

CD4⁺ CD25^{high} + CD127^{low} 调节性 T 细胞 在毛细支气管炎患儿外周血中的 表达改变及其临床意义

王秀芳 郭智兰 雷瑞瑞 韩影

(郑州大学第三附属医院儿内科,河南 郑州 450052)

[摘要] 目的 探讨 CD4⁺ CD25^{high} + CD127^{low} 调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg)在毛细支气管炎患儿外周血中的数量变化及其临床意义。方法 随机选取 31 例 2 岁以下毛细支气管炎患儿作为毛细支气管炎组,同期住院的同年龄段支气管肺炎患儿 25 例和患有疝气、肾结石等非感染性疾病患儿 25 例分别作为支气管肺炎组和对照组,采用流式细胞术检测 3 组患儿外周血中 CD4⁺ CD25^{high} + CD127^{low} Treg 占 CD4⁺ T 细胞百分比。结果 毛细支气管炎组患儿外周血中 CD4⁺ CD25^{high} + CD127^{low} Treg 占总 CD4⁺ T 细胞的 8.0% ± 2.1%,低于支气管肺炎组(9.6% ± 2.6%)及对照组(11.3% ± 2.9%),差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 毛细支气管炎患儿外周血 CD4⁺ CD25^{high} + CD127^{low} Treg 水平可能是一个较好的反映毛细支气管炎患儿免疫功能状态的参考指标,其在外周血中数量下降提示 Treg 细胞可能参与毛细支气管炎的发生发展。 [中国当代儿科杂志,2013,15(1):46-49]

[关键词] 毛细支气管炎;CD4⁺ CD25^{high} + CD127^{low} 调节性 T 细胞;流式细胞术;婴幼儿

Changes to CD4⁺ CD25^{high} + CD127^{low} regulatory T cells in peripheral blood from children with bronchiolitis, and its clinical significance

WANG Xiu-Fang, GUO Zhi-Lan, LEI Rui-Rui, HAN Ying. Department of Pediatrics, Third Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China (Email: wxf456@126.com)

Abstract: Objective To study changes to CD4⁺ CD25^{high} + CD127^{low} regulatory T cells (Treg) in peripheral blood from children with bronchiolitis, and to explore its clinical significance. **Methods** Thirty-one children with bronchiolitis and aged under two years were randomly enrolled as the bronchiolitis group, and 25 under two-year-olds with bronchopneumonia were randomly enrolled as the bronchopneumonia group. A further twenty-five children with non-infectious diseases such as hernia and renal calculus served as the control group. The level of CD4⁺ CD25^{high} + CD127^{low} Treg in peripheral blood was measured by multi-color detection and multi-parameter flow cytometry. **Results** The proportion of CD4⁺ CD25^{high} + CD127^{low} Treg in peripheral blood in the bronchiolitis group (8.0% ± 2.1%) was significantly lower than in the bronchopneumonia (9.6% ± 2.6%; $P < 0.05$) and control groups (11.3% ± 2.9%; $P < 0.05$). **Conclusions** CD4⁺ CD25^{high} + CD127^{low} Treg level in peripheral blood may be an index of immunological function in infants. A decreased level of CD4⁺ CD25^{high} + CD127^{low} Treg in peripheral blood suggests that Treg cells may be involved in the pathogenesis and development of bronchiolitis. [Chin J Contemp Pediatr, 2013, 15(1):46-49]

Key words: Bronchiolitis; CD4⁺ CD25^{high} + CD127^{low} regulatory T cell; Flow cytometry; Infant

毛细支气管炎是我国北方冬季与初春季节婴幼儿住院最常见的原因之一,主要由呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)感染引起,大多见于 2 岁以下婴幼儿,发病高峰年龄在 2~6 个月,80% 以上病例在 1 岁之内,其主要的病理改变为毛细支气管管腔狭窄甚至堵塞^[1],主要临床表现是呼吸急促、胸部凹陷和喘鸣。多项研究证实 RSV 感染

