

急性脑梗死患者外周血 CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low} 调节性 T 细胞表达及其临床意义

陈晓菲, 许文华, 任明山

摘要 目的 动态观察急性脑梗死患者不同时期外周血单个核细胞(PBMC)中 CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low} 调节性 T 细胞(Treg)表达,探讨其对急性缺血性脑卒中免疫状态及病程进展的影响。方法 选取急性脑梗死患者 60 例为脑卒中组,并分为发病 24~48 h 组($n=16$)、3~7 d 组($n=22$)和 8~14 d 组($n=22$);另选取健康体检者 22 例为对照组。采用流式细胞术检测 60 例急性脑梗死患者和 22 例健康体检者外周血中 CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low} Treg 水平并进行分析。结果 与对照组比较,脑卒中组外周血 CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low}、CD4⁺ CD25^{high} Treg 比例在起病后 24~48 h、3~7 d 时显著降低($P<0.01$);8~14 d 逐渐恢复至正常水平,与对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$);与对照组比较,脑卒中组的 CD4⁺ T 细胞比例升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论

Treg 可能参与急性缺血性脑卒中的病理生理过程,其功能失衡在急性缺血性脑卒中炎症损伤中具有重要作用,早期检测可能为其治疗提供依据。

关键词 脑缺血;卒中;CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞;CD127;流式细胞术

中图分类号 R 743.3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)05-0633-04

调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg)是具有免疫无反应和免疫抑制两大功能特征的具有免疫调节活性的 T 细胞亚群,其在免疫稳态、移植反应、过敏反应、肿瘤免疫和微生物感染等方面均具有重要的免疫调节功能。叉头翼螺旋转录因子 Foxp3 特别表达于 CD4⁺ CD25⁺ Treg,是其特异性标志物。但由于 Foxp3 是一种细胞核内成分,检测时需要固定破膜,并不能用于分离人类 Treg 细胞以作功能性研究,因此限制了其在人类中的应用^[1]。最近的研究^[2-3]表明,CD4⁺ CD25^{high} CD127^{low} T 细胞是目前人类外周血中自然发生的 Treg 细胞最好的膜标志物。

低表达的 IL-7R α 链(CD127)与高表达的 IL-2 受体的 α 链(CD25)结合能够更好地分离和鉴定具有高抑制功能的纯化 Treg 亚群^[4-5]。因此,采用 CD25^{high}和 CD127^{low}这对标志物进行临床研究将能够更精确地描述急性脑梗死患者 Treg 的调节功能。该研究通过动态检测急性脑梗死患者外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)中 CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low} Treg 的表达,从而进一步揭示急性缺血性脑卒中的免疫相关发病机制,为发现新的治疗靶点提供理论基础。

1 材料与方 法

1.1 研究对象 收集 2013 年 1 月~5 月安徽医科大学附属省立医院神经内科住院的脑梗死患者 60 例,作为脑卒中组,其中男 41 例,女 19 例,年龄 43~80(61.50 \pm 10.69)岁。其中发病 24~48 h 组 16 例,3~7 d 组 22 例,8~14 d 组 22 例。疾病诊断符合第四届全国脑血管病会议修订标准,全部病例均经头部 CT 和(或)MRI 证实。其中包括各种不同部位的脑梗死病例。所有患者均为 24 h 内的初次发病患者,且无心、肝、肾疾病及糖尿病,无自身免疫性疾病,排除颅内其他病变,近期无其他感染性疾病。另设对照组 22 例,其中男 15 例,女 7 例,年龄 44~80(59.63 \pm 9.81)岁,均系无心、肝、脑、肾和免疫、感染性疾病及糖尿病的健康成年人,头部 MRI 检查无颅内疾病。脑卒中组与对照组在年龄和性别上均匹配,具有可比性。

1.2 主要试剂与仪器 异硫氰酸荧光素(FITC)标记的小鼠抗人 CD4 单抗(克隆号 13B8.2)、藻红蛋白(PE)标记的 CD25 单抗(克隆号 U7.27)和 CD25 同型阴性对照试剂购自美国 Beckman-Coulter 公司;PE 标记的 CD127 单抗(克隆号 hiL-7R-M21)购自美国 eBioscience 公司;溶血剂为 0.83% 的氯化铵溶液,由本院中心实验室用去离子蒸馏水自行配制。流式细胞仪购自美国 BD 公司(型号 BD FACSCalibur),荧光激发波长为 488 nm 和 635 nm,分析软件为 CellQuest Pro 系统。

