

·临床核医学·

CD4⁺CD25⁺CD127⁻ 调节性 T 细胞在 Graves 病中的变化及临床意义

邹劲涛 余佩玲 董经纬 廖启洪 刘东亮 曾鸿毅

【摘要】 目的 通过观察 Graves 病患者外周血中 CD4⁺CD25⁺CD127⁻ 调节性 T 细胞(Treg)数量的变化,探讨 Graves 病发生的免疫学机制。**方法** 采用流式细胞术检测 90 例 Graves 病患者和 50 名正常人外周血中 CD4⁺CD25⁺CD127⁻Treg 的比例,同时测定甲状腺功能指标及甲状腺自身抗体水平。采用 *t* 检验进行组间比较,采用线性相关分析法分析 CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Treg 与甲状腺功能指标的关系。**结果** 90 例 Graves 病患者与 50 名正常人外周血中 CD4⁺CD25⁺CD127⁻Treg 的比例分别为 1.39%±1.09%和 4.59%±1.14%,两者间差异有统计学意义 (*t*=16.4, *P*<0.01)。CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Treg 数量与促甲状腺激素受体抗体水平呈负相关 (*r*=-0.24, *P*<0.05),与总三碘甲状腺原氨酸、总甲状腺素、游离三碘甲状腺原氨酸、游离甲状腺素、甲状腺球蛋白抗体、甲状腺微粒体抗体水平呈负相关 (*r*=-0.62、-0.65、-0.56、-0.71、-0.50、-0.15, *P*均<0.01)。**结论** Graves 病患者 CD4⁺CD25⁺CD127⁻Treg 数量减少,且 CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Treg 数量与甲状腺功能指标及甲状腺自身抗体水平关系密切,提示 CD4⁺CD25⁺CD127⁻Treg 数量减少可能与 Graves 病的发病有关。CD4⁺CD25⁺CD127⁻可能是人 CD4⁺ T 细胞中 Treg 的特异性标志物。

【关键词】 格雷夫斯病; T 淋巴细胞,调节性; 抗原, CD4; 抗原, CD25; 抗原, CD127

Changes and clinical significance of CD4⁺CD25⁺CD127⁻ regulatory T cells in Graves disease ZOU

Jin-tao*, YU Pei-ling, DONG Jing-wei, LIAO Qi-hong, LIU Dong-liang, ZENG Hong-yi. *Department of Nuclear Medicine, Liuzhou People's Hospital, Liuzhou 545006, China

Corresponding author: ZOU Jin-tao, Email: zoujint@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the mechanism of Graves disease by observing the changes of CD4⁺CD25⁺CD127⁻ regulatory T cells (Treg) population in the patients. **Methods** Flow cytometry was used to detect the proportion of CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Treg of CD4⁺ T cells in 90 Graves disease patients (Graves disease group) and 50 healthy adults (control group). Thyroid function and autoantibody levels were determined simultaneously. The *t* test was adopted for comparison between groups. The relationship between CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Treg and thyroid function was analyzed by linear correlation analysis. **Results** The percentages of CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Treg in Graves disease group and control group were 1.39%±1.09% and 4.59%±1.14% separately. There was significant difference between the two groups (*t*=16.4, *P*<0.01). There were negative correlation between CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Treg percentages and total triiodothyronine, total thyroxine, free triiodothyronine, free thyroxine and thyrotropin receptor antibody, thyroglobulin antibody, thyroid microsomal antibody (*r*=-0.62, -0.65, -0.56, -0.71, -0.50, -0.15, all *P*<0.01). **Conclusions** The reduction of CD4⁺CD25⁺CD127⁻Treg percentages in Graves disease group and close relations of CD4⁺CD25⁺CD127⁻Treg with thyroid function and thyroid autoantibody levels suggest that CD4⁺CD25⁺CD127⁻Treg decrease in the number may be associated with the onset of Graves disease. CD4⁺CD25⁺CD127⁻ may be the specific marker of Treg.

