

· 临床研究 ·

NK 与 NKT 细胞在慢加急性肝衰竭患者外周血中的变化分析*

彭辉¹, 常琳², 王磊², 陈敏^{2△}(1. 重庆医科大学附属第二医院检验科 400010; 2. 重庆医科大学病毒性肝炎研究所/
感染性疾病分子生物学省部共建教育部重点实验室 400016)

摘要:目的 研究 NK 及 NKT 细胞在乙型肝炎相关慢加急性肝衰竭(HBV-ACLF)患者外周血中的变化。方法 用流式细胞仪分别检测 25 例健康对照者(HC)、40 例慢性乙型肝炎(CHB)患者、26 例 HBV-ACLF 患者外周血淋巴细胞中 NK、NKT 细胞的比例,经统计分析,比较各组间 NK 或 NKT 的差异,同时分析 HBV-ACLF 组中的 NK 或 NKT 细胞与乙型肝炎标志物或肝功能间的相关性。**结果** HC、CHB、HBV-ACLF 组外周血的 NK 细胞比例分别为(15.0±6.0)%、(11.4±6.8)%和(8.9±6.7)%,HBV-ACLF 组与其他两组比较,差异有统计学意义($P<0.05$);而 NKT 细胞在 HC、CHB、HBV-ACLF 组外周血中的比例分别为(1.9±1.3)%、(4.3±3.7)%和(5.4±8.6)%,HBV-ACLF 组与 HC 组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** HBV-ACLF 患者外周血内 NK 细胞比例显著性降低,而 NKT 细胞比例显著性升高,他们可能在 HBV-ACLF 疾病中发挥着一定的作用。

关键词: 杀伤细胞,自然;NKT;慢加急性肝衰竭;乙型肝炎病毒

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.31.009

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)31-3747-03

The change of NK or NKT cells in the peripheral blood of patients with HBV-associated acute-on-chronic liver failure*

Peng Hui¹, Chang Lin², Wang Lei², Chen Min^{2△}

(1. Department of Clinical Laboratory, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China; 2. Institute for Viral Hepatitis, Key Laboratory of Molecular Biology for Infectious Diseases, Ministry of Education, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To investigate the change in the proportion of NK or NKT cells in the peripheral blood of patients with HBV associated acute-on-chronic liver failure(HBV-ACLF). **Methods** the frequency of NK or NKT cells in the blood of 25 healthy controls(HC), 40 patients with chronic hepatitis B(CHB) and 26 HBV-ACLF patients was detected by flow cytometry. The differences in the proportion of NK and NKT cells among the three groups were analyzed by SPSS software and the correlation was analyzed between the frequency of NK or NKT cells and HBV markers and the level of liver function. **Results** the proportion of NK cells in HC, CHB, or HBV-ACLF group was (15.0±6.0)%, (11.4±6.8)%, (8.9±6.7)% respectively, and the difference between the HBV-ACLF group and HC or CHB group was statistically significant($P<0.05$). And for the NKT cells, its frequency in the HC, CHB, or HBV-ACLF group was (1.9±1.3)%, (4.3±3.7)%, (5.4±8.6)% respectively, and there was significant difference between the HBV-ACLF group and HC group($P<0.05$). **Conclusion** The proportion of NK cells in HBV-ACLF has a significant decline, while NKT cells has a significant increases, it indicate that NK or NKT cells might be play a certain role in the HBV-ACLF development process.

Key words: kills cells, natural; NKT; acute-on-chronic liver failure; hepatitis B virus

