

· 临床研究 ·

自身免疫性疾病患者外周血 CD8⁺ 调节性 T 细胞的表达及临床意义陈莉¹, 胡宗海¹, 彭燕¹, 栗群英¹, 李继红¹, 冯苏娟^{2△}

(1. 中国人民解放军成都军区总医院检验科, 成都 610083; 2. 重庆日报报业集团医疗保健中心, 重庆 400012)

摘要:目的 研究自身免疫性疾病(AID)患者外周血 CD8⁺ 调节性 T 细胞的表达及其临床意义。方法 对 53 例系统性红斑狼疮(SLE)患者和 55 例类风湿性关节炎(RA)患者及 38 例健康者(对照组)外周血以双抗体标记流式细胞术测定 CD8⁺ CD28⁻ 和 CD8⁺ CD28⁺ T 细胞亚群比例及 CD8⁺ CD28⁻ / CD8⁺ CD28⁺ 细胞间比值, 分析检测数据与疾病活动变化的关系。结果 SLE 患者稳定期 CD8⁺ CD28⁻ T 细胞亚群比例较活动期及对照组显著升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 活动期 CD8⁺ CD28⁺ T 细胞亚群比例较稳定期和对照组显著降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), CD8⁺ CD28⁻ / CD8⁺ CD28⁺ 细胞间比值较稳定期和对照组显著升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。SLE 活动性指数评分(SLEDAI)与 CD8⁺ CD28⁺ T 细胞亚群比例负相关 ($P = 0.001$, $r = -0.56$), 与 CD8⁺ CD28⁻ / CD8⁺ CD28⁺ 比值正相关 ($P = 0.002$, $r = 0.51$)。RA 患者稳定期 CD8⁺ CD28⁻ T 细胞较活动期和对照组增高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), CD8⁺ CD28⁺ T 细胞及 CD8⁺ CD28⁻ / CD8⁺ CD28⁺ 比值 RA 活动期和稳定期患者与对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 AID 患者存在 CD8⁺ T 细胞亚群比例的改变, 反映机体细胞免疫功能紊乱。

关键词: 自身免疫性疾病; T 淋巴细胞, 调节性; CD8⁺; 流式细胞术

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.12.016

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)12-1360-02

Expression and clinical significance of CD8⁺ regulatory T cells in peripheral blood of patients with autoimmune diseasesChen Li¹, Hu Zonghai¹, Peng Yan¹, Li Qunying¹, Li Jihong¹, Feng Sujuan^{2△}

(1. Department of Clinical Laboratory, Chengdu Military General Hospital of PLA, Chengdu, Sichuan 610083, China;

2. Medical Center of Chongqing Daily Newspaper Group, Chongqing 400012, China)

Abstract: **Objective** To explore the expression and clinical significance of CD8⁺ regulatory T cells in peripheral blood of patients with autoimmune diseases(AID). **Methods** Peripheral blood of 53 patients with systemic lupus erythematosus(SLE) and 55 patients with rheumatoid arthritis(RA) and 38 healthy control were measured by flow cytometry. The proportion and ratio of CD8⁺ CD28⁻ and CD8⁺ CD28⁺ T lymphocyte subpopulations were detected. The relativity between detection data and disease activity index was analyzed. **Results** The proportion of CD8⁺ CD28⁻ T lymphocyte subpopulation of SLE patients in stable stage compared to the active stage and the control group was increased significantly ($P < 0.05$). The proportion of CD8⁺ CD28⁺ T lymphocyte subpopulation in active stage was lower than the stable stage and the control group ($P < 0.05$). The ratio of CD8⁺ CD28⁻ / CD8⁺ CD28⁺ T lymphocyte subpopulations of patients in active stage was higher than patients in stable stage and the control group ($P < 0.05$). SLEDAI had negative relationship to the proportion of CD8⁺ CD28⁺ T lymphocyte subpopulation ($P = 0.001$, $r = -0.56$) and positive relationship to the ratio of CD8⁺ CD28⁻ / CD8⁺ CD28⁺ ($P = 0.002$, $r = 0.51$). The proportion of CD8⁺ CD28⁻ T lymphocyte subpopulation of patients with RA in stable stage was higher than the proportion of patients in active stage and the control group ($P < 0.05$). The proportion of CD8⁺ CD28⁺ T lymphocyte subpopulation and the ratio of CD8⁺ CD28⁻ / CD8⁺ CD28⁺ T lymphocyte subpopulations of patients with RA in active and stable periods compared with the control group had no statistical significance ($P > 0.05$). **Conclusion** The change of CD8⁺ T lymphocyte subpopulation of patients with AID reflects the cellular immunity function disorders of the body.

