

高通量测序揭示原发性胆汁性胆管炎患者的T细胞受体图谱特征

刘珍玉, 张俊宁, 杨雪丽, 王广宇, 侯显良 (桂林医学院第二附属医院 广西慢性病代谢重塑与智能医学工程重点实验室 中心实验室, 广西 桂林 541199)

摘要: **目的** 揭示原发性胆汁性胆管炎 (primary biliary cholangitis, PBC) 患者T细胞受体 (T cell receptor, TCR) 图谱特征, 并揭示大肠埃希菌 (*Escherichia coli*, *E.coli*) 的丙酮酸脱氢酶复合体E2亚基 (pyruvate dehydrogenase complex E2, PDC-E2) 抗原在PBC疾病的分子模拟机制。**方法** 采用多重聚合酶链反应和免疫组库测序技术分析PBC患者和健康对照者的CD4⁺和CD8⁺记忆性TCR β 链互补决定区3 (complementarity determining region 3, CDR3) 序列的多样性、氨基酸组成及疏水性、共有CDR3序列。体外诱导和扩增人PDC-E2₁₆₃₋₁₇₆ (人PDC-E2) 抗原相关T细胞和*E.coli* PDC-E2_{31-44/134-147/235-248} (*E.coli* PDC-E2) 抗原相关T细胞, 通过免疫组库测序技术鉴定人 (和*E.coli*) PDC-E2抗原相关TCR β CDR3图谱, 并分析其丰度变化。**结果** PBC患者组和健康对照组间的CD4⁺记忆性T细胞、CD8⁺记忆性T细胞TCR β CDR3免疫图谱多样性相似, D50指数 [CD4⁺记忆性T细胞: 0.028 ± 0.019 比 0.034 ± 0.015 ; CD8⁺记忆性T细胞: $(1.86 \pm 2.70) \times 10^{-3}$ 比 $(4.62 \pm 3.89) \times 10^{-4}$]、Shannon指数 (CD4⁺记忆性T细胞: 9.473 ± 1.346 比 9.734 ± 0.933 ; CD8⁺记忆性T细胞: 6.197 ± 1.519 比 5.436 ± 1.629)、Gini指数 (CD4⁺记忆性T细胞: 0.786 ± 0.048 比 0.760 ± 0.036 ; CD8⁺记忆性T细胞: 0.920 ± 0.047 比 0.939 ± 0.025) 等差异均无统计学意义 (P 均 > 0.05)。PBC组和健康对照组CD4⁺记忆性T细胞和CD8⁺记忆性T细胞间共有CDR3序列百分比差异无统计学意义 [$(6.47 \pm 1.43) \%$ 比 $(6.21 \pm 3.18) \%$; $t = -0.21$, $P = 0.84$]。健康对照组和PBC组中序列长度为13、14、15的CDR3分子第6位和第7位氨基酸的组成频率中部分存在显著差异, 疏水氨基酸组成频率近似。通过细胞培养和免疫组库测序鉴定了一系列人PDC-E2和*E.coli* PDC-E2抗原刺激后丰度显著上升的TCR序列。**结论** 该研究鉴定出PBC疾病的TCR图谱特征, 从TCR这个新视角阐述了*E.coli*在PBC疾病中的分子模拟机制。**关键词:** 原发性胆汁性胆管炎; T细胞受体; 高通量测序; 丙酮酸脱氢酶复合体E2亚基

High-throughput sequencing reveals the characteristics of T cell receptor profiles in patients with primary biliary cholangitis

Liu Zhenyu, Zhang Junning, Yang Xueli, Wang Guangyu, Hou Xianliang (Central Laboratory, Guangxi Key Laboratory of Metabolic Reprogramming and Intelligent Medical Engineering for Chronic Diseases, The Second Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin 541199, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China)

Abstract: Objective To reveal the characteristics of T cell receptor (TCR) profiles in patients with primary biliary cholangitis (PBC) and to reveal the molecular mimicry mechanism of pyruvate dehydrogenase complex E2 (PDC-E2) antigen of *Escherichia coli* (*E.coli*) in PBC disease. **Methods** The sequence diversity, amino acid composition and hydrophobicity, and common sequences of memory TCR β chain complementarity determining region 3s (CDR3s) of PBC patients and healthy volunteers were analyzed by multiplex polymerase chain reaction and immune repertoire sequencing. Human PDC-E2₁₆₃₋₁₇₆ (PDC-E2) antigen-associated T cells and *E.coli*

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7380.2024.01.007

基金项目: 中央引导地方科技发展资金项目 (桂科AD20238021); 广西自然科学基金 (2024GXNSFAA010096); 中国博士后科学基金 (2023M740344)

