

系统性红斑狼疮患者 CD4⁺CD25⁺调节性 T 淋巴细胞临床研究

陈建英¹, 王 玲² (1. 湖南省马王堆医院肾病风湿免疫科, 长沙 410016; 2. 广东省第二人民医院, 广州 510317)

【摘要】 目的 探讨并分析系统性红斑狼疮(SLE)患者外周血 CD4⁺CD25⁺调节性 T 淋巴细胞(Tregs)及叉状头转录因子水平(Foxp3),以阐述其临床意义。**方法** 流式细胞术检测 34 例 SLE 初诊、20 例复发和 35 例治疗后患者外周血 CD4⁺CD25⁺Tregs 及 Foxp3 占 CD4⁺T 淋巴细胞的百分率,并以 39 例健康体检者作为健康对照组。**结果** SLE 初诊患者外周血 CD4⁺CD25⁺Tregs 及 Foxp3 占 CD4⁺T 淋巴细胞的百分率显著低于复发、治疗后及健康对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$);活动期亦显著低于非活动期($P < 0.05$),与红细胞沉降率、球蛋白、补体(C₃、C₄)、IgG 有相关性。**结论** CD4⁺CD25⁺Tregs 及 Foxp3 的改变可能是导致 SLE 发生和病情发展的关键。

【关键词】 系统性红斑狼疮; 调节性 T 淋巴细胞; CD4⁺CD25⁺; Foxp3

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2012.08.017 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2012)08-0931-03

Clinical study of CD4⁺CD25⁺ Tregs in peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus CHEN Jianying¹, WANG Ling² (1. Department of Nephrology, Rheumatology and Immunology, Ma Wang Dui Hospital, Changsha, Hunan 410016, China; 2. Guangdong Provincial Second People's Hospital, Guangzhou, Guangdong 510317, China)

【Abstract】 Objective To investigate the expression of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells(Tregs) and Foxp3⁺ in the peripheral blood in the patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and to elaborate its significance. **Methods** 34 cases of preliminarily diagnosed SLE, 20 cases of SLE relapse, 35 cases of post-treatment SLE and 39 healthy individuals were detected the expression of CD4⁺CD25⁺ Tregs and Foxp3⁺ in peripheral blood by flow cytometry (FCM). **Results** The expression of CD4⁺CD25⁺ Tregs and Foxp3⁺ in peripheral blood in the cases of preliminarily diagnosed SLE was significantly lower than that in other three groups with statistical difference ($P < 0.05$), which in active stage was significantly lower than that in non active stage ($P < 0.01$). The correlation was found between the levels of CD4⁺CD25⁺ Tregs with other serological parameters including ESR, Glb, C₃, C₄ and IgG. **Conclusion** The change of CD4⁺CD25⁺ Tregs and Foxp3⁺ may a key leading to occurrence and progression of SLE.

