

非酒精性脂肪性肝病患者外周血 TH17/Treg 细胞的变化及意义

孙 亮, 李 博, 邱厚匡, 李明友, 林茂锐, 曹东林, 雷 达

(广东省第二人民医院 检验医学部, 广东 广州 510310)

摘要:[目的]探辅助性 T 淋巴细胞 17(TH17)/调节性 T 淋巴细胞(Treg)动态平衡在非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)中的作用,为其防治提供新途径和依据。[方法]选择 2017 年 2 月~2018 年 12 月我院诊疗的 NAFLD 患者 92 例,另取我院体检中心健康体检者 40 例作为对照。根据 CT 影像学肝脂肪变分度标准,将 NAFLD 患者分为轻度、中度和重度肝脂肪变。流式细胞仪检测外周血 TH17 和 Treg 细胞比例。ELISA 法检测白细胞介素(IL)-17 和 IL-10 因子表达。[结果]NAFLD 组 TH17 细胞比例为 $(14.26 \pm 2.18)\%$,显著高于对照组的 $(7.12 \pm 1.26)\%$ $(P < 0.01)$,NAFLD 组 Treg 细胞比例为 $(5.13 \pm 0.82)\%$,显著低于对照组的 $(6.35 \pm 1.04)\%$ $(P < 0.05)$,NAFLD 组 TH17/Treg 细胞比值为 2.78 ± 0.46 ,显著高于对照组的 1.12 ± 0.15 $(P < 0.01)$ 。NAFLD 组 IL-17 因子表达水平为 $(22.74 \pm 4.62)\mu\text{g/L}$,显著高于对照组的 $(12.52 \pm 2.13)\mu\text{g/L}$ $(P < 0.01)$,NAFLD 组 IL-10 因子表达水平为 $(6.18 \pm 1.15)\mu\text{g/L}$,显著低于对照组的 $(8.47 \pm 1.54)\mu\text{g/L}$ $(P < 0.05)$,NAFLD 组 IL-17/IL-10 比值为 3.68 ± 0.60 ,显著高于对照组的 1.48 ± 0.25 $(P < 0.01)$ 。轻度、中度和重度肝脂肪变 NAFLD 患者间 TH17、Treg 细胞比例、TH17/Treg 比值、IL-17、IL-10 因子表达以及 IL-17/IL-10 比值间存在显著差异 $(P < 0.05)$ 。[结论]NAFLD 患者存在 Th17/Treg 失衡,其失衡与患者肝脂肪病变的程度密切相关,调整 Th17/Treg 失衡有望成为 NAFLD 防治的新思路。

关键词:非酒精性脂肪性肝病;辅助性 T 淋巴细胞 17;调节性 T 淋巴细胞

doi:10.3969/j.issn.1671-038X.2019.11.13

中图分类号:R575

文献标志码:A

Significance of TH17/Treg cells in peripheral blood of patients with nonalcoholic fatty liver disease

SUN Liang, LI Bo, QIU Hou-kuang, LI Ming-you, LIN Mao-rui, CAO Dong-lin, LEI Da

(Department of Laboratory Medicine, Guangdong Second People's Hospital, Guangzhou 510310, China)

Corresponding author: SUN Liang, E-mail: 18680496527@163.com

Abstract:[Objective] To detect the role of TH17/Treg dynamic balance in nonalcoholic fatty liver disease(NAFLD). [Methods] 92 NAFLD patients were enrolled in this study. Another 40 healthy individuals in the physical examination center of our hospital were taken as control. NAFLD patients were divided into mild, moderate and severe hepatic steatosis according to CT imaging criteria for liver steatosis grading. The ratios of TH17 and Treg cells in peripheral blood were measured by flow cytometry. IL-17 and IL-10 expression was detected by ELISA. [Results] The percentage of TH17 cells in NAFLD group was $(14.26 \pm 2.18)\%$, which was significantly higher than that of $(7.12 \pm 1.26)\%$ in control group $(P < 0.01)$. Treg cells in NAFLD group was $(5.13 \pm 0.82)\%$, which was significantly lower than that of $(6.35 \pm 1.04)\%$ in control group $(P < 0.05)$. The ratio of TH17/Treg in NAFLD group was 2.78 ± 0.46 , which was significantly higher than that of 1.12 ± 0.15 in control group $(P < 0.01)$. The expression of IL-17 in NAFLD group was $(22.74 \pm 4.62)\mu\text{g/L}$, which was significantly higher than that of $(12.52 \pm 2.13)\mu\text{g/L}$ in control group $(P < 0.01)$. IL-10 in NAFLD group was $(6.18 \pm 1.15)\mu\text{g/L}$, which was significantly lower than that

