

慢性乙型肝炎肝纤维化患者外周血 $CD4^+ CD25^+ CD127^{low/-}$ T 细胞与人肝星状细胞共培养的实验研究

金晓芝 陈永平 程 媛 潘黎静 潘陈为 戴志娟 叶 超

摘 要 **目的** 探讨 $CD4^+ CD25^+ CD127^{low/-}$ T 细胞在慢性乙型肝炎肝纤维化发病机制中的作用。**方法** 按肝纤维化 S 分期将慢性乙型肝炎肝纤维化患者分为 $S_1 \sim S_2$ 期 6 例和 $S_3 \sim S_4$ 期 7 例;采用磁激活细胞分选法(MACS)提取 13 例患者和 6 例健康对照者外周血 $CD4^+ CD25^+ CD127^{low/-}$ T 细胞;分别将 $CD4^+ CD25^+ CD127^{low/-}$ T 细胞以不同比例与人肝星状细胞株(hepatic stellate cell, HSC)共培养 5 天,检测各组 HSC 的增殖及 TGF- β_1 的分泌。**结果** $CD4^+ CD25^+ CD127^{low/-}$ T 细胞与 HSC 之比,当健康对照组和 $S_1 \sim S_2$ 期组为 1.5:1, $S_3 \sim S_4$ 期组为 2:1 时, HSC 的增殖速度和 TGF- β_1 分泌量均在同组不同比例中达最高值。各组同比例之间,当比例为 1.5:1 时,健康对照组 HSC 的增殖速度显著高于 $S_3 \sim S_4$ 期组($P < 0.05$);在比例为 1:1 ~ 2:1 范围内, $S_1 \sim S_2$ 期组和 $S_3 \sim S_4$ 期组 HSC 的 TGF- β_1 分泌量远高于同比例健康对照组($P < 0.05$)。**结论** $CD4^+ CD25^+ CD127^{low/-}$ T 细胞可能通过自身细胞数量和功能的双重调节,影响肝星状细胞的增殖和分泌,参与了慢乙肝肝纤维化的进展。

关键词 慢性乙型肝炎 肝纤维化 $CD4^+ CD25^+ CD127^{low/-}$ Treg MACS

The Study of Co-culturing $CD4^+ CD25^+ CD127^{low/-}$ T Cells from Patients with HBV-related Liver Fibrosis and Hepatic Stellate Cells in vitro. Jin Xiaozhi, Chen Yongping, Cheng Yuan, Pan Lijiang, Pan Chenwei, Dai Zhijuan, Ye Chao. Department of Infectious and Liver Diseases, The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Zhejiang 325000, China

Abstract Objective To investigate the roles of $CD4^+ CD25^+ CD127^{low/-}$ T cells in HBV-related liver fibrosis. **Methods** Fibrosis stage was confirmed by pathohistological examination of liver section. $CD4^+ CD25^+ CD127^{low/-}$ T cells were isolated respectively from peripheral blood of 6 healthy controls, 6 patients in $S_1 - S_2$ stage and 7 patients in $S_3 - S_4$ stage by MACS. We then cultured $CD4^+ CD25^+ CD127^{low/-}$ T cells and human hepatic stellate cell (HSC) with different ratios respectively, and after 5 days, appraised the proliferation of HSC by CCK8 and used Elisa method to test concentration of TGF- β_1 secreted by HSC. **Results** We discovered the strongest proliferation and the highest TGF- β_1 secretion of HSC when the healthy controls and patients in $S_1 - S_2$ stage ratio of (the numbers of $CD4^+ CD25^+ CD127^{low/-}$ T cells/HSC) 1.5:1, patients in $S_3 - S_4$ stage of 2:1. From health control group, we also found that HSC had a stronger proliferation compared with patients in $S_3 - S_4$ stage when ratio was 1.5:1 ($P < 0.05$). And the ratios ranged from 1:1 to 2:1. There was a lower TGF- β_1 secretion of HSC in health control group compared with other groups ($P < 0.05$). **Conclusion** Changes of numbers and functionalities of $CD4^+ CD25^+ CD127^{low/-}$ T cells might promote HSC proliferation and TGF- β_1 secretion and contribute to progression of HBV-related liver fibrosis.

