DOI:10.16016/j.1000-5404.202005286

白介素25及其相关因子在非酒精性脂肪肝患者血清及肝内的表达及其意义

吴剑平[1*],肖海英[1,2*],郑雪莲[3],张振东[4],章 燕[5],朱 萱[1],汪安江[1] 330006 南昌,南昌大学第一附属医院:消化内科[1],药学部[3],病理科[4],内分泌科[5];330092 南昌,南昌市第三医院消化科[2]

[摘要] **目的** 分析白介素25(interleukin 25,IL-25)及其相关因子在非酒精性脂肪肝(non-alcoholic fatty liver disease,NAFLD)患者血清及肝内的表达并探讨其临床意义。**方法** 纳入2017年9月至2019年2月南昌大学第一附属医院符合NAFLD诊断标准的患者50例,并纳入行部分肝切除的肝血管瘤或肝囊肿患者20例作为对照组。采用ELISA检测患者血清IL-25等细胞因子水平。选取对照组6例和NAFLD患者12例分别通过实时荧光定量PCR法检测肝内IL-25等细胞因子的mRNA表达,采用免疫组化/免疫荧光检测患者肝内IL-25水平和巨噬细胞标记物CD68、M2型巨噬细胞标记物CD206、谷氨酰胺酶转氨酶(glutaminase transaminase,TGM)2蛋白表达。**结果** ①与对照组相比,NAFLD组患者血清IL-25($P=0.003$)、IL-13($P=0.007$)及IL-4($P=0.001$)水平明显降低;②与对照组相比,NAFLD患者肝内IL-13($P=0.007$)及IL-4($P=0.003$)mRNA表达明显降低,CD68 mRNA表达明显升高($P<0.001$);③与对照组相比,NAFLD患者肝内枯否细胞数量更多($P<0.001$),M2型巨噬细胞数量减少($P<0.001$),IL-25($P<0.001$)蛋白水平更低。随着肝脏脂肪变程度的加重,肝内枯否细胞数量逐渐增加($P<0.001$),M2型巨噬细胞数量逐渐减少($P<0.001$),IL-25蛋白表达逐渐减少($P<0.001$)。**结论** NAFLD患者血清和肝组织IL-25、Th2型细胞因子和肝内M2型巨噬细胞明显减少,且与肝脏脂肪变的严重程度呈负相关。

[关键词] 白介素25;非酒精性脂肪性肝;M2型巨噬细胞;Th2型免疫反应

[中图法分类号] R329.26;R446.11;R575.5 [文献标志码] A

Expression and significance of interleukin 25 and its related factors in serum and liver of patients with non-alcoholic fatty liver

WU Jianping[1], XIAO Haiying[1,2], ZHENG Xuelian[3], ZHANG Zhendong[4], ZHANG Yan[5], ZHU Xuan[1], WANG Anjiang[1] [1]Department of Gastroenterology, [3]Department of Pharmacy, [4]Department of Pathology, [5]Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi Province, 330006; [2]Department of Gastroenterology, Nanchang Third Hospital, Nanchang, Jiangxi Province, 330092, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the expression levels of interleukin 25 (IL-25) and its related factors in the serum and liver of patients with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and explore the significance. **Methods** Between September 2017 and February 2019, NAFLD patients ($n=50$) who met the criteria of the disease and control patients ($n=20$) who undergoing partial hepatectomy due to hepatic hemangioma or hepatic cyst in the First Affiliated Hospital of Nanchang University were enrolled in this study. Serum levels of IL-25 and other cytokines were detected by ELISA. Then 6 patients in control group and 12

[基金项目] 国家自然科学基金地区科学基金(81460122);江西省杰出青年人才资助计划(20171BCB23085);江西省研究生创新基金(YC2018-S095)

* 同等贡献者

[通信作者] 汪安江,E-mail:waj1103@163.com

1000-5404/Copyright © 2021,陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循CC BY许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

patients in NAFLD group were chosen to analyze hepatic mRNA expression levels of IL-25 and other cytokines by real-time fluorescent quantitative PCR, and protein levels of IL-25, CD68 (macrophage marker), CD206 (M2 macrophage marker) and glutaminase transaminase 2 (TGM2) by immunohistochemistry or immunofluorescence assay. **Results** ① Compared with the patients in control group, those of the NAFLD group had significantly reduced serum levels of IL-25 ($P=0.003$), IL-13 ($P=0.007$) and IL-4 ($P=0.001$). ② The mRNA levels of IL-13 ($P=0.007$) and IL-4 ($P=0.003$) in the liver of NAFLD patients were also obviously lower while that of CD68 ($P<0.001$) was higher than those in the control group. ③ The NAFLD patients had more Küpffer cells ($P<0.001$), fewer M2 macrophages ($P<0.001$) and lower level of IL-25 ($P<0.001$) in the liver than the patietns of the control group. With the aggravation of hepatic steatosis, the number of Küpffer cells was increased gradually ($P<0.001$), while that of M2 macrophages ($P<0.001$) and the level of IL-25 ($P<0.001$) was decreased gradually. **Conclusion** The serum levels and liver contents of IL-25, Th2 type cytokine and intrahepatic M2 type macrophages are significantly reduced in the NAFLD patients, and these indicators are negatively correlated with the severity of liver steatosis.

