

· 论 著 ·

不同病因慢性肝病患者肝组织中 IL-10 的表达及意义

吴鸿雁¹, 黄睿², 熊亚莉², 陈锦¹, 孙珍花², 王贵阳², 吴超²

[摘要] 目的 探讨不同病因的慢性肝病(CLD)患者肝组织中白细胞介素-10(IL-10)的表达及其与肝组织炎症和纤维化的关系。方法 收集 93 例 CLD 患者及 23 例正常对照肝组织石蜡标本,免疫组织化学方法检测肝组织中 IL-10 的表达。结果 不同病因的 CLD 患者肝组织中肝小叶及汇管区 IL-10 的表达均较正常对照明显增高($P<0.01$)。随着肝脏炎症分级(G)的增高,CLD 患者肝组织内肝小叶及汇管区 IL-10 的表达逐渐增强,差异有统计学意义。随着肝脏纤维化程度分期(S)的增高,CLD 患者肝组织内肝小叶及汇管区 IL-10 的表达亦逐渐增高,差异有统计学意义。结论 IL-10 可能参与 CLD 患者肝脏的炎症和纤维化的发生。

[关键词] 慢性肝病;白细胞介素-10;炎症;肝纤维化

[中图分类号] R575 **[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1672-271X.2016.02.004

Expression of interleukin-10 in the liver tissues of patients with chronic liver diseases of different etiologies

WU Hong-yan¹, HUANG Rui², XIONG Ya-li², CHEN Jin¹, SUN Zhen-hua², WANG Gui-yang², WU Chao². 1. Department of Pathology, 2. Department of Infectious Diseases, Nanjing Drum Tower Hospital, Nanjing University Medical School, Nanjing, Jiangsu 210008, China

[Abstract] **Objective** To investigate the expression of interleukin-10 (IL-10) in the liver tissues of patients with chronic liver diseases (CLD) and determine its association with liver inflammation and liver fibrosis. **Methods** A total of 93 patients with different types of CLD were enrolled in our study. Twenty-three normal liver tissues were included as control. The expression of IL-10 was determined by immunohistochemistry in the formalin-fixed, paraffin-embedded liver tissues of CLD patients and healthy controls. **Results**

The expression of IL-10 was significantly increased in both hepatic lobule and portal area of liver tissues of CLD patients with different etiologies as compared with normal controls ($P<0.01$). CLD patients with high inflammation grades (G) had higher IL-10 expression in hepatic lobule and portal area of liver tissues compared to those with lower grades. Significantly higher IL-10 expression was found in hepatic lobule and portal area of liver tissues of CLD patients with high fibrotic stages (S) compared to those with lower stages. **Conclusion** IL-10 may play a pathological role in chronic liver inflammation and fibrosis in CLD.

[Key words] chronic liver disease; interleukin-10; inflammation; liver fibrosis

慢性肝病(chronic liver diseases, CLD)包括病毒性肝炎、自身免疫性肝病、酒精性肝病等,常可进展为肝纤维化、肝硬化、肝癌,甚至死亡,严重影响健康。研究证实,免疫系统在介导 CLD 的肝损伤及纤维化中发挥重要的作用^[1]。白细胞介素-10(interleukin-10, IL-10)是 T 淋巴细胞、活化的巨噬细胞、辅助性 T 淋巴细胞 2(Th2)等分泌的重要抗炎细胞因子。但其是否参与 CLD 患者肝组织炎症和纤维化的发生尚不完全清楚。本研究拟检测不同病因 CLD 患者肝组织中 IL-10 的表达,探讨各种 CLD

患者肝组织的 IL-10 表达与其肝组织炎症和纤维化的关系。

1 对象与方法

1.1 病例选择 研究对象为 2008 年 5 月-2013 年 12 月南京大学医学院附属鼓楼医院接受肝穿刺活检或者肝脏手术的 CLD 患者肝组织石蜡标本。共入组 93 例 CLD 患者,其中男 49 例,女 44 例,中位年龄 48(21~70)岁。其中慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB) 65 例,原发性胆汁性肝硬化(primary biliary cirrhosis, PBC) 7 例,自身免疫性肝炎(autoimmune hepatitis, AIH) 14 例,酒精性肝病(alcoholic liver disease, ALD) 7 例,同时纳入 23 例肝移植的供肝标本作为正常对照(healthy control, HC)。

