

· 临床研究 ·

喉癌中钙网蛋白和 CD47 的表达及其与 T 淋巴细胞浸润的相关性

熊辉强¹, 王鹤龄¹, 罗 璜², 刘红兵², 刘月辉², 张少容^{2△}

(1. 江西省丰城市人民医院耳鼻咽喉头颈外科 331100; 2. 南昌大学第二附属医院耳鼻咽喉头颈外科, 南昌 330006)

摘要:目的 探讨喉鳞状上皮细胞癌(LSCC)组织中钙网蛋白(CRT)和 CD47 的表达水平、临床意义及其与 T 淋巴细胞浸润的相关性。方法 应用逆转录酶-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 42 例 LSCC 组织及 18 例癌旁正常鳞状上皮组织中 CRT 和 CD47 mRNA 的表达情况,用免疫组织化学 S-P 法对 68 例原发性 LSCC 及 20 例癌旁正常组织中 CRT 和 CD47 蛋白的表达、T 淋巴细胞浸润情况进行了检测。结果 在 LSCC 组织中,CRT 和 CD47 mRNA 和蛋白的表达水平均高于癌旁正常鳞状上皮组织($P<0.05$)。CRT 及 CD47 蛋白随着 LSCC 的肿瘤分期、淋巴结转移及临床分期的增加其表达水平增加($P<0.05$),CD47 与 CRT 蛋白的表达有一种较强的正相关性($r=0.89, P<0.05$),CRT 蛋白的表达还与 CD45RO⁺ T 淋巴细胞的高浸润相关($P<0.05$)。结论 CRT 和 CD47 在 LSCC 的发生、发展过程中起重要作用,CRT 的表达和 T 淋巴细胞的浸润相关,可能是喉鳞癌的一种新的抗肿瘤免疫机制。

关键词:钙网蛋白;CD47;喉肿瘤;T 淋巴细胞

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.18.010

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)18-2086-04

Correlation between expression of calreticulin and CD47 with infiltration of T lymphocytes in laryngeal squamous cell carcinoma

Xiong Huiqiang¹, Wang Heling¹, Luo Gui², Liu Hongbin², Liu Yuehui², Zhang Shaorong^{2△}

(1. Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Fengcheng People's Hospital, Fengcheng, Jiangxi, 331100, China; 2. Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006, China)

Abstract: Objective To investigate the expression, clinical significance and correlation with T lymphocytes infiltration of calreticulin(CRT) and CD47 in laryngeal squamous cell carcinoma(LSCC). **Methods** The expression of CRT and CD47 mRNA in 42 cases of LSCC and 18 cases of peri-cancer tissues was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR), the immunohisto-chemistry was performed to detect the protein level of CRT and CD47 and T lymphocytes infiltration in 68 cases of LSCC and 20 cases of peri-cancer tissues. **Results** The expression of CRT and CD47 was significantly higher in LSCC than in peri-cancer tissue both in mRNA and protein levels($P<0.05$). The expression of CRT and CD47 protein increased with the increase of T stage, clinical stage and lymph node metastasis of patients with LSCC($P<0.05$), CD47 protein was positively correlated with the expression of CRT($r=0.89, P<0.05$), and the expression of CRT protein also related with the high infiltration of CD45RO⁺ T lymphocytes($P<0.05$). **Conclusion** CRT and CD47 can play an important role in the tumorigenesis and development of LSCC, the expression of CRT is associated with infiltration of T lymphocytes, which may be a new anti-tumor immune mechanisms of LSCC.

Key words: calreticulin; CD47; laryngeal neoplasms; T lymphocytes

肿瘤细胞能否被机体的免疫系统攻击与细胞内的促吞噬和抗吞噬信号的平衡表达有关。斯坦福大学医学院的研究人员发现多种恶性肿瘤细胞表面携带了促吞噬作用的钙网蛋白(calreticulin, CRT),其可发送信号招募巨噬细胞吞噬并消化这些肿瘤细胞,引起机体的抗肿瘤免疫反应。研究人员还证实肿瘤细胞表面的这个“来吃我”信号可被另一条独立的“别吃我”CD47 信号抵消。这一发现为某些恶性肿瘤的治疗带来了新希望^[1]。CRT 和 CD47 的表达已经在多种人类恶性肿瘤组织中被发现。尽管如此,CRT 和 CD47 表达的临床意义仍然不明确,存有争议。因此,本文通过 RT-PCR 和免疫组织化学法检测促吞噬和抗吞噬信号作用的 CRT 和 CD47 在喉鳞癌组织中的表达水平,研究二者在喉鳞状上皮细胞癌(laryngeal squamous cell carcinoma, LSCC)发生、发展中的作用,评估 CRT、CD47 的表达是否和 LSCC 的免疫发生有关。

