

原发性胆汁性肝硬化患者 外周血 Th9 细胞表达增高及其临床意义*

李 虎^a, 陈 燕^a, 张 蕾^a, 刘挺挺^a, 叶 辛^b, 郭 杰^a, 邓安梅^a

(第二军医大学长海医院 a. 实验诊断科; b. 输血科, 上海 200433)

摘要:目的 探讨原发性胆汁性肝硬化(primary biliary cirrhosis, PBC)患者外周血 Th9 细胞所占百分比并初步探讨其临床意义。方法 应用流式细胞术检测 PBC 患者($n=38$)和健康对照组($n=38$)外周血 Th9 细胞所占百分比, 利用临床资料对患者进行 Mayo 评分。采用实时荧光定量 PCR 法检测患者组和健康对照组外周血单个核细胞(PBMC)中 IL-9, PU-1, TGF- β 的表达量。并采用 ELISA 方法检测患者血清中 IL-9 的表达量。进一步分析 Th9 细胞百分比与 PBC 患者生化指标和 Mayo 评分的相关性。结果 与健康对照组相比, PBC 患者 Th9 细胞百分比增高($t=27.29$; $P<0.01$), 且随疾病分期加重逐渐增高。IL-9, PU-1 和 TGF- β mRNA 的表达量显著增高($t=14.69, 23.92, 10.48$; 均 $P<0.01$), 且血清中 IL-9 的表达量也显著增高($t=11.66$; $P<0.01$)。生化指标(ALP, AST, ALT, GGT, TBIL)较健康对照组均显著增高($t=10.94, 12.95, 10.56, 14.92, 27.70$; 均 $P<0.01$)。Th9 细胞百分比与患者 Mayo 评分、AST, ALT, GGT 和 TBIL 间呈正相关($P<0.05$)。结论 Th9 细胞可能参与了 PBC 发病机制, 且与疾病的发展相关, 这为未来免疫调节治疗靶点的探索提供了新的依据。

关键词: Th9 细胞; 原发性胆汁性肝硬化; 细胞因子

中图分类号: R575.22; R392.11 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2016)03-016-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2016.03.005

Expression of Th9 Cells from Peripheral Blood of Primary Biliary Cirrhosis Patients and Its Clinical Significance

LI Hu^a, CHEN Yan^a, ZHANG Lei^a, LIU Ting-ting^a, YE Xin^b, GUO Jie^a, DENG An-mei^a

(a. Department of Laboratory Diagnosis; b. Department of Transfusion,

Changhai Hospital of the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract: **Objective** To investigate the role of Th9 cells in primary biliary cirrhosis and its clinical significance. **Methods** The percentages of Th9 cells in patients with PBC ($n=38$) and healthy controls ($n=38$) were measured by flow cytometry. Patients clinical data were collected and Mayo risk scores were calculated. Determined the levels of IL-9, PU-1 and TGF- β mRNA expressions and the protein levels of IL-9 in plasma. Further analyzed the correlation between Th9 cells and clinical parameters. **Results** Compared to healthy controls, Th9 cells percentage was higher in PBC patients and increased with disease stages ($t=27.29$; $P<0.01$). IL-9, PU-1 and TGF- β mRNA expressions were increased compared with healthy controls ($t=14.69, 23.92, 10.48$; all $P<0.01$) and the protein level of IL-9 was also up-regulated ($t=11.66$; $P<0.01$). The clinical parameters (ALP, AST, ALT, GGT and TBIL) were higher than healthy controls ($t=10.94, 12.95, 10.56, 14.92, 27.70$; all $P<0.01$). Moreover, the percentage of Th9 cells were positively correlated to Mayo risk, ALT, AST, GGT and TBIL ($P<0.05$). **Conclusion** Th9 cells may be involved in the pathogenesis of PBC and related to the disease stage, which provides new clues for future immunotherapy.

