

SLE 患者外周血 CD4⁺T 细胞 IL-2 受体 β 、 γ 链表达缺陷与诱导性调节性 T 细胞转化形成障碍的相关性

周小斌¹, 杨晓帆¹, 徐安琪², 王慧娟¹, 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南京市红十字血液中心, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:通过检测系统性红斑狼疮(SLE)患者外周血 CD4⁺CD25⁺T 细胞及其经体外诱导转化所得 CD4⁺CD25⁺T 细胞表面白细胞介素 2 受体(IL-2R) β 和 γ 链(CD122 和 CD132)的表达,探讨其对 Foxp3⁺诱导性调节性 T 细胞(iTreg)转化形成的影响。方法:分离健康对照和 SLE 患者外周血单个核细胞(PBMCs)并进一步分离出 CD4⁺CD25⁺T 细胞,分别用流式细胞术和实时定量 PCR 技术分析 CD25⁺CD122⁺/CD4⁺、CD25⁺CD132⁺/CD4⁺比值以及 CD4⁺CD25⁺T 细胞内 CD122、CD132(IL-2R β 、 γ 链)mRNA 相对表达水平。将 CD4⁺CD25⁺T 细胞诱导转化,进一步分析转化后细胞 CD25⁺CD122⁺/CD4⁺、CD25⁺CD132⁺/CD4⁺、CD25⁺Foxp3⁺/CD4⁺、pStat5⁺/CD4⁺CD25⁺的比值。结果:与正常人相比,SLE 患者外周血细胞 CD4⁺CD25⁺T 细胞 CD122 表达变化不明显,但其 CD25⁺CD132⁺/CD4⁺比值偏低且与系统性红斑狼疮疾病活动性指数(SLEDAI)呈负相关;CD4⁺CD25⁺T 细胞内 CD132 mRNA 相对表达水平亦低于正常对照组;SLE 患者外周血 CD4⁺CD25⁺T 细胞经诱导转化后 CD4⁺T 细胞中 CD25⁺Foxp3⁺T 细胞亚群比例低于正常对照组,且与 SLEDAI 呈负相关;SLE 患者 CD4⁺CD25⁺T 细胞转化后 CD25⁺CD122⁺/CD4⁺、CD25⁺CD132⁺/CD4⁺比例低于对照组,但仅后者与 SLEDAI 呈负相关;SLE 患者细胞转化后胞内磷酸化 Stat5 表达水平低于对照组,且 pStat5⁺/CD4⁺CD25⁺比值与 SLEDAI 负相关,与 CD25⁺Foxp3⁺/CD4⁺比值呈正相关。结论:SLE 患者外周血 CD4⁺CD25⁺T 细胞存在明显的 CD132(IL-2R γ 链)表达缺陷,且与疾病活动性相关;在其向 CD4⁺CD25⁺细胞亚群转化过程中同样存在 CD132 及 CD122(IL-2R β 链)表达缺陷,但只有 CD132 表达缺陷与疾病活动性、Foxp3 分子表达相关,并伴有 Stat5 磷酸化水平降低,提示 IL-2R γ 链表达缺陷及其下游信号减弱与 SLE Foxp3⁺iTreg 转化形成障碍密切相关。

[关键词] 红斑狼疮;调节性 T 细胞;Foxp3;白细胞介素 2 受体;pStat5

[中图分类号] R593.24

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)04-455-09

doi:10.7655/NYDXBNS20150404

The predictive role of abnormal expression of IL-2 receptor β/γ chain on CD4⁺T cells in peripheral blood of SLE patients on the defective induction of induced regulatory T cells

Zhou Xiaobin¹, Yang Xiaofan¹, Xu Anqi², Wang Huijuan¹, Ji Xiaohui^{1*}

(¹Department of Microbiology and Immunology, NJMU, Nanjing 210029; ²Nanjing Red Cross Blood Center, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To detect the expression of IL-2 receptor β and γ chain (CD122 and CD132) on CD4⁺CD25⁺T cells in peripheral blood of systemic lupus erythematosus(SLE)patients and CD4⁺CD25⁺T cells which were induced from the former in vitro, as well as assess its effects on the induction of Foxp3⁺ induced regulatory T cell (iTreg). **Methods:** Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from SLE patients and healthy donors and further isolated CD4⁺CD25⁺T cells. The ratio of CD25⁺CD122⁺/CD4⁺, CD25⁺CD132⁺/CD4⁺ and CD122/CD132(IL-2 receptor β and γ chain) mRNA relative abundance in CD4⁺CD25⁺T cells were analyzed by flow cytometry and real-time quantitative PCR, respectively. CD4⁺CD25⁺T cells were induced to further analyze the ratio of CD25⁺CD122⁺/CD4⁺, CD25⁺CD132⁺/CD4⁺, CD25⁺Foxp3⁺/CD4⁺, pStat5⁺/CD4⁺CD25⁺. **Results:** Compared with the normal subjects, there were no significant changes in the expression of CD122 on CD4⁺CD25⁺T cells in SLE patients PBMCs, but the ratio of CD25⁺CD132⁺/CD4⁺ was lower and negatively correlated with the SLEDAI; The CD132 mRNA relative abundance in CD4⁺CD25⁺T cells was also lower than that in the control group; After CD4⁺CD25⁺T cells in peripheral blood of SLE patients were induced, the percentage of

[基金项目] 江苏省病原生物学重点实验室开放课题

*通信作者(Corresponding author), E-mail: jixiao@njmu.edu.cn

CD25⁺Foxp3⁺T cells in CD4⁺T cells was lower than that in the control group and negatively correlated with the SLEDAI;The ratio of CD25⁺CD122⁺/CD4⁺and CD25⁺CD132⁺/CD4⁺ in cells which were transformed from CD4⁺CD25⁺T cells in SLE patients was lower than that in the control group, but only the latter was negatively correlated with SLEDAI. The expression of phosphorylated Stat5 in transformed cells of SLE patients was lower than that in the control group and the ratio of pStat5⁺/CD25⁺CD4⁺ was negatively correlated with SLEDAI and positively correlated with the ratio of CD25⁺Foxp3⁺/CD4⁺. **Conclusion:** There was obviously defective expression of CD132(IL-2R γ chain) on CD4⁺CD25⁺T cells in peripheral blood of SLE patients and it was correlated with disease activity;The expression of CD132 and CD122 (IL-2R β chain) was also defective when the cells were transformed into CD4⁺CD25⁺T cell subsets, but only the defective expression of CD132 was correlated with disease activity and Foxp3 expression and was accompanied by lower levels of phosphorylated Stat5, suggesting that the defective expression of IL-2R γ chain and its weaker downstream signal are closely related with SLE patients Foxp3⁺iTreg induction obstacle.

