

## 系统性红斑狼疮患者外周血中调节性 T 细胞相关分子 TGF- $\beta$ 表达缺陷的研究

杨晓帆<sup>1</sup>,徐安琪<sup>2</sup>,王慧娟<sup>1</sup>,季晓辉<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>南京医科大学免疫学系,江苏 南京 211166;<sup>2</sup>南京市红十字血液中心,江苏 南京 210042)

**[摘要]** 目的:研究与系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus,SLE)患者调节性 T 细胞(regulatory T cell,Treg)功能密切相关的分子转化生长因子(transforming growth factor,TGF- $\beta$ )的转录、表达、分泌水平的异常。方法:分离正常人和 SLE 患者的外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell,PBMC)和 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞,以抗-CD3 和抗-CD28 刺激培养 48 h,获取细胞,以三色流式细胞术检测 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup>T 及 CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup>T 细胞,分析各亚群细胞比值;提取总 mRNA,qRT-PCR 测定 TGF- $\beta$ 1 的表达;收取上清用 ELISA 法检测总 TGF- $\beta$ 1 和游离的活化 TGF- $\beta$ 1 水平。结果:活动性 SLE 患者 CD4<sup>+</sup>T 细胞中 LAP<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>T、CD25<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>T、LAP<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>比值较正常人显著升高,抗-CD3、抗-CD28 抗体刺激后 LAP<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>T、CD25<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>T、LAP<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>比值进一步升高,与正常人比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ );但均与疾病活动度无显著相关性;无论刺激与未刺激,SLE 患者 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup>细胞中 LAP 染色的荧光强度亦高于相应正常组;而抗-CD3、抗-CD28 抗体刺激后 SLE 患者 PBMC 及 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞培养上清中总 TGF- $\beta$ 1 和游离的活化 TGF- $\beta$ 1 水平均显著低于正常人( $P < 0.05$ );qRT-PCR 证实,受刺激后 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞内 TGF- $\beta$ 1 的 mRNA 转录水平低于正常人。结论:尽管活动性 SLE 患者 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞膜表面潜伏态 TGF- $\beta$ (LAP)的表达较正常人明显增高,但其 TGF- $\beta$  表达依然存在缺陷,主要表现为 TGF- $\beta$ 1 的转录、分泌水平降低,游离的活化 TGF- $\beta$ 1 产生障碍,从而可能削弱了 Treg 细胞的免疫抑制作用。新鲜分离的以及受刺激后的 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞 LAP 表达增高可能反映了活动性 SLE 患者 T 细胞亚群的活化和 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup>Treg 细胞的反应性扩增。

**[关键词]** 红斑狼疮;调节性 T 细胞;TGF- $\beta$ ;LAP

**[中图分类号]** R593.24

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2016)11-1333-06

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20161110

## Expression deficiency of regulatory T cells associated TGF- $\beta$ in peripheral blood from patients with systemic lupus erythematosus

Yang Xiaofan<sup>1</sup>, Xu Anqi<sup>2</sup>, Wang Huijuan<sup>1</sup>, Ji Xiaohui<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Department of Immunology, NJMU, Nanjing 211166; <sup>2</sup>Nanjing Red Cross Blood Center, Nanjing 210042, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the possible deficiencies in the transcription, secretion, and expression of regulatory T cells (Treg) associated TGF- $\beta$  in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). **Methods:** Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cells were isolated from patients with SLE and health controls. The cells were cultured and stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 for 48 hours. Three-color flow cytometry was performed to detect CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup>T and CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup>T cells; Q-RT-PCR was used to detect TGF- $\beta$  mRNA level; ELISA was performed to detect the levels of total TGF- $\beta$ 1 and free active TGF- $\beta$ 1 in the supernatants of the cell cultures. **Results:** The ratios of LAP<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>T, CD25<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>T and LAP<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> in fresh PBMCs, or in cultured cells stimulated with anti-CD3 and anti-CD28, from active SLE patients were both significantly higher than those from health controls ( $P < 0.05$ ), but there were no significantly correlations between the abnormally increased LAP expression and SLE disease activity index (SLEDAI). Whether stimulated or not, mean fluorescent intensity (MFI) of LAP in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup> cells from patients with SLE was also higher than that from health controls ( $P < 0.05$ ). With the stimulation, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T cells from the patients secreted less TGF- $\beta$ 1, both in the forms of total TGF- $\beta$ 1 and free active TGF- $\beta$ 1 ( $P < 0.05$ ). Furthermore, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T cells from active SLE patients displayed less TGF- $\beta$  mRNA level than those from health controls did. **Conclusion:** In CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T cells from SLE, there are deficiencies in the transcription and secretion of TGF- $\beta$ 1, and in the production of free active TGF- $\beta$ 1, although the expression of LAP on the cell surface is increased, which may reflect the abnormal activation of T cells and a proliferative respond of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup>Treg to auto-antigens. These deficiencies in TGF- $\beta$  expression of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T cells in active SLE

