

哮喘患者外周血 Treg 和 Th1/Th2 的变化及其与哮喘病情的关系 *

金 跃¹ 张建明¹ 陈建平¹ 潘玉琴² 何帮顺² 王书奎^{2Δ}

(1 淮安市第二人民医院检验科 江苏 淮安 223200; 2 南京医科大学附属南京第一医院中心实验室 江苏 南京 210006)

摘要 目的:探讨哮喘患者外周血调节性 T 细胞(Treg)以及辅助性 T 细胞(Th1/Th2)的比例的变化,探讨其在哮喘的临床治疗中的作用。方法:80 例哮喘患者(哮喘组)按临床表现分为急性发作期组(54 例)和缓解期组(26 例),同时选择 50 例健康体检者。应用流式细胞仪检测上述各组外周血 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg、CD4⁺IFN- γ + Th1 和 CD4⁺IL-4⁺Th2 细胞水平,并进行统计学分析。结果:哮喘组 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg 水平亦明显低于正常对照组($P < 0.05$)。其中急性发作期组 Treg 水平明显低于缓解期组和正常对照组($P < 0.05$)。而哮喘组 Th1/Th2 比值显著低于对照组($P < 0.05$),且在哮喘急性发作组中 Th1/Th2 比值显著低于缓解期组和正常对照组($P < 0.05$)。结论:提示 Treg 和 Th 在哮喘的发生和发展中起着重要的作用。

关键词:哮喘;调节性 T 细胞;辅助性 T 细胞;流式细胞术

中图分类号:R562.25 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2011)02-326-03

The changes of regulatory T cells and T helper cell in peripheral blood and their significance in patients with asthma*

JIN Yue¹, ZHANG Jian-ming¹, CHEN Jian-ping¹, PAN Yu-qin², HE Bang-shun², WANG Shu-kui^{2Δ}

(1 Inspection Division, Traditional Chinese Medicine Hospital of Huanan, Huanan 223200, Jiangsu, China;

2 Central Laboratory, Nanjing First Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing 210006, Jiangsu, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the changes of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells (Treg) and T helper cell (Th1/Th2) in peripheral blood and their significance in the severity of patients with asthma. **Methods:** Eighty patients with asthma (asthma group) were divided into acute attack stage group (54 cases) and remission stage group (26 cases) according to their clinical features. Meanwhile, fifty health volunteers were enrolled as control group. The levels of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg, CD4⁺IFN- γ + Th1 and CD4⁺IL-4⁺ Th2 in peripheral blood of all children were tested by flow cytometer (FCM), and analyzed statistically. **Results:** The levels of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg of patients with asthma were lower than those in the control group ($P < 0.05$). The Treg levels in acute patients group were lower than those in remission group or in the control group ($P < 0.05$). The ratio of Th1/Th2 of patients with asthma were lower than those in the control group ($P < 0.05$), and The Th1/Th2 ratio in acute attack group were lower than those in remission group or in the control group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Treg and Th immunity plays an important role in the pathogenesis of asthma.

Key words: Asthma; Regulatory T cells; T helper cell; Flow cytometry

Chinese Library Classification (CLC): R562.25 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2011)02-326-03

Th1/Th2 平衡理论作为过敏性疾病如支气管哮喘发病机制中的核心已为大多数人所接受。最近的研究表明免疫耐受的破坏也是哮喘发病的重要环节。日本学者 Sakaguchi 等于 1995 年首次报道了一种 CD4⁺CD25⁺ 调节性 T (regulatory T cell, Treg) 细胞,研究证明这群 T 细胞在自身耐受的维持中发挥着重要的作用,最近的研究表明该细胞除了能表达细胞表面分子 CD4 和 CD25 外,还能表达一种细胞核内蛋白 - Foxp3,越来越多的研究表明 Foxp3 是调节 T 细胞的特异性标志^[1-2] 研究表明 Foxp3 突变的小鼠出现过敏性气道炎症,以及明显的 IgE 和嗜酸性粒细胞增高、Th1/Th2 型细胞因子失衡^[3]。Foxp3 是 CD4⁺CD25⁺ Treg 分化发育的关键基因。因此本文采用流式细胞术三色和四色标记法同时检测哮喘患者外周血 Treg 和 Th1/Th2 的变化,以探讨其在哮喘发病机制中的作用。

