

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.08.003

自噬参与原发性胆汁性胆管炎患者 Th17/ Treg 免疫失衡的研究 *

孙可帅 王 璐 李 博 刘雁声 田思远 张 苗 马硕怡 周新民[△]

(第四军医大学西京消化病医院肿瘤生物学国家重点实验室 陕西 西安 710032)

摘要 目的: Th17/ Treg 免疫失衡在原发性胆汁性胆管炎(PBC)的发病机制中起到关键作用。自噬是调节 T 细胞稳态的重要环节。本研究旨在探索自噬对 PBC 患者 Th17/ Treg 免疫失衡的影响。**方法:** 选取 20 例初次诊断的 PBC 患者, 20 例健康对照者, 收集其外周血单个核细胞(PBMCs)。利用流式细胞术检测 PBC 患者与健康对照者 PBMCs 中 Th17 和 Treg 细胞分布及其胞内自噬的水平, 进一步体外利用氯喹抑制自噬, 证实自噬对 PBC 患者 Th17/ Treg 平衡的影响。**结果:** 相较于健康对照者, PBC 患者 Th17 细胞占 CD4⁺T 比例上升($P<0.05$), 且血清中 IL-17 含量较高($P<0.01$); Treg 细胞比例下降($P<0.05$), 且血清中 TGF- β 含量较低($P<0.01$)。而 PBC 患者 Th17 细胞和 Treg 细胞内自噬水平均升高。另外, 体外实验结果证实, 自噬抑制剂氯喹能够有效地恢复 PBC 患者 PBMCs 中 Th17/ Treg 平衡。**结论:** 异常活化的自噬可导致 PBC 患者 Th17/ Treg 免疫失衡, 抑制自噬能够在体外恢复此平衡。因此, 对异常自噬的干预可能将成为 PBC 疾病治疗的新方法。

关键词: 原发性胆汁性胆管炎; Th17; Treg; 自噬**中图分类号:** R-33; R657.45 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2020)08-1410-06

Autophagy Participates in Th17/ Treg Imbalance of Patients with Primary Biliary Cholangitis*

SUN Ke-shuai, WANG Lu, LI Bo, LIU Yan-sheng, TIAN Si-yuan, ZHANG Miao, MA Shuo-yi, ZHOU Xin-min[△]

(State Key Laboratory of Cancer Biology, Xijing Hospital of Digestive Diseases, The Fourth Military University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: Immune disorder plays a critical role in the pathogenesis of primary biliary cholangitis (PBC). Autophagy is a significant process to maintain the homeostasis of T cell. The purpose of this study was to investigate the effect of autophagy on Th17/ Treg immune imbalance in patients with PBC. **Methods:** Twenty newly diagnosed patients with PBC, and twenty healthy controls were selected. And their peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were collected. We detected distribution and intracellular autophagy flux of Th17 and Treg cells of patients with PBC and healthy controls by flow cytometry. In addition, we demonstrated the effect of autophagy on Th17/ Treg immune balance of patients with PBC in vitro. **Results:** Compared with healthy controls, patients with PBC had increased proportion of Th17 cells ($P<0.05$) and IL-17 in serum ($P<0.01$), while decreased Treg cells ($P<0.05$) and TGF- β ($P<0.01$). Both Th17 and Treg cells of patients with PBC exhibited activated autophagy. Additionally, the results in vitro confirmed that autophagy inhibitor chloroquine is able to restore Th17/ Treg immune balance in patients with PBC. **Conclusions:** Abnormally activated autophagy contributed to Th17/ Treg immune balance in patients with PBC, and inhibition of autophagy can restore this balance in vitro. Therefore, intervention in abnormal autophagy may be a new method for the treatment of PBC.

Key words: Primary biliary cholangitis; Th17; Treg; Autophagy**Chinese Library Classification(CLC):** R-33; R657.45 **Document code:** A**Article ID:** 1673-6273(2020)08-1410-06

前言

原发性胆汁性胆管炎 (Primary biliary cholangitis, PBC) 是一种免疫介导的慢性肝内胆汁淤积性疾病, 多见于中年女性。该病肝脏组织病理学主要表现为汇管区淋巴细胞浸润和肝内中小胆管非化脓性破坏。血清抗线粒体抗体 (Anti-mitochondrial antibody, AMA)^[1] 和抗原特异性自身反应性 CD4⁺T^[2] 和 CD8⁺T^[3] 细胞是 PBC 的重要免疫学特点, 其中 Th17/ Treg 失衡是 PBC 重要的免疫学发病机制之一^[4-6]。尽管 PBC 免疫学发病机制方面取得了较大进展^[7], 但具体病因和发病机制仍不清。因此, 进一步探讨 PBC 肝脏损伤的免疫学机制, 对于深入了解 PBC 疾病进展及临床治疗具有重要意义。

原发性胆汁性胆管炎 (Primary biliary cholangitis, PBC) 是一种免疫介导的慢性肝内胆汁淤积性疾病, 多见于中年女性。该病肝脏组织病理学主要表现为汇管区淋巴细胞浸润和肝内中小胆管非化脓性破坏。血清抗线粒体抗体 (Anti-mitochondrial antibody, AMA)^[1] 和抗原特异性自身反应性 CD4⁺T^[2] 和 CD8⁺T^[3] 细胞是 PBC 的重要免疫学特点, 其中 Th17/ Treg 失衡是 PBC 重要的免疫学发病机制之一^[4-6]。尽管 PBC 免疫学发病机制方面取得了较大进展^[7], 但具体病因和发病机制仍不清。因此, 进一步探讨 PBC 肝脏损伤的免疫学机制, 对于深入了解 PBC 疾病进展及临床治疗具有重要意义。

* 基金项目: 国家自然科学基金项目 (81770569); 中国博士后科学基金项目 (2018M643871);

国家重大新药创制项目 (2014ZX09508002-001)