1 资料与方法

1.1 一般资料 42 例喉癌患者癌组织标本及 18 例癌旁正常

组织标本(安全界外 1 cm)均收集于 2010 年 1 月至 2011 年 5 月南昌大学第二附属医院耳鼻咽喉头颈外科手术患者,所有标本及时装入含有 RNastore 酶的冻存管中,−80℃冰箱冻存,用于 RT-PCR 检测。同时选取病理科 2008 年 1 月至 2011 年 5 月原发性 LSCC 病理存档蜡块 68 例,其中,男 62 例,女 6 例,年龄 47~79 岁,平均 61.5 岁,包括高分化 LSCC 28 例,中低分化 LSCC 40 例;随机选取同期 20 例癌旁正常组织作为对照组。上述所取所有癌组织标本术后均经病理检查证实为喉鳞状上皮细胞癌。所有患者术前均未做放、化疗。

1.2 总 RNA 的提取及 RT-PCR 总 RNA 的提取参照 TRNzol 试剂说明书进行操作,将所得的 RNA 沉淀、洗涤、晾干,溶于 RNase-free ddH₂O 中。测定吸光度值,电泳判定 RNA 的完整性,取 A260/A280 比值为 1.8~2.0 的 RNA 逆转录成 cDNA, cDNA 的合成参照 TaKaRa 逆转录试剂说明书操作,将所得的 cDNA 产物保存于−20℃冰箱中,用于 PCR。引物由上海捷瑞生物工程有限公司设计并合成, CRT 引物序列,

作者简介:熊辉强(1984~),医师,主要从事头颈肿瘤的诊治与治疗。

△ 通讯作者, Tel: (0791) 86295805; E-mail: zhang_shaorong@sina.

sense:5'-ACA ACT TCC TCA TCA CCA AC -3';antisense:5'-TCA TCC TCC TCA TCC TCA TC-3',产物长度为 211 bp。CD47 引物序列,sense:5'-CCT TCG TCA TTG CCA TA TTG-3';antisense:5'-TAG GAG GTT GTA TAG TCT TCT G-3',产物长度为 201 bp。人 β -actin 作为内参照,其序列为:sense:5'-TGG AAG GTG GAC AGC GAG G-3';antisense:5'-CGG GAA ATC GTG CGT GAC-3',产物长度为 434 bp。PCR 反应体系为 50 μ L,包括:Premix Taq 25 μ L,cDNA 2 μ L、上下游引物各 1 μ L,加灭菌蒸馏水至 50 μ L。PCR 反应条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,然后进行 30 个循环的扩增(94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,引物退火温度 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min/kbp),最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。将所得 PCR 扩增产物凝胶电泳,对电泳结果进行扫描拍照。

1.3 免疫组织化学 采用链霉素抗生物素蛋白-过氧化酶法(SP)检测 LSCC 组织中 CRT、CD47 蛋白及淋巴细胞的表达水平,CRT 及 CD47 单克隆抗体为 SANTA CRUZ 产品,CD3、CD45RO 单克隆抗体及 SP 染色试剂盒购于北京中杉金桥生物公司,抗体工作浓度为 1:100。组织切片脱蜡至水后抗原修复、室温孵育,加一抗 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h,具体操作参照其说明书严格进行,经 DAB 显色,苏木精对比染色后,中性树胶封片。免疫组织化学阳性结果判断:在每张切片上随机选取 10 个($\times 400$)高倍视野相同范围下计数,并根据阳性细胞数及染色强度区分阳性等级。(1)阳性细胞数少于 1%的为 0 分,阳性细胞小于 10%为 1 分,11%~50%为 2 分,大于 51%为 3 分;(2)染色强度:阴性为 0 分,弱阳性 1 分,中等阳性 2 分,强阳性 3 分。抗体得分为(1)+(2)。得分为 3~6 分者为阳性,小于 3 分者为阴性^[3]。癌组织中淋巴细胞浸润的计数按照 Hussein's 方法^[2],选取癌组织间质和实质中淋巴细胞高浸润的 10 个高倍视野区作为计数区域,避免选取肿瘤坏死区域,由 2 名观察者同时计数淋巴细胞,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。癌组织间质中 CD3⁺ 细胞大于 16 个/HP 为高浸润,小于或等于 16 个/HP 为低浸润;CD45RO⁺ 细胞大于 24 个/HP 为高浸润,小于或等于 24 个/HP 为低浸润。癌组织实质中 CD3⁺ 细胞大于 8 个/HP 为高浸润,小于或等于 8 个/HP 为低浸润;CD45RO⁺ 细胞大于