Key words Chronic hepatitis B; Liver fibrosis; $CD4^+ CD25^+ CD127^{low/-}$; Treg; MACS

我国是慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)高发区,肝纤维化作为慢性肝病肝脏的主要病理改变,其发生机制十分复杂。肝星状细胞(HSC)的激活被认为是肝纤维化发生发展的中心环节^[1]。HSC 被持续激活导致自身细胞增殖、表面分子及膜

受体改变从而向肌成纤维细胞转化,同时促进大量胶原、层黏蛋白、蛋白多糖等合成与分泌,致使细胞外基质(extracellular matrix, ECM)在肝内过度沉积,最终导致了肝纤维化的发生发展^[2,3]。TGF- β_1 作为最关键的致纤维化因子,主要通过刺激 HSC 的活化促进了肝纤维化的发生发展,而活化后的 HSC 又可以分泌多种细胞因子包括自分泌 TGF- β_1 , 从而不断激活其他 HSC, 如此递状反应导致肝纤维化的不断进展^[4,5]。

$CD4^+ CD25^+ FoxP3^+$ 调节性 T 细胞(Treg)作为一类具有调节功能的特殊 T 细胞群,在介导机体外周免

基金项目:浙江省自然科学基金资助项目(Y207464)

作者单位:325000 浙江省温州医学院附属第一医院感染内科(金晓芝、陈永平、程媛、戴志娟、叶超);温州市第二人民医院病理科(潘黎静);浙江省温州医学院附属第二医院感染内科(潘陈为)

通讯作者:陈永平教授,主任医师,电子信箱:ypchen106@yahoo.com.cn

疫反应和维持自身免疫耐受中起了关键的作用^[6~8]。近年来,Treg 在多种感染性疾病,如慢性乙肝疾病中的作用逐渐受到了人们的关注。大量的研究表明,Treg 参与了抑制肝对病毒的免疫反应^[9,10]。因此,Treg 的体外研究尤为重要,但由于 Treg 特异性标志 FoxP3 呈胞内表达^[11,12],以往大多实验都只能通过表面分子 CD4、CD25 途径获得 Treg,大大降低了 Treg 的纯度^[13]。近期,多位学者表明 CD127 低表达的 CD4⁺CD25⁺T 细胞高度表达 FoxP3,并可代表 Treg 用于体外研究^[14~16]。

本实验运用 MACS,分别分选慢乙肝肝纤维化患者和健康对照者外周血 CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}T 细胞,以不同比例与 HSC 共培养 5 天,观察细胞对 HSC 的影响来探讨 Treg 在慢性乙型肝炎肝纤维化发病机制中的作用。

材料与方法

1. 研究对象:13 例慢性乙肝患者,男性 8 例,女性 5 例,年龄 26~57 岁,平均 39.23 ± 15.07 岁,病例为笔者医院或温州医学院附属第二医院患者,均经过肝组织病理活检(HE 染色如图 1 所示),其中 S₁~S₂ 期 6 例、S₃~S₄ 期 7 例,并除外其他病毒性肝炎、脂肪性肝炎、酒精性肝病、药物性肝炎、自身免疫性肝病、遗传性肝病等的相关性肝炎。6 例健康对照者,男性 3 例,女性 3 例,年龄 21~59 岁,平均 36.67 ± 13.07 岁,所有病例在抽取外周血之前均未进行治疗。

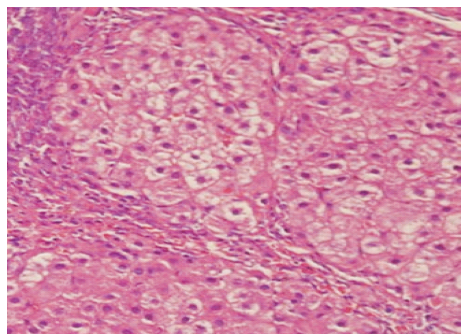


图 1 一慢乙肝肝纤维化患者肝脏组织活检 HE 染色($\times 200$)

