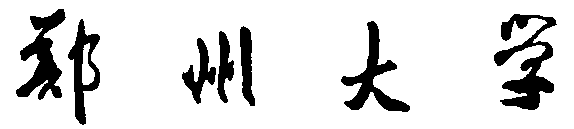
学 校 代 码 10459 学号或申请号 20095620501 密 级 公 开



专业硕士学位论文

# 肝脏**NK**细胞对梗阻性黄疸小鼠模型急性肝损伤及肝纤维化的影响

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 作 | 者 | 姓 | 名：陈 琳 |
| 导 | 师 | 姓 | 名：张宏伟 教授 |
| 学 | 科 | 门 | 类：临床医学 |
| 专 | 业 | 名 | 称：肝胆胰腺外科学 |
| 培 | 养 | 院 | 系：郑州大学人民医院 |
| 完 | 成 | 时 | 间：2016 年 3 月 |

A thesis submitted to ZhengZhou University for the degree of Master

Effect of liver NK cells on acute liver injury and liver fibrosis in mice with obstructive jaundice

By Lin Chen Supervisor: Prof. Hongwei Zhang

Medicine

The People's Hospital of Zhengzhou University March 2016

**原创性声明**

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的科研成果。对本文的研究作出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本声明的法律责任由本人承担。

学位论文作者：日期：年 月 日

**学位论文使用授权声明**

本人在导师指导下完成的论文及相关的职务作品，知识产权归属郑州大学。根据郑州大学有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留或向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅；本人授权郑州大学可以将本学位论文的全部或部分编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或者其他复制手段保存论文和汇编本学位论文。本人离校后发表、使用学位论文或与该学位论文直接相关的学术论文或成果时，第一署名单位仍然为郑州大学。保密论文在解密后应遵守此规定。

学位论文作者：日期：年 月 日

**肝脏NK细胞对梗阻性黄疸小鼠模型急性肝损伤及肝纤维化的影响**

研究生陈 琳

导师 张宏伟教授郑州大学人民医院 肝胆胰腺外科

河南郑州 450003

摘 要

前 言

梗阻性黄疸（obstructive jaundice, OJ）是临床上常见病理状态，主要导致肝脏损伤，随着梗阻时间延长，肝脏最终发展为胆汁淤积性肝硬化。目前对梗阻性黄疸急性肝损伤及肝纤维化治疗措施有限，因此研究其肝损伤的发病机制对治疗有重要意义。

自然杀伤（natural killer, NK）细胞在肝脏中含量丰富，是肝脏免疫的第一道防线。相比外周血液中的NK细胞，肝脏NK细胞除了固有免疫功能外还有特殊的功能，很多研究发现肝脏NK细胞在多种肝脏疾病中功能失调并参与肝脏疾病肝损伤。研究证实活化的NK细胞可通过直接杀伤肝星状细胞（hepatic stellate cell, HSC）及通过产生细胞因子IFN-γ抑制肝纤维化。目前关于肝脏NK细胞在梗阻性黄疸肝损伤及肝纤维化中的作用研究较少。

**目的**

本实验拟通过构建梗阻性黄疸小鼠模型，研究肝脏NK细胞对梗阻性黄疸小鼠模型急性肝损伤及肝纤维化的影响，并初步探讨其相关机制。

I

**方法**

小鼠随机分为4组，每组40只，A组：手术+Poly I: C组、B组：手术+PBS组、C组：假手术+Poly I: C组、D组：假手术+PBS组。手术组行胆总管双重结扎术（bile duct ligation, BDL）构建梗阻性黄疸模型，假手术组仅游离胆总管。

A、C组腹腔注射聚肌胞（Poly I: C）诱导NK细胞肝内活化及聚集，B、D组注射等量磷酸盐缓冲液（PBS）作为对照。于第7天及第14天两个时相取各组小鼠血液及肝脏标本，比较各组小鼠血清肝功能各指标、肝组织HE染色、Masson三染色、NF-κB免疫染色、α-SMA免疫染色及实时荧光定量聚合链反应检测肝脏NK细胞表面特异性标志NK1.1、肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体（TRAIL）、NF-κB、α-SMA及肿瘤坏死因子（TNF）-αmRNA表达量变化，观察梗阻性黄疸模型病理生理过程，对比各组急性肝损伤及肝纤维化的程度，探究肝脏NK细胞及与急性肝损伤及肝纤维化的关系。

**结果**

胆总管结扎术成功构建了小鼠梗阻性黄疸模型，术后第7天以急性肝损伤为主要表现，血清肝功能指标升高，肝质比升高，肝脏呈淤胆表现，肝脏出现大量片状坏死，Kuffer细胞活化产生大量TNF-α，NF-κB活化增多，NK1.1、TRAIL

mRNA表达增多。第14天模型组小鼠肝脏肝损伤加重，并出现明显的肝硬化表现，同时，第14天肝脏NK1.1阳性细胞及TRAIL表达较第7天增多，与肝损伤呈正相关，推断NK细胞出现免疫紊乱，NK细胞可能参与梗阻性黄疸肝损伤。与PBS对照组比较，Poly I: C干预组肝脏NK细胞数量增多，表明Poly I: C成功诱导NK细胞肝内聚集；手术组A组和B组比较，第7天肝功能指标谷丙转氨酶（ALT）、谷草转氨酶（AST）A组较B组升高，HE染色肝细胞坏死面积A组较B组增大，NF-κB及TNF-α表达增高，TRAIL表达增高，差异均有统计学意义（P＜0.05）；第14血清肝功能AST、ALT及TNF-α表达A组较B组高，

HE染色、Masson染色结果表明A组较B组肝纤维化程度重，肝脏α-SMA表达

A组较B组增多，差异有统计学意义（P＜0.05）。假手术组C组和D组比较，第7天及第14天血清肝功能指标、HE染色、Masson三染色及NF-κB、TNF-α、

II

α-SMA、TRAIL的表达均无统计学差异（P＞0.05）。

结 论

1、小鼠模型中，肝脏NK细胞含量增多，并与肝损伤严重程度相关，提示梗阻性黄疸伴随着肝脏NK细胞细胞免疫功能紊乱。

2、Poly I: C诱导肝脏NK细胞活化与聚集，加重梗阻性黄疸急性肝损伤，肝脏

NK细胞可能通过TRAIL途径参与梗阻性黄疸急性肝损伤。

3、Poly I: C诱导的肝脏NK细胞活化与聚集，加重了梗阻性黄疸肝纤维化，提示梗阻性黄疸减弱了肝脏NK细胞的抗肝纤维化作用，推测其机制可能与HSC活化增多及梗阻性黄疸抑制了肝脏NK细胞对活化的HSC的杀伤作用有关。

**关键词：**自然杀伤细胞； 梗阻性黄疸； 胆汁淤积性； 急性肝损伤； 肝硬化； NF-κB 肝星状细胞； 肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体

III

**Effect of liver NK cells on acute liver injury and liver fibrosis in mice with obstructive jaundice**

By Lin Chen Supervisor: Prof. Hongwei Zhang

Medicine

The People's Hospital of Zhengzhou University March 2016

**Abstract**

**Introduction**

Obstructive jaundice (OJ) is a common clinical pathologic condition, which mainly causes liver damage. With prolonging of the obstruction time, the liver eventually developed into biliary cirrhosis. At present, the treatment of acute liver injury and liver fibrosis in patients with OJ is limited. Therefore, it is important to study the pathogenesis of the liver injury induced by OJ.

Natural killer (NK) cells are enriched in lymphocytes within the liver and play a critical role in the early stages of immune response against tumour cells, as well as those infected by viral and microbial pathogens. Compared with the NK cells in peripheral blood, liver NK cells have special functions besides innate immune function. Accumulating evidences from the last decade suggested that liver NK cells dysfunction in a variety of liver diseases and participate in the liver damage. The anti-fibrotic function of NK cells via killing activated HSCs and producing cytokine IFN-γ were demonstrated in several studies. There are few studies on the role of NK cells in liver injury and liver fibrosis in OJ.

**Objectives**

To investigate the effect of liver NK cells on acute liver injury and liver fibrosis;

IV

And preliminarily discuss the related mechanism in mice with OJ.

**Methods**

Mice were randomly divided into 4 groups with 40 mice in each group: group A, Operation + Poly I: C group; group B, Operation + PBS group; group C, sham-operation + Poly I: C group; group D, sham-operation + PBS group. Operation groups underwent common bile duct ligation (BDL) to establish obstructive jaundice models and sham-operation groups only underwent dissociation of common bile duct. The pathophysiologic processes of liver were observed. Injection of polyinosinic-polycytidylic acid (Poly I: C) was used to activate and induce the accumulation of NK cells in mouse liver. All the mice were sacrificed at day 7 and 14 after operation. The levels of serum Alanine aminotransferase (ALT), Aspartate aminotransferase (AST), Total bilirubin (TBIL), Direct bilirubin (DBIL), Indirect bilirubin (IBIL) were detected and the liver tissue received HE stain and Masson stain. The levels of alpha-smooth muscle actin (α-SMA) and nuclear factor kappa B (NF-κB) were detected by histopathologic method. The hepatic natural kller (NK) 1.1, TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL), Tumor Necrosis Factor-α(TNF-α), NF-κB,α-SMA mRNA expression in liver were analyzed by real time polymerase chain reaction (PCR).

**Results**

We established mice models of OJ successfully by bile duct ligation (BDL) with acute liver injury as the main manifestation at day 7 after the operation. Histological examination suggested that hepatic tissue appeared to necrosis and the values of liver function index, liver mass ratio, hepatic TNF-α, hepatic NF-κB, hepatic NK1.1, hepatic TRAIL increased. Compared with day 7 after BDL, histological examination of mice liver suggested hepatic tissue necrosis area increased and fibrosis has already developed on day 14 after the operation. At the same time, the number of liver NK cells and the expression of hepatic TRAIL were higher at day 14 after BDL than day 7 after BDL, which demonstrated that NK cells dysfunctioned in OJ and it was

V

Obviously correlated with the severity of liver injury. Therefore, we supposed that liver NK cells might participate in liver injury of OJ.

The number of NK cells elevated in the liver after the injection of Poly I: C. Compared with group B at day 7 after BDL, the results of serum liver function index, the area of necrosis in the liver, the expression of NF-κB, TNF-αand TRAIL demonstrated that the acute liver injury was severer in group A. Compared with group B at day 14 after BDL, the serum ALT, AST were higher in group A; the results of HE stain and Masson stain showed that the degree of liver fibrosis in the group A was higher than that in group B. As for the acute liver injury and liver fibrosis in sham-operation groups, there is no differences between group C and group D.

**Conclusions**

1. OJ is commonly complicated with increased liver NK cells and the NK cells ere obviously correlated with the severity of liver injury, which demonstrated that NK cells might participate in liver injury of OJ.

2. Poly I: C activated and induced accumulation of NK cells in mouse livers, which aggravate acute liver injury in mice with obstructive jaundice. NK cells might participate in acute liver injury in TRAIL dependent manner.

3. Poly I: C activated and induced accumulation of NK cells in mouse livers, which aggravate liver fibrosis in mice with obstructive jaundice, which demonstrated that the OJ might suppress the anti-fibrotic function of NK cells.