[Key words] lupus erythematosus; regulatory T cell; Foxp3; interleukin-2 receptor; pStat5

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(04):455-463]

系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)是一种复杂的慢性自身免疫性疾病,特点为患者体内产生抗核抗体,并可出现肾、脑、皮肤、关节等多个系统和脏器的损伤^[1]。SLE患者体内有着明显的免疫调节紊乱,而调节性T细胞(regulatory T cell, Treg)在维持机体内环境稳态及调节免疫应答中具有显著作用^[2]。有研究结果显示,SLE患者体内CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg细胞无论是数量还是功能都存在缺陷^[3-4],且细胞因子尤其是白介素2(interleukin-2, IL-2)及其受体(IL-2R)异常表达与SLE的发生发展密切相关^[5]。目前对于胸腺来源的天然调节性T细胞(natural Treg, nTreg)的研究比较广泛,而对于外周血中诱导产生的诱导性调节性T细胞(induced Treg, iTreg)在SLE患者体内数量与转化形成的研究甚少。本课题组旨在通过研究SLE患者外周血CD4⁺T细胞表面IL-2R的 β (CD122)、 γ (CD132)链表达及其对Foxp3⁺iTreg诱导形成的影响,为深入探讨SLE患者外周免疫功能紊乱的分子机制提供参考依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 研究对 象

SLE患者85例,为2013年5月~2014年11月南京医科大学第一附属医院及南京医科大学附属南京医院风湿免疫科门诊及住院患者,所有患者均符合1997年美国风湿病学会(ACR)修订的SLE分类诊断标准,排除其他免疫系统疾病或肿瘤,其中女79例,男6例,年龄13~71岁,平均年龄36岁。根据系统性红斑狼疮疾病活动性指数(SLEDAI)划分疾病活动状态,其中活动期(SLEDAI \geq 5)患者

63例,稳定期(SLEDAI $<$ 5)患者22例。健康对照37例,均为健康志愿者,其中女33例,男4例,平均年龄26岁,无相关免疫性疾病和近期感染史。

1.1.2 试剂和仪器

人外周血淋巴细胞分离液(天津灏洋生物制品有限公司);RNA逆转录试剂盒及引物(美国Invitrogen公司);TriPure分离试剂、FastStart Universal SYBR Green Master(瑞士Roche公司);抗人CD3、CD28功能抗体(美国eBioscience公司);人rIL-2、rTGF- β 1细胞因子(英国Peprotech公司);雷帕霉素(rapamycin, RAPA, 美国Cayman公司);CD4-FITC、CD25-APC、CD132-PE、CD122-PE、Foxp3-PE鼠抗人单克隆荧光抗体及其同型对照抗体(美国Biollegend公司);RPMI-1640培养基、小牛血清(以色列BI公司);人CD4⁺CD25⁺调节性T细胞分离试剂、磁性细胞分选柱、磁性细胞分离器(德国Miltenyi公司);pStat5-PE(pY694)鼠抗人单克隆荧光抗体及其同型对照抗体、FACSCalibur流式细胞仪(美国BD公司);7300型荧光定量PCR仪(美国ABI公司)。

1.2 方 法

1.2.1 外周血单个核细胞分离

无菌采集SLE组(均于用药前采血)及对照组外周静脉血10 ml置于肝素钠抗凝管中混匀,采用聚蔗糖-泛影葡胺分层密度梯度离心法分离出外周血单个核细胞(PBMCs)。

1.2.2 PBMCs表面标记的测定

取上述分离出的PBMCs,调整细胞悬液浓度为 $5\times 10^6\sim 5\times 10^7$ 个/ml,每管加入100 μ l细胞悬液,同时标记CD4-FITC、CD25-APC、CD122-PE鼠抗人单克隆荧光抗体或CD132-PE单克隆抗体并设立同型对照管,于4 $^{\circ}$ C冰箱避光孵育30 min,后经PBS洗涤

重悬后用 FACSCalibur 检测。采用 Flowjo7.6.5 软件分析数据。

1.2.3 免疫磁珠分选 CD4⁺CD25⁺T 细胞

通过免疫磁珠分离法对 PBMC 分别进行阴选和阳选以获得 CD4⁺CD25⁺T 细胞,流式细胞计数(FCM)法检测其纯度>95%。经分选获得的 CD4⁺CD25⁺T 细胞分为两部分,一部分加入 TriPure 分离试剂后置-80℃冰箱内冻存以备定量 PCR 检测,另一部分用作细胞培养。

1.2.4 实时定量 PCR 反应

提取上述冻存细胞的总 RNA,经逆转录得到 cDNA 后进行荧光定量 PCR,检测相关基因的 mRNA 相对表达水平。人 CD122 的引物为:Sense:5'-CTGCTTCACCAACCAGGGTTA-3'和 Anti-sense:5'-GGGGTCTGTAAGTAAAGTACACCT-3',扩增片段大小为 88 bp;人 CD132 的引物为:Sense:5'-GTGCAGCCACTATCTATTCTCTG-3'和 Anti-sense:5'-GTGAAGTGTTAGGTTCTCTGGAG-3',扩增片段大小为 185 bp;内参 β-actin 引物序列为:Sense:5'-GGACCTGACCGACTACCTCATG-3'和 Anti-sense:5'-CGACGTAGCAGAGCTTCTCCTT-3',片段大小为 110 bp。

1.2.5 iTreg 细胞的体外诱导培养

预先将 24 孔板包被抗人 CD3 功能抗体(10 μg/ml)过夜,取上述经磁珠分选得到的 CD4⁺CD25⁺T 细胞按 5×10⁵ 个/孔接种于 1 ml 含 10% 小牛血清的 RPMI1640 完全培养基中,而后每孔加入抗人 CD28 功能性抗体(2 μg/ml)、rIL-2(100 U/ml),rTGF-β(5 ng/ml)和雷帕霉素(100 ng/ml),置于 37℃、5%CO₂ 饱和湿度的细胞培养箱培养 5 d。

1.2.6 转化后细胞流式细胞术检测

收取上述培养 5 d 后的细胞,调整细胞悬液浓度为 5×10⁶~5×10⁷ 个/ml,每管加入 100 μl 细胞悬液,细胞表面受体染色标记同上述。另制备同样的细胞悬液,加入 10 μl CD4-FITC 与 10 μl CD25-APC 单抗,于 4℃ 下避光孵育 30 min 以标记 CD4⁺CD25⁺T 细胞。PBS 洗涤 1 次后加入 1 ml Fix/Perm 工作液孵育 45 min,而后用洗涤缓冲液洗涤,加入 1 μl 正常兔血清于 4℃ 封闭 15 min,之后加入 5 μl 抗人 Foxp3-pE 单抗或 10 μl 抗人 pStat5-pE 单抗并设立同型对照管,于 4℃ 避光孵育 30 min。经洗涤缓冲液洗涤 2 次后用 300 μl PBS 重悬进行检测。采用 Flowjo7.6.5 软件分析数据。

1.3 统计学分析

应用 SPSS16.0 统计软件分析数据。数值变量数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,各亚群细胞百分率与其 SLEDAI 评分的相关性采用直线相关分析, $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

