

## 系统性红斑狼疮患者外周血 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> Treg 上 PD-1 分子的表达分析

王元元<sup>1,2</sup>, 陈晓蓉<sup>1</sup>, 刘 铜<sup>2</sup>, 唐 洁<sup>3</sup>, 谢长好<sup>4</sup>

**[摘要]**目的:检测系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)患者外周血 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> Treg 及其程序性死亡受体-1(programmed death-1, PD-1)分子的表达,探讨 Treg 和 PD-1 表达在 SLE 中的意义。方法:流式细胞仪检测 SLE 患者组、正常对照组外周血 CD4<sup>+</sup> T 细胞中的 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> Treg 和 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>low</sup> T 细胞的比例,及其 PD-1 分子的表达率。结果:CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> Treg 在 SLE 患者组外周血中 CD4<sup>+</sup> T 细胞的比例(0.63 ± 0.31)% 与正常对照组(2.07 ± 0.74)% 相比明显降低( $P < 0.05$ ),该亚群细胞上 PD-1<sup>+</sup> 的百分率(24.99 ± 18.65)% 与对照组(6.97 ± 1.92)% 相比显著增高( $P < 0.05$ ); CD4<sup>+</sup> CD25<sup>low</sup> T 细胞的百分率(13.40 ± 8.47)% 及其 PD-1<sup>+</sup> 的百分率(2.70 ± 3.06)% 与正常对照组(20.16 ± 11.89)% 和(0.43 ± 0.36)% 相比,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论:外周血 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> Treg 数量下降及其 PD-1 分子表达上调可能在 SLE 中有重要意义。

**[关键词]** 红斑狼疮, 系统性; 调节性 T 细胞; 程序性死亡受体-1

[中国图书资料分类法分类号] R 593.24 [文献标识码] A

### Analysis of frequency and expression of programmed cell death-1 of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> Treg peripheral blood in systemic lupus erythematosus patients

WANG Yuan-yuan<sup>1,2</sup>, CHEN Xiao-rong<sup>1</sup>, LIU Tong<sup>2</sup>, TANG Jie<sup>3</sup>, XIE Chang-hao<sup>4</sup>

(1. Department of Histology and Embryology, Anhui Medical University, Hefei, Anhui 230032;

2. Department of Histology and Embryology, 3. Key Laboratory of Infection and Immunity in Anhui,

Bengbu Medical College, Bengbu, Anhui 233004; 4. Department of Rheumatology,

The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu, Anhui 233004, China)

**[Abstract] Objective:** To detect frequency of and programmed cell death-1 (PD-1) expression of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> Treg peripheral blood of systemic lupus erythematosus (SLE) patients and to explore their roles in immune disorder of SLE. **Methods:** Flow cytometry (FCM) was used to determine the frequencies of peripheral blood CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> Treg and CD4<sup>+</sup> CD25<sup>low</sup> T cells and the PD-1 expression on these cells in SLE patients and healthy normal controls. **Results:** The frequency of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> Treg among CD4<sup>+</sup> Treg in peripheral blood of SLE patients group (0.63 ± 0.31)% decreased significantly ( $P < 0.01$ ), compared with normal control group (2.07 ± 0.74)%. The PD-1 expression on CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> Treg in SLE group (24.99 ± 18.65)% was obviously higher than that in normal control groups (6.97 ± 1.92)% ( $P < 0.05$ ). There were also no significant differences in both the frequency of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>low</sup> T cells and the PD-1 expression on these subset cells among two groups ( $P < 0.05$ ). **Conclusions:** Decreased number of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> Treg and upregulated expression of PD-1 on these Treg may play an important role in the pathogenesis of SLE.

**[Key words]** lupus erythematosus, systemic; regulatory T cell; programmed death-1

系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)是一种常见的自身免疫性疾病。目前,对 SLE 的发病机制尚未完全了解,广泛认为机体对自身抗原的免疫耐受缺失,导致了自身反应性淋巴细胞大

量活化和增殖,自身抗体大量产生和炎性介质大量释放,最终摧毁多个靶器官<sup>[1]</sup>。其中,免疫调节异常是其疾病发生发展的重要因素。具有免疫抑制性调节作用的调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg)在自身免疫性疾病中的作用成为近 10 年来关注的热点之一<sup>[2]</sup>。CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T 细胞是目前研究较多的 T 细胞亚型,其细胞表面表达多种分子标志,其中最具有特征性的是组成性表达 CD25。CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T 细胞可分为 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> Treg 和 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>low</sup> T 细胞,具有免疫抑制活性的是前者<sup>[3]</sup>。目前通常将 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> Treg 作为人类 T 细胞的检测指标。已有学者研究了 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T 细胞在 SLE 患者外周