可见肝细胞肿胀,周围纤维组织形成,大量慢性炎性细胞浸润

2. 主要试剂和仪器:美国 BD FACS 流式细胞仪,美国 Forma 二氧化碳培养箱,美国 BIO-TEK FL-800 酶标仪;小鼠抗人 CD4-FITC、CD4-PE、CD25-PE、CD25-PE-cy7、CD127-PE、CD127-APC、IgG1-PE、IgG1-PE-cy7、IgG1-APC 均购自 BD 公司;RPMI1640 购自 HyClone 公司;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自美国 Gibico 公司;人淋巴细胞分离液购自 Solarbio 公司;第六代人肝星状细胞株购自广州医学研究所;96 孔 U 型培养板购自 Corning 公司;分选 CD4⁺T 细胞

和 CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}T 细胞的磁珠、磁式细胞分选器均购自 Miltenyi Biotec 公司;CCK8 试剂盒购自日本同仁化学研究所;Elisa 试剂盒购自 Excell 公司。

3. 方法:(1)细胞分离:抽取外周血 20~25ml,用淋巴细胞分离液,经密度梯度离心获得单个核细胞(peripheral blood Mononuclear cell, PBMCs);再用 Biotin-Antibody Cocktail II 和 Anti-Biotin MicroBeads 标记 CD4⁺和 CD127^{high},阴性分选获取 CD4⁺CD127^{low/-}T 细胞;最后用 CD25 MicroBeads II 磁珠标记 CD25⁺,分选获取 CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}T 细胞。(2)细胞纯度和存活率鉴定:分选的 CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}T 细胞,加 CD4-FITC、CD25-PE-Cy7、CD127-PE 3 色抗体后,上流式细胞仪检测其纯度(每管均设对照);台盼蓝染色计活细胞比例来检测细胞的存活率。(3)CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}T 细胞对 HSC 形态、增殖、分泌的影响:分选所得的 CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}T 细胞分别与人肝星状细胞于含(10%胎牛血清+RPMI1640)培养基的 96 孔 U 型板中分 0:1、0.5:1、1:1、1.5:1、2:1、2.5:1 共 6 个比例共培养,每组均设副孔。5 天后,CCK8 法检测 HSC 的增殖状况及收集上清液用 ELISA 试剂盒检测 TGF- β_1 含量。

4. 统计学处理:采用 SPSS 16.0 统计软件,数据用均值 $\pm$ 标准差表示,多个样本均数比较采用单因素方差分析 LSD-t 检验或 Dunnett T3 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 细胞纯度和存活率鉴定:经流式细胞仪分析,如图 2 所示,细胞 CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}纯度为 $90.57\% \pm 6.38\%$;经显微镜下计数,细胞存活率为 $98.25\% \pm 1.55\%$ 。

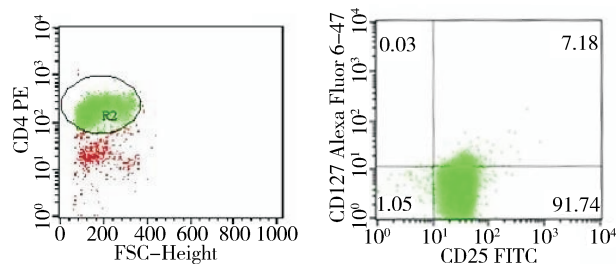


图 2 MACS 分选一慢乙肝肝纤维化患者外周 CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}T 细胞的纯度

2. CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}T 细胞对人肝星状细胞的影响:共培养 5 天后(图 3),CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}T 细胞与 HSC 之比,健康对照组和 S₁~S₂ 期组为 1.5:1, S₃~S₄ 期组为 2:1 时,HSC 的增殖速度在同组不同比例中均达最高值。而各组同比例之间,当比例为 1.5:1 时,健康对照组 HSC 的增殖速度显著高于 S₃~S₄ 期组($P < 0.05$)(图 4)。同组不同比例之间,当健康对照组和 S₁~S₂ 期组比例为