1.2 纳入标准 患者年龄大于 18 岁,性别不限。

基金项目: 南京市医学科技发展项目(YKK13065)

作者单位: 210008 江苏南京,南京大学医学院附属鼓楼医院,1. 病理科,2. 感染科

通讯作者: 熊亚莉, E-mail: yaya-mei@sohu.com

引用格式: 吴鸿雁,黄睿,熊亚莉,等.不同病因慢性肝病患者肝组织中 IL-10 的表达及意义[J].东南国防医药,2016,18(2):122-124,141.

所有患者均在我院明确诊断为 CLD, 其中 CHB 诊断符合中华医学会肝病学会和中华医学会感染病学分会制定的《慢性乙型肝炎防治指南(2010 年版)》的诊断标准^[2]。ALD 及 AIH、PBC 的诊断标准分别符合中华医学会肝病学会的《酒精性肝病诊疗指南》^[3]和中华医学会风湿病学分会的《自身免疫性肝病诊断和治疗指南》^[4]。

1.3 CLD 患者肝组织炎症分级和纤维化分期
CLD 患者肝组织石蜡标本进行切片, 常规 HE 染色, 根据 CLD 患者肝组织 HE 染色结果, 由南京鼓楼医院病理科有经验的医师参照 Scheuer 提出的标准对 CLD 患者肝组织进行炎症分级和纤维化分期^[5]。

1.4 IL-10 表达的检测 采用 Envision 免疫组化法检测 CLD 患者肝组织中 IL-10 的表达部位及水平。将肝组织蜡块切片, 常规脱蜡至水, 滴加 3% H₂O₂ 阻断内源性过氧化物酶, 将切片置于 EDTA (pH9.0) 中行高压热修复, 自然冷却, PBS 冲洗 2 次, 滴加抗 IL-10 抗体(美国 Abcam 公司), 4 ℃ 冰箱孵育过夜。PBS 冲洗 2 次, 滴加二抗(美国 Invitrogen 公司)后室温孵育 20 min, DAB 显色, 苏木精复染、脱水、透明、封固。

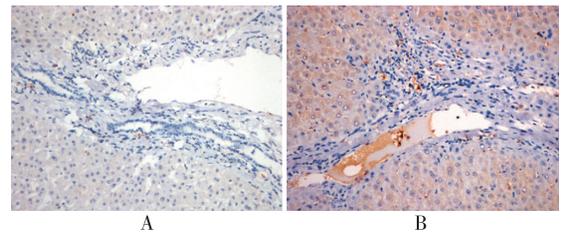
1.5 结果判读标准 由南京鼓楼医院病理科有经验的医师盲法对 CLD 患者肝组织中肝小叶及汇管区 IL-10 的表达分别进行评分, 采用染色强度乘以阳性细胞数量的方法综合评分法, 阳性数量评分: < 5% 为 0 分, 5% ~ 25% 为 1 分, 26% ~ 50% 为 2 分, 51% ~ 75% 为 3 分, > 75% 为 4 分; 着色强度评分: 无着色为 0 分, 浅黄着色为 1 分, 黄色为 2 分, 棕黄着色为 3 分。两者相乘即为该样本的 IL-10 得分^[6]。

1.6 统计学处理 所有资料均采用 IBM SPSS 22.0 统计软件进行分析, 各组得分数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。对于服从正态分布和方差齐性的计量数据, 两组比较采用两独立样本 *t* 检验, 对于不服从正态分布和方差齐性的计量数据, 采用 Mann Whitney U 检验。多组样本的比较, 服从正态分布和方差齐性的样本比较采用 One-Way ANOVA 单因素方差分析; 对于非正态或方差不齐的数据, 采用 Mann Whitney U 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

