

论著 · 临床研究

CD4⁺ CD25^{int/high} CD127^{low} 调节性 T 细胞在再生障碍性贫血患儿中的检测及意义

王西阁 曹祎明 王晓格

(郑州大学第三附属医院儿内科,河南 郑州 450052)

[摘要] 目的 探讨再生障碍性贫血(AA)患儿外周血 CD4⁺ CD25^{int/high} CD127^{low} 调节性 T 细胞(Treg)的表达特点及其与 Hb、WBC 和 血小板(Plt)数量的相关性。**方法** 采用流式细胞术检测 15 例正常儿童(对照组)和 22 例治疗有效的 AA 患儿治疗前后外周血 CD4⁺ CD25^{int/high} CD127^{low} Treg 百分比的变化,分析 CD4⁺ CD25^{high} CD127^{low} Treg 与 Hb、WBC 和 Plt 数量的相关性。**结果** AA 组急性期外周血 CD4⁺ CD25⁺、CD4⁺ CD25^{high}、CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low}、CD4⁺ CD25^{high} CD127^{low} Treg 占 CD4⁺ T 细胞的百分比均较对照组显著降低($P < 0.05$);恢复期的表达则高于急性期($P < 0.05$),而与对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。AA 组急性期、恢复期及对对照组的 CD4⁺ CD25^{high} CD127^{low} Treg 表达率与外周血中 Hb、WBC 和 Plt 数量均呈正相关(r 分别为 0.499、0.526、0.540, $P < 0.05$)。**结论** CD4⁺ CD25^{int/high} CD127^{low} Treg 减低可能与 AA 发病有关,为其作为判断 AA 病情变化的指标提供了可能的理论依据,并可以作为免疫治疗的靶点之一进行深入研究。

[中国当代儿科杂志,2011,13(4):292-295]

[关键词] 再生障碍性贫血;调节性 T 细胞;儿童
[中图分类号] R556.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2011)04-0292-04

Detection and significance of CD4⁺ CD25^{int/high} CD127^{low} regulatory T cells in pediatric aplastic anemia

WANG Xi-Ge, CAO Yi-Ming, WANG Xiao-Ge. Department of Pediatrics, Third Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China (Email: xigewang1962@sina.com)

Abstract: Objective To study the expression of CD4⁺ CD25^{int/high} CD127^{low} regulatory T cells in peripheral blood (PB) and its relation to the quantity of Hb, WBC and platelet (Plt) in children with aplastic anemia (AA). **Methods** Expression of CD4⁺ CD25^{int/high} CD127^{low} in PB was detected by flow cytometry in 22 children with AA before and after treatment and in 15 healthy controls. The relationships between CD4⁺ CD25^{high} CD127^{low} and the quantity of Hb, WBC and Plt were evaluated. **Results** Compared to controls, the percentages of CD4⁺ CD25⁺/CD4⁺, CD4⁺ CD25^{high}/CD4⁺, CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low}/CD4⁺ and CD4⁺ CD25^{high} CD127^{low}/CD4⁺ in PB of AA patients decreased markedly at the active phase ($P < 0.05$). By the recovery phase, the percentages of CD4⁺ CD25⁺/CD4⁺, CD4⁺ CD25^{high}/CD4⁺, CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low}/CD4⁺ and CD4⁺ CD25^{high} CD127^{low}/CD4⁺ increased significantly to the levels similar to the controls. There were significant positive relationships between the expression of CD4⁺ CD25^{high} CD127^{low} cells and the quantity of Hb, WBC and Plt ($r = 0.499, 0.526, 0.540$ respectively; $P < 0.05$). **Conclusions** The decrease of the percentage of CD4⁺ CD25^{int/high} CD127^{low} regulatory T cells might be associated with the development of pediatric AA. The CD4⁺ CD25^{int/high} CD127^{low} regulatory T cells can serve as a marker for the evaluation of disease severity as well as a target of further study on immune treatment of AA.

