

不同时相慢加急性乙肝肝衰竭患者外周血 NK 细胞及其受体分析

翁伟镇, 熊 静, 曹会娟, 陈俊峰, 张绍全, 张 静, 林炳亮
(中山大学附属第三医院传染病学教研室, 广东 广州 510630)

摘要:【目的】探讨不同时相慢加急性乙肝肝衰竭患者外周血 NK 细胞及相关受体的表达特点。【方法】采用流式细胞术检测各研究组,包括肝衰竭进展期组 13 例、平台期组 33 例、健康对照组 13 例的外周血 NK 细胞比例、活化性受体 NKG2D、NKp30、NKp46、抑制性受体 NKG2A、KIR2DL1、KIR2DL3、KIR3DL1、杀伤功能相关因子 Perforin、GranzymeB、FasL 的表达情况。【结果】进展期患者 NK 细胞比例较平台期患者、正常人外周血 NK 细胞比例低 ($P=0.021$), 正常人 KIR3DL1 比例较进展期患者、平台期患者外周血 KIR3DL1 比例高 ($P=0.036$), 正常人外周血 FasL 表达比例明显较进展期患者、平台期患者外周血 FasL 表达比例低 ($P<0.001$)。【结论】进展期肝衰竭患者外周血 NK 细胞、抑制性受体 KIR3DL1 较平台期、正常人下降, 而 FasL 表达升高, 这种改变和不同时相肝衰竭患者免疫状况有关。

关键词:乙型肝炎;慢加急性肝衰竭;NK 细胞;免疫细胞受体

中图分类号:R57 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-3554(2018)01-0087-06

Analysis of NK Cells and Receptors in Peripheral Blood of Patients with HBV Related Acute-on-chronic Liver Failure in Different Phases

WENG Wei-zhen, XIONG Jing, CAO Hui-juan, CHEN Jun-feng, ZHANG Shao-quan,
ZHANG Jing, LIN Bing-liang

(Department of Infectious Diseases, The Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

Corresponding to: LIN Bing-Liang; E-mail: lamikin@126.com

Abstract:【Objective】To investigate the character of expression of NK cells and its receptors in peripheral blood of patients with HBV-related acute-on-chronic liver failure (HBV-ACLF) in different phase.【Methods】There are thirteen patients with HBV-ACLF in advanced phase group and thirty-three patients in plateau phase group, with thirteen healthy person in control group. The frequency of NK cells and expression of NK cell activating receptors (NKAR) including NKG2D, NKp30 and NKp46, NK cell inhibitory receptors (NKIR) including NKG2A, KIR2DL1, KIR2DL3 and KIR3DL1, NK cell killing function related factors including Perforin, GranzymeB and FasL in peripheral blood of all patients were detected by flow cytometry.【Results】The percentage of NK cells in advanced group was lower than plateau group and healthy control group ($H=7.771$, $P=0.021$). The expression of KIR3DL1 in healthy control group was higher than advanced group and plateau group ($Z=6.639$, $P=0.036$) while the expression of FasL was significantly lower than advanced group and plateau group ($Z=22.5$, $P<0.001$).【Conclusion】Patients in advanced group had lower frequency of NK cells, lower expression of inhibitory receptor KIR3DL1 and higher expression of FasL than patients in plateau group and healthy control group, which is associated with immune status of patients in different phase of liver failure.

Key words: Hepatitis B virus; Acute-on-chronic liver failure; Natural killer cell; Receptors of immunocytes

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2018, 39(1): 87-92]

收稿日期: 2017-10-23

基金项目:“十二五”国家科技重大专项(2012ZX10002004);广州市产学研协同创新重大专项(1561000157)