**Key words**: Natural killer cells; Obstructive Jaundice; Cholestasis; Acute liver injury; Cirrhosis; NF-κB; Hepatic stellate cell; TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand

VI

**正文部分**

目 录

[肝脏](#_Toc686903495)**[NK](#_Toc686903495)**[细胞对梗阻性黄疸小鼠模型急性肝损伤及肝纤维化的影响](#_Toc686903495) 1

[摘 要](#_Toc686903496) 3

[前 言](#_Toc686903497) 3

[结 论](#_Toc686903498) 4

**[Abstract](#_Toc686903499)** 4

[中英文缩略词表](#_Toc686903500) 6

**[1](#_Toc686903501)** [前言](#_Toc686903501) 9

**[2](#_Toc686903502)** [材料和方法](#_Toc686903502) 10

**[3](#_Toc686903503)** [结 果](#_Toc686903503) 16

**[4](#_Toc686903504)** [讨论](#_Toc686903504) 21

**[5](#_Toc686903505)** [结论](#_Toc686903505) 22

[参考文献](#_Toc686903506) 23

[综述](#_Toc686903507) 24

[肝脏自然杀伤细胞：免疫Th物学及其在肝脏疾病中的作用](#_Toc686903508) 24

[前 言](#_Toc686903509) 24

[展 望](#_Toc686903510) 27

[参考文献](#_Toc686903511) 27

[个人简历及在学期间发表的学术论文与研究成果](#_Toc686903512) 29

# 中英文缩略词表

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 英文  缩略词 | 英文全称 | 中文全称 |
| OJ | Obstructive jaundice | 梗阻性黄疸 |
| BDL | Bile duct ligation | 胆总管结扎术 |
| Poly I: C | Polyinosinic-polycytidylic acid | 聚肌胞甘酸 |
| TNF-α | Tumor Necrosis Factor-α | 肿瘤坏死因子-α |
| KC | Kuffer cell | 肝巨噬细胞 |
| HSC | Hepatic stellate cell | 肝星状细胞 |
| MFB | Myofibroblast | 肌成纤维细胞 |
| ECM | Extracellular matrix | 细胞外基质 |
| TLR-3 | Toll-like receptor-3 | Toll 样受体 3 |
| TRAIL | TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand | 肿瘤坏死因子相关诱导  配体 |
| TGF-β1 | Transforming growth factor β1 | 转化生长因子 β1 |
| IFN-γ | Gamma interferon | 干扰素 γ |
| HE  staining | Hematoxylin-eosin staining | 苏木精-伊红染色 |
| α-SMA | Alpha-smooth muscle actin | α 平滑肌肌动蛋白 |
| qPCR | Quantitative Real-time polymerase chain  reaction | 实时荧光定量 PCR |
| ALT | Alanine aminotransferase | 谷丙转氨酶 |
| AST | Aspartate aminotransferase | 谷草转氨酶 |
| TBIL | Total bilirubin | 总胆红素 |
| DBIL | Direct bilirubin | 直接胆红素 |
| IBIL | Indirect bilirubin | 间接胆红素 |
| mRNA | Messenger RNA | 信使 RNA |
| TNF-α | Tumor necrosis factor-α | 肿瘤坏死因子-α |

I

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |  |
|  | NF-κB | Nuclear factor kappa B | 核转录因子-κB |  |
|  | MODS | Multiple Organ Dysfunction Syndrome | 多器官衰竭综合征 |  |
|  | PBS | Phosphate buffered saline | 磷酸盐缓冲液 |  |

II

**肝脏NK细胞对梗阻性黄疸小鼠模型急性肝损伤及肝纤维化的影响**

研究生姓名：陈琳导师姓名：张宏伟教授

郑州大学人民医院肝胆胰腺外科河南郑州450003

# **1** 前言

梗阻性黄疸（obstructive jaundice, OJ）是临床上常见病理状态，通过外科手术达到祛除病灶、引流胆汁和降低胆道压力，是梗阻性黄疸主要的治疗手段。 大量临床研究表明，梗阻性黄疸患者术后会出现较高的并发症发生率和死亡率，术后死亡率高达16-18%[1]。肝毒性的物质，主要是疏水性胆汁酸，积累在肝脏可能导致氧化损伤，胆红素、胆盐等毒物损害肝功能和改变营养状态[2]，因此梗阻性黄疸已被定性为手术后并发症的发展因素[3]。梗阻性黄疸最主要是肝脏损伤，也是其它并发症的重要诱因，随着梗阻时间延长，肝脏最终萎缩、肝细胞最终消亡，直至发展为胆汁淤积性肝硬化。肝硬化是各种形式慢性肝损伤相同的瘢痕反应，以肝细胞外基质（extracellular matrix, ECM）蛋白沉积为特征。活化的肝星状细胞（HSC）以丢失维生素A和开始表达α平滑肌蛋白（α-smooth mucle actin, α-SMA）为特征，是各种病因导致的肝纤维化发生、发展与转归的关键和共同的中心环节[4]。目前对梗阻性黄疸肝损伤及肝纤维化治疗措施很局限，因此研究其肝损伤的发病机制对减少肝损伤及肝纤维化有重要意义。

自然杀伤（natural killer, NK）细胞在外周血中含量低，在肝脏中含量丰富，约占肝脏淋巴细胞的15%-30%，在防御肿瘤及病毒感染中起到重要的免疫监视

1

功能，是肝脏免疫的第一道防线[5]。聚肌胞苷酸（Poly I: C）是Toll样受体3（TLR3）激动剂，是人工病毒RNA的模拟物，诱导类似病毒感染的免疫应答，可在体内外诱导NK细胞活化及肝内聚集。相比外周血液中的NK细胞，肝脏NK细胞对肿瘤细胞有很高的细胞毒性，富含更多的红心囊泡和颗粒，并且表达更高的TRAIL、穿孔素、粒酶B等，肝脏中的NK细胞与外周血液和其他器官中相比有很大差异，这表明肝脏中的NK细胞除了在肿瘤免疫和宿主防御微生物病原体的固有免疫外还有特殊的功能[6]。

近年来研究表明，活化的NK细胞可以通过直接杀伤肝星状细胞（HSC）及通过产生细胞因子干扰素-γ（IFN-γ）抑制肝纤维化，同时许多临床研究也提示

NK细胞对慢性肝病患者有抗肝纤维化作用[7]。NK细胞改善纤维化已在CCl4、

DDC饮食、日本血吸虫诱导肝纤维化模型中均得到证实。但是在酒精性肝硬化模型中，NK细胞/IFN-γ对HSC杀伤作用不显著[8]，梗阻性黄疸肝损伤与酒精性肝损伤都伴随全身氧化应激反应，推测梗阻性黄疸可能会影响NK细胞杀伤活化

HSC作用。至今很多研究发现NK细胞在自身免疫性肝炎、原发性硬化性胆管炎及原发性胆汁性肝硬化中出现功能失调，而NK细胞在梗阻性黄疸时的变化及对胆汁淤积性肝硬化的作用目前研究较少。

根据以上结果及推论，本课题将通过构建梗阻性黄疸小鼠模型，动态观察梗阻性黄疸小鼠模型的一般情况变化及梗阻性黄疸肝损伤的病理生理过程，监测梗阻性黄疸小鼠模型肝脏NK细胞的变化，初步探索梗阻性黄疸时肝脏NK细胞与肝损伤的相关性；通过腹腔注射Poly I: C诱导肝脏NK细胞聚集，分第7天和第14天两个时相处死小鼠，采集标本，检测各组小鼠血清中的肝功能指标变化，对第7天小鼠肝脏HE染色、NF-κB免疫染色及检测肝脏NF-κB、TNF-α、

NK细胞表面NK1.1、TRAIL mRNA的变化，探讨肝脏自然杀伤细胞对梗阻性黄疸小鼠急性肝损伤的影响及机制；第14天通过检测小鼠肝脏HE染色、Masson三染色、α-SMA免疫染色，研究肝脏NK细胞对肝纤维化的影响，并初步探索其相关机制。

2

# **2** 材料和方法

## **2.1** 实验材料

### **2.1.1** 主要试剂

|  |  |
| --- | --- |
| 试剂 | 公司 |
| Poly I: C  PBS 液  苏木精-伊红染色试剂盒 | Sigma-Aldrich 公司  北京索莱宝科技有限公司北京索莱宝科技有限公司 |
| Masson 三染色试剂盒  α-SMA 抗体  NF-κB 抗体  RNAiso Plus 总 RNA 提取剂PrimeScript TMRT reagent Kit with gRNA Eraser 反转录试剂盒SYBR Premix Ex TaqTMⅡ染料法荧光定量试剂盒  PCR 引物  DEPC（焦碳酸二乙酯）水氯仿  无水乙醇水合氯醛  10%福尔马林 | 上海源液生物科技有限公司  Abcam 公司  Abcam 公司  日本 Takara 公司日本 Takara 公司  日本 Takara 公司  invitrogen 公司  北京索莱宝科技有限公司北京索莱宝科技有限公司北京索莱宝科技有限公司北京索莱宝科技有限公司  郑州大学人民医院病理科 |

### **2.1.2** 主要仪器

|  |  |
| --- | --- |
| 仪器 | 生产厂家 |
| 超净工作台 | 苏州安泰空气技术有限公司 |
| 电子天平 | 天津精天电子仪器股份有限公司 |
| XB-100 雪花制冰机 | 宁波新芝生物科技股份有限公司 |

3

|  |  |
| --- | --- |
| 水平摇床 | 北京六一实验仪器厂 |
| 恒温水浴箱 | 上海精宏公司 |
| 振荡水槽 | 上海精宏公司 |
| 低温冰箱 | 海尔集团 |
| 台式离心机 | 德国 Eppendorf 公司 |
| 低温高速离心机 | 德国 Eppendorf 公司 |
| 移液器 | 德国 Eppendorf 公司 |
| 微波炉 | 格兰仕电器实业有限公司 |
| 酶联免疫检测仪 | 美国 BIO-RAD 公司 |
| -80℃超低温冰箱 | 海尔集团 |
| 高压灭菌锅 | 上海申安仪器有限公司 |
| 紫外分光广度仪 | 岛津公司 |
| 紫外灯 | GL-3120 |
| 倒置显微镜 | 奥林巴斯公司 |
| 荧光倒置显微镜成像系统 | 奥林巴斯公司 |
| 实时荧光定量 PCR 仪 | ABI7300 |
| 全自动生化分析仪 | 郑州大学人民医院检验科 |
| 显微手术器械主要包括持针器、  弯钳、显微剪、弯头镊子、动脉夹 | 上海医疗器械厂 |
| 5-0 3-0 丝线  红外线取暖器 | 上海医疗器械厂  上海医疗器械厂 |
| Leica 切片机 | 德国 Leica 公司 |

### **2.1.3** 实验动物

雄性昆明小鼠，体重25-30g，购自郑州大学实验动物中心。购买后在实验室适应1周后开始实验。每笼5只小鼠饲养，实验动物清洁饲养，饲养温度18-22℃，相对湿度50%-60%。照明10-14小时，每日8: 00开灯，18: 00-20: 00关灯。每周换一次小鼠笼具内垫料，每月对笼具清洗、消毒一次。小鼠饲料采用料块。供应无污染的饮水，每3天清洗一次饮水瓶。小鼠采食夜间为主，每天下午加满料块及饮水。

4

## **2.2** 小鼠梗阻性黄疸模型建立

参照文献[9]所述，采用胆总管双重结扎术（BDL）构建梗阻性黄疸模型。所有手术器械高压灭菌，所有手术严格按照无菌操作。

### **2.2.1** 实验动物准备

术前禁食12小时，自由饮水。称取体质量，体积分数4%水合氯醛0.1ml/10g腹腔注射麻醉。麻醉成功后将小鼠于恒温37℃的手术板上，取仰卧位，四肢及尾巴用胶带固定。腹部正中皮肤备皮。术野酒精消毒。

### **2.2.2** 手术操作

取腹部约2cm正中切口，切开皮肤，应用剪刀分离皮肤与腹膜间的结缔组织，从白线切开腹膜打开腹腔，充分暴露腹腔内部。用沾有0.9%的氯化钠溶液的棉签拨开肝门处的肠管，充分暴露肝门。移动胆管末端肠管，充分暴露胆管。应用显微弯头镊将胆总管从门静脉与肝动脉分离出来。应用5-0丝线双重结扎胆总管，避免损伤胆管。将肠管恢复至生理位置。逐层缝合腹膜层与皮肤。（见图1）

### **2.2.3** 术后管理

将小鼠放置于红外线保温箱内直至麻醉完全清醒（见图1），然后将小鼠转移至普通笼子，给予自由饮食及饮水。术后每隔2天腹部切口换药。

5



图1 胆总管结扎术手术步骤

注：A皮肤酒精消毒；B切开皮肤，分离皮肤与腹膜间的结缔组织；C沿白线切开腹膜打开腹腔；D棉签拨开肝门处的肠管，充分暴露肝门及胆管；E双重结扎胆总管；F缝合完毕放置保暖箱。

## **2.3** 实验分组及干预方法

### **2.3.1** 实验分组

将小鼠随机分为4组，每组40只：

A组：手术组+Poly I: C

6

B组：手术组+PBS

C组：假手术+Poly I: C

D组：假手术组+PBS

### **2.3.2** 干预方法

手术组行胆总管结扎术构建梗阻性黄疸模型；假手术组仅游离胆管，不做特殊处理，其余操作与手术组一致。将Poly I: C溶于浓度为1mg/ml无热源的PBS溶液中，A组与C组以1ug/g的剂量，每48小时腹腔注射一次，现配现用。B组与D组注射等量的磷酸盐缓冲液（PBS溶液）。

## **2.4** 一般情况观察与标本采集

### **2.4.1** 术后一般情况观察

对每只小鼠的一般情况进行观察（1 次/天），包括对精神状态、活动情况、饮食多少、体重增减、大小便性状、皮肤以及有无腹水、死亡等情况。若发现小鼠因出现病症时加强观测，至死亡尸检。

### **2.4.2** 标本采集

每组分别于第7天和第14天取标本。眼球取血，眼球取血，剖腹取肝脏标本。

1）眼球取血：左手拇指、食指和中指抓取小鼠颈部皮肤，小指和无名指固定尾巴。轻压需要摘取的眼部皮肤，使眼球充血突出。使用手术剪剪去小鼠的胡须，防止血从胡须处留下溶血。用镊子夹取眼球并快速摘取，并使血液从眼眶内流入EP管中。当血液滴入速度变慢时可轻按小鼠心脏部位，加快心脏泵血速度以获取更多的血液，随后采取脱颈椎法处死小鼠。全血静置半个小时，5000rpm离心20分钟分离血清，移液枪将上层血清转移至新的EP管，

