

文章编号 1006-8147(2019)04-0391-05

论著

同卵双胞胎胆道闭锁患儿染色体核型和全外显子组测序分析

陈扬¹, 余晨², 熊希倩², 贾金富², 詹江华¹

(1.天津市儿童医院普通外科, 天津 300134; 2.天津医科大学研究生院, 天津 300070)

摘要 目的:以临床表型不同的同卵双胞胎胆道闭锁(BA)患儿为研究对象,分别进行染色体G显带核型分析和全外显子组测序,检测该组双胞胎是否存在染色体核型异常和差异基因型,初步探讨胆道闭锁发生的遗传学背景。方法:采集3对同卵双胞胎BA患儿外周静脉血作为实验样本,分别进行染色体G显带核型分析和全外显子组测序分析。结果:临床表型不同的同卵双胞胎BA患儿,其染色体G带核型分析结果均无异常,为46,XX或46,XY。全外显子组测序结果显示,未检测到该组同卵双胞胎BA患儿的任何差异基因型。结论:同卵双胞胎BA患儿具有不同的临床表型,其染色体G显带核型正常,提示胆道闭锁的发生与染色体异常无关;双胞胎全外显子组测序检测不存在差异基因型,提示胆道闭锁不是单纯的遗传性疾病,可能与遗传表型或外显率以及其他因素等有关。

关键词 胆道闭锁;双胞胎;染色体;全外显子

中图分类号 R726.5

文献标志码 A

The study of chromosome and whole exome sequencing of monozygotic twins with biliary atresia

CHEN Yang¹, YU Chen², XIONG Xi-qian², JIA Jin-fu², ZHAN Jiang-hua¹

(1. Department of General Surgery, Tianjin Children's Hospital, Tianjin 300134, China; 2. Graduate School, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract Objective: To analyze the chromosomal karyotypes and whole exome sequencing of monozygotic twins with biliary atresia(BA) discordant for clinical phenotypes, using chromosomal G-banding staining and Illumina sequencing methods. And to investigate the genetic backgrounds of biliary atresia by detecting chromosomal karyotype abnormalities and differential genotypes. **Methods:** By collecting the peripheral blood samples of three sets of monozygotic twins with BA, chromosome G-banding karyotype staining and whole exome sequencing methods were performed. **Results:** In our study, there were no abnormal chromosomal G-banding karyotypes detected in monozygotic twins with BA discordant for clinical phenotypes(46, XX or 46, XY). The results of whole exome sequencing also showed that no differential genotypes were detected in our study. **Conclusion:** The chromosomal G-banding karyotype of monozygotic twins with BA discordant for clinical phenotypes appears normal, suggesting that the occurrence of biliary atresia may not be related to the chromosomal aberrations; there is no differential genotype of the whole exome sequencing between monozygotic twins, which indicates that BA may not be a type of pure genetic disease, and genetic phenotype, penetrance and other factors may contribute to the occurrence of BA.

Key words biliary atresia; twins; chromosome; whole exome sequencing

胆道闭锁(biliary atresia, BA)是新生儿期严重的、外科梗阻性黄疸的常见原因之一,病因不清,认为可能与病毒感染、免疫损伤、遗传易感性以及环境因素等有关。近年,关于BA遗传学背景的研究有很多,主要通过全基因组多态性分析总结与BA发病相关的位点,包括ADD3、MIF、GPC1、ICAM-1、IL-8及VCAM1等^[1-4],但目前仍无确凿的证据证明某一基因改变与BA的发生有直接必然的关系。以双胞胎为研究对象,探讨环境因素和遗传因素在疾

病发病机制中作用的相关报道有很多,包括在Crohn's病、范德沃德氏综合征(Van der Woude Syndrome)及多发性硬化等疾病中均有报道。单胎发病的同卵双胞胎BA患儿,来自同一受精卵、相同的子宫内环境以及相似的生后环境,其患病情况不同。本实验以3对临床表型不同的同卵双胞胎BA患儿为研究对象,分别进行染色体G显带核型分析和全外显子组测序,检测该对双胞胎是否存在染色体核型异常和差异基因型,初步探讨胆道闭锁发生的遗传学背景。

