

IL-35 在慢性乙型肝炎发病过程中的免疫抑制作用*

邓昭敏, 刘琳, 熊颖妮, 廖萍, 钟洪燕, 李林英[△]

(西藏自治区人民政府驻成都办事处医院检验科, 成都 610041)

摘要:目的 分析白细胞介素-35(IL-35)在慢性乙型肝炎发病过程中的免疫抑制作用。方法 选取 2016 年 6 月至 2017 年 6 月该院 45 例长期居住在西藏地区就诊的慢性乙型肝炎患者作为观察组, 同期体检中心接收的 45 例健康成年人作为对照组, 分别对两组 Th17 细胞、外周血 IL-35、乙型肝炎病毒核酸(HBV DNA)水平进行检测, 并对外周血单个核细胞进行 IL-35 刺激, 观察刺激前后的 Th17 细胞、IL-17、IL-22, 治疗过程中的 HBV 表位肽诱导 Th17 细胞与 IL-35 表达水平。结果 观察组受检者 IL-35 显著高于对照组, 两组受检者的 HBV DNA 与 IL-35 表达比较差异具有统计学意义($P < 0.05$)。两组受检者的外周血非特异性 Th17 细胞表达比较差异无统计学意义($P > 0.05$), 但观察组受检者的外周血 HBV 表位肽诱导 Th17 细胞表达明显高于对照组, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。观察组受检者 IL-35 刺激后 HBV 表位肽诱导 Th17 细胞、IL-17 与 IL-22 显著降低, 刺激前后的 Th17 细胞、IL-17 与 IL-22 表达比较差异具有统计学意义($P < 0.05$)。观察组患者治疗前、治疗 24 周与治疗 48 周的 HBV 表位肽诱导 Th17 细胞表达比较差异无统计学意义($P > 0.05$), 治疗后观察组患者 IL-35 水平逐渐降低, 治疗前、治疗 24 周与治疗 48 周的 IL-35 表达比较差异具有统计学意义($P < 0.05$)。结论 在慢性乙型肝炎发病过程中 IL-35 起到了免疫抑制作用, 能够影响到乙型肝炎病毒持续感染, 并危害患者的机体免疫功能。

关键词: 慢性乙型肝炎; 白细胞介素-35; 免疫抑制

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2018.19.011 中图法分类号: R512.62

文章编号: 1673-4130(2018)19-2376-04

文献标识码: A

The immunosuppressive effect of IL-35 in the pathogenesis of chronic hepatitis B*

DENG Zhaomin, LIU Lin, XIONG Yingni, LIAO Ping, ZHONG Hongyan, LI Linying[△]

(Department of Clinical Laboratory, Tibet Office of the People's Government of the Tibet

Autonomous Region Hospital in Chengdu, Chengdu, Sichuan 610041, China)

Abstract: Objective To discuss the immunosuppressive effect of IL-35 in the pathogenesis of chronic hepatitis B.

Methods Selected 45 cases of chronic hepatitis B stayed in Tibet for a long time in June -2017 June 2016 were selected as the observation group, 45 healthy adults receiving physical examination center over the same period as the control group, respectively, on Th17 cells in peripheral blood of two groups of IL-35, hepatitis B virus nucleic acid (HBV DNA) levels were measured and peripheral blood mononuclear cells IL-35 stimulation, Th17 cells, IL-17 and IL-22 were observed before and after stimulation, the treatment process of HBV epitope peptide induced Th17 cells and the expression level of IL-35. **Results** the IL-35 in the observation group was significantly higher than that of the control group. The HBV DNA and IL-35 expression in the two groups were statistically significant ($P < 0.05$). Peripheral blood Th17 cells specific for two groups of subjects expression was not statistically significant ($P > 0.05$), but the observation group subjects peripheral blood HBV expression was significantly higher than the control group of Th17 cells induced by the peptide, with statistical significance ($P < 0.05$). In the observation group, after stimulation with IL-35, the HBV epitope peptide induced Th17 cells, IL-17 and IL-22 significantly decreased, and the expression of Th17 cells, IL-17 and IL-22 before and after stimulation was statistically significant ($P < 0.05$). The observation group of patients before treatment, 24 weeks of treatment and treatment of HBV epitope peptide expression in Th17 cells induced by 48 weeks was not statistically significant ($P > 0.05$). After treatment, patients in the observation group the level of IL-35 decreased gradually, 24 weeks and 48 weeks of treatment, the expression of IL-35 was statistically significance before treatment ($P < 0.05$). **Conclusion** In the pathogenesis of chronic hepatitis B, IL-35 plays an immunosuppressive role, which can affect the persistent infection of hepatitis B virus and endanger the immune function of patients.