Key words: autoimmune diseases; T-lymphocytes, regulatory; CD8⁺; flow cytometry

系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)和类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是常见的自身免疫性疾病(autoimmune diseases, AID),其疾病的发生、发展与细胞免疫功能紊乱、细胞异常活化和细胞亚群的平衡失控密切相关。调节性 T 细胞与 AID 的联系在近年来得到了广泛的重视和研究,调节性 T 细胞在 AID 中的作用也得到了初步的阐明^[1-3]。本文采用双抗体标记流式细胞术检测 SLE、RA 患者外周血 CD8⁺ CD28⁻ 和 CD8⁺ CD28⁺ T 细胞亚群比例,旨在观察 AID 患者外周血 CD8⁺ 调节性 T 细胞的表达,并探讨其临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 为 2010 年 5 月至 2011 年 10 月在中国人民

解放军成都军区总医院风湿病科门诊和住院的 SLE 患者和 RA 患者。SLE 患者 53 例,其中活动期 30 例,稳定期 23 例;年龄 18~65 岁,平均 36 岁;其中,男 11 例,女 42 例。SLE 组患者均符合 1992 年美国风湿病协会(ACR)制定的 SLE 诊断标准,SLE 病情活动程度的评价参照中华医学会风湿病学分会 SLE 诊治指南(草案)^[4]中 SLE 活动性指数评分(SLE-DAI)。RA 组患者 55 例,其中活动期 31 例,稳定期 24 例;年龄 20~68 岁,平均 36.4 岁;其中,男 19 例,女 36 例。RA 患者均符合 1987 年美国风湿病协会(ACR)修订的 RA 诊断标准^[5]。对照组选择 38 例性别、年龄与上述 2 组基本匹配的体检健康者。

作者简介:陈莉(1961~),副主任技师,本科,主要从事临床免疫和自身免疫性疾病的研究。△ 通讯作者, Tel:15213156668; E-mail: sujuan616263@sina.cn。

表 1 SLE 患者外周血 CD8⁺ CD28⁻、CD8⁺ CD28⁺ T 细胞测定结果(%, $\bar{x}\pm s$)

组别	n	CD8 ⁺	CD8 ⁺ CD28 ⁻	CD8 ⁺ CD28 ⁺	CD8 ⁺ CD28 ⁻ /CD8 ⁺ CD28 ⁺
对照组	38	28.25±3.68	25.28±3.26	9.18±1.28	4.13±1.73
SLE 组	53	32.56±4.26	28.20±6.37	8.16±2.53	6.32±3.51
活动期	30	25.68±3.23	21.52±4.25 ^b	4.23±1.32 ^{ab}	12.56±5.63 ^{ab}
稳定期	23	35.82±5.35 ^a	32.03±8.58 ^a	10.35±3.06	5.21±3.12

^a: $P<0.05$,与对照组比较;^b: $P<0.05$,与稳定期组比较。

表 2 RA 患者外周血 CD8⁺ CD28⁻、CD8⁺ CD28⁺ T 细胞测定结果(%, $\bar{x}\pm s$)

组别	n	CD8 ⁺	CD8 ⁺ CD28 ⁻	CD8 ⁺ CD28 ⁺	CD8 ⁺ CD28 ⁻ /CD8 ⁺ CD28 ⁺
对照组	38	28.25±3.68	25.28±3.26	9.18±1.28	4.13±1.73
RA 组	55	30.19±4.68	27.60±4.15	9.35±3.53	5.26±2.21
活动期	31	26.63±3.75 ^b	24.26±3.19 ^b	8.42±2.18	5.35±2.40
稳定期	24	36.28±5.31 ^a	30.84±5.32 ^a	10.51±3.26	6.43±3.25

^a: $P<0.05$,与对照组比较;^b: $P<0.05$,与稳定期组比较。

1.2 方法

1.2.1 主要仪器与试剂 流式细胞仪采用美国 Beckman Coulter 公司生产 EPICS-XL4 型流式细胞仪。鼠抗人 CD8-PE/CD28⁻ FITC 及同型对照的羊抗鼠 IgG γ 1 γ 2-FITC /PE 单克隆抗体,均为美国 B-D 公司产品。

