

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.05.005

## Th17 细胞在乙型肝炎病毒相关性肝病中的表达及意义\*

陈梅, 郭晓云<sup>△</sup>, 姜海行, 王家旭, 卢东红, 岑瑜, 陶霖  
(广西医科大学第一附属医院消化内科, 广西南宁 530021)

**[摘要]** **目的** 探讨 Th17 细胞在乙型肝炎病毒(HBV)相关性肝病中的表达及相互关系。**方法** 收集慢性乙型肝炎(CHB)患者 21 例(CHB 组)、HBV 相关性肝硬化患者 36 例(LC 组)及健康对照者 20 例(HC 组)。应用流式细胞术检测外周血 Th17 细胞频率;酶联免疫吸附测定(ELISA)检测血浆白细胞介素 17(IL-17)水平;实时荧光定量 PCR 法检测肝组织中 IL-17mRNA 的表达;免疫组织化学染色检测肝脏组织中  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)的表达和分布。**结果** LC 和 CHB 组外周血单个核细胞(PBMC)中 Th17 细胞频率、血浆 IL-17 水平均明显高于 HC 组( $P < 0.01$ ),且外周血中 Th17 频率与对应血浆 IL-17 水平呈正相关( $r = 0.430, 0.660, P = 0.009, 0.001$ );LC 组患者肝组织中 IL-17 mRNA 水平、 $\alpha$ -SMA 表达量均明显高于 HC 组( $P < 0.01$ ),且  $\alpha$ -SMA 的表达与肝脏炎症程度( $r = 0.602, P = 0.014$ )和纤维化分期( $r = 0.506, P = 0.045$ )呈正相关。**结论** Th17 细胞可能参与了 HBV 相关性肝硬化的发生和发展。

**[关键词]** Th17 细胞;白细胞介素 17;肝硬化;肝炎,乙型,慢性

**[中图分类号]** R392.3;R575.1

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2016)05-0592-03

### Expression of Th17 cells in patients with hepatitis B virus-associated liver disease and its significance\*

Chen Mei, Guo Xiaoyun<sup>△</sup>, Jiang Haixing, Wang Jiaxu, Lu Donghong, Cen Yu, Tao Lin  
(Department of Gastroenterology, First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China)

**[Abstract]** **Objective** To explore the expression of Th17 cells in the patients with hepatitis B virus(HBV)-associated liver disease and its mutual relation. **Methods** 21 patients with chronic hepatitis B(CHB), 36 patients with HBV-associated liver cirrhosis(LC) and 20 healthy controls(HC) were collected. The flow cytometry was employed to determine the Th17 frequency in peripheral blood; the plasma interleukin-17(IL-17) level was measured by the enzyme linked immunosorbent assay(ELISA); the real-time fluorescence quantitative PCR was used to determine the expression of IL-17 mRNA in liver tissue; the immunohistochemical method was used to measure the expression and distribution of  $\alpha$ -smooth muscle actin( $\alpha$ -SMA) in liver tissue. **Results** The peripheral blood mononuclear cell Th17 frequencies and plasma levels of IL-17 in the LC and CHB groups were significantly higher than those in the HC group( $P < 0.01$ ), moreover the peripheral blood Th17 cells frequency was positively correlated with corresponding plasma IL-17 level in the LC group( $r = 0.430, P = 0.009$ ) and the CHB group( $r = 0.660, P = 0.001$ ); the liver tissue IL-17mRNA and  $\alpha$ -SMA expression levels in the LC group were significantly higher than those in the HC group( $P < 0.01$ ), moreover the expression of  $\alpha$ -SMA was positively correlated with the degree of hepatic inflammation( $r = 0.602, P = 0.014$ ) and the stage of hepatic fibrosis( $r = 0.506, P = 0.045$ ). **Conclusion** Th17 cells could be involved in the occurrence and development of HBV-associated liver disease.