通信作者: 侯显良 Email: houxl115@126.com

PDC-E2_{31-44/134-147/235-248} (*E.coli* PDC-E2) antigen-associated T cells were induced and amplified in vitro, and human (*E. coli*) PDC-E2 antigen-related TCR β CDR3 repertoire were identified by immune repertoire sequencing. **Results** TCR β CDR3 repertoire diversity of CD4⁺ memory T cells and CD8⁺ memory T cells between PBC patients and healthy controls was similar, there were no statistically significant differences in D50 index [CD4⁺ memory T cells: 0.028 ± 0.019 vs. 0.034 ± 0.015 ; CD8⁺ memory T cells: $(1.86 \pm 2.70) \times 10^{-3}$ vs. $(4.62 \pm 3.89) \times 10^{-4}$], Shannon index (CD4⁺ memory T cells: 9.473 ± 1.346 vs. 9.734 ± 0.933 ; CD8⁺ memory T cells: 6.197 ± 1.519 vs. 5.436 ± 1.629), Gini index (CD4⁺ memory T cells: 0.786 ± 0.048 vs. 0.760 ± 0.036 ; CD8⁺ memory T cells: 0.920 ± 0.047 vs. 0.939 ± 0.025), etc. There was no significant difference in the percentage of common CDR3 sequence between CD4⁺ memory T cells and CD8⁺ memory T cells of PBC patients and healthy controls [$(6.47 \pm 1.43)\%$ vs. $(6.21 \pm 3.18)\%$; $t = -0.21$, $P = 0.84$]. The percentage of some amino acids at positions 6 and 7 (P6 and P7) of TCR β CDR3 13~15 amino acids in length in healthy control group and PBC group were significantly different, while the percentage of hydrophobic amino acids were similar. It is noteworthy that a series of human PDC-E2 and *E.coli* PDC-E2 antigen-related TCR sequences through cell culture and immune repertoire sequencing, which may play an important role in the pathogenesis of PBC were identified. **Conclusions** This study identified the TCR profile features of PBC disease and elucidated the molecular mimicry mechanism of *E.coli* in PBC disease from the perspective of TCR.

Key words: Primary biliary cholangitis; T cell receptor; High-throughput sequencing; Pyruvate dehydrogenase complex E2 subunit

原发性胆汁性胆管炎(primary biliary cholangitis, PBC)是一种器官特异性自身免疫性肝病,其特征是存在抗线粒体抗体(anti-mitochondrial antibodies, AMAs)、炎症和小叶间胆管破坏^[1-3]。超过90%的PBC患者存在可检测的AMAs。这些疾病特异性AMAs主要针对线粒体中的丙酮酸脱氢酶E2亚基(E2 subunit of pyruvate dehydrogenase complex, PDC-E2)、支链 α 酮酸脱氢酶复合体(branched-chain α -ketoacid dehydrogenase complex, BCO-ADC)和酮戊二酸脱氢酶复合体(oxoglutarate dehydrogenase complex, OGDC)^[4]。PDC-E2复合物在包括细菌在内的物种中高度保守。尽管PBC的致病因素尚不明确,但许多研究表明,感染性因素是自身免疫耐受打破的触发因素^[5,6]。人PDC-E2₁₆₃₋₁₇₆抗原(人PDC-E2)与大肠埃希菌(*Escherichia coli*, *E.coli*) PDC-E2_{31-44/134-147/235-248}抗原(*E.coli* PDC-E2)具有高度的序列相似性,这两个抗原表位的三维结构高度同源^[7]。鉴于这种高度相似性,人体细胞免疫和体液免疫对细菌PDC-E2抗原免疫反应的同时可能靶向自身PDC-E2抗原^[8]。事实上,多项流行病学研究表明,女性PBC患者复发性尿路感染(urinary tract infection, UTI)的发病率增加,且大多数病例中能分离出*E.coli*^[9]。此外,Shimoda等^[10]报研究指出*E.coli* PDC-E2的分子模拟物使PBC患者产生了针对自身PDC-E2₁₆₃₋₁₇₆抗原的T细胞系。然而,PDC-E2这一短序列的抗原是如何导致自身免疫耐受丧失的分子机制尚未阐明。

自身反应性T细胞的激活在PBC疾病的发生发展

中发挥重要作用。CD4⁺ T细胞可能在抗原的识别和致敏中发挥重要作用,而CD8⁺细胞毒性T细胞可能参与胆管的破坏^[11-13]。CD4⁺ T细胞或CD8⁺ T细胞的抗原特异性由T细胞表面表达的T细胞受体介导。每个T细胞受体(T cell receptor, TCR)的抗原特异性在很大程度上取决于受体链的高变互补决定区3(complementarity determining region 3, CDR3),其由V基因、D基因和J基因片段的体细胞重组以及V(D)J连接处核苷酸的缺失和插入产生^[14,15]。本研究使用多色流式细胞术分选高纯度CD4⁺/CD8⁺记忆性T细胞,多重聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)技术扩增出TCR的CDR3区,并应用高通量测序技术分析PBC患者和健康对照者外周血CD4⁺/CD8⁺记忆性T细胞的多样性、氨基酸的组成频率、个体内CD4⁺和CD8⁺记忆性T细胞的CDR3序列的共有指数,并通过细胞培养和免疫组库测序鉴定了人PDC-E2和*E.coli* PDC-E2抗原相关TCR序列,为揭示PBC的致病机制提供新思路。

1 资料与方法

1.1 研究对象 募集8例具有HLA-DRB1*01:03(DRB4*01:03)的早期病理组织学阶段(I~II期)的PBC女性患者。PBC疾病基于现阶段国际公认的诊断标准^[16,17]。纳入标注:符合以下3个标准中的2项即可诊断为PBC:①血清中AMA抗体或AMA-M2抗体阳性;②反映胆汁淤积的生物化学指标[碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、 γ -谷氨酰转移酶(γ -glutamyl transferase, GGT)]升高;③肝脏组织病理学符合PBC。同时排除:①其他肝

病如酒精性肝病、病毒性肝炎、妊娠期肝内胆汁淤积症、药物性肝损伤等；②系统性疾病伴有肝损伤；③合并其他自身免疫性疾病。此外，招募8例女性健康志愿者。纳入标准：无既往肿瘤病史，近期无感染病史（呼吸道、泌尿道等）；常规实验室检查（血常规、肝功能、尿常规、大便常规等）结果均正常；彩超等检查未见肝脏等器官存在异常。本研究根据赫尔辛基宣言的原则进行，并在研究前获得了桂林医学院附属医院伦理委员会的批准。

