

• 论 著 •

原发性胆汁性肝硬化患者免疫功能及肝功能损伤情况研究

杨璐萍¹, 朱宗国¹, 张 然²

(1. 攀枝花市中西医结合医院检验科, 四川攀枝花 617000; 2. 四川大学华西医院, 成都 614100)

摘要:目的 研究原发性胆汁性肝硬化患者的免疫功能改变及肝功能损伤情况。方法 选取 2013 年 3 月至 2016 年 3 月攀枝花市中西医结合医院收治的原发性胆汁性肝硬化患者 30 例作为观察组, 肝功能轻度损伤者 17 例, 肝功能严重损伤者 13 例; 另外选取同期因其他肝脏疾病入院的 30 例患者作为其他肝病组, 选取同期行健康体检的 30 例作为健康组, 采用流式细胞术对 3 组研究对象的免疫细胞进行检测, 比较 3 组外周血树突状细胞亚群及肝功能指标等。结果 观察组患者 CD4⁺ 细胞(29.9%)、CD8⁺ 细胞(28.8%)显著高于健康组, 且差异有统计学意义($P < 0.05$); 而 CD11c⁺ 细胞(0.087%)、CD123⁺ 细胞(0.035%)及 NK 细胞(13.333%)明显低于健康组, 且差异具有统计学意义($P < 0.05$)。观察组患者 CD4⁺ 细胞(29.9%)、CD8⁺ 细胞(28.8%)、CD11c⁺ 细胞(0.087%)、CD123⁺ 细胞(0.035%)明显高于其他肝病组, 但 NK 细胞(13.3%)显著低于其他肝病组, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。健康组 CD4⁺ 细胞, 差异具有统计学意义(26.9%)、CD8⁺ 细胞(23.6%)、CD11c⁺ 细胞(0.169%)、CD123⁺ 细胞(0.064%)及 NK 细胞(20.7%)均显著高于其他肝病组($P < 0.05$)。肝功能严重损伤组 CD4⁺、CD8⁺、CD123⁺ 细胞显著高于肝功能一般损伤组, 而 CD11c⁺、NK 细胞则显著低于肝功能一般损伤组, 差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。血清抗线粒体抗体(AMA)-M2 阴性组 CD4⁺、CD8⁺ 细胞显著低于 AMA-M2 阳性组, 而 CD123⁺、CD11c⁺、NK 细胞则显著高于 AMA-M2 阳性组, 差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。结论 原发性胆汁性肝硬化患者的免疫功能与肝功能都与血清 AMA-M2 抗体的产生有关系, 其中 CD11c⁺ 与 CD123⁺ 或为影响疾病发展及 AMA-M2 抗体产生的主要因素。

关键词:原发性胆汁性肝硬化; 免疫功能; 肝功能; 损伤

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.18.016

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)18-2543-03

Study on immune function and liver function injury in patients with primary biliary cirrhosis

YANG Luping¹, ZHU Zongguo¹, ZHANG Ran²

(1. Department of Clinical Laboratory, Panzhihua Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Panzhihua, Sichuan 617000, China; 2. West China Hospital, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 614100, China)

Abstract: Objective To study the changes of immune function and liver function in patients with primary biliary cirrhosis.