[Chin J Contemp Pediatr, 2011, 13 (4):292-295]

Key words: Aplastic anemia; Regulatory T cell; Child

再生障碍性贫血(aplastic anemia, AA)是以全血细胞减少为特征的血液系统疾病,其病因尚未完全明确,目前多数研究表明 AA 的发生和发展是一种由免疫机制介导为主的、多因素综合作用的结果^[1]。CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg)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^[2]。本研究采用流式细胞术(FCM)检测了

[收稿日期]2010-07-19;[修回日期]2011-12-17
[作者简介]王西阁,女,本科,教授,主任医师。

急性期和恢复期的 AA 患儿外周血 CD4⁺CD25⁺、CD4⁺CD25^{high}、CD4⁺CD25⁺CD127^{low}、CD4⁺CD25^{high}-CD127^{low} Treg 水平,并分析其与外周血 Hb、WBC 和 Plt 数量的相关性,初步探讨 Treg 与儿童 AA 的关系。

1 资料与方法

1.1 研究对象

收集郑州大学三附院及一附院小儿血液科 2009 年 3 月至 2010 年 6 月确诊并治疗有效的 22 例 AA 患儿(AA 组),男 12 例,女 10 例,年龄 2~13 岁,中位年龄 7 岁;诊断及疗效标准均符合《小儿再障诊疗建议》^[3]。所有恢复期患儿均未输血,血象恢复标准:中性粒细胞绝对值(ANC)≥1.0×10⁹/L,Plt≥20×10⁹/L;骨髓增生活跃,粒系、红系比例正常,巨核细胞数≥8 个/HP。正常对照组 15 例,为郑州大学三附院体检的健康儿童,男 8 例,女 7 例,年龄 1~13 岁,中位年龄 6 岁,其体检各项指标均在正常范围内。对照组与 AA 组年龄、性别差异无统计学意义(*P* > 0.05)。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂和仪器 FITC(异硫氰酸荧光素)标记的鼠抗人 CD4 抗体,APC(别藻青蛋白)标记的鼠抗人 CD25 抗体,PE(藻红蛋白)标记的鼠抗人 CD127 抗体、FACS Calibur 流式细胞仪、CellQuest 软件及溶血剂均购自美国 Becton Dickinson 公司。

1.2.2 FCM 检测外周血 CD4⁺CD25^{int/high}CD127^{low} Treg 所有观察对象均于清晨空腹抽取静脉血 2~3 mL,EDTA 抗凝。应用荧光直接标记法及 FCM 检测外周血 CD4⁺CD25^{int/high}CD127^{low} T 细胞水平。取抗凝血 100 μL 置于 FCM 检测管中,分别加入不同荧光标记的单克隆抗体各 20 μL,室温避

光保存 30 min 后,每管各加溶血素 2000 μL,混匀后置室温避光孵育 15 min。待管内液体透亮,然后 1500 r/min 离心 5 min,弃上清加 PBS 500 μL 混匀,4℃ 避光 1 h 内上机检测。先以前向散射角(FSC)及侧向散射角(SSC)确定淋巴细胞群,再以 CD4⁺T 细胞射门,分析 CD4⁺T 细胞上 CD25 与 CD127 的表达,计算 CD4⁺CD25⁺CD127^{low}、CD4⁺CD25^{high}-CD127^{low} Treg 的百分比。Cellquest 软件分析数据,记录阳性细胞表达率,各指标均换算成占外周血 CD4⁺T 细胞的百分率。以 CD4⁺T 细胞中表达 CD25 荧光强度 > CD4⁻T 细胞中 CD25 荧光强度者定义为 CD4⁺CD25^{high}T 细胞,利用以上 CD4⁺-CD25⁺及 CD4⁺CD25^{high}的界限联合群体来界定 CD4⁺CD25⁺CD127^{low}、CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}T 细胞群。

1.3 统计学分析

处理数据采用 SPSS 15.0 统计软件,所有数据均进行正态分布和方差齐性检验,以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多样本均数比较用单因素方差分析,组间比较用 LSD 法,变量间的相关性分析采用 Pearson 积矩相关分析。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组外周血 Treg 表达水平的比较