1.2 T细胞分离和RNA提取 采集每名受试者20 ml外周血，使用Ficoll-Hypaque离心法分离外周血单个核细胞（peripheral blood mononuclear cell, PBMC）。使用FACS Aria流式细胞分选仪和以下抗体（均购于BD Biosciences）：抗CD4 PerCP-Cy5.5（OKT4）、抗CD8 FITC（RPA-T8）、抗CD45RA APC（HI100）和抗CD45RO PE（UCHL-1），分选CD4⁺记忆性T细胞和CD8⁺记忆性T细胞。经FACS检测，每个样本所分选的CD4⁺/CD8⁺记忆性T细胞均超过120万个细胞，纯度>95%。使用TRIzol试剂（Invitrogen）提取分选细胞的总RNA，用于后续的文库构建和高通量测序。

1.3 人（或*E.coli*）PDC-E2特异性T细胞的培养和扩增 本研究合成了2种不同的多肽片段，分别为人PDC-E2₁₆₃₋₁₇₆肽（GDLLAEETDKATI）和*E.coli* PDC-E2_{31-44/134-147/235-248}（EQSLITVEGDKASM）。经高效液相色谱分析测定，所合成肽的纯度>95%。使用Ficoll-Hypaque密度梯度离心法获得来自5例PBC患者外周血中的PBMC。采用磁珠分选法获得CD14⁺细胞和记忆性T细胞，采用ImmunoCult™ Dendritic Cell Culture Kit试剂盒将CD14⁺细胞分化发育为成熟的树突状细胞（dendritic cell, DC）。将分化的成熟DC、记忆性T细胞以及人（或*E.coli*）PDC-E2多肽建立细胞共培养体系，对照组以等量PBS缓冲液替代PDC-E2多肽，诱导人（或*E.coli*）PDC-E2相关T细胞方法参照相关文献^[2]。随后，收集每个共培养体系中的细胞，提取RNA用于后续的文库构建和高通量测序。人（或*E.coli*）PDC-E2相关TCR的鉴定方法如下：与对照组相比，人（或*E.coli*）PDC-E2抗原刺激后，频率增加的CDR3氨基酸序列被称为人（或*E.coli*）PDC-E2相关TCR。

1.4 文库构建和高通量测序及数据分析 采用QIAGEN multiplex PCR Kit进行多重PCR以捕获CDR3区域。32个正向引物（V区引物）特异性对应功能性TCR-Vβ区段，13个反向引物（J区引物）特异性对应功能性TCR-Jβ区段。将多重PCR产物（100~190 bp）电泳回收、末端修复、纯化、添加“A”碱基、加A产物纯化回收以及接头连接。随后，PCR富集上一步得到的修饰DNA片段，采用QIAquick Gel Extraction kit对PCR产物胶纯化回收，使用Agilent 2100 Bioanalyzer开展文库质检。随

后使用Illumina HiSeq2000测序平台以100 bp的读长对构建的文库进行配对末端测序。使用MiTCR软件纠正测序错误和PCR扩增偏差。过滤掉低质量的测序数据，随后将Pair-end（PE）数据的两条序列拼接成1条完整重叠群（contig）。采用MiTCR（由MiLaboratory开发：<http://mitcr.milaboratory.com/downloads/>）比对测序数据^[18]，鉴定每种CDR3 DNA序列、氨基酸序列和V-J组合的表达频率。采用逆辛普森（Inverse-Simpson）多样性指数、辛普森（Simpson）多样性指数、香农（Shannon）指数、D50指数、丰富度（richness）指数、基尼（Gini）指数分析各样本的TCRβ CDR3图谱多样性^[19-21]。本研究分析了两组中序列长度为13、14、15的CDR3分子第6位和第7位氨基酸的组成频率以及疏水氨基酸的百分频率，且分别基于独特型克隆免疫图谱（不考虑每个序列的丰度）和总TCRβCDR3免疫图谱（考虑每个序列的丰度）进行分析。

1.5 统计学处理 使用SPSS 20进行统计分析。多样性指数、重叠指数等符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，两组间采用独立样本 t 检验。CDR3序列丰度为非正态分布的计量资料，以 $M(p_{25}, p_{75})$ 表示，采用Mann-Whitney U 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TCR多样性分析 PBC患者平均（54.21 ± 6.47）岁，年龄范围41~65岁，健康志愿者平均（55.13 ± 8.25）岁，年龄范围43~63岁，两组间年龄无显著差异（ $t = -0.34$, $P = 0.45$ ）。采用Inverse-Simpson指数、Simpson指数、Shannon指数、D50指数、Richness指数、Gini指数评估TCRβ CDR3的多样性。Inverse-Simpson指数、Shannon指数、D50指数和Richness指数数值越大，CDR3多样性越高；而Simpson指数和Gini指数则相反。PBC组和对照组间CD4⁺记忆性T细胞（表1）和CD8⁺记忆性T细胞（表2）的多样性相似，两组间差异无统计学意义（ P 均>0.05）。

2.2 CD4⁺记忆性T细胞和CD8⁺记忆性T细胞共有TCR β CDR3序列分析 对照组中CD4⁺记忆性T细胞和CD8⁺记忆性T细胞间的共有CDR3序列百分占比在2.25%~11.41%，平均值为（6.21 ± 3.18）%；PBC组中CD4⁺记忆性T细胞和CD8⁺记忆性T细胞间的共有CDR3序列百分占比在4.18%~8.63%间，平均值为（6.47 ± 1.43）%，两组间差异无统计学意义（ $t = -0.21$, $P = 0.84$ ），见图1、图2。

