

• 论 著 •

乙型肝炎病毒携带者外周血 IFN-γ、IL-32 和 IL-6 的变化及临床相关性*

李彩东, 杨勇卫, 李惠军, 田鹏飞, 吴斌

(兰州市第二人民医院肝病研究所, 甘肃兰州 730046)

摘要:目的 探讨乙型肝炎病毒(HBV)携带者外周血细胞因子 γ 干扰素(IFN- γ)、白细胞介素-32(IL-32)和白细胞介素-6(IL-6)水平变化及其与肝功能水平和HBV DNA载量的相关性。方法 收集60例HBV携带者空腹血清标本,其中慢性HBV携带者39例,非活动性乙型肝炎表面抗原(HBsAg)携带者21例,另收集体检健康者50例(对照组),检测血清IFN- γ 、IL-32和IL-6水平、HBV DNA载量及血清肝功能水平,并进行相关性分析。结果 与对照组相比,慢性HBV携带者和非活动性HBsAg携带者外周血IFN- γ 、IL-32和IL-6水平均升高,差异均有统计学意义($P<0.05$);中病毒载量慢性HBV携带者外周血IFN- γ 、IL-32和IL-6水平均高于低病毒载量与高病毒载量携带者,但差异均无统计学意义($P>0.05$);HBV携带者外周血IL-32水平与AST水平呈正相关($r=0.32, P<0.05$),与ALB水平呈负相关($r=-0.27, P<0.05$)。结论 细胞因子IFN- γ 、IL-32和IL-6在慢性HBV感染过程中可能起重要作用,可作为评估HBV携带者肝脏炎症严重程度的重要指标。

关键词:乙型肝炎病毒携带者; γ 干扰素; 白细胞介素-32; 白细胞介素-6

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.18.003

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)18-2622-03

Changes and clinic correlation of IFN- γ , IL-32 and IL-6 levels in peripheral blood of hepatitis B virus carriers*

Li Caidong, Yang Yongwei, Li Huijun, Tian Pengfei, Wu Bin

(Liver Diseases Research Institute, Lanzhou Municipal Second People's Hospital, Lanzhou, Gansu 730046, China)

Abstract: Objective To explore changes of levels of interferon- γ (IFN- γ), interleukin-32(IL-32) and interleukin-6(IL-6) in peripheral blood and the correlation between peripheral IFN- γ , IL-32, IL-6 and liver function level and hepatitis B virus(HBV) DNA load in HBV carriers. **Methods** Sixty HBV carriers, including 39 cases of chronic HBV carriers and 21 cases of inactive hepatitis B surface antigen(HBsAg) carriers, and 50 healthy individuals were collected. Serum levels of IFN- γ , IL-32 and IL-6, the amount of HBV DNA and liver function were detected, and clinical correlations were analysed. **Results** Compared with the control group, serum levels of IFN- γ , IL-32 and IL-6 of chronic HBV carriers and inactive HBsAg carriers were significantly increased ($P<0.05$). Compared with chronic HBV carriers with low amount of HBV DNA loads and high amount of HBV DNA loads, chronic HBV carriers with medial HBV DNA loads had higher serum levels of IFN- γ , IL-32 and IL-6, but no statistically significant differences were observed($P>0.05$). There was positive correlation between IL-32 level and ALT level ($r=0.32, P<0.05$), and negative correlation between IL-32 level and ALB level($r=-0.27, P<0.05$). **Conclusion** IFN- γ , IL-32 and IL-6 may play important roles in chronic HBV infection, the levels of IFN- γ , IL-32 and IL-6 could be used as important indicators to assess the severity of inflammation in HBV carriers.

