

· 临床研究 ·

肝硬化合并自发性细菌性腹膜炎患者外周血和腹水中固有淋巴样细胞亚群的变化

陈攀丽¹ 张炳勇² 付雪琴¹ 张逸强¹ 谢华平³

¹驻马店市中心医院消化内科, 驻马店 463000; ²河南省人民医院消化内科, 郑州 450003; ³华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科, 武汉 430030

通信作者: 谢华平, Email: hpxie@tjh.tjmu.edu.cn

【摘要】 目的 观察肝硬化合并自发性细菌性腹膜炎(SBP)患者外周血和腹水中固有淋巴样细胞(ILC)亚群的变化。方法 收集2019年11月至2020年11月在驻马店市中心医院住院的62例肝硬化患者的病例资料,其中肝硬化合并单纯腹水41例(单纯腹水组),肝硬化合并SBP 21例(SBP组),同时收集同期进行健康查体的对照者20名(健康对照组)。所有患者和对照者采集外周血,分离外周血单个核细胞(PBMC),肝硬化患者常规穿刺获取腹水,分离腹水单个核细胞,流式细胞术检测PBMC和腹水单个核细胞中ILC1、ILC2、ILC3亚群的比例变化。分选腹水中CD3⁺CD19⁻CD20⁻CD14⁻细胞(即lin⁻细胞),使用脂多糖(LPS)刺激培养24 h,实时定量PCR法检测lin⁻细胞中转录因子T-bet、GATA3和ROR γ t mRNA相对表达量,酶联免疫吸附试验检测培养上清中细胞因子水平。比较各组间外周血和腹水中ILC亚群的区别。结果 单纯腹水组男29例、女12例,年龄 $M(Q_1, Q_3)$ 为49(33, 78)岁,SBP组男12例、女9例,年龄50(37, 76)岁,健康对照组男11名、女9名,年龄48(32, 69)岁。三组外周血和腹水中均可检测到lin⁻CD45⁺CD161⁺CD127⁺ILC细胞,总ILC细胞占PBMC的比例在单纯腹水组、SBP组及健康对照组之间的差异无统计学意义($P=0.235$)。总ILC占腹水单个核细胞的比例在单纯腹水组及SBP组之间的差异亦无统计学意义($P=0.232$)。CD117⁻CRTh2⁻ILC1、CRTh2⁺ILC2、CD117⁺CRTh2⁻ILC3占外周血ILC的比例在单纯腹水组、SBP组及健康对照组之间的差异均无统计学意义(均 $P>0.05$)。SBP组ILC1占腹水ILC的比例高于单纯腹水组(35.69% \pm 3.39%比26.40% \pm 3.85%, $P<0.001$),而ILC2占腹水ILC的比例低于单纯腹水组(36.83% \pm 7.70%比48.35% \pm 9.45%, $P<0.001$),ILC3占腹水ILC的比例在两组间的差异无统计学意义($P=0.230$)。SBP组腹水lin⁻细胞经LPS刺激后T-bet mRNA相对表达量和干扰素(IFN)- γ 分泌水平均高于单纯腹水组(均 $P<0.001$),GATA3 mRNA相对表达量、白细胞介素(IL)-5/IL-13分泌水平均低于单纯腹水组(均 $P<0.05$),lin⁻细胞中ROR γ t mRNA相对表达量、IL-17/IL-22分泌水平在两组之间的差异均无统计学意义(均 $P>0.05$)。结论 肝硬化合并SBP患者外周血中ILC亚群比例无变化,腹水中ILC1细胞比例升高,ILC2细胞比例降低。

【关键词】 肝硬化; 腹水; 腹膜炎; 固有淋巴样细胞

Change of innate lymphoid cell subsets in peripheral bloods and ascites in liver cirrhotic patients complicated with spontaneous bacterial peritonitis

Chen Panli¹, Zhang Bingyong², Fu Xueqin¹, Zhang Yiqiang¹, XieHuaping³

¹Department of Gastroenterology, Zhumadian Central Hospital, Zhumadian 463000, China;

²Department of Gastroenterology, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou 450003, China;

³Department of Gastroenterology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of

DOI: 10.3760/cma.j.cn112137-20210428-01022

收稿日期 2021-04-28 本文编辑 周阳

引用本文: 陈攀丽, 张炳勇, 付雪琴, 等. 肝硬化合并自发性细菌性腹膜炎患者外周血和腹水中固有淋巴样细胞亚群的变化 [J]. 中华医学杂志, 2022, 102(2): 141-146. DOI: 10.3760/cma.j.cn112137-20210428-01022.