Keywords: Th9 cells; primary biliary cirrhosis; cytokines

原发性胆汁性肝硬化(primary biliary cirrhosis, PBC)是一种典型的自身免疫性疾病,其特点是产生抗线粒体抗体(AMA),病理学特点为在中小胆管区域产生渐进的非化脓性炎症反应^[1,2]。疾病进展可发生肝纤维化、肝硬化以及肝衰竭。PBC 患者机体免疫稳态被打破,在胆管周围有大量的炎

症细胞引发机体适应性免疫应答,例如自反应性 T 细胞、Treg 细胞、B 细胞和单核细胞等^[3]。近年来的研究表明, T 细胞及其亚群数量和功能紊乱在 PBC 的发病中处于关键环节^[4]。Th9 细胞是最近被发现的一种新的 T 细胞亚群,在过去被认为是 Th2 的一个亚群^[5]。但目前认为其功能与 Th2 细

* 基金项目: 973 计划(2013CB531606), 国家自然科学基金(81471605, 81401358, 81501397, 81501398), 上海申康基金(CHDC22014014), 上海教育科学基金(D14017), 军队科研基金(BWS14J023), 长海医院基金(CH125530300), 南京军区科研基金(12MA056)。

作者简介: 李 虎(1986—), 男, 主管技师, 大学本科, 从事临床检验工作, 主要研究方向为感染免疫及自身免疫, Tel: 021-31162075, E-mail: lihul127@126.com。

陈 燕(1977—), 女, 主管技师, E-mail: chenyan770628@163.com, 共同第一作者。

通讯作者: 邓安梅, 主任医师, 教授, E-mail: amdeng70@163.com。

胞存在差异, Th9 细胞能够在转化生长因子- β (TGF- β), 白细胞介素(IL-4)或胸腺基质淋巴生长素(TSLP)的存在下经 T 细胞抗原受体(TCR)刺激分化形成, 以大量分泌 IL-9 为其特征^[6]。已有的研究表明, Th9 细胞数量和功能的紊乱与多种自身免疫性疾病相关, 如系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎等^[7]。本研究拟探讨 Th9 细胞亚群在 PBC 患者外周血的表达情况, 并初步分析其在发病机制中的作用, 为进一步理解 PBC 的免疫学发病机制提供新的实验依据, 并为未来免疫调节治疗靶点的选择提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 研究对象 本研究共纳入 2013 年 9 月~2015 年 5 月间在上海长征医院和上海长海医院新诊断的 PBC 患者 38 例, 其中男性 6 例, 女性 32 例, 平均年龄 53.8 岁。同期纳入性别、年龄相匹配的健康体检者 38 例作为对照组。所有患者的诊断均符合美国肝病学会(AASLD)2000 推荐的 PBC 诊断标准^[8]。所有 PBC 患者根据其组织病理学表现分为四期: I 期为胆管炎症期, 12 例; II 期为胆管增生期, 9 例; III 期为疤痕形成期, 8 例; IV 期为硬化期, 9 例。本研究通过上海长征医院和上海长海医院伦理委员会批准, 所有研究对象均签署书面知情同意书。

1.2 试剂与仪器 淋巴细胞分离液(sigma), Trizol(Introgen), 反转录试剂盒(Takara), ELISA 试剂盒, IL-9 抗体(BD), CD4 抗体(BD), ABI prism 7500 型荧光定量 PCR 仪(ABI), 全自动生化检测仪(日立), 流式细胞仪(BD FACSCalibur)。

1.3 方法

1.3.1 Mayo 评分: 是用来判断 PBC 预后的可靠指标。其计算公式为 $R = 0.871 \times \ln \text{胆红素} - 2.53 \times \ln \text{清蛋白} + 0.039 \times \text{年龄} + 2.38 \times \ln \text{凝血酶原时间} + 0.859 \times \text{浮肿程度}$ (0: 没有应用利尿剂并不出现浮肿; 0.5: 应用利尿剂但无浮肿或者没有应用利尿剂但出现浮肿; 1: 应用利尿剂其有浮肿)^[9]。