Key words: hepatitis B virus carriers; interferon- γ ; interleukin-32; interleukin-6

乙型肝炎病毒(HBV)感染是全球性的公共卫生问题,也是我国最常见的传染性疾病之一,我国1~59岁一般人群中乙型肝炎表面抗原(HBsAg)携带率为7.18%,胎儿期或婴幼儿时期感染HBV,80%会发展成为慢性携带者,根据其临床表现不同又细分为慢性HBV携带者和非活动性HBsAg携带者^[1]。乙型肝炎患者和携带者的传染性高低主要取决于血液中HBV DNA水平。HBV携带者肝组织无明显损伤,其体内参与免疫调节的细胞因子,包括 γ 干扰素(IFN- γ)、白细胞介素-32(IL-32)和白细胞介素-6(IL-6)的水平变化,以及其与HBV DNA的相关性研究并未见报道。本研究选取60例HBV携带者为研究对象,检测其血清HBV DNA载量、肝功能水平及外周血IFN- γ 、IL-32和IL-6水平等指标,探讨HBV携带者外周血细胞因子IFN- γ 、IL-32和IL-6水平变化及其与HBV DNA载量和肝功能水平的相关性,以进一步探索HBV携带者感染HBV后的免疫状态。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2012年2月至2013年12月本院体检中心体

检健康者50例纳入对照组,男25例,女25例;年龄23~58岁,平均(32.15±8.46)岁;均排除各型肝炎病毒感染及心肺疾病等,肝功均能正常。同期本院住院及肝病专家门诊确诊HBV携带者60例纳入观察组,男32例,女28例;年龄21~57岁,平均(37.28±12.08)岁;其中慢性HBV携带者39例(慢性HBV携带组),非活动性HBsAg携带者21例(非活动性HBsAg携带组);所有患者排除其他肝炎性疾病和病毒感染,诊断符合2010年12月中华医学会肝病学分会和中华医学会感染学分会联合制订的《慢性乙型肝炎诊治指南》中的诊断标准^[1]。

1.2 仪器与试剂 7300型实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)仪(美国ABI公司),ST-360酶标仪(上海科华公司),AU680全自动生化分析仪(美国贝克曼库尔特公司);HBV DNA定量检测试剂盒(湖南圣湘生物科技有限公司),血清IFN- γ 、IL-32和IL-6检测试剂盒(美国RD公司),血清丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、总胆红素(TBIL)和清蛋白(ALB)检测试剂盒(北京九强生物技术有限公司)。

1.3 方法

* 基金项目:兰州市科技发展指导性计划项目(2014-ZD-07)。 作者简介:李彩东,女,主任药师,主要从事肝胆疾病发病机制及治疗学研究。

1.3.1 标本采集 收集各组研究对象的空腹血清标本 2 mL,于-80 °C 储存备用。

1.3.2 HBV DNA 检测 取血清 5 μL, 释放病毒 DNA, 加入 PCR 反应液, 采用 7300 型实时荧光定量 PCR 仪进行荧光定量 PCR 检测, 结果判断: <10² IU/mL 为阴性, 10²~10⁴ IU/mL 为低载量, 10⁵~10⁶ IU/mL 为中载量, >10⁷ IU/mL 为高载量, HBV DNA 载量取对数值(lg)表示。

1.3.3 IFN-γ、IL-32 和 IL-6 水平检测 将不同浓度的标准品及试验血清(10 μL)依次加入已包被好的相应的酶联免疫吸附试验(ELISA)检测孔中(空白孔除外), 封板, 置于 37 °C 孵育箱中孵育 1 h 后洗板 5 次。每孔(空白孔除外)加入 50 μL 显色剂, 置于 37 °C 避光显色 15 min, 每孔加入终止液 50 μL 终止反应, 当孔中液体颜色由蓝色变黄色后, 混匀, 立即用 ST-360 酶

标仪(15 min 内)测定 450 nm 处吸光度值(A₄₅₀ 值), 根据标准品不同浓度的 A₄₅₀ 值, 绘制标准曲线, 求出标准方程, 然后换算出每个待测标本的浓度。

1.3.4 肝功能水平检测 采用 AU680 全自动生化分析仪检测血清 ALT、AST、TBIL 和 ALB 水平, 结果判断: ALT<50 IU/L、AST<50 IU/L、TBIL<30.1 μmol/L、35 g/L<ALB<55 g/L 为正常。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行数据处理与统计分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 均数比较采用配对 t 检验; 相关性分析采用 Spearman 相关分析; 以 $\alpha=0.05$ 为检验水准, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组临床基本资料 见表 1。

