

外周血中3种标记的Tregs细胞表达频率比较

邢应如^{1*}, 孟阿娜¹, 胡东², 张荣波²

(¹安徽理工大学附属东方肿瘤医院检验科, 安徽淮南 232001; ²安徽理工大学医学院免疫与检验教研室, 安徽淮南 232001)

[摘要] 目的:分析 CD4⁺CD25^{High}、CD4⁺CD25⁺CD127^{Low/-}、CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ 3种标记的 Tregs 细胞比例的相关性,探讨不同荧光素组合标记 Tregs 细胞的鉴定效果。方法:随机抽取健康体检者 60 例,平均分成 2 组(I 组、II 组),I 组用 CD25-APC/CD127-PE/CD4-FITC 三色抗体标记,II 组用 CD25-PE/CD127-Alexa Fluor[®]647/CD4-PerCP-Cy5.5 标记;另选 I 组 10 例,用 CD25-FITC/FoxP3-PE/CD4-PerCP-Cy5.5/CD127-Alexa Fluor[®]647 四色抗体标记;流式细胞仪检测,CellQuest 软件分析,比较 Tregs 细胞结果差异,分析 FoxP3⁺与 CD127^{Low/-}的相关性。结果:CD25⁺CD127^{Low/-}Tregs 细胞 II 组(7.89 ± 1.37)%明显高于 I 组(6.37 ± 1.83)%($P=0.001$),2 组中 CD4⁺CD25^{High} 和 CD4⁺CD25⁺CD127^{Low/-}的相关系数(r)分别是 0.944、0.916;(94.08 ± 1.93)%的 CD25⁺FoxP3⁺细胞低表达 CD127,CD25⁺FoxP3⁺和全血检测 CD25⁺CD127^{Low/-}的 Tregs 细胞有较高的相关性($r=0.846$),结果差异不明显($P=0.774$)。结论:CD25⁺CD127^{Low/-}是 Tregs 细胞特异性标志,适合临床应用。全血检测 Tregs 细胞,用 CD25-APC、CD127-PE、CD4-FITC 荧光素组合检测结果与 FoxP3 相关度高。

[关键词] 调节性 T 细胞;CD127;FoxP3;流式细胞仪

[中图分类号] R392-33

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)06-798-06

doi:10.7655/NYDXBNS20150608

Comparison of three methods for identifying Tregs of peripheral blood

Xing Yingru^{1*}, Meng Ana¹, Hu Dong², Zhang Rongbo²

(¹Clinical Laboratory, Eastern Oncology Hospital Affiliated to Anhui University of Science & Technology, Huainan 232001; ²Department of Immunology and Laboratory Medicine, Medical College, Anhui University of Science & Technology, Huainan 232001, China)

[Abstract] **Objective:**To analyze the association of three kinds of Tregs labeled by CD4⁺CD25^{High}, CD4⁺CD25⁺CD127^{Low/-}, CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ and study the effect of different fluorescence labeling methods on Tregs identification. **Methods:** Sixty samples of the peripheral blood from 60 healthy people were randomly divided into 2 groups (group I and group II). Group I was labeled by CD25-APC/CD127-PE/CD4-FITC, group II was labeled by CD25-PE/CD127-Alexa Fluor[®]647/CD4-PerCP-Cy5.5. Another 10 samples from group I were labeled by CD25-FITC/FoxP3-PE/CD4-PerCP-Cy5.5/CD127-Alexa Fluor[®]647. All labeled samples were detected using flow cytometry, and the data were analyzed using CellQuest software to count the numbers of Tregs labeled with different methods, and then the relationships between them were analyzed. **Results:** CD25⁺CD127^{Low/-} Tregs cells in group II (7.89 ± 1.37)% was significantly higher than that in group I (6.37 ± 1.83)% ($P=0.001$). The correlation coefficient (r) of CD4⁺CD25^{High} and CD4⁺CD25⁺CD127^{Low/-} in the two group were 0.944 and 0.916, respectively; (94.08 ± 1.93)% of CD25⁺FoxP3⁺ cells were also labeled with low CD127 expression, there was a high correlation ($r=0.846$) and no significant difference ($P=0.774$) between them. **Conclusion:** CD25⁺CD127^{Low/-} can specifically label Tregs, and is suitable for clinical application. Between the labellings with FoxP3 and CD25-APC/CD127-PE/CD4-FITC fluorescein combination, there is a high correlation to identify Tregs in the peripheral blood.

