文章编号:1000-5404(2012)17-1733-04

论著

HBV感染相关的慢加急性肝衰竭患者外周血中TCR γδT细胞促炎细胞因子的产生及与临床指标的相关性分析

彭 辉[1],陈维贤[1],常 琳[2],陈 敏[2] (400010 重庆,重庆医科大学:附属第二医院检验科[1],病毒性肝炎研究所,感染性疾病分子生物学省部共建教育部重点实验室[2])

[摘要] **目的** 探讨HBV感染相关的慢加急性肝衰竭患者(HBV-associated acute-on-chronic liver failure,HBV-ACLF)外周血中TCRγ δT(γδT)细胞的比例及产生IFN-γ、TNF-α及IL-17等促炎细胞因子的能力,分析它们与临床指标间的相关性。**方法** 入选26例HBV-ACLF患者、40例慢性HBV感染患者(CHBV)、25例健康对照者,用流式细胞仪方法检测外周血中γδT细胞的频率及产生炎性细胞因子IFN-γ、TNF-α、IL-17细胞的比例,采用SPSS 13.0统计软件分析各组间各细胞比例的差异及细胞比例与临床指标的相关性。**结果** HBV-ACLF患者外周血中γδT细胞占总T细胞的比例的中位值为4.8%,低于CHB患者(10.7%)与健康对照者(10.3%),差异有统计学意义($P<0.01$)。在体外经刺激后,IFN-γ阳性的γδT细胞在HBV-ACLF组的比例中位值为73.9%、CHBV组为70.9%,高于健康对照组(45.3%,$P<0.01$);HBV-ACLF患者中TNF-α阳性的γδT细胞中位值为26.7%,显著高于CHBV患者(11.5%)及健康对照组(11.7%,$P<0.01$);产生IL-17因子的γδT在HBV-ACLF组中中位值为0.7%,高于CHBV组(0.3%)及健康对照组(0.3%,$P<0.01$)。经Spearman Correlation相关性分析,HBV-ACLF组中TNF-α$^+$ γδT细胞的比例与ALT或AST水平呈负相关。**结论** 虽然HBV-ACLF患者外周血中总的γδT细胞比例降低,但产生炎性细胞因子IFN-γ、TNF-α、IL-17的能力显著增强,可能参与了HBV-ACLF发病过程中炎症因子急剧升高的过程。

[关键词] γδT细胞;慢加急性肝衰竭;乙型肝炎病毒;炎性因子
[中图法分类号] R373.21; R392.32; R575.302 [文献标志码] A

Proinflammatory cytokine production of TCR γδT cells in peripheral blood of patients with HBV-associated acute-on-chronic liver failure, and correlation analysis between cell proportion and clinical parameters

Peng Hui[1], Chen Weixian[1], Chang Lin[2], Chen Min[2]([1]Department of Laboratory Medicine, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University; [2]Key Laboratory of Molecular Biology for Infectious Diseases cofounded by Chongqing and Ministry of Education, Institute for Viral Hepatitis, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China)

[**Abstract**] **Objective** To explore the proportion of TCR γδT (γδT) cells and the cytokine production ability of the γδT cells in peripheral blood of patients with hepatitis B virus-associated acute-on-chronic liver failure (HBV-ACLF), and to analyze the correlation between the proportion of cells and the clinical parameters. **Methods** Twenty-six patients with HBV-ACLF (HBV-ACLF group), 40 patients with chronic HBV infection (CHBV group), and 25 healthy controls (HC group) were enrolled in this study. The proportion of γδT cells in peripheral blood of the subjects and the proportion of IFN-γ, TNF-α, or IL-17 producing γδT cells were determined by flow cytometry. The differences of the proportion of cytokine-producing γδT cells among the three groups and the correlation of the proportion with clinical parameters were statistically analyzed by SPSS software. **Results** The proportion of γδT cells in peripheral blood of the HBV-ACLF group (4.8% as median) was significantly lower than that of the CHBV group (10.7% as median) and HC group (10.3% as median) ($P<0.01$). After stimulation, the proportion of IFN-γ$^+$ γδT cells in the HBV-ACLF group (73.9% as median) and CHBV group (70.9% as median) was significantly higher than that in the HC group (45.3% as median) ($P<0.01$). The proportions of TNF-α$^+$ γδT cells and IL-17$^+$ γδT cells (26.7% and 0.7% as median) were significantly higher in the HBV-ACLF group than in the CHBV group (11.5% and 0.3%) and HC group (11.7% and 0.3%) ($P<0.01$). Moreover, the proportion of TNF-α$^+$γδT cells was negatively correlated with the levels of ALT and AST. **Conclusion** Although the proportion of total γδT cells in peripheral blood of HBV-ACLF patients decreases, the ability of the γδT cells in producing IFN-γ, TNF-α

