

急性冠脉综合征患者外周血 CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low} 调节性 T 细胞的变化及意义

徐林杰 吴继雄 许邦龙 王晓晨 彭晓云 何非

摘要 目的 探讨急性冠脉综合征(ACS)患者外周血 CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low} 调节性 T 细胞(Treg)的变化及意义。方法 收集行冠状动脉造影检查的住院患者 96 例,按照 1979 年 WHO 冠心病诊断和分型标准将患者分为 3 组:ACS 组 48 例、稳定性心绞痛(SAP)组 24 例、正常对照组 24 例。采用流式细胞术检测各组患者外周血 CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low} Treg 细胞水平,同时检测并比较各组患者超敏 C 反应蛋白(hs-CRP)、外周血白细胞(PWBC)计数水平。结果 ACS 组外周血 CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low} 占 CD4⁺ 细胞比例 [(3.18 ± 1.76)%]显著低于正常对照组 [(5.64 ± 1.63)%]和 SAP 组 [(5.60 ± 1.56)%] ($F = 25.247, P < 0.01$),而 ACS 组外周血 hs-CRP、PWBC 计数水平明显高于正常对照组和 SAP 组 ($P < 0.05$)。此外,患者外周血 CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low} 占 CD4⁺ 细胞比例的下降与 hs-CRP 和 PWBC 计数的升高呈负相关 (r 分别为 -0.518、-0.311, $P < 0.01$)。结论 ACS 患者外周血中 Treg 细胞比例的下降可能通过破坏外周免疫耐受平衡和激活炎症反应参与动脉粥样硬化的发生发展过程。
关键词 急性冠脉综合征;调节性 T 细胞;超敏 C 反应蛋白;白细胞;流式细胞术

中图分类号 R 541.4;R 392.12;R 341

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)05-0637-04

随着人们生活水平的不断提高,心血管疾病的发病率和死亡率逐年上升。急性冠脉综合征(acute coronary syndrome, ACS)发病急、病情危重、死亡率高,是临床常见的心血管急重症,包括不稳定型心绞痛(unstable angina, UA)和急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)^[1]。动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是其主要的病理性基础,目前认为 AS 是一种慢性炎症性疾病,免疫细胞尤其是 CD4⁺ T 细胞在其中发挥重要作用。调节性 T 细胞(regulatory T cells, Treg 细胞)是一组特殊的具有免疫负调节功能的 CD4⁺ T 细胞亚群,在 AS 和 ACS 发生、发展的

各个阶段均发挥着重要的作用。近年来相关研究^[2]表明 ACS 患者外周血 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞数量减少。CD127 作为 Treg 细胞新的表面标志物,在 ACS 中的研究较少,因此通过标记 CD127 采用流式细胞仪检测 ACS 组、稳定性心绞痛(stable angina pectoris, SAP)组和正常对照组外周血 CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low} Treg 细胞水平的变化,及其与超敏 C 反应蛋白(high-sensitivity C-reactive protein, hs-CRP)、外周血白细胞(peripheral white blood cell, PWBC)计数之间的关系,探讨免疫调节因素在 ACS 中的可能作用。

1 材料与方法

1.1 研究对象 收集 2012 年 8 月~2013 年 6 月在安徽医科大学第二附属医院心血管内科行冠状动脉造影等检查的住院患者 96 例,按照 1979 年 WHO 冠心病诊断和分型标准,其中 ACS 组 48 例,包括 AMI 18 例和 UA 30 例;SAP 组 24 例;经临床症状、心电图、经胸心脏彩色多普勒超声、冠状动脉造影检查排除其他器质性心脏疾病的正常对照组 24 例。所有患者均排除肿瘤、感染、自身免疫性疾病、严重肝肾疾病、血液系统疾病及近期服用免疫抑制剂。

1.2 试剂与仪器 藻红蛋白(PE)标记的抗人 CD127 单抗(克隆号 hiL-7R-M21)、异硫氰酸荧光素(FITC)标记的小鼠抗人 CD25 单抗(克隆号 U7.27)和 PE-Cy5-CD4 同型阴性对照试剂购自美国 Beckman-Coulter 公司;溶血剂为 0.83% 的氯化铵溶液,由安徽医科大学第二附属医院血液病实验室用去离子蒸馏水自行配制。流式细胞仪为美国 Beckman-Coulter 公司 FC500 系列,荧光激发光波长为 488 nm 和 633 nm,分析软件为 CXP 系统。

