

类风湿关节炎患者 CD4⁺CD25⁺CD127^{LOW/-}调节性 T 细胞检测及意义

张智贤, 曾 桦(中山大学孙逸仙纪念医院检验科, 广州 510120)

【摘要】 目的 研究 CD4⁺CD25⁺CD127^{LOW/-}调节性 T 细胞(Tregs)在类风湿关节炎患者(RA)外周血中的比例改变,并探讨其在疾病进程中的意义。**方法** 选取活动期及稳定期 RA 患者,采用流式细胞术,检测外周血中 CD4⁺CD25⁺CD127^{LOW/-}Treg 细胞占 CD4⁺细胞的比例,并与健康者进行比较。**结果** RA 患者 CD4⁺CD25⁺细胞所占比例与健康对照组差异无统计学意义;而活动期患者外周血 CD4⁺CD25⁺CD127^{LOW/-}Treg 细胞明显低于稳定期组和健康对照组($P<0.05$)。**结论** 类风湿性关节炎活动期时 CD4⁺CD25⁺CD127^{LOW/-}Treg 细胞明显减少,这群调节性 T 细胞可能参与了类风湿性关节炎的疾病进程。

【关键词】 类风湿性关节炎; 流式细胞术; CD4⁺CD25⁺CD127^{LOW/-}调节性 T 细胞

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2013.22.022 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2013)22-2984-02

Analysis of CD4⁺CD25⁺CD127^{LOW/-} regulatory T cells in patients with rheumatoid arthritis and its significance

ZHANG Zhi-xian, ZENG Hua (Department of Clinical Laboratory, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong 510120, China)

【Abstract】 Objective To investigate the percentage and significance of CD4⁺CD25⁺CD127^{LOW/-} regulatory T cells in peripheral blood in patients with rheumatoid arthritis. **Methods** Patients with active and non-active rheumatoid arthritis were included in this study. The percentage of CD4⁺CD25⁺CD127^{LOW/-} regulatory T cells in CD4⁺ T cells were determined by four-colour flow cytometry and the results were compared with the normal. **Results** There was similar percentage of CD4⁺CD25⁺ T cells in peripheral blood of RA patients and healthy subjects. However, the percentage of CD4⁺CD25⁺CD127^{LOW/-} regulatory T cells in active RA group was lower than that in non-active group and healthy subjects ($P<0.05$). **Conclusion** There was similar percentage of CD4⁺CD25⁺ T cells in peripheral blood of RA patients and healthy subjects. However, the percentage of CD4⁺CD25⁺CD127^{LOW/-} regulatory T cells in active RA group was lower than that in non-active group and healthy subjects ($P<0.05$).

【Key words】 rheumatoid arthritis; flow cytometry; CD4⁺CD25⁺CD127^{LOW/-} regulatory T cells

目前类风湿性关节炎(RA)病因和发病机制尚不完全清楚,但一般认为与机体的自身免疫耐受有关^[1]。调节性 T 细胞(Treg)是一群具有免疫负调控作用的 T 淋巴细胞亚群,健康人外周血 Treg 细胞占 CD4⁺ T 细胞的 5%~10%,其在维持机体自身免疫耐受方面发挥着极为重要的作用^[2]。一直以来,有关 Tregs 的定义及研究方法不统一,其中以 CD4⁺CD25⁺天然调节性 T 细胞为主。研究发现,用 CD4⁺CD25⁺CD127^{LOW/-} T 细胞代表的 Treg 细胞不仅在体外实验显示出 Treg 特有的免疫抑制活性,而且能区分体内激活的效应 T 细胞^[3]。本研究通过流式细胞术(FCM)对 RA 患者外周血中 CD4⁺CD25⁺CD127^{LOW/-} Treg 细胞进行检测,探讨其在 RA 的发生和发展中的作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2011 年 9 月至 2012 年 4 月来中山大学孙逸仙纪念医院就诊的 RA 患者 58 例,按患者晨僵持续的时间、关节疼痛和肿胀的程度、关节压痛和肿胀的数目、关节功能受限制程度以及实验室检测指标[如红细胞沉降率、C 反应蛋白、类风湿因子和抗环瓜氨酸肽抗体(CCP)检测]等分为活动期组和稳定期组。其中活动期组 31 例,其中男 10 例,女 21 例,年龄 24~62 岁(中位数 39 岁);稳定期组 27 例,男 11 例,女 16 例,年龄 23~58 岁(中位数 37 岁)。同时选取年龄和性别相匹配的健康体检者(既往无自身免疫性疾病、血液病、肝肾

