

论著·临床研究

不同阶段原发性胆汁性胆管炎患者外周血 T 淋巴细胞亚群变化

李卓敏¹, 张牧之^{2#}, 王晓宁¹, 刘 晴¹, 郑芳芳¹, 古 媛¹,
韩 旭¹, 田 野¹, 聂秋燕¹, 张然星³, 闫惠平⁴, 谭延国^{1△}

(1. 首都医科大学附属复兴医院检验科, 北京 100038; 2. 首都医科大学临床检验诊断学系, 北京 100038;
3. 中国中医科学院望京医院检验科, 北京 100102; 4. 首都医科大学附属北京佑安医院
感染与免疫研究中心, 北京 100061)

摘要:目的 了解原发性胆汁性胆管炎(PBC)患者疾病过程中外周血单个核细胞中 CD4⁺T 细胞及调节性 T 细胞(Treg)改变。方法 采用流式细胞术分析 36 例 PBC 患者(PBC 组)及 15 例健康对照者(健康对照组)外周血单个核细胞中 CD4⁺T 细胞及 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg 水平及不同疗效及临床分期 PBC 患者治疗前后 Treg 水平变化。结果 PBC 组外周血中 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg 水平 [(3.61±1.82)%] 比健康对照组 [(9.80±4.70)%] 水平显著降低, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。分析 PBC 患者治疗前 Treg 水平及实验室指标相关性, 可见 PBC 患者 Treg 水平与碱性磷酸酶 ($r=0.257, P=0.03$)、IgM ($r=0.241, P=0.045$) 等生化指标呈正相关; CD4⁺T 细胞与年龄呈负相关 ($r=-0.252, P=0.033$)。Treg 水平在不同疗效 PBC 患者组内及组间比较差异均无统计学意义 ($P>0.05$), 不同阶段的 PBC 患者比较仅在第 2 阶段可见显著升高, 差异有统计学意义 ($P=0.033$)。结论 PBC 患者疾病早期体内 Treg 水平显著高于其他分期, 熊去氧胆酸治疗不影响患者体内 Treg 水平。

关键词: 原发性胆汁性胆管炎; CD4⁺T 细胞; 调节性 T 细胞; 熊去氧胆酸

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.24.007

中图法分类号:R575.7

文章编号:1673-4130(2019)24-2970-04

文献标识码:A

Changes of T lymphocyte subsets in peripheral blood of patients with primary biliary cholangitis at different stages

LI Zhuomin¹, ZHANG Muzhi^{2#}, WANG Xiaoning¹, LIU Qing¹, ZHENG Fangfang¹, GU Yuan¹,
HAN Xu¹, TIAN Ye¹, NIE Qiuyan¹, ZHANG Ranxing³, YAN Huiping⁴, TAN Yanguo^{1△}

(1. Department of Clinical Laboratory, Fuxing Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100038, China; 2. Department of Clinical Laboratory Diagnosis, Capital Medical University, Beijing 100038, China; 3. Department of Clinical Laboratory, Wangjing Hospital of China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100102, China; 4. Department of Infection and Immunity, Beijing Youan Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100061, China)

Abstract: **Objective** To understand the change of CD4⁺T cells and Treg in peripheral blood mononuclear cells of patients with PBC. **Methods** Flow cytometry was used to analyze the levels of CD4⁺T cells and CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg in peripheral blood mononuclear cells of 36 patients with PBC (PBC group) and 15 healthy controls (healthy control group), as well as the changes of Treg levels in patients with PBC before and after treatment in different therapeutic effects and clinical stages. **Results** The percentage of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg of PBC group [(3.61±1.82)%] was significantly lower than healthy control group [(9.80±4.70)%], the difference was statistically significant ($P<0.05$). Analysis the correlation of Treg levels and laboratory indicators before treatment, ALP ($r=0.257, P=0.03$), IgM ($r=0.241, P=0.045$) were positively relationship with Treg levels, age of patients ($r=-0.252, P=0.033$) was negatively correlated with CD4⁺T cells. Treg level in PBC patients with different curative effects showed no statistical significance ($P>0.05$), while the level of Treg in PBC patients with different stages only increased significantly in stage 2, with statistical significance ($P=0.033$). **Conclusion** Treg levels in patients with PBC are significantly higher in the early stage of disease than in other stages, and ursodeoxycholic acid treatment do not affect Treg levels in pa-

作者简介:李卓敏,女,主管技师,主要从事临床免疫学研究; # 共同第一作者:张牧之,男,在读研究生,主要从事临床免疫学研究。

△ 通信作者, E-mail: tanyanguo61@126.com。

本文引用格式:李卓敏,张牧之,王晓宁,等.不同阶段原发性胆汁性胆管炎患者外周血 T 淋巴细胞亚群变化[J].国际检验医学杂志,2019,40(24):2970-2973.

tients.

