

• 论 著 •

细胞因子 IL-15、IL-16、IFN- γ 及 TGF- β 在慢性乙型肝炎病毒感染者外周血中的表达及临床意义的研究*

李彩东¹, 林 静², 陈锡莲¹, 杨勇卫¹, 靳克俭¹, 吴 斌¹

(1. 兰州市第二人民医院肝病研究所, 兰州 730046; 2. 甘肃省医学情报研究所, 兰州 730050)

摘 要:目的 探讨 HBV 感染者外周血细胞因子 IL-15、IL-16、IFN- γ 、TGF- β 的表达水平变化的及临床意义。方法 选择肝癌患者 60 例(HCC 组)、肝硬化患者 60 例(LC 组)、慢性乙型肝炎患者 60 例(CHB 组)、慢性乙型肝炎病毒携带者 60 例(ASC 组)和健康对照者 40 例(健康对照组),采用酶联免疫法检测细胞因子表达水平,运用聚合酶链反应检测 HBV DNA 载量,同时检测各项生化指标。结果 随着患者病情加重,细胞因子 IL-15、IL-16、IFN- γ 、TGF- β 表达水平均呈逐渐升高的趋势,且在肝硬化患者中达到最大值。与健康对照组相比,不同临床类型 HBV 感染者细胞因子表达水平均显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。IL-15、IL-16、IFN- γ 、TGF- β 在 CHB 患者外周血 HBV DNA 高载量组表达水平最高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 IL-15、IL-16、IFN- γ 、TGF- β 可能参与了乙型肝炎的肝脏炎性损伤过程,且其表达水平与病毒量具有一定相关性。

关键词:乙型肝炎; IL-15; IL-16; IFN- γ ; TGF- β ; 临床意义

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.01.002

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)01-0003-03

Expression of peripheral blood IL-15, IL-16, IFN- γ and TGF- β cytokines in patients with hepatitis B virus infection and its clinical significance*

Li Caidong¹, Lin Jing², Chen Xilian¹, Yang Yongwei¹, Jin Kejian¹, Wu Bin¹

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

2. Gansu Provincial Research Institute of Medical Information, Lanzhou, Gansu 730050, China)

Abstract:Objective To investigate the expression levels of peripheral blood cytokines(IL-15, IL-16, IFN- γ and TGF- β) in the patients with hepatitis B virus(HBV group) infections and its clinical significance. **Methods** 60 cases of hepatocellular cancer(HCC), 60 cases of liver cirrhosis(LC group), 60 cases of chronic hepatitis B(CHB group), 60 hepatitis B virus carriers(ASC group and 40 healthy control individuals(control group) were selected. The expression levels of cytokines were detected by using the enzyme linked immunosorbent assay(ELISA) and HBV DNA loads were measured by using real time fluorescence quantitative polymerase chain reaction. Meanwhile, the biochemical indexes were detected. **Results** With the disease aggravation, the expression levels of cytokines IL-15, IL-16, IFN- γ and TGF- β showed a gradually increasing trend, and reached a maximum value in the patients with liver cirrhosis. In the comparison with the healthy control group, the expression level of cytokines were significant increased in different clinical types of HBV infections, the differences were statistically significant($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The expression levels of IL-15, IL-16, IFN- γ and TGF- β were highest in the high HBV DNA loads group among the patients with CHB, the difference was statistically significant($P < 0.05$). **Conclusion** IL-15, IL-16, IFN- γ and TGF- β might be involved in the liver inflammatory injury process in hepatitis B, moreover their expression levels have certain correlation with the viral quantity.

Key words: hepatitis B; cytokines; IL-15; IL-16; IFN- γ ; TGF- β ; clinical significance