[Key words] regulatory T cells; CD127; FoxP3; flow cytometry

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(06): 798-803]

[基金项目] 国家自然科学基金(81202294, 81172778)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: 491710459@qq.com

调节性 T 细胞(regulatory T cells, Tregs)是一群具有免疫无能和免疫负调控功能的 T 细胞亚群。研究表明 Tregs 与多种自身免疫性疾病、移植排斥、肿瘤、病毒感染和自然戒断期成瘾药物依赖者免疫功能紊乱相关^[1]。过度表达的 Treg 细胞可能通过细胞间直接接触,或分泌转化生长因子(transforming growth factor, TGF- β)和白细胞介素(interleukin IL)-10 来抑制 T 细胞的活化增殖^[2],达到抑制细胞免疫的效应。人外周血中来源于胸腺的 CD4 单阳性 Tregs 称为天然性调节性 T 细胞(nTregs),它可以构成性地高表达 IL-2Ra 链(CD25),起初认为 CD4⁺CD25^{high}是 Tregs 细胞的标志。FoxP3 基因是 CD4⁺CD25⁺ Tregs 分化发育和功能维持的重要调控基因,其编码的 FoxP3 蛋白可作为 Tregs 的特异性分子标志。研究发现 CD127(IL-7 受体)与 FoxP3 表达呈负相关^[3-4]。本研究旨在分析 3 种 Tregs 标志的相关性,以评价 CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}作为 Tregs 标志的优劣。

1 材料和方法

1.1 材料

荧光素标记抗体 CD4-FITC (Cat:340133, Lot:3015659)、CD127-PE (Cat:557938, Lot:2170590)、CD25-APC (Cat:340939, Lot:2338884)、CD25-PE (Cat:341009, Lot:52248)、CD4PerCP-Cy55 (Cat:341654, Lot:2265572)、CD127-Alexa Fluor[®] 647 (Cat:558598, Lot:2170590)、FoxP3-PE (Cat:560852, Lot:2125517)、同型对照小鼠 IgG1APC γ 1 (Cat:340442, Lot:47823)、小鼠 IgG1FITC γ 1 和 IgG2PE γ 2a (Cat:340041, Lot:2258985)、FoxP3 破膜剂 (Cat:9008100, Lot:2238667)、FBS 染色洗液 (Cat:554656, Lot:2108616)、溶血素 (Cat:349202, Lot:2312897)均购自美国 BD 公司;人淋巴细胞分离液 (Cat:LTS1077, Lot:G20120829)购自天津灏洋生物。FACS Calibur 流式细胞仪、CellQuest 软件均为美国 BD 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 标本来源与分组

健康体检者 60 例,随机分为两组,每组 30 例。I 组男 20 例,女 10 例,年龄 25~59 岁,中位年龄 44 岁,用 CD25-APC、CD127-PE、CD4-FITC 三色抗体标记,直接检测外周血中 CD4⁺CD25^{high}和 CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}2 种 Tregs 占 CD4⁺细胞的百分比;另用 CD25-FITC、FoxP3-PE、CD4-PerCP-Cy5.5、CD127-Alexa Fluor[®] 647 四色抗体标记,检测 10 例外周血单个核细胞中 FoxP3⁺细胞比例。II 组男 19 例,女 11

例,年龄 20~62 岁,中位年龄 42 岁。用 CD25-PE、CD127-Alexa Fluor[®] 647、CD4-PerCP-Cy5.5 标记,直接检测外周血中 Tregs 占 CD4⁺T 细胞的百分比。

1.2.2 血 CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}细胞计数及表型分析

取抗凝全血 100 μ L, I 组分别加入 CD4-FITC、CD127-PE 抗体 20 μ L、CD25-APC 抗体 10 μ L; II 组分别加入 CD25-PE、CD4-PerCP-Cy5.5 抗体 20 μ L、CD127-Alexa Fluor[®] 647 抗体 10 μ L;平行设 2 管同型对照。室温下避光孵育 30 min,加入红细胞裂解液 1 mL,室温避光放置 10 min,振荡混匀,300 \times g 离心 5 min,弃上清,用 2 mL PBS 洗涤 2 次,加入 500 μ L PBS 重悬细胞,流式细胞仪检测,每次均收集 CD4⁺T 细胞 2×10^4 个以上,CellQuest 软件分析。