【Key words】 Graves disease; T-lymphocytes, regulatory; Antigens, CD4; Antigens, CD25; Antigens, CD127

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2012.06.010

基金项目: 广西卫生厅立项科研项目(Z2009315); 柳州市科技局科研项目(2010030715)

作者单位: 545006, 柳州市人民医院核医学科(邹劲涛, 董经纬, 刘东亮, 曾鸿毅), 医疗保健部(余佩玲), 检验科(廖启洪)

通信作者: 邹劲涛 (Email: zoujint@126.com)

Graves 病是一种常见的内分泌疾病。由于患者血中可检查到多种自身抗体,因而被认为是一种自身免疫性疾病。什么原因导致机体对甲状腺组织抗原的耐受状态被打破? 其机制迄今仍未完全阐明。

自1995年Sakaguchi等^[1]首次报道小鼠外周循环中CD4⁺CD25⁺T细胞具有抑制多器官自身免疫性疾病功能以来,该群细胞受到了广泛关注,为了与传统免疫理论中的抑制性T细胞相区别,此类细胞被命名为“CD4⁺CD25⁺调节性T细胞(regulatory T cells, Treg)”。通常认为其在CD4⁺T细胞中所占比例下降,与多种自身免疫性疾病关系密切。但国内为数不多的有关CD4⁺CD25⁺Treg与Graves病关系的研究结果却并未显示出Graves病患者外周血中CD4⁺CD25⁺Treg的明显减少^[2-3]。研究显示,人类外周循环中也存在5%~10%的CD4⁺CD25⁺Treg,但人CD25的表达情况明显不同于小鼠:小鼠CD4⁺T细胞表面CD25的数量比较均匀一致,CD4⁺CD25⁺与CD4⁺CD25⁻T细胞分界清晰,呈相互独立的单一细胞群;而人CD4⁺CD25⁺T细胞表面CD25的表达量根据荧光强度可分为弱、中、强3个等级,目前认为仅CD25强阳性的CD4⁺T细胞(CD4⁺CD25^{high})能特异性代表人CD4⁺CD25⁺Treg^[3]。为进一步了解Treg与Graves病的关系,本研究以CD4⁺CD25⁺CD127⁻作为识别Treg的标志物,对90例Graves病患者外周血中高表达CD25、同时低表达CD127的CD4⁺Treg(CD4⁺CD25⁺CD127⁻Treg)进行检测,以探讨Graves病中Treg的变化。

1 资料与方法

1.1 一般资料

Graves病组: Graves病患者共90例,其中,男性33例、女性57例。纳入标准: 选取经我院门诊确诊为Graves病初发或复发未经治疗的患者,年龄为17~49岁,诊断依据为人民卫生出版社第7版《内科学》关于Graves病的诊断标准^[4]。排除标准: 凡伴急慢性感染、肿瘤、器官移植术后、严重器质性疾病及妊娠且无其他自身免疫性疾病及家族史者均予排除。

正常对照组: 选取我院健康体检者50名,其中,男性22名、女性28名,年龄17~49岁。体检者需各项常规检查指标正常,无甲状腺疾病和其他自身免疫性疾病及家族史,无肿瘤、器官移植术后、严重器质性疾病及妊娠。

两组受检者的性别、年龄差异无统计学意义。

1.2 仪器和试剂

多甲藻叶绿素蛋白荧光标记的CD4⁺抗体,异

硫氰酸荧光标记的鼠抗人免疫球蛋白G1,藻红蛋白荧光标记的大鼠免疫球蛋白G1,异硫氰酸荧光标记的CD25⁺抗体,藻红蛋白荧光标记的鼠抗人CD127抗体,红细胞裂解液,鞘液, FACSCalibur型流式细胞仪均购自美国Becton Dickinson公司;促甲状腺激素受体抗体(thyrotropin receptor antibody, TRAb)由天津市协和医药科技有限公司生产;XH-6020型 γ 免疫计数器由西安核仪器厂(国营二六二厂)生产。