【Key words】 systemic lupus erythematosus; regulatory T cells; CD4⁺CD25⁺; Foxp3⁺

系统性红斑狼疮(SLE)是自身免疫病的原型,迄今已有很多研究报道了 CD4⁺CD25⁺调节性 T 淋巴细胞(Tregs)数量减少及(或)功能缺陷在 SLE 发病机制上可能起了重要的作用^[1-4]。同时越来越多的研究也发现 CD4⁺CD25⁺Tregs 在类风湿性关节炎(RA)、I 型糖尿病(T1D)等其他自身免疫性疾病发病机制中的作用^[5]。CD4⁺CD25⁺T 淋巴细胞数量和(或)功能的改变可能是导致自身免疫性疾病的关键。但有关 CD4⁺CD25⁺T 淋巴细胞在 SLE 初诊、复发、治疗后患者及健康对照组体内阳性百分率对比,及其与红细胞沉降率(ESR)、血清球蛋白(Glb)、补体 C₃、补体 C₄、免疫球蛋白 IgG 的相关性,国内报道仍比较少。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2010 年 5 月至 2011 年 5 月广东省第二人民医院 SLE 初诊患者 34 例,其中女 30 例,男 4 例,平均年龄(33.06±14.71)岁;复发 20 例,其中女 17 例,男 3 例,平均年龄(32.20±16.50)岁;治疗后患者 35 例,其中女 31 例,男 4 例,平均年龄(26.66±14.80)岁。所有 SLE 患者均符合 1982 年美国风湿病协会(ACR)制定的 SLE 诊断标准,患者的临床特征主要包括狼疮肾病、发热、神经精神狼疮、心包炎、浆膜炎、肺炎、肺部感染(细菌、真菌)、低蛋白血症、血小板减少、粒细胞减少/缺乏甚至三系细胞低下,经激素及细胞毒药物治疗后并发高血压、糖尿病、高脂血症、病毒感染(常见带状疱疹)、高尿酸血症、弥散性血管内凝血、心衰等。为进一步研究所测指标与疾病活动性的关系,把初诊患者分为活动期 20 例,非活动期 14 例[SLE 病情活动程度的评价根据美国 SLE 疾病活动指数评分(SLEDAI-Score),SLEDAI-Score≥10 为活动期,SLEDAI-Score<10 为非活动期]^[6],以 39 例年龄和性别匹配的广东省

第二人民医院同期健康体检者作为健康对照组。

1.2 试剂 流式抗体、FITC-IL-2R(CD25)和 PE-Cy5-CD4、PE-抗人 Foxp3 mAb、溶血素购自美国 BD 公司;流式细胞仪(Coulter Epics ELITE Esp)购自美国贝克曼公司。

1.3 检测方法 CD4⁺CD25⁺Tregs 及 Foxp3 水平的百分率用流式细胞仪检测,具体操作步骤严格按照 BD 公司试剂盒的说明书,以 CD4⁺CD25⁺细胞群平均荧光强度(MFI)为基准,其中平均荧光强度为 CD4⁺CD25⁺细胞群 MFI 2 倍的亚型细胞群定义为 CD4⁺CD25^{hi}T 淋巴细胞,ESR、Glb、C₃、C₄、IgG 用日立生化分析仪测定。

1.4 统计学处理 应用 SPSS13.0 统计软件分析,主要统计指标行正态分布及方差齐性检验,各统计指标以 $\bar{x} \pm s$ 表示,符合正态分布及方差齐性用 t 检验或 One-way ANOVA 分析,不符合正态分布及方差齐性,多组均数间的比较应用 Kruskal-Wallis H 检验,两两比较采用 Mann-Whitney U 检验,相关性分析采用双变量 Bivariate Correlations 分析、直线回归和多元线性逐步回归分析法。检验水准 $\alpha = 0.05$ (双侧)。

2 结果

2.1 各患者组与健康对照组 CD4⁺CD25⁺Tregs 及 Foxp3 水平比较 SLE 初诊组 CD4⁺CD25⁺、CD4⁺CD25^{hi}、CD4⁺CD25^{lo}Foxp3、CD4⁺CD25^{hi}Foxp3 水平明显低于复发组、治疗后组及健康对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。与健康对照组相比,初诊组的 CD4⁺CD25^{hi}、CD4⁺CD25^{lo}Foxp3 + Tregs 比值明显降低($P < 0.05$),复发组与健康对照组比较 CD4⁺CD25⁺、CD4⁺CD25^{hi}Foxp3、CD4⁺CD25^{lo}Foxp3 差异有统计学意义($P < 0.05$),治疗后组与健康对照组比较差异无统计学意义。见表 1、图 1。

2.2 活动性与非活动性 SLE 初诊患者 CD4⁺CD25⁺Tregs 及 Foxp3 水平 对 34 例 SLE 初诊患者研究结果显示活动期 SLE 患者 CD4⁺CD25⁺Tregs 比值升高,但差异无统计学意义($P >$

0.05),绝对数较非活动期均明显减少,除 CD4⁺CD25^{hi}Foxp3⁺ 细胞差异无统计学意义,其余均显著减少($P < 0.05$),活动期与非活动期 CD4⁺CD25⁺Tregs 亚型绝对值比较,见图 2。