作者简介:翁伟镇,医学硕士,住院医师,研究方向:慢加急性肝衰竭;林炳亮,通信作者,E-mail:lamikin@126.com

慢加急性肝衰竭(acute-on-chronic liver failure, ACLF)是在慢性肝病基础上出现的急性肝功能失代偿^[1]。在中国,乙型肝炎病毒感染(hepatitis B virus, HBV)是引起肝衰的最常见原因。肝衰竭的发生发展过程复杂,其病理生理主要是免疫损伤、缺血缺氧和内毒素血症等三重打击,临床的过程大致可分为进展期、平台期、恢复期,不同时相其免疫状态不同^[2]。而自然杀伤(natural killer, NK)细胞作为体内重要的免疫细胞,与抗肿瘤、抗病毒感染和免疫调节密切相关,可能参与慢加急性肝衰竭的进程^[3]。本文就进展期和恢复期两个时相慢加急性乙型肝炎肝衰竭其外周血NK细胞及其受体表达情况作一探讨。

1 材料与方法

1.1 研究对象

所有病例均为本院2012年1月到2013年1月住院病人,共46人。本研究严格遵循1975年赫尔辛基宣言的相关规定,所有患者均签署知情同意书,该研究经中山大学附属第三医院临床伦理委员会批准。所有患者均符合2009年APASL关于慢加急性乙型肝炎肝衰竭诊断标准^[4],年龄16~60岁,并且排除重叠其他肝炎病毒、自身免疫性疾病、酒精性肝病、药物性肝病,合并严重并发症、心肺肾等重要脏器功能衰竭、恶性肿瘤患者。根据7 d内总胆红素平均每日上升是否 $\geq 17.1 \mu\text{mol/L}$ 为基础,将不同组患者划分为疾病进展期和平台期,其中进展期13人,平台期33人。各组患者年龄、性别及治疗前血清学指标见表1。

1.2 研究方法

1.2.1 生物化学指标及血清标记物检测 肝功能采用美国 Beckman CX9 ALX 型全自动生物化学分析仪及其配套试剂检测;HBV血清标志物采用采用 CMIA (Abbott I 2000, USA) 或者 ECL kits (Roche Laboratories, Germany)。HBV DNA 采用实时荧光定量 PCR 检测(检测下限:100 U/mL,广州达安基因有限公司)。所有检测均严格按照试剂盒说明书进行操作。终末期肝病模型(model for end-stage liver disease, MELD)是主要应用血清胆红素、凝血酶原时间国际标准化比值和血清肌酐指标来评价终末期肝病的系统,其在预测终末期肝病死亡率及肝移植中的应用已渐趋成熟,应

用范围也开始扩大到重型肝炎、肝癌中。其计算公式为: $R=9.6 \times \ln(\text{Cr mg/dL})+3.8 \times \ln(\text{TBil mg/dL})+11.2 \times \ln(\text{INR})+6.4$ 。其R值越高,风险越大,生存率越低。

1.2.2 外周血标本采集 EDTA 抗凝管采集患者静脉血 10 mL,充分混匀,在 6 h 内采用聚蔗糖(Ficoll)-泛影葡胺(Urografin)(F/H)(华精生物高科技公司,中国上海)密度梯度离心法离心分离外周血单核细胞(PBMC)。将 10 mL 抗凝的外周静脉血与淋巴细胞分离液以 3:2 比例铺于其表面,室温下,400 $\times g$, 35 min 梯度离心,血浆与淋巴细胞分离液间的白膜即外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC),小心吸出,经 PBS 洗涤细胞后 2 次并离心后,可得到 PBMC。将 PBMC 冻存液加入 PBMC 中混匀,每管 0.6~0.8 mL 置于冻存管中,并于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中冻存。同时抽取健康成年人外周静脉血分离 PBMC 作为对照。