**[Key words]** Th17 cells; interleukin-17; liver cirrhosis; hepatitis, B type, chronic

乙型肝炎为世界范围内的病毒感染性疾病,约 10% 的感染者疾病呈慢性状态,且可进展为肝硬化和肝细胞癌,严重危害人民健康。有研究表明,CD4<sup>+</sup> T 细胞介导的获得性免疫应答在乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染所致的肝细胞损伤和肝组织炎症的发病机制中起重要作用<sup>[1]</sup>。Th17 细胞是近年来发现的一群独立于 Th1、Th2 细胞的效应性 T 细胞亚群,以产生大量白细胞介素 17(IL-17)为特征<sup>[2-3]</sup>,在自身免疫性疾病、感染及肿瘤中起重要作用。最新研究显示, Th17 细胞参与肝脏疾病的发生、发展,包括酒精性肝病、急慢性乙型肝炎、慢加急性肝衰竭、肝癌等疾病<sup>[4-7]</sup>,然而对其在 HBV 相关性肝硬化患者中的表达和作用,目前的报道很少,其具体作用机制也未完全阐明。本研究收集了健康者、慢性乙型肝炎(CHB)和 HBV 相关性肝硬化患者外周血和肝组织标本,通过

检测外周血 Th17 细胞、血浆 IL-17 以及肝内  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA)、IL-17mRNA 的表达情况,以探讨 Th17 细胞及其细胞因子与 HBV 相关性肝硬化的关系及可能的作用机制。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 收集本院 2012 年 10 月至 2014 年 5 月住院的 CHB 患者 21 例(CHB 组),其中,男 14 例,女 7 例;年龄 18~71 岁,中位年龄 34.00 岁。HBV 相关性肝硬化患者 36 例(LC 组),其中,男 28 例,女 8 例;年龄 27~71 岁,中位年龄 48.50 岁。诊断符合 2010 年版 CHB 防治指南<sup>[8]</sup>,所有患者入组前 6 个月内未接受抗病毒及免疫调节治疗;并排除合并 HIV 感染,其他病毒性肝炎,酒精性肝病,自身免疫性疾病及其他系统严重疾病的患者。另收集健康对照者 20 例(HC 组),其中,男

\* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81260083);广西自然科学基金资助项目(2014GXNSFAA118203);广西高校科学研究项目(KY2015YB069);广西卫生厅重点学科普通外科学实验室及中央财政支持地方高校发展专项资金(肝病外科重点学科)资助项目。 作者简介:陈梅(1988—),在读硕士研究生,主要从事免疫细胞对肝纤维化影响的研究。 <sup>△</sup> 通讯作者, Tel:13977121496; E-mail: withoutgloom@sohu.com。

12 名,女 8 名;年龄 24~45 岁,中位年龄 35.50 岁,均无肝炎病史,HBV 血清学标志物均阴性,肝功能各项指标正常。研究经本院伦理委员会批准,所有入选对象均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂与仪器 主要试剂:IFN- $\gamma$ -AF488、IL-17-AF647、IL-22-PE、CD4-PerCP-Cy5.5 抗体及同型对照抗体、固定破膜剂、莫能霉素、溶血素购自美国 BD 公司,佛波醇乙酯(PMA)、离子霉素购自美国 Sigma 公司,IL-17 ELISA 试剂盒购自北京欣博盛生物科技有限公司。TRIZOL 试剂购自美国 Invitrogen 公司,逆转录试剂盒、实时荧光定量 PCR 试剂盒购自美国 Roche 公司。主要仪器:流式细胞仪(美国 BD 公司),ABI 7500 实时荧光定量 PCR 反应仪,7600 型全自动生化分析仪(日本日立公司),SYM-Bio 半自动免疫分析仪及 DA-7600 实时荧光定量扩增仪。

1.2.2 流式细胞术检测外周血 Th17 细胞频率 用肝素抗凝真空采血管采集静脉血 3 mL,取 300  $\mu$ L 全血,加入十四烷酸 PMA 50 ng/mL、离子霉素 1  $\mu$ g/mL、莫能霉素 0.7  $\mu$ g/mL,放入含 5%CO<sub>2</sub> 培养箱孵育 5 h。然后加入 CD4-PerCP-Cy5.5 抗体 5  $\mu$ L,室温避光孵育 20 min。加入 1 $\times$ 溶血素,混匀,室温避光孵育 10 min。300 $\times$ g 离心 5 min,弃上清液,加入 250  $\mu$ L 固定破膜剂充分混匀,室温避光孵育 25 min,500 $\times$ g 离心 5 min,弃上清液,将其分两管,实验管加入 IL-17-AF647 抗体、IFN- $\gamma$ -AF488 抗体、IL-22-PE 抗体,对照管加入同型对照抗体,室温避光孵育 30 min 后,用 1%多聚甲醛 300  $\mu$ L 固定,24 h 内上机检测。所有制备好的样本均应用流式细胞仪进行检测,采用 FlowJo7.6.1 软件进行分析。CD4<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>-</sup>IL17<sup>+</sup>IL-22<sup>-</sup>定义为 Th17 细胞。