patients probably weaken the function of Treg cells.

[Key words] lupus erythematosus; regulatory T cell; TGF- $\beta$ ; LAP

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(11): 1333-1338]

系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)是常见的自身免疫性疾病,患者体内存在明显的免疫调节紊乱和病理性自身免疫应答。调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg)在抑制自身免疫、维持机体内环境稳态及调节免疫应答中具有重要作用<sup>[1]</sup>。目前,越来越多的研究证据显示, SLE 发生发展过程中有 Treg 数量和功能的缺陷,且这种缺陷与疾病活动性呈正相关<sup>[2-3]</sup>。

经典的 Treg 表型为 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>,即同时高表达 CD25(CD25<sup>high</sup>)和 Foxp3(Foxp3<sup>high</sup>)的 CD4<sup>+</sup>T 细胞。其中包括直接在胸腺发育生成的自然 Treg(nature Treg, nTreg)和在外周由抗原刺激、细胞因子诱导形成的诱导性 Treg(induced Treg, iTreg)。越来越多的研究表明, Treg 的免疫调节活性和一系列免疫分子相关,如 Foxp3、CTLA-4、TGF- $\beta$  和 IL-10 等<sup>[4-5]</sup>。

TGF- $\beta$  即转化生长因子(transforming growth factor, TGF)- $\beta$ , 包括 TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 2、TGF- $\beta$ 3, 是一类结构上相关的调节细胞生长和分化的因子, 并可通过调节 Foxp3 和 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg 的功能促进免疫耐受<sup>[6]</sup>。细胞直接分泌的是非活性状态的前体形式, 即潜伏态 TGF- $\beta$ (latent-TGF- $\beta$ , L-TGF- $\beta$ )。细胞内合成的是一种前体蛋白(pro-TGF- $\beta$  precursor), 由一段全长 2 201 个碱基的基因外显子编码。该基因 N 末端编码 20~30 个氨基酸的信号肽, 中间部分编码潜伏相关肽(latency associated peptide, LAP), C 末端编码 112~114 个氨基酸的 TGF- $\beta$  肽。L-TGF- $\beta$  前体蛋白在高尔基体内被具有蛋白内切酶活性的转化酶切割, 形成 LAP 同源二聚体和成熟 TGF- $\beta$  同源二聚体结合的四聚体复合物即 L-TGF- $\beta$ 。分泌出细胞的 L-TGF- $\beta$  可与 L-TGF- $\beta$  结合蛋白(latent TGF- $\beta$  binding protein, LTBP)相连接形成更大的复合物, 固定在组织基质上; 也可与糖蛋白 A 优势重复序列(glycoprotein A repetitions predominant, GARP)结合, 锚定在细胞膜上。无论是游离的、与 LTBP 结合的、或是被 GARP 固定在细胞膜表面的 L-TGF- $\beta$  都是无活性的, 因为成熟的 TGF- $\beta$  被 LAP 封闭了, 不能与受体结合。只是在需要时, 通过 TGF- $\beta$  激活剂(TGF- $\beta$  activator, TA)如离子强度、酸化或蛋白水解酶等使其水解为游离的 TGF- $\beta$  和 LAP, 或者使其发生构象改变暴露出成熟 TGF- $\beta$  受体结合位点, 才能