表 1 外周血 CD4⁺CD25⁺T 淋巴细胞占 CD4⁺T 淋巴细胞百分率($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	CD4 ⁺ CD25 ⁺	CD4 ⁺ CD25 ^{hi}	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3	CD4 ⁺ CD25 ^{hi} Foxp3
初诊组	21.364 1±13.022 3	1.375 9±1.462 0	3.576 2±3.213 0	0.578 5±0.582 9
复发组	42.943 0±22.014 2	9.199 5±7.101 4	15.481 0±17.869 2	3.253 0±4.660 8
治疗后组	33.920 3±12.012 9	7.918 9±4.683 0	7.842 0±4.673 1	1.932 9±1.010 3
健康对照组	27.756 7±9.112 5	8.496 7±2.873 5	3.925 6±1.278 2	1.151 8±0.523 6

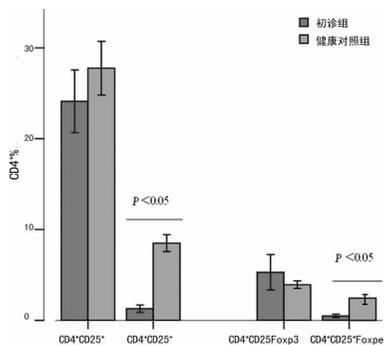


图 1 初诊未治患者与健康对照组 Tregs 亚型百分值的比较

2.3 CD4⁺CD25⁺Tregs 及 foxp3 与 SLEDAI 的相关性 34 例 SLE 初诊患者研究结果显示,CD4⁺CD25⁺占 CD4⁺T 淋巴细胞百分率与 SLEDAI 呈负相关,差异有统计学意义(r 值为 $-0.448, P < 0.01$),CD4⁺CD25^{hi}、CD4⁺CD25⁺Foxp3、CD4⁺CD25^{hi}Foxp3 与 SLEDAI 无显著相关性。

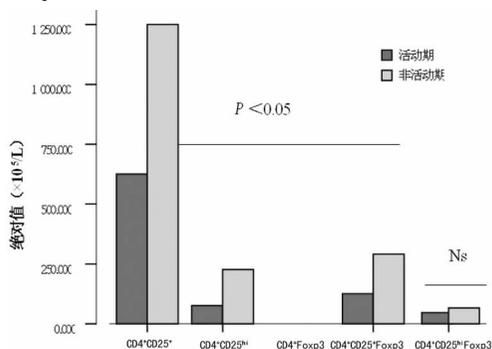


图 2 活动期与非活动期 Tregs 亚型绝对值比较

2.4 CD4⁺CD25⁺Tregs 及其 Foxp3 与 Glb、IgG、ESR、C₃、C₄ 的相关性 研究结果提示,初诊患者 CD4⁺CD25⁺T 淋巴细胞阳性百分率与 ESR、Glb 呈显著负相关,结果差异有统计学意义, r 值分别为 $-0.579, -0.579, P$ 值分别为 $0.000, 0.032$,与 C₄ 呈显著正相关($r = 0.538, P < 0.01$),CD4⁺CD25^{hi} 阳性百分率与 IgG 呈正相关($r = 0.676, P < 0.01$),CD4⁺CD25⁺Foxp3 与 IgG 呈负相关($r = -0.489, P < 0.01$)。

3 讨论

自身免疫病发生机制主要是自身免疫耐受破坏,自身反应性/效应性淋巴细胞逃避阴性选择,针对相应自身抗原产生免疫应答,使免疫稳态失衡。Tregs 亚群很多,有 Th3、Tr1、CD8Tregs、NK Tregs 等,T 淋巴细胞亚群的失衡常常是自身免疫病发生的诱因^[7-8]。本研究结果显示,初诊 SLE 患者外周血 CD4⁺CD25⁺Tregs 及 Foxp3 水平显著低于复发、治疗后及健康对照组($P < 0.01$),可能是初诊患者 CD4⁺CD25⁺Treg 分化发育障碍,泼尼松和环磷酰胺治疗后,其占 CD4⁺T 淋巴细胞比率显著上升^[9]。复发组和治疗后组 SLE 患者 CD4⁺CD25⁺Tregs 及 Foxp3 水平明显增高,Foxp3 表达水平增高的