1.3 实验方法

1.3.1 血清生化检测 所有患者常规检测血常规、肝肾功能、血糖、血脂,同时采用免疫散射比浊法测定 hs-CRP。

1.3.2 流式细胞仪检测 Treg 细胞的百分率 患者均于夜间禁食 12 h 后清晨空腹平卧位、严格无菌操

2013-11-25 接收

作者单位:安徽医科大学第二附属医院心血管内科,合肥 230601

作者简介:徐林杰,女,硕士研究生;

吴继雄,男,副教授,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-

mail:WJX8261@163.com

作采集肘静脉血 2 ml 肝素抗凝 4 h 内送检血液病学实验室行流式细胞仪检测。检测时首先根据前向 (FSC) 和侧向 (SSC) 散射光信号对淋巴细胞群进行设门,每份标本获取设门内细胞在 10 000 个以上。将收集的全血 1 500 r/min 离心 5 min 弃上清液,留取沉淀细胞并打散,加入 PBS,再反复离心洗涤 3 次,制成细胞悬液,调整细胞数为 $(1 \sim 6) \times 10^6$ /ml。采用三色直接免疫荧光标记法:首先取 2 支试管分别加入抗凝全血 100 μ l,其中一管加入 CD25-FITC、CD127-PE 以及 CD4-PC5-Cy5 单抗各 10 μ l,另一管则作为对照管加入 CD4-PC5-Cy5、FITC-IgG1 和各单抗相对应的同型对照 PE 10 μ l,充分混匀后室温下避光孵育 15 min,加入 1 ml 溶血剂,37 $^{\circ}$ C 水浴箱内放置 10 min 左右,待完全溶血后立刻上流式细胞仪检测,检测后数据以 Listmode 文件形式保存。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,符合正态分布和方差齐性检验的计量资料多组间比较采用单因素方差分析 (ANOVA) 进一步两两比较采用 LSD 检验,计数资料间比较采用 χ^2 检验,部分指标采用 Pearson 直线相关分析。

2 结果

2.1 各组一般临床资料的比较 各组年龄、性别、吸烟、高血压、空腹血糖 (Glu)、总胆固醇 (TC)、三酰甘油 (TG)、低密度脂蛋白 (LDL-c) 等冠心病危险因素的比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。ACS 组和 SAP 组高密度脂蛋白 (HDL) 水平明显低于正常对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.01$),而 ACS 组和 SAP 组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见表 1。

2.2 各组外周血 Treg 细胞检测的比较 ACS 组外周血 CD4⁺CD25⁺CD127^{low} 占 CD4⁺ 细胞比例明显低

表 1 各组一般情况 ($\bar{x} \pm s$)

项目	正常对照组 (n=24)	SAP 组 (n=24)	ACS 组 (n=48)	F/ χ^2 值	P 值
男/女(例)	15/9	15/9	34/14	0.750	0.687
高血压(例)	9	15	30	4.571	0.102
糖尿病(例)	9	15	30	0.643	0.725
吸烟(例)	8	15	18	5.236	0.073
年龄(岁)	58.63 \pm 10.34	56.88 \pm 9.09	61.77 \pm 10.19	2.137	0.124
Glu(mmol/L)	5.50 \pm 0.66	5.73 \pm 0.52	5.60 \pm 1.18	0.350	0.706
TC(mmol/L)	3.86 \pm 0.84	3.99 \pm 1.21	3.62 \pm 1.06	1.119	0.331
TG(mmol/L)	1.14 \pm 0.45	1.09 \pm 0.52	0.91 \pm 0.60	1.691	0.190
LDL-c(mmol/L)	2.43 \pm 0.59	2.32 \pm 1.05	2.41 \pm 0.87	0.144	0.866
HDL(mmol/L)	1.30 \pm 0.32	0.84 \pm 0.41 ^{**}	0.91 \pm 0.35 ^{**}	11.894	0.000

与正常对照组比较: ** $P < 0.01$

于正常对照组和 SAP 组,差异有统计学意义 ($P < 0.01$),SAP 组外周血 CD4⁺CD25⁺CD127^{low} 占 CD4⁺ 细胞比例与正常对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见表 2、图 1。ACS 组外周血 Treg 细胞/CD4⁺CD25⁺CD127^{high} 比值低于正常对照组 ($P < 0.01$),而 SAP 组和正常对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见表 2。

表 2 各组外周血流式细胞仪检测结果 ($\bar{x} \pm s$)

