

## · 实验研究 ·

胆道闭锁中胆固醇活化 CD177<sup>+</sup> 中性粒细胞致胆管损伤的实验研究

全文二维码

肖依依<sup>1,2</sup> 赵子阳<sup>2</sup> 童燕陆<sup>2</sup> 陈虹交<sup>2</sup> 王贺珍<sup>2</sup> 夏慧敏<sup>2</sup> 张锐忠<sup>1,2</sup><sup>1</sup> 华南理工大学医学院, 广州 510006; <sup>2</sup> 广州市妇女儿童医疗中心广东省结构性出生缺陷疾病研究重点实验室, 广州 510623

通信作者: 张锐忠, Email: cowboy2006@163.com

**【摘要】 目的** 通过实验研究胆道闭锁(biliary atresia, BA)患儿总胆固醇(total cholesterol, TC)对胆管损伤的影响,并探讨其免疫学机制。**方法** 回顾性收集2011—2020年间广州市妇女儿童医疗中心收治的118例经术中胆管造影确诊的BA患儿、80例同龄婴儿肝炎综合征(infantile hepatitis syndrome, IHS)患儿以及165例无肝病证据且无肝功能异常的同龄正常对照(normal control, NC)儿童外周血TC含量。分析TC与胆管损伤各指标及多种与BA形成相关免疫细胞之间的关联。在体外CD177<sup>+</sup>中性粒细胞与胆道上皮细胞(biliary epithelial cell, BEC)共培养体系中加入胆固醇,观察其对BEC凋亡的影响,同时观察加入胆固醇刺激后CD177<sup>+</sup>中性粒细胞内相关指标的变化;根据外周血TC检测数值将BA患儿分为高胆固醇BA组、正常胆固醇BA组,通过RNA测序分析,比较高胆固醇组、正常胆固醇组BA患儿CD177<sup>+</sup>中性粒细胞基因表达差异。**结果** BA患儿外周血TC含量为4.9(4.0, 6.1)mmol/L,高于NC组的3.7(3.1, 4.1)mmol/L及IHS组的4.2(3.3, 5.4)mmol/L,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );BA患儿外周血TC含量[4.9(4.0, 6.1)mmol/L]与胆管损伤指标 $\gamma$ -谷氨酰转氨酶( $\gamma$ -glutamyltransferase, GGT)含量[497.0(298.5, 843.0)U/L]呈正相关( $r = 0.401, P < 0.05$ ),同时与直接胆红素(direct bilirubin, DBIL)、总胆汁酸(total bile acid, TBA)含量呈正相关( $r = 0.338, P < 0.05; r = 0.235, P < 0.05$ );在肝脏组织胆管细胞凋亡数量比例层面,高胆固醇BA组为 $0.724 \pm 0.146$ ,正常胆固醇BA组为 $0.232 \pm 0.141$ ,NC组(患儿年龄相近门静脉海棉样变儿童)为 $0.242 \pm 0.228$ ,高胆固醇BA组与其余两组间差异有统计学意义( $P < 0.05$ );BA患儿外周血TC含量[4.4(3.1, 5.5)mmol/L]与外周血CD177<sup>+</sup>中性粒细胞比例[( $26.5 \pm 6.4$ )%]呈正相关( $r = 0.503, P < 0.05$ ),与外周血单核细胞[( $1.0(0.8, 1.2) \times 10^9/L$ )]、中性粒细胞[( $3.2 \pm 1.4$ ) $\times 10^9/L$ ]无相关性( $P > 0.05$ );BA患儿外周血TC含量[( $4.7 \pm 1.6$ )mmol/L]与外周血T细胞数量( $4\,952.1 \pm 1\,985.0$ )个/ $\mu L$ 呈正相关( $r = 0.488, P < 0.05$ ),与外周血B细胞971.0(664.8, 1\,636.1)个/ $\mu L$ 无相关性( $P > 0.05$ );与正常胆固醇BA组相比,高胆固醇BA组线粒体氧化磷酸化相关基因(*CYBB*、*CALR*、*MT-CYB*、*MT-ND5*、*MT-ND1*)表达显著上调,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );在胆固醇刺激下,CD177<sup>+</sup>中性粒细胞中代表线粒体氧化磷酸化的指标TOMM20及DNA 8-OHdG的平均荧光强度分别为 $73.47 \pm 6.36$ 、 $159.07 \pm 10.17$ ,较刺激前差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),而CD177<sup>+</sup>中性粒细胞胞外诱捕网指标MPO和H2B分别为 $60.51 \pm 4.26$ 、 $157.46 \pm 9.40$ ,较刺激前差异有统计学意义( $P < 0.05$ );同时在CD177<sup>+</sup>中性粒细胞与BEC共培养体系中,加入胆固醇刺激后BEC细胞活率较刺激前差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。**结论** 胆道闭锁中胆固醇可上调CD177<sup>+</sup>中性粒细胞线粒体氧化磷酸化水平,促进胞外诱捕网的释放,引起胆管损伤。

**【关键词】** 胆道闭锁; 胆固醇; CD177<sup>+</sup>中性粒细胞; 胆管损伤**基金项目:** 国家自然科学基金面上项目(81974056, 82271750); 广州市科技计划项目(202206080002)

DOI: 10.3760/cma.j.cn101785-202303064-016

Experimental study of bile duct injury caused by cholesterol-activated CD177<sup>+</sup> neutrophils in biliary atresiaXiao Yiyi<sup>1,2</sup>, Zhao Ziyang<sup>2</sup>, Tong Yanlu<sup>2</sup>, Chen Hongjiao<sup>2</sup>, Wang Hezhen<sup>2</sup>, Xia Huimin<sup>2</sup>, Zhang Ruizhong<sup>1,2</sup><sup>1</sup> School of Medicine, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China; <sup>2</sup> Guangdong Provincial Key Laboratory of Research in Structural Birth Defect Disease, Guangzhou Women and Children's Medical Center,