1 资料和方法

1.1 临床资料

选择本院 2009 年 3 月 - 2010 年 3 月呼吸科门诊及住院哮喘患者 80 例,男 58 例,女 22 例,平均年龄 35 ± 12 岁。按临床表现分为急性发作期组(54 例)和缓解期组(26 例),诊断均符合 2003 年中华医学会呼吸病学分会哮喘学组制定的诊断标准^[4]。对照组为健康体检者 50 例,男 35 例,女 15 例,平均年龄 31 ± 14 岁,近期无感染性疾病。

1.2 试剂和设备

鼠抗人 CD4-FITC 单克隆抗体、鼠抗人 CD25-PE 单克隆抗体及其相匹配的同型对照均购自美国 BD PharMingen 公司,鼠抗人 Foxp3-APC 单克隆抗体和 Fixation /Perm 购自美国 e-

* 基金项目"南京医科大学科技发展基金面上项目(09NMUM070)

作者简介:金跃(1968-),男,江苏淮安人,主任技师,从事医学检验专业

Δ通讯作者:王书奎(1967-),男,主任技师,医学博士,从事肿瘤免疫学专业。E-mail: sk_wang@njmu.edu.cn

(收稿日期:2010-10-06 接受日期:2011-10-31)

Bioscience 公司。鼠抗人 CD3-PC5 单克隆抗体、鼠抗人 CD8-PC7 单克隆抗体、鼠抗人 IFN- γ -FITC 单克隆抗体和鼠抗人 IL-4-PE 单克隆抗体及其相匹配的同型对照均购自美国贝克曼公司,Fix&Perm 购自美国贝克曼公司,刺激剂(Leukocyte Activation Cocktail)购自美国 BD Pharmingen 公司。流式细胞仪是美国 BD 公司的 FACSCanto。

1.3 实验方法

1.3.1 Treg 的检测 每例患者清晨空腹使用肝素抗凝管抽取静脉血 3ml,取 100 μ l 全血,加入 CD4-FITC 与 CD25-PE cocktail 各 10 μ l,于 4℃ 避光孵育 30 min;加 1ml 红细胞裂解液室温溶血 10 min,生理盐水洗涤 3 次,1200rpm/min,5min。洗涤后加入 1 mL Fixation /Perm 缓冲液破膜固定 45 min,用洗涤缓冲液洗涤 2 次,1200rpm/min,5min。加入 10 μ l 鼠抗人 Foxp3-APC 单克隆抗体于 4℃ 避光孵育 30 min。经洗涤缓冲液洗涤 2 次,1200rpm/min,5min。用 300 μ l flow cytometry staining buffer 重悬并上 FACSCanto 检测。采用 BD FACSDiva 软件分析数据,计算 CD4 $^{+}$ 细胞中 Foxp3 $^{+}$ 细胞百分率。每个样本每次检测细胞数为 1×10^4 。

1.3.2 Th1/Th2 的检测 取 100 μ l 全血标本,用 RPMI 1640(不含小牛血清 -FBS) 1:1 等体积稀释;各管加入刺激剂 10 μ l,37℃,5% CO $_2$ 培养箱培养 4~6 小时。混匀,加入 10 μ l CD3-PC5 和 10 μ l CD8-PC7,室温,避光孵育 15 分钟;每管中加入 100 μ l Fix&Perm 中的 Reagent 1 (即固定液),室温,避光孵育 15 分钟;每管中加入 3mL PBS,1200 rpm 离心 5 分钟,弃除上清。每管中加入 100 μ l Fix&Perm 中的 Reagent 2(即破膜和溶血液),同时各管中加入 IFN- γ -FITC 和 IL-4-PE10 μ l,室温,避光孵育 15 分钟。每管中加入 3mL PBS,1200 rpm 离心 5 分钟,弃除上清;0.5mL PBS 重悬细胞,上机检测。每个样本每次检测