[基金项目] 国家自然科学基金(30901264);重庆市科委自然科学基金(CSTC2009BB5264);重庆市卫生局医学科研计划项目(2011-2-152)
[通信作者] 陈 敏,电话:(023)63893707,E-mail:chenggming@yahoo.com.cn

and IL-17 is enhanced, which may be involved in the acute systemic inflammatory responses in HBV-ACLF development.

[**Key words**] γδT; acute-on-chronic liver failure; hepatitis B virus; inflammatory cytokine

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30901264), the Natural Science Foundation Project of Chongqing (CSTC2009BB5264) and the Project of Medical Science Research of Chongqing Municipal Health Bureau (2011-2-152). Corresponding author: Chen Min, Tel: 86-23-63893707, E-mail: chenggming@yahoo.com.cn

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,是一种死亡率高的严重临床综合征,其特征为在一定的时限内(2~4周),黄疸迅速加深(血清胆红素≥85 μmol/L)、凝血功能障碍(凝血酶原活动度<40%)、伴有腹水和/或肝性脑病等并发症。在我国,慢性HBV感染是导致ACLF最主要的因素(>80%),但其发病机制尚不十分清楚。目前研究显示,NK/NKT或非HBV特异性T淋巴细胞的大量激活,致体内多种炎性细胞因子的急剧增加,是导致大量肝细胞凋亡或坏死的重要因素[1-4]。γδT细胞是表达T细胞受体(TCR)γ与δ链的一种T细胞,且为NK/NKT外的另一类重要的非特异性免疫细胞。γδT细胞激活后可产生大量的炎性细胞因子,是IFN-γ、TNF-α或IL-17等因子的重要来源之一。研究显示,γδT细胞在多种病毒性感染疾病中(如腺病毒、疱疹病毒、丙型肝炎病毒等)分泌炎性细胞因子能力增强,在疾病的免疫病理过程中起重要作用[5-6]。那么,γδT细胞是否参与了HBV-ACLF的发生发展过程?γδT细胞在HBV-ACLF中的炎性细胞因子分泌功能究竟如何?本研究观察HBV-ACLF患者外周血中γδT细胞的比例及炎性细胞因子产生情况,探讨γδT细胞产生细胞因子能力与HBV-ACLF疾病的相关性。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取2009年1月至2011年11月重庆医科大学附属第二医院门诊或住院患者,共入选了26例HBV-ACLF患者(年龄26~78岁,男性21例,女性5例),40例慢性HBV感染患者(CHBV,年龄20~46岁,男性31例,女性9例)。25例健康对照为同期我院健康体检者,年龄24~51岁,男性14例,女性11例。慢性HBV感染患者的诊断标准符合中华医学会2006年发布的《慢性乙型肝炎防治指南》[7],均为血清HBsAg及HBV-DNA(≥10^4拷贝/ml)阳性至少6个月以上。HBV-ACLF患者的诊断符合2006年中华医学会发布的《肝衰竭诊疗指南》[8]及2010年亚太肝病学会推荐的慢加急性肝衰竭共识[1],均有慢性HBV感染病史,并主述在某种诱因下突然出现急性黄疸(总胆红素≥85 μmol/L)及凝血功能障碍(凝血酶原活动度<40%),肝功能进行性下降,甚至可出现肝性脑病或肝肾综合征。患者在入选前的半年内均未接受过抗病毒治疗,并排除其他肝炎病毒感染、HIV感染或肝癌等肝脏疾病。外周血在疾病诊断后1周内采集并立即检测。本研究经重庆医科大学附属第二医院伦理委员会批准。

1.2 临床指标的检测

肝功能(ALT、AST、TBiL或DBiL等)用全自动生化分析仪检测,HBV血清标志物HBsAg、HBsAb、HBeAg、HBeAb及HBcAb用罗氏电化学发光法分析,血清HBV-DNA用罗氏实时定量PCR仪作定量检测,凝血酶原活动度用全自动血凝分析仪检测。受试者的临床参数结果见表1。

