

## 初发系统性红斑狼疮患者外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞和 TGF-β1 含量

谭国珍, 罗益金, 曾凡钦\*

(中山大学附属第二医院皮肤科, 广东 广州 510120)

**摘要:**【目的】了解初发系统性红斑狼疮(SLE)患者外周血中 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞和 TGF-β1 在 SLE 发病中的作用。【方法】流式细胞仪检测 25 例初发未治疗的 SLE 患者和 15 例健康对照者外周血单个核细胞中 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup>调节性 T 细胞占 CD4<sup>+</sup> T 细胞的百分比,ELISA 检测血清中 TGF-β1 含量。【结果】SLE 患者 PBMC 中 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 细胞、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T 细胞占 CD4<sup>+</sup> T 细胞百分比均较健康对照组明显减少(分别为 7.9 ± 2.2 vs 12.5 ± 5.3 和 2.1 ± 1.1 vs 4.0 ± 1.8, P < 0.05)。SLE 患者血清中 TGF-β1 含量(pg/mL)低于健康对照组(214 ± 48 vs 419 ± 85, P < 0.05)。SLE 患者 PBMC 中 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 细胞、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T 细胞占 CD4<sup>+</sup> T 细胞的百分比以及血清 TGF-β1 的含量均与病情活动指数(DAI)成负相关(r 分别 = -0.68、-0.56、-0.53, P < 0.05),但各型 T 细胞占 CD4<sup>+</sup> T 细胞的百分比与血清 TGF-β1 的含量之间相关分析均无统计学意义。【结论】T<sub>reg</sub> 与 TGF-β1 参与 SLE 的发病,两者均可作为病情活动的观察指标。且血清 TGF-β1 的含量与 T<sub>reg</sub> 占 CD4<sup>+</sup> T 细胞的百分比在 SLE 中的下降趋势一致,提示两者之间存在一定的联系,推测是 TGF-β1 的不足导致 T<sub>reg</sub> 的生成减少。

**关键词:** 调节性 T 细胞; TGF-β1; 系统性红斑狼疮

**中图分类号:** R69      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1672-3554(2009)05-0636-03

系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)是一种较常见的全身多器官系统受累的自身免疫病,病因及发病机制未明,目前认为其根本原因是机体对自身抗原失去免疫耐受,自身反应性免疫细胞失去调控所致<sup>[1-2]</sup>。调节性 T 细胞(regulatory T cells, T<sub>reg</sub>)和转化生长因子 β(transforming growth factor-beta, TGF-β)在稳定机体的免疫平衡、维持机体免疫耐受中起着至关重要的作用。两者无论在数量上还是在功能上的缺陷均可导致自身免疫病的发生<sup>[3-4]</sup>。系统性红斑狼疮作为一种典型的自身免疫病,T<sub>reg</sub> 和 TGF-β 在疾病发生发展中的作用已引起了学者们的关注<sup>[3,5]</sup>。然而,迄今为止,对 T<sub>reg</sub> 和 TGF-β1 在 SLE 发病中的作用认识不足,两者在 SLE 中的相互关系缺乏研究。本研究拟观察初发 SLE 患者体内外周血单个核细胞(PBMC)中 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 细胞、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> T 细胞占 CD4<sup>+</sup> T 细胞的百分比及血清中 TGF-β1 水平,并进一步分析它们之间的相互关系及与病情活动的关系。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 研究对象

25 例 SLE 患者均为 2005 年 6 月-2008 年 2 月期间中山大学附属第二医院皮肤科门诊或住院患者,均符合 1997 年 ARA SLE 诊断标准,均为初次确诊未使用任何药物治疗者,均处于病情活动期(DAI ≥ 10 分),外周血采集经患者本

人同意。全部为女性;年龄 13 ~ 42 岁,平均年龄 27.0 岁;病程 2 月 ~ 1 年,平均 5 月;DAI 评分为 13 ~ 26,平均评分为 21.2。15 例健康志愿者均来自我院健康体检中心,性别、年龄与患者组相匹配,均为女性,年龄 12 ~ 42 岁,平均年龄 26.2 岁,无系统性疾病及免疫性疾病病史及家族史。外周血采集经志愿者同意。