1 资料与方法

1.1 研究对象 收集3对同卵双胞胎BA患儿临床资料,均为双胞胎之一患胆道闭锁,诊断依据术中

基金项目 国家自然科学基金资助项目(81570471);天津市卫生行业重点攻关项目(14KJ129)

作者简介 陈扬(1991-),女,硕士在读,研究方向:胆道闭锁的病因及诊疗;通信作者:詹江华,E-mail:zhanjianghuatj@163.com。

胆道造影及肝活检结果,采集双胎儿外周静脉血作为实验样本,分别进行染色体G显带核型分析和全外显子测序分析。本实验经天津市儿童医院伦理委员会审查并通过。

1.2 实验试剂与仪器 主要试剂:人血液样本DNA提取试剂盒,无酶水、无水乙醇、秋水仙素、75%甲醇、25%乙酸、0.2%胰酶消化液,均购自天根生化科技有限公司。姬姆萨染液,人体外周血淋巴细胞培养基,0.075 mol/L的氯化钾溶液,均购自北京博奥森生物科技有限公司。主要仪器:NanoDrop 2000 分光光度计(美国 Thermo 公司),恒温培养箱,恒温水浴锅(德国 IKA 公司),光学显微镜(Olympus)。

1.3 实验步骤

1.3.1 染色体G显带染色步骤 (1)取血:用肝素抗凝的采血管分别取双胞胎外周静脉血各4 mL;(2)接种、细胞培养:将外周血液标本接种于人体外周血淋巴细胞培养基中,随后置于CO₂、37℃恒温培养箱内培养72 h;(3)秋水仙素处理、低渗处理:加入10 μg 秋水仙素,继续培养2 h,离心10 min,再与KCl溶液混匀,37℃水浴20 min;(4)预固定、固定:在离心管中加入甲醇和乙酸固定液,静置10 min,离心,弃上清液,获得固定液,将固定液置于新的离心管中,37℃水浴10 min,离心,弃上清液;(5)制片、染色:将固定液置于新的离心管中,在载玻片上滴加2滴细胞悬液,烘干,取出玻片后先用胰酶消化,再用Giemsa染液染色;(6)显微镜下观察细胞分裂相,并进行染色体核型分析。

1.3.2 全外显子组测序实验步骤 (1)按照DNA提取试剂盒说明书提取血液样本总DNA;(2)用NanoDrop 2000 分光光度计对所提DNA样品浓度和纯度进行测定;(3)全外显子组测序,将提取合格的血液样本DNA送至测序公司进行测序和数据处理。包括①文库的建立;②IlluminaHiSeq 上机测序;③测序数据的处理;④目标基因在KEGG数据库中的注释。分析软件及数据筛选数据库:(1)原始数据定位软件-BWA(Burrows-Wheeler Aligner);(2)数据校准-Genome Analysis Toolkit 1.3-22-gbfe280;(3)SNP calling-SAMtools (Sequence Alignment/Map Tools);(4)dbSNP 数据库(version 135);(5)千人基因组(1 000 genome)数据库(version 1 000 g2012apr)。

2 结果

2.1 临床资料 Twin1,同卵双胎儿,女性,足月剖宫产,其中之一患胆道闭锁,另一双胎儿正常,患儿出生后3 d即出现黄疸,因黄疸持续未退于生后46 d来我院就诊,查体患儿皮肤及巩膜黄染,苍白

