

IL-8 在 HBV 相关慢加急性肝衰竭中的临床意义

穆玄玄 管世鹤 杨凯 张浩 侯杰

摘要 目的 探讨白细胞介素(IL)-8在乙型肝炎相关慢加急性肝功能衰竭(HBV-ACLF)中的临床价值。方法 对62例HBV-ACLF患者和57例HBV患者采用免疫组化技术分析肝组织IL-8水平与分布情况,利用ELISA技术测定血清IL-8水平。对其HBV-DNA和血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、总胆红素和肌酐等肝功能指标水平亦进行同步测定。结果 HBV-ACLF患者肝组织及血清中IL-8含量均明显高于HBV患者及健康对照者;且经Pearson相关性分析,HBV > 500 IU/ml时血清IL-8与HBV-DNA水平呈正相关性($r = 0.416, P < 0.05$)。与HBV患者和健康对照者相比,HBV-ACLF患者血清中ALT、AST、ALP、总胆红素和肌酐含量均有明显增加。血清IL-8与肝损害程度(ALT、AST水平)亦呈显著正相关性($r = 0.247, 0.317, P < 0.05$)。结论 HBV-ACLF患者肝组织及外周血IL-8水平显著升高,且血清IL-8水平与患者肝脏炎症损伤和病情严重程度有关。

关键词 白细胞介素-8;乙型肝炎病毒;慢加急性肝功能衰竭;病毒载量

中图分类号 R 575.3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)04-0562-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.04.022

慢加急性肝衰竭(acute-on-chronic liver failure, ACLF)是指在已知或尚未发现的慢性肝病的基础上,患者以出现黄疸和(或)凝血功能障碍为最初临床表现的急性肝功能失代偿,临床特征为起病急、进展迅速,且近中期病死率高达50%以上^[1]。在我国,乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)的感染或重新激活位居ACLF病因之首,约占我国肝衰竭患者总数80%^[2]。HBV相关慢加急性肝衰竭的发病机制复杂,其中细胞因子起到了重要作用^[3-4]。既

往研究^[5-6]显示,各类型HBV患者血清白细胞介素(interleukin, IL)-8含量均有不同程度的升高,但IL-8在HBV-ACLF病程发展中的作用目前尚不清楚。为此,该研究通过分析HBV-ACLF患者血清和肝组织IL-8表达水平,并研究HBV-ACLF患者血清IL-8含量与HBV病毒载量及肝功能指标关系,拟初步探讨HBV-ACLF疾病发生的免疫机制。

1 材料与方法

1.1 病例资料 选取2011年4月~2014年6月在安徽医科大学第二附属医院治疗的HBV-ACLF患者62例,HBV患者57例,健康者54例。HBV诊断标准符合慢性HBV防治指南(2010年版),肝功能衰竭诊断标准符合2006年肝功能衰竭诊疗指南,排除甲型、丙型或戊型肝炎病毒,以及EB病毒、CMV及HIV感染等重叠感染,酒精、非酒精性脂肪性肝病及自身免疫性肝病等。

1.2 肝指标检测 丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate transaminase, AST)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、总胆红素、肌酐及HBV DNA检测均在安徽医科大学第二附属医院检验科检测分析。

1.3 检测方法及主要仪器、试剂 ELISA法测定IL-8水平,ELISA试剂盒购自美国R&D systems公司,以酶标仪ST-360型(上海科华公司)读取吸光度值,实验操作严格按照试剂盒说明书的要求进行。

1.4 免疫组化法检测IL-8的表达 各组肝组织取材后经过固定,石蜡包埋,4 μm度连续切片,经免疫组化染色,在高倍显微镜下观察免疫复合物出现部位及免疫反应强度,当细胞膜、胞质、胞核出现棕黄色颗粒物质时认为阳性结果,否则为阴性结果。

1.5 统计学处理 应用SPSS 19.0软件进行分析。计量资料经正态性检验,呈正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组均数比较行t检验,多组均数比较行方差分析。变量间相互关系行Spearson直线相关分析。

2 结果

2.1 研究对象基本情况 本研究纳入HBV-ACLF

2017-01-10 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81171662);安徽省卫生计生委科研计划项目(全科医学临床科研课题)(编号:2016QK014);安徽省高校省级自然科学基金重点项目(编号:KJ2016A351)

作者单位:安徽医科大学第二附属医院检验科,合肥 230601

作者简介:穆玄玄,女,硕士研究生;

