

肝豆状核变性患者的免疫功能监测

许力¹, 杨任民², 洪铭范²

[摘要] 目的: 了解肝豆状核变性(hepatolenticular degeneration, HLD)患者的免疫状态特点。方法: 选取正常对照组 19 名及 HLD 患者 21 例, 放射比浊法和流式细胞术分别测定血清免疫球蛋白、补体水平及外周静脉全血 T 淋巴细胞亚群、CD3⁻CD16⁺CD56⁺、CD19⁺计数。结果: HLD 患者体液免疫指标中 CD19⁺、IgG、IgM 均较正常组升高, C₄ 较正常组减低($P < 0.05 \sim P < 0.01$); 细胞免疫指标 CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺、CD3⁻CD16⁺CD56⁺ 均较正常组减低, CD8⁺ 升高($P < 0.05 \sim P < 0.01$)。结论: HLD 患者的免疫状态紊乱表现为体液免疫处于亢进状态, 细胞免疫低下。

[关键词] 肝豆状核变性; 免疫, 体液; 免疫, 细胞; 流式细胞术

[中国图书资料分类法分类号] R 742.4 **[文献标识码]** A

Study of the immune function in patients with hepatolenticular degeneration

XU Li¹, YANG Ren-min², HONG Ming-fan²

(1. Department of Neurology, Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233004;

2. Affiliated Hospital of Institute of Neurology, Anhui College of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230061, China)

[Abstract] **Objective:** To study the immunological characteristics of patients with hepatolenticular degeneration (HLD). **Methods:** The levels of serum immunoglobulins, complement and T-lymphocyte subsets, the indexes of the humoral immunity and the proportion of CD19⁺ in 21 patients with HLD and 19 normal controls were measured with immune turbidimetry and flow cytometry. **Results:** The levels of IgG and IgM in group HLD were increased compared with the controls, except for C₄, which was depressed ($P < 0.05 \sim P < 0.01$), together with the ratio of CD4⁺/CD8⁺, the proportion of CD3⁻CD16⁺CD56⁺, CD4⁺ increased ($P < 0.05 \sim P < 0.01$). **Conclusions:** The study showed that there was disorder of the immunological state in patients with HLD, and suggests the manifestation of which is activation of the humoral immunity and depression of the cellular immunity.

[Key words] hepatolenticular degeneration; immunity, humoral; immunity, cellular; flow cytometry

[收稿日期] 2006-04-10

[作者单位] 1. 蚌埠医学院附属医院 神经内科, 安徽 蚌埠 233004;

2. 安徽中医学院神经病学研究所, 安徽 合肥 230061

[作者简介] 许力(1972-), 男, 硕士, 主治医师。

肝豆状核变性(hepatolenticular degeneration, HLD) 又称 Wilson's Disease(WD), 是一种以青少年为主的常染色体隐性遗传性铜代谢障碍性疾病, 在我国并不少见。大量铜离子在体内沉积造成以不同脏器为主的全身功能损害, 产生复杂多样的临床表

3.4 术毕拔管注意事项 腭裂修复后, 由于气道的改变, 鼻咽腔偏小变窄, 手术创伤致鼻咽腔黏膜水肿及腭裂患儿均有习惯性舌后缩致舌后坠、舌紧贴于腭部等原因而致鼻咽、口咽腔狭窄、阻塞, 拔管后常会出现不同程度的通气不畅, 切忌过早拔管。术毕脱氧后, SpO₂ > 95% 以上, 患儿反应、反射灵敏为拔管指征, 腭裂手术时间冗长, 术中口腔出血较多, 拔管时应彻底吸痰清理口腔积血, 以防误吸。

3.5 麻醉安全性与呼吸功能的关系 腭裂患儿手术麻醉的安全性与其本身的呼吸功能也有一定的关系。小儿除呼吸系统解剖生理特点与成人不同外, 文献还报道^[2-4] 小儿的功能残气量(functional residual capacity, FRC) 比成人低, 氧耗量比成人高。无通气期机体的氧供主要来自于 FRC, 小儿的分钟通气量与 FRC 之比为 5/1, 而成人的分钟通气量与 FRC 的比为 1.5/1。故小儿对缺氧的敏感性比成人

高。因此麻醉期间防止缺氧至至关重要。

综上所述, 腭裂手术麻醉安全时机的选择应为 2~3 岁较为安全。但麻醉的平稳、妥善的管理、呼吸道的通畅、分泌物的减少、充足的氧供以及缩短吸痰的时间等亦不容忽视。

[参考文献]

