



胆道闭锁患者肝内胆管 $\gamma\delta$ T 细胞和调节性 T 细胞浸润及意义

李 康 阳 历 汤绍涛 王新星 雷海燕 张 茜

【摘要】 目的 研究胆道闭锁(Biliary atresia, BA)患者肝组织中 $\gamma\delta$ T 细胞和调节性 T 细胞(Foxp3⁺Treg)的比例变化。**方法** 采用免疫组织化学方法和流式细胞术观察和检测胆道闭锁患儿组(BA 组)23 例和对照组(CG 组)12 例肝组织中 $\gamma\delta$ T 细胞分布情况以及 $\gamma\delta$ T 细胞和 Foxp3⁺Treg 细胞比例关系。**结果** 免疫组织化学染色显示 BA 组肝脏汇管区胆管周围有大量 $\gamma\delta$ T 细胞和一定程度的 Foxp3⁺Treg 细胞浸润。流式细胞术显示胆道闭锁肝组织中 $\gamma\delta$ T 细胞与 Foxp3⁺Treg 细胞比例明显高于对照组($P < 0.05$),且 $\gamma\delta$ T 细胞与 Foxp3⁺Treg 细胞比例呈显著负相关($P < 0.05$)。**结论** 胆道闭锁患儿肝组织中 $\gamma\delta$ T 细胞增多,或抑制 Foxp3⁺Treg 细胞增值,促进了胆管的进行性炎症损伤。

【关键词】 胆道闭锁;胆管,肝内;T 淋巴细胞,调节性

Infiltration and significance of $\gamma\delta$ T cells and regulatory T cell in intrahepatic bile duct of Biliary Atresia.

LI Kang, YANG Li, TANG Shao-tao, et al. Department of Pediatric Surgery in Union Hospital Affiliated to Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China. Corresponding author: TANG Shao-tao, E-mail: tshaotao83@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the changes of the percentages of $\gamma\delta$ T cells and Foxp3⁺Treg cells in the liver tissues of patients with biliary atresia(BA). **Methods** $\gamma\delta$ cells and Foxp3⁺Treg cells were determined in the portal tracts of patients of 23 cases BA patients and of the 12 cases from the control group using immunohistochemical staining and flow cytometry. The liver tissues lymphocytes were separated with Percoll Hypaque density gradient centrifugation. The proportion of $\gamma\delta$ T cells and Foxp3⁺Treg cells were detected with flow cytometry. **Results** $\gamma\delta$ T cells and Foxp3⁺Treg cells are scattered in the interface areas of inflamed portal tracts of BA livers. BA tissues contained more $\gamma\delta$ T cells and Foxp3⁺Treg cells. The percentage of $\gamma\delta$ T cells in the liver of BA patients were significantly elevated compared with the healthy controls. The percentage of Foxp3⁺Treg cells decreased in the liver of BA patients compared with healthy controls. There was significant negative correlation between the percent of $\gamma\delta$ T cells and the percent of Foxp3⁺Treg cells in BA patients($P < 0.05$). **Conclusions** The up-regulation of liver $\gamma\delta$ T cells in BA patients might cause the down-regulation of liver Foxp3⁺Treg cells, thus contributes to the occurrence of the disease.

【Key words】 Biliary Atresia; Bile Ducts, Intrahepatic; T-Lymphocytes, Regulatory

胆道闭锁(biliary atresia, BA)是新生儿胆汁淤积的常见原因,近年来研究证实围产期 BA 发病与病毒感染触发的异常自身免疫应答密切相关^[1]。 $\gamma\delta$ T 细胞是介于固有免疫(先天性免疫)和适应性免疫(获得性免疫)之间的一群 T 细胞亚群,是除了 NK、NKT 以外的最重要的固有免疫细胞,在抗感染、