1.3.2 流式细胞术检测 Th9 细胞: 取 100 μl 外周血加入流式管, 加入 PE 标记的抗 IL-9 (BD) 和 FITC 标记的抗 CD4 (BD) 各 5 μl 并设置同型对照管和空白对照管。避光孵育 30 min 后, 加入红细胞裂解液, 再加入 PBS 洗涤, 离心后弃上清, 最后加入 100 μl PBS 混匀后上机检测, 定义 $\text{CD4}^+ \text{IL-9}^+$ 细胞为 Th9 细胞亚群。

1.3.3 实时荧光定量 PCR 法检测 PBMC 中 IL-9, PU-1, TGF- β 的表达量: 采用 Ficoll 密度梯度离心法分离外周血单个核细胞(PBMC), 抽提总 RNA 并制备 cDNA。采用 SYBR Green 法进行扩增反

应。以 GAPDH 为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 IL-9, PU-1 和 TGF- β 在两组标本中的相对表达量。

1.3.4 采用 ELISA 法检测 IL-9 浓度: 根据试剂盒说明书检测血清中 IL-9 的浓度。

1.4 统计学分析 使用 SPSS17.0 统计软件。计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 两组间均数比较采用成组 t 检验, 多组间均数比较采用方差分析, 两两比较使用 Bonferroni 法。相关性分析使用 Spearman 秩相关法。以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准, 所有检验均为双侧检验。

2 结果

2.1 PBC 患者外周血 Th9 细胞亚群比例显著增高 见图 1。与健康对照相比, PBC 患者外周血 Th9 细胞亚群百分比增高, 差异有统计学意义($t = 27.29, P < 0.01$)。PBC 患者的四个分期相互比较, II 期高于 I 期且 IV 期高于 III 期, 差异均有统计学意义($t = 4.112, 4.512; P < 0.01$), II 期与 III 期之间的差异无统计学意义($P < 0.01$)。

2.2 PBC 患者 IL-9 蛋白水平与 mRNA 水平表达

见图 2。与健康对照组相比, PBC 患者 PBMC 中的 mRNA 表达水平及血清中 IL-9 蛋白的表达量均增高, 差异有统计学意义($t = 14.69, 11.66; P < 0.01$)。

2.3 PBC 患者 PU-1, TGF- β 的表达量 见图 3。与健康对照组相比, PBC 患者中 PU-1, TGF- β mRNA 表达水平均增高, 差异有统计学意义($t = 23.92, 10.48; P < 0.01$)。

2.4 PBC 患者临床生化指标的测定结果 见表 1。我们检测了 PBC 患者和健康对照组血清中 ALP, AST, ALT, GGT 和 TBIL 的水平, 与健康对照组相比, PBC 患者上述指标均增高, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。

表 1 PBC 患者生化指标测定

项 目	HC 组	PBC 组	t 值	P 值
ALP(U/L)	63 \pm 21	397 \pm 187	10.94	<0.01
AST(U/L)	18 \pm 7	147 \pm 61	12.95	<0.01
ALT(U/L)	23 \pm 9	166 \pm 83	10.56	<0.01
GGT(U/L)	28 \pm 13	443 \pm 171	14.92	<0.01
TBIL($\mu\text{mol/L}$)	12 \pm 3	143 \pm 29	27.70	<0.01

注: ALP: 碱性磷酸酶; AST: 天冬氨酸氨基转移酶; ALT: 丙氨酸氨基转移酶; GGT: γ 谷氨酰转肽酶; TBIL: 总胆红素。

2.5 Th9 细胞与临床特征的相关性分析 本研究发现 PBC 患者外周血 Th9 细胞百分比与 Mayo 评分、AST, ALT, GGT, TBIL 呈正相关($r = 0.41, 0.29, 0.19, 0.35, 0.46; P < 0.05$), 与 ALP 水平无相关性($r = 0.23; P > 0.05$)。