2.3 TCRβ CDR3序列第6位和第7位氨基酸组成及疏水性分析 在独特型克隆免疫图谱中健康对照组和PBC组间以上长度和位点的氨基酸组成频率相似，但以下位点的氨基酸频率呈现显著性差异（图3、图4）：独特型克隆免疫图谱中CD4⁺记忆性T细胞长度为14的CDR3序列第6位氨基酸（14-pos6-4RO-unique）的蛋氨酸〔（0.764 ± 0.060）%比（0.700 ± 0.046）%；

$t = 2.42, P = 0.03$], 14-pos7-4RO-unique的精氨酸 $[(10.385 \pm 0.379) \% \text{比} (10.862 \pm 0.216) \%]$; $t = -3.09, P = 0.008$], 14-pos7-8RO-unique的丝氨酸 $[(7.158 \pm 0.421) \% \text{比} (6.729 \pm 0.317) \%]$; $t = 2.32, P = 0.04$], 15-pos6-4RO-unique的精氨酸 $[(10.174 \pm 0.438) \% \text{比} (10.619 \pm 0.362) \%]$; $t = -2.22, P = 0.04$], 15-pos7-8RO-unique的丝氨酸 $[(7.568 \pm 0.425) \% \text{比} (6.990 \pm 0.239) \%]$; $t = 3.36, P = 0.005$]. 此外, 总TCR β CDR3免疫图谱中, 个体间以上长度和位点的氨基酸组成频率具有较大异质性, 经统计分析发现健康对照组和PBC组以下位点的氨基酸频率呈现显著性差异: 总TCR β CDR3免疫图谱中CD4 $^{+}$ 记忆性T细胞长度为13的CDR3序列第7位氨基酸(13-pos7-4RO-total)的赖氨酸 $[(0.900 \pm 0.196) \% \text{比} (0.619 \pm 0.254) \%]$; $t = 2.48, P = 0.03$], 13-pos7-4RO-total的天门冬氨酸 $[(2.439 \pm 0.926) \% \text{比} (1.526 \pm 0.626) \%]$; $t = 2.31, P = 0.04$],

14-pos6-4RO-total的苯丙氨酸 $[(0.693 \pm 0.139) \% \text{比} (0.970 \pm 0.309) \%]$; $t = -2.31, P = 0.04$], 14-pos7-4RO-total的苏氨酸 $[(8.594 \pm 1.055) \% \text{比} (10.489 \pm 1.895) \%]$; $t = -2.47, P = 0.03$], 15-pos6-4RO-total的赖氨酸 $[(1.125 \pm 0.334) \% \text{比} (1.510 \pm 0.375) \%]$; $t = -2.17, P = 0.048$], 15-pos6-4RO-total的脯氨酸 $[(5.819 \pm 0.868) \% \text{比} (6.848 \pm 1.016) \%]$; $t = -2.18, P = 0.047$], 15-pos6-8RO-total的色氨酸 $[(0.575 \pm 0.325) \% \text{比} (1.552 \pm 0.992) \%]$; $t = -2.65, P = 0.03$],

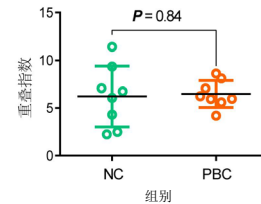


图2 PBC患者组和健康对照组(NC)间CD4 $^{+}$ 记忆性T细胞和CD8 $^{+}$ 记忆性T细胞间共有CDR3序列百分比

表1 PBC组和对对照组的CD4 $^{+}$ 记忆性T细胞的TCR β CDR3多样性分析 ($\bar{x} \pm s$)

组别	D50指数	Simpson指数	Shannon指数	Richness指数	Inverse-Simpson指数	Gini指数
对照组	0.034 \pm 0.015	0.013 \pm 0.017	9.734 \pm 0.933	191462 \pm 40148	1037 \pm 1670	0.760 \pm 0.036
PBC组	0.028 \pm 0.019	0.028 \pm 0.039	9.473 \pm 1.346	206239 \pm 39826	1772 \pm 3401	0.786 \pm 0.048
<i>t</i> 值	0.74	-0.97	0.45	-0.74	-0.55	-1.25
<i>P</i> 值	0.47	0.35	0.67	0.47	0.59	0.23

表2 PBC组和对对照组CD8 $^{+}$ 记忆性T细胞的TCR β CDR3多样性分析 ($\bar{x} \pm s$)

组别	D50指数	Simpson指数	Shannon指数	Richness指数	Inverse-Simpson指数	Gini指数
对照组	$(4.62 \pm 3.89) \times 10^{-4}$	0.108 \pm 0.163	5.436 \pm 1.629	51358 \pm 23656	28.320 \pm 21.871	0.939 \pm 0.025
PBC组	$(1.86 \pm 2.70) \times 10^{-3}$	0.042 \pm 0.040	6.197 \pm 1.519	57533 \pm 14119	60.408 \pm 57.683	0.920 \pm 0.047
<i>t</i> 值	-1.45	1.12	-0.97	-0.63	-1.47	1.01
<i>P</i> 值	0.19	0.28	0.35	0.54	0.18	0.33