自身免疫性疾病以及肿瘤发生等过程中起关键作用^[2]。有报道 $\gamma\delta$ T 细胞可抑制 Foxp3⁺Treg 使免疫抑制功能下调,从而促进免疫炎性细胞活动,促进疾病的进行性发展^[3]。至于在 BA 患者中是否也存在 $\gamma\delta$ T 细胞的异常分布以及 $\gamma\delta$ T 细胞与 Foxp3⁺Treg 的关系,目前未见文献报道。本研究旨在初步探讨 BA 患者肝汇管区 $\gamma\delta$ T 细胞的分布,及其与 Foxp3⁺Treg 的比例变化,从而进一步理解 BA 患者细胞免疫调节机制。

doi:10.3969/j.issn.1671-6353.2015.01.005

基金项目:国家自然科学基金资助项目:调节性和效应性 T 细胞亚群参与胆道闭锁发病及机制研究(项目号:30973137)

作者单位:华中科技大学同济医学院附属协和医院小儿外科(武汉市,430022),通讯作者:汤绍涛, E-mail: tshaotao83@126.com

材料与方法

一、研究对象

选择临床确诊为Ⅲ型胆道闭锁的患儿 23 例,为 BA 组,其中男性 5 例,女性 18 例;Ⅱ型 8 例,Ⅲ型 15 例,平均年龄为 2.5 个月(2~5 个月),于 Kasai 手术时切取肝方叶组织。收集先天性胆总管囊肿患

儿 7 例,新生儿肝炎患儿 5 例,为对照组(control groups, CG),其中男性 4 例,女性 8 例,平均年龄为 3.2 个月(1~14 个月),切取肝方叶。两组患儿临床资料见表 1。肝脏组织切取标本大小约 10 mm × 10 mm × 10 mm。一部分制作石蜡切片用作免疫组织化学染色,另一部分用作淋巴细胞的分离以进行 $\gamma\delta$ T 细胞和 Foxp3⁺ Treg 流式细胞分析。本研究经华中科技大学同济医学院伦理委员会同意。

表 1 两组患儿临床资料($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Two groups of children with clinical data($\bar{x} \pm s$)

分组	n	年龄(月)	体重(kg)	TB(μ mol/L)	DB(μ mol/L)	ALT(U)	GGT(U)
胆道闭锁组	23	2.91 \pm 3.03	5.50 \pm 1.30	218 \pm 54	156 \pm 31	354 \pm 162	351 \pm 154
对照组							
胆总管囊肿	7	5.27 \pm 3.32	7.20 \pm 2.80	69 \pm 23	49 \pm 21	39 \pm 15	73 \pm 26
新生儿肝炎	5	3.54 \pm 2.82	6.20 \pm 4.60	195 \pm 72	141 \pm 46	296 \pm 94	298 \pm 123

注: TB-总胆红素(2.0~20 μ mol/L);DB-直接胆红素(0~4 μ mol/L),ALP-谷丙转氨酶(0~20 U);GGT- γ -谷氨酰转肽酶(0~50 U)

二、方法

1. 肝脏组织 $\gamma\delta$ T 细胞和 Foxp3⁺ Treg 的分布: 收集 BA 组、对照组肝脏组织,经过固定、脱水、包埋、制片后进行免疫组织化学染色。两张连续切片中一张使用鼠抗人 Foxp3 抗体(1:100, abcam, ab20034)标 Foxp3⁺ Treg 细胞,另一张加入鼠抗人 TCR $\gamma\delta$ 抗体(1:200, abcam, ab79056)标 $\gamma\delta$ T 细胞。光学显微镜于 200 倍的视野下选取有代表性的图片,利用 Image Pro plus (version 5.01, Media Cybernetics, Silver Spring, USA)软件分析两组图片中 Foxp3⁺ Treg 及 $\gamma\delta$ T 细胞的累积光密度(IOD)和平均光密度(MOD),计算两类细胞的分布比例。