中华医学杂志社
Chinese Medical Association Publishing House

版权所有 违者必究



Science and Technology, Wuhan 430030, China

Corresponding author: XieHuaping, Email: hpxie@tjh.tjmu.edu.cn

[Abstract] Objective To investigate the change of innate lymphoid cells (ILC) subsets in peripheral blood and ascites in liver cirrhotic patients complicated with spontaneous bacterial peritonitis (SBP). **Methods** The data of 62 patients with liver cirrhosis admitted to the Zhumadian Central Hospital from November 2019 to November 2020 were analyzed. Among them, 41 cases were complicated with untainted ascites (untainted ascites group), while the other 21 cases were complicated with SBP (SBP group). Meanwhile, 20 cases of controls who received healthy examination in the same period were also enrolled (control group). Peripheral blood mononuclear cell (PBMC) was isolated from peripheral blood of all patients and controls. Mononuclear cell in ascites was isolated from patients with liver cirrhosis. The percentage of ILC1, ILC2, and ILC3 subsets in PBMC and mononuclear cell in ascites were measured by flow cytometry. CD3⁺CD19⁻CD20⁻CD14⁻ cells (lin⁻ cells) were purified from ascites and were stimulated with lipopolysaccharide (LPS) for 24 h. The transcription factor T-bet, GATA3, and ROR γ t mRNA relative level in lin⁻ cells was semi-quantified by real-time PCR. Cytokine level in the supernatants was measured by enzyme linked immunosorbent assay. Differences of ILC subsets in peripheral blood and ascites were compared among groups. **Results** There were twenty-nine males and twelve females in untainted ascites group, aged $M(Q_1, Q_3)$ 49(33, 78) years. There were twelve males and nine females in SBP group, aged 50(37, 76) years. There were eleven males and nine females in control group, aged 48(32, 69) years. lin⁻CD45⁺CD161⁺CD127⁺ ILC cells could be detected in both peripheral blood and ascites. There was no significant difference in total ILC percentage within PBMC among untainted ascites group, SBP group, and control group ($P=0.235$). There was also no significant difference of total ILC percentage within mononuclear cells in ascites between untainted ascites group and SBP group ($P=0.232$). The differences were not statistically significant of peripheral CD117⁻CRTh2⁻ILC1, CRTh2⁺ILC2, or CD117⁺CRTh2⁻ILC3 within peripheral ILC among untainted ascites group, SBP group, and control group (all $P>0.05$). ILC1 percentage in ascites was up-regulated in SBP group compared with untainted ascites group (35.69% \pm 3.39% vs 26.40% \pm 3.85%, $P<0.001$), while ILC2 in ascites was down-regulated in SBP group (36.83% \pm 7.70% vs 48.35% \pm 9.45%, $P<0.001$). There was no statistical difference in ILC3 percentage in ascites between the two groups ($P=0.230$). T-bet mRNA relative level and IFN- γ production by lin⁻ cells from ascites were elevated in response to LPS stimulation in SBP group compared with untainted ascites group (both $P<0.001$). GATA3 mRNA relative level and IL-5/IL-13 secretion by lin⁻ cells from ascites were reduced in SBP group compared with untainted ascites group (both $P<0.05$). There was no significant difference of ROR γ t mRNA relative level or IL-17/IL-22 expression between the two groups (both $P>0.05$). **Conclusion** Peripheral ILC subsets do not change in liver cirrhosis patients with SBP. ILC1 percentage is up-regulated, and ILC2 percentage is down-regulated in liver cirrhosis patients with SBP.

