

• 研究报告 •

急性冠脉综合征患者 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞分析

李玉杰 郑东诞 陈洁 梁艳冰 孔庆瑜 熊艳 唐皓 李欣

【关键词】 急性冠脉综合征； CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞； 转化生长因子-β1； 炎症

动脉粥样硬化(AS)是涉及内皮细胞、巨噬细胞、平滑肌细胞和淋巴细胞间相互作用的多因素过程^[1],斑块的增长影响器官血液灌注,导致脑血管事件和急性冠脉综合征(ACS)的发生。AS 是一种慢性炎症性病变,受机体免疫反应的影响,抗原特异性效应 T 细胞(主要为 CD4⁺T 细胞)促进了斑块的产生和演变^[2];调节性 T 细胞(Tregs)通过直接细胞接触机制和细胞因子调节机制对 T 细胞和 B 细胞产生调节作用,维持机体的免疫稳态;其中,CD4⁺CD25⁺Tregs 能通过对效应 T 细胞的抑制作用产生抗 AS 作用^[3-4]。为了解 ACS 患者外周血 CD4⁺CD25⁺Tregs 数目变化和和功能改变,我们检测了 ACS 患者外周血 CD4⁺CD25⁺Tregs 数目和血清转化生长因子-β1(TGF-β1)水平,探讨 ACS 与外周血 CD4⁺CD25⁺Tregs 数目变化和和功能改变的可能关系。

1 对象与方法

1.1 对象:所有病例选自中山大学附属第一医院急诊科、心血管医学部。依据有关诊断标准选取 24 例冠心病患者,其中 ACS[包括不稳定型心绞痛(UAP)、急性心肌梗死(AMI)]13 例,稳定型心绞痛(SAP)11 例;健康对照组为与患者年龄、性别相匹配的健康志愿者 10 例。所有受试者排除感染、肿瘤、风湿、肝肾功能不全等,未使用类固醇类和免疫抑制剂等。

1.2 检测指标及方法:取晨起空腹静脉血 4 ml。2 ml 以乙二胺四乙酸(EDTA)

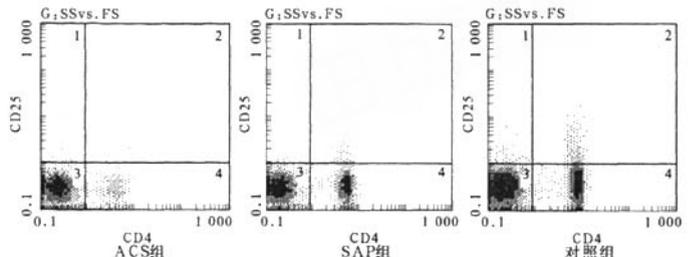


图 1 3 组患者外周血 CD4⁺CD25⁺T 细胞的流式细胞分析

进行抗凝,用于流式细胞技术检测 CD4⁺T 细胞表达 CD25 的比例,即 CD4⁺CD25⁺/CD4⁺T 细胞比例;2 ml 为未抗凝血,经离心后取血清,采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测血清 TGF-β1 浓度,严格按照试剂盒说明书操作。

1.3 统计学处理:应用 SPSS 11.0 统计软件,数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,先行方差齐性检验,组间比较用方差分析(one way ANOVA),两者间比较用独立样本 t 检验,相关分析用 Pearson 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血 CD4⁺CD25⁺T 细胞的流式细胞分析(图 1):检测、计算图中 2/(2+4) 的比值,即表示 CD4⁺CD25⁺/CD4⁺T 细胞比例。结果发现,ACS 患者的比例最低,健康对照组最高。

2.2 血中 CD4⁺CD25⁺/CD4⁺T 细胞比例及血清 TGF-β1 浓度(表 1):ACS 组外周血 CD4⁺CD25⁺/CD4⁺T 细胞比例显著低于 SAP 组和健康对照组(P 均 < 0.01),且 SAP 组低于健康对照组($P < 0.05$)。ACS 组血清 TGF-β1 浓度明显低于 SAP 组和健康对照组(P 均 < 0.05)。SAP 组和健康对照组血清 TGF-β1 浓度比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.3 血中 CD4⁺CD25⁺/CD4⁺T 细胞比例和血清 TGF-β1 浓度相关性分析:ACS 组外周血 CD4⁺CD25⁺/CD4⁺T 细胞比例和血清 TGF-β1 浓度呈显著正相关($r = 0.585, P = 0.036$),而 SAP 组和健康对照组外周血 CD4⁺CD25⁺/CD4⁺

T 细胞比例和血清 TGF-β1 浓度间无相关性(P 均 > 0.05)。

表 1 3 组患者外周血 CD4⁺CD25⁺/CD4⁺T 细胞比例和血清 TGF-β1 浓度比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	CD4 ⁺ CD25 ⁺ / CD4 ⁺ (%)	TGF-β1 (μg/L)
健康对照组	10	15.5 ± 3.0	101.9 ± 44.7
SAP 组	11	13.2 ± 1.8 ^a	84.7 ± 24.5
ACS 组	13	8.8 ± 2.3 ^{b,d}	66.1 ± 15.4 ^{ac}