2. 肝脏内淋巴细胞的分离: 将新鲜肝脏组织用 PBS 清洗后剪碎,通过 Percoll 非连续密度梯度离心法得肝脏内淋巴细胞。

3. $\gamma\delta$ T 细胞染色及流式细胞仪检测: 取 BA 患儿和对照者肝脏分离得到的淋巴细胞各两管,每管含有淋巴细胞约 1×10^6 ,一管通过刺激剂刺激后进行以下流氏抗体染色: FITC-anti-CD4 单抗;PE-anti-CD25 单抗及 APC-anti-Foxp3 单抗;另一管进行以下流氏抗体染色: FITC-anti-CD3 单抗,PE-anti-TCR- $\gamma\delta$ 单抗。以上标本均以小鼠 IgG 2a-PE、IgG 1-FITC 和 IgG2b-APC 作为各荧光抗体的同型对照,以上试剂均购于 eBioscience 公司。先进行表面 CD 分子染色后进行破膜及胞内细胞因子的标记。使用 BD FACS Aria II 流式细胞仪对标记的细胞进行流式检测各管 CD4⁺、CD25⁺、Foxp3⁺ Treg 和 CD3⁺、TCR $\gamma\delta$ ⁺ T 细胞的比例,利用 FlowJo 软件 7.6.1 (Tree

Star, Inc., Stanford)对流式数据进行分析。

三、统计学处理

应用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 *t* 检验,BA 患儿肝组织中 $\gamma\delta$ T 细胞与 Foxp3⁺ Treg 细胞的相关性采用 Pearson 相关分析,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

一、两组 Foxp3⁺ Treg 细胞和 $\gamma\delta$ T 细胞在肝组织中的表达及分布

免疫组化显示 BA 患儿肝脏汇管区被一定程度的 Foxp3⁺ Treg 细胞(图 1a)和大量 $\gamma\delta$ T 细胞浸润(图 1c),而对照组肝脏汇管区 Foxp3⁺ Treg 细胞表达很少(图 1b), $\gamma\delta$ T 细胞几乎没有表达(图 1d)。经过 Image Pro Plus 图像分析表明 BA 组和对照组肝组织中 Foxp3⁺ Treg 细胞和 $\gamma\delta$ T 细胞表达差异显著(图 2)。通过 IOD 分析,BA 组中 Treg 细胞的 IOD 为 10 295 \pm 310, $\gamma\delta$ T 细胞为 13 093 \pm 290;CG 组中 Treg 细胞的 IOD 为 532 \pm 72, $\gamma\delta$ T 细胞为 137 \pm 50。通过 MOD 分析,BA 组中 Treg 细胞的 MOD 为 0.232 \pm 0.045, $\gamma\delta$ T 细胞为 0.160 \pm 0.039;CG 组中 Treg 细胞的 MOD 为 0.102 \pm 0.008, $\gamma\delta$ T 细胞为 0.046 \pm 0.009。经过统计学分析,BA 组和 CG 组中 Treg 细胞比例差异显著(IOD:*t* = -30.414, *P* < 0.001; MOD:*t* = 12.726, *P* < 0.001), $\gamma\delta$ T 细胞比例差异显著(IOD:*t* = 196.974, *P* < 0.001; MOD:*t* = 12.761,

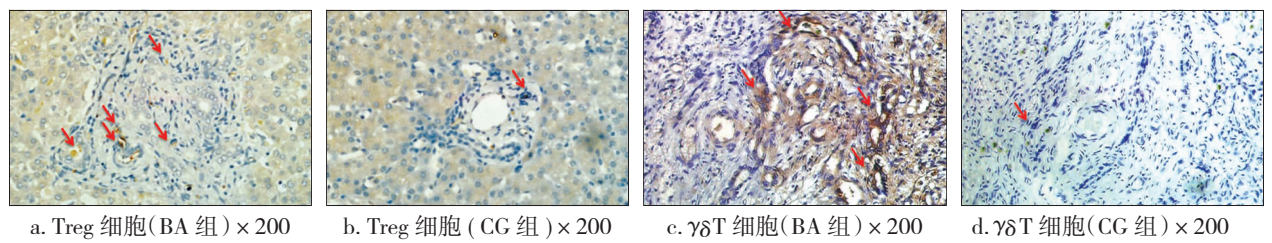


图 1 胆道闭锁组和对照组肝脏 Treg 细胞和 $\gamma\delta$ T 细胞的分布,a,c 为 BA 组肝脏汇管区切面,b,d 显示为 CG 组肝脏汇管区切面,红色箭头指示为相应的 Treg 细胞和 $\gamma\delta$ T 细胞。