人感染乙型肝炎病毒(HBV)病毒后的临床转归差异巨大,如不积极治疗,病情将不断进展,肝脏发生纤维化,最终导致肝硬化和肝功能衰竭,HBV 的慢性感染也是原发性肝癌诸多致病因素中最主要的致病因素之一^[1]。乙型肝炎的发病与机体的免疫反应有关,细胞因子是一类由单核巨噬细胞、淋巴细胞等分泌的具有调节细胞功能的多肽物质,在机体的免疫反应中与乙肝病毒相互作用,相互影响^[2]。目前,将细胞因子 IL-15、IL-16、IFN- γ 、TGF- β 结合,研究其在慢性乙型肝炎患者的发病机制中所发挥作用的报道尚不多见,本研究旨在探讨 HBV 感染者血清 IL-15、IL-16、IFN- γ 、TGF- β 的表达及其与 HBV DNA 载量的相关性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 240 例患者均为 2014 年 7~12 月在兰州市第二人民医院住院及肝病专家门诊收治的 HBV 感染者,肝癌患者 60 例(HCC 组),肝硬化患者 60 例(LC 组),慢性乙型肝炎患者 60 例(CHB 组),慢性乙型肝炎病毒携带者 60 例(ASC 组),所有患者均未接受治疗,排除其他疾病,其中男 146 例,女 94 例,年龄 11~66 岁,平均(45.38 \pm 12.72)岁,诊断符合 2010 年 12 月中华医学会肝病学会和中华医学会感染学会联合制定的慢性乙型肝炎诊治指南^[3]中的诊断标准。健康对照组为同期门诊健康体检者 40 例,年龄 23~58 岁,平均(38.68 \pm 13.01)岁。所有操作程序均符合伦理委员会制定的伦理学标

* 基金项目:兰州市城关区科技计划项目(2014-4-1)。 作者简介:李彩东,女,主任药师,主要从事慢性乙肝的发病机制研究及治疗研究。

准,且所有研究对象均签署知情同意书。

1.2 检测方法

1.2.1 人血清细胞因子 IL-15、IL-16、IFN- γ 、TGF- β 检测方法

采用 ELISA 法,试剂盒购自美国 RD 公司,严格按照说明书要求操作,使用科华 ST-360 酶标仪检测。

1.2.2 生化指标检测方法 谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶

(AST)、总胆红素(TBil)、血小板(PLT)均采用美国贝克曼(BECKMAN)AU-680 全自动生化分析仪测定。

1.2.3 HBV DNA 检测方法 采用美国 ABI-7300 荧光定量

PCR 分析仪进行基因扩增,试剂购自湖南圣湘生物科技有限公司。结果判断: $<10^2$ IU/mL 为阴性, $10^2 \sim 10^4$ IU/mL 为低载量组, $10^5 \sim 10^6$ IU/mL 为中载量组, $>10^7$ IU/mL 为高载量组。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较均值采用配对样本 t 检验。相关性运用 Pearson 相关分析进行处理,相关系数用 r 表示。 $P < 0.05$ 为差别有统计学意义。

2 结 果

2.1 慢性 HBV 感染者及健康对照组血清细胞因子水平检测

结果 与健康对照组比较,慢性 HBV 感染者 ASC 组、CHB 组、LC 组和 HCC 组外周血 IL-15、IL-16、IFN- γ 、TGF- β 水平均显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),结果见表 1。

2.2 慢性 HBV 感染者及健康对照组血清肝功能检测结果

随着病情的进一步发展,慢性 HBV 感染者肝功能炎症损害加重。与健康对照组相比,ASC 组、CHB 组、LC 组和 HCC 组外周血 ALT、AST、TBIL 水平均显著升高,差异具有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),结果见表 2。

表 3 CHB 组不同 HBV DNA 载量细胞因子检测结果($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	HBV DNA(lg IU/mL)	IL-15(ng/mL)	IL-16(ng/mL)	IFN- γ (ng/mL)	TGF- β (ng/mL)
HBV DNA(+)高	15	7.61 \pm 0.39	216.19 \pm 30.42	119.43 \pm 16.48	253.71 \pm 23.00	386.06 \pm 23.42
HBV DNA(+)中	19	6.19 \pm 0.66	165.14 \pm 14.30	70.34 \pm 14.38	158.17 \pm 17.84	282.16 \pm 18.70
HBV DNA(+)低	26	3.41 \pm 0.82	188.43 \pm 24.68	97.60 \pm 11.61	181.99 \pm 13.59	343.78 \pm 22.55