Key words: primary biliary cholangitis; CD4⁺ T cells; regulatory T cells; ursodesoxycholic acid

原发性胆汁性胆管炎(PBC)是一种原因未明的慢性胆汁淤积性疾病,患者以碱性磷酸酶(ALP)和γ-谷丙酰转肽酶(GGT)升高为主,丙氨酸氨基转移酶(ALT)或天门冬氨酸基转移酶(AST)及免疫球蛋白(主要为IgM)可见中等程度升高,胆红素升高、清蛋白下降、凝血酶原时间(PT)延长常为疾病进展的表现。PBC的发病机制尚不明确,但遗传易感性及环境因素是其主要发病机制之一^[1]。已有研究表明,PBC患者受累胆管周围伴随淋巴细胞浸润,可见CD4⁺T、CD8⁺T细胞及B细胞,而且在PBC患者外周血及受累胆管周围均已被证实有丙酮酸脱氢酶复合体E2(PDC-E2)抗原特异性的CD4⁺的自身反应性T细胞的存在。CD4⁺CD25⁺T细胞具有免疫抑制功能,可抑制自身反应T细胞的增殖。很多学者提出PBC患者自身反应T细胞与免疫调节性T细胞(Treg)的失衡,可能是PBC的致病因素之一。本研究分析PBC患者外周血CD4⁺T细胞、Treg水平与肝功能指标的相关性,重点探讨不同临床分期及治疗前后PBC患者外周血CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺调节T细胞在其病情进展及机体免疫平衡维持中的可能作用,以尝试从免疫调节角度为PBC的早期治疗提供新的策略。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取2009年6月至2013年12月于北京佑安医院初次住院治疗且后期随访依从性较好36例PBC患者(PBC组),选取该36例患者随访过程中(治疗时间均大于或等于12个月)不同时间点标本进行下述研究。研究对象符合2009年美国肝病学会(AASLD)制定的PBC诊断标准,同时排除病毒性肝炎,酒精性及药物性肝损害^[2]。健康对照组均为北京佑安医院及首都医科大学的健康献血志愿者,共计15例。所有标本的采集均符合北京佑安医院科研伦理委员会要求且已签署知情同意。

1.2 仪器与试剂 荧光抗体抗CD4-FITC、抗CD25-percp和FoxP3-PE购自BD公司,RPM1640培养基购自北京Hyclone公司,二亚基甲砒(DMSO)及胎牛血清(PBS)购自Sigma公司。流式细胞仪FACS Calrbar为BD公司产品。

1.3 方法

1.3.1 淋巴细胞悬液的制备 乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝管分别采取不同时间段患者的外周静脉血且在6h内进行实验,用淋巴细胞分离液按说明书步骤分离淋巴细胞,以RPM1640离心洗涤细胞2次,加入细胞冻存液(DMSO:PBS=1:9)后调节细胞浓度,分装冻存入液氮以备。

1.3.2 细胞染色 提取适宜细胞迅速入37℃水浴箱进行复苏,转移至10mLR10(RPMI1640:PBS=9:1)中离心弃上清,以5mLR10重悬后计数细胞及存活率(10μL细胞悬液及10μL2%台盼蓝混合),37

℃孵箱培养。取培养的细胞,加PBS调节浓度为10⁷/mL后加100μL入BD流式管中同时加入CD4及CD25抗体各5μL,避光染色20min后PBS洗涤离心弃上清,加入Fix/Perm液1mL破膜后加入FoxP3抗体2.5μL染色30min,PBS洗涤后2%多聚甲醛固定,待测。

1.3.3 流式细胞仪检测及分析 染色后细胞在流式细胞仪上检测,用Cell Quest软件获取数据后然后分别用Cell Quest及Flowjo软件分析结果。

1.4 统计学处理 采用SPSS16.0统计软件进行分析,计数资料用行×列χ²检验;正态分布的定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用独立样本t检验进行组间比较;偏态分布定量资料以中位数和四分位数表示,采用Wilcoxon秩和检验;正态分布定量资料采用Pearson多元相关分析法;偏态分布定量资料采用Spearman秩相关分析法,P<0.05表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 流式实验分析不同组别间CD4⁺T细胞及CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg水平 比较36例随访依从性较好PBC患者治疗前时间点细胞与15例健康对照外周血单个核细胞中CD4⁺T细胞及CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg水平,可见PBC患者在熊去氧胆酸治疗前表达CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg水平显著低于健康对照组,CD4⁺T细胞数量未见显著变化,见表1。

