

·临床研究·

高表达 CCL20 对乙肝相关慢加急性肝衰竭患者的影响

张耿林¹, 徐士丞², 朱翔¹, 谢婵¹, 彭亮¹, 高志良¹
(中山大学附属第三医院 1.感染病科, 2.超声科, 广东广州 510630)

摘要:【目的】探讨乙肝相关慢加急性肝衰竭(HBV-ACLF)患者血清 CCL20 的表达及其高表达对 HBV-ACLF 的影响。【方法】收集 30 例 HBV-ACLF 患者外周血,以 30 例慢性乙型肝炎(CHB)患者和 27 例健康体检者(NC)作为对照,采用 ELISA 法检测血清中 CCL20 的表达,荧光定量 PCR 法检测 HBV-DNA 定量,化学发光法检测 HBeAg 的状态及甲胎蛋白水平,分析 CCL20 的表达与 HBV 病毒产物及临床指标的关系。【结果】与 NC 组及 CHB 组相比,HBV-ACLF 患者血清 CCL20 水平明显升高($P < 0.001$)。通过相关分析,发现高表达 CCL20 与总胆红素成正相关关系($P = 0.048$);同时发现高表达 CCL20 与甲胎蛋白水平成正相关关系($P = 0.021$)。低 HBV-DNA 复制患者其 CCL20 水平高于 HBV-DNA 较高复制组($P = 0.044$),然而不同 HBeAg 状态的 HBV-ACLF 患者其 CCL20 水平差异无统计学意义。【结论】CCL20 趋化因子参与了 HBV-ACLF 疾病的发生发展,且 CCL20 高表达提示患者具有良好肝细胞再生潜力。

关键词: 乙型肝炎病毒;慢加急性肝衰竭;CCL20

中图分类号: R512.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2016)05-0692-05

Influence of CCL20 Overproduction on Patients with HBV Related Acute-on-chronic Liver Failure

ZHANG Geng-lin¹, XU Shi-cheng², ZHU Xiang¹, XIE Chan¹, PENG Liang¹, GAO Zhi-liang¹

(1.Department of infectious diseases and 2.Department of Ultrasound, The Third Affiliated Hospital of Sun-Yat-Sen University, Guangzhou 510630, China)

Corresponding to: GAO Zhi-liang, E-mail: zhilianggao@21cn.com

Abstract: 【Objective】 To investigate serum CCL20 level and its influence on the patients with HBV related acute-on-chronic liver failure (HBV-ACLF). 【Methods】 Peripheral blood samples were collected from 30 patients with HBV-ACLF, 30 patients with chronic hepatitis B (CHB) and 27 normal controls (NC). Serum CCL20 level was measured using ELISA. HBV-DNA loads were measured by fluorescent PCR. The presence of HBeAg and AFP levels were measured by automated chemiluminescence assay. Serum CCL20 levels in HBV-ACLF patients and their correlations with HBeAg presence, HBV-DNA loads and liver function were analyzed. 【Results】 Serum CCL20 levels were significantly elevated in patients with HBV-ACLF compare with NC subjects and CHB patients ($P < 0.001$). CCL20 levels were positively correlated with Tbil levels ($P = 0.048$) and AFP levels ($P = 0.021$). Higher CCL20 levels were found in patients with lower HBV-DNA loads than those with higher HBV-DNA loads ($P = 0.044$). However, no significant differences in CCL20 levels were observed between HBeAg-positive and HBeAg-negative patients with HBV-ACLF. 【Conclusion】 CCL20 chemokine may contributed to the mechanism of HBV-ACLF, and overproduction of CCL20 may indicate latent capacity of hepatocyte regeneration.