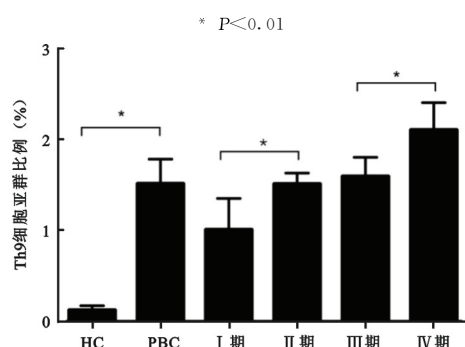


图1 PBC患者与健康对照组中Th9细胞亚群百分比

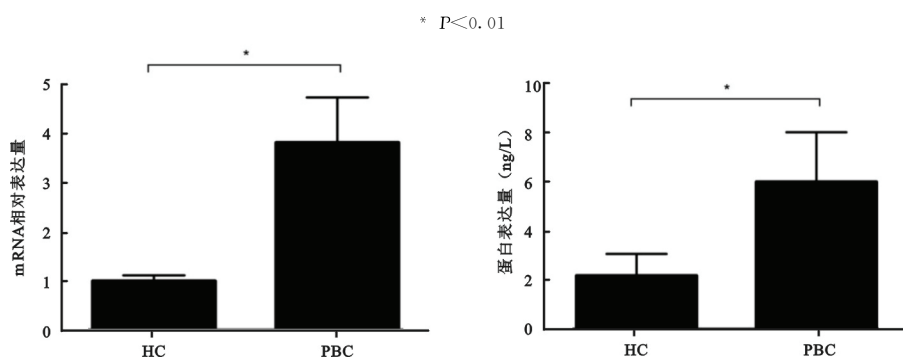


图2 PBC患者与健康对照组中IL-9 mRNA蛋白与水平表达量

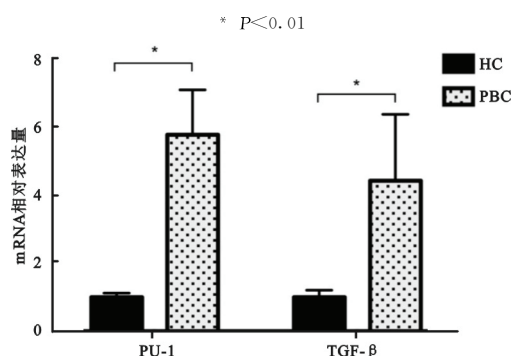


图3 PBC患者与健康对照组中PU-1,TGF-β mRNA表达量

GGT和ALT是传统的用于评估肝脏炎症情况的指标,Mayo评分是新的系统评估PBC患者病情及预后的指标^[12]。在PBC患者的不同分期中,Th9细胞均有增高的趋势,且随疾病分期的加重,其增高程度亦加重。这些都说明Th9细胞与PBC疾病的进展相关,并且能够促进疾病的发展。研究表明,Th9细胞的发育受到多种转录因子和细胞因子的调控,其中PU-1,TGF-β的作用十分重要。Th9细胞与多种自身免疫性疾病相关,其分泌的细胞因子IL-9参与了T细胞依赖的B细胞分化增殖以及自身抗体的产生^[13]。Th9细胞通过合成分泌IL-9,与IL-9受体结合并将其激活,然后经JAK-STAT等通路对多种靶细胞发挥其生物学效应。因此,Th9细胞在疾病发病中起了重要作用。