表 1 两组 CD4 ⁺ T 及 CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ Treg 水平比较(%, $\bar{x} \pm s$)			
组别	n	CD4 ⁺ T 细胞	CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ Treg
健康对照组	15	47.72±5.88	9.80±4.70
PBC 组	36*	42.71±6.12	3.61±1.82
P		0.613	0.000

注:*表示治疗前的例数

2.2 CD4⁺T细胞、Treg水平与血清生化指标相关性分析 36例治疗前PBC患者的CD4⁺T细胞、Treg水平与相应时间点的血清生化值的相关性见表2,可见PBC患者外周血Treg水平与ALP($r=0.257$ 、 $P=0.03$)、IgM($r=0.241$ 、 $P=0.045$)等生化指标呈正相关;CD4⁺T细胞水平仅与年龄呈负相关($r=-0.252$ 、 $P=0.033$)。

2.3 不同临床阶段PBC患者及治疗前后Treg水平比较分析 根据文献[3]将PBC患者分为4个阶段,第1阶段:无临床症状且生化检查正常,AMA阳性,病理上有PBC表现;第2阶段:无临床症状但可见肝脏生化异常;第3阶段:出现临床症状,如乏力、瘙痒等;第4阶段:出现肝功失代偿征象。因第1阶段的PBC患者在临床较难发现,故本研究中的36例患者分别涵盖第2阶段(9例)、第3阶段(17例)、第4阶段(10例)患者,经方差分析可得,第2阶段患者Treg

水平 $[(3.88 \pm 1.70)\%]$ 显著高于第 3 阶段患者 $[(2.66 \pm 1.13)\%]$,差异有统计学意义($P < 0.05$)。各阶段 PBC 患者熊去氧胆酸治疗前后 Treg% 比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

2.4 不同疗效 PBC 患者治疗前后 Treg 水平比较
巴塞罗那标准判断患者应答状况:PBC 患者经过熊去氧胆酸治疗 1 年后 ALP 下降 40%或降至正常值范围

说明患者对熊去氧胆酸应答较佳^[4]。根据该标准将 36 例 PBC 患者分为无应答组 18 例,应答良好组 18 例。经分析后可见不同疗效 PBC 患者组内及组间比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$),见表 3,似乎可认为熊去氧胆酸治疗对 PBC 患者体内 Treg%可能无太大影响。

表 2 CD4⁺T 细胞、Treg 水平与生化指标相关性分析

项目	年龄	ALT	AST	ALP	GGT	IgG	IgA	IgM
CD4 ⁺ T								
<i>r</i>	-0.252	-0.12	-0.80	0.003	-0.136	0.164	-0.07	0.016
<i>P</i>	0.033	0.302	0.399	0.981	0.259	0.174	0.566	0.897
Treg								
<i>r</i>	-0.018	0.212	0.159	0.257	0.239	-0.103	0.01	0.241
<i>P</i>	0.324	0.076	0.084	0.03	0.045	0.395	0.937	0.045

表 3 不同疗效 PBC 治疗前后 CD4⁺T 及 Treg 水平变化(% , $\bar{x} \pm s$)

组别	CD4 ⁺ T 细胞		<i>P</i>	Treg		<i>P</i>
	治疗前	治疗后		治疗前	治疗后	
无应答组	40.68±9.26	38.28±12.22	0.526	2.86±1.28	2.65±1.45	0.511
应答良好组	41.35±11.7	41.01±10.09	0.631	3.13±1.51	3.35±2.21	0.662
<i>P</i>	0.549	0.722		0.564	0.256	