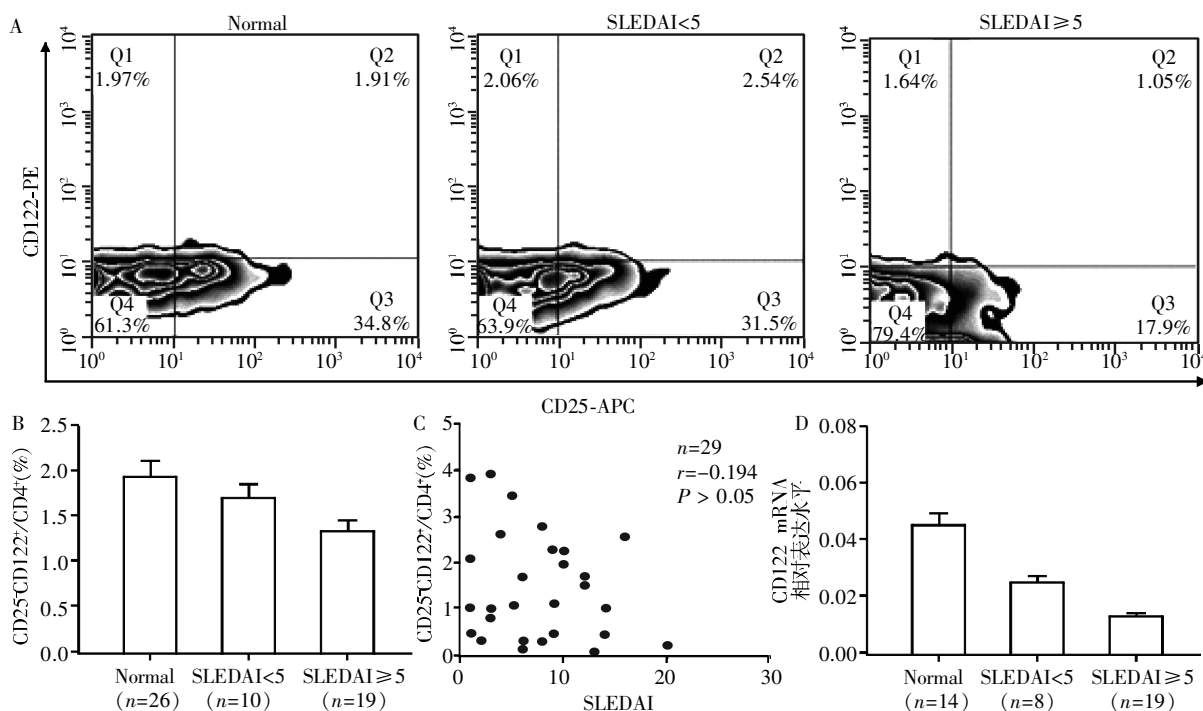
2.1 SLE 患者外周血 CD4⁺CD25⁺T 细胞亚群 IL-2 受体 γ 链表达缺陷明显,且与疾病活动性相关

我们检测了 SLE 患者外周血 T 细胞 CD4⁺CD25⁺亚群的 CD122 和 CD132 的表达情况,以评估其 IL-2R β 和 γ 链表达情况。结果发现,与健康对照组相比,无论稳定期还是活动期 SLE 患者,其外周血 T 细胞 CD25⁺CD122⁺(IL-2R β 链)/CD4⁺比值均无明显改变[(1.93 ± 1.06)% vs (1.69 ± 1.33)% vs (1.31 ± 1.03)%, $P > 0.05$],且 SLE 患者 CD25⁺CD122⁺/CD4⁺比值与 SLEDAI 无相关性。与此同时,经实时定量 PCR 检测,稳定期与活动期 SLE 患者 CD4⁺CD25⁺T 细胞内 CD122(IL-2R β 链)mRNA 相对表达水平与正常对照组比较无统计学差异 [(0.05 ± 0.11)%、(0.03 ± 0.04)% vs (0.01 ± 0.02)%, $P > 0.05$,图 1]。

然而,与健康对照相比,稳定期和活动期 SLE 患者 CD25⁺CD132⁺(IL-2R γ 链)/CD4⁺比值均低于健康对照组,且有统计学差异[(41.30 ± 5.69)%、(28.84 ± 5.07)% vs (24.26 ± 8.52)%, $P < 0.01$];虽然稳定期比值高于活动期,但是没有统计学差异;相关分析显示 SLE 患者 CD25⁺CD132⁺/CD4⁺比值与 SLEDAI 呈负相关。实时定量 PCR 检测结果亦表明,稳定期与活动期 SLE 患者外周血 CD4⁺CD25⁺T 细胞内 CD132(IL-2R γ 链)mRNA 相对表达水平均低于正常对照组[(0.25 ± 0.18)%、(0.08 ± 0.04)% vs (0.10 ± 0.09)%, $P < 0.01$],而稳定期与活动期间无统计学差异(图 2)。

2.2 SLE 患者外周血 CD4⁺CD25⁺T 细胞诱导转化形成 Foxp3⁺T 细胞的能力缺陷,且与疾病活动性相关

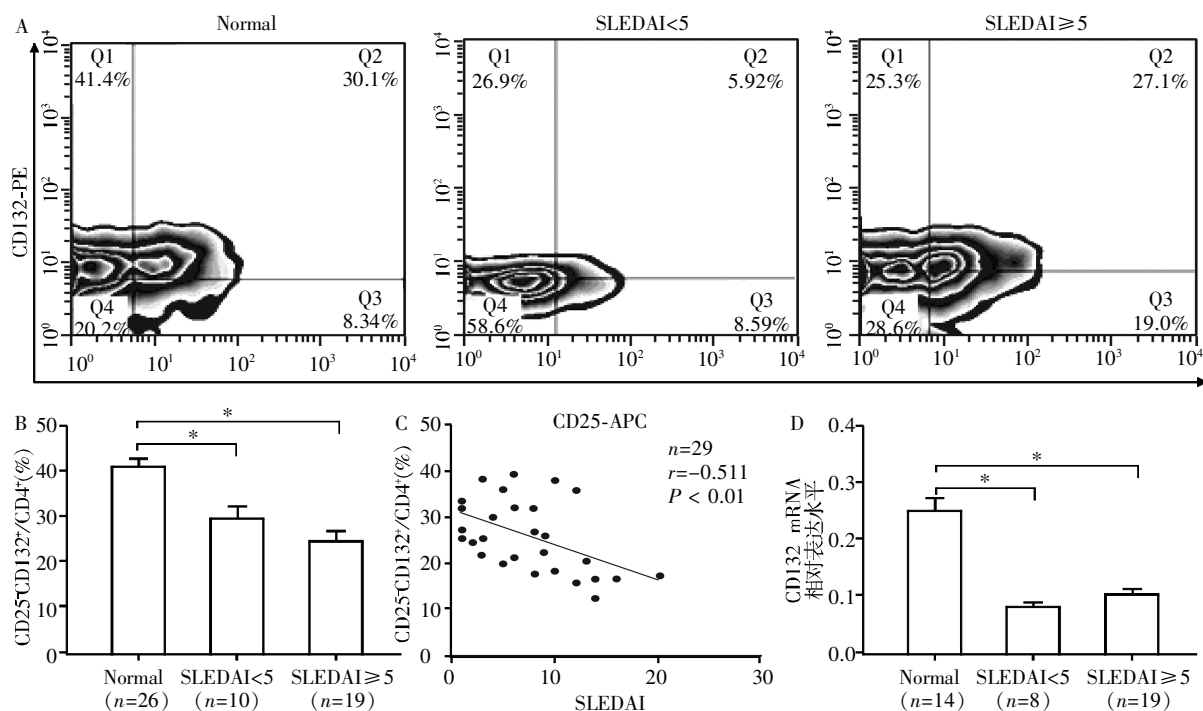
将健康对照与 SLE 患者外周血 CD4⁺CD25⁺T 细胞在体外经过 5 d 的诱导培养,再分析其转化为 CD25⁺Foxp3⁺ iTreg 的形成情况。结果发现,虽经相同的诱导培养,无论稳定期还是活动期 SLE 患者,其 CD25⁺Foxp3⁺T 细胞占 CD4⁺T 细胞比例均低于健康对照组[(43.20 ± 10.94)%、(17.44 ± 7.97)% vs (60.02 ± 9.79)%, $P < 0.01$];稳定期 SLE 患者诱导转化所得细胞 CD25⁺Foxp3⁺/CD4⁺比值高于活动期 SLE 患者,且差异有统计学意义($P < 0.01$);与此同