1.2.3 CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}联合细胞内 FoxP3 检测

取抗凝全血 1 mL,采用淋巴细胞分离液分离出外周血单个核细胞,用 PBS 液洗涤 2 次,300 \times g 离心 5 min,弃上清,PBS 重悬细胞,细胞密度调至 1×10^9 个/L。取制备好的细胞悬液 100 μ L,分别加入 CD25-FITC、CD4-PerCP-Cy5.5 抗体 20 μ L、CD127-Alexa Fluor[®] 647 抗体 10 μ L(另分设 CD25、CD127、FoxP3 同型对照各 1 管),2~8 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min;用 FBS 染色洗液 2 mL 洗涤 1 次,300 \times g 离心 5 min,弃上清,FBS 染色洗液 50 μ L 重悬细胞;每管加 1 h 内新鲜配制的 Fix/Perm 缓冲液(R1 液 1 份加 R2 稀释液 3 份)1 mL,混匀样品,将样品在 2~8 $^{\circ}$ C 避光 40~50 min;每管添加 1 mL 的 Perm/Wash 液 (R3 液 1 份加去离子水 4 份),300 \times g 离心 5 min,弃上清,加 2 mL 的 Perm/Wash 液,300 \times g 离心 5 min,弃上清;各管添加 80~100 μ L Perm/Wash 液和 FoxP3-PE 或同型对照抗体 10 μ L,混匀样品,避光,2~8 $^{\circ}$ C 40~50 min;2 mL 的 Perm/Wash 液洗涤 2 次,弃上清;加 FBS 染色洗液 500 μ L 重悬细胞,流式仪检测,CellQuest 软件分析。

1.2.4 CD25⁺A^{high} 设门方法

先以前向散射角(FSC)及侧向散射角(SSC)确定淋巴细胞群,用 CD25 同型对照确定 CD25⁺门的位置,用 CD4⁺T 细胞中 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。记录阳性细胞百分率,减去非特异对照值,各指标均换算成占外周血 CD4⁺T 细胞的比例。

1.3 统计学方法

计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,比值以百分比表示,组间比较用独立样本 *t* 检验,组内两两比较用配对样本 *t* 检验,多重比较用方差分析,且行

直线回归相关分析,SPSS17.0 软件分析结果, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

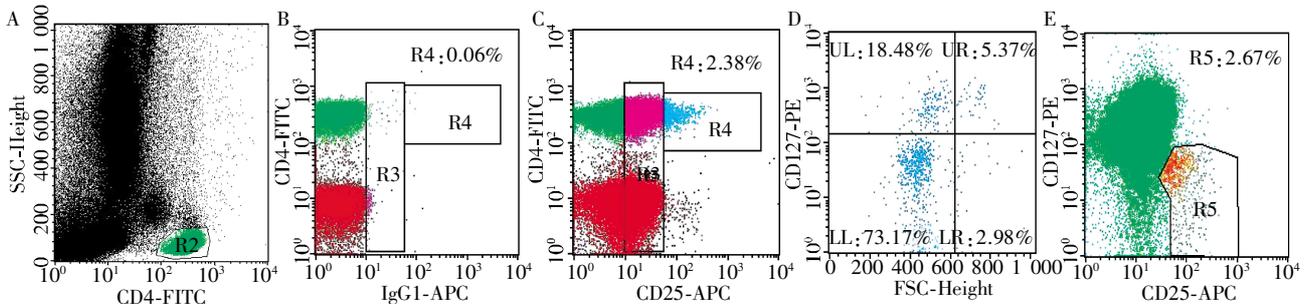
2.1 不同荧光素组合标记的 Tregs 的设门及表达模式
不同荧光素组合标记的 Tregs 的设门及表达模式见图 1、2。不同荧光素组合标记的 $CD4^+CD25^{High}$ 、 $CD4^+CD25^+CD127^{Low/-}$ 的 Tregs 比较和 $CD25^{High}$ 含 $CD127^{Low/-}$ 细胞比例结果见表 1。

CD127 与 FSC 散点图显示 $CD25^{High}$ 细胞群中绝大部分 $CD127^{Low/-}$ 细胞位于 FSC 小细胞群中,本研究进一步分析了 I 组中 $CD4^+CD25^+CD127^{Low/-}$ 细胞群,其中 $(94.85 \pm 4.59)\%$ 的细胞位于 $CD127^{Low}FSC^{Small}$ 细胞群。

$CD25^+CD127^{Low/-}$ 细胞群 II 组 $(7.89 \pm 1.37)\%$ 明显高于 I 组 $(6.37 \pm 1.83)\%$,且 II 组中 $CD25^+CD127^{Low/-}$ 细胞群明显高于 $CD25^{High}$ 。为明确 Tregs 比例是否与荧光素有关,本研究分别用 $CD25-PE/CD127-Alexa Fluor^{\text{®}}647/CD4-PerCP-Cy5.5$ (A 管)、 $CD25-FITC (Cat:347643, Lot:2291743)/CD127-Alexa Fluor^{\text{®}}647/CD4-PerCP-Cy5.5$ (B 管)、 $CD25-FITC/CD127-PE/CD4-PerCP-Cy5.5$ (C 管)、 $CD25-APC/CD127-PE/CD4-PerCP-Cy5.5$ (D 管) 标记,每管分设 $CD25$ 和 $CD127$ 同型对照 2 管,分析结果见图 3。