2013-11-15 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81000550)

作者单位:安徽医科大学附属省立医院神经内科,合肥 230001

作者简介:陈晓菲,女,硕士研究生;

任明山,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:renmingshan 2012@163.com

1.3 流式细胞仪检测 受试者均于清晨空腹状态下抽取肘静脉血 2~3 ml,肝素抗凝,标本在采集后 2 h 内测定。检测时取抗凝全血 100 μl,加入 CD25-PE、CD4-FITC 各 10 μl 及 CD127-PE 2.5 μl,震荡器上充分混匀,室温避光反应 15 min;加入溶血剂 2 ml,充分震荡混匀,室温避光反应 10 min,加入生理盐水 2 ml,1 500 r/min 离心 5 min 弃上清液,取 500 μl 立即上流式细胞仪检测。每次检测前常规用荧光微球和同型阴性对照试剂对仪器进行质量监测和调控,并用标准方法对各荧光素之间的干扰进行补偿,排除相互干扰。检测时先根据前向角和侧向角散射光信号,对淋巴细胞群进行设门,每次获取设门内细胞 20 000 个以上并保存数据。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,数据均符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组样本间采用单因素方差分析进行检验。

2 结果

2.1 急性脑梗死患者和健康体检者外周血 CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low} T 细胞、CD4⁺ CD25^{high} T 细胞水平

比较 结果显示,与对照组比较,脑卒中组外周血 CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low} T 细胞、CD4⁺ CD25^{high} T 细胞占 CD4⁺ T 细胞比例在起病后 24~48 h、3~7 d 时显著降低,差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 8~14 d 则逐渐恢复至正常水平,与对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1 图 1、2。

2.2 急性脑梗死患者和健康体检者外周血 CD4⁺ T 细胞水平比较 结果显示,与对照组比较,脑卒中组外周血 CD4⁺ T 细胞占淋巴细胞比例在起病后 24~48 h、3~7 d、8~14 d 时均高于对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 不同组中 CD4⁺ CD25^{high}、CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low}、CD4⁺ T 细胞的检测结果 (% $\bar{x} \pm s$)

组别	n	CD4 ⁺ CD25 ^{high} / CD4 ⁺	CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ^{low} / CD4 ⁺	CD4 ⁺ / 淋巴细胞
脑卒中				
24~48 h	16	0.67 ± 0.33 ^{△△}	4.56 ± 0.96 ^{△△}	35.24 ± 7.74 [△]
3~7 d	22	0.77 ± 0.31 ^{△△}	4.51 ± 0.64 ^{△△}	37.72 ± 11.53 [△]
8~14 d	22	0.95 ± 0.23	5.25 ± 1.30	36.96 ± 11.29 [△]
对照	22	0.96 ± 0.14	5.35 ± 0.55	27.58 ± 7.03