1.5:1, $S_3 \sim S_4$ 期组比例为 2:1 时, HSC 的 $TGF-\beta_1$ 分泌量均达最高值。而在比例为 1:1 ~ 2:1 范围内, $S_1 \sim S_2$ 期组和 $S_3 \sim S_4$ 期组 HSC 的 $TGF-\beta_1$ 分泌量远高于同比例健康对照组 ($P < 0.05$) (图 5)。

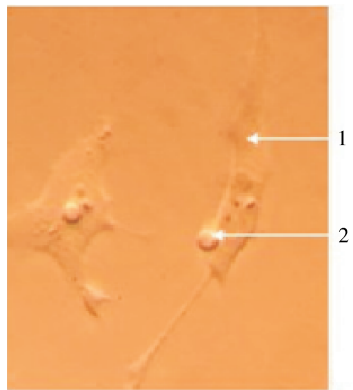


图3 $CD4^+CD25^+CD127^{low/-}$ T 细胞与 HSC 共培养

1. HSC; 2. $CD4^+CD25^+CD127^{low/-}$ T 细胞

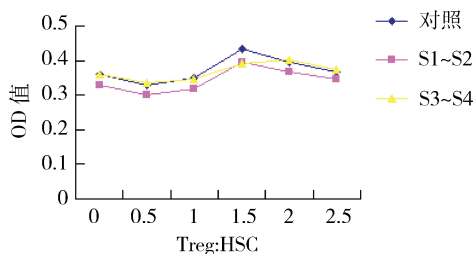


图4 各组不同比例 Treg 与 HSC

共培养之 HSC 增殖曲线

对照组和 $S_1 \sim S_2$ 期组为 1.5:1, $S_3 \sim S_4$ 期组为 2:1 时, HSC 的增殖速度在同组不同比例中均达最高值, 各组同比例之间, 当比例为 1.5:1 时, 对照组 HSC 的增殖速度显著高于 $S_3 \sim S_4$ 期组 ($P < 0.05$)

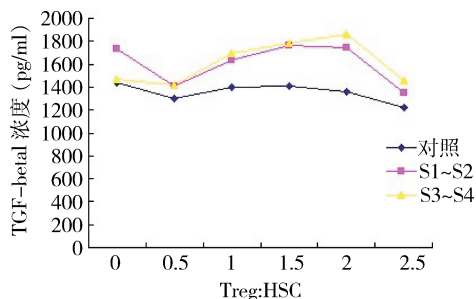


图5 各组不同比例 Treg 与 HSC 共培养

上清液 $TGF-\beta_1$ 浓度

对照组和 $S_1 \sim S_2$ 期组比例为 1.5:1, $S_3 \sim S_4$ 期组比例为 2:1 时, HSC 的 $TGF-\beta_1$ 分泌量均达最高值。在比例为 1:1 ~ 2:1 范围内, $S_1 \sim S_2$ 期组和 $S_3 \sim S_4$ 期组 HSC 的 $TGF-\beta_1$ 分泌量远高于同比例健康对照组 ($P < 0.05$)

讨 论

慢性乙型肝炎肝纤维化免疫相关的发病机制至今仍不明确。具有免疫调节功能的 Treg 参与了乙肝相关性免疫反应近年来引起了人们的关注。实验分别将从两组不同程度肝纤维化患者和健康对照者的外周血中分选到的 $CD4^+CD25^+CD127^{low/-}$ T 细胞按不同比例与人肝星状细胞共培养, 结果表明当 $CD4^+CD25^+CD127^{low/-}$ T 细胞与 HSC 之比达到某一值时, HSC 的增殖速度与 $TGF-\beta_1$ 分泌均出现了高峰, 从某种意义上讲, 最大程度地促进了肝纤维化的发展。