3 讨 论

人类一旦不幸感染了 HBV 后,能否彻底清除病毒,是否导致肝脏疾病慢性化,可能更大程度上依赖于个体针对乙肝病毒产生的免疫水平^[4]。细胞因子作为宿主对炎症反应产生的重要免疫调节介质,在宿主清除 HBV 病毒的免疫应答的过程中发挥重要的作用。IL-15 是 1994 年 Grabstein 等^[5]在检测猿肾上皮细胞系 CV-1/EBNA 培养上清液时发现的一种细胞因子。IL-16 在炎症和肿瘤发生、自身免疫疾病、免疫治疗方面起着重要的作用。Th1 细胞和自然杀伤细胞在免疫应答过程中可以产生细胞因子 IFN- γ ,它是具有高度生物活性的一种细胞因子,抑制 Th2 细胞增殖分化,以往的研究已证实它具有抗肿瘤、抗病毒和免疫调节三大功能。TGF- β ^[6]主要由肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)和枯否细胞(kupper cell, KC)产生,其除具有抑制肝细胞增殖、激活 HSC、诱导肝细胞凋亡,促进其产生细胞外基质并抑制细胞外基质降解的作用,主要与肝纤维化有关。

表 1 慢性 HBV 感染者及健康对照组血清细胞因子水平检测结果($\bar{x} \pm s$, ng/mL)

组别	<i>n</i>	IL-15	IL-16	IFN- γ	TGF- β
HCC 组	60	214.48 \pm 18.65 ^b	81.80 \pm 37.77 ^b	138.73 \pm 48.24 ^b	326.87 \pm 87.61 ^b
LC 组	60	222.89 \pm 19.95 ^b	109.77 \pm 21.96 ^b	242.14 \pm 38.12 ^b	473.62 \pm 68.18 ^b
CHB 组	60	187.99 \pm 23.90 ^b	94.43 \pm 17.51 ^b	192.38 \pm 19.25 ^b	334.84 \pm 23.58 ^b
ASC 组	60	95.99 \pm 41.66 ^a	45.79 \pm 10.44	230.58 \pm 17.18 ^b	362.32 \pm 34.51 ^b
健康对照组	40	57.71 \pm 77.13	22.13 \pm 23.39	14.41 \pm 14.75	42.28 \pm 37.50

与健康对照组比较,^a: $P < 0.05$,^b: $P < 0.01$ 。

表 2 慢性 HBV 感染者及健康对照组血清肝功能检测结果($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	ALT(U/L)	AST(U/L)	TBIL(μ mol/L)
HCC 组	60	120.03 \pm 16.38 ^b	145.98 \pm 14.38 ^b	74.26 \pm 11.03 ^b
LC 组	60	101.60 \pm 14.28 ^b	116.87 \pm 19.59 ^b	53.28 \pm 14.50 ^b
CHB 组	60	263.42 \pm 37.65 ^b	210.62 \pm 39.11 ^b	67.95 \pm 24.13 ^b
ASC 组	60	33.05 \pm 6.66 ^a	36.03 \pm 18.14 ^a	33.45 \pm 12.63 ^a
健康对照组	40	19.9 \pm 3.95	15.38 \pm 2.68	13.67 \pm 2.30

与健康对照组比较,^a: $P < 0.05$,^b: $P < 0.01$ 。

2.3 CHB 组不同 HBV DNA 载量细胞因子检测结果 探讨

CHB 组不同 HBV DNA 载量患者外周血细胞因子水平,结果显示 CHB 组 HBV DNA(+)高载量患者 IL-15、IL-16、IFN- γ 和 TGF- β 水平最高,与 HBV DNA(+)中载量患者相比,差异有统计学意义($P < 0.05$),结果见表 3。

本研究对 240 例慢性 HBV 感染者进行分组研究,结果发现,与健康对照组比较,慢性 HBV 感染者 ASC 组、CHB 组、LC 组和 HCC 组外周血 IL-15、IL-16、IFN- γ 、TGF- β 均水平显著升高;随着病情的不断发展,细胞因子水平不断升高且在 LC 组中细胞因子水平最高,说明 IL-15、IL-16、IFN- γ 、TGF- β 水平的高低在一定程度上能够反映肝细胞损害的严重程度,其参与了肝脏炎性损伤过程,与肝炎病情轻重密切相关。提示 IL-15、IL-16、IFN- γ 、TGF- β 参与了乙肝、肝硬化、肝癌等肝病的发生过程。