与对照组比较:△ $P < 0.05$,△△ $P < 0.01$

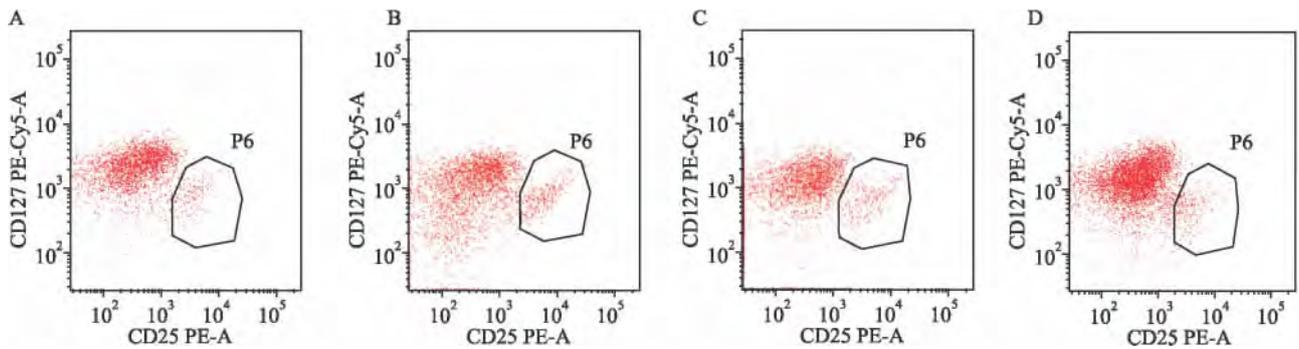


图 1 各组外周血 CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low} Treg 表达
A:对照组;B:24~48 h 组;C:3~7 d 组;D:8~14 d 组

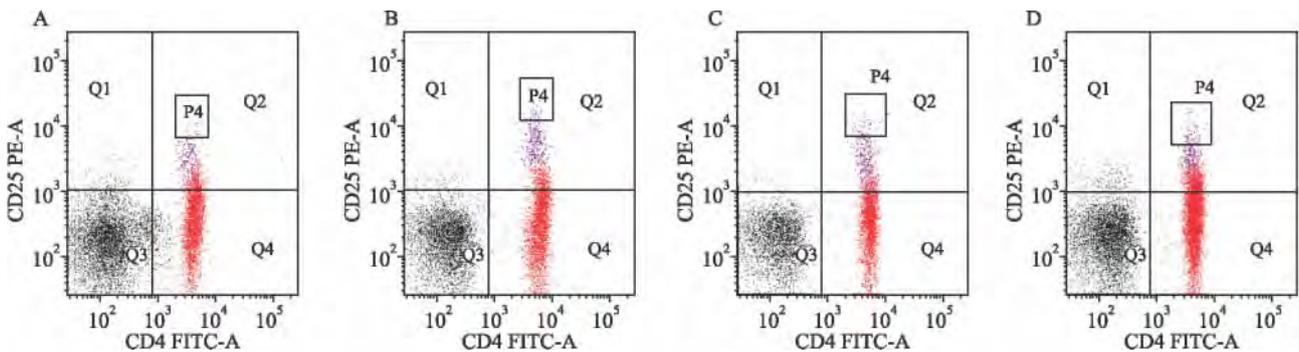


图 2 各组外周血 CD4⁺ CD25^{high} Treg 表达
A:对照组;B:24~48 h 组;C:3~7 d 组;D:8~14 d 组

3 讨论

近来研究^[6]显示,脑卒中的病理过程正如炎症性肠病、继发性血管炎、类风湿关节炎或抗磷脂综合征等一样,也是一个复杂的全身炎症性疾病或自身免疫过程。该研究表明炎症免疫反应可能在急性缺血性脑损伤中具有重要作用,卒中后的免疫抑制成为当今治疗急性缺血性脑损伤的重要靶点。

CD4⁺CD25⁺Treg 是指部分高表达 IL-2 受体的 α 链(CD25)分子的 CD4⁺T 细胞^[7],是一类具有独特免疫调节功能的 T 细胞亚群,能够通过免疫负性调节的方式来抑制自身反应性 T 细胞的效应,负向调节机体的免疫炎症反应,维持免疫耐受。Foxp3 是其特异性细胞标志物,但人 Treg 不同于小鼠,其表型非常复杂。最近的研究^[8-10]结果显示,在 4 个潜在的 Treg 种群中,人外周血 CD4⁺CD25⁺CD127^{low} T 细胞的 Foxp3 更容易表达,其中 CD25^{high}CD127^{low/-}T 细胞包含最多的 Foxp3,并且表明在分离的 CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}T 细胞中有 95% 表达 Foxp3,不表达 Foxp3 的是 CD4⁺CD25⁻T 细胞。这表明 CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}T 细胞是目前发现的最能表达高水平 Foxp3 的标志物,更适用于人类外周血中 Treg 的功能性研究。