* 基金项目: 西藏自治区人民政府驻成都办事处医院院级科研项目(2016-YJ-8)。

作者简介: 邓昭敏, 女, 技师, 主要从事检验方面研究。 [△] 通信作者, E-mail: li863268@126.com。

本文引用格式: 邓昭敏, 刘琳, 熊颖妮, 等. IL-35 在慢性乙型肝炎发病过程中的免疫抑制作用[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(19): 2376-2378.

Key words: chronic hepatitis B; interleukin-35; immunosuppression

慢性乙型肝炎是国内临床常见的传染性疾病,有报道显示,我国目前乙型肝炎病毒携带者超过 1 亿人,占全国人口的 10%,其中慢性乙型肝炎患者超过 2 000 万^[1]。目前研究认为,发生乙型肝炎病毒感染后机体的免疫功能受损,是造成病毒复制和持续感染的重要机制之一,但其发生具体机制尚未获得明确结论^[2]。白细胞介素-35(IL-35)是近年来发现的新型免疫调控因子,IL-35 可以对人体 T 细胞与 B 细胞的分泌形成影响作用,从而诱导发生免疫性疾病^[3]。目前,已有研究表示慢性乙型肝炎患者存在 IL-35 异常表达,但对于该因子在慢性乙型肝炎患者机体炎性反应与免疫抑制中的作用尚无报道^[4]。本研究分别检测慢性乙型肝炎患者的 Th17 细胞与外周血 IL-35 表达,旨在进一步明确 IL-35 对慢性乙型肝炎发生的免疫抑制作用。现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2016 年 6 月至 2017 年 6 月收治的 45 例长期居住在西藏地区就诊的慢性乙型肝炎患者作为观察组,纳入标准:(1)所有患者均符合 2015 年修订的《慢性乙型肝炎防治指南》中慢性乙型肝炎诊断标准^[5];(2)患者首次诊断,入组前未接受抗病毒治疗和免疫治疗;(3)患者及家属对研究知情同意。排除标准:(1)合并其他类型肝炎病毒感染者;(2)自身免疫性疾病及其他重症感染患者;(3)酒精性肝病及其他类型肝脏疾病者。其中男 24 例,女 21 例,年龄 23~65 岁,平均(33.41±5.85)岁,同期选择体检中心接收的 45 例健康成年人作为对照组,男 25 例,女 20 例,年龄 24~63 岁,平均(32.63±5.67)岁,两组受检者基本资料比较差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性,本研究经医院伦理委员会审批同意。

1.2 仪器与试剂 研究仪器分别为美国 BD FACS-Canto II 流式细胞仪;美国派普泰克生物科技有限公司提供的重组人白细胞介素-17(IL-17)、白细胞介素-22(IL-22)与 IL-35 酶联免疫吸附法试剂盒,美国西格玛有限公司提供的淋巴细胞分离液;乙型肝炎病毒核酸(HBV DNA)定量检测试剂盒。

1.3 方法

1.3.1 Th17 细胞、外周血 IL-35、HBV DNA 水平检测 对照组受检者检验时间为健康体检过程中,观察组受检者检验时间分别为治疗前、治疗 24 周与治疗 48 周,其治疗方案均为口服恩替卡韦,每次 0.5 mg,每天 1 次。采集空腹外周静脉血 8 mL,应用酶联免疫吸附法检测 IL-35,应用流式细胞术测定外周血单个核细胞中 Th17 细胞表达,应用实时荧光定量聚合酶链反应(qPCR)检测 HBV DNA。