表 1 HBV 携带者及对照组临床基本资料($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ALT(IU/L)	AST(IU/L)	TBIL(μmol/L)	ALB(g/L)	HBV DNA(lg IU/mL)
慢性 HBV 携带组	39	33.36±6.79	38.62±7.59	41.22±8.76	41.19±7.27	5.15±2.05
非活动性 HBsAg 携带组	21	32.48±6.51	31.24±6.91	19.00±2.80	43.13±3.81	—
对照组	50	19.90±3.95	15.38±2.68	13.67±2.30	44.39±3.57	—

—: 无数据。

2.2 各组外周血细胞因子水平比较 与对照组比较, 慢性 HBV 携带者外周血 IFN-γ、IL-32 和 IL-6 水平均升高, 差异均有统计学意义(*t* 值分别为 7.15、6.42、9.47, $P<0.05$); 非活动性 HBsAg 携带者外周血 IFN-γ、IL-32 和 IL-6 水平也升高, 差异均有统计学意义(*t* 值分别为 6.14、5.07、7.28, $P<0.05$)。慢性 HBV 携带者 IFN-γ 和 IL-6 水平低于非活动性 HBsAg 携带者, 而 IL-32 水平略高于非活动性 HBsAg 携带者, 但差异均无统计学意义($P>0.05$)。见表 2。

2.3 不同 HBV DNA 载量的慢性 HBV 携带者细胞因子水平

比较 中病毒载量慢性 HBV 携带者外周血 IFN-γ、IL-32 和 IL-6 水平均高于高病毒载量及低病毒载量 HBV 携带者, 但差异均无统计学意义($P>0.05$)。见表 3。

表 2 各组外周血细胞因子水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	IFN-γ(ng/mL)	IL-32(ng/mL)	IL-6(ng/mL)
慢性 HBV 携带组	39	219.67±47.85*	1 288.53±175.28*	45.28±4.61*
非活动性 HBsAg 携带组	21	250.82±38.64*	961.89±103.52*	50.18±6.64*
对照组	50	14.41±3.71	182.24±72.22	1.62±0.63

*: $P<0.05$, 与对照组比较。

表 3 不同 HBV DNA 载量的慢性 HBV 携带者细胞因子水平比较($\bar{x} \pm s$)

HBV DNA 载量	n	HBV DNA(lg IU/mL)	IFN-γ(ng/mL)	IL-32(ng/mL)	IL-6(ng/mL)
高病毒载量	9	7.93±0.59	196.62±48.67	1 055.49±188.31	37.84±6.42
中病毒载量	10	6.20±0.65	279.98±66.34	1 465.74±336.38	52.28±10.17
低病毒载量	20	3.37±0.68	199.89±37.49	1 304.79±290.12	45.12±6.93

2.4 HBV 携带者各检测项目与外周血细胞因子水平的相关性分析 HBV 携带者外周血细胞因子 IL-32 水平与 AST 水平呈正相关($r=0.32$, $P<0.05$), 与 ALB 水平呈负相关($r=-0.27$, $P<0.05$), 其余均无明显相关性($P>0.05$)。见表 4。

表 4 各检测项目与 HBV 携带者外周血细胞因子水平的相关性分析

检测项目	IFN-γ		IL-32		IL-6	
	r	P	r	P	r	P
ALT	0.12	0.38	0.11	0.42	0.10	0.44
AST	0.02	0.87	0.32	0.01	0.00	0.98
TBIL	-0.15	0.26	-0.08	0.57	-0.11	0.41
ALB	-0.22	0.10	-0.27	0.04	-0.18	0.17
HBV DNA	0.02	0.92	-0.04	0.83	-0.06	0.74

3 讨 论

人感染 HBV 病毒后的临床转归差异巨大, 其中一部分患者成为 HBV 携带者, 根据其临床表现不同又细分为慢性 HBV 携带者和非活动性 HBsAg 携带者; 前者多为处于免疫

耐受期的 HBsAg、乙型肝炎 e 抗原(HBeAg)和 HBV DNA 阳性者, 1 年内连续随访 3 次以上均显示血清 ALT 和 AST 在正常范围, 肝组织学检查无明显异常; 而非活动性 HBsAg 携带者血清 HBsAg 阳性、HBeAg 阴性、乙型肝炎 e 抗体(HBeAb)阳性或阴性, HBV DNA 低于最低检测限, 1 年内连续随访 3 次以上, 转氨酶水平均在正常范围^[1-3]。