1.3 方法

外周血CD4⁺CD25⁺CD127⁻Treg检测: 用乙二胺四乙酸抗凝管抽取3 ml外周静脉血,取50 μ l全血加入多甲藻叶绿素蛋白荧光标记的CD4⁺抗体5 μ l、异硫氰酸荧光标记的鼠抗人免疫球蛋白G1抗体2.5 μ l、藻红蛋白荧光标记的大鼠免疫球蛋白G1抗体2.5 μ l作为对照管;另取50 μ l全血加入多甲藻叶绿素蛋白荧光标记的CD4⁺抗体5 μ l、异硫氰酸荧光标记的CD25⁺抗体2.5 μ l、藻红蛋白荧光标记的鼠抗人CD127抗体2.5 μ l作为测量管;两管分别常温避光孵育15~20 min,加入红细胞裂解液1 ml,避光放置5 min后,以20 cm为离心半径,1500 r/min离心6 min,弃上清液并加入鞘液2 ml,洗涤、混匀,以20 cm为离心半径,1500 r/min离心6 min后弃上清液,再次加入鞘液500 μ l。用流式细胞仪Treg模板检测其表达情况。

采用化学发光法测定外周血中总三碘甲状腺原氨酸(total triiodothyronine, TT₃)、总甲状腺素(total thyroxine, TT₄)、游离三碘甲状腺原氨酸(free triiodothyronine, FT₃)、游离甲状腺素(free thyroxine, FT₄)的水平;采用放射免疫分析法检测外周血中促甲状腺激素受体抗体(thyrotropin receptor antibody, TRAb)、甲状腺球蛋白抗体(thyroglobulin antibody, TGAb)、甲状腺微粒体抗体(thyroid microsomal antibody, TMAb)的水平。

1.4 统计学方法

使用SPSS13.0软件进行统计学分析。连续变量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用独立样本 t 检验进行组间差异比较,对非正态分布数据采用对数转换为正态分布后进行分析。TRAb水平为开放性数据,且分布偏倚,故未进行均数比较。将CD4⁺CD25⁺CD127⁻Treg与TRAb、非正态分布数据进行Spearman等级相关分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Treg 数量及甲状腺功能检测结果

Graves 病组外周血中 TT₃、TT₄、FT₃、FT₄、TGAb、TMAb 水平均高于正常对照组, 外周血中 CD4⁺CD25⁺CD127⁻Treg 数量较正常对照组明显降低 [(1.39%±1.09%) vs. (4.59%±1.14%)], 差异有统计学意义 ($t=16.4$, $P<0.01$) (表 1)。

2.2 CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Treg 数量与 TRAb 及甲状腺功能的相关性分析

Graves 病组 CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Treg 数量与 TRAb 水平呈负相关 ($r=-0.24$, $P<0.05$), 与 TT₃、TT₄、FT₃、FT₄、TGAB、TMAB 水平呈负相关 ($r=-0.62$ 、 -0.65 、 -0.56 、 -0.71 、 -0.50 、 -0.15 , P 均 <0.01), 与年龄无相关性 ($r=-0.15$, $P>0.05$)。

3 讨论

正常机体对自身抗原的免疫耐受是一个极其复杂且严密的调控过程。上世纪 90 年代中期, 一种自然发生的免疫调节性细胞 CD4⁺CD25⁺Treg 被发现, 并且被认为可能对维持机体的中枢和外周免疫耐受起到重要作用, 这使得这一领域的研究取得了重要进展^[1]。

目前的观点普遍认为, CD4⁺CD25⁺Treg 具有免疫无能性和免疫抑制性两大特性^[5-6], 对 CD4⁺CD25⁺T 细胞、自然杀伤细胞、树突状细胞和单核细胞等多种免疫细胞均有抑制作用, 可以防止自身免疫现象的发生; CD4⁺CD25⁺Treg 约占外周 CD4⁺T 细胞总数的 5%~10%^[7], CD4⁺CD25⁺Treg 功能减低或数量减少可导致或加重自身抗原的高水平免疫应答。在对 Graves 病模型大鼠的研究中发现, Graves 病的发生及严重程度都与 CD4⁺CD25⁺Treg 的数量有