管世鹤,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail: shiheguan@126.com

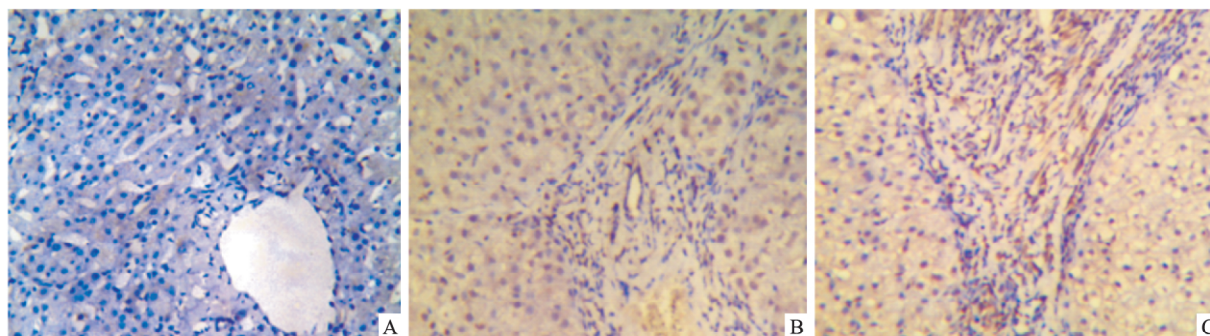


图1 免疫组化技术分析肝组织 IL-8 表达水平 $\times 200$
A: 健康对照者; B: 慢性 HBV 患者; C: HBV-ACLF 患者

患者 62 例, HBV 患者 57 例和健康对照者 54 例。ACLF 患者、HBV 患者及健康对照者的基本情况见表 1。

表 1 组间临床和实验室检查数据比较($\bar{x} \pm s$)

项目	健康对照者	HBV 患者	HBV-ACLF 患者	F 值
性别(男/女 <i>n</i>)	39/15	41/16	48/14	0.35
年龄(岁)	43.52 \pm 11.73	45.13 \pm 12.38	46.94 \pm 11.27	0.98
ALT(U/L)	18.02 \pm 8.05	140.26 \pm 218.84	569.44 \pm 741.57	5.24
AST(U/L)	19.22 \pm 5.05	78.11 \pm 134.04	563.16 \pm 765.91	6.31
ALP(U/L)	80.22 \pm 41.59	83.59 \pm 37.46	137.34 \pm 77.80	3.75
总胆红素(μ mol/L)	11.29 \pm 3.00	42.96 \pm 82.75	337.41 \pm 140.09	5.11
肌酐(mmol/L)	64.62 \pm 12.45	66.90 \pm 27.46	90.15 \pm 34.26	2.22

2.2 HBV-ACLF 患者肝组织中 IL-8 表达 以免疫组化技术分析健康对照者、慢性 HBV 患者及 HBV-ACLF 患者肝组织中 IL-8 表达水平与分布情况。结果显示,健康对照者的正常肝组织几乎不表达 IL-8,而在慢性 HBV 患者及 HBV-ACLF 患者肝组织 IL-8 表达水平明显上升,且 HBV-ACLF 患者肝组织 IL-8 表达相对较强,见图 1。此外,HBV-ACLF 患者肝组织汇管区炎症细胞周边 IL-8 呈现强表达,表明肝组织中趋化因子 IL-8 通过募集相应的炎症细胞向肝脏感染局部聚集,导致肝脏免疫损伤。

2.3 HBV-ACLF 患者血清 IL-8 含量 采用 ELISA 技术分别分析 HBV-ACLF 患者、慢性 HBV 患者及健康对照者血清 IL-8 含量。IL-8 在 HBV-ACLF 患者、慢性 HBV 患者和健康对照者血清中含量分别为(324.24 \pm 28.72)、(225.81 \pm 37.56)和(148.04 \pm 36.46) pg/ml, HBV-ACLF 患者血清 IL-8 含量明显高于慢性 HBV 患者及健康对照者,差异有统计学意义($F = 4.67$ $P < 0.05$),见图 2。

2.4 HBV-ACLF 患者血清 IL-8 含量与 HBV 病毒载量关系 62 例 HBV-ACLF 患者 HBV > 500 IU/ml

为 47 例, HBV < 500 IU/ml 为 15 例。HBV > 500 IU/ml 的 HBV-ACLF 患者血清 IL-8 含量为(350.58 \pm 15.72) pg/ml, HBV < 500 IU/ml 的 HBV-ACLF 患者血清 IL-8 含量为(302.29 \pm 14.72) pg/ml, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。其中, HBV > 500 IU/ml 的 HBV-ACLF 患者血清 IL-8 含量与 HBV-DNA 呈显著正相关性($r = 0.416$ $P < 0.05$)。见图 3。

