



[DOI] 10.3969/j.issn.1001-9057.2020.10.010

http://www.lcnkzz.com/CN/10.3969/j.issn.1001-9057.2020.10.010

· 论著 ·

白细胞介素-21 对乙型病毒性肝炎肝硬化患者自然杀伤细胞表型及功能的影响

李媛 龙富立 张衍 官志杰 黄古叶 毛德文

【摘要】 目的 探讨白细胞介素(IL)-21 对乙型肝炎病毒性肝炎(简称乙肝)肝硬化患者自然杀伤(NK)细胞表型及功能的影响。**方法** 根据肝硬化分期,将 60 例乙肝肝硬化患者分为代偿期组 30 例和失代偿期组 30 例,同时纳入 30 例乙型肝炎病毒表面抗体阳性的健康人作为对照组。采用流式细胞术检测 NK 细胞频率、NK 细胞表面抑制性受体 A(NKG2A)、NK 细胞表面活化性受体 D(NKG2D)及细胞毒活性分子 CD107a 的表达水平,采用胞内因子染色法检测 NK 细胞胞内干扰素(IFN)- γ 的表达水平。分离出外周血单个核细胞(PBMC)与 IL-21 共培养后,再检测上述指标并进行比较。**结果** 代偿期组和失代偿期组患者 NKG2A 的表达水平均高于对照组,NK 细胞频率、NKG2D、CD107a 及 IFN- γ 的表达水平均低于对照组($P < 0.05$);加入 IL-21 后,代偿期组和失代偿期组患者 NKG2D、CD107a 及 IFN- γ 的表达水平均高于同组未加 IL-21 时($P < 0.05$)。**结论** IL-21 可促进乙肝肝硬化患者 NK 细胞活化和 IFN- γ 分泌,增强其细胞毒活性,提示 IL-21 可用于乙肝肝硬化的预防和免疫治疗。

【关键词】 白细胞介素-21; 乙肝肝硬化; 自然杀伤细胞; 功能

Effect of interleukin-21 on phenotype and function of natural killer cell in hepatitis B cirrhosis patients Li Yuan, Long Fuli, Zhang Kan, Guan Zhijie, Huang Guye, Mao Dewen. Department of Liver Disease, the First Affiliated Hospital, Guangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning 530023, China

【Abstract】 Objective To explore the effect of interleukin(IL)-21 on phenotype and function of natural killer(NK) cell in hepatitis B cirrhosis patients. **Methods** A total of 60 hepatitis B cirrhosis patients were divided into compensatory period group (30 cases) and decompensatory period group (30 cases), according to stage of cirrhosis and 30 cases of healthy people with positive Hepatitis B virus surface antibody were included as control group. Frequency of NK cells, NK cell surface inhibitory receptor A(NKG2A), NK cell surface activating receptor D(NKG2D) and cytotoxic activity of molecular CD107a expression level were detected by flow cytometry. NK cells intracellular interferon (IFN)- γ expression level was detected by intracellular factor staining method. After the peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated and co-cultured with IL-21, above indicators were detected and compared. **Results** NKG2A expression level in compensatory period group and decompensatory period group were higher than that in control group, NK cell frequency, NKG2D, CD107a and IFN- γ expression level were lower than those in control group ($P < 0.05$). After adding IL-21, NKG2D, CD107a and IFN- γ expression levels in compensatory period group and decompensatory period group were higher than the same group without IL-21 ($P < 0.05$). **Conclusion** IL-21 can promote the activation of NK cell and secretion of IFN- γ , enhance its cytotoxic activity in hepatitis B cirrhosis patients, which suggests that IL-21 can be used in the prevention and immunotherapy of hepatitis B cirrhosis.