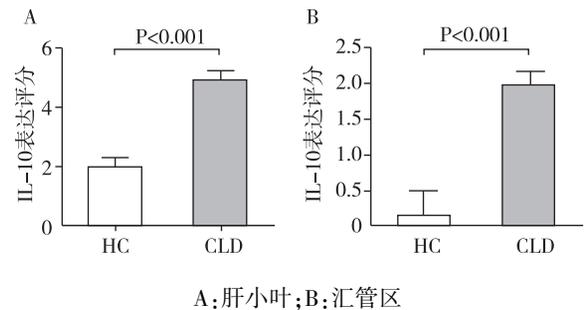
2.1 不同病因 CLD 患者肝组织 IL-10 表达 对不同病因所致 CLD 患者肝组织内 IL-10 的表达进行免疫组织化学检测。结果发现正常对照肝组织中仅有少量的 IL-10 的表达, 而 CLD 患者肝组织中肝小

叶及汇管区均有大量的 IL-10 的表达(图 1)。统计分析表明, CLD 患者肝组织中肝小叶及汇管区 IL-10 的表达均较正常对照明显增高 (P < 0.001, 图 2)。对不同病因的 CLD 患者肝组织中 IL-10 的表达进行比较, 发现 CHB、PBC、AIH 及 ALD 患者肝组织内肝小叶及汇管区 IL-10 表达均较正常对照肝组织明显增多, 差异有统计学意义 (P < 0.01)。而不同病因的 CLD 患者 IL-10 表达无明显的统计学差异 (P > 0.05, 图 3)。



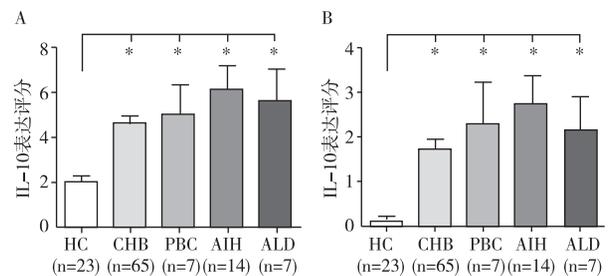
A: 正常对照; B: 慢性乙型肝炎

图 1 慢性肝病肝组织中 IL-10 免疫组织化学染色 (×200)



A: 肝小叶; B: 汇管区

图 2 慢性肝病肝组织与正常对照肝组织中 IL-10 表达的比较

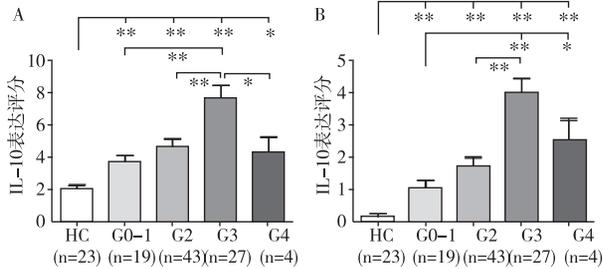


A: 肝小叶; B: 汇管区; 与正常对照组比较, * P < 0.01

图 3 不同病因的慢性肝病肝组织中 IL-10 表达比较

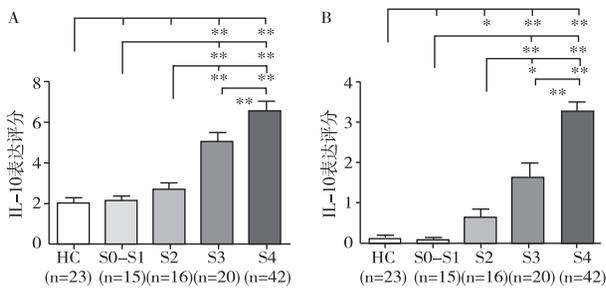
2.2 CLD 患者肝组织中 IL-10 表达与肝组织炎症和纤维化的关系 为分析 IL-10 表达与 CLD 患者肝组织炎症和纤维化程度的关系, 对不同炎症分级 (G) 和纤维化分期 (S) 的 CLD 患者肝组织内 IL-10 表达进行了分析。如图 4 所示, 不论肝小叶或是汇管区, 随着 G 分级的增高, CLD 患者肝组织内肝小