1.2.2 检测方法 受试者清晨空腹采取静脉血 2 mL,EDTA-Na₂ 抗凝。取 2 支专用试管,每管加入抗凝血 100 μ L 后,分别加入 CD28⁻ FITC/CD8-PE 单克隆抗体及同型对照羊抗鼠 IgG γ 1 γ 2-FITC/PE 单克隆抗体 20 μ L。室温避光放置 30 min 后加入溶血剂 2.0 mL,15 min 后采用 1 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,加入磷酸盐缓冲液(PBS)2 mL,待上机。根据前向散射光和侧向散射光以淋巴细胞群设门,然后分别检测淋巴细胞 CD8⁺、CD8⁺CD28⁻ 及 CD8⁺CD28⁺ 细胞群的比例,用流式细胞仪软件获取和分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行统计分析,计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,成组资料比较采用 *t* 检验,配对资料比较采用配对 *t* 检验,相关分析采用 Spearman 法,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 SLE 患者 CD8⁺ CD28⁻、CD8⁺CD28⁺ T 细胞与对照组比较 SLE 稳定期组 CD8⁺CD28⁻ T 细胞较 SLE 活动期组和对照组显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$);SLE 活动期组 CD8⁺ CD28⁺ T 细胞较对照组和稳定期组显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$),CD8⁺ CD28⁻/CD8⁺ CD28⁺ 比值较对照组和稳定期组升高,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1。

2.2 SLE 患者 SLEDAI 积分与 CD8⁺CD28⁻、CD8⁺CD28⁺ T 细胞相关性分析 SLEDAI 积分与 CD8⁺CD28⁺ 及 CD8⁺CD28⁻/CD8⁺CD28⁺ 比值存在相关性($P=0.001,r=-0.56$; $P=0.002,r=0.51$),与其他细胞比例之间无相关性。

2.3 RA 患者 CD8⁺ CD28⁻、CD8⁺CD28⁺ T 细胞与对照组比较 RA 稳定期患者外周血 CD8⁺CD28⁻ T 细胞较活动期和对照组增高,差异有统计学意义($P<0.05$);CD8⁺CD28⁺ T 细胞及 CD8⁺ CD28⁻/CD8⁺ CD28⁺ 比值 RA 活动期和稳定期患者与对照组比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见表 2。

3 讨 论

CD8⁺ 调节性 T 细胞在维持机体免疫功能稳定中发挥着

重要作用,研究表明抑制性 T 淋巴细胞的数量及功能改变在自身免疫性疾病的发病过程中具有一定作用^[6-8]。近年来研究发现,SLE 及 RA 等免疫性疾病患者的外周血淋巴细胞表面分子及调节性 T 细胞等表达异常^[9-11]。

本研究将 CD8⁺ CD28⁻、CD8⁺ CD28⁺ 与 RA 疾病的活动性进行分析,结果显示 RA 稳定期外周血 CD8⁺ CD28⁻ T 细胞较活动期和对照组增高,差异有统计学意义($P<0.05$);CD8⁺ CD28⁺ T 细胞及 CD8⁺ CD28⁻/CD8⁺CD28⁺ 比值 RA 活动期和稳定期与对照组,差异无统计学意义($P>0.05$)。结果表明 RA 患者体内的这两种调节性 T 细胞的表达与 RA 的活动性相关,研究 CD8⁺ CD28⁻、CD8⁺ CD28⁺ 调节性 T 细胞的改变,有助于对 RA 发病机制的研究。CD8⁺ CD28⁻、CD8⁺ CD28⁺ 在 RA 疾病的发生、发展中的具体作用机理还有待深入探讨。

