

CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺:与 SLE 疾病相关的 Treg 标志

徐安琪¹,杨晓帆¹,王慧娟¹,张缪佳²,季晓辉^{1*}

(¹南京医科大学微生物学与免疫学系,江苏 南京 210029;²南京医科大学第一附属医院风湿科,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:研究与系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus,SLE)病理活动相关的调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg)标志。方法:分离正常人和 SLE 患者外周血单个核细胞(PBMCs),用三色流式细胞术(flowcytometer,FCM)检测 CD4 和 CD8 T 细胞亚群的 CD25、Foxp3 表达,分析 T 细胞 Foxp3⁺/CD4⁺、CD25⁺Foxp3⁺/CD4⁺、Foxp3⁺/CD4⁺CD25⁺、Foxp3⁺/CD8⁺、CD25⁺Foxp3⁺/CD8⁺及 Foxp3⁺/CD8⁺CD25⁺的比值变化,及其与 SLE 疾病活动指数(SLE disease activity index,SLEDAI)、抗-dsDNA 阳性、补体 C3/C4 水平降低、血清 IgG 水平增高、肾脏损害、关节病变、白细胞减少、疾病初/复发的关系。结果:①与正常人相比,SLE 患者 T 细胞 CD4⁺CD25⁺/CD4⁺比值无明显改变,但中/重度 SLE 患者外周血 T 细胞 Foxp3⁺/CD4⁺、CD25⁺Foxp3⁺/CD4⁺及 Foxp3⁺/CD4⁺CD25⁺比值均显著下降,并与 SLEDAI 呈负相关;其中 CD25⁺Foxp3⁺/CD4⁺比值还与 SLE 的抗-dsDNA 阳性、补体 C3/C4 水平降低、血清 IgG 水平增高相关,在疾病初发、肾脏损害、白细胞减少患者该比值下降更为显著;②SLE 患者 CD8⁺ T 细胞中 CD25⁺、Foxp3⁺亚群比例未见明显减少,仅中/重度活动性 SLE 患者 Foxp3⁺/CD8⁺CD25⁺比例减少,但与 SLEDAI 无相关性。结论:以 CD25⁺Foxp3⁺作为 Treg 标志,可以明显反映出 SLE 患者 CD4⁺ Treg 存在数量缺陷,并与疾病活动性、免疫功能紊乱和病理损害密切相关,故将 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺作为标志进行 Treg 检测对阐明 SLE 患者免疫系统功能状态具有一定的临床参考价值。

[关键词] 红斑狼疮;系统性;调节性 T 细胞;Foxp3

[中图分类号] R593.241

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)06-745-09

CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺: a marker of Treg related to SLE pathogenesis

XU An-qi¹, YANG Xiao-fan¹, WANG Hui-juan¹, ZHANG Miao-jia², JI Xiao-hui^{1*}

(¹Department of Microbiology and Immunology, NJMU, Nanjing 210029; ²Department of Rheumatology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate markers of regulatory T cells in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus (SLE). **Methods:** Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from SLE patients and healthy donors; Flow cytometry (FCS) was used to detect the expressions of CD25 and Foxp3 in CD4 and CD8 T subsets and analyze the changes in the ratios of Foxp3⁺/CD4⁺, CD25⁺Foxp3⁺/CD4⁺, Foxp3⁺/CD4⁺CD25⁺, Foxp3⁺/CD8⁺, CD25⁺Foxp3⁺/CD8⁺, Foxp3⁺/CD8⁺CD25⁺, and their relationships with SLEDAI, anti-dsDNA antibodies, complement C3/C4, serum IgG, kidney damage and leucopenia. **Results:** ① Compared with healthy donors, the percentage of CD25⁺ cells in CD4⁺T cells did not change significantly in SLE patients, but the ratios of Foxp3⁺/CD4⁺, CD25⁺Foxp3⁺/CD4⁺ and Foxp3⁺/CD4⁺CD25⁺ significantly reduced in patients with mid- and high-active SLE, and the ratios were also negatively correlated to SLEDAI. Particularly, the ratio of CD25⁺Foxp3⁺/CD4⁺ in SLE patients was related with anti-dsDNA antibody, decrease of complement C3/C4 and increase of IgG; and the reduce of CD25⁺Foxp3⁺/CD4⁺ ratio was remarkable in SLE patients with renal damage or Leucopenia and patients in initial disease stage. ② Foxp3⁺ cells ratio of CD8⁺ cell population was similar between SLE patients and healthy controls, except that the ratio of Foxp3⁺/CD8⁺CD25⁺ decreased in mid- and high-active SLE patients, but had no relationship with disease activity. **Conclusion:** CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ is an important marker for evaluation of regulatory T cells, which reflects the deficient quantity of Treg, and might reflects the deficient function of Treg by the relationship between the cell percentage and SLE disease activity, immune disorder and tissue lesion. The study confirmed that CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ as the marker of Treg is significant for evaluation of immune system functional status of SLE patients in clinical.

[Key words] lupus erythematosus; systemic; regulatory T cells; Foxp3

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(6): 745-753]

[基金项目] 南京医科大学科技发展基金资助(NY020609)

*通讯作者, E-mail: immune@njmu.edu.cn

系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)是一种慢性自身免疫性疾病,具有复杂的临床表现,其发病机制仍不明确。目前认为SLE发生的机制主要在于患者丧失对自身组分的免疫耐受,导致体内自身反应性T细胞和B细胞的异常激活,进而产生自身抗体,激活补体反应,这些细胞及抗体扩散到机体的各个系统,最终形成疾病的损伤表现^[1-4]。由于调节性T细胞(regulatory T cells, Treg)在调节免疫耐受方面起着重要作用,使它在SLE等自身免疫性疾病的研究中获得了广泛的关注^[1,5-6]。

然而,对SLE Treg的研究存在着不少尚未解决的问题。首先是Treg的标志问题。尽管一般认为经典的Treg应该是CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T细胞亚群,由于Foxp3⁺的检测需要破膜,且Foxp3⁺细胞阳性率较低,有一些临床研究直接以CD4⁺CD25⁺细胞亚群作为Treg来检测、评价。由于评价指标不同,评价结果差异很大,难以得到确切、一致的结论。本实验采用三色标记流式细胞(flow cytometer, FCM)检测方法,测定CD4⁺T和CD8⁺T细胞中Foxp3的表达水平,对其表达水平与SLE病情活动性、临床表现及实验室指标相关性进行评估,并与用CD25⁺作为Treg标志进行比较,初步探讨了Foxp3作为Treg的必要标志在评价SLE免疫功能状态方面的临床意义。

