

慢性乙型重型肝炎患者外周血各亚群淋巴细胞绝对值的特点

辛绍杰^{1*}, 邹正升^{2*}, 李保森², 赵军², 徐东平³, 陈黎明⁴, 邢汉前¹, 金磊³, 王福生³

(1. 解放军第302医院感染三科, 北京100039; 2. 解放军第302医院感染四科; 3. 解放军传染病研究所生物治疗研究中心; 4. 解放军第302医院感染六科)

[摘要] **目的:**分析慢性乙型重型肝炎(以下简称慢重肝)患者外周血各亚群淋巴细胞绝对值的特点。**方法:**慢重肝患者61例, 乙肝引起的肝硬化26例, 慢性乙型肝炎21例, 健康志愿者10例。采用流式细胞仪检测各自外周血淋巴细胞CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、NK细胞(CD3⁻/CD16⁺/CD56⁺)、NKT细胞(CD3⁺/CD16⁺CD56⁺)等亚群表达百分比, 计算各淋巴细胞亚群绝对值, 并进行统计学分析。**结果:**与乙肝引起的肝硬化、慢性乙型肝炎患者以及健康志愿者相比, 慢重肝患者CD3⁺、CD4⁺及CD8⁺T淋巴细胞的绝对值均明显降低($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$); 与存活者相比, 慢重肝死亡患者外周血淋巴细胞、CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、NK细胞、NKT细胞绝对值均有一种降低的趋势但尚未达到统计学意义。**结论:**慢重肝患者存在一定程度的细胞免疫功能紊乱, 可能与其预后存在一定的相关性。

[关键词] 肝炎, 乙型, 慢性; 淋巴细胞; 预后

[中图分类号] R 575.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)04-0413-04

Characteristics of peripheral circulating lymphocyte subsets and their clinical implication in severe hepatitis patients with chronic HBV infection

XIN Shao-jie^{1*}, ZOU Zheng-sheng^{2*}, LI Bao-sen², ZHAO Jun², XU Dong-ping³, CHEN Li-ming⁴, XING Han-qian¹, JIN Lei³, WANG Fu-sheng³ (1. The 3rd Infectious Department, No. 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China; 2. The 4th Infectious Department, No. 302 Hospital of PLA; 3. Research Center of Biological Therapy, Beijing Institute of Infectious Diseases of PLA; 4. The 6th Infectious Department, No. 302 Hospital of PLA)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the characteristics of peripheral circulating lymphocyte subsets in severe hepatitis patients with chronic HBV infection (SHPCHI). **Methods:** The numbers of circulating lymphocyte subsets, including CD3⁺, CD4⁺ and CD8⁺, NK cells (CD3⁻/CD16⁺/CD56⁺), and NKT cells (CD3⁺/CD16⁺CD56⁺), were determined in SHPCHI ($n=61$), patients with chronic hepatitis B (CHB, $n=21$), patients with cirrhosis (LC, $n=26$) and healthy volunteers ($n=10$) by flow cytometry. The absolute values of each lymphocyte subset were calculated and statistically analyzed. **Results:** The absolute numbers of circulating CD3⁺, CD4⁺ and CD8⁺ T cells were significantly reduced in SHPCHI group compared with those in the other 3 groups ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). There was a decreasing trend in the absolute numbers of peripheral CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ and NK cells in non-surviving SHPCHI compared with surviving SHPCHI, but the decrease was not statistically significant. **Conclusion:** SHPCHI has an disorderd cellular immune function, which might be related to the prognosis of SHPCHI.