疾病等病史)30 例作为健康对照组。

1.2 仪器与试剂 Cytomics™ FC500 型流式细胞仪(美国 Beckman-Coulter 公司),所用试剂和光路校正品、质控品均为原配套试剂。乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K₂)抗凝真空管购自广州阳普医疗用品有限公司。

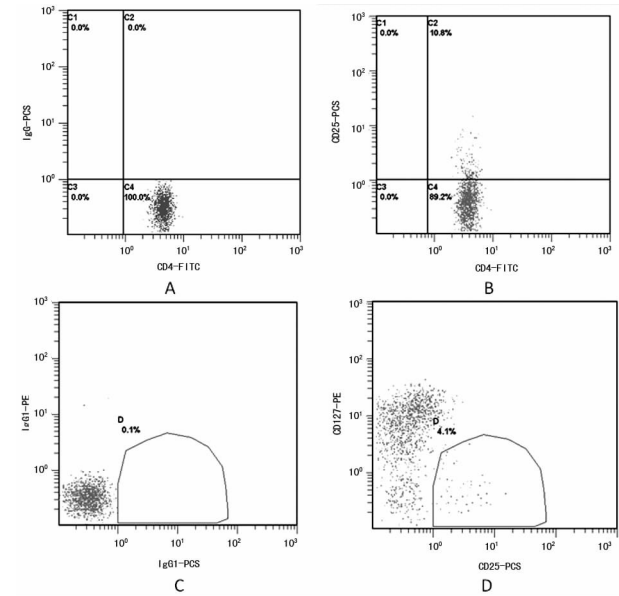
1.3 细胞表面染色 用 EDTA-K₂ 抗凝真空管采集受试者空腹静脉血 2 mL,6 h 内检测完毕。抗体标记采用直接免疫荧光法。具体操作如下:每个标本设测试管和同型对照管,测试管中加 CD45-PC7、CD25-PC5 各 5 μ L,CD4-FITC、CD127-PE 各 10 μ L;同型对照管中加 CD45-PC7、IgG1(Mouse)-PC5 各 5 μ L,CD4-FITC、IgG1(Mouse)-PE 各 10 μ L。再向每管中各加入 500 μ L 抗凝静脉血,充分混匀,室温避光孵育 20 min 后加入 500 μ L 溶血素,振荡混匀后室温避光放置 10~15 min,待红细胞充分溶解后,加入 2.0 mL 磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤细胞 1 次(1 500 r/min,5 min),弃上清液,再以 1 mL PBS 重悬细胞,即制成所需的单细胞悬液。

1.4 流式细胞仪检测 应用贝克曼 FC500 型流式细胞仪对制成的单细胞悬液进行检测。结果分析应用贝克曼 CXP 流式细胞分析软件,在 CD45-SSC 散点图上选定淋巴细胞群,然后以 SSC 和 CD4 设门选择 CD4 阳性细胞分析 CD4⁺CD25⁺细胞和 CD4⁺CD25⁺CD127^{LOW/-}细胞占 CD4⁺细胞的百分比。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组外周血中 CD4⁺CD25⁺T 细胞比较 应用流式细胞术检测 RA 患者外周血 CD4 阳性细胞表面 CD25 的表达,结果发现,RA 患者外周血 CD4⁺CD25⁺T 细胞占 CD4⁺细胞百分比与健康对照组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1、图 1。



注:A、C 为标本同型对照,B、D 为标本检测结果。
图 1 外周血调节性 T 细胞流式细胞术检测结果

2.2 各组外周血中 CD4⁺CD25⁺CD127^{LOW/-}Treg 细胞比较 与 RA 稳定期组和健康对照组相比,RA 活动期组外周血中 CD4⁺CD25⁺CD127^{LOW/-}Treg 细胞占 CD4⁺细胞百分比明显降低,差异有统计学意义($P<0.01$),见表 1。RA 稳定期组和健康对照组相比则差异无统计学意义。

