短篇论著

文章编号:1000-5404(2014)18-1966-02

肝硬化合并自发性细菌性腹膜炎患者淋巴细胞亚群分析

朱剑功,王大刚,何叶莉,苑文雯,卞成蓉,郭桐生 (100039 北京,解放军第三〇二医院临床检验医学中心)

[摘要] **目的** 通过研究肝硬化合并自发性细菌性腹膜炎(spontaneous bacterial peritonitis,SBP)患者外周血和腹水的淋巴细胞亚群变化,探讨患者的免疫功能紊乱在SBP发生中的作用。**方法** 采用美国BD公司的FACSCalibur流式细胞仪和四色MultiTEST IMK Kit试剂盒检测患者的淋巴细胞亚群。**结果** 与单纯肝硬化患者对比,SBP患者外周血$CD8^+$ T细胞显著降低,而CD4/CD8比值显著升高($P<0.05$,$P<0.01$);与自身外周血对比,SBP患者腹水细胞$CD4^+$ T细胞、B细胞、CD4/CD8比值显著降低,$CD8^+$ T细胞、NK细胞显著升高($P<0.05$,$P<0.01$);漏出性腹水患者与单纯肝硬化组患者外周血淋巴细胞亚群差异均不具有统计学意义($P>0.05$)。**结论** 肝硬化合并SBP患者外周血和腹水的淋巴细胞亚群变化是不同的,患者全身和局部的免疫功能紊乱对SBP的发生可能具有重要意义。

[关键词] 肝硬化;自发性细菌性腹膜炎;淋巴细胞亚群

[中图法分类号] R392.12;R572.2;R575.2 [文献标志码] A

晚期肝硬化患者易产生腹水,自发性细菌性腹膜炎(spontaneous bacterial peritonitis,SBP)是其常见的严重并发症之一。估计10%~30%肝硬化合并腹水的住院患者会发生SBP,其病死率接近30%[1]。一般认为致病机制包括肠黏膜屏障破坏同时伴有细菌移位过度生长,肠道转运延迟,腹水细菌调理素活性减低导致的免疫功能改变等[2]。目前流式细胞术检测淋巴细胞亚群方案已经非常成熟,临床常用于评价患者的免疫状况。我们采用四色流式细胞仪同时分析肝硬化合并SBP患者外周血和腹水中包括T细胞、B细胞和NK细胞在内的淋巴细胞亚群的变化情况,旨在探讨这类患者全身和局部的免疫紊乱在SBP发生中的作用。

1 资料与方法

1.1 研究对象

收集2011-2013年我院住院肝硬化合并自发性细菌性腹膜炎的患者52例,男性30例,女性22例,年龄(56±5)岁。漏出性腹水肝硬化患者50例,男性29例,女性21例,年龄(55±5)岁。并选取单纯肝硬化患者60例作为对照组。其中男性35例,女性25例,年龄(55±4)岁,各组患者年龄、性别之间无显著性差异($P>0.05$)。诊断参考2000年国际腹水学会(IAC)SBP和细菌性腹水症的标准。

1.2 检测方法

患者的外周血和腹水标本采用EDTA-K2抗凝管留取。腹水多形核细胞的计数采用SysmexXT-4000i全血细胞分析仪的体液模式进行分析;外周血淋巴细胞亚群采用美国BD公司的FACSCalibur流式细胞仪和淋巴细胞亚群检测试剂盒MultiTEST IMK Kit检测并用Multiset软件进行分析;腹水标本300×g离心5 min后,弃去上清,取沉渣50 μL加入20 μL抗体室温避光孵育15 min,加入450 μL溶血素作用10 min后用1 ml PBS洗涤1次,300×g离心5 min后弃去上清再加入450 μL PBS混匀后上机检测并用CellQuest Pro软件进行分析,其圈门策略同IMK试剂盒。

1.3 统计学处理

采用SPSS 19.0统计软件,数据结果以$\bar{x}\pm s$表示,各组之间的比较采用Mann-Whitney U检验。

2 结果

与单纯肝硬化患者外周血比较,肝硬化合并SBP患者外周血$CD8^+$ T细胞显著降低、CD4/CD8比值显著升高($P<0.05$,$P<0.01$);与肝硬化合并SBP患者外周血比较,肝硬化合并SBP患者腹水$CD4^+$ T细胞、B细胞、CD4/CD8比值显著降低,$CD8^+$ T细胞、NK细胞显著升高($P<0.05$,$P<0.01$,表1)。

表1 各组淋巴细胞亚群结果分析(%,$\bar{x}\pm s$)

组别	$CD3^+$T细胞	$CD4^+$ T细胞	$CD8^+$ T细胞	B细胞	NK细胞	CD4/CD8
A	72.69±7.30	42.85±6.58	26.08±3.95	15.15±6.88	7.85±4.81	1.68±0.36
B	68.38±11.29	44.62±12.39	20.08±7.14[b]	17.69±11.94	11.15±8.05	2.57±1.34[a]
C	68.23±8.43	39.92±6.86	23.08±7.76	17.77±5.28	11.08±4.68	1.94±0.81
D	69.77±11.03	32.62±8.70[c]	32.69±11.97[d]	5.23±4.11[c]	26.08±9.62[d]	1.19±0.64[d]

A:单纯肝硬化患者外周血;B:肝硬化合并SBP患者外周血;C:肝硬化合并漏出性腹水患者外周血;D:肝硬化合并SBP患者腹水 a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与A组比较;c:$P<0.05$,d:$P<0.01$,与B组比较