Key words: HBV; ACLF; CCL20

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2016, 37(5): 692-696]

2006年全国调查结果显示我国现有的慢性乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染者接近 1

亿,而慢性乙型肝炎患者(chronic hepatitis B, CHB)约 2 000 万^[1]。在中国,HBV 感染相关的慢加

收稿日期:2016-05-12

基金项目:国家“十三五”科技重大专项(2016ZX10002008, 2016ZX10002009, 2016ZX10002010);广州市科技计划项目(1561000155)

作者简介:张耿林,研究生,主治医师,研究方向:肝衰竭的免疫发病机制,E-mail: zhanggenglin1984@163.com;高志良,通信作者,E-mail: zhilianggao@21cn.com

急性肝衰竭患者 (HBV related acute-on-chronic liver failure, HBV-ACLF) 占肝衰竭病例约 80%。目前, HBV-ACLF 的治疗仍以内科综合对症治疗为主, 缺乏特效的治疗手段, 病死率高达 60% ~ 80%^[2]; 且目前其具体发病机制仍未完全阐明, 大部分学者认为与体内免疫失调有关^[3]。趋化因子是分子质量为 8 000 ~ 14 000U 的小分子多肽, 通过与细胞膜表面的 G 蛋白偶联受体结合, 趋化免疫细胞到达靶器官, 发挥特异性或非特异性免疫应答^[4]。我们及其他学者的研究均表明 Th17 细胞参与 HBV-ACLF 的发病机制^[5-6], 而 CC chemokine ligand 20 (CCL20) 亦曾称为巨噬细胞炎症蛋白 3a, 认为是 Th17 细胞的主要趋化因子^[7], 因此我们推测 CCL20 也可能参与 HBV-ACLF 的发生发展, 但是目前关于该类研究报道甚少。基于此, 本研究通过检测 HBV-ACLF 患者血清中 CCL20 的表达水平, 并探讨其与生化学指标的关系, 发现 CCL20 在 HBV-ACLF 中可能起到促进炎症的作用, 介导肝细胞损伤及有助于清除乙肝病毒。同时我们发现 CCL20 与甲胎蛋白水平成正相关, 提示 CCL20 可能参与肝细胞再生。

1 材料与方 法

1.1 研究对象

收集 2009 年 6 月至 2010 年 1 月在中山大学附属第三医院感染病科住院的 30 例 HBV-ACLF 患者血清(男性 29 例, 女性 1 例), 平均年龄 41.5 (18 ~ 69) 岁。全部患者均采取内科综合对症治疗,

未采用人工肝、干细胞及免疫调节剂等措施。收集同期 27 名健康体检者(normal control, NC)、30 例 CHB 患者作为对照组, 采集外周血, 分离血清, -20℃ 储存统一检测。3 组受检者在年龄及性别方面均无统计学差异(表 1)。HBV-ACLF 及 CHB 患者的诊断标准参照 2006 年《肝衰竭诊疗指南》及 2010 年修订的《慢性乙型肝炎防治指南》等指南^[8-9]。CHB 具体诊断标准: 血清乙肝表面抗原阳性超过半年, HBV-DNA 阳性, 转氨酶持续或反复异常。HBV-ACLF 具体诊断标准: 在慢性乙型肝炎基础上, 伴有极度乏力、食欲缺乏、频繁呕吐、腹胀等消化道症状, 且总胆红素 $\geq 171 \mu\text{mol/L}$ 及凝血酶原活动度 $< 40\%$ 。排除标准: 妊娠患者、哺乳期患者、肝癌或疑为肝癌者、合并其他严重躯体疾病如心脏病、自身免疫性疾病或恶性肿瘤、重叠其他肝炎病毒感染(如甲型、丙型、丁型、戊型病毒)和 HIV 感染者均予以排除。受检者的一般临床资料详见表 1。中山大学附属第三医院伦理委员会批准本项研究。

