

本文引用:田二军,王辉. 维生素D诱导调节性T细胞分化及其在自身免疫性肝炎发病中的作用[J]. 新乡医学院学报,2017,34(7):592-595. DOI:10.7683/xyxyxb.2017.07.010.

【临床研究】

维生素D诱导调节性T细胞分化及其在自身免疫性肝炎发病中的作用

田二军^{1,2}, 王辉²

(1. 平顶山市第一人民医院检验科, 河南 平顶山 467000; 2. 新乡医学院, 河南 新乡 453003)

摘要: **目的** 分析自身免疫性肝炎(AIH)患者外周血调节性T细胞(Treg)比例、白细胞介素-10(IL-10)水平与维生素D的相关性,探讨维生素D对Treg细胞分化的影响。**方法** 选取平顶山市第一人民医院2015年2月至2016年12月收治的AIH患者30例为观察组,另选取同期体检健康者18例为对照组,对照组于体检当日、观察组于入院次日抽取晨起空腹肘静脉血10 mL,以肝素锂抗凝,分离血浆冻存,并采用密度梯度离心法分离外周血单个核细胞(PBMC),分别采用全自动生物化学分析仪和酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血浆25-羟维生素D[25-(OH)-D₃]和IL-10水平,采用多色荧光抗体结合流式细胞术分析样本中CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺IL-10⁺Treg细胞比例,分析三者之间的相关性。在体外条件下分离观察组患者的PBMC,在有或无活化形式的维生素D[1,25-(OH)₂-D₃]的条件下给予佛波酯(PMA)刺激16 h,再用流式细胞术检测刺激后PBMC中CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺IL-10⁺Treg细胞比例,同时采用ELISA法检测刺激后上清液中IL-10水平。**结果** 观察组患者血浆25-(OH)-D₃、IL-10水平显著低于对照组($P < 0.05$, $P < 0.01$)。观察组患者外周血CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺IL-10⁺Treg细胞比例显著低于对照组($P < 0.05$)。观察组患者外周血25-(OH)-D₃水平与IL-10水平及CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺IL-10⁺Treg细胞比例均呈正相关($R^2 = 0.379$, $P = 0.0003$; $R^2 = 0.151$, $P = 0.0341$)。在有1,25-(OH)₂-D₃的条件下给予PMA刺激,观察组患者的CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺IL-10⁺Treg细胞比例和上清液中IL-10水平均显著高于无1,25-(OH)₂-D₃的条件下给予PMA刺激后($P < 0.05$)。**结论** 维生素D可直接诱导Treg细胞增殖分化,AIH患者体内Treg细胞减少在某种程度上与维生素D缺乏有关。

关键词: 自身免疫性肝炎;调节性T细胞;白细胞介素-10;维生素D

中图分类号: R575 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-7239(2017)07-0592-04

Differentiation of regulatory T cells induced by vitamin D and its role in the pathogenesis of autoimmune hepatitis

TIAN Er-jun^{1,2}, WANG Hui²

(1. Department of Clinical Laboratory, the First People's Hospital of Pingdingshan City, Pingdingshan 467000, Henan Province, China; 2. Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan Province, China)

Abstract: **Objective** To investigate the relationship between the proportion of regulatory T (Treg) cells, interleukin-10 (IL-10) level and vitamin D in peripheral blood of patients with autoimmune hepatitis (AIH), and to investigate the effect of vitamin D on the differentiation of Treg cells. **Methods** Thirty patients with AIH as observation group in the First People's Hospital of Pingdingshan City from February 2015 to December 2016 were selected. and eighteen healthy subjects were selected as control group. The ulnar venous blood samples 10 mL of the subjects in the control group and observation group were collected on the day of medical examination or the next day after admission. The blood samples were anticoagulated with heparin lithium, and the plasma was separated and cryopreserved. The peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by density gradient centrifugation. The levels of plasma 25-hydroxy vitamin D [25-(OH)-D₃] and IL-10 were detected by automatic biochemical analyzer and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The proportion of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺IL-10⁺Treg cells in the samples was detected by multicolor fluorescent antibody combined with flow cytometry. The correlation among them was analyzed. The PBMC were isolated *in vitro* in the observation group, then the PBMC were stimulated with phorbol ester (PMA) for 16 hours under the conditions with or without the activated vitamin D. Then the proportion of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺IL-10⁺Treg cells was detected by flow cytometry, and the level of IL-10 in supernatant was determined by ELISA. **Results** The levels of plasma 25-(OH)-D₃ and IL-10 in the observation group were significantly lower than those in the control