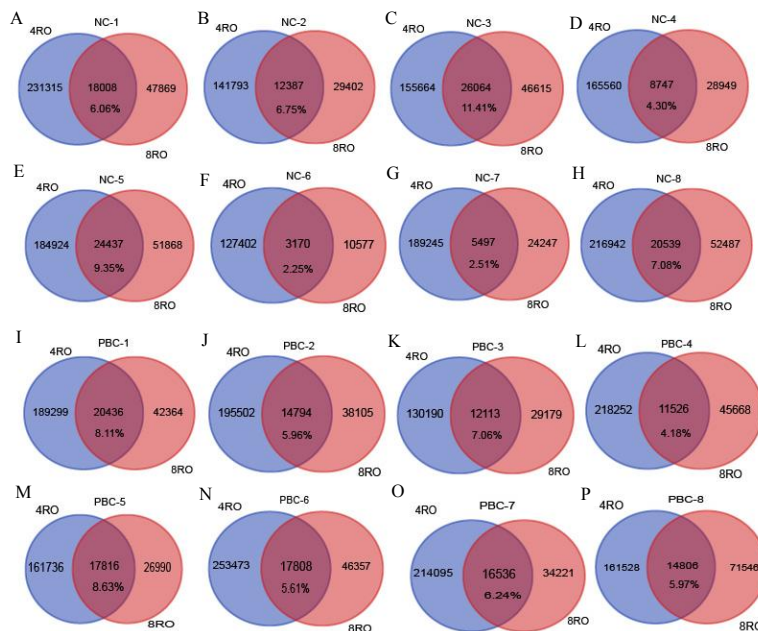


图1 PBC患者组和健康对照组间CD4 $^{+}$ 记忆性T细胞和CD8 $^{+}$ 记忆性T细胞间共有CDR3序列百分比

注: Venn图展示了每个受试者CD4 $^{+}$ 记忆性T细胞和CD8 $^{+}$ 记忆性T细胞间TCR β CDR3序列的共有程度, 其中A~H为健康对照组, I~P为PBC组; 图中4RO指CD4 $^{+}$ 记忆性T细胞; 8RO指CD8 $^{+}$ 记忆性T细胞。

15-pos7-4RO-total的天冬氨酸 $[(4.213 \pm 0.551) \%]$ 比 $(5.221 \pm 0.897) \% ; t = -2.71, P = 0.017]$, 见图5。此外, 健康对照组和PBC疾病组间以上长度和位点的疏水氨基酸组成频率也近似, 无显著性差异。

2.4 PDC-E2抗原刺激揭示*E.coli*在PBC疾病的分子模拟机制 选取5例PBC患者外周血中的记忆T细胞进行研究, 结果发现部分CDR3序列在人PDC-E2刺激组、*E.coli* PDC-E2刺激组、PBS溶液对照组中共有, 在5例PBC患者中共有序列数和共有频率分别为2234 (10.9%)、10278 (8.6%)、12550 (12.3%)、1176

(3.7%)、2641 (3.1%), 见图6。部分CDR3序列丰度在人PDC-E2和*E.coli* PDC-E2抗原刺激后显著增加。在S1样本中, 相比于未刺激组, 54条CDR3序列的丰度在人PDC-E2抗原和*E.coli* PDC-E2抗原刺激后显著增加 ($P < 0.001$), 而人PDC-E2抗原刺激组和*E.coli* PDC-E2抗原刺激组间无显著差异 ($P = 0.311$); 在S3样本中, 相比于未刺激组, 18条CDR3序列的丰度在人PDC-E2抗原和*E.coli* PDC-E2抗原刺激后显著增加 ($P < 0.001$), 同样人PDC-E2抗原刺激组和*E.coli* PDC-E2抗原刺激组间无显著差异 ($P = 0.448$) (表3)。这些序

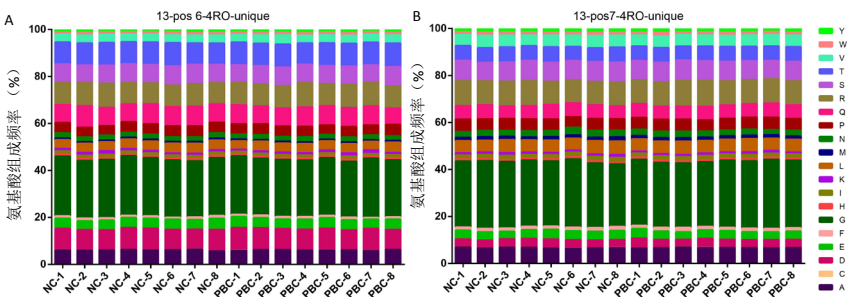


图3 PBC组和健康对照组独特型克隆免疫图谱(不考虑每个序列的丰度)中序列长度为13的CDR3分子第6位(A)和第7位(B)氨基酸组成频率

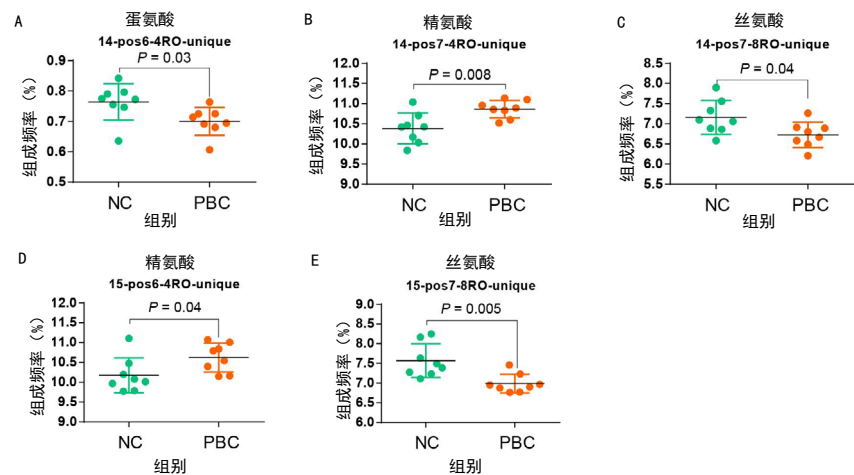


图4 PBC组和健康对照组独特型克隆免疫图谱中组成频率呈现显著性差异的氨基酸

注: 图中A~E分别为CD4⁺记忆性T细胞长度为14的CDR3序列第6位(14-pos6-4RO-unique)蛋氨酸、CD4⁺记忆性T细胞长度为14的CDR3序列第7位(14-pos7-4RO-unique)精氨酸、CD8⁺记忆性T细胞长度为14的CDR3序列第7位(14-pos7-8RO-unique)丝氨酸、CD4⁺记忆性T细胞长度为15的CDR3序列第6位(15-pos6-4RO-unique)精氨酸、CD8⁺记忆性T细胞长度为15的CDR3序列第7位(15-pos7-8RO-unique)丝氨酸。