1.2.3 NK 细胞及其相关受体检测 比较不同期患者的 NK 细胞比例,活化性受体 NKG2D、NKp30、NKp46,抑制性受体 NKG2A、KIR2DL1、KIR2DL3、KIR3DL1 以及杀伤相关因子 Perforin、GranzymeB、FasL 表达情况。抗 CD3-V450、CD16-APC-CY7、CD56-PERCP-CY5.5、hNKp46-PE-CY7、hNKp30-A488、GranzymeB-Alexa Flour700 购自 BD 公司,抗 hNKG2A-PE、hNKG2D-APC、hKIR2DL1-Fluor MAb、hKIR2DL3-PE、hKIR3DL1-APC 购自 R & D 公司,抗 Perforin-FITC、FasL-PE 购自 eBioscience 公司。采用流式细胞分选仪(BD Influx, 美国)检测。将已分离冻存的 PBMC 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴解冻后,用 RPMI 1640 (Millipore, USA) 洗涤 1 次,1100 r/min ($r=18 \text{ cm}$), 4 min, RPMI 1640 3 mL 重悬细胞,置于 6 孔板,37 $^{\circ}\text{C}$, 体积分数 5% CO_2 , 2 h 后,经滤网过滤, PBS 洗涤 2 次,1000 r/min ($r=18 \text{ cm}$), 10 min, 加入流式抗体,室温避光孵育 30 min, 加入 1 mL PBS 洗涤,1000 r/min ($r=18 \text{ cm}$), 10 min, 弃上清, 加入 10 g/L 多聚甲醛溶液 200 μL 固定细胞, 24 h 内上机检测。

1.3 统计方法

使用 SPSS 13.0 软件包统计,患者的临床及生化指标采用平均数 \pm 标准差或中位数、四分位间距进行描述;使用 t 检验对两组间 ALB、TB、PTA、MELD 评分进行比较,使用卡方检验/Fisher

确切概率法对两组间年龄、性别、HBeAg 进行比较,使用Mann-Whitney U秩和检验对两组间ALT、HBV-DNA 进行比较,使用Kruskal-Wallis H 秩和检验对三组之间NK、NKG2D、NKp30、NKp46、NKG2A、KIR2DL1、KIR2DL3、KIR3DL1、Perforin、GranzymeB、FasL等表达情况进行比较。当 $P < 0.05$,差异有统计学意义。

2 结果

2.1 入组患者的基线特征

最终进入研究的患者共46人。各组患者年龄、性别及治疗前血清学指标、MELD评分均无统计学差异(表1)。

表1 进展期与平台期各期患者基线情况比较

Table 1 Comparison of clinical, biochemical and virologic characteristics of patients in the advanced and plateau group

	n	Gender (male/female)	Age/ years	ALT/ (U/L)	ALB/ (g/L)	Total bilirubin/ ($\mu\text{mol/L}$)	PTA/ %	HBeAg (+/-)	IgHBV-DNA loads/(U/mL)	MELD Score
Advanced	13	13/0	39.9 \pm 9.9	137.0; 109.3, 180	34.6 \pm 5.2	587.2 \pm 143.3	35.3 \pm 11.7	5/8	3.9; 2.0, 8.0	27.0 \pm 4.9
Plateau	33	32/1	40.2 \pm 9.5	69.0; 46.0, 115.0	37.2 \pm 5.4	492.8 \pm 163.9	36.2 \pm 9.7	10/23	3.5; 2.0, 4.2	24.6 \pm 3.6
χ^2 or F	0.000	-1.886	-0.119	0.925	0.873	1.004	0.089	-1.927	-1.092	0.000
P	0.991	0.062	0.9058	0.358	0.385	0.318	0.766	0.054	0.278	0.991

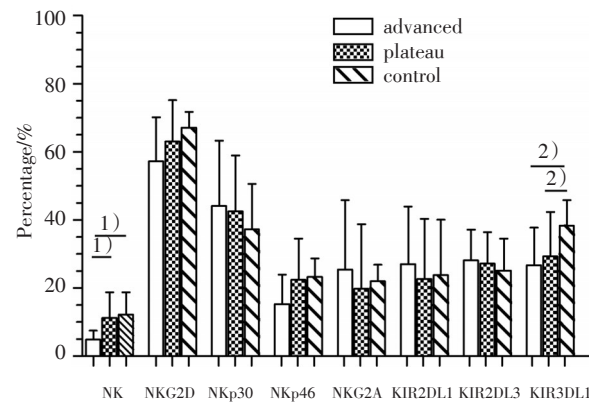
Compare advanced group with plateau group, except for ALT ($Z = -2.837$, $P = 0.004$), others' $P > 0.05$; ALT, alanine aminotransferase; ALB, albumin; PTA, prothrombin activity; HBeAg, hepatitis B e antigen; HBV, hepatitis B virus; MELD, Model for End-Stage Liver Disease.