[Key words] Liver cirrhosis; Peritonitis; Ascites; Innate lymphoid cells

肝硬化所致的机体免疫功能不全和致病菌移位增加了肝硬化失代偿期患者的感染风险。细菌感染是肝硬化患者最严重和致命的并发症之一,细菌感染可诱导机体系统性炎症应答,造成氧化应激和线粒体功能不全,诱发慢加急性肝衰竭发生^[1-2]。肝硬化失代偿期患者感染后容易导致自发性细菌性腹膜炎(spontaneous bacterial peritonitis, SBP),但由于缺乏典型临床表现,早期诊断困难,在重症病例中可迅速发展为感染性休克,造成循环衰竭,导致患者死亡^[3]。固有淋巴样细胞(innate lymphoid cells, ILC)是新近鉴定的一类固有免疫细胞,不表达T淋巴细胞和B淋巴细胞抗原受体,主要位于组织器官中,发挥抗感染、黏膜屏障构建、调

控机体炎症应答、协调适应性免疫应答等多种功能^[4]。ILC分为ILC1、ILC2和ILC3等三个亚群,不同亚群在肝脏疾病中发挥的功能亦有差异^[5-6]。鉴于固有免疫细胞在肝硬化发病中的重要调控作用,本研究检测了肝硬化合并SBP患者外周血和腹水中ILC亚群的变化。

对象与方法

一、研究对象

横断面研究。纳入2019年11月至2020年11月在驻马店市中心医院住院的62例肝硬化患者,其中肝硬化合并单纯腹水41例(单纯腹水组),



肝硬化合并 SBP 21 例(SBP 组);纳入标准:(1)年龄 >18 岁;(2)影像学检查发现中至大量腹水;(3)单纯腹水诊断标准:腹水中性粒细胞计数 < $250 \times 10^6/L$ 且腹水培养阴性。SBP 诊断标准:腹水中性粒细胞计数 > $250 \times 10^6/L$, 或腹水培养阳性, 排除腹腔内的、可手术治疗的感染来源^[7]。排除标准:(1)合并人类免疫缺陷病毒感染;(2)合并恶性肿瘤;(3)合并自身免疫性肝炎、原发性胆汁性胆管炎、原发性硬化性胆管炎、系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎等免疫性疾病;(4)合并妇科疾病等非肝脏疾病造成的腹水;(5)妊娠及哺乳期妇女。所有肝硬化腹水患者在入院后常规进行腹腔穿刺放水, 腹水送检常规、生化和培养。所有患者在进行腹腔穿刺前均未接受抗感染治疗。同时纳入 20 名在驻马店市中心医院体检中心进行查体的健康者作为健康对照组。本研究通过驻马店中心医院伦理委员会审批(编号:2019 市医伦理 07012 号), 所有患者和对照者均签署知情同意书。

二、研究方法

1. 主要试剂和仪器:人 Ficoll 淋巴细胞分离液、Percoll 密度梯度分离液、脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)均购自美国 Sigma 公司, RPMI1640 培养液和胎牛血清均购自美国 Gibco 公司, 抗 lineage (lin, 包含 CD3/CD19/CD20/CD14)-藻红蛋白(PE)、抗 CD45-异硫氰酸荧光素酯(FITC)、抗 CD161-别藻蓝蛋白(APC)、抗 CD127-藻红蛋白 Cy7(PE Cy7)、抗 CD117-多甲藻黄素-叶绿素-蛋白质复合物 Cy5.5(PerCP Cy5.5)、抗辅助性 T 细胞 2 趋化因子受体同源分子(CRTh2)-藻红蛋白德克萨斯红(PE Texas Red)均购自美国 BD 公司, Trizol 试剂购自美国 Invitrogen 公司, PrimeScript 反转录试剂盒、TB Green 实时定量 PCR 检测试剂盒均购自北京 TaKaRa 生物技术公司, 酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒购自武汉华美公司。FACS Aria II 流式细胞仪为美国 BD 公司产品, ABI7500 实时定量 PCR 仪为美国 Applied Biosystems 公司产品, 全自动酶标仪为美国 BioRad 公司产品。

2. 外周血单个核细胞(PBMC)的分离:所有患者和对照者均于清晨、空腹采集乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝外周血 10 ml, 使用人 Ficoll 淋巴细胞分离液分离 PBMC, 加入 RPMI1640+10% 胎牛血清于 37 °C、5% CO₂ 条件下培养。

3. 腹水中单个核细胞的分离:患者常规进行腹

腔穿刺术获取腹水, 将腹水于 4 °C、 $364 \times g$ 离心 10 min, 收集沉淀的细胞, 使用 Percoll 密度梯度分离液分离腹水中的单个核细胞, 加入 RPMI1640+10% 胎牛血清于 37 °C、5% CO₂ 条件下培养。