1.2 实验方法

1.2.1 CCL20 趋化因子检测 采用 ELISA 技术检测血清中 CCL20 水平, 试剂盒购自美国 R&D Systems 公司, 最低检测值为 0.87 pg/mL, 严格根据产品说明书的要求检测。

1.2.2 HBV-DNA 检测 使用 ABI5700 全自动实时荧光定量 PCR 扩增仪检测, 试剂由中山大学达安基因公司提供, 最低检测值为 100 U/mL。

1.2.3 生物化学指标检测 日本 Olympus 公司的 Olympus AU 640 检测肝功能。法国 STAGO 公司的

表 1 研究对象的一般临床资料

Table 1 Clinical characteristics of the populations enrolled in this study

	NC(n = 27)	CHB(n = 30)	HBV-ACLF(n = 30)	P
Gender(male/female)	25/2	30/0	29/1	0.303
Age/years	37.0 ± 1.4	37.1 ± 2.1	41.5 ± 2.4	0.199
Tbil/($\mu\text{mol/L}$)	ND	280(46 ~ 806)	534(198 ~ 1 154)	<0.001
PTA/(%)	ND	68(45 ~ 126)	31(13 ~ 40)	<0.001
ALT/(U/L)	ND	233(34 ~ 2 424)	188(26 ~ 1 688)	0.584
AST/(U/L)	ND	192(52 ~ 2 646)	187(66 ~ 1 561)	0.852
ALB/(g/L)	ND	38.93 ± 0.87	35.64 ± 0.95	0.008
AFP/(ng/mL)	ND	109(2 ~ 1210)	73(1 ~ 950)	0.279
HBeAg/(P/N)	ND	16/14	12/18	0.438
Ig (HBV-DNA)/(U/mL)	ND	5.35 ± 0.23	5.04 ± 0.28 ¹⁾	0.389

1) HBV-DNA could not be detected in 5 patients with HBV-ACLF in this study. ND; not detected

STA-Compact 型全自动分析仪检测凝血功能。采用化学发光法检测甲胎蛋白 (α -fetoprotein, AFP), 试剂盒由罗氏诊断公司提供。

1.2.4 病毒血清标志物检测使用 Abbott/AxSYM 试剂盒检测 HBsAg、抗-HBs、HBeAg、抗-HBe 和抗-HBc; 丙肝抗体试剂盒及戊肝抗体试剂盒分别由中山生物工程有限公司及美国 Genelabs 公司提供。所有检测均严格按照产品说明书的要求进行。

1.3 统计学分析

使用 SPSS 软件包(13.0 版本)进行统计学分析。符合正态分布的计量资料以均数 \pm 标准误描述, 采用独立样本 t 检验或方差分析; 非正态分布的计量资料以中位数(M)和范围(Range)描述, 采用秩和检验; 率的分析比较采用卡方检验或 Fisher's 精确概率检验; 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

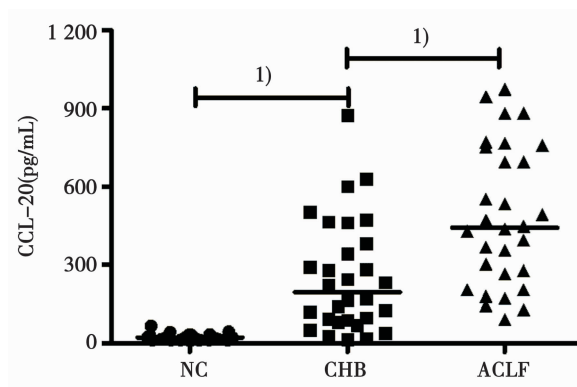
2 结 果

2.1 HBV-ACLF、CHB 和 NC 组间血清 CCL20 趋化因子水平的比较

三组血清 CCL20 趋化因子表达相比较, 差异具有统计学意义($\chi^2 = 55.785, P < 0.001$); 进一步分析 HBV-ACLF 患者 CCL20 趋化因子比值 443 pg/mL(90-973)明显高于 CHB 组 196 pg/mL(13-874)及 NC 组 22 pg/mL(9-66), 而且 CHB 患者 CCL20 趋化因子水平明显高于 NC 组, 差异均具有统计学意义($P < 0.001$, 图 1)。

2.2 CCL20 与肝功能指标的相关分析

临床上, 高胆红素血症(总胆红素 ≥ 171



NC subjects ($n = 27$). ACLF, acute-on-chronic liver failure; CHB, chronic hepatitis B; NC, normal control; 1) $P < 0.001$.