[收稿日期] 2011-07-20

[基金项目] 安徽省卫生厅青年基金资助项目(09B108)

[作者单位] 1. 安徽医科大学 组织学与胚胎学教研室,安徽 合肥 230032; 2. 蚌埠医学院 组织学与胚胎学教研室,安徽 蚌埠 233030; 3. 感染与免疫安徽省重点实验室,安徽 蚌埠 233030; 4. 蚌埠医学院第一附属医院 风湿免疫科,安徽 蚌埠 233004

[作者简介] 王元元(1979-),女,讲师。

[通讯作者] 陈晓蓉,硕士研究生导师,教授。

血中数量的变化,例如 Liu 等<sup>[4]</sup>研究发现 SLE 患者外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞及 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Treg 数量均较正常人显著降低,提示可能与 SLE 免疫抑制功能异常相关。程序性死亡受体-1 (programmed death-1, PD-1) 是负性刺激分子,通过与其配体 PD-L 结合,传递负性协同刺激信号,抑制 T、B 淋巴细胞的增殖活化。本实验拟通过流式细胞仪检测 SLE 患者外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Treg 的数量和其 PD-1 分子的表达率,分析 SLE 患者外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Treg 是否存在数量变化和功能障碍。

## 1 资料与方法

1.1 一般资料 SLE 患者 32 例,均为蚌埠医学院第一附属医院风湿免疫科 2010 年 7 月至 2011 年 6 月住院患者,临床诊断符合美国风湿病学会 (ARA) 1997 年修订的诊断标准,其中男 6 例,女 26 例;年龄 13~47 岁。初诊 26 例,复诊 6 例。入院检测前 30 d 均未接受过免疫抑制剂和糖皮质激素的治疗。正常对照组 28 名,均为健康志愿者,男 8 名,女 20 名;年龄 18~35 岁。2 组性别、年龄具可比性。

1.2 仪器与试剂 流式细胞仪 FACSCalibur 为美国 Becton Dickinson 公司产品,CellQuest 软件获取实验数据,CellQuest 和 WinMDI2.9 软件分析数据。anti-humanCD4-PeCy5.5、anti-humanCD25-PE、anti-humanPD1-APC、MouseIgG1-PE、MouseIgG1-APC 荧光抗体均购自 eBioscience 公司。

1.3 方法 采集受试者清晨空腹状态下外周静脉血 2 ml,EDTA-K2 抗凝,血标本在 6 h 内上流式机检测。取流式试管 7 支,试管 1 中未加入抗体,为空白对照;试管 2、3、4 调荧光通道补偿用;试管 5 为同型对照,加入荧光抗体抗 anti-humanCD4-PeCy5.5 2  $\mu$ l, MouseIgG1-PE 2  $\mu$ l; 试管 6 anti-humanCD4-PeCy5.5 2  $\mu$ l, anti-human-CD25-PE 2  $\mu$ l, MouseIgG1-APC 2  $\mu$ l; 试管 7 anti-humanCD4-PeCy5.5 2  $\mu$ l, anti-humanCD25-PE 2  $\mu$ l, anti-humanPD1-APC 2  $\mu$ l。血标本 50  $\mu$ l 分别加入到上述 7 支流式管中,将血液与荧光抗体充分混匀,室温避光放置 15 min; 加入 BD 溶血剂每管 1 ml,充分震荡混匀,室温避光放置 10 min,使红细胞充分裂解;室温离心,1 500 r/min  $\times$  5 min,倒弃上清液;加入染色缓冲液 (SB) 每管 1 ml,洗涤,再次室温离心,1 500 r/min  $\times$  5 min,倒弃上清液;加入 1% 多聚甲醛 (PFA) 固定液每管 300  $\mu$ l,上流式机检测。对流式检测数据分析时,先作散点图,以 FSC 为 X 轴,SSC 为 Y 轴,对淋巴细胞圈门 R1; 然后作荧光参数散点图,anti-human CD4-