A: 外周血 CD25⁺CD122⁺/CD4⁺T 细胞比值分析(流式细胞术检测)结果; B: 正常对照组与 SLE 患者外周血 CD25⁺CD122⁺/CD4⁺的比例; C: SLE 患者外周血 CD25⁺CD122⁺/CD4⁺比值与 SLEDAI 的相关性; D: 正常对照组与 SLE 患者外周血 CD4⁺CD25⁺T 细胞内 CD122 mRNA 相对表达水平。

图1 外周血 CD4⁺CD25⁺T 细胞亚群 CD122(IL-2R β 链)的表达及其与 SLEDAI 的相关性

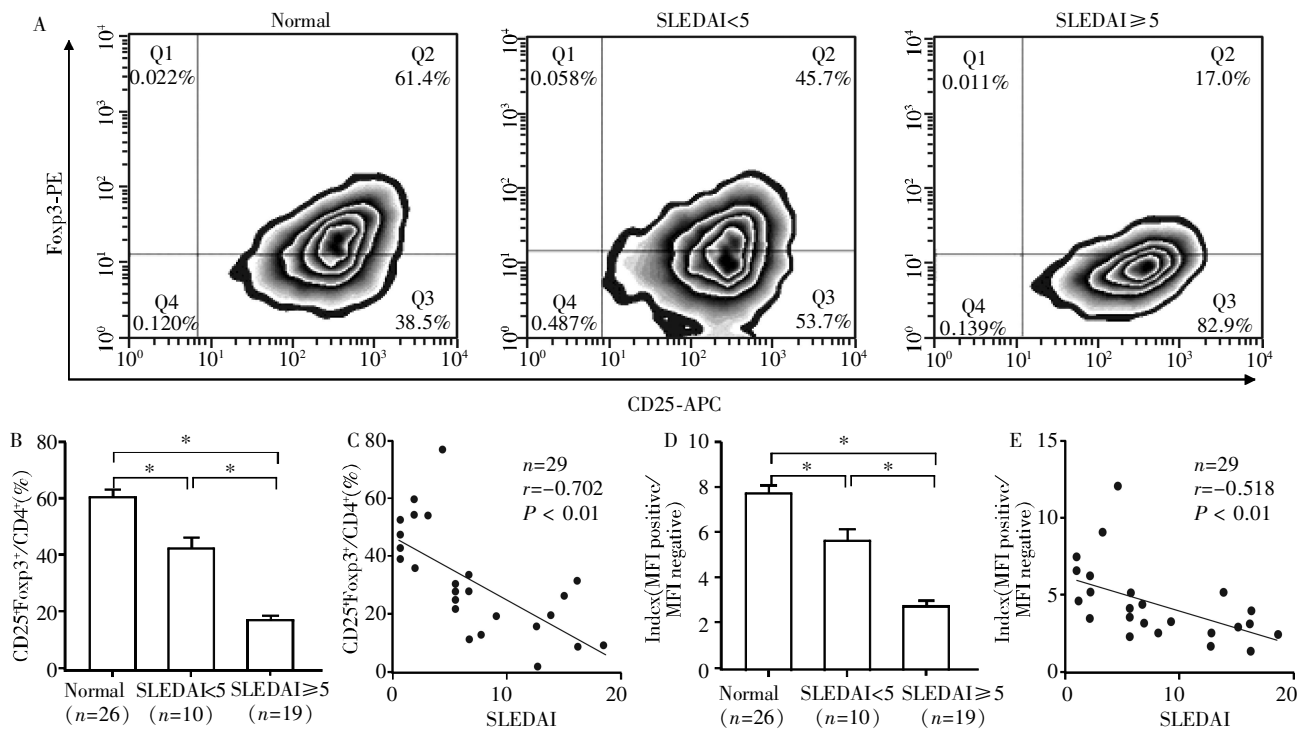
Figure 1 Expression of CD122 (IL-2R β chain) on CD4⁺CD25⁺T cell subsets in peripheral blood and its relationship with SLEDAI



A: 外周血 CD25⁺CD132⁺/CD4⁺T 细胞比值分析(流式细胞术检测)结果; B: 正常对照组与 SLE 患者外周血 CD25⁺CD132⁺/CD4⁺的比例, *P < 0.01; C: SLE 患者外周血 CD25⁺CD132⁺/CD4⁺比值与 SLEDAI 的相关性; D: 正常对照组与 SLE 患者外周血 CD4⁺CD25⁺T 细胞内 CD132 mRNA 相对表达水平, *P < 0.01。

图2 外周血 CD4⁺CD25⁺T 细胞亚群 CD132(IL-2R γ 链)的表达及其与 SLEDAI 的相关性

Figure 2 Expression of CD132 (IL-2R γ chain) on CD4⁺CD25⁺T cell subsets in peripheral blood and its relationship with SLEDAI



A: CD4⁺CD25⁺T 细胞经诱导转化后 CD25⁺Foxp3⁺/CD4⁺T 细胞比值分析 (流式细胞术检测) 结果; B: 正常对照与 SLE 患者细胞转化后 CD25⁺Foxp3⁺/CD4⁺ 的比值, **P* < 0.01; C: SLE 患者 CD25⁺Foxp3⁺/CD4⁺ 比值与 SLEDAI 的相关性; D: 正常对照和 SLE 患者细胞转化后 Foxp3 平均荧光强度相对值, **P* < 0.01; E: SLE 患者 Foxp3 平均荧光强度相对值与 SLEDAI 的相关性。

图 3 CD4⁺CD25⁺T 细胞经诱导所得 CD4⁺CD25⁺T 细胞内 Foxp3 表达水平及其与 SLEDAI 的相关性

Figure 3 Expression of Foxp3 in CD4⁺CD25⁺T cells which were induced from CD4⁺CD25⁺T cell and its relationship with SLEDAI

时, 进一步对 CD25⁺Foxp3⁺/CD4⁺ 比值和对应的 SLEDAI 进行相关性分析, 发现两者间呈负相关。转化后细胞 Foxp3 平均荧光 (MFI) 强度相对值与上述百分比结果趋势一致 (图 3)。

2.3 SLE 患者经诱导转化形成的 CD4⁺CD25⁺T 细胞表面 IL-2R β、γ 链表达缺陷, 但只有 γ 链表达缺陷与疾病活动性相关

我们在体外将 CD4⁺CD25⁺T 细胞诱导培养后, 进一步分析了经诱导转化得到的 CD4⁺CD25⁺T 细胞表面 IL-2R β 链 (CD122) 及 γ 链 (CD132) 表达情况。结果发现, 稳定期与活动期患者 CD25⁺CD122⁺/CD4⁺ 比值均低于正常对照组, 差异有统计学意义 [(2.13 ± 2.47)%、(1.17 ± 1.24)% vs (4.73 ± 2.66)%、*P* < 0.01]; 但稳定期与活动期患者间无统计学差异 (*P* > 0.05), 且 SLE 患者 CD25⁺CD122⁺/CD4⁺ 比值与 SLEDAI 无相关性。转化后 CD4⁺CD25⁺T 细胞上 CD122 平均荧光强度相对值与上述百分比结果趋势一致 (图 4)。