收稿日期:2019-06-10

基金项目:广东省 2015 年度自然科学基金——基础与应用基础研究专项资金(No:605)

作者简介:孙 亮,男,本科,研究方向:临床医学检验

通讯作者:孙 亮, E-mail: 18680496527@163.com

of $(8.47 \pm 1.54) \mu\text{g/L}$ in control group ($P < 0.05$). The ratio of IL-17/IL-10 in NAFLD group was 3.68 ± 0.60 , which was significantly higher than that of 1.48 ± 0.25 in control group ($P < 0.01$). There were significant differences in TH17, Treg cell, TH17/Treg, IL-17 expression, IL-10 expression and IL-17/IL-10 among patients with NAFLD with mild, moderate and severe hepatic steatosis ($P < 0.05$). [Conclusion] There is Th17/Treg imbalance in NAFLD patients, which is closely related to the degree of hepatic steatosis. Adjusting Th17/Treg imbalance might be expected to become a new way to prevent and treat NAFLD.

Key words: non-alcoholic fatty liver diseases; Th17; Treg

非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)是一种与胰岛素抵抗和遗传相关的代谢应激性肝损伤,患者无过量饮酒史,但肝组织损伤的病理改变与酒精性肝病相似,表现为过多甘油三酯堆积在肝脏内,人群患病率可以高达 20%~30%^[1],临床早期表现为非酒精性肝脂肪变(non-alcoholic hepatic steatosis, NAHS)和非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH),进一步发展为 NAFLD 相关性肝硬化(NAFLD-related hepatic cirrhosis, NRHC),甚至肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)^[2]。而肝脏是重要的免疫器官,免疫异常在肝细胞损伤中的作用占有重要的地位^[3],辅助性 T 淋巴细胞 17(TH17)和调节性 T 淋巴细胞(Treg)是新发现的 CD4⁺ T 淋巴细胞的亚群,TH17/Treg 动态平衡的失调参与了机体内的多种免疫异常性疾病^[4],本研究观察了 NAFLD 患者外周血中 TH17 和 Treg T 细胞亚群的变化,以期探讨 TH17/Treg 动态平衡在 NAFLD 中的作用,为其防治提供新途径和依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选择 2017 年 2 月~2018 年 12 月我院诊疗的 NAFLD 患者 92 例,其中男 58 例,女 34 例,年龄 24~68 岁,平均 (52.36 ± 9.64) 岁。入选标准:符合《非酒精性脂肪性肝病防治指南(2018 更新版)》中的诊断标准^[5]。排除标准:诊前 1 个月内曾使用过免疫调节剂,伴发病毒性、药物性或自身免疫性肝炎,伴发肝豆状核变性、 β 脂蛋白血症、先天性脂质萎缩症、乳糜泻等可以导致脂肪肝的特定疾病,伴发肿瘤者。另取我院体检中心健康体检者 40 例作为对照,其中男 24 例,女 16 例,年龄 23~67 岁,平均 (52.72 ± 9.83) 岁,NAFLD 患者与对照组在性别和年龄组成方面,差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。根据 CT 影像学肝脂肪变分度标准,将 NAFLD 患者分为轻度、中度和重度肝脂肪变。脂肪变轻度组男 22 例,女 14 例,年龄 24~65 岁,平均 (52.16 ± 9.72) 岁,中度组男 20 例,女 11 例,年龄 25~68 岁,平均 (52.73 ± 9.88) 岁,重度组男 16 例,

女 9 例,年龄 24~67 岁,平均 (52.19 ± 9.54) 岁,3 组间性别和年龄具有可比性,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

1.2 实验试剂和仪器

溶血素美国购自美国贝克曼库尔特公司,淋巴细胞分离液购自天津灏洋生物有限公司, FITC-CD4、APC-CD25、PE-Foxp3、APC-IL-17 荧光抗体购自美国 e Bioscience 公司,白细胞介素(IL)-17 和 IL-10 ELISA 检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所, Med550 酶标仪为美国 Bio-Rad 公司产品, FACSCalibur 流式细胞仪为美国贝克曼库尔特公司产品,流式细胞仪自带 Cell Quest v 3.2 分析软件。

