

慢性 HBV 感染者外周血中 IL-35 表达水平的检测及其意义

石银月 颜学兵 徐娟 孔玮晶 武桂萍 戴明佳 方园 郝俊贵

【摘要】 目的 通过检测慢性乙型肝炎病毒(HBV)感染者外周血中白细胞介素-35(IL-35)水平,探讨 IL-35 在 HBV 持续感染致病机制中的作用。方法 用酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测 27 例慢性乙型肝炎(CSHB)患者,69 例慢性乙型肝炎(CHB)患者,24 例乙型肝炎肝硬化(LC)患者,29 例慢性乙型肝炎病毒携带者(ASC)和 26 例健康者作为正常对照组(NC)的外周血中 IL-35 水平,并对不同组别患者之间的 IL-35 水平进行比较;对 IL-35 水平与 HBV DNA 载量、肝功能指标 ALT、AST、ALB 和 TBil 进行了相关性分析。结果 HBV 感染者中 IL-35 水平高于 NC 组,其中 CSHB 组患者 IL-35 水平($19\,408 \pm 23\,272.6$ pg/ml),显著高于 CHB 组(4478.1 ± 5838.9 pg/ml, $P < 0.05$)、LC 组(3920.9 ± 6520.2 pg/ml, $P < 0.05$)、ASC 组(224.7 ± 123.3 pg/ml, $P < 0.05$)及 NC 组(37.0 ± 48.6 pg/ml, $P < 0.05$);CHB 组 IL-35 水平显著高于 ASC 和 NC 组($P < 0.05$),与 LC 组无显著性差异;ASC 组显著高于 NC 组($P < 0.05$);IL-35 水平与 ALT、AST、TBil 和 PT 水平呈正相关($P < 0.05$),与 ALB 水平呈负相关($P < 0.05$);与 HBV DNA 载量无显著线性相关,HBeAg 阳性与阴性者患者血清中 IL-35 水平比较差异无统计学意义。结论 HBV 感染者外周血中 IL-35 水平增高,提示 IL-35 在 HBV 持续感染的免疫致病机制中起着一定作用,为临床中通过调控 IL-35 水平来治疗 HBV 感染提供了新的思路。

【关键词】 肝炎,乙型,慢性;白细胞介素-35;肝功能

Detection of the expression levels and value of interleukin-35 in blood of patients with HBV infection

SHI Yin-yue, YAN Xue-bing, XU Juan, KONG Wei-jing, WU Gui-ping, DAI Ming-jia, FANG Yuan, Hao Jun-gui. Department of Infectious Diseases, First Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002, China

Corresponding author: YAN Xue-bing, Email: yxbxuzhou@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the value of interleukin-35 (IL-35) in the pathogenesis of hepatitis B virus (HBV) continuous infection by detecting the expression levels of IL-35 in patients with HBV infection. **Methods** The levels of IL-35 in the peripheral blood of 27 cases with chronic severe hepatitis B (CSHB), 69 cases with chronic hepatitis B (CHB), 24 cases with liver cirrhosis (LC), 29 cases with asymptomatic carriers (ASC) and 26 normal controls (NC) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), respectively. The levels of IL-35 in different groups were compared. The correlation between IL-35 and liver function such as ALT, AST, TBil, ALB and HBV DNA was studied. **Results** The levels of IL-35 in patients with HBV infection were significantly higher than those in NC group. The levels of IL-35 in CSHB were significantly higher than those in CHB, LC, ASC and NC groups ($P < 0.05$). The levels of IL-35 in CHB were significantly higher than those in ASC and NC groups ($P < 0.05$), but there was no significant difference between CHB and LC groups. And levels of IL-35 in ASC were significantly higher than those in NC group ($P < 0.05$). The levels of IL-35 were positively correlated with ALT, TBil and PT, but negatively correlated with ALB and not significantly correlated with AST and HBV DNA. There were no significant difference in levels of IL-35 between patients with HBeAg positive and HBeAg negative. **Conclusions** The higher levels of IL-35 in peripheral blood of patients with HBV infection indicates that IL-35 might play an important role in the pathogenesis of HBV continuous infection and could

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2012.03.009

基金项目:2011年江苏省“科教兴卫”医学重点人才培养基金(No. RC2011117);2011年江苏省第四期“333高层次人才培养工程”第三层次培养对象基金

作者单位:221002 徐州市,徐州医学院附属医院感染性疾病科

通讯作者:颜学兵,Email:yxbxuzhou@126.com

provide a new idea for rescuing HBV infection by regulating IL-35.