然而, 稳定期与活动期患者 CD25⁺CD132⁺/CD4⁺ 比值不仅均低于正常对照组 [(33.73 ± 6.50)%、(21.13 ± 9.33)% vs (48.14 ± 11.49)%、*P* < 0.01]; 而且, 活动期患者亦低于稳定期患者, 差异有统计学意义 (*P* < 0.01)。进一步通过相关性分析发现, SLE

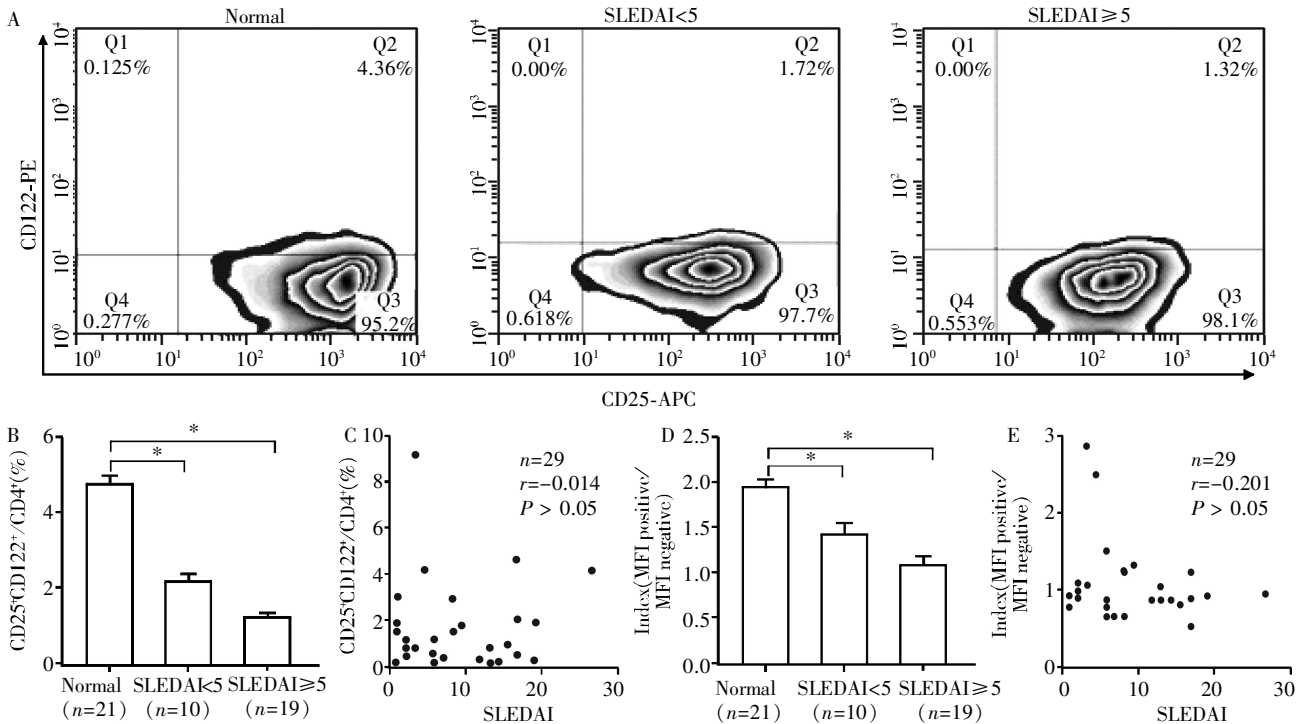
患者 CD25⁺CD132⁺/CD4⁺ 比值与 SLEDAI 呈负相关。转化后 CD4⁺CD25⁺T 细胞上 CD132 平均荧光强度相对值与上述百分比结果趋势一致 (图 5)。

2.4 SLE 患者转化后的 CD4⁺CD25⁺T 细胞 IL-2R 信号通路下游磷酸化 Stat5 表达水平显著降低, 且与疾病活动性相关

我们进一步检测了诱导转化后 CD4⁺CD25⁺T 细胞内磷酸化 Stat5 表达水平, 发现 SLE 患者 pStat5⁺/CD4⁺CD25⁺ 比值低于正常对照组 [(14.87 ± 7.18)% vs (40.70 ± 6.53)%、*P* < 0.01]; 稳定期患者高于活动期患者, 且差异有统计学意义 [(19.76 ± 6.71)% vs (12.30 ± 6.13)%、*P* < 0.01]。与此同时, 经相关性分析发现 pStat5⁺/CD4⁺CD25⁺ 比值与 SLEDAI 呈负相关, 与 CD25⁺Foxp3⁺/CD4⁺ 比值正相关。转化后 CD4⁺CD25⁺T 细胞内磷酸化 Stat5 平均荧光强度相对值与上述百分比结果趋势一致 (图 6)。

3 讨论

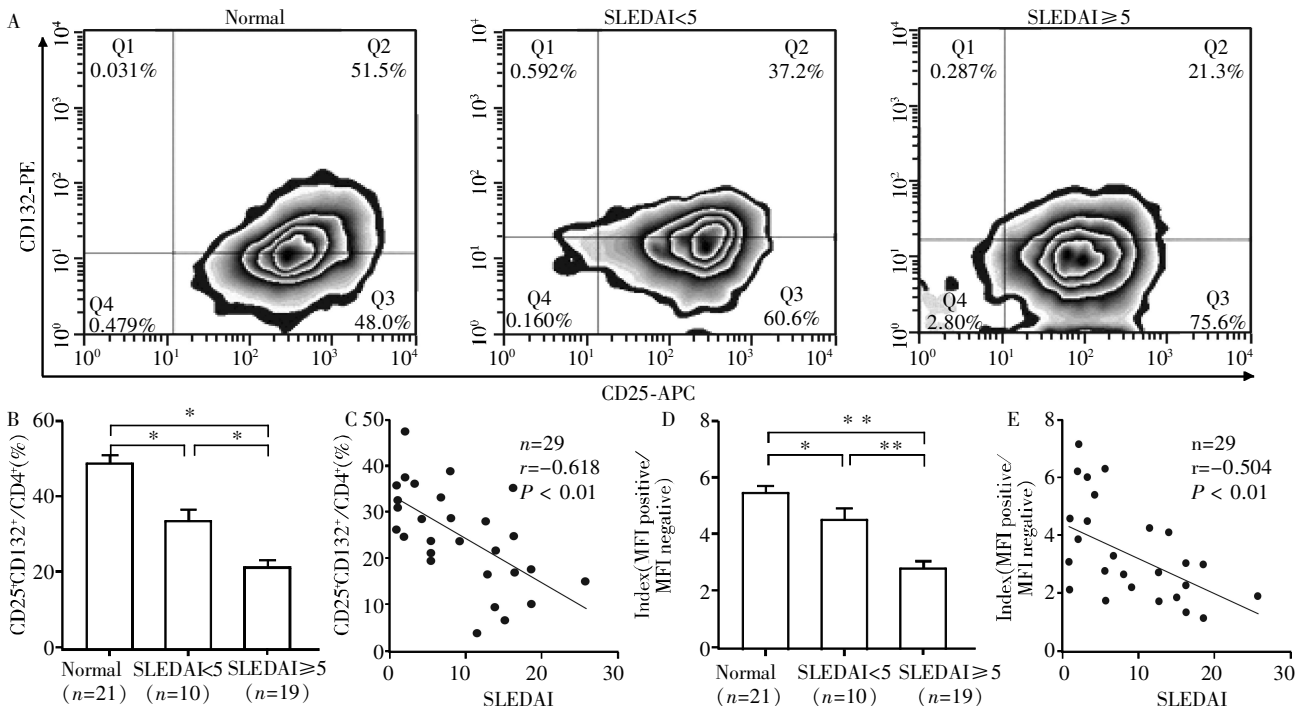
SLE 发病机制仍不明确, 目前认为患者在易感体质的基础上由病毒感染、药物作用等环境和内分泌因素诱发免疫系统丧失对自身组织的免疫耐受, 最终形成疾病的损伤表现 [6]。Treg 在 1995 年由 Sak-