图 1 HBV-ACLF 患者 CCL20 水平显著高于 NC 组及 CHB 患者

Fig.1 CCL20 levels were significantly higher in HBV-ACLF patients than CHB

$\mu\text{mol/L}$)及严重凝血功能障碍(凝血酶原活动度 $< 40\%$) 往往提示肝细胞大片坏死。本研究应用 Spearman 相关分析, 发现在 HBV 感染者中, 高水平 CCL20 与总胆红素(total bilirubin, Tbil)成正相关(对于 CHB 患者, $r = 0.618, P < 0.001$; 对于 ACLF 患者, $r = 0.364, P = 0.048$; 表 2)。而在 CHB 患者中, 高水平 CCL20 与凝血酶原活动度(prothrombin time activity, PTA)成负相关($r = -0.467, P = 0.009$, 表 2)。然而对于 HBV-ACLF 患者, CCL20 与 PTA 未提示存在相关, 这可能与患者输注外源性凝血因子有关。在 HBV-ACLF 患者中, 发现高水平 CCL20 与 AFP 成正相关关系($r = 0.420, P = 0.021$, 表 2), 而 AFP 是临床上用于评估肝细胞再生的重要标志, 因此 CCL20 高表达提示患者可能存在较

表 2 高水平 CCL20 相关肝功能观察

Table 2 relation of CCL20 levels with liver function

	CHB($n = 30$)	HBV-ACLF($n = 30$)	Correlations between CCL20 and liver function in CHB		Correlations between CCL20 and liver function in HBV-ACLF	
			r	P	r	P
Tbil/ $(\mu\text{mol/L})$	280(46 ~ 806)	534(198 ~ 1 154)	0.618	< 0.001	0.364	0.048
PTA/%	68(45 ~ 126)	31(13 ~ 40)	-0.467	0.009	0.323	0.082
ALT/(U/L)	233(34 ~ 2424)	188(26 ~ 1 688)	-0.115	0.543	-0.103	0.586
AST/(U/L)	192(52 ~ 2 646)	187(66 ~ 1 561)	0.066	0.728	-0.184	0.330
ALB/(g/L)	38.93 ± 0.87	35.64 ± 0.95	-0.467	0.009	-0.046	0.809
AFP/(ng/mL)	109(2 ~ 1210)	73(1 ~ 950)	0.173	0.360	0.420	0.021

好的肝细胞再生潜力。

2.3 HBV-ACLF 病毒产物与趋化因子 CCL20 水平的关系比较

探讨不同 HBeAg 抗原状态对 CCL20 水平的影响,根据 HBV-ACLF 患者 HBeAg 抗原的表达,分为阳性组和阴性组,结果显示两组间 CCL20 水平差异无统计学意义($P = 0.528$)。应用 Pearson 相关分析,我们发现 HBV-DNA 载量与 CCL20 水平存在负相关趋势($r = -0.281$),但差异无明显统计学意义($P = 0.156$);进一步根据 HBV-DNA 复制水平,分为低复制组(HBV-DNA < 5log10)和较高复制组(HBV-DNA \geq 5log10),我们发现低复制组其 CCL20 水平高于 HBV-DNA 较高复制组($Z = -2.013$, $P = 0.044$),差异有明显统计意义(表 3)。

表 3 病毒产物对趋化因子 CCL20 水平的影响

Table 3 Relationship between CCL20 levels and HBV-DNA loads or status of HBeAg

	Group	n	CCL20/(pg/mL)	Z	P
HBeAg status	positive	12	447 \pm 62	-0.640	0.528
	negative	18	512 \pm 71		
lg(HBV-DNA) /(U/mL) ¹⁾	< 5	13	567 \pm 62	-2.013	0.044
	\geq 5	12	285(128 ~ 945)		

1)HBV-DNA could not be detected in 5 patients with HBV-ACLF in this study.