【Key words】 Interleukin-21; Hepatitis B cirrhosis; Natural killer cell; Function

肝硬化是各种慢性肝病发展的晚期阶段,若治疗

不及时,死亡率较高,严重影响患者的健康。在我国,乙型肝炎病毒(HBV)的持续感染是造成肝硬化的主要原因。乙型病毒性肝炎(简称乙肝)肝硬化患者多存在免疫功能紊乱或低下,自然杀伤(NK)细胞是机体执行非适应性免疫反应的重要免疫细胞,其介导天然免疫应答,不依赖抗体和补体,可直接杀伤靶细胞,如肿瘤细胞或受病毒感染的细胞等,同时也具有抗感染、

基金项目:广西自然科学基金联合资助培育项目(2018GXNSFAA138077);
广西壮族自治区中青年教师基础能力提升项目(2017KY0309)

作者单位:530023 南宁,广西中医药大学第一附属医院肝病科(李媛、
龙富立、张衍、官志杰、黄古叶、毛德文);广西高发传染病中西医结合传
化医学重点实验室培育基地(李媛)

通讯作者:毛德文, E-mail: mdwboshi2005@163.com

免疫调节和免疫监视作用^[1-2]。在天然免疫中,作为效应细胞的 NK 细胞发挥重要作用,而白细胞介素(IL)-21 在 NK 细胞发育和活化过程中具有重要作用。IL-21 与 IL-2、IL-4、IL-7、IL-9 及 IL-15 同属于 I 型细胞因子家族成员,IL-21 受体广泛表达于 T 细胞、B 细胞、CD8⁺T 细胞及 NK 细胞等^[3]。在本研究中,我们主要检测乙肝肝硬化患者外周血 NK 细胞表面受体、NK 细胞毒活性分子和 NK 细胞分泌细胞因子水平,并观察 IL-21 对乙肝肝硬化患者 NK 细胞表型及功能的影响。

对象与方法

1. 对象:2017 年 10 月~2018 年 10 月于广西中医药大学第一附属医院住院的乙肝肝硬化患者 60 例,诊断符合《慢性乙型肝炎防治指南(2015 年版)》中关于乙肝肝硬化的诊断标准^[4]。根据肝硬化分期将所有患者分为代偿期组 30 例和失代偿期组 30 例。另选取同期于我院体检的 30 例 HBV 表面抗体(HBsAb)阳性的健康成年人作为对照组。排除标准:合并 HIV 感染或其他病毒性肝炎、酒精性肝病、自身免疫性疾病、寄生虫感染、肝癌及其他系统严重疾病。本研究经广西中医药大学第一附属医院伦理委员会审核批准,所有受试者均签署知情同意书。

2. 方法

(1)NK 细胞频率及 NK 细胞表面抑制性受体 A (NKG2A)、NK 细胞表面活化性受体 D(NKG2D)的检测:3 组受试者均空腹抽取外周血 10 ml,当天将抽取的外周血加入人淋巴细胞分离液分离出人外周血单核细胞(PBMC),取 PBMC 加入异硫氰酸荧光素(FITC)标记的抗人 CD56 抗体、Percp-cy5.5 标记的抗人 CD3 抗体、PE 标记的抗人 NKG2A 抗体及 APC 标记的抗人 NKG2D 抗体,室温避光孵育 30 min 后用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 2 次,采用流式细胞仪检测 NK 细胞频率及 NKG2A、NKG2D 的表达水平。

(2)NK 细胞毒活性分子 CD107a 的检测:取 PBMC 与 K562 细胞按 10:1 比例混合,加入 PE 标记的抗人 CD107a 抗体,然后分别加激活剂佛波酯(PMA)、离子霉素及阻断剂莫能霉素放入培养箱孵育 6 h,最后加入 Percp-cy5.5 标记的抗人 CD3 抗体和 FITC 标记的抗人 CD56 抗体,室温避光孵育 30 min 后用 PBS 洗涤 2 次,采用流式细胞仪检测 CD107a 的表达水平。

(3)NK 细胞分泌细胞因子干扰素(IFN)- γ 的检测:取 PBMC 分别加入激活剂 PMA、离子霉素和阻断剂莫能霉素后放入培养箱孵育 5 h,然后加入 Percp-cy5.5 标记的抗人 CD3 抗体和 FITC 标记的抗人 CD56 抗体,室温避光孵育 30 min 后分别加入固定剂和破膜剂,最