- [1] 赵秀琴, 陈焰, 刘可斌, 等. 婴儿腭裂修复术的麻醉处理[J]. 临床口腔医学杂志, 2003, 19(8): 489-490.
- [2] Keidan I, Fine GF, Kagawa T, et al. Work of breathing during spontaneous ventilation in anesthetized children[J]. *Anesth Analg*, 2000, 91(6): 1381-1388.
- [3] Rosenbaum A, Kirby C, Breen PH. Measurement of oxygen uptake and carbon dioxide elimination using the bymizer [J]. *Anesthesiology*, 2004, 100(6): 1427-1437.
- [4] 谢荣主编. 麻醉学[M]. 第3版. 北京: 科学出版社, 1994: 630.

现,主要为肝硬化和锥体外系症状,也可累及骨、血液系统、内分泌代谢系统等。为了解该病对免疫功能的影响,笔者对患者的血清补体、免疫球蛋白及外周血淋巴细胞亚群进行了测定,并与年龄构成相当的健康人对照,并就其机制进行了初步探讨。

1 资料与方法

1.1 一般资料 HLD 患者组 21 例,为 2004 年 10 月~2005 年 4 月安徽中医学院神经病学研究所住院患者,且均符合 HLD 诊断标准^[1],男 11 例,女 10 例;年龄 12~22 岁。均未进行过排铜治疗,未用过影响免疫功能的药物。正常对照组 19 名,男 13 名,女 6 名;年龄 16~25 岁。均为无血缘关系的健康志愿者,血铜、铜蓝蛋白及铜氧化酶活力等铜代谢检查均正常,排除病毒性肝炎等其他相关疾病。

1.2 主要试剂 (1)C₃、C₄ 测定试剂盒及 IgA、IgG、IgM 测定试剂盒:上海捷门生物技术合作公司。(2) Monoclonal Antibodies: CD4-FITC/CD8-PE/CD3-PE-CY5、CD3-FITC/CD16 + CD56-PE、CD19-FITC;及同型阴性对照 M3IgG-FITC/M3IgG-CY5 均购自 IMMUNOTECH FRANCE(A COULTER COMPANY),

苏州基因生物有限责任公司代理。

1.3 标本留取及检测方法 HLD 患者组及正常对照组均于早晨 7:30 分别采取空腹静脉全血:一部分低速冷冻离心后取血清分装在 2 个离心管中(每管约 0.5 ml),当日透射比浊法检测 C₃、C₄ 及 IgA、IgG、IgM;另外用肝素抗凝管取 2 ml 血行流式细胞仪分析法测淋巴细胞 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD19⁺、CD3⁻CD16⁺CD56⁺ 计数分析检查。

1.4 统计学方法 采用 *t*(或 *t'*) 检验。

2 结果

2.1 HLD 患者组和正常对照组细胞免疫各指标比较 HLD 患者组外周血中淋巴细胞 CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ 及 CD3⁻CD16⁺CD56⁺ 均低于正常对照组($P < 0.01$);而 CD8⁺ 高于正常对照组($P < 0.05$)(见表 1)。

2.2 HLD 患者组和正常对照组体液免疫指标比较 HLD 患者组 CD19⁺、IgG 及 IgM 均高于正常对照组($P < 0.05 \sim P < 0.01$),C₄ 则低于正常对照组($P < 0.01$)(见表 2)。

表 1 HLD 组、正常对照组各细胞免疫指标比较($\bar{x} \pm s$)

分组	<i>n</i>	CD3 ⁺ (%)	CD4 ⁺ (%)	CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺ (%)
正常对照组	19	66.13 ± 4.15	36.89 ± 3.52	22.43 ± 3.48	1.69 ± 0.35	17.26 ± 4.59
HLD 组	21	63.00 ± 8.01	31.53 ± 6.51	25.67 ± 5.68	1.29 ± 0.43	12.03 ± 5.65
<i>t'</i>	—	1.57	3.28	2.20	3.21 ^Δ	3.20 ^Δ
<i>P</i>	—	>0.05	<0.01	<0.05	<0.01	<0.01

Δ 示 *t* 值

表 2 HLD 组、正常对照组各体液免疫指标比较($\bar{x} \pm s$)