叶及汇管区 IL-10 的表达逐渐增高,差异有统计学意义。G4 期的患者 IL-10 评分略低于 G3 期,考虑与 G4 期患者样本较少有关。随着 S 分期的增高,CLD 患者肝组织肝组织内肝小叶及汇管区 IL-10 的表达亦呈逐渐增高的趋势(图 5)。



A:肝小叶;B:汇管区; * P<0.05, ** P<0.01

图 4 不同炎症分级(G)的慢性肝病患者肝组织中 IL-10 表达比较



A:肝小叶;B:汇管区; * P<0.05, ** P<0.01

图 5 不同纤维化分期(S)的慢性肝病患者肝组织中 IL-10 表达比较

3 讨论

IL-10 是最早由 Mosmann 等发现的由 T 淋巴细胞、活化的巨噬细胞、Th2 等细胞产生的重要免疫抑制因子^[7]。IL-10 有广泛的免疫抑制活性,可抑制 T 细胞增殖、抑制抗原提呈,抑制巨噬细胞活化等^[7],能够限制过度的免疫反应对组织器官造成的损害^[8]。

在肝脏中许多细胞都能分泌 IL-10,包括肝细胞、Kupffer 细胞、窦内皮细胞、肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)以及淋巴细胞等^[9-10]。既往的动物实验及临床数据表明,IL-10 可能参与肝损伤和纤维化的发生。Poovorawan 等^[11]研究发现 HBeAg 阴性的 CHB 患者血清中 IL-10 的水平与其肝组织炎症坏死程度及纤维化程度呈明显的正相关。Lian 等^[12]研究也发现 CHB 患者血清 IL-10 水平较正常对照明显增高,且与患者血清丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)水平呈明显的正相

关,提示 IL-10 参与 CHB 患者肝损伤。Wang 等^[13]研究发现,HBV 相关慢加急性肝衰竭患者血清 IL-10 明显增高,且与血清 ALT 正相关。对于 IL-10 在 CLD 患者肝组织中的表达情况及其与肝组织炎症程度和纤维化程度的关系报道较少。本研究对不同病因的 CLD 患者肝组织中 IL-10 表达检测,发现不同病因的 CLD 患者肝组织中 IL-10 表达较正常对照明显增高。CLD 患者肝组织中 IL-10 表达与肝组织炎症及纤维化程度均呈明显的正相关,提示 IL-10 参与 CLD 患者的肝组织炎症和纤维化。

CLD 患者肝组织中 IL-10 增高的原因尚不完全清楚。动物实验研究发现四氯化碳(carbon tetrachloride, CCl₄)诱导的肝损伤和肝纤维化小鼠肝组织中 IL-10 的表达明显增高,提示 IL-10 参与肝损伤及肝纤维化的发生^[14]。然而 IL-10 缺陷的小鼠 CCl₄ 诱导的肝损伤及纤维化的程度却较野生型明显严重^[15-16]。此外,有研究发现给予外源性 IL-10 能够明显减轻 CCl₄ 诱导的大鼠肝组织炎症程度和肝纤维化程度^[17],同时能减轻肝星状细胞的活化,促进活化的肝星状细胞凋亡^[18]。因此,推测 CLD 患者肝组织中 IL-10 的增高,可能是机体为了限制过强的免疫导致的肝组织炎症和纤维化的发生。

总之,本研究提示 IL-10 参与 CLD 患者的肝脏炎症和纤维化,但其肝组织中 IL-10 具体来源及调控机制尚不完全明确^[19-20]。因此,进一步明确 IL-10 在 CLD 肝组织中的来源及其具体的调控机制,将有利于明确 CLD 的发病机制,从而寻找有效的治疗 CLD 的新方法。