A: CD4⁺CD25⁺T 细胞经 5 d 诱导转化后 CD25⁺CD122⁺/CD4⁺T 细胞比值分析(流式细胞术检测)结果;B: 正常对照与 SLE 患者转化后细胞 CD25⁺CD122⁺/CD4⁺ 的比值, **P* < 0.01;C: SLE 患者 CD25⁺CD122⁺/CD4⁺ 比值与 SLEDAI 的相关性;D: 正常对照与 SLE 患者细胞转化后 CD122 平均荧光强度相对值, **P* < 0.01;E: SLE 患者 CD122 平均荧光强度相对值与 SLEDAI 的相关性。

图 4 CD4⁺CD25⁺T 细胞经诱导转化所得 CD4⁺CD25⁺T 细胞亚群表面 CD122(IL-2R β 链)表达及其与 SLEDAI 的相关性

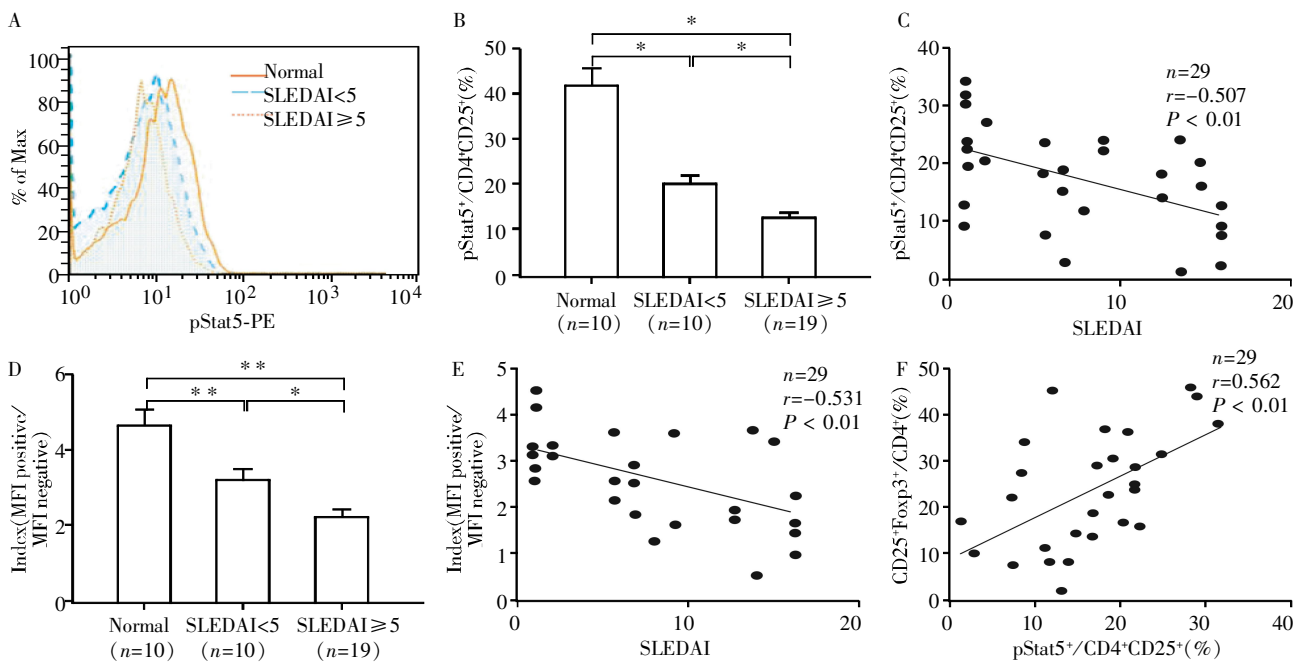
Figure 4 Expression of CD122(IL-2R β chain) on CD4⁺CD25⁺T cell subsets which were induced from CD4⁺CD25⁺T cells and its relationship with SLEDAI



A: CD4⁺CD25⁺T 细胞经 5 d 诱导转化后 CD25⁺CD132⁺/CD4⁺T 细胞比值分析(流式细胞术检测)结果;B: 正常对照与 SLE 患者细胞转化后 CD25⁺CD132⁺/CD4⁺ 的比值, **P* < 0.01;C: SLE 患者 CD25⁺CD132⁺/CD4⁺ 比值与 SLEDAI 的相关性;D: 正常对照与 SLE 患者细胞转化后 CD132 平均荧光强度相对值, **P* < 0.05, ***P* < 0.01;E: SLE 患者 CD132 平均荧光强度相对值与 SLEDAI 的相关性。

图 5 CD4⁺CD25⁺T 细胞经诱导转化所得 CD4⁺CD25⁺T 细胞亚群表面 CD132(IL-2R γ 链)表达及其与 SLEDAI 的相关性

Figure 5 Expression of CD132(IL-2R γ chain) on CD4⁺CD25⁺T cell subsets which were induced from CD4⁺CD25⁺T cells and its relationship with SLEDAI



A: CD4⁺CD25⁺T 细胞经 5 d 诱导转化后 pStat5⁺/CD4⁺CD25⁺ 比值分析(流式细胞术检测)结果; B: 正常对照与 SLE 患者细胞转化后 pStat5⁺/CD4⁺CD25⁺ 的比值, **P* < 0.01; C: SLE 患者 pStat5⁺/CD4⁺CD25⁺ 比值与 SLEDAI 的相关性; D: 正常对照与 SLE 患者细胞转化后磷酸化 Stat5 平均荧光强度相对值, **P* < 0.05, ***P* < 0.01; E: SLE 患者磷酸化 Stat5 平均荧光强度相对值与 SLEDAI 的相关性; F: pStat5⁺/CD4⁺CD25⁺ 比值与 CD25⁺Foxp3⁺/CD4⁺ 比值的相关性。