项目	正常对照组 (n=24)	SAP 组 (n=24)	ACS 组 (n=48)	F 值	P 值
CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ^{low} 占 CD4 ⁺ 细胞比例 (%)	5.64 \pm 1.63	5.60 \pm 1.56	3.18 \pm 1.76 ^{**###}	25.247	0.000
CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ^{high} 占 CD4 ⁺ 细胞比例 (%)	5.41 \pm 2.01	5.40 \pm 2.24	5.69 \pm 1.81	0.243	0.785
Treg 细胞/CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ^{high}	1.30 \pm 0.60	1.07 \pm 0.41	0.94 \pm 0.34 ^{**}	5.644	0.005

与正常对照组比较: ** $P < 0.01$;与 SAP 组比较: ### $P < 0.01$

2.3 各组外周血 hs-CRP、PWBC 计数比较 统计结果显示:ACS 组 hs-CRP、PWBC 计数均明显高于正常对照组和 SAP 组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),

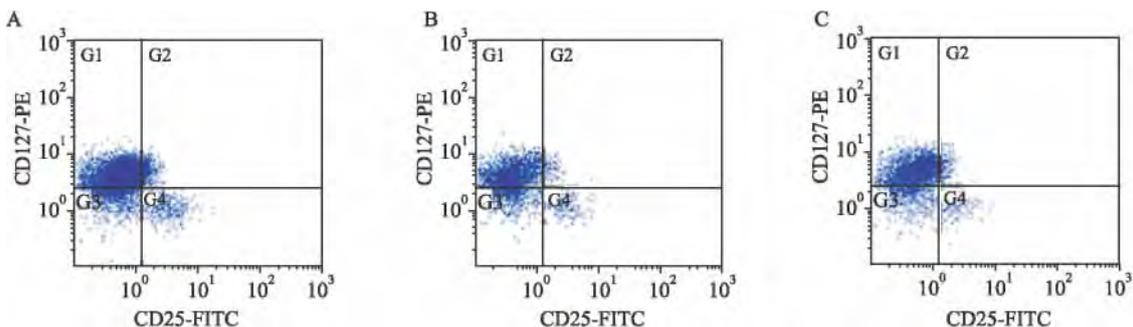


图 1 各组 Treg 细胞的流式检测图

A: 正常对照组; B: SAP 组; C: ACS 组; G2: CD4⁺CD25⁺CD127^{high} 占 CD4⁺ 细胞的比例; G4: CD4⁺CD25⁺CD127^{low} 占 CD4⁺ 细胞比例

SAP 组中 PWBC 计数与正常对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$), hs-CRP 水平比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 3。

表 3 各组外周血 hs-CRP、PWBC 计数的比较 ($\bar{x} \pm s$)

项目	正常对照组 (n=24)	SAP 组 (n=24)	ACS 组 (n=48)	F 值	P 值
hs-CRP(mg/L)	2.82 ± 2.86	3.14 ± 3.04	7.36 ± 1.77***	39.140	0.000
PWBC($\times 10^9/L$)	5.54 ± 1.12	6.86 ± 0.77**	7.65 ± 1.63***	19.696	0.000

与正常对照组比较: ** $P < 0.01$; 与 SAP 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.4 CD4⁺CD25⁺CD127^{low} 占 CD4⁺ 细胞比例与 hs-CRP、PWBC 计数的相关性 对上述 3 项指标采用 Pearson 直线相关分析, 结果显示 CD4⁺CD25⁺CD127^{low} 占 CD4⁺ 细胞比例和 hs-CRP、PWBC 计数呈负相关 ($P < 0.01$), 见表 4。hs-CRP 和 PWBC 计数具有正相关性 ($r = 0.296$, $P = 0.03$)。

表 4 CD4⁺CD25⁺CD127^{low} 占 CD4⁺ 细胞比例与 hs-CRP、PWBC 计数的相关性分析

项目	r 值	P 值
hs-CRP(mg/L)	-0.518	0.000
PWBC($\times 10^9/L$)	-0.311	0.002

3 讨论

ACS 是由于冠状动脉内不稳定的斑块破溃和斑块内出血, 继发血栓形成, 导致冠状动脉管腔堵塞的一组临床综合征, 其病程包括炎症反应和自身免疫反应^[3]。Treg 细胞是一组具有免疫负调节功能的 T 细胞亚群, CD4⁺CD25⁺Treg 细胞为其中数量少而作用重要的一群 T 淋巴细胞, 具有免疫抑制性和免疫无能性, 通过细胞间接触和分泌具有抑制作用的细胞因子来发挥免疫负调节作用, 维持机体内环境的稳定^[4]。CD127 是 IL-7 受体 α 链, 在 T 淋巴细胞的增殖、分化和成熟中起重要作用, CD127 在 Treg 细胞中低表达, 联合应用 CD25 高表达和 CD127 低表达, 能够有效去除 CD25⁺T 淋巴细胞中效应 T 淋巴细胞, 从而准确反映 Treg 细胞的数量^[5]。