14 个/HP 为高浸润,小于或等于 14 个/HP 为低浸润。
1.4 统计学处理 应用 SPSS16.0 统计软件进行统计学处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样本均数比较采用近似 t 检验,计数资料采用 χ^2 检验或 Fisher 精确检验、线性相关分析,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 RT-PCR 检测结果 PCR 产物电泳结果见图 1。在本实验中,通过对 42 例 LSCC 新鲜标本进行 RT-PCR 检测,发现 22 例可见 CRT mRNA 的强表达,3 例为弱表达,其余未见 CRT mRNA 的表达,CRT mRNA 在 LSCC 中的阳性表达率为 59.5%;18 例癌旁正常组织中 CRT mRNA 仅 2 例为弱表达,阳性表达率为 11.1%,CRT mRNA 在 LSCC 组织及癌旁正常组织中的相对表达量分别为(0.608 1 $\pm$ 0.357 6)和(0.248 6 $\pm$ 0.156 9)。在 42 例 LSCC 中,CD47 mRNA 的阳性表达率为 54.8%(23/42),在 18 例癌旁正常组织中 CD47 mRNA 低表达 4 例,阳性率为 22.2%(4/18),CD47 mRNA 在 LSCC 组织及癌旁正常组织中的相对表达量分别为(0.563 7 $\pm$ 0.350 1)和(0.260 7 $\pm$ 0.172 9),CRT mRNA、CD47 mRNA 在 LSCC 组织中的表达明显高于癌旁正常组织($P<0.05$)。