4. 流式细胞术检测:PBMC 或腹水中获取的单个核细胞转入 FACS 管中, 使用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 2 次, 然后加入抗 lin-PE、抗 CD45-FITC、抗 CD161-APC、抗 CD127-PE Cy7、抗 CD117-PerCP Cy5.5、抗 CRTh2-PE Texas Red 各 5 μ l, 同时设立同型对照, 4 °C、避光孵育 30 min, 然后使用 PBS 洗涤 2 次, 加入含 4% 多聚甲醛的 PBS 溶液固定后上机。使用 CellQuest Pro 软件获取细胞, 使用 FlowJo V10 软件分析结果。

5. PBMC 和腹水单个核细胞中 ILC1、ILC2 和 ILC3 的亚群分析:首先利用前向角(FSC)和侧向角(SSC)对单个核细胞圈门, 在单个核细胞中根据 lin 和 CD45 的表达水平筛选出 lin⁻CD45⁺的细胞, 在 lin⁻CD45⁺细胞中根据 CD161 和 CD127 的表达筛选出 CD161⁺CD127⁺细胞, lin⁻CD45⁺CD161⁺CD127⁺细胞即为 ILC^[8]。在 ILC 细胞中, 根据 CD117 和 CRTh2 的表达情况, 将 ILC 分为 3 个亚群^[8]: ILC1 为 CD117⁻CRTh2⁻, ILC2 为 CRTh2⁺, ILC3 为 CD117⁺CRTh2⁻。

6. lin⁻细胞的分选和培养:使用抗 lin-PE 抗体对 10 例肝硬化合并单纯腹水和 10 例肝硬化合并 SBP 患者腹水单个核细胞进行染色(每例患者需约 5 000 ml 腹水), 使用 FACS Aria II 流式细胞仪对 PE 染色阴性的细胞进行分选, 即为 lin⁻细胞。向 lin⁻细胞中加入 LPS(1 μ g/ml)刺激培养 24 h, 收集细胞和上清。

7. 实时定量 PCR 法检测 lin⁻细胞中 ILC1 转录因子 T-bet、ILC2 转录因子 GATA3 和 ILC3 转录因子 ROR γ t mRNA:使用 Trizol 试剂提取 lin⁻细胞中的总 RNA。取 1 μ g 总 RNA, 使用 PrimeScript 反转录试剂盒将总 RNA 反转录为 cDNA, 使用 TB Green 实时定量 PCR 检测试剂盒对转录因子 T-bet、GATA3 和 ROR γ t mRNA 进行检测, 以 β -肌动蛋白作为内参照, 采用 2^{- $\Delta\Delta$ CT}法进行半定量分析。实时定量 PCR 引物序列见表 1。

8. ELISA 法检测干扰素(IFN)- γ 、白细胞介素(IL)-5、IL-13、IL-17 和 IL-22:使用 ELISA 检测试剂盒对培养上清中 IFN- γ 、IL-5、IL-13、IL-17 和 IL-22 水平进行检测。

9. 统计学分析:所有数据均采用 SPSS 21.0 软



表 1 实时定量 PCR 引物序列

引物名称	序列
T-bet 上游	5'-CGGCTGCATATCGTTGAGGT-3'
T-bet 下游	5'-GTCCCCATTGGCATTCTC-3'
GATA3 上游	5'-TCATTAAGCCCAAGCGAAGG-3'
GATA3 下游	5'-GTCCCCATTGGCATTCTC-3'
ROR γ t 上游	5'-GCAGCGCTCCAACATCTTCT-3'
ROR γ t 下游	5'-ACGTACTGAATGGCCTCGGT-3'
β -肌动蛋白上游	5'-GCATGGGTCAGAAGGATTCCT-3'
β -肌动蛋白下游	5'-TCGTCCCAGTTGGTGACGAT-3'

件进行分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用独立样本 t 检验进行两组间比较,单因素方差分析进行多组间比较。不符合正态分布的计量资料以 $M(Q_1, Q_3)$ 表示,采用 Mann-Whitney 检验进行两组间比较。采用率和频数描述定性资料,使用 χ^2 检验进行比较。相关性分析采用 Spearman 检验。双侧检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

结 果

1. 一般情况:各组的一般情况见表 2。SBP 组均出现发热或腹痛症状,腹水镜检可见脓球,且在腹水培养中检测到致病菌,其中大肠埃希菌 17 例、肺炎克雷伯菌 2 例、铜绿假单胞菌 2 例,所有致病菌均对碳青霉烯类抗生素敏感,使用美罗培南或亚胺培南西司他丁钠抗感染治疗后 SBP 症状好转。

