

• 临床检验研究 •

脐血干细胞移植治疗肝硬化失代偿后 T 淋巴细胞亚群的观察

但刚¹, 金静^{2*}, 吴丽娟¹, 刘媛¹, 吴艾霖¹, 曾维政³, 蒋明德³

(成都军区总医院: 1. 检验科; 3. 消化内科, 成都 610083; 2. 四川省人民医院干部治疗科, 成都 610072)

摘要:目的 观察脐血干细胞移植对肝硬化失代偿患者免疫功能的影响。方法 采用流式细胞术测定脐血干细胞治疗肝硬化失代偿前后患者总 T 细胞(CD3⁺)、T₄ 细胞(CD3⁺CD4⁺)、T₈ 细胞(CD3⁺CD8⁺)含量的变化。结果 51 例肝硬化失代偿患者治疗前总 T 细胞、T₄ 细胞、T₈ 细胞含量及 T₄/T₈ 比值分别为 60.6±22.5、45.2±13.6、26.2±7.6 和 1.21±0.35, 均明显低于健康对照组(P<0.05); 脐血干细胞移植治疗 1 周后外周血总 T 细胞和 T₄ 细胞含量及 T₄/T₈ 比值分别为 68.5±17.6、51.2±14.6 和 1.71±0.65, 均明显高于治疗前组(P<0.05); T₈ 细胞含量 21.3±8.5, 明显低于治疗前组(P<0.05)。结论 脐血干细胞移植能有效改善肝硬化失代偿患者的免疫功能。

关键词: T 淋巴细胞亚群; 流式细胞术; 脐血干细胞; 失代偿肝硬化

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.20.010

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)20-2319-02

Alteration of T-lymphocyte subsets after treated by cord blood-derived stem cells in patients with decompensated cirrhosis

Dan Gang¹, Jin Jing^{2*}, Wu Lijuan¹, Liu Yuan¹, Wu Ailin¹, Zeng Weizheng³, Jiang Mingde³

(1. Department of Medical laboratory; 3. Department of Digestive Disease, ChengDu Military General Hospital, ChengDu 610083, China; 2. Department of Geniatrics, Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610072, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of cord blood-derived stem cells transplantation on immunologic function in patients with decompensated cirrhosis. **Methods** The content of T cell subsets of the patients with decompensated cirrhosis(DEC) who before and after treated with cord blood-derived stem cells transplantation was detected by flow cytometry. **Results** The study results shows that the concent of total T cells, T₄ cells and T₈ cells, the ratio of T₄/T₈ in decompensated cirrhosis was respectively 60.6±22.5, 45.2±13.6, 26.2±7.6, 1.21±0.35, obviously higher than in control; After treated with cord blood-derived stem cells transplantation in DEC patients, the concent of total T cells, T₄ cells and the ratio of T₄/T₈ were separately 68.5±17.6, 51.2±14.6, 1.71±0.65 and significantly higher than before treatment(P<0.05); the content of T₈ cells was 21.3±8.5 and definitely lower than before treatment(P<0.05). **Conclusion** The transplantation of cord blood-derived stem cells on DEC patients can improve their function immunologic function significantly.

Key words: T-lymphocyte subsets; flow cytometry; cord blood-derived stem cells; decompensate cirrhosis

近年来,随着分子生物学和细胞生物工程技术的发展,以及对干细胞研究认识的深入,通过脐血干细胞(CBSC)移植治疗肝硬化失代偿逐渐成为临床研究的热点。脐血干细胞在肝脏微环境中可分化成肝干细胞及肝细胞,从而参与损伤肝组织的修复与重构,最终恢复患者的肝功能^[1]。本研究通过观察肝硬化失代偿患者脐血干细胞移植前后患者 T 淋巴细胞亚群,包括总 T 细胞(CD3⁺)、T₄ 细胞(CD3⁺CD4⁺)、T₈ 细胞(CD3⁺CD8⁺)及 T₄/T₈ 比值(CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺)的变化,评估患者治疗前后免疫功能的改善。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2009 年 9 月至 2010 年 12 月在本院住院的肝硬化失代偿患者 51 例,其中男 35 例,女 16 例;年龄 20~73 岁,平均 48 岁,包括乙肝后肝硬化 44 例,酒精性肝炎后肝硬化 4 例,原发性胆汁性肝硬化 3 例。所有患者诊断均符合世界卫生组织关于肝硬化失代偿的诊断标准,肝功能分级属 Child-Pugh B/C 级,患者无原发性肝癌、其他感染性疾病等并发症。健康对照组为同期健康体检人群共 40 例,无肝脏及其他慢性疾病,肝功能正常。