图 6 经 CD4⁺CD25⁺T 细胞诱导转化所得 CD4⁺CD25⁺T 细胞内磷酸化 Stat5 表达水平及其与 SLEDAI 的相关性

Figure 6 Expression of phosphorylated Stat5 in CD4⁺CD25⁺T cells which were induced from CD4⁺CD25⁺T cells and its relationship with SLEDAI

aguchi 等^[7]发现,它不仅可以抑制自身反应性 T 细胞增殖,执行免疫调节功能,还可限制机体对外源性抗原的应答^[8]。有研究结果显示,调节性 T 细胞的数量减少或功能异常可能导致多种自身免疫病的发生,其中就包括 SLE^[9-10]。Treg 细胞除了表达高水平的 CD25 分子外,还特异性表达叉头样转录因子 Foxp3(Forkhead box P3, Foxp3),该蛋白的表达对 Treg 的发育及其抑制功能均具有重要作用^[11]。Foxp3⁺Treg 主要可分为两类:天然型 Foxp3⁺Treg (nTreg) 和诱导性 Foxp3⁺Treg (iTreg)^[12]。虽然 nTreg 和 iTreg 表型相似,但两者在细胞起源、抗原特异性、促进增殖的条件、维持稳定的条件、进一步分化的条件、细胞信号转导特征、免疫调节方式以及抑制机制等多方面存在不同^[13]。目前 nTreg 的形成、增殖、分化和功能效应已经得到广泛研究,然而对于 iTreg 的研究甚少。

iTreg 细胞亚群的抗原识别范围表明其不但可以调节免疫应答,还可以防止炎症中组织过度损伤。有模型提示 iTreg 和 nTreg 细胞亚群实际上可能通过共同作用或者通过不同水平的功能性分化来调节免疫应答^[14]。外周淋巴器官中的 Foxp3⁺iTreg 主要是在树突状细胞递呈的环境抗原刺激下由前体 T 细胞转化而成;与此同时, iTreg 也可以在体外由活

化后的 CD4⁺CD25⁺T 细胞经转化生长因子 β (transforming growth factor-β, TGF-β) 和 IL-2 共同作用转化形成^[15]。有研究显示 mTOR 抑制剂雷帕霉素 (RAPA) 无论在体内还是体外都可以促进 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 的形成并维持其稳定^[16],此外 Qian 等^[17]发现在体外诱导体系中加入 RAPA 后极大增强了此类细胞的体内抑制功能。本课题组推测, SLE 患者体内 Treg 数量与功能的缺陷可能既包含 nTreg 的数量与功能缺陷,也包含 iTreg 的数量与功能缺陷。为了证实关于 SLE 可能存在 iTreg 缺陷的推测,我们设计了本实验。实验中,我们建立了以抗 CD3、抗 CD28 双抗体激活 T 细胞 TCR-CD3 信号、以 IL-2 及 TGF-β 诱导 CD4⁺CD25⁺T 细胞转化为 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺iTreg 的培养体系,并在培养体系中引入了雷帕霉素。我们发现 SLE 患者外周血中 CD4⁺CD25⁺T 细胞经诱导转化后 CD25⁺Foxp3⁺/CD4⁺ 比例明显低于正常对照组,且与 SLEDAI 呈负相关。这一结果提示, SLE 患者外周血中 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺iTreg 可能存在诱导形成障碍,从而导致其外周血中 Treg 细胞总量的不足,这具有重要的病理意义。

IL-2 对于维持外周免疫耐受有重要作用^[18]。尽管 TGF-β 是启动 iTreg 分化的关键性细胞因子,调

控 Foxp3 的表达,但 IL-2 对于 Treg 细胞的存活和增殖非常重要。Koreth 等^[19-20]报道 IL-2 不但可以优先促进体内 Treg 细胞扩增,而且还可以提高体外产生的 iTreg 的稳定性。IL-2 是通过靶细胞膜上的 IL-2 受体发挥作用的。IL-2 受体包含 3 个亚单位:α 链 (IL-2Rα 或 CD25)、β 链 (IL-2Rβ 或 CD122, 与 IL-15R 共用) 以及共用细胞因子受体 γ 链 (γc 或 CD132, 与 IL-4R、IL-7R、IL-9R、IL-15R、IL-21R 共用), IL-2R 与 IL-2 结合后可通过 β 链和 γ 链转导活化信号, 进一步激活下游 JAK-STAT、PI3K-AKT、MAPK 等信号途径^[21-22]。细胞表面 IL-2R 的表达异常与机体自身免疫病密切相关, 动物实验证实 IL-2Rα 基因敲除 (IL2ra^{-/-}) 或 IL-2Rβ 基因敲除 (IL2rb^{-/-}) 的小鼠会引发致死性的自身免疫疾病^[23]。尽管 γc 缺乏的小鼠由于 T 细胞发育受损 (IL-7R 信号缺陷所致) 而不显现出自身免疫病, 但是研究发现此类小鼠中仅存的极少量 T 细胞仍然表现出活化的表型, 提示可能是由于受损的 IL-2R 信号所致^[24]。IL-2 受体信号是外周血 Foxp3⁺iTreg 细胞诱导形成的一个不可或缺的条件, 作为 iTreg 细胞的前体细胞, CD4⁺CD25⁺T 细胞表面表达由 β 链和 γ 链组成的中等亲和力的 IL-2 受体以便与 IL-2 结合进一步活化下游信号, 引起包括 Foxp3 在内的基因表达的激活。本实验结果显示, 狼疮患者外周血 CD4⁺T 细胞亚群中 CD25⁺CD132⁺/CD4⁺比例低于正常对照组, 且与 SLEDAI 呈负相关; 患者 CD4⁺CD25⁺T 细胞内 γ 链 mRNA 相对表达水平也低于正常对照组。这一结果提示, SLE 患者体内存在与疾病活动性相关的 IL-2R γ 链表达缺陷。γ 链是 IL-2R 信号转导的重要组成部分, 低表达的 γc 可能会导致细胞活化过程中 IL-2R 信号的不充足, 从而影响外周血中 Foxp3⁺iTreg 的转化形成。

本研究还进一步检测了体外诱导转化后得到的 CD4⁺CD25⁺T 细胞, 发现 SLE 患者此类细胞中 CD25⁺CD122⁺/CD4⁺、CD25⁺CD132⁺/CD4⁺比例均低于正常对照组, 即转化形成的 CD4⁺CD25⁺T 细胞中均有 IL-2Rβ 链和 γ 链表达缺陷, 但只有 γ 链 (CD132) 表达水平与 SLEDAI 呈负相关。因此我们推测, 转化前的前体细胞 (CD4⁺CD25⁺T 细胞) 和转化中、转化后的 CD4⁺CD25⁺T 细胞所持续存在的 γc 链 (CD132) 表达缺陷在 SLE 的免疫调节功能紊乱中具有重要意义, 可能是参与 iTreg 转化形成障碍的原因之一。尽管调节性 T 细胞只表达中等水平的 CD122、CD132, 但 IL-2 受体信号对于 Foxp3⁺iTreg 细胞在外周血中维持表型和功能稳定至关重要^[25]。Bensinger 等^[26]发

现 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞表面 IL-2R 与配体结合后, 可以活化下游 JAK-STAT 信号途径, 但是不能活化 PI3K 的下游靶标, 如 Akt 或 p70s6kinase 等。JAK1 结合于 IL-2 受体 β 链, 而 JAK3 结合在共用受体 γc 链上, IL-2 与受体结合后引起 JAK1 和 JAK3 激酶相互交联活化, 进一步激活下游的 Stat5^[27]。Zorn 等^[28]报道 IL-2 受体信号可以上调 CD4⁺CD25⁺T 细胞内转录因子 Foxp3 的表达, 这种调节主要通过磷酸化的 Stat5/Stat3 结合到 foxp3 基因第一个基因内区的一个高度保守的 STAT 结合区来实现。因此我们推测既然 SLE 患者 T 细胞存在 γc 链 (CD132) 表达缺陷, 在向 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺iTreg 转化过程中 γc 的信号转导作用势必减弱, 从而影响 Stat5 的活化, 最终导致 Foxp3 表达不够充分。为了证实这一推测, 我们进一步进行了实验分析。通过对诱导转化后细胞内磷酸化 Stat5 表达水平的检测发现, 稳定期和活动期 SLE 患者的 pStat5⁺/CD4⁺CD25⁺比值低于正常对照组; 经相关性分析发现, 磷酸化 Stat5 表达水平与 SLEDAI 呈负相关, 与 Foxp3 表达呈正相关。这一结果支持了我们的上述推测, 即由于 CD4⁺CD25⁺T 细胞表面 IL-2 受体表达有缺陷而导致 IL-2R 信号下游 Stat5 信号减弱, 进而影响 SLE 患者 CD4⁺CD25⁺T 细胞内 Foxp3 的稳定表达。由于 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 细胞在维持外周免疫耐受以及在各种炎症环境下调节对非自身抗原的免疫应答中不可或缺, 而 Foxp3 的稳定表达可以使 Treg 细胞在各类环境中维持抑制功能^[29], 因此 Foxp3 稳定表达的障碍可能成为 SLE 患者体内外周免疫耐受破坏的重要原因之一。