表 1 各组外周血中 CD4⁺CD25⁺T 细胞以及 Treg 细胞比较($\bar{x}\pm s, \%$)

组别	n	CD4 ⁺ CD25 ⁺ T 细胞	CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ^{LOW/-} Treg 细胞
RA 活动期组	31	10.5±1.9	3.8±0.9 ^{ab}
RA 稳定期组	27	10.7±2.1	5.7±1.3
健康对照组	30	10.2±1.7	5.4±1.2

注:与 RA 稳定期组比较,^a $P<0.01$;与健康对照组比较,^b $P<0.01$ 。

3 讨 论

免疫调节细胞是一类可下调或是抑制其他细胞免疫功能的细胞,其概念最早于 1971 年被提出,直到 1995 年, Sakaguchi 等^[4]发现天然 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞,引起免疫学界的广泛关注,人们也一直在寻找鉴别 Treg 的特殊免疫标记以求获得更广泛应用。Foxp3 一度被认为是目前识别 CD4⁺CD25⁺Treg 最特异的标记^[5];它是 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞生长发育和发挥免疫调节功能所必需的,目前已被广泛应用于 RA 等自身免疫性疾病的研究中。然而,由于 Foxp3 表达在细胞内,需要经过固定、破膜等一系列步骤后方可对其进行染色、检测,这在很大程度上有可能对结果的重复性、准确性造成干扰,所以用 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺筛选 Treg 细胞具有一定局限性。目前相继有研究发现,高表达于非调节性 T 细胞的

CD127 分子在调节性 T 细胞表面低表达。Hartigan-O'Connor 等^[3]研究发现通过 CD4⁺CD127^{low}选定的细胞与表达 Foxp3 的 Treg 细胞数量相近,并且这部分 CD4⁺CD127^{low}细胞展现出了 Treg 的特性。因此笔者认为用 CD127 联合 CD4、CD25 检测可以准确的反映 Treg 细胞在人体内的表达情况,同时保持细胞的完整性,保证结果的重复性。

RA 是一个累及周围关节为主的多系统性炎症性的自身免疫病^[6]。本研究结果显示,对于 RA 患者,无论是处于稳定期还是活动期,其外周血中 CD4⁺CD25⁺T 细胞所占比例与健康者相比,差异无统计学意义;活动期与稳定期组间比较差异无统计学意义。文献^[7-8]报道 RA 患者外周血中 CD4⁺CD25⁺细胞所占比例与健康者比较差异无统计学意义,这与本研究结果相一致。与之不同的是, van Amelsfort 等^[9]发现, RA 患者外周血中 CD4⁺CD25⁺细胞所占比例高于健康对照组。这些不同的结果可能与人体内激活的效应 T 细胞也表达 CD25 有关,也可能与人们对 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞的定义不同有关。有学者将 CD4⁺CD25⁺细胞定义为 Treg 细胞,也有学者将 CD4⁺CD25^{high}细胞定义为 Treg 细胞,定义不同导致研究结果可能也存在不同。

而作为定义 Tregs 的新指标,CD4⁺CD25⁺CD127^{LOW/-}Treg 细胞已逐渐被应用于试验研究中^[10-11]。本研究结果显示,活动期 RA 患者组外周血中 CD4⁺CD25⁺CD127^{LOW/-}Treg 细胞占 CD4⁺细胞比例低于稳定期 RA 患者组和健康对照组,差异有统计学意义。说明 Treg 细胞与 RA 的疾病活动有关。活动期 RA 患者存在 CD4⁺CD25⁺CD127^{LOW/-}Treg 细胞数量减少,因此其免疫调节及抑制功能可能受到影响。但 RA 活动期患者 CD4⁺CD25⁺CD127^{LOW/-}Treg 细胞减少的原因及机制还需进一步研究。

综上所述,以 CD4⁺CD25⁺CD127^{LOW/-}为标记检测 Treg 细胞可简化试验操作,保证结果重复性。同时,活动期 RA 患者外周血中存在 CD4⁺CD25⁺CD127^{LOW/-}Treg 细胞表达减少,CD4⁺CD25⁺CD127^{LOW/-}Treg 细胞可能参与了 RA 的发病并与疾病活动度有关。