1.2.3 ELISA 检测血浆 IL-17 水平 将前述剩余的血离心取血浆,并保存于 -80  $^{\circ}$ C 冰箱。血浆 IL-17 的表达水平通过 ELISA 来检测,严格按照说明书进行。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 检测肝组织中 IL-17mRNA 的表达 肝组织取自 20 例 LC 组患者,为临床诊断肝硬化并同意行肝活检者;12 例正常对照(HC 组),为肝血管瘤、肝囊肿等良性病变患者外科手术中切除的正常肝组织。新鲜肝组织取材后立即放入液氮中转移,保存于 -80  $^{\circ}$ C 冰箱备用。以 TRIZOL 试剂提取肝组织总 RNA,应用逆转录试剂盒合成 cDNA,产物迅速冰浴后 -20  $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。实时荧光定量 PCR 扩增 IL-17 mRNA。以 3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)作为内参照基因。IL-17 引物序列:F-CTC TGT GAT CTG GGA GGC AAA,R-CTC TTG CTG GAT GGG GAC A;GAPDH 引物序列:F-GCA CCG TCA AGG CTG AGA AC,R-TGG TGA AGA CGC CAG TGG A。用 2<sup>- $\Delta\Delta$ C<sub>t</sub></sup> 值表示 mRNA 的相

对表达量。

1.2.5 肝组织 HE 和 Masson 染色 新鲜肝组织(来源同 1.2.4)取材后立即固定于 4%甲醛溶液中,24 h 内制作成蜡块。蜡块连续切片,常规 HE 和 Masson 染色,光学显微镜下观察并行 Scheuer 评分<sup>[9]</sup>。炎症活动度分为 G<sub>0</sub>~G<sub>4</sub>,纤维化程度分为 S<sub>0</sub>~S<sub>4</sub>。

1.2.6 免疫组织化学染色检测肝脏组织中  $\alpha$ -SMA 的表达 肝组织(来源同 1.2.4)石蜡包埋标本 3  $\mu$ m 厚连续切片,采用 SP 法,切片、脱蜡、水化、抗原修复、第一抗体温育、第二抗体温育、二氨基联苯胺显色、苏木精复染、脱水、透明、封片后于显微镜下观察。以 PBS 代替第一抗体作为空白对照。胞浆呈棕黄色为阳性细胞。每个标本由两名独立观察员计算 5 个不同高倍视野( $\times$ 400),使用 Image proplus6.0 图像分析系统半定量测定  $\alpha$ -SMA 的表达,计算平均光密度(average optical density, AOD)值。

1.2.7 血清学指标的检测 全自动生化仪检测 ALT、TBIL 等肝功能指标,SYM-Bio 半自动免疫分析仪检测 HBV 血清学标志物及 DA-7600 实时荧光定量扩增仪检测 HBV DNA 载量。

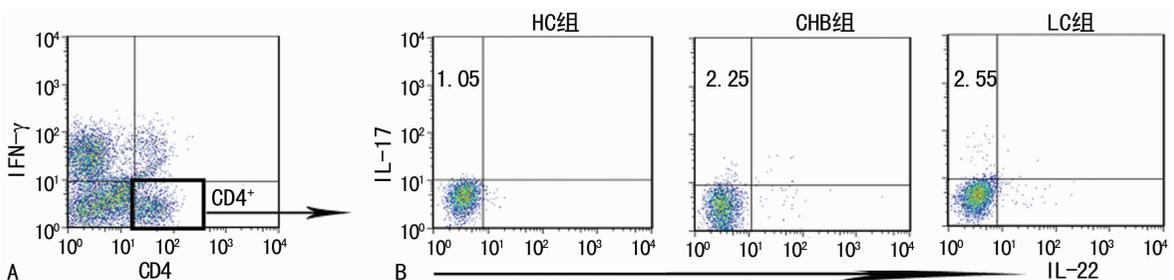
1.3 统计学处理 采用 SPSS16.0 对数据进行分析,结果图用 GraphPad Prism 5.0 软件以  $\bar{x}\pm s$  的形式输出。两组比较采用非配对 *t* 检验,组间比较采用单因素方差分析,相关性分析根据数据类型进行 Pearson 或者 Spearman 相关性分析。以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组对象外周血 Th17 细胞频率比较 采用流式细胞术多色荧光分析法检测外周血 Th17 细胞频率,LC 组、CHB 组和 HC 组外周血 Th17 细胞频率分别为(2.48 $\pm$ 0.34)%、(2.17 $\pm$ 0.39)%和(1.11 $\pm$ 0.24)%,LC 组、CHB 组患者外周血 Th17 细胞频率均高于 HC 组(*P*<0.01),且 LC 组又高于 CHB 组患者(*P*<0.01),见图 1。