便,茶色尿。肝功能结果提示梗阻性黄疸。母亲乳汁病毒学检查CMV-DNA为8×10³个/mL,提示患儿可能有CMV病毒感染。腹部超声示:胆囊窝未见正常胆囊形态,仅见裂隙样囊性结构,约14 mm×3 mm,壁粗糙,较硬,未见明显粘膜线回声。胆总管未探及,第一肝门区可见局限性强回声区约12 mm×3.5 mm呈条索状,肝脾增大(图1)。术前未行肝活检。患儿生后49 d行开腹探查术,术中胆道造影和冰冻肝活检结果符合肝外胆道梗阻,行Kasai手术,术后3个月患儿黄疸完全消退,大小便恢复正常颜色,术后恢复良好。随访期间患儿共发生2次晚期胆管炎,入院治疗1周后好转出院。随访3年患儿未发生其他严重的并发症。

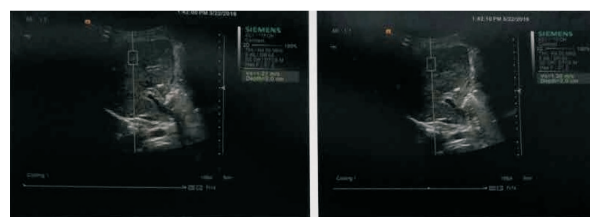


图1 彩色Doppler超声检查结果

Fig 1 The results of Color Doppler ultrasound

其余两对双胎皆为男性,同卵双胞胎,其中之一患胆道闭锁,另一双胎儿正常,两患儿分别于生后168 d和63 d行Kasai手术,术中胆道造影和肝活检结果符合肝外胆道梗阻诊断标准,于患儿术后2个月和3个月黄疸消退,随访期间未出现其他严重并发症,预后良好。

2.2 双胞胎染色体核型检查结果 本组3对同卵双胞胎BA患儿外周血染色体常规G显带核型分析结果显示,核型分别为46,XX或46,XY(图2),该组双胞胎的染色体核型均未见异常,未见伴发染色体数目或结构异常。

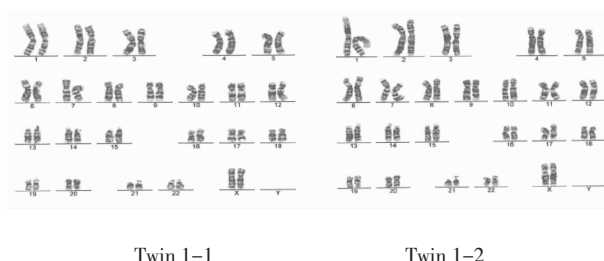


图2 双胞胎染色体核型检测结果

Fig 2 The results of twins karyotype test

2.3 双胞胎外显子测序结果

2.3.1 测序数据及覆盖度 本组同卵双胞胎的全外显子组测序质量较好,平均测序深度100×。将测序数据与相应数据库进行比对,并通过Annovar软

件对检测到的突变位点进行功能注释。BA 同卵双胞胎测序结果显示共检测出 10 个差异 SNP 位点,但通过测序验证分析以上 10 个差异位点在双胞胎中序列均一致,说明差异 SNP 位点是由检测错误造成的,本组单胎发病的 BA 同卵双胞胎不存在 SNP 差异型。另外双胞胎插入/缺失(InDel)和基因拷贝数(CNV)在双胞胎中均未检测到差异位点。

2.3.2 胆道闭锁同卵双胞胎的部分 SNP 位点 分析总结以往文献报道过的与胆道闭锁发生相关的部分 SNP 位点(表 1)。

表 1 双胞胎 BA 患儿部分 SNP 位点

Tab 1 Partial SNP loci in patients with twin BA

Chromosome	Gene	dbSNP147	Ref	Obs
10q24.2~q25.3	XPNPEP1	rs17095355	C	T
	ADD3	rs2501577	A	G
2q35	GPC1	rs35971355	G	A
	GPC1	rs2229458	C	T
	GPC1	rs6760745	G	A
	GPC1	rs2228331	A	G
6P21.2	VEGFA	rs3025039	C	T