Methods From March 2013 to March 2016 in our hospital patients with primary biliary cirrhosis 30 cases as the observation group. There were 17 patients with mild liver injury and 13 with severe hepatic dysfunction. And at the same time for the admission of 30 patients with other liver diseases in patients with liver disease as a group, 30 cases underwent physical examination as healthy group were detected by flow cytometry in three groups of subjects of immunity comparison of three groups of cells, dendritic cell subsets in peripheral blood and liver function index. **Results** The CD4⁺ cells and CD8⁺ cells in the observation group were significantly higher than those in the healthy group ($P < 0.05$), while the CD11c⁺ cells, CD123⁺ cells and NK cells were significantly lower than those in the healthy group ($P < 0.05$). In the observation group, CD4⁺ cells, CD8⁺ cells, CD11c⁺ cells and CD123⁺ cells were significantly higher than those of other liver diseases but the NK cells were significantly lower than those of the other groups ($P < 0.05$). In healthy group, CD4⁺ cells, CD8⁺ cells, CD11c⁺ cells, CD123⁺ cells and NK cells were significantly higher than those of other liver disease group ($P < 0.05$). The CD4⁺, CD8⁺ and CD123⁺ cells in the liver injury group were significantly higher than those in the liver function damage group, while the CD11c⁺ and NK cells were significantly lower than those in the liver function group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The CD4⁺ and CD8⁺ cells in the AMA-M2 negative group were significantly lower than that in the AMA-M2 positive group, while those in CD123⁺, CD11c⁺ and NK cells were significantly higher than those in the AMA-M2 positive group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** The immune function of patients with primary biliary cirrhosis and liver function injury are associated with production of serum AMA-M2 antibodies, including CD11c⁺ and CD123⁺ or as the main factors influence the development of the disease and the AMA-M2 antibody.

Key words: primary biliary cirrhosis; immune function; liver function; injury

原发性胆汁性肝硬化(PBC)是一种病因不明的自身免疫性疾病,多数患者的肝内胆管(中、小)发生非化脓性破坏,临床表现以皮肤瘙痒、乏力、胆汁淤积为主,且最终发展为肝衰竭与肝硬化。PBC 女性发病多于男性,且发病高峰年龄为 50~60 岁,到目前为止还未明确该病的发病机制^[1]。现阶段的多数研

究指出 PBC 的发生与患者的免疫功能、个体易感性、环境因素及感染等有关^[2]。其中免疫系统对肝内胆管上皮细胞的破坏是导致疾病最重要的一个特征^[3],主要包括机体内的各种炎症因子和多种淋巴细胞都参与其中。树突状细胞是一种专职抗原提呈细胞,也是唯一一种能刺激静息型 T 细胞活化的细胞,

在免疫反应中起着重要调节作用的细胞。近年来,部分研究也指出树突状细胞在自身免疫性疾病中起重要的作用,特别是某些自身免疫性疾病患者的 CD11c⁺ 与 CD123⁺ 亚群显著降低^[5]。本文对 PBC 患者的免疫功能进行了研究,同时对比了其肝功能损伤的情况,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2013 年 3 月至 2016 年 3 月攀枝花市中西医结合医院收治的 PBC 患者 30 例作为观察组,肝功能轻度损伤者 17 例[谷氨酰转肽酶(GGT)、碱性磷酸酶(ALP)≤5 倍正常值],肝功能严重损伤者 13 例(GGT、ALP≥5 倍正常值);选取同期因其他肝脏疾病入院的 30 例患者作为其他肝病组,选取同期行健康体检的 30 例作为健康组。所有 PBC 患者均满足 2009 年美国肝脏病学学会(AASLD)修订的 PBC 临床实践指南^[6],包括以下 3 项中的 2 项即可:(1)血清抗线粒体抗体(AMA)阳性;(2)血清 ALP 水平升高;(3)病理出现非化脓性破坏性胆管炎及小叶间胆管损伤。观察组患者肝硬化程度按照 Child-Pugh 进行分级:A 级 16 例,B 级 10 例,C 级 4 例。其他肝脏疾病的肝病组包括隐性肝硬化 4 例,酒精肝 17 例,药物性肝炎 2 例,胆管炎 2 例,心源性肝硬化 5 例;Child-Pugh 进行分级:A 级 17 例,B 级 10 例,C 级 3 例。3 组患者的性别、年龄比较,差异无统计学意义($P>0.05$),且观察组与其他肝病组患者在肝硬化程度上比较,差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。