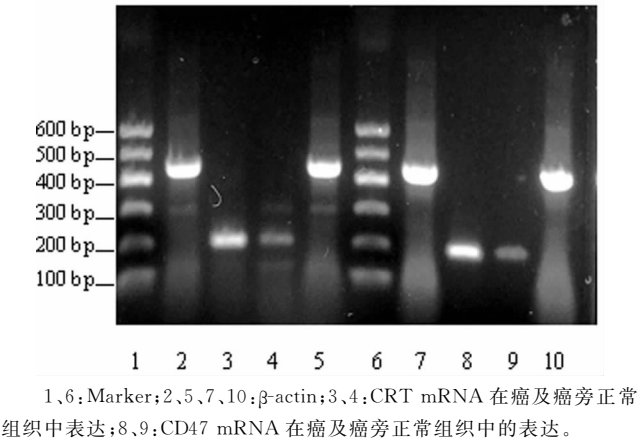


图 1 PCR 产物电泳结果

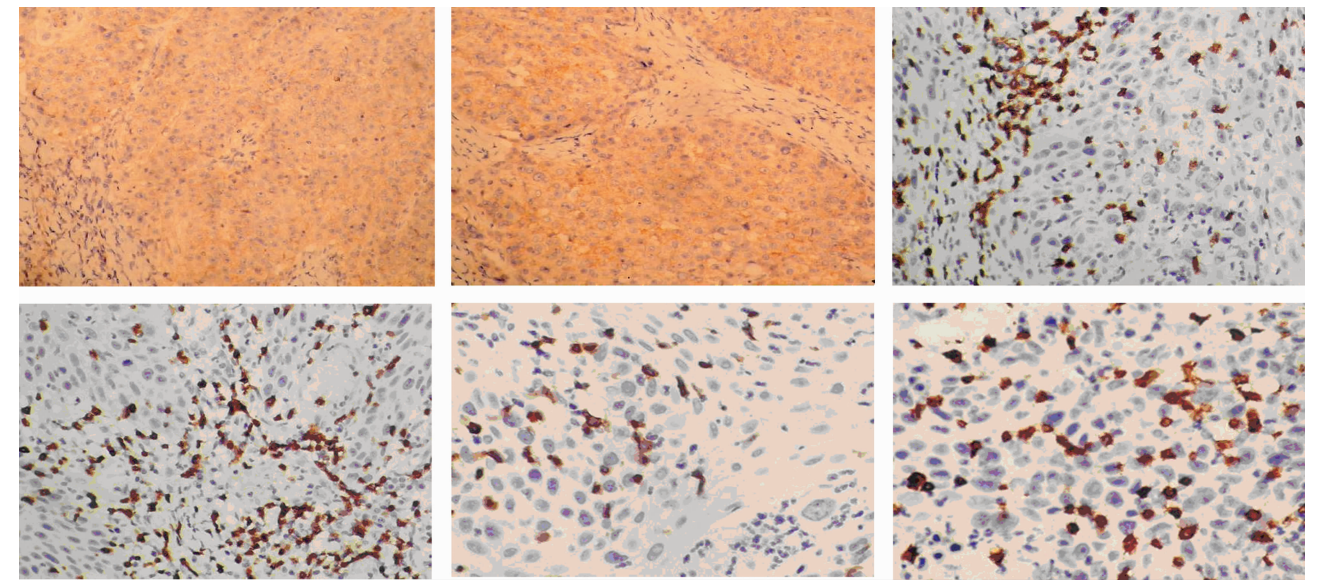


图 2 CRT 蛋白表达(SP, $\times 200$);图 3 CD47 蛋白的表达(SP, $\times 200$);图 4 间质中 CD3⁺T 淋巴细胞表达(SP, $\times 200$);图 5 间质中 CD45RO⁺T 淋巴细胞(SP, $\times 200$);图 6 实质中 CD3⁺T 淋巴细胞表达(SP, $\times 400$);图 7 实质中 CD45RO⁺T 淋巴细胞(SP, $\times 400$)

2.2 免疫组织化学检测结果 CRT 蛋白主要表达于胞浆、胞膜中,细胞核及细胞外基质中未见表达,镜下阳性细胞呈棕黄色(图 2)。在 68 例 LSCC 组织中,33 例可见不同程度的阳性表达,其余 35 例未见表达。20 例癌旁正常鳞状上皮组织中 CRT 蛋白仅 1 例呈弱阳性表达。CRT 蛋白在 LSCC 组织中的表达水平明显高于癌旁正常鳞状上皮组织($P<0.05$)。本实验研究了 CRT 与患者性别、吸烟、肿瘤 T 分期、淋巴结转移、临床分期、组织分化程度、CD3⁺T 细胞及 CD45RO⁺T 细胞浸润 8 项临床病理参数的关系,结果显示 CRT 随着肿瘤分期、淋巴结转移及临床分期的增加,CRT 蛋白的表达亦增加($P<0.05$),CRT 阳性的表达和癌组织间质和实质中高浸润的 CD45RO⁺细胞呈正相关,而与癌组织间质和实质中 CD3⁺细胞浸润及患者的其他临床病理参数(患者性别、吸烟、组织分化

程度)无相关性(表 1)。CD47 蛋白的表达主要位于细胞膜表面,细胞质中亦见部分表达,细胞核中未见到表达(见图 3)。CD47 蛋白在 LSCC 中的表达率为 42.6%(29/68),在癌旁正常鳞状上皮组织中的表达率为 15%(3/20),CD47 蛋白在 LSCC 中的表达明显高于癌旁正常鳞状上皮组织($P<0.05$)。通过与 LSCC 临床病理参数的分析发现,CD47 蛋白的表达与 LSCC 的肿瘤分期、淋巴结转移、临床分期及癌组织实质中 CD45RO⁺T 细胞的浸润密切相关($P<0.05$),而与患者性别、吸烟、组织分化程度、CD3⁺T 细胞及癌组织间质中 CD45RO⁺T 细胞的浸润均无相关性(表 1)。CD47 蛋白的表达随着 CRT 蛋白的表达增加而增加,其与 CRT 蛋白的表达呈正相关(Pearson 相关系数 $r=0.89$ $P<0.05$)。

