

IL-17 在胆道闭锁患儿肝组织中的表达及意义

谭梅军 陶 强 黄金狮

【摘要】 目的 研究胆道闭锁(Biliary Atresia BA)患者肝组织中白介素-17(IL-17)的表达水平及其与肝纤维化程度的关系。探讨其在 BA 发病和肝纤维变中的意义和可能的免疫作用机制。**方法** 选用 40 例 BA 患者肝组织标本和 10 例非肝脏疾病死亡婴儿尸检肝组织标本,采用免疫组织化学法对肝组织进行 IL-17 染色,观察 IL-17 在两组肝组织中的表达。**结果** BA 组肝组织中 IL-17 表达水平平均秩次为 30.28,对照组肝组织中 IL-17 表达水平平均秩次为 6.4,经秩和检验, $U_c = 4.773, P < 0.01$,差异有显著统计学意义;BA 组肝组织中 IL-17 表达水平与肝纤维化程度呈正相关($r = 0.8714, P < 0.01$)。**结论** IL-17 在胆道闭锁发病过程及肝纤维化的发生发展中发挥了一定的作用。

【关键词】 胆道闭锁;肝硬化;免疫组织化学

A study on the intrahepatic expression of IL-17 in the patients with biliary atresia. TAN Mei-jun, TAO Qiang, HUANG Jin-shi. Department of Pediatric Surgery, Children's Hospital of Jiangxi Province, Nanchang 330006, China

【Abstract】 Objective To study the relationship among the expression and cellular localization of interleukin-17(IL-17), the degree of liver inflammation and necrosis, the level of liver fibrosis or cirrhosis in patients of biliary atresia, and to explore the contribution of IL-17 in the immunopathogenesis mechanism of biliary atresia. **Methods** Forty patients with BA as experimental group and ten death babies with other disease as control group were involved in the study. Intrahepatic expression of IL-17 was assayed in immunohistochemical staining using specific monoclonal antibody. Liver histological Pathology was dyed by HE and hepatic fibrosis indexes were determined respectively. **Results** The expression of IL-17 in Patients with BA was significantly stronger than that in the control group ($P < 0.01$); it was correlated with hepatic fibrosis staging ($r = 0.884, P < 0.01$); it was mainly localized in portal area and fibrosis region, involving lymphocyte, fibroblast cells and sinusoid endothelial cells. **Conclusion** The intrahepatic expression of IL-17 is closely correlated with hepatic inflammatory cell infiltration, liver fibrosis level and cirrhosis degree. IL-17 plays an important role in BA and developing of liver fibrosis. It is inferred that by blocking IL-17 expression of the Progression of BA into hepatic fibrosis, cirrhosis can be controlled.

【Key words】 Biliary Atresia; Liver Cirrhosis; Immunohistochemistry

胆道闭锁(Biliary atresia, BA)是婴儿常见病理性黄疸的病因之一,目前胆道闭锁的病因尚不明了,表现为肝内外胆管持续性炎症和迅速进展的肝纤维化,目前多数学者认为是围生期婴儿合并病毒感染所引起的炎症和自身免疫反应所致。新近发现的细胞因子 IL-17 是一种前炎症因子,具有强大的介导炎症功能,有研究发现 IL-17 在多种肝病的发病及抗病毒免疫中均有表达^[1,2]。本研究初步探讨肝组织中 IL-17 的表达与 BA 发病及肝纤维化的关系。

材料与方法

一、标本来源

胆道闭锁组(BA 组):收集本院 2009 ~ 2011 年经腹腔镜手术探查、造影及术后病理检查确诊为 BA 的 40 例患儿临床资料和肝组织活检标本,均术前获得患儿家长知情同意并签字。

对照组:选择 10 例非肝脏疾病死亡婴儿的尸检肝组织活检标本。其中因外伤致死婴儿 4 例,严重先天性心脏病致死婴儿 5 例,气管异物死亡婴儿 1 例,年龄均小于 6 个月。本研究获得医院伦理委员会授权。

