

• 临床论著 •

乙型肝炎病毒相关慢加急性肝衰竭患者外周血 T 淋巴细胞比例的特征及其意义

曹慧 谭善忠 孙薇薇 沈建军 肖倩 梁重锋 蒋淑莲

【摘要】 目的 探讨乙型肝炎病毒相关慢加急性肝衰竭患者外周血 T 淋巴细胞的变化及意义。方法 乙型肝炎病毒相关慢加急性肝衰竭患者(肝衰竭组)与慢性乙型肝炎患者(慢乙肝组)各 50 例,以门诊同期健康体检者(健康对照组)20 名为对照,应用流式细胞仪测定外周血 CD3⁺T 淋巴细胞所占比例、CD4⁺和 CD8⁺T 淋巴细胞所占比例及比值、CD4⁺CD25⁺调节性 T 淋巴细胞所占比例。结果 肝衰竭组外周血 CD3⁺T 淋巴细胞[(35.48±23.44)%]、CD8⁺T 淋巴细胞[(37.66±13.28)%]、CD4⁺CD25⁺调节性 T 淋巴细胞[(0.72±1.07)%]所占比例与健康对照组[分别为(50.31±12.09)%、(42.05±9.26)%、(2.93±1.31)%]和慢乙肝组[分别为(49.72±20.11)%、(41.95±8.63)%、(3.47±2.29)%]比较均下降,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 乙型肝炎病毒相关慢加急性肝衰竭一旦形成,有别于慢性乙型肝炎时期,外周血总 T 淋巴细胞、CD8⁺T 淋巴细胞以及 CD4⁺CD25⁺调节性 T 淋巴细胞等效应 T 淋巴细胞便处于耗损状态。

【关键词】 肝功能衰竭; 乙型肝炎病毒相关慢加急性肝衰竭; T 淋巴细胞; T 淋巴细胞, 调节性; 特征

The characteristics and significance of T lymphocyte in peripheral blood in patients with HBV related acute-on-chronic liver failure CAO Hui, TAN Shan-zhong, SUN Wei-wei, SHEN Jian-jun, XIAO Qian, LIANG Chong-feng, JIANG Shu-lian. Department of Integrated TCM & Western Medicine, the Second Hospital of Nanjing, Nanjing 210003, China

Corresponding author: TAN Shan-zhong, Email: doctor_tsz@hotmail.com

【Abstract】 Objective To investigate the changes and significance of the peripheral blood T lymphocytes for patients with hepatitis B virus-related acute-on-chronic liver failure. **Methods** 50 patients with hepatitis B virus-related acute-on-chronic liver failure (liver failure group), 50 patients with chronic hepatitis B (chronic hepatitis B group), and 20 healthy persons taking physical examination in the corresponding period (healthy control group) were selected to determine the proportions of CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ T lymphocytes and CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells (regulatory T cells, Tregs) in peripheral blood by flow cytometry. **Results** The proportions of the peripheral blood CD3⁺(35.48%±23.44%), CD8⁺ T lymphocytes(37.66%±13.28%) and CD4⁺CD25⁺ Tregs (0.72%±1.07%) of the patients with hepatitis B virus-related acute-on-chronic liver failure were significantly lower than that of the healthy control group (respectively 50.31%±12.09%; 42.05%±9.26%; 2.93%±1.31%) and chronic hepatitis B group (respectively 49.72%±20.11%; 41.95%±8.63%; 3.47%±2.29%) ($P<0.05$). **Conclusion** Once the hepatitis B virus-related acute-on-chronic liver failure formed, the total peripheral blood T lymphocytes, CD8⁺ T lymphocytes, CD4⁺CD25⁺ Tregs and other effector cells would be in the “wear and tear” state.

【Key words】 Liver failure; Hepatitis B virus-related acute-on-chronic liver failure; T lymphocytes; T-lymphocytes, regulatory; Feature

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2013.19.007

基金项目:南京市医学科技项目(DYY056);南京市科技计划项目(201104004);江苏省“六大人才高峰”项目(苏人社发(2010)555号);江苏省中医药领军人才项目(LJ200922);江苏省“333 高层次人才培养工程”项目(苏人才(2011)15号)

作者单位:210003 南京市第二医院中西医结合科(曹慧、谭善忠、孙薇薇、沈建军、肖倩、梁重锋、蒋淑莲);南京中医药大学第一临床医学院(谭善忠)

