong, Ji Xiaoting
(Department of Clinical Laboratory, the Fourth People's Hospital, Huai'an, Jiangsu 223002, China)

Abstract: Objective To analyze serocym LL-37 levels in hepatitis B virus-infected subjects, and to explore the correlation with plasma LL-37 levels and liver damage in HBV-infected subjects. **Methods** Plasma samples were obtained from 90 hepatitis B virus-infected subjects, these subjects were divided three groups as hepatitis B virus patients with mild, moderate and severe chronic B hepatitis. Plasma LL-37 levels were determined using enzyme-linked immunosorbent assay. **Results** The mean plasma LL-37 concentrations in HBV mild, moderate and severe chronic B virus were lower than matched healthy controls ($P<0.01$). Plasma LL-37 levels decreased with liver damage ($P<0.01$). They were 38.93, 33.11, 12.87 ng/mL. **Conclusion** Plasma LL-37 levels provides a useful marker of define disease progression of HBV infection. The change of plasma LL-37 level in patients with chronic hepatitis B can assist diagnosis and predicting prognosis.

Key words: hepatitis B virus; peptide antibiotic; LL-37; plasma

国内慢性乙型病毒性肝炎(乙肝)患者大约 2 000 万^[1],目前认为乙型肝炎病毒本身并不引起明显的肝细胞损伤,肝细胞损伤主要由免疫病理引起,即机体的免疫反应在清除 HBV 的过程中造成肝细胞的损伤^[2]。

近年来新发现的一类肽抗菌药物 Cathelicidins,其中 hCAP18(human cathelicidin antimicrobial peptide 18, hCAP-18)/LL-37 是目前在人体发现的惟一 Cathelicidins 家族成员^[3],研究表明 LL-37 既有抗微生物特征,又是先天性免疫体系中的调节器和效应分子^[4]。LL-37 是一种多功能的肽抗菌药物,能杀灭病原微生物(包括 G^+ 、 G^- 、真菌、部分带包膜的病毒),能调节免疫功能和炎症介质的释放,引起免疫细胞分化及趋化、细胞因子的释放,特别是具有结合与中和内毒素等功能^[5]。肽抗菌药物特别是 hCAP18/LL-37 与肝病关系的文献鲜有报道,本研究就慢性乙型肝炎患者血浆中 LL-37 水平,探讨其在慢性肝病中的临床价值,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集本院慢性乙型肝炎患者 90 例,其中男 73 例,女 17 例,平均年龄(45 ± 15.0)岁。所有病例均无吸毒史或自身免疫性疾病,入院前未使用过免疫调节剂,全部病例符合 2005 年制定的《中国慢性乙型肝炎防治指南》,病例分 3 组,慢性乙型肝炎轻度组、慢性乙型肝炎中度组和慢性乙型肝炎重度组,每组 30 例。本研究同时留取 30 例健康体检者血浆作对照组研究,对照组在年龄、性别等方面与研究组相似,经方差统计检验无差异。留取的血浆标本严格按试剂盒说明书要求聚丙烯微量离心管,乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝剂抗凝,皆住院后,于患者系统治疗前留取,于-86℃超低温冰箱保存备用。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂 使用进口 LL-37 专用试剂盒(LOT:3213K 21 Hycult Biotech the Netherlands)检测血浆 LL-37 浓度,试剂盒检测浓度范围为:0.1~100.0 ng/mL,具体操作严格按说明书进行并做标准曲线。

1.2.2 主要设备 -86℃超低温冰箱(型号:DW-HL388,中科美菱);酶标仪(型号:WELLSCAN MK3,英国);洗板机(型号:WELLWASH MK4,英国)。

1.3 统计学处理 检测结果均采用 $\bar{x}\pm s$ 表示。实验数据分析采用 SPSS13.0 统计软件进行分析,组间比较采用单因素方差分析及 Kruskal-Wallis 法检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

HBV 感染者血浆 LL-37 水平健康对照组浓度均值为(62.45 ± 14.07)ng/mL,HBV 感染者血浆 LL-37 均值下降,其中轻度组与中度组,中度组与重度组,重度组与轻度组, Kruskal-Wallis 法,各组间两两比较差异有统计学意义($P<0.01$)。各组血浆 LL-37 浓度范围见表 1。经过单因素方差分析差异有统计学意义($F=113.20, P<0.01$)。