总之, 本研究显示 SLE 患者外周血 CD25⁻CD132⁺/CD4⁺比例以及 CD4⁺CD25⁺T 细胞内 IL-2R γ 链 mRNA 相对表达水平均偏低; 与此同时, 经诱导转化得到的 CD4⁺CD25⁺T 细胞表面 IL-2R β 链和 γ 链表达亦低于正常对照组, 且与 SLE 患者疾病活动性密切相关。由于 IL-2R γ 链和 β 链联合缺陷, 尤其是 γ 链表达缺陷影响了 IL-2R 信号的转导, 导致 SLE 患者外周血 Foxp3⁺iTreg 细胞不能有效形成并维持稳定, 进而引起免疫耐受失衡, 最终引起组织器官炎症性损伤。

[参考文献]

- [1] Diamond B, Bloom O, Al Abed Y, et al. Moving towards a cure: blocking pathogenic antibodies in systemic lupus erythematosus [J]. J Intern Med, 2011, 269(1): 36-44
- [2] Leslie M. Regulatory T cells get their chance to shine [J]. Science, 2011, 332(6033): 1020-1021

- [3] Miyara M, Gorochov G, Ehrenstein M, et al. Human Foxp3⁺ regulatory T cells in systemic autoimmune diseases [J]. *Autoimmun Rev*, 2011, 10(12): 744-755
- [4] 徐安琪, 杨晓帆, 王慧娟, 等. CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺: 与 SLE 疾病相关的 Treg 标志 [J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2012, 32(6): 745-753
- [5] 马乐, 李亚萍, 康湛苑, 等. 系统性红斑狼疮患者全基因组中白介素 2 共同受体 γ c 甲基化水平检测 [J]. *中华皮肤科杂志*, 2012, 45(11): 778-781
- [6] Okamoto A, Fujio K, Okamura T, et al. Regulatory T-cell-associated cytokines in systemic lupus erythematosus [J]. *J Biomed Biotechnol*, 2011; 463412
- [7] 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*, 1995, 155(3): 1151-1164
- [8] Von Herrath MG, Harrison LC. Antigen-induced regulatory T cells in autoimmunity [J]. *Nat Rev Immunol*, 2003, 3(3): 223-232
- [9] Buckner JH. Mechanisms of impaired regulation by CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ regulatory T cells in human autoimmune diseases [J]. *Nat Rev Immunol*, 2010, 10(12): 849-859
- [10] Ma L, Zhao P, Jiang Z, et al. Imbalance of different types of CD4⁺ forkhead box protein 3 (FoxP3)⁺ T cells in patients with new-onset systemic lupus erythematosus [J]. *Clin Exp Immunol*, 2013, 174(3): 345-355
- [11] Zhang H, Xiao Y, Zhu Z, et al. Immune regulation by histone deacetylases: a focus on the alteration of FOXP3 activity [J]. *Immunol Cell Biol*, 2012, 90(1): 95-100
- [12] 陈祚珈, 高雅懿, 李志远, 等. Foxp3⁺调节性 T 细胞 [J]. *生命科学杂志*, 2010, 22(6): 515-527
- [13] Vercoulen Y, Guichelaar T, Meerding J, et al. Human induced CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatory T cells suppress effector immune responses in vitro, but not *in vivo* [J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2011, 29(2): 437
- [14] Haribhai D, Lin W, Edwards B, et al. A central role for induced regulatory T cells in tolerance induction in experimental colitis [J]. *J Immunol*, 2009, 182(6): 3461-3468
- [15] Horwitz DA, Zheng SG, Gray JD. Natural and TGF- β -induced Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells are not mirror images of each other [J]. *Trends Immunol*, 2008, 29(9): 429-435
- [16] Lu L, Qian XF, Rao JH, et al. Rapamycin promotes the expansion of CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells after liver transplantation [J]. *Transplant Proc*, 2010, 42(5): 1755-1757
- [17] Qian X, Wang K, Wang X, et al. Generation of human regulatory T cells de novo with suppressive function prevent xenogeneic graft versus host disease [J]. *Int Immunopharmacol*, 2011, 11(5): 630-637
- [18] Boyman O, Sprent J. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system [J]. *Nat Rev Immunol*, 2012, 12(3): 180-190
- [19] Koreth J, Matsuoka K, Kim HT, et al. Interleukin-2 and regulatory T cells in graft-versus-host disease [J]. *N Engl J Med*, 2011, 365(22): 2055-2066
- [20] Matsuoka K, Koreth J, Kim HT, et al. Low-dose interleukin-2 therapy restores regulatory T cell homeostasis in patients with chronic graft-versus-host disease [J]. *Sci Transl Med*, 2013, 5(179): 179ra43
- [21] Cheng G, Yu A, Malek TR. T-cell tolerance and the multi-functional role of IL-2R signaling in T-regulatory cells [J]. *Immunol Rev*, 2011, 241(1): 63-76
- [22] Liao W, Lin JX, Leonard WJ. IL-2 family cytokines: new insights into the complex roles of IL-2 as a broad regulator of T helper cell differentiation [J]. *Curr Opin Immunol*, 2011, 23(5): 598-604
- [23] Malek TR, Castro I. Interleukin-2 receptor signaling: at the interface between tolerance and immunity [J]. *Immunity*, 2010, 33(2): 153-165
- [24] Rochman Y, Spolski R, Leonard WJ. New insights into the regulation of T cells by gamma(c) family cytokines [J]. *Nat Rev Immunol*, 2009, 9(7): 480-490
- [25] Setoguchi R, Hori S, Takahashi T, et al. Homeostatic maintenance of natural Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization [J]. *J Exp Med*, 2005, 201(5): 723-735
- [26] Bensinger SJ, Walsh PT, Zhang J, et al. Distinct IL-2 receptor signaling pattern in CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells [J]. *J Immunol*, 2004, 172(9): 5287-5296
- [27] Haan C, Rolwing C, Raulf F, et al. Jak1 has a dominant role over Jak3 in signal transduction through γ c-containing cytokine receptors [J]. *Chem Biol*, 2011, 18(3): 314-323
- [28] Zorn E, Nelson EA, Mohseni M, et al. IL-2 regulates Foxp3 expression in human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells through a STAT-dependent mechanism and induces the expansion of these cells in vivo [J]. *Blood*, 2006, 108(5): 1571-1579
- [29] Da Silva Martins M, Piccirillo CA. Functional stability of Foxp3⁺ regulatory cells [J]. *Trends Mol Med*, 2012, 18(8): 454-462