1.2 检测方法 采用流式细胞术对细胞表面的分子进行检测,每组研究对象各抽取 2 mL 全血,加入肝素钠抗凝,立即送检。取外周血 100 μL 加入 20 μL 的相应抗体混合后,在避光的室内环境下孵育 20 min,再加入 2 mL 流式细胞仪专用红细胞裂解液,将其混匀后,继续避光的室内环境孵育 10 min,随后放置到 1 200 r/min 的离心机离心 5 min,摒弃上清液后加入 2 mL 的磷酸盐缓冲液,再置入 1 000 r/min 的离心机离心 5 min,摒弃上清液后将其洗涤 2 次,再加入 500 μL 的磷酸盐缓冲液,即刻上机检测。对于树突状细胞亚群 CD11c⁺ 与 CD123⁺ 测定方式:将每个标本分别置入标有 A、B、C、D 的 4 个试管中,包括:CD11c⁺、CD123⁺、CD11c 阴性对照与

CD123⁺ 阴性对照,并加入 100 μL 的全血,20 μL 树突状细胞非特异性标志物(PerCP-Anti-HLA-DR,购于北京泰泽瑞达科技有限公司)、20 μL 荧光素 FITC 流式抗体,分别向 4 个试管内再加入 CD11c⁺、CD123⁺、CD11c⁺ 阴性对照与 CD123⁺ 阴性对照,采用侧向散色光与前向散色光对设门 R1 进行测定,以排除细胞碎片造成的干扰^[7]。再以 Lin-设门 R2 测定,G2 作为 CD11c⁺ 对照设门 R3,G1 作为 CD123⁺ 对照设门 R3,结果以 R3 中设定的 CD11c⁺、CD123⁺ 树突状亚群细胞。

1.3 观察指标 采用酶联免疫吸附试验(ELISA)对血清抗线粒体抗体 AMA-M2 亚型进行检测,操作方法按照试剂盒使用说明进行。采用日本 Olympus AU2700 全自动生化仪对肝功能指标进行检测,比较 3 组研究对象两两之间的树突状细胞亚群、NK 细胞。

1.4 统计学处理 本次研究数据采用 SPSS19.0 统计学软件进行分析处理,各组外周血各类细胞阳性百分率比较以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,进一步两两比较采用 SNK-q 检验。以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 观察组与健康组外周血各类细胞阳性率比较 观察组患者 CD4⁺、CD8⁺ 细胞明显高于健康组,而 CD11c⁺、CD123⁺ 及 NK 细胞则明显低于健康组,差异均具有统计学意义($P<0.05$)。观察组患者 CD4⁺、CD8⁺、CD11c⁺、CD123⁺ 细胞明显高于其他肝病组,NK 细胞明显低于其他肝病组,差异均具有统计学意义($P<0.05$)。健康组 CD4⁺、CD8⁺、CD11c⁺、CD123⁺ 及 NK 细胞均显著高于其他肝病组,差异均具有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

2.2 不同 PBC 患者外周血细胞阳性率比较 肝功能严重损伤组 CD4⁺、CD8⁺、CD123⁺ 细胞显著高于肝功能一般损伤组,而 CD11c⁺、NK 细胞则显著低于肝功能一般损伤组,差异均具有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。AMA-M2 阴性组 CD4⁺、CD8⁺ 细胞显著低于 AMA-M2 阳性组,而 CD123⁺、CD11c⁺、NK 细胞则显著高于 AMA-M2 阳性组,差异均具有统计学意义($P<0.05$)。见表 3。

表 1 观察组与健康组外周血各类细胞阳性百分率比较($\bar{x} \pm s, \%$)

分组	n	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD11c ⁺	CD123 ⁺	NK
观察组	30	29.9±1.4	28.8±1.2	0.087±0.008	0.035±0.005	13.3±1.5
其他肝病组	30	21.6±1.5*	22.4±1.5*	0.073±0.005*	0.022±0.006*	16.3±1.6*
健康组	30	26.9±1.1*△	23.6±1.4*△	0.169±0.011*△	0.064±0.005*△	20.7±1.4*△
F		293.30	184.35	1 152.57	483.84	184.17
P		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与观察组比较,* $P<0.05$;与其他肝病组比较,△ $P<0.05$ 。