存在免疫功能紊乱^[2],且在 RSV 细支气管炎患儿外周血中存在 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg)表达水平异常^[3]。Treg 细胞是一组具有免疫抑制性和维持机体免疫平衡作用的 T 细胞亚群,参与多种自身免疫性疾病的发生^[4],但 Treg 细胞在 RSV 毛细支气管炎患儿的免疫学发病机制中的具体作用尚未完全阐明。外周血 CD4⁺ T 淋巴细

[收稿日期]2012-07-09;[修回日期]2012-10-19
[基金项目]河南省卫生厅科技攻关计划项目(201003063)。
[作者简介]王秀芳,女,本科,教授。

胞中 CD4⁺ CD25^{high} CD127^{low} Treg (6% ~ 8%) 较 CD4⁺ CD25⁺ 标记的 Treg 细胞 (1% ~ 2%) 多,用 CD4⁺ CD25^{high} CD127^{low} 来标记 Treg 细胞能获得足够数量和纯度的 Treg 细胞,便于更好地开展免疫学研究。因此,本研究采用 CD4⁺ CD25^{high} CD127^{low} Treg 占 CD4⁺ T 淋巴细胞百分比表示 Treg 细胞的表达水平,根据 Treg 细胞在外周血中的表达特征来研究毛细支气管炎的免疫学改变,并深入探讨毛细支气管炎的发生发展,为毛细支气管炎的临床诊治提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

研究对象均来自于 2011 年 9 月至 2012 年 3 月就诊于郑州大学第三附属医院的住院患儿。31 例确诊为毛细支气管炎的患儿作为毛细支气管炎组,其中男 20 例,女 11 例,年龄在 1 个月至 1 岁 4 个月,平均年龄 6 个月;25 例同期住院的支气管肺炎患儿作为支气管肺炎组,其中男 17 例,女 8 例,年龄在 3 个月至 2 岁,平均年龄 10 个月;25 例同期外科疝气、肾结石等非感染性疾病患儿作为对照组,其中男 14 例,女 11 例,年龄在 2 个月至 1 岁 7 个月,平均年龄 9 个月。3 组患儿的年龄、性别差异无统计学意义。

1.2 诊断标准

毛细支气管炎和支气管肺炎诊断标准依据《诸福棠实用儿科学》^[5]。

1.3 方法

1.3.1 主要仪器及试剂 FACS Calibur 型流式细胞仪(美国 BD 公司);FITC 标记的鼠抗人 CD4 单克隆抗体、APC 标记的鼠抗人 CD25 单克隆抗体、PE 标记的鼠抗人 CD127 单克隆抗体和同型对照鼠抗人 IgG1 单克隆抗体均购自美国 BD 公司。

1.3.2 标本收集与检测 入院患儿第 1 天清晨空腹采集外周静脉血 2 mL,室温保存,6 ~ 8 h 内进行免疫荧光染色处理。取流式细胞仪专用试管(FALCON 管)2 支,顺序标记为 Treg 细胞和同型对照,在各标记试管中分别加入 100 μL 抗凝混匀全

血;在标记 Treg 细胞的试管中分别加入 FITC 标记的鼠抗人 CD4 单克隆抗体 20 μL、APC 标记的鼠抗人 CD25 单克隆抗体 10 μL 和 PE 标记的鼠抗人 CD127 单克隆抗体 10 μL;在标记同型对照的试管中分别加入 FITC 标记的鼠抗人 IgG1 单克隆抗体 20 μL、APC 标记的鼠抗人 IgG1 单克隆抗体 20 μL 和 PE 标记的鼠抗人 IgG1 单克隆抗体 20 μL。低速涡流 3 s 混匀,室温下反应 20 min。室温条件下 300 g 离心 5 min,弃上清。分别加入 1 mL 鞘液重悬细胞,低速涡流混匀,300 g 离心 5 min,弃上清;再加入 500 μL 鞘液,低速涡流混匀 3 s,采用流式细胞术分析其外周血中 CD4⁺ CD25^{high} CD127^{low} Treg 数量,以 CD4⁺ CD25^{high} CD127^{low} Treg 细胞占 CD4⁺ T 淋巴细胞百分比表示其表达水平。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计学软件对数据进行统计学分析。计量资料用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组患儿外周血中 CD4⁺ CD25^{high} CD127^{low} Treg 细胞水平比较