DOI:10.7683/xyxyxb.2017.07.010

收稿日期:2017-03-02

作者简介:田二军(1983-),男,河南鲁山人,硕士,主管检验技师,研究方向:自身免疫性疾病。

通信作者:王辉(1965-),男,河南信阳人,博士,教授,研究方向:分子免疫学研究;E-mail:wanghui@xxmu.edu.cn。

group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The proportion of peripheral blood $CD4^+ CD25^+ Foxp3^+ IL-10^+$ Treg cells in the observation group was significantly lower than that in the control group ($P < 0.05$). The peripheral blood 25-(OH)- D_3 level was positively correlated with the proportion of $IL-10$ and $CD4^+ CD25^+ Foxp3^+ IL-10^+$ Treg cells in the observation group ($R^2 = 0.379$, $P = 0.0003$; $R^2 = 0.151$, $P = 0.0341$). After PMA stimulation, the levels of $CD4^+ CD25^+ Foxp3^+ IL-10^+$ Treg cell and $IL-10$ in supernatant under the condition of $1,25-(OH)_2-D_3$ were significantly higher than those under the condition of absenting $1,25-(OH)_2-D_3$ in the observation group ($P < 0.05$). **Conclusion** Vitamin D can directly induce the proliferation and differentiation of Treg cells. The decrease of Treg cells in AIH patients is related to vitamin D deficiency in some extent.

Key words: autoimmune hepatitis; regulatory T cells; interleukin-10; vitamin D

自身免疫性肝炎(autoimmune hepatitis, AIH)是一种以高丙球蛋白血症、血浆自身抗体增高为特征的肝炎。AIH发生机制尚不明确,目前认为其与遗传因素、环境因素、病毒感染及自身免疫功能紊乱有关。多种因素引起机体固有免疫及适应性免疫应答增强,进一步引起肝脏组织损伤。其中,调节性T细胞(regulatory T cell, Treg)/辅助性T细胞(helper T cell)17的平衡破坏在AIH疾病发生、发展中起着重要作用。Treg细胞在AIH患者外周血比例减少,且分泌少量的细胞因子白细胞介素-10(interleukin-10, IL-10)。慢性肝脏疾病患者多出现钙-甲状旁腺素-维生素D轴功能紊乱, AIH患者多出现维生素D缺乏。目前,基因组学研究可为发现连接维生素D和AIH发病的功能性蛋白提供依据。维生素D可影响多种免疫细胞功能,如B细胞、T细胞等。AIH患者外周血Treg细胞减少与维生素D缺乏是否有关以及相互影响的机制如何尚未见文献报道。本课题采用流式细胞术、酶联免疫等技术分析AIH患者外周血Treg细胞比例、IL-10水平与维生素D的关系,并在体外条件下探讨维生素D对Treg细胞分化的影响。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择平顶山市第一人民医院2015年2月至2016年12月收治的AIH患者30例为观察组,其中男17例,女13例,年龄19~61岁,平均 (34.1 ± 22.5) 岁,均符合2010年美国肝病学会自身免疫性肝炎诊断标准^[1]。另选取同期体检健康者18例为对照组,其中男9例,女9例,年龄20~55岁,平均 (36.4 ± 23.1) 岁。2组对象的性别、年龄比较差异均无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。