3 讨论

Shimizu 等^[10]研究表明 CCL20 参与了肝脏的局部炎症反应,国内也有学者研究表明 CHB 患者外周血及肝组织中 CCL20 表达均明显高于健康对照组^[11]。但目前关于 CCL20 是否参与 HBV-ACLF 的发病机制的研究报道甚少。本研究发现 CCL20 在 HBV 感染患者中较健康对照组明显升高,这与国内外研究是相符合的。进而我们发现 HBV-ACLF 患者其 CCL20 表达水平较 CHB 组明显升高($P < 0.001$),初步提示 CCL20 介导的炎症反应可能参与 HBV-ACLF 的发病机制。

进一步分析发现 CCL20 水平与 HBV 感染者的总胆红素水平成呈正相关(对于 CHB 患者, $P < 0.001$;对于 HBV-ACLF 患者, $P = 0.048$);同时发现 CCL20 水平与 CHB 组的 PTA 水平成负相关($P = 0.009$)。由于 HBV-ACLF 患者均存在凝血功能

障碍,有明显出血倾向,输注外源性凝血因子是综合治疗的重要组成部分。为此本研究在 HBV-ACLF 组并未发现 CCL20 与 PTA 存在相关。终末期肝病模型 (Model for end-stage liver disease, MELD) 评分是临床评估 HBV-ACLF 患者转归的重要模型,由总胆红素水平、凝血功能及肌酐等指标组成,由于受到外源性输注凝血因子的影响,本研究亦未发现 CCL20 与 MELD 评分存在相关。结合以上数据,我们推测 CCL20 对 HBV-ACLF 可能起到促进炎症反应的作用,介导肝细胞损伤。

HBV 病毒本身并不引起炎症反应,宿主的免疫系统识别介导的炎症反应才是清除 HBV 病毒的关键,但过激的免疫反应可导致组织细胞损伤。我们进一步分析 CCL20 表达与 HBV 病毒产物的关系,发现在 HBV-ACLF 组中 CCL20 水平与 HBV-DNA 载量存在负相关趋势($r = -0.281$, $P = 0.156$);进一步根据 HBV-DNA 复制水平,分为低复制组(HBV-DNA < 5log10)和较高复制组(HBV-DNA \geq 5log10),发现低复制组其 CCL20 水平明显高于较高复制组($P = 0.044$),提示 CCL20 介导的炎症反应与 HBV 病毒清除有关,同时 CCL20 高表达者可能存在更加激烈的免疫反应,进一步支持 CCL20 在 HBV-ACLF 中起到促炎作用。

在小鼠的肝切除模型中发现,CCL20- $\gamma\delta$ T 细胞轴对肝细胞再生有促进作用^[12]。新近的研究发现,在对乙酰氨基酚诱导的小鼠肝损伤模型中,通过拮抗 CCL20 的表达可导致肝细胞再生不良^[13],从而提示 CCL20 具有促进肝细胞再生的作用。HBV-ACLF 的核心病理改变是肝细胞大片坏死及后续肝细胞再生不良,目前尚未见报道表明 CCL20 具有影响 HBV-ACLF 患者肝细胞再生的作用。AFP 是临床上用于评估肝细胞再生能力的重要标志,本研究发现 HBV-ACLF 患者中 CCL20 水平与 AFP 成正相关($P = 0.021$),提示 CCL20 参与肝细胞再生,高表达 CCL20 的患者具有良好的肝细胞再生潜力。在酒精性肝炎模型中发现 CCL20 通过刺激促增殖丝裂原激活蛋白激酶直接激活肝脏星形细胞,从而促进肝细胞再生^[10]。且在对乙酰氨基酚诱导的肝损伤模型中发现去除肝星形细胞加重肝细胞凋亡坏死^[14]。多数研究表明 CCR6 是 CCL20 结合的唯一受体,但 CCL20 的作用主要取决于表达 CCR6 的细胞类别,如 Th17 细

胞、调节性 T 细胞等^[15]。因此我们推测 CCL20 可能通过激活肝星形细胞或者调节性 T 细胞等机制参与肝细胞再生过程,但具体机制需要进一步研究阐明。

综上所述,CCL20 具有促进炎症反应的作用,同时可能参与肝细胞再生环节,影响 HBV-ACLF 疾病的发生发展,本研究为阐明 HBV-ACLF 的发病机制提供理论基础。