与受体结合发挥生物学作用<sup>[7-8]</sup>。这一过程被称为 TGF- $\beta$  活化。

研究表明在 TGF- $\beta$  和 TCR 共同刺激下, 外周 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T 细胞能够向 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg 细胞转化, 可能是通过其信号通路(Smad3)启动细胞核 Foxp3 基因的表达<sup>[9]</sup>。另一方面, CD4<sup>+</sup>和 CD8<sup>+</sup>的 nTreg 主要通过细胞间直接接触发挥对 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>细胞的增殖抑制作用, 有学者认为这种抑制是通过 nTreg 细胞膜表面的 TGF- $\beta$  发挥作用的<sup>[10]</sup>。因此, TGF- $\beta$  既参与诱导 iTreg, 又参与 Treg (包括 nTreg 和 iTreg)的免疫抑制作用。近年来, 有研究先后在小鼠和人体内发现了一种由膜 TGF- $\beta$  介导抑制作用的 CD4<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup>的活化 iTreg, 并在鼠的狼疮模型中发挥了重要调控作用<sup>[11-13]</sup>。本课题组前期实验结果显示 SLE 患者血清中 TGF- $\beta$ 1 水平下降<sup>[14]</sup>。那么, 在 SLE 患者体内, Treg 的 mTGF- $\beta$ (即膜 L-TGF- $\beta$ )或分泌性 TGF- $\beta$  的表达是否发生了改变值得关注, 这可能为进一步深入理解 SLE 的免疫调节紊乱提供线索。为此, 本研究检测了与 Treg 功能密切相关的 TGF- $\beta$  转录、表达和分泌水平。

## 1 对象和方法

### 1.1 对象

提供外周血的 SLE 患者共 42 例, 选自 2009 年 11 月—2011 年 8 月南京医科大学第一附属医院风湿免疫科与肾内科、南京第一医院风湿免疫科的住院患者。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, 均为活动性评分 SLEDAI  $\geq$  5 的活动性患者, 排除合并其他免疫系统疾病或肿瘤, 其中女 65 例, 男 6 例, 年龄 21~66 岁, 平均 38 岁。正常对照组 22 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, 性别和年龄与 SLE 组基本匹配, 否认自身免疫性疾病、肿瘤病史, 近期无感染病史。

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(Invitrogen 公司, 美国); TriPure 分离试剂、FastStart Universal SYBR Green Master(Roche 公司, 瑞士); 抗人 CD3、CD28 功能抗体(eBioscience 公司, 美国); 植物血凝素(phytohemagglutinin, PHA)(Sigma 公司, 美国);

CD4-FITC、CD25-APC、CD25-PE-cy5、CD8-FITC 鼠抗人单克隆荧光抗体及其同型对照抗体(Biolegend 公司,美国);LAP-PE 鼠抗人单克隆荧光抗体及其同型对照抗体(克隆编号 27232,R&D 公司,美国);RPMI1640 培养基、小牛血清(BI 公司,以色列);人 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg 分离试剂盒、磁性细胞分选柱、磁性细胞分离器(Miltenyi 公司,德国);Free Active TGF- $\beta$ 1 ELISA Kit 以及 Total TGF- $\beta$ 1 ELISA Kit (Biolegend 公司,美国);FACS Calibur 流式细胞仪 (BD 公司,美国);7300 型荧光定量 PCR 仪(ABI 公司,美国);酶标仪 CliniBio-128C(ASYS-Hitech 公司,奥地利)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)分离

无菌采集正常对照和 SLE 患者外周静脉血 15 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 PBMC。

### 1.2.2 PBMC 的培养

将上述获得的 PBMC 种于 96 孔细胞培养板进行培养(5%CO<sub>2</sub>,37°C),5×10<sup>4</sup>个/孔,每孔加 200  $\mu$ L 培养基(RMPI1640 含 15% FCS),并加入抗-CD3(10  $\mu$ g/mL)和抗-CD28(2  $\mu$ g/mL)抗体,刺激 48 h,分别收取细胞和培养上清。细胞用于流式细胞术检测 LAP 的表达,培养上清收于-20°C 冰箱保存,用于 ELISA 检测 TGF- $\beta$ 1 水平。