1 对象和方法

1.1 对象

26例SLE患者选自2009年11月~2010年10月于南京医科大学第一附属医院风湿免疫科与肾内科和南京市第一医院风湿免疫科住院患者。所有患者符合美国风湿病学会1997年修订的SLE分类诊断标准^[7],排除合并其他免疫系统疾病或肿瘤患者,其中女25例,男1例,年龄22~61岁,平均33岁。SLE疾病活动度根据加拿大Toronto大学制定的SLE疾病活动指数(SLE disease activity index, SLEDAI)^[8]进行评分,SLEDAI 0~4分为非活动性,5~9分为轻度活动性,≥10分为中/重度活动性。

正常对照组29例,来自南京医科大学健康志愿献血者和南京市江宁区妇幼保健院正常体检人员,平均年龄28岁,女23例,男6例,否认自身免疫性疾病、肿瘤病史,近期无感染病史。

Treg试剂盒(CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性T细胞流式细胞术检测试剂盒)和CD8a-FITC鼠抗人单克隆荧光抗体(eBioscience公司,美国);Ficoll人淋巴细胞分离液(天津TBD生物技术发展中心);磷酸盐缓

冲液(D-hank's)为本实验室自配。

1.2 方法

1.2.1 SLE患者分组

将SLE患者按以下方法分组:①按活动性分组:非活动性、轻度活动性、中/重度活动性(后两组合并称为活动性)组;②按抗dsDNA抗体检测结果分组:抗dsDNA抗体阳性组和阴性组;③按血清补体C3/C4水平分组:血清补体C3/C4水平正常组(C3:0.9~1.8 g/L;C4:0.1~0.4 g/L)和水平降低组(C3 < 0.9 g/L或C4 < 0.1 g/L);④按血清IgG定量结果分组:血清IgG水平正常组(7.0~16.0 g/L)和水平增高组(> 16.0 g/L);⑤按有无肾脏损害分组:肾损组(尿中存在有诊断意义的管型、尿蛋白> 0.5 g/d或+++)和非肾损组;⑥按有无关节病变分组:关节病变组(关节疼痛和炎症体征:压痛、肿胀和红肿)和非关节病变组;⑦按白细胞计数结果分组:白细胞正常组(4.0~10.0 × 10⁹/L)和白细胞减少组(< 4.0 × 10⁹/L);⑧按红细胞计数结果分组:红细胞正常组(3.50~5.50 × 10¹²/L)和白细胞减少组(< 3.50 × 10¹²/L);对以上不同分组进行对比分析。

1.2.2 相关临床实验室检查

SLE患者的相关临床实验室检查包括全血分析、尿液分析、抗dsDNA抗体检测、血清补体(C3、C4)定量、血清IgG定量由南京医科大学第一附属医院或南京市第一医院临床检验中心完成。其中抗dsDNA抗体检测采用免疫印迹法,补体水平的检测采用免疫比浊法,血清IgG定量采用散射比浊法。

1.2.3 流式细胞术检测T细胞表型

外周血标本采集:无菌采集正常对照和确诊的SLE患者外周静脉血4 ml,置于肝素钠抗凝管中混匀;人外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC)的分离:采用聚蔗糖-泛影葡胺分层密度梯度离心法分离外PBMC;FCM检测T细胞CD25⁺、Foxp3⁺亚群:①将上述PBMC细胞悬液调整细胞浓度为5 × 10⁶~5 × 10⁷个/ml,吸取100 μl到每个流式检测管中;②加入表面标志荧光抗体或其同型对照各20 μl,4℃避光孵育30 min;③以染色缓冲液进行洗涤,1 500 r/min离心5 min,弃上清,重复1次;④加入1 ml新鲜配制的Fixation/Permeabilization工作液,振荡混匀,4℃避光孵育60 min;⑤孵育结束后加入缓冲液洗涤1 500 r/min离心5 min,弃上清。重复1次;⑥在大约100 μl的细胞沉淀中加入2 μl正常大鼠血清,室温避光封闭15 min;⑦加入Foxp3-PE荧光抗体或同型对照进行染

色,4℃避光孵育 30 min;⑧孵育结束后再以缓冲液洗涤,1 500 r/min 离心 5 min,弃上清,重复 1 次;⑨加入 300 μl FACS 缓冲液重悬细胞,上流式细胞仪(型号为 FACSCalibur, BD 公司,美国)检测。

1.3 统计学方法

流式细胞仪所得数据采用 Flow Jo7.6.5 软件进行分析,结果采用 SPSS16.0 进行统计学分析,以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组间比较采用方差分析,两两比较采用组间 *t* 检验;各亚群细胞百分率与其 SLEDAI 评分以及 C3、C4 值的相关性采用直线相关分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

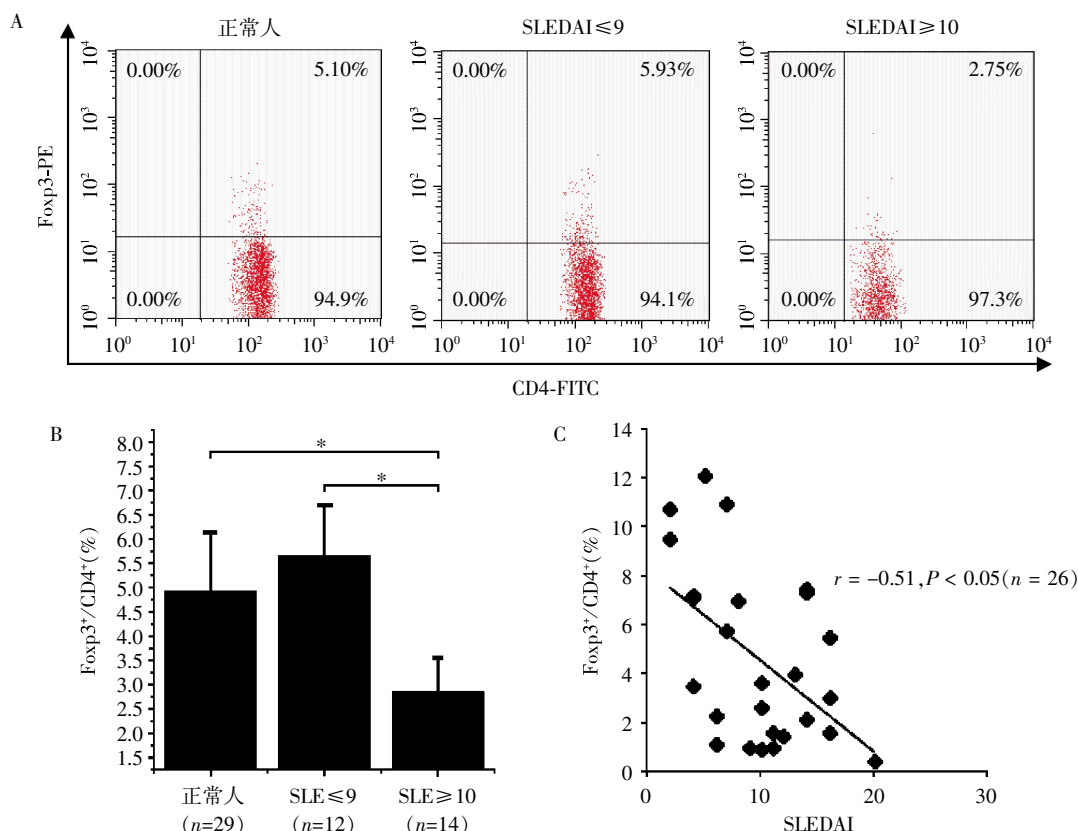
2.1 SLE 患者 CD4⁺ T 细胞亚群中 CD25⁺细胞比例无明显改变,且 SLE 患者 CD4⁺CD25⁺/CD4⁺比值与 SLE 活动性无关