#### 1.2 主要试剂

相对密度 1.077 ± 0.001 的聚蔗糖-泛影葡胺(天津 TBD),抗人 CD4-FITC、抗人 CD25-PE、抗人 Foxp3-APC(美国 eBioscience),人类 TGF-β1 ELISA Set(美国 BD 公司)。

#### 1.3 实验方法

1.3.1 T 细胞的检测 清晨采集空腹 SLE 患者、健康对照组外周血每人 8 mL,用肝素钠抗凝。采用人 Ficoll-Hypaque 淋巴细胞分层液的密度梯度离心法分离外周血单个核细胞。采用双色或三色荧光抗体标记流式细胞仪检测法检测新鲜外周血单个核细胞中调节性 T 细胞相关表型,计算出 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 细胞、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> T 细胞占 CD4<sup>+</sup> T 细胞的百分比。具体操作均由中山大学附属第二医院林百欣医学研究中心流式细胞仪室完成。

1.3.2 血清中 TGF-β1 含量的检测 收集病例组及对照组血清每人 300 μL,-20 °C 冰箱保存备用。严格按照 ELISA 试剂盒中的操作步骤,绘制出标准曲线,根据样品光密度值在标准曲线图上查出相应 TGF-β1 含量。

#### 1.4 统计学方法

收稿日期: 2009-05-22

基金项目: 广东省科技计划项目(2006B36005006)

作者简介: 谭国珍,博士,副主任医师,硕士生导师,主要从事系统性红斑狼疮的研究, E-mail: tgzzsy@163.com; \* 通信作者,曾凡钦,教授,博士生导师, E-mail: shenzqtgz@yahoo.com.cn.

采用 SPSS 13.0 统计软件包分析实验数据。各组间的差异比较采用单因素方差分析;两变量间的相关性分析采用 Pearson 回归相关分析法。显著性水准  $\alpha$  设为 0.05。

## 2 结果

### 2.1 SLE 患者 PBMC 中各型 T 细胞占 CD4<sup>+</sup>T 细胞的百分比

初发 SLE 患者 PBMC 中 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>T 细胞占 CD4<sup>+</sup>T 细胞百分比均较健康对照组明显减少,分别为  $7.9 \pm 2.2$  vs  $12.5 \pm 5.3$  ( $F = 15.08, P = 0.00$ )和  $2.1 \pm 1.1$  vs  $4.0 \pm 1.8$  ( $F = 18.924, P = 0.00$ ), 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

### 2.2 SLE 患者血清中 TGF-β1 的含量

初发 SLE 患者血清中 TGF-β1 含量 (pg/mL) 低于健康对照组 ( $214 \pm 48$  vs  $419 \pm 85, F = 95.680, P = 0.00$ ), 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

### 2.3 各型 T 细胞百分比及血清 TGF-β1 的含量与病情活动之间的相关分析

初发 SLE 患者 PBMC 中 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>T 细胞占 CD4<sup>+</sup>T 细胞的百分比以及血清 TGF-β1 的含量三者均与病情活动指数 (DAI) 成负相关 ( $P < 0.05$ ), 相关系数分别为  $r = -0.68, -0.56, -0.53$ , 但两种百分比与血清 TGF-β1 的含量之间相关分析均无统计学意义。