AA 组急性期患儿外周血中 CD4⁺CD25⁺、CD4⁺CD25^{high}、CD4⁺CD25⁺CD127^{low}、CD4⁺CD25^{high}-CD127^{low}占 CD4⁺T 细胞的百分比均较对照组明显降低(*P* < 0.05);恢复期的表达则较急性期明显升高(*P* < 0.05),而与对照组比较差异无统计学意义(*P* > 0.05)。见表 1。

表 1 外周血 Treg 的表达水平比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	例数	CD4 ⁺ CD25 ⁺	CD4 ⁺ CD25 ^{high}	CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ^{low}	CD4 ⁺ CD25 ^{high} CD127 ^{low}
对照组	15	7.28 ± 0.60	2.02 ± 0.28	6.56 ± 0.88	1.65 ± 0.41
AA 急性期	22	5.49 ± 0.80 ^a	1.33 ± 0.22 ^a	4.79 ± 0.95 ^a	1.02 ± 0.31 ^a
AA 恢复期	22	7.00 ± 0.95 ^b	1.93 ± 0.21 ^b	6.21 ± 0.80 ^b	1.56 ± 0.44 ^b
<i>F</i> 值		27.652	51.017	21.324	15.171
<i>P</i> 值		< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01

a:与对照组比较,*P* < 0.05; b:与 AA 急性期比较,*P* < 0.05

2.2 各组 CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} T 细胞表达率与血细胞数量的相关性

Pearson 相关分析显示,AA 组急性期、恢复期及

对照组的 CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} T 细胞表达率与外周血 Hb、WBC 和 Plt 数量均呈正相关关系(*r* 分别为 0.499、0.526、0.540;*P* < 0.05)。

3 讨论

AA 是由细胞毒性 T 淋巴细胞引起的造血干细胞衰竭,应用免疫抑制剂治疗后的造血恢复和血液学缓解表明 AA 是一种免疫因素介导的疾病。 $CD4^+CD25^+$ Treg 是机体维持自身免疫耐受的重要组成部分,约占健康人 $CD4^+$ T 淋巴细胞群的 5%~10%^[4],具有免疫无能性和免疫抑制性两大特性^[5]。天然性 $CD4^+CD25^+$ Treg 来源于胸腺,在外周主要参与自身免疫耐受的维持^[6],其主要功能是抑制自身反应性 T 细胞。研究发现, $CD4^+CD25^+$ Treg 与多种自身免疫性疾病、移植排斥、肿瘤及病毒感染相关。

$CD4^+CD25^+$ T 淋巴细胞分为 3 个表型: $CD25^{high}$ 、 $CD25^{int}$ 和 $CD25^{low}$ ^[7]。 $CD4^+CD25^+$ Treg 主要存在于 $CD25^{high}$ 亚群中,约占人外周血 $CD4^+$ T 细胞的 2% 左右。活化的 T 细胞亦可表达 $CD25$,而 $CD25^{int}$ 亚群则包含大量活化的 T 细胞。因此,如果实验中直接按照外周血 $CD4^+CD25^+$ T 细胞数量进行比较的话,由于混杂一些活化的 T 细胞,可能会影响结果的分析。因此,本研究选择具有无能性和免疫抑制性的 $CD4^+CD25^{high}$ T 细胞作为定义 Treg 的指标之一进行研究。然而单纯依据高表达 $CD25$ 会丢失很多 Treg,所以再结合某一特征性表面标志进行研究可以更确切地界定 Treg。

以往认为 Foxp3 可能为该细胞的特征性标志,但其为胞内蛋白,检测时须破膜固定染色,且影响后续研究,其实用性较差。最近有学者在分析我国健康人 $CD4^+CD25^+$ Treg 表达频率时,采用了三色免疫荧光染色,分选了具有 $CD4^+CD25^{int/high}CD127^{low}$ 表达特征的细胞群。经胞内 Foxp3 染色结果证实: $CD25^{int/high}CD127^{low}$ 表达的细胞 Foxp3 阳性,而 $CD25^{low}CD127^{high}$ 细胞几乎全部 Foxp3 阴性。由此提示 $CD25^{int/high}CD127^{low}$ 可作为 Treg 表面的特征性标志物而用于 Treg 的分选^[8]。本课题组前期的研究已发现 AA 患儿外周血中 $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ Treg 的表达是降低的^[9]。在此基础上,本研究将 $CD4^+CD25^{int/high}CD127^{low}$ T 细胞分成两个群体分别比较分析, $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}$ T 细胞和 $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ T 细胞,前者比后者表达更多的 Foxp3,能更快地活化并上调 Foxp3 的表达,表现出更强大的抑制功能^[10]。说明 $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}$ T 细胞可能更确切地反映 Treg 的表达水平。据上述发现,本研究以 $CD4^+$ T 细胞中表达

