

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.21.012

创伤脓毒症患儿外周血中 Helios 在 CD4⁺Foxp3⁺Tregs 中的表达比例变化及其意义

高 强,李政委,李大进,朱炳鑫,秦海辉[△]

(徐州医科大学附属徐州儿童医院创伤外科 221006)

摘 要:目的 探讨创伤脓毒症患儿外周血中 Helios 在 CD4⁺Foxp3⁺调节性 T 细胞(Tregs)中表达比例的变化及其意义。方法 该院 2015 年 1 月至 2017 年 6 月收治的 60 例创伤脓毒症患儿纳入脓毒症组,同期入院但未患脓毒症的 60 例创伤患儿纳入创伤组,健康体检儿童 60 例纳入对照组。采集所有研究对象外周血,应用流式细胞学技术检测外周血中 Helios 在 CD4⁺Foxp3⁺Tregs 中的表达比例;实时荧光定量聚合酶链式反应技术检测外周血单核淋巴细胞转录因子 Helios 及 Foxp3 的 mRNA 表达水平,应用酶联免疫吸附试验检测受试儿童外周血血浆中白细胞介素(IL)-10,转化生长因子(TGF)- β 1 的表达水平。结果 脓毒症组、创伤组及对照组外周血中转录因子 Helios 在 CD4⁺Foxp3⁺Tregs 中的表达比例分别为(85.37 $\pm$ 11.25)%、(66.56 $\pm$ 10.86)%、(63.72 $\pm$ 9.88)%,脓毒症组明显高于创伤组、对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。脓毒症组、创伤组及对照组外周血单核淋巴细胞 Helios 的 mRNA 表达水平分别为 4.88 $\pm$ 1.77、3.21 $\pm$ 1.29、0.96 $\pm$ 0.18,脓毒症组明显高于创伤组和对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。脓毒症组 IL-10、TGF- β 1 水平明显高于创伤组和对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 创伤脓毒症患儿外周中 Helios 在 CD4⁺Foxp3⁺Tregs 中的表达比例及相关细胞因子表达水平均明显升高。

关键词:创伤脓毒症; Helios; 外周血; 调节性 T 细胞

中图分类号:R446.63

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2018)21-3203-03

The alteration of Helios+Tregs in peripheral blood in children with posttraumatic sepsis and its significance

GAO Qiang, LI Zhengwei, LI Dajin, ZHU Bingxin, QIN Haihui[△]

(Department of Traumatology, Xuzhou Children's Hospital, Xuzhou Medical University, Xuzhou, Jiangsu 221006, China)

Abstract: **Objective** To investigate the alteration of the ratio of Helios in CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells (Helios+Tregs) in children with posttraumatic sepsis and its significance. **Methods** Helios+Tregs in 60 children with posttraumatic sepsis (sepsis group), 60 children of trauma without sepsis (trauma group) and 60 healthy children (control group) were detected from January 2015 to June 2017. The Helios+Tregs in peripheral blood were measured by flow cytometry. Plasma cytokine level of interleukin (IL)-10 and transforming growth factor- β 1 (TGF)- β 1 were measured by ELISA. The mRNA expression of Helios and Foxp3 in peripheral blood mononuclear cells were determined by RT-PCR. **Results** The Helios+Tregs increased significantly in sepsis group compared with trauma group and control group [(85.37 $\pm$ 11.25)% vs. (66.56 $\pm$ 10.86)% and (63.72 $\pm$ 9.88)%]. The mRNA expression level of Helios in peripheral mononuclear lymphocytes of the sepsis group and control group were 4.88 $\pm$ 1.77, 3.21 $\pm$ 1.29, 0.96 $\pm$ 0.18 respectively, which in the sepsis group was significantly higher than those in trauma group and control group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). Levels of IL-10 and TGF- β 1 in the sepsis group were significantly higher than those in trauma group and control group ($P<0.05$). **Conclusion** Helios+Tregs upregulated in children with posttraumatic sepsis and it might play a role in posttraumatic sepsis.