## 3 讨论

T<sub>reg</sub> 具有调控自身反应性 T 细胞的生成、活化、增殖的作用,在稳定机体免疫平衡、维持外周免疫耐受中起重要作用。动物实验表明 T<sub>reg</sub> 的异常是导致自身免疫病的直接原因。SLE 是一种典型的自身免疫性疾病,其抑制性 T 细胞 (T<sub>reg</sub>) 存在缺陷。有报道 SLE 患者体内 T<sub>reg</sub> 减少,并认为 T<sub>reg</sub> 的减少与 SLE 的发病有关<sup>[6]</sup>,但是这些研究在病例的选择上未能注意排除治疗药物如糖皮质激素等对 T<sub>reg</sub> 的影响,而事实上已有研究报道糖皮质激素可以上调 T<sub>reg</sub> 的百分比<sup>[7]</sup>。因此,我们选择了 25 例初发未使用过任何药物的活动期 SLE 患者为研究对象,更能客观地反映出 SLE 患者体内 T<sub>reg</sub> 的真实情况。我们同时检测 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>T 细胞,能更全面地了解 T<sub>reg</sub> 不同功能群的状况。结果发现,初发未治疗的活动期 SLE 患者 PBMC 中无论是 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞还是 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>T 细胞占 CD4<sup>+</sup>T 细胞的百分比均比健康对照组低,差异具有统计学意义。已知 CD25 分子高表达在 T<sub>reg</sub> 细胞上,同时也可表达在活化的 T 细胞表面,据以往的研究结果显示在活动期的 SLE 患者体内存在有 T 细胞的异常活化,因此,CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞亚群并不能完全真实地反映患者体内的 T<sub>reg</sub> 水平,患者体内的 T<sub>reg</sub> 的实际水平应较检测结果更低。Foxp3 是目前公认的 T<sub>reg</sub> 的特异性标志,检测 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>T 细胞较能反映真实的 T<sub>reg</sub> 水平,结果表明 SLE 患

者体内确实存在 T<sub>reg</sub> 的缺陷。此外,研究结果还发现 SLE 患者 PBMC 中 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>T 细胞百分比均与疾病活动指数成负相关。因此,我们推测 SLE 患者体内 T<sub>reg</sub> 比例减少,导致其对自身反应性淋巴细胞的抑制能力减弱,从而与 SLE 致病有关,且其数量与病情活动指数成负相关,可以作为临床病情观察的新指标。最近,国内外相继有学者对 SLE 患者体内 T<sub>reg</sub> 进行了研究, Lee 等发现儿童活动期 SLE 患者 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞比健康对照组和稳定期患者明显减少,并且与疾病的活动程度和抗 ds-DNA 滴度呈负相关<sup>[8]</sup>,结果与我们的一致。

在 SLE 患者体内存在细胞因子的异常, TGF-β1 作为一种免疫抑制因子在 SLE 发病中的作用已有少量的研究报道,发现 SLE 患者外周血中 TGF-β1 水平较正常人低,并且与疾病的活动度成负相关<sup>[9]</sup>。但这些研究在病例的选择上未排除激素等药物对 TGF-β 的影响,事实上已知环孢素 A、维甲酸等药物可以影响 TGF-β 的产生。为此,本研究选择了 15 例从未使用过任何药物的初发 SLE 患者为研究对象,结果发现初发患者血清 TGF-β1 的水平明显低于健康对照组,差异有统计学意义,且与病情活动指数成负相关,结果与 Hammad 等<sup>[9]</sup>报道的一致。说明 TGF-β1 的异常与 SLE 发病有关, TGF-β1 的含量可作为病情观察指标。推测 TGF-β1 的减少导致其免疫抑制作用减弱,使自身反应性 T、B 细胞过度增殖,产生大量自身抗体,导致疾病的发生发展。

SLE 患者 T<sub>reg</sub> 减少的原因尚不清楚。TGF-β1 是一种与 T<sub>reg</sub> 关系非常密切的细胞因子,无论在 T<sub>reg</sub> 功能的发挥上还是在在外周 T<sub>reg</sub> 数量的维持上均起着十分重要的作用<sup>[10-11]</sup>。