PeCy5.5 为 X 轴,Mouse IgG1-PE 或 anti-human-CD25-PE 为 Y 轴 (G1 = R1),其中 Mouse IgG1-PE 为同型对照,获得 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞群,CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Treg 圈门 R2,CD4<sup>+</sup>CD25<sup>low</sup>Treg 圈门 R3; MouseIgG1-APC 或 anti-humanPD1-APC 为横坐标, G2 = R2  $\times$  R1 和 G3 = R3  $\times$  R1, Mouse IgG1-APC 为同型对照,分别作直方图。

1.4 统计学方法 采用  $t(t')$  检验。

## 2 结果

2.1 SLE 患者外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Treg 和 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>low</sup>Treg 及其 PD-1 的表达 SLE 患者外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Treg 和 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>low</sup>Treg 在 CD4<sup>+</sup>T 细胞中均低于正常对照组,差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); SLE 患者外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>和 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>low</sup>PD-1<sup>+</sup>细胞的比例均高于正常对照组,差异亦有统计学意义 ( $P < 0.05$ ) (见表 1、图 1)

表 1 SLE 患者和正常组外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Treg 和 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>low</sup>T 细胞及其 PD-1 的表达 (%)

n	CD4 <sup>+</sup> T 细胞		PD-1 <sup>+</sup> 细胞		
	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>low</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>low</sup>	
SLE 患者组	30	0.63 $\pm$ 0.31	13.40 $\pm$ 8.47	24.99 $\pm$ 18.65	2.70 $\pm$ 3.06
正常对照组	28	2.07 $\pm$ 0.74	20.16 $\pm$ 11.89	6.97 $\pm$ 1.92	0.43 $\pm$ 0.36
<i>t</i>	—	9.54*	2.51	5.26*	4.03*
<i>P</i>	—	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

\* 为  $t'$  值

## 3 讨论

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞具有免疫无能性和免疫抑制性两大功能特性,其免疫无能性表现为在对高浓度 IL-2 的单独刺激及抗 CD3 单抗的联合作用均呈无应答状态,也不分泌 IL-2; 免疫抑制性表现在经 TCR 介导的信号刺激活化以后能够抑制 CD4<sup>+</sup>和 CD8<sup>+</sup>T 细胞的活化和增殖,这种作用是非抗原特异性的,并且这种免疫抑制性不具有主要组织相容性复合物限制性,能够抑制同型或同种异型 T 细胞的增殖。CD25 对于 T 细胞的生存是必不可少的,但由于活化的 T 也表达 CD25,因而仅依据 CD25 就将 T 细胞与活化的 T 细胞效应或记忆细胞区分开有很大困难<sup>[5]</sup>。可将 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞分为 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Treg 和 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>low</sup>T 细胞,具有免疫抑制活性的是前者。Baecher-Allan 等<sup>[6]</sup>认为 CD25<sup>high</sup>T 细胞才是人类 Treg。CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞作为一类调节性细胞,在抑制自身反应性细胞增殖、维持免疫环境稳定方面起着重要作用,CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞数

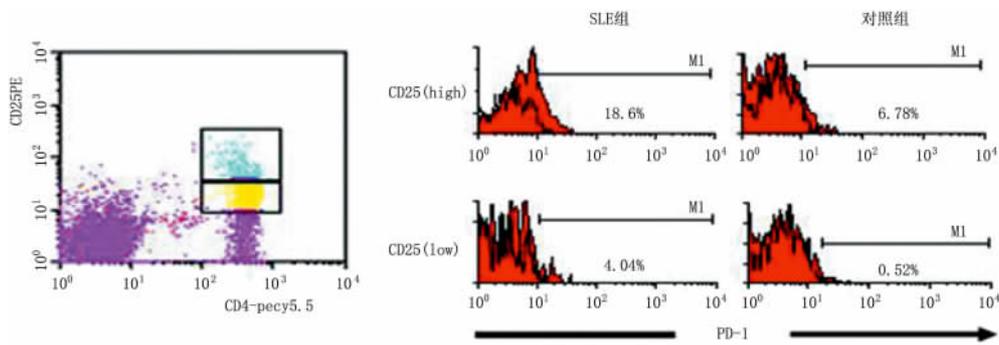


图1 SLE患者外周血CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Treg细胞和CD4<sup>+</sup>CD25<sup>low</sup>T细胞及其PD-1的表达