表3 人*E.coli* PDC-E2抗原刺激后CDR3序列丰度 [$M (p_{25}, p_{75})$]

组别	S1 样本	S3 样本
人 PDC-E2 抗原刺激组	$1.07 \times 10^{-4} (4.18 \times 10^{-5}, 3.14 \times 10^{-4})$	$3.04 \times 10^{-5} (6.95 \times 10^{-6}, 1.30 \times 10^{-4})$
<i>E.coli</i> PDC-E2 抗原刺激组	$6.40 \times 10^{-5} (1.92 \times 10^{-5}, 3.16 \times 10^{-4})$	$2.35 \times 10^{-5} (8.22 \times 10^{-6}, 4.92 \times 10^{-5})$
未刺激组	$2.20 \times 10^{-7} (1.46 \times 10^{-7}, 9.88 \times 10^{-7})$	$1.79 \times 10^{-7} (8.96 \times 10^{-8}, 1.79 \times 10^{-7})$
H 值	103.28	34.90
P 值	< 0.001	< 0.001
Z ₁ 值	-8.84	-5.08
P ₁ 值	< 0.001	< 0.001
Z ₂ 值	8.79	-5.14
P ₂ 值	< 0.001	< 0.001
Z ₃ 值	-1.01	-0.76
P ₃ 值	0.311	0.448

注: Z₁、P₁为人PDC-E2抗原刺激组和未刺激组相比, Z₂、P₂为*E.coli* PDC-E2抗原刺激组和未刺激组相比, Z₃、P₃为人PDC-E2抗原刺激组和*E.coli* PDC-E2抗原刺激组相比。

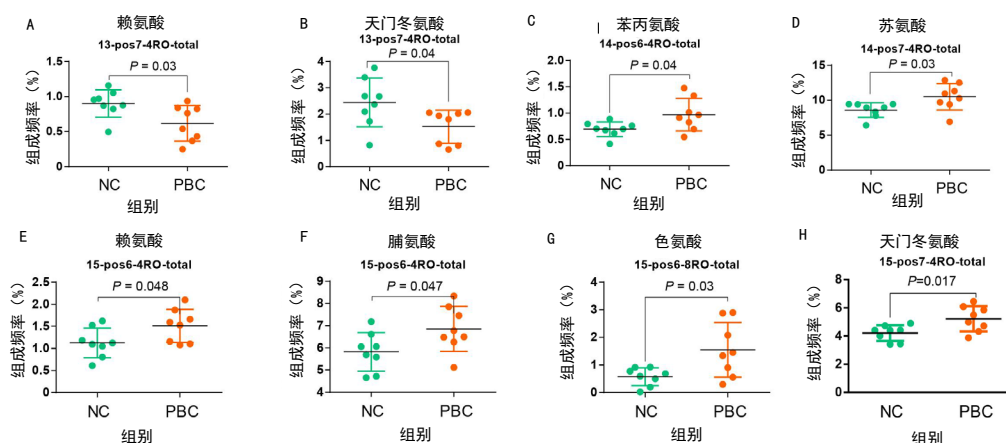


图5 PBC组和健康对照组间总 TCR β CDR3 克隆免疫图谱中组成频率呈现显著性差异的氨基酸

注: A ~ H 分别为 CD4⁺ 记忆性 T 细胞长度为 13 的 CDR3 序列第 7 位 (13-pos7-4RO-total) 的赖氨酸、CD4⁺ 记忆性 T 细胞长度为 13 的 CDR3 序列第 7 位 (13-pos7-4RO-total) 的天门冬氨酸、CD4⁺ 记忆性 T 细胞长度为 14 的 CDR3 序列第 6 位 (14-pos6-4RO-total) 的苯丙氨酸、CD4⁺ 记忆性 T 细胞长度为 14 的 CDR3 序列第 7 位 (14-pos7-4RO-total) 的苏氨酸、CD4⁺ 记忆性 T 细胞长度为 15 的 CDR3 序列第 6 位 (15-pos6-4RO-total) 的赖氨酸、CD4⁺ 记忆性 T 细胞长度为 15 的 CDR3 序列第 6 位 (15-pos6-4RO-total) 的脯氨酸、CD8⁺ 记忆性 T 细胞长度为 15 的 CDR3 序列第 6 位 (15-pos6-8RO-total) 的色氨酸、CD4⁺ 记忆性 T 细胞长度为 15 的 CDR3 序列第 7 位 (15-pos7-4RO-total) 的天门冬氨酸。