1.2 主要试剂及仪器 IL-10酶联免疫试剂盒(默沙克生物公司),固定破膜剂、荧光素BB515标记白细胞分化抗原4检测试剂CD4-BB515、荧光素APC标记白细胞分化抗原25检测试剂CD25-APC、荧光素PE标记的叉头蛋白P3检测试剂Foxp3-PE(美国Becton Dickinson and Company公司),荧光素PEcy7标记白介素10检测试剂IL-10-PEcy7(美国Biolog-

end公司);流式细胞仪器(美国Becton, Dickinson and Company)。

1.3 标本收集方法 对照组于体检当日、观察组于入院次日抽取晨起空腹肘静脉血10 mL,以肝素锂抗凝,分离血浆冻存,并采用密度梯度离心法分离外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC),备用。

1.4 方法

1.4.1 外周血血浆IL-10水平检测 采用酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测2组受试者外周血血浆IL-10水平,具体检测方法参照试剂盒说明书进行,检测标准品及样本在450 nm处的吸光度值,以标准品倍比稀释浓度绘制标准曲线,将样本吸光度值转化为相应浓度。

1.4.2 外周血血浆维生素D水平检测 采用化学发光法检测2组受试者外周血血浆25-羟维生素D [$25-(OH)-D_3$]水平,检测仪器采用美国贝克曼库尔特全自动生物化学分析仪,检测流程参考相应标准化操作流程文件。

1.4.3 PBMC中 $CD4^+ CD25^+ Foxp3^+ IL-10^+$ Treg细胞比例检测 2组受试者的外周血PBMC标本经过预冷磷酸盐缓冲液洗涤后,加入固定破膜剂A固定20 min,离心洗涤后加入 $1 \times$ 固定破膜剂B,然后加入CD4-BB515、CD25-APC、Foxp3-PE和IL-10-PEcy7荧光抗体各5 μ L,避光孵育50 min,洗涤后采用流式细胞仪收集分析细胞。

1.4.4 维生素D对 $CD4^+ CD25^+ Foxp3^+ IL-10^+$ Treg细胞分化影响检测 观察组患者分选的PBMC加入CD4-BB515孵育30 min,洗涤,采用流式细胞仪分选 $CD4^+$ T细胞,铺入24孔板,每孔 $1 \times 10^8 L^{-1}$,在有或无活化形式的维生素D [$1,25-(OH)_2-D_3$] ($40 nmol \cdot L^{-1}$)的条件下,分别采用 $10 \mu g \cdot L^{-1}$ 的佛波酯(phorbol-12-myristate-13-acetate, PMA)刺激,流式细胞术检测刺激后 $CD4^+ CD25^+ Foxp3^+ IL-10^+$ Treg细胞比例,ELISA法检测刺激后上清液中IL-10水平。各项检测均严格按照对应试剂盒说明进行。

1.5 统计学处理 应用SPSS 20.0软件进行分析,

计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用 t 检验或配对 t 检验,外周血维生素 D 与 IL-10、CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ IL-10⁺ Treg 细胞相关性采用 Pearson 相关分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2 组受试者血浆 25-(OH)-D₃ 水平比较 对照组受试者血浆 25-(OH)-D₃ 水平为 (61.43 ± 14.90) nmol · L⁻¹, 观察组患者血浆 25-(OH)-D₃ 水平为 (38.65 ± 5.38) nmol · L⁻¹, 观察组患者血浆 25-(OH)-D₃ 水平显著低于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.2 2 组受试者血浆 IL-10 水平比较 对照组受试者血浆 IL-10 水平为 (57.51 ± 12.68) ng · L⁻¹, 观察组患者血浆 IL-10 水平为 (33.43 ± 6.50) ng · L⁻¹, 观察组患者的血浆 IL-10 水平显著低于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