关^[8], 证实了 Treg 在大鼠 Graves 病发病中的作用。

但对人类 CD4⁺CD25⁺Treg 与 Graves 病关系的研究结论却并不一致, 党珊和施秉银^[9]研究发现, Graves 病患者与正常人外周血 CD4⁺CD25⁺Treg 数量的差异有统计学意义, 但差异不是很明显; 而李惠芝等^[2]和高书涛等^[3]的研究却显示, Graves 病患者与正常人外周血 CD4⁺CD25⁺Treg 数量的差异无统计学意义。

目前研究和利用人 CD4⁺CD25⁺Treg 的最大障碍是缺乏理想的特异性标志物。人 CD4⁺CD25⁺Treg 最基本的分子表达特征为持续、稳定表达 CD25, 因此, CD25 曾被认为是识别效应性和调节性 CD4⁺T 细胞亚型的主要标志物, 然而感染免疫后被活化的效应性 CD4⁺T 细胞也能表达弱至中等强度的 CD25 (CD4⁺CD25^{low}), 因此不能认为 CD25 是 CD4⁺CD25⁺Treg 的特异性标志物。后来有研究发现高表达 CD25 的 CD4⁺T 细胞 (CD4⁺CD25^{high}) 能更集中地代表人 CD4⁺CD25⁺Treg^[7], 但不包含与活化的 T 细胞重合的那一部分 CD4⁺CD25⁺Treg, 因此, CD4⁺CD25^{high}Treg 不能完全涵盖人体内的 Treg, 故也不能作为人 CD4⁺CD25⁺Treg 的理想标志物。2006 年, Seddiki 等^[10]发现, CD127 可以帮助识别 CD4⁺CD25⁺Treg 与活化的 T 细胞, CD4⁺T 细胞活化后高表达 CD127 (CD4⁺CD25⁺CD127^{high}), 而真正的 Treg 仅表达较低的 CD127 (CD4⁺CD25⁺CD127^{low})。因此, 在 CD4⁺CD25⁺的基础上联合 CD127 可以更好地识别人 CD4⁺CD25⁺Treg。

本研究采用 CD4⁺CD25⁺CD127^{low} (即 CD4⁺CD25⁺CD127⁻) 为标志物测定 Graves 病患者与正常人外周血中 Treg 数量, 结果显示 Graves 病患者 CD4⁺CD25⁺CD127⁻Treg 在 CD4⁺T 细胞中所占百分比明显低于正常人, 两组间差异有统计学意义。正常人 CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Treg 在 CD4⁺T 细胞中占 3.45%~

表 1 Graves 病组与正常对照组 CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Treg 数量及甲状腺功能检测结果比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	年龄	CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁻ Treg 数量(%)	TT ₃ (nmol/L)	TT ₄ (nmol/L)	FT ₃ (pmol/L)	FT ₄ (pmol/L)	TGAb (%)	TMAb (%)
正常对照组	90	32.78±6.46	4.59±1.14	1.62±0.25	99.55±19.83	4.56±1.66	14.30±2.22	6.61±3.16	4.47±2.69
Graves 病组	50	35.47±10.22	1.39±1.09	8.02±2.75	286.25±70.85	26.92±1.70	67.04±21.26	28.18±2.69	19.5±2.46
t 值		1.90	16.4	21.10	22.59	11.87	22.71	7.74	8.63
P 值		>0.05	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注: 表中, Treg: 调节性 T 细胞; TT₃: 总三碘甲状腺原氨酸; TT₄: 总甲状腺素; FT₃: 游离三碘甲状腺原氨酸; FT₄: 游离甲状腺素; TGAb: 甲状腺球蛋白抗体; TMAb: 甲状腺微粒体抗体。

5.73%, 此结果与相关研究结果相似^[11]。这些结果提示, CD4⁺CD25⁺CD127⁻可能是 CD4⁺T 细胞中 Treg 的特异性标志物。相关性研究结果显示, CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Treg 数量与 TT₃、TT₄、FT₃、FT₄ 及 TRAb、TMAb、TGA 水平呈负相关, 显示 CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Treg 与 Graves 病关系密切, 证实了动物实验中 CD4⁺CD25⁺改变对 Graves 病发病影响的结论, 为进一步进行 CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Treg 分离及治疗 Graves 病提供了新的思路。

综上所述, Graves 病患者 CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Treg 数量明显低于正常人, 且与甲状腺功能指标及甲状腺自身抗体水平密切相关, 提示 CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Treg 数量减少可能与 Graves 病的发病有关。CD4⁺CD25⁺CD127⁻ 可能是人 CD4⁺T 细胞中 Treg 的特异性标志物。

参 考 文 献

[1] Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, et al. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL2-receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*, 1995, 155 (3): 1151-1164.