机体感染上乙肝病毒后, Treg 可能为了阻止机体为清除病毒而过分损伤肝脏, 而募集到肝脏组织, 通过抑制效应性 T 细胞从而减轻炎症, 但与此同时导致了感染慢性化。研究发现 Treg 除了细胞间接触抑制效应性 T 细胞增殖外, 还可通过以下两种途径发挥作用: 分泌抑制性细胞因子, 如 $TGF-\beta_1$; 作用于抗原递呈细胞 (antigen-presenting cells, APC), 如增强其色氨酸代谢及分泌抑制性细胞因子来调节机体免疫^[17]。在乙肝病毒慢性感染的机体中, Treg 可能通过 3 种途径的共同作用与相互拮抗参与机体的免疫调节。一方面 Treg 比例的加大, 减轻了炎症的程度, 减缓了肝纤维化的发生发展; 另一方面 Treg 自分泌少量 $TGF-\beta_1$ 以及引导作为肝内固有 APC 的 HSC 分泌 $TGF-\beta_1$, 从而加速了肝纤维化的进展。实验的结果表明, 随着 $CD4^+CD25^+CD127^{low/-}$ T 细胞与 HSC 共培养比例逐渐增大, HSC 的增殖速度与 $TGF-\beta_1$ 分泌量整体呈逐渐升高趋势, 当到达某一高峰后, 随着 $CD4^+CD25^+CD127^{low/-}$ T 细胞与 HSC 比例的继续扩大, HSC 的增殖速度与 $TGF-\beta_1$ 分泌量反而减少。从结果推断, 当共培养比例到达某一值时, 两条正面途径发挥的作用远大于一条负面作用途径, 从而不但促进了 HSC 增殖与 $TGF-\beta_1$ 的分泌, 而且致使这个效应放大到最高程度。此外有文献报道: 在对部分细胞的作用中, $TGF-\beta_1$ 具有双重作用, 低浓度时刺激增殖, 高浓度时抑制增殖^[18]。实验结果中 HSC 的增殖速度与 $TGF-\beta_1$ 分泌量在出现峰值后随之下落, 也可能与微环境内 $TGF\beta_1$ 的浓度随着 $CD4^+CD25^+CD127^{low/-}$ T 细胞比例增大而逐渐达到一个高值, 此时大量的 $TGF-\beta_1$ 反过来抑制 HSC 的增殖及促进其凋亡有关。因此, Treg 影响 HSC 增殖分泌的具体途径还有待更深一步的研究。

Stoop 等人在对慢乙肝患者外周血 Treg 进行研究时发现, 慢乙肝患者外周血 Treg 比例高于正常

人^[9]。而从本实验结果发现,在影响 HSC 增殖分泌过程中,CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-} T 细胞的比例也起关键作用。因此,Treg 可能通过自身数量的调节参与了整个慢性肝炎尤其是向肝纤维化进展的过程。这对今后指导临床,通过调整患者体内 CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-} T 细胞比例来改善肝纤维化程度具有一定意义。

同时,在对实验对象进行分组发现,虽然各组 HSC 的增殖速度与 TGF-β₁ 分泌量均出现高峰,然而肝纤维化 S₃ ~ S₄ 期组的峰值在 CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-} T 细胞/HSC 为 2:1 迟于健康对照组和肝纤维化 S₁ ~ S₂ 期组的 1.5:1 时出现。并且在对各组同比例进行比较发现,当比例为 1.5:1 时,健康对照组 HSC 的增殖速度显著高于 S₃ ~ S₄ 期组。而在比例为 1:1 ~ 2:1 范围内,S₁ ~ S₂ 期组和 S₃ ~ S₄ 期组 HSC 的 TGF-β₁ 分泌量却远高于同比例健康对照组。在文献对晚期胃癌患者体内 CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-} T 细胞的研究中报道,晚期胃癌患者 CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-} T 细胞抑制效应性 T 细胞增殖的功能发生了改变^[16]。由此推断,不同组 CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-} T 细胞存在一定上的功能差异,而正因为这个功能上的差异导致了在相同数量 CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-} T 细胞作用下,各组 HSC 的增殖和 TGF-β₁ 分泌量却不同。不同组 CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-} T 细胞可能由于自分泌 TGF-β₁ 的功能发生改变,也可能在对 APC 调节的这个功能上发生改变等等,最终导致在同比例情况下,产生了不同的致 HSC 活化效应。因此,CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-} T 细胞某种功能的改变与慢乙肝肝纤维化的发展具有极其密切的联系,但具体的功能改变仍需进一步探索。