1.2 脐血干细胞移植手术

1.2.1 手术及造影器械 Philips 公司产 CV-15 血管造影机、4F/5F Cobra 导管、穿刺针、动脉鞘、高压注射器。

1.2.2 细胞分离器械 高速低温离心机、超净工作台、细胞分离液(天津灏洋生物制品科技股份有限公司)。

1.2.3 术前准备 进行异体脐血干细胞移植治疗前均详细询问病史,结合临床症状,严格选择手术适应证,确定手术时间,拟定治疗方案。

1.2.3 脐血干细胞采集与细胞分离 脐血均来自本院妇产科(所产产妇均知情同意),采集时间为新生儿娩出后即刻采血,血量一般为 100~200 mL,脐血标本均在采集后 1 h 内无菌分离单个核细胞。采用流式细胞术对分离后的干细胞进行细胞计数,本组分离的单个核细胞数目应在 10⁹~10¹⁰/L。

1.2.4 治疗方法 在介入条件下,经股动脉插管至肝固有动脉,注射造影剂,观察肝内血管情况及有无占位性病变。将分离好的脐血干细胞悬液缓慢注入肝内。术毕拔管,穿刺点加压包扎后,穿刺侧下肢加压包扎并制动 8 h。

1.2.5 不良反应 51 例移植患者中未发现严重不良反应及并发症,术后轻度恶心 3 例,均在 24 h 内自行缓解。患者无感染、肝区疼痛、出血等并发症。

1.3 脐血造血干细胞分类计数 要求半小时内对分离获得的脐血干细胞进行干细胞分类计数。同型对照抗体 IgG1-FITC 和 IgG1-PE,测定抗体 CD45⁻PC5、CD34⁻PE 和 CD38⁻FITC,标本预处理试剂等均购自 Beckman-Coulter 公司,使用美国

* 共同第一作者。

Beckman-Coulter 公司 EPICS-XL4 MCL 流式细胞仪进行测定。具体检验方法参见参考文献[2]执行。

1.4 T 淋巴细胞亚群检测 于治疗前及治疗后 1 周,分别于清晨抽取患者静脉血 2~3 mL,EDTA-K₂ 抗凝(紫色采血管)。同型对照抗体 IgG1-PC5/IgG1-FITC/IgG1-PE、测定抗体 CD3⁻PC5/CD4⁻FITC/CD8⁻PE、标本预处理试剂等均购自 Beckman-Coulter 公司,使用美国 Beckman-Coulter 公司 EPICS-XL4 MCL 流式细胞仪进行测定。具体检验方法参见参考文献[2]执行。

1.5 统计学处理 全部数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用 SPSS13.0 统

计学软件进行数据处理,多组间数据的比较采用方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

肝硬化失代偿患者治疗前、后外周血 T 细胞亚群的检测结果见表 1。肝硬化失代偿患者治疗前,外周血总 T 细胞、T₄ 细胞、T₈ 细胞及 T₄/T₈ 比值与健康对照组比较显著下降($P < 0.05$);肝硬化失代偿患者干细胞治疗后,外周血总 T 细胞、T₄ 细胞、T₄/T₈ 比值与治疗前比较显著升高($P < 0.05$);T₈ 细胞与治疗前比较显著降低($P < 0.05$);T₄/T₈ 比值较治疗前更接近健康对照组水平。

表 1 肝硬化患者治疗前、后外周血 T 淋巴细胞亚群测定结果($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | n | 总 T 细胞(%) | T ₄ 细胞(%) | T ₈ 细胞(%) | T ₄ /T ₈ |
|---------|----|--------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------------|
| 健康对照组 | 40 | 72.3 ± 26.5 | 58.3 ± 10.3 | 36.5 ± 7.9 | 1.86 ± 0.55 |
| 肝硬化组治疗前 | 51 | 60.6 ± 22.5 ^a | 45.2 ± 13.6 ^a | 26.2 ± 7.6 ^a | 1.21 ± 0.35 ^a |
| 肝硬化组治疗后 | 51 | 68.5 ± 17.6 ^b | 51.2 ± 14.6 ^b | 21.3 ± 8.5 ^c | 1.71 ± 0.65 ^b |