$CD25$ 荧光强度 $> CD4^+$ T 细胞中 $CD25$ 荧光强度者定义为 $CD4^+CD25^{high}$ T 细胞,利用以上 $CD4^+CD25^+$ 及 $CD4^+CD25^{high}$ 的界限联合群体区分来界定 $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ 、 $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}$ T 细胞群体^[11-12],然后对结果进行分析。

本研究发现,AA 组患儿急性期 $CD4^+CD25^+$ 、 $CD4^+CD25^{high}$ 、 $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ 及 $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}$ T 细胞占 $CD4^+$ T 细胞的百分比明显低于对照组,说明 AA 患儿体内存在 Treg 的异常;AA 组恢复期患儿上述 4 个数值均较急性期明显升高,而与对照组比较差异无统计学意义,提示免疫调节剂可能对患儿体内的 Treg 起着重要作用。

Treg 的表达水平降低对 AA 发病的可能影响因素有:(1) Treg 的低表达使其不能充分发挥抑制 Th1 细胞活化和增殖的作用,导致由 Th1 细胞分泌的因子如 IL-2、IFN- γ 等表达增多,IFN- γ 等负性造血因子增多阻止了细胞周期的进行和促进 $CD34^+$ 细胞凋亡,是造成 AA 造血功能衰竭的原因之一;(2) Treg 可以经 TCR 介导的信号传导途径活化后能够抑制 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 细胞的活化和增殖,当其表达降低时,则 $CD4^+$ 与 $CD8^+$ T 淋巴细胞均增高,提示 AA 患儿 T 淋巴细胞处于活化状态,并推测 T 淋巴细胞于发病前向骨髓组织选择性定向归巢和活化增殖,继而引发骨髓干/祖细胞的损伤;(3) Treg 表达降低,则其对活化的细胞毒性 T 细胞(CTL)和自然杀伤细胞(NK)的免疫抑制作用减弱,NK 细胞可以抑制造血细胞生长,而 CTL 也可以直接杀伤白细胞和血小板等,从而导致 AA 的发生。

治疗有效的 AA 患儿外周血中 Treg 的数量较治疗前升高,且治疗后患儿外周血中 $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}$ T 细胞的表达水平与其 Hb、WBC 和 Plt 水平均呈正相关,经治疗后血象恢复正常的患儿在这一点上表现得更加明显。说明 AA 发病时, $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}$ T 细胞的表达水平降低导致血细胞的破坏增多,经免疫调节剂治疗有效后,紊乱的免疫反应被纠正, $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}$ T 细胞表达水平恢复正常,随之血象也逐渐恢复正常。因此,本研究认为 $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}$ T 细胞在一定程度上可能提示病情的变化,可以此作为判断疗效及评价预后的指标之一。另外,由于 AA 发病后 $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}$ T 细胞表达水平降低,提示可以把 $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}$ T 细胞作为治疗的靶点,采用可以促进 Treg 表达和增强其功能的免疫疗法,以加快机体免疫紊乱的恢复,从而提高疗效。

[参 考 文 献]

[1] Young NS. Hematopoietic cell destruction by immune mechanism in acquired aplastic anemia[J]. Semin Hematol, 2000, 37(1): 3-14.

[2] Stephens LA, Barclay AN, Mason D. Phenotypic characterization of regulatory CD4⁺ CD25⁺ T cells in rats[J]. Int Immunol, 2004, 16(2): 365-375.

[3] 中华医学会儿科分会血液组, 中华儿科杂志编委会. 小儿再生障碍性贫血的诊疗建议[J]. 中华儿科杂志, 2001, 39(7): 422-423.