综上所述,调控Th9细胞发育的关键因子增高,使Th9细胞的数量和功能异常变化,导致机体免疫功能紊乱,进而参与了PBC的发生发展,监测

3 讨论 PBC的发病机制至今仍不明确,以往研究表明,主要与基因、环境与免疫等因素有关,特别是与机体免疫紊乱所产生的自身抗体及炎性因子有密切联系^[10,11]。由于病因的不明确,导致PBC在临床上的诊断治疗都十分困难,因此深入研究PBC的免疫病理机制将有助于疾病的个体化治疗。本研究从新的角度探讨了PBC的病因,首次发现Th9细胞在PBC患者中显著增高,且与Mayo评分、TBIL,GGT,AST和ALT有相关性。

Th9细胞的数量可能提示患者所处的疾病状态,这为PBC未来免疫调节治疗的开发提供了新的潜在靶点。

参考文献:

- [1] Shimoda S, Harada K, Niuro H, et al. Biliary epithelial cells and primary biliary cirrhosis; the role of liver-infiltrating mononuclear cells [J]. *Hepatology* (Baltimore, Md), 2008, 47(3): 958-965.
- [2] Abe M, Onji M. Natural history of primary biliary cirrhosis [J]. *Hepatology Research*, 2008, 38(7): 639-645.
- [3] 杜慧慧, 张玮. 原发性胆汁性肝硬化发病机制 [J]. *肝脏*, 2012, 17(1): 50-53.
- [4] Webb GJ, Siminovich KA, Hirschfield GM. The immunogenetics of primary biliary cirrhosis; a comprehensive review [J]. *Journal of Autoimmunity*, 2015, 64(1): 42-52.
- [5] Kaplan MH. Th9 cells: differentiation and disease [J]. *Immunological Reviews*, 2013, 252(1): 104-115.
- [6] Yao W, Zhang Y, Jabeen R, et al. Interleukin-9 is required for allergic airway inflammation mediated by the cytokine TSLP [J]. *Immunity*, 2013, 38(2): 360-372.
- [7] Ciccio F, Guggino G, Rizzo A, et al. Potential involvement of IL-9 and Th9 cells in the pathogenesis of rheumatoid arthritis [J]. *Rheumatology*, 2015, 54(12): 2264-2272.

(下转 21 页)

化氮还原酶(norA)、胞外酶 Y(exoY)、胞外酶 S(exoS)、脓菌素(PYP)、胞外酶 U(exoU)、胞外酶 T(exoT)和弹力蛋白酶(lasB)等多种毒力因子,其可通过阻碍宿主细胞蛋白质合成等作用来增强自身毒力,以及介导部分抗生素耐药。然而其并不能完全解释铜绿假单胞菌的耐药机制,与浮游细菌相比,生物被膜细菌对抗菌药物的抗性可提高10~1000倍,现有药物难以清除生物被膜,生物被膜细菌高度耐药的机制尚未阐明^[5]。Cif基因在囊性纤维化研究中被发现,其可在铜绿假单胞菌中表达,但Cif基因在黏液型和非黏液型铜绿假单胞菌中的表达差异却未见报道,本次研究主要对两种不同类型的铜绿假单胞菌Cif基因表达差异作比较。Cif可以使肺泡上皮细胞氯离子转运通道数量减少,从而减少肺泡表面黏液的分泌,降低了气管纤毛排除黏液的作用^[6],这也可能是黏液型铜绿假单胞菌感染不易清除反复发作的原因。本次研究显示,黏液型铜绿假单胞菌和非黏液型铜绿假单胞菌对应宿主CRP, WBC等炎症指标差异无统计学意义,其与Cif基因表达量相关性不明显,可能是因为本次研究分离铜绿假单胞菌为呼吸道分离菌株,其可为感染菌或定植菌,故不与宿主炎症程度相关,而此炎症因子与PA感染也无特异性;研究还提示黏液型PA检出率与支气管扩张相关,其检出率为65%,可能黏液型PA在支气管扩张病人中较其它菌更利于生存定植。Saue等^[7]研究发现黏液型PA和非黏液型PA在流动介质中可形成不同类型的生物被膜,黏液型PA为塔状或蘑菇状,非黏液型PA则为薄膜状。逆转录PCR结果显示,黏液型铜绿假单胞菌Cif基因表达量显著高于非黏液型铜绿假单胞菌($t=2.09$, $P<0.05$),提示Cif基因表达量可能与黏液型菌落及不同类型生物被膜的形成有关,可能为PA新的毒力因子,但均需