注:与健康对照组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与 SAP 组比较,^c $P < 0.05$,^d $P < 0.01$

3 讨论

AS 是一种慢性炎症性疾病,是血浆脂蛋白、细胞成分(巨噬细胞、T 细胞、内皮细胞、血管平滑肌细胞)和动脉壁细胞外基质等相互作用的结果^[1-5],免疫反应在 AS 过程中起重要作用,AS 损害了局部存在的 T 细胞和抗体,在 AS 过程中存在类似于自身免疫的过程^[6]。对 AS 模型小鼠的研究发现,CD4⁺T 细胞具有促进 AS 的作用,而 CD8⁺T 细胞对 AS 进程亦有促进作用,缺乏 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞鼠的 AS 过程明显减慢^[2]。

机体对自身抗原的免疫耐受通过中枢耐受和外周耐受来维持。前者指在中枢免疫器官中自身抗原应答淋巴细胞的克隆清除,后者指由 Tregs 控制的外周特异性抗原诱导的细胞无能或免疫忽视状态,Tregs 能够有效调节自身反应性 T 细胞,维持自身免疫耐受和防止自身

基金项目:广东省科技计划项目(2006B36007003);广东省自然科学基金资助项目(07001655)

作者单位:510080 广东广州,中山大学附属第一医院急诊科(李玉杰,陈洁,熊艳,李欣),心内科(郑东诞),普内科(梁艳冰,唐皓),肾内科(孔庆瑜)

作者简介:李玉杰(1962-),男(汉族),安徽省人,医学博士,副教授,主要研究方向为内科急危重症。

免疫性疾病的发生。在小鼠和人类的外周血和脾脏中天然存在的 CD4⁺CD25⁺Tregs 约占 CD4⁺T 细胞的 5%~10%，该细胞表达 CD45RB、CD62L、CD103、糖皮质激素诱导肿瘤坏死因子(TNF)受体(TNFR18,GITR)和细胞溶解性 T 细胞相关抗原-4 (CTLA-4)，其中 GITR 和 CTLA-4 似乎是其表面特异性分子标志，亦为其激活的重要共刺激分子，与其功能密切相关；而又头状/翅膀状螺旋转录因子(Foxp3)为 CD4⁺CD25⁺Tregs 发育和维持功能所必需的控制基因^[7]。激活的 CD4⁺CD25⁺Tregs 以抗原非特异性方式抑制 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞，这种抑制作用依赖于细胞间的直接接触和借助于其 T 细胞受体(TCR)的激活。抗原激活的 CD4⁺CD25⁺Tregs 分泌白细胞介素-10(IL-10)和 TGF-β。此对其抑制功能有重要作用，IL-10 抑制单核/巨噬细胞等分泌早期炎症因子，抑制核转录因子-κB(NF-κB)的激活和 IL-2 的产生，影响 CD4⁺效应 T 细胞的功能；TGF-β 通过对抗原呈递细胞(APC)的抑制间接抑制效应 T 细胞的增殖，通过抑制辅助性 T 细胞 2(Th2)转录激活因子 Gata-3 的表达阻止 Th2 的发育，通过抑制 Th1 的转录激活因子阻止 Th1 的发育^[8]。同时，CD4⁺CD25⁺Tregs 对 B 细胞的免疫应答具有抑制作用，其可以通过抑制 Th 细胞而抑制 B 细胞的活化和分化，以及通过对 B 细胞的直接抑制作用抑制 T 细胞依赖的 B 细胞应答^[9]。由于 Tregs 的上述特点，其不仅在维持静息状态下的外周耐受中发挥作用，而且对于抑制正在进行的免疫反应、重建自身耐受至关重要；其功能异常将引发多种免疫相关性疾病，如风湿病、肝炎、糖尿病等。有关研究证实，在 AS 局部发现了表达 Foxp3 的 T 细胞及 Foxp3 mRNA，提示 AS 过程涉及 CD4⁺CD25⁺Tregs^[4]。

研究表明，在 ACS 发生过程中，炎症反应的激活破坏了斑块稳定性，引发粥样斑块的破裂及伴随的附壁血栓形成^[3]；效应 T 细胞和炎症细胞因子有重要作用，而能够抑制效应 T 细胞功能的 CD4⁺CD25⁺Tregs 数目减少^[10-11]。本研究结果显示，ACS 组外周血 CD4⁺CD25⁺/CD4⁺T 细胞比例显著低于 SAP 组和健康对照组，且 SAP 组低于健康对照组。提示 ACS 患者外周血 CD4⁺