### 1.2.3 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 细胞的分离与培养

通过免疫磁珠分离法对 PBMC 分别进行阴选和阳选以获得 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 细胞。将 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 细胞种于 96 孔细胞培养板进行培养(5%CO<sub>2</sub>,37°C),5×10<sup>4</sup>个/孔,每孔 200  $\mu$ L 培养基(RMPI1640 含 15% FCS),两种方式进行培养:以 PHA(10  $\mu$ g/mL)刺激培养 48 h 收集细胞,加入 TRIzol 溶解细胞,-70°C 冰箱保存用于 RT-PCR 检测;或者加入抗-CD3(10  $\mu$ g/mL)和抗-CD28(2  $\mu$ g/mL)抗体,刺激培养 48 h,收取培养上清,-20°C 冰箱保存用于 ELISA 检测 TGF- $\beta$ 1 水平。

### 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 L-TGF- $\beta$  前体蛋白基因的 mRNA 相对表达水平。上游引物起止为该基因第 1254—1274 号碱基,具体序列为 5'-CAA-GCAGAGTACACACAGCAT-3',下游引物起止为该基因第 1379—1358 号碱基,具体序列为 5'-TGCTCC-ACTTTTAACTTGAGCC-3',产物为 126 bp。 $\beta$ -actin

上游引物序列为 5'-CATGTACGTTGCTATCCAG-GC-3',下游引物序列为 5'-CTCCTTAATGTCACGCA-CGAT-3',产物大小为 250 bp。

### 1.2.5 FCM 检测细胞培养后各亚群 LAP 分子的表达

预先将 24 孔板包被抗-CD3 功能抗体(10  $\mu$ g/mL)过夜,取 PBMC 细胞按 5×10<sup>5</sup>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-CD28 功能性抗体(2  $\mu$ g/mL),置于 37°C、5%CO<sub>2</sub> 饱和湿度的细胞培养箱培养 48 h。收集培养细胞,加入 Anti-CD4-FITC(20  $\mu$ L)或 Anti-CD8-FITC(20  $\mu$ L)、Anti-CD25-APC(20  $\mu$ L)、Anti-LAP-PE(10  $\mu$ L),并设立同型对照管,4°C 避光孵育 30 min,洗涤后重悬细胞,上机检测。采用 Flowjo7.6.5 软件分析数据。

### 1.2.6 培养上清中游离活性 TGF- $\beta$ 1 及总 TGF- $\beta$ 1 水平的 ELISA 检测

将 1.2.2 和 1.2.3 中收集的培养上清按说明书中所述操作步骤用 ELISA 检测游离活性 TGF- $\beta$ 1、总 TGF- $\beta$ 1 水平。

## 1.3 统计学方法

应用 SPSS16.0 统计软件分析,数据以均数  $\pm$  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疾病活动度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 活动性 SLE 患者 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 细胞中 L-TGF- $\beta$ 前体蛋白的 mRNA 表达水平降低

实时定量 PCR 检测结果显示,经 PHA 刺激后的活动性 SLE 患者 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 细胞中 L-TGF- $\beta$  前体蛋白的 mRNA 相对表达水平低于正常对照组,差异具有统计学意义(图 1)。

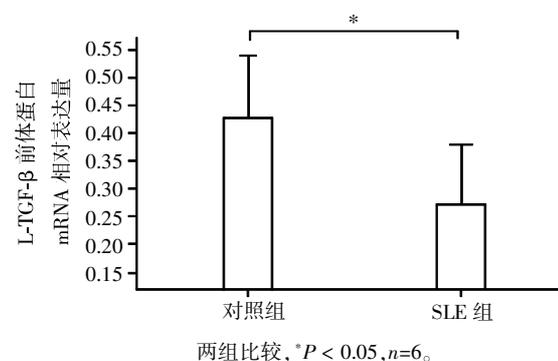


图 1 外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>细胞内 L-TGF- $\beta$  前体蛋白 mRNA 的相对表达水平

Figure 1 Relative expression level of pro-L-TGF- $\beta$  mRNA in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cell subsets in peripheral blood