2.2 $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ 与 $CD4^+CD25^{High}$ 、 $CD4^+CD25^+CD127^{Low/-}$ 的相关性

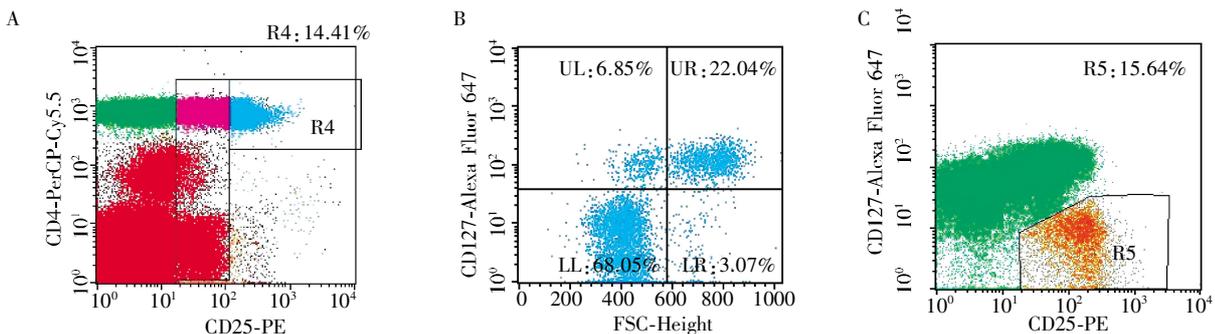
I 组中 10 例标本,淋巴细胞分离液分离出单个核细胞,图 4、5 显示用 $CD25-FITC/FoxP3-PE/CD4-PerCP-$



A: 在 $CD4^+SSC$ 低细胞群设门 R2; B: 在 $CD4^+$ APC 同型对照位置设定 $CD25^+$ 细胞群界限; C: 在 $CD4^+CD25^+$ 位置设定 $CD25^{High}$ 细胞群界限; D: R4 门内 $CD25^+CD127^{Low/-}$ 细胞含量百分比; E: 在 $CD25$ 与 $CD127$ 散点图中圈出 $CD25^+CD127^{Low/-}$ 细胞群。

图 1 $CD25-APC$ 、 $CD127-PE$ 、 $CD4-FITC$ 三色标记 Tregs 的表达模式

Figure 1 The expression pattern of $CD25-APC$, $CD127-PE$ and $CD4-FITC$ marked Tregs



A: 在 $CD4^+CD25^+$ 位置设定 $CD25^{High}$ 细胞群界限; B: R4 门内 $CD25^+CD127^{Low/-}$ 细胞含量百分比; C: 在 $CD25$ 与 $CD127$ 散点图中圈出 $CD25^+CD127^{Low/-}$ 细胞群。

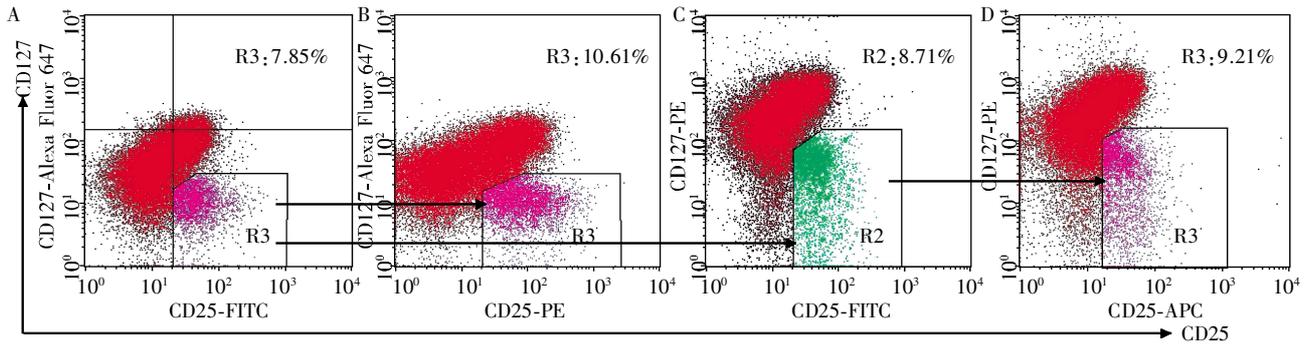
图 2 $CD25-PE$ 、 $CD127-Alexa Fluor^{\text{®}}647$ 、 $CD4-PerCP-Cy5.5$ 三色标记 Tregs 的表达模式