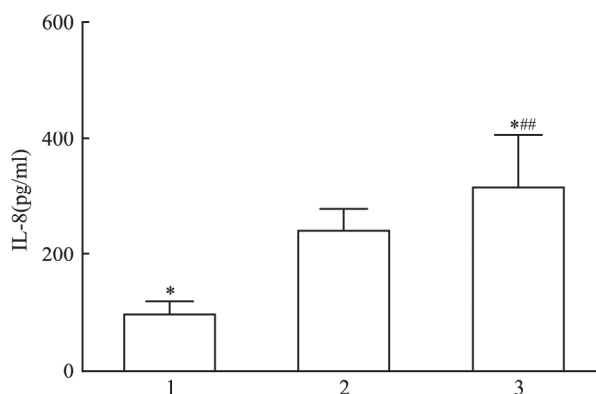


图 2 健康对照者、慢性 HBV 患者及 HBV-ACLF 患者血清中 IL-8 含量
1: 健康对照者; 2: 慢性 HBV 患者; 3: HBV-ACLF 患者; 与健康对照者比较: $## P < 0.001$; 与慢性 HBV 患者比较: $* P < 0.05$

2.5 HBV-ACLF 患者血清 IL-8 含量与肝功能参数关系 与 HBV 患者及健康对照者相比较, HBV-ACLF 患者的 ALT、AST 等临床指标显著增高, 并且 HBV-ACLF 患者血清 IL-8 与 ALT、AST 呈显著正相关性($r = 0.247, 0.317$ $P < 0.05$)。见图 4。

3 讨论

HBV-ACLF 发病机制十分复杂, HBV 是导致肝炎活动与最终肝功能失代偿的始动因素, 可能与 HBV 病毒载量、病毒变异、重叠 HAV 或 HEV 等其他病毒感染有关。既往研究^[7]提出了 HBV-ACLF

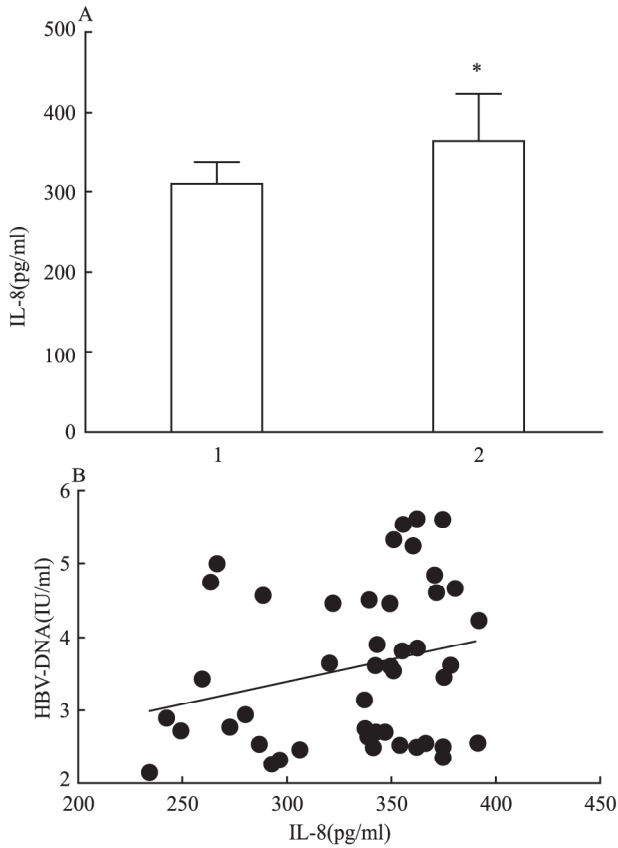


图3 HBV-ACLF 患者血清 IL-8 含量与 HBV-DNA 关系

A: 不同 HBV 载量的 HBV-ACLF 患者血清中 IL-8 含量; B: HBV > 500 IU/ml 的 HBV-ACLF 患者血清 IL-8 含量与 HBV-DNA 相关性分析; 1: HBV-DNA < 500 IU/ml; 2: HBV-DNA > 500 IU/ml; 与 HBV-DNA < 500 IU/ml 的 HBV-ACLF 患者比较: * P < 0.05