1.3 外周血γδT细胞比例检测

取100 μl新鲜全血,加入相应剂量的荧光标记的单克隆抗体PerCP-conjugated anti-CD3 mAb (clone SK7)或APC-conjugated anti-TCR γδ mAb(clone B1),同时设立相同荧光标记的IgG对照,混匀,4 ℃避光染色30 min,加入2 ml 1∶10稀释的BD FACS™ lysing solution混匀,室温避光作用10 min,离心后,用FACS buffer(含1%胎牛血清的PBS)洗1次,最后将细胞重悬于200 μl的FACS Buffer中,立即于BD FACS Canto Ⅱ流式细胞仪上样检测,用BD FACS Diva 2.0软件分析数据。

1.4 γδT细胞体外刺激及细胞内细胞因子检测

新鲜全血2 ml用含0.85% NH_4Cl的PBS溶解红细胞,FACS Buffer洗1次,白细胞重悬于含10%胎牛血清(FCS)的RPMI1640的完全培养基中,加入终浓度为100 ng/ml佛波脂(PMA)、1 μg/ml离子霉素及高尔基体阻断剂,将细胞置于24孔板内,37 ℃ 5% CO_2孵箱内作用4 h。细胞体外刺激后,用FACS buffer洗1次,先用APC-conjugated anti-TCR γδ mAb做表面染色,洗涤后,用4%多聚甲醛固定,经0.1%皂素透膜后,加入相应体积的FITC-conjugated anti-IFN-γ、PE-conjugated anti-TNF-α或PE-conjugated anti-IL-17流式抗体做细胞内染色,4 ℃避光染色30 min,洗涤后,加200 μl的FACS Buffer重悬,于BD FACS CantoⅡ流式细胞仪上样检测,并用BD FACSDiva 2.0软件分析数据。

1.5 统计学分析

采用SPSS 13.0统计软件,数据用中位值及4分位值表示。各细胞比例在各组间的差异用Kruskal-Wallis及Mann-Whitney U检验,Spearman等级相关分析。

表1 入选的HBV-ACLF、CHBV患者及健康对照者的临床指标[中位值(最低值-最高值)]

组别	*n*	ALT(U/L)	AST(U/L)	TBiL(mol/L)	DBiL(mol/L)	PTA(%)	HBeAg(+/-)	血清HBV DNA [lg(拷贝/ml)]
健康者	25	22(7-33)	22(19-28)	11.3(9.2-15.7)	1.9(0.4-3.6)	94(86-100)	0/25	0
CHBV组	40	199.5(95-1 178)	89(30-698)	19.8(8.8-625.1)	9.3(1.1-408.9)	92(82-100)	33/7	6.9(4.4-8.9)
HBV-ACLF组	26	206(61-1 443)	187(75-966)	427.6(102-932.1)	326.7(92.3-658.8)	29(11-39)	18/8	6.3(4.1-7.6)

2 结果

2.1 3 组间外周血 γδT 细胞比例的比较

流式检测显示,外周血 γδT 细胞占总 T 细胞比例在 HBV-ACLF、CHBV 和健康对照组中分别为 4.8%、10.7% 和 10.3%。统计分析显示,HBV-ACLF 组的 γδT 细胞比例明显低于 CHBV 组或健康对照组,差异有显著性($P<0.01$),而 CHBV 组与健康对照组的 γδT 细胞比例差异无显著性($P>0.05$)。图 1 显示了 1 例 HBV-ACLF 患者外周血中 γδT 细胞的流式检测。

2.2 3 组间外周血中 γδT 细胞产生 IFN-γ、TNF-α 或 IL-17 细胞因子能力的比较

流式检测显示,HBV-ACLF 组的 TNF-α^+ γδT(26.7%)或 IL-17^+ γδT(0.7%)比例明显高于 CHBV 组(11.5%、0.3%)或健康对照组(11.7%、0.3%),差异有显著性($P<0.01$)。IFN-γ^+γδT 比例在 HBV-ACLF 组(73.9%)与健康对照组(45.3%)间差异有显著性($P<0.01$),而与 CHBV 组(70.9%)无显著性差异($P>0.05$)。同时,CHBV 组的 IFN-γ^+γδ T 比例明显高于健康对照组($P<0.01$),但 TNF-α^+ γδT 或 IL-17^+ γδT 比例与健康对照组间无显著性差异($P>0.05$)。图 2 显示了 1 例 HBV-ACLF 患者外周血经 PMA 及离子霉素刺激后,IFN-γ^+γδT、TNF-α^+ γδT 和 IL-17^+ γδT 的流式检测。