2.3 2 组受试者外周血 CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ IL-10⁺ Treg 细胞比例比较 对照组受试者外周血 CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ IL-10⁺ Treg 细胞比例为 (10.08 ± 4.03)%, 观察组患者外周血 CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ IL-10⁺ Treg 细胞比例为 (5.09 ± 1.50)%, 观察组患者外周血 CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ IL-10⁺ Treg 细胞比例显著低于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.4 观察组患者外周血维生素 D 与 IL-10、CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ IL-10⁺ Treg 细胞比例的相关性 观察组患者外周血 25-(OH)-D₃ 水平与 IL-10 水平及 CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ IL-10⁺ Treg 细胞比例均呈正相关 ($R^2 = 0.379, P = 0.0003; R^2 = 0.151, P = 0.0341$)。

2.5 维生素 D 对 CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ IL-10⁺ Treg 细胞分化的影响 在无 1,25-(OH)₂-D₃ 的条件下给予 PMA 刺激, 观察组患者 CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ IL-10⁺ Treg 细胞比例为 (5.54 ± 2.17)%, 上清液中 IL-10 水平为 (19.99 ± 6.72) ng · L⁻¹; 在有 1,25-(OH)₂-D₃ 的条件下给予 PMA 刺激, CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ IL-10⁺ Treg 细胞比例为 (12.05 ± 4.59)%, 上清液中 IL-10 水平为 (57.26 ± 20.20) ng · L⁻¹; 在有 1,25-(OH)₂-D₃ 的条件下给予 PMA 刺激, 观察组患者的 CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ IL-10⁺ Treg 细胞比例和上清液中 IL-10 水平均显著高于无 1,25-(OH)₂-D₃ 的条件下给予 PMA 刺激后, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

3 讨论

AIH 以血浆 IgG 水平增高并出现自身免疫性抗

体为特点, 该类抗体主要包括抗核抗体和抗平滑肌抗体^[2], 病理学表现为界面性肝炎, 典型患者可观察到肝组织淋巴细胞和浆细胞浸润^[3-4]。AIH 的发生、发展主要基于抗自身肝细胞免疫耐受异常及引发的相关免疫应答, AIH 的发病因素不仅与遗传因素有关, 还与机体免疫学异常有关^[5-7]。

参与 AIH 疾病发生、发展的适应性免疫应答主要涉及自体活化 T 细胞的功能。这些 T 细胞通常可被 Treg 细胞抑制, 当这一抑制作用被破坏, 机体免疫耐受将受到干扰, 进而引发自身免疫性疾病^[8-10]。基于 AIH 患者外周血 Treg 细胞表达减少, Treg 定量及半定量检测均表明与 AIH 发病机制有关^[11-13]。此外, 尽管浸润到肝脏组织的 CD8⁺ 细胞毒性 T 细胞被认为是引起肝细胞损伤的主要效应细胞, 但近年来学者更多关注于 Th17 细胞^[14]。AIH 患者外周血及肝组织均可出现 Th17 细胞增加。在转化生长因子-β 和 IL-6 的诱导下, 可刺激 T 细胞向 Th17 分化, 且抑制 Treg 细胞分化^[15-16]。Treg/Th17 平衡在 AIH 疾病发生、发展中起重要作用^[17]。本课题组在早期研究中发现, 与对照组受试者相比, 观察组患者外周血 CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ IL-10⁺ Treg 细胞比例和 IL-10 水平均显著降低, 与文献报道一致^[15,17]。