【Key words】 Chronic hepatitis B; Interleukin-35; Liver function

白细胞介素 35 (IL-35) 是 2007 年由 Collison 和 Workman 等发现并命名^[1], 是为细胞介素 12 (IL-12) 家族中的一个新成员, IL-12 家族还包括 IL-12、IL-27 和 IL-23。IL-35 是由 EB13 和 IL-12p35 两种亚基组成的异源二聚体, 与 IL-27 共用 EB13 亚基, 两者均具有免疫抑制活性, 而不含 EB13 亚基的另外两种细胞因子, 即 IL-12 和 IL-23 则不具有免疫抑制作用。已发现 IL-35 具有扩增调节性 T 细胞 (Treg) 分化, 抑制 Th17 细胞亚群的分化、增殖及其细胞因子的分泌, 防止过度的自身免疫反应等作用^[2]。目前已知 EB13 是 Treg 细胞中 Foxp3 转录因子的下游靶分子, 近期研究显示 IL-35 可能是 Treg 细胞发挥其免疫功能的重要因子。目前国外关于 IL-35 的研究主要集中在其与自身免疫性疾病、炎症和感染的关系, 关于其在肝病尤其是乙型肝炎病毒 (HBV) 感染致病机制中的研究尚少。尚未见关于各种 HBV 感染者血清中 IL-35 水平的报道, 本文对 HBV 感染者中慢性重型乙型肝炎 (CSHB)、慢性乙型肝炎 (CHB)、乙型肝炎肝硬化 (LC) 和慢性 HBV 携带者 (ASC) 血清中 IL-35 表达水平进行分析, 旨在探讨 IL-35 在 HBV 持续感染中的作用。

资料和方法

一、研究对象

入组的 149 例 HBV 感染者均来自 2011 年 5 月至 2011 年 10 月本院住院或门诊患者, 其中男性 76 例, 女性 73 例, 年龄 18 ~ 60 岁, 平均年龄 (37.7 ± 13.3) 岁。正常对照组 (NC 组) 为本院健康体检中心体检者 26 例, 既往身体健康, 无其他基础病, 其中男性 15 例, 女性 11 例, 平均年龄 (38.8 ± 12.9) 岁。149 例 HBV 感染者中 HBeAg 阳性者 64 例, HBeAg 阴性者 53 例。HBV DNA 阳性者 108 例, 阴性者 41 例。CSHB 患者 27 例 (其中 9 例存在继发感染)、CHB 患者 69 例、LC 患者 24 例、ASC 患者 29 例。病毒性肝炎的诊断依据《中国慢性乙型肝炎防治指南》的诊断标准, 排除甲型肝炎、丙型肝炎、戊型肝炎、药物性和酒精性肝病、自身免疫性肝病等, 均未进行干扰素、抗病毒和免疫调节治疗。

二、标本收集

入组患者均无菌操作采静脉血 3 ml, 置于乙二胺四乙酸 (EDTA) 试管中, 室温下以 1000 rpm 离心 20 min, 离心后将上清液移至 EP 管中, 标记后置于 -40℃ 冰箱中冻存, 备用。

三、方法

1. IL-35 浓度的测定: 按照 ELISA 试剂盒 (日本 Cusabio 公司) 说明书操作。标本于常温下解冻并重新离心。设标准孔 (8 个) 和样本孔, 每个孔内分别加入 100 μl 标准品或待测样本, 置于 37℃ 孵育箱孵育 2 h, 弃去液体后甩干, 然后在各孔中加入抗生物素抗体 100 μl, 置于 37℃ 孵育箱孵育 1 h, 洗板 3 次, 甩干, 加 100 μl 辣根过氧化物酶标记亲合素工作液, 孵育 1 h。弃去液体甩干, 洗板 5 次, 每孔加底物溶液 90 μl 于 37℃ 避光孵育 20 min, 结束后加入 50 μl 终止液终止反应, 30 min 内用全自动酶标仪在 450 nm 处检测每孔的吸光度并自动换算为浓度值。

2. 肝功能检查: 采用全自动生化仪完成, HBV 标志物和 HBV DNA 检测分别采用 ELISA 和实时定量聚合酶链反应 (RT-PCR) 技术由本院感染科实验室完成。

