

◇临床医学◇

外周血 T 淋巴细胞对乙肝病毒相关慢加急性肝衰竭患者预后的影响

汪增秀¹, 谭善忠^{1,2}, 孙薇薇¹, 沈建军¹, 肖倩¹, 梁重锋¹, 蒋淑莲¹

(1. 南京市第二医院中西医结合科, 江苏 南京 210003;

2. 南京中医药大学第一临床医学院, 江苏 南京 210006)

摘要:目的 探讨乙肝病毒相关慢加急性肝衰竭(HBV-ACLF)患者外周血 T 淋巴细胞亚群比例对其预后的影响。方法 选择 HBV-ACLF 患者 43 例,随访观察 3 个月后患者的存活率,应用流式细胞仪测定外周血 CD3⁺、CD4⁺ 和 CD8⁺ T 淋巴细胞及 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞的百分比,并计算 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 淋巴细胞比值,分析 T 淋巴细胞亚群对乙肝病毒相关慢加急性肝衰竭患者预后的影响,选择门诊同期健康体检者 20 例为健康对照组。结果 3 个月后,43 例 HBV-ACLF 患者存活 26 例,死亡 17 例。与肝衰竭存活组相比,肝衰竭死亡组 CD3⁺ 细胞百分率(22.96 ± 20.59)%、CD8⁺ 细胞百分率(31.63 ± 12.69)% 均低于存活组(37.89 ± 17.36)% 和(36.52 ± 9.75)%,而 CD4⁺ 细胞百分率(55.15 ± 14.23)%、CD4⁺/CD8⁺ (1.77 ± 1.38) 高于存活组(48.51 ± 13.35)%、(1.32 ± 0.68),均差异有统计学意义($P < 0.05$),但两组之间 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞比例差异无统计学意义。与健康对照组相比,肝衰竭死亡组患者外周血 CD3⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞及 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞比例下降,CD4⁺ T 淋巴细胞、CD4⁺/CD8⁺ 升高,肝衰竭存活组患者 CD3⁺ T 淋巴细胞及 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞百分比下降,均差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 T 淋巴细胞亚群比例的变化在一定程度上可以预测 HBV-ACLF 患者的预后,外周血 T 淋巴细胞 CD3⁺、CD8⁺、CD4⁺CD25⁺Treg 比例下降的程度越重,预后可能越差。

关键词:乙型肝炎病毒相关慢加急性肝衰竭;外周血 T 淋巴细胞亚群

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2017.12.009

Effects of peripheral blood T lymphocytes on the prognosis of patients with hepatitis B virus-associated acute-on-chronic liver failure

WANG Zengxiu¹, TAN Shanzhong^{1,2}, SUN Weiwei¹, SHEN Jianjun¹, XIAO Qian¹, LIANG Chongfeng¹, JIANG Shulian¹

(1. Department of Integrated Chinese and Western Medicine, The Second Hospital of Nanjing, Nanjing, Jiangsu 210003, China; 2. The First Clinical Medical School of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing, Jiangsu 210006, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of T lymphocyte subsets in peripheral blood of patients with hepatitis B virus-associated acute-on-chronic liver failure. **Methods** Forty-three cases of hepatitis B virus-associated acute-on-chronic liver failure (HBV-ACLF) patients and 20 healthy subjects were recruited in this study. Three months later, the survival rates of patients with liver failure were followed up. Flow cytometric analysis was used to detect the quantification of peripheral CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ T lymphocyte subgroup and CD4⁺CD25⁺Treg and calculate the ratio of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes, analyze the effect of T lymphocyte subsets on the prognosis of patients with chronic hepatitis B virus-associated acute liver failure. **Results** Three months later, 26 patients survived and 17 cases died. Compared with HBV-ACLF survival group, the proportions of the peripheral blood CD3⁺ (22.96 ± 20.59)%, CD8⁺ cells (31.63 ± 12.69)% were lower than the survival group (37.89 ± 17.36)% and (36.52 ± 9.75)%; the percentages of CD4⁺ cells (55.15 ± 14.23)% and CD4⁺/CD8⁺ (1.77 ± 1.38) were higher than those in the survival group (48.51 ± 13.35)%, (1.32 ± 0.68)%, and there were significant differences between them ($P < 0.05$), but there was no statistically significant difference between the two groups in CD4⁺CD25⁺Treg cells. Compared with healthy control group, the proportions of the peripheral blood CD3⁺, CD8⁺ T lymphocytes and CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells of HBV-ACLF death group were significantly lower while CD4⁺ T lymphocytes and CD4⁺/CD8⁺ were significantly higher, the proportions of the peripheral blood CD3⁺ T lymphocytes and CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells of HBV-ACLF survival group were significantly lower; the differences were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusions** The changes of the proportion of T lymphocyte subsets can predict the prognosis of patients with HBV-ACLF to a certain extent. The more