2.2 3 组对象血浆 IL-17 水平比较 LC 组、CHB 组患者血浆 IL-17 分别为(32.51 $\pm$ 9.57)、(21.75 $\pm$ 4.68)pg/mL,与 HC 组的(11.73 $\pm$ 3.20)pg/mL 比较,差异均有统计学意义(*P*<0.01),且 LC 组与 CHB 组比较,亦差异有统计学意义(*P*<0.01)。同时分析病例组患者中血浆 IL-17 和外周血 Th17 细胞频率的相关性,发现 LC 组和 CHB 组患者血浆 IL-17 和外周血 Th17 细胞频率均呈正相关,差异均有统计学意义(*r*=0.430、0.660,*P*=0.009、0.001)。

2.3 肝组织中 IL-17mRNA 的表达变化 IL-17 mRNA 在对照组相对表达量设定为 1.00,与对照组比较,LC 组明显升高(3.32 $\pm$ 2.80),差异有统计学意义(*P*<0.01)。



A:CD4<sup>+</sup>T 细胞的设门;B:HC 组、CHB 组、LC 组外周血 Th17 细胞频率的流式图。

图 1 3 组对象外周血 Th17 细胞的频率分布

2.4 肝组织中  $\alpha$ -SMA 的表达 对照组肝组织中  $\alpha$ -SMA 表达

较少,主要分布于血管壁。LC 组患者肝组织中  $\alpha$ -SMA 表达明

显增多,主要集中在门静脉、汇管区及纤维间隔区域内,与肝脏炎症程度( $r=0.602, P=0.014$ )和纤维化分期( $r=0.506, P=0.045$ )呈正相关,且  $\alpha$ -SMA 表达与外周血 Th17 细胞频率呈正相关( $r=0.789, P=0.000$ ),见图 2。

## 2.5 外周血 Th17 细胞频率与血清学指标的相关性 LC 组

患者外周血 Th17 细胞频率与血清 ALT、TBIL 水平及 HBV DNA 载量间均无明显相关性( $r=-0.040, -0.153, 0.177, P>0.05$ );CHB 组患者外周血 Th17 细胞频率与血清 ALT、TBIL 水平及 HBV DNA 载量间也未发现明显相关性( $r=0.264, 0.195, -0.056, P>0.05$ )。