二、试剂

采用兔抗人 IL-17 单克隆抗体(武汉博士德生物有限公司);两步法检测试剂盒(PV-9000)、DAB 显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司)。

三、方法

所有肝组织标本均常规经过 4% 甲醛固定、石蜡包埋后,切 4 μm 厚标本片备用。MASSON 染色确定纤维化分级,免疫组织化学二抗-酶标多聚体二步法(SP 法)进行 IL-17 的免疫组织化学染色。肝脏综合病变病理诊断标准参照 2000 年中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会联合修订病毒性肝炎防治方案^[3]。

染色结果判断:显微镜下观察组织和细胞中出现棕黄色或棕褐色颗粒者为 IL-17 染色阳性。依据肝脏组织 IL-17 显色范围来记分:无阳性染色为“-”;见阳性染色组织,范围占总标本范围的 25% 以下,为“+”;26%~50% 为“++”;51%~75% 为“+++”;75% 以上为“++++”^[4]。

四、统计学方法

采用 DPS 统计软件建立数据库,分析方法包括两组独立样本的秩和检验、双等级变量的线性相关趋势分析^[5]、3 组等级变量的回归与相关分析。 $P < 0.01$ 为差异有统计学意义。

结果

一、两组肝组织中 IL-17 的表达情况

BA 组肝组织中 IL-17 表达均呈阳性,主要表达在肝窦区、汇管区及纤维化区,阳性部位与纤维化关系密切(图 1~4)。对照组多数肝组织中未见 IL-17 表达(图 5~6)。

二、两组 IL-17 表达强度的比较

BA 组的平均秩次为 30.28,对照组的平均秩次为 6.4,经秩和检验,BA 组 IL-17 表达水平高于对照组,差异有统计学意义($U_c = 4.773, P = 0.000$),见表 1。

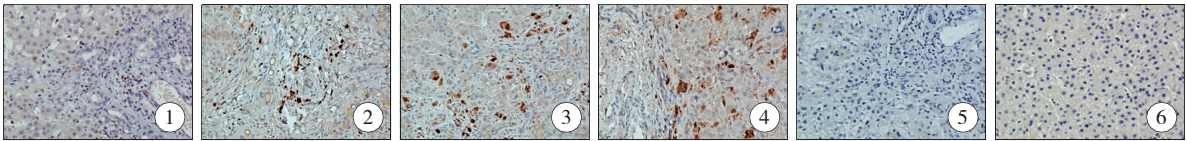


图 1 BA 组 IL17 在汇管区阳性表达(+),肝纤维化 2 级,SP 法,×200; 图 2 BA 组 IL17 在汇管区与肝组织内阳性表达(++),肝纤维化 1 级,SP 法,×200; 图 3 BA 组 IL17 在肝组织内阳性表达(+++),肝纤维化 3 级,SP 法,×200; 图 4 BA 组 IL17 在肝组织内阳性表达(++++),肝纤维化 3 级,SP 法,×200; 图 5 对照组 IL17 在汇管区阴性表达,SP 法,×200; 图 6 IL17 在对照组肝组织内阴性表达(-),SP 法,×200

Fig. 1 The expression of IL-17 was localized in portal area(+); Fig. 2 The expression of IL-17 was localized in portal area and liver(++); Fig. 3 The expression of IL-17 was localized in liver(+++); Fig. 4 The expression of IL-17 was localized in portal area and fibrosis region(++++); Fig. 5 The expression of IL-17 was not existed in the control group; Fig. 6 The expression of IL-17 was not existed in the control group.