表 2 不同 PBC 患者外周血细胞阳性率百分率比较($\bar{x} \pm s, \%$)

分组	n	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD11c ⁺	CD123 ⁺	NK
肝功能一般损伤组	17	23.5±1.3	25.6±1.7	0.125±0.009	0.062±0.006	21.3±1.7
肝功能严重损伤组	13	32.1±1.4	30.7±1.9	0.073±0.005	0.072±0.007	10.4±1.3
t		17.37	7.74	18.69	4.20	19.19
P		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

表 3 不同 PBC 患者外周血细胞阳性率百分率比较(±s, %)

分组	n	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD11c ⁺	CD123 ⁺	NK
AMA-M2 阴性组	12	27.7±1.1	25.2±1.8	0.096±0.008	0.063±0.006	15.6±1.3
AMA-M2 阳性组	18	31.0±1.3	34.1±1.5	0.076±0.005	0.047±0.007	12.0±1.1
t		7.22	14.70	8.45	6.48	8.16
P		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

3 讨 论

PBC 是一种自身免疫性疾病,患者常表现出乏力、黄疸、皮肤瘙痒等症状,随着近年来对该病的研究报道越来越多^[8-9],国内对该病的了解也逐渐增加,特别是自身抗体 AMA 的检查,让疾病的确诊率得到明显提升^[10]。患者的免疫功能异常已经得到临床证实,包括以下几点:(1)多个细胞系无法对丙酮酸脱氢酶 E2 亚单位(PDC-E2)耐受,其中囊括了 CD4⁺、CD8⁺ 与高度 B 细胞直接应答;(2)生长认知缺失、固有免疫缺失,该病的病理机制为在疾病的不同阶段参与的细胞因子不同。有研究指出,外源性致病微生物和外源性化学物质都会导致胆管上皮细胞不断分泌细胞因子,刺激 PBC 的发展^[11]。由于 PBC 的发病机制复杂,所以在多个环节都存在免疫紊乱,包括 Th/Ts 细胞比例失调、T 细胞高度活化且增生、细胞因子异常、自身抗体大量产生^[12],但最主要的还是机体丧失了对自身抗原的耐受,导致疾病的发生。

PBC 患者与其他肝病患者不同,大多数 PBC 患者的病情发展缓慢,从起病到发展为肝硬化或肝衰竭为 10~20 年^[13],其中不乏部分患者的胆管提前消失造成病情在 5 年内迅速改变。本研究结果发现,PBC 患者体内的 CD4⁺ 与 CD8⁺ 相比,健康组与其他肝病组均显著升高,且差异具有统计学意义(P<0.05),这提示患者体内的 T 细胞被大量活化,尤其是 CD8⁺ T 细胞群。但不同的树突状细胞群在以上自身反应性 T 细胞的活化过程中对 T 细胞的刺激能力也不同,现阶段已经得到临床证实的树突状细胞类型有两种,一种是髓细胞来源的 CD11c⁺,另一种是浆细胞来源的 CD123⁺^[14]。CD11c⁺ 在受到活化后会分泌大量的白细胞介素(IL)-1β、IL-2α、IL-6、IL-10、IL-12,促使 Th1 大量的分化;CD123⁺ 在受到活化后会分泌大量的 IL-8,促使 Th2 大量的分化。CD11c⁺ 与 CD123⁺ 是自身免疫性疾病中的决定因素,所以在血液中对以上两种因子进行检测能有效的反映机体的免疫状态^[15]。本研究发现,观察组患者 CD4⁺、CD8⁺、CD11c⁺、CD123⁺ 细胞明显高于其他肝病组,但 NK 细胞又明显低于其他肝病组,观察组患者 CD4⁺、CD8⁺ 细胞明显高于健康组,而 CD11c⁺、CD123⁺ 及 NK 细胞则明显低于健康组。对比不同肝功能损伤的 PBC 患者发现,肝功能严重损伤组 CD4⁺、CD8⁺、CD123⁺ 细胞显著高于于肝功能一般损伤组,而 CD11c⁺、NK 细胞则显著低于肝功能一般损伤组;且 AMA-M2 阴性组与 AMA-M2 阳性组在 CD4⁺、CD8⁺、CD11c⁺、CD123⁺、NK 细胞比较上,差异有统计学意义(P<0.05)。这都提示了 PBC 患者的肝功能与病情发展和 AMA-M2 抗体的产生与 CD11c⁺ 和 CD123⁺ 有密切关系。