3 讨 论

自 1995 年日本学者 SAKAGUCHI 等^[5]首次报道 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞以来,很多学者投入到这类细胞的研究中并且取得了丰硕成果。FoxP3 是目前公认的 CD4⁺CD25⁺Treg 的特异性标志^[6]。CD4⁺CD25⁺T 细胞具有免疫抑制性,可抑制 CD4⁺T、CD8⁺T 等增殖反应及杀伤功能,从而抑制机体自身免疫反应、维持免疫稳定。PBC 患者由于环境、遗传等因素影响胸腺内 CD4⁺CD25⁺T 细胞的产生,外周血中 CD4⁺CD25⁺T 细胞数量减少,其抑制功能受到严重削弱,因而产生 Th1 细胞驱动的有害自身免疫应答。LAN 等^[7]研究在 PBC 患者中 FoxP3⁺Treg 数量相对减少,提示其在 FoxP3⁺Treg 细胞免疫耐受缺乏。许茵等^[8]及 CICHOSZ-LACH 等^[9]研究也指出 PBC 患者外周血 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg 调节性 T 淋巴细胞减少,免疫抑制功能减弱,对评估 PBC 患者细胞免疫状态和预后具有重要价值。本研究中结果与上述学者研究结果类似。

有研究报道 Treg 细胞比例降低会促使胆管上皮细胞表达 IL-17 受体,与体内 IL-17 结合后会促进多种炎症因子的释放,加剧炎性反应,这可能是其致病机制所在^[10]。本研究还显示,Treg 水平似乎能够对临床分期为Ⅱ、Ⅲ期的 PBC 患者进行区分,但总体而言区分能力不强。

本研究中未治疗的 PBC 患者,其自然病程中 Treg 水平与 ALP 及 IgM 水平呈正相关($r = 0.257$ 、

$P = 0.03$, $r = 0.241$ 、 $P = 0.045$),这与其他研究报道结果一致^[10],RONG 等^[11]认为 PBC 患者 Th17 细胞、Treg 细胞及相应细胞因子的异常参与自身免疫耐受的打破,在损害胆管上皮细胞中起着重要作用,同时 PBC 继发肝内胆管炎,导致肝脏合成 TB、ALP、GGT 等经胆道排泄异常。本研究后期尚需要加大病例数、细化治疗前 PBC 患者的临床分期和病理分期后进一步研究,方能得出一个更为可靠的结论。

熊去氧胆酸是目前被美国 FDA 批准用于 PBC 治疗的唯一药物,在体外实验中熊去氧胆酸被证实可抑制免疫球蛋白和细胞因子的产生、抑制淋巴细胞增殖及 CD4⁺T 淋巴细胞调节的靶细胞凋亡^[12]。熊去氧胆酸治疗可使 PBC 患者血清胆红素及 ALP、GGT 等降低,肝功能恢复正常,临床症状基本缓解,使具有调节作用的 CD4⁺CD25⁺T 细胞逐渐恢复正常水平,本研究中仅可见升高趋势,可能与患者差异及选择例数较少有关,期待后期扩大样本量继续观察。

本实验初步研究 PBC 患者外周血 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺T 细胞在不同阶段及治疗前后水平比较,提示 Treg 细胞可能通过抑制体内 T 细胞活化来延缓病情发展和减轻肝功能损伤,故今后 PBC 患者除早发现早治疗外,有望通过刺激机体产生 Treg 细胞来达到治疗效果。

4 结 论

PBC 患者与健康者对比可见外周血 Treg 水平显著降低且与 ALP、IgM 等生化指标呈正相关,且患者

疾病早期体内 Treg 水平显著高于其他分期。熊去氧胆酸治疗似乎不影响患者体内 Treg 水平,仅可见应答良好患者中呈现轻微上升趋势。

参考文献

[1] WEBB G J, HIRSCHFIELD G M. Primary biliary cholangitis in 2016: High-definition PBC: biology, models and therapeutic advances[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2017, 14(2): 76-78.

[2] LINDOR K D, GERSHWIN M E, Poupon R, et al. Primary biliary cirrhosis[J]. Hepatology, 2009, 50(1): 291-308.

[3] 王宝恩, 张定凤. 现代肝脏病学[M]. 北京: 科学出版社, 2003: 363-364.

[4] PARÉS A, CABALLERÍA L, RODÉS J. Excellent long-term survival in patients with primary biliary cirrhosis and biochemical response to ursodeoxycholic acid [J]. Gastroenterology, 2006, 130(3): 715-720.

[5] SAKAGUCHI S, SAKAGUCHI N, ASANO M, et al. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25) Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases [J]. J Immunol, 1995, 155(3): 1151-1164.

[6] SAKAGUCHI S, ONO M, SETOGUCHI R, et al. FoxP3⁺ CD4⁺ CD25⁺ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease[J]. Immunol Rev, 2006, 212(1): 8-27.