我们的研究发现初发的 SLE 患者中 T<sub>reg</sub> 与 TGF-β1 的变化趋势一致,均比健康对照低,虽未发现两者成明显的正相关,但根据以往的研究结果我们仍有理由推测两者之间存在一定的联系,是 TGF-β1 减少导致 T<sub>reg</sub> 的生成减少抑或是 T<sub>reg</sub> 减少导致 TGF-β1 的产生减少?既往有学者认为是 T<sub>reg</sub> 减少导致 TGF-β1 的生成减少,从而使 T<sub>reg</sub> 的功能发挥受到影响<sup>[12]</sup>。但我们认为前者的可能性更大,因为体内 TGF-β1 的来源广泛,可由各种淋巴细胞、巨噬细胞和树突细胞等合成和分泌,而 T<sub>reg</sub> 在体内的比例很少,在正常人体内 T<sub>reg</sub> 仅占总淋巴细胞的 5% 以下, SLE 患者更低, T<sub>reg</sub> 的减少并不足以引起 TGF-β1 的量减少。而 TGF-β1 则是体内诱导 T<sub>reg</sub> 产生的主要途径,以往研究证明 TGF-β1 可诱导初始 CD4<sup>+</sup>T 细胞转化为 T<sub>reg</sub>, 诱导 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 细胞转化为 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>T 细胞,因此推测 TGF-β1 的不足导致 T<sub>reg</sub> 的生成减少的可能性更大。它们之间的确切因果关系尚有待进一步研究。

总之,我们的研究发现 SLE 患者体内 PBMC 中 T<sub>reg</sub> 比例减少,血清 TGF-β1 含量降低,且均与病情活动成负相关,提示 T<sub>reg</sub> 与 TGF-β1 参与 SLE 的发病,两者均可作为病情活动的观察指标。且血清 TGF-β1 的含量与 T<sub>reg</sub> 的比例在 SLE 中的下降趋势一致,提示两者之间存在一定的联系,推测是 TGF-β1 的不足导致 T<sub>reg</sub> 的生成减少。

## 参考文献:

- [1] Salaman MR. A two-step hypothesis for the appearance of autoimmune disease [J]. *Autoimmunity*, 2003, 36(2):57-61.
- [2] 李玉杰, 李幼姬, 叶任高, 等. 系统性红斑狼疮外周血单个核细胞周期相改变及药物影响 [J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2003, 24(3):274-276.
- [3] Sakaguchi S. Naturally arising CD4<sup>+</sup> regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses [J]. *Annu Rev Immunol*, 2004, 22(8):531-562.
- [4] Shull MM, Ormsby I, Kier AB, et al. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease [J]. *Nature*, 1992, 359(6397):693-699.
- [5] Ohtsuka K, Gray JD, Stimmler MM, et al. The relationship between defects in lymphocyte production of transforming growth factor-beta1 in systemic lupus erythematosus and disease activity or severity [J]. *Lupus*, 1999, 8(2):90-94.
- [6] Liu MF, Wang CR, Fung LL, et al. Decreased CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells in peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus [J]. *Scand J Immunol*, 2004, 59(2):198-202.
- [7] 彭辉, 谭国珍, 吴长有. 糖皮质激素治疗对 SLE 患者外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 细胞亚群的影响 [J]. *中国免疫学杂志*, 2005, 21(12):83-85.
- [8] Lee JH, Wang LC, Lin YT, et al. Inverse correlation between CD4<sup>+</sup> regulatory T-cell population and autoantibody levels in paediatric patients with systemic lupus erythematosus [J]. *Immunology*, 2006, 117(2):280-286.
- [9] Hammad AM, Youssef HM, El-Arman MM. Transforming growth factor beta 1 in children with systemic lupus erythematosus: a possible relation with clinical presentation of lupus nephritis [J]. *Lupus*, 2006, 15(9):608-612.
- [10] Liston A, Rudensky AY. Thymic development and peripheral homeostasis of regulatory T cells [J]. *Curr Opin Immunol*, 2007, 19(2):176-185.
- [11] Li MO, Wan YY, Flavell RA. T cell-produced transforming growth factor-beta1 controls T cell tolerance and regulates Th1- and Th17-cell differentiation [J]. *Immunity*, 2007, 26(5):579-591.
- [12] 赖仁建. SLE 患者外周血调节性 T 细胞与 il-10、tgf-β1 的检测 [J]. *中国医药导报*, 2007, 4(29):15-17.