本文对 SLE 患者外周血 CD8⁺ CD28⁻、CD8⁺ CD28⁺ T 细胞检测结果分析表明,SLE 活动期外周血 CD8⁺ CD28⁻、CD8⁺ CD28⁺ T 细胞均较对照组和稳定期显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$),CD8⁺ CD28⁺ T 细胞降低,导致 CD8⁺ CD28⁻/CD8⁺ CD28⁺ 比值较对照组和稳定期显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。提示 SLE 患者体内 CD8⁺ CD28⁻ T 细胞群与疾病的控制、缓解及转归相关。研究发现患者经过治疗后 CD8⁺ 及 CD8⁺CD28⁻ 细胞的比例均明显高于该患者疾病活动期,提示激素治疗可促进 CD8⁺ 调节性 T 细胞数量的恢复^[12-13]。由此推测,SLE 稳定期 CD8⁺ CD28⁻ T 细胞群的升高,可减轻自身免疫性反应引起的免疫损伤。CD8⁺ CD28⁺ T 细胞亚群属于效应性 T 细胞亚群,主要在抗病毒感染及抗肿瘤免疫中发挥 CTL 作用,SLE 活动期免疫系统严重紊乱,伴有 CD8⁺ CD28⁺ 效应性 T 细胞功能障碍,同时还有可能是 SLE 抗感染、抗肿瘤免疫功能降低的原因之。CD8⁺ CD28⁺ T 细胞比例稳定期增高,反映了机体免疫系统紊乱的修复,CD8⁺ CD28⁻、CD8⁺ CD28⁺ T 细胞亚群百分比在 SLE 活动期均下降,由于 CD8⁺ CD28⁺ T 细胞亚群的下降更显著,使得 CD8⁺ CD28⁻/CD8⁺ CD28⁺ 细胞间比值在活动期或在免疫系统紊乱严重时呈现明显升高。因此,CD8⁺ CD28⁻ 和 CD8⁺ CD28⁺ T 细胞百分比、CD8⁺ CD28⁻/CD8⁺ CD28⁺ 细胞间比值可作为帮助临床判断病情的观察指标。本研究结果表明,SLE 及 RA 患者体内存在 CD8⁺ CD28⁻ 和 CD8⁺ CD28⁺ T(下转第 1364 页)

目前,有关 P38 MAPK 参与炎症反应的研究多限于体外实验,其在 ALI 的在体研究少见报道^[11-12]。曾有文献报道,用 LPS 刺激小鼠肺血管内皮细胞,5 min 后就可见到细胞内 P38 MAPK 蛋白磷酸化水平升高,10~45 min 内最为明显,而后逐渐减弱,2 h 基本恢复正常^[13]。而本实验通过免疫组化和 Western blot 检测发现,在腹腔注射 LPS 后 0.5 h 肺组织中磷酸化 P38 MAPK 的表达开始增加,2 h 达到峰值,然后逐渐下降,8 h 仍高于对照组。与肺组织的病理改变程度基本一致。提示 LPS 诱导了肺组织 P38 蛋白激酶的活化,其活化可能与 ALI 的发生和发展密切相关。但 P38 MAPK 参与 ALI 的具体作用机制以及如何通过调节 P38 活性达到防治 ALI 的目的还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Ono K, Han JH. The P38 signal transduction pathway activation and function[J]. Cell signal, 2000, 12(1): 1.
- [2] 董静, 施毅, 宋勇, 等. 特异性 P38 蛋白激酶抑制剂 SB 203580 对小鼠感染肺炎衣原体后细胞因子变化的影响[J]. 国际呼吸杂志, 2009, 29(20): 1225-1228.
- [3] Herdaar E, Brown Z. P38 MAPK signalling cascades in inflammatory disease [J]. Mol Med Today, 1999, 5(10): 439-447.
- [4] Zhan J, Liu Y, Zhang Z, et al. Effect of penehyclidine hydrochloride on expressions of MAPK in mice with CLP-induced acute lung injury[J]. Mol Biol Rep, 2011, 38(3): 1909-1914.
- [5] 张诗彤, 白文元, 马俊骥, 等. P38 丝裂原活化蛋白激酶信号转导通路在诱导 Barrett 食管发生中的作用[J]. 中华消化杂志, 2012, 32(8): 539-542.
- [6] Clark AR, Dean JL, Saklatvala J. Post-transcriptional regulation of gene expression by mitogen-activated protein kinase P38 [J]. FEBS Lett, 2003, 546(1): 37-44.

