

慢性丙型肝炎患者外周血 $CD3^+CD(16+56)^+$ NK 细胞水平与肝纤维化指标相关性分析*

吴志美, 袁建芬, 徐建, 许亮亮 (江苏省南通市中医院检验科, 江苏南通 226001)

摘要:目的 探讨慢性丙型肝炎患者外周血 $CD3^+CD(16+56)^+$ 自然杀伤细胞(NK 细胞)的变化与肝纤维化指标的相关性。方法 对 65 例慢性丙型肝炎组及 30 例健康对照组采用流式细胞术(FCM)检测外周血 NK 细胞百分比和绝对值,并采用化学发光法检测血清中肝纤维化四项指标:透明质酸(HA),Ⅲ型前胶原肽(PCⅢ),Ⅳ型胶原(Ⅳ-C)和层黏连蛋白(LN)的水平。同时对患者 NK 细胞的水平与四项肝纤维化指标含量进行相关性分析。结果 慢性丙型肝炎患者 NK 细胞的总数和百分比低于健康对照组,差异有统计学意义($t=6.204, 2.473$, 均 $P<0.05$);肝纤维化四项指标中 HA 和 Ⅳ-C 含量高于健康对照组,差异有统计学意义($t=3.899, 4.654$, 均 $P<0.05$),PCⅢ 和 LN 与健康对照组比较含量无明显变化,差异无统计学意义($t=0.223, 0.175$, 均 $P>0.05$)。同时通过相关性分析得出患者 HA 和 Ⅳ-C 含量的变化与 NK 细胞的水平呈现负相关($r=0.939, P<0.05$; $r=0.841, P<0.05$),PCⅢ 和 LN 含量的变化与 NK 细胞的水平无相关性($r=-0.062, P>0.05$; $r=0.051, P>0.05$)。结论 丙型肝炎病毒感染阶段, NK 细胞数量下降与机体清除 HCV 病毒的能力下降有关;同时 NK 细胞数量下降使得患者肝脏更易形成纤维化。

关键词:慢性丙型肝炎;自然杀伤细胞;肝纤维化指标

中图分类号:R512.63;R392.11 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2018)04-095-03

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2018.04.025

Correlation Analysis of $CD3^+CD(16+56)^+$ NK Cell Level in Peripheral Blood and Liver Fibrosis Index in Patients with Chronic Hepatitis C

WU Zhi-mei, YUAN Jian-fen, XU Jian, XU Liang-liang (Department of Clinical Laboratory, Traditional Chinese Medicine Hospital of Jiangsu Nantong, Jiangsu Nantong 226001, China)

Abstract: Objective To analyse the correlation between the changes of natural killer cell count and the indexes of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. **Methods** The total number, the percentage and absolute value of NK cells in peripheral blood of 65 patients with chronic hepatitis C, and 30 healthy control group were detected by flow cytometry. Four indexes of liver fibrosis in serum were detected by chemiluminescence: hyaluronic acid (HA), type III procollagen peptide (PC III), type IV collagen (IV-C) and laminin (LN). At the same time, the correlation between the level of NK cells and the four indexes of liver fibrosis was also studied. **Results** The total number and percentage of NK cells in patients with chronic hepatitis C were lower than those in healthy controls ($t=6.204, 2.473$, all $P<0.05$). The content of HA and IV-C was higher than that in the healthy control group, the difference was statistically significant ($t=3.899, 4.654$, all $P<0.05$). There was no significant difference in the content of PC and LN with the healthy control group, and there was no statistical difference ($t=0.223, 0.175$, all $P>0.05$). At the same time, it was found that there was a negative correlation between the changes of HA and IV-C and the level of NK cells ($r=0.939, P<0.05$; $r=0.841, P<0.05$). There was no correlation between the changes of HA and LN indexes and the level of NK cells ($r=-0.062, P>0.05$; $r=0.051, P>0.05$). **Conclusion** In hepatitis C virus infection phase, the decline in the number of NK cells was related to the decline in the ability of the body to clear the HCV virus, NK decreased cell numbers, making it easier for patients to form fibrosis.