表 1 LL-37 在慢性乙型肝炎轻、中、重度血浆中水平

组别	n	LL-37(ng/mL, $\bar{x}\pm s$)
健康对照组	30	62.45±14.07
慢性乙型肝炎轻度	30	38.93±8.49 ^{ab}
慢性乙型肝炎中度	30	33.11±9.43 ^{ab}
慢性乙型肝炎重度	30	12.87±2.91 ^{ab}

^a: $P<0.01$,与健康对照组比较;^b: $P<0.01$,慢性乙型肝炎组间比较。

3 讨 论

目前, HBV 本身并不引起明显的肝细胞损伤。机体免疫反应在造成肝细胞损伤过程中起重要作用。在原发肝损伤基础上, 肝脏屏障功能受损, 特别是 kupffer 细胞功能低下, 使肠道来的细菌内毒素得不到有效清除, 造成肠源性内毒素血症, 内毒素刺激诱导活化肝内外单核-巨噬细胞, 特别是 kupffer 细胞释放 $\text{TNF-}\alpha$, 内毒素还诱导 IL-8、血小板激活因子(PAF)、血栓素(TXA_2)、白三烯、自由基, 这些因子对 $\text{TNF-}\alpha$ 起到协调、辅助和强化作用^[2]。内毒素、PAF、 $\text{TNF-}\alpha$ 、IL-6 等扩血管物质合成导致扩张血管, 是引起高动力循环的一个原因, 高动力循环对门静脉高压的持续期作用, 是腹腔积液等出现的原因。研究表明内毒素在肝病进程中起非常重要的作用, 提示临床工作者不但要重视肝脏的损伤, 还要重视内毒素起重要作用而引起的继发损伤, 探讨降低机体存在的内毒素血症可能机制。

完成人类基因组测序后, 后基因组学是当前研究热点, 从结构基因组学转向功能基因组研究, 目标之一是探讨基因与疾病的关系。慢性乙型肝炎(轻、中、重组)与机体的免疫功能及状态有关, 本文首次检测患者血浆中抗微生物肽 LL-37 在慢性乙型肝炎(轻、中、重组)血浆中的差异。

LL-37 是迄今为止发现的惟一存在于人体的 Cathelicidins 家族抗微生物肽, 基因定位于 3P21.3, 其前体肽 hCAP-18 经酶解后释放出的有活性的羧基端片段, 因其氨基酸端前两个是亮氨酸残基(L)和总氨基酸残基数是 37 而得名。LL-37 在人体组织广泛分布, 具有广谱抗微生物作用, 并影响细胞因子表达, 促进树突状细胞分裂, 具有结合与中和内毒素及促进血管再生及趋化作用, 是人体天然免疫重要作用因子^[5]。

LPS 首先与其结合蛋白(LBP)结合, LBP 将 LPS 运到 CD14 分子, LPS-LBP-CD14 复合物通过膜蛋白 Toll 样受体结合而激活细胞内信号转导通路。LPS-CD14 复合体激活转录因子 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 及各种蛋白激酶介导炎症因子产生如 $\text{TNF-}\alpha$ 、IL-6 等。LL-37 结合中和内毒素, 降低 LPS 对机体的损伤^[6]。研究表明, LL-37 通过与 LPS 的脂质 A 部分结合而抑制 LPS-CD14 复合物的形成, 防止内毒素依赖性细胞因子被诱导而使巨噬细胞被激活。半乳糖胺致敏小鼠在注射 LPS 24 h 后, 90% 发生内毒素休克而死亡, 而在注射 LPS 后再注射 LL-37, 则小鼠生存率上升到 80%^[7]。

Mookherjee 等^[7]研究表明内毒素在生理浓度的 LL-37 存在下, 通过抑制促感染因子 $\text{TNF-}\alpha$ 的释放而被中和。研究表明, LL-37 可以抑制 FPRL-1(formyl peptide receptor-like 1)的反向连接, 诱导 HIV-1 趋化因子受体下调, 抑制原始 CD4^+ T 细胞复制, 使 HIV-1 感染性减低^[8]。Zhang 等^[9]报道, 研究 HIV-1 感染 10 年或以上仍不发病的人群, 发现 CD8^+ T 细胞分泌的 α -防御素-1、-2 和 -3 能明显抑制以 CXCR4 为辅助受体的 HIV-1, 部分抑制以 CCR5 为辅助受体的 HIV-1。

