

DOI:10.13210/j.cnki.jhmu.20170628.005

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1049.R.20170628.0853.010.html>

补益方联合免疫治疗对自身免疫性肝炎患者外周血 T 细胞中 PD-1/PD-L1 表达量的影响

冯晓霞, 梁海林, 聂苑霞

(上海市黄浦区传染病医院临床科, 上海 200011)

[摘要] **目的:** 研究补益方联合免疫治疗对自身免疫性肝炎(autoimmune hepatitis, AIH)患者外周血 T 细胞中程序性死亡因子-1(programmed death-1, PD-1)及其配体 PD-L1 表达量的影响。**方法:** 选择 2014 年 5 月~2016 年 12 月在我院就诊的 56 例自身免疫性肝炎患者, 随机分为两组, 每组 28 例。对照组给予泼尼松联合硫唑嘌呤常规免疫治疗, 观察组给予补益方联合泼尼松、硫唑嘌呤治疗。治疗后 12 周后, 测定两组肝功能、肝纤维化标志分子、T 细胞相关细胞因子的含量, 采集外周血并测定 CD4⁺ T 细胞中 PD-1 及 PD-L1 的表达量。**结果:** 治疗 12 周后, 观察组患者外周血中 CD4⁺ PD-1⁺、CD4⁺ PD-L1⁺ T 细胞的荧光强度均显著低于对照组($P < 0.05$); 血清中丙氨酸氨基转移酶(ALT)、谷氨酰转肽酶(γ -GT)、Ⅲ型前胶原(PC-Ⅲ)、Ⅳ型胶原(C-Ⅳ)、干扰素- γ (interferon, IFN- γ)、白细胞介素(interleukin, IL)-17 的含量均显著低于对照组($P < 0.05$), IL-4、IL-10 的含量显著高于对照组($P < 0.05$)。**结论:** 补益方联合免疫治疗能够降低 PD-1/PD-L1 的表达, 调节 CD4⁺ T 细胞的功能, 减轻肝损伤、抑制肝纤维化, 有效治疗 AIH。

[关键词] 补益方; 自身免疫性肝炎; 程序性死亡因子-1(PD-1); 程序性死亡因子-1 配体; CD4⁺ T 淋巴细胞

[中图分类号] R575.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-1237(2017)14-1900-03

Effects of Buyi prescription combined with immunotherapy on PD-1 / PD-L1 expression in peripheral blood T cells of patients with autoimmune hepatitis

FENG Xiao-xia, LIANG Hai-lin, NIE Yuan-xia

(Clinical Department, the Infectious Diseases Hospital of Shanghai Huangpu District, Shanghai 200011)

[Foundation Project]: Science and Technology Project of Health and Family Planning Commission of Shanghai Huangpu District (grant No. HKW201551).

[Author]: FENG Xiao-xia (1983-), Female, Shandong Province, M. M., Attending Physician, Tel: 13671754357, E-mail: 2848721383@qq.com.

Received: 2017-06-13 Revised: 2017-06-27

JHMC, 2017; 23(14): 1900-1902

View from specialist: It is creative, and of certain scientific and educational value.

[ABSTRACT] **Objective:** To study the effects of Buyi prescription combined with immunotherapy on PD-1/PD-L1 expression in peripheral blood T cells in patients with autoimmune hepatitis. **Methods:** A total of 56 patients with autoimmune hepatitis who were treated in our hospital between May 2014 and December 2016 were randomly divided into two groups of 28 patients in each group. The control group received prednisone combined with azathioprine for routine immunotherapy, and the observation group received Buyi prescription combined with prednisone and azathioprine therapy. Twelve weeks after treatment, the serum was collected to determine the levels of liver damage marker molecules, liver fibrosis marker molecules and T cell-related cytokines, and the peripheral blood was collected to determine the PD-1 and PD-L1 expression in CD4⁺ T cells. **Results:**

[基金项目] 上海市黄浦区卫计委科技项目(HKW201551)

[作者简介] 冯晓霞(1983-),女,山东人,硕士研究生,主治医师。电话:13671754357,Email: 2848721383@qq.com。

[收稿日期] 2017-06-13 [修回日期] 2017-06-27 网络出版时间:2017-6-28 08:53

Twelve weeks after treatment, fluorescence intensity of CD4⁺PD-1⁺ and CD4⁺PD-L1⁺ T cells in the peripheral blood of the observation group were significantly lower than those of the control group; serum ALT, γ -GT, PC-III, C-IV, IFN- γ and IL-17 levels were significantly lower than those of the control group while IL-4 and IL-10 levels were significantly higher than those of the control group. **Conclusions:** Buyi prescription combined with immunotherapy can reduce the expression of PD-1/PD-L1, adjust the CD4⁺T cell function, reduce the liver damage, inhibit the liver fibrosis and treat AIH effectively.