1.3.2 IL-35 刺激前后的 Th17 细胞、IL-17、IL-22 表达检测 分别采用密度梯度离心法分离观察组受检者外

周血单个核细胞标本,同时对采集血液标本进行离心处理分离血清标本。提取外周血单个核细胞标本置于 24 孔板内,采用 RPMI-1640 培养基(含 10%胎牛血清)对标本进行培养,随后滴入佛波酯、伊屋诺霉素与莫能霉素持续培养 12 h。开展临床试验时先滴入 1 ng/mL 的 IL-35 培养 6 h 后再行培养。提取受检者血清标本,根据酶联免疫吸附法试剂盒指示说明书分别检验其 IL-17、IL-22 与 IL-35 水平。采用流式检测试管提取培养后外周血单个核细胞,应用磷酸盐缓冲溶液(PBS)洗涤,滴入抗人 CD4-FITC 标记抗体、抗人 CD3-PerCP 表及抗体,4 ℃ 30 min;滴入破膜固定液 A,26 ℃ 15 min;滴入破膜固定液 B、抗人 IL-17,4 ℃ 30 min,再应用流式细胞术测定外周血单个核细胞中 Th17 细胞表达。

1.4 统计学处理 采用 SPSS23.0 统计学软件进行数据处理,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组数据比较应用单因素方差分析,两组数据比较应用 t 检验,计数资料应用 χ^2 检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组受检者的 HBV DNA 与 IL-35 水平比较 观察组受检者 IL-35 水平显著高于对照组,两组受检者的 HBV DNA 与 IL-35 水平比较,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1。

表 1 两组受检者的 HBV DNA 与 IL-35 水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	HBV DNA(log ₁₀ IU/mL)	IL-35(pg/mL)
对照组	45	—	45.97±13.39
观察组	45	6.51±1.48	73.12±15.63
<i>t</i>		—	12.384
<i>P</i>		—	0.000

注:—表示无数据

2.2 两组受检者的 Th17 细胞表达比较 两组受检者的外周血非特异性 Th17 细胞表达比较,差异无统计学意义($P>0.05$),但观察组受检者的外周血 HBV 表位肽诱导 Th17 细胞表达明显高于对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$),见表 2。

表 2 两组受检者的 Th17 细胞表达比较($\bar{x}\pm s, \%$)

组别	<i>n</i>	外周血非特异性 Th17 细胞	外周血 HBV 表位肽诱导 Th17 细胞
对照组	45	1.45±0.39	0.04±0.01
观察组	45	1.65±0.40	1.54±0.43
<i>t</i>		1.143	7.498
<i>P</i>		0.087	0.000

2.3 观察组受检者 IL-35 刺激前后的 Th17 细胞、IL-17、IL-22 水平比较 观察组受检者 IL-35 刺激后 HBV 表位肽诱导 Th17 细胞、IL-17 与 IL-22 水平显著降低,

刺激前后的 Th17 细胞、IL-17 与 IL-22 水平比较差异具有统计学意义($P < 0.05$),见表 3。

表 3 观察组受检者 IL-35 刺激前后 HBV 表位肽诱导 Th17 细胞、IL-17、IL-22 水平比较($\bar{x} \pm s$)

时间	HBV 表位肽诱导 Th17 细胞 (%)	IL-17 (pg/mL)	IL-22 (pg/mL)
刺激前	1.82 ± 0.26	1 082.64 ± 150.72	1 996.72 ± 129.51
刺激后	1.54 ± 0.43	923.45 ± 127.31	1 784.34 ± 137.48
<i>t</i>	4.365	22.472	16.383
<i>P</i>	0.028	0.005	0.000

2.4 观察组患者治疗过程中的 HBV 表位肽诱导 Th17 细胞与 IL-35 水平比较 观察组患者治疗前、治疗 24 周与治疗 48 周的 HBV 表位肽诱导 Th17 细胞水平比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),治疗后观察组患者 IL-35 水平逐渐降低,治疗前、治疗 24 周与治疗 48 周的 IL-35 水平比较,差异具有统计学意义($P < 0.05$),见表 4。