慢性肝脏疾病患者多出现钙-甲状旁腺素-维生素 D 轴功能紊乱。AIH 患者多出现维生素 D 缺乏。目前, 基因组学研究可为发现连接维生素 D 和 AIH 发病的功能性蛋白提供依据, 这类蛋白主要包括组织相容性抗原 2 型分子、维生素 D 受体、Toll 样受体、细胞毒素 T 淋巴细胞抗原、细胞色素 P450、Treg 细胞及可调控其功能的转录调控因子 3 (Foxp3) 等^[18-19]。维生素 D 还可通过非基因组学因素参与 AIH 发病, 如促分裂原活化蛋白激酶信号通路、γδT 细胞、一氧化氮合成酶和活性氧成分等^[20]。总之, 维生素 D 对 AIH 患者极其重要, 其可提高患者的肝功能状态。本研究结果显示, AIH 患者外周血维生素 D 水平降低, 患者呈现维生素 D 缺乏状态。

本研究中, AIH 患者 Treg 细胞比例及 IL-10 水平降低, 经相关性分析, 二者降低程度均与维生素 D 缺乏程度呈正相关, 说明维生素 D 可能直接或间接影响 Treg 细胞的比例和功能。为了进一步验证该假设, 本实验在体外条件下采用 1,25-(OH)₂-D₃ 直接刺激 CD4⁺ T 细胞, 结果显示, Treg 细胞比例呈上升趋势, 且 Treg 细胞分泌 IL-10 水平也增高, 证明维生素 D 可直接诱导 Treg 细胞增殖分化, 进而揭示 AIH 患者体内 Treg 细胞减少在某种程度上与维生素 D 缺乏有关。本研究为 AIH 在临床治疗的同时

需要补充维生素D提供了理论依据。

参考文献:

- [1] ALVAREZ F, BERG P A, BIANCHI F B, *et al.* International autoimmune hepatitis group report; review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis[J]. *J Hepatol*, 2010, 31(5):929-938.
- [2] CZAJA A J. Autoantibodies in autoimmune liver disease[J]. *Adv Clin Chem*, 2015, 40(11):127-164.
- [3] 段树鹏,朱利红. 自身免疫性肝病56例临床及病理学特征分析[J]. *新乡医学院学报*, 2015, 32(7):649-652.
- [4] ZACHOU K, MURATORI P, FAU KOUKOU LIS G K, *et al.* Review article: autoimmune hepatitis-current management and challenges [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2013, 38(8):887-913.
- [5] LIBERAL R, GRANT C R, MIELI-VERGANI G, *et al.* Autoimmune hepatitis: a comprehensive review [J]. *J Autoimmun*, 2013, 41:126-139.
- [6] TANAKA E, KIYOSAWA K, SEKI T, *et al.* Low prevalence of hepatitis C virus infection in patients with auto-immune hepatitis type 1[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2013, 8(5):442-447.
- [7] CZAJA A J, MANNS M. Advances in the diagnosis, pathogenesis, and management of autoimmune hepatitis [J]. *Gastroenterology*, 2015, 139(1):58-72.
- [8] VERGANI D, MIELI-VERGANI G. Autoimmune hepatitis and PSC connection[J]. *Clin Liver Dis*, 2008, 12(1):187-202.
- [9] OO Y H, HUBSCHER S G, ADAMS D H. Autoimmune hepatitis: new paradigms in the pathogenesis, diagnosis, and management [J]. *Hepatol Int*, 2010, 4(2):475-493.
- [10] LONGHI M S, MA Y F, MIELI-VERGANI G, *et al.* Adaptive immunity in autoimmune hepatitis[J]. *Dig Dis*, 2016, 28(1):63-69.
- [11] LONGHI M S, MA Y, BOGDANOS D P, *et al.* Impairment of

CD4⁺CD25⁺ regulatory T-cells in autoimmune liver disease[J]. *J Hepatol*, 2014, 41(1):31-37.