^a: $P < 0.05$,与健康对照组比较;^b: $P < 0.05$,^c: $P < 0.01$,与肝硬化组治疗前比较。

3 讨 论

近年来国内外大量基础研究发现,脐血干细胞在特定环境下可分化为肝组织和干细胞从而参加肝脏的修复与重建。Avital 等^[3]研究证实从脐血分离的造血干细胞移植入受体后,可整合到受体肝板,分化为成熟肝细胞并合成尿素。Harris 等^[4]以绿色荧光蛋白报告基因转染干细胞并进行性别交叉移植实验,发现分化的肝细胞没有表达荧光蛋白且仍为双倍体,进一步证实了脐血造血干细胞可横向分化为肝细胞。杨宏丽等^[5]将自体脐血干细胞通过介入移植到 86 例肝硬化病患者肝内,发现患者肝功能、凝血机制较对照组有明显提高。

本实验通过检测 51 例干细胞治疗后肝硬化失代偿患者 T 淋巴细胞亚群,观察治疗对机体免疫功能的影响。从结果可以看出,干细胞治疗后,外周血总 T 细胞、T₄ 细胞、T₄/T₈ 比值与治疗前比较显著升高($P < 0.05$);T₈ 细胞与治疗前比较显著降低($P < 0.05$)。上述结果表明,患者在接受干细胞治疗后机体免疫功能得到了显著提升。

T₄ 细胞在体内能够诱导细胞凋亡,清除分泌自身抗体的 B 细胞,干细胞治疗后 T₄ 细胞升高,表明机体为了增强免疫抑制功能,通过增加 T₄ 细胞的比例来发挥抑制作用^[6]。T₈ 细胞具有细胞毒作用,对机体具有免疫调节功能,干细胞治疗后 T₈ 细胞明显降低,表明在干细胞治疗后,降低了细胞毒作用的 T₈ 细胞的数量,抑制了自身反应性的 T₈ 细胞的细胞毒作用,从而达到抑制自身免疫性反应的作用^[1]。干细胞治疗后肝硬化失代偿患者 T₄/T₈ 细胞比例显著升高,更接近健康对照组水平,表明机体的免疫功能得到了明显提升^[5]。

总之,肝硬化患者由于肝纤维化导致肝脏功能丧失,肝脏对淋巴细胞的拮抗作用引起 T 淋巴细胞减少。T₄ 淋巴细胞作

为体内启动细胞免疫的主要细胞,T₄ 淋巴细胞的减少将引起体内免疫机能调节能力下降。T₈ 淋巴细胞作为体内细胞免疫的主要效应细胞,T₈ 淋巴细胞的减少将引起体内清除靶细胞的功能降低。肝硬化患者外周血 T₄ 细胞的下降程度高于 T₈ 细胞,引起 T₄/T₈ 比值下降。干细胞治疗后,上述被打破的 T₄ 淋巴细胞和 T₈ 淋巴细胞平衡向着逐步恢复的方向发展。因此,对于肝硬化失代偿患者来说,早期利用脐血干细胞修复肝损伤、改善遗传性缺陷组织的功能以及代替退行性组织,在一定程度上可以恢复肝功能,提高机体免疫功能,可缩短治疗时间,改善预后,提高病人生存质量。

参考文献

[1] 张丽欣,邢利和,张丽丽,等. 脐血干细胞移植治疗失代偿期肝硬化的临床效果研究[J]. 中国全科医学,2010,13(8):2680-2682.
 [2] 吴丽娟. 临床流式细胞学检验技术[M]. 北京:人民军医出版社,2010:66-70,79-82.
 [3] Avital I, Feraresso C, Aoki T, et al. Bone marrow-derived liver stem cell and mature hepatocyte engraftment in livers undergoing rejection[J]. Surgery,2000,132:384-390.
 [4] Harris JR, Brown GA, Jorqensen M, et al. Bone marrow-derived cells home to and regenerate retinal pigment epithelium after injury[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci,2006,47(5):2108-2113.
 [5] 杨宏丽,于发涛,李桂杰,等. 脐血干细胞移植治疗失代偿期肝硬化 86 例疗效观察[J]. 山东医药,2010,50(45):16-17.
 [6] 王剑虹,吴建波. 肝硬变患者的细胞免疫状态研究[J]. 世界华人消化杂志,2000,8(10):1178-1190.

(收稿日期:2011-08-08)

(上接第 2318 页)

[5] 高玲,高艳霞,周缤. 慢性肾功能衰竭患者 T 淋巴细胞亚群测定分析[J]. 泰山医学院学报,2006,27(4):373-374.
 [6] 钟琼,刘尧娟,欧超伟,等. 慢性肾功能衰竭患者血清腺苷脱氨酶

活性与淋巴细胞亚群的关系[J]. 国际检验医学杂志,2010,31(7):625-626.

(收稿日期:2011-08-08)