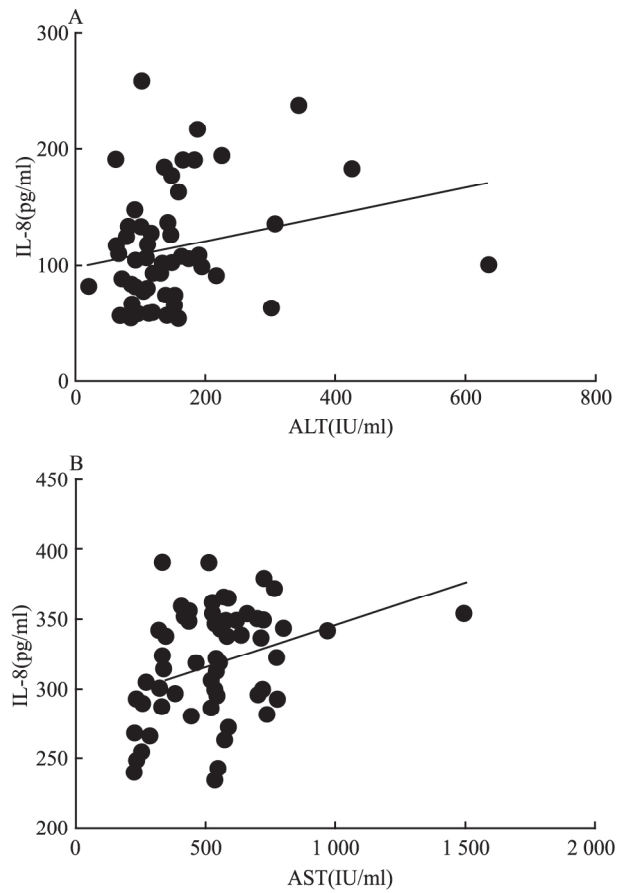


图4 HBV-ACLF 患者血清 IL-8 含量与 ALT、AST 关系

A: HBV-ACLF 患者血清 IL-8 含量与 ALT 相关性分析; B: HBV-ACLF 患者血清 IL-8 含量与 AST 相关性分析

发生机制中的“三重打击”学说,即肝衰竭发生过程中肝组织依次遭遇了免疫损伤、缺血低氧性损伤和内毒素血症的三重打击,其中免疫损伤过程至关重要。细胞因子贯穿于整个免疫损伤和炎症反应过程之中。而另一种肝衰竭的二次损伤学说^[8]也强调了细胞因子的重要性,该学说认为,机体感染 HBV 后产生了特异性细胞毒性 T 淋巴细胞,造成了肝细胞的大量溶解和凋亡,造成原发性肝损伤。原发性肝损伤可引起肠源性内毒素血症,激活肝脏 Kupffer 细胞释放各种细胞因子,进而启动一系列级联反应,产生了大量的细胞因子。这些细胞因子介导肝脏损伤,同时继续向肝脏募集大量非特异性炎症细胞,造成了肝脏更为严重的二次损伤,乃至肝衰竭^[9]。

IL-8 能够招募炎症细胞聚集,参与肝组织免疫清除与损伤过程。慢性肝病患者肝组织中的 IL-8 可通过其受体 CXCR1 募集单核巨噬细胞至肝脏炎症部位,参与肝脏炎症损伤并进一步导致肝脏纤维化的发生^[10]。另有研究^[11]报道,丙型肝炎病毒的

NS5A 蛋白能够上调肝细胞 IL-8 的表达进而参与丙型肝炎慢性化进程。除此之外,在急性肝损伤和急性 HBV 患者体内也显示 IL-8 表达呈高水平,表明 IL-8 可能参与了肝脏疾病的急性发作过程。

本研究显示,HBV-ACLF 患者血清 IL-8 含量明显高于慢性 HBV 患者及健康对照者,提示随着慢性 HBV 病程进展,患者血清 IL-8 含量逐步升高。通过比较不同病毒载量 HBV-ACLF 患者血清 IL-8 含量,本研究显示 HBV > 500 IU/ml 的 HBV-ACLF 患者血清 IL-8 含量高于 HBV < 500 IU/ml 的 HBV-ACLF 患者,表明 HBV 持续复制可能有助于提高 HBV-ACLF 患者血清 IL-8 含量。HBV > 500 IU/ml 的 HBV-ACLF 患者血清 IL-8 与 HBV-DNA 具有显著的正相关性,进一步表明血清 HBV 复制与血清 IL-8 可能存在正反馈关系。血清 ALT 和 AST 含量升高反映肝脏炎症损伤程度,是临床常用监测肝功能的生化指标。本研究通过相关性分析显示,HBV-ACLF 患者血清 IL-8 含量均与 ALT 和 AST 呈显著正相关性,