2.2 NK细胞比例、NK细胞活化性受体、抑制性受体的比较

进展期患者NK细胞比例较平台期患者、正常人外周血NK细胞比例低,且差异有统计学意义($H = 7.771$, $P = 0.021$,其中进展期患者与平台期患者比较: $Z = 26.0$, $P = 0.036$;进展期与正常人对比较: $Z = 10.5$, $P = 0.006$);进展期、平台期、正常人外周血NK细胞相关活化性受体NKG2D、NKp30、NKp46表达无统计学差异($P > 0.05$)。进展期、平台期、正常人3组之间抑制性受体NKG2A、KIR2DL1、KIR2DL3表达无统计学差异($P > 0.05$),而正常人KIR3DL1比例较进展期患者、平台期患者外周血KIR3DL1比例高,差异具有统计学意义($Z = 6.639$, $P = 0.036$,其中进展期患者与正常人对比较: $Z = 17.0$, $P = 0.0265$;平台期患者与正常人对比较: $Z = 59.0$, $P = 0.0328$,而进展期患者与平台期患者表达无统计学差异;图1、图2)。

2.3 杀伤相关因子的比较

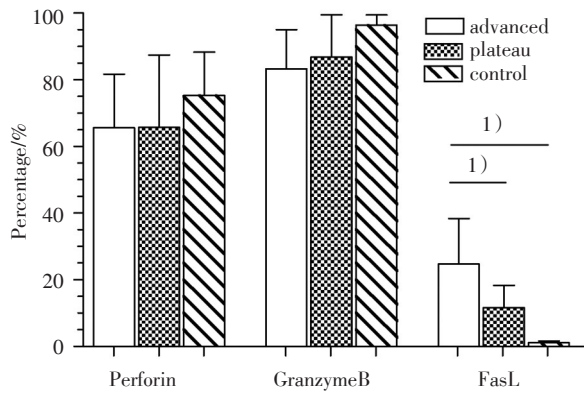
正常人外周血FasL表达比例明显较进展期患者、平台期患者外周血FasL表达比例低,且差异有统计学意义($Z = 22.5$, $P < 0.001$,其中进展期患者与正常人对比较: $Z = 20.0$, $P = 0.0327$;平台期患者



1) The percentage of NK cells in advanced patients was lower than that in plateau patients and healthy controls ($H = 7.771$, $P = 0.021$, advanced vs. plateau: $Z = 26.0$, $P = 0.036$; advanced vs. control: $Z = 10.5$, $P = 0.006$); 2) The percentage of inhibitory NK receptor KIR3DL1 in advanced and plateau patients were both lower than healthy controls ($Z = 6.639$, $P = 0.036$, advanced vs. control: $Z = 17.0$, $P = 0.0265$; advanced vs. control: $Z = 59.0$, $P = 0.0328$). There were no significantly differences in activating NK receptors NKG2D, NKp30, NKp46, inhibitory NK receptors NKG2A, KIR2DL1, KIR2DL3 among advanced group, plateau group and control, $P > 0.05$.

图1 各组患者NK细胞、受体表达情况

Fig.1 The percentages of NK cells and receptors in advanced group, plateau and control group



1) The expression of FasL was much higher in MSC-advanced patients than that in MSC-plateau patients and the healthy controls ($Z=22.5$, $P<0.001$, advanced vs. plateau: $Z=0.00$, $P=0.0007$; advanced vs. control: $Z=20.0$, $P=0.0327$; plateau vs. control: $Z=13.5$, $P=0.000$); Significant deviations were not observed in Perforin, GranzymeB, $P>0.05$.