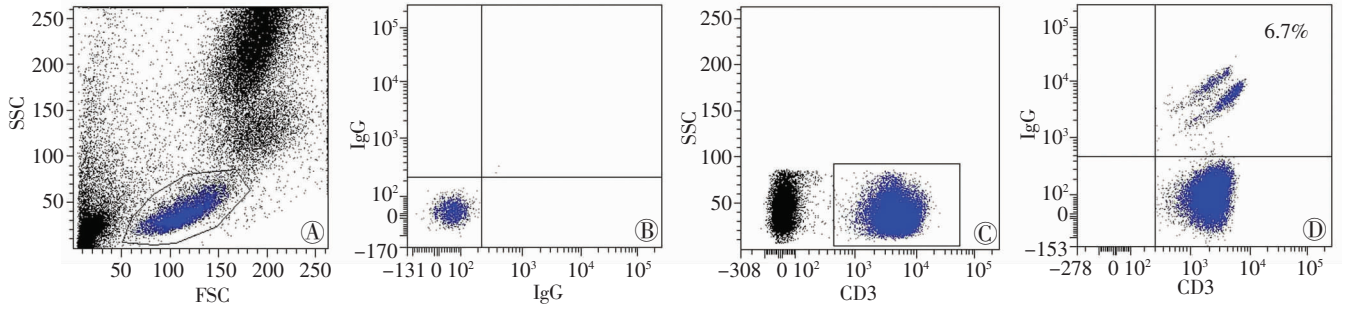
2.3 γδT 细胞比例及 IFN-γ^+γδT、TNF-α^+ γδT 或 IL-17^+ γδT 细胞比例与 HBV-ACLF 患者的临床指标的相关性分析

Spearman 相关分析结果显示,TNF-α^+ γδT 细胞比例与 ALT 水平呈负相关($r=-0.393$,$P=0.047$),与 AST 水平也呈负相关($r=-0.453$,$P=0.020$)。而总的 γδT 细胞比例及 IFN-γ^+γδT 或 IL-17^+ γδT 细胞比例与 ALT 水平间无相关性($r=-0.078$、-0.008 或 -0.062,$P>0.05$),且与 AST 水平也不相关($r=-0.096$、-0.127 或 0.045,$P>0.05$)。HBV-ACLF 组外周血总 γδT 细胞的比例及 IFN-γ^+γδT、TNF-α^+ γδT 或 IL-17^+ γδT 细胞比例与血清 HBV-DNA 载量间无相关性($r=-0.086$、0.111、-0.053 或 -0.232,$P>0.05$)。

3 讨论

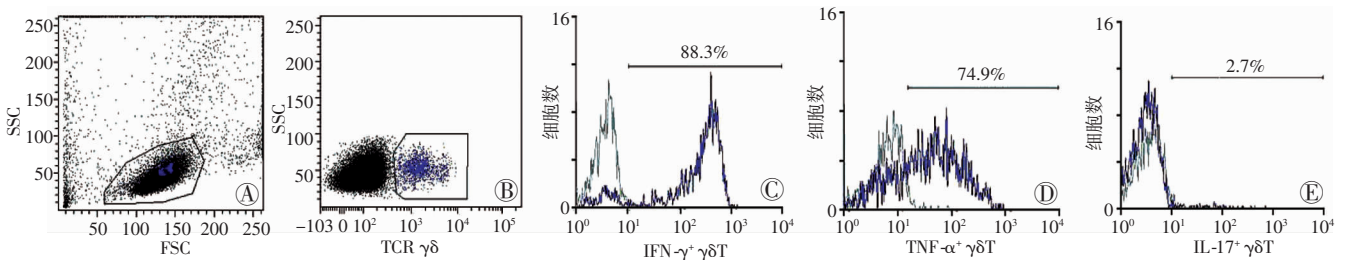
慢加急性肝衰竭是一种肝功能进行性下降,可引发肝性脑病或肝肾综合征等严重并发症、死亡率高的疾病。在我国,引发 ACLF 的主要原因是慢性 HBV 感染[1-3]。目前,HBV-ACLF 的发病机制还不十分清楚,有文献显示,炎性细胞因子急剧增多,大量免疫活性细胞的浸润引起的急性系统性炎性反应是诱发 ACLF 的重要因素。在 HBV-ACLF 患者血清中可检测到高水平的 TNF-α、sTNF-αR1、sTNF-αR2、IL-2 或 IFN-γ 等多种炎性细胞因子。目前,研究报道显示,NK、NKT 或其他的非特异性免疫细胞是这些炎性细胞因子的重要来源[3-4,9]。