[KEY WORDS] hepatitis B, chronic; lymphocytes; prognosis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(4): 413-416]

慢性乙型重型肝炎(SHPCHI, 以下简称慢重肝)在我国发病率高(占重型肝炎90%以上)^[1,2], 病情危重, 病死率高, 其发病机制复杂, 一直是研究的难点。目前国内外仅有少数文献报道了慢重肝患者部分免疫指标(CD4⁺及CD8⁺T淋巴细胞)特点^[3]。为了比较全面地了解慢重肝患者外周血淋巴细胞表达及各自绝对值变化与疾病的关系, 探讨疾病发生发展过程中免疫功能变化特点, 本研究选择了61例慢重肝患者作为研究对象, 对其外周血淋巴细胞亚群CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、NK细胞、NKT细胞的特点及临床意义进行了分析, 现报告如下。

1 材料和方法

1.1 研究对象 收集解放军第302医院感染三科、感染四科、感染六科及感染十五科4个科2004年7月至2005年5月住院的慢重肝患者61例, 其中男性53例, 女性8例, 年龄29.5(23~65)岁。诊断均符合2000年9月西安全国第十次病毒性肝炎及肝

[基金项目] 国家自然科学基金(30571749)。Supported by National Natural Science Foundation of China (30571749)。

[作者简介] 辛绍杰, 博士生导师。

* Corresponding author. E-mail: xsj302@263.net; E-mail: zzs302@sohu.com

病学术会议制订的病毒性肝炎防治方案^[4],并满足(1)排除原发性肝癌或其他肝脏转移性肿瘤;(2)无合并HCV、HDV、HGV、HIV感染和自身免疫性肝病;(3)入组前3个月无使用免疫抑制剂治疗史^[5,6]。另选择21例慢性乙肝患者、26例因慢性乙型肝炎导致的肝硬化患者,诊断亦均符合2000年9月西安全国第十次病毒性肝炎及肝病学术会议制订的病毒性肝炎防治方案^[4],并满足慢重肝组(1)、(2)及(3)。来源于我院临床及实验室历年健康检查为健康的10例志愿者为正常对照,年龄39.4(25~58)岁,男女比例7:3。

1.2 主要试剂和仪器 RPMI 1640 购自 Gibco 公司,淋巴细胞分离液(Histopaque,1.077 g/ml)购自上海试剂二厂,淋巴细胞亚群的单抗试剂:Simultest™ IMK-Lymphocyte 试剂盒购自 BD 公司(Catalog No. 340182)。FACS Calibur 流式细胞仪购自 BD 公司。Gens 五分类血细胞分析仪购自 Beckman Coulter 公司。

1.3 外周血血常规检测及单个核细胞的分离 采集慢重肝患者和对照组肝素抗凝外周血 5 ml。2 ml 用于血常规检测并得到淋巴细胞的绝对值,其余血液在采集后 4 h 之内通过淋巴细胞分离液对其单个核细胞进行分离并计数。

1.4 流式细胞仪测定淋巴细胞亚群百分比,计算各淋巴细胞亚群绝对值 肝素抗凝外周血 3 ml,在采

集后 4 h 之内,通过 Simultest™ IMK-Lymphocyte 试剂盒在常规免疫荧光标记三色 FACS Calibur 流式细胞仪分析淋巴细胞亚群 CD3⁺/CD4⁺、CD3⁺/CD8⁺、CD3⁻/CD16⁺CD56⁺(NK 细胞)、CD3⁺/CD16⁺CD56⁺NKT(NKT 细胞)表达百分比,最后计算各淋巴细胞亚群的绝对值。

1.5 统计学处理 所有统计分析采用 SPSS 10.0 软件(SPSS Inc., Chicago, IL)。3个连续变量采用 ANOVA 和 LSD or Tamhane multiple 比较检验(根据 homogeneity of variances 检验结果)或2个连续变量采用 *t* 检验。Dichotomous 变量用 Fisher's exact test 分析。

2 结果

2.1 患者的临床资料特点 慢重肝组与肝硬化或慢性肝炎患者性别比、病程、HBeAb 阳性率及 ALT 等无统计学差异,具可比性。与肝硬化组比较,慢重肝患者年龄、HBeAg 阳性率与 HBV DNA copy 数等无统计学差异,具有可比性。然而慢重肝患者血清总胆红素水平高,凝血酶原时间延长,血清白蛋白与血浆凝血酶原活动度降低,与肝硬化或慢性肝炎患者相比有显著差异(*P*<0.05);肝性脑病和腹水等并发症的发生率高,病死率也显著高于肝硬化或慢性肝炎患者(*P*<0.05)。具体详见表 1。