毛细支气管炎组外周血中 CD4⁺ CD25^{high} CD127^{low} Treg 细胞占 CD4⁺ T 淋巴细胞的 8.0% ± 2.1%,低于支气管肺炎组(9.6% ± 2.6%)和对照组(11.3% ± 2.9%),差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1、图 1。

表 1 3 组患儿外周血中 CD4⁺ CD25^{high} CD127^{low} Treg 细胞的表达水平 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	例数	CD4 ⁺ CD25 ^{high} CD127 ^{low} Treg
对照组	25	11.3 ± 2.9
支气管肺炎组	25	9.6 ± 2.6
毛细支气管炎组	31	8.0 ± 2.1 ^{a,b}
F 值		11.25
P 值		< 0.05

a: 与对照组比较, $P < 0.05$; b: 与支气管肺炎组比较, $P < 0.05$

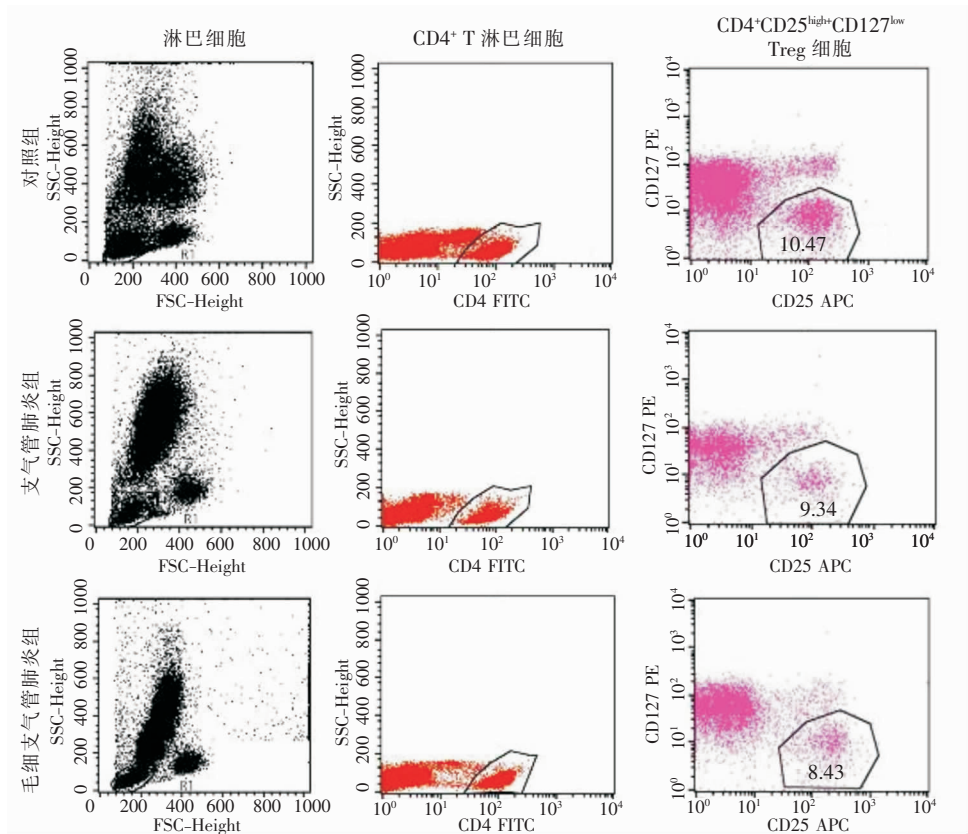


图1 流式细胞术检测患儿外周血中 CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} Treg 细胞

3 讨论

根据细胞的发育过程、功能及分泌因子的作用不同,CD4⁺ T 淋巴细胞可分为 Th1、Th2、Treg 细胞和 Th17 四大亚群^[6]。Treg 细胞是 1995 年发现的一群具有调节功能的 T 细胞,是存在于人体内的功能独特的一类具有免疫抑制作用的 T 淋巴细胞亚群^[7]。Treg 细胞可以分泌炎症因子 IL-4、IL-10 和 TGF-β,对效应 T 淋巴细胞具有抑制作用,在自身免疫性疾病、感染、肿瘤等方面发挥着重要作用,是近十年来免疫学研究的一大热点。