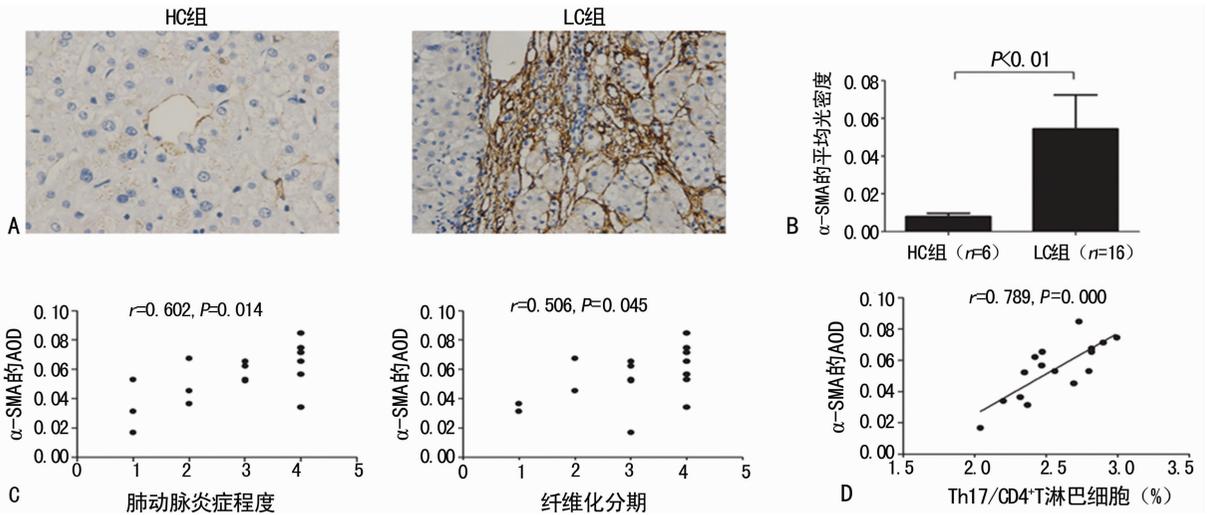


图 2 LC 组患者肝组织中  $\alpha$ -SMA 的表达情况  
A:肝组织  $\alpha$ -SMA 免疫组化情况;B:对照和 LC 组肝组织  $\alpha$ -SMA 表达的比较;C:LC 组肝组织  $\alpha$ -SMA 的 AOD 与肝脏炎症程度和纤维化分期的相关性;D:LC 组肝组织  $\alpha$ -SMA 的 AOD 与外周血 Th17 细胞频率的相关性;\* $P<0.01$ ,与 HC 组比较。

图 2 LC 组患者肝组织中  $\alpha$ -SMA 的表达情况

## 3 讨论

HBV 是一种嗜肝 DNA 病毒,感染人体后可转变为慢性感染,在中国,10%~20% 的 CHB 患者在 5 年内发展为肝硬化<sup>[10]</sup>。肝硬化是临床常见的慢性进行性肝病,由一种或多种病因长期或反复作用形成的弥漫性肝损害,以细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的形成和积聚及肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)的激活为特征<sup>[11-12]</sup>。目前大多数学者认为 HBV 造成的肝脏损伤及转归与机体细胞免疫功能及免疫耐受密切相关<sup>[13]</sup>。CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞是机体免疫应答中的重要部分,在机体免疫调节中发挥关键作用,Th17 细胞是近来发现的一个新的 CD4<sup>+</sup> T 细胞亚群,以分泌大量 IL-17 为特征<sup>[3]</sup>。已有研究表明 Th17 细胞参与多种肝脏疾病的发生发展,但是对于其在 HBV 相关性肝硬化患者中的作用机制还未完全阐明。

Th17 细胞能分泌 IL-17A(即 IL-17)、IL-17F、IL-21、TNF- $\alpha$  等,这些细胞因子诱导其他炎症介质和白细胞(尤其是中性粒细胞)聚集在炎症部位,从而加重炎症<sup>[13-14]</sup>,IL-17 是最重要的效应因子,其受体在体内有广泛表达。IL-17 不仅是一种重要的促炎细胞因子,它还可诱导其他促炎细胞因子(如 IL-6、TNF)、趋化因子和金属蛋白酶表达,加重炎症细胞浸润和组织损伤<sup>[15]</sup>。本研究结果显示,LC 组和 CHB 组患者外周血 Th17 细胞频率和血清 IL-17 水平高于 HC 组,LC 组又明显高于 CHB 组,提示 Th17 细胞可能通过 IL-17 对 HBV 相关性肝病的发生、发展起到了一定的促进作用。

在肝组织中,本研究应用 PCR 的方法检测肝组织 IL-17mRNA 的表达情况,结果显示,LC 组患者肝组织 IL-17mRNA 的相对表达量明显高于对照组,与上述外周血的结果一致。由于 IL-17 是由 Th17 细胞特异性分泌的细胞因子,因此肝内 IL-17 表达水平可反映 Th17 细胞的数量。故研究结果提示,LC 组患者肝内 Th17 细胞数量高于对照组。

肝纤维化是肝脏对慢性损伤的修复反应,以 ECM 异常增

生和过度沉积为特征,肝硬化是肝纤维化发展的晚期阶段。在肝纤维化进展过程中发挥中心作用的是 HSC,其活化和增殖是肝纤维化形成的中心环节<sup>[16]</sup>,而表达  $\alpha$ -SMA 是 HSC 活化的标志。本研究对 LC 组患者肝组织进行  $\alpha$ -SMA 的免疫组化染色,结果显示  $\alpha$ -SMA 的平均光密度在 LC 组明显升高,且与肝脏炎症和纤维化程度呈正相关,说明患者体内炎症反应较明显,肝损伤严重,提示在肝纤维化进展过程中,慢性炎症刺激使 HSC 处于激活状态,而激活的 HSC 不断分泌 ECM,最终形成肝硬化。本研究进一步分析  $\alpha$ -SMA 与外周血 Th17 细胞频率之间有无关联,结果发现呈正相关关系,由此推测 Th17 细胞可能参与 HSC 的激活。