原因一是功能性补偿,初诊患者 CD4⁺CD25⁺Tregs 及 Foxp3 水平降低或功能缺陷,为重新获得免疫抑制功能,Foxp3 表达增强,二是与应用甾体类激素有关,Foxp3 表达水平增高提示这种治疗有效^[1]。复发组与治疗组 CD4⁺CD25⁺Foxp3 水平比较差异有统计学意义($P < 0.05$),复发组显著高于治疗后,提示(1)可能存在 Foxp3 异位表达,使自身效应性 T 淋巴细胞获得天然 Tregs 的表型和功能,体内免疫稳态被破坏^[10]; (2)是否存在 Foxp3 基因突变,Foxp3 是 Tregs 细胞发育成熟和功能维持的关键性因子,是 CD4⁺CD25⁺Tregs 细胞特异性标志。Ziegler^[11]认为 Foxp3 并不是 Tregs 所特有,CD4⁺T 淋巴细胞活化后也可被诱导表达 Foxp3,活化后的 CD4⁺T 淋巴细胞低反应性,从而下调 T 淋巴细胞受体介导的免疫应答,免疫稳态失衡导致了病情的复发。复发组 CD4⁺CD25⁺T 淋巴细胞及 Foxp3 水平水平显著高于其他组,提示 SLE 发病,(1)并非 Tregs 本质上的缺陷,可能是患者体内抗原提呈细胞(APCs)不能有效地激活 CD4⁺CD25⁺Tregs,是 APCs 缺乏激活的能力^[12]。(2)CD4⁺CD25⁺Tregs 自发性凋亡进行性增高或凋亡敏感性增强;高水平的凋亡可能是降低 CD4⁺CD25⁺Tregs 免疫活性的诱因,凋亡水平与它们的免疫抑制功能相关性需要进一步研究^[13]。活跃期 SLE 初诊患者 CD4⁺CD25⁺数量显著减少,与 SLEDAI 呈负相关,这与国外很多研究结果一致^[5]。然而有研究发现,SLE 初诊患者(活动期和非活动期)、类风湿关节炎与健康对照组外周血 CD4⁺CD25⁺Treg 差异无统计学意义,SLE 病情活动性与 Tregs 绝对数占 CD4⁺T 淋巴细胞百分比、Foxp3 表达水平无显著相关性,与 Tregs 免疫活性呈负相关^[8]。活跃期 SLE 患者 CD4⁺CD25⁺Tregs 免疫抑制活性显著降低,是自身效应性 T 淋巴细胞对 Tregs 作用敏感性降低所致。对于常规免疫抑制治疗无效的难治性狼疮性肾炎,应用单克隆抗体(如利妥昔单抗治疗)治疗后,患者的肾脏病变逐渐好转,尿蛋白明显减少,疾病活动性明显下降。Vigna-Perez 和 Hernández-Castro^[14]认为利妥昔单抗治疗 SLE 患者是通过增强效应性 CD4⁺CD25⁺T 淋巴细胞对调节信号的敏感性而达到治疗效果。Valencia 和 Yarbora^[3]进一步研究发现活跃期 SLE 患者 CD4⁺CD25⁺Tregs 细胞免疫活性降低是可逆的,其抑制效应性 T 淋巴细胞的增殖和细胞因子分泌的免疫活性明显降低,与 Foxp3 表达水平降低相关联,通过药物治疗使 Foxp3 表达水平升高后,其免疫抑制活性可以恢复,这与本研究结论相符。