作者简介: 孙可帅 (1994-), 硕士研究生, 主要研究方向: 慢性肝病的防治, E-mail: kerrsun123@163.com

[△] 通讯作者: 周新民 (1963-), 教授, 主要研究方向: 慢性肝病的发病机制及治疗方面的研究, 特别是肝功能衰竭的人工肝支持治疗,

E-mail: zhouxmm@fmmu.edu.cn

(收稿日期: 2019-10-28 接受日期: 2019-11-25)

自噬是维持 T 细胞稳态及功能的重要环节^[8,9],参与 T 细胞介导的免疫和自身免疫反应^[10]。近年来相继有学者提出,自噬有望解释 PBC 疾病研究中的困惑^[11],但未见相关报道。本研究的目的在于探讨自噬在 PBC 患者 Th17/ Treg 失衡中的作用,有望为 PBC 免疫学发病机制提供新的解释。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 研究对象 本研究经西京消化病医院医学伦理委员会批准,共纳入 2019 年 3 月到 10 月就诊于我院的初次诊断的 PBC 患者 20 例,健康志愿者 20 例,所有对象均已签署知情同意书。PBC 诊断标准依据 2009 年 AASLD^[12]和 2017 年 EASL^[13]的诊疗指南:①胆汁淤积的生化证据,ALP 升高,且影像学检查可除外胆道梗阻;② AMA 高滴度阳性;③ 肝脏活检提示有非化脓性胆管炎及中小胆管破坏。患者满足上述三项标准中的两项即诊断为 PBC。排除标准为诊断前 6 个月内使用过糖皮质激素或免疫抑制剂,伴有肝硬化并发症,或合并自身免疫性肝炎、原发性硬化性胆管炎、酒精性肝病、Wilson's 病、乙肝、丙肝等肝脏相关疾病及其他自身免疫性疾病者。收集所有健康志愿者及患者治疗前的外周血样本及临床资料。两组间性别、年龄无明显差异。

1.1.2 试剂 淋巴细胞分离液(Lymphoprep™, Density gradient medium for the isolation of mononuclear cells)购自 STEMCELL 公司;RPMI 1640 培养基,PBS 缓冲液购自 Gibco 公司;X-VIVO15 培养基购自 Lonza 公司;细胞刺激剂[eBioscience™, Cell Stimulation Cocktail (plus protein transport inhibitors) (500×)]购自 Invitrogen 公司;流式胞内细胞因子检测试剂盒(BD Cytotfix/Cytoperm™, Fixation/Permeabilization Kit)购自 BD 公司;流式 Treg 细胞检测试剂盒(eBioscience™, Foxp3/Transcription factor staining buffer set)购自 Invitrogen 公司;Mouse anti-human CD3 (PE-Cy™7), Mouse anti-human CD4 (FITC), Donkey anti-rabbit IgG (Brilliant Violet™ 421)购自 Biolegend 公司, Mouse anti-human CD25 (PE), Mouse anti-human IL-17 (Brilliant Violet™ 510), Mouse anti-human Foxp3 (Alexa Fluor™ 647) 购自 BD 公司; Rabbit anti-human LC3 购自 MBL 公司; Rabbit anti-human p62 购自 abcam 公司;皂素(saponin),氯喹(chloroquine, CQ)均购自 Sigma-Aldrich 公司;ELISA 试剂盒(Human IL-2 ELISA Kit, Human TGF-β ELISA Kit)均购自 Biolegend 公司。

1.2 方法

1.2.1 外周血单个核细胞(PBMCs)的分离 取患者及健康对照者外周静脉血 20 mL,肝素锂抗凝。将 20 mL 提前预热的淋巴细胞分离液加至 50 mL 离心管中,缓缓向其上方加入经 RPMI 1640 培养基 1:1 稀释的血液样本,避免破坏其分层。1600 rpm 离心 30 分钟后取出离心管,避免晃动,用吸管小心吸取白膜层细胞至新离心管中,此即为 PBMCs。加入 30 mL RPMI 1640 培养基重悬,1300 rpm 离心 10 分钟,弃上清。加入 10 mL 红细胞裂解液,重悬后静置 10 分钟,离心弃上清。最后再加入 30 mL RPMI 1640 培养基洗涤一次,计数备用。

1.2.2 体外刺激 PBMCs 产生细胞因子 因为仅 1%未刺激过的细胞能够产生细胞因子,因此流式细胞术检测细胞因子之前

需对细胞进行体外刺激。向 1×10^6 mL PBMCs 悬液中加入含 PMA 与离子霉素的细胞刺激剂,37℃孵育 4 小时。

1.2.3 流式细胞术 收集刺激或未刺激过的 PBMCs 至流式管中,加入荧光素标记的抗体或同型对照抗体对其表面标记进行染色,常温避光染色 20 分钟。每管加入 2 mL 含 0.1 % 皂素的 PBS 缓冲液重悬洗涤细胞,以排除非自噬相关的 LC3-I 的影响^[14],2000 rpm 离心 5 分钟后弃上清。加入 500 μL Fixation/ Permeabilization 重悬细胞,常温避光孵育 20 分钟固定细胞,2000 rpm 离心 5 分钟后弃上清。加入 2 mL $1 \times$ Perm/ Wash 缓冲液,常温避光孵育 10 分钟以通透细胞,2000 rpm 离心 5 分钟后弃上清,加入一抗或同型对照抗体常温避光孵育 30 分钟。加入 2 mL $1 \times$ Perm/ Wash 缓冲液洗涤,2000 rpm 离心 5 分钟后弃上清,加入荧光二抗常温避光孵育 30 分钟。2 mL $1 \times$ Perm/ Wash 缓冲液洗涤一次后,500 μL PBS 重悬,上机检测。