对 SLE 及正常人 PBMCs 进行 CD3、CD4、CD25 三重标记。在流式细胞仪上先以 CD3⁺设门,圈出 CD3⁺T 细胞,再以 CD4⁺设门,圈出 CD4⁺ T 细胞,计算 CD4⁺ T 细胞中 CD4⁺CD25⁺双阳性细胞的比例。结

果显示,与正常人相比,SLE 患者 CD4⁺ T 细胞亚群中 CD25⁺细胞比例没有明显改变 [(14.67 ± 4.85)% vs (15.12 ± 6.49)%, $P > 0.05$],且 CD4⁺CD25⁺/CD4⁺比值与 SLEDAI 没有相关性($r = -0.20, P > 0.05$)。

2.2 中重度 SLE 患者 CD4⁺T 细胞中 Foxp3⁺细胞比例减少,并主要发生于 CD4⁺CD25⁺亚群,且与活动性呈负相关

对 SLE 及正常人 PBMCs 进行 CD4、CD25、Foxp3 三重标记。在流式细胞仪上先以 CD4⁺设门,圈出 CD4⁺细胞,再进一步分析 CD4⁺细胞 CD25、Foxp3 的表达。结果显示,CD4⁺T 细胞亚群中,SLEDAI ≥ 10 的中/重度活动性 SLE 患者表达 Foxp3 的 T 细胞的百分率与正常人相比显著降低,SLEDAI ≤ 9 的轻度或非活动性 SLE 患者外周血 Foxp3⁺T 比例与正常人并无差别。相关分析结果显示,Foxp3⁺/CD4⁺T 值与 SLEDAI 呈负相关(图 1)。如对 CD4⁺细胞同时分析 CD25 和 Foxp3 的表达,结果显示,活动性 SLE 患者外周血 CD25⁺Foxp3⁺/CD4⁺比例与正常人相比显著降低,并与活动性评分呈负相关(图 2)。而且,SLE 患者无论非活动性或轻度活



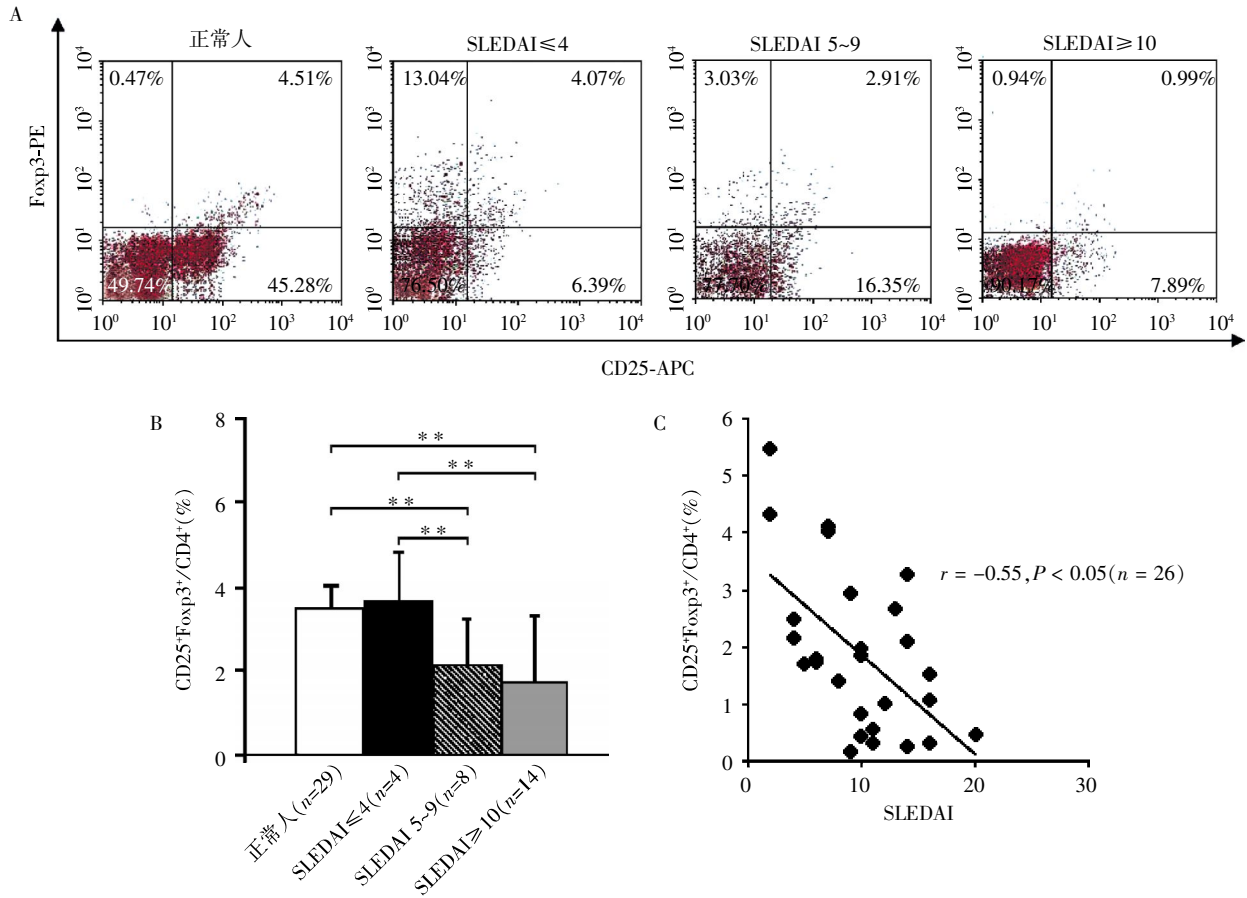
A: 外周血 Foxp3⁺/CD4⁺T 细胞比值分析流式细胞术检测结果;B:SLE 患者外周血 Foxp3⁺/CD4⁺比例的变化, * $P < 0.05$;C:SLE 患者外周血 Foxp3⁺/CD4⁺比值与 SLEDAI 的相关性分析。