表 4 观察组患者治疗过程中的 HBV 表位肽诱导 Th17 细胞与 IL-35 水平比较($\bar{x} \pm s$)

时间	HBV 表位肽诱导 Th17 细胞 (%)	IL-35 (pg/mL)
治疗前	1.54 ± 0.43	73.12 ± 15.63
治疗 24 周	1.56 ± 0.45	68.37 ± 13.86
治疗 48 周	1.53 ± 0.42	62.17 ± 11.96
<i>F</i>	1.043	25.385
<i>P</i>	0.372	0.018

3 讨 论

目前,关于 HBV 感染和致病的机制仍未完全明确。相关研究表明,宿主的免疫功能变化在 HBV 感染过程中起到重要的作用^[6]。研究发现,HBV 感染机体后,可以激活机体免疫系统,并释放多种细胞因子,导致机体损伤^[7]。其中 IL-35 泛属于 IL-12 细胞因子家族,主要为 IL-12 p35 亚基与 EB 病毒诱导基因 3 表达产物结合的异二聚体蛋白质^[8]。IL-35 功能与同家族细胞因子存在明显不同,具体表现为效应性 T 细胞无分泌而调节性 T 细胞有分泌,而两种 T 细胞共同作用下人体 IL-35 表达最高,进而影响到 T 细胞抑制功能^[9]。近年临床研究指出人体中 IL-35 能够对视黄酸受体形成抑制作用,从而影响到 T 细胞分泌,促进 IL-17 表达而形成炎症因子抑制作用^[10]。另外,也有报道表示人体 Th17 细胞也会受到 IL-35 的影响,抑制其增殖与分化,有利于阻滞机体免疫疾病的发生与发展^[11]。但目前,对于 IL-35 在慢性乙型肝炎发生、发展中的作用仍缺乏相关报道。

本研究分别选取了 45 例健康成人与 45 例慢性乙型肝炎患者,分别对其开展了 IL-35、Th17 细胞等临床检验。结果显示观察组受检者 IL-35 显著高于对照组,

两组受检者的 HBV DNA 与 IL-35 水平比较差异具有统计学意义($P < 0.05$)。表明慢性乙型肝炎患者存在外周血 IL-35 异常高表达,推测 IL-35 可能在慢性乙型肝炎发生、发展中起到重要作用。进一步观察发现,两组受检者的外周血非特异性 Th17 细胞表达比较差异无统计学意义($P > 0.05$),但观察组受检者的外周血 HBV 表位肽诱导 Th17 细胞表达明显高于对照组。Th17 细胞是近年来新发现的一种 T 细胞亚群,其可以分泌 IL-17,在机体防御反应和免疫疾病发生中起到重要作用^[12]。本研究结果表明乙型肝炎患者虽然与健康人非特异性 Th17 细胞表达比较差异无统计学意义($P > 0.05$),但外周血 HBV 表位肽诱导 Th17 细胞表达明显增高。提示 HBV 感染可以通过影响机体免疫细胞水平,诱导 Th17 细胞表达增高,导致机体损伤^[13]。而观察组受检者 IL-35 刺激后 HBV 表位肽诱导 Th17 细胞、IL-17 与 IL-22 显著降低,刺激前后的 Th17 细胞、IL-17 与 IL-22 水平比较差异具有统计学意义($P < 0.05$)。其中 IL-17 与 IL-22 是由 Th17 细胞分泌的细胞因子,可以发挥保护性免疫的作用^[14]。本结果表明体外培养条件下,IL-35 刺激后可以导致 Th17 细胞、IL-17 与 IL-22 显著升高。这可能由于 IL-35 可以通过直接抑制 Th17 细胞,导致 Th17 细胞不能稳定扩增,其功能降低,进而导致其分泌的 IL-17 与 IL-22 水平降低^[15-16]。推测 IL-35 主要发挥免疫抑制作用,在慢性乙型肝炎发病和 HBV 复制中起到重要作用。本研究还对慢性乙型肝炎患者治疗过程中的 HBV 表位肽诱导 Th17 细胞与 IL-35 表达进行了比较,结果观察组患者治疗前、治疗 24 周与治疗 48 周的 HBV 表位肽诱导 Th17 细胞表达比较差异无统计学意义($P > 0.05$),治疗后观察组患者 IL-35 水平逐渐降低,治疗前、治疗 24 周与治疗 48 周的 IL-35 表达比较差异具有统计学意义($P < 0.05$)。这一结果提示经过抗病毒治疗后患者可以促进 T 细胞功能恢复,降低 HBV 表位肽诱导 Th17 细胞表达的抑制,其具体机制有待于进一步研究证实。