图2 进展期患者、平台期患者、正常人外周血 Perforin、GranzymeB、FasL 表达情况

Fig.2 The percentages of Perforin, GranzymeB and FasL in advanced, plateau and control group

与正常人比较: $Z=13.5$, $P=0.000$; 进展期患者与平台期患者比较: $Z=0.00$, $P=0.0007$), 而 Perforin、GranzymeB 表达无统计学差异(图2、图3)。

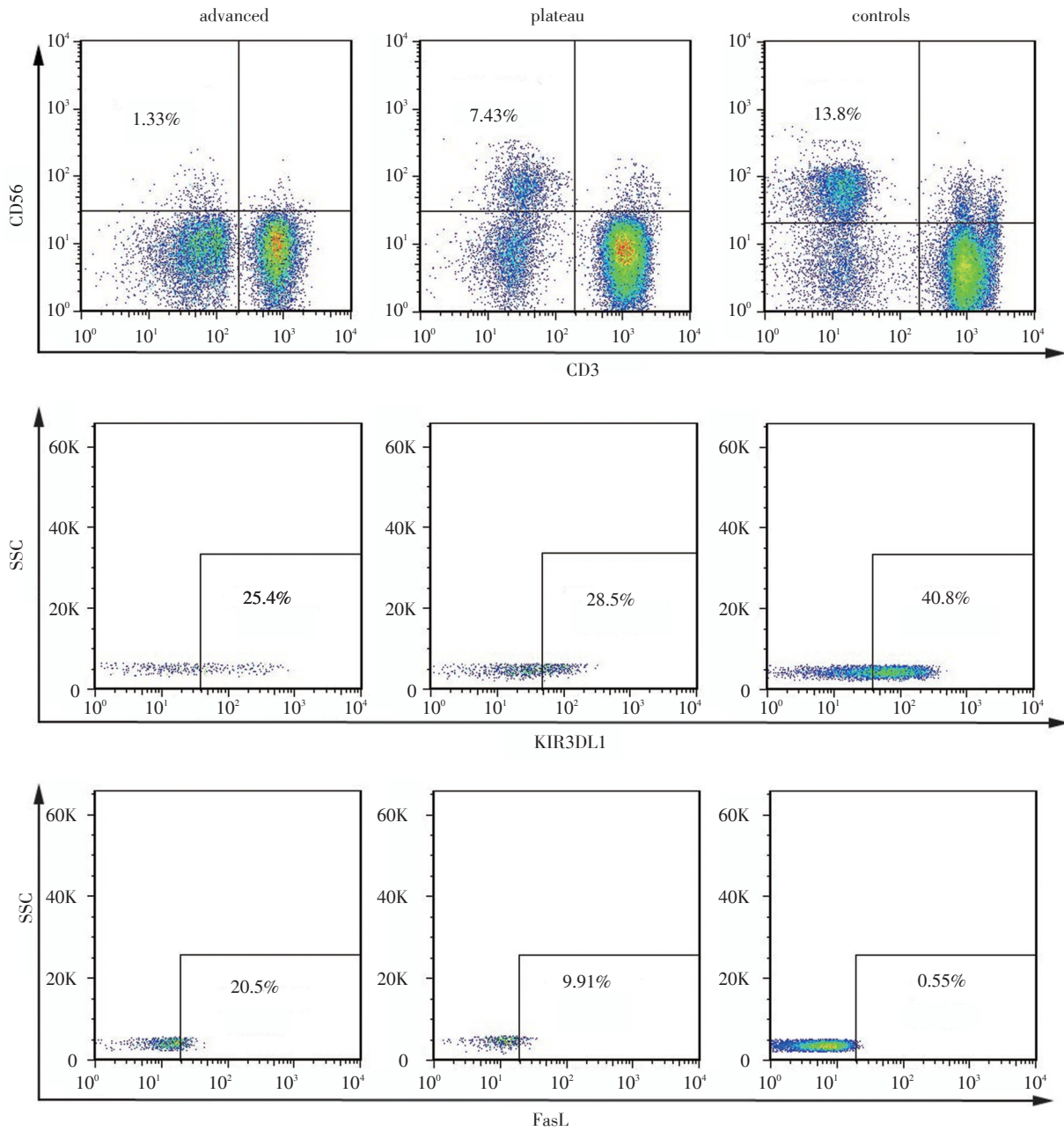
3 讨论

肝衰竭的发生发展过程复杂, 变幻莫测, 但临床的过程大致可分为进展期、平台期、恢复期等时相^[5]。本课题组研究显示乙型肝炎相关慢加急性肝衰竭患者其肝组织依次经受了免疫损伤、缺血缺氧和内毒素血症等三重致死性打击^[2]。慢加急性肝衰竭的发展是由于级联事件的发生导致的肝脏损伤进行性加重所致, 比如感染、出血、黄疸、腹水等, 其中感染与肝功能紊乱导致的促炎环境继续进展将加剧内循环紊乱, 使肝脏细胞持续大量坏死并最终导致多器官功能衰竭^[6-7]。

HBV 引起的免疫损伤以细胞免疫为主, 体液免疫为辅助, 包括树突状细胞、NK 细胞、CTL 细胞等均参与免疫损伤过程^[8]。NK 细胞作为固有免疫的重要细胞, 在抗感染、肿瘤等过程中发挥重要作用^[9]。NK 细胞可以通过上调 FasL、TRAIL、Per-

forin 等表达, 直接造成肝细胞死亡, 同时也可以通过释放 IL-4、IL-5、IFN- γ , 进一步诱导固有免疫细胞 Kupffer 细胞、肝窦内皮细胞、巨噬细胞活化, 从而直接促使肝细胞死亡, 也可分泌趋化因子 MIP-2、MCP-1、IP-10 等, 招募并活化免疫效应细胞如 NK 细胞、NKT 细胞、巨噬细胞至肝脏并造成肝细胞死亡^[10]。有研究发现, 慢加急性肝衰竭患者体内的 NK 细胞活性明显升高, 且受体 NKp30 和 NKp46 的升高与疾病的进展有关, 同时发现 NK 细胞介导的肝损伤是通过 Fas/FasL 及 NKG2D/NKG2D 配体途径^[11-12]。