由于 Th17 细胞与肝损伤相关,本研究分析其与血清学指标的相关性,研究结果表明,患者外周血 Th17 细胞频率与肝损伤血清学指标 ALT、TBIL 及 HBV DNA 载量间均无明显相关性,与 Liang 等<sup>[6]</sup>对 CHB 相关参数的分析结果一致。但是 Zhang 等<sup>[5]</sup>的研究结果提示,在 CHB 患者中,外周血 Th17 细胞频率与血清 ALT 及 HBV DNA 载量均呈明显的正相关。对比后发现,其样本例数比较大,而本研究纳入的病例数与 Liang 等<sup>[6]</sup>的研究相近,增大样本量或许可以得出更加符合实际的结果。

综上所述,本研究认为 Th17 细胞在 HBV 相关性肝硬化中起到了重要作用,可能发挥了促进炎症、引起病理损伤的效应,导致肝脏炎症和免疫损伤,参与肝纤维化的发生、发展,但具体作用机制和途径尚未明了。Th17 细胞的研究将来有可能为调节机体免疫、控制疾病进展提供新的治疗靶点。深入研究 Th17 细胞在 HBV 相关性肝硬化中的作用,可能为肝硬化患者的临床治疗提供新的策略。

## 参考文献

[1] Liaw YF,Chu CM. Hepatitis B virus infection(下转第 597 页)

HDV<sup>[14]</sup>、肝细胞生长因子<sup>[15]</sup>等基因在肝脏的表达,结果表明流体力法能非常高效的将这些基因转移到肝脏,并且获得高水平表达。本研究通过流体力法将重组 pcDNA3.1/mB7-H4-Fc 表达载体导入小鼠体内,采用 RT-PCR 和 ELISA 检测法分别在 mRNA 水平和蛋白水平检测 mB7-H4-hIg 在体内的表达水平和表达持续时间。采用建立好的 ELISA 检测技术,测定小鼠可溶性 mB7-H4-hIg 融合蛋白的表达,结果表明,经尾静脉注射的 pcDNA3.1/mB7-H4-Fc 能在体内表达,并且在 48 h 时间点分泌的量达到最高,最大量约 120 ng/mL。采用 RT-PCR 技术,取小鼠肝脏用于总 RNA 提取。结果表明,pcDNA3.1/mB7-H4-Fc 经小鼠尾静脉注射,能够在小鼠肝脏内表达 mB7-H4-Fc 融合基因 mRNA,也在 48 h 达到最高值。这为进一步研究可溶性 mB7-H4-hIg 融合蛋白对 Con A 诱导肝损伤的保护作用奠定基础。

#### 参考文献

- [1] Sica GL, Choi IH, Zhu G, et al. B7-H4, a molecule of the B7 family, negatively regulates T cell immunity[J]. *Immunity*, 2003, 18(6): 849-861.
- [2] He C, Qiao H, Jiang H, et al. Inhibitory role of b7-h4 in antitumor immunity: association with cancer progression and survival[J]. *Clin Dev Immunol*, 2011, 20(11): 695-704.
- [3] Sica GL, Choi IH, Zhu G, et al. B7-H4, a molecule of the B7 family, negatively regulates T cell immunity[J]. *Immunity*, 2003, 18(6): 849-861.
- [4] Wang X, Hao J, Metzger DL, et al. B7-H4 treatment of T cells inhibits ERK, JNK, p38, and AKT activation[J]. *PLoS One*, 2012, 7(1): 28-32.
- [5] Zhu G, Augustine MM, Azuma T, et al. B7-H4-deficient mice display augmented neutrophil-mediated innate immunity[J]. *Blood*, 2009, 113(8): 1759-1767.
- [6] Chen L. Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in

the control of T cell immunity[J]. *Nature Rev Immunol*, 2004, 4(6): 336-347.