Key words: posttraumatic sepsis; Helios; peripheral blood; regulatory T cells

脓毒症为创伤外科常见的全身炎性反应综合征,发病率较高,可诱发器官衰竭综合征,严重时可能导致死亡^[1]。脓毒症并非仅仅是过度炎性反应,它是炎性反应和抗炎反应相互作用过程中机体免疫功能紊乱的结果。脓毒症病程进展过程中,涉及机体多种免

疫细胞之间平衡的失调和免疫调节网络的紊乱。儿童由于自身免疫功能尚不完善,在发生严重创伤时,更易由感染诱发脓毒症,造成严重后果。调节性 T 细胞(Tregs)是 T 淋巴细胞的一个亚群,具有强大的免疫抑制功能,是维持人体免疫系统稳态不可或缺的一

部分。曾一度被认为仅存在于胸腺来源的 $CD4^+$ Foxp3 $^+$ T 细胞之中的转录因子 Helios 在 Tregs 中呈高水平表达^[2-3]。Helios 是维持 $CD4^+$ Foxp3 $^+$ T 细胞稳定抑制能力所不可或缺的角色^[4], 同时是具有抑制功能的调节性 T 细胞的标记物^[5-6]。既往研究表明, Helios 在 $CD4^+$ Foxp3 $^+$ Tregs 中的表达比例在多种免疫相关的疾病中扮演了重要角色, 但其在儿童创伤后脓毒症中的作用鲜有报道^[7-11]。本研究旨在通过检测创伤脓毒症患者外周血中 Helios 在 $CD4^+$ Foxp3 $^+$ Tregs 中的表达比例的变化, 分析 Helios 在 $CD4^+$ Foxp3 $^+$ Tregs 中的表达比例与相关细胞因子表达水平间的潜在关系, 探讨 Helios 在 $CD4^+$ Foxp3 $^+$ Tregs 中的表达比例在儿童创伤脓毒症中的意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择本院 2015 年 1 月至 2017 年 6 月收治的 60 例创伤脓毒症患者纳入脓毒症组, 经病原学及影像学检查确诊, 符合 2005 年国际儿科脓毒症年会所制定的小儿脓毒症诊断标准^[1], 其中男 36 例, 女 24 例; 平均 (8.56 ± 2.33) 岁。选择同期入院但未发生脓毒症的 60 例创伤儿童纳入创伤组, 其中男 32 例, 女 28 例; 平均 (9.21 ± 3.12) 岁。同期本院 60 例健康体检者纳入对照组, 其中男 30 例, 女 30 例; 平均 (8.94 ± 2.79) 岁。所有研究对象排除标准: 患有自身免疫疾病、严重的慢性疾病、或是长期服用糖皮质激素的儿童。本研究经本院伦理委员会审核通过后进行, 所有研究对象监护人均对本研究知情同意。

1.2 方法 所有研究对象均空腹 8 h 后抽取静脉血 2 mL 于肝素抗凝管内, 室温静置 30 min 后以 $300 \times g$ 速度离心 7 min, 分离上层血浆, 分装保存于 -80°C 冰箱内待测。用淋巴细胞分离液对血细胞进行密度梯度离心, 分离得到单核淋巴细胞; 对单核淋巴细胞进行特异性抗体染色后进行流式细胞学检测, 并采用 Flowjo V10 软件进行流式数据分析。应用酶联免疫吸附试验(ELISA 法)检测血浆中细胞因子白细胞介素(IL)-10、转化生长因子(TGF)- $\beta 1$ 的水平。应用实时定量聚合酶链式反应(PCR)技术, 检测外周血单核淋巴细胞中转录因子 Helios 及 Foxp3 的 mRNA 表达水平。

1.3 统计学处理 采用 SPSS22.0 统计软件进行数据处理及统计学分析。呈正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用方差分析, 多组间中的 2 组比较采用 LSD- q 检验。计数资料以例数或百分率表示, 多组间比较采用 χ^2 检验, 多组间中的 2 组比较法采用 Fisher 确切概率法。相关分析采用 Pearson 相关。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组研究对象 Tregs 比例检测结果比较 脓毒症组、创伤组及对照组外周血中转录因子 Helios 在 $CD4^+$ Foxp3 $^+$ Tregs 中的表达比例分别为 $(85.37 \pm$