乙型肝炎相关的慢加急性肝衰竭(HBV-ACLF)是在慢性乙型肝炎(CHB)基础上出现的急性肝功能失代偿,病死率高,但其发病机制尚不十分清楚。研究显示,HBV-ACLF 的发生与非特异性淋巴细胞的大量激活相关^[1-4]。NK 细胞是重要的非特异性免疫细胞,NKT 细胞是具有一定 NK 细胞特征的 T 细胞亚群,它们均有细胞毒及免疫调节的功能。由于肝脏中富含 NK 及 NKT 细胞,可占肝脏总淋巴细胞的 2/3,因此其在乙型肝炎及相关疾病中的作用引起了学者的广泛兴趣^[5-10]。目前,NK 或 NKT 细胞在 HBV-ACLF 中的作用在国内还少见报道,因此本文同时分析了 HBV-ACLF 患者外周血内 NK、NKT 细胞的比例,并与健康对照者及 CHB 患者做比较,探讨 NK、NKT 细胞在 HBV-ACLF 中的作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本研究共入选了 25 例健康对照者,24~51 岁,男 14 例,女 11 例;40 例 CHB 患者,20~46 岁,男 31 例,女 9 例;26 例 HBV-ACLF 患者,26~78 岁,男 21 例,女 5 例。所有患者均来自重庆医科大学附属二院门诊或住院患者,健康对照者为来本院的健康体检者。受试者的临床指标结果见表 1。CHB 患者的诊断参照 2005 年中华医学会肝病学会、感染病学分会修定的《慢性乙型肝炎防治指南》^[11],HBV-ACLF 患者的诊断符合 2006 年中华医学会发布的《肝衰竭诊疗指南》^[1]。所有患者在入选前的半年内均未接受过抗病毒治疗,并排除其他病毒性肝炎、人类免疫缺陷病毒(HIV)感染或肝癌等疾病。本研究经重庆医科大学附属第二医院伦理委员会批准。

* 基金项目:重庆市卫生局医学科研计划资助项目(2011-2-152)。

作者简介:彭辉(1974~),主管技师,硕士,主要从事感染病的临床免疫

△ 通讯作者,E-mail:chenggming@aliyun.com。

1.2 试剂与仪器 PE cy7-conjugated anti-CD3 mAb (clone SK7)、FITC-conjugated anti-CD56 mAb (clone SK7)、同型对照及红细胞裂解液 (FACSTM lysing solution) 购自美国 BD pharmingen 公司。HBV 血清标志物检测试剂盒购自罗氏公司, HBV 核酸荧光定量检测试剂盒购自中山达安生物技术有限公司。流式细胞仪 (BD FACS Canto II, 美国 BD 公司), 日立全自动生化分析仪, 罗氏电化学发光仪, 罗氏实时定量 PCR 仪, 全自动血凝分析仪。

1.3 临床指标的检测 肝功能: 丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶 (AST)、总胆红素 (TbIL) 或直接胆红素 (DBiL) 等用日立全自动生化分析仪检测。乙型肝炎病毒 (HBV) 血清标志物: 乙型肝炎表面抗原 (HBsAg)、乙型肝炎表面抗体 (HBsAb)、乙型肝炎 e 抗原 (HBeAg)、乙型肝炎 e 抗体 (HBeAb) 及乙型肝炎核心抗体 (HBcAb) 用罗氏电化学发光法分析, 血清 HBV-DNA 用罗氏实时定量 PCR 仪作定量检测, 凝血酶原活动度用全自动血凝分析仪检测。

1.4 外周血 NK、NKT 细胞比例检测 取 100 μ L 新鲜全血, 加入相应剂量的荧光标记的 anti-CD3 及 anti-CD56 mAb, 同时设立相同荧光标记的 IgG 对照, 混匀, 4 $^{\circ}$ C 避光染色 30 min, 加入 2 mL 1:10 稀释的红细胞裂解液混匀, 室温避光作用 10 min, 离心后, 用 FACS 缓冲液 (含 1% 胎牛血清的磷酸盐缓冲液) 洗一次, 最后将细胞重悬于 200 μ L 的 FACS 缓冲液中, 立即于 BD FACS Canto II 流式细胞仪上样检测, 用 BD FACSDi-va 2.0 软件分析数据。

1.5 统计学处理 所有数据均由 SPSS13.0 软件做统计分析。数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各细胞比例在各组间的差异用 one-way ANOVA 检验, Pearson correlation test 用于做相关性分析, 作双侧检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