Guangzhou 510623, China

Corresponding author: Zhang Ruizhong, Email: cowboy2006@163.com

**[Abstract] Objective** To explore the effect of total cholesterol (TC) on bile duct injury in children with biliary atresia (BA) and investigate the immunological mechanism. **Methods** Peripheral blood TC levels were retrospectively collected from 118 BA children diagnosed by intraoperative cholangiography, 80 infants of the same age with infantile hepatitis syndrome (IHS) and 165 normal control (NC) children of the same age without any evidence of hepatopathology and liver function abnormalities admitted to Guangzhou Women and Children's Medical Center during the period of 2011 – 2020. The correlation between peripheral blood TC and various indicators of bile duct injury or multiple immune cells associated with BA formation was statistically analyzed respectively. Cholesterol was added into the co-culture system of CD177<sup>+</sup> neutrophils and biliary epithelial cells (BECs) in vitro, and its effect on BEC apoptosis was observed. Simultaneously, the changes of related indicators in CD177<sup>+</sup> neutrophils after cholesterol stimulation were observed. BA children were divided into high-cholesterol BA group and normal-cholesterol BA group according to the detection value of peripheral blood TC. Through RNA sequencing analysis, the differences in gene expression of CD177<sup>+</sup> neutrophils between the high-cholesterol BA group and the normal-cholesterol BA group were compared. **Results** The peripheral blood TC level of [4.9 (4.0, 6.1)] mmol/L in BA children was higher than that of [3.7 (3.1, 4.1)] mmol/L in NC group and [4.2 (3.3, 5.4)] mmol/L in IHS children, and the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). The peripheral blood TC level of [4.9 (4.0, 6.1)] mmol/L in BA children was positively correlated with gamma-glutamyltransferase (GGT) level of [497.0 (298.5, 843.0)] U/L, an indicator of bile duct injury ( $r = 0.401, P < 0.05$ ), as well as positively correlated with direct bilirubin (DBIL) and total bile acid (TBA) ( $r = 0.338, P < 0.05$ ;  $r = 0.235, P < 0.05$ ). In terms of the proportion of apoptotic cholangiocytes in liver tissue, the high-cholesterol BA group was  $0.724 \pm 0.146$ , the normal-cholesterol BA group was  $0.232 \pm 0.141$ , the NC group (children with portal vein cavernous transformation of similar age) was  $0.242 \pm 0.228$ . There was a statistically significant difference between high-cholesterol BA group and the other two groups ( $P < 0.05$ ). Peripheral blood TC content [4.4 (3.1, 5.5)] mmol/L in BA children was positively correlated with peripheral blood CD177<sup>+</sup> neutrophil ratio ( $26.5 \pm 6.4$ )% ( $r = 0.503, P < 0.05$ ), while there was no significant correlation between TC and peripheral blood monocytes [ $1.0 (0.8, 1.2) \times 10^9/L$ ] or neutrophils ( $3.2 \pm 1.4 \times 10^9/L$ ) ( $P > 0.05$ ). The peripheral blood TC level of BA children ( $4.7 \pm 1.6$ ) mmol/L was significantly positively correlated with the number of peripheral blood T cells ( $4952.1 \pm 1985.0$ ) cells/ $\mu L$  ( $r = 0.488, P < 0.05$ ) and had no correlation with the number of peripheral blood B cells [ $971.0 (664.8, 1636.1)$ ] cells/ $\mu L$  ( $P > 0.05$ ). Compared with the normal-cholesterol BA group, the expression of various mitochondrial oxidative phosphorylation-related genes (CYBB, CALR, MT-CYB, MT-ND5, MT-ND1) was significantly up-regulated in high-cholesterol BA group, and the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). Under cholesterol stimulation, the mean fluorescence intensity (MFI) of TOMM20 and DNA 8-OHdG, the indicators of mitochondrial oxidative phosphorylation, were  $73.47 \pm 6.36$  and  $159.07 \pm 10.17$ , respectively, and the differences were statistically significant as compared with those before stimulation ( $P < 0.05$ ). The CD177<sup>+</sup> neutrophil extracellular trap indicators, MPO and H2B were  $60.51 \pm 4.26$  and  $157.46 \pm 9.40$  respectively, and the differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ) as compared with those before stimulation. Meanwhile, in the co-culture system of CD177<sup>+</sup> neutrophils and BECs, the viability of BECs after cholesterol stimulation was statistically significantly different from that before stimulation ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Mitochondrial oxidative phosphorylation in CD177<sup>+</sup> neutrophils is up-regulated by cholesterol in BA, promoting the release of neutrophil extracellular traps and causing bile duct injury.

**[Key words]** Biliary Atresia; Cholesterol; CD177<sup>+</sup> Neutrophils; Bile Duct Injury

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China (81974056 & 82271750); Science and Technology Planning Project of Guangzhou (202206080002)

DOI:10.3760/cma.j.cn101785-202303064-016

胆道闭锁 (biliary atresia, BA) 是引起婴幼儿梗阻性黄疸的常见原因, 预后差, 发病机制不明。其

基本病理变化是肝内、外胆管进行性损伤, 胆管闭锁, 致胆汁淤积及肝功能受损。由于该病在临床尚

无有效治疗药物,即便是进行了 Kasai 手术,仍有至少约 70% 的患儿在成年前会发展为肝硬化,乃至亟待肝移植的肝衰竭<sup>[1-3]</sup>。

BA 被认为是一种针对胆管的自身免疫性疾病<sup>[1]</sup>。该病肝内胆管周围包绕着大量免疫细胞如 CD4<sup>+</sup>T 细胞、CD8<sup>+</sup>T 细胞、B 细胞、自然杀伤细胞(natural killer cell, NK 细胞)和巨噬细胞等,上述细胞可攻击胆道上皮细胞(biliary epithelial cell, BEC)引起胆管损伤<sup>[1,4-7]</sup>。我们的前期研究表明,BA 中 CD177<sup>+</sup> 中性粒细胞处于活化状态,通过释放胞外诱捕网(neutrophil extracellular traps, NETs)引起胆管损伤,但引起 CD177<sup>+</sup> 中性粒细胞活化的环境因素未明<sup>[8]</sup>。