本课题组根据患者 7 d 内总胆红素每日上升是否 $\geq 17.1 \mu\text{mol/L}$, 将患者划分为疾病进展期和疾病平台期, 对这些患者行 NK 细胞相关抗体标记并流式检测。进展期患者 NK 细胞比例、平台期患者 NK 细胞比例、抑制性受体 KIR3DL1 比例均较正常人低, 且进展期患者较平台期患者更低; 而 FasL 的表达在进展期患者、平台期患者明显较正常人高, 且进展期患者较平台期患者更高。我们推测原因可能是发生慢加急性肝衰竭时, 体内 NK 细胞更多地聚集于肝脏, 炎症状态失衡, 促炎状态占主导, 造成肝脏炎症剧烈, 肝细胞大量坏死, 故进展期、平台期患者外周血 NK 细胞均较正常人比例低; 而在慢加急性肝衰竭发生的早期、进展期, 肝脏局部免疫激活, 坏死较剧烈, 因此进展期外周血 NK 细胞更多地聚集于肝脏内, 故外周血中 NK 细胞比例较平台期少。同时进展期患者、平台期患者、正常人外周血中各种活化性受体 NKG2D、NKp30、NKp46、抑制性受体 NKG2A、KIR2DL1、KIR3DL1 均无明显统计学差异, 而其中抑制性受体 KIR3DL1 则在慢加急性肝衰竭患者体内表达较正常人低, 且进展期患者较平台期患者更低, 同时可见有关细胞凋亡的膜表面分子 FasL 在慢加急性肝衰竭患者体内表达较正常人明显增高, 且进展期患者表达较平台期患者高。我们推测原因可能是在慢加急性肝衰竭发生时, 肝脏炎症明显, 体内 NK 细胞大部分聚集于肝脏内部, 在杀伤病毒、感染的同时对肝脏细胞大量破坏致坏死, 同时由于抑制性受体 KIR3DL1 的表达减少, NK 细胞杀伤功能更明显, 表达有关细胞凋亡的膜表面分子 FasL 更多, 从而导致 NK 细胞的杀伤功能明显上升, 肝脏破坏更为明显。本实验研究结果与国外文献报导相一致, 均提示慢加急性



The percentages of NK cells was lowest in advanced patients while KIR3DL1 was highest in control patients. The expression of FasL was gradually decreased from advanced patients, plateau patients and control patients.