- [7] Xu A, Shi G, Liu F, et al. Caenorhabditis elegans mom-4 is required for the activation of the P38 MAPK signaling pathway in the response to Pseudomonas aeruginosa infection[J]. Protein Cell, 2013, 4(1): 53-61.
- [8] Garcia-Herrera J, Marca MC, Brot-Laroche E, et al. Protein kinases, TNF-alpha, and proteasome contribute in the inhibition of fructose intestinal transport by sepsis *in vivo* [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2008, 294(1): 155-164.
- [9] Zhang X, Liu F, Liu H, et al. Urinary trypsin inhibitor attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury by blocking the activation of p38 mitogen-activated protein kinase[J]. Inflamm Res, 2011, 60(6): 569-575.
- [10] Dong YJ, Ding CH, Gu WW, et al. Inhibitory effects of melatonin on the expression of phosphorylation p38 mitogen-activated protein kinase during acute lung injury in rats[J]. Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue, 2010, 22(7): 418-421.
- [11] 黄翠萍, 张珍祥, 徐永健. p38 蛋白激酶对大鼠肺泡巨噬细胞活化机制的调控[J]. 中国病理生理杂志, 2003, 19(5): 661-663.
- [12] Yan SR, Al-Hertani W, Byers D, et al. Lipopolysaccharide-binding protein and CD14-dependent activation of mitogen-activated protein kinase P38 by lipopolysaccharide in human neutrophils is associated with priming of respiratory burst [J]. Infect Immun, 2002, 70(8): 4068-4074.
- [13] 臧传波, 吴荣谦, 李荣, 等. 内毒素对小鼠血管内皮细胞 P38-MAPK 蛋白磷酸化的影响[J]. 中华实用医学, 2004, 6(1): 1-3.

(收稿日期: 2012-11-21 修回日期: 2013-03-15)

(上接第 1361 页)

细胞群的变化,与 SLE、RA 疾病活动性、病情进展及转归密切相关,其作用机制有待进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 梅杨, 葛锐, 潘发明, 等. 调节性 T 细胞与常见自身免疫性疾病[J]. 安徽医药, 2010, 14(3): 249-251.
- [2] 徐巍, 沈波, 陈葆国, 等. RA 患者外周血 CD8⁺CD28⁻和 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞的表达及疾病活动性指标相关性分析[J]. 放射免疫学志, 2010, 23(1): 69-72.
- [3] 沈敏宁, 苏定雷, 季晓辉. 系统性红斑狼疮患者 CD8⁺T 细胞亚群 Fas-FasL 的表达及凋亡的关系研究[J]. 现代免疫学, 2009, 29(6): 501-504.
- [4] 中华医学会风湿病学分会. 系统性红斑狼疮诊治指南(草案)[J]. 中华风湿病学杂志, 2003, 8(7): 508-513.
- [5] Muller-Ladner U, Pap T. Pathogenesis of RA: more than just immune cells[J]. J Rheumatol, 2005, 64(6): 396-401.
- [6] Najafian N, Chitnis T, Salama AD, et al. Regulatory functions of CD28⁺CD28⁻T cells in an autoimmune disease model [J]. Clin Invest, 2003, 112(7): 1037-1048.
- [7] Cassis L, Aiello S, Noris M. Natural versus adaptive regu-

- latory T cells [J]. Contrib Nephrol, 2005, 146: 121-131.
- [8] 杨中萌. CD8⁺调节性 T 细胞的生物学特性及功能[J]. 现代免疫学, 2009, 29(5): 438-440.
- [9] 杨炳华, 樊一算, 许志荣, 等. 活动期类风湿性关节炎患者外周血 CD4⁺T 细胞的表型分析[J]. 临床检验杂志, 2005, 23(6): 447-448.
- [10] 陈洁晶, 眭维国, 张岳, 等. 系统性红斑狼疮患者外周血调节性 T 细胞的表达[J]. 中国现代医学杂志, 2011, 21(5): 662-664.
- [11] 周红霞. 系统性红斑狼疮患者外周血 B 淋巴细胞中 TLR9 的表达及其临床意义[J]. 海南医学院学报, 2012, 18(11): 1560-1562.
- [12] 沈敏宁, 孙可一, 季晓辉, 等. CD8⁺调节性 T 细胞亚群在系统性红斑狼疮患者外周血中分布的初步研究[J]. 南京医科大学学报, 2006, 26(9): 745-748.
- [13] 李毓阳, 戴永江, 邓斌, 等. 复方甘草酸苷对系统性红斑狼疮患者 CD4⁺CD25⁺T 细胞的表达及损伤指数的影响[J]. 南方医科大学学报, 2011, 31(7): 1285-1286.

(收稿日期: 2012-11-08 修回日期: 2013-01-22)