表 1 BA 组与对照组 IL-17 表达强度的比较

Table 1 To compare the IL-17 expression intensity in patients with BA and control group

组别	例数	IL-17 表达					平均秩次	Uc	P 值
		-	+	++	+++	++++			
BA 组	40	0	6	14	15	5	30.28	4.773	0.000
对照组	10	7	3	0	0	0	6.4		

三、BA 组肝组织 IL-17 的表达与肝纤维化的关系

BA 组的 IL-17 表达强度(x)与肝纤维化程度(y)使用等级秩次进行双变量线性相关趋势分析,和肝纤维化等级划分一样,IL-17 +、IL-17 ++、IL-17 +++、IL-17 ++++ 分别赋予等级值 1、2、3、4,检验线性趋势的 F 值达 119.85,显著性 $P = 0.0000$ 。进一步算得等级相关系数 0.8714,显示线性相关的 t 值为 10.95, $P = 0.0000$,表明 IL-17 的表达强度与

肝纤维化程度呈高强度线性正相关,详见表 2。

四、婴儿出生日龄、BA 组肝组织 IL-17 的表达与肝纤维化的关系

继续将 BA 组的婴儿出生日龄考虑进来,依次按 40 d 以下、41~60 d、61~80 d、81 d 以上赋予等级值 1、2、3、4,然后和 IL-17 表达强度等级一起分析与肝纤维化程度等级的线性相关关系,3 组变量两两等级相关系数及其显著性如表 3 所示。

表 2 40 例婴儿不同水平 IL-17 组的肝纤维化程度情况

肝纤维化等级	IL-17 +	IL-17 ++	IL-17 +++	IL-17 ++++
肝纤维化 1 级	3	0	0	0
肝纤维化 2 级	3	11	0	0
肝纤维化 3 级	0	3	13	1
肝纤维化 4 级	0	0	2	4
纤维化等级均值 *	1.50 ± 0.55	2.21 ± 0.43	3.13 ± 0.35	3.80 ± 0.45

注 *: 均值后的“±”值基于小样本 *t* 检验而整理

表 3 婴儿日龄、IL-17 表达强度与肝纤维化等级相关分析
Table 3 The relationship among the postnatal age, the expression of interleukin-17 (IL-17), the level of liver fibrosis or cirrhosis in patients of biliary atresia

三组变量分析项目	日龄与 IL-17	日龄与肝纤维化	IL-17 与肝纤维化
两两等级相关系数 r_s	0.340 7	0.416 5	0.871 4
显著性 P	0.031 5	0.007 5	0.000 0
两两相关程度描述	弱线性相关	较强线性相关	高强度线性相关

按 $P < 0.01$ 的差异显著性标准,有必要将婴儿出生日龄(x_1)和 IL-17 表达强度(x_2)一起分析与肝纤维化程度(y)的相关性。仍使用等级秩次进行 3 组变量线性回归与相关趋势分析,检验总的线性回归趋势的 F 值达 63.89,显著性 $P = 0.000\ 0$ 。进一步算得肝纤维化程度依出生日龄的线性回归系数 0.109 9,显示线性相关的 t 值为 1.63,显著性 $P = 0.110\ 8$,与表 3 中两者等级相关系数显示的显著性不完全一致;与此同时,肝纤维化程度依 IL-17 表达强度的线性回归系数 0.759 7,显示线性相关的 t 值为 9.96,显著性 $P = 0.000\ 0$,和表 2、表 3 的相关显著性都完全一致。

由此可见,使用线性趋势分析挖掘出了比表 3 等级相关分析更为详尽的信息,表明婴儿出生日龄会对表 2 所示的高强度线性相关起到推波助澜的作用,但未显示其对肝纤维化程度产生直接作用,只是通过影响 IL-17 的表达强度对肝纤维化程度产生间接作用,也就是根据本研究 BA 组的 40 个病例作出推断,婴儿出生日龄等级越高,越容易显示表 2 所示的高强度正相关。

讨 论

BA 是婴儿病理性黄疸的常见病因之一,多数在出生后 7 d 出现解白色陶土样大便以及进行性加重的黄疸等症状。因其容易与生理性黄疸期重叠,

早期不易诊断。最终结果就是胆管细胞、肝细胞损伤、胶原沉着和肝纤维化,预后极差。既往有研究发现 BA 与病毒感染存在一定的相关性:围产期病毒感染所引起的机体炎症和自身免疫反应,可导致肝内外胆管和肝细胞持续性损伤,最终导致 BA 和肝纤维化形成。临床医生发现在 Kasai 术后使用免疫抑制剂,如大剂量激素冲击治疗可明显减轻 BA 患者术后黄疸程度^[6-7]。这些提示在 BA 的发病中有机体炎症反应及自身免疫反应参与,但确切机制仍不清楚。