图 1 SLE 患者外周血 Foxp3⁺/CD4⁺比例的变化及其与疾病活动性的关系

Figure 1 The variation in the ratio of Foxp3⁺/CD4⁺ in peripheral blood of SLE patients and its relationship with disease activity

动者还是中/重度活动者,CD4⁺CD25⁺T 细胞中 Foxp3⁺细胞比例均显著低于正常人,SLE 中/重度活

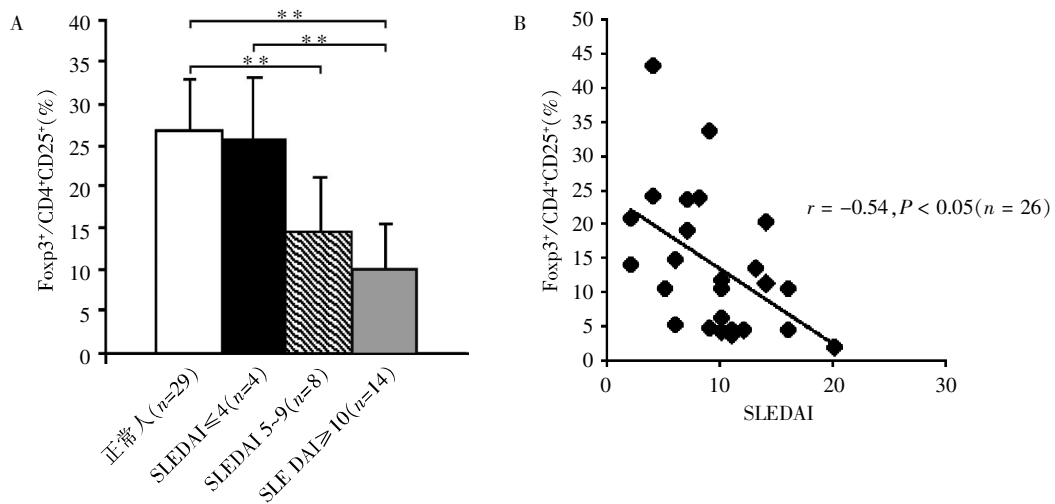
动者又显著低于非活动性患者,Foxp3⁺/CD4⁺CD25⁺比例与 SLEDAI 呈负相关(图 3)。



A:外周血 CD25⁺Foxp3⁺/CD4⁺T 细胞比值分析流式细胞术检测结果;B:SLE 患者外周血 CD25⁺Foxp3⁺/CD4⁺T 比例的变化, **P < 0.01;C:SLE 患者外周血 CD25⁺Foxp3⁺/CD4⁺T 比值与 SLEDAI 的相关性分析。

图 2 SLE 患者外周血 CD25⁺Foxp3⁺/CD4⁺比例的变化及其与疾病活动性的关系

Figure 2 The variation in the ratio of CD25⁺Foxp3⁺/CD4⁺ in peripheral blood of SLE patients and its relationship with disease activity



A:SLE 患者外周血 Foxp3⁺/CD4⁺CD25⁺T 比例的变化, **P < 0.01;B:SLE 患者外周血 Foxp3⁺/CD4⁺CD25⁺T 比值与 SLEDAI 的相关性分析。

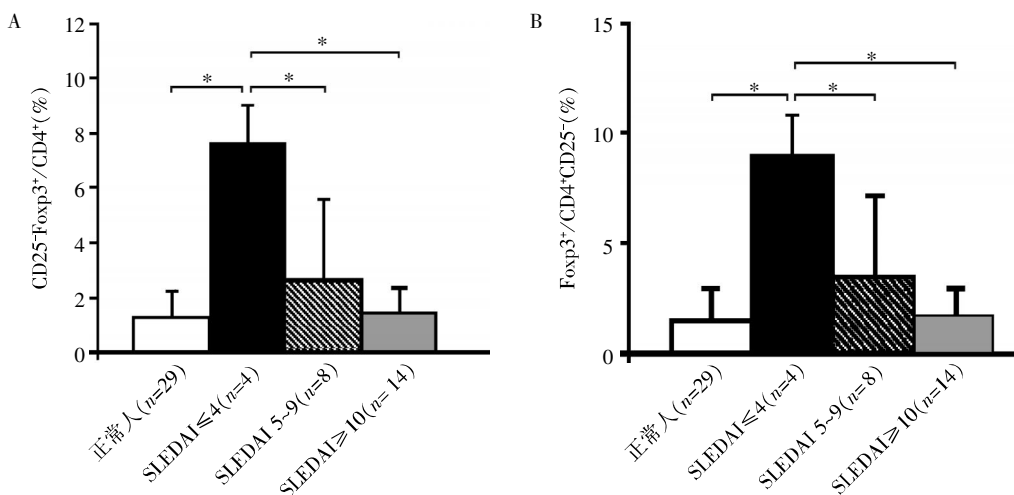
图 3 SLE 患者外周血 Foxp3⁺/CD4⁺CD25⁺比例的变化及其与疾病活动性的关系

Figure 3 The variation in the ratio of Foxp3⁺/CD4⁺CD25⁺ in peripheral blood of SLE patients and its relationship with disease activity

进一步分析 CD4⁺CD25⁻亚群 T 细胞中的 Foxp3 表达发现,非活动性 SLE 患者 CD4⁺CD25⁻亚群 T 细胞中 Foxp3 表达显著增多,表现为 CD25⁻Foxp3⁺/CD4⁺比值显著高于正常人,也显著高于轻度活动和中/重度活动患者(图 4A),但与 SLEDAI 无相关性($r = -0.45, P > 0.05$);相应地,Foxp3⁺/CD4⁺CD25⁻比值也表现为非活动性患者显著高于正常人和活动性患者(图 4B),与 SLEDAI 无相关性($r = -0.43, P > 0.05$)。