[**Key words**] interleukin 25; non-alcoholic fatty liver disease; M2 macrophages; Th2 immune response

Supported by the Regional Program of National Natural Science Foundation of China (81460122), the Outstanding Young Talents Foundation of Jiangxi Province (20171BCB23085), and the Postgraduate Innovation Fund of Jiangxi Province (YC2018-S095). WU Jianping and XIAO Haiying contributed equally to the article. Corresponding author: WANG Anjiang, E-mail: waj1103@163.com

非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)是指无过量饮酒史,以肝脏脂肪变性和脂肪贮积为特征的临床病理综合征,其疾病谱包括单纯性脂肪肝、非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis,NASH)、非酒精性脂肪性肝纤维化、肝硬化和肝细胞癌。目前该病在全球成年人患病率约为25%,且NASH患病率为3%~5%,已成为发达国家的第一大慢性肝病。在我国该病发病率逐年升高,且发病呈年轻化趋势,也已经成为慢性肝病的最常见原因之一[1-2]。NAFLD发病机制尚不未完全阐明,目前考虑是多因素共同作用所致,如胰岛素抵抗、氧化应激、遗传决定因素、营养和生活方式、内质网应激、炎症和肠道微生物群和免疫相关炎症等[3],且尚缺乏有效且安全的治疗药物。

白介素25(interleukin 25,IL-25)是新发现的一种细胞因子,主要来源于Th2型细胞、肥大细胞、嗜酸性或嗜碱性粒细胞、肺泡巨噬细胞、树突状细胞和乳腺上皮细胞等,作用于基质细胞、先天免疫细胞和适应性免疫细胞,协调Th2型免疫反应。IL-25可诱导固有淋巴样2型细胞产生IL-4、IL-5、IL-13等Th2型细胞因子,还可在$CD4^+$ T细胞簇的参与下诱导Th细胞分化为Th2细胞[4-5]。研究表明IL-25可抑制Th1和Th17细胞因子的促炎作用,调节脂肪代谢[6],诱导巨噬细胞向M2型转化,增强巨噬细胞对脂肪的摄取,促进脂肪分解,抑制脂肪合成,也能改变脂滴相关蛋白的表达和调节脂质代谢[7]。我们前期动物实验发现IL-25可通过IL25/IL13/STAT6轴促进NAFLD小鼠体内M2a型巨噬细胞的分化,并促进肝细胞脂质分解,抑制脂质合成[8-9]。IL-25还可通过减少小鼠肠道内分节丝状菌的含量抑制小鼠肝脂肪变[10]。但IL-25与NAFLD肝脂肪变及肝内M2型巨噬细胞的关系在人体内尚未得到证实。本研究拟观察和比较NAFLD和对照组患者体内白介素25及其相关细胞因子和M2型巨噬细胞表达水平,为未来开发IL-25作为NAFLD新型药物提供参考。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选择2017年9月至2019年2月南昌大学第一附属医院经B超或CT检查诊断、符合现行NAFLD诊断标准[11]患者,并同时纳入本院肝胆外科拟行部分肝切除的肝血管瘤或肝囊肿患者作为对照组。NAFLD组排除标准:①需要放化疗或最近1年服用过免疫调节药物、自身免疫性疾病、结缔组织疾病等影响体内IL-25水平的疾病;②存在肝活检禁忌证(血小板低下、凝血功能障碍、孕妇等);③拒绝加入研究。对照组患者除在临床上排除NAFLD诊断外,其余排除标准同NAFLD组。本研究通过南昌大学第一附属医院医学伦理委员会审批(2015-007),患者均签署知情同意书。

1.2 资料收集

所有患者在空腹时抽静脉血 4 mL,离心后取血清备用。选取肝功能异常的 NAFLD 患者行肝活检,采用 16 号肝活检针,B 超引导活检术,获取的肝组织其中一条立即置于 10% 中性甲醛溶液内固定,改良法脱水、包埋、切片后保存。另一条立即置于 RNA 保护液中并液氮保存,随后立即转存于-80 ℃低温冰箱。在对照组中选择肝巨大血管瘤或肝巨大囊肿行手术切除的患者血管瘤前或囊肿病变周边正常肝组织 2 块(直径 1~2 cm),一块在离体后立即置于 RNA 保护液中并液氮保存,随后立即转存于-80 ℃低温冰箱。另一块立即以 10%中性甲醛浸泡,改良法脱水、包埋、切片后保存。

1.3 方法

1.3.1 主要试剂 IL-25、IL-13、IL-10、IL-5、IL-4 ELISA 试剂盒购于 Elabscience 公司;IL-25、CD68、TGM2、CD206 抗体试剂盒购于英国 Abcam 公司;Polymer 双染检测试剂盒购于北京中杉金桥生物技术公司;HE 染色试剂盒购于北京索莱宝科技有限公司;浓缩型正常山羊血清(封闭)及荧光(CY3)标记羊抗兔 IgG 均购于武汉博士德生物工程有限公司。

1.3.2 血清 IL-25、IL-13、IL-10、IL-5、IL-4 水平检测

采用 ELISA 法检测,严格按说明书操作进行,并用用酶标仪在 450 nm 波长测量每孔光密度值 $D(450)$。

1.3.3 肝组织病理学检查 将石蜡固定的肝组织切片,行 HE 染色;根据 Kleiner 系统对载玻片进行肝脏脂肪变性分级[12]。根据脂质在肝细胞中的积累程度(<5%计 0 分,5%~33%计 1 分,34%~66%计 2 分,>66%计 3 分)来评定肝脏脂肪变性的程度。根据评分将 NAFLD 分为轻度脂肪变(0~1 分)和中重度脂肪变(2~3 分)。