表 1 CRT、CD47 蛋白与 LSCC 临床病理参数及淋巴细胞的关系

临床病理参数	n	CRT		χ^2	P	CD47		χ^2	P
		—	+			—	+		
组别				12.351	0.000			5.105	0.024
正常组	20	19	1			17	3		
LSCC 组	68	35	33			39	29		
性别				0.000	1.000			0.003	0.959
男	62	32	30			35	27		
女	6	3	3			4	2		
年龄(岁)				2.199	0.138			0.767	0.381
≤60	31	19	12			16	15		
>60	37	16	21			23	14		
吸烟				0.471	0.492			3.595	0.058
否	22	10	12			9	13		
是	46	25	21			30	16		
肿瘤 T 分期				7.008	0.008			6.212	0.013
早期(T1,T2)	23	17	6			18	5		
进展期(T3,T4)	45	18	27			21	24		
淋巴结转移				17.697	0.000			14.205	0.000
无	49	33	16			35	14		
有	19	2	17			4	15		
临床分期				11.390	0.001			10.236	0.001
Ⅰ+Ⅱ	24	19	5			20	4		
Ⅲ+Ⅳ	44	16	28			19	25		
分化程度				1.414	0.234			2.322	0.128
高分化	28	12	16			13	15		
中低分化	40	23	17			26	14		
每高倍视野(肿瘤间质)CD3 ⁺ T 细胞浸润				0.180	0.671			2.610	0.106
≤16	21	10	11			9	12		
>16	47	25	22			30	17		
CD45RO ⁺ T 细胞浸润				6.783	0.009			2.600	0.107
≤24	18	14	4			12	6		
>24	50	21	29			27	23		
每高倍视野(肿瘤实质)CD3 ⁺ T 细胞浸润				2.274	0.132			2.788	0.095
≤8	39	17	22			19	20		
>8	29	18	11			20	9		
CD45RO ⁺ T 细胞浸润				6.671	0.010			5.620	0.018
≤14	25	18	7			19	6		
>14	43	17	26			20	23		

3 讨 论

3.1 CRT mRNA 和蛋白表达 CRT 是一种相对分子质量为 46×10^3 Ca^{2+} 结合蛋白,由人 19 号染色体上单一基因编码,包含 9 个外显子及 3 个不同的结构域(N、P 和 C),具有高度的进化保守性^[3]。CRT 具有多种功能,参与伴侣分子活性及细胞内 Ca^{2+} 环境平衡的调节,细胞间黏附信号的调控,内质网中折叠和低聚反应过程中粘蛋白的合成,以及抑制血管生成和肿瘤细胞生长^[4]。Panaretakis 等^[5]研究表明,细胞表面的 CRT 暴露,能提供一种“来吃我”信号,招募树突状细胞(DCs)和巨噬细胞,导致免疫反应。CRT 的表达已经在多种肿瘤中被发现,例如黑色素瘤、肝癌、肺癌、乳腺癌、胰腺癌及前列腺癌^[6],CRT 被证实参与了多种肿瘤的发生和发展。

在本研究中,CRT mRNA 和蛋白在 LSCC 中的表达均明显高于它的邻近正常上皮组织($P < 0.05$),提示 CRT 可能与抑制 LSCC 癌变的发生有关,CRT 的抑癌活性与 CRT 对肿瘤细胞免疫原性的产生有关。研究发现,肿瘤细胞死亡的免疫原性依靠细胞膜表面的 CRT 的暴露,CRT 暴露后能被吞噬细胞或者其他抗原提呈细胞识别(APCs)而被吞噬,在 APCs 期间,肿瘤相关抗原(TAA)或者肿瘤特异性抗原(TSA)同时被处理,并呈递给相应的 T 淋巴细胞,最后引起特异性抗肿瘤免疫反应,抑制肿瘤的发生^[7]。本研究通过对癌组织间质和实质中淋巴细胞的检测发现,CRT 的表达伴随 CD45RO⁺ T 细胞的高浸润,二者呈正相关($P < 0.05$),与 CD3⁺ T 细胞无相关性($P > 0.05$),表明免疫反应中产生的 CD45RO⁺ T 细胞可能参与了肿瘤的发生过程。Peng 等^[8]在研究 CRT 在Ⅲ_B 期结肠癌中的表达亦发现,CRT 阳性的表达和高浸润的 CD45RO⁺ 细胞有关,认为发生在结肠癌中的 CRT 表达和免疫反应有关。在免疫反应中产生的效应细胞(例如 CD3⁺ T 细胞、CD45RO⁺ T 细胞和巨噬细胞)浸润癌组织时,能抑制癌组织的发生、发展^[9]。