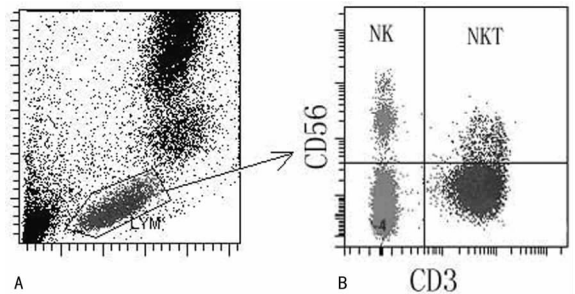
2.1 HBV-ACLF 患者外周血 NK、NKT 细胞频率的检测 以 CD3 与 CD56 的表达与否来划分, 若 CD56 单阳性而 CD3 阴性为 NK 细胞, 若 CD56 与 CD3 双阳性的为 NKT 细胞。HBV-ACLF 组中 NK 细胞为 (8.9 \pm 6.7)%, NKT 细胞为 (5.4 \pm 8.6)%; CHB 组的 NK 细胞为 (11.4 \pm 6.8)%, NKT 细胞为 (4.3 \pm 3.7)%; HC 组的 NK 细胞为 (15.0 \pm 6.0)%, NKT 细胞为 (1.9 \pm 1.3)%。经统计检验, HBV-ACLF 组外周血中的 NK 细胞频率低于 CHB 组 ($P < 0.05$) 及 HC 组 ($P < 0.01$)。而 NKT 细胞在 HBV-ACLF 组外周血中的频率明显高于 HC 组 ($P < 0.01$), 但与 CHB 组相比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 1、2。

表 1 各组临床指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

项目	HC 组 (n=25)	CHB 组 (n=40)	HBV-ACLF 组 (n=26)
ALT(U/L)	20.8 \pm 7.0	254.5 \pm 202.4	317.3 \pm 234.1
AST(U/L)	22.9 \pm 2.9	163.5 \pm 112.1	283.2 \pm 264.1
TbIL(μ mol/L)	11.8 \pm 1.7	75.8 \pm 53.4	425.8 \pm 184.0
DBiL(μ mol/L)	2.0 \pm 0.8	44.9 \pm 33.6	314.7 \pm 128.4
HBeAg(+/-)	0/25	33/7	18/8
血清 HBV DNA [lg(copies/mL)]	0	6.7 \pm 1.5	6.0 \pm 1.1

2.2 HBV-ACLF 患者外周血 NK、NKT 细胞频率与 HBV 标

志物、血清肝功能水平的相关性分析 经相关性统计分析, 结果显示, HBV-ACLF 患者外周血的 NK 或 NKT 细胞比例与 HBV-DNA 载量、血清肝功能水平均无相关性 ($P > 0.05$)。但 CHB 患者的 NK 或 NKT 细胞比例与 HBV-DNA 载量呈正相关 ($P < 0.05$)。见图 3。