Figure 2 The expression pattern of $CD25-PE$, $CD127-Alexa Fluor^{\text{®}}647$ and $CD4-PerCP-Cy5.5$ marked Tregs

表 1 $CD4^+CD25^{High}$ 、 $CD4^+CD25^+CD127^{Low/-}$ 的 Tregs 组内和组间的比较

Table 1 The comparison of Tregs of $CD4^+CD25^{High}$ and $CD4^+CD25^+CD127^{Low/-}$ within group and between groups

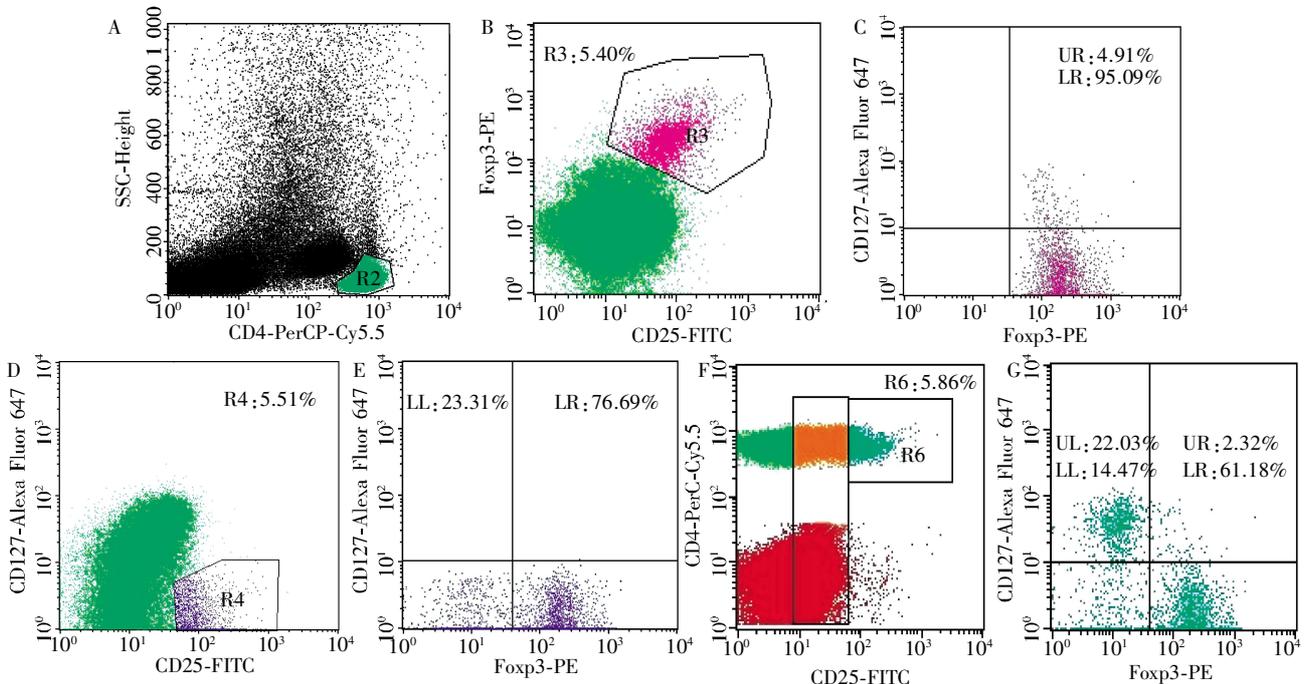
组别	① $CD25^{High}(\%)$	② $CD25^+CD127^{Low/-}(\%)$	③ $CD25^{High}$ 含 $CD127^{Low/-}(\%)$	组内①与②比较		
				相关系数	t 值	P 值
I 组	6.61 ± 2.00	6.37 ± 1.83	74.60 ± 9.28	0.944	1.979	0.057
II 组	7.47 ± 1.25	7.89 ± 1.37	61.96 ± 7.85	0.916	4.197	<0.001
P 值	0.051	0.001	<0.001			



A、B: CD127 标记相同, CD25-PE(B) 标记的 Tregs 数高于 CD25-FITC(A); C、D: CD127 标记相同, CD25-APC(D) 标记的 Tregs 数高于 CD25-FITC(C); A、C: CD25 标记相同, CD127-PE(C) 标记的 Tregs 数高于 CD127-Alexa Fluor 647(A)。