1.2.4 酶联免疫吸附试验(Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA) ELISA 试剂盒用以检测人血清、细胞培养液中 IL-17, TGF-β 水平。按试剂盒说明配置标准品及工作液,将不同浓度标准品、待测血清或细胞培养上清加入相应孔中,100 μL/孔,用胶纸封住,37℃孵育 90 分钟。然后甩尽孔内液体,每孔加入洗涤液 350 μL,静置 30 秒后甩尽液体,在吸水纸上拍干,上述步骤重复 4 次。每孔加入生物素化抗体工作液 100 μL,用胶纸封住,37℃孵育 60 分钟后再洗板 4 次。每孔加入酶结合工作液 100 μL,用胶纸封住,37℃孵育 30 分钟后再洗板 4 次。每孔加入显色剂 100 μL,避光 37℃孵育 20 分钟后,每孔加入终止液 100 μL,混匀后即刻测量 OD₄₅₀ 值。

1.2.5 细胞培养 将密度梯度离心得到的 PBC 患者 PBMCs 重悬于 X-VIVO15 培养基中,分别设置氯喹处理组(10 μmol/L)和对照组,37℃,5 % CO₂ 孵箱培养 6 小时。

1.3 统计学分析

两组临床指标的统计和分析通过 IBM SPSS Statics 23 实现,定量数据统计分析和作图通过 Prism Graphpad 5 软件实现,两组之间的比较采取 t 检验, $P < 0.05$ 时定义为有统计学差异,数据按照均数 ± 标准差表示。

2 结果

2.1 研究对象临床指标

研究对象分为两组,初诊 PBC 患者组($n=20$)和健康对照组($n=20$),两组的临床指标如表 1 所示。

2.2 PBC 患者 Th17/ Treg 细胞失衡

为了解初诊的 PBC 患者外周血 Th17/ Treg 平衡状态,我们利用流式细胞术分别检测了 PBC 患者($n=20$)和健康对照者($n=20$)外周血 Th17 和 Treg 细胞占 CD4⁺ T 细胞的比例。如图 1a-f 所示,PBC 患者外周血内 Th17 细胞的比例明显高于健康对照者($1.48 \pm 0.13 \%$ vs. $1.16 \pm 0.08 \%$, $P < 0.05$),而 Treg 细胞比例较健康对照者显著降低($3.50 \pm 0.25 \%$ vs. $4.24 \pm 0.23 \%$, $P < 0.05$)。为了进一步了解 PBC 患者外周血 Th17 和 Treg 细胞的功能,我们通过 ELISA 方法检测了血清相关细胞因子 IL-17, TGF-β 的水平。如图 1g-h 所示,相较于健康对照者,PBC 患者血清中 IL-17 水平明显升高, (7.07 ± 0.55 pg/mL vs. 4.82 ± 0.59 pg/mL, $P < 0.01$) 而 TGF-β 水平明显降低 (32.80 ± 2.98

表 1 PBC 患者及健康对照者临床指标($\bar{x} \pm s$)Table 1 Clinical features of PBC patients and health control included in the study($\bar{x} \pm s$)

	PBC(n=20)	HC(n=20)
Age	52.45 $\pm$ 9.26	52.01 $\pm$ 10.14
Gender(F/M)	14/6	13/7
ALT(U/L)	52.12 $\pm$ 33.44	17.98 $\pm$ 9.15
AST(U/L)	66.35 $\pm$ 41.33	19.55 $\pm$ 8.33
ALP(U/L)	290.56 $\pm$ 192.37	73.21 $\pm$ 45.67
GGT(U/L)	308.13 $\pm$ 264.98	47.98 $\pm$ 46.13
TBIL(mg/dL)	1.40 $\pm$ 1.26	0.61 $\pm$ 0.33
Albumin(g/L)	38.30 $\pm$ 4.76	52.14 $\pm$ 4.10
AMA(+)/(-)	17/3	0/20
IgM(g/L)	4.43 $\pm$ 2.66	-
Clinical stage		
Non-cirrhotic	12	-
Cirrhotic	8	-

Note: F/M, Female and Male; AMA, anti-mitochondrial antibody.

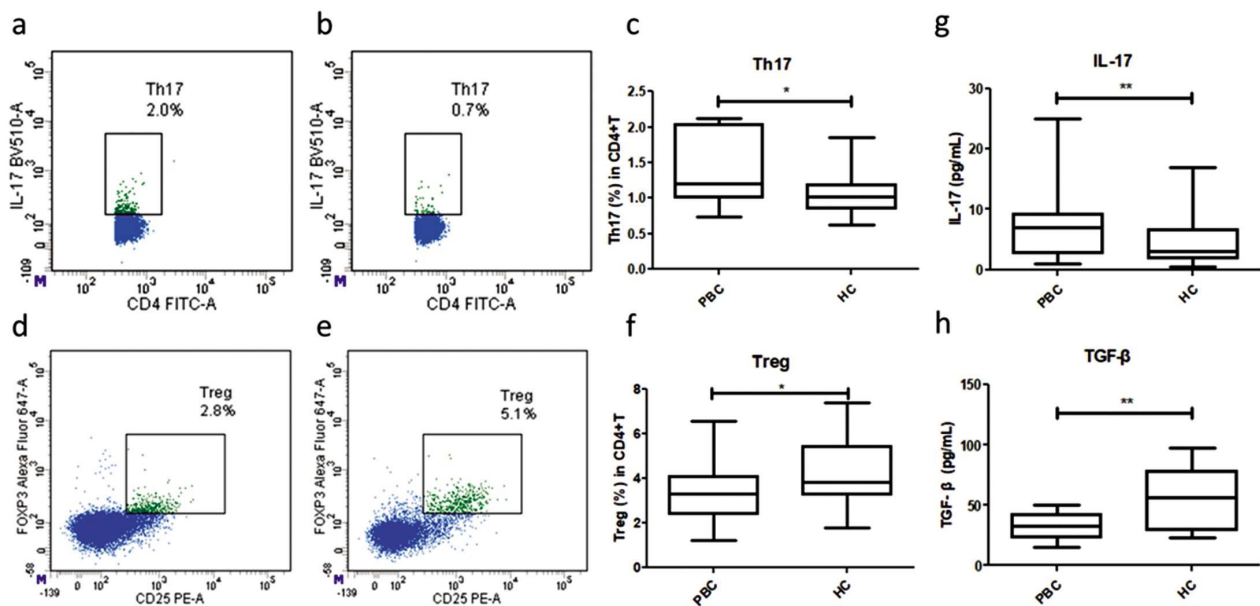


图 1 PBC 患者 Th17/ Treg 失衡

(a, b, c) PBC 患者(a)和健康对照者(b)外周血 Th17 细胞占 CD4⁺T 细胞的比例;(d, e, f) PBC 患者(d)和健康对照者(e)外周血 Treg 细胞占 CD4⁺T 细胞的比例;(g, h)血清中 IL-17 和 TGF-β 的水平