后加入 PE 标记的抗人 IFN- γ 抗体,室温避光孵育 30 min 后用 PBS 洗涤 2 次,采用流式细胞仪检测 IFN- γ 的表达水平。

(4)IL-21 对 NK 细胞生物学活性的影响:取 PBMC 与 IL-21 共培养 48 h 后,再按上述方法检测 NKG2A、NKG2D、CD107a 及 IFN- γ 的表达水平。以上流式抗体均购自美国 BD 公司。

3. 统计学处理:应用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验,3 组间比较采用方差分析;计数资料以例数表示,组间比较采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1.3 组受试者基本资料比较:对照组、代偿期组、失代偿期组受试者性别及年龄比较差异均无统计学意义($P > 0.05$),而 3 组受试者 ALT 水平比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。失代偿期组乙肝病毒 DNA 水平平均高于代偿期组($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 3 组受试者基本资料比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	性别 (男/女)	年龄 (岁)	ALT (U/L)	乙肝病毒 DNA (lgIU/ml)
对照组	30	15/15	39.2 \pm 11.5	17.22 \pm 9.62	—
代偿期组	30	20/10	43.0 \pm 15.2	40.45 \pm 37.68	3.45 \pm 1.56
失代偿期组	30	22/8	46.5 \pm 13.5	125.58 \pm 87.64	4.51 \pm 1.83
$\chi^2/F/t$ 值		3.732	2.199	31.860	2.414
P 值		0.155	0.117	<0.001	0.019

2.3 组受试者 NK 细胞频率及 NKG2A、NKG2D 的表达水平比较:代偿期组和失代偿期组患者 NKG2A 的表达水平均高于对照组,NK 细胞频率及 NKG2D 的表达水平均低于对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.001$)。代偿期组和失代偿期患者 NK 细胞频率、NKG2A 及 NKG2D 的表达水平比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 3 组受试者 NK 细胞频率及 NKG2A、NKG2D 的表达水平比较(% , $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	NK 细胞频率	NKG2A	NKG2D
对照组	30	15.08 \pm 6.33	10.69 \pm 7.56	62.33 \pm 15.34
代偿期组	30	5.04 \pm 3.63 ^a	21.09 \pm 12.63 ^b	42.90 \pm 16.87 ^b
失代偿期组	30	3.97 \pm 3.20 ^a	26.08 \pm 16.92 ^a	32.44 \pm 17.57 ^a

注:与对照组比较,^a $P < 0.01$,^b $P < 0.05$

3.3 组受试者 NK 细胞 CD107a 和 IFN- γ 的表达水平比较:代偿期组和失代偿期组患者 NK 细胞 CD107a 及 IFN- γ 的表达水平均低于对照组($P < 0.001$)。代偿期组和失代偿期患者 NK 细胞 CD107a 及 IFN- γ 的表达水平比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。见表 3。

表 4 IL-21 对代偿期组和失代偿期组患者 NK 细胞生物学活性的影响(%, $\bar{x} \pm s$)

组别		例数	NK 细胞频率	NKG2A	NKG2D	CD107a	IFN- γ
代偿期组	未加 IL-21	30	5.04 \pm 3.63	21.09 \pm 12.63	42.90 \pm 16.87	61.94 \pm 9.08	11.46 \pm 9.55
	加入 IL-21	30	8.73 \pm 7.00	12.23 \pm 7.70	58.97 \pm 21.98 ^a	78.92 \pm 22.36 ^a	30.58 \pm 16.05 ^a
失代偿期组	未加 IL-21	30	3.97 \pm 3.20	26.08 \pm 16.92	32.44 \pm 17.57	57.40 \pm 13.70	6.48 \pm 8.19
	加入 IL-21	30	7.69 \pm 6.29	21.45 \pm 14.36	47.91 \pm 13.77 ^a	73.60 \pm 17.17 ^a	25.13 \pm 12.52 ^a