1×10^4 细胞。

1.4 统计学方法

实验数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。使用 Stata7.0 软件进行分析,各组间均数的差异比较用 t 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 各组患者的 CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ Foxp3 $^{+}$ Treg 水平比较

哮喘组患者外周血 CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ Foxp3 $^{+}$ Treg 占 CD4 $^{+}$ T 细胞的(1.03 ± 0.54)%,明显低于正常对照组的(2.74 ± 0.74)% ($P < 0.05$)。哮喘组中急性发作期患者外周血 CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ Foxp3 $^{+}$ Treg 占 CD4 $^{+}$ T 细胞的 (0.96 ± 0.45)%,比缓解期组患者的(2.31 ± 1.24)%及正常对照组 (2.74 ± 0.74)%均降低($P < 0.05$),而缓解期与对照组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)(见表 1)。

2.2 各组患者的 Th1/Th2 水平比较 哮喘组患者 Th 亚群分类与正常组相比有明显改变

哮喘组中急性发作期患者外周血 CD4 $^{+}$ IFN- γ + Th1 (11.53 ± 5.68)%与缓解期组患者的(14.75 ± 5.81)%及正常对照组 (18.14 ± 6.29)%比较均降低 (均为 $P < 0.05$);而 CD4 $^{+}$ IL-4 $^{+}$ Th2(4.16 ± 1.56)与缓解期组(2.23 ± 0.91)和正常组(2.05 ± 0.54)比较显著升高 ($P < 0.05$);从而导致急性发作期患者外周血 Th1/Th2 比值(3.29 ± 1.34)明显低于缓解期组(9.24 ± 2.51)和正常组(10.16 ± 2.75)($P < 0.05$),提示哮喘患者急性发作期的 Th 亚群存在着明显失衡状态。而缓解组与对照组比较,CD4 $^{+}$ IL-4 $^{+}$ Th2 及 Th1/Th2 比值之间的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)(见表 1)。

表 1 各组患者外周血 Treg、Th1 和 Th2 细胞的百分率比较($\bar{x} \pm s$) %
Table 1 The proportion of Tregs, Th1 and Th2 in different groups ($\bar{x} \pm s$) %

Groups	Cases	Treg CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ Foxp3 $^{+}$	Th1 CD4 $^{+}$ IFN- γ +	Th2 CD4 $^{+}$ IL-4 $^{+}$	Th1/ Th2
Control	50	2.74 ± 0.74	18.14 ± 6.29	2.05 ± 0.54	10.16 ± 2.75
Acute attack stage Group	54	$0.96 \pm 0.45^{* \Delta}$	$11.53 \pm 5.68^{* \#}$	$4.16 \pm 1.56^{* \#}$	$3.29 \pm 1.34^{* \#}$
Remission stage Group	26	2.31 ± 1.24	14.75 ± 5.81	2.23 ± 0.91	9.24 ± 2.51

Note: compared with control group * $P < 0.01$; compared with remission stage group # $P < 0.01$; compared with control group $\Delta P < 0.01$.

3 讨论

支气管哮喘是一种较为常见的慢性呼吸道疾病,其发病机制复杂,与内分泌、免疫和遗传等多种因素密切相关^[5-8]。越来越多的研究表明免疫功能紊乱在支气管哮喘的发病机制中发挥重要的作用。研究表明 Th2 优势应答及 Th1/Th2 比例失衡在哮喘的发病中起着重要的作用^[9]。而 Treg 是一群具有免疫抑制效应的 T 细胞,研究表明其在维持机体自身耐受以及抑制自身免疫性疾病的过程中发挥了重要作用^[10-12]。Treg 为 CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ T 细胞,同时高表达 Foxp3^[13-15]。它是不同于 Th1 和 Th2 细胞的一种免疫调节性 T 细胞,具有使机体通过调节外周免疫耐受来控制免疫性疾病的功能^[16]。Treg 细胞在哮喘发病中的作用已得