1.3.4 免疫组化或免疫荧光检测肝内 IL-25、CD68,CD206 和谷氨酰胺酶转氨酶(glutaminase transaminase,TGM)2 蛋白水平 免疫组化:将石蜡固定的肝组织脱蜡水化,通过柠檬酸液(pH=6.0)高压锅内抗原修复,0.3%H_2O_2 和 80%甲醇溶液阻断内源性过氧化物酶封闭非特异性抗原,一抗,二抗,DAB 显色,苏木精复染,以 PBS 代替一抗作阴性对照,通过 CD68 检测枯否细胞[13],使用 Image J 软件评估肝内枯否细胞(CD68 阳性细胞)数量。

免疫双染(CD206、TGM2):按上述步骤完成二抗后,失活第一重染色,再进行一抗,二抗,Polymer 双染检测试剂显色、复染及分化、观察。本研究通过 CD206 及 TGM2 检测 M2 型巨噬细胞数量[13],采用 Image J 软件评估肝内 M2 型巨噬细胞(CD206/TGM2 双染阳性细胞)数量。

免疫荧光:将石蜡固定的肝组织脱蜡水化,通过 0.01 mol/L 枸橼酸缓冲液微波抗原修复:进行血清封闭,加一抗。暗处加荧光(FITC)二抗及复染核,荧光显微镜下观察,并采集图像。采用 Image J 软件评估 IL-25 阳性区域。

1.3.5 实时荧光定量 PCR 检测肝内 IL-25、IL-13、IL-10、IL-5、IL-4、CD68、CD206、TGM2 细胞因子 mRNA 表达 通过 TRIzol 法提取肝组织总 RNA,并进行 RNA 样品的检测。按照反转录及荧光定量试剂盒说明书,将提取的 mRNA 逆转录成 cDNA,将 IL-25、IL-13、IL-10、IL-5、IL-4、CD68、CD206 和 TGM2 进行 PCR 扩增,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对定量结果进行分析,获得上述基因 mRNA 的相对表达量。PCR 条件为 50 ℃ 2 min,95 ℃ 预变性 10 min;95 ℃变性 30 s,60 ℃退火 30 s,共 40 个循环。实验引物及内参 β-actin 的设计与合成由武汉巴菲尔生物科技有限公司完成。引物序列如表 1 所示。

表 1 基因引物序列

基因	引物序列	产物长度/bp
IL-10	正向:5′-TGCTGGAGGACTTTAAGGGT-3′ 反向:5′-ACGGCCTTGCTCTTGTTTTC-3′	208
IL-4	正向:5′-TCTCACCTCCCAACTGCTTC-3′ 反向:5′-GTGTTCTTGGAGGCAGCAAA-3′	183
IL-5	正向:5′-GAGACCTTGGCACTGCTTTC-3′ 反向:5′-TCCGTCTTTCTTCTCCACACT-3′	238
IL-13	正向:5′-ATGGTATGGAGCATCAACCT-3′ 反向:5′-TCAGCATCCTCTGGGTCTT-3′	106
IL-25	正向:5′-TTGGCAATGGTCATGGGAAC-3′ 反向:5′-CCATCTTCACTGGCCCTACA-3′	170
CD68	正向:5′-ATGGCGGTGGAGTACAATG-3′ 反向:5′-TGATGAGAGGCAGCAAGATG-3′	256
TGM2	正向:5′-GCCGAGAAGGAGGAGACAGG-3′ 反向:5′-AGCGGTGTTGTTGGTGATGTG-3′	105
CD206	正向:5′-GCTACTGAACCCCCACAAC-3′ 反向:5′-GGAAACCAGAGAGGAACCC-3′	159
β-actin	正向:5′-AGCGAGCATCCCCCAAAGTT-3′ 反向:5′-GGGCACGAAGGCTCATCATT-3′	286

1.4 统计学分析

采用 SPSS 23.0 统计软件。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较采用 Student's t 检验,多组间采用单因素方差分析,方差齐时采用 F 检验,随后用最小显著性差异法(least-significant difference,

LSD 法)进行两两比较,方差不齐时采用 Welch 检验,随后用 Dunnett' T3 法进行两两比较,不符合正态分布的资料采用秩和检验。计数资料组间比较采用 χ^2 检验。分类作图采用 Prism Graphpad 6.0 软件完成,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 患者一般资料

于 2017 年 9 月至 2019 年 2 月连续纳入南昌大学第一附属医院符合 NAFLD 诊断标准的患者和对照组患者。其中 NAFLD 患者 50 例,包括男性 28 例,女性 22 例,年龄(47±13)岁。对照组纳入 20 例,男性 11 例,女性 9 例,年龄(48±13)岁,两组平均年龄($t=-0.24$,$P=0.786$)及性别比例($\chi^2=0.01$,$P=0.939$)差异无统计学意义。

2.2 两组患者血清 IL-25 水平

与对照组相比,NAFLD 组患者血清 IL-25($P=0.003$)、IL-13($P=0.007$)及 IL-4($P=0.001$)水平明显降低;IL-10 及 IL-5 血清水平偏低,但差异无统计学意义(表 2)。