大量研究表明,高胆固醇与多种自身免疫性疾病(如类风湿性关节炎、多发性硬化、哮喘等)相关,限制胆固醇摄入量已成为这些疾病的治疗策略之一<sup>[9-10]</sup>。此外,肝脏疾病也会改变甾醇代谢稳定。BA 作为一种严重的新生儿自身免疫性疾病,至目前为止有关胆固醇在 BA 中的含量及胆固醇对该病免疫反应的影响及相关机制研究鲜有报道。

因此,我们通过分析临床 BA 患儿的总胆固醇(total cholesterol, TC)含量,并与肝功能中胆汁淤积及胆管损伤相关指标  $\gamma$ -谷氨酰转氨酶( $\gamma$ -glutamyltransferase, GGT)、直接胆红素(direct bilirubin, DBIL)、总胆汁酸(total bile acid, TBA)等进行相关性分析,同时检测 BEC 的凋亡情况,以期阐明其引起胆管损伤的免疫学机制,进而明确 BA 的可能发病机制,为该病的临床治疗提供实验依据。

## 资料与方法

### 一、临床资料及实验材料

#### (一)临床资料

回顾性收集广州市妇女儿童医疗中心 2011 年至 2020 年共 118 例经术中胆管造影确诊的 BA 患儿、80 例同龄婴儿肝炎综合征(infantile hepatitis syndrome, IHS)患儿及 165 例同年龄正常对照(normal control, NC, 无肝病证据且无肝功能异常并诊断为血管瘤等)组儿童术前外周血肝功能指标及 TC 含量;组织染色实验中,本院检验科系统提示 TC 正常值为 3.4~5.2 mmol/L,故本研究以 5.2 mmol/L 为临界值,根据外周血 TC 检测数值将 BA 患儿分为高胆固醇 BA 组和正常胆固醇 BA 组。BA 组患儿( $n=7$ )肝脏标本取自患儿术中肝脏病理活检组织标本,

并以肝组织正常的门脉海绵样畸形患儿( $n=4$ )的肝活检组织标本作为对照。本研究获得广州市妇女儿童医疗中心临床研究机构评审委员会批准[穗妇儿科伦批字(2021)第 401B01 号]。

#### (二)主要实验材料

人肝内胆道上皮细胞(#5100)及上皮细胞培养基(#4101)购自美国 ScienCell 公司;PE conjugated mouse anti-human CD177(ab69777)、rabbit anti-human/mouse cytokeratin 19(ab52625)、100 × Tris-EDTA Buffer, pH9.0(ab93684)、TOMM20(ab186734)、8-OHdG(ab62623)、MPO(ab9535)、H2B(ab52484)购自美国 Abcam 公司;anti-PE microbeads(130-105-807)购自德国 Miltenyi Biotec 公司;anti-human CD45-APC-Cy7(25-0459)购自美国 Tonbo Biosciences 公司;anti-human CD66b-BV421(562940)购自美国 BD biosciences 公司;DAB(SA-HRP)TUNEL Cell Apoptosis Detection Kit(G1507-50T)购自中国 Servicebio 公司;胆固醇(C3045)购自美国 Sigma Aldrich 公司。

#### 二、研究方法

##### (一)BA 患儿临床病理数据收集

术前收集 118 例未经抗生素干预的 BA 患儿外周血进行肝功能、血脂等生化指标检测,包括:GGT、总胆红素(total bilirubin, TBIL)、DBIL、TBA、丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)和 TC 水平。

(二)流式分析 BA 患儿外周血 CD177<sup>+</sup> 中性粒细胞比例并收集 BA 患儿外周血免疫细胞数据

收集术前无抗生素干预的 BA 患儿外周血样本,使用红细胞裂解液将其裂解成单细胞悬液,加入 FcR Blocking 室温孵育 10 min,加入 anti-CD45、anti-CD66b、anti-CD177 抗体,孵育后再加入 7-AAD 孵育 5 min,在 BD FACS Aria II(BD Biosciences, USA)流式细胞仪上检测并收集 CD177<sup>+</sup> 中性粒细胞检测结果;同时收集 BA 患儿的外周血相关免疫细胞检测数据。

(三)患儿肝脏石蜡组织切片免疫组织化学染色

将来自患者的肝脏组织样本固定后制作成石蜡切片并进行 TUNEL(TdT-mediated dUTP nick end labeling)染色及细胞角蛋白 19(cytokeratin 19, CK19)免疫组化染色。TUNEL 染色使用 DAB(SA-HRP)TUNEL Cell Apoptosis Detection Kit,严格按照说明书步骤进行染色。TUNEL 显色结束后,进行抗

原修复,然后 anti-cytokeratin 19 antibody [EP1580Y-cytoskeleton marker 一抗 4℃ 孵育过夜,稀释比例 1:400。与对应二抗在室温下孵育 1 h 后进行显色。ImmPACT DAB(VECTOR,CA,U.S.A)和 HIGHDEF® Green AP Chromogen/Substrate (ENZ-ACC130-0030,Enzo Life Sciences) 分别用于 TUNEL 及 CK19 显影。每组使用 3~10 个独立切片,并在每个切片随机挑选 5 个门脉区域于×40 高倍镜下拍照,分别计数每个视野中 TUNEL 阳性与 CK19 阳性细胞,采取 TUNEL 阳性细胞在 CK19 阳性细胞中的占比作为统计值。

#### (四)磁珠分选 CD177<sup>+</sup> 中性粒细胞

收集术前无抗生素干预的同龄血管瘤或马蹄足患儿新鲜外周血样本作为正常对照。将血样按比例进行红细胞裂解后制成外周血单细胞悬液,调整单细胞悬液浓度为  $1 \times 10^8$  个/mL,在 100  $\mu$ L 单细胞悬液体系中加入 PE conjugated mouse anti-human CD177 避光孵育 30 min 后离心并洗涤细胞 2 次,取 160  $\mu$ L 细胞悬液,加入 anti-PE microbeads 避光孵育 20 min,孵育后洗涤并离心细胞 2 次,调整细胞浓度至  $2 \times 10^8$  个/mL。在使用流式染色缓冲液润洗好的 LS 分离柱中加入已标记的细胞悬液,待所有细胞流经分离柱后,再加入流式染色缓冲液冲洗分离柱,使用配套活塞将分选所得 CD177<sup>+</sup> 中性粒细胞推入 15 mL 离心管中,流式检测细胞纯度,并使用细胞纯度 >95% 的细胞进行下一步实验。