2.3.3 突变基因在 KEGG 数据库中的整体分布情况 将全外显子测序获得的所有突变位点对到 KEGG 数据库中,结果显示大多数变异位点都集中在免疫系统、病毒感染以及信号转导等方面,说明在胆道闭锁发生过程中免疫损伤和信号转导等起重要作用(图 3)。

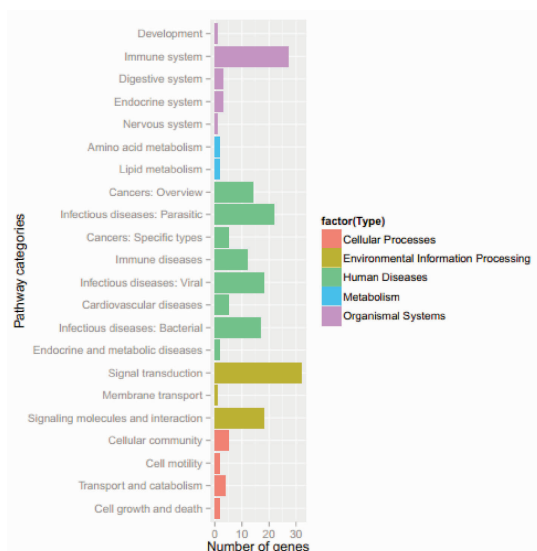


图 3 突变基因在 KEGG 数据库中的分布情况

Fig 3 Distribution of mutant genes in the KEGG database

3 讨论

3.1 同卵双胞胎 BA 患儿临床特点分析 研究普遍认为,术时年龄小于 60 d 的 BA 患儿,会获得较好的预后^[5-6]。kasai 术时年龄越早,其肝细胞受损程

度、炎症细胞浸润以及肝纤维化程度越轻,患儿自体肝生存时间越长。Shinkai 等^[7]的数据结果显示,kasai 术时年龄 ≤ 70 d 的患儿与术时年龄 >70 d 相比,前组 20 年自体肝存活率明显高于后组,分别为 50.88% 和 28.57%。本组 BA 患儿分别于生后 49 d、63 d 和 168 d 行 kasai 手术,术时肝纤维化程度较轻,术后胆汁引流通畅,黄疸消退较快,自体肝生存至今,预后较好。

成功的 kasai 术后肝内胆汁引流通畅,黄疸多在 6 个月内逐渐消退^[8]。Wildhaber 等^[9]通过比较 kasai 术后黄疸消退组与未消退组患儿自体肝生存情况,结果显示前组患儿 2 年、5 年自体肝存活率明显高于后者,分别为 60% vs 4.8% 和 60% vs 0。本组 BA 双胞胎术后黄疸消退较快,3 个月内黄疸完全消退,大、小便颜色恢复正常,随访至今肝功能指标和肝脏纤维化特异性指标多在正常范围内波动,患儿状况良好。

3.2 同卵双胞胎 BA 患儿染色体核型分析 人类的染色体是遗传物质的载体,也是细胞遗传学的主要研究对象。染色体核型异常包括数目异常和结构异常。同卵双胞胎虽由同一个受精卵分裂、分化发育而来,但在发育成单独个体的过程中,可发生染色体的异常而致病。染色体异常的患者可表现为智力低下、生长发育迟缓、特殊体征以及发育异常等临床特点。

文献报道 2 对同卵双胞胎同患急性淋巴细胞性白血病,但染色体核型不同,其中一对双胞胎 G 显带染色体核型分别为 46,XX 和 46,XX,t(4;11)(a21;q23);另一对染色体核型分析结果为 46,XY,-4,+10,-13,del(14)(q24),-15,+2mar/46,XY 和 46XY^[10]。学者认为宫内单克隆起源假说以及胎盘内转移机制是同卵双胞胎同时患病的主要原因,但不能除外不同克隆起源的可能,而且表观遗传学在疾病发展中可能还发挥着一定的作用,影响个体细胞遗传学和分子生物学特性。Chang 等^[11]的研究中,一对同卵双胞胎儿其中之一患 21 三体综合征,其染色体核型为 47,XY+21;另一双胞胎为 46,XY,染色体核型正常,且未出现任何临床症状,认为同卵双胞胎出现不一致的染色体核型的原因,可能是前卵裂体开始时,母体 21 号染色体减数分裂未分离导致的,双胎之一保持 21 三体,并且另一个双胎体在胚胎形成之前即在桑葚胚或早期囊胚期进行三体性拯救,使胎盘呈 21 三体嵌合体,胎儿为正常染色体组成。