Keyword: chronic hepatitis C; natural killer cell; liver fibrosis index

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)感染是慢性肝炎的主要病因之一,感染后死亡的原因主要是肝的纤维化及进展后的肝硬化以及肝癌。越来越多的研究表明^[1],自然杀伤(natural killer cells, NK)细胞的主要功能是通过分泌各种细胞因子来调节机体的免疫功能从而提高机体清除 HCV 的能力,使 HCV 持续感染原因之一是 NK 细胞数量的减少和活性的降低。同时有研究显示^[2],患者

肝纤维化进展程度与 NK 细胞的数量有密切的关系。本文选择了 2015~2017 年期间于江苏省南通市中医院就诊的慢性丙型肝炎患者为研究对象,研究患者外周血 NK 细胞数量变化,并分析其与透明质酸(hyaluronic acid HA),Ⅲ型前胶原肽(procollagen III PCⅢ),Ⅳ型胶原(Ⅳ collagen IV-C)和层黏连蛋白(laminin LN)四项肝纤维化指标的相关性;探讨其在丙型肝炎病毒感染及患者肝纤维化

* 作者简介:吴志美(1976—),本科,女,副主任技师,主要从事血液学研究, E-mail:2357152000@qq.com。

通讯作者:袁建芬(1969—),本科,女,主任技师,主要从事免疫学研究, E-mail:1571513605@qq.com。

过程中的作用,现报道如下:

1 材料和方法

1.1 研究对象 选择2015年11月~2017年4月本院门诊及住院的65例慢性丙型肝炎患者,其中男性26例,女性39例,平均年龄 43.08 ± 14.05 岁,入选标准:均符合2015年《丙型肝炎防治指南》的诊断标准^[3]。并排除并发其他病毒性肝炎、酒精性肝病、肿瘤、自身免疫性疾病、代谢性疾病等其它疾病。取同期入院健康体检者30例,设为健康对照组,年龄在33~52岁,其中男性11例,女性19例,平均年龄 41.55 ± 5.89 岁。

1.2 试剂和仪器 ①NK细胞的检测试剂:CD3⁻FITC/CD(16+56)⁻PE/CD45⁻PerCP/CD19⁻APC四色试剂,为深圳迈瑞公司提供;仪器:迈瑞BriCyte E6。标本:均于清晨空腹采集2 ml EDTA-K₂抗凝静脉血2 h内完成检测;②肝纤维化指标检测使用深圳新产业 MAGLUMI2000plus 仪器及配套试剂;清晨空腹采血,离心后取血清-18℃保存。

1.3 检测方法 ①NK细胞的检测取20 μ l CD3⁻FITC/CD(16+56)⁻PE/CD45⁻PerCP/CD19⁻APC四色试剂加入试管底部;吸取50 μ l EDTA-K₂抗凝血加入试管底部;试管在螺旋混匀器上轻旋混匀,室温避光孵育15 min;向试管中加入450 μ l 稀释的流式溶血剂,在螺旋混匀器上轻旋混匀,室温避光孵育15 min,上机检测。以SSC/CD45和SSC/CD3设门分别圈定淋巴细胞和T细胞。NK细胞以淋巴细胞百分比表示,绝对计数以细胞

个数/ mm^3 表示,每次测定前均进行电压定标。②肝纤维化指标的检测在深圳新产业 MAGLUMI2000plus 仪器采用化学发光法检测,严格按照试剂说明书步骤进行,测定前均进行质控分析。

1.4 统计学分析 采用SPSS 22.0软件对数据进行统计处理,计量资料采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,计量资料组间比较采用 t 检验,相关分析采用Pearson相关分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 慢性丙型肝炎组和健康对照组比较 见表1。慢性丙型肝炎组NK细胞比例及绝对值计数明显低于健康对照组,两者间的差异有统计学意义($t = 2.473, 6.204$, 均 $P < 0.05$)。慢性丙型肝炎组HA, IV-C含量明显高与健康对照组,差异有统计学意义($t = 3.899, 4.654$, 均 $P < 0.05$)。PCIII, LN含量无明显变化,差异无统计学意义($t = 0.223, 0.175$, 均 $P > 0.05$)。

2.2 慢性丙型肝炎患者肝纤维化指标与外周血NK细胞的相关性分析 见图1,图2。通过Pearson相关分析得知,PCIII, LN水平与NK细胞绝对值计数无相关性($r = -0.062, P > 0.05$; $r = 0.051, P > 0.05$)。HA, IV-C水平与NK细胞绝对值计数呈负相关,相关系数分别为 $r = 0.939, P < 0.05$; $r = 0.841, P < 0.05$,即随着NK细胞绝对值计数的降低,血清中HA, IV-C水平呈上高趋势。

