

• 临床检验研究论著 •

HBV-ACLF 患者外周血 NK 细胞活化型受体和抑制型受体表达分析*

鲍俊杰¹, 邹勇², 陈小红¹, 张白杜¹

(1. 广州市妇女儿童医疗中心检验科, 广东广州 510623; 2. 中山大学附属第三医院输血科, 广东广州 510630)

摘要:目的 探讨乙型肝炎病毒(HBV)相关慢加急性肝衰竭(HBV-ACLF)患者外周血自然杀伤(NK)细胞活化型受体和抑制型受体表达与肝损伤的相关性。**方法** 利用多色流式技术检测 20 例 HBV-ACLF 患者和 20 例 HBV-慢性乙型肝炎(CHB)患者外周血 NK 细胞活化型受体(NKP30、NKP46、NKG2D)及抑制型受体(CD158a)的表达频率。**结果** 与 HBV-CHB 患者相比, HBV-ACLF 患者外周 NK 细胞活化型受体(NKP30、NKP46)表达均显著上调($P<0.05$), 而 NK 细胞抑制型受体 CD158a 的表达显著下调($P<0.05$)。**结论** NK 细胞活化型受体 NKP30 和 NKP46 表达的增强及抑制型受体 CD158a 表达的减弱可能是 NK 细胞活化及随后 HBV-ACLF 免疫介导的肝细胞损伤的重要因素。

关键词: 肝炎病毒, 乙型; 肝衰竭; 受体

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.15.011 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2014)15-1993-02

Analysis on expression of activating and inhibitory receptors on peripheral natural killer cells in HBV-ACLF patients*

Bao Junjie¹, Zou Yong², Chen Xiaohong¹, Zhang Baidu¹

(1. Department of Clinical Laboratory, Guangzhou Women and Children's Medical Center, Guangzhou, Guangdong 510623, China;

2. Department of Blood Transfusion, Third Affiliated Hospital, Zhongshan University, Guangzhou, Guangdong 510630, China)

Abstract: **Objective** To investigate the correlation between the expression of the activating and inhibitory receptors on peripheral natural killer (NK) cells with the liver injury in the patients with hepatitis B virus related acute-on-chronic liver failure (HBV-ACLF). **Methods** The peripheral blood samples were collected from 20 patients with HBV-ACLF and 20 patients with HBV-chronic hepatitis B(CHB). The expressions of the activating receptors (NKP30, NKP46, NKG2D) and the inhibitory receptor (CD158a) on peripheral NK cells were detected by the multicolor flow cytometry. **Results** Compared with the HBV-CHB patients, the expression of the activating receptors NKP30 and NKP46 in the HBV-ACLF were remarkably unregulated($P<0.05$), but the expression of the inhibitory receptor CD158a was markedly downregulated($P<0.05$). **Conclusion** The enhanced expression of the activating receptors NKP30 and NKP46 and the weakened expression of inhibitory receptor CD158a may be the important factor of the NK cells activation and the subsequent HBV-ACLF immune-mediated hepatocyte injury.

Key words: hepatitis B virus; liver failure; receptor

HBV 相关慢加急性肝衰竭(HBV-ACLF)是在慢性乙肝感染的基础上,因急性诱因如乙型肝炎再激活、感染、酒精、药物、未知的肝毒等因素作用下发生的恶性疾病。其病情凶险,发展迅猛,许多患者数周甚至数天内即出现大片肝细胞坏死,广泛的炎性细胞浸润和纤维蛋白的沉积,最后发展为肝功能衰竭。目前临床上缺乏特异、有效的治疗靶点和干预手段,除非实施紧急肝移植,绝大部分患者预后不良^[1-2]。HBV 诱导的慢加急性肝衰竭发病机制复杂,目前已有的研究表明 HBV 基因型和基因变异、遗传易感性、超强的 CTL 反应、炎性细胞的浸润、凝血障碍等与 HBV-ACLF 的发病密切相关^[1-2]。本文通过分析 HBV-ACLF 患者外周血 NK 细胞活化型受体和抑制型受体的表达特征,探讨 NK 细胞受体表达与 NK 细胞活化及随后的免疫介导的肝细胞损伤的相关性,为深入研究 HBV-ACLF 的发病机制提供新的分子靶点和理论基础。

1 资料与方法

1.1 一般资料 HBV-ACLF 和慢性乙型肝炎(CHB)患者均来自中山大学附属第三医院感染科。HBV-ACLF 的诊断标准参考《2006 年肝衰竭指南》。收集 HBV-ACLF 和 CHB 患者外周抗凝血标本,行流式细胞染色。详细资料见表 1。