图 3 不同荧光素标记的 CD25⁺CD127^{low/-} Tregs 表达频率

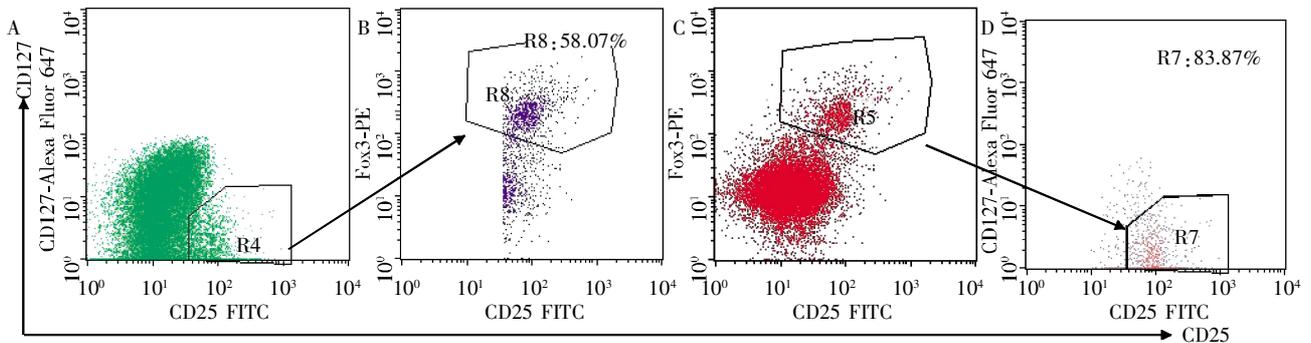
Figure 3 The expression frequency of fluorescein labeled CD25⁺CD127^{low/-} Tregs



A; CD4⁺SSC 低细胞群设门 R2; B; R3 门内 CD25⁺FoxP3⁺ 细胞明显聚集成群; C; R3 门内 (94.08 ± 1.93)% 的细胞低表达 CD127; D、E: R4 门内 (62.41 ± 8.66)% 的 CD25⁺CD127^{low/-} 细胞表达 FoxP3⁺; F、G; R4 门内 (57.13 ± 7.77)% 的 CD25^{high} 细胞表达 FoxP3⁺, (71.48 ± 5.82)% 的 CD25^{high} 细胞低表达 CD127。

图 4 CD25-FITC、FoxP3-PE、CD4-PerCP-CY5.5、CD127-Alexa Fluor[®]647 四色标记 Tregs 的表达模式

Figure 4 The expression pattern of CD25-FITC, FoxP3-PE, CD4-PerCP-CY5.5, CD127-Alexa Fluor[®]647 four color marker Tregs



A、B: 外周血中 CD4⁺ 细胞, (59.38 ± 8.70)% 的 CD25⁺CD127^{low/-} 在 CD25⁺FoxP3⁺ 的门内; C、D: (84.00 ± 2.93)% 的 CD25⁺FoxP3⁺ 的细胞在 CD4⁺CD127^{low/-} 门内。

图 5 CD25⁺CD127^{low/-} 门与 CD25⁺FoxP3⁺ 门相关性

Figure 5 The correlation between CD25⁺CD127^{low/-} and CD25⁺FoxP3⁺ doors

Cy5.5/CD127-Alexa Fluor®647 四色抗体标记、FoxP3⁺、CD25^{High} 和 CD127^{Low/-} 3 种标记 Tregs 的表达模式。标记结果经方差齐性检验 $P=0.837$, 具有方差齐性, 经方差分析显示, 差异有显著性 ($F=2.874, P=0.033$ 表 2, 图 6)。

3 讨论

本研究用 CD4⁺CD25⁺ 细胞作参照设立 CD4⁺

CD25^{High} 细胞群界限^[5-6], 确定的 CD4⁺CD25^{High} Tregs 与 CD4⁺CD25⁺CD127^{Low/-} 表型有很好的相关性 (相关系数 ≥ 0.885), FoxP3 分析显示, 在 CD25^{High} 细胞群中, $(57.13 \pm 7.77)\%$ 的细胞表达 FoxP3⁺, $(71.48 \pm 5.82)\%$ 细胞低表达 CD127; CD25-APC 荧光素标记的 I 组中 CD4⁺CD25^{High} 细胞含 CD4⁺CD25⁺CD127^{Low/-} 细胞的比例为 $(74.60 \pm 9.28)\%$, 明显高于 CD25-PE