CD25⁺Tregs 数目减少，推测由于体内维持自身免疫稳态的细胞减少，促进了炎症的发生，导致斑块破裂和血栓形成，引起急性冠脉事件。

同时，除细胞-细胞接触抑制作用外，CD4⁺CD25⁺Tregs 亦通过细胞因子对效应 T 细胞产生抑制作用，而 IL-10 和 TGF-β 是其重要功能性细胞因子。研究证实，IL-10 具有抗 AS 作用，ACS 患者血清 IL-10 浓度降低，与 CD4⁺CD25⁺Tregs 功能有关，也可能为 Th 极化偏移的结果^[12-13]。目前，有关 ACS 和 CD4⁺CD25⁺Tregs 数目变化的研究不多，亦少有关于其和血清 TGF-β1 浓度关系的报道，尚未见有关 ACS 时 CD4⁺CD25⁺Tregs 数目改变和血清 TGF-β1 浓度变化及其相关性的探讨。本研究结果显示，ACS 患者血清 TGF-β1 浓度明显低于 SAP 组和健康对照组，而 SAP 组和健康对照组间血清 TGF-β1 浓度无明显差异；进一步分析发现，ACS 患者外周血 CD4⁺CD25⁺/CD4⁺T 细胞比例和血清 TGF-β1 浓度呈显著正相关，而在 SAP 组和健康对照组间无明显相关性，可能由于 CD4⁺CD25⁺Tregs 功能改变程度不同，继而对效应 T 细胞的抑制有差异，因而炎症引发的 AS 临床结局也不相同。结果提示，ACS 患者 CD4⁺CD25⁺Tregs 数目减少，其功能性细胞因子的水平降低，抗炎作用减弱，促进了 ACS 发病过程，引发了急性冠脉事件。

综上所述，ACS 发生过程中，CD4⁺CD25⁺Tregs 数目减少，其功能性细胞因子水平降低，通过直接细胞接触机制和细胞因子调节机制的作用减弱，对效应 T 细胞的抑制作用降低，引发了炎症反应，促进了 ACS 的发展。应该进一步研究以明确 ACS 过程中 CD4⁺CD25⁺Tregs 数目改变以及其表达的 CTLA-4 水平变化、其功能必需基因 Foxp3 变化以及相关细胞因子改变，全面了解其功能改变在 ACS 发生过程中的作用。

参考文献

[1] Libby P. Inflammation in atherosclerosis [J]. Nature, 2002, 420 (6917): 868-874.
 [2] Hansson GK. Immune mechanisms in atherosclerosis [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2001, 21 (12): 1876-1890.
 [3] Ait-Oufella H, Salomon BL, Potteaux S, et al. Natural regulatory T cells

control the development of atherosclerosis in mice [J]. Nat Med, 2006, 12 (2):178-180.
 [4] Heller EA, Liu E, Tager AM, et al. Chemokine CXCL10 promotes atherogenesis by modulating the local balance of effector and regulatory T cells [J]. Circulation, 2006, 113 (19): 2301-2312.
 [5] Fan J, Watanabe T. Inflammatory reactions in the pathogenesis of atherosclerosis [J]. J Atheroscler Thromb, 2003, 10(2): 63-71.
 [6] Hansson GK, Bene GP. Atherosclerosis and the immune system [J]. Acta Paediatr Suppl, 2004, 93(446): 63-69.
 [7] Annunziato F, Cosmi L, Liotta F, et al. Phenotype, localization and mechanism of suppression of CD4⁺CD25⁺ human thymocytes [J]. J Exp Med, 2002, 196 (3): 378-387.
 [8] Gorelik L, Flavell RA. Transforming growth factor-beta in T-cell biology [J]. Nat Rev Immunol, 2002, 2 (1): 46-53.
 [9] Fields ML, Hondowicz BD, Metzgar MH, et al. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells inhibit the maturation but not the initiation of an autoantibody response [J]. J Immunol, 2005, 175 (7): 4255-4264.
 [10] Mor A, Luboshits G, Planer D, et al. Altered status of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in patients with acute coronary syndromes [J]. Eur Heart J, 2006, 27(21): 2530-2537.
 [11] Mor A, Planer D, Luboshits G, et al. Role of naturally occurring CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in experimental atherosclerosis [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007, 27(4): 893-900.
 [12] Mallat Z, Ait-oufella H, Tedgui A. Regulatory T cell responses, potential role in the control of atherosclerosis [J]. Curr Opin Lipidol, 2005, 16 (5): 518-524.
 [13] Heeschen C, Dimmeler S, Hamm CW, et al. Serum level of the antiinflammatory cytokine interleukin-10 is an important prognostic determinant in patients with acute coronary syndromes [J]. Circulation, 2003, 107 (16): 2109-2114.
 (收稿日期: 2008-02-06
 修回日期: 2008-10-10
 (本文编辑: 李银平)