注:与同组未加 IL-21 比较,^a $P < 0.05$

表 3 3 组受试者 CD107a 和 IFN- γ 的表达水平比较

(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	CD107a	IFN- γ
对照组	30	80.25 \pm 9.71	37.42 \pm 20.49
代偿期组	30	61.94 \pm 9.08 ^a	11.46 \pm 9.55 ^a
失代偿期组	30	57.40 \pm 13.70 ^a	6.48 \pm 8.19 ^a

注:与对照组比较,^a $P < 0.001$

4. IL-21 对代偿期组和失代偿期组患者 NK 细胞生物学活性的影响:加入 IL-21 后,代偿期组和失代偿期组患者 NKG2D、CD107a 及 IFN- γ 的表达水平均高于同组未加 IL-21 时($P < 0.05$),但同组未加 IL-21 时和加入 IL-21 后 NK 细胞频率和 NKG2A 的表达水平比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。见表 4。

讨 论

肝硬化病因复杂,在我国常见的病因包括 HBV 和丙型肝炎病毒 HCV 感染、饮酒、寄生虫感染,尤其以 HBV 感染最为常见^[5]。肝脏纤维化是肝硬化演变发展过程中的一个重要阶段,随着对肝脏免疫的深入研究和肝纤维化发病机制的进一步阐释,肝脏纤维化的致病过程被认为是免疫系统介导的炎症反应与组织修复失衡的过程,多种免疫细胞与肝星状细胞(HSCs)相互作用构成复杂的免疫调控网络影响肝脏纤维化和肝硬化的疾病进程^[6]。

NK 细胞作为天然免疫系统的主要成分,除具有抗肿瘤、抗病毒、免疫调节等作用外,还具有抗纤维化功能,在肝脏纤维化和肝硬化的发生发展中发挥重要作用^[7]。NK 细胞发挥功能由其表面活化性受体和抑制性受体之间的平衡所决定。本研究结果显示,代偿期组和失代偿期组患者 NKG2A 的表达水平均高于对照组,NK 细胞频率及 NKG2D 的表达水平均低于对照组,与近期的报道一致^[8]。目前 NK 细胞频率下降的原因尚不明确,有学者推测是因为肝脏免疫系统介导的炎症反应增强,从而导致炎症细胞向肝脏迁移,抑制 NK 细胞活化。但也有学者发现肝脏 NK 细胞频率及亚群的变化与外周血的变化一致^[8],因此并不存在“迁移”之说,故还有待进一步研究。NK 细胞表面受体表达出现异常提示 NK 细胞的功能可能发生变化,

故推测乙型肝炎肝硬化患者 NK 细胞可能对肝脏的免疫损伤和病毒控制有一定作用。

2006 年有学者在小鼠模型上发现 NK 细胞可通过 NKG2D 杀伤活化的 HSCs,从而减轻肝脏纤维化^[9]。此后 NK 细胞的抗纤维化作用被广泛研究。目前认为 NK 细胞的抗纤维化功能主要包括杀伤活化的 HSCs 和分泌 IFN- γ 诱导 HSCs 凋亡及阻滞细胞周期等^[10-14]。NK 细胞的功能主要包括细胞毒活性和分泌细胞因子。本研究主要通过检测 NK 细胞毒活性(以 NK 细胞分泌 CD107a 的水平反映细胞毒活性)及分泌的 IFN- γ 水平反映 NK 细胞的抗纤维化功能。本研究结果显示,代偿期组和失代偿期组患者 CD107a 及 IFN- γ 的表达水平均低于对照组,提示乙型肝炎肝硬化患者的 NK 细胞处于抗纤维化功能受损状态,NK 细胞活性下降。NK 细胞活性下降可能与病毒的直接抑制、机体 Kupffer 细胞功能低下及营养不良等有关。NK 细胞活性下降使其干扰病毒复制和抗感染的免疫能力下降,从而使病毒在机体内持续复制而难以清除,导致疾病趋于慢性化,甚至进展至肝硬化。