[7] LAN R Y, CHENG C, LIAN Z X, et al. Liver targeted and peripheral blood alterations of regulatory T cells in primary biliary cirrhosis [J]. Hepatology, 2006, 43(1): 729-737.

[8] 许茵, 杨小娟, 蒯守刚. 原发性胆汁性肝硬化患者外周血 CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ 调节性 T 细胞检测及其临床意义 [J]. 中国实验诊断学, 2014, 32(4): 592-594.

[9] CICHÓZ-LACH H, GRYWALSKA E, MICHALAK A, et al. Deviations in peripheral blood cell populations are associated with the stage of primary biliary cholangitis and presence of itching [J]. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2018, 66(6): 443-452.

[10] 陈小君, 宋洋. UDCA 联合维生素 D 治疗原发性胆汁性肝硬化患者外周血 T 细胞亚群变化及其对疗效的影响 [J]. 实用肝病杂志, 2018, 21(1): 80-83.

[11] RONG G, ZHOU Y, XIONG Y, et al. Imbalance between T helper type 17 and T regulatory cells in patients with primary biliary cirrhosis: the serum cytokine profile and peripheral cell population [J]. Clin Exp Immunol, 2009, 156(2): 217-225.

[12] 石光英, 谢敬东. 不同阶段原发性胆汁性肝硬化患者经不同剂量熊去氧胆酸治疗后外周血 T 淋巴细胞亚群及细胞因子的变化 [J]. 临床肝胆病杂志, 2015, 31(9): 1447-1451.

(收稿日期: 2019-03-11 修回日期: 2019-07-21)

(上接第 2969 页)

[11] 肖林林, 杜颖, 刘维薇, 等. 医学实验室认可进程中分析前过程的流程优化与监控 [J]. 检验医学, 2018, 33(4): 343-347.

[12] 张传宝, 黄宪章, 王兰兰, 等. 我国人群多中心参考区间研究—生化检验项目分析质量保证 [J]. 中华检验医学杂志, 2015, 38(5): 301-305.

[13] 曾洁, 陈文祥, 申子瑜. 参考区间研究现状概述 [J]. 中华检验医学杂志, 2010, 33(6): 570-573.

[14] 杨锡强, 易著文. 儿科学 [M]. 6 版. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 181-182.

[15] 康凤凤, 酃卫星, 王薇, 等. 全国 8 029 家医疗机构临床实验室 15 项质量指标现况分析 [J]. 中华医院管理杂志, 2018, 34(1): 59-63.

[16] PACIFICO L, OSBORN J F, NATALE F, et al. Procalcitonin in Pediatrics [J]. Adv Clin Chem, 2013, 59(1): 203-263.

[17] GALETTO-LACOUR A, ZAMORA S A, ANDREOLA B, et al. Validation of a laboratory risk index score for the identification of severe bacterial infection in children with fever without source [J]. Arch Dis Child, 2010, 95(12): 968-973.

[18] DOGAN, HACER, YILDIZ, et al. Sulfonated carbon black-based composite membranes for fuel cell; applica-

tions [J]. Bull Mater Sci, 2013, 36(4): 563-573.

[19] KHAN A N, SAWAN A, LIKOUREZOS A, et al. The usefulness of procalcitonin in the diagnosis of appendicitis in children: a pilot study [J]. Emerg Med Int, 2012, 20(12): 317504.

[20] HAHN W H, BAE C W. Reference intervals of serum cystatin C/creatinine ratio of 30 postnatal days in neonates [J]. Pediatr Nephrol, 2014, 29(2): 311.

[21] 吉颖, 周星, 姜丽, 等. 重庆地区儿童降钙素原生物参考区间的建立 [J]. 国际检验医学杂志, 2017, 38(14): 1935-1936.

[22] SAGER R, KUTZ A, MUELLER B, et al. Procalcitonin-guided diagnosis and antibiotic stewardship revisited [J]. BMC Med, 2017, 15(1): 15.

[23] VIJAYAN A L, VANIMAYA, RAVINDRAN S, et al. Procalcitonin: a promising diagnostic marker for sepsis and antibiotic therapy [J]. J Intensive Care, 2017, 5(1): 51.

[24] AZIZI R, MARZIYE H, BARAT I, et al. Procalcitonin in diagnosing the diabetic foot infection [J]. Iran J Clin Infect Dis, 2017, 6(2): 71-73.

(收稿日期: 2019-03-18 修回日期: 2019-06-12)