-20°冻存。

2）剖腹取肝脏：小鼠取血脱颈椎法处死后，将小鼠快速剖腹，观察肝脏、胆囊、胆管变化，切断第1肝门与第2肝门，完整摘取肝脏，快速照相并称取、记录小鼠肝脏湿重，取约100mg左右肝脏组织放入冻存管内放入液氮快速冻存，部分肝脏组织10%福尔马林固定待做病理。

7

## **2.5** 肝功能检测

取出冻存血清，常温融化，全自动生化分析仪血清谷丙转氨酶（Alanine aminotransferase, ALT）、谷草转氨酶（Aspartate aminotransferase, AST）、总胆红素（Total bilirubin, TBIL）、直接胆红素（Direct bilirubin, DBIL）、间接胆红素（Indirect bilirubin, IBIL）。

## **2.6** 肝组织病理学检查

### **2.6.1** **HE**染色步骤

1）组织浸蜡包埋：60℃温箱浸蜡2h，利用L型金属框包埋，并编号，待蜡块冷却后修整蜡块；

2）切片：石蜡切片5um，展片放置于60℃烤箱烤片1小时；

3)脱蜡至水：二甲苯2级，每级10min. 不同浓度梯度乙醇脱水，100%乙醇5 min→90%乙醇5 min→80%乙醇5 min→70%乙醇5 min→50%乙醇5 min→水5 min；

4）染色：苏木精染色5 min→水洗1-3s→1%盐酸乙醇分化1-3s→流水过洗至返蓝→0.5%伊红液染色1-3min→蒸馏水稍洗1-2s；

5) 梯度乙醇脱水：依次70%乙醇1-2s→80%乙醇1-2s→95%乙醇5min→95%

乙醇5min→95%乙醇Ⅰ、Ⅱ各5min→100%乙醇Ⅰ、Ⅱ各5min；

6）二甲苯透明，中性树胶封片；

7）显微镜观察，照相。

### **2.6.2** **Masson**三色染色法（胶原纤维染色）

1）如HE染色石蜡包埋组织，切片，常规脱蜡至水；

2）苏木精染液染核2-3min；

3）流水稍洗，1%盐酸分化；

4）流水冲洗数分钟；

5）丽春红-酸性复红溶液染色5 min；

6）蒸馏水稍冲洗；

7）1%磷钨酸也处理约5min；

8）苯胺蓝液复染5min；

8

9) 1%冰醋酸处理30s；

10）95%乙醇梯度脱水；

11）二甲苯透明，中性树胶封片；

12）显微镜观察，照相。

### **2.6.3** 免疫组化

一抗分别为兔抗鼠NF-κB多克隆抗体（1: 200稀释）、兔抗鼠α-SMA单克隆抗体（1: 300稀释），二抗为羊抗兔IgG多克隆抗体（1: 500稀释）。

1）切片脱蜡至水，PBS洗3×5min ；

2）柠檬酸抗原修复10min，直至自然冷却；

3) PBS浸泡5分钟，3次；

4）3%H2O2溶液封闭内源性过氧化物酶，室温20min；

5) PBS浸泡3×5min ；

6）滴加ft羊血清50μl/片，室温封闭内源性生物素20min；

7）甩除勿洗，滴加一抗50μl/片，4℃过夜；

8) PBS浸泡3×5min ；

9)滴加二抗50μl/片，37℃30min；

10) PBS浸泡3×5min ；

11）滴加辣根酶标记卵霉链白素50μl/片，37℃30min；

12) PBS浸泡3×5min ；

13）DAB显色，显微镜下控制，自来水中止；

14）苏木素复染，梯度酒精脱水；

15）二甲苯透明，中性树胶封片；

16）显微镜观察，照相。

## **2.7** 实时荧光定量聚合链反应检测

### **2.7.1** 总**RNA**的提取

1）研钵等器皿用0.1%DEPC水溶液在37℃下处理12小时，然后在120℃下高温灭菌30分钟除去残留的DEPC；

2）从液氮罐中取出冻存肝脏，迅速转移至液氮预冷的研钵中，用研杵研磨组织，

9

其间不断加入液氮，直至研磨至粉末状，向研钵内加入2ml RNAiso Plus，充分匀浆；

3）将匀浆液转移至离心管，室温（15-30℃）静置5分钟。1200g 4℃离心5分钟，小心吸取上清液，移入新的离心管；

4）向上述匀浆裂解液中加入0.4ml氯仿，充分摇匀，溶液乳化至乳白色，室温静置5分钟，12000g 4℃离心15分钟，此时匀浆分三层，吸取上清液转移至另一个新的离心管中，向上清中加入0.4ml异丙醇，充分混匀，室温静置10分钟，12000g 4℃离心10分钟，可见离心管底部的RNA沉淀；

5）小心弃去上清，加入2ml 75%乙醇，上下颠倒洗涤离心管管壁，7500×g 4℃离心5分钟后小心弃去上清；

6）室温下自然干燥RNA沉淀，加入30ulRNase-free水溶解沉淀。

7）吸光度测定RNA纯度分析：用TE buffer 495ul稀释RNA5ul，测定OD260/OD280，取比值在1.7-2.1的RNA计算浓度，浓度计算方法：RNA浓度（ug/ul）=

（OD260-OD280）×稀释倍数×0.04 .

### **2.7.2** 去**DNA**与反转录反应

1）去除基因组DNA反应：在冰上配置反应混合液，5×gDNA Eraser Buffer 2ul+1ul gDNA Eraser+1ug的Total RNA，然后加入RNase Free dH2O至10ul. 室温放置5-30分钟；

2）反转录反应：反应液在冰上进行配置。1ul PrimeScript RT Enzyme Mix I+1ul RT Primer Mix+4ul 5×PrimeScript Buffer 2+4ul RNase Free dH 2O，然后加入上述10ul反应液放入热循环仪中进行反转录反应，反应条件37℃15min→85℃5s-4℃。反应合成的cDNA于-80℃保存。

### **2.7.3** 实时荧光定量**PCR**反应

在冰上配置PCR反应液，10ul SYBR Premix Ex TaqⅡ（Ti RNaseH Plus）(2×) +0.8 ul PCR上游引物（10uM）+0.8ul PCR下游引物（10uM）+0.4ul ROX Reference Dye(50×) +2ul RT反应液（cDNA溶液）+6ul dH2O共20ul反应液，每个样本设置3个复孔，7300实时荧光定量PCR仪以两步法进行扩增，第一步预变性1个循环95℃30秒，第二步PCR反应，40个循环，95℃5秒，60℃31秒。反应结束后确认Real Time PCR的扩增曲线和溶解曲线，获取Ct值。以D组为对照组，采用2—△△Ct计算各组模板的起始拷贝数之间的相对倍数，计算各

10

组间mRNA的差别。引物碱基序列见表1。

表1 引物碱基序列

|  | 上游引物 | 下游引物 |
| --- | --- | --- |
| NK1.1 | 5'-TCATCCTCCTTGTCCTGACC-3' | 5'-TTGAATGAGCAGCAAAGTGG-3' |
| TRAIL | 5'-CCCTGCTTGCAGGTTAAGAG-3' | 5'-GGCCTAAGGTCTTTCCATCC-3' |
| TNF-α | 5'- CTGTAGCCCACGTCGTAGC-3' | 5'-TTGAGATCCATGCCGTTG-3' |
| α-SMA | 5'-ACTACTGCCGAGCGTGAGAT-3' | 5'-AAGGTAGACAGCGAAGCCAG-3' |
| NF-κB | 5'-ATACCACCAAGACCCACCCC-3' | 5'-TGAGGAGGGTCCTTGGTGAC-3' |
| β-actin | 5'-AAATGGTGAAGGTCGGTGTGAAC-3' | 5'-CAACAATCTCCACTTTGCCACTG-3' |

## **2.8** 统计学分析

所有实验所得数据以以均数±标准差(x±s)表示，应用SPSS 16.0软件进行统计分析，2组间比较采用t检验，多组间比较采用方差分析（ANOVA），

P＜0.05为有统计学意义。

11

# **3** 结 果

## **3.1** 小鼠一般情况及死亡率



胆总管结扎术构建小鼠梗阻性黄疸模型死亡率低，术后生存率高，由于麻醉、手术出血、胆漏等原因，胆总管结扎手术总体死亡率约 7%。

手术组术后第 1 天出现尿黄，之后逐渐出现皮肤粘膜黄染，大便颜色变浅， 食欲减退，体重下降，活动减少，反应迟缓等，假手术组未出现梗阻性黄疸表现（见图 2）。部分小鼠出现急性肝功能衰竭，肝功能失代偿，进行性腹水增多

（见图 2），胆酶分离，肝脏萎缩。14 天内肝功能失代偿发生率 A 组 7%，B 组

4%，C 组、D 组分别为 0%。术后 7 天内死亡率 A 组 13%、B 组 7%、C 组及 D 组死亡率均为 0%。术后 14 天死亡率 A 组死亡率 12%、B 组 8%、C 组及 D 组死亡率均为 0%。

图 2 小鼠一般情况

注：A术后第1天，蓝色箭头所指正常尿液，红色箭头指尿色变黄；B假手术组小鼠；C胆总管结扎术后14天，箭头所指的耳朵、尾巴等处皮肤明显变黄；D小鼠肝功能失代偿，箭头所指大量腹水。

## **3.2** 小鼠体重变化

每 2 天测定小鼠体重，所得体重与第一天体重比值测定体重比，反应小鼠体重变化，A、B、C、D 组体重变化曲线如图 3 所示，整体来说，由于手术打击、伤口愈合等原因，术后 7 天内各组小鼠体重增长速度较慢，第 7 天至第 14

12

天体重增长速度加快。手术组体重增长较假手术组慢。梗阻性黄疸模型组 A、B 组小鼠体重增长慢，至第 14 天 A、B 组小鼠体重约是原来的 116%，C、D 组小鼠体重约是原来的 125%。



图3 各组小鼠术后体重变化

注：A、B、C、D组小鼠前7天增长速度较后7天慢。手术组A、B组小鼠体重增长较假手术组小鼠体重增长慢。

## **3.3** 小鼠肝功能指标



如表2 所示，第7 天及第14 天手术组小鼠血清肝功能指标ALT、AST、TBIL、

DBIL、IBIL 较假手术组明显升高，差异有显著统计学意义（P＜0.01）；手术组第 14 天较第 7 天升高，差异有统计学意义（P＜0.05）；A 组与 B 组比较，第 7 天及第 14 天血清 ALT、AST 含量 A 组较 B 组升高，差异有统计学意义（P＜0.05）

（如图 4），血清 TBIL、DBIL、IBILA 组与 B 组比较，差异无统计学意义（P

＞0.05）。C 组与 D 组小鼠血清 ALT、AST、TBIL、DBIL、IBIL 比较，差异无统计学意义（P＞0.05）

表 2 各组小鼠肝功能指标比较

13



图4 各组小鼠血清ALT、AST比较

注：A图表示各组小鼠血清ALT含量，A7: A组第7天；B7: B组第7天；C7: C组第7天；D7: D组第7天；B图表示各组小鼠血清AST含量，A14: A组第14天；B14: B组第14天；C14: C组第14天；D14: D组第14天。手术组A、B组第14天ALT、AST指标较第7天高，第7天与第14天指标A组较B组高。

## **3.4** 小鼠肝质比与肝脏大体标本

### **3.4.1** 小鼠肝质比

梗阻性黄疸小鼠模型组小鼠术后肝脏水肿，质量增加。肝质比（肝脏/体重比值×100%）各组分别为第7天，A组8.42±0.33%，B组8.40±0.36%，C组4.36±0.24%，D 组4.27±0.24%. 第14天，A 组10.12±0.31%，B 组10.11±0.17% ，

C组：4.31±0.19%，D组4.28±0.21%。手术组A、B组第14天较第7天肝质比增大，差异有统计学意义（P＞0.05）；假手术组A组和B组，手术组C组和D组第7天与第14天比较，差异均无统计学意义（P＞0.05）。

### **3.4.2** 小鼠肝脏大体标本

**3.4.2.1模型观察**

正常小鼠腹腔脏器无黄染，胆总管直径约0.2-0.3mm，胆囊在肝叶内，体积正常，约为0.7×0.5mm；手术组的肝脏肿大，大体呈淤胆表现，表面形成不规则的水肿和纤维化结节。术后第7天可见腹腔脏器黄染，结扎处胆总管增宽，直径约2mm，胆囊体积增大，约为3×2mm；术后第14天，可见腹腔脏器重度