分组	<i>n</i>	CD19 ⁺ (%)	C ₃ (g/L)	C ₄ (g/L)	IgG(g/L)	IgA(g/L)	IgM(g/L)
正常对照组	19	5.53 ± 1.57	1.68 ± 0.27	0.39 ± 0.09	9.45 ± 1.86	1.69 ± 0.30	1.32 ± 0.28
HLD 组	21	11.70 ± 5.14	1.67 ± 0.41	0.27 ± 0.05	13.78 ± 5.64	1.99 ± 0.86	1.59 ± 0.41
<i>t'</i>	—	5.34	0.09 ^Δ	5.14	3.32	1.50	2.41 ^Δ
<i>P</i>	—	<0.01	>0.05	<0.01	<0.01	>0.05	<0.05

Δ 示 *t* 值

3 讨论

反映细胞免疫功能的各项指标中,外周血 T 淋巴细胞及其亚群分析是公认的反映机体细胞免疫状态的较好指标。作为异质性群体的 T 细胞,根据其表面标志白细胞分化抗原(cluster of differentiation, CD)不同可将 T 细胞分为 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 等亚群。正常情况下,T 淋巴细胞在淋巴器官及外周血的数目和亚群的比例相对恒定,机体得以维持正常的免疫状态。本实验 HLD 的 T 淋巴细胞中 CD4⁺

比例及 CD4⁺/CD8⁺ 比值均较正常对照组减小,CD8⁺(抑制性 T 淋巴细胞为主)比例较正常组升高。CD4⁺/CD8⁺ 比值是判断细胞免疫状态的一个敏感指标,正常人以免疫辅助-诱导亚群 CD4⁺ 细胞为主,为抑制性亚群 CD8⁺ 细胞的 2 倍左右,一般说 CD4⁺/CD8⁺ 比值上升提示细胞免疫呈正向免疫占优势,反之则负向免疫占优势。HLD 患者 CD4⁺/CD8⁺ 比值下降,而 CD3⁺ 比例无显著性变化,说明主要是 CD4⁺ 细胞减少和 CD8⁺ 细胞增多所致,并提示 HLD 机体的负向免疫占优势。

测定体内血清免疫球蛋白是检验机体体液免疫有效可靠的实验室指标。B 淋巴细胞是合成免疫球蛋白的唯一细胞, CD19 作为 B 细胞的特异性标志, 检测外周血 CD19⁺ 比例则可反应 B 细胞含量。本研究显示 HLD 外周血 CD19⁺ 比例和血清 IgG、IgM 含量显著升高, 提示外周血 B 细胞不仅在数量上增多, 还在功能上亢进。而补体系统在体内作为一种有效的效应机制, 广泛参与机体的抗微生物防御反应, 扩展着体液免疫的功能, 同时调节免疫应答的过程, 测定血清中 C₃、C₄ 含量也可间接反应体液免疫功能。HLD 补体 C₄ 浓度明显减低, 与患者体内明显升高的 IgG、IgM、抗原 - 抗体免疫复合之消耗增多有关, 即间接反应 HLD 体液免疫功能的亢进状态; 同时也可能与患者普遍存在的肝脏病变使得补体合成不足及血管渗透性增高、大出血和肾病综合征导致补体成分大量丧失有关。

自然杀伤细胞 (nature killer cell, NKC) 是不同于 T、B 淋巴细胞而具有直接杀伤靶细胞效应的一个特殊淋巴细胞系, 是机体免疫监视的主要成分, 主要具有细胞免疫和免疫调节作用。人体 NKC 表面相对特有的标志为 CD16 和 CD56, 检测外周血 CD3⁻CD16⁺CD56⁺ 比例可基本反应含 NKC 的数量、比例。本研究采取流式细胞术分析外周血 CD3⁻CD16⁺CD56⁺ 三种抗原的组合来分析 NKC 计数, 特异性强, 结果显示 HLD 外周血 NKC 比例较正常对照组明显减低。因 NKC 作为重要的免疫调节细胞, 其通过释放细胞因子抑制 B 细胞的分化和增殖, 同时对 T 细胞介导的细胞免疫起调节作用; 而 HLD 患者体液免疫功能的亢进及 T 细胞介导的细胞免疫功能减弱可能与其 NKC 功能低下的调节障碍有一定关系。综上所述, HLD 免疫状态紊乱, 表现为细胞免疫低下, 体液免疫亢进。谢文光等^[2] 在单纯的体液免疫的研究中发现部分体液免疫指标异常, 本实验与之结果相符, 然其就此推论 HLD 可能不仅仅是铜代谢障碍性疾病, 究竟 HLD 免疫状态紊乱原因何在?