研究^[6-7]显示通过输注或诱导产生 Treg 细胞可延缓 AS 的发展、抑制动脉粥样硬化斑块的形成, 表明 Treg 细胞在 AS 及 ACS 的调节中起着重要的作用。Sardella et al^[8]研究发现 ACS 患者的 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞数量减少, 并且其抑制 CD4⁺

CD25⁺效应 T 淋巴细胞增殖的能力减弱。本研究通过流式细胞仪检测 ACS 组、SAP 组及正常对照组外周血 CD4⁺CD25⁺CD127^{low}Treg 细胞表达水平, 结果显示 ACS 组外周血 CD4⁺CD25⁺CD127^{low} 占 CD4⁺细胞比例显著低于 SAP 组和正常对照组, 推测可能由于 CD4⁺CD25⁺CD127^{low}Treg 细胞的数量减少减弱了对机体炎症反应的抑制作用, 机体更易于发生炎症免疫应答, 从而导致炎症激活、斑块不稳定及 ACS 的发生。因此, 对 CD4⁺CD25⁺CD127^{low}Treg 细胞的检测有可能作为衡量动脉粥样硬化斑块是否稳定的指标之一。此外, SAP 组的 Treg 细胞表达与正常对照组比较差异无统计学意义, 可能由于 SAP 患者体内多是稳定性斑块, 并且局部炎症反应较轻。

CD4⁺效应性 T 细胞活化后高表达 CD127 (CD127^{high}), 而真正的 Treg 细胞低表达 CD127 (CD127^{low}), 因此 CD127^{high} 可作为机体活化效应性 T 细胞的表面标志物^[9]。王剑等^[10]研究发现 CD4⁺CD25⁺CD127^{low}Treg 细胞具有抑制效应性 T 淋巴细胞增殖的能力, 而且随着 CD4⁺CD25⁺CD127^{low}Treg 细胞的减少, CD4⁺CD25⁺CD127^{high}T 淋巴细胞的增殖指数逐步升高。基于 Treg 细胞与效应性 T 淋巴细胞的相互抑制作用, 控制 Treg 细胞/CD4⁺CD25⁺CD127^{high} 的比值、提高效应性 T 淋巴细胞对 Treg 细胞的抑制作用可能为 ACS 患者提供一种新的免疫治疗方案^[11]。

CRP 是人体非特异性炎症反应最敏感的标志物之一, 目前 hs-CRP 在 AS 发生发展过程中的作用日益明显, hs-CRP 可以作为炎症指标中预测心血管事件的独立因子^[12]。本研究结果显示, 正常对照组、SAP 组及 ACS 组 hs-CRP 水平呈上升趋势, 其中在 ACS 组升高显著, 表明体内可能存在内环境紊乱、炎症反应增加、免疫活动过强等情况。

Hillis et al^[13]研究发现 PWBC 计数水平在冠心病患者中明显升高, 而且病变严重时和急性期更加明显, 同时发生 PWBC 计数水平与 ACS 患者住院不良事件的发生呈显著正相关。本研究结果显示, ACS 组的 PWBC 水平较 SAP 组和正常对照组显著升高, SAP 组 PWBC 水平较正常对照组也明显升高。同时 CD4⁺CD25⁺CD127^{low} 占 CD4⁺ 细胞比例与 hs-CRP、PWBC 计数的相关性分析显示其存在负性相关, 表明冠心病患者体内炎症反应高度激活, 免疫活动过强与体内 CD4⁺CD25⁺CD127^{low}Treg 细胞降低存在一定联系, 但其具体机制尚不明确, 需要进一

步研究。

综上所述,CD4⁺CD25⁺CD127^{low}Treg 细胞在 AS 和 ACS 的发生、发展中扮演了很重要的角色,但由于本研究的样本量较小,实验结果存在一定的局限性。今后通过更大样本、更完善的临床试验深入研究 Treg 细胞在 AS 及 ACS 中的免疫调节机制,有助于寻找免疫治疗新策略。

参考文献

[1] Singh S K ,Suresh M V ,Voleti B ,et al. The connection between C-reactive protein and atherosclerosis [J]. *Ann Med* 2008 40(2): 110 - 20.