[KEY WORDS] Buyi prescription; Autoimmune hepatitis; Programmed death-1; Programmed death-1 ligand; CD4⁺T lymphocyte

自身免疫性肝炎(autoimmune hepatitis, AIH)是由自身免疫应答介导的慢性肝脏炎症性疾病,临床治疗较为棘手^[1,2]。程序性死亡因子-1(programmed death-1, PD-1)及其配体 PD-L1 是近年来发现的负性共刺激分子,能够在 T 细胞成熟、分化及增殖过程中提供负性共刺激信号并抑制免疫应答的活化,参与多种自身免疫疾病的发生、恶性肿瘤细胞的免疫逃逸过程^[3,4]。国内张宏宇^[5]的研究发现,外周血 T 细胞中 PD-1/PD-L1 的高表达与自身免疫性肝炎的发生有关,而临床上中医药对 AIH 的治疗有很大特色,因此,本文研究了本院自创方剂补益方对 AIH 患者外周血 T 细胞中 PD-1/PD-L1 表达量的影响。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选择 2014 年 5 月~2016 年 12 月在我院就诊的 56 例 AIH 患者作为研究对象,所有患者符合自身免疫性肝炎的诊断,血清生化标志物提示肝功能异常,相关自身抗体检测阳性,排除病毒性肝炎、酒精性肝炎、药物性肝炎所引起的肝损伤。56 例患者,采用随机数表法将入组患者分为两组,每组各 28 例。对照组男性 7 例、女性 21 例,年龄 32~61 岁;观察组男性 6 例、女性 22 例,年龄 34~62 岁;两组患者一般资料比较差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。

对照组给予常规免疫治疗,泼尼松 30 mg/d,并于 4 周内逐渐减量为 10 mg/d,同时给予硫唑嘌呤 50 mg/d。观察组在常规免疫治疗基础上给予补益方,方剂组成:党参 9 g、黄芪 9 g、白术 9 g、枸杞子 9 g、当归 9 g、茯苓 9 g、陈皮 6 g、丹参 9 g、麦冬 9 g、甘草 6 g,日一剂,水煎,取汁 200 mL,分早晚 2 次温服。两组均治疗 12 周。

1.2 研究方法

1.2.1 血清采集及指标检测方法 对照组、观察组在治疗前及治疗后 12 周时,分别采集患者的空腹肘静脉血,静置后 3 000 r/min 离心 10 min,分离上层血清后采用全自动生化分析仪测定肝损伤标志物血清中丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、谷氨酰转氨酶(γ -GT)的含量,采用酶联免疫吸附试剂盒测定肝纤维化标志物 III 型前胶原(PC-III)、IV 型胶原(C-IV)、干扰素- γ (interferon, IFN- γ)、及细胞因子白细胞介素(interleukin, IL)-2、IL-4、IL-5、IL-10、IL-17 的含量。

1.2.2 外周血单个核细胞采集及 T 细胞中 PD-1/PD-L1 表达量的检测方法 对照组、观察组在治疗前及治疗后 12 周时,分别采集患者的空腹肘静脉血,EDTA 抗凝后取 50 μ L 全血,分别避光孵育 CD3、CD4、PD-1、PD-L1 的荧光单克隆抗体 30 min,而后加入 450 μ L 红细胞裂解液并孵育 15 min,完全溶血后用 PBS 洗涤、离心 2 遍,最后在流式细胞仪上测定 CD4⁺PD-1⁺、CD4⁺PD-L1⁺ 的荧光强度。