IL-17 是一群可溶性细胞因子的统称,相对分子质量约为 20 ~ 30 kD 的同源二聚体糖蛋白,它含有 155 个氨基酸,编码的基因位于人染色体的 6q12。它包括 6 种细胞因子,分别为 IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E, IL-17F^[8]。目前发现主要由 Th-17 细胞产生^[9]。IL-17 作为一种前炎症细胞因子,具有强大的致炎性,被认为是 T 细胞诱导的炎症反应早期启动因素^[10-11]。近年来,人们发现 IL-17 参与了多种肝脏炎症疾病的发病, Amaud Lemmers 等^[2]证实 IL-17 在酒精性肝炎的进展中起关键作用,唐永明等^[12]证实各种慢性肝病的发病过程中血清 IL-17 水平均有明显升高,且与患者肝纤维化程度及 HA、LN、IVC 水平相关,杨江华等^[13]发现细胞因子 IL-17 参与了丙型肝炎的发病过程,且与肝脏炎症活动、肝损害密切相关。但目前国内外尚未见有 IL-17 与 BA 发病有关的临床研究报道。

本实验发现 BA 组肝组织中 IL-17 呈均呈阳性表达,而对照组肝组织中 IL-17 无明显表达,其差异有统计学意义。有作者认为其可能的炎症机制如下:当围生期婴儿合并的病毒经细胞膜进入胆道上皮并将其损伤后,树突状细胞的 Toll 样受体和感染的病毒受体结合后 DC 细胞可大量分泌促炎症因子 IL-6, IL-6 可与 TGF-β 共同促进 Th-17 细胞的分化, Th-17 细胞释放的 IL-17 与 IL-17R 结合后活化

发挥生物学作用,它可以诱导粒细胞集落刺激因子(Granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF)和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF)产生,刺激骨髓细胞增生,募集、活化中性粒细胞并抑制其凋亡,并对 T 细胞的活化起协同刺激作用^[14-16]。IL-17 还能通过趋化因子 IL-8、单核细胞趋化蛋白 1(Monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)和生长相关蛋白 α (Growth-related protein- α , Gro- α)介导中性粒细胞及单核细胞趋化到炎症部位,能诱导人成纤维细胞表达 ICAM-1,从而介导炎症^[17]。IL-17 还放大炎症反应,刺激靶细胞产生 IL-1、IL-2、IL-6、IL-8、一氧化氮合成酶-2(NOS-2)和前列腺素 E2 等增强炎症反应^[18]。推测 IL-17 在 BA 的发病过程中通过多种途径促进了肝脏持续的慢性炎症,导致胆道狭窄及闭锁的发生。

本实验发现 BA 组 IL-17 阳性表达主要位于肝窦区、汇管区及纤维化区、间质,阳性部位与纤维化关系密切。已有大量实验发现 IL-17 与肝纤维化密切相关:Lant R Y. 等^[19]在胆汁性肝硬化患者肝组织中发现肝门部有 Th-17 细胞数量增多和 IL-17⁺细胞增多;秦来英^[4]发现在 HBV 感染患者肝组织内 IL-17 明显增高,且随肝纤维化程度的增高而表达增强。而 2011 年孟繁立等在动物实验中发现,在小鼠中 IL-17 促进肝纤维化的机制主要有两方面,一方面 IL-17 可以直接激活肝星形细胞(Hepatic stellate cell, HSC),从而导致肝内 HSC 细胞活化释放细胞外基质(Extracellular matrix, ECM),抑制 ECM 的分解,导致 ECM 的合成与分解平衡被破坏。此外 IL-17 通过激活肝 Kupffer 细胞释放的炎症细胞因子 IL-6, IL-1, TGF- β , 与肝纤维化密切相关。TGF- β 是促进肝纤维化的最关键细胞因子, TGF- β 可促进 ECM 合成,抑制其分解,还可促进静息的 HSC 向肌成纤维细胞(Myofibroblasts, MFB)转化,进一步促进 MFB 的有丝分裂,造成 ECM 进一步增多;可以推断 IL-17 在 BA 患者肝纤维化的进展中可能起到了一定的作用,但具体作用机制有待进一步研究。