回顾胆道闭锁双胎文献,同卵双胞胎单胎发病和双胎都患病的病例均有报道,但单胎发病的情况

更多见,通过检索文献未发现关于 BA 患儿染色体核型分析的研究,本实验通过对同卵双胞胎外周血进行染色体 G 带核型分析,结果显示双胎儿核型为 46,XX 或 46,XY,未发现染色体核型异常,初步说明同卵双胞胎 BA 患儿出现不同临床表型可能与染色体异常无关。

3.3 同卵双胞胎 BA 患儿全外显子组测序分析 外显子组测序是目前用于鉴别遗传性疾病新发致病基因的重要研究工具。通过检索文献发现,本实验是目前首次以同卵双胞胎 BA 患儿为研究对象,进行全外显子组测序,试图找到胆道闭锁遗传学病因的研究。在 3 对双胞胎中共检测到 10 个差异 SNP 位点。差异 SNP 位点表现为该位点在双胞胎之一是杂合子,在另一个双胞胎是纯合子,或者该位点在双胞胎中均为纯合子,但是具有不同的核苷酸。这些差异 SNP 位点通过测序实验进行验证,结果发现以上所有的差异 SNP 碱基序列在双胞胎中均一致,说明以上 10 个差异 SNP 位点是由检测错误造成的,该组同卵双胞胎之间所有 SNP 位点均一致。同时分析测序结果中的插入、缺失(Indel)以及基因拷贝数变异(CNV)情况,未检测到以上各类型的差异基因型。本组 BA 同卵双胞胎,虽单胎发病,出现不同的临床表型,但双胎儿之间不存在任何差异基因型,提示 BA 发生可能不是单纯的遗传性疾病,可能与外显率或遗传表现修饰如 DNA 甲基化有关,有待下一步研究证实。

3.4 同卵双胞胎 BA 患儿相关 SNP 位点分析 目前关于胆道闭锁遗传学病因的研究有很多,主要通过二代测序技术总结与胆道闭锁相关的突变位点,但目前为止尚未发现与 BA 发生直接相关的基因突变。目前认为与 BA 发生相关性较强的有 ADD3、GPC1 和 VEGFA 基因等。

ADD3 基因编码内收蛋白-3,它在消化道、肝组织以及胆管上皮细胞的细胞连接处表达,主要参与细胞骨架的组装、细胞迁移和收缩。学者 Cheng 等^[12]通过基因芯片技术在 339 例 BA 组和 401 例正常对照组研究发现,在 10q24.2 的启动子和增强子区的 SNP 位点 rs17095355 可通过调控 ADD3 基因在肝组织的表达水平影响胆道系统的发育和相应生物学功能。Tsai 等^[3]对高加索人 171 例 BA 患儿和 1630 例正常儿的 ADD3 基因进行筛查,研究发现 ADD3 基因上的 rs7099604 与胆道闭锁发生密切相关,且 ADD3 基因在 BA 患儿肝组织特异表达。

GPC1 基因位于 2q37.3 上,主要编码磷脂酰肌醇蛋白聚糖 1,可通过糖基-磷脂酰肌醇键连接到细

胞膜上,在细胞之间发挥信号转导的作用,主要介导炎症发生和通过 Hedgehog 信号通路、Wnt 信号通路以及成纤维细胞生长因子调控细胞间信号传导。学者 Leyva-Vega^[2]通过对 30 例 BA 患儿进行全基因组多态性分析,数据结果显示有 2 例 BA 患儿的 2q37.3 区域存在正常基因拷贝数片段的异常缺失。Cui 等^[14]利用全基因组相关性分析方法对位于 2q37.3 的 GPC1 进行相关 SNP 位点和 CNV 变异分析比较,观察到在 BA 患儿组中 GPC1 基因有明显的拷贝数缺失,并利用斑马鱼对 GPC1 基因进行功能验证,发现在敲除 GPC1 基因的斑马鱼中,该片段缺失后,斑马鱼幼体在短期内就出现了胆道发育缺陷。