1.2 仪器与试剂 BD LSR II 流式细胞仪(美国 BD 公司); CD3-FITC、CD56-APC、CD107a-PE、NKP30-PE、NKP46-PE、NKG2A-PE、NKG2D-PE、CD158a-PE、同型对照抗体(Mouse

IgG1)均购自美国 BD 公司。

表 1 患者详细资料信息

项目	HBV-CHB	HBV-ACLF
<i>n</i>	20	20
年龄(岁)	32(20.0~30.5)	39(34.5~45.0)
男性比例[<i>n</i> (%)]	14(70)	15(75)
HBsAg+ (%)	100	65
HBeAg+ (%)	40	20
HBcAb+ (%)	100	100
HBV DNA(log ₁₀ copies/mL)	5.9(3.6~8.3)	3.7(3.0~5.9)
血清 ALT(IU/L)	112(66.0~223.5)	116.5(64.0~245.5)
血清总胆红素(μmol/L)	14.4(11.7~11.6)	596.0(440.1.3~843.7)
凝血酶原时间(s)	12.0(11.5~12.7)	32.3(27.5~39.5)
凝血酶原活力(%)	103.0(96.0~112.3)	23.4(20.0~27.3)

1.3 外周血 NK 细胞受体流式染色分析 取 100 μL HBV-ACLF 或 CHB 患者外周抗凝血,加入 CD3-FITC、CD16-PerCP-Cy5. 5、CD56-PE、NKP30-PE/NKP46-PE/NKG2A-PE/NKG2D-PE/CD158a-PE/同型对照抗体(Mouse IgG1)鼠抗人单克隆抗体各 20 μL(美国 BD 公司),室温闭光孵育 30 min,红细胞裂解液室温裂解 15 min 后用流式缓冲液离心洗涤 2 次,500 μL 流式缓冲液重悬,立即流式细胞仪检测。

* 基金项目:国家自然科学基金青年基金资助项目(81000180)。 作者简介:鲍俊杰,女,主管技师,主要从事临床免疫学研究。

1.4 统计学处理 采用 SPSS16.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间均值比较采用非参数检验(Mann-Whitney U),以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 NK 细胞活化性受体表达 见图 1(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)所示与 HBV-CHB 患者相比,HBV-ACLF 患者外周 NK 细胞活化型受体(NKP30、NKP46)表达均显著上调($P < 0.05$),而 NKG2D 差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 NK 细胞抑制型受体表达 见图 2(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)所示与 HBV-CHB 患者相比,HBV-ACLF 患者外周 NK 细胞抑制型受体 CD158a 表达显著下调($P < 0.05$)。

3 讨 论

NK 细胞在病毒性肝炎中究竟扮演何种角色是当前国内外众多学者迫切想探明的问题。已报道的资料显示 HBV 急性感染,外周血 NK 细胞的毒性增强,白细胞介素-2 水平增加;而在恢复期,两者均处在正常水平^[3]。相反,HBV 慢性感染,NK 细胞的毒性及白细胞介素-2 活力均被显著抑制^[4],表明 NK 细胞的细胞毒作用可能是人体早期控制 HBV 感染的关键因素之一。最近的研究发现 e 抗原阳性的 CHB 患者在肝脏炎症突然加剧时,NK 细胞可以通过 TRAIL/TRAIL-R 途径介导肝细胞死亡^[5],这一发现为 NK 细胞在 HBV 诱导的肝细胞损伤中的作用提供了直接证据。

NK 细胞在 HBV 相关慢加急性肝衰竭免疫介导的肝损伤中可能也发挥着重要作用。NK 细胞通过其表面活化型受体和抑制型受体与相应配体特异识别,启动一系列信号转导,并且各种信号的整合效应决定着 NK 细胞是发挥效应功能,还是处于抑制状态^[6]。本研究发现,HBV-ACLF 患者外周血 NK 细胞活化型受体(NKP30、NKP46)表达显著上调,而 NK 细胞抑制型受体 CD158 的表达却显著下调,这可能是 NK 细胞激活的关键因素之一。NK 细胞显著活化一方面通过受体-配体直接的相互作用而介导肝细胞损伤,另一方面分泌大量炎症细胞因子及趋化因子招募和活化其他效应细胞共同参加炎症反应而加重肝细胞损伤。