参考文献

[1] 缪怡,胡朝英,钱柳,等.类风湿性关节炎免疫学研究进展[J].上海交通大学学报:医学版,2011,31(7):1035-1040.
[2] Hill JA,Benoist C,Mathis D. Treg cells guardians for life[J]. Nature Immunol,2007,8(2):124-125.
[3] Hartigan-O'Connor DJ,Poon C,Sinclair E,et al. Human CD4⁺ regulatory T cells express lower levels of the IL-7 receptor alpha chain(CD127),allowing consistent identification and sorting of live cells[J]. J Immunol Methods, 2007,319(1):41-52.
[4] Sakaguchi S,Sakaguchi N,Asano M,et al. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha 2 chains(CD25):breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases[J]. J Immunol,1995,155(3):1151-1164.
[5] Cretney E,Kallies A,Nutt SL. Differentiation and function of Foxp3⁺ effector regulatory T cells[J]. Trends in Immunology,2013,34(2):74-80.
[6] 齐育英.抗环瓜氨酸肽抗体与类风湿因子联合检测在诊断类风湿关节炎中的临床意义[J]. 检验医学与临床, 2011,8(18):2268-2230. (下转第 2987 页)

2.2 按照科室制订的教学计划实施 1 年后, 护理部按照年终考核目标, 根据实习生满意度调查的七项内容对 2012 年全院 19 个科室实习生满意度进行调查, 2012 年全院实习生满意率由过去的 92% 跃为 93.4%; 最高的是手术室, 满意度为 99%; 供应室满意率由过去的 67% 增长为 96%, 位居第 3 名。

3 讨 论

提高带教老师的素质, 通过“双师型人才”这个概念的引入, 让带教老师产生强烈的责任感和荣誉感, 进一步激发了带教老师的热情和挖掘潜能^[1-2]。“手供一体”的观念即手术室和供应室一体化新型管理模式^[3-4]。该模式下实习生在消毒供应中心培训后节省了手术室老师的带教时间和精力, 学生很快能适应手术室的工作任务, 同时也体现了供应室实习的重要性。教学互动, 个性化教育, 既对学生负责也是在竞争中促进带教工作的不断进步。要提高供应室实习生满意度, 还应具体做好以下几点。

3.1 提高带教老师的素质、培养“双师型”人才 所谓双师型“是指即从事临床实践活动, 又从事护理教育工作的老师”^[5-7]。科室人员结构目前很难有大的改变, 积极创造条件争取外出培训学习机会, 同时利用远程教学平台不断提升科室人员的知识水平和教学水平, 努力打造“双师型的带教老师”。

3.2 加强医德医风教育 作为老师不仅应给予他们理论和操作知识, 而且应该给予心灵指导, 在工作中如何体现真、善、美, 如何培养护理“慎独”精神。

3.3 与时俱进突出“手供一体”、提高实习生兴趣和个性化培训 “手供一体”理念改变实习生轮转计划, 这样的改变给学生带来了成就感, 其原因是在供应室实习中不仅学到了清洗、消毒、灭菌知识, 更重要的是通过老师的悉心讲解认识了各种手术器械, 在包装检查时老师把器械容易出故障的地方给予演示, 并激发了对下一个科室的兴趣, 如止血钳闭合问题、手术剪和组织剪区别等; 在敷料包制作时先让学生看教学录像“手术部位铺巾的方法”, 先在大脑里有初步印象后再学习如何配置不同的手术敷料包, 经过供应室的培训后到手术室与没有实习供应室的学生相比有明显的优势, 学生进入手术室 1 周后就能顺利完成小手术的器械、巡回护士工作。其他学生一般在第 4 周左右才能完成小手术的器械、巡回护士工作^[8]。

3.4 教学互动, 个性化教育 个性化教育以人为本的理念主张尊重人、真心关怀人^[9]。学生在科室实习的第 1 周主要负责人是教学组长和护士长, 学习的内容不仅完成计划规定的小讲座, 而且对实习生给予心理疏导, 消除学生陌生、紧张感。1 周后学生根据意愿填写选择表, 内容包括: (1) 是否愿意实习供应室。(2) 是否按照科室安排实习。(3) 是否选择重点实习(高温