ALT、AST 和 TBIL 是目前临床上反映肝细胞功能的最常用指标之一,ALT 测定反映肝细胞损伤的灵敏度较高^[7]。本研究中,慢性 HBV 感染者 ASC 组、CHB 组、LC 组和 HCC 组外周血 ALT、AST、TBIL 随着病情的不断加重均显著升高;说明随着肝功能损害程度加重,机体内的细胞因子变化程度显著,细胞免疫明显增强。

唐先梅等^[8]研究发现 HBV 感染者血清 IL-15 和 IL-16 水

平明显高于健康对照组, HBV 高载量组感染者血清 IL-15 和 IL-16 水平明显高于健康对照组和低载量组。本研究结果显示, 在 CHB 组随着 IL-15 和 IL-16 水平的增高, HBV DNA 载量也逐渐增高, 在 HBV DNA 高载量组达最大值。这一研究结果提示血清 IL-15 和 IL-16 水平变化与乙肝病毒的复制水平有关, 可能参与了机体清除 HBV 的过程, 这和 HBV 持续存在和复制水平有关。相反, 在 HBV 携带者(ASC)组 HBV DNA 低载量组血清 IL-15 和 IL-16 水平达最大值。随着血清 IL-15 和 IL-16 水平的增高, HBV DNA 载量逐渐降低, 提示 IL-15 和 IL-16 与 HBV 的清除有关, 它可激活肝细胞自身抗病毒机制, 抑制 HBV DNA 复制^[9]。HBV DNA 高载量组患者血清 IFN- γ 和 TGF- β 水平均高于中载量组和低载量组。我们的研究结果显示随着 IFN- γ 水平的增高, HBV DNA 载量逐渐升高, 提示 IFN- γ 与 HBV 的清除有关, 它可激活肝细胞自身抗病毒机制, 抑制 HBV DNA 复制。同时 HBV DNA 的持续存在, 导致肝实质细胞受损, TGF- β 的表达被启动且表达增加。

综上所述, 慢性 HBV 感染是一个由多种免疫细胞和细胞因子参与的复杂过程, 各种免疫细胞和细胞因子间相互影响、调节和制约^[10]。本研究结果表明, 在慢性乙型肝炎的发生和发展过程中细胞因子 IL-15、IL-16、IFN- γ 、TGF- β 水平可能起重要作用, 联合检测这 4 种细胞因子可作为评估慢性乙型肝炎病情严重程度的重要指标, 并有望成为慢性肝病治疗的新靶点。

参考文献

[1] 余昶, 熊永炎. 肝细胞性肝癌中 MIF、CD147、MMP-9 蛋白的表达

(上接第 2 页)

行了比较。由于肝素组标本为离心后标本, 离心过程中细胞会有破裂, 再经过多次的洗涤和分离后, 细胞损失的较多, 导致回收率不如 EDTA 组未离心的标本结果理想, 但单个核细胞的纯度比 EDTA 组高。而细胞存活率方面, 3 组单个核细胞的存活率无明显差异, 与传统方法获得的细胞存活率水平相当, 均在 90% 以上。故肝素+EDTA 混合组单个核细胞则无论从回收率、纯度以及细胞存活率方面, 都与单种抗凝剂结果无差异, 故可将两种不同抗凝剂的血互相混合, 从而增加了分离单个核细胞的原始血量, 提高了单个核细胞的产出, 为下一步实验提供了充分的准备, 特别是对于婴幼儿采血困难以及采血量不足具有现实意义。同时, 分离过程简单化、有利缩短工作时间、提高工作效率, 也减少了耗材, 降低了试验成本。

本研究还探讨了不同离心时间和离心力下单个核细胞的分离效果, 发现单个核细胞的分离效果并不是单纯随着转数增加, 离心时间延长而分离效果越好。分离细胞时离心转数过低或者离心时间太短, 表现在中间层下的分层液中出现红细胞所形成的红色区, 称为红细胞污染, 导致分离效果不佳。而离心时间过长, 单个核细胞又会损失过多, 故分离时的转速与时间要做出合理的调整。从实验结果来看, 笔者认为在离心力为 1 800 r/min, 离心时间为 25 min 时的离心条件, 分层效果最好, 细胞计数中细胞活力最好。

综上所述, 在获取 PBMC 的回收率和纯度时应根据实际工作和实验室的条件来不断摸索, 选择最佳分离方法。临床大部分科研分离 PBMC 通常只采用肝素抗凝全血, 而本实验通过观察不同抗凝剂的全血标本混合后采用 Ficoll 离心法进行

及意义[J]. 武汉大学学报: 医学版, 2009, 30(3): 358-361.