[2] 李惠芝, 冯波, 华咏, 等. Graves 病 CD4⁺CD25⁺T 调节细胞水

平的变化. 同济大学学报: 医学版, 2009, 30(5): 54-56.

[3] 高书涛, 朱铁年, 张玉娜, 等. CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞在自身免疫性甲状腺疾病中数量和功能变化. *中国免疫学杂志*, 2011, 27(3): 269-273.

[4] 陆再英, 钟南山. 内科学. 7 版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 712-721.

[5] Shevach EM. CD4⁺CD25⁺ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol*, 2002, 2(6): 389-400.

[6] Ramsdell F, Ziegler SF. Transcription factors in autoimmunity. *Curr Opin Immunol*, 2003, 15(6): 718-724.

[7] Baecher-Allan C, Viglietta V, Hafler DA. Human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Semin Immunol*, 2004, 16(2): 89-98.

[8] Saitoh O, Nagayama Y. Regulation of Graves' hyperthyroidism with naturally occurring CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in a mouse model. *Endocrinology*, 2006, 147(5): 2417-2422.

[9] 党珊, 施秉银. Graves 病患者 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞的变化. *中华内分泌代谢杂志*, 2007, 23(3): 253-254.

[10] 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 cell. *J Exp Med*, 2006, 203(7): 1693-1700.

[11] 王会平, 翟志敏, 张爱梅, 等. CD4⁺CD25⁺CD127^{low} 识别人外周血 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞的优势. *中国免疫学杂志*, 2008, 24(12): 1059-1062.

(收稿日期: 2012-08-27)

·消息·

全国核医学技术学术交流会第二轮征文通知

由中华医学会核医学分会主办的“全国核医学技术学术交流会”定于 2013 年 5 月 10 日至 13 日在天津召开。自今年 8 月底第一轮通知下发后, 各省核医学分会、全国核医学分会各位常委与委员、技术学组各位组员都做了大量的宣传与督促工作, 有的甚至包干到单位或个人, 在大家的共同努力下, 稿件已陆续送来, 在此一并致谢。为方便起见, 本会务下发第二轮通知, 再次提醒大家征文内容与截稿时间。

1、会议征文内容: ①核医学成像方法、经验与体会; ②核医学成像的质量控制; ③核医学仪器常规质控与预防性质控; ④核医学图像计算机分析新方法; ⑤核医学体外分析技术应用经验与体会; ⑥核医学医学工程经验与体会; ⑦核医学辐射防护经验与体会; ⑧核医学药物质量控制; ⑨核医学护理经验与体会; ⑩加速器日常维护与个案分析。

2、稿件要求: 应征论文必须论点鲜明、证据充分、数据可靠、文字流畅、图表清晰, 字数控制在 3000 字以内, word 文件类型, 全文与摘要均提供。投稿时请标明主题、电子邮箱、通信地址、邮政编码、联系电话。

3、截稿时间: 2013 年 3 月 15 号

4、投稿地址与联系人: 尹大一 (Email: yindy301@sohu.com, 电话: 13501364614, 地址: 北京 301 医院核医学科, 邮编: 100853)、欧阳晓辉 (Email: oyangxh@gmail.com, 电话: 15210180063, 地址: 北京 309 医院核医学科, 邮编: 100091)、赵光宇 (Email: zhaogy@sina.com, 电话: 13611347886, 地址: 北京大学第一医院核医学科, 邮编: 100034)

本次会议授予国家继续教育项目学分 10 分, 此次会议是对核医学技术队伍的一次大检阅, 届时还要邀请知名专家开展相关继续教育讲座, 诚邀各位同仁尽早动手准备, 踊跃投稿。

中华医学会核医学分会