表 1 患者的一般临床资料

Tab 1 Clinical and biochemical parameters of patients

Parameters	Chronic hepatitis (n=21)	Cirrhosis (n=26)	SHPCHI (n=61)
Age (year)	35.95(18-51)	43.19(16-60) *	42.84(23-65) *
Male/female	21/0	22/4	53/8
Duration of diseases (year)	7.51(1-19)	11.39(2-32)	12.34((5-34)
HBeAg(+/-)	15/7	9/17 *	23/38 *
HBeAb(+/-)	1/20	8/18	15/46
HBV DNA (+) [n(%)]	21(100)	20(76.92) *	42(68.85) *
Encephalopathy grade III/IV [n(%)]	0(0.0)	0(0.0)	19(31.1) *△
Ascites[n(%)]	1(4.8)	5(19.2)	49(80.3) *△
ALT (U/L)	131.2(16-562)	125.9(16-1426)	93.6(11-1161)
Albumin(ρ _B /g • L ⁻¹)	38.4(31-45)	35.5(19-43) *	32.6(24-43) *△
Total bilirubin(c _B /mmol • L ⁻¹)	23.8(3.2-230.3)	27.5(7.0-134.0) *	318.6(171.1-892.0) *△
Prothrombin time (t/s)	13.2(11.7-15.5)	15.7(12.8-25.2) *	24.6(12.0-76.8) *△
Prothrombin activity (%)	91.8(60.5-112.1)	69.0(29.5-95.9) *	37.8(7.4-39.9) *△
Mortality[n(%)]	0(0.0)	4(15.3)	36(59.0) *△

Clinical chemical data were expressed as $\bar{x} \pm s$. ALT: Alanine transaminase; SHPCHI: Severe hepatitis patients with chronic HBV infection. * *P*<0.05 vs chronic hepatitis; △ *P*<0.05 vs stable cirrhosis

2.2 慢重肝患者外周血淋巴细胞各亚群表达特点

如表 2 所示, 淋巴细胞绝对值从健康志愿者、慢性肝炎、肝硬化、慢重肝患者逐渐降低, 除慢性肝炎患者与健康志愿者之间差异无统计学意义外, 其他各组之间差异显著 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 慢重肝患者 $CD3^+$ 、 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ 淋巴细胞的绝对值较肝硬化、慢性肝炎患者或健康志愿者明显降低, 差异显著

($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 肝硬化患者 $CD3^+$ 、 $CD8^+$ T 淋巴细胞的绝对值较慢性肝炎降低, 差异显著 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$); 慢重肝患者 NK 细胞的绝对值较健康志愿者降低 ($P < 0.01$); 慢重肝患者 NKT 细胞的绝对值较肝硬化患者降低 ($P < 0.05$), 但与健康志愿者及慢性肝炎患者相比差异无统计学意义。

表 2 各组淋巴细胞亚群绝对值的比较

Tab 2 Comparison of absolute numbers of circulating $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, NK and NKT cells in different groups

Group	n	Total	$CD3^+$	$CD4^+$	$CD8^+$	NK	NKT
Normal	10	2 070.00±	1 227.10±	724.20±	477.90±	329.40±	60.10±
		540.00	366.74	210.49	167.61	96.38	31.37
Chronic hepatitis	21	1 870.00±	1 297.20±	698.04±	541.12±	220.16±	64.21±
		590.00	402.41	270.01	214.93	97.47	97.47
Cirrhosis	26	1 490±	991.67±	573.11±	382.60±	211.10±	69.40±
		670.00*△	433.80△	231.18	217.10△△	176.33	54.10
SHPCHI	61	1 180±	742.77±	428.79±	284.46±	168.26±	48.17±
		610.00**△△▲	382.61**△△▲▲	232.39**△△▲	179.99**△△▲	161.51**	34.93▲

SHPCHI: Severe hepatitis patients with chronic HBV infection. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs normal group; △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$ vs chronic hepatitis; ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$ vs stable cirrhosis