在慢性乙型肝炎肝纤维化的发展过程中,CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-} T 细胞可能不仅通过自身细胞比例的调节,而且也发生某些功能上的变化,从而影响了肝星状细胞的增殖与分泌。

参考文献

- Gressner AM, Weiskirchen R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-β as major players and therapeutic targets. *J Cell Mol Med*, 2006, 10(1): 76-99
- Mariani TJ, Roby JD, Mecham RP, *et al.* Localization of type I procollagen gene expression in silica-induced granulomatous lung disease and implication of transforming growth factor-β as a mediator of fibrosis. *Am J Pathol*, 1996, 148(1): 151-164
- Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology*, 2008, 134(6): 1655-1669
- Schnaper HW, Hayashida T, Hubchak SC, *et al.* TGF-β signal transduction and mesangial cell fibrogenesis. *AM J Physiol Renal Physiol*, 2003, 284(2): F243-F252
- Wells RG, Kruglov E, Dranoff JA, *et al.* Autocrine release of TGF-β by portal fibroblasts regulates cell growth. *FEBS Lett*, 2004, 559(1-3): 107-110
- Shevach EM. CD4⁺CD25⁺ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol*, 2002, 2(6): 389-400
- Suri-Payer E, Fritzsche B. Regulatory T cells in experimental autoimmune disease. *Springer Semin Immunopathol*, 2006, 28(1): 3-16
- Kullberg MC, Jankovic D, Gorelick PL, *et al.* Bacteria-triggered CD4⁺ T regulatory cells suppress *Helicobacter hepaticus*-induced colitis. *J Exp Med*, 2002, 196(4): 505-515
- Stoop JN, van der Molen RG, Baan CC, *et al.* Regulatory T cells contribute to the impaired immune response in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology*, 2005, 41(4): 771-778
- Cabrera R, Tu Z, Xu Y, *et al.* An immunomodulatory role for CD4⁺CD25⁺ regulatory T lymphocytes in hepatitis C virus infection. *Hepatology*, 2004, 40(5): 1062-1071
- Wildin RS, Ramsdell F, Peake J, *et al.* X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat Genet*, 2001, 27(1): 18-20
- Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, *et al.* The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet*, 2001, 27(1): 20-21
- Kingsley CI, Karim M, Bushell AR, *et al.* CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells prevent graft rejection; CTLA-4- and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses. *J Immunol*, 2002, 168(3): 1080-1086
- Liu W, Putnam AL, Xu YZ, *et al.* CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ Treg cells. *J Exp Med*, 2006, 203(7): 1701-1711
- Ardon H, Verbinen B, Maes W, *et al.* Technical advancement in regulatory T cell isolation and characterization using CD127 expression in patients with malignant glioma treated with autologous dendritic cell vaccination. *Journal of Immunological Methods*, 2010, 352(1-2): 169-173
- Shen LS, Wang J, Shen DF, *et al.* CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-} regulatory T cells express Foxp3 and suppress effector T cell proliferation and contribute to gastric cancers progression. *Clinical Immunology*, 2009, 131(1): 109-118
- Von Borhmer H. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat Immunol*, 2005, 6(4): 338-344
- 牛晓华, 任来成. TGF-β/Smads 信号转导通路与肾间质纤维化的关系. *山西中医学院学报*, 2007, 6(7): 51-53

(收稿: 2011-01-10)