2.2 SLE 患者 PBMC 及 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞培养上清中分泌性 TGF-β 表达水平降低

经抗-CD3、抗-CD28 抗体刺激后 SLE 患者 PBMC 培养上清中的总 TGF-β1 (即酸化处理后游离活化的 L-TGF-β1+游离活化的 TGF-β1) 水平与正常人 PBMC 相比偏低,但差异无显著性;然而在 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞培养上清中 SLE 患者的总 TGF-β1

水平显著低于正常人(图 2A)。

正常人外周血 PBMC 和 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞分别经抗-CD3、抗-CD28 刺激后,即使不用外源性 TA 处理,其培养上清中也有一定量的游离活化 TGF-β1 表达,但活动性 SLE 患者 PBMC 和 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞培养中均未能测出游离活化的 TGF-β1 (图 2B)。

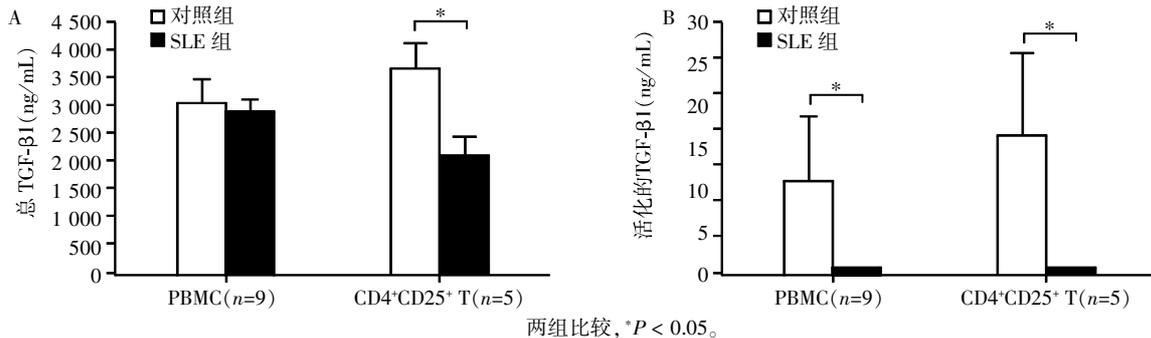


图 2 培养上清中总 TGF-β1(A)和游离的活化 TGF-β1(B)分泌水平  
Figure 2 Levels of total TGF-β1(A) and free active TGF-β1(B) in culture supernatants

2.3 活动性 SLE 患者 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 细胞中 LAP<sup>+</sup>细胞比例较正常人显著增高,但与疾病活动性无关

正常人的 PBMC 未经刺激时,CD4<sup>+</sup>T 细胞中几乎检测不出 LAP 的表达,而活动性 SLE 患者的 PBMC 未经刺激即可检测出 LAP 的表达。经抗-CD3、抗-CD28 抗体刺激之后,正常人 CD4<sup>+</sup>T 细胞表达 LAP,而活动性 SLE 患者的 CD4<sup>+</sup>T 细胞中 LAP<sup>+</sup>、CD25<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup>细胞的比例较正常人显著增高,但与疾病活动度评分之间无显著相关性。而 CD4<sup>+</sup>T 细胞亚群中,未刺激时活动性 SLE 患者仅有 1%~2%CD25<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup>细胞,而刺激后无论正常人还是 SLE 患者 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup>细胞均不

足 1%,提示 LAP 基本表达于 CD25<sup>+</sup>细胞。

经抗-CD3、抗-CD28 抗体刺激后的活动性 SLE 患者 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞中 LAP<sup>+</sup>细胞比例较正常人升高,但也与疾病活动度无相关性。未刺激时 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 细胞中仅有少量 LAP 表达,刺激后 LAP<sup>+</sup>细胞反而 <1%。正常人无论刺激与否 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 中均无明显 LAP 的表达(表 1)。

荧光强度分析结果显示,刺激与未刺激组中活动性 SLE 患者 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup>T 细胞中 LAP 的平均荧光强度(mean fluorescent intensity, MFI)均高于相应正常对照组(图 3)。

表 1 CD4<sup>+</sup>T 细胞中各亚群细胞表达 LAP 的百分率

Table 1 Percentages of LAP in CD4<sup>+</sup>T cell subsets

(%,  $\bar{x} \pm s$ )