Liu 等^[15]发现,原发性干燥综合征患者 CD4⁺CD25^{hi}绝对数、占外周血的百分数、占 CD4⁺T 淋巴细胞百分率明显下降,与 CRP、RF、ESR、IgG 负关联。本研究结果显示,CD4⁺CD25⁺T 淋巴细胞阳性百分率与 ESR、GLB 呈显著负相关,与 C₄ 呈显著正相关,CD4⁺CD25^{hi}与 IgG 呈正相关,CD4⁺CD25⁺Foxp3 与 IgG 呈负相关。C₃、C₄ 是 SLE 活动性指标之一,且 C₄ 是 SLE 易感性的表现,IgG 是再次体液免疫应答产生的主要免疫球蛋白,某些自身抗体如 SLE 患者体内的抗核抗体属于 IgG,CD4⁺CD25⁺Tregs 及 Foxp3 水平与 ESR、Glb、C₄、IgG 的相关性更验证了 Tregs 在自身免疫病的关键作用,目前国内

外在这方面的报道较少,彼此之间怎样相互影响尚需进一步深入研究。

本研究结果显示,实时监测 SLE 患者 CD4⁺ CD25⁺ T 淋巴细胞及 Foxp3 表达水平有望成为预测病情活动性、疗效及预后的免疫学指标。然而临床实践中,治疗药物对 Tregs 具体的作用机制尚不清楚,体内用什么样的药物能更好地提升该细胞免疫活性,如何维持该细胞在体内的抑制活性以达到治疗目的,期待这些问题得到更深入的研究。

参考文献

[1] van Amelsfort JM, van Roon JA, Noordegraaf M. Proinflammatory mediator-induced reversal of CD4⁺, CD25⁺ regulatory T cell-mediated suppression in rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Rheum, 2007, 56(3): 732-742.

[2] Lee JH, Wang LC, Lin YT, et al. Inverse correlation between CD4⁺ regulatory T-cell population and autoantibody levels in paediatric patients with systemic lupus erythematosus[J]. Immunology, 2006, 117(2): 280-286.

[3] Valencia X, Yarboro C. Deficient CD4⁺ CD25^{high} T regulatory cell function in patients with active systemic lupus erythematosus[J]. J Immunol, 2007, 178(4): 2579-2588.

[4] Alvarado-Sánchez B, Hernández-Castro B, Portales-Pérez D, et al. Regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus[J]. J Autoimmun, 2006, 27(2): 110-118.

[5] Brode S, Raine T, Zaccane P. Cyclophosphamide-induced type-1 diabetes in the NOD mouse is associated with a reduction of CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells[J]. J Immunol, 2006, 177(10): 6603-6612.

[6] Guzmán J, Cardiel MH, Arce-Salinas A, et al. Measurement of disease activity in systemic lupus erythematosus. Prospective validation of 3 clinical indices[J]. J Rheumatol, 1992, 19(10): 1551-1558.

[7] 吴伟全, 孙炎华, 邱少玲. AIHA 患者外周血 Th1/Th2、Tc1/Tc2 亚群的研究及意义[J]. 实用医技杂志, 2006, 13(7): 1044-1046.

[8] 肖红, 刘仿, 伍昌林. 特发性血小板减少性紫癜患儿外周血 T 细胞亚型的分析[J]. 中国实验血液学杂志, 2006, 14(8): 722-725.

[9] Nasonov EL, Bykovskaia SN. The role of regulatory T-cells in autoimmune rheumatic diseases[J]. Vestn Ross Akad Med Nauk, 2006, (9/10): 74-82.

[10] Le NT, Chao N. Regulating regulatory T cells[J]. Bone Marrow Transplant, 2007, 39(1): 1-9.

[11] Ziegler SF. FOXP3: not just for regulatory T cells anymore[J]. Eur J Immunol, 2007, 37(1): 21-23.

[12] Alard P, Manirarora JN, Parnell SA, et al. Deficiency in NOD antigen-presenting cell function may be responsible for suboptimal CD4⁺ CD25⁺ T-cell-mediated regulation and type 1 diabetes development in NOD mice[J]. Diabetes, 2006, 55(7): 2098-2105.

[13] Glisic-Milosavljevic S, Waukau J, Jailwala P, et al. At-Risk and Recent-Onset Type 1 Diabetic Subjects Have Increased Apoptosis in the CD4⁺ CD25⁺ high T-Cell Fraction[J]. PLoS One, 2007, 2(1): 1-7.