Liesz et al^[11]首次提出 CD4⁺CD25⁺Treg 在急性缺血性卒中方面起到关键作用,并指出其可抑制急性缺血后促炎因子表达的上调及阻止中性粒细胞、淋巴细胞与小胶质细胞的活化和向大脑的入侵,从而减轻脑组织免疫炎症性损伤的发生。本临床实验结果显示,急性脑梗死患者外周血 CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}T 细胞和 CD4⁺CD25^{high}T 细胞比例在 24~48 h 及 1~3 d 时均较健康体检者下降,以后逐渐上升,至 8~14 d 时与健康体检者已无明显差异。该研究表明在急性脑梗死后早期阶段,炎症免疫反应以促炎反应为主,促炎因子过度激活,效应 T 细胞过度活化,使 Treg 相对性减少,抑制了 Treg 活化分化,正是由于 Treg 免疫抑制能力的下降,这些发挥免疫保护作用的 Treg 数量和功能的抑制加重了炎症反应所致的脑组织二次损伤。提示 CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}T 细胞对缺血性脑损伤具有保护作用,其功能下调导致了缺血性脑损伤进一步加重。

目前,CD4⁺CD25⁺Treg 表达水平在缺血性脑卒中方面的研究仅见动物实验报道。杨双文等^[12]研究发现,实验小鼠短暂性脑缺血后,脾脏单个核细胞

中 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T 细胞在缺血再灌注 24 h 时比例较对照组明显减少,但在 72 h 时基本恢复正常,5 d 时则明显高于对照组,且这些变化与脑梗死容积变化密切相关。陈瑞清等^[13]研究发现,外周血中 CD4⁺CD25⁺Treg 在大鼠脑缺血后 1、3 d 时表达与对照组无明显差异,而到 7 d 时表达高于对照组,以后逐渐上升,到 14 d 时则明显高于对照组。这些实验研究结果提示 CD4⁺CD25⁺Treg 与脑梗死发病后的病理变化具有明确的因果关系,其基本的变化趋势为 CD4⁺CD25⁺Treg 表达水平在脑梗死发病后早起即降低,后期逐渐升高。但在后期升高的时间点和升高的水平方面存在争议,这可能与选取的实验对象分别是人和动物有关、以及表面标记物的选择及检测手段方法不同有关。

新的免疫学理论认为,CD4⁺T 细胞在不同的理化因素作用下可分化成如辅助性 T 细胞 1(Th1)、辅助性 T 细胞 2(Th2)、Treg 和辅助性 T 细胞 17(Th17)等不同功能的细胞亚群。本研究结果显示,与健康体检者相比,急性脑梗死患者的 CD4⁺T 细胞比例明显增高。可能由于卒中后损伤所导致的血脑屏障破坏,使得平时隐含的特殊的中枢神经系统抗原暴露于免疫系统并得以进入体循环,从而可能造成自身免疫性损伤。与此同时,急性脑梗死患者外周血 CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}T 细胞和 CD4⁺CD25^{high}T 细胞比例在发病 24~48 h 及 3~7 d 较健康体检者下降,该研究表明在急性脑梗死急性期炎症反应被激活,CD4⁺T 细胞可能以诱导分化成促炎细胞因子为主,而具有免疫抑制功能的 Treg 数量和功能则受到抑制,从而加重了脑组织损伤。而患者外周血 CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}T 细胞和 CD4⁺CD25^{high}T 细胞比例在发病 8~14 d 逐渐恢复至正常水平,则可能在缺血性脑卒中恢复期,机体内诱导产生大量的 Treg,从而抑制免疫炎症反应的发生,促进脑组织神经元的修复。

总之,急性脑梗死患者急性期存在免疫耐受缺陷,Treg 功能失衡是急性缺血性脑卒中免疫功能紊乱的重要因素,CD4⁺CD25⁺CD127^{low}Treg 作为一种具有免疫炎症负性调节作用的 T 细胞亚群,对缺血性脑卒中后脑组织具有保护作用,本结果为进一步阐明急性缺血性脑卒中的免疫机制提供了新证据,为卒中后免疫抑制治疗提供理论基础。