唐翠兰和陈智^[10]报道, α -防御素 mRNA 在慢乙型肝炎患者中的表达是无症状 HBV 携带者的 1.4 倍, 其在慢性乙型肝炎患者中表达显著高于无症状 HBV 携带者, 表明 α -防御素与 HBV 感染引起的炎症有关, 但在慢性乙型肝炎轻、中、重组中 HNP-1~3 水平依次降低, 但差异无统计学意义。

LL-37 分子特征及抗菌、抗病毒药用功能等实验研究是目前的研究热点, 但 LL-37 与慢性乙型肝炎关系的研究未见报道。通过严格的病例选择, 加强质量控制, 严格优化实验室条件^[11-12], 通过微孔板 ELISA 法, 严格按试剂盒说明书操作, 检

测血浆中 LL-37 在慢性乙型肝炎患者中的表达, 证实慢性乙型肝炎患者的 LL-37 与健康对照组有差异。慢性乙型肝炎患者 LL-37 血浆含量显著低于对照组($P < 0.01$)。在慢性乙型肝炎轻、中、重度中 LL-37 依次下降, 组与组之间差异有统计学意义($P < 0.01$)。慢性乙型肝炎轻、中、重度, 随着病情的加重, 患者发生内毒素血症的概率不断增加, LL-37 是体内惟一具有中和内毒素作用的抗微生物肽, 需要消耗机体大量的 LL-37。LL-37 于外周血中是与血浆脂蛋白结合, 研究表明, 载脂蛋白 A 的缺乏可引起 LL-37 的下调, 而肝炎患者随病情的加重, 血脂特别是脂蛋白含量明显下降^[13], 这些都可能是 LL-37 血浆含量降低的原因之一, 也可能是乙型肝炎患者病情加重, 肝功能下降的原因或者是结果之一, 可作为一个标志物在临床上作为判断病情和预后的辅助手段。到目前为止, LL-37 对 HBV 的临床研究未见报道, 所以 LL-37 对病毒性肝炎特别是乙型或丙型的临床价值及相关性有待于进一步深入研究。

参考文献

- [1] 中华医学会肝脏病学分会, 中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南[J]. 中华临床感染病杂志, 2010, 4(1): 1-20.
- [2] 马亦林. 传染病学[M]. 4 版. 上海: 上海科学技术出版社, 2005: 296-322.
- [3] Durr UH, Sudheendra US, Ramamoorthy A, et al. LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2006, 1758(9): 1408-1425.
- [4] Bucki R, Leszczynska K, Namiot A, et al. Cathelicidin LL-37: A multitask antimicrobial peptide[J]. Arch Immunol Ther Exp, 2010, 58(1): 15-25.
- [5] Rosenfeld Y, Papo N, Shai Y, et al. Endotoxin(lipopolysaccharide) neutralization by innate immunity host-defense peptides. Peptide properties and plausible modes of action[J]. J Biol Chem, 2006, 281(3): 1636-1643.
- [6] Nagaoka I, Hirota S, Niyonasaba F, et al. Cathelicidin family of antibacterial CAP18 and CAP11 inhibit the expression of $\text{TNF-}\alpha$ by blocking the binding of LPS to CD14^+ cells[J]. J Immunol, 2001, 167(6): 3329-3338.
- [7] Mookherjee N, Brown KL, Owdish DM, et al. Modulation of the TLR-mediated inflammatory response by endogenous human host defense peptide LL-37[J]. J Immunol, 2006, 176(4): 2455-2464.
- [8] Berqman P, Walter-Jallow L, Broliden K, et al. The antimicrobial peptide LL-37 inhibits HIV-1 replication[J]. Curr HIV Res, 2007, 5(4): 410-415.
- [9] Zhang LQ, Tu WJ, He T, et al. Contribution of human α -defense 1, 2 and 3 to the anti-HIV-1 activity of CD8^+ antiviral factor[J]. Science, 2002, 298(5595): 995-1000.
- [10] 唐翠兰, 陈智. α -防御素在慢性乙型肝炎和无症状 HBV 携带者之间的差异表达[J]. 中华临床感染病杂志, 2009, 2(2): 112-115.
- [11] 王炯默, 肖林, 范文, 等. 乙型肝炎病毒 HBsAg 检测假阳性原因分析[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(5): 423-424.
- [12] 郭翀, 张真铭. ELISA 法检测 HBsAg 实验条件的优化[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(6): 656-657.
- [13] Sorci-Thomas MG, Thomas MJ. The effects of altered apolipoprotein A-I structure on plasma HDL concentration[J]. Trends Cardiovasc Med, 2002, 12(3): 121-128.