γδT 细胞是除 NK、NKT 外的一类重要的非特异性免疫细胞,是体内炎性细胞因子 IFN-γ、TNF-α 等的重要来源之一。近来 Ajuebor 等[10]发现,在腺病毒(Ad)感染小鼠的肝脏炎性损伤模型中,γδT 细胞是启动肝毒性免疫损伤反应的关键因素;Barcy 等[11]也观察到 γδT 细胞在慢性人疱疹病毒(HHV-8)感染中的比例及杀伤功能增强;Tseng 等[12]发现,慢性丙型肝炎患者肝组织中的 γδT 细胞比例增加,并具强的分泌 IFN-γ、TNF-α、IL-8 细胞因子能力与强的非特异性免疫杀伤功能;提示 γδT 细胞分泌炎性细胞因子及杀伤功能增强在多种病毒感染诱发的机体免疫病理过程中均有重要作用[13]。而目前,有关 γδT 细胞在 HBV-ACLF



A:淋巴细胞;B:IgG 阴性对照;C:CD3$^+$ T 细胞;D:γδT 细胞占 CD3$^+$T 细胞的比例

图 1 HBV-ACLF 患者外周血中 γδT 细胞的流式细胞检测结果



A:淋巴细胞;B:总 γδT 细胞;C:IFN-γ^+γδT 细胞比例;D:TNF-α^+ γδT 细胞比例;E:IL-17^+ γδT 细胞比例

图 2 HBV-ACLF 患者外周血中 IFN-γ^+γδT、TNF-α^+ γδT 或 IL-17^+ γδT 细胞比例

中的作用尚少见报道。本研究通过检测 γδT 细胞产生 IFN-γ、TNF-α、IL-17 炎性因子，探讨 γδT 细胞在 HBV-ACLF 中的可能作用。结果显示，HBV-ACLF 外周血 γδT 细胞比例显著低于 CHBV 或健康对照组，可能与在 ACLF 疾病过程中免疫活性细胞消耗增加有关。产生多种炎性细胞因子是 γδT 细胞的一种重要的免疫功能。本研究重点观察了 HBV-ACLF 患者 γδT 细胞 IFN-γ、TNF-α 及 IL-17 等炎症因子产生情况。结果显示，在 PMA 及离子霉素刺激下，HBV-ACLF 组的 γδT 细胞具非常强的产生 IFN-γ、TNF-α 及 IL-17 因子的能力，强于 CHBV 组或健康对照组；HBV-ACLF 组与 CHBV 组间的 IFN-γ^+ γδT 细胞比例无差异，而 TNF-α^+ γδT 或 IL-17^+ γδT 细胞比例有显著性差异（$P<0.01$）。由于 HBV-ACLF 也是由 CHBV 发展而来，免疫细胞在 CHBV 中也存在某些功能的紊乱，因此 CHBV 或 HBV-ACLF 患者的免疫细功能胞既存在某些相似，也存在某些差异。与健康对照组比较，CHBV 组仅表现为 IFN-γ^+ γδT 细胞比例显著性升高，而 ACLF 组出现了多种 γδT 细胞比例的显著性改变。提示，可能 HBV-ACLF 的发生过程，伴随着 γδT 细胞由单纯的 IFN-γ 产生增多逐步向多种促炎性细胞因子增多的过程。同样，Tseng 等[12]在慢性丙型肝炎肝组织中也发现了 γδT 细胞具有很强的分泌炎性细胞因子的能力，提示 γδT 细胞在这两种慢性肝炎的免疫病理过程中有相似的作用。同时分析了 γδT 细胞比例及产生炎性细胞能力与临床指标的相关性，结果显示，仅 TNF-α^+ γδT 细胞比例与 HBV-ACLF 组的 ALT 或 AST 水平呈负相关，而未发现 IFN-γ^+ γδT 或 IL-17^+ γδT 与各临床指标有相关性，可能是因为除 γδT 细胞外，还有多种其他免疫活性细胞及炎症因子均参与到了 HBV-ACLF 的发病进程中，肝细胞的损伤是多种因素共同作用的结果。如 Zhang 等[14]发现，分泌 IL-17 炎性因子的 $CD4^+$ T 细胞比例增高与慢性乙型肝炎肝损伤的严重程度相关。Zhang 等[15]也发现，树突状细胞功能紊乱可能参与了 HBV-ACLF 的免疫发病过程。为观察 γδT 细胞比例与肝衰竭病程之间的关系，进一步将 26 例 HBV-ACLF 患者细分为 12 例早期肝衰竭，11 例中期肝衰竭及 3 例晚期肝衰竭。由于晚期肝衰竭的病例较少，因此仅比较了早期肝衰竭与中期肝衰竭患者外周血 γδT 细胞的比例及细胞因子产出的差异。统计学分析结果显示，早、中期肝衰竭患者外周血总 γδT、IFN-γ^+ γδT、TNF-α^+ γδT 或 IL-17^+ γδT 细胞比例间均无显著性差异（$P>0.05$）。下一步需扩大病例数，做进一步的分析。