【参考文献】

- [1] Hernandez-Gea V, Friedman SL. Pathogenesis of liver fibrosis[J]. Annu Rev Pathol, 2011, 6: 425-456.
- [2] 中华医学会肝病学会,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]. 中国病毒病杂志, 2011, 19(1): 9-23.
- [3] 中华医学会肝病学会脂肪肝和酒精性肝病学组.酒精性肝病诊疗指南(2010 年修订版) [J]. 中华肝脏病杂志, 2010, 18(3): 167-170.
- [4] 中华医学会风湿病学分会.自身免疫性肝病诊断和治疗指南 [J]. 中华风湿病学杂志, 2011, 15(8): 556-558.
- [5] Scheuer PJ. Classification of chronic viral hepatitis: a need for re-assessment[J]. J Hepatol, 1991, 13(3): 372-374.
- [6] Weng HL, Liu Y, Chen JL, et al. The etiology of liver damage imparts cytokines transforming growth factor beta1 or interleukin-13 as driving forces in fibrogenesis [J]. Hepatology, 2009, 50(1): 230-243.
- [7] Mosser DM, Zhang X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine [J]. Immunol Rev, 2008, 226(1): 205-218.

(下转第 141 页)

组织损害。本结果显示术后三组 SP 浓度明显升高,再次说明 SP 的水平确实和疼痛正相关。已有研究证明,阿片类药物能够抑制 SP、5-羟色胺等许多致痛递质的释放^[15]。与 T 组比较,术后 O 组和 OT 组 SP 浓度明显降低,表明羟考酮联合酮咯酸氨丁三醇应用于自控静脉镇痛可以有效缓解或消除患者手术后疼痛,明显抑制患者术后血清 SP 浓度的升高,有利于患者术后康复。

综上所述,盐酸羟考酮复合酮咯酸氨丁三醇用于剖宫产术后镇痛效果确切,不影响子宫复旧,不良反应少,可安全有效用于剖宫产术后镇痛。

【参考文献】

[1] 徐建国.成人术后疼痛治疗进展[J].临床麻醉学杂志,2011,27(3):293-301.
 [2] Rawlinson A, Kitchingham N, Hart C, et al. Mechanisms of reducing postoperative pain, nausea and vomiting: a systematic review of current techniques[J]. Evid Based Med, 2012, 17(3): 75-80.
 [3] 董丰琴,熊秀萍,陈丹,等.骨科患者术后疼痛管理的新进展[J].东南国防医药,2013,15(6):615-617.
 [4] 许幸,吴新民,薛张纲,等.盐酸羟考酮注射液用于全麻患者术后镇痛的有效性和安全性:前瞻性、随机、盲法、多中心、阳性对照临床研究[J].中华麻醉学杂志,2013,33(3):269-274.
 [5] Staahl C, Dimceviski G, Andersen SD, et al. Different effect of opioids in patients with chronic pancreatitis: an experimental pain study[J]. Scand J Gastroenterol, 2007, 42(3): 383-390.
 [6] Andreassen TN, Klepstad P, Davies A, et al. Is oxycodone efficacy reflected in serum concentrations? A multicenter, cross-sectional study in 456 adult cancer patients[J]. J Pain Symptom Manage,

2012, 43(4): 694-705.
 [7] 徐建国. 盐酸羟考酮的药理学和临床应用[J]. 临床麻醉学杂志, 2014, 30(5): 511-513.
 [8] 王海. 酮咯酸氨丁三醇用于妇科手术后患者自控镇痛 50 例的临床评价[J]. 中国药业, 2013, 22(11): 17-18.
 [9] 李红新,詹锦六,劳燕萍,等.酮咯酸氨丁三醇复合芬太尼用于胸科手术术后镇痛的观察[J].临床肺科杂志,2011,16(8):1188-1189.
 [10] 杨帆,高林林,李洋,等.酮咯酸复合曲马多超前镇痛对术后舒芬太尼静脉镇痛效果的影响[J].实用药物与临床,2012,15(12):794-796.
 [11] Gan TJ, Daniels SE, Singla N, et al. A novel injectable formulation of diclofenac compared with intravenous ketorolac or placebo for acute moderate-to-severe pain after abdominal or pelvic surgery: a multicenter, double-blind, randomized, multiple-dose study [J]. Anesth Analg, 2012, 115(5): 1212-1220.
 [12] Nakamura A, Hasegawa M, Minami K, et al. Differential activation of the mu-opioid receptor by oxycodone and morphine in pain-related brain regions in a bone cancer pain model [J]. Br J Pharmacol, 2013, 168(2): 375-388.
 [13] Humes DJ, Simpson J, Smith J, et al. Visceral hypersensitivity in symptomatic diverticular disease and the role of neuropeptides and low grade inflammation [J]. Neurogastroenterol Motil, 2012, 24(4): 318-e163.
 [14] 范国明,龚遂良,戴加平,等.股神经阻滞对骨关节炎模型兔血清 P 物质含量的影响[J].中国疼痛医学杂志,2012,18(4):238-241.
 [15] 章壮云,胡建,刘耿,等.地佐辛复合酮咯酸氨丁三醇术后 PCIA 的效果及对血清 5-羟色胺和 P 物质的影响[J].临床麻醉学杂志,2013,29(9):863-866.