Fig.1 Patients with PBC exhibit Th17/ Treg imbalance

(a, b, c) Proportion of Th17 in CD4⁺T in peripheral blood from patients with PBC(a) and health controls(b);(d, e, f) Proportion of Treg in CD4⁺T in peripheral blood with patients with PBC (d) and health controls (e); (g, h) Levels of IL-17 and TGF-β in serumNote: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

pg/mL vs. 54.50 ± 6.81 pg/mL, $P < 0.01$)。以上结果说明 PBC 患者外周血 Th17 细胞数量增加且功能增强,而 Treg 细胞数量减少且功能降低,说明 PBC 患者 Th17/ Treg 处于失衡状态。

2.3 自噬与 PBC 患者 Th17 和 Treg 失衡密切相关

为明确自噬对 PBC 患者 Th17/Treg 失衡的影响,我们借助流式细胞术检测了胞内两个自噬标志物(LC3-II 和 p62)的含量,观察 PBC 患者 Th17 和 Treg 细胞内的自噬水平。结果如图

2a-b 所示,PBC 患者 Th17 内 LC3-II 的表达水平明显高于健康对照,Treg 亦表现出相同趋势,如图 2c-d。为了明确自噬标志物 LC3-II 水平的升高是因为自噬功能激活还是降解能力受损,我们还检测了自噬底物 p62 的水平。如图 2e-h 所示,PBC 患者 Th17 和 Treg 细胞内 p62 的水平明显低于健康对照。细胞内升高的 LC3-II 和降低的 p62 可以说明 PBC 患者 Th17 和 Treg 细胞内的自噬被激活,而 Th17/ Treg 失衡可能与自噬异常激活密

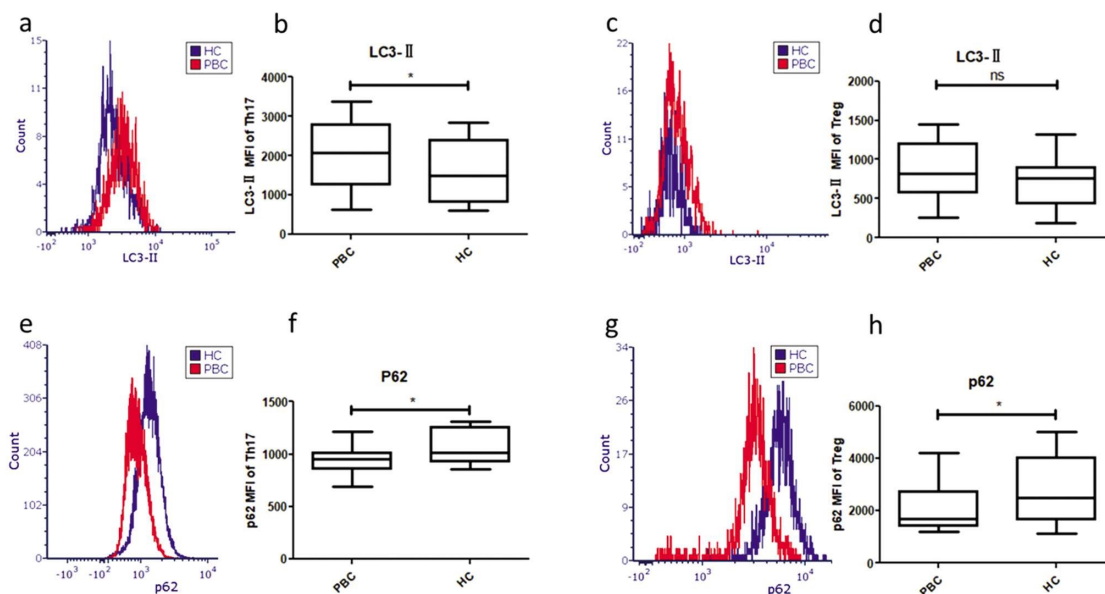


图2 外周血 Th17 和 Treg 细胞内自噬相关蛋白水平

(a, b, c, d) Th17 细胞(a, b)和 Treg 细胞内(c, d)自噬相关蛋白 LC3- II 的水平; (e, f, g, h) Th17 细胞(e, f)和 Treg 细胞内(g, h)自噬相关蛋白 p62 的水平

Fig.2 Levels of autophagy-related proteins in Th17 and Treg in the peripheral blood

(a, b, c, d) Levels of LC3- II in Th17 (a, b) and Treg (c, d); (e, f, g, h) Levels of p62 in Th17 (e, f) and Treg(g, h)

Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

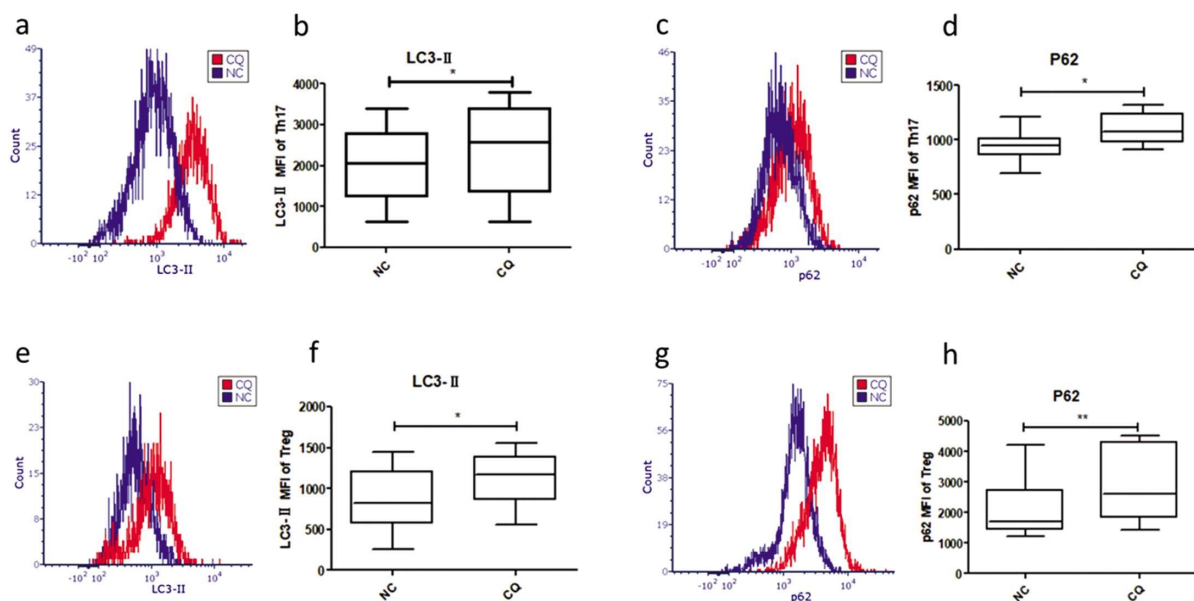


图3 氯喹可提高 PBC 患者 Th17 和 Treg 细胞内自噬相关蛋白水平

(a, b, c, d) 氯喹处理后 PBC 患者 Th17 细胞内自噬相关蛋白 LC3- II (a, b)和 p62(c, d);

(e, f, g, h) 氯喹处理后 PBC 患者 Treg 细胞内 LC3- II (e, f)和 p62 水平(g, h)

Fig.3 Chloroquine can enhance the levels of autophagy-related proteins of Th17 and Treg cells from patients with PBC;

(a, b, c, d) Levels of LC3- II (a, b) and p62(c, d) in Th17 from patients with PBC after treatment of CQ;

(e, f, g, h) Levels of LC3- II (a, b) and p62(c, d) in Treg from patients with PBC after treatment of CQ

Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

切相关。

2.4 体外抑制自噬可以改善 PBC 患者 Th17/ Treg 平衡

我们进一步利用自噬抑制剂氯喹(Chloroquine, CQ)体外处理 PBC 患者 PBMCs, 检测 Th17 和 Treg 细胞的免疫反应, 以明确自噬在 Th17/ Treg 失衡中的意义。氯喹可以通过提高溶酶

体 pH 值而破坏自噬体与溶酶体的融合, 抑制溶酶体的降解。通过流式细胞术检测氯喹处理及未处理的 PBC 患者 PBMCs 中自噬标志物的水平, 如图 3a-h 所示, 我们发现经过 $10 \mu\text{mol/L}$ 氯喹处理 6 小时后, PBC 患者 Th17 和 Treg 细胞中的 LC3-II 和 p62 水平均升高, 其胞内自噬被有效抑制。而有趣的是, 如

图 4a-f 所示,氯喹处理后 PBC 患者 PBMCs 中的 Th17 细胞比例下降($1.48 \pm 0.13\%$ vs. $1.19 \pm 0.08\%$, $P < 0.05$), Treg 细胞比例升高($3.50 \pm 0.25\%$ vs. $4.11 \pm 0.72\%$, $P < 0.05$)。且经 ELISA 检测,发现细胞上清中 IL-17 水平降低(1009.11 ± 46.47 pg/mL

vs. 729.29 ± 47.02 pg/mL, $P < 0.01$), TGF- β 水平升高 (22.60 ± 0.92 ng/mL vs. 28.00 ± 18.38 ng/mL, $P < 0.01$), 如图 4g-h 所示。以上体外证据说明通过氯喹抑制自噬可以重新恢复 PBC 患者 Th17/Treg 免疫失衡。

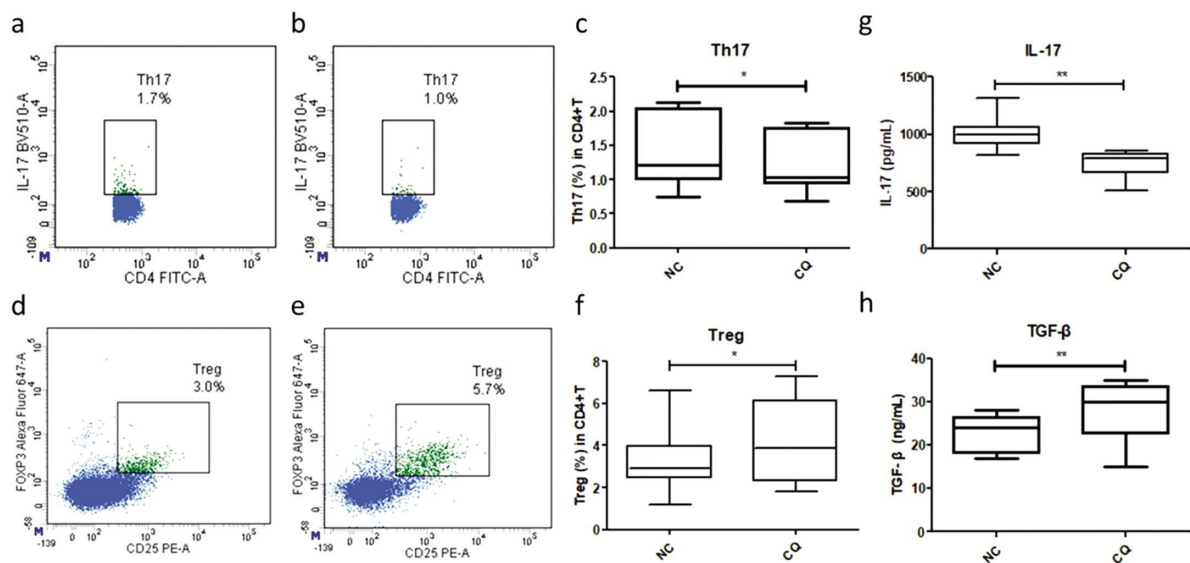


图 4 氯喹可恢复 PBC 患者 Th17/ Treg 平衡

(a, b, c)氯喹未处理(a)和处理后(b) Th17 细胞占 CD4⁺T 细胞的比例; (d, e, f)氯喹未处理(d)和处理后(e) Treg 细胞占 CD4⁺T 细胞的比例; (g, h)氯喹未处理(g)和处理后(h)细胞上清中 IL-17 和 TGF- β 的水平