表 2 10 例标本中不同标记的 Tregs 结果比较

Table 2 The comparison of results of different labeled Tregs in 10 specimens

方法	Treg 标记分组	比例(%)	统计学比较	P 值	相关系数
分离单个核细胞后联合检测	①CD25 ⁺ FoxP3 ⁺	5.91 ± 1.48	①与②	0.016	0.810
	②CD25 ⁺ CD127 ^{Low/-}	7.98 ± 1.62	②与④	0.031	0.566
	③CD25-FITC ^{High}	7.74 ± 2.08	①与③	0.031	0.823
全血检测	④CD25-APC ⁺ CD127 ^{Low/-}	6.15 ± 1.76	①与④	0.774	0.846
	⑤CD25-APC ^{High}	6.16 ± 2.16	①与⑤	0.761	0.876

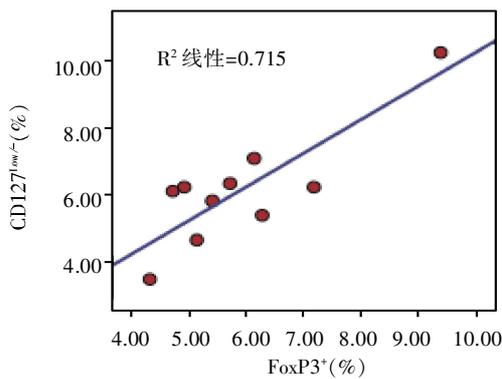


图 6 CD25⁺FoxP3⁺ 与溶血检测 CD25-APC⁺CD127-PE^{Low/-} Tregs 的相关性

Figure 6 The correlation between CD25⁺FoxP3⁺ and hemolysis detection of CD25-APC⁺CD127-PE^{Low/-} Tregs

荧光素标记的 II 组 $(61.96 \pm 7.85)\%$; PE 荧光素标记的 CD25^{High} 细胞中, 含低表达 CD127 的细胞比例明显降低; 说明 CD4⁺CD25^{High} 确定的细胞群虽然与 CD4⁺CD25⁺CD127^{Low/-} 表型有很好的相关性, 但易受荧光抗体、体内细胞活化状态等因素影响, 不能代表体内真实的 Tregs 数量。

研究发现^[4,7], 通过 CD25⁺CD127^{Low/-} 分选后分析, 细胞表达 CD25⁺FoxP3⁺。定量 PCR 证实, CD127 启动子是 FoxP3 的结合靶点, FoxP3 可能直接调控 CD127 低表达^[4]。本研究用 FoxP3 检测 Tregs, CD25⁺FoxP3⁺ 门内 $(94.08 \pm 1.93)\%$ 的细胞低表达 CD127; 经过透膜处理的 CD25⁺CD127^{Low/-} 细胞比例高于 CD25⁺FoxP3⁺ 和全血检测的 CD25⁺CD127^{Low/-} 细胞群, CD25⁺CD127^{Low/-} 细胞群中表达 FoxP3⁺ 的细胞只有 $(62.41 \pm 8.66)\%$, 究其原因, 系透膜处理, 多次洗

涤, CD127-Alexa Fluor® 647 强度明显降低 (图 2C, 图 4D), 导致 CD25⁺CD127^{Low/-} 细胞群界限不清, 细胞比例增高, 说明细胞标记的荧光抗体不宜进行透膜处理和多次洗涤; CD25⁺FoxP3⁺ 和全血检测 CD25⁺CD127^{Low/-} 的 Tregs 有较高的相关性 ($r=0.846$), 结果差异不明显 ($P=0.774$), 外周血检测 CD25⁺CD127^{Low/-} 细胞可代表体内 Tregs 频率。由于 FoxP3 检测需要透膜处理, 实验方法繁琐, 不适合大批量检测; 相对于 FoxP3 而言, CD127 膜标记分子可以用来更好地展现 Tregs 的典型特征, 适合细胞分选, 并且操作简便、临床评价效果好^[8-10]; 故 CD25⁺CD127^{Low/-} 是 Tregs 细胞特异性标志, 适合临床应用。

II 组中 CD25⁺CD127^{Low/-} 细胞群比例 $(7.89 \pm 1.37)\%$ 明显高于 I 组 $(6.37 \pm 1.83)\%$, 与叶军等^[11] 用 CD25-PE 荧光素标记报道的结果 $(8.07 \pm 2.18)\%$ 相近。活化的 T 细胞累积表达 CD25 是一个渐进的过程, 由于 PE 荧光素的荧光强度明显高于 APC 等荧光素, 可能原来 CD25 弱表达的细胞被检测出来, 此结果可以解释为更多的 Tregs 被检出, 相反, 也可以解释为一些 CD25 弱 CD127^{Low/-} 的细胞被误鉴定为 Tregs。为进一步研究确认 Tregs 检出是否与荧光素有关, 本研究设计了 4 个不同荧光素标记的组合来鉴定同一份标本; 如图 3 所示, 当 CD127-Alexa Fluor®647 标记相同, CD25-PE (10.61%) 标记的 Tregs 数高于 CD25-FITC (7.85%); 当 CD127-PE 标记相同, CD25-APC (9.21%) 标记的 Tregs 数高于 CD25-FITC (8.71%); 当 CD25-FITC 标记相同, CD127-PE (8.71%) 标记的 Tregs 数高于 CD127-Alexa Fluor® 647 (7.85%); 荧光强度 PE>APC>FITC, 且 PE>Alexa