2.3 NAFLD 患者和对照组患者肝组织 IL-25 mRNA 水平

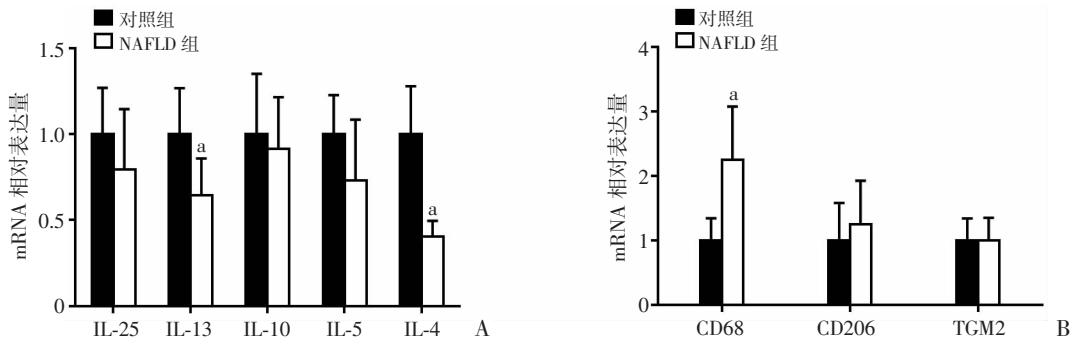
与对照组($n=6$)相比,NAFLD 组($n=12$)肝组织 IL-13 和 IL-4 mRNA 表达明显降低($P=0.007$、0.003),而 CD68 mRNA 表达明显增高($P<0.001$);肝组织 IL-25、IL-5、IL-10 和 TGM2 的 mRNA 表达比对照组降低,但差异无统计学意义(图 1)。

2.4 两组患者肝脏组织学形态及肝组织 IL-25 表达、枯否细胞数量、M2 型巨噬细胞数量

获取我院肝胆外科拟行部分肝切除的肝血管瘤或肝囊肿患者正常肝组织作为对照组 6 例,根据肝脏脂肪变性分级将 NAFLD 组 12 例患者分为轻度脂肪变 6 例和中重度脂肪变 6 例。轻度脂肪变组和中度脂肪变组评分比较差异有统计学意义[(1.50±0.55) *vs* (2.67±0.52)分,95%*CI*:0.93~2.07 *vs* 2.12~3.21,$P=0.004$];肝组织免疫组化分析显示(图 2):3 组间肝内枯否细胞、M 型巨噬细胞比较差异有统计学意义($F=302.57$、802.47,$P<0.001$)。NAFLD 组患者肝内枯否细胞数量百分比明显高于对照组,M2 型巨噬细胞数量百分比(CD206/TGM2 双染阳性细胞)低于对照组;与轻度脂肪变 NAFLD 患者相比,中重度脂肪变 NAFLD 患者肝内枯否细胞数量百分比更高[(3.51±0.21)% *vs* (6.87±0.84)% *vs* (10.92±1.03)%,95%*CI*:3.30%~3.73%、6.00%~7.75%、9.84%~12.00%,$P<0.001$],M2 型巨噬细胞数量百分比更低[(8.69±0.23)% *vs* (5.78±0.31)% *vs* (2.75±0.22)%,95%*CI*:8.44%~8.93%、5.46%~6.11%、2.52%~2.97%,$P<0.001$]。

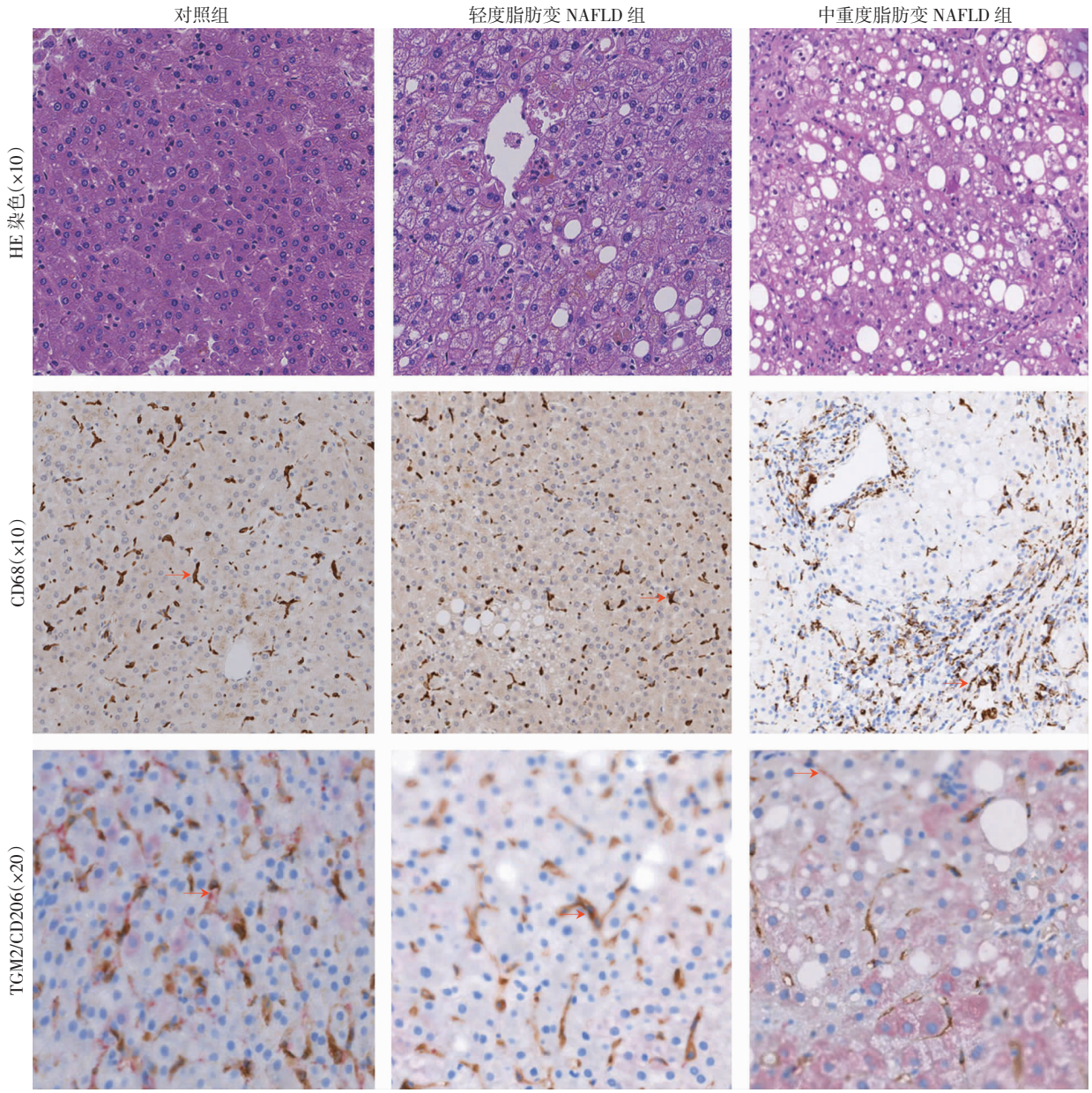
表 2 两组患者血清 IL-25 及相关细胞因子水平(pg/mL,$\bar{x}\pm s$)