14

黄染，结扎处胆总管直径约3mm，胆囊体积较第7天增大，约为4×3mm。（见图4 A、B、C）急性肝衰竭小鼠出现大量腹水，肝脏严重萎缩（图4 D）。



图4 .梗阻性黄疸小鼠模型肝脏观察

注：A正常小鼠，红色箭头指正常胆总管，直径约0.2-0.3mm；B术后第7天，腹腔脏器黄染，红色箭头指扩张胆总管，胆总管直径增宽约2mm；C术后第14天，腹腔脏器重度黄染，胆总管直径增宽约3mm，蓝色箭头指肿大的胆囊，约4×3mm；D急性肝衰竭小鼠肝脏严重萎缩。

**3.4.2.2实验组肝脏大体标本观察**

A组第7天肝脏可见明显黄色片状胆汁样梗死；B组第7天大体标本未见明显坏死灶；A组第14天可见梗死灶较第7天面积增大；B组第14天可见点状坏死灶，较A组少；C组和D组仅见肝周轻度粘连，肝脏大小、质地、颜色未见明显异常。（图5）



图5 实验组肝脏大体标本

注：红色箭头指胆汁样梗死蓝色箭头指肿大的胆囊A7: A组第7天肝脏；B7: B组第7天肝脏；C7: C组第7天肝脏；D7: D组第7天肝脏；A14: A组：第14天肝脏；B14: B组第14天肝脏；C14: C组第14天肝脏；D14: D组第14天肝脏

15

## **3.5** 小鼠肝脏**HE**染色



如图 6 所示，手术组 A、B 组第 7 天肝脏 HE 染色可见肝细胞肿胀，出现片状胆汁性梗死，空泡变性，汇管区边缘小管径小胆管增生，无假小叶形成，A 组第 7 天坏死面积较 B 组明显增大第 14 天可见广泛肝细胞坏死，面积较第 7 天增大，汇管区小胆管大量增生，纤维结缔组织增生向肝小叶内扩展并侵入、分隔肝小叶，肝索紊乱，中央静脉缺如或偏位，小胆管增生，间隔内淋巴及单核细胞浸润，正常肝小叶结构消失，可见明显假小叶形成，A 组与 B 组小鼠肝脏肝纤维化程度无明显差异；假手术组 C 组、D 组在第 7 天与第 14 天肝脏组织结构清晰，可见肝小叶，肝细胞索以肝小叶中央静脉为中心向四周放射排列整齐， 无异常改变。

图6 各组小鼠肝脏HE染色（×200 ）

注：A7为A组第7天，可见肝细胞肿胀，出现片状坏死，红色箭头指肝细胞变性坏灶，较

B7面积大。B7为B组第7天，可见肝细胞肿胀，红色箭头所指坏死灶；C7为C组第7天，肝细胞形态正常，肝板排列整齐。D7为D组第7天，可见肝小叶正常。A14为A组第14天，可见肝小叶结构消失，假小叶形成，蓝色箭头指假小叶。B14为B组第14天，可见假小叶形成，蓝色箭头指假小叶；C14为C组第14天，无假小叶形成，肝小叶结构未见异常；

D14为D组第14天，可见肝小叶结构正常。

## **3.6** 小鼠第**7**天肝脏**NF-κB**免疫染色与**NF-κB mRNA**表达量

16

### **3.6.1** **NF-κB**免疫染色结果

免疫组化结果回示后，用双盲法在每张切片中随机选取 10 个视野，根据细胞染色强度分为四级，并分别记分：阴性细胞(－)无显色（0）；弱阳性细胞(+) 显色为浅黄色（1）；中度阳性细胞(++)显色为棕黄色（2）；强阳性细胞(+++) 显色为棕褐色（3）。判断标准:根据阳性细胞在全部组织细胞中所占比例以及阳性细胞染色强度判定实验结果：A：按显色细胞数记分，阳性细胞数<1/3 为 1 分，阳性细胞数 1/3～2/3 为 2 分，阳性细胞数≥2/3 为 3 分。B：按细胞显色深浅记分，无阳性反应细胞为 0 分，浅黄色为 1 分，棕黄色为 2 分，棕褐色为 3 分。积分数=A×B 。A×B=0 判断为（－），A×B=1 ～2 判断为（+），A×B=3 ～4 判断为（++）， A×B=6 ～9 判断为（+++）。

术后第 7 天，小鼠肝脏 NF-κB 染色可见，A 组大量染成棕色的阳性细胞， 较其他组阳性细胞数量明显增多，积分数（++）；B 组棕色阳性细胞积分数（+）， 较 C、D 组多；C 组和 D 组偶见阳性细胞，两组比较无明显差异，评分均为（-）。

（如图 7）



图7 术后第 7 天各组肝脏NF-κB免疫染色（×400 ）

注：A组可见大量染成棕色的细胞，如红色箭头所示，积分数（++）；B组可见许多棕色阳性细胞，如红色箭头所示，积分数（+）；C组、D组偶见棕色细胞，积分数（-）。蓝色箭头指正常肝细胞。

### **3.6.2** 各组小鼠肝脏**NF-κB mRNA**表达量

以 D 组为对照组，采用 2—△△Ct 计算各组模板的起始拷贝数之间的相对倍数，

A 组小鼠肝脏 NF-κB mRNA 表达量相对倍数为 2.09±0.11 ，B 组为 1.65±0.31 ，C 组为 0.82±0.21 ，D 组为 1.00±0.00 。手术组 A 组和 B 组小鼠肝脏 NF-κB mRNA 表达量较假手术组 C 组和 D 组升高，差异均有统计学意义（P＜0.01）；A 组较

17

B 组 NF-κB mRNA 表达量增高，差异有显著统计学意义（P＜0.01），C 组与 D

组比较差异无统计学意义（P＞0.05）。如图 8。



图8 术后第 7 天各组肝脏NF-κB mRNA表达量

## **3.7** 术后第**14**天小鼠肝脏**Masson**三染色



Masson 三染色结果回示，胶原纤维呈绿色，弹力纤维呈棕色，肌纤维呈红色，红细胞呈橘红色。根据染为绿色的面积判断肝纤维化程度，如图 9 所示， 手术组 A 组和 B 组小鼠肝脏可见染成绿色的胶原纤维包绕假小叶，表明假小叶周围有大量纤维结缔组织。通过软件 image j 计算绿色面积 A 组约

（30.638±2.12 ）%，B 组约（28.506±1.23）%，由此初步判断 A 组纤维化程度较

B 组纤维化程度高，差异有统计学意义（P＜0.05）。C 组和 D 组小鼠肝脏未见明显纤维沉积，表明肝脏无纤维化。

图9 术后第14天各组肝脏Masson三染色（×400 ）

注：白色箭头指示绿色胶原纤维。A组可见沿着假小叶周围大量染成绿色的胶原纤维；B组可见假小叶周围染成绿色的胶原纤维；C组和D组未见明显胶原纤维沉积。

18

## **3.8** 术后第**14**天小鼠肝脏**α-SMA**免疫染色与**α-SMA mRNA**表达量

### **3.8.1** 术后第**14**天小鼠肝脏**α-SMA**免疫染色结果

手术组 A 组和 B 组第 14 天肝组织 α-SMA 免疫组织化学染色可见大量染为棕色的 α-SMA 阳性细胞，反映活化的肝星状细胞（Hepatic stellate cells, HSCs） 数量，主要分布于汇管区、纤维间隔、肝窦及增生的胆管周围；A 组阳性细胞积分数（+++），B 组阳性细胞积分数（++）；假手术组 C 组和 D 组肝组织内仅在血管壁周围弱阳性表达，积分数均为（+）。见图 10。



图10 各组术后第14天小鼠肝脏α-SMA免疫染色

注：A组可见大量染为棕色的阳性细胞，主要沿着假小叶周围，积分数（+++）；B 组可见大量阳性细胞，沿假小叶周围分布，积分数（++）；C组和D组肝组织内仅在血管壁周围弱阳性表达，积分数均为（+）。

### **3.8.2** 术后第**14**天各组小鼠肝脏**α-SMA mRNA**表达量

术后第 14 天，各组小鼠肝脏 α-SMA mRNA 表达量分别为，A 组：

239.67±12.09 ；B 组：179.96±20.95 ；C 组：1.21±0.31 ；D 组：1.00±0.00 ，手术

组 A 组和 B 组 α-SMA mRNA 表达量较假手术组 C 组和 D 组明显升高，差异有显著统计学意义（P＜0.01）；A 组较 B 组 α-SMA mRNA 表达量高，差异有统计学意义（P＜0.01），C 组和 D 组比较，差异无统计学意义（P＞0.05）。如图

11 所示。

19



图11 术后第14天各组小鼠肝脏α-SMA mRNA表达量

## **3.9** 小鼠肝脏**TNF-α、NK 1.1**与**TRAIL mRNA**表达量

### **3.9.1** 梗阻性黄疸小鼠模型**TNF-α、NK 1.1**与**TRAIL mRNA**表达量变化观察：

以假手术组D 组术后7 天为对照组，计算各组2-△△Ct，对比各组相对表达量。手术组 B 组第 7 天与第 14 天 NK1.1、TRAIL、TNF-α mRNA 表达水平明显高于假手术组 D 组第 7 天与第 14 天，差异有统计学意义（P＜0.01）。手术组术后第 14 天高于术后第 7 天（P＜0.01），假手术组第 7 天与第 14 天比较差异无统计学意义（P＞0.05）。见表 3。



注：与假手术组比较，*a P*＜0.01；与手术组第7天比较，*b P*＜0.01；与假手术组第7天比较，

*C P*＞0.05.

### **3.9.2** 术后第**7**天各组**TNF-α、NK 1.1**与**TRAIL mRNA**表达量的变化

20

术后第 7 天，通过腹腔注射 Poly I:C 干预的 A 组和 C 组 NK1.1 mRNA 表达量明显高于以 PBS 为对照的 B 组和 D 组，手术组高于假手术组即 A 组高于 C 组、B 组高于 D 组，差异均有统计学意义（P<0.01）。手术组 A 组与 B 组 TRAIL

mRNA 及细胞因子 TNF-αmRNA 相对表达量高于假手术组 C 组和 D 组，其中 A 组明显高于 B 组，差异均有统计学意义（P<0.01），C 组与 D 组比较差异无统计学意义（P>0.05）。见表 4

注：A为手术+Poly I: C；B为手术+PBS；C为假手术+Poly I: C；D为假手术+PBS；与B、C、

D组比较*aP*<0.01；与D组比较*bP*<0.01；与C、D组比较*cP*<0.01；与B、D组比较*dP*<0.01.



21

# **4** 讨论

梗阻性黄疸是临床上常见复杂病理生理学状态，可导致全身多脏器功能受损，包括最常见的肝功能异常及肠黏膜屏障受损、急性肾功能不全、脓毒血症、神经损伤甚至多器官衰竭[10]。病因通常为胆总管结石、胰胆管恶性肿瘤、胆管的良性狭窄和转移性疾病等，当胆红素超过2.5mg/dl便会出现临床症状。临床表现通常为黄疸、陶土样便、黑尿、皮肤瘙痒、脂肪泻和出血。并发症包括胆管炎、胆汁性肝硬化、胰腺炎、骨软化症或者骨质疏松、肾和肝衰竭[11]。梗阻性黄疸肝细胞损害是术后并发症的重要诱因，其机制极为复杂，尚未完全阐明，目前认为肝损伤机制与胆汁淤积引起内毒素血症和细菌移位、能量代谢障碍、免疫功能受损、氧自由基损伤、肝细胞凋亡、钙稳态失调等[12]多种因素有关。核转录因子-κB（nuclear factor-κB, NF-κB）是广泛存在于体内，是多种细胞因子和炎症介质表达的共同转录因子及多种信号转导途径的汇聚点，NF-κB与肝损伤的关系一直是肝脏疾病研究中的热点。梗阻性黄疸中NF-κB对肝组织的炎性反应、氧化应激以及肝细胞凋亡和再生发挥着重要作用[13]。

随着梗阻时间延长，肝脏最终萎缩、肝细胞最终消亡，直至发展为胆汁淤 积性肝硬化。肝硬化是各种形式慢性肝损伤相同的瘢痕反应，以肝细胞外基质 蛋白沉积为特征。越来越多证据证明多种细胞可促进肝纤维化，包括肝星状细胞（HSC）、肌成纤维细胞、骨髓源性祖细胞和肝细胞，其中HSC被认为在肝纤维化发病机制中起着主要作用。HSC在正常健康肝脏中处于静息状态，各种致病因子造成肝细胞损伤，引起肝Kupffer（KC）细胞、血小板、肝窦内皮细胞和肝细胞激活，分泌多种细胞因子，与某些化学递质共同作用于HSC，使其激活和增殖，转化为以丢失维生素A和增加蛋白表达为特征的肌成纤维细胞（myofibroblast，