2. 肝硬化患者外周血中 ILC 亚群的变化:外周血中 lin⁻CD45⁺CD161⁺CD127⁺ILC 占 PBMC 的比例在

单纯腹水组、SBP 组及健康对照组之间的差异无统计学意义 ($13.13\% \pm 2.84\%$ 比 $13.66\% \pm 3.57\%$ 比 $12.04\% \pm 3.10\%$, $F=1.48$, $P=0.235$), ILC1 占 PBMC 的比例单纯腹水组、SBP 组及健康对照组之间的差异无统计学意义 ($29.18\% \pm 7.34\%$ 比 $29.51\% \pm 7.95\%$ 比 $30.23\% \pm 7.90\%$, $F=0.13$, $P=0.880$), ILC2 占 PBMC 的比例在单纯腹水组、SBP 组及健康对照组之间的差异无统计学意义 ($43.67\% \pm 10.24\%$ 比 $41.72\% \pm 9.49\%$ 比 $40.78\% \pm 9.44\%$, $F=0.66$, $P=0.521$), ILC3 占 PBMC 的比例在单纯腹水组、SBP 组及健康对照组之间的差异无统计学意义 ($28.13\% \pm 9.02\%$ 比 $28.77\% \pm 8.27\%$ 比 $28.99\% \pm 7.73\%$, $F=0.08$, $P=0.921$)。肝硬化患者 PBMC 中 ILC 比例与 ALT ($r=0.140$, $P=0.279$)、T-BIL ($r=0.136$, $P=0.293$) 均无相关性。

3. 肝硬化患者腹水中 ILC 亚群变化:腹水中 ILC 占腹水单个核细胞的比例在单纯腹水组和 SBP 组之间的差异无统计学意义 ($12.27\% \pm 2.29\%$ 比 $13.22\% \pm 3.94\%$, $t=1.21$, $P=0.232$)。腹水中 ILC1 占腹水单个核细胞的比例在 SBP 组高于单纯腹水组 ($35.69\% \pm 3.39\%$ 比 $26.40\% \pm 3.85\%$, $t=9.36$, $P<0.001$)。ILC2 占腹水单个核细胞的比例在 SBP 组 ($36.83\% \pm 7.70\%$) 低于单纯腹水组 ($36.83\% \pm 7.70\%$ 比 $48.35\% \pm 9.45\%$, $t=4.823$, $P<0.001$)。ILC3 占腹水单个核细胞的比例在 SBP 组和单纯腹水组之间的差异无统计学意义 ($27.48\% \pm 5.80\%$ 比 $25.25\% \pm 7.29\%$, $t=1.21$, $P=0.230$)。肝硬化患者腹水中 ILC 比例与 ALT ($r=0.053$, $P=0.681$)、T-BIL ($r=-0.118$,

表 2 各组肝硬化患者和健康对照组的临床资料比较

项目	单纯腹水组	SBP 组	健康对照组	Z/F/ χ^2 值	P 值
例数	41	21	20	-	-
男性 ^a	29(70.7)	12(57.1)	11(55.0)	0.74	0.575 ^c
年龄(岁) ^b	49(33, 78)	50(37, 76)	48(32, 69)	1.45	0.163 ^c
腹水细胞总数($\times 10^6/L$) ^b	87(32, 279)	997(339, 5 123)	-	2.11	0.002
腹水白细胞总数($\times 10^6/L$) ^b	24(17, 89)	318(146, 1 173)	-	3.25	<0.001
ALT(U/L) ^b	142(87, 219)	105(76, 163)	-	0.87	0.387
T-BIL($\mu\text{mol/L}$) ^b	82(52, 183)	103(79, 283)	-	0.81	0.419
引发肝硬化的原因 ^a					
HBV 感染	30(73.2)	16(76.2)	-	0.54	0.697
HCV 感染	3(7.3)	0	-	-	-
酒精性肝病	3(7.3)	2(9.5)	-	0.98	0.212
布加综合征	1(2.4)	0	-	-	-
特发性肝硬化	4(9.8)	3(14.3)	-	0.88	0.309