组别	n	IL-25	IL-13	IL-10	IL-5	IL-4
对照组	20	26.51±5.84	16.84±3.03	8.39±2.26	15.75±6.44	45.43±11.15
NAFLD 组	50	22.82±3.91	13.88±4.34	7.59±1.49	14.18±4.39	35.96±9.48
t 值		−3.07	−2.79	−1.74	−1.17	−3.59
P 值		0.003	0.007	0.086	0.246	0.001



a:$P<0.01$,与对照组比较

图 1 两组患者肝组织中 IL-25、Th2 型免疫相关细胞因子(A)和巨噬细胞标志物(B)mRNA 表达



CD68 是巨噬细胞表面标记物,TGM2 和 CD206 是 M2 巨噬细胞的表面标记物;红色箭头示阳性染色区域

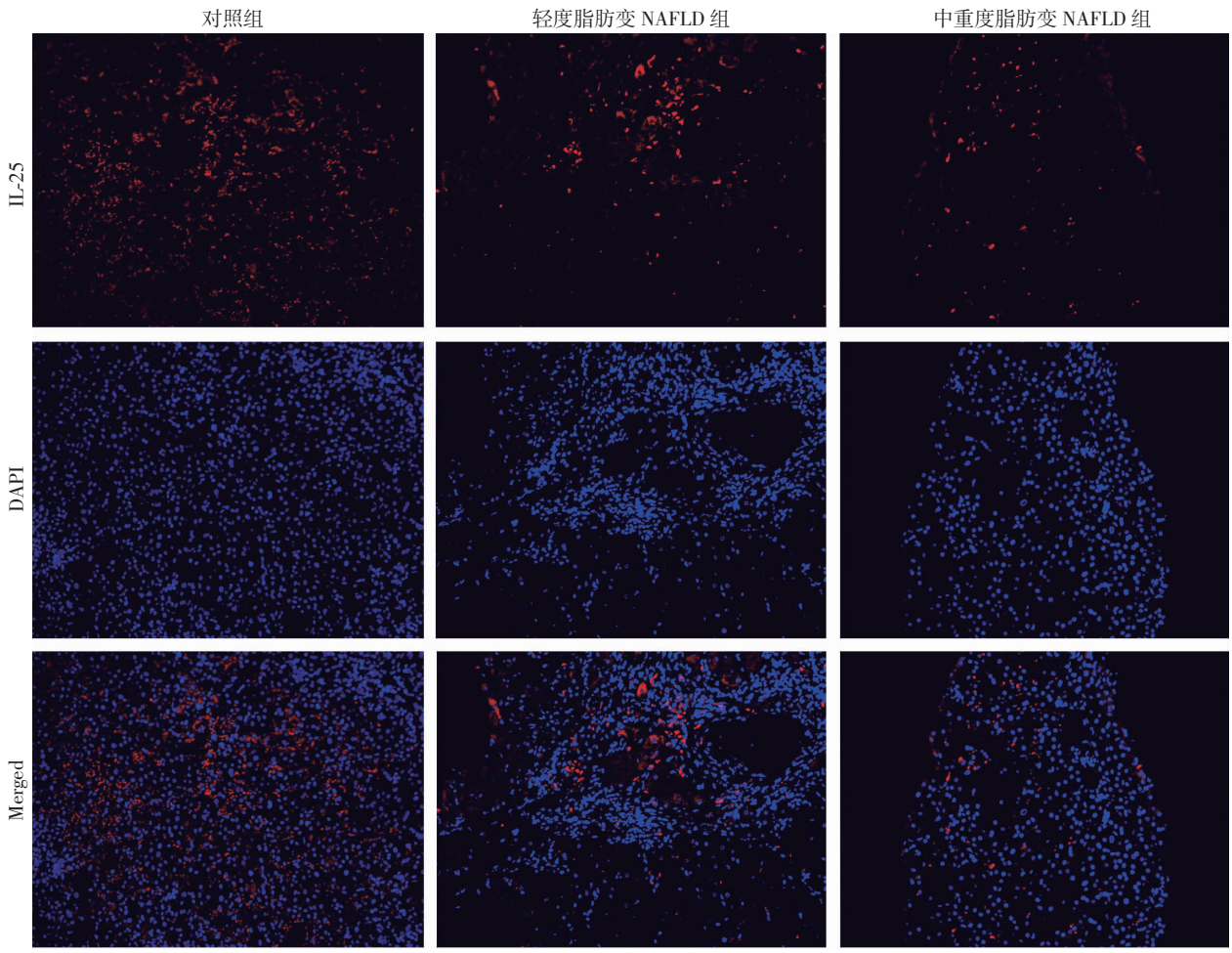
图 2 免疫组化观察各组患者肝脏组织学形态

免疫荧光分析显示(图 3):3 组间 IL-25 蛋白水平比较差异有统计学意义($F=170.85$,$P<0.001$)。与对照组相比,NAFLD 患者肝内 IL-25 蛋白水平下降;与轻度脂肪变 NAFLD 患者相比,中重度脂肪变 NAFLD 患者 IL-25 蛋白水平减少更为明显[(3.24±0.41)% *vs* (1.82±0.12)% *vs* (0.49±0.09)%,95%*CI*:2.81%~3.67%、1.69%~1.94%、0.40%~0.59%,$P<0.001$]。