通讯作者:谭善忠, Email: doctor_tsz@hotmail.com

乙型肝炎病毒相关慢加急性肝衰竭 (Hepatitis B virus related acute-on-chronic liver failure, HBV-ACLF) 是我国慢性肝衰竭的主要类型, 临床表现复杂, 治疗难度大, 病死率高, 病理机制尚不明确。T 淋巴细胞参与与细胞因子诱导的免疫损伤在肝衰竭的发生中起着至关重要的作用^[1]。CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞 (regulatory T cells, Tregs) 是近年来发现的具有自身免疫无能和免疫抑制特性的 CD4⁺ T 淋巴细胞亚群, 能抑制 CD8⁺ T 细胞的活化、增殖及其细胞因子的分泌, 从而调控机体对 HBV 感染的免疫应答, 影响慢性乙型肝炎的进展^[2-3]。我们先前的研究提示, HBV 携带者, HBeAg (+) 与 HBeAg (-) 者外周血 CD4⁺CD25⁺ Tregs 比例不同, HBeAg (+) HBV 携带者高于健康对照组, 而 HBeAg (-) HBV 携带者低于健康对照组, 说明尽管肝功能在正常范围, HBeAg (+) 与 HBeAg (-) HBV 携带者处于不同的免疫状态^[4]。大量研究表明 HBV-ACLF 发生免疫功能紊乱^[5-6]。本研究旨在探讨 HBV-ACLF 患者外周血 T 淋巴细胞的变化及其意义。

资料与方法

一、一般资料

选择 2010 年 1 月至 2012 年 12 月南京市第二医院肝病科收住入院的诊断为 HBV-ACLF 早期患者 (肝衰竭组) 50 例, 符合 2012 年修订的《肝衰竭诊疗指南》的诊断标准^[7]。选择同期门诊诊断为慢性乙型肝炎患者 (慢乙肝组) 50 例, 符合 2010 年《慢性乙型肝炎诊疗指南》^[8] 的诊断标准。健康对照组选取同期门诊健康体检者 (健康对照组) 20 例。各组临床特征比较见表 1。

诊断标准: 慢加急性肝衰竭早期: (1) 极度乏力, 并有明显厌食、呕吐和腹胀等严重消化道症状。(2) 黄疸进行性加深血清总胆红素 (TBil) $\geq 171 \mu\text{mol/L}$ 。(3) 有出血倾向, $30\% < \text{凝血酶原活动度 (PTA)} \leq 40\%$ 。(4) 未出现肝性脑病或明显腹水。慢性乙型肝炎: 血清 HBsAg 阳性, HBeAg 阳性或阴性, 抗-HBe 阳性或阴性, HBV DNA 阳性, ALT 持续或反复异常, 或肝组织学检查有肝炎病变。

排除标准: (1) 急性、亚急性肝衰竭; (2) 其

他原因包括自身免疫性、药物性、酒精性、中毒性、寄生虫性肝病导致的慢性肝损伤; (3) 妊娠或哺乳期妇女; (4) 原发性肝癌患者; (5) 合并其他肝炎病毒感染患者; (6) 抗 HIV 阳性者; (7) 有免疫治疗史; (8) 近 3 个月内曾参加其他临床试验者。

二、方法

1. 仪器及试剂: 流式细胞仪 (FACSCalibur) 购自美国 BD 公司; CD3-Percp-CD4-FITC-CD8-PE、CD4-FITC-CD25-PE、CD3-FITC-CD16+56-PE 试剂盒均购自法国 RECKMAN COLILTER 公司。

2. 外周血 T 淋巴细胞的检测: 参考文献^[9-10]的方法, 大致步骤如下: 于三管 50 μl 全血中分别加入 CD3-Percp-CD4-FITC-CD8-PE 试剂、CD3-FITC-CD16+56-PE 试剂与 CD4-FITC-CD25-PE 试剂表面染色, 以前向角散射光 (FSC) 为横坐标, 侧向角散射光 (SSC) 为纵坐标, 建立二维散点图, 在散点图上调整阈值参数, 圈定淋巴细胞设门以获取细胞。以 CD3-SSC 设门, 分析门内 CD4⁺、CD8⁺占 CD3⁺ T 细胞的百分率。以淋巴细胞设门, 分析门内 CD16+56⁺CD3⁺、CD16+56⁺占淋巴细胞的百分率。以淋巴细胞设门, 分析门内 CD25⁺ CD4⁺占淋巴细胞的百分率。

三、统计学处理

应用 SPSS 16.0 软件进行统计分析。T 淋巴细胞亚群的百分比用均数士标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间均数比较采用独立样本 *t* 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

结 果

1. 外周血 CD3⁺ T 淋巴细胞所占比例的比较: 与健康对照组比较, 慢乙肝组 CD3⁺ T 淋巴细胞所占外周血百分比差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与健康对照组和慢乙肝组比较, 肝衰竭组外周血 CD3⁺ T 淋巴细胞所占百分比下降明显, 有统计学差异 ($P < 0.01$) (表 2)。

2. 外周血 CD4⁺、CD8⁺T 淋巴细胞所占比例及其比值的比较: 与健康对照组比较, 慢乙肝组外周血 CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞占百分比及其比值差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与健康对照组和慢乙肝组比较, 肝衰