#### (五)CD177<sup>+</sup> 中性粒细胞与 BEC 体外共培养实验

将上述分选所得 CD177<sup>+</sup> 中性粒细胞加入 BEC 中,同时加入 5 mg/mL 胆固醇刺激,于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 5 d,镜下观察 BEC 增殖凋亡情况,并收集各组 BEC,使用 MTT 法检测 BEC 增殖情况。

#### (六)免疫荧光检测 NETs 成分及线粒体氧化标志物表达

将上述分选的 CD177<sup>+</sup> 中性粒细胞加入胆固醇刺激 1 h 后涂片,4% 的多聚甲醛固定 30 min,磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffered saline,PBS)清洗 3 次后,用 0.02% 聚乙二醇辛基苯基醚(2-(2-[4-(1,1,3,3,-Tetramethylbutyl)phenoxy]ethoxy)ethanol,Triton X-100)破膜 15 min,PBS 清洗 3 次后孵育一抗线粒体外膜转位酶 20(translocase of outer mitochondrial membrane 20,TOMM20)、8-羟基脱氧鸟苷(8-hydroxy-2'-deoxyguanosine,8-OHdG)、髓过氧化物酶(myeloperoxidase,MPO)、组蛋白 2B(histone 2B,

H2B)过夜,PBS 清洗 3 次后孵育 anti-mouse/rabbit 二抗 1 h,PBS 清洗 3 次后进行细胞核染色,4',6-二脒基-2 苯基吲哚(4',6-diamidino-2'-phenylindole,DAPI)染色 20 min,封片后进行共聚焦拍照并作定量分析。

#### (七)高胆固醇 BA 组与正常胆固醇 BA 组差异表达基因分析

在对 BA 患儿肝脏组织 CD177<sup>+</sup> 中性粒细胞 RNA 测序数据分析基础上,进一步分别对正常胆固醇 BA 组和高胆固醇 BA 组在表达上具有显著性差异的基因进行统计分析。

#### 三、统计学处理

采用 SPSS 26.0 和 GraphPad Prism 8.0 进行统计学分析。使用 Image J 对免疫组化及免疫荧光结果进行分析。服从正态分布的数据用  $\bar{x} \pm s$  表示;非正态分布数据用  $M(Q_1, Q_3)$  表示;两组间正态分布数据采用独立样本  $t$  检验;两组间平均荧光强度(mean fluorescence intensity,MFI)比较采用配对样本  $t$  检验;两组间非正态数据比较采用独立样本 Mann-Witney 秩和检验;多组间正态分布数据比较采用单因素方差分析,并进一步通过 LSD 检验进行两两比较;差异表达基因分析采用 Wilcoxon 两样本秩和检验;服从正态分布数据相关性分析采用 Pearson 积差相关;非正态数据指标相关性分析采用 Spearman 等级相关;以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

#### 一、一般资料

本研究共纳入 118 例 BA 患儿、80 例 IHS 患儿及 165 例 NC 患儿。所有纳入患儿的临床基本特征及病理参数特征如表 1 所示。其中基本特征层面,三组患儿年龄差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),BA 组与 IHS 组相比,性别差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。病理参数层面,BA 组和 IHS 组相比,GGT、ALT、AST、TBIL、DBIL 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。

#### 二、BA 患儿外周血 TC 含量升高

各组外周血 TC 含量:NC 组 3.7 (3.1, 4.1) mmol/L、IHS 组 4.2 (3.3, 5.4) mmol/L、BA 组 4.9 (4.0, 6.1) mmol/L,组间差异有统计学意义( $P < 0.05$ );BA 组 TC 含量显著高于 NC 组及 IHS 组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。



表 1 正常对照组、婴儿肝炎综合征组及胆道闭锁组儿童临床特征

Table 1 Clinical characteristics of children in three groups

分组	例数	年龄 [ $M(Q_1, Q_3)$ , 天]	性别(例, %)		GGT [ $M(Q_1, Q_3)$ , U/L]	ALT [ $M(Q_1, Q_3)$ , U/L]	AST [ $M(Q_1, Q_3)$ , U/L]	TBIL [ $M(Q_1, Q_3)$ , $\mu\text{mol/L}$ ]	DBIL [ $M(Q_1, Q_3)$ , $\mu\text{mol/L}$ ]
			男	女					
NC 组	165	82 (53, 103)	102 (61.82)	63 (38.18)	41.0 (26.0, 70.0)	31.0 (20.5, 46.0)	41.0 (31.0, 58.5)	8.2 (4.4, 13.9)	1.7 (1.1, 3.2)
IHS 组	80	72 (58, 98)	49 (61.25)	31 (38.75)	141.0 (73.3, 331.5)	93.5 (47.8, 158.0)	141.5 (83.8, 245.3)	111.5 (30.9, 164.8)	83.8 (7.3, 126.3)
BA 组	118	70 (56, 84)	72 (61.02)	46 (38.98)	497.0 (298.5, 843.0)	141.0 (100.0, 215.0)	201.5 (144.8, 308.3)	159.1 (136.0, 184.9)	122.0 (103.9, 144.5)
$H/\chi^2/Z$ 值	/	$H=7.229$	$\chi^2=0.020$		$Z=-7.454$	$Z=-4.176$	$Z=-3.930$	$Z=-5.205$	$Z=-5.985$
$P$ 值	/	0.027	0.408		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注 除年龄为三组间比较检验结果之外,其余统计值与  $P$  值均为 IHS 组与 BA 组比较结果。NC 组:正常对照组;IHS 组:婴儿肝炎综合征组;BA 组:胆道闭锁组;TC:总胆固醇;GGT: $\gamma$ -谷氨酰转氨酶;ALT:丙氨酸转氨酶;AST:天冬氨酸转氨酶;TBIL:总胆红素;DBIL:直接胆红素

