

• 临床检验研究论著 •

肝硬化患者外周血 T 淋巴细胞亚群变迁与免疫功能状态

谢妮奇^{1,2}, 吴丽娟^{1△}, 刘毓刚¹

(1. 成都军区总医院检验科/成都军区检验医学中心, 四川成都 610083;

2. 重庆市大足区人民医院检验科, 重庆 402360)

摘要:目的 了解肝硬化(LC)患者外周血 T 淋巴细胞亚群的变化规律,探讨患者 T 细胞免疫功能状态。方法 采用流式细胞术检测 32 例代偿期 LC 患者(CC 组)、35 例失代偿期 LC 患者(LCC 组)和 63 例健康者(对照组)外周血 T 淋巴细胞亚群水平。结果 与对照组比较,CC 组和 LCC 组总 T 细胞及其各亚群细胞的绝对含量均下降, T_4/T_8 比值升高,双阴性 T 细胞百分含量下降($P < 0.05$);CC 组 T_4/T_8 比值较 LCC 组更高($P < 0.05$)。结论 LC 患者存在明显的 T 细胞免疫功能紊乱,包括各亚群细胞数量的减少及 T_4 细胞相对于 T_8 细胞的功能亢进。随着病情加重, T_4 细胞的应答能力进一步减退。

关键词:肝硬化; T 细胞亚群; 双阴性 T 细胞; 双阳性 T 细胞; 免疫功能

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.18.007

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)18-2191-02

Alteration of T-cell subsets in peripheral blood and related immunologic function in patients with liver cirrhosis

Xie Niqi^{1,2}, Wu Lijuan^{1△}, Liu Yugang¹

(1. Department of Medical Laboratory, Chengdu Military General Hospital, Chengdu, Sichuan 610083, China;

2. Department of Medical Laboratory, Chongqing Dazu Hospital, Chongqing 402360, China)

Abstract: Objective To study the alteration regularity of peripheral blood T lymphocyte subsets in patients with liver cirrhosis and investigate their immune functional status. Methods Peripheral blood T lymphocyte subsets were detected by flow cytometry in 32 compensatory cirrhosis patients(CC group), 35 lose-compensatory cirrhosis patients(LCC group) and 63 healthy subjects(control group). The results were analyzed statistically. Results Absolute quantity of total T cell, $CD8^+$ T cell and double negative T cell were lower, and $CD4^+/CD8^+$ ratio was higher in CC and LCC group than those in control group. Compared with LCC group, the $CD4^+/CD8^+$ ratio in CC group was relatively higher. Conclusion There might be with immune disorder in LC patients, including the decrease of total T cell and each subset as well as the relative hyperfunction of $CD4^+$ T cell to $CD8^+$ T cell. As the diseases condition turning to severer, the responsibility of $CD4^+$ T cell could be further weaker.

Key words: liver cirrhosis; T-cell subsets; double negative T-cell; double positive T-cell; immune function

肝硬化(LC)是一种常见慢性肝病,可由一种或多种原因引起肝脏进行性、弥漫性、纤维性病变,具体表现为肝细胞弥漫性变性坏死,继而出现纤维组织增生和肝细胞结节状。上述改变反复交错进行,导致肝小叶结构和血液循环途径被改建,肝变形、变硬而导致 LC。LC 患者早期无明显症状,后期出现一系列不同程度的门静脉高压和肝功能障碍,最终导致上消化道出血、肝性脑病等并发症。为探讨 LC 患者细胞免疫功能,本研究采用三色流式细胞术(FCM)对代偿期 LC(CC)、失代偿期 LC(LCC)患者及健康者外周血 T 淋巴细胞亚群进行了测定和分析,探讨 LC 患者各阶段免疫功能改变,为病情判断及疗效监测提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 确诊的肝硬化患者 67 例,男 55 例、女 12 例,年龄 31~88 岁,平均 43.1 岁,包括 CC 患者 32 例和 LCC 患者 35 例,均为乙型肝炎所致 LC。体检健康者 63 例(对照组),男 33 例、女 30 例,年龄 18~77 岁,平均 38.2 岁。各观察组年龄及性别构成差异无统计学意义($P > 0.05$)。CC 诊断标准:Child-Pugh A 级,轻度乏力、食欲缺乏或腹胀,无明显肝衰竭表现;血清清蛋白(Alb)降低,但不低于 35 g/L,胆红素(Bil)小于 35 $\mu\text{mol/L}$,凝血酶原活动度多大于 60%,血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)及天门冬氨酸氨基转移酶(AST)轻度升高,AST 可高于 ALT, γ -谷氨酰转肽酶(GGT)可轻度升高,可有门静脉高压症,无腹水、肝性脑病或上消化道出血。LCC 诊断标准:

Child-Pugh B 级或 C 级,有明显肝功能异常及失代偿征象, $\text{Alb} < 35 \text{ g/L}$, $\text{A/G} < 1.0$,明显黄疸, $\text{Bil} > 35 \mu\text{mol/L}$,ALT 和 AST 升高,凝血酶原活动度小于 60%,出现腹水、肝性脑病及门静脉高压症引起的食管、胃底静脉曲张或破裂出血。

1.2 方法 患者入院当天、治疗前采集静脉血 2~3 mL,ED-TA- K_2 抗凝。T 细胞亚群检测采用 Beckman-Coulter XL4-MCL 型流式细胞仪及配套试剂,双平台法,以 SSC/FSC 设门淋巴细胞,分析总 T 细胞($CD3^+$)、 T_4 细胞($CD3^+ CD4^+ CD8^-$)、 T_8 细胞($CD3^+ CD4^- CD8^+$)、双阴性 T 细胞($CD3^+ CD4^- CD8^-$)、双阳性 T 细胞($CD3^+ CD4^+ CD8^+$)百分含量和绝对含量,并计算 T_4/T_8 比值。具体试验方法参照文献[1-2]。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行所有统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料组间比较采用 t 检验,百分数组间比较采用方差分析,显著性检验水准为 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

与对照组比较,CC 组 T_4 细胞百分含量和 T_4/T_8 比值升高, T_8 细胞和双阴性 T 细胞百分含量下降,总 T 细胞、 T_4 细胞、 T_8 细胞、双阴性 T 细胞和双阳性 T 细胞绝对含量下降($P < 0.05$);LCC 组 T_4/T_8 比值升高,总 T 细胞、 T_8 细胞和双阴性 T 细胞百分含量下降,总 T 细胞、 T_4 细胞、 T_8 细胞、双阴性 T 细胞和双阳性 T 细胞绝对含量下降($P < 0.05$)。LCC 组 T_4/T_8 比值较 CC 组下降($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 外周血 T 淋巴细胞亚群检测结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	百分含量(%)					T ₄ /T ₈
		总 T 细胞	T ₄ 细胞	T ₈ 细胞	双阴性 T 细胞	双阳性 T 细胞	
对照组	63	64.00±5.21	34.72±4.32	26.61±3.84	7.36±2.13	0.15±0.12	1.54±0.51
CC 组	32	60.00±9.63	39.58±7.58	16.75±6.97	4.79±2.28	0.13±0.09	3.13±1.50
LCC 组	35	58.76±11.99	36.87±9.44	17.11±4.67	5.00±2.81	0.12±0.06	2.43±0.84

续表 1 外周血 T 淋巴细胞亚群检测结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	绝对含量($\times 10^9/L$)				
		总 T 细胞	T ₄ 细胞	T ₈ 细胞	双阴性 T 细胞	双阳性 T 细胞*
对照组	63	1.15±0.38	0.59±0.19	0.45±0.16	0.12±0.06	2.31±0.97
CC 组	32	0.34±0.16	0.21±0.08	0.10±0.07	0.03±0.02	0.79±0.72
LCC 组	35	0.40±0.23	0.25±0.15	0.12±0.08	0.03±0.03	0.85±0.68

*:细胞绝对含量单位为 $\times 10^6/L$ 。

3 讨 论

上述结果表明,LC 患者体内存在明显的 T 细胞免疫功能异常。首先可能存在 T 细胞生成抑制;其次,总 T 细胞及其各亚群细胞数量减少,T 细胞免疫功能整体下降;第三,CC 组患者 T₄ 细胞在 T 细胞构成中升高引起 T₄/T₈ 比值显著升高,提示 T₄ 细胞功能相对亢进;第四,随着患者病情的加重,LCC 患者 T₄ 细胞在 T 细胞中的比例有所下降引起 T₄/T₈ 比值略有恢复,提示 T₄ 细胞应答能力被减弱。