Fig.4 Patients with PBC exhibit Th17/ Treg imbalance

(a, b, c) Proportion of Th17 in CD4⁺T in the absence (a) or presence of CQ(b); (d, e, f) Proportion of Treg in CD4⁺T in the absence (d) or presence of CQ (e); (g, h) Levels of IL-17 and TGF- β in the supernatant

Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

3 讨论

原发性胆汁性胆管炎(PBC)是一种自身免疫性肝病,其发病原因和机制不清。其主要病理学特征是汇管区淋巴细胞浸润,肝内中小胆管肉芽肿性破坏和非化脓性炎症,晚期可进展为肝纤维化或肝硬化。有学者认为,疾病早期的治疗应针对免疫耐受的打破,而后续则应解决胆汁毒性的影响^[15,16]。免疫紊乱是 PBC 以及多种自身免疫性疾病的重要特点,PBC 患者淋巴亚群存在多种异常^[17-19]。首先,对丙酮酸脱氢酶复合物 E2 亚基(PDC-E2)多谱系的耐受性丧失,如自身反应性 CD4⁺T^[2]和 CD8⁺T 细胞^[3]的出现,以及 B 细胞的高反应性^[20]。PBC 患者受损的胆管周围存在大量的致病性 CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞和 B 细胞等,但这些浸润的淋巴细胞状态和作用机制仍存在争议。此外,固有免疫细胞,如 NK 细胞、NKT 细胞也参与了 PBC 发病^[21]。

目前,大量的研究表明 Th17 细胞及其相关细胞因子的免疫调节功能参与了多种疾病中肝脏的损伤^[22,23]。以往国际上大多数的学者认为,PBC 主要与 Th1/ Th2 介导的自身免疫相关,而近年来,随着 Th17 细胞相关研究的不断深入,越来越多的人开始关注到 Th17 细胞在自身免疫疾病发病机制中的作用^[5,24]。研究发现,在 PBC 患者肝脏组织中,Th17 细胞的浸润明显增多,且集中分布在汇管区小叶间胆管周围,这种分布特征与 PBC 病理表现中慢性非化脓性小胆管损伤的特征相符合。并且,PBC 早期患者中,肝脏内的 Th1/ Th17 比例保持平

衡,而晚期患者中 Th1/ Th17 比例明显降低^[25]。这些证据提示,在疾病起始阶段,Th1 细胞可能具有促进炎症和自身免疫反应的作用,而在疾病进展阶段,Th17 对于持续免疫损伤发挥着重要的作用。

PBC 患者外周血淋巴细胞中 Th17 细胞比例明显增加,而 Treg 细胞比例下降。患者 Th17/ Treg 免疫平衡被打破,这使得 PBC 患者维持自身免疫耐受的功能遭到了破坏,在一定程度上能够促进 PBC 患者疾病的发生和进展^[6]。众所周知,Treg 细胞在调节自身免疫耐受,抑制过度免疫损伤的过程中举足轻重。而 PBC 患者外周血及肝脏中的 Treg 细胞数量减少。完全去除 Scurfy 小鼠中的 Treg,会出现汇管区淋巴细胞浸润和胆管损伤,且血清中出现 AMA,多种促炎细胞因子增多^[26]。越来越多的证据表明,疾病的发病机制可能在不同的疾病活动阶段涉及不同谱系的免疫细胞^[27,28]。因此,探索 T 细胞不同亚群有助于我们理解 PBC 疾病条件下多种免疫细胞间的相互作用。

本研究中,我们利用流式细胞术对新诊断的 20 例 PBC 患者与 20 例健康对照外周血中 Th17 和 Treg 细胞分布进行了检测,并利用 ELISA 方法检测了两组研究对象血清内 IL-17, TGF- β 的水平,以期说明 PBC 患者 Th17/ Treg 免疫平衡的状态。检测结果表明,Th17 细胞不仅在含量上高于健康对照,且能够产生更多的促炎因子 IL-17。相反,Treg 细胞的含量减少,并且分泌产生的 TGF- β 减少,从而证实了 PBC 患者确实存在 Th17/ Treg 免疫失衡的现象。然而,能够导致 Th17/ Treg 失衡

的原因仍然不明。

近年来,自噬被认为是维持 T 细胞稳态的重要环节,在 T 细胞介导的自身免疫性疾病中发挥着重要的作用^[9]。自噬是一种高度保守的,利用溶酶体清除衰老和变性大分子物质和细胞器的过程^[29]。微管相关蛋白 1 轻链 3(Microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3)-II 和 p62 是监测自噬流的关键性标志^[30,31]。LC3-II 水平的增加表明自噬泡的形成,提示其合成增加或降解减少。p62 是一个泛素结合的自噬受体和信号蛋白,它的聚积提示自噬-溶酶体通路障碍^[32]。本研究中,我们采取流式细胞术检测免疫细胞内的 LC3-II 和 p62 水平,来反映 PBC 患者 Th17 和 Treg 细胞的自噬功能状态。结果表明,无论是 Th17 细胞,还是 Treg 细胞,其自噬都被异常激活。因此我们猜想,自噬可能参与了 PBC 患者 Th17/Treg 免疫失衡的调节。