四、统计学处理

应用 SPSS 16.0 统计软件对数据进行分析, 数据资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间计量资料比较用 *t* 检验, 相关分析采用 Spearson 相关检验和线性回归。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、HBV 感染者与 NC 组血清中 IL-35 的表达
HBV 感染者血清中 IL-35 浓度显著高于正常对照组 ($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 HBV 感染者与正常对照组血清中 IL-35 表达水平的比较

组别	例数	IL-35 (pg/ml, $\bar{x} \pm s$)
HBV 感染者	149	6265.8 ± 12588.2 ^a
NC 组	26	37.0 ± 48.6

注: 与 NC 组比较, ^a $P < 0.05$

二、不同组 HBV 感染者与 NC 组血清中 IL-35 的表达

CSHB 患者血清中 IL-35 表达水平显著高于 CHB、LC、ASC 和 NC 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); CHB 和 LC 组患者血清中 IL-35 表达水平高于 ASC 和 NC 组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); ASC 患者血清中 IL-35 表达高于 NC 组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); CHB 和 LC 组患者血清中 IL-35 表达水平差异无统计学意义, 见表 2。

三、是否合并继发感染的 CSHB 患者之间及其

与 CHB 组患者血清中 IL-35 的表达

合并继发感染的 CSHB 患者血清中 IL-35 表达高于无继发感染者,而无继发感染 CSHB 患者血清中 IL-35 表达高于 CHB 组,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$),见表 3。

表 2 各组 HBV 感染者与正常对照组血清中 IL-35 表达水平的比较

组别	例数	IL-35 (pg/ml, $\bar{x} \pm s$)
NC 组	26	37.0 \pm 48.6
ASC 组	29	224.7 \pm 123.3 ^c
CHB 组	69	4478.1 \pm 5838.9 ^b
LC 组	24	3920.9 \pm 6520.2 ^b
CSHB 组	27	19 408 \pm 23 272.6 ^a

注:与 CHB、LC、ASC 和 NC 组比较,^a $P < 0.05$;与 ASC 和 NC 组比较,^b $P < 0.05$;与 NC 组比较,^c $P < 0.05$

表 3 是否合并继发感染的 CSHB 患者血清中 IL-35 表达水平的比较

组别	例数	IL-35 (pg/ml, $\bar{x} \pm s$)
CHB 组	69	4478.1 \pm 5838.9
CSHB 组		
无继发感染	18	13655.5 \pm 16187.7 ^b
合并继发感染	9	37540.0 \pm 26019.3 ^a

注:与无继发感染 CSHB 组比较,^a $P < 0.05$;与 CHB 组比较,^b $P < 0.05$

四、肝功能指标 ALT、AST、ALB 和 TBil 与 IL-35 表达水平的关系

将 149 例患者血清中 ALT、AST、ALB 和 TBil 与 IL-35 表达水平进行线性相关分析,结果显示血清 IL-35 水平与 ALT、AST、TBil 和 PT 呈正相关,与 ALB 呈负相关,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$),见图 1。