注:^a例(%);^b $M(Q_1, Q_3)$; SBP 为自发性细菌性腹膜炎; ALT 为丙氨酸转氨酶; T-BIL 为总胆红素; HBV 为乙型肝炎病毒; HCV 为丙型肝炎病毒; ^c三组间比较,其他均为单纯腹水组与 SBP 组两组间比较;“-”为未检测或不适用



$P=0.374$)均无相关性。

4. SBP 组腹水中 lin^- 细胞转录因子表达和细胞因子分泌变化: SBP 组腹水 lin^- 细胞经 LPS 刺激后, 转录因子 T-bet mRNA 相对表达量高于单纯腹水组 (1.77 ± 0.41 比 1.03 ± 0.12 , $t=5.50$, $P<0.001$), 转录因子 GATA3 mRNA 相对表达量低于单纯腹水组 (0.88 ± 0.12 比 1.10 ± 0.15 , $t=3.63$, $P=0.002$), ROR γ t mRNA 相对表达量在单纯腹水组和 SBP 组 lin^- 细胞中的差异无统计学意义 (1.06 ± 0.13 比 1.08 ± 0.15 , $t=0.32$, $P=0.754$)。LPS 刺激后, SBP 组腹水 lin^- 细胞分泌 IFN- γ 的水平高于单纯腹水组, IL-5 和 IL-13 的分泌水平低于单纯腹水组, IL-17 和 IL-22 水平在单纯腹水组和 SBP 组之间的差异无统计学意义 (表 3)。

表 3 各组肝硬化患者腹水 lin^- 细胞分泌细胞因子水平的比较 (ng/L, $\bar{x} \pm s$)

项目	单纯腹水组 (n=10)	SBP 组 (n=10)	t 值	P 值
IFN- γ	95.55 \pm 17.85	133.5 \pm 23.88	4.03	<0.001
IL-5	60.90 \pm 9.78	47.30 \pm 14.41	2.47	0.024
IL-13	300.80 \pm 54.77	237.00 \pm 54.93	2.60	0.018
IL-17	63.90 \pm 9.57	70.30 \pm 11.65	1.34	0.196
IL-22	279.50 \pm 50.56	257.70 \pm 38.38	1.09	0.292

注: SBP 为自发性细菌性腹膜炎; IFN 为干扰素; IL 为白细胞介素; 仅纳入单次腹水量 > 5 000 ml 的患者, 每组 10 例

讨 论

目前认为肝硬化是一种多系统性疾病, 主要由进展性肝病所致的炎症应答诱发。肝硬化患者容易罹患细菌感染, 可能导致急性失代偿或慢加急性肝衰竭, 短期死亡率极高。固有免疫细胞是机体防御微生物感染的第一道防线, 肝脏内巨噬细胞和肥大细胞活化可发挥促进炎症应答和促进血管通透性的作用, 诱导中性粒细胞、淋巴细胞、嗜酸性粒细胞、单核细胞等多种炎症细胞向肝脏的募集浸润, 促进肝脏炎症损伤。但是, 随着肝硬化病程进展, 外周血中性粒细胞和单核细胞抗感染功能逐渐降低, 进而促进疾病进展^[9]。但固有免疫应答功能障碍在肝硬化患者中的作用和机制及其复杂, 且尚未完全阐明。

ILC 是新近鉴定的一类固有免疫细胞, 根据其表面标志和功能的不同分为 ILC1、ILC2 和 ILC3 亚群, 分别在转录因子 T-bet、GATA3 和 ROR γ t 的作用下, 分别以分泌 IFN- γ 、IL-5/IL-13、IL-17/IL-22 等因

子, 发挥相应生物学活性^[10]。不同 ILC 亚群在多种组织器官的纤维化过程中发挥不同的免疫调控作用。肝脏中的 ILC1 可通过分泌多种促炎因子促进非酒精性脂肪性肝病和慢性乙肝疾病进展, 诱导肝纤维化甚至肝硬化发生^[11-12], 并可发挥抗病毒和抗细菌感染活性^[13]。有研究发现, ILC2 可通过分泌 IL-5 和 IL-13 促进嗜酸性粒细胞功能, 诱导肝星状细胞分泌 IL-10 和转化生长因子- β , 促进肝纤维化发生^[14]。然而, 心脏中的 ILC2 可通过分泌 IL-33 发挥免疫调控作用, 改善和缓解心肌损伤诱导的心脏纤维化^[15]。因此, ILC2 在纤维化中发挥的作用可能与其所处的组织微环境密切相关。与之相似的是, ILC3 在四氯化碳诱导的小鼠肝纤维化模型中发挥促进纤维的作用^[16], 但在高脂饮食诱导的小鼠脂肪性肝炎模型中, ILC3 可通过分泌 IL-22 发挥增强肝脏脂类代谢、抑制凋亡的活性^[17]。虽然 ILC 主要定植在黏膜组织中, 但既往的研究发现, 外周血中亦存在 ILC^[8,18], 本研究结果也表明, 外周血 ILC 亚群在健康对照和肝硬化患者之间的差异无统计学意义, ILC 比例与肝硬化患者肝功能亦无显著相关性。因此, 尚不能确定 ILC 是否参与了肝硬化的疾病进程。