Fluor[®]647; 说明不同荧光素对 Tregs 检测结果差异有显著性, 荧光强度与 Tregs 检测结果呈正比, 荧光强度越强, Tregs 检测结果越高。CD25⁺CD127^{Low/-}门与 CD25⁺FoxP3⁺门相关性分析显示, (59.38 ± 8.70)% 的 CD25⁺CD127^{Low/-} 门细胞在 CD25⁺FoxP3⁺的门内, 而 (84.0 ± 2.93)% 的 CD25⁺FoxP3⁺门细胞在 CD4⁺CD127^{Low/-}门内检测到, 与文献报道的 87%、84%^[3]结果相近, 而与文献报道的 (66.0 ± 15.5)%、(69.7 ± 7.4)%^[12]结果差异明显, 根据文献报道, 其抗体标记的荧光素均不相同。本研究结果显示, APC 荧光强度适中, 用 CD25-APC、CD127-PE、CD4-FITC 抗体界定的 Tregs 与 FoxP3 结果差异小, 相关度高; 因此本研究认为全血检测 Tregs, 用 CD25-APC、CD127-PE、CD4-FITC 荧光素组合较好。

总之, CD4⁺CD25^{High} 不能代表体内真实的 Tregs 数量。CD25⁺CD127^{Low/-}是 Tregs 特异性标志, 且不需要透膜处理、检测方便快捷, 适合临床应用。荧光素的荧光强度与 Tregs 检测结果呈正比, 荧光强度越强, Tregs 检测结果越高。全血检测 Tregs, 用 CD25-APC、CD127-PE、CD4-FITC 荧光素组合检测结果与 FoxP3 结果相关度高。

[参考文献]

- [1] 王文洋, 张荣波, 邢应如, 等. 自然戒断期成瘾药物依赖者 CD4⁺CD25⁺CD127^{Low} 调节性 T 细胞的变化特征及意义 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2013, 29 (10): 1072-1075
- [2] Lan Q, Fan H, Quesniaux V, et al. Induced Foxp3(+) regulatory T cells: a potential new weapon to treat autoimmune and inflammatory diseases [J]. J Mol Cell Biol, 2012, 4(1): 22-28
- [3] Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J, et al. Expression of interleukin(IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells [J]. J Exp Med, 2006, 203(7): 1693-1700
- [4] Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ Treg cells [J]. J Exp Med, 2006, 203(7): 1701-1711
- [5] 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
- [6] 韩文敏, 邱国强, 周民, 等. CD4⁺CD25^{High}CD127^{Low} Tregs 及 TGF-β 在多发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
- [7] 王盈, 周磊明, 宫菊丽, 等. 中国健康人外周血中具有 CD4⁺CD25^{nt/hi}CD127^{Lo} 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
- [8] Saison J, Demaret J, Venet F, et al. CD4⁺CD25⁺CD127⁻ assessment as a surrogate phenotype for FOXP3⁺ regulatory T cells in HIV-1 infected viremic and aviremic subjects [J]. Cytometry B Clin Cytom, 2013, 84(1): 50-54
- [9] Sun Q, Zhang Q, Xiao H, et al. Significance of the frequency of CD4⁺CD25⁺CD127⁻ T-cells in patients with pulmonary tuberculosis and diabetes mellitus [J]. Respirology, 2012, 17(5): 876-882
- [10] Pan XD, Mao YQ, Zhu LJ, et al. Changes of regulatory T cells and FoxP3 gene expression in the aging process and its relationship with lung tumors in humans and mice [J]. Chin Med J (Engl), 2012, 125(11): 2004-2011
- [11] 叶军, 陈亚宝, 徐洪涛, 等. 流式细胞术不同设门方法对 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞的检测方法比较 [J]. 中华生物医学工程杂志, 2010, 16(5): 495-498
- [12] Klein S, Kretz CC, Krammer PH, et al. CD127^{Low/-} and FoxP3⁺ expression levels characterize different regulatory T-cell populations in human peripheral blood [J]. J Invest Dermatol, 2010, 130(2): 492-499

[收稿日期] 2014-12-18