本研究通过检测不同肿瘤分期、临床分期及淋巴结转移组的 CRT 表达发现,CRT 随着肿瘤、临床分期及淋巴结转移的增加,CRT 的表达率逐渐升高,提示 CRT 在 LSCC 的发展、侵袭转移中起重要作用。Alur 等^[10]研究表明,CRT 在前列腺癌中的过度表达能抑制前列腺癌细胞的生长和转移,它的抑制功能发挥需要富含脯氨酸 P-区域,该区域包括 2 个序列重复结构,能形成一种扩展的支臂结构使其能结合到其他的伴侣分子,例如 ERp57,或者通过影响细胞内 Ca^{2+} 的储藏来发挥抑制肿瘤细胞生长的作用,从而抑制前列腺癌的发展。还有报道表明 CRT 能通过增加细胞与细胞间、细胞与基质间黏附发挥抑制浸润和转移作用。Vougas 等^[11]认为 CRT 在低分化的结肠癌中的表达高于高分化结肠癌,尽管如此,在本研究中 CRT 的表达和不同病理分化程度无关($P > 0.05$)。

3.2 CD47 mRNA 和蛋白表达 CD47,又称整联蛋白(integrin-associated protein,IAP),是一种广泛表达于细胞膜表面的免疫球蛋白样蛋白质,由特定的整联蛋白、G 蛋白及胆固醇组成的超分子复合物^[12]。CD47 的配体为信号调节蛋白 α 链(signal regulatory protein α chain, SIRP α),CD47 和 SIRP α 组成细胞间通讯系统(CD47- SIRP α 系统),其在多种细胞进程中发挥重要作用,包括细胞迁移、B 细胞的黏附和 T 细胞凋亡的活化,此外,CD47-SIRP α 系统也与巨噬细胞的吞噬作用的负调节有关,CD47 通过与 SIRP α 结合产生抑制抗性信号,下调巨噬细胞的吞噬作用,进而对固有免疫系统产生抑制作用^[13]。在治疗上,抗 CD47 单克隆抗体能结合 CD47-SIRP α 复合体从而促进肿瘤细胞被巨噬细胞吞噬。

Chao 等通过检测不同肿瘤细胞和正常细胞中的 CRT 和 CD47 的表达发现,CRT 阳性的细胞同时伴有高水平的 CD47 表达,CRT 和 CD47 的表达有一种较强的正相关性。本研究通过检测 LSCC 和癌旁正常上皮组织中的 CD47 表达发现,CD47 mRNA 和蛋白在 LSCC 组织中的表达要高于癌旁正常上皮组织,同时 CD47 蛋白的表达随着肿瘤、临床分期及淋巴结转移的增加,CD47 的表达率逐渐升高。线性相关分析表明 CD47 的表达和 CRT 呈正相关(Pearson 相关系数 $r = 0.89$ $P < 0.05$),提示 CD47 亦参与 LSCC 的发生、发展过程。CD47 主要表现在能促使 LSCC 癌变的发生和发展。其机制可能与高水平或者上调表达的 CD47 能抵抗 CRT 的促吞噬及免疫激活功能,从而允许虽有 CRT 表达的细胞不被吞噬并获得额外的突变,最后转化成恶性细胞。Majeti 等^[14]在小鼠体内的实验显示,人类白血病干细胞(LSC)通过上调 CD47 表达,利用人 CD47-鼠 SIRP α 机制来逃避巨噬细胞对 LSC 的吞噬作用,使其逃避了机体的固有免疫系统的杀伤作用,促使肿瘤的发生和发展。程千松等^[15]研究表明 CD47 对 T 细胞凋亡过程有活化作用,能为 T 细胞凋亡的激活提供共刺激信号,增强 T 细胞受体(T cell receptor,TCR)信号转导的效率。而在本研究中,通过评估 CD47 的表达和癌组织间质与实质中 T 淋巴细胞浸润的关系,发现 CD47 阳性细胞的表达和癌组织实质中 CD45RO⁺ T 细胞的高浸润正相关($P < 0.05$),而与癌组织间质中 CD45RO⁺ T 细胞及 CD3⁺ T 细胞的浸润无明显相关性($P > 0.05$)。