MFB），合成大量的细胞外基质（extracellular matrix, ECM），在肝内沉积形成肝纤维化[14]。国内外研究胆汁淤积性肝损伤动物模型多采用胆总管结扎法

（BDL），该法制备的模型能较好地模拟人因长期胆汁淤积引起的肝纤维化疾病。

BDL刚开始2周会有急性梗阻性黄疸，BDL刺激胆管上皮细胞和卵形细胞（肝祖细胞）增殖，导致增生胆小管伴随门静脉炎症和纤维化。用这种方法，肝硬化在7天到4周形成[9]。

本实验对小鼠BDL成功构建梗阻性黄疸小鼠模型，小鼠相对于大鼠有胆囊，

22

较好模拟人类因胆汁淤积引起的肝损伤疾病，重复性好、成功率高、生存期长。通过观察，胆总管结扎术后第1天出现尿黄，之后逐渐出现皮肤粘膜黄染，大便颜色变浅，食欲减退，体重下降，活动减少，反应迟缓等，血清酶及胆红素水平升高，术后第7天可见肝脏组织病理学检查可见大量炎症浸润及肝细胞肿胀、坏死，以急性肝损伤为主要表现。术后14 d血清酶学较术后7 d升高，组织病理学检查显示肝组织坏死面积增大，汇管区小胆管明显增生，并出现明显肝纤维化，表明梗阻性黄疸肝损伤随时间延长进行性加重。模型建立14 d可见肝组织明显纤维化，免疫组织化学检查可见大量α-SMA染色阳性细胞聚集，表明梗阻性黄疸肝损伤结局为肝纤维化。表明大量HSC活化。部分小鼠出现急性肝功能衰竭，表现为肝功能失代偿，腹水进行性增多，胆酶分离等症状。

肝脏具有独特的解剖结构和免疫功能，25%血供来自肝动脉，75%的血供来自起源于内脏器官的门静脉，后者携带大量细菌代谢产物、毒素和食物抗原。肝脏过滤大量血液（--25%心排出量/分钟），来自肝动脉及门静脉的血液在肝血窦中混合并通过肝静脉回到心脏，实际上，肝脏是除了淋巴结最容易受到各种原发性恶性肿瘤转移的部位[15]。肝脏持续不断暴露于来源于肠道血液中多种可诱发免疫反应的物质，因此，需要良好的固有免疫功能有效防御病原体并避免诱发破坏性的免疫反应。肝脏NK/NKT细胞与Kuffer细胞、窦状上皮细胞构成强大的固有免疫系统，在清除病原体、无效分子、毒素和循环中的肿瘤细胞免疫中发挥重要作用。其中NK细胞在外周血中含量低，在肝脏中含量丰富，约占肝脏淋巴细胞的15%-30%，在防御肿瘤及病毒感染中起到重要的免疫监视功能，是肝脏免疫的第一道防线[16]。

1976年Wisse [17]首次描述了pit细胞，后来Kaneda等把这一类型细胞改名为自然杀伤细胞（NK细胞），NK1.1是识别小鼠NK(NK1.1+CD3-) /NKT(NK1.1+CD3+)细胞表面特异性标志。聚肌胞苷酸（Poly I: C）是Toll样受体3（TLR3）激动剂，是人工病毒RNA的模拟物，诱导类似病毒感染的免疫应答，可在体内外诱导NK细胞活化及肝内聚集。活化的NK细胞通过释放穿孔素、颗粒酶、Fas配体和TRAIL直接杀死靶细胞。NK细胞通过TRAIL介导的细胞凋亡是杀伤靶细胞的重要途径。

TRAIL是肿瘤坏死因子超家族成员，可通过死亡受体TRAIL-R1、TRAIL-R2（又称DR5）促进靶细胞凋亡，并对正常细胞无明显毒性作用。相比外周血液中的

NK细胞，肝脏NK细胞对肿瘤细胞有很高的细胞毒性，富含更多的红心囊泡和颗粒，并且表达更高的TRAIL、穿孔素、粒酶B等，肝脏中的NK细胞与外周血液23

和其他器官中相比有很大差异，这表明肝脏中的NK细胞除了在肿瘤免疫和宿主防御微生物病原体的固有免疫外还有特殊的功能[6]。

至今，很多研究发现NK细胞在自身免疫性肝炎、原发性硬化性胆管炎及原发性胆汁性肝硬化中出现功能失调。活化的NK细胞可以通过直接杀伤肝细胞或者通过产生细胞因子影响肝细胞参与肝疾病的发病机制。NK细胞可以杀死肝损伤动物模型中的同源的肝细胞、肝星状细胞和胆管上皮细胞[5]。梗阻性黄疸肝脏免疫紊乱近年来受到关注[18]，梗阻性黄疸伴随着Kuffer细胞活化产生大量细胞TNF-α，TNF-α与肝损伤严重程度呈明显正相关[19]。胆汁淤积不仅损害免疫系统而且肝细胞功能和代谢（包括急性期蛋白产生和补体），提示表明宿主防御机制被广泛的影响[20]。

本实验以梗阻性黄疸小鼠模型为研究对象，动态观察肝脏NK细胞变化，实验结果发现梗阻性黄疸伴随着肝脏免疫功能紊乱，Kuffer细胞活化产生大量TNF-α，NF-κB上调。第14天较第7天增多，与肝损伤呈正相关。肝脏NK1.1阳性细胞增多同时肝脏TRAIL表达增多，推断NK细胞出现免疫紊乱，推断NK细胞可能参与梗阻性黄疸肝损伤。

为了进一步证明肝脏NK细胞对梗阻性黄疸小鼠急性肝损伤的作用，本实验通过小剂量腹腔注射Toll样受体3（TLR3）激动剂、人工病毒RNA的模拟物Poly

I: C干预梗阻性黄疸小鼠模型，诱导NK细胞活化及外周血中NK细胞向肝内聚集。通过检测肝组织NK1.1mRNA表达量，结果Poly I: C干预组NK1.1 mRNA表达增加，表明Poly I: C诱导NK细胞肝内聚集成功。有研究表明，Poly I: C可引起轻微肝损伤[21]，本实验Poly I: C干预假手术组，结果表明本实验所用剂量可诱导NK细胞肝内聚集，对正常肝细胞无明显肝损伤作用。比较肝功能、肝脏病理学检查提示Poly I: C干预后梗阻性黄疸急性肝损伤加重，免疫组化结果回示肝脏NK细胞上调了NF-κB表达，同时增加梗阻性黄疸小鼠肝脏细胞因子TNF-α的含量，进一步验证肝脏NK细胞可能通过TRAIL途径参与梗阻性黄疸急性肝损伤。

近年来研究表明，活化的NK细胞可以通过TRAIL/NKG2D途径直接杀伤肝星状细胞（HSC）及通过产生细胞因子干扰素-γ（IFN-γ）抑制肝纤维化，同时许多临床研究也提示NK细胞对慢性肝病患者有抗肝纤维化作用。NK细胞改善纤维化已在CCl4、DDC饮食、日本血吸虫诱导肝纤维化模型中均得到证实。但是在酒精性肝硬化模型中，NK细胞/IFN-γ对HSC杀伤作用不显著，其具体机制包括（1）抑制NK细胞对活化HSC的杀伤作用，（2）通过TGF-beita1依赖方式诱导

24

HSC抗NK细胞杀伤作用，（3）通过诱导SOCS蛋白中断FSC的IFN-γ/STAT1信号，

（4）通过诱导氧化应激抑制IFN-γ/STAT1信号。因此慢性酒精性肝硬化抑制NK细胞/IFN-γ抗纤维化的特性[8]。为研究肝脏NK细胞对梗阻性黄疸伴随的胆汁淤积性肝纤维化的作用，本实验，应用Poly I: C干预梗阻性黄疸小鼠模型，第14天HE染色、Masson三染色、α-SMA免疫染色结果表明，Poly I: C诱导NK细胞肝内聚集，加重了肝纤维化，由此推测梗阻性黄疸可能减弱NK细胞抗肝纤维化的作用。梗阻性黄疸肝损伤与酒精性肝损伤都伴随全身氧化应激反应，推测其机制可能为

HSC细胞活化增多，且梗阻性黄疸可能减弱NK细胞对活化HSC的杀伤作用。本研究通过构建梗阻性黄疸小鼠模型，应用Poly I: C干预诱导NK细胞肝内活

化及聚集，通过对比急性肝损伤及肝纤维化的变化，提示梗阻性黄疸小鼠模型中肝脏NK细胞可能通过TRAIL途径加重急性肝损伤，梗阻性黄疸减弱了肝脏NK细胞抗纤维化的作用。

25

# **5** 结论

1、梗阻性黄疸小鼠模型中，肝脏NK细胞含量增多，并与肝损伤严重程度相关，提示梗阻性黄疸伴随肝脏NK细胞免疫功能紊乱。

2、Poly I: C诱导肝脏NK细胞活化与聚集，加重梗阻性黄疸急性肝损伤，肝脏

NK细胞可能通过TRAIL途径参与梗阻性黄疸急性肝损伤。

3、Poly I: C诱导的肝脏NK细胞活化与聚集，加重了梗阻性黄疸肝纤维化，提示梗阻性黄疸减弱了肝脏NK细胞的抗肝纤维化作用，推测其机制可能与HSC活化增多及梗阻性黄疸抑制了肝脏NK细胞对活化的HSC的杀伤作用有关。

26

参考文献

[1] Kemp R, Castro-e-Silva Od, Santos JS, et al. Evaluation of the mitochondrial respiration of cardiac myocytes in rats submitted to mechanical bile duct obstruction [J]. Atca Cir Bras. 2008; 23(1): 66-71.

[2] Vendemiale G, Grattagliano I, Lupo L, et al. Hepatic oxidative alterations in patients with extra-hepatic cholestasis. Effect of surgical drainage [J]. J Hepatol. 2002; 37(5): 601–605.

[3] Kemp R, Castro-e-Silva Od, Santos JS, et al. Evaluation of the mitochondrial respiration of cardiac myocytes in rats submitted to mechanical bile duct obstruction [J]. Acta Cir Bras. 2008; 23 Suppl 1: 66-71.

[4] Gäbele E, Froh M, Arteel GE, et al. TNF alpha is required for cholestasis -induced liver fibrosis in the mouse [J]. Biochem Biophys Res Commun. 2009; 378(3): 348-353.

[5] Fernández -Álvarez S, Gutiérrez -de Juan V, Zubiete-Franco I, et al. TRAIL-producing NK cells contribute to liver injury and related fibrogenesis in the context of GNMT deficiency [J]. Lab Invest. 2015; 95(2): 223-236.

[6] Bin Gao, Svetlana Radaeva, Ogyi Park. Liver natural killer and natural killer T cells: immunobiology and emerging roles in liver diseases [J]. Journal of Leukocyte Biology. 2009; 86 (3): 513-528.

[7] Radaeva S, Sun R, Jaruga B, et al. Natural killer cells ameliorate liver fibrosis by killing activated stellated cells in NKG2D-dependent and tumor necrosis factor-relatedapoptosis-inducing ligand-dependent manners [J]. Gastroenterology. 2006; 130(2): 435-452.

[8] Jeong WI, Park O, Gao B. Abrogation of the antifibrotic effects of natural killer cells/interferon- gamma contributes to alcohol acceleration of liver fibrosis [J]. Gastroenterology. 2008; 134: 248–258.

[9] Tag CG, Sauer-Lehnen S, Weiskirchen S, et al. Bile duct ligation in mice: induction of inflammatory liver injury and fibrosis by obstructive cholestasis [J]. J Vis Exp. 2015; 10(96): 52438.

[10] Papakostas C, Bezirtzolou E, Pitiakoudis M, et al. Endotoxinemia in the portal and the systemic circulation in obstructive jaundice [J]. Clin Exp Med. 2003; 3(2): 124-128.

[11] Addley J, Mitchell RM. Advances in the investigation of obstructive jaundice[J]. Curr Gastroenterol Rep. 2012; 14(6): 511-9.

[12] 姜双, 王志新, 刘艳秋, 等. 梗阻性黄疸肝细胞损伤机制研究现状[J]. 医学综述. 2002; 8 (6): 343-344.

[13] 成小林, 时开网, 徐锦, 等. 梗阻性黄疸大鼠NF-κB的变化及其对免疫应答的影响[J]. 世界华人消化杂志. 2009; 17(7): 662-666.

[14] Tsukamoto H, She H, Hazra S, et al. Anti-adipogenic regulation underlies hepatic stellate cell transdifferentiation[J]. J Gastroenterol Hepatol. 2006; 21 Suppl 3: S102-5.27

[15] Gao B, Jeong WI, Tian Z. Liver: an organ with predominant innate immunity[J]. Hepatology. 2008; 47(2): 729–736.