灭菌器、低温灭菌器、清洗消毒设备的操作)。(4) 是否选择带教老师(带教老师的个人简历贴在办公室墙上, 内容包括老师学历、性格、专业特长、获奖情况、对学生的要求)。经过测试, 他们选择的结果是: 6% 不愿意实习供应室; 69% 愿意按照科室安排实习; 10% 选择重点实习设备操作; 15% 选择带教老师。科室对学生的意愿认真对待, 对不愿意实习的学生退回护理部, 科室对这部分学生不进行理论和操作考试, 只是在实习手册上如实记录 1 周的学习内容; 其余学生按照他们的选择完成 4 周实习后均参加相同的专科理论考试, 操作考试分为有无选择实习重点而进行考试, 有重点实习的学生考他们选择的内容, 无选择者考科室安排的内容。最后实习出科前每人手里有 1 个五星, 帖在他们心中最喜欢的老师 1 栏内, 并征求他们的意见和建议以便改进科室的教学工作。

综上所述, 消毒供应室实习生满意度低的原因与社会的重视度、人员素质、教学能力、教学态度及对专业的热爱息息相关; 坚持手供一体、教学互动、个性化教育和双师型人才的理念有利于提高消毒供应中心实习生满意度。

参考文献

- [1] 何惠燕, 陈丽莉, 李丽娇. 主带教老师模式在手术室带教中的应用[J]. 中华护理教育, 2009(8): 360-362.
- [2] 沈新宇. 加强教研室建设适应高等职业学校发展[J]. 卫生职业教育, 2008, 26(24): 30-32.
- [3] 王丽娟, 郭凯, 张艳. 谈消毒供应中心怎样才能为全院提供高质量的无菌物品[J]. 吉林医学, 2011, 32(8): 1648-1648.
- [4] 许和风, 章莉. 手供一体化之器械打包的管理[J]. 中国冶金工业医学杂志, 2011, 28(4): 489-491.
- [5] 高薇, 侍杏华. 高职高专临床护理课程师资队伍模式探讨[J]. 中华护理教育, 2008, 5(6): 264-265.
- [6] 战同霞, 魏秀红, 卢国华. 论提高临床护理课程教学质量的有效措施[J]. 卫生职业教育, 2012, 30(23): 80-81.
- [7] 王连艳, 沈翠珍. 临床护理课程理论教学现状分析[J]. 护理实践与研究, 2010, 7(21): 90-92.
- [8] 汪小敏. 最新医院手术室护理技术操作规范与风险防范及质量管理体系规章制度必备手册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 63.
- [9] 朱明霞. 护理教育与仁爱关怀[J]. 中华现代护理杂志, 2010(15): 1737-1741.

(收稿日期: 2013-06-05 修回日期: 2013-08-02)

(上接第 2985 页)

- [7] Cao D, Barjesson O, Larsson P, et al. FOXP3 identifies regulatory CD25^{bright} CD4⁺ T cells in rheumatic joints[J]. Scand J Immunol, 2006, 63(6): 444-452.
- [8] 焦志军, 尤海燕, 陈蕾, 等. 类风湿性关节炎患者 CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ 调节性 T 细胞检测及意义[J]. 中国免疫学杂志, 2007, 23(10): 936-938.
- [9] van Amelsfort JM, Jacobs KM, Bijlsma JW et al. CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in rheumatoid arthritis: differences in the presence, phenotype, and function between

peripheral blood and synovial fluid[J]. Arthritis Rheum, 2004, 50(9): 2775-2785.

- [10] 韩文敏, 邱国强, 周民, 等. CD4⁺ CD25^{+/high} CD127^{low} Tregs 及 TGF- β 在多发骨髓瘤患者外周血的表达分析[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2008, 24(10): 996-998.
- [11] 荣守华, 贾莉婷, 泰淑红, 等. CD4⁺ CD25^{high} CD127^{low} 调节性 T 细胞在乳腺癌患者外周血中的临床意义[J]. 免疫学杂志, 2010, 26(9): 785-788.

(收稿日期: 2013-05-06 修回日期: 2013-06-12)