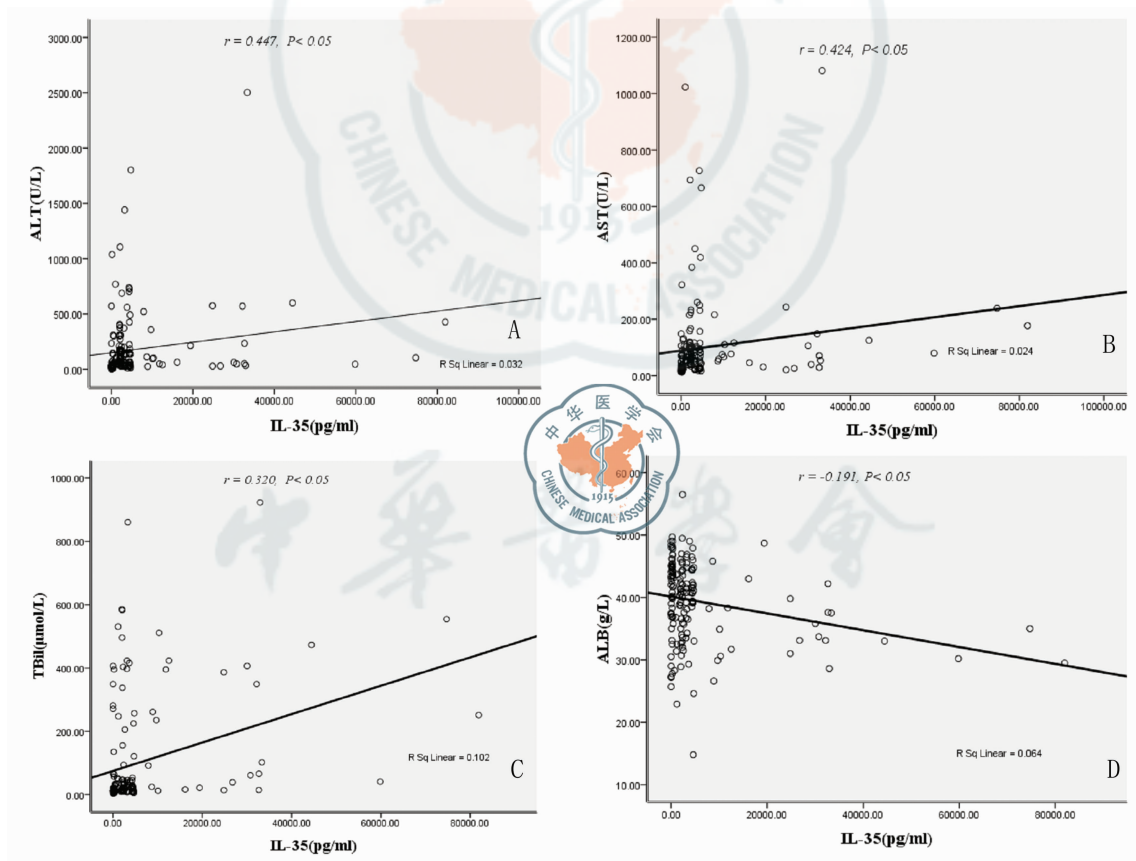


图 1 肝功能 ALT、AST、ALB 和 TBil 与 IL-35 表达水平的线性相关性分析

注:A 图为 ALT 与 IL-35 呈正相关, $r = 0.447, P < 0.05$;B 图为 AST 与 IL-35 呈正相关, $r = 0.424, P < 0.05$;C 图为 TBil 与 IL-35 呈正相关, $r = 0.32, P < 0.05$;D 为 ALB 与 IL-35 呈负相关, $r = 0.191, P < 0.05$

五、凝血功能 PT 与 IL-35 表达水平的关系

将 PT 与 IL-35 表达水平进行线性相关分析,结果显示 PT 与 IL-35 呈正相关($P < 0.05$),见图 2。

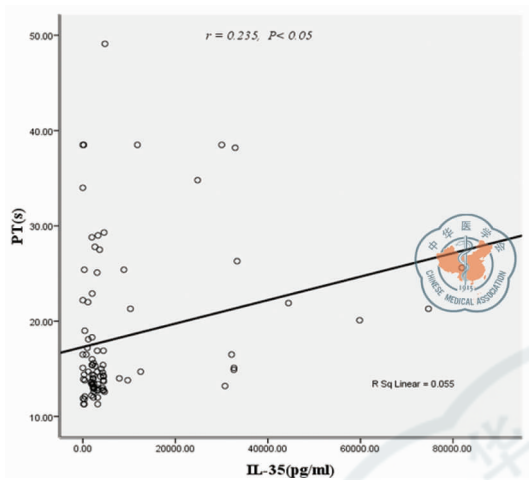


图 2 PT 与 IL-35 表达水平之间的线性相关注:PT 与 IL-35 呈正相关, $r = 0.235, P < 0.05$

六、HBeAg 阳性和阴性患者 IL-35 水平比较及其与 HBV DNA 载量相关性分析

HBV 感染者中 HBeAg 阳性和阴性患者血清中 IL-35 表达水平差异无统计学意义($P > 0.05$), IL-35 表达水平与 HBV DNA 亦无显著相关性,见图 3。