[16] Notas G, Kisseleva T, Brenner D. NK and NKT cells in liver injury and fibrosis[J]. Clin Immunol. 2009; 130: 16–26.

[17] Wisse, E., van't Noordende J M, van der Meulen J, et al. The pit cell: description of a new type of cell occurring in rat liver sinusoids and peripheral blood[J]. Cell Tissure Res. 1976; 173(4), 423-435.

[18] Kawarabayashi N, Seki S, Hatsuse K, et al. Immunosuppression in the livers of mice with obstructive jaundice participates in their susceptibility to bacterial infection and tumor metastasis [J]. Shock, 2010; 33(5): 500-506.

[19] 戴峰, 王卫星, 丁佑铭, 等. 大鼠梗阻性黄疸时肝细胞凋亡与肿瘤坏死因子的关系[J]. 中华实验外科杂志, 2003; 22(1): 51-2.

[20] Gäbele E, Froh M, Arteel, et al. TNF alpha is required for cholestasis -induced liver fibrosis in the mouse [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 378(3): 348-353.

[21] He J, Lang G, Ding S, et al. Pathological role of interleukin-17 in poly I: C–induced hepatitis[J]. PloS One. 2013; 8(9): e73909.

28

# 综述

# 肝脏自然杀伤细胞：免疫Th物学及其在肝脏疾病中的作用

陈琳综述张宏伟审校

前 言

肝脏是人体重要且复杂的实质性器官，其在新陈代谢中的作用广为人知，包括胆汁合成，蛋白合成，脂肪代谢和糖代谢等。近年来，越来越多的研究关注肝脏的免疫功能[1][2]。由于独特的解剖位置和血液供应，肝脏持续不断的暴露于来自胃肠道的病原体[3]。肝脏的免疫系统需要安全清除病原体和毒物，并对无害的食物抗原免疫耐受，过度的或者不适当的免疫反应会导致肝脏自身免疫学疾病或者慢性感染[4]，因此肝脏拥有一个强大的固有免疫系统。肝脏富含各种天然免疫细胞，其中的自然杀伤细胞（natural killer, NK）细胞在宿主防御和保持免疫平衡中发挥重要作用[5]。肝脏NK细胞在20世纪70年代首次描述为“pit cell”

[6]，如今研究表明在小鼠和人肝脏中有两种不同的类型，肝脏NK（Resident NK）

细胞和传统NK（conventional NK, cNK）细胞[7][8]。越来越多证据表明，NK细胞的功能受周围组织环境影响。在正常肝脏中，相对于外周血中的NK细胞，肝脏的NK细胞对肿瘤细胞有更高的细胞毒性并表达更高水平的细胞毒性介质[9]。慢性丙肝病毒（Hepatitis C virus, HCV）感染时，肝内NK细胞细胞毒性受损[10]，而慢性肝炎病毒感染或IFN-α抗病毒治疗诱导的肝脏NK细胞活化在控制病毒感染和肝纤维化中发挥重要作用[11-13]。慢性酒精消耗伴随着NK细胞功能的抑制，促进酒精性肝疾病的病理进程[14]。本文综述了肝脏NK细胞在抗病毒、抗纤维化、抗肿瘤等反应中的功能作用。

29

**1肝脏的解剖与免疫系统组成**

肝脏位于腹腔的右上象限，是人体最大的实质性器官。肝脏具有双重血供，80%的血供来自胃肠道的门静脉，20%来自富含氧的肝动脉[15]。门静脉和肝动脉会合并共同分支于肝实质的中央静脉，血液经过交通的血窦网后通过中央静脉离开肝实质[16]。肝血窦的直径很窄（5-7um）[17]，血压明显低于系统循环压力，导致肝血窦的相对低血流。低流速的血流利于肝脏固有免疫细胞对有害物质的清除，并放大了循环淋巴细胞与肝血窦内皮细胞间的相互作用[18]。

肝脏由多种功能的细胞构成。肝细胞是肝实质细胞，约占肝细胞总数的三分之二[2]。非实质细胞主要分布于组织中的窦状隙，包括窦状隙内皮细胞[19]、肝巨噬细胞（Kuffer cells, KCs）[20]、淋巴细胞和髓细胞[21]。肝细胞通过Disse间隙与内皮细胞分开，Disse间隙中包含肝星状细胞（Hepatic stellate cells, HSCs）和细胞外基质蛋白[16]。作为一个淋巴器官，肝脏含有大量天然淋巴细胞（比如NK细胞、NKT细胞，γδT细胞）和获得性淋巴细胞（比如αβT细胞和B细胞）。在人类中，大约65%的肝脏淋巴细胞由NK细胞、NKT细胞和γδT细胞组成[22]。这些细胞在特定的环境或者病理条件下增生，在肝脏免疫中早期防御病原体中发挥重要作用。

**2 NK细胞**

NK细胞最早在20世纪70年代因无需提前的刺激而能够直接杀伤肿瘤细胞被命名[23][24]，NK细胞除了是细胞毒性淋巴细胞，也可产生特定细胞因子如IFN-γ，通过细胞IFN-γNK细胞参与获得性免疫反应[25]。尽管NK细胞因缺乏抗原特异性受体被归类于固有免疫细胞，一些线索表明NK细胞可以介导抗原特异性免疫记忆，挑战了传统固有免疫和获得性免疫概念的区别[26]。

NK细胞可以通过NK细胞表面特异性标志识别，人类的NK细胞根据细胞表面CD56的表达情况，主要分成两个主要类型：CD56brightCD3-和CD56dimCD3-细胞，90%的NK细胞为对肿瘤细胞有更高毒性的CD56dimCD3，剩余10%为能产生更多的细胞因子的CD56brightCD3-[27][28]. DX5或者NK1.1被广泛用于小鼠NK细胞的识别（CD3-DX5+或者CD3-NK1.1+）[29]，大鼠NK细胞通过NKR-P1A（CD3-NKR-P1A+）。有些NK细胞也表达树突状细胞的（DC）

30

的标志，这些细胞被称为NKDC[30]. NK细胞的免疫效应作用由多种细胞表明活化或者抑制受体控制。NK细胞的活化受体主要包括自然细胞毒性受体（NKp46, NKp44和NKp30），CD16和C型凝集素受体（C-type lectin receptors, CLRs）

（CD94/NKG2C, NKG2D, NKG2E/H和NKG2F）[31]。一些活化性受体的配体，如NKG2D的配体（人类中是UL16结合蛋白和MHC-I相关性分子，小鼠中是RAE1、H60和MULT1分子），在细胞应激情况可被诱导活化，使应激的细胞易于被NK细胞溶解[32]。

**3肝脏NK细胞**

NK细胞在肝脏中含量丰富，在人类中约占肝脏淋巴细胞总数的25-40%，在小鼠中约占淋巴细胞总数的10%-20%。肝脏含有肝脏NK（resident NK）细胞和传统NK（conventional NK, cNK）细胞两种NK细胞。过去研究主要集中在人外周血中的NK细胞和小鼠脾脏中的NK细胞，他们被称为是cNK细胞。肝脏NK细胞在1976年首次被Wisse等人描述为“pit 细胞”，pit细胞是大鼠肝脏中的NK细胞，因这种细胞的细胞质内含有类似水果核特征的颗粒而被命名[6]。

十几年前，Kim等人无意中在小鼠肝脏中观察到出现频率较高的表型不成熟的NK细胞，这种细胞表达较低含量的表明NK细胞成熟的DX5、Mac-1和Ly49受体[33]。随后这种不成熟的NK细胞表型和功能得到了更深入的研究。尽管肝脏NK细胞表型上类似于不成熟的cNK细胞，但这些细胞更倾向留在肝脏中而不是转化为成熟的DX5+ cNK细胞，表明肝脏NK细胞保持稳态，骨髓衍生的cNK细胞能够迁移至肝脏中并进一步分化为肝脏特异性NK细胞（如图1）。有证据表明肝脏NK细胞与IL-2活化的脾脏NK细胞相似，它们表达相似类型的mRNA和蛋白，均表达更高的毒性效应物，产生更高的细胞毒性。相比外周血或脾脏中的NK细胞，肝脏NK细胞有不同的免疫表型、形态学特征和功能特点。与外周血中的NK细胞相比，肝脏NK细胞对肿瘤细胞有更高的毒性、具有更多的红核囊泡和颗粒，并表达更高的TRAIL、穿孔素、颗粒酶B等[34]。

31



图1 两种不同来源的肝脏NK细胞

注：成人肝脏中含有2种NK细胞，即骨髓衍生的传统NK（cNK）细胞和肝脏造血祖细胞发展而成肝脏NK细胞(iver resident NK cells)

**4肝脏NK细胞与肝再Th**

肝脏一个显著的特点是强大的再生功能，超过50%肝脏遭到急性损伤后可以在相对短的时间内恢复。这个过程被多种多样的细胞因子、生长因子和激素控制[35-37]。研究肝再生最常用的啮齿动物模型是在切除三分之二的部分肝脏，大约10-14周后肝脏会恢复到原来的重量。研究表明肝脏部分切除术后NK细胞在肝内聚集并调节肝再生。应用anti-anti-asialo GM1抗体去除NK细胞或者应用NK细胞抑制药物能够促进肝再生[38][39]，Poly I: C或者病毒感染诱导的NK细胞活化抑制的了肝再生[39]。

**5肝脏NK细胞与肝硬化**

32

不管何种病因，慢性反复肝细胞破坏均可导致伴随胶原蛋白沉积的肝纤维化，肝星状细胞（Hepatic stellate cells, HSCs）在肝纤维化过程中起关键作用[40]。正常的HSC在健康肝脏处于静息状态，细胞质内70%为维生素A。在肝损伤或者离体培养过程中，HSC活化并分化为以丢失维生素A和促进胶原表达的成肌纤维细胞。活化的HSC在慢性肝损伤中或者离体培养9-15代后逐渐衰老[41]。研究表明，NK细胞可以通过选择性杀伤早期活化或者衰老激活的HSCs，对静息和完全活化的HSC无明显杀伤作用[42-44]（见图2）。这是因为早期活化或者衰老激活的HSC表达更高的NK细胞活化配体（小鼠中为RAE-1，人类中为MICA），而静息和完全活化的星状细胞没有[43]。早期活化和衰老激活的HSC表达NK细胞活化配体可能是由于细胞内的维甲酸产物和DNA损伤[43][45]。并且，下调NK细胞抑制性配体和上调活化星状细胞的TRAIL受体的配体也有助于NK细胞对这些细胞杀伤的敏感性。除此之外，NK细胞活化的标志——IFN-γ的生成也是

有助于NK细胞抗纤维化的重要机制。IFN-γ不但可以直接抑制星状细胞活化，并且可以通过上调NK细胞表面的NKG2D和TRAIL的表达扩大NK细胞对星状细胞的细胞毒性[46]。最后，有研究表明NK细胞的活性与丙肝患者肝纤维化程度呈负相关。因此活化的NK细胞可能是治疗肝纤维化的新型治疗方法。



图 2 NK细胞与HSC反应

注：NK细胞杀伤早期活化和衰老激活的HSC而不是静息的或者完全活化的HSC。本图表示离体培养的HSC，早期活化的HSC，维生素A代谢成维甲酸，维甲酸可诱导小鼠RAE-1

（NK细胞活化配体）的表达。上调RAE-1激活NK细胞杀伤早期活化的HSC。完全活化的HSC丢失了维甲酸，不表达RAE-1,抵抗NK细胞的杀伤作用。在人衰老激活的HSC中，33

DNA损伤诱导MICA（NK细胞活化配体）的表达，MICA激活NK细胞，所以NK细胞杀伤衰老活化的HSC。

**6肝脏NK细胞与丙肝**

世界上有超过1.7亿丙肝病毒（Hepatitis C virus, HCV）感染者[47]，小数患者可以通过自身的免疫系统在急性感染期间自然清除亲肝病毒，60%-80%患者为终生慢性感染[48]，并导致严重的肝脏病理变化，20%-30%患者发展为肝硬化，其中1%-4%的患者发展为肝细胞肝癌[49]。在丙肝病毒急性感染发展为慢性感染中涉及HCV特异性T细胞的功能缺陷。T细胞是获得性免疫的重要效应细胞，而在抗病毒感染的固有免疫NK细胞是至关重要的效应细胞。体外实验研究表明，

HCV感染的肝癌细胞削弱NK细胞的功能。NK细胞与HCV感染的细胞接触下调了NK细胞表面的活化受体NKG2D和NKp30的表达，导致NK细胞功能减弱及功能抑制。这些发现表明HCV可能损伤NK细胞对感染细胞的效应功能。有趣的是，IFN-α预刺激的NK细胞可吓死HCV感染的肝癌细胞，这表明固有细胞因子（例如I型干扰素包括IFN-α和IFN-β、IL-8、IL-12、IL-15和IL-18）能增加NK细胞与HCV感染细胞的相互作用[50]。