(收稿日期:2015-11-09;修回日期:2015-12-25)

(本文编辑:黄攸生; 英文编辑:王建东)

(上接第 124 页)

[8] Bliss SK, Alcaraz A, Appleton JA. IL-10 prevents liver necrosis during murine infection with *Trichinella spiralis* [J]. J Immunol, 2003, 171(6): 3142-3147.
 [9] Wan S, LeClerc JL, Schmartz D, et al. Hepatic release of interleukin-10 during cardiopulmonary bypass in steroid-pretreated patients [J]. Am Heart J, 1997, 133(3): 335-339.
 [10] Hammerich L, Tacke F. Interleukins in chronic liver disease: lessons learned from experimental mouse models [J]. Clin Exp Gastroenterol, 2014, 7: 297-306.
 [11] Poovorawan K, Tangkijvanich P, Chirathaworn C, et al. Circulating cytokines and histological liver damage in chronic hepatitis B infection [J]. Hepat Res Treat, 2013, 2013: 757246.
 [12] Lian JQ, Yang XF, Zhao RR, et al. Expression profiles of circulating cytokines, chemokines and immune cells in patients with hepatitis B virus infection [J]. Hepat Mon, 2014, 14(6): 18892.
 [13] Wang K, Wu ZB, Ye YN, et al. Plasma Interleukin-10: A likely predictive marker for hepatitis B virus-related acute-on-chronic liver failure [J]. Hepat Mon, 2014, 14(7): e19370.
 [14] Takekoshi S, Kitatani K, Yamamoto Y. Roles of oxidized diacylglycerol for carbon tetrachloride-induced liver injury and fibrosis in

mouse [J]. Acta Histochem Cytochem, 2014, 47(5): 185-194.
 [15] Thompson K, Maltby J, Fallowfield J, et al. Interleukin-10 expression and function in experimental murine liver inflammation and fibrosis [J]. Hepatology, 1998, 28(6): 1597-1606.
 [16] Louis H, Van Laethem JL, Wu W, et al. Interleukin-10 controls neutrophilic infiltration, hepatocyte proliferation, and liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in mice [J]. Hepatology, 1998, 28(6): 1607-1615.
 [17] Huang YH, Shi MN, Zheng WD, et al. Therapeutic effect of interleukin-10 on CCl4-induced hepatic fibrosis in rats [J]. World J Gastroenterol, 2006, 12(9): 1386-1391.
 [18] Zhang LJ, Zheng WD, Shi MN, et al. Effects of interleukin-10 on activation and apoptosis of hepatic stellate cells in fibrotic rat liver [J]. World J Gastroenterol, 2006, 12(12): 1918-1923.
 [19] 刘滨蕊,李强.脂肪及细胞因子与非酒精性脂肪性肝病关系的研究进展 [J]. 医学研究生学报, 2013, 26(11): 1211-1214.
 [20] 周岳进. 妊娠期妇女慢性乙型肝炎患者核苷(酸)类似物抗病毒治疗 [J]. 东南国防医药, 2013, 15(3): 279-281.

(收稿日期:2015-07-10;修回日期:2015-10-19)

(本文编辑:齐名; 英文编辑:王建东)