参考文献:

- [1] Chao MP, Jaiswal S, Weissman-Tsukamoto R, et al. Calreticulin is the dominant pro-phagocytic signal on multiple human cancers and is counterbalanced by CD47[J]. Sci Transl Med, 2010, 2(1): 1-9.
- [2] Hussein MR, Hassan HI. Analysis of the mononuclear inflammatory cell infiltrate in the normal breast, benign proliferative breast disease, in situ and infiltrating ductal breast carcinomas: preliminary observations[J]. J Clin Pathol, 2006, 59(8): 972-977.
- [3] Ni M, Lee AS. ER chaperones in mammalian development and human diseases[J]. FEBS Lett, 2007, 581(26): 3641-3651.
- [4] Garg AD, Nowis D, Golab J, et al. Immunogenic cell death, DAMPs and anticancer therapeutics: an emerging amalgamation[J]. Biochim Biophys Acta, 2010, 18(1): 53-71.
- [5] Panaretakis T, Kepp O, Brockmeier U, et al. Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death[J]. EMBO J, 2009, 28(5): 578-590.
- [6] Seliger B, Stoehr R, Handke D, et al. Association of HLA class I antigen abnormalities with disease progression and early recurrence in prostate cancer[J]. Cancer Immunol Immunother, 2010, 59(4): 529-540.
- [7] Obeid M, Tesniere A, Panaretakis T, et al. Ecto-calreticulin in immunogenic chemotherapy[J]. Immunol Rev, 2007, 220(1): 22-34.
- [8] Peng RQ, Chen YB, Ding Y, et al. Expression of calreticulin is associated with infiltration of T-cells in stageⅢ B colon cancer[J]. World J Gastroenterol, 2010, 32(16): 2428-2434.

无统计学意义($P>0.05$),提示 CSHB 存在细胞免疫功能异常,肝功损害程度与细胞免疫功能异常的程度存在一定相关性。与辛绍杰等^[12]报道的结果一致,与肖光明等^[13]报道的对照组、CHB 组患者的结果有差异,其原因是否与 CHB 组病情轻重不一有关,需进一步观察。重型肝炎患者早期免疫活性 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞引起机体强烈的细胞免疫反应,通过释放多种淋巴因子诱导炎症反应而损伤肝细胞。机体在免疫应答清除体内病毒及免疫介导的肝细胞损伤过程中,消耗了大量的淋巴细胞,再生补充部分不足以抵消机体淋巴细胞消耗的数量,就会造成血中淋巴细胞计数降低,亦可能存在 T 细胞向肝脏聚集致外周血 T 细胞亚群减少,在一定程度上反映机体的免疫应答能力过强。

动态观察 T 淋巴细胞亚群的变化发现,CSHB 无好转组 CD3、CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞进一步下降、CD4⁺/CD8⁺ 比值上升,好转组 CD3、CD4⁺ T 细胞、CD4⁺/CD8⁺ 比值上升,CD8⁺ T 细胞下降,无好转组与好转组比较差异有统计学意义($P<0.01$);同期 ALT、TBil、PTA:无好转组损害进一步加重,CSHB 好转组好转,两组比较差异明显($P<0.01$)。与高海兵等^[14]、丁巧云等^[15]报道类似,但与辛绍杰等^[12]报道的结果有差异。提示 CSHB 持续的细胞免疫功能异常,导致大量肝细胞坏死,肝功损害加重。随着细胞免疫功能的恢复,肝功好转。

本研究表明,CSHB 患者存在细胞免疫功能异常,细胞免疫功能异常的程度与肝功损害程度有一定相关性,随着细胞免疫功能的恢复,肝功好转。临床上通过检测 CSHB 患者外周血 T 细胞亚群变化趋势对其诊断及预后的判断有一定的指导意义。

参考文献:

- [1] 王宇明,陈耀凯,顾长海,等.重型肝炎命名和诊断分型的再认识——附 477 例临床分析[J].中华肝脏病杂志,2000,8(2):261-263.
- [2] 邹正升,陈菊梅,辛绍杰,等.565 例重型病毒性肝炎的临床特点分析[J].中华肝脏病杂志,2001,9(2):247-248.
- [3] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会,肝病学分会.病毒性肝炎防治方案[J].中华传染病杂志,2001,19(1):56-62.
- [4] 中华医学会肝病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组.酒精性肝病诊疗指南[J].临床肝胆病杂志,2010,26(3):229-232.
- [5] Kaplovitz N. Drug induced liver disorders implication for drug development and regulation[J]. Drug Saf, 2001, 24(3):489-490.
- [6] 王燕,陆伦根.自身免疫性肝炎评分系统在临床诊断中的应用和评价[J].中华肝脏病杂志,2010,18(5):394-396.
- [7] Maini MK, Boni C, Lee CK, et al. The role of virus specific CD8(+) cells in liver damage and viral control during persistent hepatitis B virus infection[J]. J Exp Med, 2000,191(8):1269-1280.
- [8] 毛卫林,陈瑜.T 细胞亚群对乙型肝炎发病机制的作用[J].国际流行病学传染病学杂志,2007,34(2):128-130.
- [9] 李鸿宾,江晓萍.测定慢性乙型肝炎患者外周血 T 淋巴细胞亚群的临床意义[J].安徽医药,2006,10(8):588-589.
- [10] Ando K, Moriyama T, Guidotti LG, et al. Mechanisms of class I restricted immunopathology. A transgenic mouse model of fulminant hepatitis[J]. J Exp Med, 1993, 178(13):1541-1554.
- [11] 陈瑜,李兰娟.乙型肝炎病毒感染的特异性 CTL 细胞免疫应答研究进展[J].国外医学:流行病学传染病学分册,2004,31(1):27-30.
- [12] 辛绍杰,邹正升,李保森,等.慢性乙型重型肝炎患者外周血各亚群淋巴细胞绝对值的特点[J].第二军医大学学报,2006,27(4):413-416.
- [13] 肖光明,姚细安,连粤湘,等.乙型肝炎患者外周血 T 淋巴细胞亚群的变化[J].实用肝脏病杂志,2005,8(1):22-24.
- [14] 高海兵,许利军,潘晨,等.慢性乙型肝炎病毒感染者外周血 T 细胞亚群及 NK 细胞的特点及意义[J].中华实验和临床感染病杂志,2009,3(1):13-19.
- [15] 丁巧云,俞海英,孙薇薇,等.重型肝炎外周血 T 淋巴细胞亚群变化[J].江苏医药,2010,36(19):2336-2337.

(收稿日期:2013-01-08 修回日期:2013-03-06)

(上接第 2089 页)

- [9] Laghi L, Bianchi P, Miranda E, et al. CD3⁺ cells at the invasive margin of deeply invading (pT3-T4) colorectal cancer and risk of post-surgical metastasis: a longitudinal study[J]. Lancet Oncol, 2009, 10(7):877-884.
- [10] Alur M, Nguyen MM, Eggen SE, et al. Suppressive roles of calreticulin in prostate cancer growth and metastasis[J]. Amer J Pathol, 2009, 175(7):882-890.
- [11] Vougas K, Gaitanarou E, Marinos E, et al. Two-dimensional electrophoresis and immunohistochemical study of calreticulin in colorectal adenocarcinoma and mirror biopsies[J]. J BUON, 2008, 13(1):101-107.
- [12] Brown EJ, Frazier WA. Integrin-associated protein(CD47) and its ligands[J]. Trends Cell Biol, 2001, 11(2):130-135.
- [13] Barclay AN, Brown MH. The SIRP family of receptors and immune regulation[J]. Nat Rev Immunol, 2006, 6(4):457-464.
- [14] Majeti R, Chao MP, Alizadeh AA, et al. CD47 is an adverse prognostic factor and therapeutic antibody target on human acute myeloid leukemia stem cells[J]. Cell, 2009, 138(3):286-299.
- [15] 程千松,王兴兵. CD47 与白血病干细胞[J].中国实验血液学杂志,2010,18(4):1088-1091.

(收稿日期:2012-11-28 修回日期:2013-01-14)