肝硬化腹水患者容易罹患细菌感染, 而由于肠道菌群移位造成革兰氏阴性菌感染所致的 SBP 是肝硬化腹水患者最常见的感染并发症^[3]。本研究对腹水中的 ILC 进行了检测, 肝硬化患者腹水中存在 ILC, 腹水中的 ILC 可能来源于腹膜生理性渗出、门静脉高压造成的血管通透性升高以及 SBP 造成的外周炎症细胞募集浸润和肠道黏膜原位 ILC 的移位。ILC 比例在单纯腹水和合并 SBP 患者之间无明显差异, 且腹水 ILC 比例与患者肝功能亦无显著相关性。但不同 ILC 亚群在肝硬化合并单纯腹水及合并 SBP 患者中存在差异。细菌感染所致的腹膜炎可诱导腹水中 ILC1 比例升高, ILC2 比例降低, ILC3 比例无变化, 这一结果亦通过检测转录因子表达和细胞因子分泌加以证实。这说明急性感染可能诱导了肝硬化患者 ILC1 细胞比例升高, 通过分泌 IFN- γ 发挥抗感染和诱导炎症应答的活性, 在清除细菌感染的同时也可能造成炎症损伤, 而 ILC2 细胞比例降低, 但 ILC2 在肝硬化合并 SBP 中的作用尚不清楚。

本研究存在一定的局限性, 首先, ILC 作为新近鉴定的固有免疫细胞亚群, 对其表面标志的研究尚存在一定争议。Trabanelli 等^[18]认为 CD161 并非



在所有 ILC 中具有表达,不能将 CD161 作为 ILC 鉴定的标志。但 Mazzurana 等^[8]则发现,大多数 NKG2A⁻细胞并不表达转录因子 Eomes 但却表达 CD161,说明 ILC 与自然杀伤细胞可能是两类不同的细胞亚群。本研究采用 CD161 作为表面标志进行 ILC 鉴定。其次,本研究使用 lin⁻(包括 CD3⁻、CD19⁻、CD20⁻、CD14⁻)作为 ILC 分选标志,虽然在分选前已经对外周血和腹水中的单个核细胞进行了提取,去除了以粒细胞为主的多核细胞,lin⁻的单个核细胞中仍有少量非 ILC 存在。在人体标本获取数量伦理学因素的基础上,为获得有效数量的 ILC,本研究仍采用 lin⁻单个核细胞进行体外分析,亦可得到有效的结论。

综上,肝硬化合并 SBP 患者腹水中 ILC1 细胞比例升高,ILC2 细胞比例降低。ILC 亚群比例失调在肝硬化合并 SBP 患者清除细菌感染和诱导炎症损伤中可能发挥重要作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 陈攀丽:实验操作、论文撰写、数据整理、统计分析;张炳勇:数据整理、统计分析;付雪琴、张逸强:实验操作、统计分析;谢华平:研究指导、数据分析、论文修改、经费支持