细胞亚群	正常人(n=11)		活动性 SLE(n=18)	
	未刺激	刺激后	未刺激	刺激后
LAP <sup>+</sup> /CD4 <sup>+</sup> T	-	4.72 ± 0.72*	4.69 ± 2.67 <sup>#</sup>	8.46 ± 2.80**
CD25 <sup>+</sup> LAP <sup>+</sup> /CD4 <sup>+</sup> T	-	4.63 ± 0.69*	3.35 ± 1.94 <sup>#</sup>	8.17 ± 2.59**
CD25 <sup>-</sup> LAP <sup>+</sup> /CD4 <sup>+</sup> T	-	0.09 ± 0.10	1.50 ± 1.44	0.33 ± 0.41
LAP <sup>+</sup> /CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> T	-	5.78 ± 1.41*	9.58 ± 6.93 <sup>#</sup>	10.11 ± 3.82 <sup>#</sup>
LAP <sup>+</sup> /CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> T	-	0.41 ± 0.48	1.82 ± 1.57	0.38 ± 0.70

与相应未刺激组比较,\*P < 0.05;与相应正常对照组比较,<sup>#</sup>P < 0.05。

正常人的 PBMC 未经抗-CD3、抗-CD28 抗体刺激时 CD8<sup>+</sup>T 细胞中检测不出 LAP 的表达,而活动性 SLE 患者的 PBMC 未经刺激即可检测出微量 LAP 的表达。经刺激之后,正常人与活动性 SLE 患者 LAP<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>[(4.08 ± 1.87)% vs. (3.12 ± 2.18)%],

CD25<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>[(3.67 ± 1.44)% vs. (2.99 ± 2.06)%], LAP<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>[(5.65 ± 2.99)% vs. (6.34 ± 3.85)%], 两组间相比并无显著性差异(P > 0.05),但均较未刺激时有所增高,且与疾病活动度无关。无论正常人还是活动性 SLE 患者刺激和未刺激组 CD25<sup>-</sup>LAP<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>、

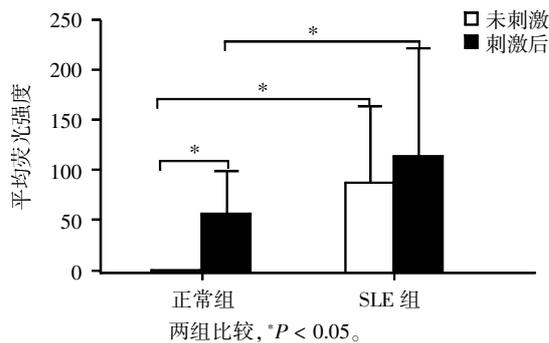


图 3 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup> T 细胞的 LAP 平均荧光强度分析结果

Figure 3 MFI of LAP in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup> T cells

LAP<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>比值均小于 1%, 基本检测不出 LAP 的表达,提示在 CD8<sup>+</sup>T 细胞中 LAP 也主要表达于 CD25<sup>+</sup>T 细胞亚群。

### 3 讨论

本研究应用抗-LAP 单克隆抗体 (27232 克隆) 来识别、检测膜 L-TGF- $\beta$ 1, 由于 T 细胞膜上 LAP 是以同源二聚体形式与 TGF- $\beta$ 1 同源二聚体结合成四聚体的 L-TGF- $\beta$ , 所以 LAP 检测结果即反映了膜上的 L-TGF- $\beta$ 。本研究检测的 mRNA 是细胞内生成总 L-TGF- $\beta$  的 mRNA, 其转译形成的蛋白 L-TGF- $\beta$  被高尔基体转运至细胞膜上后以两种形式存在, 其一是被 GRAP 结合而锚定在细胞膜上, 其二是被释放至细胞外而形成分泌型 L-TGF- $\beta$ 。无论是膜上的或是分泌型的 L-TGF- $\beta$ , 均需将成熟的 TGF- $\beta$  二聚体从 L-TGF- $\beta$  四聚体中释出成为游离的 TGF- $\beta$  才能发挥作用。检测结果显示, 尽管活动性 SLE 患者外周血 CD4<sup>+</sup>T 细胞膜上 LAP 即潜伏态 TGF- $\beta$  表达有所增强, 但其 TGF- $\beta$  表达依然存在缺陷, 主要表现为 TGF- $\beta$ 1 的转录、分泌水平降低, 游离的活化 TGF- $\beta$ 1 产生障碍, 这在分离获得的 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞上显得更为显著, 从而可能削弱了 Treg 细胞的免疫抑制作用。本研究尚不能解释 TGF- $\beta$ 1 的转录、分泌水平降低及游离的活化 TGF- $\beta$ 1 产生障碍的原因。SLE 体内是否存在某些抑制 TGF- $\beta$  TA 活性的因素也是需要进一步追究的可能原因。