丙肝病毒感染自然过程分为3个部分：潜伏期，此期感染HCV，但是未检测出肝炎和病毒血症；急性期，此期可检测出肝炎和病毒血症；慢性期：急性期后6个月开始，以持续性HCV感染和慢性肝脏炎症为特征[51]。NK细胞在丙型肝炎病毒感染的每一阶段都发挥十分重要的作用。感染早期指从潜伏期开始到急性期结束。在病程早期，NK细胞对抗HCV感染起重要的免疫保护作用，可能是因为NK细胞的免疫反应并非最佳，导致60-80%急性期患者发展为慢性感染[52]。慢性期NK细胞对HCV感染的作用与早期感染期不同，慢性期感染NK细胞持续活化，但是并不代表NK细胞所有方面的功能都增强。NK细胞的细胞毒性增强，而IFN-γ的生成减少。HCV靶向NK细胞的免疫逃逸策略可能有助于丙肝病毒的慢性感染进程。在慢性病程中，NK细胞可能控制HCV复制并调节肝纤维化[50]。尽管关于NK细胞与丙肝的研究有很大进步，但需建立生理模型（例如免疫活性小鼠模型）解决现有实验方法的问题，并进一步研究NK细胞在HCV感染的每一期的作用。

34

**7肝脏NK细胞与乙肝**

乙肝病毒(Hepatitis B virus, HBV)感染是人类最常见的慢性病毒感染之一。HBV不是细胞病变，当细胞免疫缺乏或通过药物抑制，在体的HBV复制率很高但是并未检测到发生病理结果[53, 54]。现已证明肝损伤实际上是由于宿主的抗病毒免疫反应。慢性HBV感染中，持续的肝脏炎症反应最后导致肝硬化和肝细胞肝癌[55]。固有免疫是抵抗病原体的第一道防线，功能包括识别危险信号、在感染早期控制病毒复制和分布并及时编排病毒特异性获得性免疫[56]。HBV不调节宿主细胞基因转录，导致HBV不诱导肝细胞内抗病毒免疫反应和肝内固有免疫反应，因此慢性HBV感染患者以长期高HBV负荷且无症状的免疫耐受为特点。因此过去认为抗HBV反应中固有免疫缺失。然而，一些研究表明了固有免疫在HBV清除中的积极作用。NK细胞作为固有免疫系统主要的组成部分参与抗病毒反应。

研究证明了NK细胞参与含RNA病毒（例如HCV, HIV）和DNA病毒（例如CMV）的抗病毒反应[57]，但是HBV感染者持续多年缺乏明显症状和肝损伤，因此感染早期很难被识别。并且只有大猩猩和树鼩能感染乙肝病毒[58]，导致此病模型不足。因此关于HBV感染早期的研究相对较少。目前有研究表明在乙肝急性期感染，NK细胞活化性受体表达增多，NK细胞抑制性受体表达减少。并且两个独立实验表明，NK细胞在细胞毒性活性和IFN-γ产物中增加多减少[59][60]。这些研究成果表明NK细胞参与早期HBV感染免疫反应。但是大部分研究来自于动物实验，来自人类的实验数据较少。

在HBV感染过程中，NK细胞通常扮演矛盾的角色，他们有抗病毒和免疫调节功能，同时促进肝损伤的病理过程。在慢性HBV感染的免疫激活阶段，NK细胞的细胞毒性增强，与肝细胞严重程度正相关，一定程度上改变了特定细胞因子并识别NKG2D和它的配体。除了细胞毒性效应物介导的肝损伤，细胞凋亡传输也是导致肝细胞死亡的重要因素。HBV患者肝脏中表达TRAIL的NK细胞含量增加，并且肝细胞上调了TRAIL死亡受体配体的表达。除此之外，活化的NK细胞可能通过Fas/Fas配体的相互作用诱导大量HBV感染的肝细胞变性，并参与HBV相关的慢加急性肝衰竭（acute-on-chronic liver failure, ACLF）的过程[61]。

在慢性HBV感染过程中，NK细胞出现功能异常，表现为分布比例、表型

35

和/或功能变化，NK细胞表现为更高的细胞毒性并损害抗病毒细胞因子的分泌等。但NK细胞在在HBV感染过程中的作用尚未明确，仍需进一步研究。

**8肝脏NK细胞与酒精性肝病（Alcoholic liver disease, ALD）和非酒精性脂肪肝(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)**

酒精消耗可增加未患有ALD个体的NK细胞毒活性，促进发展为酒精性肝损伤的发展。但是患有ALD的患者的NK细胞数量水平通常较低且细胞毒活性降低[62]。NK细胞活性降低减弱NK细胞的抗病毒、抗纤维化和抗肿瘤作用，因此促进ALD患者的病毒性肝炎的敏感性，加快了肝纤维化和肝细胞肝癌的进程。

NKT细胞在NAFLD中的作用已被深入研究[63]，而NK细胞在此疾病中的作用尚未明确。研究表明肥胖患者与对照组比较，循环血液中NK细胞减少且有细胞毒性更低。但是，有研究表明，患有非酒精性脂肪性肝炎（nonalcoholic steatohepatitis, NASH）的肥胖患者肝脏中的NK细胞数量和NK细胞相关毒性介质（如NKG2D、TRAIL和MICA/B mRNA）显著升高，而在NAFLD患者中升高程度较小[64]。MICA/B mRNA的表达与NAFLD活性评分和NASH患者肝细胞凋亡正相关。这种关系表明，活化的NK细胞促进NASH的病理生理过程。NASH中肝脏NK细胞活化由于这些患者中多种NK细胞活化细胞因子（例如IL-12, IL-18和IFN-γ）和配体的升高[65]。需要进一步研究阐明NASH中NK细胞的作用。

**9肝脏NK细胞与自身免疫性肝疾病**

NK细胞功能失调与人类多种自身免疫性肝脏疾病有关，包括自身免疫性肝炎（autoimmune hepatitis, AIH）、原发性硬化性胆管炎(primary sclerosing cholangitis, PSC)和原发性胆汁性肝硬化（primary biliary cirrhosis, PBC）。NK细胞在这些疾病发病机制中发挥重要作用。通过观察poly I: C诱导的小鼠NK细胞依赖性肝炎，结果表明NK细胞可能在AIH的病理生理过程发挥关键作用。尽管PSC的发病机制很大程度是未知的，值得注意的是，在PSC患者中，肝脏NK细胞细胞毒性降低，抵消NK细胞通过TRAIL一类机制介导的胆管细胞破坏。活化

36

的NK细胞通过TRAIL依赖途径或者产生增强抗原呈递细胞功能及促进获得性免疫的细胞因子，杀伤胆管内皮细胞促进PBC的进展，相反，NK细胞可能通过产生细胞因子IL-10和杀死自体树突状细胞（Dendritic Cells, DCs）或者T细胞抑制获得性免疫反应减缓PBC进展[66]。

**10肝脏NK细胞与肝细胞肝癌（Hepatocellular carcinoma, HCC）**

HCC是临床常见的恶性肿瘤，在全球癌症发病率中居第5位，死亡率居第3位[67]。HCC患者主要在发展中国家，HBV与HCV是主要的病因。肝脏NK细胞在正常肝脏中含量丰富，肝脏NK细胞相对于其他器官的NK细胞有更高溶细胞活性，这在肿瘤的免疫监视中发挥重要作用。肝脏NK细胞对肿瘤细胞的清除作用主要通过穿孔素、颗粒酶、TRAIL和IFN-γ，但是目前NK细胞与HCC之间相互作用的机制尚不明确，有临床研究表明HCC患者外周血中的NK细胞与肝癌的生存率和预后有直接关系。HCC患者外周血中的NK细胞数量减少。主要是CD56dimCS16posNK细胞减少显著，导致CD56bright和CD56dim比例显著上升。HCC患者NK细胞出现功能失调，晚期HCC患者NK细胞通常活性受损（例如TNF-α和IFN-γ生成减少）。越来越多证据强烈支持晚期HCC患者中，NK细胞的功能失调或功能疲劳促进肝癌的病理发展[68]。

**11其他肝脏疾病**

胆道闭锁是病因不明的婴幼儿渐进性的成纤维闭塞性胆管病，破坏肝脏胆汁流入肠道。实验模型研究发现NK细胞通过NKG2D依赖途径杀死胆管细胞，是胆管细胞损伤的的主要启动子。在胆管闭锁中发现NK细胞不可控制的活化好像是因为T调节细胞的后天缺失，允许肝脏DC细胞持续活化NK细胞[69]。

37

展 望

在过去20年里，越来越多证据表明NK细胞不但抑制肝脏病毒性肝炎、肝纤维化、癌变，并且促进肝细胞损伤（见图3）。尽管这些研究成果让我们对肝脏疾病的发病机制和治疗有更深的认识，但仍需要更多的研究阐明NK细胞的多种功能，并将这些研究发现转化为临床实践与治疗。



图3 NK细胞在人类肝脏疾病中的作用

注：很多种疾病中，比如病毒性肝炎、脂肪肝、肝纤维化、肝硬化、肿瘤和其他疾病中，肝脏NK细胞发生了显著变化。NK细胞在肝脏中聚集并且表达更高水平的细胞毒性和细胞因子产物，以此益于抑制病毒感染、肿瘤生长和肝纤维化，但是同样也促进了肝细胞损害。除此之外，慢性肝脏疾病中伴随着NK细胞数量减少和NK细胞细胞毒性和细胞因子产物的破坏。

38

参考文献

[1] Crispe IN. The liver as a lymphoid organ. Annu Rev Immunol. 2009; 27: 147–163.

[2] Racanelli V, Rehermann B. The liver as an immunological organ. Hepatology. 2006; 43: S54–62.

[3] Son G, Kremer M, Hines IN. Contribution of gut bacteria to liver pathobiology. Gastroenterol Res Pract. 2010; 2010: 453563.

[4] HudspethK, PontariniE, TentorioP, et al. The role of natural killer cells in autoimmune liver disease: a comprehensive review. J Autoimmun. 2013; 46: 55–65.

[5] Gao B, Jeong WI, Tian Z. Liver: an organ with predominant innateimmunity. Hepatology. 2008; 47: 729–736

[6] Wisse E, van't Noordende JM, van der Meulen J, et al. The pit cell: description of a new type of cell occurring in rat liver sinusoids and peripheral blood. Cell Tissure Res. 1976; 173(4): 423-435.

[7] Sojka DK, Tian Z, Yokoyama WM. Tissue-resident natural killer cells and their potential diversity. Semin Immunol. 2014; 26(2): 127–131.

[8] Peng H, Wisse E, Tian Z. Liver natural killer cells: subsets and roles in liver immunity. Cell Mol Immunol. 2015; 7: 1-9.

[9] Ishiyama K, Ohdan H, Ohira M, et al. Difference in cytotoxicity against hepatocellular carcinoma between liver and periphery natural killer cells in humans. Hepatology. 2006; 43(2): 362–372.

[10] Varchetta S, Mele D, Mantovani S, et al. Impaired intrahepatic natural killer cell cytotoxic function in chronic hepatitis C virus infection. Hepatology. 2012; 56(3): 841–849.

[11] Ahlenstiel G, Titerence RH, Koh C, et al. Natural killer cells are polarized toward cytotoxicity in chronic hepatitis C in an interferon-alfa-dependent manner. Gastroenterology. 2010; 138(1): 325–335. e3-2.

[12] Ahlenstiel G, Edlich B, Hogdal LJ, et al. Early changes in natural killer cell function indicate virologic response to interferon therapy for hepatitis C. Gastroenterology. 2011; 141(4): 1231–1239. 1239 e1-2.

[13] Krämer B, [Körner C,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=K%C3%B6rner%20C%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22532190) Kebschull M, et al. Natural killer p46High expression defines a natural killer cell subset that is potentially involved in control of hepatitis C virus replication and modulation of liver fibrosis. Hepatology. 2012; 56(4): 1212-1213.

[14] Jeong WI, Park O, Gao B. Abrogation of the antifibrotic effects of natural killer cells/interferon- gamma contributes to alcohol acceleration of liver fibrosis. Gastroenterology. 2008; 134(1): 248–258.

[15] Jenne CN, Kubes P. Immune surveillance by the liver. Nat Immunol. 2013; 14(10): 996–1006.39

[16] Adams DH, Eksteen B. Aberrant homing of mucosal T cells and extra-intestinal manifestations of inflammatory bowel disease. Nat Rev Immunol. 2006; 6(3): 244–251.

[17] MacPhee PJ, SchmidtEE, GroomAC. Intermittence of blood flow in liver sinusoids, studied by high-resolution in vivo microscopy. Am J Physiol 1995; 269(5 Pt 1): G692–698.