即 HBV-ACLF 患者血清 IL-8 含量 ALT 和 AST 升高而逐步增高,进一步揭示 IL-8 与 HBV-ACLF 患者肝脏的免疫损伤和病情严重程度密切相关。

综上所述,本研究揭示 HBV-ACLF 患者血清 IL-8 含量与 HBV-DNA 及肝功能相互关系,提示 IL-8 可能在 HBV-ACLF 发生过程发挥重要作用,为今后临床治疗 HBV-ACLF 提供重要理论依据。

参考文献

- [1] Gustot T, Fernandez J, Garcia E, et al. Clinical Course of acute-on-chronic liver failure syndrome and effects on prognosis [J]. *Hepatology* 2015, 62(1): 243-52.
- [2] 李小鹏, 张伦理. 慢加急性肝衰竭研究新进展 [J]. *内科急危重症杂志* 2014, 20(3): 157-8.
- [3] Malik R, Mookerjee R P, Jalan R. Infection and inflammation in liver failure: two sides of the same coin [J]. *J Hepatol* 2009, 51(3): 426-9.
- [4] Dirchwolf M, Podhorzer A, Marino M, et al. Immune dysfunction in cirrhosis: distinct cytokines phenotypes according to cirrhosis severity [J]. *Cytokine* 2016, 77: 14-25.
- [5] Yang K, Guan S H, Zhang H, et al. Enhanced levels of interleukin-8 are associated with hepatitis B virus infection and resistance to interferon-alpha therapy [J]. *Int J Mol Sci* 2014, 15(11): 21286-98.
- [6] Sirota J C, Walcher A, Faubel S, et al. Urine IL-18, NGAL, IL-8 and serum IL-8 are biomarkers of acute kidney injury following liver transplantation [J]. *BMC Nephrol* 2013, 14: 17.
- [7] 叶一农, 高志良. 乙型肝炎肝衰竭发生机制中的三重打击 [J]. *传染病信息* 2009, 17(5): 638-40.
- [8] 董妹, 刘平, 孙明瑜. 非酒精性脂肪肝病发病机制—“二次打击”学说研究进展 [J]. *临床肝胆病杂志* 2012, 28(7): 551-5.
- [9] Carazo A, León J, Casado J, et al. Hepatic expression of adiponectin receptors increases with non-alcoholic fatty liver disease progression in morbid obesity in correlation with glutathione peroxidase 1 [J]. *Obes Surg* 2011, 21(4): 492-500.
- [10] Zimmermann H W, Tacke F. Modification of chemokine pathways and immune cell infiltration as a novel therapeutic approach in liver inflammation and fibrosis [J]. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 2011, 10(6): 509-36.
- [11] Chen W C, Tseng C K, Chen Y H, et al. HCV NS5A Up-regulates COX-2 expression via IL-8-mediated activation of the ERK/JNK MAPK pathway [J]. *PLoS One* 2015, 10(7): e0133264.

Clinical significance in detection of serum levels of IL-8 in patients with HBV-ACLF

Mu Xuanxuan, Guan Shihe, Yang Kai, et al

(Dept of Clinical Laboratory, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University Hefei 230601)

Abstract Objective To investigate the clinical significance of serum levels of IL-8 in patients with HBV-ACLF. **Methods** The level of interleukin-8 (IL-8) in liver tissue were analysed by immunohistochemistry in totally 62 HBV-ACLF patients and 57 patients with chronic hepatitis B (CHB). ELISA was used to detect the serum level of IL-8. Meanwhile, HBV DNA and several liver function indexes such as alanine aminotransferase (ALT), aspartate transaminase (AST), alkaline phosphatase (ALP), total bilirubin (TBIL) and creatinine (Cr) were examined. **Results** IL-8 levels in serum and liver tissues of HBV-ACLF patients were both significantly higher than those in HBV group and healthy control group ($P < 0.05$). Through the Pearson correlation analysis, serum IL-8 quantification was positively correlated with HBV-DNA load when $HBV > 500$ IU/ml ($r = 0.416, P < 0.05$). Compared with HBV patients and healthy controls, liver function indicators such as ALT, AST, ALP, TBIL and Cr were obviously increased in HBV-ACLF patients. In addition, serum IL-8 quantifications were positively correlated with ALT and AST ($r = 0.247, 0.317, P < 0.05$). **Conclusion** IL-8 level in serum and liver tissue of HBV-ACLF patients increase significantly, and the serum IL-8 level is related to the degree of liver inflammation injury and the severity of HBV-ACLF.

Key words interleukin-8; HBV; ACLF; viral load