LC 可导致肝细胞成片炎性坏死,刺激肝细胞再生并纤维化和形成假小叶,随着从代偿逐步演变成失代偿,肝组织内外循环障碍日益加重,肝功能进行性恶化。现有关于 LC 的研究主要集中在细胞因子(如白细胞介素)和调节性 T 细胞(CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺),总 T 细胞、T₄ 细胞、T₈ 细胞研究相对较少,双阴性 T 细胞和双阳性 T 细胞则少见报道。为全面了解 LC 患者外周血 T 淋巴细胞各亚群的变化规律,掌握患者 T 细胞免疫功能状态,本研究对 LC 患者进行了外周血总 T 细胞、T₄ 细胞、T₈ 细胞、双阴性 T 细胞和双阳性 T 细胞百分含量及绝对含量的流式检测,并计算 T₄/T₈ 比值,结果发现 LC 患者上述 T 细胞各亚群的绝对含量均较健康者明显下降,说明患者 T 细胞免疫功能受到抑制;LCC 患者 T₄ 细胞百分含量明显高于健康者,而 T₈ 细胞百分含量则明显降低,导致 T₄/T₈ 比值升高,说明 LCC 患者虽然 T 细胞免疫功能整体被抑制,但仍然存在 T₄ 和 T₈ 细胞失衡,表现为 T₄ 细胞功能相对亢进;随着病情加重至失代偿期后,T₄ 和 T₈ 细胞失衡有一定缓解,可能是 T₄ 细胞应答减退而呈现出的一种假象好转。LC 患者双阴性 T 细胞和双阳性 T 细胞数量减少,则提示患者 T 细胞生成有可能减少。Bernuzzi 等^[3]报道原发性胆汁性 LC 患者体内存在大量 CD4⁺ 细胞和 CD8⁺ 细胞浸润至肝组织,导致肝组织中 CD4⁺ 细胞和 CD8⁺ 细胞数量增加。Yang 等^[4]则利用硫代乙酰胺诱导的肝癌并发肝纤维化鼠动物模型,发现肝纤维化可以使鼠肝组织中浸润的 CD4⁺ 细胞和 CD8⁺ 细胞数量减少,提示肝纤维化可以导致进一步的免疫抑制。国内张嫣等^[5]观察了 60 例女性原发性胆汁性 LC 患者不予治疗情况下外周血 CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺CD25⁺ 和 CD4⁺CD28⁻ T 细胞的水平,结果发现 CD4⁺ 细胞百分含量较健康者明显增加,CD8⁺ 细胞百分含量则明显下降。结合上述研究报道及本研究结果,笔者认为早期 LC 患者外周血 T₄ 细胞、T₈ 细胞可迁移至肝组织中,使肝组织内存在大量 T₄ 细胞和 T₈ 细胞,外周血 T₄ 细胞

和 T₈ 细胞数量则减少;随着病情逐步加重,T 细胞免疫被逐步抑制,T 细胞生成逐步减少,外周血及肝组织中 T₄ 细胞和 T₈ 细胞均减少。并且,LC 患者体内存在 T₄ 细胞和 T₈ 细胞的失衡,T₄ 细胞相对亢进。T₄ 细胞和 T₈ 细胞失衡贯穿于 LC 早期(代偿期)到晚期(失代偿期),但 LC 早期的失衡程度较晚期更为明显。

值得注意的是,国内也有少数文献报道并不一致的结果。钟英强等^[6]检测了 30 例原发性肝癌和乙肝所致 LC 患者外周血 T 淋巴细胞亚群的百分含量,发现 CD3⁺ T 细胞、CD3⁺CD4⁺ T 细胞、CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺ 比值均与健康者无统计学差异(P>0.05)。何浩明等^[7]测定了 38 例 LC 患者外周血 T 淋巴细胞亚群的百分含量,发现患者 CD4⁺ T 细胞降低,CD8⁺ T 细胞增高,二者比例降低。上述不一致报道的出现,可能与观察对象的纳入标准有关。感染性肝炎(如乙型肝炎和丙型肝炎)、酒精性肝炎、肝癌等原发性疾病均可导致 LC,且临床分期、治疗及干预措施的不同,均可导致患者体内的免疫调节功能存在差异,造成数据缺乏可比性^[8]。