2.3 SLE 患者外周血 CD4⁺T 细胞中 CD25⁺Foxp3⁺细胞亚群的减少与免疫功能紊乱、特定的组织器官病理损害密切相关

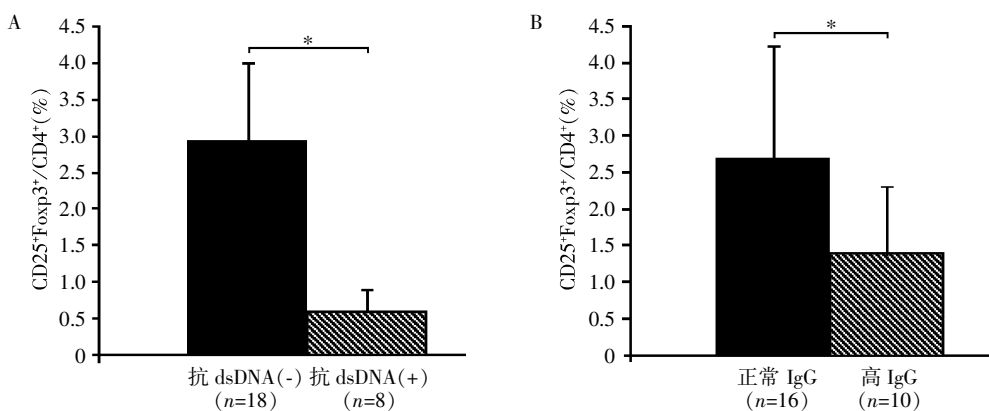
SLE 患者外周血 CD4⁺T 细胞中 CD25⁺Foxp3⁺细胞亚群百分率与抗 dsDNA 相关,呈现抗 dsDNA(+)组患者的 CD25⁺Foxp3⁺/CD4⁺比例显著低于抗 dsDNA(-)组的特点(图 5A);SLE 患者外周血 CD4⁺T 细胞中 CD25⁺Foxp3⁺细胞百分率降低还与 IgG 水平增高相关,表现为其外周血 CD25⁺Foxp3⁺/CD4⁺比例在血清 IgG 增高组要显著低于血清 IgG 水平正常组(图 5B);也与血清补体 C3/C4 水平降低有相关性,呈现 C3、C4 水平下降组外周血 CD4⁺T 细胞中 CD25⁺Foxp3⁺细胞亚群百分率较补体正常组显著减少的特点(图 6A),且 CD25⁺Foxp3⁺/CD4⁺比例与 C3 补体水平呈正相关(图 6B)。



A;SLE 患者外周血 CD25⁻Foxp3⁺/CD4⁺T 比例的变化, * $P < 0.05$;B;SLE 患者外周血 Foxp3⁺/CD4⁺CD25⁻T 比例的变化, * $P < 0.05$ 。

图 4 SLE 患者外周血 CD25⁻Foxp3⁺/CD4⁺比例和 Foxp3⁺/CD4⁺CD25⁻比例的变化

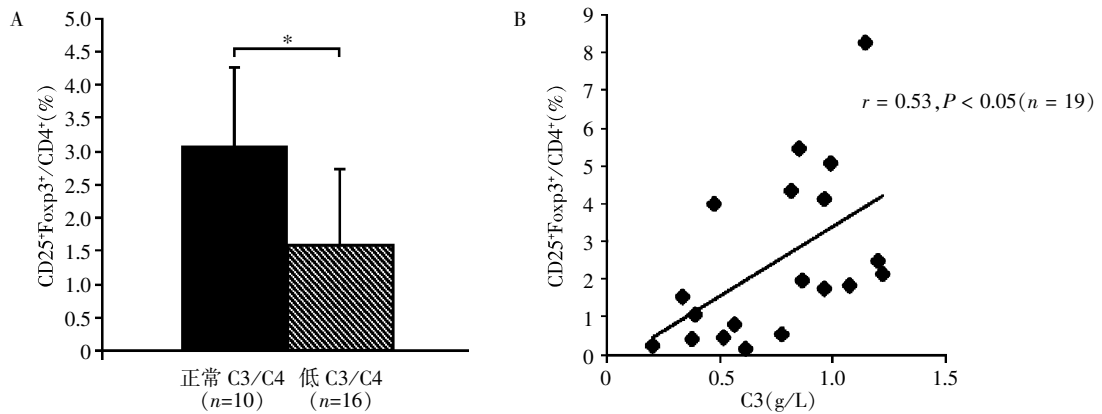
Figure 4 The variation in the ratio of CD25⁻Foxp3⁺/CD4⁺ and Foxp3⁺/CD4⁺CD25⁻ in peripheral blood of SLE patients



A;SLE 患者抗 dsDNA(+)组和抗 dsDNA(-)组 CD25⁻Foxp3⁺/CD4⁺比值的比较, * $P < 0.05$;B;SLE 患者血清 IgG 水平增高组与 IgG 水平正常组 CD25⁻Foxp3⁺/CD4⁺比值的比较, * $P < 0.05$ 。

图 5 SLE 患者外周血 CD25⁻Foxp3⁺/CD4⁺比例的变化及其与抗-dsDNA、血清 IgG 水平的关系

Figure 5 The variation in the ratio of CD25⁻Foxp3⁺/CD4⁺ in peripheral blood of SLE patients and its relationship with anti-dsDNA antibodies or with serum IgG levels



A: SLE 患者 C3/C4 补体水平降低组与 C3/C4 补体水平正常组 CD25⁺Foxp3⁺/CD4⁺ 比值的比较, * $P < 0.05$; B: SLE 患者外周血 CD25⁺Foxp3⁺/CD4⁺ 比例与血清 C3 水平的相关性分析。