3 讨论

NAFLD 逐渐成为全世界慢性肝病的主要病因之一,特别是在西方发达国家。NAFLD 全球患病率具有上升趋势,且和糖尿病、血管粥样硬化、心血管疾病、慢性肾脏病、结肠腺瘤、肝癌、骨质疏松等其他疾病发病有密切关系[14-15]。NAFLD 发病机制及新型药物开发是当前的研究热点。目前进入临床试验的 NAFLD 新型治疗安全有效的药物有 Elafibranor、Aramchol、奥贝胆酸、利拉鲁肽等,但长期有效性和安全性仍有待进一步证实[16]。

IL-17 家族包括 6 个成员,包括 IL-17A、IL-17B、IL-17C、IL-17D、IL-17E 和 IL-17F。其中 IL-17E 也称 IL-25,其分子结构和生物学功能明显不同于家族中的其他成员。IL-25在调节炎症和肿瘤生长中有一定



红色为 IL-25 阳性区域

图 3 免疫荧光检测各组患者肝脏中 IL-25 蛋白水平(×200)

作用[17],我们既往动物实验发现 IL-25 具有缓解 NAFLD 小鼠肝脂肪变的作用[8]。有研究显示高脂饮食(HFD)诱导的 NAFLD 小鼠肝内 IL-25 表达减少;外源性给予 IL-25 可通过增加体内 IL-13 表达,激活核转录因子信号传导及转录激活因子 6(STAT6),诱导分化 M2a 型巨噬细胞,促进肝细胞脂质分解且抑制肝细胞脂质合成,从而改善 NAFLD[8-9]。IL-25 还可通过减少小鼠肠道内分节丝状菌的含量,提高体内抗菌肽的水平,减少体内 IL-17A 水平并拮抗其促炎作用,从而抑制小鼠肝脂肪变[10]。虽然既往多项研究也发现 NAFLD 患者较非 NAFLD 患者肝内及(或)血清内 IL-25 表达减少[7-8,18],但均未从转录水平探讨 IL-25 与脂肪肝的关系,且样本量极少。本研究不仅增加了样本量,而且同时从血清和肝组织标本中检测了 IL-25 的 mRNA 及蛋白水平,探讨了肝内 IL-25 水平和 NAFLD 肝脂肪变严重程度的关系。在血清中观察到与对照组相比,NAFLD 患者血清 IL-25 水平降低,在肝组织中虽未观察两组 IL-25 mRNA 表达差异,但 NAFLD 患者肝组织 IL-25 mRNA 表达是呈下降趋势的,且随着肝脏脂肪变的加重,减少更为明显。结合我们既往动物研究发现,与非高脂饮食小鼠相比,高脂饮食喂养的小鼠肝组织 IL-25 表达减少。因本研究人体肝组织样本量少,或许增加样本量也能得出动物实验相似的结果。因此,根据本次临床研究和前期动物研究的结果,我们发现,无论在人体还是小鼠体内,体内 IL-25 水平和肝脂肪变严重程度呈负相关。结合动物实验中探讨的 IL-25 抑制 NAFLD 的机制,未来 IL-25 有希望开发成为治疗 NAFLD 肝脂肪变的新型药物。由于本研究的样本量仍然较少,该研究结论需进一步扩大样本量或在未来多中心研究中得到证实。

巨噬细胞在肝脏免疫中发挥着重要作用,主要分为两种表型,即 M1 型及 M2 型巨噬细胞。M1 型巨噬细胞主要表达 CD80、CD86、IL-1R、Toll 样受体(TLR)2、TLR4 和诱导型一氧化氮合酶(iNOS),由 IL-12、干扰素-γ(IFN-γ)和脂多糖(LPS)诱导活化,参与 Th1 及 Th17 型免疫反应,从而发挥清除细菌病毒、促进炎症等效