基金项目:江苏省中医药领军人才项目(LJ200922);南京市医学科技重点项目(ZKX13018);南京市科技计划项目(201503030)

通信作者:谭善忠,男,主任医师,硕士生导师,研究方向:慢性肝病中西医结合临床和基础研究, E-mail:doctor_tsz@aliyun.com

serious the ratio of CD3⁺, CD8⁺ T lymphocytes and CD4⁺ CD25⁺ Treg in peripheral blood T lymphocytes, the worse the prognosis.

Key words: Hepatitis B virus-associated acute-on-chronic liver failure; Peripheral blood T lymphocyte subgroup

乙肝病毒相关慢加急性肝衰竭(HBV-ACLF)是我国肝衰竭的主要类型,其发病机制复杂,并发症多,病死率高,其防治关键是对诱发 HBV-ACLF 事件的早期识别及有效的救治^[1-2]。HBV-ACLF 患者 T 淋巴细胞亚群失衡,将进一步导致免疫紊乱,使人体不能有效清除乙肝病毒(HBV)病毒,而向慢性化及重症化方向发展^[3-4]。我们前期研究发现,肝衰竭患者外周血 CD3⁺、CD8⁺、CD4⁺ CD25⁺ Treg 比例较慢性乙型肝炎患者明显下降^[5]。本研究旨在探讨 HBV-ACLF 患者外周血 T 淋巴细胞频数变化与其预后的相关性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2013 年 1 月—2015 年 12 月南京市第二医院肝病科收住入院,诊断为 HBV-ACLF 患者(肝衰竭组)43 例,符合 2012 年中华医学会感染病学分会及肝病学会联合制定的《肝衰竭诊疗指南》的诊断标准。选取同期门诊健康体检者(健康对照组)20 例。肝衰竭组中男性 23 例,女性 20 例,平均年龄(46.84 ± 11.56)岁;健康对照组中男性 11 例,女性 9 例,平均年龄(45.85 ± 13.52)岁。各组在性别比例、年龄方面比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。排除标准:(1)急性、亚急性肝衰竭;(2)其他原因包括中毒性、药物性、自身免疫性、酒精性、寄生虫性肝病导致的慢性肝损伤;(3)合并其他肝炎病毒感染;(4)原发性肝癌;(5)有免疫治疗史;(6)哺乳或妊娠期妇女;(7)抗人类免疫缺陷病毒(HIV)阳性者。本研究经南京市第二医院医学伦理委员会批准,患者均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 仪器及试剂 抗-CD3-PerCP、抗-CD4-FITC、抗-CD8-PE、抗-CD4-FITC-CD25-PE 试剂盒均购自美国 BECKMAN COULTER 公司;淋巴细胞分离液购自北京 Solarbio 生物公司;流式细胞仪(FACSCalibur)购自美国 BD 公司。

1.2.2 外周血 T 淋巴细胞的检测 按照文献[6-7]的方法,具体步骤如下:根据细胞计数大约取 10⁵ 分离外周血单个核细胞,加入抗-CD3-PerCP、抗-CD4-FITC、抗-CD8-PE、抗-CD4-FITC-CD25-PE 试剂表面染色,另外一管加入 IgG-PE、IgG-FITC、IgG-Per-cp 作为同型对照然后进行检测,以侧向角散射光(SSC)为纵坐标,前向角散射光(FSC)为横坐标,建立二维散点图,并在散点图上调整阈值参数,圈

定淋巴细胞设门以获取细胞。以淋巴细胞设门,分析门内 CD4⁺ CD25⁺ Treg 占淋巴细胞的百分率。以 CD3-SS 设门,分析门内 CD4⁺、CD8⁺ 占 CD3⁺ T 淋巴细胞的百分率。