NKP30 和 NKP46 属于 NK 细胞天然细胞毒受体(NCRs)。国外学者的研究显示:NCRs 在启动 NK 细胞溶解包括黑色素瘤、神经母细胞瘤、髓系及淋巴细胞白血病等肿瘤细胞以及 EB 病毒、牛痘病毒、流感病毒等病毒感染细胞中均发挥重要作用^[7-13]。最近的研究表明 NCRs 可能直接影响 NK 细胞的功能,在抗 HBV 和 HCV 感染以及 HBV 相关慢加急性肝衰竭中也发挥着重要作用^[14-15]。CD158a(KIR2DL1)属于 NK 细胞杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR)家族,其识别的配体为 HLA-CW2、Cw4、Cw5 和 Cw6。已有研究显示 CD158a 在机体抗肿瘤免疫及移植排斥中发挥重要调节作用。研究者推测 HBV-ACLF 中 NK 细胞受体表达模式受到多种因素如炎症细胞因子、趋化因子、配体等调节而发生改变,原来在维持免疫自稳中发挥重要作用的 NK 细胞抑制型受体如 CD158a 表达减弱,NK 细胞传递的抑制信号减弱,NK 细胞逐渐去抑制而活化,活化型受体如 NKP30 和 NKP46 的表达增强,从而增强了 NK 细胞的效应功能。

总之,本研究发现了与 HBV-ACLF NK 细胞活化及免疫介导的肝细胞损伤相关的重要的活化型受体 NKP30 和 NKP46 及抑制型受体 CD158a,为深入研究 HBV-ACLF 的发病机制以及临床免疫干预治疗提出新的分子靶点和策略。

参考文献

- [1] Sarin SK, Kumar A, Almeida JA, et al. Acute-on-chronic liver failure; consensus recommendations of the Asian Pacific Association for the study of the liver (APASL)[J]. *Hepatol Int*, 2009, 3(1): 269-282.
- [2] Liu Q, Liu Z, Wang T, et al. Characteristics of acute and sub-acute liver failure in China: nomination, classification and interval[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2007, 22(12): 2101-2106.
- [3] Echevarria S, Casafont F, Miera M, et al. Interleukin-2 and natural killer activity in acute type B hepatitis[J]. *Hepatogastroenterology*, 1991, 38(4): 307-310.
- [4] Castillo FM, Romero TA, Estevez J, et al. Concentrations of cytokines, soluble interleukin-2 receptor, and soluble CD30 in sera of patients with hepatitis B virus infection during acute and convalescent phases[J]. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2002, 9(6): 1372-1375.
- [5] Dunn C, Brunetto M, Reynolds G, et al. Cytokines induced during chronic hepatitis B virus infection promote a pathway for NK cell-mediated liver damage[J]. *J Exp Med*, 2007, 204(3): 667-680.
- [6] Lanier LL. NK cell recognition[J]. *Annu Rev Immunol*, 2005; 23(1): 225-274.
- [7] Pende D, Parolini S, Pessino A, et al. Identification and molecular characterization of NKP30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells[J]. *J Exp Med*, 1999, 190(10): 1505-1516.
- [8] Castriconi R, Dondero A, Corrias MV, et al. Natural killer cell-mediated killing of freshly isolated neuroblastoma cells: critical role of DNAM-1/PVR interaction[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(24): 9180-9184.
- [9] El-Sherbiny YM, Meade JL, Holmes TD, et al. The requirement for DNAM-1, NKG2D, and NKP46 in the natural killer cell-mediated killing of myeloma cells[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(18): 8444-8449.
- [10] Pende D, Spaggiari GM, Marcenaro S, et al. Analysis of the receptor-ligand interactions in the natural killer-mediated lysis of freshly isolated myeloid or lymphoblastic leukemias: evidence for the involvement of the Poliovirus receptor (CD155) and Nectin-2 (CD112)[J]. *Blood*, 2005, 105(5): 2066-2073.
- [11] Bottino C. NTB-A, a novel SH2D1A-associated surface molecule contributing to the inability of natural killer cells to kill Epstein-Barr virus-infected B cells in X-linked lymphoproliferative diseases[J]. *J Exp Med*, 2001, 194(3): 235-246.
- [12] Chisholm SE, Reyeburn HT. Recognition of vaccinia virus-infected cells by human natural killer cells depends on natural cytotoxicity receptors[J]. *J Virol*, 2006, 80(5): 2225-2233.
- [13] Achdout H, Segman T, Hirsh S, et al. Killing of avian and swine influenza by natural killer cells[J]. *J Virol*, 2010, 84(8): 3993-4001.
- [14] De Maria A, Fogli M, Costa P, et al. The impaired NK cell cytolytic function in viremic HIV-1 infection is associated with a reduced surface expression of natural cytotoxicity receptors (NKP46, NKP30 and NKP44)[J]. *Eur J Immunol*, 2003, 33(9): 2410-2418.
- [15] Nattermann J, Feldmann G, Ahlenstiel G, et al. Surface expression and cytolytic function of natural killer cell receptors is altered in chronic hepatitis C[J]. *Gut*, 2006, 55(6): 869-877.