[14] Vigna-Perez M, Hernández-Castro B. Clinical and immunological effects of Rituximab in patients with lupus nephritis refractory to conventional therapy: a pilot study [J]. Arthritis Res Ther, 2006, 8(3): 83.

[15] Liu MF, Lin LH, Weng CT, et al. Decreased CD4⁺ CD25⁺ bright T cells in peripheral blood of patients with primary Sjogren's syndrome[J]. Lupus, 2008, 17(1): 34-39.

(收稿日期: 2011-11-22)

(上接第 930 页)

异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 1。疗效评价: 无疼痛 22 例, 轻度疼痛 27 例, 中度疼痛 5 例 (差为有效), 优良率达 90.74%, 止痛总有效率 (显效 + 有效) 和缓解率均为 100%。

表 1 患者疼痛程度 VAS 评分 ($\bar{x} \pm s$)

时间	最痛	平均疼痛	就诊时
治疗前	5.45 ± 1.61	4.81 ± 1.27	4.56 ± 0.90
治疗后	5.09 ± 1.36	4.09 ± 1.49	3.89 ± 1.26
t 值	2.006	2.270	2.630
P 值	>0.05	<0.05	<0.05

3 讨 论

胰腺癌为消化道常见恶性肿瘤, 具有发现晚、病程短、转移早、预后极差等特点, 80% 的患者确诊时已是晚期, 局部进展期和伴转移的胰腺癌患者中位生存时间分别为 6~10 个月和 3~6 个月^[2-3]。剧烈腹痛是晚期胰腺癌患者的主要临床症状。疼痛是对刺激或伤害后的不愉快的感觉和情绪上的体验, 疼痛的信息调节由下丘脑、桥脑和躯体感觉皮层完成^[4]。疼痛的发生机制是多方面的, 单一药物难以覆盖不同的作用机制。由于药效、安全性和耐药性等因素的限制, 镇痛药物剂量不能无限加大, 所以多模式镇痛在疼痛的控制中得到广泛的应用。因此采用 HIFU 联合曲马多镇痛, 可以减轻单一药物的剂量, 减少药物不良反应的发生^[5-6]。

目前提高胰腺癌的总生存率和改善生活质量是综合治疗的目标, 其中疼痛治疗是关键, 而疼痛治疗却是胰腺癌治疗中的一大难题^[7]。HIFU 治疗机利用超声波组织穿透和可聚焦性等

物理性能, 在体内肿瘤病灶处产生高热效应, 使焦点区的肿瘤组织瞬间凝固性坏死, 从而阻止疼痛性递质的合成与释放。本研究结果表明, 曲马多联合 HIFU 治疗能有效缓解胰腺癌疼痛症状, 总有效率达 100%。综上所述, 曲马多联合 HIFU 治疗晚期胰腺癌能取得较好的疗效, 延缓肿瘤进展, 有效缓解疼痛, 提高生活质量, 为胰腺癌的止痛策略提供了新方向。

参考文献

[1] 赵玉沛. 中国胰腺癌治疗 20 年的成绩和需要研究的问题 [J]. 外科理论与实践, 2007, 12(3): 193-195.

[2] Haller DG. New Perspectives in the management of pancreas cancer [J]. Semin Oncol, 2003, 30 Suppl 1: S3.

[3] 李兆申. 胰腺癌早期诊断研究的现状与展望 [J]. 解放军医学杂志, 2009, 34(1): 7-9.

[4] Li JM. Pain management in the hospitalized patient [J]. Med Clin North Am, 2008, 92(2): 371-385.

[5] Schug SA. Combination analgesia in 2005—a rational approach: focus on paracetamol-tramadol [J]. Clin Rheumatol, 2006, 25(1): 16-21.

[6] 李娜, 梅琪, 丁晶, 等. 高强度聚焦超声治疗晚期胰腺癌疼痛 20 例 [J]. 武警医学, 2007, 18(8): 621-622.

[7] 彭淑牖. 胰腺癌 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 23.

(收稿日期: 2012-12-22)