根据 Treg 细胞来源的不同可将其分为 2 种,一种是由胸腺细胞自然分化发育而来的主要 Treg 细胞亚群—天然型调节性 T 细胞(naturally occurring regulatory T cells, nTreg),即 CD4⁺CD25⁺ Treg 细胞;另外一种为适应型或诱导型调节性 T 细胞(induced regulatory T cell, iTreg),是外周成熟 CD4⁺CD25⁺ T 细胞在受到特异性抗原刺激及细胞因子的诱导下转化的具有 Treg 细胞功能特征的细胞亚群^[8]。nTreg 可通过细胞间相互接触发挥免疫调节作用。稳定状态下,当免疫系统未活化时,TGF-β 促使 iTreg 产生,iTreg 可以抑制炎症反应,并防止自身

免疫病的发生,然而感染后,固有免疫系统的 IL-6 可以抑制 iTreg 产生。由于 Treg 细胞在炎症性疾病中发挥着重要作用^[9],本研究重点讨论病毒感染后毛细支气管炎患儿外周血中 Treg 细胞的变化特征,采用 CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} Treg 的相对数量表示 Treg 细胞。Seddiki 等^[10]发现 CD127 可以辅助识别 CD4⁺CD25⁺ Treg 细胞与活化的 T 细胞,CD4⁺ T 细胞活化后高表达 CD127(CD4⁺CD25⁺CD127^{high}),而 Treg 细胞仅低表达 CD127(CD4⁺CD25⁺CD127^{low})。因此在 CD4⁺CD25⁺基础上联合 CD127 抗原可以更好地识别 CD4⁺CD25⁺ Treg 细胞。

随着免疫学的快速发展,大量研究证明毛细支气管炎的发病与免疫功能紊乱有关^[2],而免疫功能紊乱可能与免疫调节异常有关。毛细支气管炎大多是病毒感染引起,它的免疫学改变大多认为存在 Th 细胞的功能失衡^[11-12],当 Th2 细胞因子占优势时,毛细支气管炎更容易进一步发展^[13],但最近发现 Treg 细胞也参与毛细支气管炎的发病,Treg 细胞是一类具有负性免疫调节功能的 CD4⁺ T 细胞,可通过细胞间接触抑制及分泌抑制性细胞因子(TGF-β1 和 IL-10)等发挥抗炎及免疫耐受作用,在毛细支气管炎中存在 Treg 细胞亚型的表达下降^[14-15],另外 Zhu 等^[16]发现毛细支气管炎患者的肺泡灌洗液中

Treg 细胞减少,可能正是因为这种细胞数量上的缺失,导致了免疫抑制功能的低下,为疾病的发生发展创造了条件。

本研究发现,在毛细支气管炎患儿外周血中 CD4⁺CD25^{high}⁺CD127^{low} Treg 数量较对照组及支气管肺炎组下降,这与上述研究一致,提示 CD4⁺CD25^{high}⁺CD127^{low}Treg 细胞参与毛细支气管炎的发生发展。毛细支气管炎患者免疫调节功能失调可能与患者外周血 Treg 细胞比例数量不足,免疫抑制功能下降有关。另有流行病学研究显示反复的喘息发作最终可能会发展成支气管哮喘^[17-18],赵志旭等^[19]发现支气管哮喘大鼠存在 Treg 细胞数量与功能的异常,表明毛细支气管炎与支气管哮喘之间可能有一定的关联性。本研究对毛细支气管炎患儿中 Treg 细胞水平进行研究,以期为两者之间的相关性研究提供一些依据。

[参 考 文 献]

[1] Kajosaari M, Syvanen P, Forars M, Juntunen-Backman K. Inhaled corticosteroids during and after respiratory syncytial virus-bronchiolitis may decrease subsequent asthma[J]. *Pediatr Allergy Immu*, 2000, 11(3): 198-202.