[通信作者] 郭桐生,E-mail:gtsheng@sina.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140905.0906.002.html(2014-09-05)

3 讨论

SBP是导致肝硬化腹水患者死亡的主要原因之一,其主要致病机制包括免疫系统受损、门脉高压、肠道菌群移位等[3]。近年研究发现肝硬化腹水患者的固有免疫和获得性免疫功能紊乱与继发腹水细菌感染有关[4],淋巴细胞亚群作为免疫系统的重要效应细胞,$CD4^+$和$CD8^+$T淋巴细胞主要参与细胞免疫,B细胞主要参与体液免疫,NK细胞则更多参与天然免疫。

本研究表明与单纯肝硬化患者比较,肝硬化合并SBP的患者外周血表现为$CD8^+$ T细胞显著降低($P=0.005$)以及由此导致的CD4/CD8比值升高($P=0.038$),与Mueller等[5]的研究结果一致。根据腹水的性质,我们进一步比较了50例漏出性腹水患者与单纯性肝硬化患者外周血淋巴细胞亚群的特点,发现两组患者的淋巴细胞亚群并没有显著差异($P>0.05$)。张政等[6]研究发现肝硬化患者外周血$CD4^+$ T细胞比慢性乙型肝炎患者明显升高,而$CD8^+$ T细胞则显著降低,同时伴随CD4/CD8比值的显著升高。在本研究中我们发现单纯肝硬化和肝硬化合并漏出性腹水患者外周血CD4/CD8比值与本实验室正常参考范围相比同样存在升高的情况,并且在肝硬化合并SBP患者中更有明显升高的趋势,其可能的原因为肝硬化腹水患者由于门脉系统受损,肠道菌群移位等造成慢性刺激因素持续存在,这些抗原长时间刺激导致$CD8^+$T细胞过度消耗,此外肝硬化患者脾功能亢进导致淋巴细胞绝对值降低,这些因素增加了腹水合并细菌感染的可能性,或许是晚期肝硬化腹水患者容易合并感染的原因之一。需要指出的是,本研究结果显示,肝硬化合并SBP患者外周血CD4/CD8比值升高与之前王玲等[7]报道的CD4/CD8比值降低结果不一致,分析其原因可能为所采用的方法学不同所致,目前流式细胞术检测淋巴细胞亚群方案已经标准化,我们采用商品化试剂盒按照标准程序进行检测避免了间接荧光法人工计数的误差。

传统诊断SBP主要依靠腹水检查(多形核细胞数$>0.25\times10^9$/L),但易受人为因素或者血性腹水的干扰,而且对其细胞成分不能进行精确分析,尤其是对于淋巴细胞不能分类。我们建立了自己实验室流式细胞仪检测腹水标本的方法并对SBP患者的腹水淋巴细胞亚群成分进行了分析,结果发现相对患者自身外周血而言,腹水淋巴细胞亚群表现为$CD4^+$T细胞降低($P=0.017$),$CD8^+$T细胞升高($P=0.006$),CD4/CD8比值降低($P=0.002$),B淋巴细胞降低($P=0.010$),而NK细胞则显著升高($P=0.002$)。其原因可能由于腹水感染导致的局部细菌溶解产物增加,刺激大量的细胞因子如TNF-α、IL-12和IL-6等的释放,进而引起$CD8^+$细胞以及NK细胞的升高[8]。

综上所述,我们采用流式细胞术同时检测了肝硬化合并SBP患者的外周血和腹水中淋巴细胞亚群,发现SBP患者外周血的CD4/CD8比值升高,而腹水的CD4/CD8比值降低,同时腹水中的NK细胞比例显著升高,说明肝硬化合并SBP患者存在全身和局部的免疫功能紊乱状况,监测患者的淋巴细胞亚群变化有助于临床评价患者的免疫状态及时采取有效的预防措施。

参考文献:

[1] Burri E, Schulte F, Muser J, *et al*. Measurement of calprotectin in ascitic fluid to identify elevated polymorphonuclear cell count[J]. World J Gastroenterol, 2013, 19(13): 2028-2036.

[2] Reginato T J, Oliveira M J, Moreira L C, *et al*. Characteristics of ascitic fluid from patients with suspected spontaneous bacterial peritonitis in emergency units at a tertiary hospital[J]. Sao Paulo Med J, 2011, 129(5): 315-319.

[3] Lippi G, Danese E, Cervellin G, *et al*. Laboratory diagnostics of spontaneous bacterial peritonitis[J]. Clin Chim Acta, 2014, 430: 164-170.

[4] Sipeki N, Antal-Szalmas P, Lakatos P L, *et al*. Immune dysfunction in cirrhosis[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(10): 2564-2577.

[5] Mueller S N, Ahmed R. High antigen levels are the cause of T cell exhaustion during chronic viral infection[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(21): 8623-8628.

[6] 张政, 福军亮, 周春保, 等. 中国乙型肝炎患者外周血淋巴细胞亚群频率参考值范围[J]. 传染病信息, 2011, 24(4): 206-210.

[7] 王玲, 张才军, 李惠琴, 等. 乙型肝炎肝硬化自发性细菌性腹膜炎患者T细胞亚群的研究[J]. 昆明医学院学报, 2004, 25(3): 1-3.

[8] Raue H P, Beadling C, Haun J, *et al*. Cytokine-mediated programmed proliferation of virus-specific $CD8^+$ memory T cells[J]. Immunity, 2013, 38(1): 131-139.

(**收稿**:2014-05-10;**修回**:2014-08-27)

(编辑 邓强庭)