(编辑 刘清海)

(上接第 635 页 from page 635)

2 存在于胞浆,核膜,与细胞的程序化凋亡相关,bcl-2 蛋白的过表达可以抑制细胞的凋亡,进而导致肿瘤的发生<sup>[4]</sup>。本实验以细胞免疫化学的方法对人舌鳞癌 Tca8113 细胞中的 bcl-2 进行特异性标记,以同种激光(激发波长 488 nm,强度 100 mW)激发 QD<sub>605nm</sub> 和 FITC 标记的人舌癌 Tca8113 细胞的 bcl-2,通过激光共聚焦显微镜观测 bcl-2 表达,FITC 标记的 bcl-2 主要存在于细胞的胞浆,核膜表达不明显,QD<sub>605nm</sub> 标记的舌癌 Tca8113 细胞中胞浆和核膜均有高亮度荧光,表明 bcl-2 主要存在于舌癌细胞的胞浆和核膜,且 QD<sub>605nm</sub> 荧光亮度更强。而阴性对照组只见非常弱的荧光。本研究结果提示 QD<sub>605nm</sub> 在荧光成像方面有很低的非特异性结合及有较高的荧光信号,可以用于细胞中蛋白的定位检测。此外,QD<sub>605nm</sub> 所用激发波长为 488 nm,而不是它的最大激发波长;但是 FITC 所用激发波长已是它的最大激发波长,因此,可以认为如使用更短的激发波长,QD<sub>605nm</sub> 和 FITC 间将存在更大的差别<sup>[5]</sup>。

普通的有机荧光染料的荧光寿命很短,光漂白率很快,加上对于激光共聚焦显微镜而言,激光的亮度极高,导致有机荧光染料的荧光衰减更明显,这对需长时间成像的研究来说极为不利<sup>[6]</sup>。本研究将 QD 和 FITC 进行了光稳定性实验,结果显示在激光共聚焦的连续照射 1 h 中,QD 稳定性高,对光漂白的抵抗能力强,荧光寿命长,QD 比 FITC 具有更高的光稳定性,更加适用于需长时间观察或动态观察细胞内的生理变化的研究及观察细胞核内的生理变化。下一步,我们将利用量子点的独特特性对细胞膜上、核膜和胞浆中两种或两种以上蛋白同时成像研究,相信在不久

的将来量子点荧光标记技术代替传统的有机荧光,加速生物成像技术的应用和发展。

## 参考文献:

- [1] Sukhanova A, Devy J, Venteo L, et al. Biocompatible fluorescent nanocrystals for immunolabeling of membrane proteins and cells [J]. *Anal Biochem*, 2004, 324(1):60-67.
- [2] Garon EB, Marcu L, Luong Q, et al. Quantum dot labeling and tracking of human leukemic, bone marrow and cord blood cell [J]. *Leuk Res*, 2007, 31(5):643-651.
- [3] Hanaki K, Mono 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.
- [4] Staibano S, Mignogna MD, Lo Muzio L, et al. Overexpression of cyclin-D1, bcl-2, and bax proteins, proliferating cell nuclear antigen (PCNA), and DNA-ploidy in squamous cell carcinoma of the oral cavity [J]. *Hum Pathol*, 1998, 29(11):1189-1194.
- [5] Wang ZH, Wang YH, Liang QR, et al. Detection of tumor marker CA125 in ovarian carcinoma using quantum dots [J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2004, 36(10):681-686.
- [6] Li Z, Wang K, Tan W, et al. Immunofluorescent labeling of cancer cells with quantum dots synthesized in aqueous solution [J]. *Anal Biochem*, 2006, 354(2):169-174.

(编辑 徐杰)