作为常染色体隐性遗传的肝豆状核变性, 其 WD 基因外显子的突变而致铜代谢障碍是其一切临床表现的根本原因, 临床表现之一的免疫系统紊乱的根本原因也不例外。(1) 肝脏是体内铜中毒的原发靶器官和铜主要沉积的部位; 过量铜在肝细胞内沉积, 从而导致肝细胞的变性坏死; 在尸检或肝活检时, 肝硬化几乎见于所有 HLD 患者^[1], 甚至年龄小到 2 岁的无症状患儿其肝影像学也有肝硬化表现^[3]。肝脏的损害可通过对体内抗原肝处理能力减弱、细胞因子紊乱^[4]、肠源性内毒素血症^[5]、门脉

高血压症^[6]以及物质代谢、生物转化功能障碍等多方面因素对免疫系统有着广泛影响, 使得 T 淋巴细胞减少或功能下降和 NKC 计数及活性降低, 体液免疫亢进等。(2) HLD 患者体内广泛铜沉积及血铜蓝蛋白浓度的降低不仅导致神经 - 内分泌细胞结构功能损害, 还影响了单胺递质代谢酶功能, 使得 HLD 临床上神经系统表现为锥体外系、锥体系症状外, 尚有癫痫发作、明显的精神症状和自主神经症状等其他表现; 在内分泌系统^[7-10] 则有生长激素, 卵泡刺激素, 孕酮、黄体生成素、雌二醇显著降低、睾酮总量升高, 甲状腺功能低下、甲状旁腺素升高及肾上腺皮质功能明显异常等紊乱, 也正是这些神经 - 内分泌系统结构和功能的广泛异常通过神经 - 内分泌 - 免疫调节网络使得免疫功能进一步紊乱。(3) HLD 患者铜代谢障碍引起体内多种微量元素代谢异常, 如血细胞锌减低、血锌/铜比降低、血清硒水平下降等金属元素的代谢异常, 然而这些金属元素与免疫功能又有着密切的关系。(4) HLD 肾脏等其他脏器损害及贫血 - 输血、营养物质及维生素的缺乏等均对免疫有着明确的影响。也就是说, HLD 患者存在着多种复杂的影响免疫功能的机制。诚然, 部分机制尚属推测, 有待于进一步相关实验来证实, 如对 HLD 综合驱铜会使上述影响免疫功能的诸多因素得以矫正, 如能证实免疫功能同时也得以矫正, 则反过来说明上述有关机制推论的正确性。

[参 考 文 献]

- [1] 杨任民主编. 肝豆状核变性 [M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1995: 16 - 156.
- [2] 谢文光, 魏钰书, 周良玉. 儿童肝豆状核变性的体液免疫和急性期反应蛋白变化 [J]. 四川医学, 2000, 21(2): 108 - 109.
- [3] Ko S, Lee T, Ng S, et al. Unusual liver MR findings of Wilson's disease in an asymptomatic 2-year-old girl [J]. *Abdominal Imaging*, 1998, 23(1): 56 - 59.
- [4] Zhang LH, Pan JP, Yao HP, et al. Intrasplenic transplantation of IL-18 gene-modified hepatocytes [J]. *Gene Ther*, 2001, 8(17): 1333 - 1342.
- [5] 赵龙凤, 韩德五. 肝病患者内毒素血症的临床意义 [J]. 世界华人消化杂志, 1999, 7(5): 391 - 393.
- [6] Bahr MJ, Manns MP. Function of the immune system in liver cirrhosis [J]. *Gastroenterol*, 2001, 39(8): 601 - 607.
- [7] 赵连旭, 杨任民. 男性肝豆状核变性下丘脑 - 垂体 - 睾丸轴功能研究 [J]. 中华神经科杂志, 1998, 31(1): 24 - 27.
- [8] 赵连旭, 杨任民, 胡纪原. 女性肝豆状核变性下丘脑 - 垂体 - 卵巢轴功能研究 [J]. 中华神经科杂志, 2000, 33(6): 349 - 351.
- [9] 王灵芝. 肝豆状核变性伴肾损害时甲状腺功能改变的临床观察 [J]. 中国误诊学杂志, 2003, 3(2): 221 - 222.
- [10] 杨广娥, 洪铭范, 杨斌, 等. 肝豆状核变性患者异常骨代谢机制研究 [J]. 中华神经精神疾病杂志, 2003, 29(3): 201 - 203.