[4] Lutsiak ME, Semnani RT, De Pascalis R, Kashmiri SV, Schlom J, Sabzevari H. Inhibition of CD4⁺ 25⁺ T regulatory cell function implicated in enhanced immune response by low-dose cyclophosphamide[J]. Blood, 2005, 105(7): 2862-2868.

[5] Godfrey WR, Spoden DJ, Ge YG, Baker SR, Liu B, Levine BL, et al. Cord blood CD4⁺ CD25⁺-derived T regulatory cells lines express FOXP3 protein and manifest potent suppressor function[J]. Blood, 2005, 105(2): 750-758.

[6] Toda A, Piccirillo CA. Development and function of naturally occurring CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells[J]. J Leukoc Biol, 2006, 80(3): 458-470.

[7] Kamikozuru K, Fukunaga K, Hirota S, Hida N, Ohda Y, Yoshida K, et al. The expression profile of functional regulatory T cells, CD4⁺ CD25^{high}+/forkhead box protein P3⁺, in patients with ulcerative colitis during active and quiescent disease[J]. Clin Exp Immunol, 2009, 156(2): 320-327.

[8] 王盈, 周磊明, 宫菊丽, 周明奎, 沈方伟, 郑晓虹, 等. 中国健康人外周血中具有 CD4⁺ CD25^{int/high} CD127^{low} 特征的调节性 T 细胞频率[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2007, 23(9): 816-818.

[9] 王西阁, 王晓格, 胡姬婷. 调节性 T 细胞及 Foxp3 基因在再生障碍性贫血患儿外周血中的变化及意义[J]. 中国当代儿科杂志, 2010, 12(4): 241-243.

[10] Hartigan-O'Connor DJ, Poon C, Sinclair E, McCune JM. 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.

[11] 韩文敏, 邱国强, 周民, 任敏, 谢晓宝. CD4⁺ CD25^{high} CD127^{low} Tregs 及 TGF-β 在多发性骨髓瘤患者外周血的表达分析[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2008, 24(10): 996-998.

[12] Moniuszko M, Bodzenta-Lukaszyk A, Dabrowska M. Effects of oral glucocorticoid therapy on CD4⁺ CD25⁺ CD127⁻ and CD4⁺ CD25^{high} T cell levels in asthmatic patients[J]. Inflammation, 2010, 33(6): 415-420.

(本文编辑:俞 燕)

· 消息 ·

2011 西部、东北地区儿科医师和护士培训项目招生简章

2002 年, 时值国家提出开发西部的宏观战略, 为了支持和配合国家西部战略的实施和推进, 上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心结合医院的具体实际和建院理念 - “TRAIN THE TRAINER”, 在美国世界健康基金会 (Project HOPE) 的通力协作下, 筹建了“上海儿童医学中心 - 西部、东北地区儿科医师和护士培训项目”。

培训地区: 云南、贵州、广西、四川、重庆、西藏、陕西、宁夏、甘肃、内蒙古、新疆、青海、辽宁、吉林、黑龙江

要求: ① 进修医生: 三级医院, 本科毕业, 主治医师, 45 岁以下, 有一定英语水平。② 进修护士: 三级医院, 中专以上学历, 有一定英语水平。

培训科目: 招生重点专业为急救与 PICU 科、新生儿与 NICU 科、普内科; 其次为血液肿瘤科、小儿外科、儿童保健和小儿营养等。

培训时间: 2011 年 7 月至 2012 年 6 月 (1 年)

西部奖学金: 录取的学员均能获得“西部奖学金”, 医生 10000 元/年, 护士 8000 元/年, 同时免收进修费、住宿费。

报名办法: 请报名者将个人简历、进修科目 (只限选一个专业)、一位正高级职称医师推荐信、盖有单位公章的介绍信于 2011 年 4 月 30 日前寄联系人。2011 年 5 月底面试。面试地点及时间另行通知。

联系地址: 上海东方路 1678 号 (200127) 上海儿童医学中心 科教部

电 话: 021-38626161 × 3082/3181 传 真: 021-50904612

申请表可复印或从我院网站下载, 医院网址: www.scmc.com.cn

联系人: 陆梅华/张云婷

上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心
美国 HOPE 基金会
2011 年 2 月