4 结 论

在慢性乙型肝炎发病过程中 IL-35 起到了免疫抑制作用,能够影响到乙型肝炎病毒持续感染,并危害患者的机体免疫功能。

参考文献

[1] 邵丽春,邓国伟,金国贤.慢性乙型肝炎外周血单个核细胞与血清中 TOII 样受体及 Th1/Th2/Th17 型细胞因子的表达[J].中国临床医生,2016,34(11):39-42.
 [2] 赵霞,盛慧萍,杨岩,等.慢性乙型肝炎患者外周血 IL-17 细胞因子水平及其临床意义[J].西安交通大学学报(医学版),2017,38(1):83-87.
 [3] JIN Y,LIU D X,LIN X P.IL-35 May maintain homeostasis of the immune microenvironment in periodontitis[J].Exp Ther Med,2017,14(6):5605-5610. (下转第 2382 页)

关,提示在 T2DM 患者治疗过程中,应及时补充 VD 制剂,以利于患者血糖水平的控制,进而有效预防及控制远期慢性并发症的发生发展。

参考文献

- [1] XU Y, WANG L, HE J, et al. Prevalence and control of diabetes in Chinese adults[J]. *JAMA*, 2013, 310(9): 948-959.
- [2] QU G B, WANG L L, TANG X, et al. The association between vitamin D level and diabetic peripheral neuropathy in patients with type 2 diabetes mellitus: an update systematic review and meta-analysis[J]. *J Clin Transl Endocrinol*, 2017, 9(1): 25-31.
- [3] SANKAR J, LOTHAN W, ISMAIL J, et al. Vitamin D deficiency and length of pediatric intensive care unit stay: a prospective observational study[J]. *Ann Intensive Care*, 2016, 6(1): 3.
- [4] CHIUSO-MINICUCCI F, ISHIKAWA L L, MIMURA LA, et al. Treatment with Vitamin D/MOG Association Suppresses Experimental Autoimmune Encephalomyelitis [J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0125836
- [5] FLEET J C, DESMET M, JOHNSON R, et al. Vitamin D and cancer: a review of molecular mechanisms[J]. *Biochemical J*, 2012, 441(1): 61-76.
- [6] 夏维波, 李梅. 维生素 D 缺乏的评价、预防及治疗——内分泌学会临床实践指南[J]. *中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志*, 2011, 4(2): 144-146.
- [7] 刘宁, 叶小珍, 卢斌, 等. 初诊 2 型糖尿病患者血清 25-羟维生素 D 水平与胰岛 α 细胞及 β 细胞功能的相关性[J]. *医学研究生学报*, 2016, 29(1): 57-61.
- [8] 苏丽丽, 何小洁, 潘钦石, 等. 温州地区成年男性血清 25 羟维生素 D 水平及影响因素分析[J]. *中国卫生检验杂志*, 2016, 26(23): 3404-3406.
- [9] 陈晓彤, 甘小玲, 王培, 等. 广州市老年体检人群维生素 D 水平与代谢综合征的相关性[J]. *中国老年学杂志*, 2016, 36(8): 1977-1978.
- [10] HAN Y Y, FORNO E, CELEDON J C. Vitamin D insufficiency and asthma in a US nationwide study[J]. *J Allergy Clin Immunol Pract*, 2017, 5(3): 790-796.
- [11] 冯斯. 2 型糖尿病维生素 D 水平与胰岛素敏感性研究[J]. *实用妇科内分泌杂志*, 2017, 24(4): 20.
- [12] 姜文娟, 张进安, 黎丹凤. 血清 25-羟基维生素 D 和骨钙素水平对 2 型糖尿病患者病程转归的预警价值[J]. *中国临床医学*, 2017, 24(3): 382-386.
- [13] PITTAS A G, LAU J, HU F B, et al. The role of vitamin D and calcium in type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007, 92(6): 2017-2029.
- [14] PETERSON C A, TOSH A K, BELENCHIA A M. Vitamin D insufficiency and insulin resistance in obese adolescents[J]. *Ther Adv Endocrinol Metab*, 2014, 5(6): 166-189.
- [15] 王莹, 刘俊丽, 司少艳, 等. 男性非糖尿病人群维生素 D 与血糖关系研究[J]. *临床军医杂志*, 2016, 44(4): 414-416.
- [16] 包春春, 李冬梅, 斯琴高娃, 等. 2 型糖尿病前期患者血清 25-羟维生素 D 水平变化及相关因素分析[J]. *疑难病杂志*, 2017, 16(8): 792-800.