应;M2 型巨噬细胞主要表面标志物为 ARGINASE-1、CD260 和 TGM2,主要由 IL-4 和 IL-13 诱导活化,促进 Th2 型免疫反应,分泌抗炎因子(如 IL-10、IL-4、IL-13、IL-5 等),发挥防御寄生虫感染、抑制炎症、参与组织重塑和调节免疫等效应[19]。M1 型巨噬细胞释放各种炎症因子促进肝细胞的凋亡和炎症细胞聚集。M2 型巨噬细胞通过释放 IL-10 促进 M1 型巨噬细胞凋亡,从而缓解 NAFLD[20]。体外研究发现,M2 型巨噬细胞活化能增加肝细胞脂质分解基因的表达,抑制脂质合成酶活性,减少肝细胞内脂滴蛋白合成,缓解肝脏脂肪变性[21]。ZHAO 等[22]发现脂肪源性干细胞可向 M2 型巨噬细胞分化并促进 M2 型巨噬细胞活化,从而缓解了 HFD 喂养的小鼠诱导的肥胖和代谢紊乱。M2 型巨噬细胞能分泌 Th2 型细胞因子促进脂肪动员,释放游离脂肪酸,增强巨噬细胞的脂质摄取,改善线粒体呼吸能力,并减轻肝脏和脂肪组织中的脂质积累,从而改善 NAFLD[7]。我们的动物实验也发现:移植小鼠肝内 M2 型巨噬细胞至 NAFLD 小鼠体内,能有效抑制 NAFLD 肝脂肪变[9]。可见 M2 型巨噬细胞对 NAFLD 有抑制作用。但上述现象均在动物或细胞实验中发现,本研究从人体肝组织标本探讨 NAFLD 患者体内 M2 型巨噬细胞水平变化,发现 NAFLD 患者肝内 M2 型巨噬细胞水平下降,且随肝脂肪变程度加重,肝内 M2 型巨噬细胞水平下降更为明显,这与上述动物和细胞研究结果相符。虽然本研究无法在临床研究中进一步探讨 M2 型巨噬细胞抑制 NAFLD 脂肪肝变的作用机制,但结合动物及细胞研究中探讨的 M2 型巨噬细胞抑制 NAFLD 肝脂肪变的相关机制,推测未来可能将 M2 型巨噬细胞的输注治疗开发为新型细胞治疗,从而治疗 NAFLD 肝脂肪变。

Th2 型免疫反应在寄生虫感染和组织损伤修复中发挥着重要作用。Th2 型反应主要细胞因子包括 IL-4、IL-5、IL-9、IL-13、IL-25、IL-33 等,效应细胞包括嗜酸性粒细胞、肥大细胞、嗜碱性粒细胞、T 辅助 2 细胞、2 型先天淋巴细胞和 M2 型巨噬细胞等[23]。IL-25 具有刺激 Th2 型免疫反应和促进 Th2 细胞因子增加的功能。动物实验结果表明:外源性 IL-25 干预高脂饮食诱导 NAFLD 小鼠后,2 型先天淋巴样细胞(ILC2)数量增加,小鼠肝内 IL-13 表达上调,M2 型巨噬细胞极化增加并伴随着小鼠脂质调节相关蛋白 Cidea、Cidec 表达下调、小鼠肝脏体积减小和肝脏脂肪变性缓解,然而 IL-25 对 NAFLD 的上述抑制作用在 IL-13 基因敲除小鼠中明显减弱[8],而 ILC2 是肝脏中主要的 IL-25 反应性及 IL-13 产生细胞[24],IL-4/IL-13 可以诱导 M2 型巨噬细胞极化[19],说明 IL-25 是通过促进 ILC2 分泌 Th2 型细胞因子 IL-13,进而诱导 M2 巨噬细胞极化调节脂质代谢抑制了肝脂肪变。上述研究也仅在动物实验中发现 IL-25 可通过诱导 Th2 型免疫反应,促进 IL-13 增加,从而诱导 M2 巨噬细胞极化缓解肝脏脂肪变。本研究在人体内验证了上述结果,NAFLD 患者血清及肝内 IL-13、IL-4 明显减少,而且其他的 Th2 型细胞因子 IL-10 及 IL-5 也呈下降趋势,并伴随着 M2 巨噬细胞数量的减少。故猜测 IL-25 可以通过增加人体内 Th2 型免疫反应细胞因子、诱导 Th2 型免疫反应效应细胞 M2 型巨噬细胞活化,进而调节脂质代谢,对 NAFLD 肝脂肪变有一定的治疗作用。

综上所述,本研究在 NAFLD 患者体内分别从 mRNA 转录水平和蛋白水平验证了 IL-25、Th2 型细胞因子及 M2 巨噬细胞的水平明显减少。结合既往动物实验和细胞实验中探讨的机制,外源性补充 IL-25 和 M2 型巨噬细胞,激活人体内 Th2 型免疫反应可能对 NAFLD 肝脂肪变有治疗作用。

参考文献:

[1] MANTOVANI A, SCORLETTI E, MOSCA A, *et al*. Complications, morbidity and mortality of nonalcoholic fatty liver disease [J]. Metabolism, 2020, 154170. DOI: 10.1016/j.metabol.2020.154170. [published online ahead of print].

[2] YOUNOSSI Z M, KOENIG A B, Abdelatif D, *et al*. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease: Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes [J]. Hepatology, 2016; 64 (1): 73-84. DOI: 10.1002/hep.28431.

[3] TILG H, MOSCHEN A R. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis [J]. Hepatology, 2010, 52 (5): 1836-1846. DOI: 10.1002/hep.24001.

[4] BARLOW J L, MCKENZIEB A N J. Nuocytes: expanding the innate cell repertoire in type-2 immunity [J]. J Leukoc Biol, 2011, 90 (5): 867-874. DOI: 10.1189/jlb.0311160.

[5] TAMACHI T, MAEZAWA Y, IKEDA K, *et al*. IL-25 enhances allergic airway inflammation by amplifying a TH2 cell-dependent pathway in mice [J]. J Allergy Clin Immunol, 2006, 118 (3): 606-614. DOI: 10.1016/j.jaci.2006.04.051.

[6] THOMAS J A, POPE C, WOJTACHA D, *et al*. Macrophage therapy for murine liver fibrosis recruits host effector cells improving fibrosis, regeneration, and function [J]. Hepatology, 2011, 53 (6): 2003-2015. DOI: 10.1002/hep.24315.