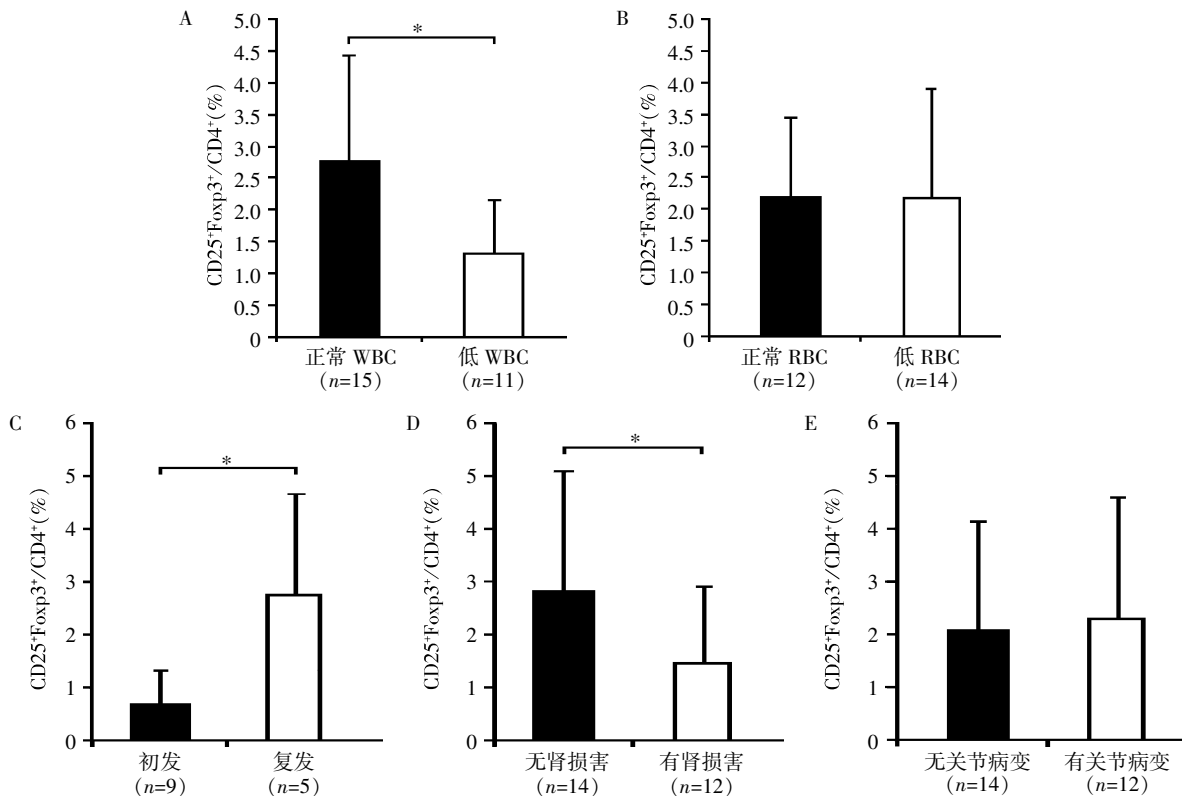
图 6 SLE 患者外周血 CD25⁺Foxp3⁺/CD4⁺ 比例的变化及其与补体 C3/C4 的关系

Figure 6 The variation in the ratio of CD25⁺Foxp3⁺/CD4⁺ in peripheral blood of SLE Patients and its relationship with complement C3/C4

将 SLE 患者按白细胞计数和红细胞计数结果分组分析,结果显示,SLE 患者白细胞减少组外周血 CD25⁺Foxp3⁺/CD4⁺ 比例显著低于白细胞计数正常组(图 7A),但红细胞减少组与红细胞计数正常组之间 CD25⁺Foxp3⁺/CD4⁺ 比例无明显差异(图 7B)。

将 SLE 患者按初次发病或复诊分组,或按有

无肾脏损害分组,或按有无关节病变分组。分析结果显示,初发患者的 CD25⁺Foxp3⁺/CD4⁺T 比例显著低于复诊患者(图 7C),有肾损的患者 CD25⁺Foxp3⁺/CD4⁺T 比例也显著低于无肾损组(图 7D),但有无关节病变组间 CD25⁺Foxp3⁺/CD4⁺T 比例没有明显差异(图 7E)。



A: CD25⁺Foxp3⁺/CD4⁺ 比值与白细胞减少的关系, * $P < 0.05$; B: CD25⁺Foxp3⁺/CD4⁺ 比值与红细胞减少的关系; C: 初发与复诊患者 CD25⁺Foxp3⁺/CD4⁺ 比值的比较, * $P < 0.05$; D: CD25⁺Foxp3⁺/CD4⁺ 比值与肾损害的关系, * $P < 0.05$; E: CD25⁺Foxp3⁺/CD4⁺ 比值与关节病变的关系。

图 7 SLE 患者外周血 CD25⁺Foxp3⁺/CD4⁺ 比值与临床表现的关系

Figure 7 Relationship of the ratio of CD25⁺Foxp3⁺/CD4⁺ in peripheral blood and clinical characteristic of SLE

2.4 SLE 患者外周血 CD8⁺T 细胞中 CD25⁺亚群比例未见明显减少,且与活动性无关

对 SLE 及正常人 PBMCs 进行 CD3、CD8、CD25 三重标记。在流式细胞仪上先以 CD3⁺设门,圈出 CD3⁺T 细胞,再以 CD8⁺设门,圈出 CD8⁺T 细胞,计算 CD8⁺T 细胞中 CD8⁺CD25⁺双阳性细胞的比例。结果显示,与正常人相比,SLE 患者 CD8⁺T 细胞亚群中 CD25⁺细胞无明显改变 [(1.75 ± 0.93)% vs (1.52 ± 0.74)%*P* > 0.05],且其 CD8⁺CD25⁺/CD8⁺T 比值与 SLEDAI 无相关性(*r* = -0.15,*P* > 0.05)。

2.5 SLE 患者 CD8⁺T 细胞中 Foxp3⁺亚群比例未见减少,仅在中/重度活动性 SLE 患者中见 Foxp3⁺/CD8⁺CD25⁺比值明显减少,但与 SLEDAI 无直线相关性

对 SLE 及正常人 PBMCs 进行 CD8、CD25、Foxp3 三重标记。在流式细胞仪上先以 CD8⁺设门,圈出 CD8⁺细胞,再进一步分析 CD8⁺细胞 CD25、Foxp3 的表达。正常人与 SLE 患者外周血 CD8⁺T 细胞中 Foxp3⁺或 CD25⁺Foxp3⁺或 CD25⁻Foxp3⁺细胞亚群均极少,比例在 1%以下,且正常人与 SLE 之间并无差异(数据未列出);仅见 SLE 中/重度活动性外周血 CD8⁺CD25⁺T 细胞亚群中 Foxp3⁺细胞比例减少(图 8),但与 SLEDAI 无相关性(*r* = -0.15,*P* > 0.05)。

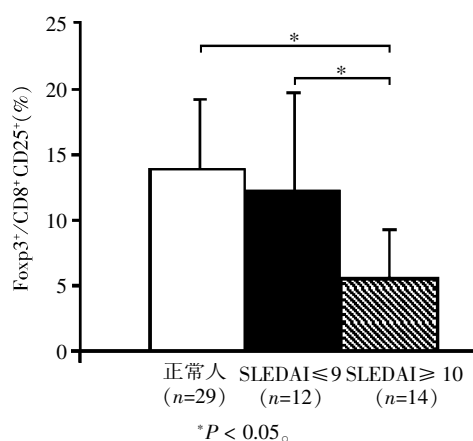


图 8 SLE 患者外周血 Foxp3⁺/CD8⁺CD25⁺比例的变化

Figure 8 The variation in the ratio of Foxp3⁺/CD8⁺CD25⁺ in peripheral blood of SLE patients