- [12] LONGHI M S, HUSSAIN M J, MITRY R R, *et al.* Functional study of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in health and autoimmune hepatitis[J]. *J Immunol*, 2016, 176(7):4484-4491.
- [13] PEISELER M, SEBODE M, FRANKE B, *et al.* Foxp3⁺ regulatory T cells in autoimmune hepatitis are fully functional and not reduced in frequency[J]. *J Hepatol*, 2012, 57(1):125-132.
- [14] LIBERAL R, GRANT C R. Cirrhosis and autoimmune liver disease: current understanding[J]. *World J Hepatol*, 2016, 8(28):1157-1168.
- [15] YU H, HUANG J F, LIU Y, *et al.* IL-17 contributes to autoimmune hepatitis [J]. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci*, 2010, 30(4):443-446.
- [16] ZHAO L, TANG Y F, YOU Z, *et al.* Interleukin-17 contributes to the pathogenesis of autoimmune hepatitis through inducing hepatic interleukin-6 expression[J]. *PLoS One*, 2011, 6(4):e18909.
- [17] ZHAO L, QIU D K, MA X, *et al.* Th17 cells: the emerging reciprocal partner of regulatory T cells in the liver[J]. *J Dig Dis*, 2013, 11(3):126-133.
- [18] 邹婷婷,詹学. 儿童自身免疫性肝炎研究进展[J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2016, 31(20):1598-1600.
- [19] DUARTE-REY C, PARDO A L, RODRIGUEZ-VELOSA Y, *et al.* HLA class II association with autoimmune hepatitis in Latin America: a meta-analysis [J]. *Autoimmun Rev*, 2016, 8(4):325-331.
- [20] BITTENCOURT P L, PALACIOS S A, CANCADO E L, *et al.* Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 gene polymorphisms do not confer susceptibility to autoimmune hepatitis types 1 and 2 in Brazil[J]. *Am J Gastroenterol*, 2013, 98(7):1616-1620.

(本文编辑:李胜利 英文编辑:徐自超)

(上接第591页)

能异常率为34.8%^[7]。本研究结果发现,不同丙戊酸钠血药浓度的3组患儿的肾功能和红细胞参数比较差异均无统计学意义。高浓度组患儿ALT、AST水平显著高于低浓度组和中浓度组,差异有统计学意义。说明高丙戊酸钠血药浓度的患者和长期用药的患者出现肝功异常的概率增加,ALT和AST可较早反映肝脏损伤,对于长期服用该药的患者,应定期检测这些指标,并及时对症治疗。

综上所述,长期服用高浓度丙戊酸钠可引起ALT和AST异常。因此,癫痫患儿使用丙戊酸钠时,应特别注意监测ALT和AST,及时调整丙戊酸钠剂量,降低丙戊酸钠血药浓度及因血药浓度高引起的不良反应,保证患者用药安全,提高患者的生活质量,实现个体化精准治疗。

参考文献:

- [1] 陈希,王文娥,刘洋,等. 丙戊酸引起肝酶谱变化相关因素分析[J]. *中国医药导报*, 2013, 10(25):73-75.
- [2] 安胜男,杨莉萍,史爱欣,等. 丙戊酸对住院患者生化及血常规指标的影响分析[J]. *临床药物治疗杂志*, 2015, 13(6):59-63.
- [3] 常琳. 中国癫痫流行病学调查研究进展[J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2012, 39(2):161-164.
- [4] 叶建林,徐晓华,洪荣,等. 不同发育阶段儿童癫痫的用药特点及不良反应研究进展[J]. *中国临床药理学杂志*, 2015, 31(2):155-157.
- [5] 班立丽,唐晓. 丙戊酸钠血药浓度与抗癫痫疗效及不良反应关系研究[J]. *中国医院用药评价与分析*, 2013, 13(12):1086-1089.
- [6] 王灿,马虹英,王方杰,等. 丙戊酸肝毒性的早期预警及预防研究状况[J]. *中国临床药理学杂志*, 2015, 31(2):150-154.
- [7] 曾艳,刘立丽,闫素英. 丙戊酸钠血清浓度接近或超过治疗浓度范围上限患者的肝功能、血常规结果分析[J]. *中国药物应用与监测*, 2013, 10(2):102-104.

(本文编辑:徐刚珍 英文编辑:孟月)