[7] FENG J, LI L, OU Z, *et al*. IL-25 stimulates M2

macrophage polarization and thereby promotes mitochondrial respiratory capacity and lipolysis in adipose tissues against obesity [J]. Cell Mol Immunol, 2018, 15 (5): 493-505. DOI:10.1038/cmi.2016.71.

[8] WANG A J, YANG Z, GRINCHUK V, *et al*. IL-25 or IL-17-E protects against high-fat diet-induced hepatic steatosis in mice dependent upon IL-13 activation of STAT6 [J]. J Immunol, 2015, 195 (10): 4771-4780. DOI: 10.4049/jimmunol.1500337.

[9] ZHENG X L, WU J P, GONG Y, *et al*. IL-25 protects against high-fat diet-induced hepatic steatosis in mice by inducing IL-25 and M2a macrophage production [J]. Immunol Cell Biol, 2019, 97 (2): 165-177. DOI: 10.1111/imcb.12207.

[10] FRICKE W F, SONG Y, WANG A J, *et al*. Type 2 immunity-dependent reduction of segmented filamentous bacteria in mice infected with the helminthic parasite Nippostrongylus brasiliensis[J]. Microbiome, 2015, 3: 40. DOI: 10.1186/s40168-015-0103-8.

[11] 中华医学会肝病学分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]. 中华肝脏病杂志,2018,26(3):195-203. DOI:10.3969/j.issn.1672-5069.2018.02.007.

Fatty Liver and Alcoholic Liver Disease Group of Chinese Medical Association, Expert Committee of Fatty Liver Disease of Chinese Medical Doctor Association. Guidelines of prevention and treatment for nonalcoholic fatty liver disease: a 2018 update [J]. Chin J Hepatol, 2018, 26 (3): 195-203. DOI: 10.3969/j.issn.1672-5069.2018.02.007.

[12] KLEINER D E, BRUNT E M, VAN N M, *et al*. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease [J]. Hepatology, 2005, 41 (6): 1313-1321. DOI:10.1002/hep.20701.

[13] BELJAARS L, SCHIPPERS M, REKER-SMIT C, *et al*. Hepatic localization of macrophage phenotypes during fibrogenesis and resolution of fibrosis in mice and humans [J]. Front Immunol, 2014, 5: 430. Published 2014 Sep 8. DOI:10.3389/fimmu.2014.00430.

[14] MIKOLASEVIC I, MILIC S, TURK WT, *et al*. Nonalcoholic fatty liver disease—a multisystem disease? [J]. World J Gastroenterol, 2016, 22 (43): 9488-9505. DOI: 10.3748/wjg.v22.i43.9488

[15] ADAMS L A, ANSTEE Q M, TILG H, *et al*. Non-alcoholic fatty liver disease and its relationship with cardiovascular disease and other extrahepatic diseases [J]. Gut, 2017, 66 (6):1138-1153. DOI: 10.1136/gutjnl-2017-313884.

[16] 肖海英, 郑雪莲, 汪安江. 非酒精性脂肪性肝病治疗进展[J]. 中国实用内科杂志, 2017, 37 (12): 1069-1073. XIAO H Y, ZHENG X L, WANG A J. Advance in treatment of non-nalcoholic fatty liver disease [J]. Chin J Pract Med, 2017, 37(12): 1069-1073.

[17] LIU Y, SHAO Z, SHANG G G, *et al*. Biological properties and the role of IL-25 in disease pathogenesis [J]. J Immunol Res, 2018: 6519465. DOI: 10.1155/2018/6519465.

[18] BERNAL W, AUZINGER G, DHAWAN A, *et al*. Acute liver failure [J]. Lancet, 2010, 376 (9736): 190-201. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)60274-7.

[19] SHAPOURI-MOGHADDAM A, MOHAMMADIAN S, VAZINI H, *et al*. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease [J]. J Cell Physiol, 2018, 233 (9): 6425-6440. DOI: 10.1002/jcp.26429.

[20] WAN J, BENKDANE M, TEIXEIRA-CLERC F, *et al*. M2 Kupffer cells promote M1 Kupffer cell apoptosis: a protective mechanism against alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease [J]. Hepatology, 2014, 59 (1): 130-142. DOI: 10.1002/hep.26607.

[21] 王祺, 许钦瑜, 吴惠敏, 等. 脂质诱导的巨噬细胞 M1/M2 型极化对肝细胞脂质代谢的影响[J]. 中华肝脏病杂志, 2018, 26 (4): 276-281. DOI:10.3760/cma.j.issn.1007-3418.2018.04.009.

WANG Q, XU Q Y, WU H M, *et al*. Effect of lipid-induced macrophage M1/M2 polarization on lipid metabolism in hepatocytes [J]. Chin J Hepatol, 2018, 26 (4):276-281. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1007-3418.2018.04.009.

[22] ZHAO H, SHANG Q W, PAN Z Z, *et al*. Exosomes from adipose-derived stem cells attenuate adipose inflammation and obesity through polarizing M2 macrophages and beiging in white adipose tissue [J]. Diabetes, 2018, 67 (2): 235-247. DOI: 10.2337/db17-0356.

[23] GIESECK R L, WILSON M S, WYNN T A. Type 2 immunity in tissue repair and fibrosis [J]. Nat Rev Immunol, 2018, 18 (1): 62-76. DOI:10.1038/nri.2017.90.

[24] HAMMAD H, LAMBRECHT B N. Barrier epithelial cells and the control of type 2 immunity [J]. Immunity, 2015, 43 (1): 29-40. DOI: 10.1016/j.immuni.2015.07.007.

(收稿:2020-05-30;修回:2020-09-15)

(编辑 郭建秀)