3 讨论

SLE 临床表现多样,所导致的全身性免疫功能紊乱引发多组织器官的损伤,例如狼疮性肾炎、血管炎、中枢神经系统损伤、肌炎、关节炎等。大约 70% 的 SLE 伴有肾脏损害,几乎累及包括肾小球、肾小管间质和肾血管等一系列部位。免疫复合物的形成与沉着是 IgG 沉积和补体活化引起肾损害的主

要机制,而进行性肾功能损害是 SLE 主要死亡原因之一。约 95% 的患者可出现关节疼痛和关节炎,常见于四肢小关节。因而 SLE 患者血清中免疫球蛋白 IgG 对于诊断有重要价值,活动期 IgG、IgA、IgM 均可升高,尤以 IgG 为主。IgG 在非 SLE 患者几乎没有沉积,而在 SLE 患者,在皮肤损害、肾脏等处均可见 IgG 的沉积,其特异性近于 100%,且 IgG 沉积者发生狼疮性肾炎的几率较大。此外,一些相关的免疫学检查对于 SLE 的诊断和活性评价也有重要的指导意义。例如抗 dsDNA 抗体属于抗核抗体的一种,是 SLE 标志性自身抗体,在其他疾病少见,对 SLE 的诊断有特异性;其抗体滴度与病情进展一致,高滴度的抗 dsDNA 抗体往往提示患者病情相对较重、预后较差;而缓解期抗 dsDNA 抗体滴度可下降直至恢复正常。而免疫复合物的形成与补体活化使血清 C3/C4 水平因大量消耗而降低。同时,SLE 患者外周血中出现红细胞、白细胞的降低。白细胞降低的主要原因是细胞毒作用和细胞凋亡,包括粒细胞和 T 细胞的凋亡;红细胞和血小板的降低往往是由于抗体、免疫复合物介导的溶细胞作用,也可由促红细胞生成素水平降低引起。

Treg 是体内重要的免疫负调控机制,对 SLE 的上述病理过程具有抑制作用,而 Treg 的数量和功能缺陷可能是 SLE 发生、发展的重要原因之一^[6,9]。CD4⁺CD25⁺Treg 的标记物包括 Foxp3、CD127^{low}、CD49d、GITR、细胞毒 T 细胞相关抗原-4(CTLA-4),糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子受体(GITR),CD60L^{high},Neuropilin-1,CD122,OX-40(CD134),TNFR2,淋巴细激活基因 3(LAG-3),CCR4,CCR7 and CCR8 等^[10]。其中 Foxp3 是监测调节 T 细胞功能活性的最好标记物之一。CD8⁺Treg 标记物包括 CD25、Foxp3、CD45RO⁺、CD122⁺、CD103⁺、CD152⁺、CD28⁻等^[11]。Foxp3 是 forkhead/winged-helix 转录因子家族成员,其基因位于人染色体 Xp11.23~Xp13.3,含有 11 个外显子,人类中高度保守。Foxp3 基因转录翻译为 Scurfin 蛋白,由叉头螺旋结构、C2H2 锌指结构和亮氨酸拉链(氨基酸位置介于叉头结构和锌指结构之间)3 个主要的功能结构域组成。Foxp3 是 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞的特异性分子,参与调控 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞的发育和成熟,进而影响 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞发挥抑制性调节功能^[12-14]。在 Foxp3 基因突变或敲除小鼠中均未发现调节性 T 细胞。同时,Foxp3 缺陷小鼠的 CD25⁺T 细胞不具有正常小鼠的调节性 T 细胞的免疫抑制特性。这些现象

都说明了 Foxp3 在维持调节性 T 细胞功能中所起的决定性作用^[15]。

尽管 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞中都存在 Treg 功能亚群,但 CD4⁺Treg 是目前研究得比较多的亚型,在自身免疫耐受中起重要作用。由于 Treg 的标志尚未统一,关于 SLE Treg 的具体研究结果也就存在一定的分歧。有些研究结果显示,SLE 患者体内的 CD4⁺CD25⁺Treg 无论是数量还是功能都有缺陷,即 CD4⁺CD25^{high}Treg 占 CD4⁺T 细胞的比例下降,同时其免疫抑制功能也降低^[16-17],而这种缺陷或降低与疾病的活动程度呈正相关。但也有不少研究未能证明 SLE 外周血 CD4⁺CD25⁺T 细胞数量发生明显改变且与疾病活动相关。赵书山等^[18]研究显示 SLE 患者 CD4⁺CD25⁺CD127^(low/-)调节性 T 细胞与正常对照相比并无显著差异。本研究选取最特异性的 Foxp3 分子来研究 SLE 患者体内 CD4⁺CD25⁺和 CD8⁺CD25⁺Treg,并与 SLE 病情活动性、临床表现及实验室指标相关性进行评估,阐述这两类调节性 T 细胞在 SLE 的发生、发展及转归中可能的作用。

本文结果显示,中重度 SLE 患者 CD4⁺T 细胞中 Foxp3⁺细胞比例减少,并主要发生于 CD4⁺CD25⁺亚群,Foxp3⁺/CD4⁺、CD25⁺Foxp3⁺/CD4⁺、Foxp3⁺/CD4⁺CD25⁺比例均减少;而相比之下,非活动性 SLE 患者与轻度活动性患者 CD25⁺Foxp3⁺/CD4⁺、Foxp3⁺/CD4⁺CD25⁺细胞比例均与正常人相近。Foxp3⁺/CD4⁺、CD25⁺Foxp3⁺/CD4⁺、Foxp3⁺/CD4⁺CD25⁺比例与 SLEDAI 呈负相关。尤其是 CD25⁺Foxp3⁺/CD4⁺比值与抗 dsDNA 阳性、血清补体 C3/C4 水平降低、血清 IgG 水平增高相关;SLE 患者白细胞降低组、有肾脏损害组 CD4⁺T 中 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T 细胞比例下降更为显著,提示 CD25⁺Foxp3⁺/CD4⁺所反映的 Treg 的数量/功能缺陷与因免疫紊乱所导致的临床病理损害相一致。这一结果也提示外周血的调节性 T 细胞的降低可能参与了狼疮肾病等组织器官的病变。SLE 患者往往病程较长,发病数十年,经过长期药物的治疗,包括糖皮质激素、各种细胞毒性药物、免疫抑制药等,会对 SLE 发病机制的研究结果造成影响。本研究将初次发病、用药不超过 1 个月的患者归为初诊组;其余经长期治疗但病情有反复者归为复诊组(包含仍有活动及不活动者)。初诊组疾病活动性高,病情严重,平均 SLEDAI 为(12.0 ± 2.5)分;复诊组病情较轻,主要为轻度活动或不活动的病人,平均 SLEDAI 为(8.9 ± 4.2)分。两组相比较,初发患者 CD4⁺T 中 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T 细胞比例显著