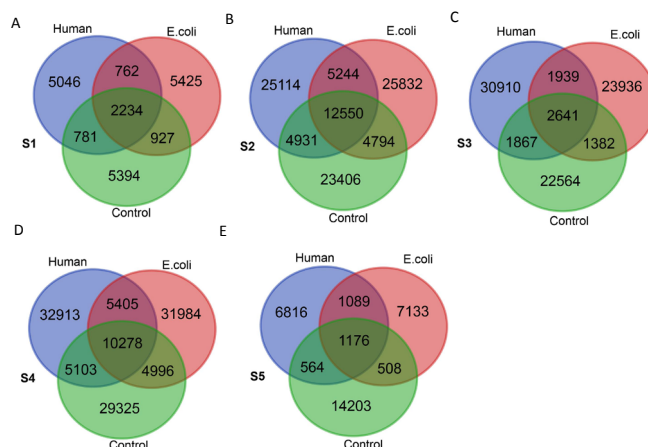


图6 受试者记忆性 T 细胞经人 (human) PDC-E2 抗原、大肠埃希菌 (*E.coli*) PDC-E2 抗原及 PBS 溶液 (control) 刺激后所得 TCR 免疫图谱间 TCR β CDR3 序列共有程度的 Venn 图

列可能在 PBC 患者打破自身免疫耐受的分子机制中发挥关键作用。

3 讨论

PBC 是一种免疫介导的慢性胆管损伤性疾病, 目前关于其发病机制尚未完全阐明^[22]。自身反应性 T 细胞在包括 PBC 在内的各种自身免疫疾病的发生发展中起着至关重要的作用。TCR 图谱特征分析对于鉴定 PBC 疾病相关 T 细胞及评估 T 细胞多样性至关重要^[23,24]。本研究使用高通量测序技术分析 PBC 患者和健康者外周血 CD4⁺/CD8⁺ 记忆 T 细胞的 TCR β CDR3 图谱特征, 并通过体外诱导扩增自身 PDC-E2₁₆₃₋₁₇₆ (和 *E.coli* PDC-E2) 特异性 T 细胞, 为阐明 PDC-E2 抗原在 TCR 分子水平上的交叉反应提供新的证据。本研究发现 PBC 患者 TCR β CDR3 免疫图谱多样性与健康对照组相比无显著差异, 其原因可能是研究收集的 PBC 患者尚处于疾病早期, TCR β CDR3 免疫图谱多样性尚未明显减

小。此外, 共有 TCR β CDR3 序列是不同个体 (或不同细胞亚群) 所共有的, 这些序列在不同个体 (或不同细胞亚群) 中表达且响应相同抗原决定簇的刺激, 在疾病的发生发展中发挥关键作用。CD4⁺ T 细胞和 CD8⁺ T 细胞在机体免疫反应中相互协调, 共同抵御外界病原体。特异性抗原与 CD4⁺ T 细胞相互作用使 DC 优化抗原递呈, 并传递特殊细胞因子和共刺激信号给 CD8⁺ T 细胞, CD4⁺ T 细胞还可通过多种分子机制增强 CD8⁺ T 细胞功能^[25,26]。由于 PBC 是一种慢性炎症性疾病, 故预测 PBC 患者的 CD4⁺ 记忆性 T 细胞和 CD8⁺ 记忆性 T 细胞间的共有 CDR3 序列百分比高于健康者, 然而统计发现 PBC 组和健康对照组间该值无显著性差异, 可能原因是样本数较少或患者处于疾病早期。后续还需要进一步研究 CD4⁺ T 细胞和 CD8⁺ T 细胞间的协同作用在 PBC 疾病中的作用。CDR3 区域的氨基酸残基能与抗原接触, 识别不同抗原的 TCR β CDR3 分子具有不同的氨基酸组成。

分析CDR3区域氨基酸组成特征对疫苗的研发和TCR免疫治疗都具有重要意义。先前有研究发现序列长度为13的CDR3分子第6位和第7位氨基酸疏水性促进了自身反应性T细胞的产生^[27]。本研究系统全面地研究了PBC组和健康对照组中序列长度为13、14、15的CDR3分子的第6位和第7位氨基酸的组成频率以及疏水氨基酸的百分频率。发现绝大部分氨基酸的组成频率无显著差异,但也有少部分氨基酸(赖氨酸、天门冬氨酸、苯丙氨酸、苏氨酸、脯氨酸、天冬氨酸)在两组间呈现显著性差异。值得注意的是,本研究中PBC组和健康对照组间疏水氨基酸的百分比无显著差异。这与前人研究结果不一致^[27],这可能是研究对象来自不同种族及所研究的疾病种类差异等造成的。

此外,大量研究发现*E.coli*在触发PBC疾病过程中发挥重要作用,主要因为*E.coli* PDC-E2与人PDC-E2序列非常相似^[4]。宿主对细菌PDC-E2抗原的细胞免疫应答也会对自身PDC-E2抗原起作用。因此,*E.coli* PDC-E2与人PDC-E2间的分子模拟可能是导致自身免疫耐受丧失的关键因素。但目前为止,分子模拟机制在PBC疾病中的作用尚缺乏足够的理论依据。本研究通过细胞培养和免疫组库测序,鉴定了一系列既能响应人PDC-E2抗原又能响应*E.coli* PDC-E2抗原的TCR β CDR3序列,从T细胞受体角度阐明了人与*E.coli*的PDC-E2分子模拟机制。但本研究纳入的样本量较少,存在局限性,未来需在更大的患者样本中进行前瞻性多中心研究以进一步验证以上结果。总之,这些发现对PBC的发病机制、诊断和治疗等方面提供了理论依据。