- [2] 张政, 王福生. 慢性乙型肝炎免疫致病机制和免疫治疗现状[J]. 临床肝胆病杂志, 2012, 28(11): 801-804.
- [3] 中华医学会肝病学分会, 中华医学会感染病学分会. 乙型肝炎防治指南[J]. 临床肝胆病杂志, 2011, 27(1): 88-89.
- [4] 杨春艳, 苏先狮, 李曼妮, 等. 白细胞介素-15 重组体对 HBsAg 核酸疫苗的免疫佐剂作用[J]. 中华肝脏病杂志, 2004, 12(1): 60-61.
- [5] Grabstein KH, Eisenman J, Shanebeck K, et al. Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor[J]. Science, 1994, 264(9): 965-968.
- [6] 刘宁, 徐杰, 刘金花, 等. 慢性乙型肝炎、乙型肝炎肝硬化、乙型肝炎患者 Th1/Th2 型细胞因子水平变化研究[J]. 肠胃病学和肝病杂志, 2014, 23(2): 158-161.
- [7] 陈捷, 王兰兰, 付阳, 等. IL-17、IL-23、TGF- β 和 IL-10 在乙型肝炎病毒感染中的表达分析[J]. 免疫学杂志, 2012, 28(2): 231-236.
- [8] 唐先梅. 慢性乙型肝炎患者血清中 IL-15、IL-16 水平检测及意义[D]. 新疆: 石河子大学, 2007: 21-23.
- [9] Thakur S, Singla A, Chawla Y, et al. Expansion of peripheral and intratumoral regulatory T-cells in hepatocellular carcinoma: a case control study[J]. Indian J Pathol Microbiol, 2011, 54(3): 448-453.
- [10] 邹同. 不同 HBV-DNA 载量慢性乙肝患者血清 MIF 和 IL-17 的表达意义[J]. 中国实用医药, 2013, 8(1): 7-8.

(收稿日期: 2015-08-10)

单个核细胞的分离, 达到增加分离 PBMC 时的血样来源的目的, 是具有现实意义的。

参考文献

- [1] Serbina NV, Jia T, Hohl TM, et al. Monocyte-mediated defense against microbial pathogens[J]. Annu Rev Immunoi, 2008, 26(4): 421-452.
- [1] 李金凤, 刘文礼, 史小娟, 等. 四种常用的人中性粒细胞分离方法的比较[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2008, 28(4): 277-281.
- [2] 邹常春. 全血中性粒细胞分离方法的改进研究[J]. 实验与检验医学, 2009, 27(4): 337-338.
- [3] 吕金星, 汪健, 张锡庆, 等. Percoll 非连续密度梯度沉降法分离人外周血中性粒细胞[J]. 现代免疫学, 2000, 20(2): 122.
- [4] 樊卫平, 宋玉靖, 郝颜琴, 等. 简易外周血单个核细胞分离方法的探索[J]. 山西医科大学学报, 2010, 41(3): 274-276.
- [5] 吴鹏, 刘映峰, 梁东辉, 等. 提高人外周血单核细胞分离率的方法探讨[J]. 实用医学杂志, 2008, 24(5): 707-708.
- [6] 张伟, 李建斌, 赵林娜, 等. 两种离心方法对单个核细胞回收率的影响[J]. 中国输血杂志, 2005, 18(4): 321.
- [7] Yang H, Loutfy MR, Mayerhofer S, et al. Factors affecting banking quality of umbilical cord blood for transplantation[J]. Transfusion, 2011, 51(2): 284-292.
- [8] 周文玲, 郝一文, 等. 三种不同型号的血细胞分离机在采集外周血单个核细胞中的应用分析[J]. 中国实验血液学杂志, 2014, 22(10): 1103-1108.

(收稿日期: 2015-07-25)