1.3 统计学处理

采用 SPSS17.0 软件录入,治疗前后上述数据的比较采用重复测量方差分析,按照 $P<0.05$ 判断差异有统计学意义。

2 结果

2.1 治疗后两组血清中肝损伤标志物及肝纤维化标志物的含量

治疗后,观察组患者血清中 ALT(U/L)、 γ -GT(U/L)、PC-III (ng/mL)、C-IV (ng/mL) 的含量均显著低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

表 1 两组治疗后血清中肝损伤标志物及肝纤维化标志物的比较($n=28, \bar{x} \pm s$)

组别	肝损伤标志物			肝纤维化标志物	
	ALT	AST	γ -GT	PC-III	C-IV
观察组	44.2 \pm 6.7*	42.8 \pm 7.4	39.4 \pm 5.4*	50.1 \pm 6.7*	53.1 \pm 7.6*
对照组	65.6 \pm 8.9	42.1 \pm 9.2	61.5 \pm 8.3	78.2 \pm 9.4	81.5 \pm 9.1

注:与对照组比较,* $P<0.05$ 。

2.2 治疗后两组患者外周血 T 细胞 PD-1/PD-L1 的表达量

治疗后,观察组患者外周血中 CD4⁺PD-1⁺、CD4⁺PD-L1⁺ T 细胞的荧光强度均显著低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

表 2 两组治疗后外周血 T 细胞中 PD-1/PD-L1 表达量的比较($n=28, \%, \bar{x} \pm s$)

组别	CD4 ⁺ PD-1 ⁺	CD4 ⁺ PD-L1 ⁺
观察组	7.75 \pm 0.93*	10.18 \pm 1.85*
对照组	12.21 \pm 1.67	15.17 \pm 2.04

注:与对照组比较,* $P<0.05$ 。

2.3 治疗后两组血清 T 细胞亚群相关细胞因子的含量

治疗后,观察组患者血清中 IFN- γ 、IL-17 的含量显著低于对照组,IL-4、IL-10 的含量显著高于治疗前,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 3。

表 3 两组治疗后血清中 T 细胞亚群相关细胞因子含量的比较 ($n=28, \text{ng/mL}, \bar{x} \pm s$)

组别	IFN- γ	IL-2	IL-4	IL-5	IL-10	IL-17
观察组	14.08 \pm 1.94*	4.19 \pm 0.66	3.42 \pm 0.58*	6.48 \pm 0.63	22.12 \pm 3.46*	10.39 \pm 1.58*
对照组	18.21 \pm 2.85	4.38 \pm 0.76	2.59 \pm 0.51	6.62 \pm 0.79	12.58 \pm 2.62	15.42 \pm 1.95

注:与对照组比较,* $P<0.05$ 。

3 讨论

AIH 是由自身免疫耐受破坏所引起的一类自身免疫性疾病,自身免疫应答紊乱是其重要的病理特征。PD-1/PD-L1 是具有负性免疫调节作用的共刺激分子,对 T 细胞的分化、成熟、活化、增殖均具有抑制作用^[6,7]。已有研究报道,自身免疫性肝炎患者外周血 CD4⁺ T 淋巴细胞和 CD8⁺ T 淋巴细胞表面 PD-1、PD-L1 的表达量均显著升高^[5],这可能与自身免疫性肝炎病程进展中机体的自身代偿有关。机体的免疫应答机制通过增加 PD-1、PD-L1 的表达来实现对 T 淋巴细胞的负性调控,避免免疫应答过度激活所造成的肝细胞损伤。

T 淋巴细胞含量改变、功能紊乱主要通过多种炎症因子合成和分泌的异常来造成肝细胞损伤,其中 CD4⁺ T 淋巴细胞根据所分泌细胞因子的不同又可以进一步分为 Th1、Th2、Th17、Treg 亚型^[8]。在免疫应答过程中,Th1 与 Th2 细胞相互影响、相互作用,而 Th17 与 Treg 细胞相互影响、相互作用^[9,10]。Th1 细胞主要分泌 IFN- γ 、IL-2, Th2 细胞主要分泌 IL-4、IL-5,前者介导细胞免疫应答、后者介导体液免疫应答^[11]。Treg 主要分泌 IL-10 并对免疫应答起到抑制作用,Th17 细胞主要分泌 IL-17 并且能够介导组织的免疫性损伤^[12]。已有研究报道,Th1、Th17 细胞功能增强,Th2、Treg 细胞功能减弱与自身免疫性肝炎的病情发展变化密切相关^[13-15]。