2008 年 Chen 等<sup>[11]</sup>在小鼠身上发现一种不同于经典 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> Foxp3<sup>high</sup> 的 nTreg, 即 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> LAP<sup>+</sup> T 细胞, 是一种活化诱导的 Treg (iTreg), 表达高水平的 Treg 相关分子 Foxp3、GITR、CTLA-4、TGF- $\beta$ 、TGF- $\beta$ Rs、ICOS 和 PD1, 以 TGF- $\beta$  依赖的方式、并通过分泌 TGF- $\beta$  和 IL-10 以及细胞间直接接触两种机

制, 在体内外均能抑制效应性 T 细胞。这种 TGF- $\beta$  依赖的 Treg 具有一定的扩增能力, 在 TGF- $\beta$  存在的条件下, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>LAP<sup>+</sup> T 细胞可以被诱导分化为 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup> T 细胞。稍后, Gandhi 等<sup>[12]</sup>进一步在人外周血中也证实了 CD4<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup> Treg 细胞的存在, 但与小鼠的略有不同: 这是一种可从初始 (naive) T 细胞活化诱导的 iTreg, 不表达 Foxp3, 表达 T 细胞早期活化标志 CD69, 表达高水平 TGF- $\beta$ R II、GITR、CTLA-4 和 IL-8、IL-9、IL-10、TGF- $\beta$ 1、IFN- $\gamma$ , 可以在 IL-8 诱导下显著扩增, 以 TGF- $\beta$  和 IL-10 依赖的方式发挥抑制作用<sup>[13]</sup>。本研究发现正常人外周血 T 细胞受到刺激活化后的确可以产生 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup> T 细胞, 而 SLE 患者新鲜分离的外周血 T 细胞中即存在正常人所没有的 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup> T 细胞, 受刺激后的 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 细胞 LAP 表达又可以进一步增高, 可能反映了活动性 SLE 患者 T 细胞亚群的活化和 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup>Treg 细胞的反应性扩增。但其水平与疾病活动度之间并无相关性。SLE 患者的 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup>Treg 细胞的功能状态如何, 尚未深入研究, 还有待今后进一步阐明。实际上, L-TGF- $\beta$  是通过与 GARP 结合而被锚定在 Treg 细胞表面的, 因此怀疑 SLE 患者体内 CD4<sup>+</sup>T 细胞异常活化, GARP 表达增高, 使更多的 L-TGF- $\beta$  被锚定在 T 细胞膜上, 导致 LAP<sup>+</sup>细胞增多。当然, 这种推测需要进行进一步的研究加以证实。

目前已知 CD4<sup>+</sup>Treg 对免疫效应细胞的作用机制主要有 4 种<sup>[15]</sup>: ①分泌抑制性细胞因子; ②竞争性抑制 IL-2; ③直接的溶细胞毒性; ④通过已知或未知的 Treg 表面分子与效应 T 细胞相互作用, 引起效应 T 细胞的细胞周期停滞或凋亡。TGF- $\beta$  可以通过多种机制参与 Treg 对免疫效应细胞的作用: 既可能作为抑制性细胞因子诱导效应性 T 细胞进入细胞周期停滞状态, 也可能作为膜分子介导 Treg 与效应性 T 细胞直接相互作用, 还可能诱导 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>Foxp3<sup>+</sup> 的效应性 T 细胞转化为 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> 的 iTreg。因此, SLE 的 Treg 缺陷是否与 TGF- $\beta$ 1 缺陷相关值得关注。本研究结果显示: ①活动性 SLE 患者外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞内的 TGF- $\beta$  mRNA 表达显著低于正常人, 同时, 其分泌到细胞外的总 TGF- $\beta$  水平降低。正常人 PBMC 中分离出 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞后单独培养, 其上清中的总 TGF- $\beta$  水平可进一步增高, 显示了 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 是主要分泌 TGF- $\beta$ 1 的细胞; 然而 SLE 患者的 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞分离出来后产生的总 TGF- $\beta$ 1 水平反而较 PBMC 明显下降, 提