参考文献

- [1] Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell de-

- velopment by the transcription factor Foxp3 [J]. *Science* 2003 , 299(5609):1057-61.
- [2] Schmetterer K G , Neunkirchner A , Pickl W F. Naturally occurring regulatory T cells: markers , mechanisms , and manipulation [J]. *FASEB J* 2012 26(6) : 2253 - 76.
- [3] Su H , Longhi M S , Wang P , et al. Human CD4⁺ CD25⁺ (high) CD127⁻ (low/neg) regulatory T cells [J]. *Methods Mol Biol* , 2012 806:287 - 99.
- [4] Hartigan-O'Connor D J , 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(1-2) :41 - 52.
- [5] Seddiki N , Santner-Nanan B , Martinson J , et al. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells [J]. *J Exp Med* 2006 , 203(7) : 1693 - 700.
- [6] Deb P , Sharma S , Hassan K M. Pathophysiologic mechanisms of acute ischemic stroke: an overview with emphasis on therapeutic significance beyond thrombolysis [J]. *Pathophysiology* 2010 , 17(3) : 197 - 218.
- [7] Lockshin R A , Zakeri Z. Apoptosis , autophagy , and more [J]. *Int J Biochem Cell Biol* 2004 36(12) :12405 - 19.
- [8] Touil S , Rosenzweig M , Landau D A , et al. Depletion of T regulatory cells through selection of CD127⁻ positive cells results in a population enriched in memory T cells: implications for anti-tumor cell therapy [J]. *Haematologica* , 2012 97(11) :1678 - 85.
- [9] Yu N , Li X , Song W , et al. CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low/-} T cells: a more specific Treg population in human peripheral blood [J]. *Inflammation* 2012 , 35(6) :1773 - 80.
- [10] Kobayashi T , Nakatsuka K , Shimizu M , et al. Ribavirin modulates the conversion of human CD4⁺ CD25⁻ T cell to CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ T cell *via* suppressing interleukin-10-producing regulatory T cell [J]. *Immunology* , 2012 137(3) :259 - 70.
- [11] Liesz A , Suri-Payer E , Veltkamp C , et al. Regulatory T cells are key cerebroprotective immunomodulators in acute experimental stroke [J]. *Nat Med* , 2009 , 15(2) :192 - 9.
- [12] 杨双文 , 曹丽 , 杨双武 , 等. Treg 细胞及 TGF-β1 免疫调节功能紊乱加重小鼠缺血性脑损伤 [J]. *细胞免疫学杂志* 2011 27(4) :408 - 11.
- [13] 陈瑞清 , 谭盛 , 陈健 , 等. 大鼠急性脑缺血后 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞、Foxp3 表达及其意义 [J]. *南方医科大学学报* , 2012 32(5) :659 - 63.

Clinical significance of CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low} regulatory T cells expression in the peripheral blood of patients with acute cerebral infarction

Chen Xiaofei , Xu Wenhua , Ren Mingshan

(Dept of Neurology , The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University , Hefei 230001)

Abstract Objective To investigate the expression of CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low} regulatory T cells in peripheral blood mononuclear cells (PBMNCs) in order to explore the influence on the immune status and disease progression in the different period of acute ischemic stroke. **Methods** 60 patients with acute cerebral infarction were selected as the stroke group and divided them into the 24 ~ 48 h group ($n = 16$) , 3 ~ 7 d group ($n = 22$) and 8 ~ 14 d group ($n = 22$) ; 22 healthy human were set as the control group. To analyze the percentage of CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low} regulatory T cells in the peripheral blood of acute cerebral infarction patients and healthy human with flow cytometry.

Results The percentages of CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low} and CD4⁺ CD25^{high} regulatory T cells in the peripheral blood of the stroke group were significantly decreased at 24 ~ 48 h 3 ~ 7 d ($P < 0.01$) when compared with the control group , and then tended to return toward the control value at 8 ~ 14 d ($P > 0.05$) ; the percentage of CD4⁺ regulatory T cells in the peripheral blood of the stroke group was significantly higher than control group ($P < 0.05$).

Conclusion Imbalance of regulatory T cells is very likely to play an important role in the immunological injury of acute ischemic stroke. Regulatory T cells may be involved in the pathogenesis of acute ischemic stroke , and early detection may provide a basis for treatment.

Key words cerebral ischemia ; stroke ; CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells ; CD127 ; flow cytometry