表 1 各组临床资料比较

组别	例数	年龄 (岁, $\bar{x} \pm s$)	男/女 (例)	ALT (U/L, $\bar{x} \pm s$)	AST (U/L, $\bar{x} \pm s$)	TBil ($\mu\text{mol/L}$, $\bar{x} \pm s$)	DBil ($\mu\text{mol/L}$, $\bar{x} \pm s$)	PTA (%, $\bar{x} \pm s$)	HBV DNA (\log_{10} copies/ml, $\bar{x} \pm s$)	HBeAg (+/-, 例)
健康对照组	20	34.51 \pm 3.45	3/7	35.01 \pm 6.37	32.92 \pm 5.98	17.62 \pm 4.83	8.01 \pm 2.34	98.27 \pm 5.73	—	—
慢乙肝组	50	36.23 \pm 4.76	13/37	87.73 \pm 7.56	67.52 \pm 6.69	18.95 \pm 3.85	7.86 \pm 2.13	87.93 \pm 8.09	6.02 \pm 2.62	22/28
肝衰竭组	50	33.62 \pm 3.01	15/35	341.45 \pm 50.41	145.59 \pm 46.35	327.78 \pm 72.43	127.81 \pm 10.92	35.95 \pm 4.78	5.87 \pm 2.36	24/26

表2 外周血T淋巴细胞所占比例比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	CD3 ⁺ T 淋巴细胞(%)	CD4 ⁺ T 淋巴细胞(%)	CD8 ⁺ T 淋巴细胞(%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Tregs(%)
健康对照组	20	50.31 ± 12.09	50.01 ± 8.67	42.05 ± 9.26	1.32 ± 0.31	2.93 ± 1.31
慢乙肝组	50	49.72 ± 20.11	50.72 ± 10.35	41.95 ± 8.63	1.31 ± 0.52	3.47 ± 2.29 ^a
肝衰竭组	50	35.48 ± 23.44 ^{ab}	56.34 ± 14.47 ^{ab}	37.66 ± 13.28	1.79 ± 1.23 ^{ab}	0.72 ± 1.07 ^{ab}

注:与健康对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与慢乙肝组比较, ^b $P < 0.05$

竭组外周血 CD4⁺T 淋巴细胞所占百分比上升, CD8⁺ T 淋巴细胞所占百分比下降, CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞的比值升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (表 2)。

3. 外周血 CD4⁺CD25⁺ Tregs 所占比例的比较: 与健康对照组相比, 慢乙肝组外周血 CD4⁺CD25⁺ Tregs 比例升高明显, 有统计学差异 ($P < 0.01$); 肝衰竭组较健康对照组外周血 CD4⁺CD25⁺ Tregs 比例下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$) (表 2)。

讨 论

乙型肝炎病毒感染所致肝损伤以免疫损伤为主, CD8⁺ T 淋巴细胞为细胞毒性 T 淋巴细胞, CD4⁺ T 淋巴细胞起着辅助作用, CD4⁺CD25⁺ Tregs 更是对于 CD8⁺ T 淋巴细胞的功能起调节作用^[3]。

CD4⁺CD25⁺ Tregs 对自我和外来抗原维持免疫耐受扮演重要的角色, 可以抑制效应 T 细胞的功能, 近年的研究发现 Tregs 在抗 HBV 特异性免疫反应损伤中发挥着重要的作用。而 Tregs 的频率和慢加急性肝衰竭严重程度的关系莫衷一是。有研究者报道^[9]急性乙型肝炎患者急性期 Tregs 频率明显低于慢性乙型肝炎, 也低于健康对照组, 推测在急性乙型肝炎发病初期相对较低的 Tregs 数量有利于特异性细胞免疫反应发挥清除病毒的作用, 并建立有效的免疫应答。对于慢性 HBV 感染后 Tregs 的研究, 有研究者发现慢性乙型肝炎患者外周血 CD4⁺CD25⁺ Tregs 的比例比健康对照组和已治愈的要高^[10]。进一步研究发现 CD4⁺CD25⁺ Tregs 在 HBeAg (+) 肝功能正常者升高, 而一旦肝功能异常, 其百分比则有所下降, 且与 HBV DNA 呈正相关^[11]。对于 HBV 携带者, HBeAg (+) 与 HBeAg (-) 者外周血 CD4⁺CD25⁺ Tregs 比例也不同, HBeAg (+) HBV 携带者高于健康对照组, 而 HBeAg (-) HBV 携带者低于健康对照组^[4]。

CD4⁺CD25^{high} Tregs 在 HBV-ACLF 患者外周血中显著高于健康者和慢性乙型肝炎患者, 在 ACLF 或慢性乙型肝炎患者, 与 HBV DNA 载量呈正相关^[12]。