讨 论

Treg 细胞是 CD4⁺ T 细胞中关键亚群之一,在

维持自我耐受,防止自身免疫性疾病,限制慢性炎症性疾病如哮喘、炎症性肠病,调节淋巴细胞的稳态性扩增等方面均发挥着基础作用。但尚未明确 Treg 细胞中发挥抑制性作用的分子,近年研究已证实 IL-35 是由 Treg 细胞特异性分泌的抑制性细胞因子,其发现可能为 Treg 细胞的抑制性作用机制研究提供新的线索。近年 Collison 等^[2] 研究发现,IL-35 预处理的传统 T 细胞具有强效作用,而未处理细胞则不具有此作用,前者可通过滤过膜而非直接细胞接触来抑制应答性 T 细胞的增殖,这一发现支持细胞因子介导的抑制作用,另外,中和抗-IL-35 可阻断其抑制作用,这提示 IL-35 可使传统 T 细胞转化成诱导性调节性 T 细胞(iTR),并通过 IL-35 发挥其抑制作用。IL-35 在感染性疾病中发挥着重要作用,在急性感染期,IL-35 可诱导 Th1 细胞增殖来清除病原体,同时通过抑制 Th17 细胞分化来阻止过度的自身免疫反应,还可扩增 Treg 细胞,在随后的慢性感染阶段发挥抑制效应性 T 细胞作用,以阻止机体的免疫损伤^[3],但 Treg 细胞在慢性乙型肝炎中的抑制作用很可能促进病毒的持续感染^[4]。慢性丙型肝炎和自限性 HCV 感染的研究发现,Treg 细胞和效应细胞共培养体系中加入中和抗-IL-35 物质能有效阻断 Treg 细胞介导的抑制效应^[5]。此发现为临床中解决病毒(如 HCV 和 HBV)持续、慢性感染问题带来了希望。

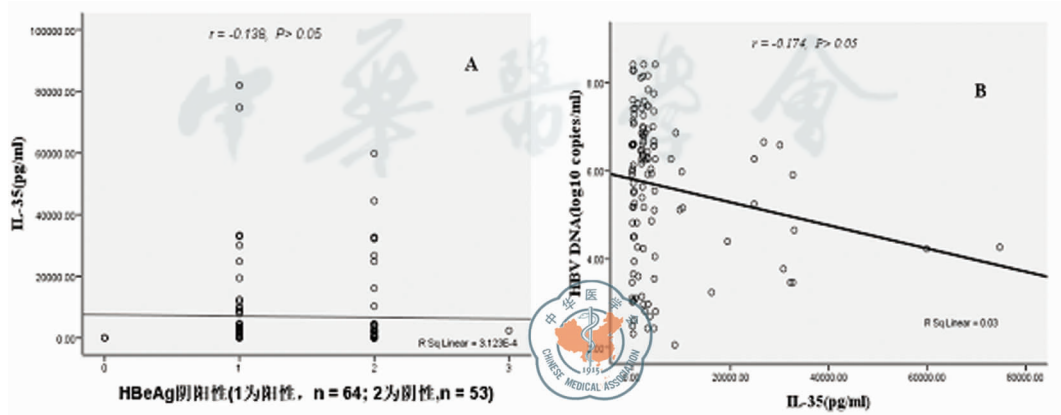


图 3 HBeAg 与 IL-35 表达水平之间的线性相关性分析

注:A: HBeAg 阴阳性与 IL-35 表达无相关性, $r = -0.138, P > 0.05$; B: HBV DNA 与 IL-35 表达无相关性, $r = -0.174, P > 0.05$

本研究对 IL-35 在不同类型 HBV 感染者外周血中水平作了比较分析,结果显示 HBV 感染者血清中 IL-35 水平显著高于 NC 组,且 CSHB 组显著高于 CHB、LC、ASC 和 NC 组,CHB、LC 组高于 ASC 组,ASC 组高于 NC 组。IL-35 的表达水平与 ALT、AST、TBil 和 PT 之间呈正相关,而与 ALB 呈负相关。ALT、AST 是反映肝脏炎症的临床指标之一,TBil 升高则反映肝脏受损严重,导致细胞坏死,PT 延长在排除血液系统疾病的情况下同 ALB 减少均,可间接反映肝脏合成功能降低。HBV 感染者中 IL-35 作为一种抑制性免疫调节因子,可通过免疫调节机制使 HBV 和机体的效应细胞之间维持一种稳态,避免激发过度的免疫损伤而引起肝组织病理损害,当免疫调节紊乱时就会引起 HBV 活动性增强,造成肝组织损伤,反之又可促进产生更多的免疫调节因子来抑制造成的损害,使 CSHB、CHB 和 LC 患者外周血中 IL-35 高于 ASC 组和 NC 组,且与肝脏炎症、坏死、合成功能呈一定程度的相关性。

本研究结果显示,IL-35 水平与 HBV DNA 载量无相关性,提示 IL-35 的免疫调节作用可能与病毒复制情况无直接关系,也可能与及早进行抗病毒治疗相关。HBeAg 阳性与阴性感染者外周血中 IL-35 水平无显著性差异。