本研究结果显示,BA 患儿肝组织中 IL-17 表达强度高于对照组,且其表达强度与肝纤维化程度有相关性,提示 IL-17 在 BA 发病过程及肝纤维化的发生发展中发挥了一定的作用。

参考文献

1 Diego Vergani, Giorgia Mieli-Vergani. Aetiopathogenesis of

- autoimmune hepatitis [J]. World J Gastroenter, 2008, 14 (21):3306-3312.
- 2 Arnaud Lemmers, Christophe Moreno, Thierry Gustot, et al. The Interleukin-17 Pathway is Involved in Human Alcoholic Liver Disease [J]. HEPATOLOGY, 2009, 49 (2):646-657.
- 3 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学会联合修订. 病毒性肝炎防治方案 [J]. 中华内科杂志, 2001, 40 (1):62-68.
- 4 秦来英, 陈士俊. 慢性乙型肝炎病毒感染者肝内 IL-17 的表达及意义 [D]. 济南: 山东大学医学院, 2008.
- 5 唐启义, 冯明光. DPS 数据处理系统: 实验设计、统计分析及数据挖掘 [M]. 北京: 科学出版社, 2007:
- 6 Ohya T, Fujimoto T, Shimomura H, et al. Degeneration of intra-hepatic bile duct with lymphocyte infiltration into biliary epithelial cells in biliary atresia [J]. Pediatr Surg, 1995, 30: 515-518.
- 7 Kobayashi H, Puri P, O'Briain SO, et al. Hepatic over-expression of MHC class II antigens and macrophage-associated antigens (CD68) in patients with biliary atresia of poor prognosis [J]. J Pediatr Surg, 1997, 32:590-593.
- 8 Kobayashi T, Okamoto S, Hisamatsu T, et al. IL23 differentially regulates the Th1/Th17 balance in ulcerative colitis and Crohn's disease [J]. Gut, 2008, 57 (12):1682-1689.
- 9 Ousman SS, Tomooka BH, van Noort JM, et al. Phenotypic and functional features of human Th17 cells [J]. J Exp Med, 2007, 204 (8):1849-1861.
- 10 Katz Y, Nadiv O, Rapoport MJ, et al. IL-17 regulates gene expression and protein synthesis of the complement system C3 and factor B, in skin fibroblasts [J]. Clin Exp Immunol, 2000, 120:22-29.
- 11 Chisholm DM, Mason DK. Labial salivary gland biopsy in Sjogren's disease [J]. Clin Path, 1968, 21:656-660.
- 12 唐永明, 梁立敏, 余建华, 等. 检测 IL-17 和 IL-18 水平在纤维增生性疾病中的意义 [J]. 检验医学与临床, 2007, 4 (2):88-90.
- 13 杨江华, 侯为顺, 杨利才, 等. 聚乙二醇 Q 干扰素对慢性丙型肝炎患者血清 IL-17/IL-10 与 TGF-13 的影响及意义 [J]. 临床消化杂志, 2010, 22 (3):138-140.
- 14 Kryczek I, Banerjee M, Cheng P, et al. Phenotype, distribution, generation and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments [J]. Blood, 2009, 114 (6):1141-1149.
- 15 Guang Wei Liu, Yong Zhao. Toll-like receptors and immune regulation: their direct and indirect modulation on regulatory CD4⁺ CD25⁺ T cells [J]. Immunology, 2007, 122: 149 - 156.
- 16 Korn T, Oukka M, Kuchroo V, et al. Th17 cells: effect on T cells with inflammatory properties [J]. (下转第 308 页)