2.3 慢重肝患者外周血中淋巴细胞总数、 $CD3^+$ 、 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ 、NK 细胞、NKT 细胞绝对值与预后的关系 我们对 61 例慢重肝存活者 (25 例) 与死亡者 (36 例) 外周血淋巴细胞总数、 $CD3^+$ 、 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ 、NK 细胞、NKT 细胞绝对值进行比较, 发现慢重肝

死亡者外周血淋巴细胞总数、 $CD3^+$ 、 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ 、NK 细胞、NKT 细胞绝对值, 较存活者均有一种降低的趋势, 尤其是 $CD8^+$ T 淋巴细胞, 但尚未达到统计学意义。详见表 3。

表 3 61 例慢重肝患者存活者与死亡者外周血淋巴细胞总数、 $CD3^+$ 、 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ 、NK 细胞、NKT 细胞等绝对值之间的比较

Tab 3 Comparison of absolute numbers of circulating total lymphocytes, $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, NK and NKT cells between non-surviving hepatitis and surviving hepatitis patients with chronic HBV infection

Lymphocyte	Non-surviving (n=36)	Surviving (n=25)	P
Total	300-2 800(1182.76±653.60)	400-3 000(1351.79±633.60)	0.25
$CD3^+$	213-1 782(739.79±408.54)	256-2 490(912.36±468.34)	0.10
$CD4^+$	148-1 215(447.68±245.31)	144-1 440(528.09±277.33)	0.20
$CD8^+$	33-805(268.68±181.37)	108-1 050(358.66±213.58)	0.06
NK	21-728(173.36±179.61)	30-713(215.80±169.83)	0.29
NKT	8-100(43.74±25.13)	8-180(46.89±39.30)	0.67

3 讨论

Shimizu 等^[7]报道了急性及亚急性暴发性肝炎患者外周血淋巴细胞的特点。结果发现: (1) 与急性暴发性肝炎患者相比, 亚急性暴发性肝炎患者有更

高的 $CD19^+$ B 细胞, 它们占淋巴细胞的百分比分别为 $(12.7 \pm 3.7)\%$ 和 $(31.7 \pm 7.6)\%$; 与急性暴发性肝炎患者相比, 亚急性暴发性肝炎患者有更低的 $CD3^+$ T 淋巴细胞, 它们占淋巴细胞的百分比分别为 $(65.6 \pm 10.5)\%$ 和 $(50.2 \pm 8.7)\%$ 。通过测定其

绝对值,发现它们的不平衡主要是因为亚急性暴发性肝炎患者下降的 CD3⁺ T 淋巴细胞。(2)在 T 细胞亚群中,CD8⁺ CD11b⁻ 的 T 细胞在急性暴发性肝炎患者中升高,而在亚急性暴发性肝炎患者中降低。(3)通过动态研究发现,随着病情的好转,这些不平衡的变化得到逐步恢复。提示急性与亚急性暴发性肝衰竭患者有不同的免疫学背景。认为淋巴细胞亚群,对于评价急性与亚急性暴发性肝衰竭患者治疗效果及判断预后是一个有效的标志。

本研究通过血常规及流式细胞仪测定慢重肝外周血淋巴细胞亚群发现:(1)淋巴细胞绝对值从健康志愿者、慢性肝炎、肝硬化到慢重肝患者呈逐渐降低的趋势($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);(2)CD3⁺ T 淋巴细胞的绝对值,慢重肝患者较肝硬化、慢性肝炎患者或健康志愿者明显降低($P < 0.01$),与 Shimizu 等^[7]报道的亚急性暴发性肝炎患者的结果相似,与王静艳等^[8]、朱银芳等^[9]报道类似;(3)CD4⁺ T 淋巴细胞的绝对值,慢重肝患者较肝硬化、慢性肝炎患者及健康志愿者明显降低($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),与朱银芳等^[9]报道类似;(4)CD8⁺ T 淋巴细胞绝对值,慢重肝患者较肝硬化、慢性肝炎患者及健康志愿者明显降低($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),与 Shimizu 等^[7]报道的亚急性暴发性肝炎患者的结果相似,与朱银芳等^[9]、顾锡炳等^[9]报道不一致。我们认为,CD8⁺ T 淋巴细胞绝对值下降很可能与 CD8⁺ T 淋巴细胞被大量聚集到肝脏有关。