量减少,抑制功能受损和(或)表面分子表达缺陷,都可能自身免疫病的发生、发展。

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T细胞在SLE发病机制中的作用受到越来越多的重视。Wu等<sup>[7]</sup>研究发现狼疮鼠NZB×NZWF1的CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T细胞百分率持续低于与之性别、年龄相匹配的非自身免疫鼠。赵书山等<sup>[8]</sup>和牛倩等<sup>[9]</sup>均研究发现SLE患者外周血CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Treg百分率较正常对照组低(前者 $P < 0.01$ ,后者 $P < 0.05$ )。杨旭燕等<sup>[10]</sup>研究发现SLE患者外周血CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T细胞百分率明显减少,而且活动期比稳定期减少更明显。我们的研究也发现,SLE患者外周血CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Treg明显低于正常对照组,这些研究均说明SLE患者由于CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T细胞数量减少导致其抑制效应T细胞和记忆细胞的活化增殖作用下降,可能在SLE发病机制中起着重要作用。结合本研究,我们可以进一步推测,CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Treg而非CD4<sup>+</sup>CD25<sup>low</sup>T细胞数量减少参与SLE的发病机制。

PD-1/PD-L1信号所产生的抑制功能是通过使细胞周期停滞于G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期所致,而非引起细胞凋亡。近年来研究<sup>[11]</sup>发现,PD-1在CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T细胞上也有表达,有学者<sup>[12]</sup>研究PD-1对CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>T细胞的作用时,发现PD-1-PD-L1通路负性Treg的数量增殖和免疫抑制功能,其机制为该通路抑制了T细胞的信号转导及转录激活因子的磷酸化,从而阻断IL-2的作用。在本研究中,SLE患者外周血CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Treg的PD-1<sup>+</sup>的百分率明显高于正常对照组。我们推测SLE患者由于CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T细胞上其PD-1表达异常,一方面抑制了T细胞的正常增殖,也体现了CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Treg的数量减少;另一方面抑制了CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T细胞的免疫抑制功能。由于CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Treg数量及功能降低,从而对效应性T细胞的抑制能力不足,进而增强效应T细胞活性,诱导机体发生免疫平衡紊乱,增加免疫病理损伤,导致疾病的发生发展。综上所

述,CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Treg数量下降及其表达PD-1分子上调导致进一步降低Treg的免疫抑制活性,可能在SLE发病机制中起了重要作用。

#### [参考文献]

- [1] 杨华夏,张烜,张文,等.调节性T细胞与系统性红斑狼疮[J].中华临床免疫和变态反应杂志,2009,3(2):133-138.
- [2] 薛俭成,伍昌林,刘仿.调节性T细胞及Foxp3基因在特发性血小板减少性紫癜患儿免疫失调中的作用[J].中华儿科杂志,2007,45(8):631-632.
- [3] 郎涛,吴广胜.CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性T细胞与自身免疫性疾病[J].医学综述,2008,15(19):2887-2890.
- [4] Liu MF,Wang CR,Fung LL,et al. Decreased CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T cells in peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus[J].Scand J Immunol,2004,59(2):198-202.
- [5] Pillai V,Karandikar NJ. Human regulatory T cells: a unique, stable thymic subset or a reversible peripheral state of differentiation? [J].Immunol Lett,2007,114(1):9-15.
- [6] Baecher-Allan C,Brown JA,Freeman GJ,et al. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>regulatory cells in human peripheral blood[J].J Immunol,2001,167(3):1245-1253.
- [7] Wu HY,Staines NA. A deficiency of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T cells permits the development of spontaneous lupus-like disease in mice, and can be reversed by induction of mucosal tolerance to histone peptide autoantigen [J].Lupus,2004,13(3):192-200.
- [8] 赵书山,楼晓佳,胡建文,等.系统性红斑狼疮患者外周血CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup>-T细胞的表达及其意义[J].中华临床免疫和变态反应杂志,2008,2(4):272-277.
- [9] 牛倩,黄卓春,蔡蓓,等.类风湿性关节炎患者外周血Th17/Treg细胞比率失衡的研究[J].细胞与分子免疫学杂志,2010,26(3):267-269,272.
- [10] 杨旭燕,许东航,王巧宏.外周血CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T细胞表达在系统性红斑狼疮患者中的意义[J].中华内科杂志,2005,44(8):570-572.
- [11] Puccetti P,Grohmann U. IDO and regulatory T cells: a role for reverse signalling and non-canonical NF-kappaB activation [J].Nat Rev Immunol,2007,7(10):817-823.
- [12] Franceschini D,Paroli M,Francavilla V,et al. PD-L1 negatively regulates CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Tregs by limiting STAT-5 phosphorylation in patients chronically infected with HCV [J].J Clin Invest,2009,119(3):551-564.

( 本文编辑 姚仁斌)