本研究结果显示, 在慢性乙型肝炎患者, 外周血 CD4⁺CD25⁺ Tregs 的比例明显上升, 但 CD8⁺ T 淋巴细胞和 CD4⁺T 淋巴细胞的比值及其比值与健康对照组无差异; 而 HBV-ACLF 患者较健康对照者和慢性肝炎患

者, 外周血总 T 淋巴细胞——CD3⁺ T 淋巴细胞比例明显下降, CD8⁺ T 淋巴细胞明显下降, CD4⁺CD25⁺ Tregs 的比例下降。提示, 在慢性乙型肝炎, 外周血 CD4⁺CD25⁺ Tregs 的比例增加, 但对于 CD8⁺ T 淋巴细胞的调节尚未明显起效; 而 HBV 相关慢加急性肝衰竭一旦形成, 外周血总 T 淋巴细胞、CD8⁺ T 淋巴细胞以及 CD4⁺CD25⁺ Tregs 等效 T 淋巴细胞便处于低水平状态, 推测 HBV-ACLF 形成过程中, 参与免疫损伤的效应 T 淋巴细胞极度耗损。更有研究提示 CD3⁺ T 淋巴细胞与单核细胞的比值与慢加急性肝衰竭的不良预后有关^[13]。

本研究的结果表明, 在慢性乙型肝炎基础之上发生的肝衰竭即 HBV-ACLF, 其一旦形成, T 淋巴细胞即处于与慢性乙型肝炎时明显不同的状态, 这一点对于进一步研究 T 淋巴细胞尤其一些效应细胞如 CD4⁺CD25⁺ Tregs 在 HBV-ACLF 患者免疫发病机制中的作用, 探讨在 HBV-ACLF 发生发展过程中以 T 淋巴细胞尤其总 T 淋巴细胞及 Tregs 功能作为治疗靶向的策略提供了新的思路。

参 考 文 献

- [1] 史文丽, 孙永强, 张弢. 中医药防治乙型肝炎肝功能衰竭发生机制中三重因素的思路和方法. 中医杂志, 2011, 52: 389-391.
- [2] 庄勤建, 邱隆敏, 姚新生, 等. CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞与乙型肝炎病毒感染的研究进展. 世界华人消化杂志, 2012, 20: 2248-2253.
- [3] 吴银亚, 谭善忠. CD4⁺CD25⁺调节性 T 淋巴细胞在慢性乙型肝炎发病机制中的作用. 中华传染病杂志, 2012, 30: 563-565.
- [4] 吴银亚, 谭善忠, 赵磊, 等. HBeAg(+)与 HBeAg(-)乙型肝炎病毒携带者外周血 CD4⁺CD25⁺调节性 T 淋巴细胞比例的变化及意义. 临床肝胆病杂志, 2012, 28: 209-211.
- [5] Zou Y, Chen T, Han M, et al. Increased killing of liver NK cells by Fas/Fas ligand and NKG2D/ NKG2D ligand contributes to hepatocyte necrosis in virus-induced liver failure. J Immunol, 2010, 184: 466-475.
- [6] Maini MK, Schurich A. The molecular basis of the failed immune response in chronic HBV: therapeutic implications. J. Hepatol, 2010, 52: 616-619.
- [7] 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/CD]. 中华移植杂志: 电子版, 2013, 7: 48-56.
- [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). 临床肝胆病杂志, 2011, 27: 1-15.
- [9] Sun XH, Liu QL, Li M, et al. The study of CD4⁺ and CD8⁺: T subsets in chronic hepatitis B patients. Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi, 2011, 27: 545-547.
- [10] Deng M, Li MH, Liu SA, et al. Studies about the level of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells and relation between expression of Foxp3 and CD127

- in peripheral blood of chronic HBV infection . Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi, 2010, 24: 21-23.
- [11] Nan XP, Zhang Y, Yu HT, et al. Circulating CD4⁺CD25⁺ high regulatory T cells and expression of PD-1 and BTLA on CD4⁺ T cells in patients with chronic hepatitis B virus infection . Viral Immunol, 2010, 23: 63-70.
- [12] Yang J, Yi P, Wei L, et al. Phenotypes and clinical significance of circulating CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells (Tregs) in patients with acute-on-chronic liver failure (ACLF) . J Transl Med, 2012, 10: 193.
- [13] Shi F, Zhang JY, Zeng Z, et al. Skewed ratios between CD3(+) T cells and monocytes are associated with poor prognosis in patients with HBV-related acute-on-chronic liver failure. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 402: 30-36.

(收稿日期: 2013-10-14)
(本文编辑: 马超)

曹慧, 谭善忠, 孙薇薇, 等. 乙型肝炎病毒相关慢加急性肝衰竭患者外周血 T 淋巴细胞比例的特征及其意义 [J/CD]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2013, 7 (19): 8565-8568.