[18] Jenne CN, Kubes P. Immune surveillance by the liver. Nat Immunol. 2013; 14(10): 996–1006.

[19] WisseE. An ultrastructural characterization of the endothelial cell in the rat liver sinusoid under normal and various experimental conditions, as a contribution to the distinction between endothelial and Kupffer cells. J Ultrastruct Res. 1972; 38(5): 528–562.

[20] Wisse E. Observations on the fine structure and peroxidase cytochemistry of normal rat liver Kupffer cells. J Ultrastruct Res 1974; 46: 393–426.

[21] KmiećZ. Cooperation of liver cells in health and disease. Adv Anat Embryol Cell Biol. 2001; 161: III–XIII, 1–151.

[22] Doherty DG, O'Farrelly C. Innate and adaptive lymphoid cells in the human liver. Immunol Rev 2000; 174: 5–20.

[23] HerbermanRB, Nunn ME, Lavrin DH. Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic acid allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity. Int J Cancer 1975; 16(2): 216–229.

[24] KiesslingR, KleinE, WigzellH." Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. Eur J Immunol. 1975; 5(2): 112–117.

[25] Ferlazzo G, Morandi B. Cross-talks between natural killer cells and distinct subsets of dendritic cells. Front Immunol. 2014; 5: 159.

[26] Marcus A, Raulet DH. Evidence for natural killer cell memory. Curr Biol. 2013; 23(17): R817–820.

[27] Caligiuri M A. Human natural killer cells. Blood. 2008; 112(3)**:** 461–469.

[28] Poli A, Michel T, [Thérésine M,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Th%C3%A9r%C3%A9sine%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=19278419) et al. CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset. Immunology. 2009; 126(4)**,** 458–465.

[29] Koo, GC, Dumont, F J, Tutt M, et al. The NK-1.1(–) mouse: a model to study differentiation of murine NK cells. J. Immunol*.* 1986; 137(12): 3742–3747.

[30] Plitas G, Chaudhry UI, Kingham TP, et al. NK dendritic cells are innate immune responders to Listeriamonocytogenes infection. J Immunol. 2007; 178(7)**,** 4411–4416.

[31] Cheng M, Chen Y, Xiao W, et al. NK cell-based immunotherapy for malignant diseases. Cell Mol Immunol. 2013; 10(3): 230–252.

[32] LanierLL. NK cell recognition. Annu Rev Immunol. 2005; 23: 225–274.

[33] Kim S, lizuka K, Kang HS, et al. In vivo developmental stages in murine natural killer cell maturation. Nat Immunol. 2002; 3(6): 523–528.

[34] Gao B, Radaeva S, Park O. Liver natural killer and natural killer T cells: immunobiology and emerging roles in liver diseases. J Leukoc Bio. 2009; 86 (3): 513-528.40

[35] Michalopoulos GK, DeFrances M. Liver regeneration. Adv Biochem. Eng Biotechnol*.* 2005; 93, 101–134.

[36] Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ. Liver regeneration. J Hepatology. 2012; 57(3)**:** 692-694.

[37] Taub R. Liver regeneration: from myth to mechanism. Nat Rev Mol Cell Biol*.* 2004; 5(10): 836–847.

[38] Tamura F, Masuhara A, Sakaida I, et al. FK506 promotes liver regeneration by suppressing natural killer cell activity. J Gastroenterol Hepatol*.* 1998; 13(7): 703–708.

[39] Kato T, Sato Y, Takahashi S, et al. Involvement of natural killer T cells and granulocytes in the inflammation induced by partial hepatectomy. J Hepatol. 2004; 40(2): 285–290.

[40] Puche JE, Saiman Y, Friedman SL. Hepatic stellate cells and liver fibrosis. Compr Physiol. 2013; 3(4): 1473–1492.

[41] Schnabl B, Purbeck CA, Choi YH, et al. Replicative senescence of activated human hepatic stellate cells is accompanied by a pronounced inflammatory but less fibrogenic phenotype. Hepatology. 2003; 37(3): 653–664.

[42] Melhem A, Muhanna N, Bishara A, et al. Anti-fibrotic activity of NK cells in experimental liver injury through killing of activated HSC. J Hepatol. 2006; 45(1), 60–71.

[43] Krizhanovsky V, Yon M, Dickins RA, et al. Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. Cell. 2008; 134(4): 657–667.

[44] Muhanna N, Doron S, Wald O, et al. Activation of hepatic stellate cells after phagocytosis of lymphocytes: a novel pathway of fibrogenesis. Hepatology. 2008; 48(3): 963–977.

[45] Gasser S, Orsulic S, Brown E J, et al. The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor. Nature. 2005*;* 436(7054): 1186–1190.

[46] Jeong, WI, Park O, Radaeva S, et al. STAT1 inhibits liver fibrosis in mice by inhibiting stellate cell proliferation and stimulating NK cell cytotoxicity. Hepatology; 44(6), 1441–1451.

[47] Alter HJ, Seeff LB. Recovery, persistence, and sequelae in hepatitis C virus infection: a perspective on long-term outcome. Semin Liver Dis. 2000; 20(1): 17–35.

[48] Rehermann B. Hepatitis C virus versus innate and adaptiveimmune responses: a tale of coevolution and coexistence. J Clin Invest. 2009; 119(7): 1745-1754.

[49] Lee MH, Yang HI, Yuan Y, et al. Epidemiology and natural history of hepatitis C virus infection. World J Gastroenterol. 2014; 20(28): 9270-9280.

[50] Yoon JC, Yang CM, Song Y, et al. Natural killer cells in hepatitis C: Current progress. World J Gastroenterol. 2016; 22(4): 1449-1460.

[51] Rehermann B. Pathogenesis of chronic viral hepatitis: differentialroles of T cells and NK cells. Nat Med. 2013; 19(7): 859-868.

[52] Rehermann B, Nascimbeni M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. Nat Rev Immunol. 2005; 5(3): 215-229.

[5353] Guidotti LG, Chisari FV. Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis. Annu Rev Pathol. 2006; 1: 23–61.41

[54] Guidotti LG, Rochford R, Chung J, et al. Viral clearance without destruction of infected cells during acute HBV infection. Science. 1999; 284(5415): 825–429.

[55] Ferrari C, Missale G, Boni C, et al. Immunopathogenesis of hepatitis B. J Hepatol. 2003; 39 Suppl 1: S36–42.

[56] Xu L, Yin W, Sun R, et al. Kupffer cell-derived IL-10 plays a key role in maintaining humoral immune tolerance in hepatitis B virus-persistent mice. Hepatology. 2014; 59(2): 443–452.

[57] Orange JS, Fassett MS, Koopman LA, et al. Viral evasion of natural killer cells. Nat Immunol. 2002; 3(11): 1006–1012.

[58] Fletcher SP, Chin DJ, Ji Y, et al. Transcriptomic analysis of the woodchuck model of chronic hepatitis B. Hepatology. 2012; 56(3): 820–830.

[59] Zhao J, Li Y, Jin L, et al. Natural killer cells are characterized by the concomitantly increased interferon-gamma and cytotoxicity in acute resolved hepatitis B patients. PLoS One. 2012; 7(11): e49135.

[60] Lunemann S, Malone DF, Hengst J, et al. Compromised function of natural killer cells in acute and chronic viral hepatitis. J Infect Dis. 2014; 209(9): 1362–1373.

[61] Wu SF, Wang WJ, Gao YQ. Natural killer cells in hepatitis B virus infection. Braz J Infect Dis. 2015; 19(4): 417-425.

[62] Laso FJ, Almeida J, Torres E, et al. Chronic alcohol consumption is associated with an increased cytotoxic profile of circulating lymphocytes that may be related with the development of liver injury. Alcohol Clin Exp Res. 2010; 34(5): 876–885.

[63] O'Shea D, Cawood TJ, O'Farrelly C, et al. Natural killer cells in obesity: impaired function and increased susceptibility to the effects of cigarette smoke. PLoS One. 2010; 5(1): e8660.

[64] Kahraman A, Schlattjan M, Kocabayoglu P, et al. Major histocompatibility complex classI-related chains A and B (MIC A/B): a novel role in nonalcoholic steatohepatitis. Hepatology. 2010; 51(1): 92–102.

[65] Bertola A, Bonnafous S, Anty R, et al. Hepatic expression patterns of inflammatory and immune response genes associated with obesity and NASH in morbidly obese patients. PLoS One. 2010; 5(10): e13577.

[[66] Hudspeth K,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Hudspeth%20K%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23880068) [Pontarini E,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Pontarini%20E%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23880068) [Tentorio P,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Tentorio%20P%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23880068) et al. The role of natural killer cells in autoimmune liver disease: a comprehensive review. J Autoimmun. 2013; 46: 55-65.

[67] Waller LP, Deshpande V, Pyrsopoulos N. Hepatocellular carcinoma: A comprehensive review. World J hepatol. 2015; 7(26): 2648-2663.

[[68] Sun C,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Sun%20C%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=26073325) [Sun HY,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Sun%20HY%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=26073325) [Xiao WH](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Xiao%20WH%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=26073325), et al. Natural killer cell dysfunction in hepatocellular carcinoma and NK cell-based immunotherapy. Acta Pharmacol Sin. 2015; 36(10): 1191-1199.

[[69] TianZ,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Tian%20Z%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23111952) [ChenY,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Chen%20Y%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23111952) [GaoB.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Gao%20B%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23111952) Naturalkillercellsinliverdisease. Hepatology. 2013; 57(4): 1654-1662.42

# 个人简历及在学期间发表的学术论文与研究成果

**个人简历**

姓名：陈琳性别：女

出生年月：1989年10月研究方向：肝胆胰外科学

**教育背景**

2009.09-2014.06郑州大学/医学院临床医学获医学学士学位

2014.07-2016.06郑州大学/郑州大学人民医院临床医学七年制获医学硕士学位

**在学期间研究成果**

1、**陈琳**,付强,唐强,刘传江,张莉,张宏伟.梗阻性黄疸小鼠模型肝脏自然杀伤细胞水平变化及意义.中华实用诊断与治疗杂志.2016;30(1):27-30.

2、**陈琳**，付强，唐强，刘传江，楚皓源，张辉，张宏伟.肝脏自然杀伤细胞对梗阻性黄疸小鼠模型急性肝损伤的影响及机制.中华实验外科杂志.2016; 33(3)：659-61.

3、Fu Q, Qin T, **Chen L**, Liu CJ, Zhang X, Wang YZ, Hu MX, Chu HY, Zhang HW. MiR-29a up-regulation in AR42J cells contributes to apoptosis via targeting TNFRSF1A gene in acute pancreatitis. World Journal of Gastroenterology.2016;22(20):4881-4890.

4、付强，秦涛，刘传江，**陈琳**，楚皓源，胡明星，王玉柱，张宏伟.微小RNA-135a 通过抑制靶基因

Sp53的表达促进大鼠胰腺腺泡细胞凋亡.中华实验外科杂志.2016;33(3)：666-669.

5、刘莉娜，崔晶，甘冠华，潘亮，**陈琳**，乔呈瑞，王忠全.双抗体夹心ELISA检测旋毛虫循环抗原实验条件的研究.中国病原微生物杂志.2013;8(5)：423-425.

43

致**谢**

时光荏苒，回首充实的两年硕士生生活，感慨万千。

首先，诚挚感谢我的导师张宏伟教授对我的辛勤培养、不倦教诲和无微不至的关怀。感谢导师在本研究实验设计、实施及论文撰写中对我的严格要求和支持鼓励，感谢导师在我临床学习中的言传身教，感谢导师对我生活的关心和帮助。张宏伟教授以严谨的治学之道、宽厚仁慈的胸怀、积极乐观的生活态度，为我树立了一辈子学习的典范。

衷心感谢郑州大学人民医院肝胆胰外科张莉、唐强、秦涛、薛飞、王玉柱、胡明星医师在我临床实践中给予的精心指导。感谢刘传江、付强、罗乾坤等师兄弟们在我课题研究、工作学习和生活中的和帮助。

感谢郑州大学人民医院中心实验室的孙恺、丁松泽、李雅欣、夏彦清老师为我提供良好的实验环境，感谢王慧萌、马香香、李亚坤、张思宇、陈明凯等同学在学习实验操作技能、统计学方法等方面对我的帮助。感谢郑州大学基础医学院任老师在本实验病理切片制作的指点和帮助，感谢郑州大学人民医院检验科在本实验肝功能测定的帮助。

感谢郑州大学人民医院肝胆外科陈瑞护士长及许丽霞、张辉等全体护理人员对我学习和生活上给予的帮助！

最后，衷心感谢我挚爱的双亲和姐姐、弟弟，他们对我的关爱和支持永远是我前进的动力！

谨以此文献给所有关心和帮助我的人们！

44