三、BA 患儿外周血 TC 含量与胆管损伤相关指标的相关性

BA 组外周血 TC 含量  $4.9(4.0, 6.1)$  mmol/L, 与胆管损伤指标 GGT  $497.0(298.5, 843.0)$  U/L 呈显著正相关( $r=0.401, P<0.05$ ), 与胆汁淤积指标 DBIL  $122.0(103.9, 144.5)$   $\mu\text{mol/L}$  呈显著正相关( $r=0.338, P<0.05$ ), 与 TC 代谢分解产物 TBA  $124.0(103.7, 154.1)$   $\mu\text{mol/L}$  呈显著正相关( $r=0.235, P<0.05$ )。

四、BA 患儿外周血 TC 含量升高与胆管损伤密切相关

CK19 阳性主要定位于 BEC, TUNEL 染色定位凋亡细胞中细胞核断裂 DNA, 可反映细胞凋亡情况(图 1A-C)。高胆固醇 BA 组患儿肝脏组织 BEC 凋亡数量比例  $0.724 \pm 0.146$  显著高于正常胆固醇 BA 组  $0.232 \pm 0.141$  及 NC 组  $0.242 \pm 0.228$ , 差异均有统计学意义( $P<0.05$ );见表 2。

五、BA 患儿外周血 TC 含量与各免疫细胞的相关性

26 例 BA 患儿外周血 TC 含量  $4.4(3.1, 5.5)$  mmol/L 与外周血 CD177<sup>+</sup> 中性粒细胞比例( $26.5 \pm$

$6.4$ )% 呈正相关( $r=0.503, P<0.05$ ); 而外周血 TC 含量与外周血单核细胞数量  $1.0(0.8, 1.2) \times 10^9/\text{L}$  和外周血中性粒细胞数量( $3.2 \pm 1.4$ )  $\times 10^9/\text{L}$  之间均无相关性( $P>0.05$ )。

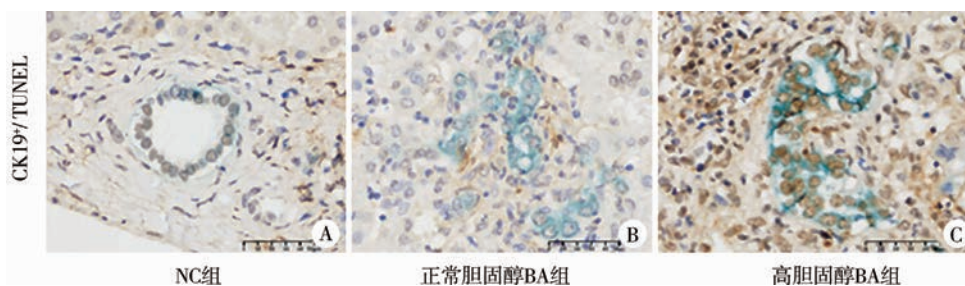
25 例 BA 患儿外周血 TC 含量( $4.7 \pm 1.6$ ) mmol/L 与外周血 T 细胞数量( $4952.1 \pm 1985.0$ ) 个/ $\mu\text{L}$  呈正相关( $r=0.488, P<0.05$ ); 外周血 TC 含量与外周血 B 细胞数量  $971.0(664.8, 1636.1)$  个/ $\mu\text{L}$  之间无相关性( $P>0.05$ )。

#### 六、细胞共培养结果

在体外正常 CD177<sup>+</sup> 中性粒细胞与 BEC 共培养体系中加入胆固醇, 结果显示, 加入胆固醇刺激后, BEC 凋亡数量显著增加( $P<0.05$ , 图 2A-E)。上述结果表明, BA 中 TC 含量的升高可通过刺激 CD177<sup>+</sup> 中性粒细胞引起 BEC 凋亡。

七、高胆固醇 BA 组与正常胆固醇 BA 组差异表达基因分析结果

与正常胆固醇 BA 组相比, 高胆固醇 BA 组线粒体氧化磷酸化相关基因 *CYBB*、*CALR*、*MT-CYB*、*MT-ND5*、*MT-ND1* 表达均显著上调, 差异有统计学意义( $P<0.05$ ), 见表 3。



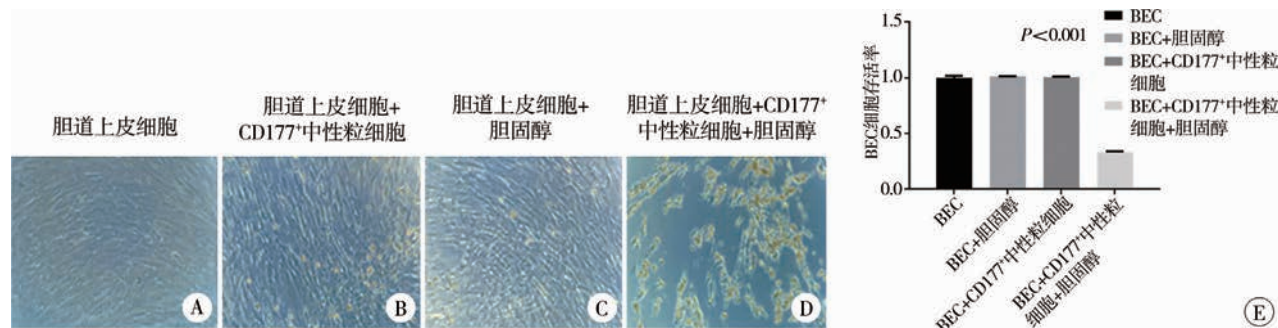
注 A:CK19 及 TUNEL 在 NC 组肝脏组织中弱表达;B:在正常胆固醇 BA 组中 TUNEL 弱表达,CK19 强表达;C:CK19 及 CK19 在高胆固醇 BA 组中均强表达;NC:正常对照组;BA:胆道闭锁

图 1 NC 组、正常胆固醇 BA 组和高胆固醇 BA 组患儿肝脏组织胆管细胞凋亡情况免疫组化染色结果( $\times 400$ )Fig. 1 Immunohistochemical staining results of cholangiocyte apoptosis in liver tissues of children in NC, normal-cholesterol BA and high-cholesterol BA groups( $\times 400$ )

表 2 对照组、正常胆固醇 BA 组和高胆固醇 BA 组肝脏组织胆管细胞凋亡数量比例比较

Table 2 Comparison of the proportion of apoptotic cholangiocytes in liver tissue among NC, normal-cholesterol BA and high-cholesterol BA groups