低于复诊组,显示 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺/CD4⁺比例与疾病的严重程度、活动性呈负相关。而 SLE 患者 CD8⁺T 细胞中 CD25⁺、Foxp3⁺亚群比例未见明显减少,只是当引入 Foxp3 标志精确到 CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺细胞亚群时显示中/重度活动性 SLE 患者 Foxp3⁺/CD8⁺CD25⁺比例减少,但与活动性无关。这一结果提示 CD8⁺CD25⁺Treg 在 SLE 中的作用可能不如 CD4⁺CD25⁺Treg 显著。

本研究还在 SLE 患者体内证实了 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T 细胞亚群的存在。国外也有研究报道了 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T 细胞亚群的存在^[12]。有人认为这也是一种 Treg,是机体在免疫失调情况下为恢复免疫系统的平衡而发生的代偿反应^[11]。也有人认为,Foxp3⁺T 细胞不一定都是有功能的 Treg,有可能是静息的 Treg,甚至还可能是造成免疫炎症损伤的效应细胞^[19]。从本文结果看,CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T 细胞亚群主要是在非活动性 SLE 患者外周血中显著增高,且与 SLEDAI 无相关性。因此更加支持该群细胞可能是免疫代偿性调节的功能性 Treg 的推测。

总之本研究显示 SLE 患者体内 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 显著减少与疾病活动性、免疫功能紊乱和病理损害密切相关,说明 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 在 SLE 患者体内发挥了更重要的作用,而以 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺作为 Treg 的标志进行临床检测更能体现 SLE 患者调节性 T 细胞的缺陷,可以作为帮助判断病情严重性的临床观察指标。

[参考文献]

- [1] Tenbrock K, Juang YT, Kyttaris VC, et al. Altered signal transduction in SLE T cells[J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2007, 46(10): 1525-1530
- [2] Kassi E, Moutsatsou P. Estrogen receptor signaling and its relationship to cytokines in systemic lupus erythematosus [J]. *J Biomed Biotechnol*, 2010, 2010: 317452
- [3] Rhodes B, Vyse TJ. The genetics of SLE: an update in the light of genome-wide association studies [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2008, 47(11): 1603-1611
- [4] Bonelli M, Savitskaya A, Von Dalwigk K, et al. Quantitative and qualitative deficiencies of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus (SLE)[J]. *Int Immunol*, 2008, 20(7): 861-868
- [5] Leslie M. Regulatory T cells get their chance to shine[J]. *Science*, 2011, 332(6033): 1020-1021
- [6] 王卫文, 张戎, 杨晓帆, 等. 正常人外周血中 CD8⁺CD25⁺T 细胞亚群的数量及其细胞因子表达的初步研究 [J]. *南京医科大学学报 (自然科学版)*, 2007, 27

- (10):1092-1097
- [7] Urowitz MB, Gladman DD, Tom BD, et al. Changing patterns in mortality and disease outcomes for patients with systemic lupus erythematosus [J]. *Rheumatol*, 2008, 35 (11):2152-2158
- [8] Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus [J]. *Arthritis Rheum*, 1997, 40(9):1725
- [9] Mudd PA, Teague BN, Farris AD. Regulatory T cells and systemic lupus erythematosus [J]. *Scand J Immunol*, 2006, 64(3):211-218
- [10] Matarese G, De Rosa V, La Cava A. Regulatory CD4 T cells: sensing the environment [J]. *Trends Immunol*, 2008, 29(1):12-17
- [11] Lu L, Cantor H. Generation and regulation of CD8⁺ regulatory T cells [J]. *Cell Mol Immunol*, 2008, 5 (6):401-406
- [12] Bonelli M, Savitskaya A, Steiner CW, et al. Phenotypic and functional analysis of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T Cells in Patients with systemic lupus erythematosus [J]. *Immunol*, 2009, 182(3):1689-1695
- [13] Williams LM, Rudensky AY. Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3 [J]. *Nat Rev Immunol*, 2007, 8(3):277-284
- [14] Zheng Y, Rudensky AY. Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage [J]. *Nat Immunol*, 2007, 8(5):457-462
- [15] Bruinsma M, van Soest PL, Leenen PJ, et al. Keratinocyte growth factor improves allogeneic bone marrow engraftment through a CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cell-dependent mechanism [J]. *Immunol*, 2009, 182(12):7364-7369
- [16] Miyara M, Gorochoy G, Ehrenstein M, et al. Human Foxp3⁺ regulatory T cells in systemic autoimmune diseases [J]. *Autoimmun Rev*, 2011, 10(12):744-755
- [17] Novak J, Lehuen A. Mechanism of regulation of autoimmunity by iNKT cells [J]. *Cytokine*, 2011, 53 (3):263-270
- [18] 赵书山, 厉小梅, 李向培, 等. CD4⁺CD25⁺CD127^{low} T 细胞在系统性红斑狼疮活动期患者中的表达 [J]. *中华医学杂志*, 2008, 88(7):453-456
- [19] Dinesha RK, Skaggsa BJ, Cavaa AL, et al. CD8⁺ Tregs in lupus, autoimmunity, and beyond [J]. *Autoimmun Rev*, 2010, 9(8):560-568

[收稿日期] 2012-01-07

科技出版物中文字与标点符号的书写

1. 汉字的使用应严格执行国家的有关规定,除特殊需要外,不得使用已废除的繁体字、异体字等不规范汉字。
2. 标点符号的用法应以 GB/T 15834-1995《标点符号用法》为准,根据科技书刊的习惯,建议:
 - (1) 省略号用 2 个三连点,其后不写“等”字,外文字符只用 1 个三连点;
 - (2) 波浪号“~”用于表示数值范围;
 - (3) 一字线“—”用于表示地域范围、走向、相关、递进等;
 - (4) 半字线“-”用于表示复合名词等;
 - (5) 外文中的标点符号应遵循外文的习惯用法,如连字符“-”。

(本刊编辑:接雅俐)