A: 圈内为淋巴细胞; B: 淋巴细胞中 NK 细胞 (CD3⁻ CD56⁺) 及 NKT (CD3⁺ CD56⁺) 细胞。

图 1 外周血中 NK 及 NKT 细胞的流式检测图

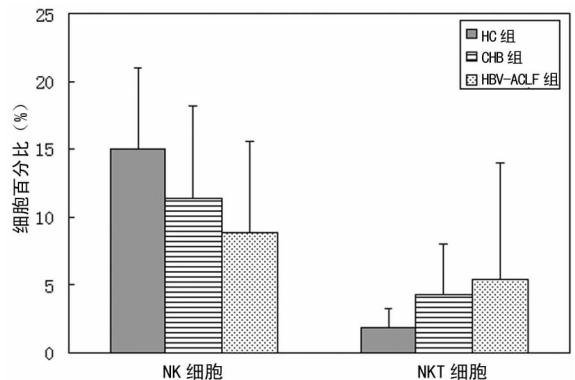


图 2 外周血中 NK 及 NKT 细胞的流式检测图

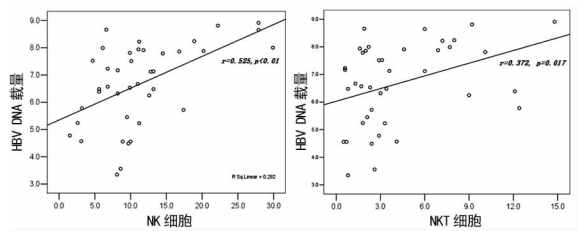


图 3 外周血中 NK 及 NKT 细胞的流式检测图

3 讨 论

乙型肝炎是由 HBV 感染引起, 感染后可发生慢性化, 并由此导致多种严重肝病, 严重威胁人民生命健康。而 HBV-ACLF 是在 CHB 基础上产生的, 其表现为肝功能进行性下降, 在一定的时限内 (2~4 周), 黄疸迅速加深 (血清胆红素大于或等于 85 μ mol/L)、凝血功能障碍 (凝血酶原活动度小于 40%)、伴有腹腔积液和 (或) 肝性脑病等并发症, 病死率极高。目前, HBV-ACLF 的发病机制还不十分清楚, 有文献显示, 大量免疫活性细胞的浸润、炎性细胞因子急剧增多引起的急性系统性炎症反应是诱发 ACLF 的重要因素 [1-4]。研究表明, 肝脏内含有大量的 NK、NKT 细胞等非特异性免疫细胞, 可占整个肝脏淋巴细胞的 2/3, 且 NK、NKT 细胞也是这些炎性细胞因子的重要来源。同时已有报道显示, 在小鼠肝衰竭模型中肝内 NK 细胞逐渐活化、杀伤功能逐渐增强, 在疾病的发生中起到了作用, 与肝脏严重炎症程度密切相关。而 NKT 细胞也具有一定的

NK 细胞功能特征,因此作者推测,NK 细胞及 NKT 细胞均在 HBV-ACLF 疾病中可能起到一定的作用^[5-13]。

在本研究中,作者直接检测了 HBV-ACLF 患者外周血中 NK 细胞、NKT 细胞的频率,结果显示 HBV-ACLF 组、CHB 组及 HC 组的 NK 细胞比例依次升高,而 NKT 细胞比例依次降低。有文献报道,在 CHB 患者体内,NK 细胞可能由于 HBV 的持续存在而受到了抑制。在本研究中,作者也发现 CHB 患者外周血中的 NK 细胞频率较健康者低,与其他报道相似^[14-15]。本研究还发现,HBV-ACLF 患者的 NK 细胞频率较 CHB 组更低,可能是由于在 HBV-ACLF 的疾病过程中外周血中的大量 NK 细胞向肝脏迁移,并与其他多种炎性细胞共同参与了肝脏的凋亡与坏死过程,最终大量 NK 细胞消耗,导致了外周血中的 NK 细胞比例降低。而与 NK 细胞相反,NKT 细胞在 HBV-ACLF 及 CHB 患者中均表现为升高,且 HBV-ACLF 患者高于 CHB 患者。由于 NKT 细胞的重要功能包括了分泌 IL-4 等细胞因子,因此增多的 NKT 细胞可能参与到 HBV-ACLF 疾病过程的免疫调节中。因此,实验结果提示了 NK 细胞与 NKT 细胞在 HBV-ACLF 疾病中可能起到不同的作用,推测 NK 细胞可能主导细胞毒效应,而 NKT 细胞是以免疫调节效应为主。

但相关性分析结果并未显示 HBV-ACLF 患者的 NK 细胞或 NKT 细胞比例与肝功能水平或 HBV-DNA 载量相关,这可能与 HBV-ACLF 的疾病过程复杂,不同患者的免疫细胞变化波动差异大相关。

由于外周血与肝脏中的免疫细胞还存在一定的差异,因此,下一步还将进一步做肝脏内 NK 细胞或 NKT 细胞的比例分析。

参考文献:

- [1] 中华医学会感染病学分会肝衰竭与人工肝学组,中华医学会肝病学会重型肝病与人工肝学组. 肝衰竭诊疗指南[J]. 中华内科杂志,2006,45(12):1053-1056.
- [2] 张耿林,高志良. 乙型肝炎相关慢加急性肝衰竭的免疫学特征及治疗策略[J]. 中国病毒病杂志,2011,1(1):5-8.
- [3] 刘青,王泰龄. 慢加急性肝衰竭(ACLF)共识纪要:亚太肝病学会推荐(APASL)[J]. 临床肝胆病杂志,2010,26(1):13-18.
- [4] Zou Z, Li B, Xu D, et al. Imbalanced intrahepatic cytokine

expression of interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-10 in patients with acute-on-chronic liver failure associated with hepatitis B virus infection[J]. J Clin Gastroenterol, 2009, 43(2):182-190.

- [5] Vivier E, Tomasello E, Baratin M, et al. Functions of natural killer cells[J]. Nat Immunol, 2008, 9(5):503-510.
- [6] Welsh RM, Waggoner SN. NK cells controlling virus-specific T cells: Rheostats for acute vs. persistent infections[J]. Virology, 2013, 435(1):37-45.
- [7] 陈大为,张鸿飞,王福生. NK/NKT 细胞亚群研究进展及其在乙型肝炎中的作用[J]. 肝脏, 2005, 10(3):249-250.
- [8] Bendelac A, Savage PB, Teyton L. The biology of NKT cells[J]. Annu Rev Immunol, 2007, 25(3):297-336.
- [9] Zhang Z, Zhang S, Zou Z, et al. Hypercytolytic activity of hepatic natural killer cells correlates with liver injury in chronic hepatitis B patients[J]. Hepatology, 2011, 53(1):73-85.
- [10] 邹勇,陈韬,王洪武,等. 肝脏自然杀伤细胞在小鼠急性肝衰竭中的作用[J]. 中华肝脏病杂志, 2008, 16(9):660-664.
- [11] 中华医学会肝病学会和中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南[J]. 中华内科杂志, 2006, 45(2):162-170.
- [12] 赵阳. NKT 细胞在乙型病毒性肝炎治疗中作用的研究进展[J]. 国际免疫学杂志, 2007, 30(6):436-439.
- [13] Dong Z, Wei H, Sun R, et al. The roles of innate immune cells in liver injury and regeneration[J]. Cell Mol Immunol, 2007, 4(4):241-252.
- [14] Wei H, Wei H, Gao Y, et al. Blocking the natural killer cell inhibitory receptor NKG2A increases activity of human natural killer cells and clears hepatitis B virus infection in mice[J]. Gastroenterol, 2013, 144(2):392-401.
- [15] Peppas D, Micco L, Javadi A, et al. Blockade of immunosuppressive cytokines restores NK cell antiviral function in chronic Hepatitis B virus infection[J]. PLoS Pathog, 2010, 6(12):e1001227.

(收稿日期:2013-06-05 修回日期:2013-07-10)

(上接第 3746 页)

- J Hum Genet, 2001, 69(5):1141-1145.
- [9] Sacconi S, Féasson L, Antoine JC, et al. A novel CRYAB mutation resulting in multisystemic disease[J]. Neuro-muscul Disord, 2012, 22(1):66-72.
- [10] Su CH, Liu LC, Hsieh YH, et al. Association of Alpha B-Crystallin (CRYAB) genotypes with breast cancer susceptibility in Taiwan[J]. Cancer genomics proteomics, 2011, 8(5):251-254.
- [11] Bau DT, Tsai CW, Lin CC, et al. Association of alpha B-

crystallin genotypes with oral cancer susceptibility, survival, and recurrence in Taiwan[J]. PLoS One, 2011, 6(9):e16374.

- [12] Sun C, Sedimbi SK, Ashok AK, et al. CRYAB-650 C>G (rs2234702) affects susceptibility to Type 1 diabetes and IAA-positivity in Swedish population[J]. Hum Immunol, 2012, 73(7):759-766.

(收稿日期:2013-06-15 修回日期:2013-07-10)