Fig. 1 The distribution of Treg and $\gamma\delta$ T Cells in the liver of BA and CG groups

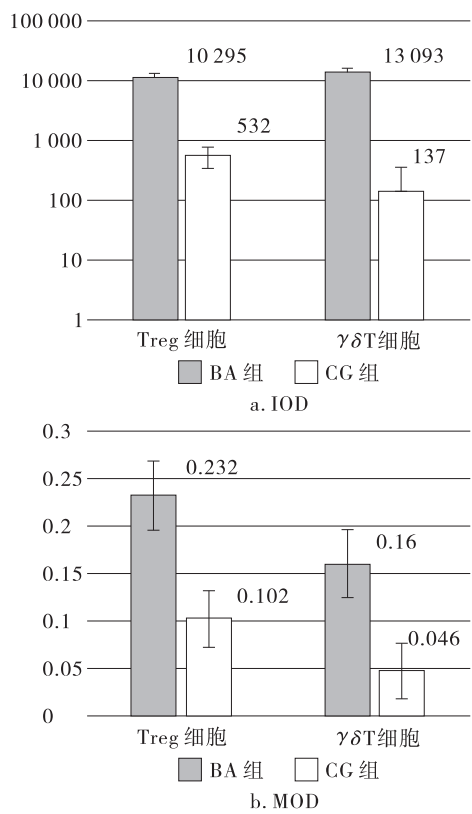


图 2 免疫组化半定量分析结果

Fig. 2 The semiquantitative analysis of immunohistochemistry staining

$P < 0.001$)。结果还表明,在 BA 组肝内胆管周围, Foxp3^+ Treg 细胞/ $\gamma\delta$ T 细胞比例明显降低 (BA = 0.6 ± 0.06 ; CG = 4.0 ± 1.1 , $P = 0.004$), 这表明 Foxp3^+ Treg/ $\gamma\delta$ T 细胞失衡可能在 BA 胆管炎症发病机制中发挥作用。

二、两组肝脏组织中 Foxp3^+ Treg 细胞和 $\gamma\delta$ T 细胞的比例变化

胆道闭锁患儿中 CD4^+ 、 CD25^+ 、 Foxp3^+ Treg 细胞占 T 细胞的比例显著低于对照组 ($P < 0.05$) (图 3a、3c), 而 $\gamma\delta$ T 细胞比例显著高于对照组 ($P < 0.05$, 见图 3b、3d、表 1)。