分组	例数	胆管细胞凋亡数量比例( $\bar{x} \pm s$ , TUNEL <sup>+</sup> /CK19 <sup>+</sup> )
对照组	4	0.242 ± 0.228 <sup>a</sup>
正常胆固醇 BA 组	3	0.232 ± 0.141 <sup>a</sup>
高胆固醇 BA 组	4	0.724 ± 0.146
F 值		9.266
P 值		0.008

注 <sup>a</sup> 代表与高胆固醇 BA 组相比差异有统计学意义;BA:胆道闭锁

注 A-D:胆道上皮细胞与外周血 CD177<sup>+</sup> 中性粒细胞体外共培养实验培养 5 d 后各组 BEC 细胞形态变化( $\times 100$ ), A~D 分别为 BEC 组、BEC + CD177<sup>+</sup> 中性粒细胞组、BEC + 胆固醇组、BEC + CD177<sup>+</sup> 中性粒细胞 + 胆固醇组;E:MTT 法测定培养后各组 BEC 细胞活率,BEC + CD177<sup>+</sup> 中性粒细胞 + 胆固醇组 BEC 细胞活率较其余各组差异有统计学意义( $P < 0.05$ )

图 2 细胞共培养体系中加入胆固醇刺激前后各组 BEC 细胞形态变化及 BEC 细胞活率结果

Fig. 2 Morphological changes of BEC and results of BEC cell viability in each group in cell co-culture system

表 3 高胆固醇 BA 组与正常胆固醇 BA 组差异表达基因分析[ $M(Q_1, Q_3)$ ]Table 3 Analysis of differentially expressed genes between high-cholesterol BA and normal-cholesterol BA groups[ $M(Q_1, Q_3)$ ]

分组	例数	CYBB	CALR	MT-CYB	MT-ND5	MT-ND1
正常胆固醇 BA 组 (TC ≤ 5.2 mmol/L)	16	0.02 (0.00, 0.16)	0.43 (0.00, 1.99)	10.70 (3.97, 37.20)	5.84 (3.08, 10.72)	7.39 (2.40, 20.03)
高胆固醇 BA 组 (TC > 5.2 mmol/L)	10	1.19 (0.22, 16.85)	2.98 (0.65, 33.50)	86.08 (27.91, 197.13)	53.95 (10.18, 141.55)	83.09 (18.26, 250.47)
Z 值	/	3.180	2.540	2.690	2.160	2.140
P 值	/	0.001	0.010	0.006	0.031	0.031

注 BA:胆道闭锁

## 八、细胞免疫荧光结果

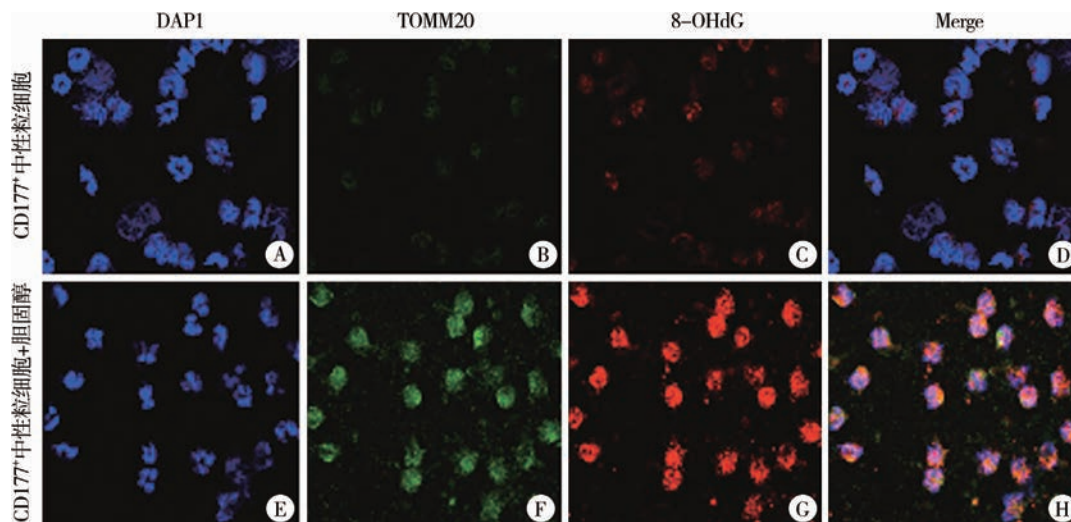
在体外正常 CD177<sup>+</sup> 中性粒细胞中加入胆固醇后,代表线粒体氧化磷酸化指标的 TOMM20 及 DNA 8-OHdG 明显增加(图 3A-H),MFI 值均显著升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 4。同时,经胆固

醇刺激后,正常 CD177<sup>+</sup> 中性粒细胞释放的 NETs 成分 MPO 和 H2B 明显增加(图 4A-H),MFI 值均显著升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 4。上述结果表明胆固醇通过上调 CD177<sup>+</sup> 中性粒细胞线粒体氧化磷酸化水平促进 NETs 的释放,引起胆管损伤。

表 4 NC 组患儿外周血 CD177<sup>+</sup> 中性粒细胞加入胆固醇刺激前后各指标平均荧光强度值比较( $\bar{x} \pm s$ )Table 4 Comparison of MFI values for each index before and after cholesterol stimulation of peripheral blood CD177<sup>+</sup> neutrophils in NC group( $\bar{x} \pm s$ )

分组	TOMM20	8-OHdG	MPO	H2B
CD177 <sup>+</sup> 中性粒细胞	50.70 ± 7.24	130.86 ± 8.47	45.33 ± 1.56	125.37 ± 5.77
CD177 <sup>+</sup> 中性粒细胞 + 胆固醇	73.47 ± 6.36	159.07 ± 10.17	60.51 ± 4.26	157.46 ± 9.40
t 值	-8.717	-5.713	-11.172	-11.254
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