到越来越多的研究,但其作用机制尚不明确。高正仪等^[17]的研究发现,CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ Treg 细胞在小鼠哮喘模型的脾脏中显著低于正常鼠,其数量以及抑制功能均显著降低,因此认为 Treg 数量和抑制功能降低可能是导致支气管哮喘发病的重要原因。Jaffar 等^[18]研究表明,CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ Treg 能够有效地抑制促进气道嗜酸性炎症形成的 Th2 的产生以及 Th2 所诱导的嗜酸粒细胞在气道的聚集。Taylor 等^[19]也推测 Treg 细胞可通过分泌的 IL-10 及 TGF- β , 从而抑制 Th2 细胞产生 IL-4, IL-5 和 IL-13, 进一步降低 IgE 的产生;抑制了嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞及肥大细胞的致炎作用,从而直接抑制变态反应性疾病。而 Shi 等^[20]实验结果发现过敏性哮喘患者急性发作期血 CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ Treg 细胞数目显著增加,但哮喘稳定期、非哮喘过敏症

及正常人群并无显著改变,且 Treg 细胞对 Th1 和 Th2 的抑制作用无显著性差别。本文结果发现,哮喘组患者外周血 Treg 水平明显低于正常对照组,这提示哮喘患者体内存在 Treg 细胞免疫功能平衡失调,Treg 细胞处于低表达,不能有效抑制 CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞的活化增殖。本研究结果还显示哮喘急性发作期患者的外周血 Treg 水平显著低于缓解期以及对照组,而缓解组外周血 Treg 水平与正常组比较差异无统计学意义,此结果支持有关 Treg 数量减少,导致抑制免疫功能降低或呈低反应性可能是引起支气管哮喘发病机制的学说,结果表明哮喘患者症状的缓解可能与体内 Treg 水平的恢复密切相关。

本研究结果显示哮喘急性发作期患者外周血 Th1 显著降低,而外周血 Th2 显著增高,且 Th1/Th2 比值明显下降,说明在哮喘患者 Th 亚群之间的平衡发生了改变,引起 Th1 细胞相对减少而 Th2 细胞相对增加,与已有研究相一致。而缓解期组患者外周血 Th1 和 Th2 比例与对照组比较无显著差异,提示对 Th 细胞亚群的研究,将在哮喘患者的临床诊断、预后判断中发挥重要作用。

综上所述,寻找有效的途径来提高哮喘患者体内 Treg 细胞的数量以及功能,恢复 Th1/Th2 的免疫应答平衡,进而来控制哮喘的发生以及发展已变得尤为关键。通过本文以及已有的关于哮喘与 Treg 关系的研究,将为哮喘的免疫治疗方案提供坚实的基础。

参考文献(References)