慢重肝患者或肝硬化患者 CD3⁺ T 细胞的下降可能也与 B 淋巴细胞增加(与自身抗体成分和球蛋白增加)有关。我们研究也发现慢重肝或肝硬化患者外周血 B 淋巴细胞的百分比较慢性肝炎或健康志愿者高,与健康志愿者相比差异显著($P < 0.05$ 或 0.01)。但慢重肝或肝硬化患者外周血 B 淋巴细胞的绝对值较慢性肝炎或健康志愿者要低,无统计学差异(数字未显示)。

另外本研究还发现,慢重肝患者外周血淋巴细胞、CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞、NK 细胞、NKT 细胞绝对值,死亡者较存活者均存在一种降低的趋势,尤其是 CD8⁺ T 淋巴细胞,但尚未达到统计

学意义,值得今后增加病例数进一步观察。

Wasmuth 等^[5]报道,“慢加急”肝衰竭(acute-on-chronic liver failure, ACLF; 相当于我国的慢性重型肝炎)患者与败血症患者一样呈现着“免疫麻痹”现象。ACLF 或败血症患者,体外实验 TNF- α 的产生、HLA-DR 的表达,与代偿性肝硬化相比,明显降低(P 均 < 0.001)。而血清 IL-6 的水平明显升高(P 均 < 0.05)。ACLF 患者明显的免疫功能紊乱与肝硬化的病因无关,但与高病死率有关。结果提示,ACLF 患者明显降低的细胞免疫功能,导致了患者感染率增加,为这些患者的防治提供了理论依据。本研究结果提示,与健康志愿者、慢性乙肝、代偿性乙型肝炎肝硬化相比,慢性乙型肝炎重型肝炎患者细胞免疫功能明显低下,提示慢性乙型肝炎患者外周血可能也呈现着细胞“免疫麻痹”现象,具体机制有待进一步探讨。

[参考文献]

- [1] 王宇明,陈耀凯,顾长海,等. 重型肝炎命名和诊断分型的再认识——附 477 例临床分析[J]. 中华肝脏病杂志,2000,8:261-263.
- [2] 邹正升,陈菊梅,辛绍杰,等. 565 例重型病毒性肝炎的临床特点分析[J]. 中华肝脏病杂志,2001,9:247-248.
- [3] 顾锡炳,李小雯. 慢性重型肝炎患者 T 细胞亚群的变化[J]. 肝脏,2002,6:210-211.
- [4] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学会联合修订. 病毒性肝炎防治方案[J]. 中华肝脏病杂志,2000,8:324-329.
- [5] Wasmuth HE, Kunz D, Yagmur E, et al. Patients with acute on chronic liver failure display sepsis-like immune paralysis[J]. J Hepatol,2005,42:195-201.
- [6] Ke WM, Ye YN, Huang S. Discriminant function for prognostic indexes and probability of death in chronic severe hepatitis B [J]. J Gastroenterol, 2003,38:861-864.
- [7] Shimizu T, Tokushige K, Yamaaguchi N, et al. Discrimination of two different clinical entities, acute-type and subacute-type, human fulminant hepatitis by peripheral blood lymphocyte subsets[J]. J Gastroenterol Hepatol,1999, 14:274-280.
- [8] 王静艳,穆桂玲,刘沛,等. 乙型肝炎基因变异与免疫异常的关系[J]. 中华传染病杂志,2001,19:73-76.
- [9] 朱银芳. 胸腺肽 $\alpha 1$ 对慢性重型肝炎 T 细胞亚群的影响[J]. 肝脏,2004,8:140-141.

[收稿日期] 2006-01-09

[修回日期] 2006-03-16

[本文编辑] 孙岩