- [7] 徐军发,袁春雷,杨衡,等.小鼠 B7-H4 基因克隆及真核表达载体的构建[J]. *细胞与分子免疫学*, 2007, 23(7): 665-667.
- [8] Zhang G, Budkar V, Wolff JA. High levels of foreign gene expression in hepatocytes after tail vein injections of naked plasmid DNA. *Hum Gene Ther*, 2011, 10(10): 1735-1737.
- [9] Zhang LL, Shao SL, Wu Y. Expression of osteopontin and B7-H4 in epithelial ovarian neoplasm and their significance[J]. *Clin J Cancer*, 2010, 29(1): 25-29.
- [10] Arigami T, Uenosono Y, Hirata M, et al. Expression of B7-H4 in blood of patients with gastric cancer predicts tumor progression and prognosis[J]. *Surg Oncol*, 2010, 102(7): 748-752.
- [11] 郭国宁,向强,文亮,等. B7-H4 在类风湿关节炎组织内的表达及分布研究[J]. *现代免疫学*, 2011, 31(2): 130-134.
- [12] 俞大亮,厉小梅,王喜梅,等. 共刺激分子 B7-H4 在狼疮性肾炎肾组织及血清中的表达[J]. *安徽医学*, 2012, 33(7): 793-796.
- [13] Jiang J, Yamato E, Miyazaki J. Intravenous delivery of naked plasmid DNA for in vivo cytokine expression[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 289(5): 1088-1092.
- [14] Jiang J, Yamato E, Miyazaki J. Intravenous delivery of naked plasmid DNA for in vivo cytokine expression[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 289(5): 1088-1092.
- [15] Miao CH, Ohashi K, Patijn GA, et al. Inclusion of the hepatic locus control region, an intron, and untranslated region increases and stabilizes hepatic factor IX gene expression in vivo but not in vitro[J]. *Mol Ther*, 2013, 1(6): 522-532.

(收稿日期:2015-05-08 修回日期:2015-10-16)

(上接第 594 页)

- [1] [J]. *Lancet*, 2009, 373(9663): 582-592.
- [2] Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, et al. Interleukin 17-producing CD4<sup>+</sup> effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages[J]. *Nature Immunol*, 2005, 6(11): 1123-1132.
- [3] Park H, Li Z, Yang XO, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17[J]. *Nature Immunol*, 2005, 6(11): 1133-1141.
- [4] Lemmers A, Moreno C, Gustot T, et al. The interleukin-17 pathway is involved in human alcoholic liver disease[J]. *Hepatology*, 2009, 49(2): 646-657.
- [5] Zhang JY, Zhang Z, Lin F, et al. Interleukin-17-producing CD4<sup>+</sup> T cells increase with severity of liver damage in patients with chronic hepatitis B[J]. *Hepatology*, 2010, 51(1): 81-91.
- [6] Liang XS, Li CZ, Zhou Y, et al. Changes of Treg and Th17 cells balance in the development of acute and chronic hepatitis B virus infection[J]. *BMC Gastroenterol*, 2012, 12(1): 43.
- [7] Zhang JP, Yan J, Xu J, et al. Increased intratumoral IL-17-producing cells correlate with poor survival in hepatocellular carcinoma patients[J]. *J Hepatology*, 2009, 50(5): 980-989.
- [8] 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]. *中国肝脏病杂志*,

2011, 3(1): 40-56.

- [9] Brunt EM. Grading and staging the histopathological lesions of chronic hepatitis: the Knodell histology activity index and beyond[J]. *Hepatology*, 2000, 31(1): 241-246.
- [10] Liu J, Fan D. Hepatitis B in China[J]. *Lancet*, 2007, 369(9573): 1582-1583.
- [11] Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis[J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(2): 209-218.
- [12] Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis[J]. *Gastroenterology*, 2008, 134(6): 1655-1669.
- [13] Ouyang W, Kolls JK, Zheng Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation[J]. *Immunity*, 2008, 28(4): 454-467.
- [14] Dong C. Regulation and pro-inflammatory function of interleukin-17 family cytokines[J]. *Immunol Rev*, 2008, 226(1): 80-86.
- [15] Kolls JK, Linden A. Interleukin-17 Family Members and Inflammation[J]. *Immunity*, 2004, 21(4): 467-476.
- [16] Sarem M, Znaidk R, Macias M, et al. Hepatic stellate cells: its role in normal and pathological conditions[J]. *Gastroentero Hepatol*, 2006, 29(2): 93-101.

(收稿日期:2015-07-13 修回日期:2015-10-25)