1.3 外周血 TH17 和 Treg 细胞的流式细胞仪检测

抽取受试者抗凝静脉血 5 mL,按说明书加入溶血素,混匀后离心,加入淋巴细胞分离液,1 000 g 离心 20 min 后,抽取淋巴细胞层,生理盐水调整细胞浓度为 1×10^5 细胞/mL,按照抗体说明书加入相关抗体以及同行对照,避光孵育 30 min,置冰上待流式细胞仪检测,同行对照调零后,先对 CD4⁺ T 细胞设门,使用 Cell Quest 软件圈定 CD4⁺ IL-17⁺ 的 TH17 细胞和 FITC-CD4⁺ APC-CD25⁺ PE-Foxp3⁺ 的 Treg 细胞,分析各亚群细胞在 CD4⁺ T 细胞中所占的比例。

1.4 外周血 IL-17 和 IL-10 因子的 ELISA 检测

抽取受试者抗凝静脉血 2 mL,1 000 g 离心 10 min 后,分离上层血浆,IL-17 和 IL-10 因子使用 ELISA 法检测,严格按照试剂盒说明书操作,加入相关试剂,显色后,在 450 nm 波长处使用酶标仪检测各孔吸光度值的变化,对照标准品绘制的标准曲线,计算各样品的表达水平。

1.5 统计学处理

SPSS 19.0 统计软件对数据进行统计学处理,组间对比采用独立 t 检验,组内比较采用配对 t 检验,多组均数比较使用方差分析,进一步 2 组间的比较使用 LSD- t 检验进行,计数资料使用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NAFLD 和对照组患者 TH17 和 Treg 细胞比例的变化

NAFLD 组 TH17 细胞比例为 $(14.26 \pm 2.18)\%$, 显著高于对照组的 $(7.12 \pm 1.26)\%$ ($P < 0.01$), NAFLD 组 Treg 细胞比例为 $(5.13 \pm 0.82)\%$, 显著低于对照组的 $(6.35 \pm 1.04)\%$ ($P < 0.05$), NAFLD 组 TH17/Treg 细胞比例比值为 2.78 ± 0.46 , 显著高于对照组的 1.12 ± 0.15 ($P < 0.01$), 见表 1。

2.2 NAFLD 和对照组患者 IL-17 和 IL-10 因子表达的变化

NAFLD 组 IL-17 因子表达水平显著高于对照

组 ($P < 0.01$), NAFLD 组 IL-10 因子表达水平显著低于对照组 ($P < 0.05$), NAFLD 组 IL-17/IL-10 比值显著高于对照组 ($P < 0.01$)。见表 1。

2.3 轻度、中度和重度肝脂肪变 NAFLD 患者 TH17 和 Treg 细胞比例的变化

轻度、中度和重度肝脂肪变 NAFLD 患者间 TH17 和 Treg 细胞比例存在显著差异 ($P < 0.05$), 其中重度组 TH17 细胞比例和 TH17/Treg 比值显著高于中度组 ($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$), 中度组 TH17 细胞比例和 TH17/Treg 比值又显著高于轻度组 ($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$), 重度组 Treg 细胞比例显著低于中度组 ($P < 0.05$), 中度组 Treg 细胞比例显著低于轻度组 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 1 2 组 TH17 和 Treg 细胞比例以及 IL-17 和 IL-10 因子表达的比较

$\bar{x} \pm s$

组别	例数	TH17/%	Treg/%	TH17/Treg	IL-17/ $(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	IL-10/ $(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	IL-17/IL-10
对照组	40	7.12 ± 1.26	6.35 ± 1.04	1.12 ± 0.15	12.52 ± 2.13	8.47 ± 1.54	1.48 ± 0.25
NAFLD 组	92	$14.26 \pm 2.18^{2)}$	$5.13 \pm 0.82^{1)}$	$2.78 \pm 0.46^{2)}$	$22.74 \pm 4.62^{2)}$	$6.18 \pm 1.15^{1)}$	$3.68 \pm 0.60^{2)}$