VEGFA 基因位于 6p12,编码肝素结合蛋白,作为血管生成调节剂和炎症反应介质,越来越多的证据表明 VEGFA 可能在 BA 的发病机制中发挥作用^[15-16]。2010 年学者 Lee 等^[17]通过基因芯片技术,探究位于 VEGFA 基因上的 SNP 位点 rs3025039 与台湾人的患 BA 的关系,结果证实该 SNP 位点可使患胆道闭锁的风险增加。最近的一项研究对 1336 名西北汉族中国人进行 VEGFA 基因分型,包括 311 名 BA 患者和 1025 名健康对照样本,结果发现 SNP 位点 rs3025039 与 BA 风险相关性较强,rs3025039 的 CC 基因型比其他两种基因型的发病率高,表明 C 等位基因是一个患胆道闭锁的风险等位基因^[18]。

尽管目前关于 BA 基因学的研究有很多,以双胎或家族性 BA 病例为研究背景的研究尚未见报道,可能由于 BA 本身的发病率较低,而且双胞胎 BA 或家族性 BA 发病病例更为罕见。本组 BA 双胎儿虽存在以往文献报道的部分 SNP 位点,但双胎儿之间基因型完全相同,提示单个或几个核苷酸变异尚不足以致病。

3.5 突变基因在 KEGG 数据库中的整体分布情况分析 目前普遍认为 BA 发生是由遗传、炎症、免疫损伤、感染及其他环境条件等诸多因素共同作用的结果。从 KEGG 通路图可以看出,免疫损伤、病毒感染以及信号转导在胆道闭锁发生过程中起重要作用。

Treg 细胞通过产生调节性细胞因子、接触抑制及竞争作用等发挥免疫抑制作用,在自身免疫性疾病和感染性疾病中扮演着重要的角色,Th17 细胞则起促进炎症反应的作用,可通过自身细胞增殖干扰 Treg 细胞发挥免疫抑制功能,阻断 Treg 细胞的抗炎反应能力。以往研究发现,BA 患儿外周血中 Th17 细胞数量明显增加,而 Treg 细胞数量显著减少,随着疾病进展,Treg/Th17 比值呈降低趋势^[19]。另外,Treg 细胞和 Th17 细胞之间平衡的紊乱还见于

自身免疫性硬化性胆管炎、原发性胆汁性肝硬化等,说明 Treg/Th17 细胞比率降低引起的免疫炎症性紊乱参与了 BA 发生发展过程。

本实验以同卵双胞胎 BA 患儿为研究对象,试图通过染色体核型分析和全外显子方法初步分析胆道闭锁发生的遗传学背景,但限于目前实验所获取的双胎儿血液样本数量较少,难以得出具有统计学意义的结果,有待于继续收集实验样本,进一步深入研究。

综上,本组中双胞胎胆道闭锁患儿均为单胎发病,即双胎之一患胆道闭锁,另一双胎儿出生正常,且随访期间未出现与黄疸相关疾病或伴发其他先天畸形。临床表型不同的同卵双胞胎 BA 患儿,其染色体核型无异常,提示胆道闭锁发生可能与染色体异常无关;双胎儿全外显子组测序结果未发现异常基因型,提示胆道闭锁发生可能不是单纯的遗传性疾病,可能在一定的遗传学背景下,外在的某些环境因素如病毒感染、毒素、免疫损伤等触发胆道闭锁发生。

参考文献:

- [1] Wang J, Wang W, Dong R, et al. Gene expression profiling of extra-hepatic ducts in children with biliary atresia[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(4):5186
- [2] Leyva-Vega M, Gerfen J, Thiel B D, et al. Genomic alterations in biliary atresia suggest region of potential disease susceptibility in 2q37.3[J]. *Am J Med Gene A*, 2010, 152(4):886
- [3] Arikan C, Berdeli A, Ozgenc F, et al. Positive association of macrophage migration inhibitory factor gene-173G/C polymorphism with biliary atresia[J]. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2006, 42(1):77
- [4] Bessho K, Mourya R, Shivakumar P, et al. Gene expression signature for biliary atresia and a role for interleukin-8 in pathogenesis of experimental disease[J]. *Hepatology*, 2014, 60(1):211
- [5] Goda T, Kawahara H, Kubota A, et al. The most reliable early predictors of outcome in patients with biliary atresia after Kasai's operation[J]. *J Pediatr Surg*, 2013, 48(12):2373
- [6] Davenport M, Caponcelli E, Livesey E, et al. Surgical outcome in biliary atresia - Etiology affects the influence of age at surgery[J]. *Ann Surg*, 2008, 247(4):694
- [7] Shinkai M, Ohhama Y, Take H, et al. Long-term outcome of children with biliary atresia who were not transplanted after the Kasai operation: >20-year experience at a children's hospital[J]. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2009, 48(4):443
- [8] Koga H, Wada M, Nakamura H, et al. Factors influencing jaundice-free survival with the native liver in post-portoenterostomy biliary atresia patients: Results from a single institution[J]. *J Pediatr Surg*, 2013, 48(12):2368
- [9] Wildhaber B E, Majno P, Mayr J, et al. Biliary atresia: Swiss National study, 1994-2004 [J]. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2008, 46(3):299
- [10] 李雪, 孙念政, 张红, 等. 两对同卵双胞胎同患急性淋巴细胞性白血病[J]. *中华儿科杂志*, 2014, 52(1):60
- [11] Chang Y L, Yi W P, Chao A S, et al. Monozygotic twins discordant for trisomy 21: Discussion of etiological events involved[J]. *Taiwan J Obstet Gynecol*, 2017, 56(5):681
- [12] Cheng G, Tang C S, Wong E H, et al. Common genetic variants regulating ADD3 gene expression alter biliary atresia risk[J]. *J Hepatol*, 2013, 59(6):1285
- [13] Tsai E A, Grochowski C M, Loomes K M, et al. Replication of a GWAS signal in a Caucasian population implicates ADD3 in susceptibility to biliary atresia[J]. *Hum Genet*, 2014, 133(2):235
- [14] Cui S, Leyva-Vega M, Tsai E A, et al. Evidence from human and zebrafish that GPC1 is a biliary atresia susceptibility gene [J]. *Gastroenterology*, 2013, 144(5):1107
- [15] Simons M, Gordon E, Claesson-Welsh L. Mechanisms and regulation of endothelial VEGF receptor signalling[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2016, 17(10):611
- [16] Yang L, Kwon J, Popov Y, et al. Vascular endothelial growth factor promotes fibrosis resolution and repair in mice[J]. *Gastroenterology*, 2014, 146(5):1339
- [17] Lee H C, Chang T Y, Yeung C Y, et al. Genetic variation in the vascular endothelial growth factor gene is associated with biliary atresia[J]. *J Clin Gastroenterol*, 2010, 44(2):135
- [18] Liu B L, Wei J L, Li M, et al. Association of common genetic variants in VEGFA with biliary atresia susceptibility in Northwestern Han Chinese[J]. *Gene*, 2017, 628:87
- [19] Brindley S M, Lanham A M, Karrer F M, et al. Cytomegalovirus-specific T-cell reactivity in biliary atresia at the time of diagnosis is associated with deficits in regulatory T cells [J]. *Hepatology*, 2012, 55(4):1130

(2018-08-27 收稿)