为了验证这个猜想,我们设计了体外验证实验,利用自噬抑制剂氯喹对 PBC 患者 PBMCs 进行体外处理。我们发现,降低自噬水平后,能够分泌 IL-17 的细胞含量减少,而表达转录因子 Foxp3 的细胞含量增多。且细胞上清中 IL-17 分泌量降低,TGF- β 升高。此结果表明,自噬对不同 T 细胞亚群产生的影响是不一致的。可能的解释为,自噬抑制剂会阻断 Treg 中关键转录因子 Foxp3 的降解,从而影响 Treg 细胞的分化及功能。在以往研究中也发现,通过氯喹处理以提高 Treg 细胞的功能,可以降低自身免疫性脑脊髓炎动物模型的疾病严重程度^[34]。然而,自噬对不同免疫细胞的调节功能还需进一步证实,这种调节作用可能取决于多种细胞代谢因素,和自噬对特定功能蛋白的降解。

在本项研究中,我们证实了 PBC 患者 Th17 和 Treg 细胞中异常激活的自噬作为一个重要因素,参与了 PBC 疾病进展中 Th17/Treg 免疫失衡。氯喹体外作用于 PBC 患者 PBMCs,可减少 IL-17 的分泌,提高 Foxp3 的表达,恢复 Th17 和 Treg 细胞的功能,使被打破了的平衡得到改善。因此,通过抑制自噬改善 Th17/Treg 失衡可能成为控制 PBC 发病和进展的新思路。

参 考 文 献(References)

- [1] Jin Q, Moritoki Y, Lleo A, et al. Comparative analysis of portal cell infiltrates in antimitochondrial autoantibody-positive versus antimitochondrial autoantibody-negative primary biliary cirrhosis[J]. *Hepatology*, 2012, 55(5): 1495-1506
- [2] Shimoda S, Nakamura M, Ishibashi H, et al. HLA DRB4 0101-restricted immunodominant T cell autoepitope of pyruvate dehydrogenase complex in primary biliary cirrhosis: evidence of molecular mimicry in human autoimmune diseases [J]. *J Exp Med*, 1995, 181(5): 1835-1845
- [3] Kita H, Lian Z X, Van de Water J, et al. Identification of HLA-A2-restricted CD8⁺ cytotoxic T cell responses in primary biliary cirrhosis: T cell activation is augmented by immune complexes cross-presented by dendritic cells[J]. *J Exp Med*, 2002, 195(1): 113-123
- [4] Yang C Y, Ma X, Tsuneyama K, et al. IL-12/Th1 and IL-23/Th17 biliary microenvironment in primary biliary cirrhosis: implications for therapy[J]. *Hepatology*, 2014, 59(5): 1944-1953
- [5] Harada K, Shimoda S, Sato Y, et al. Periductal interleukin-17 production in association with biliary innate immunity contributes to the pathogenesis of cholangiopathy in primary biliary cirrhosis [J]. *Clin Exp Immunol*, 2009, 157(2): 261-270
- [6] 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
- [7] Selmi C, Bowlus C L, Gershwin M E, et al. Primary biliary cirrhosis [J]. *Lancet*, 2011, 377(9777): 1600-1609
- [8] Bronietzki A W, Schuster M, Schmitz I. Autophagy in T-cell development, activation and differentiation [J]. *Immunol Cell Biol*, 2015, 93(1): 25-34
- [9] Ma Y, Galluzzi L, Zitvogel L, et al. Autophagy and cellular immune responses[J]. *Immunity*, 2013, 39(2): 211-227
- [10] Liu G, Bi Y, Wang R, et al. Self-eating and self-defense: autophagy controls innate immunity and adaptive immunity [J]. *J Leukoc Biol*, 2013, 93(4): 511-519
- [11] van de Graaf S, Beuers U. Autophagy - another piece of the puzzle towards understanding primary biliary cirrhosis?[J]. *Liver Int*, 2014, 34(4): 481-483
- [12] Lindor K D, Gershwin M E, Poupon R, et al. Primary biliary cirrhosis [J]. *Hepatology*, 2009, 50(1): 291-308
- [13] EASL Clinical Practice Guidelines: The diagnosis and management of patients with primary biliary cholangitis[J]. *J Hepatol*, 2017, 67(1): 145-172
- [14] Eng K E, Panas M D, Karlsson H G, et al. A novel quantitative flow cytometry-based assay for autophagy [J]. *Autophagy*, 2010, 6 (5): 634-641
- [15] Mousa H S, Carbone M, Malinverno F, et al. Novel therapeutics for primary biliary cholangitis: Toward a disease-stage-based approach [J]. *Autoimmun Rev*, 2016, 15(9): 870-876
- [16] Carey E J, Ali A H, Lindor K D. Primary biliary cirrhosis[J].*Lancet*, 2015, 386(10003): 1565-1575
- [17] Shi T Y, Zhang F C. Role of autoimmunity in primary biliary cirrhosis [J]. *World J Gastroenterol*, 2012, 18(48): 7141-7148
- [18] Gershwin M E, Mackay I R. The causes of primary biliary cirrhosis: Convenient and inconvenient truths[J]. *Hepatology*, 2008, 47(2): 737-745
- [19] Takahashi T, Miura T, Nakamura J, et al. Plasma cells and the chronic nonsuppurative destructive cholangitis of primary biliary cirrhosis[J]. *Hepatology*, 2012, 55(3): 846-855
- [20] Nakamura M, Ishibashi H, Matsui M, et al. Peripheral B lymphocyte repertoire to mitochondrial antigen in primary biliary cirrhosis-positive correlation between the disease activity and the frequency of circulating B lymphocytes specific for pyruvate dehydrogenase complex[J]. *Autoimmunity*, 1995, 21(4): 253-262
- [21] Chuang Y H, Lian Z X, Tsuneyama K, et al. Increased killing activity and decreased cytokine production in NK cells in patients with primary biliary cirrhosis[J]. *J Autoimmun*, 2006, 26(4): 232-240
- [22] Hammerich L, Heymann F, Tacke F. Role of IL-17 and Th17 cells in liver diseases[J]. *Clin Dev Immunol*, 2011, 2011: 345803
- [23] Pellicoro A, Ramachandran P, Iredale J P, et al. Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ [J]. *Nat Rev Immunol*, 2014, 14(3): 181-194