作为与 IL-15 同属的 I 型细胞因子家族成员,既往体外实验结果显示,IL-21 可以诱导 NK92 细胞表达 IFN- γ 及活化胞内信号分子信号传导与转录激活因子 3(STAT3)^[15]。本研究结果显示,加入 IL-21 后,代偿期组和失代偿期组患者 NKG2D、CD107a 及细胞因子 IFN- γ 的表达水平均高于同组未加 IL-21 时,表明 IL-21 能增强 NK 细胞的细胞毒活性并促进 IFN- γ 分泌,提示 IL-21 参与天然免疫反应的激活。NK 细胞的功能与其表面分子、受体类型表达有关。本研究中,代偿期组和失代偿期组患者未加 IL-21 时和加入 IL-21 后 NK 细胞频率和 NKG2A 表达水平比较差异均无统计学意义,表明 IL-21 刺激 NK 细胞后,在不影响 NKG2A 表达的情况下促进 NKG2D 的表达。IL-21 诱导乙型肝炎肝硬化患者 NK 细胞激活,并刺激其分泌高水平的细胞因子,提示 IL-21 参与乙型肝炎肝硬化的免疫损伤。

综上所述,乙型肝炎肝硬化患者 NK 细胞功能受损,而 IL-21 可以靶向增强乙型肝炎肝硬化患者 NK 细胞毒活性和 IFN- γ 的分泌,促进 NK 细胞活化,推测 IL-21 具有预防和治疗乙型肝炎肝硬化的潜在价值,如能采取针对性

的免疫干预措施靶向调节 NK 细胞功能,可为乙肝肝硬化免疫治疗提供新策略。

参 考 文 献

- [1] Peppas D, Gill US, Reynolds G, et al. Up-regulation of a death receptor renders antiviral T cells susceptible to NK cell-mediated deletion[J]. J Exp Med, 2013, 210(1): 99-114.
- [2] Simoni Y, Diana J, Ghazarian L, et al. Therapeutic manipulation of natural killer (NK) T cells in autoimmunity: are we close to reality? [J]. Clin Exp Immunol, 2013, 171(1): 8-19.
- [3] Mehta DS, Wurster AL, Grusby MJ. Biology of IL-21 and the IL-21 receptor[J]. Immunol Rev, 2004, 202: 84-95.
- [4] 中华医学会肝病学会, 中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2015 年版)[J]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版), 2015, 9(5): 570-589.
- [5] Wang FS, Fan JG, Zhang Z, et al. The global burden of liver disease: the major impact of China[J]. Hepatology, 2014, 60(6): 2099-2108.
- [6] Lee YA, Wallace MC, Friedman SL. Pathobiology of liver fibrosis: a translational success story[J]. Gut, 2015, 64(5): 830-841.
- [7] Tosello-Tramont A, Surette FA, Ewald SE, et al. Immunoregulatory role of NK cells in tissue inflammation and regeneration[J]. Front Immunol, 2017, 8: 301.
- [8] 史继静, 赵娟娟, 张政. 乙肝肝硬化肝组织和外周血自然杀伤细胞的表型及功能特点[J]. 解放军医学杂志, 2019, 44(3): 260-265.

- [9] Radaeva S, Sun R, Jaruga B, et al. Natural killer cells ameliorate liver fibrosis by killing activated stellate cells in NKG2D-dependent and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-dependent manners[J]. Gastroenterology, 2006, 130(2): 435-452.
- [10] Fasbender F, Wiedera A, Hengstler JG, et al. Natural killer cells and liver fibrosis[J]. Front Immunol, 2016, 7: 19.
- [11] Gur C, Doron S, Kfir-Erenfeld S, et al. Nkp46-mediated killing of human and mouse hepatic stellate cells attenuates liver fibrosis[J]. Gut, 2012, 61(6): 885-893.
- [12] Mantovani S, Mele D, Oliviero B, et al. Nkp30 isoforms in patients with chronic hepatitis C virus infection[J]. Immunology, 2015, 146(2): 234-242.
- [13] Muhanna N, Abu TL, Doron S, et al. Amelioration of hepatic fibrosis by NK cell activation[J]. Gut, 2011, 60(1): 90-98.
- [14] Glassner A, Eisenhardt M, Kramer 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]. Lab Invest, 2012, 92(7): 967-977.
- [15] Strengell M, Sarenova T, Foster D, et al. IL-21 up-regulates the expression of genes associated with innate immunity and Th1 response[J]. J Immunol, 2002, 169(7): 3600-3605.