总之,利用流式细胞术对外周血总 T 细胞、T₄ 细胞、T₈ 细胞、双阴性细胞和双阳性细胞百分含量和绝对含量进行检测,有助于及时掌握 T 细胞免疫功能状态,对于病情判断、疗效监测、预后评估等均具有积极意义,也有助于发现和总结与疾病有关的新规律、新机制。

参 考 文 献

- [1] 吴丽娟. 临床流式细胞学检验技术[M]. 北京:人民军医出版社, 2010:78-88.
- [2] 吴丽娟,刘霞,赵文利. 流式单平台和双平台计数定量检测外周血淋巴细胞亚群的实验研究[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(2): 143-145.
- [3] Bernuzzi F, Fenoglio D, Battaglia F, et al. Phenotypical and functional alterations of CD8 regulatory T cells in primary biliary cirrhosis[J]. J Autoimmun, 2010, 35(3): 176-180.
- [4] Yang MC, Chang CP, Lei HY. Induction of liver fibrosis in a murine hepatoma model by thioacetamide is associated with enhanced tumor growth and suppressed antitumor immunity[J]. Lab Invest, 2010, 90(12): 1782-1293.
- [5] 张嫣,陈伟忠,施杰民. 原发性胆汁性肝硬化患者雌激素受体 α 基因多态性对细胞因子漂移的影响[J]. 中华肝病杂志, 2010, 18(10): 740-744.

(下转第 2206 页)

对不确定度平方和的根, 求其相对合成相对标准不确定度 $u_{rel}(C_{TP})$ 。

$$u_{rel}(C_{TP}) =$$

$$\sqrt{u_{rel}^2(r) + u_{rel}^2(s) + u_{rel}^2(st) + u_{rel}^2(C) + u_{rel}^2(A_{ARM}) + u_{rel}^2(A_{KS}) + u_{rel}^2(d)}$$

待测样本扩展不确定度 $U(CTP) = k \times u_{rel}(C_{TP}) \times C_{TP}$, 包含因子 $k=2$, 待测样本 KSA, KSB 测量不确定度结果见表 5。

表 3 TP 重复性测量不确定度

样本	次数	量值(g/L)	SD	U(r)	urel(r)
KSA	20	47.7	0.257	0.057	0.001 203
KSB	20	60.4	0.224	0.050	0.000 828

表 4 样本和标准溶液 TP 反应吸光度不确定度

样本	A 修正值	标准不确定度	相对标准
		U(A)	不确定度 $u_{rel}(A)$
SRM	0.405	0.001 71	0.004 23
KSA	0.273	0.001 29	0.004 76
KSB	0.344	0.001 54	0.004 48

表 5 样本 TP 测量结果不确定度

样本	CTP(g/L)	相对标准	扩展不确定度
		不确定度 $u_{rel}(CTP)$	U(C_{TP})
KSA	47.7	0.008 9	0.85
KSB	60.4	0.008 7	1.05

3 讨 论

本研究建立 TP 参考方法, 以实现常规检测系统的溯源性和性能评价。在进行参考方法试验前, 应对易受环境或使用影响的和影响结果关键量的仪器设备进行校准或核查, 以确认性能满足要求, 并将其结果用于测量结果不确定度评估。实验室对仪器设备进行定期检定是不充分的, 可能出现检定合格而某些关键量并不能满足参考方法的使用要求, 同时也无法有效评估仪器设备的校准情况。

血清 TP 参考方法要求加样器不精密度不大于 0.3%, 比色杯透光面光径为 (10 ± 0.01) mm, 天平称量误差不超过 0.005 g, 分光光度计波长为 (540 ± 1) nm, 带宽小于 8 nm, 反应温度波动 ± 1 °C^[3-4]。本研究在试验前对分光光度计、移液器、电子天平、比色杯子的关键性能进行了确认。分光光度计吸光度准确性和重复性对于测试结果的影响较为显著, 作为主要贡献量体现在结果不确定度计算中。由于方法灵敏度为 0.005 82, 则吸光度测量重复性极差不能大于 0.005, 否则参与计算的样本反应吸光度(扣除试剂空白)将受到影响。因此, TP 参考方法应确保使用高精度分光光度计。Doumas 双缩脲方法中, 样本反应条件设定为 25 °C 孵育 30 min, 本试验对采用 37 °C 孵育 10 min 进行了确认, 结果表明二者对多份血清样本的检测结果无统计学差异。37 °C 孵育温度与常规测试方法的温度要求一致, 并能缩短反应时间, 故采用该反应条件。