示其 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 细胞产生 TGF-β1 能力有缺陷, PBMC 中的 TGF-β1 可能还来自其他一些细胞亚群。这一现象值得进一步关注。②无论是 PBMC 还是 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞, 均不能在 SLE 患者来源的细胞培养上清中测到游离活化的 TGF-β1, 提示 SLE 患者的 TGF-β1 从潜伏态转化为游离活化态缺陷, 因此其膜 L-TGFβ 是否存在激活障碍而不能有效发挥作用还有待进一步研究。

## [参考文献]

- [1] Leslie M. Regulatory T cells get their chance to shine[J]. *Science*, 2011, 332(633): 1020-1021
- [2] Miyara M, Gorochov G, Ehrenstein M, et al. Human FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells in systemic autoimmune diseases [J]. *Autoimmun Rev*, 2011, 10(12): 744-755
- [3] Novak J, Lehuen A. Mechanism of regulation of autoimmunity by iNKT cells[J]. *Cytokine*, 2011, 53(3): 263-270
- [4] Fife BT, Bluestone JA. Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways[J]. *Immunol Rev*, 2008, 224(1): 166-182
- [5] Savage ND, De Boer T, Walburg KV, et al. Human anti-inflammatory macrophages induce Foxp3<sup>+</sup> GITR<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells, which suppress via membrane-bound TGFbeta-1[J]. *J Immunol*, 2008, 181(3): 2220-2226
- [6] Chen ZF, Xu Q, Ding JB, et al. CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Treg and TGF-beta play important roles in pathogenesis of Uygur cervical carcinoma[J]. *Eur J Gynaecol Oncol*, 2012, 33(5): 502-507
- [7] Tran DQ, Andersson J, Wang R, et al. GARP(LRRC32) is essential for the surface expression of latent TGF-beta on platelets and activated FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(32): 13445-13450
- [8] Robertson IB, Rifkin DB. Unchaining the beast; insights from structural and evolutionary studies on TGFβ secretion, sequestration, and activation [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2013, 24(4): 355-372
- [9] Horwitz DA, Zheng SG, Gray JD. Natural and TGF-beta-induced Foxp3(+)CD4(+)CD25(+)regulatory T cells are not mirror images of each other[J]. *Trends Immunol*, 2008, 29(9): 429-435
- [10] Josefowicz SZ, Lu LF, Rudensky AY. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function [J]. *Ann Rev Immunol*, 2012, 30: 531-564
- [11] Chen ML, Yan BS, Bando Y, et al. Latency-associated peptide identifies a novel CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cell subset with TGFbeta-mediated function and enhanced suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. *J Immunol*, 2008, 180(11): 7327-7337
- [12] Gandhi R, Farez MF, Wang Y, et al. Cutting edge: human latency-associated peptide<sup>+</sup> T cells; a novel regulatory T cell subset [J]. *J Immunol*, 2010, 184(9): 4620-4624
- [13] Wu HY, Quintana FJ, Weiner HL. Nasal anti-CD3 antibody ameliorates lupus by inducing an IL-10-secreting CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> LAP<sup>+</sup> regulatory T cell and is associated with down-regulation of IL-17<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> ICOS<sup>+</sup> CXCR5<sup>+</sup> follicular helper T cells [J]. *J Immunol*, 2008, 181(9): 6038-6050
- [14] 徐红星, 邱德华, 宋恒蕊, 等. 血清 sCD40L 和 TGF-β1 对系统性红斑狼疮活动性及治疗转归的预测价值 [J]. *江苏大学学报(医学版)*, 2009, 19(4): 328-332
- [15] Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM. FOXP3(+) regulatory T cells in the human immune system [J]. *Nat Rev Immunol*, 2010, 10(7): 490-500

[收稿日期] 2015-10-26