与对照组比较, $^{1)} P < 0.05$, $^{2)} P < 0.01$ 。

表 2 轻度、中度和重度肝脂肪变 NAFLD 患者 TH17 和 Treg 细胞比例以及 IL-17 和 IL-10 因子表达的比较

$\bar{x} \pm s$

组别	例数	TH17/%	Treg/%	TH17/Treg	IL-17/ $(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	IL-10/ $(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	IL-17/IL-10
轻度组	36	11.36 ± 1.52	5.72 ± 0.91	1.99 ± 0.38	19.26 ± 3.82	7.22 ± 1.26	2.67 ± 0.47
中度组	31	$14.83 \pm 2.27^{1)}$	$5.06 \pm 0.77^{1)}$	$2.93 \pm 0.48^{2)}$	$23.05 \pm 4.73^{1)}$	$6.04 \pm 1.12^{1)}$	$3.82 \pm 0.65^{2)}$
重度组	25	$17.73 \pm 3.02^{2)3)}$	$4.37 \pm 0.75^{2)3)}$	$4.06 \pm 0.55^{2)4)}$	$27.37 \pm 5.64^{1)3)}$	$4.86 \pm 1.03^{2)3)}$	$5.63 \pm 0.73^{2)4)}$

与轻度组比较, $^{1)} P < 0.05$, $^{2)} P < 0.01$; 与中度组比较, $^{3)} P < 0.05$, $^{4)} P < 0.01$ 。

2.4 轻度、中度和重度肝脂肪变 NAFLD 患者 IL-17 和 IL-10 因子表达的变化

轻度、中度和重度肝脂肪变 NAFLD 患者间 IL-17 和 IL-10 因子表达存在显著差异 ($P < 0.05$), 其中重度组 IL-17 因子表达和 IL-17/IL-10 比值显著高于中度组 ($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$), 中度组 IL-17 因子表达和 IL-17/IL-10 比值又显著高于轻度组 ($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$), 重度组 IL-10 因子表达显著低于中度组 ($P < 0.05$), 中度组 IL-10 因子表达显著低于轻度组 ($P < 0.05$)。见表 2。

3 讨论

NAFLD 已成为我国慢性肝病和健康体检肝脏生物化学指标异常的首要原因, 对于 NAFLD 的病因和发病机制目前还没完全了解, 给其有效防治带来一定的困难^[6-7]。

王彦丽等^[8]的研究发现 NAFLD 患者存在淋巴细胞亚群的紊乱, 致炎活性的 CD4^+ T 淋巴细胞显

著增加, 在 NAFLD 患者的免疫功能紊乱中起到关键性的作用。Th17 与 Treg 细胞是新发现的 CD4^+ T 淋巴细胞成员, Th17 主要分泌致炎因子 IL-17, 发挥致炎作用, Treg 细胞主要分泌 IL-10 炎症抑制因子, 调节 IL-17 的作用, 因此机体内 Th17/Treg 细胞和分泌的 IL-17/IL-10 因子间维持一个动态的平衡^[9]。Th17/Treg 失衡参与了多种疾病的发生, 唐涛等^[10]在 NAFLD 患者中发现 Treg 和 Th17 细胞的异常表达, 杨毅等^[11]使用 NAFLD 小鼠模型研究发现樟芝多糖调节模型鼠 Treg 细胞表达后可以发挥对 NAFLD 的保护作用, 本研究发现 NAFLD 患者 Th17 细胞比例以及 Th17/Treg 比值均显著高于对照组, 而且其效应分子 IL-17 和 IL-17/IL-10 比值也显著高于对照组, 上述结果都说明了 Th17/Treg 失衡参与了 NAFLD 的致病过程。Su 等^[12]研究发现在高脂肪喂养的小鼠中 Th17 更容易迁移到肝脏发挥致炎作用, 本研究根据 NAFLD 患者肝脏

脂肪病变的程度分为轻度、中度和重度肝脂肪变组,结果显示肝脏脂肪病变程度越重的 NAFLD 患者 Th17 细胞比例以及 Th17/Treg 比值越高,Treg 细胞比例越低,其相应的效应因子也得到了相似的结果。

综上所述,本研究显示 NAFLD 患者存在 Th17/Treg 失衡,其失衡与患者肝脂肪病变的程度密切相关,调整 Th17/Treg 失衡有望成为 NAFLD 防治的新思路。