(收稿日期: 2018-02-06 修回日期: 2018-05-09)

(上接第 2378 页)

- [4] 张静, 李青春. 不同浓度白介素-18 联合树突状细胞对慢性乙型肝炎患者外周血细胞因子及细胞毒性 T 淋巴细胞的影响[J]. *中西医结合肝病杂志*, 2016, 26(3): 166-168.
- [5] TREHANPATI N, VYAS AK. Immune regulation by T regulatory cells in hepatitis B Virus-Related inflammation and cancer[J]. *Scand J Immunol*, 2017, 85(3): 175-181.
- [6] 方宏罡, 董秀鹏. 慢性乙型肝炎白介素 18 及其结合蛋白与乙型肝炎病毒 DNA 载量的相关性[J]. *中国老年学杂志*, 2015, 28(14): 3953-3955.
- [7] CASELLA G, FINARDI A, DESCAMPS H, et al. IL-27, but not IL-35, inhibits neuroinflammation through modulating GM-CSF expression [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 16547.
- [8] 李雪莹, 沈宇清. 髓源抑制性细胞参与慢性乙型肝炎免疫抑制的机制[J]. *中国免疫学杂志*, 2017, 33(1): 152-155.
- [9] 罗新军, 张佩, 吕琳, 等. 肝类颗粒联合聚乙二醇干扰素 α -2a 治疗慢性乙型肝炎的临床研究[J]. *现代药物与临床*, 2017, 32(10): 1904-1907.
- [10] TAVAKOLPOUR S, ALAVIAN S M, SALI S. Manipulation of regulatory cells' responses to treatments for chronic hepatitis B virus infection[J]. *Hepat Mon*, 2016, 16(6): e37927.
- [11] ZHOU Y L, ZHANG H, LI Y M. IL-35 expression in peripheral blood CD4(+) T cells from chronic hepatitis B virus-infected patients directly correlates with virus load [J]. *Cytokine*, 2015, 73(1): 169-175.
- [12] SHI Y Y, DAI M J, WU G P, et al. Levels of interleukin-35 and its relationship with regulatory T-Cells in chronic hepatitis B patients[J]. *Viral Immunol*, 2015, 28(2): 93-100.
- [13] 李志强, 何玉霞, 耿建洪, 等. 聚乙二醇 a 干扰素对慢性乙型肝炎患者血清 IFN- γ , IL-17, IL-10 的影响作用及机制[J]. *世界华人消化杂志*, 2016, 35(1): 116-120.
- [14] LI Y, WANG Y, LIU H, et al. Lower level of IL-35 and its reduced inhibition in Th17 cells in patients with bone marrow mononuclear cells Coombs test-positive hemocytopenia[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(2): 2973-2981.
- [15] 徐强, 王晓忠. 慢性乙型肝炎中白介素-21 的表达及其与中医体质的关系[J]. *新疆中医药*, 2016, 34(1): 93-97.
- [16] WEI X D, ZHANG J H, GU Q C, et al. Reciprocal expression of IL-35 and IL-10 defines two distinct effector Treg subsets that are required for maintenance of immune tolerance[J]. *Cell Rep*, 2017, 21(7): 1853-1869.

(收稿日期: 2018-02-02 修回日期: 2018-05-05)