$11.25)\%$ 、 $(66.56 \pm 10.86)\%$ 、 $(63.72 \pm 9.88)\%$, 脓毒症组明显高于创伤组、对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。脓毒症组、创伤组及对照组外周血 $CD4^+$ Foxp3 $^+$ Tregs 细胞比例分别为 $(7.90 \pm 1.31)\%$ 、 $(6.88 \pm 1.02)\%$ 、 $(2.79 \pm 0.31)\%$, 脓毒症组和创伤组明显高于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 脓毒症组与创伤组之间比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 3 组研究对象血浆 IL-10、TGF- $\beta 1$ 水平比较 ELISA 法检测结果显示, 脓毒症组、创伤组及对照组血浆中 IL-10 水平分别为 (25.46 ± 3.67) 、 (20.51 ± 2.91) 、 (17.47 ± 0.89) pg/mL, 脓毒症组明显高于创伤组和对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。脓毒症组、创伤组及对照组血浆中 TGF- $\beta 1$ 水平分别为 (45.26 ± 8.62) 、 (41.81 ± 7.11) 、 (33.79 ± 6.97) pg/mL, 脓毒症组明显高于创伤组和对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 Helios 在 $CD4^+$ Foxp3 $^+$ Tregs 中的表达比例与血浆 IL-10、TGF- $\beta 1$ 水平相关性分析 IL-10 ($r = 0.627$, $P = 0.001$)、TGF- $\beta 1$ ($r = 0.638$, $P = 0.001$) 与外周血中 Helios 在 $CD4^+$ Foxp3 $^+$ Tregs 中的表达比例间呈显著正相关。

2.4 3 组研究对象外周血单核淋巴细胞转录因子 Helios 及 Foxp3 的 mRNA 表达水平比较 脓毒症组、创伤组及对照组外周血单核淋巴细胞 Helios 的 mRNA 表达水平分别为 4.88 ± 1.77 、 3.21 ± 1.29 、 0.96 ± 0.18 , 脓毒症组明显高于创伤组和对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。脓毒症组、创伤组及对照组 Foxp3 的 mRNA 水平分别为 3.76 ± 1.30 、 3.68 ± 1.21 、 0.87 ± 0.15 , 脓毒症组及创伤组明显高于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 但脓毒症组与创伤组之间, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3 讨论

2001 年美国医师协会等多个相关组织在华盛顿召开会议, 将脓毒症定义为由微生物引起的全身炎症反应综合征^[1]。美国每年约 75 万人发生脓毒症, 病死率为 $20\% \sim 60\%$; 我国每年也有大量脓毒症患者, 死亡人数近百万。儿童患者免疫功能尚未发育健全, 病情进展迅速, 更应引起重视。脓毒症发生时机体炎症细胞激活, 引其自身系统性炎症反应。Tregs 是 T 细胞的组成部分, 在抑制炎症反应过程中发挥重要作用, Tregs 数量异常或是功能降低均可能导致机体免疫功能失调, 导致疾病发生。Tregs 通过产生 IL-10 抑制 T effs 激活及后续一系列的免疫炎症反应^[12-13], 并通过分泌 TGF- $\beta 1$ 抑制其他 T 细胞的作用, 阻碍辅助 T 细胞及细胞毒性 T 细胞的激活^[14-16]。Foxp3 曾被认为是 Tregs 标记物^[11, 17-18], 然而进一步研究发现, Foxp3 既表达于具有抑制功能的 Tregs, 也可以出现在效应性 T 细胞中^[19-20]。

Helios 是属于 Ikaros 家族的核内转录因子,近期研究认为 Helios 是具有抑制功能的 Tregs 的标记物^[5-6],本研究发现,创伤脓毒症患儿外周血中 Helios 在 CD4⁺Foxp3⁺Tregs 中的表达比例相对于创伤组和对照组明显升高,且血浆细胞因子 IL-10、TGF-β1 与 Helios 在 CD4⁺Foxp3⁺Tregs 中的表达比例存在显著正性相关关系。细胞因子 IL-10 是人类细胞因子的合成抑制因子,是具有免疫调节和抗炎作用的细胞因子,被视作 Tregs 标记物之一,研究证实,Tregs 通过产生 IL-10 从而抑制 T effs 激活及免疫炎症反应。TGF-β1 是转化生长因子超家族成员,它承载多项细胞功能,包括调控细胞生长繁殖,细胞分化凋亡等。Tregs 能够分泌 TGF-β1,进一步抑制其他 T 细胞效应功能,从而抑制免疫炎症反应。本研究发现,Helios 在 CD4⁺Foxp3⁺Tregs 中的表达水平同以上两种细胞因子的表达水平之间存在正相关关系,由此笔者猜测,过度表达的 Helios 在 CD4⁺Foxp3⁺Tregs 中的表达比例可能在创伤脓毒症患儿疾病进展中产生了潜在的影响,抑制了机体的正常免疫炎症反应,导致疾病病程进展,但其具体作用机制仍待进一步研究。