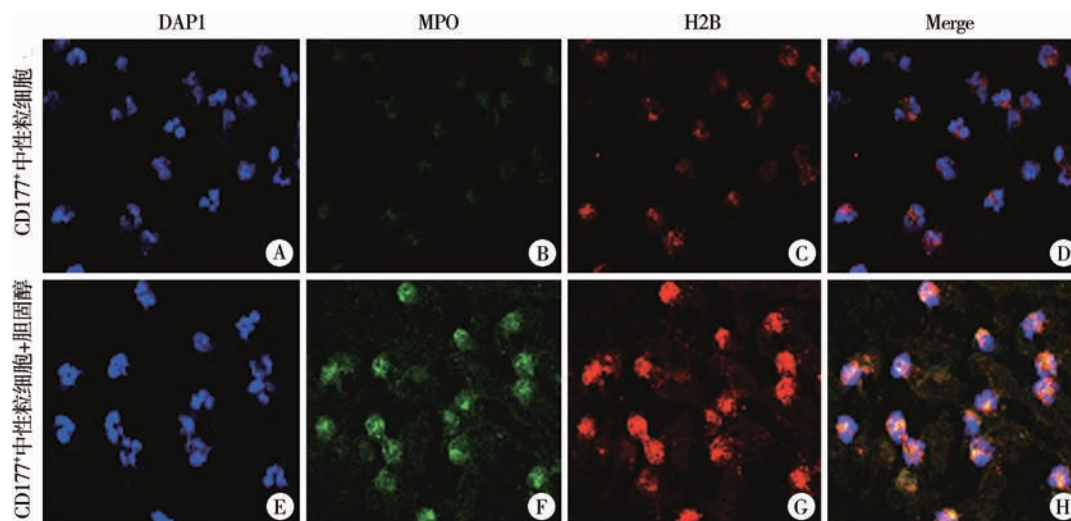
注 NC:正常对照



注 A-D:胆固醇体外刺激前正常 CD177<sup>+</sup> 中性粒细胞 DAPI、TOMM20、8-OHdG 表达及 Merge 结果;E-H:胆固醇体外刺激后正常 CD177<sup>+</sup> 中性粒细胞 DAPI、TOMM20、8-OHdG 表达及 Merge 结果

图 3 胆固醇刺激正常 CD177<sup>+</sup> 中性粒细胞前后氧化磷酸化指标 TOMM20、8-OHdG 免疫荧光染色结果(×630)

Fig. 3 Immunofluorescent staining results of TOMM20 and 8-OHdG, indicators of oxidative phosphorylation, before and after cholesterol stimulation of normal CD177<sup>+</sup> neutrophils(×630)



注 A-D:胆固醇体外刺激前正常 CD177<sup>+</sup> 中性粒细胞 DAPI、MPO、H2B 表达及 Merge 结果;E-H:胆固醇体外刺激后正常 CD177<sup>+</sup> 中性粒细胞 DAPI、MPO、H2B 表达及 Merge 结果

图 4 胆固醇刺激正常 CD177<sup>+</sup> 中性粒细胞前后胞外诱捕网相关指标 MPO、H2B 免疫荧光染色结果(×630)

Fig. 4 Immunofluorescent staining results of MPO and H2B, indicators related to NETs before and after cholesterol stimulation of normal CD177<sup>+</sup> neutrophils(×630)

## 讨论

本研究发现 BA 患儿外周血总胆固醇含量升高,且与胆管损伤密切相关,胆固醇通过刺激 CD177<sup>+</sup> 中性粒细胞产生 NETs 引起 BEC 凋亡。

研究表明,高胆固醇可引起组织细胞损伤,但损伤的机制是由胆固醇自身直接引起的还是间接引起尚无定论<sup>[11-12]</sup>。本研究体外实验中,我们观察到在 BEC 中直接加入胆固醇并不会引起细胞数量的改变,只有在 CD177<sup>+</sup> 中性粒细胞的介导下细胞

数量才会显著减少,表明高胆固醇对 BEC 的损伤作用是间接的。

CD177 属于 Ly-6 家族中的 58-64-kDa 蛋白,其通过糖基磷脂酰肌醇键在嗜中性粒细胞中表达,在生理条件下,约 60% 的中性粒细胞上表达 CD177,然而,机体发生急性炎症时,CD177<sup>+</sup> 中性粒细胞数量明显增加<sup>[13-14]</sup>。胆固醇对中性粒细胞具有活化作用目前有少量报道,但其活化机制尚未见报道。Warnatsch 等<sup>[15]</sup>研究发现,胆固醇结晶通过刺激中性粒细胞释放 NETs,从而进一步活化巨噬细胞和 Th17,放大炎症反应。此外,循环中的胆固醇水平



也能影响中性粒细胞的活性,高胆固醇水平可通过降低 CXCL12 水平来降低中性粒细胞的清除率<sup>[16]</sup>。本研究结果显示,在胆固醇的刺激下,CD177<sup>+</sup> 中性粒细胞线粒体氧化磷酸化水平上调。研究表明,中性粒细胞线粒体氧化磷酸化水平上调可产生过量 ROS,在 ROS 的影响下,细胞内颗粒和核膜破裂,释放的核颗粒和细胞质内容物混合,形成 NETs 所必须的 DNA、组蛋白、NE、MPO 和 PAD4,最终质膜破裂导致细胞溶解,并释放 NETs 至胞外,引起组织细胞损伤<sup>[17-18]</sup>。

综上,我们的研究首次发现了胆固醇在胆道闭锁患儿中含量升高且可引起胆管损伤,首次阐明了胆固醇可通过上调 CD177<sup>+</sup> 中性粒细胞线粒体氧化磷酸化水平,促进胆管上皮细胞的凋亡。然而,目前我们的研究还存在治疗靶点探索的局限性,未来我们将在动物实验基础上进一步探索胆固醇和胆管上皮细胞之间的关系,并在此基础上尝试使用胆固醇抑制剂治疗慢性 BA 小鼠,建立慢性 BA 小鼠模型,使用降胆固醇药物进行干预和评估治疗效果,拓展研究将进一步阐明胆固醇致 BA 的发病机制,并为该病的临床治疗提供实验依据。