[2] 凌 佳,朱彦琪,金 炜. 急性冠脉综合征患者血清调节性 T 细胞的变化及其临床意义 [J]. *中国心血管杂志* 2008 4(13): 258 - 61.

[3] Hansson G K ,Hermansson A. The immune system in atherosclerosis [J]. *Nat Immunol* 2011 12(3):204 - 12.

[4] Shigematsu Y ,Hanagiri T ,Shiota H ,et al. Immunosuppressive effect of regulatory T lymphocytes in lung cancer ,with special reference to their effects on the induction of autologous tumor-specific cytotoxic T lymphocytes [J]. *Oncol Lett* 2012 4(4):625 - 30.

[5] 王会平,翟志敏,张爱梅,等. CD4⁺CD25⁺CD127^{low} 识别人外周血 CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞的优势 [J]. *分子与细胞免疫学* 2008 24(12):1059 - 62.

[6] Li H ,Ding Y ,Yi G ,et al. Establishment of nasal tolerance to heat

shock protein-60 alleviates atherosclerosis by inducing TGF-β-dependent regulatory T cells [J]. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2012 32(1):24 - 30.

[7] Zhong Y ,Wang X ,Ji Q ,et al. CD4⁺LAP⁺ and CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells induced by nasal oxidized low-density lipoprotein suppress effector T cells response and attenuate atherosclerosis in ApoE - / - mice [J]. *J Clin Immunol* 2012 32(5): 1104 - 17.

[8] Sardella G ,De Luca L ,Francavilla V ,et al. Frequency of naturally-occurring regulatory T cells is reduced in patients with ST-segment elevation myocardial infarction [J]. *Thromb Res* 2007 120(4):631 - 4.

[9] 钱晓君,赵 磊,陆友金,等. CD4⁺CD25⁺CD127^{low} 调节性 T 细胞在结核性及恶性胸腔积液患者中的表达及意义 [J]. *安徽医科大学学报* 2013 48(3):279 - 82.

[10] 王 剑,袁向亮,李美星,等. CD4⁺CD25⁺CD127^{low} 细胞体外抑制效应 T 淋巴细胞增殖的影响 [J]. *中华检验医学杂志* 2009 32(3):340 - 3.

[11] 于益芝,曹雪涛. 调节性 T 细胞在肿瘤免疫和肿瘤免疫治疗中的作用 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志* 2010 17(1):1 - 6.

[12] Anand S S ,Yusuf S. C-reactive protein is a bystander of cardiovascular disease [J]. *Eur Heart J* 2010 31(17):2092 - 6.

[13] Hillis G S ,Dalsey W C ,Terregino C ,et al. Altered CD18 leukocyte integrin expression and adhesive function in patients with an acute coronary syndrome [J]. *Heart* 2001 85(6):702 - 4.

The change and clinical significance of circulating CD4⁺CD25⁺CD127^{low} regulatory T cells in patients with acute coronary syndrome

Xu Linjie ,Wu Jixiong ,Xu Banglong ,et al

(Dept of Cardiology ,The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University Hefei 230601)

Abstract Objective To investigate the change of CD4⁺CD25⁺CD127^{low} regulatory T (Treg) cells in peripheral blood of patients with acute coronary syndrome (ACS) and explore its clinical significance. **Methods** 96 subjects were divided into three groups: ACS (n = 48) ,stable angina pectoris (SAP n = 24) and normal patients (n = 24) . CD4⁺CD25⁺CD127^{low} Treg cells were detected by flow cytometry ,and the levels of high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) ,peripheral white blood cells (PWBC) were tested in each group. **Results** The ratio of CD4⁺CD25⁺CD127^{low}Treg cells in peripheral blood of patients with ACS [(3.18 ± 1.76) %] was significantly lower than that of normal patients [(5.64 ± 1.63) %] and patients with SAP [(5.60 ± 1.56) %] (F = 25.247 ,P < 0.01) . The levels of hs-CRP ,PWBC in patients with ACS were higher than that of normal patients and patients with SAP (P < 0.05) . Besides ,the level of CD4⁺CD25⁺CD127^{low}Treg cells was negatively correlated with hs-CRP and PWBC (r = -0.518 , -0.311 respectively; P < 0.01) . **Conclusion** In ACS patients ,the decreased Treg cells may participate in the development of atherosclerosis through break the balance of peripheral immune-tolerance and activate the inflammatory response.

Key words acute coronary syndrome;regulatory T cells;high-sensitivity C-reactive protein;white blood cell;flow cytometry