参考文献

- [1] Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, et al. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease; practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases[J]. *Hepatology*, 2017, 67(1):328—357.
- [2] Haas JT, Francque S, Staels B. Pathophysiology and mechanisms of nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Annu Rev Physiol*, 2016, 78(1):181—205.
- [3] 曲宝戈. 脂肪性肝病患者炎症、免疫改变及治疗的研究现状及展望[J]. *世界华人消化杂志*, 2016, 24(19):2931—2942.
- [4] Swiderska M, Jaroszewicz J, Stawicka A, et al. The interplay between Th17 and T-regulatory responses as well as adipokines in the progression of non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Clin Exp Hepatol*, 2017, 3(3):127—134.
- [5] 中华医学会肝病学会脂肪肝和酒精性肝病学组, 中国医师协会脂肪性肝病专家委员会. 非酒精性脂肪性肝病防治指南(2018 更新版)[J]. *传染病信息*, 2018, 31(5):393—402, 420.
- [6] 李静, 唐洁婷, 茅益民. 非酒精性脂肪性肝病和非酒精性脂肪性肝炎治疗的现状与未来[J]. *肝脏*, 2018, 23(9):756—759.
- [7] 李军祥, 陈詒, 王允亮. 非酒精性脂肪性肝病中西医结合诊疗共识意见(2017 年)[J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2017, 25(11):805—811.
- [8] 王彦丽, 郝礼森, 张铁强, 等. 非酒精性脂肪性肝病患者外周血 T 细胞亚群的变化及意义[J]. *实用预防医学*, 2018, 25(12):1473—1475.
- [9] 高伟华, 葛宽雪, 向晓星. 辅助性 T 淋巴细胞 17 和调节性 T 淋巴细胞及其平衡改变与非酒精性脂肪性肝病的关系[J]. *临床肝胆病杂志*, 2018, 34(6):1347—1350.
- [10] 唐涛, 蔡旭华, 李伟平, 等. HIF-1 α 、Treg 和 Th17 在非酒精性脂肪性肝病患者外周血中的表达及其临床意义[J]. *中华全科医学*, 2017, 15(10):1672—1674, 1820.
- [11] 杨毅, 张晓玲, 官俏兵, 等. 樟芝多糖通过 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 调节性 T 细胞对小鼠非酒精性脂肪性肝病的保护作用[J]. *中国现代应用药学*, 2018, 35(3):382—387.
- [12] Su L, Wu Z, Chi Y, et al. Mesenteric lymph node CD4⁺ T lymphocytes migrate to liver and contribute to non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Cell Immunol*, 2019, 337(1):33—41.
- (上接第 857 页)
- [7] 中华中医药学会脾胃病分会. 胃食管反流病中医诊疗专家共识意见(2017)[J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2017, 25(5):321—326.
- [8] 唐艳萍, 刘思邈, 弓艳霞. 复方白及糊对反流性食管炎模型大鼠黏膜血流的影响[J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2011, 19(5):295—298.
- [9] 雷萍. 以中药糊剂卧位服药疗法为主的中西医结合治疗反流性食管炎 56 例临床疗效观察[J]. *青海医药杂志*, 2017, 60(47):51—53.
- [10] 唐艳萍, 弓艳霞, 李淑红. 复方白及糊对反流性食管炎模型大鼠食管黏膜的影响[J]. *中医杂志*, 2011, 52(15):1312—1315.
- [11] 吴练红. 中药穴位贴敷治疗反流性食管炎 42 例[J]. *河南中医*, 2011, 31(10):1149—1150.
- [12] 廖卫民, 冯美灵, 王舒云. 空腹血清胃蛋白酶原和胃泌素-17 检测在反流性食管炎中的临床应用研究[J]. *基层医学论坛*, 2018, 22(7):871—872.
- [13] 陈海山, 龚锦容, 黄朝忠, 等. 功能性消化不良与胃黏膜肥大细胞、血浆胃动素的关系[J]. *胃肠病学*, 2015, 20(9):533—537.
- [14] 李淑红, 唐艳萍, 刘华一. 枳椇化浊解毒汤配合穴位敷贴治疗慢性萎缩性胃炎的疗效及对胃动力的影响[J]. *世界中西医结合杂志*, 2018, 13(11):1498—1500.