- [21] Zhang W, Chen M, Li H, et al. Hypoxia preconditioning attenuates lung injury after thoracoscopic lobectomy in patients with lung cancer: a prospective randomized controlled trial [J]. *BMC Anesthesiology*, 2019, 19(1): 209
- [22] Hao D, He C, Ma B, et al. Hypoxic Preconditioning Enhances Survival and Proangiogenic Capacity of Human First Trimester Chorionic Villus-Derived Mesenchymal Stem Cells for Fetal Tissue Engineering[J]. *Stem Cells International*, 2019, 2019: 9695239
- [23] 孙崇毅,姚猛,刘庆鹏,等.神经干细胞缺氧预处理后的内源性保护作用 and 促红细胞生成素的表达 [J]. *中华创伤杂志*, 2006, 22 (9): 707-709
- [24] Guan R, Lv J, Xiao F, et al. Potential role of the cAMP/PKA/CREB signalling pathway in hypoxic preconditioning and effect on propofol induced neurotoxicity in the hippocampus of neonatal rats [J]. *Molecular Medicine Reports*, 2019, 20(2): 1837-1845
- [25] Luo Z, Wu F, Xue E, et al. Hypoxia preconditioning promotes bone marrow mesenchymal stem cells survival by inducing HIF-1 α in injured neuronal cells derived exosomes culture system[J]. *Cell Death & Disease*, 2019, 10(2): 134
- [26] Wei Z Z, Zhu Y, Zhang J Y, et al. Priming of the Cells: Hypoxic Preconditioning for Stem Cell Therapy [J]. *Chinese Medical Journal*, 2017, 130(19): 2361-2374
- [27] 徐娅蓓,陈国强.间隙连接蛋白 43 的表达调控及其功能[J].*临床与病理杂志*, 2005, 25(6): 477-480
- [28] Jiang J X, Gu S. Gap junction- and hemichannel-independent actions of connexins[J]. *FEBS Letters*, 2016, 588(8): 1186-1192
- [29] Wu JI, Wang LH. Emerging roles of gap junction proteins connexins in cancer metastasis, chemoresistance and clinical application [J]. *Journal of biomedical science*, 2019, 26(1): 8
- [30] Kim EM, Bae YM, Choi MH, et al. Connexin 43 plays an important role in the transformation of cholangiocytes with *Clonochis sinensis* excretory-secretory protein and N-nitrosodimethylamine [J]. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2019, 13(4): e0006843
- [31] Fan WL, Liu P, Wang G, et al. Transplantation of hypoxic preconditioned neural stem cells benefits functional recovery via enhancing neurotrophic secretion after spinal cord injury in rats[J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2017, 119(6): 4339-4351
- [32] Wakai T, Narasimhan P, Sakata H, et al. Hypoxic preconditioning enhances neural stem cell transplantation therapy after intracerebral hemorrhage in mice [J]. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 2015, 36(12): 2134-2145
- [33] Fan W L, Liu P, Wang G, et al. Transplantation of hypoxic preconditioned neural stem cells benefits functional recovery via enhancing neurotrophic secretion after spinal cord injury in rats[J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2017, 119(6): 4339-4351
- [34] Wang J W, Qiu Y R, Fu Y, et al. Transplantation with hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells suppresses brain injury caused by cardiac arrest-induced global cerebral ischemia in rats[J]. *Journal of Neuroscience Research*, 2017, 95(10): 2059-2070
- [35] Jiang RH, Wu CJ, Xu XQ, et al. Hypoxic conditioned medium derived from bone marrow mesenchymal stromal cells protects against ischemic stroke in rats [J]. *Journal of cellular physiology*, 2019, 234(2): 1354-1368

(上接第 1415 页)

- [24] Webb G J, Siminovitch K A, Hirschfield G M. The immunogenetics of primary biliary cirrhosis: A comprehensive review[J]. *J Autoimmun*, 2015, 64: 42-52
- [25] Yang C Y, Ma X, Tsuneyama K, et al. IL-12/Th1 and IL-23/Th17 biliary microenvironment in primary biliary cirrhosis: implications for therapy[J]. *Hepatology*, 2014, 59(5): 1944-1953
- [26] Zhang W, Sharma R, Ju S T, et al. Deficiency in regulatory T cells results in development of antimitochondrial antibodies and autoimmune cholangitis[J]. *Hepatology*, 2009, 49(2): 545-552
- [27] Kita H, Naidenko O V, Kronenberg M, et al. Quantitation and phenotypic analysis of natural killer T cells in primary biliary cirrhosis using a human CD1d tetramer[J]. *Gastroenterology*, 2002, 123(4): 1031-1043
- [28] Zhao J, Zhao S, Zhou G, et al. Altered biliary epithelial cell and monocyte responses to lipopolysaccharide as a TLR ligand in patients with primary biliary cirrhosis[J]. *Scand J Gastroenterol*, 2011, 46(4): 485-494
- [29] Yang Z, Klionsky D J. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2010, 22(2): 124-131
- [30] Liu W J, Shen T T, Chen R H, et al. Autophagy-Lysosome Pathway in Renal Tubular Epithelial Cells Is Disrupted by Advanced Glycation End Products in Diabetic Nephropathy[J]. *J Biol Chem*, 2015, 290 (33): 20499-20510
- [31] Liu W J, Xu B H, Ye L, et al. Urinary proteins induce lysosomal membrane permeabilization and lysosomal dysfunction in renal tubular epithelial cells[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2015, 308(6): F639-F649
- [32] Johansen T, Lamark T. Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins[J]. *Autophagy*, 2011, 7(3): 279-296
- [33] Du T, Nagai Y, Xiao Y, et al. Lysosome-dependent p300/FOXp3 degradation and limits Treg cell functions and enhances targeted therapy against cancers[J]. *Exp Mol Pathol*, 2013, 95(1): 38-45
- [34] Thome R, Moraes A S, Bombeiro A L, et al. Chloroquine treatment enhances regulatory T cells and reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e65913