参考文献

- [1] LLEOA A, LEUNG P S C, HIRSCHFELD G M, et al. The pathogenesis of primary biliary cholangitis: a comprehensive review[J]. Semin Liver Dis, 2020, 40(1): 34-48.
- [2] 唐爱群, 唐宇轩, 张德祥, 等. 胆汁淤积性肝病患儿脂溶性维生素水平分析[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版), 2021, 13(3): 48-55.
- [3] 刘晓, 刘亚平, 高学松, 等. 原发性胆汁性胆管炎合并血脂异常研究进展[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版), 2020, 12(3): 17-22.
- [4] HOU X, YANG Y, CHEN J, et al. TCR β repertoire of memory T cell reveals potential role for *Escherichia coli* in the pathogenesis of primary biliary cholangitis[J]. Liver Int, 2019, 39(5): 956-966.
- [5] BARTOLI A, GITTO S, SIGHINOLFI P, et al. Primary biliary cholangitis associated with SARS-CoV-2 infection[J]. J Hepatol, 2021, 74(5): 1245-1246.
- [6] GOUBRAN M, WANG W, INDIK S, et al. Isolation of a human betaretrovirus from patients with primary biliary cholangitis[J]. Viruses, 2022, 14(5): 886.
- [7] 张明月, 赵军, 谢欢, 等. 原发性胆汁性胆管炎免疫发病机制[J]. 中华肝脏病杂志, 2021, 29(6): 500-504.
- [8] GE S, XU Q, LI H, et al. Differential immune response to xenobiotic-modified self-molecule in simple and connective tissue disease-associated primary biliary cholangitis[J]. Liver Int, 2022, 42(10): 2204-2215.
- [9] HIMOTO T, YAMAMOTO S, MORIMOTO K, et al. Clinical impact of antibodies to Sp100 on a bacterial infection in patients with primary biliary cholangitis[J]. J Clin Lab Anal, 2021, 35(11): e24040.
- [10] SHIMODA S, NAKAMURA M, SHIGEMATSU H, et al. Mimicry peptides of human PDC-E2 163-176 peptide, the immunodominant T-cell epitope of primary biliary cirrhosis[J]. Hepatology, 2000, 31(6): 1212-1216.
- [11] 尹伟明, 孟伟伟, 卢小娟. 原发性胆汁性肝硬化患者外周血Th9细胞表达水平及其与肝功能和Mayo评分的相关性[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版), 2020, 12(2): 31-36.
- [12] YU K, LI P, XU T, et al. Decreased infiltration of CD4⁺ Th1 cells indicates a good response to ursodeoxycholic acid (UDCA) in primary biliary cholangitis[J]. Pathol Res Pract, 2021, 217: 153291.
- [13] PRIETO J, BANALES J M, MEDINA J F. Primary biliary cholangitis: pathogenic mechanisms[J]. Curr Opin Gastroenterol, 2021, 37(2): 91-98.
- [14] WANG P, JIN X, ZHOU W, et al. Comprehensive analysis of TCR repertoire in COVID-19 using single cell sequencing[J]. Genomics, 2021, 113(2): 456-462.
- [15] HOU X, ZENG P, ZHANG X, et al. Shorter TCR β -chains are highly enriched during thymic selection and antigen-driven selection[J]. Front Immunol, 2019, 10: 299.
- [16] YOU H, MA X, EFE C, et al. APASL clinical practice guidance: the diagnosis and management of patients with primary biliary cholangitis[J]. Hepatol Int, 2022, 16(1): 1-23.
- [17] MANNS M P, CZAIAA J, GORHAM J D, et al. Diagnosis and management of autoimmune hepatitis[J]. Hepatology, 2010, 51(6): 2193-2213.
- [18] BOLOTIN D A, SHUGAY M, MAMEDOV I Z, et al. MiTCR: software for T-cell receptor sequencing data analysis[J]. Nat Methods, 2013, 10(9): 813-814.
- [19] HOU X, WANG G, FAN W, et al. T-cell receptor repertoires as potential diagnostic markers for patients with COVID-19[J]. Int J Infect Dis, 2021, 113: 308-317.
- [20] WANG G, SUI W, XUE W, et al. Comprehensive analysis of B and T cell receptor repertoire in patients after kidney transplantation by high-throughput sequencing[J]. Clin Immunol, 2022, 245: 109162.
- [21] HOU X, CHEN W, ZHANG X, et al. Pre-selection TCR repertoire predicts CD4⁺ and CD8⁺ T cell differentiation state[J]. Immunology, 2020, 161(4): 354-363.
- [22] CAZZAGON N, FLOREANI A. Primary biliary cholangitis: treatment[J]. Curr Opin Gastroenterol, 2021, 37(2): 99-104.
- [23] NAKAGAWA R, MUROYAMA R, SAEKI C, et al. CD4⁺ T cells from patients with primary biliary cholangitis show T cell activation and differentially expressed T-cell receptor repertoires[J]. Hepatol Res, 2019, 49(6): 653-662.
- [24] HAN Y, BIAN Z H, YANG S Y, et al. Single-cell characterization of hepatic CD8⁺ T cells in a murine model of primary biliary cholangitis[J]. Front Immunol, 2022, 13: 860311.
- [25] KHAN S M, DESAI R, COXON A, et al. Impact of CD4 T cells on intratumoral CD8 T-cell exhaustion and responsiveness to PD-1 blockade therapy in mouse brain tumors[J]. J Immunother Cancer, 2022, 10(12): e005293.
- [26] LU Y J, BARREIRA-SILVA P, BOYCE S, et al. CD4 T cell help prevents CD8 T cell exhaustion and promotes control of Mycobacterium tuberculosis infection[J]. Cell Rep, 2021, 36(11): 109696.
- [27] STADINSKI B D, SHEKHAR K, GÓMEZ-TOURINO I, et al. Hydrophobic CDR3 residues promote the development of self-reactive T cells[J]. Nat Immunol, 2016, 17(8): 946-955.

收稿日期: 2023-02-17

刘珍玉, 张俊宁, 杨雪丽, 等. 高通量测序揭示原发性胆汁性胆管炎患者的T细胞受体图谱特征[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版), 2024, 16(1): 38-44.