许多研究发现, HBV 携带者中有相当一部分伴有不同程度肝脏炎症和纤维化改变^[4-5]; 慢性 HBV 感染自然史过程复杂, HBV 携带者目前在临幊上属于观察对象, 处于相对稳定阶段, 可以进展到 HBeAg 阴性慢性乙型肝炎、肝硬化, 甚至肝细胞癌(HCC)^[6-7]。IFN-γ 是由数种具有免疫活性的细胞产生的一个重要的细胞因子, 能抑制病毒复制, 有利于病毒清除^[8]; 有研究显示 IL-32 与肝脏的炎症及纤维化程度密切相关, 在肝细胞和肝癌患者的肿瘤细胞中表达较多^[9]; IL-6 为体内重要的炎性细胞因子, 同时也是一种与慢性肝病患者免疫调节有关的细胞因子^[10]。

本研究结果显示: 与对照组相比, 慢性 HBV 携带者和非活动性 HBsAg 携带者外周血 IFN-γ、IL-32 和 IL-6 水平均明显升高($P<0.05$); 提示 HBV 携带者虽然转氨酶水平在正常

范围,但其体内炎性细胞因子水平的升高,说明存在肝组织炎症;发现慢性HBV携带者IFN- γ 和IL-6水平低于非活动性HBsAg携带者,而IL-32水平略高于非活动性HBsAg携带者,但差异均无统计学意义($P>0.05$),可提示非活动性HBsAg携带状态的患者虽然大部分肝组织炎症较轻微,但更有可能存在较严重的肝组织炎症,仍有较高的发展为肝炎肝硬化的风险^[11-12],且IL-32可能与患者体内病毒复制活跃程度有关;比较不同HBV DNA载量的外周血细胞因子水平,发现中病毒载量慢性HBV携带者外周血IFN- γ 、IL-32和IL-6水平均高于高病毒载量及低病毒载量携带者,但差异均无统计学意义($P>0.05$),提示中病毒载量携带者可能存在更高的慢性化进展的风险,对此类患者有待扩大样本量进行进一步研究;发现HBV携带者外周血细胞因子IL-32水平与AST水平呈正相关,与ALB水平呈负相关,提示IL-32与HBV携带者肝组织损伤及病情进展密切相关。

本研究探讨了HBV携带者外周血IFN- γ 、IL-32和IL-6水平的变化,并分别做了三者与HBV DNA载量和肝功能水平的相关性分析,发现并证实IFN- γ 、IL-32和IL-6间接或直接地参与了乙型肝炎的发生、发展进程,同时也有待进一步扩大样本量进行更深入的研究。

参考文献

- [1] 中华医学会肝病学分会,中华医学会感染病分会.慢性乙型肝炎防治指南[J].临床肝胆病杂志,2011,27(1):1-16.
- [2] Tong MJ, Trieu J. Hepatitis B inactive carriers: clinical course and outcomes[J]. J Digest Dis, 2013,14(6):311-317.
- [3] Shaikh S, Ram DB, Tanveer S, et al. Comparison of the histological and serological parameters of patients with hepatitis delta virus in active and inactive hepatitis B virus carriers[J]. J Coll Physicians Surg Pak, 2014,24(2):97-100.

(上接第2621页)

度和灵敏度分别为83.1%,65.6%。而这些标志物的联合检测可以将诊断PHC的灵敏度提高至96.6%。相反,其诊断PHC的特异度有所下降。因此,这就需要在临床应用时合理利用这些标志物。同时,对AFP阴性及低浓度PHC患者GP73、TSGF的阳性率进行统计,结果表明,GP73、TSGF对AFP阴性及低浓度PHC患者有一定的诊断价值,联合检测AFP、GP73及TSGF可提高PHC患者的早期诊断率。

综上所述,AFP、GP73及TSGF这3项肿瘤标志物诊断PHC时缺乏高度的特异性,使用单项进行检测时,易遗漏阳性患者,阳性率不高,而联合检测3项肿瘤标志物时,可明显提高诊断PHC的灵敏度。联合检测AFP、GP73和TSGF作为诊断PHC的重要指标,可互为补充,从而提高PHC的诊断率。