**利益冲突** 所有作者声明不存在利益冲突

**作者贡献声明** 肖依依负责研究的设计、实施和起草文章;赵子阳负责研究的实施;童燕陆、王贺珍、陈虹交负责病例数据收集及分析;夏慧敏负责对文章知识性内容进行审阅;张锐忠负责研究设计,并对文章知识性内容进行审阅

## 参 考 文 献

- [1] Lakshminarayanan B, Davenport M. Biliary atresia: a comprehensive review [J]. J Autoimmun, 2016, 73: 1-9. DOI: 10.1016/j.jaut.2016.06.005.
- [2] Schreiber RA. Newborn screening for biliary atresia [J]. JAMA, 2020, 323(12): 1137-1138. DOI: 10.1001/jama.2020.2727.
- [3] 詹江华, 孙溶涓, 王智茹, 等. 日本《胆道闭锁临床实践指南》解读 [J]. 临床小儿外科杂志, 2023, 22(3): 205-210. DOI: 10.3760/cma.j.cn101785-202212025-002.
- [4] Zhan JH, Sun RJ, Wang ZR, et al. Interpretations of Clinical Practice Guidelines for Biliary Atresia in Japan [J]. J Clin Ped Sur, 2023, 22(3): 205-210. DOI: 10.3760/cma.j.cn101785-202212025-002.
- [5] Mack CL, Falta MT, Sullivan AK, et al. Oligoclonal expansions of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cells in the target organ of patients with biliary atresia [J]. Gastroenterology, 2007, 133(1): 278-287. DOI: 10.1053/j.gastro.2007.04.032.
- [6] Zhang Y, Zhou L, Gu GX, et al. CXCL8<sup>high</sup> inflammatory B cells in the peripheral blood of patients with biliary atresia are involved in disease progression [J]. Immunol Cell Biol, 2020, 98(8): 682-692. DOI: 10.1111/imcb.12366.
- [7] 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. DOI: 10.1016/j.jhep.2009.12.027.
- [8] 阿里木江·阿不都热依木, 林峰, 王皓洁, 等. Notch 信号通路活化协同巨噬细胞对胆道闭锁肝纤维化的作用研究 [J]. 临床小儿外科杂志, 2021, 20(4): 376-381. DOI: 10.12260/lxewkzz.2021.04.014.
- [9] Abudureyimu ALMJ, Lin F, Wang HJ, et al. Activation of notch signaling pathway collaborated with macrophages for promoting liver fibrosis in biliary atresia [J]. J Clin Ped Sur, 2021, 20(4): 376-381. DOI: 10.12260/lxewkzz.2021.04.014.
- [10] Zhang RZ, Su L, Fu M, et al. CD177<sup>+</sup> cells produce neutrophil extracellular traps that promote biliary atresia [J]. J Hepatol, 2022, 77(5): 1299-1310. DOI: 10.1016/j.jhep.2022.06.015.
- [11] Manzel A, Muller DN, Hafler DA, et al. Role of "western diet" in inflammatory autoimmune diseases [J]. Curr Allergy Asthma Rep, 2014, 14(1): 404. DOI: 10.1007/s11882-013-0404-6.
- [12] Chen YC, Tung KY, Tsai CH, et al. Lipid profiles in children with and without asthma: interaction of asthma and obesity on hyperlipidemia [J]. Diabetes Metab Syndr, 2013, 7(1): 20-25. DOI: 10.1016/j.dsx.2013.02.026.
- [13] Chen XY, Yin QH, Ma L, et al. The role of cholesterol homeostasis in diabetic kidney disease [J]. Curr Med Chem, 2021, 28(36): 7413-7426. DOI: 10.2174/0929867328666210419132807.
- [14] Janoudi A, Shamoun FE, Kalavakunta JK, et al. Cholesterol crystal induced arterial inflammation and destabilization of atherosclerotic plaque [J]. Eur Heart J, 2016, 37(25): 1959-1967. DOI: 10.1093/eurheartj/ehv653.
- [15] Kim MC, Borchering N, Ahmed KK, et al. CD177 modulates the function and homeostasis of tumor-infiltrating regulatory T cells [J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 5764. DOI: 10.1038/s41467-021-26091-4.
- [16] Hu N, Mora-Jensen H, Theilgaard-Mönch K, et al. Differential expression of granulopoiesis related genes in neutrophil subsets distinguished by membrane expression of CD177 [J]. PLoS One, 2014, 9(6): e99671. DOI: 10.1371/journal.pone.0099671.
- [17] Warnatsch A, Ioannou M, Wang Q, et al. Inflammation. neutrophil extracellular traps license macrophages for cytokine production in atherosclerosis [J]. Science, 2015, 349(6245): 316-320. DOI: 10.1126/science.aaa8064.
- [18] Drechsler M, Megens RTA, van Zandvoort M, et al. Hyperlipidemia-triggered neutrophilia promotes early atherosclerosis [J]. Circulation, 2010, 122(18): 1837-1845. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.961714.
- [19] Lood C, Blanco LP, Purmalek MM, et al. Neutrophil extracellular traps enriched in oxidized mitochondrial DNA are interferogenic and contribute to lupus-like disease [J]. Nat Med, 2016, 22(2): 146-153. DOI: 10.1038/nm.4027.
- [20] Dan Dunn J, Alvarez LA, Zhang XZ, et al. Reactive oxygen species and mitochondria: a nexus of cellular homeostasis [J]. Redox Biol, 2015, 6: 472-485. DOI: 10.1016/j.redox.2015.09.005.

(收稿日期: 2023-03-29)

**本文引用格式:** 肖依依, 赵子阳, 童燕陆, 等. 胆道闭锁中胆固醇活化 CD177<sup>+</sup> 中性粒细胞致胆管损伤的实验研究 [J]. 临床小儿外科杂志, 2023, 22(8): 782-789. DOI: 10.3760/cma.j.cn101785-202303064-016.

**Citing this article as:** Xiao YY, Zhao ZY, Tong YL, et al. Experimental study of bile duct injury caused by cholesterol-activated CD177<sup>+</sup> neutrophils in biliary atresia [J]. J Clin Ped Sur, 2023, 22(8): 782-789. DOI: 10.3760/cma.j.cn101785-202303064-016.