三、BA 肝脏组织中 $\gamma\delta$ T 细胞和 Foxp3^+ Treg 细

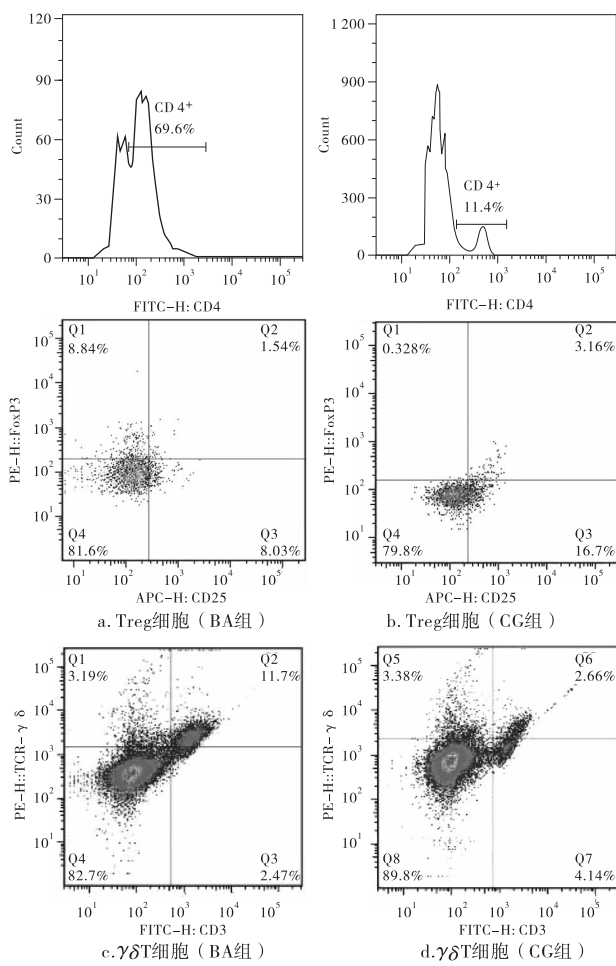


图 3 胆道闭锁组与对照组肝脏中 Treg 细胞和 $\gamma\delta$ T 细胞流式检测结果

Fig. 3 The flow cytometry of treg and $\gamma\delta$ T cells in BA and CG groups

表 1 两组肝组织中 Treg 和 $\gamma\delta$ T 细胞比例的比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 1 The ratio comparison of treg and $\gamma\delta$ T cells in two groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	Foxp3 ⁺ Treg 细胞(%)	$\gamma\delta$ T 细胞(%)
BA 组	23	1.70 \pm 0.32	10.30 \pm 1.30
CG 组	12	3.50 \pm 1.10	2.90 \pm 0.70
t 值		-7.503	22.729
P 值		<0.001	<0.001

胞相关性分析

经 Pearson 相关分析,胆道闭锁患儿肝组织中 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞与 $\text{Foxp3}^+\text{Treg}$ 细胞比例呈显著负相关($r = -0.842, P < 0.5$)。

讨 论

本研究结果显示 BA 组汇管区 $\text{Foxp3}^+\text{Treg}$ 细胞绝对数量增多,但 $\text{Foxp3}^+\text{Treg}$ 细胞占 T 细胞的比例却明显少于对照组,说明 BA 中促炎细胞如 $\text{CD4}^+\text{T}$ 细胞、 $\text{CD8}^+\text{T}$ 细胞、NK T 细胞等增生更加显著,与文献报道一致^[4-6]。 $\text{Foxp3}^+\text{Treg}$ 细胞尤其是 $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{Foxp3}^+\text{Treg}$ 细胞具有高度免疫抑制功能,在维持自身免疫耐受及机体免疫稳态中起主要作用。Miethke 等^[4]在动物模型研究中发现,BA 是因小鼠出生前 3 d 缺乏 $\text{Foxp3}^+\text{Treg}$ 细胞,导致其抑制 NK 细胞的功能丧失,NK 过度活化、增殖,从而导致 BA 的发生。我们研究也证实,BA 小鼠肝脏存在炎性介质,如 IL-12P35, P40, IFN- γ 的异常增高^[7]。Lages 等^[6]在近期研究中也发现,过继输入 $\text{Foxp3}^+\text{Treg}$ 细胞到 BA 小鼠模型体内能抑制 DC 细胞依赖的 CD8^+ 细胞激活,从而减轻胆管上皮的损伤。在我们前期的研究中发现,BA 肝组织汇管区有 $\text{Foxp3}^+\text{Treg}$ 和 Th17 细胞明显增多,但 Th17 细胞增高更明显,且 $\text{Treg}/\text{Th17}$ 比例明显降低,从而推断 $\text{Treg}/\text{Th17}$ 细胞比例失调在 BA 进行性炎症中发挥作用^[8]。从上述研究结果看出,刚出生的新生儿因 $\text{Foxp3}^+\text{Treg}$ 细胞尚未发育,是 BA 始发于该窗口期的关键因素。然而随着病情的进展,肝脏胆管周围 $\text{Foxp3}^+\text{Treg}$ 细胞并没有发挥相适应的免疫抑制功能,说明在 BA 炎症进展阶段有某些抑制 $\text{Foxp3}^+\text{Treg}$ 细胞增生或功能的因素存在。