[2] Smit JJ, Boon L, Lukacs NW. Respiratory virus-induced regulation of asthma-like responses in mice depends upon CD8⁺ T cells and interferon-gamma production[J]. *Am J Pathol*, 2007, 171(6): 1944-1951.

[3] 朱亚非, 朱建央, 李卫武, 蓝陈福, 方静, 林海玲. 毛细支气管炎 CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞和 Foxp3 mRNA 表达及与 IgE 关系[J]. *中国当代儿科杂志*, 2009, 11(5): 349-353.

[4] 王西阁, 王檬, 刘松, 王晓格, 乔俊英, 曹祎明. 环孢素对慢性再生障碍性贫血患儿外周血 T 调节细胞及 Foxp3 表达的影响[J]. *中国当代儿科杂志*, 2011, 13(12): 936-939.

[5] 胡亚美, 江载芳. 诸福棠实用儿科学[M]. 第 7 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 1175-1187.

[6] Henness S, van Thoor E, Ge Q, Armour CL, Hughes JM, Ammit AJ. IL-17A act via p38 MAPK to increase stability of TNF-alpha-induce IL-8 mRNA in human ASM [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2006, 290(6): L1283-L1290.

[7] 王伟伟, 沈茜. Th17 细胞和 Treg 细胞在人类常见疾病中的表达及相互关系[J]. *中国免疫学杂志*, 2010, 26(3): 284-288.

[8] 王洪瑞, 杨敬平. 变应性鼻炎、哮喘患者 T 细胞亚群、白介素水平及肺功能测定[J]. *临床肺科杂志*, 2006, 11(2): 174-175.

[9] Wu HY, Maron R, Tukuph AM, Weiner HL. Mucosal anti-CD3 monoclonal antibody attenuates collagen-induced arthritis that is associated with induction of LAP⁺ regulatory T cells and is enhanced by administration of an emulsome-based Th2-ske-wing adjuvant[J]. *J Immunol*, 2010, 185(6): 3401-3407.

[10] Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J, Zaunders J, Sasson S, Landay A, et al. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cell[J]. *J Exp Med*, 2006, 203(7): 1693-1700.

[11] Openshaw PJ, Tregoning JS. Immune responses and disease enhancement during respiratory syncytial virus infection[J]. *Clin Microbiol Rev*, 2005, 18(3): 541-555.

[12] Tripp RA, Oshansky C, Alvarez R. Cytokines and respiratory syncytial virus infection[J]. *Proc Am Thorac Soc*, 2005, 2(2): 147-149.

[13] Legg JP, Hussain IR, Warner JA, Johnston SL, Warner JO. Type 1 and type 2 cytokine imbalance in acute respiratory syncytial virus bronchiolitis[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2003, 168(6): 633-639.

[14] 陈芸. 毛细支气管炎与支气管哮喘免疫学改变的比较[D]. 重庆医科大学, 2011.

[15] 李宾, 吴福玲, 冯学斌, 孙大康, 李营营, 赵志旭. 呼吸道合胞病毒毛细支气管炎患儿外周血 CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞及 IL-10、TGF-β 检测及意义[J]. *滨州医学院学报*, 2011, 34(6): 407-413.

[16] Zhu YF, Cai XH, Zhu JY, Jiang WP, Lan JH, Liu S. Study of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells and expression of Foxp3 mRNA in bronchiolitis and glucocorticoid regulation[J]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2009, 89(22): 1563-1566.

[17] Mailaparambil B, Grychtol R, Heinzmann A. Respiratory syncytial virus bronchiolitis and asthma-insights from recent studies and implications for therapy[J]. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 2009, 8(3): 202-207.

[18] 刘义红, 熊丽萍, 沈红云. 毛细支气管炎患儿红细胞免疫及 T 细胞亚群变化的研究[J]. *中国当代儿科杂志*, 2011, 13(3): 202-204.

[19] 赵志旭, 冯学斌, 石涛, 杨成, 张立霞. 哮喘大鼠淋巴液与血液 CD4⁺CD25⁺Treg 及 IL-10、TGF-β 水平比较和地塞米松干预的影响[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2010, 26(3): 238-241.

(本文编辑:万静)