表1 慢性丙型肝炎组NK细胞及肝纤维化四项指标与健康对照组的比较

指标	慢性丙型肝炎组($n=65$)	健康对照组($n=30$)	t 值	P 值
NK细胞比例(%)	7.64 ± 4.92	11.35 ± 5.27	2.473	< 0.05
NK细胞绝对值计数(个/ mm^3)	81.37 ± 58.66	178.72 ± 126.48	6.204	< 0.05
HA(ng/ml)	122.4 ± 80.04	61.4 ± 44.7	3.899	< 0.05
PCIII(ng/ml)	80.0 ± 64.55	76.9 ± 59.2	0.223	> 0.05
LN(ng/ml)	71.5 ± 66.98	69.2 ± 36.1	0.175	> 0.05
IV-C(ng/ml)	69.3 ± 53.82	45.2 ± 39.3	4.654	< 0.05

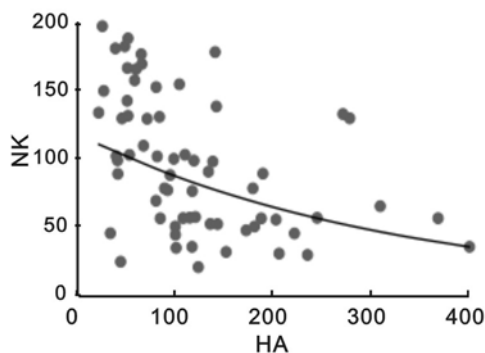


图1 HA与NK细胞的相关性分析

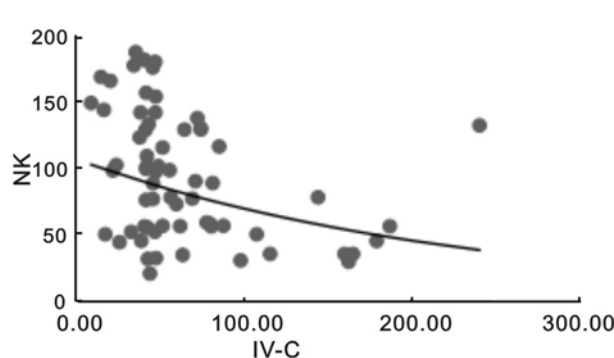


图2 IV-C与NK细胞的相关性分析

3 讨论 NK 细胞属于天然免疫细胞之一,对机体病毒感染的控制起到了非常重要的作用。NK 细胞在慢性丙型肝炎感染初期及进展过程中起着重要的作用,在外周血中的 NK 细胞绝对数值、外周血淋巴细胞比例、NK 细胞功能的变化均可能是使丙型肝炎转为慢性的重要原因^[4]。本研究显示,在慢性丙型肝炎感染的病人中 NK 细胞的总数和百分比均明显低于健康对照组,差异有统计学意义。先天性免疫反应是人体在 HCV 感染后立即防御的防线,NK 细胞是机体重要的免疫细胞,能有效地控制 HCV 感染。NK 细胞除了可以直接杀伤被 HCV 感染的细胞外,释放的 IFN- γ 还可以直接抑制病毒复制。同时在 HCV 入侵人体后引发固有免疫反应的过程中,可能存在某些环节的抑制,即存在 HCV 病毒对固有免疫的逃逸作用,从而导致诱发 IFN 生成的信号通路中断,无法发挥抗病毒作用^[5]。NK 细胞还具有较强的细胞因子分泌能力,能较强烈地分泌 γ 干扰素 (INF- γ)、 β 肿瘤坏死因子 (TNF- β) 和白介素 10 (IL-10) 等细胞因子,通过分泌多种细胞因子对机体起到免疫调节的作用,增强机体抵抗 HCV 的能力。据统计,全球有超过 1.7 亿人感染了 HCV,55%~85% 的成人在急性感染后可发展为慢性丙型肝炎^[6],肝纤维化是慢性丙型肝炎向肝硬化发展的必经阶段。肝纤维化过程中透明质酸 (HA)、Ⅲ型前胶原 (PCⅢ)、Ⅳ型胶原 (IV-C)、层黏蛋白 (LN) 这四项指标可以反映肝纤维化程度,特别是 IV-C 胶原在血清含量升高最能反映肝纤维化程度。本实验检测了肝纤维化四项指标,研究其与 NK 细胞的关系。结果表明:PCⅢ 和 LN 水平与 NK 细胞绝对值计数无相关性;HA 和 IV-C 水平与 NK 细胞绝对值计数呈负相关,这一结果表明 NK 细胞在肝纤维化过程中起了一定的抑制作用。肝纤维化小鼠模型中^[8],已证明 HCV 病毒感染后体内 NK 细胞能有效诱导肝星状细胞 (HSCs) 凋亡,杀伤活化的 HSCs,表现出抗纤维化作用。亦有研究表明:活化的 NK 细胞表达出肿瘤坏死因子相关促凋亡配体 (TRAIL),与 HSCs 表面的相应受体 (TRAILR) 结合,促进活化 HSCs 的凋亡,能够起抑制肝纤维化的作用^[9]。NK 细胞分泌的 IFN- γ 具有抗纤维化的作用,作为 IFN- γ 重要来源之一的 NK 细胞数量减少,IFN- γ 的含量下降也是慢性 HCV 感染患者肝纤维化程度加重的原因。所以我们通过调控 NK 细胞的数量及活性可以更好地控制肝纤维化。