由于 PBC 患者的自身抗原损伤以及机体的免疫系统在呈递抗原时过度进行,患者的免疫功能与肝损伤功能都和血清抗体 AMA-M2 抗体的产生有关系,其中 CD11c⁺ 与 CD123⁺ 为影响疾病发展及 AMA-M2 抗体产生的主要因素。

原发性胆汁性肝硬化患者中的特点[J]. 中华肝脏病杂志,2015,23(5):343-349.

[2] 江洪娟,杨晋辉,唐映梅,等. 自身免疫性肝病的临床及病理研究现状[J]. 胃肠病学和肝病杂志,2015,24(8):1019-1025.

[3] 杨俊,于雅丽,郑长青,等. 药物性肝损伤与原发性胆汁性肝硬化的临床特征比较[J]. 临床肝胆病杂志,2016,32(4):728-731.

[4] 韩炎炎,戴晓波,云芝肝泰胶囊辅助熊去氧胆酸片治疗原发性胆汁性肝硬化及对患者免疫学指标的影响[J]. 中国老年学杂志,2015,35(23):6812-6814.

[5] 李腾达,刘挺挺,吴林洪,等. 原发性胆汁性肝硬化患者外周血单个核细胞中 Tim-1 表达增高及其意义[J]. 现代检验医学杂志,2016,31(4):41-43.

[6] 胡伟. 自身抗体和免疫指标在原发性胆汁性肝硬化诊断中的价值[J]. 广西医学,2014,26(11):1565-1567.

[7] 万敏. 自身抗体和免疫功能指标对诊断原发性胆汁性肝硬化及评估病情的价值[J]. 中国卫生标准管理,2016,7(8):155-156.

[8] 钟燕明,武希润,王琦,等. 原发性胆汁性肝硬化患者外周血 25-羟维生素 D3、Th17 细胞、CD4⁺ 调节性 T 细胞的变化及其意义[J]. 中华肝脏病杂志,2016,24(11):829-833.

[9] 胡志明. 原发性胆汁性肝硬化患者食管静脉曲张程度与肝功能评价的相关性研究[J]. 临床医学工程,2016,23(1):58-59.

[10] 肖琼怡,杨晋辉. 原发性胆汁性肝硬化及其重叠综合征的治疗进展[J]. 中国医师进修杂志,2014,37(5):70-72.

[11] 罗莉丽,周璐,王邦茂,等. 抗线粒体抗体阴性原发性胆汁性肝硬化患者的临床、生化和病理学特点[J]. 山东医药,2014,54(7):5-8.

[12] 邱春婷,卢建华,刘勇钢,等. 原发性胆汁性肝硬化 65 例临床分析[J]. 山东医药,2014,54(8):65-66.

[13] 姚兰杰. 原发性胆汁性肝硬化前期及肝硬化期治疗前后肝功能指标水平分析[J]. 中国现代药物应用,2014,8(16):65-66.

[14] 陈春先. 慢性乙型肝炎合并原发性胆汁性肝硬化 1 例[J]. 中西医结合肝病杂志,2015,25(1):57.

[15] 钱铮,谷明莉,陈燕,等. 原发性胆汁性肝硬化患者外周血单个核细胞 IL-23p19 表达增高及意义[J]. 现代检验医学杂志,2016,31(2):20-21.

(收稿日期:2017-02-11 修回日期:2017-04-10)

参考文献

[1] 孙丽梅,王一鹏,刘燕敏,等. 抗线粒体抗体 M2 亚型在非