要进一步研究证实。随着人工关节等医疗器械的使用,生物被膜的研究显得越来越重要,传统研究认为铜绿假单胞菌生物被膜的形成与藻酸盐的合成有关,本次研究结果为铜绿假单胞菌生物被膜研究提供了新的方向,这对于阐明铜绿假单胞菌生物被膜的形成机制及耐药性研究均有重大意义。

参考文献:

- [1] Wagner VE, Iglewski BH. *P. aeruginosa* biofilms in CF infection[J]. Clin Rev Allergy Immunol, 2008, 35(5):124-134.
- [2] Borlee BR, Goldman AD, Murakami K, et al. *Pseudomonas aeruginosa* uses a cyclic-di-GMP-regulated adhesin to reinforce the biofilm extracellular matrix[J]. Mol Microbiol, 2010, 75(4):827-842.
- [3] Sheppard DN, Welsh MJ. Structure and function of the CFTR chloride[J]. Physiol Rev, 1999, 79: s23-s45.
- [4] Alicia E, Christopher D, Emily L, et al. Epoxide-mediated CifR repression of cif gene expression utilizes two binding sites in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Journal of Bacteriology, 2012, 194(19):5315-5324.
- [5] 田德英,倪明,余冰,等.黏液型和非黏液型铜绿假单胞菌生物被膜形成及藻酸盐基因的表达差异[J].中华传染病杂志,2006,24(3):155-158.
Tian DY, Ni M, Yu B, et al. The investigation of biofilm formation, alginate biosynthetic genes expression and sequence of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Chinese Journal of Infectious Diseases, 2006, 24(3):155-158.
- [6] Boucher RC. Airway surface dehydration in cystic fibrosis: pathogenesis and therapy[J]. Annu Rev Med, 2007(58):157-170.
- [7] Sauer K, Camper AK, Ehrlich GD, et al. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm[J]. Bacteriol, 2002, 184(4):1140-1154.
- [8] Heathcote EJ. Management of primary biliary cirrhosis. The American Association for the Study of Liver Diseases practice guidelines [J]. Hepatology (Baltimore, Md), 2000, 31(4):1005-1013.
- [9] Murtaugh PA, Dickson ER, Van Dam GM, et al. Primary biliary cirrhosis: prediction of short-term survival based on repeated patient visits[J]. Hepatology (Baltimore, Md), 1994, 20(1 Pt 1):126-134.
- [10] Griffiths L, Jones DE. Pathogenesis of primary biliary cirrhosis and its fatigue[J]. Digestive Diseases (Basel, Switzerland), 2014, 32(5):615-625.
- [11] Griffiths L, Dyson JK, Jones DE. The new epidemiology of primary biliary cirrhosis[J]. Seminars in Liver Disease, 2014, 34(3):318-328.
- [12] 王洪泓,周晔,胡志德,等.原发性胆汁性肝硬化患者外周血TNFSF9的表达及其疾病关联性[J].现代检验医学杂志,2010,25(2):25-30.
Wang QH, Zhou Y, Hu ZD, et al. Expression of TNFSF9 in the peripheral blood mononuclear cells of primary biliary cirrhosis patients and its clinical significance[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2010, 25(2):25-30.
- [13] Pan HF, Leng RX, Li XP, et al. Targeting T-helper 9 cells and interleukin-9 in autoimmune diseases[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2013, 24(6):515-522.

收稿日期:2015-04-05

修回日期:2015-12-23

收稿日期:2015-12-09

修回日期:2016-01-04