- [1] 陈广洁. Foxp3 和 CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞研究进展 [J]. 国外医学:免疫学分册, 2005, 28(1):1-4
Guangjie Chen. The research of Foxp3 and CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell [J]. Foreign Medical: Immunology volumes, 2005, 28(1):1-4(In Chinese)
- [2] Schubert LA, Jeffery E, Zhang Y, et al. Scurfin (Foxp3) acts as a repressor of transcription and regulates T cell activation. J Biol Chem, 2001, 276 (40): 37672-37679
- [3] Lin W, Truong N, Grossman WJ, et al. Allergic dysregulation and hyperimmunoglobulin emia in Foxp3 mutant mice [J]. J Allergy Clin Immunol, 2005, 116(5): 1106-1115
- [4] 中华医学会呼吸病学分会哮喘学组. 支气管哮喘防治指南(支气管哮喘的定义、诊断、治疗及教育和管理方案) [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2003, 26 (2):132-138
Chinese Medicine Respiratory Diseases Asthma Study Group. Bronchial Asthma Guide (the definition of asthma, diagnosis, treatment and education and management programs [J]. Journal of Tuberculosis and Respiratory Diseases, 2003, 26(2):132-138(In Chinese)
- [5] 洪建国. 小儿危重哮喘的处理 [J]. 实用儿科临床杂志, 2006, 21(2): 196-198
Jianguo Hong. Treatment of severe asthma in children [J]. Journal of Applied Clinical Pediatrics, 2006, 21(2): 196-198(In Chinese)
- [6] 张建华, 张学兰, 季正华, 等. 支气管哮喘患儿血管紧张素 II 的致炎作用 [J]. 实用儿科临床杂志, 2006, 21(2):196-198
Jianhua Zhang, Xuelan Zhang, Zhenghua Ji, et al. Angiotensin II induced inflammation in bronchial asthma infant [J]. Journal of Applied Clinical Pediatrics, 2006, 21(2):196-198(In Chinese)
- [7] 姚德胜, 李伯坝, 刘江峰. α -细辛脑对哮喘豚鼠气道炎症的影响 [J]. 新乡医学院学报, 1998, 15(3):214-215
Desheng Yao, Li Boxun, Liu Jiangfeng. α -asarone in asthmatic airway inflammation in guinea pigs [J]. Journal of Xinxiang Medical College, 1998, 15 (3):214-215(In Chinese)
- [8] 袁晓梅, 郭悦鹏. 转化生长因子 β 1 与哮喘的相关性及川芎嗪治疗哮喘的研究进展 [J]. 新乡医学院学报, 2006, 23 (2): 207-210
Xiaomei Yuan, Yuepeng Guo. Transforming growth factor β 1 and asthma in the research and progress in the treatment of asthma TMP [J]. Journal of Xinxiang Medical College, 2006, 23 (2): 207-210(In Chinese)
- [9] Robinson DS. Th2 cytokines in allergic disease [J]. Br Med Bull, 2000, 56(4):956-968
- [10] Tsitoura DC, Blumenthal RL, Berry G, et al. Mechanisms preventing allergen-induced airways hyperreactivity: role of tolerance and immune deviation [J]. J Allergy Clin Immunol, 2000, 106(2): 239-246
- [11] Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, et al. Stimulation of CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance [J]. Nat Immunol, 2002, 122 (3): 135-142
- [12] Pasare C, Medzhitou R. Toll pathway-dependent blockade of CD4⁺CD25⁺ T cell-mediated suppression by dendritic cells [J]. Science, 2003, 299(5609):1033-1036
- [13] Hanaki K, Momo A, Oku T, et al. Semiconductor quantum dot/albumin complex is a long-life and highly photostable endosome marker [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 302(3): 496-501
- [14] Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, et al. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases [J]. J Immunol, 155 (3): 1151-1164
- [15] Jonuleit H, Schnitt E, Stassen M, et al. Identification and functional characterization of human CD4⁺CD25⁺ T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood [J]. J Exp Med, 2001, 193 (11):1285-1294
- [16] 李莹莹, 冯学斌. CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞在支气管哮喘中的研究进展 [J]. 国际内科学杂志, 2007, 34 (9): 545-548
Yingying LI, Xuebin Feng. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in bronchial asthma research progress [J]. International Journal of Internal Medicine, 2007, 34 (9): 545-548(In Chinese)
- [17] 高正仪, 张冬青, 肖家祁, 等. CD4⁺CD25⁺FOXP3 调节性 T 细胞细胞与哮喘发病关联性的实验研究 [J]. 中国微循环, 2004, 8(4): 249-250
Zhengyi Gao, Dongqing Zhang, Jiaqi Xiao, et al. CD4⁺CD25⁺FOXP3 regulatory T cells associated with asthma Experimental study [J]. Journal of Chinese Microcirculation, 2004, 8(4): 249-250(In Chinese)
- [18] Jaffar Z, Sivakunu T, Roberts K. CD4⁺CD25⁺ T cells regulate airway eosinophilic inflammation by modulating the Th2 cell phenotype [J]. J Immunol, 2004, 172(6):3842-3849
- [19] Taylor PA, Noelle RJ, Blazar BR. CD4⁺CD25⁺ immune regulatory T cells are required for induction of tolerance to alloantigen via costimulatory blockade [J]. J Exp Med, 2001, 193(11): 1311-1318
- [20] Shi HZ, Li S, Xie ZF, et al. Regulatory CD4⁺CD25⁺ T Lymphocytes in peripheral blood from patients with atopic asthma [J]. Clin Immunol, 2004, 113(2):172-178