1.3 统计学方法 应用 SPSS 19.0 软件进行统计分析,观测资料主要为计量数据,若通过正态性检验,符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 描述,三组之间行方差分析,两两比较采用 LSD 检验,若不符合正态分布,以中位数、最大值、最小值、四分位数间距描述,三组之间的比较采用 Kruskal-Wallis H 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肝衰竭患者转归 43 例 HBV-ACLF 患者经过治疗 1~3 个月后,存活 26 例(56.9%),死亡 17 例(43.1%)。

2.2 外周血 CD3⁺ 细胞百分率的比较 与肝衰竭存活组相比,死亡组 CD3⁺ T 淋巴细胞比例下降,差异有统计学意义($P = 0.007$)。与健康对照组相比,肝衰竭死亡组($P = 0.004$)、存活组 CD3⁺ 细胞百分率($P = 0.000$)均下降明显,差异有统计学意义,具体数据见表 1。

表 1 各组患者外周血 CD3 ⁺ Treg 比较					
组别	例数	中位数	最大值	最小值	四分位数间距
健康对照组	20	53.49	69.96	34.69	26.77
肝衰竭组	43				
存活组	26	28.32 ^a	59.37	17.39	36.62
死亡组	17	10.56 ^{ab}	52.87	4.89	43.29

注: $H = 20.22, P = 0.000$; 两两比较:与健康对照组比较,^a $P < 0.05$;与肝衰竭存活组比较,^b $P < 0.05$ (表中资料不符合正态分布)。

2.3 外周血 CD4⁺、CD8⁺ 细胞百分率及其比值的比较 与肝衰竭存活组相比,肝衰竭死亡组 CD4⁺ 细胞百分率上升($P = 0.045$),而 CD8⁺ 细胞百分率下降($P = 0.034$), CD4⁺/CD8⁺ 升高($P = 0.016$),差异有统计学意义。与健康对照组比较,肝衰竭死亡组外周血 CD4⁺ 细胞百分率上升($P = 0.037$), CD8⁺ 细胞百分率下降($P = 0.004$), CD4⁺/CD8⁺ 升高($P = 0.002$),均差异有统计学意义,而肝衰竭存活组外周血 CD4⁺ ($P = 0.068$)、CD8⁺ 细胞百分率($P = 0.083$)及其比值($P = 0.057$)差异无统计学意义,具体数据见表 2。

表 2 各组患者外周血 T 淋巴细胞亚群比较 $\bar{x} \pm s$

组别	例数	CD4 ⁺ Treg/%	CD8 ⁺ Treg/%	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
健康对照组	20	49.17 ± 8.25	41.87 ± 9.03	1.27 ± 0.40
肝衰竭组	43			
存活组	26	48.51 ± 13.35	36.52 ± 9.75	1.32 ± 0.68
死亡组	17	55.15 ± 14.23 ^{ab}	31.63 ± 12.69 ^{ab}	1.77 ± 1.38 ^{ab}
F 值		1.699	4.480	5.275
P 值		0.039	0.015	0.008

注:与健康对照组比较,^a $P < 0.05$;与肝衰竭存活组比较,^b $P < 0.05$ (表中资料符合正态分布)。

2.4 外周血 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞百分率的比较
与健康对照组相比,肝衰竭存活组($P = 0.000$)、死亡组患者外周血 CD4⁺CD25⁺Treg 比例($P = 0.004$)明显下降,差异有统计学意义。肝衰竭死亡组较存活组明显下降,差异有统计学意义($P = 0.007$),具体数据见表 3。

表 3 各组患者外周血 CD4⁺CD25⁺Treg 比较

组别	例数	中位数	最大值	最小值	四分位数间距
健康对照组	20	3.06	4.75	1.32	2.35
肝衰竭组	43				
存活组	26	0.13 ^a	1.85	0.02	1.60
死亡组	17	0.12 ^{ab}	2.67	0.02	1.24

注: $H = 25.68$, $P = 0.000$;与健康对照组比较,^a $P < 0.05$;与肝衰竭存活组比较,^b $P < 0.05$ (表中资料不符合正态分布)。