图3 进展期患者、平台期患者、正常人NK细胞、KIR3DL1、FasL表达流式细胞图

Fig.3 A representative flow diagram showed the percentages of NK cells, KIR3DL1 and FasL of patients in advanced, plateau and control groups

乙肝肝衰竭患者体内NK细胞活性升高,且NK细胞介导的肝损伤与Fas/FasL相关,同时我们在实验中发现,其肝损伤与抑制性受体KIR3DL1相关,为进一步研究肝衰竭发生、发展的免疫学特征提供一定的基础。

总之,不同时相慢加急性乙肝肝衰竭患者外

周血的NK细胞比例、抑制性受体KIR3DL1、FasL表达发生改变,这种改变与不同时相肝衰竭患者免疫状况有关,为进一步研究肝衰竭发生、发展机制提供一定的基础,同时对慢加急性肝衰竭不同时相的分层施治,特别是免疫治疗策略的制定具有重要的指导意义。

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. 肝衰竭诊治指南(2012年版) [J]. 实用肝脏病杂志, 2013, 16(3): 210-216.
Liver failure and artificial liver group, Chinese society of infectious diseases, Chinese medical association. Diagnostic and treatment guidelines for liver failure [J]. J Prac Hepatol, 2013, 16(3): 210-216.
- [2] 叶一农, 高志良. 乙型肝炎肝衰竭发生机制中的三重打击 [J]. 中国肝脏病杂志, 2009, 17(8): 638-640.
Ye YN, Gao ZL. Three shock hypotheses that may induce liver failure [J] Chin J Hepatol, 2009, 17(8): 638-640.
- [3] Rehermann B. Natural killer cells in viral hepatitis [J]. Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2015, 1(6): 578-588.
- [4] Sarin SK, Kumar A, Almeida JA, et al. Acute-on-chronic liver failure: Consensus recommendations of the Asian Pacific Association for the study of the liver (APASL) [J]. Hepatol Int, 2009, 3(1): 269-282.
- [5] 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(01): 5-8.
Zhang GL, Gao ZL. The immunological characteristics of and treatment strategies for HBV related acute-on-chronic liver failure [J] Chin J Viral Dis, 2011, 1(1): 5-8.
- [6] Blasco-Algora S, Masegosa-Ataz J, Gutierrez-Garcia ML, et al. Acute-on-chronic liver failure: Pathogenesis, prognostic factors and management [J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(42): 12125-12140.
- [7] Mucke MM, Rumyantseva T, Mucke VT, et al. Bacterial infection-triggered acute-on-chronic liver failure is associated with increased mortality [J]. Liver Int, 2017; 00: 1-9. <https://doi.org/10.1111/liv.13568>.
- [8] Sun C, Sun H, Zhang C, et al. NK cell receptor imbalance and NK cell dysfunction in HBV infection and hepatocellular carcinoma [J]. Cell Mol Immunol, 2015, 12(3): 292-302.
- [9] Leavy O. Maturation and function of NK cells [J]. Nat Rev Immunol, 2012, 12(3): 150-151.
- [10] Zheng Q, Zhu YY, Chen J, et al. Activated natural killer cells accelerate liver damage in patients with chronic hepatitis B virus infection [J]. Clin Exp Immunol, 2015, 180(3): 499-508.
- [11] 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]. J Immunol, 2010, 184(1): 466-475.
- [12] Liu F, Duan X, Wan Z, et al. Lower number and decreased function of natural killer cells in hepatitis B virus related acute-on-chronic liver failure [J]. Clin Res Hepatol Gastroenterol, 2016, 40(5): 605-613.

(编辑 孙慧兰)