本研究结果显示，HBV-ACLF 患者外周血中的 γδT 比例降低，但产生 IFN-γ、TNF-α 或 IL-17 等炎性细胞因子的能力升高，可能参与了 ACLF 的发病进程。

参考文献：

[1] 刘青，王泰龄. 慢加急性肝衰竭(ACLF)共识纪要：亚太肝病学会推荐(APASL)[J]. 临床肝胆病杂志，2010，26(1)：13－18.

[2] 魏连军. 慢加急性肝衰竭[J]. 现代诊断与治疗，2009，20(1)：29－32.

[3] 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(1)：5－8.

[4] Zou Z, Li B, Xu D, *et al*. Imbalanced intrahepatic cytokine expression of interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-10 in patients with acute-on-chronic liver failure associated with hepatitis B virus infection[J]. J Clin Gastroenterol, 2009, 43(2): 182－190.

[5] Bonneville M, O'Brien R L, Born W K. Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity[J]. Nat Rev Immunol, 2010, 10(7): 467－478.

[6] Chen M, Zhang D, Zhen W, *et al*. Characteristics of circulating T cell receptor gamma-delta T cells from individuals chronically infected with hepatitis B virus (HBV): an association between V(delta)2 subtype and chronic HBV infection[J]. J Infect Dis, 2008, 198(11): 1643－1650.

[7] 中华医学会肝病学分会、中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南[J]. 中华内科杂志，2006，45(2)：162－170.

[8] 中华医学会感染病学分会肝衰竭与人工肝学组、中华医学会肝病学分会重型肝病与人工肝学组. 肝衰竭诊疗指南[J]. 中华内科杂志，2006，45(12)：1053－1056.

[9] Zhai S, Zhang L, Dang S, *et al*. The ratio of Th-17 to Treg cells is associated with survival of patients with acute-on-chronic hepatitis B liver failure[J]. Viral Immunol, 2011, 24(4): 303－310.

[10] Ajuebor M N, Jin Y, Gremillion G L, *et al*. GammadeltaT cells initiate acute inflammation and injury in adenovirus-infected liver *via* cytokine-chemokine cross talk[J]. J Virol, 2008, 82(19): 9564－9576.

[11] Barcy S, De Rosa S C, Vieira J, *et al*. Gamma delta + T cells involvement in viral immune control of chronic human herpesvirus 8 infection[J]. J Immunol. 2008, 180(5): 3417－3425.

[12] Tseng C T, Miskovsky E, Houghton M, *et al*. Characterization of liver T cell receptor gammadelta T cells obtained from individuals chronically infected with hepatitis C virus (HCV): evidence for these T cells playing a role in the liver pathology associated with HCV infection[J]. Hepatology, 2001, 33 (5) : 1312－1320.

[13] Poccia F, Agrati C, Martini F, *et al*. Vgamma9Vdelta2 T cell-mediated non-cytolytic antiviral mechanisms and their potential for cell-based therapy[J]. Immunol Lett, 2005, 100(1): 14－20.

[14] Zhang J Y, Zhang Z, Lin F, *et al*. Interleukin-17-producing CD4 (+) T cells increase with severity of liver damage in patients with chronic hepatitis B[J]. Hepatology, 2010, 51(1): 81－91.

[15] Zhang Z, Zou Z S, Fu J L, *et al*. Severe dendritic cell perturbation is actively involved in the pathogenesis of acute-on-chronic hepatitis B liver failure[J]. J Hepatol, 2008, 49(3): 396－406.

（**收稿**：2012-02-29；**修回**：2012-05-24）

（编辑　吴培红）