参考文献

- [1] Lee JM, Yang J, Newell P, et al. β -Catenin signaling in hepatocellular Cancer: implications in inflammation, fibrosis, and proliferation[J]. Cancer Lett, 2014,343(1):90-97.
- [2] Lai Q, Avolio AW, Graziadei I, et al. Alpha-fetoprotein and modified response evaluation criteria in solid tumors progression after locoregional therapy as predictors of hepatocellular Cancer recurrence and death after transplantation[J]. Liver Transpl, 2013,19(10):1108-1118.
- [3] Zhang YL, Zhang YC, Han W, et al. Effect of GP73 silencing on proliferation and apoptosis in hepatocellular Cancer[J]. World J

- [4] Kumar M, Sarin SK, Hissar S, et al. Virologic and histologic features of chronic hepatitis B virus-infected asymptomatic patients with persistently normal ALT[J]. Gastroenterology, 2008,134(5):1376-1384.
- [5] 高某,李丹,江红,等.慢性乙型肝炎病毒携带者73例肝组织病理结果分析[J].中华临床医师杂志:电子版[J/CD]. 2013,7(18):8475-8476.
- [6] Fujiwara K, Yokosuka O, Ehata T, et al. The two different states of hepatitis B virus DNA in asymptomatic carriers: HBe-antigen-positive versus anti-HBe-positive asymptomatic carriers[J]. Dig Dis Sci, 1998,43(2):368-376.
- [7] 任婷婷,徐光华,李春霞.非活动性HBsAg携带状态的自然转归[J].肝脏,2014,19(1):71-73.
- [8] 陈旭丹,刘琼,李新华,等.慢性HBV感染者HBV特异性CD8+T细胞Tim-3和PD-1的表达水平及其与IFN- γ 产生的相关性研究[J].中华实验和临床感染病杂志:电子版[J/CD]. 2013,7(5):665-669.
- [9] Moschen AR, Fritz T, Clouston AD, et al. Interleukin-32: a new proinflammatory cytokine involved in hepatitis C Virus-Related liver inflammation and fibrosis[J]. Hepatology, 2011, 53 (6): 1819-1829.
- [10] 齐育英,林振忠,明德松. IL-6、IL-10、IL-17在慢性乙型病毒性肝炎患者血中水平分析[J].中国免疫学杂志,2013,29(11):1177-1180.
- [11] 黄珊,何清,唐奇远,等.91例非活动性HBsAg携带者肝组织病理特点的研究[J].中国病毒病杂志,2012,2(3):58-61.
- [12] 苏秋东,毕胜利.慢性乙型肝炎感染自然史[J].中华实验和临床病毒学杂志,2012,26(6):494-496.

(收稿日期:2015-07-10)

Gastroenterol, 2014,20(32):11287-11296.

- [4] Deng B, Tan QY, Fan XQ, et al. Clinical value of assaying tumor supplied group of factor/tumor specific growth factor in patients with solitary pulmonary nodule[J]. Clin Lung Cancer, 2011, 12(3):192-196.
- [5] 中国抗癌协会肝癌专业委员会.原发性肝癌诊断标准[J].中华肝脏病杂志,2000,8(3):135.
- [6] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会,肝病学分会.病毒性肝炎防治方案[J].中华传染病杂志,2001,19(1):56-62.
- [7] Lee SY, Konstantinidis IT, Eaton AA, et al. Predicting recurrence patterns after resection of hepatocellular Cancer[J]. HPB (Oxford), 2014,16(10):943-953.
- [8] Wang NY, Wang C, Li W, et al. Prognostic value of serum AFP, AFP-L3, and GP73 in monitoring short-term treatment response and recurrence of hepatocellular carcinoma after radiofrequency ablation[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014,15(4):1539-1544.
- [9] Zhou G, Niu L, Chiu D, et al. Changes in the expression of serum markers CA242, CA199, CA125, CEA, TNF- α and TSGF after cryosurgery in pancreatic cancer patients[J]. Biotechnol Lett, 2012,34(7):1235-1241.
- [10] Yao S, Zhang J, Chen H, et al. Diagnostic value of immunohistochemical staining of GP73, GPC3, DCP, CD34, CD31, and reticulin staining in hepatocellular carcinoma[J]. J Histochem Cytochem, 2013,61(9):639-648.

(收稿日期:2015-07-16)