3 讨论

外周血 T 淋巴细胞是反映人体免疫状态的重要指标,它的每个亚群各司其职,通过比例、功能等变化来维持机体免疫内环境的稳定。CD3⁺代表总 T 淋巴细胞,CD3⁺ T 淋巴细胞数量下降提示机体的免疫活性细胞不足,免疫功能低下,近年来有研究发现 HBV-ACLF 患者的 CD3⁺ T 淋巴细胞与单核细胞比例的下降与不良预后有关^[8]。CD4⁺为辅助性 T 细胞。CD8⁺为细胞毒性 T 细胞,HBV 特异性的 CD8⁺ T 细胞在初期可清除 HBV 不引起免疫损伤,如果没及时清除 HBV,则和非特异性 CD8⁺ T 淋巴细胞共同作用从而引起肝损伤。CD4⁺CD25⁺Treg 主要通过维持对外源性和内源性抗原的免疫耐受,进而调控机体对 HBV 感染的免疫应答。CD4⁺/CD8⁺比值反映了机体的免疫状态,该比值失衡则说明存在免疫系统紊乱。

本研究通过分析肝衰竭死亡组与存活组外周血 T 淋巴细胞比例的区别及与健康对照组的比较发现,肝衰竭存活组 CD3⁺ T 淋巴细胞、CD4⁺CD25⁺Treg 比例明显减少,死亡组 CD3⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞、CD4⁺CD25⁺Treg 比例均明显减少,且较肝衰竭

存活组减少更为显著,提示肝衰竭死亡组的细胞免疫水平更为低下。对于 HBV-ACLF 患者 T 淋巴细胞 CD3⁺、CD8⁺、CD4⁺CD25⁺Tregs 比例明显下降的原因,可能是参与免疫反应而“消耗”所致,并且其“消耗”越明显越不利于病情的改善。肝衰竭死亡组患者 CD4⁺ T 淋巴细胞数明显上升,CD4⁺/CD8⁺升高,CD4⁺ T 淋巴细胞的增加提示免疫系统对 CD8⁺ T 淋巴细胞减少做出反应,而肝衰竭死亡组患者 CD4⁺CD25⁺Treg 减少无法改变 CD8⁺ T 淋巴细胞明显减少的状态,而肝衰竭存活组由于 CD8⁺、CD4⁺ T 淋巴细胞数改变不明显,尽管 CD4⁺CD25⁺Treg 也处于低下的状态,但预后好于肝衰竭死亡组。本研究结果与多数研究一致^[9-10],HBV-ACLF 患者常发生免疫机能障碍,早期机体以免疫损伤为主,表现为天然免疫反应的高度活化和免疫调节反应的紊乱^[11-12],中晚期患者的细胞免疫功能更为低下^[13]。

综上所述,我们的研究说明 HBV-ACLF 患者的 T 淋巴细胞亚群比例的变化在一定程度上与预后相关,HBV-ACLF 患者的外周血 T 淋巴细胞 CD3⁺、CD8⁺、CD4⁺CD25⁺Tregs 比例明显下降,且下降的程度越重,预后可能越差。但本研究病例数量相对较少,且 HBV-ACLF 病情多变,用药复杂,治疗过程中某些干预可能影响结果。有待于更多中心、更多病例、更深入的研究来证实。

参考文献

[1] MOREAU R,ARROYO V. Acute on chronic liver failure;A new clinical entity[J]. Clin Gastroenterol Hepatol,2015,13(5):836-841.
[2] OLSON JC,KAMATH PS. Acute-on-chronic liver failure;concept, natural history, and prognosis[J]. Curr Opin Crit Care,2011,17(2):165-169.
[3] 王晓晶,张小平,宁琴.肝衰竭的免疫发病机制[J]. 临床肝胆病杂志,2014,30(10):984-991.
[4] 张涛,吉婧,刘鹏,等.不同阶段 HBV 相关 ACLF 患者外周血 DC 及 T 淋巴细胞免疫功能特点研究[J]. 肝脏,2014,19(12):924-929.
[5] 曹慧,张咏,谭善忠,等.乙型肝炎病毒相关慢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(9):8565-8568.
[6] SUN XH,LIU QL,LI M,et al. The study of CD4⁺ and CD8⁺ T subsets in chronic hepatitis B patients [J]. Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology,2011,27(5):545-547.
[7] 邓敏,李明慧,刘顺爱,等.慢性 HBV 感染者调节性 T 细胞水平及 Foxp3 与 CD127 表达关系的研究[J]. 中华实验和临床病毒学杂志,2010,24(1):21-23.
[8] 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[J]. Biochem Biophys Res Commun,2010,402(1):30-36.