研究发现 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞不但可以直接识别并杀伤靶细胞,分泌的各类细胞因子诱发适应性免疫,而且激活的 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞还可以抑制 $\text{Foxp3}^+\text{Treg}$ 细胞的增殖和功能^[3,9]。在多发硬化症(MS)小鼠中的研究显示,表达白细胞介素 23 受体的 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞可通过白细胞介素 23 依赖的机制抑制 $\text{Foxp3}^+\text{Treg}$ 细胞的增殖及功能,从而促进效应性 T 细胞的增殖,促进 MS 发病^[10]。我们研究发现 BA 患儿肝组织汇管区 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞比例较对照组显著增多,而 $\text{Foxp3}^+\text{Treg}$ 细胞比例相对减少。提示 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞和 $\text{Foxp3}^+\text{Treg}$ 细胞的异常表达与 BA 的发病及病情进展有关。进一步相关性分析显示, $\text{Foxp3}^+\text{Treg}$ 细胞比例与 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞

比例呈负相关,提示 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞有可能通过抑制 $\text{Foxp3}^+\text{Treg}$ 细胞的增殖而下调机体的免疫调控,从而促进肝内外胆管炎症的发生。

T 细胞根据抗原受体 α 、 β 、 γ 、 δ 四种肽链的不同,分为 $\alpha\beta\text{T}$ 细胞(CD4^+ 、 CD8^+ 细胞)和 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞。 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞即是一群表达 T 细胞抗原受体 $\gamma\delta$ 链的 T 细胞亚群,在组织中特别是上皮层内含量很丰富^[11]。以往研究已经证实 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞是 IFN- γ 的重要来源^[12]。近年来越来越多的证据表明 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞也是 IL-17 的重要来源,尤其是在抗病毒感染、自身免疫性疾病等中发挥重要作用^[13]。既往研究已经显示 $\alpha\beta\text{T}$ 细胞分泌的 IFN- γ 和 IL-17 均参与了 BA 肝内外胆管的免疫炎性损伤,但增高的细胞因子来源并不完全清楚。谭梅军等^[14]的研究也证实胆道闭锁患儿肝组织中 IL-17 增高,参与了胆道闭锁的发病过程。本实验中我们发现,BA 患儿肝组织中 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞比例显著高于对照组,提示 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞也可能通过分泌 IFN- γ 和 IL-17 参与 BA 胆管的免疫炎性损伤。虽然 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞的绝对数量远少于 $\alpha\beta\text{T}$ 细胞,但研究发现它们通过识别 TCR 信号和模式识别受体信号较 $\alpha\beta\text{T}$ 细胞能更快在宿主体内启动免疫应答,并发挥出其数量不相称的重要作用。下一步我们将通过动物实验验证 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞参与 BA 胆管损伤的机制。

参 考 文 献

- 1 Mack CL. The pathogenesis of biliary atresia: evidence for a virus-induced autoimmune disease [J]. Semin Liver Dis, 2007, 27(3):233-242.
- 2 Kisielow J, Kopf M. The origin and fate of $\gamma\delta\text{T}$ cell subsets [J]. Curr Opin Immunol, 2013, 25(2):181-188.
- 3 Gong G, Shao L, Wang Y, et al. Phosphoantigen-activated V gamma 2V delta 2 T cells antagonize IL-2-induced CD4^+ 、 CD25^+ 、 Foxp3^+ T regulatory cells in mycobacterial infection [J]. Blood, 2009, 113: 837-845.
- 4 Miethke AG, Saxena V, Shivakumar P, et al. Post-natal paucity of regulatory T cells and control of NK cell activation in experimental biliary atresia [J]. J Hepatol, 2010, 52(5):718-726.
- 5 Mack CL, Tucker RM, Sokol RJ, et al. Biliary atresia is associated with CD4^+ Th1 cell-mediated portal tract inflammation [J]. Pediatr Res, 2004, 56(1):79-87.
- 6 Lages CS, Simmons J, Choungnet CA, et al. Regulatory T cells control the CD8^+ adaptive immune response at the time of ductal obstruction in experimental (下转第 32 页)