综上所述:在 HCV 感染过程中 NK 细胞在机体免疫系统中具有重要作用,调节其数量及活性更

好地发挥 NK 细胞的免疫调节作用,可以成为治疗并控制其纤维化的有效途径之一。

参考文献:

- [1] Li N, Puga Yung GL, Pradier A, et al. NK cell isolation from liver biopsies: phenotypic and functional analysis of low cell numbers by flow cytometry[J]. *Frontiers in Immunology*, 2013, 4: 61.
- [2] Lee S, Watson MW, Flexman JP, et al. Increased proportion of the CD56 (bright) NK cell subset in patients chronically infected with hepatitis C virus (HCV) receiving interferon-alpha and ribavirin therapy[J]. *J Med Virol*, 2010, 82(4): 568-574.
- [3] 中华医学会肝病学分会, 中华医学会感染病学分会. 《丙型肝炎防治指南》2015 年更新版[J]. *中国肝脏病杂志电子版*, 2015, 7(3): 1-18. Chinese Society of Hepatology and Chinese Society of Infectious Diseases, Chinese Medical Association. The guideline of prevention and treatment for hepatitis C (2015 updated version)[J]. *Chinese Journal of Hepatology (Electronic Edition)*, 2015, 7(3): 1-18.
- [4] Serti E, Chepa-Lotrea X, Kim YJ, et al. Successful interferon-free therapy of chronic hepatitis C virus infection normalizes natural killer cell function[J]. *Gastroenterology*, 2015, 149(1): 190-200, e2.
- [5] 杨晓燕, 张平安, 牛志立, 等. 慢性丙型肝炎患者外周血单个核细胞中干扰素刺激基因及相关信号通路基因表达的研究[J]. *现代检验医学杂志*, 2017, 32(3): 18-21, 25. Yang XY, Zhang PA, Niu ZL, et al. Study on expression interferon stimulating gene and related signal pathway gene in peripheral blood mononuclear cells of patients with chronic hepatitis C[J]. *J Mod Lab Med*, 2017, 32(3): 18-21, 25.
- [6] Golden-Mason L, Rosen HR. Natural killer cells: multifaceted players with key roles in hepatitis C immunity[J]. *Immunol Rev*, 2013, 255(1): 68-81.
- [7] Atta HM. Reversibility and heritability of liver fibrosis: Implications for research and therapy[J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2015, 21(17): 5138-5148.
- [8] Glassner A, Eisenhardt M, Krämer B, et al. NK cells from HCV-infected patients effectively induce apoptosis of activated primary human hepatic stellate cells in a TRAIL-, FasL- and NKG2D-dependent manner[J]. *Laboratory Investigation*, 2012, 92(7): 967-977.
- [9] Fasbender F, Widera A, Hengstler JG, et al. Natural killer cells and liver fibrosis[J]. *Frontiers in Immunology*, 2016, 7(Suppl 1): 19.

收稿日期: 2017-09-02

修回日期: 2018-06-02