建立的 TP 参考方法需进行性能验证, 以评估是否符合要求。对准确度的评估采用了室内比对和国际 TP 参考方法能力验证, 以 JCTLM 对该项目的等效限作为接受指标。方法灵敏度是测量体系对单位浓度的反应吸光度, 可换算表示成摩尔吸光系数, 当在标准物质加样准确、试剂配制良好、光度计吸光度准确、比色杯光径符合要求的条件下得到的摩尔吸光系数应一致, 可作为参考测量体系测量准确度评价指标之一。本研究测试得到摩尔吸光系数为 $0.296 8 \text{ L} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, 与 Doumas 评估试验 $(0.296 8 \pm 0.001 8) \text{ L} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 报告一致^[4]。

每个完整的和可溯源的测量结果应附有合理评定的不确定度, ISO/IEC 17025 和 ISO 15189 都对实验室的不确定度评定提出了相应要求^[6-7]。参考方法测量样本的不确定度是进行常规方法校准品不确定评估的重要来源之一, 为常规临床检验对样本结果不确定度的评估提供依据。本研究按 GUM 评估原则^[5]对 TP 参考方法的重要影响量绘制成图进行分析和合并, 将加样重复性、抽样瓶间差、光度计测量重复性等一并归入 A 类重复性计算, 在 B 类分量的评估中使用了仪器性能确认中的校准数据, 简化了测量结果不确定度分析过程, 同时使评估数据来源较为合理有效。

综上所述, 本实验室依据 JCTLM 推荐方法建立的血清 TP 参考方法, 方法性能符合要求, 测试结果通过 RELA 参考方法能力评估, 同时建立了结果不确定度评估模型, 可应用于后续检测试剂盒的标准化。

(志谢: 本研究得到了杨振华教授, 北京航天总医院检验科陈宝荣主任的大力支持, 在此深表感谢!)

参考文献

- [1] 叶应妩, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 3 版. 南京: 东南大学出版社, 2006.
- [2] 陈文祥, 申子瑜, 杨振华. 临床生化检验参考方法的主要作用[J]. 中华检验医学杂志, 2008, 31(2): 245-248.
- [3] Doumas BT, Bayse DD, Carter RJ, et al. A candidate reference method for determination of total protein in serum; I. Development and Validation[J]. Clin Chem, 1981, 27(12): 1642-1650.
- [4] Doumas BT, Bayse DD, Carter RJ, et al. A candidate reference method for determination of total protein in serum; II. Test for Transferability[J]. Clin Chem, 1981, 27(12): 1651-1654.
- [5] ISO. Guide to the expression of uncertainty in measurement[M]. Geneva, Swiss; ISO, 1993.
- [6] ISO, IEC. ISO/IEC 17025: 2005 General Requirements for the Competence of Calibration and Testing Laboratories[S]. Geneva, Swiss; ISO/IEC, 2005.
- [7] ISO, DIS. ISO/DIS 15189 Quality management in medical laboratories[S]. Geneva, Swiss; ISO/DIS, 2000.

(收稿日期: 2012-04-09)

(上接第 2192 页)

- [6] 钟英强, 黄花荣, 魏菁. 原发性肝癌和乙型肝炎肝硬化患者外周血淋巴细胞凋亡率、T 细胞亚群和 NK 细胞的水平变化和临床意义[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2005, 14(6): 571-574.
- [7] 何浩明, 田小平, 苏彩女. 肝硬化患者淋巴细胞内腺昔脱氨酶活性的变化与 T 淋巴细胞亚群的关系[J]. 陕西医学检验, 1992, 14(1): 5-6.
- [8] Soldevila B, Alonso N, Martínez-Arconada MJ, et al. A prospective

study of T- and B-lymphocyte subpopulations, CD81 expression levels on B cells and regulatory CD4(+)CD25(+)CD127(low/-) FoxP3(+) T cells in patients with chronic HCV infection during pegylated interferon-alpha 2a plus ribavirin treatment[J]. J Viral Hepat, 2011, 18(6): 384-392.

(收稿日期: 2012-01-17)