参考文献

- [1] LU FM, ZHUANG H. Management of hepatitis B in China[J].Chin Med J (Engl), 2009, 122(1):3-4.
- [2] LIU Q, LIU Z, WANG T, et al.Characteristics of acute and sub-acute liver failure in China: nomination, classification and interval [J].J Gastroenterol Hepatol, 2007, 22(12):2101-2106.
- [3] SARIN SK, KUMAR A, ALMEIDA JA, et al.Acute-on-chronic liver failure: consensus recommendations of the Asian Pacific Association for the study of the liver (APASL)[J].Hepatol Int, 2009, 3(1):269-282.
- [4] ZLOTNIK A, YOSHIE O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity [J].Immunity, 2000, 12(2):121-127.
- [5] ZHANG GL, XIE DY, LIN BL, et al. Imbalance of interleukin-17-producing CD4 T cells/regulatory T cells axis occurs in remission stage of patients with hepatitis B virus-related acute-on-chronic liver failure [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2013, 28(3):513-521.
- [6] ZHANG JY, ZHANG Z, LIN F, et al.Interleukin-17-producing CD4(+) T cells increase with severity of liver damage in patients with chronic hepatitis B [J].Hepatology, 2010, 51(1):81-91.
- [7] ANNUNZIATO F, COSMI L, SANTARLASCIO V, et al. Phenotypic and functional features of human Th17 cells [J].J Exp Med, 2007, 204(8):1849-1861.
- [8] 中华医学会感染病学分会肝衰竭与人工肝学组,中华医学会肝病学分会重型肝病与人工肝学组.肝衰竭诊疗指南 [J].中华肝脏病杂志,2006,14 (9):643-646.
Liver Failure and Artificial Liver Group, Chinese Society of Infectious Diseases, Chinese Medical Association;
- Severe Liver Diseases and Artificial Liver Group, Chinese Society of Hepatology, Chinese Medical Association.Diagnostic and treatment guidelines for liver failure[J].Chin J Hepatol, 2006, 14(9):643-646.
- [9] 中华医学会肝病学分会,中华医学会感染病学分会.慢性乙型肝炎防治指南(2010年版)[J].中华肝脏病杂志,2011,19(1):13-24.
Chinese Society of Hepatology and Chinese Society of Infectious Diseases, Chinese Medical Association. The guideline of prevention and treatment for chronic hepatitis B (2010 version) [J].Chin J Hepatol, 2011, 19 (1): 13-24.
- [10] AFFÒ S, MORALES-IBANEZ O, RODRIGO-TORRES D, et al. CCL20 mediates lipopolysaccharide induced liver injury and is a potential driver of inflammation and fibrosis in alcoholic hepatitis [J]. Gut, 2014, 63(11): 1782-1792.
- [11] 邵先安,熊思东,徐薇,等.趋化因子 CCL20 在慢性乙型肝炎活检组织中的表达及意义[J].中华检验医学杂志,2008,31(8):864-867.
SHAO XA, XIONG SD, XU W, et al. Significance of CCL20 expression in liver biopsies of chronic hepatitis B patients [J]. Chin J Lab Med, 2008, 31(8):864-867.
- [12] RAO R, GRAFFEO CS, GULATI R, et al.Interleukin 17-Producing $\gamma\delta$ T Cells Promote Hepatic Regeneration in Mice [J]. Gastroenterology, 2014, 147(2):473-484.
- [13] SCHEIERMANN P, BACHMANN M, HÄRDLE L, et al.Application of IL-36 receptor antagonist weakens CCL20 expression and impairs recovery in the late phase of murine acetaminophen-induced liver injury [J]. Sci Rep, 2015, 5:8521.
- [14] SHEN K, CHANG W, GAO X, et al. Depletion of activated hepatic stellate cell correlates with severe liver damage and abnormal liver regeneration in acetaminophen-induced liver injury [J].Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2011, 43(4):307-315.
- [15] ERHARDT A, BIBURGER M, PAPADOPOULOS T, et al. IL-10, regulatory T cells, and Kupffer cells mediate tolerance in concanavalin A-induced liver injury in mice [J]. Hepatology, 2007, 45(2):475-485.

(编辑 徐杰)