AIH 应归属于中医“胁痛”、“积聚”等范畴。“正气存内,邪不可干”,中医辨证认为其发病以本虚为主,正气亏虚或素体本虚,致脏腑功能失调,精气亏虚,气血津液耗损而发病。补益方中以党参、黄芪、当归、丹参补气和血,白术、茯苓、枸杞健脾补肾,佐以麦冬滋阴、陈皮理气,甘草调和药性,气血调和,诸脏平顺,故可扶正驱邪。本研究也表明,补益方能够抑制 CD4⁺ T 淋巴细胞表面 PD-1、PD-L1 的表达,纠正 Th1、Th2、Th17、Treg 亚型相关细胞因子的分泌,有效减轻肝损伤及肝纤维化,促进肝细胞恢复。

参考文献

1 Nielsen PR, Benros ME, Dalsgaard S. Associations between

autoimmune diseases and attention-deficit/hyperactivity disorder: a nationwide study[J]. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 2017, 56(3): 234-240.

2 Bersanelli M, Buti S. From targeting the tumor to targeting the immune system: Transversal challenges in oncology with the inhibition of the PD-1/PD-L1 axis[J]. *World J Clin Oncol*, 2017, 8(1):37-53.

3 Brogden KA, Vali S, Abbasi T. PD-L1 is a diverse molecule regulating both tumor-intrinsic signaling and adaptive immunosuppression[J]. *Transl Cancer Res*, 2016, 5(Suppl 7):S1396-S1399.

4 Aarslev K, Dige A, Greisen SR, et al. Soluble programmed death-1 levels are associated with disease activity and treatment response in patients with autoimmune hepatitis[J]. *Scand J Gastroenterol*, 2017, 52(1): 93-99.

5 张宏宇, 张晓刚, 何梅芳, 等. PD-1/PD-L1 在自身免疫性肝炎患者外周血 T 淋巴细胞中的表达及意义[J]. *广东医学*, 2016, 37(1):101-103.

6 Aizawa Y, Hokari A. Autoimmune hepatitis: current challenges and future prospects[J]. *Clin Exp Gastroenterol*, 2017, 19(10): 9-18.

7 Zamani MR, Aslani S, Salmaninejad A, et al. PD-1/PD-L and autoimmunity: A growing relationship [J]. *Cell Immunol*, 2016, 310:27-41.

8 吴丽阳, 李象霖. 自身免疫性肝炎患者 CD4⁺ T 细胞及其细胞因子的表达水平及意义[J]. *临床荟萃*, 2014, 29(2):202-203.

9 Arterbery AS, Osafo-Addo A, Avitzur Y, et al. Production of proinflammatory cytokines by monocytes in liver-transplanted recipients with de novo autoimmune hepatitis is enhanced and induces TH1-like regulatory T cells[J]. *J Immunol*, 2016, 196(10): 4040-4051.

10 Liu B, Gao W, Zhang L, et al. Th17/Treg imbalance and increased interleukin-21 are associated with liver injury in patients with chronic severe hepatitis B [J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 46: 48-55.

11 Liberal R, Grant CR, Holder BS, et al. In autoimmune hepatitis type 1 or the autoimmune hepatitis-sclerosing cholangitis variant defective regulatory T-cell responsiveness to IL-2 results in low IL-10 production and impaired suppression[J]. *Hepatology*, 2015, 62(3):863-875.

12 Behairy BE, El-Araby HA, Abd El Kader HH, et al. Assessment of intrahepatic regulatory T cells in children with autoimmune hepatitis[J]. *Ann Hepatol*, 2016, 15(5):682-690.

13 Montano-Loza AJ, Thandassery RB, Czaja AJ. Targeting Hepatic Fibrosis in Autoimmune Hepatitis[J]. *Dig Dis Sci*, 2016, 61(11): 3118-3139.

14 张沛枫, 赵云. Th22、Th1 细胞在乙型肝炎中表达及其意义[J]. *交通医学*, 2017, 31(1): 13-16.

15 乔兵, 周振华, 李曼, 等. 补肾方对 ConA 诱导的慢性肝损伤小鼠模型肝组织 Th1/Th2 作用的研究[J]. *中华中医药杂志*, 2017, 32(2):841-844.