参考文献

- [1] NISHIDA O, OGURA H, EGI M, et al. The Japanese clinical practice guidelines for management of sepsis and septic shock 2016 (J-SSCG 2016)[J]. *Acute Med Surg*, 2018, 5(1): 3-89.
- [2] THORNTON A M, KORTY P E, TRAN D Q, et al. Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3⁺ T regulatory cells[J]. *J Immunol*, 2010, 184(7): 3433-3441.
- [3] ROSS E M, BOURGES D, HOGAN T V, et al. Helios defines T cells being driven to tolerance in the periphery and thymus[J]. *Eur J Immunol*, 2014, 44(7): 2048-2058.
- [4] KIM H J, BARNITZ R A, KRESLAUSKY T, et al. Stable inhibitory activity of regulatory T cells requires the transcription factor Helios[J]. *Science*, 2015, 350(6258): 334-339.
- [5] GOTTSCHALK R A, CORSE E, ALLISON J P. Expression of Helios in peripherally induced Foxp3⁺ regulatory T cells[J]. *J Immunol*, 2012, 188(3): 976-980.
- [6] AKIMOVA T, BEIER U H, WANG L, et al. Helios expression is a marker of T cell activation and proliferation[J]. *PLoS One*, 2011, 6(8): e24226.
- [7] SYED KHAJA A S, TOOR S M, EL SALHAT H, et al. Intratumoral FoxP3⁺ Helios⁺ regulatory T cells upregulating immunosuppressive molecules are expanded in human colorectal cancer[J]. *Front Immunol*, 2017, 8: 619.
- [8] ASANUMA S, YAMAGISHI M, KAWANAMI K, et al. Adult T-cell leukemia cells are characterized by abnormalities of Helios expression that promote T cell growth[J]. *Cancer Sci*, 2013, 104(8): 1097-1106.
- [9] 王晓莉,葛晓松,翟志敏,等.不同年龄段健康人及老年肺癌患者外周血中 Helios⁺调节性 T 细胞比例的研究[J]. *中国血液流变学杂志*, 2014, 24(3): 354-357.
- [10] 李雪,李栋,时庆,等. Helios 在儿童急性淋巴细胞性白血病调节性 T 细胞中的表达及功能[J]. *山东大学学报(医学版)*, 2017, 62(4): 76-81.
- [11] JIANG L, CHEN F, HU X, et al. Decreased Helios expression in regulatory T cells in acute coronary syndrome[J]. *Dis Markers*, 2017, 2017(8): 7909407.
- [12] LI Y, SUN W. Effects of Th17/Treg cell imbalance on HIV replication in patients with AIDS complicated with tuberculosis[J]. *Exp Ther Med*, 2018, 15(3): 2879-2883.
- [13] SHEVACH E M. Mechanisms of foxp3⁺ T regulatory cell-mediated suppression[J]. *Immunity*, 2009, 30(5): 636-645.
- [14] TROJAN K, UNTERRAINER C, WEIMER R, et al. Correction: Helios expression and Foxp3 TSDR methylation of IFNγ⁺ and IFNγ⁻ Treg from kidney transplant recipients with good long-term graft function[J]. *PLoS One*, 2017, 12(5): e0179069.
- [15] LI J N, LI J X, HUANG H L, et al. Influence of sirolimus-induced TGF-beta secretion on mouse Treg cell proliferation[J]. *Genet Mol Res*, 2015, 14(4): 18569-18579.
- [16] SHEN Y, WEI Y, WANG Z, et al. TGF-beta regulates hepatocellular carcinoma progression by inducing Treg cell polarization[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 35(4): 1623-1632.
- [17] WAWMAN R E, BARTLETT H, OO Y H, et al. Regulatory T cell metabolism in the hepatic microenvironment[J]. *Front Immunol*, 2017, 8: 1889.
- [18] D'ARENA G, VITALE C, COSCIA M, et al. Regulatory T cells and their prognostic relevance in hematologic malignancies[J]. *J Immunol Res*, 2017, 2017: 1832968.
- [19] LEE J, PARK N, PARK J Y, et al. Induction of immunosuppressive CD8⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ regulatory T cells by suboptimal stimulation with staphylococcal enterotoxin C1[J]. *J Immunol*, 2018, 200(2): 669-680.
- [20] SANTONI DE SIO F R, PASSERINI L, VALENTE M M, et al. Ectopic FOXP3 expression preserves primitive features of human hematopoietic stem cells while impairing functional T cell differentiation[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 15820.

(收稿日期:2018-02-24 修回日期:2018-05-16)