参 考 文 献

- [1] 张猛,李耀光,王科妍,等. 肿瘤相关抗原自身抗体用于慢性乙型肝炎相关肝硬化人群肝癌筛查的成本效果分析[J]. 中华医学杂志, 2021, 101(32): 2544-2551. DOI: 10.3760/cma.j.cn112137-20201229-03502.
- [2] 朱宇莉,丁红,付甜甜,等. 实时剪切波弹性成像技术检测肝脾弹性硬度对乙型病毒性肝炎肝硬化门脉高压的预测价值[J]. 中华医学杂志, 2020, 100(21): 1654-1657. DOI: 10.3760/cma.j.cn112127-20191029-02340.
- [3] 侯环荣,潘寒寒,李玉魁,等. 肝硬化合并自发性细菌性腹膜炎患者腹水白细胞介素-7 的表达水平和临床意义[J]. 中华肝脏病杂志, 2019, 27(4): 274-280. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1007-3418.2019.04.007.
- [4] Vivier E, Artis D, Colonna M, et al. Innate lymphoid cells: 10 years on[J]. Cell, 2018, 174(5): 1054-1066. DOI: 10.1016/j.cell.2018.07.017.
- [5] Nabekura T, Riggan L, Hildreth AD, et al. Type 1 innate lymphoid cells protect mice from acute liver injury via interferon- γ secretion for upregulating Bcl-xL expression in hepatocytes[J]. Immunity, 2020, 52(1):96-108.e9. DOI: 10.1016/j.immuni.2019.11.004.
- [6] Shen Y, Li J, Wang SQ, et al. Ambiguous roles of innate lymphoid cells in chronic development of liver diseases [J]. World J Gastroenterol, 2018, 24(18): 1962-1977. DOI: 10.3748/wjg.v24.i18.1962.
- [7] Aithal GP, Palaniyappan N, China L, et al. Guidelines on the management of ascites in cirrhosis[J]. Gut, 2021, 70(1): 9-29. DOI: 10.1136/gutjnl-2020-321790.
- [8] Mazzurana L, Forkel M, Rao A, et al. Suppression of Aiolos and Ikaros expression by lenalidomide reduces human ILC3-ILC1/NK cell transdifferentiation[J]. Eur J Immunol, 2019, 49(9):1344-1355. DOI: 10.1002/eji.201848075.
- [9] Bernsmeier C, van der Merwe S, Périanin A. Innate immune cells in cirrhosis[J]. J Hepatol, 2020, 73(1): 186-201. DOI: 10.1016/j.jhep.2020.03.027.
- [10] Cherrier DE, Serafini N, Di Santo JP. Innate lymphoid cell development: a T cell perspective[J]. Immunity, 2018, 48(6):1091-1103. DOI: 10.1016/j.immuni.2018.05.010.
- [11] Luci C, Vieira E, Perchet T, et al. Natural killer cells and type 1 innate lymphoid cells are new actors in non-alcoholic fatty liver disease[J]. Front Immunol, 2019, 10:1192. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01192.
- [12] Yang Z, Tang T, Wei X, et al. Type 1 innate lymphoid cells contribute to the pathogenesis of chronic hepatitis B[J]. Innate Immun, 2015, 21(6): 665-673. DOI: 10.1177/1753425915586074.
- [13] Krueger PD, Narayanan S, Surette FA, et al. Murine liver-resident group 1 innate lymphoid cells regulate optimal priming of anti-viral CD8+T cells[J]. J Leukoc Biol, 2017, 101(1):329-338. DOI: 10.1189/jlb.3A0516-225R.
- [14] Hams E, Bermingham R, Fallon PG. Macrophage and innate lymphoid cell interplay in the genesis of fibrosis[J]. Front Immunol, 2015, 6: 597. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00597.
- [15] Chen WY, Wu YH, Tsai TH, et al. Group 2 innate lymphoid cells contribute to IL-33-mediated alleviation of cardiac fibrosis[J]. Theranostics, 2021, 11(6): 2594-2611. DOI: 10.7150/thno.51648.
- [16] Wang S, Li J, Wu S, et al. Type 3 innate lymphoid cell: a new player in liver fibrosis progression[J]. Clin Sci (Lond), 2018, 132(24):2565-2582. DOI: 10.1042/CS20180482.
- [17] Hamaguchi M, Okamura T, Fukuda T, et al. Group 3 innate lymphoid cells protect steatohepatitis from high-fat diet induced toxicity[J]. Front Immunol, 2021, 12: 648754. DOI: 10.3389/fimmu.2021.648754.
- [18] TrabANELLI S, Gomez-Cadena A, Salomé B, et al. Human innate lymphoid cells (ILCs): Toward a uniform immune-phenotyping[J]. Cytometry B Clin Cytom, 2018, 94(3):392-399. DOI: 10.1002/cyto.b.21614.

更正

本刊2021年第101卷第44期第3656页“磁共振泌尿系统成像(MRCP)”应为“磁共振胰胆成像(MRCP)”