(收稿日期: 2019-09-11)

(本文编辑: 周三凤)



[DOI] 10.3969/j.issn.1001-9057.2020.10.011

http://www.lcnkzz.com/CN/10.3969/j.issn.1001-9057.2020.10.011

• 病例报告 •

单纯男性化型 21-羟化酶缺陷症 5 例

胡嫚丽 陈静 李玉凯 董坤 杨雁 邓红艳

[关键词] 21-羟化酶缺陷症; 单纯男性化型

病例 1: 患者, 社会性别男, 生物性别女, 50 岁, 因“发生双侧肾上腺增生伴占位 2 周”入住华中科技大学同济医学院附属同济医院。患者出生时家属发现其生殖器异常, 未做特殊关注, 患者 5 岁于当地医院行生殖器矫正手术后未再诊治。2018 年 5 月因双侧腰部胀痛不适行腹部增强 CT 检查, 结果显示双侧肾上腺增生伴占位性病变。门诊以“双侧肾上腺增生”收入院。患者未婚未育, 自诉 18 岁左右开始出现较规律的(28~35 天)下体出血, 时间为 2~7 天, 无性生活, 无性取向。体格检查: Bp 119/78 mmHg, 身高 145 cm, 体重 56 kg, 外貌似男性, 声线粗, 有胡须, 无痤疮, 甲状腺不大。乳房发育 Tanner II 期。心肺检查未见明显异常。阴毛呈男性分布, 阴蒂明显增生肥大, 长约 3 cm, 似阴茎。小阴唇不明显。阴毛 Tanner V 期。入院后查 17-羟孕酮(17-OHP)、雄稀二酮、睾酮(T)水平均升高, 皮质醇(COR)水平偏低, 醛固酮(ALD)及促肾上腺皮质激素(ACTH)水平均正

常(表 1)。中剂量地塞米松抑制试验结果提示 17-OHP 可被抑制(表 2)。ACTH 兴奋试验结果提示 ACTH 兴奋后 17-OHP > 35 nmol/L, 同时雄稀二酮、睾酮水平升高(表 3)。肾上腺 CT 检查结果示双侧肾上腺增生伴占位性病变(左 2.1 cm × 3.3 cm、3.2 cm × 4.3 cm)。妇科超声检查结果: 宫腔下段及宫颈管内积液; 左侧附件区小囊肿; 右侧附件区囊性包块。染色体核型 46, XX。基因检测结果为 CYP21 基因突变。诊断为 21-羟化酶缺陷症(21-OHD)。患者拒绝接受任何治疗。

病例 2: 患者, 女, 12 岁, 因“月经未来潮”入住华中科技大学同济医学院附属同济医院。2010 年患者 7 岁时其母亲发现其外貌特征男性化, 声音变粗, 无智力、性别、行为异常, 无社交障碍, 未予重视。2016 年 7 月因发现同龄人有月经而自身月经未来潮, 遂来我院就诊, 门诊以“闭经查因”收住院。既往无特殊病史。体格检查: Bp 120/85 mmHg, 身高 143 cm, 体重 37 kg, 外貌似男性, 声线粗, 无明显胡须, 无痤疮, 甲状腺不大。双下肢体毛浓密, 乳房发育 Tanner II 期。心肺检查未见明显异常。阴毛呈男性分布, 阴蒂明显增生肥大, 长 3 cm, 似阴茎。小阴唇不明显。阴毛 Tanner V 期。双足第四趾畸形。入院后查 17-OHP、雄稀二酮、T 水平均升高, COR 水平偏低, ALD 水平正常, ACTH 水平升高(表 1)。

作者单位: 430033 湖北省武汉市第四医院 华中科技大学同济医学院附属普爱医院内分泌科(胡嫚丽、李玉凯、邓红艳); 华中科技大学同济医学院附属同济医院内分泌科(陈静、董坤、杨雁)

通讯作者: 邓红艳, E-mail: padenghongyan@163.com