CSHB 组患者外周血中 IL-35 水平显著高于 CHB 组和 LC 组,且合并继发感染的 CSHB 组比无继发感染组的 IL-35 表达水平高,说明 IL-35 的表达与继发感染有一定关系。Winsnoki 等^[6]研究发现严重腹腔感染时 Treg 细胞的表达明显升高,继发感染时,一方面,病原体表面抗原能够刺激 Treg 使其表达增强,分泌更多的细胞因子包括 IL-10、TGF- β 和 IL-35^[7];另一方面,病菌代谢产物如内毒素等亦可促进 Treg 活化与增殖^[8],从而促进 IL-35 的分泌。

研究证实 IL-35 作为抑制性细胞因子,与多种自身免疫性疾病如类风湿性关节炎^[1]、实验性结肠炎^[9]、实验性自身免疫性脑炎和实验性自身免疫性心肌炎^[10-11] 等密切相关。黄斯斯等^[12] 研究发现 IL-35 在人扩张型心肌病中也发挥一定的免疫调节作用。有研究证实,IL-12p35 敲除小鼠可降低真菌感染机率^[12],由于 IL-12p35 是 IL-35 的亚基,推测 IL-35 可通过基因敲除来增强抗真菌感染作用,以此来证实其在真菌感染中发挥免疫抑制作用^[13]。以上研究提示 IL-35 在自身免疫性疾病和感染性疾病中具有调节自身免疫的功能,而自身免疫疾病和炎症性疾病都是由免疫系统正常调控过程中出现障碍

石银月,颜学兵,徐娟,等.慢性 HBV 感染者外周血中 IL-35 表达水平的检测及其意义[J/CD].中华实验和临床感染病杂志:电子版,2012,6(3):212-216.

而导致的,抑制或中和 IL-35 可能对维持机体正常免疫调控起到一定的效果,并可有效抑制某些慢性 HBV 感染的持续,为临床治愈乙型肝炎带来的希望。

参 考 文 献

- 1 Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, et al. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature*, 2007, 450: 566-569.
- 2 Collison LW, Abigail VC, Paul LH, et al. IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population. *Nature Immunology*, 2010, 11(12):1093-1101.
- 3 Niedbala W, Wei X, Cai B, et al. IL-35 is a novel cytokine with therapeutic effects against collagen-induced arthritis through the expansion of regulation T cells and suppression of Th17 cells. *European J Immunol*, 2007, 37(11):3021-3029.
- 4 Peng G, L IS, Wu W, et al. Circulating CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells correlate with chronic hepatitis B infection. *Immunology*, 2008, 123(1):57-65.
- 5 Langhans B, Braunschweiger I, Arndt S, et al. Core-specific adaptive regulatory T-cells in different outcomes of hepatitis C. *Clinical Science*, 2010, 119(2):97-109.
- 6 Winsnoki N, Chung CS, Chen Y, et al. The contribution of CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells to immune suppression in sepsis. *Shock*, 2007, 27(3):251-257.
- 7 Cabrera R, Tu Z, Xu Y, et al. An immunomodulatory role for CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells lymphocytes ji hepatitis C virus infection. *Hepatopology*, 2004, 40(5):1062-1071.
- 8 Caramalho I, Lopes Carvalho T, Ostler D, et al. Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide. *Exp Med*, 2003, 197(4):403-411.
- 9 Neurath MF. IL-12 family members in experimental colitis. *Mucosal Immunol*, 2008, 1(Suppl 1):S28-S30.
- 10 Redd YJ, Illes Z, Zhang XM, et al. Myelin proteolipid proteinspecial CD4⁺CD25⁺ regulatory cells mediate genetic resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proceeding of the National Academy of Sciences of USA*, 2004, 101(43):15434-15439.
- 11 Collison LW, Vignali DA. Interleukin-35: odd one out or part of the family? *Immunol Rev*, 2008, 226:248-262.
- 12 黄斯斯,伍伟锋,林松,等.扩张型心肌病患者外周血单个核细胞白细胞介素-35 表达及分泌的初步研究. *临床心血管病杂志*, 2010, 26(2):97-100.
- 13 Conti HR, Shen F, Nayyar N, et al. Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis. *J Exp Med*, 2009, 206(2):299-311.
- 14 Wei XQ, Rogers H, Lewis MA, et al. The role of the IL-12 cytokine family in directing T-cell responses in oral candidosis. *Clin Dev Immunol*, 2011(697340):1-10.

(收稿日期:2011-12-08)

(本文编辑:孙荣华)