

高危后循环短暂性脑缺血发作患者 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞检测及意义

杨汀¹, 樊光辉², 刁波³

(广州军区武汉总医院 1. 心血管内科, 2. 院长办公室, 3. 神经外科实验室, 湖北省武汉市 430070)

[关键词] 短暂性脑缺血发作; CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞; 自身免疫; 动脉粥样硬化

[摘要] 目的 探讨高危后循环短暂性脑缺血发作患者外周血 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞(Treg)水平及意义。方法 采用流式细胞分析法,检测 21 例高危后循环短暂性脑缺血发作患者、19 例眩晕综合征患者及 20 例健康成人外周血 Treg 占 CD4⁺ T 细胞比例。结果 高危后循环短暂性脑缺血发作组外周血 Treg/CD4⁺ T 细胞比例(5.66% ± 1.91%)显著低于眩晕综合征组(9.18% ± 2.26%)和健康成人组(9.21% ± 2.71%)。结论 高危后循环短暂性脑缺血发作患者外周血 Treg 比例下降。Treg 比例降低可能破坏了外周自身免疫耐受并参与了动脉粥样硬化的发生发展,可能是高危后循环短暂性脑缺血发作的发病机制之一。

[中图分类号] R543.5

[文献标识码] A

Significance of Change of CD4⁺ CD25⁺ Regulatory T Cells in Patients with High-risk Transient Ischemic Attack in Posterior Circulation

YANG Ting¹, FAN Guang-Hui², and DIAO Bo³

(1. Department of Cardiology, 2. Dean's Office, 3. Laboratory of Neurosurgery, Wuhan General Hospital of Guangzhou Military, Wuhan, Hubei 430070, China)

[KEY WORDS] Transient Ischemic Attack; CD4⁺ CD25⁺ Regulatory T Cell; Autoimmune; Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To explore the significance of the change of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells (Treg) in patients with high-risk transient ischemic attack (TIA) in posterior circulation. **Methods** The frequencies of Treg were detected in 21 patients with high-risk TIA in posterior circulation, 19 patients with dizziness syndrome and 20 health adults by flow cytometer. **Results** The frequencies of Treg were found to be significantly lower in patients with high-risk TIA in posterior circulation (5.66% ± 1.91%) than those of dizziness syndrome (9.18% ± 2.26%) and health adults (9.21% ± 2.71%). **Conclusions** The frequencies of Treg decrease in patients with high-risk TIA in posterior circulation. The decrease of Treg may lead to the breakdown of autoimmune tolerance and participate in the progression of atherosclerosis, which could be one of the pathogenesis of the high-risk TIA in posterior circulation.

后循环缺血的主要发病机制是动脉粥样硬化(atherosclerosis, As),导致大动脉狭窄性低灌注、血栓形成或动脉源性栓塞,发生后循环短暂性脑缺血发作(transient ischemic attack, TIA)或脑梗死。本研究选取高危后循环 TIA 患者作为实验组,眩晕综合征(dizziness syndrome, DS)患者作为无 As 对照组,体检中心健康成人作为无症状空白对照组,检测外周血调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg)/CD4⁺ T

细胞比例,探讨高危后循环 TIA 的发病是否与 Treg 调节外周自身免疫耐受功能失常致 As 发生发展有关。

1 对象与方法

1.1 研究对象

选取我院 2012 年 9 月至 2013 年 2 月住院的 40

[收稿日期] 2013-02-05

[基金项目] 2010 年度军队中医药科研专项课题(10ZY117)

[作者简介] 杨汀,硕士研究生,研究方向为中西医结合治疗心脑血管病,E-mail 为 723215743@qq.com。通讯作者樊光辉,博士,主任医师,主要研究方向为心脑血管病的基础和临床,E-mail 为 whghmfan@163.com。刁波,硕士,主管技师,主要研究方向为脑康复医学,E-mail 为 dpitao@163.com。

例患者,其中 TIA 组 21 例,为高危后循环 TIA 患者,临床诊断符合 1996 年全国脑血管病会议分类及诊断标准^[1],并且 ABCD² 评分^[2] 为 4~7 分(依据年龄、血压、临床特征、脑缺血症状持续时间、糖尿病 5 个因素对 TIA 患者评分,评分越高近期卒中风险越高),行颈动脉彩超、经颅多普勒超声检查,头颅磁共振血管成像检查,发现动脉粥样硬化斑块形成并动脉狭窄,未发现血管畸形;DS 组 19 例,为眩晕综合征患者,临床诊断耳源性、眼源性眩晕或颈椎病椎动脉型的患者,经上述检查未发现颈动脉、椎基底动脉及颅内其他各动脉粥样硬化斑块形成、动脉狭窄或畸形。对照组 20 例,为同期我院体检中心无症状健康成人。

1.2 标本收集和 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞流式检测

全部受试者均清晨空腹抗凝管采肘静脉血 2 mL,采血后 3 h 内送检。样本测试管中分别加入不同荧光素标记的 CD3 单抗、CD45 单抗、CD4 单抗和 CD25 单抗各 10 μ L;加入全血 100 μ L,含白细胞约 10⁶ 个;4 $^{\circ}$ C 避光孵育 20 min;加入红细胞裂解液 2 mL,室温避光孵育 10 min;离心,弃上清,PBS 缓冲液洗涤 1 次后上机检测。上述主要试剂均购自美国 BD 公司。应用流式细胞仪(BD FACSCalibur 型)对 CD4⁺T/CD3⁺CD45⁺T 细胞比例及 CD4⁺CD25⁺Treg/CD4⁺T 细胞比例进行检测。

1.3 统计学处理

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析,作方差齐性检验(Levene 检验),方差分析(F 检验),多个均数间的两两比较用 q 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 各组临床资料比较

TIA 组、DS 组患者及对照组健康成人的年龄、性别和 4 项血脂指标无显著性差异(表 1)。

表 1. 各组临床资料的比较

Table 1. Comparison of clinical data

项目	TIA 组($n=21$)	DS 组($n=19$)	对照组($n=20$)
年龄(岁)	61.1 \pm 9.1	56.3 \pm 10.1	53.9 \pm 8.4
男/女(例)	13/8	12/7	13/7
TC (mmol/L)	4.32 \pm 0.81	4.47 \pm 0.78	4.09 \pm 0.71
LDLC (mmol/L)	2.78 \pm 0.62	2.81 \pm 0.68	2.63 \pm 0.58
HDLC (mmol/L)	1.05 \pm 0.24	1.18 \pm 0.19	1.23 \pm 0.17
TG (mmol/L)	1.52 \pm 0.76	1.49 \pm 0.64	1.55 \pm 0.62

2.2 各组 Treg/CD4⁺T 细胞比例的比较

TIA 组患者外周血 Treg/CD4⁺T 细胞比例显著低于 DS 组和对照组。而各组间 CD4⁺T 细胞占 CD3⁺CD45⁺T 淋巴细胞比例未见明显差异(图 1、表 2)。

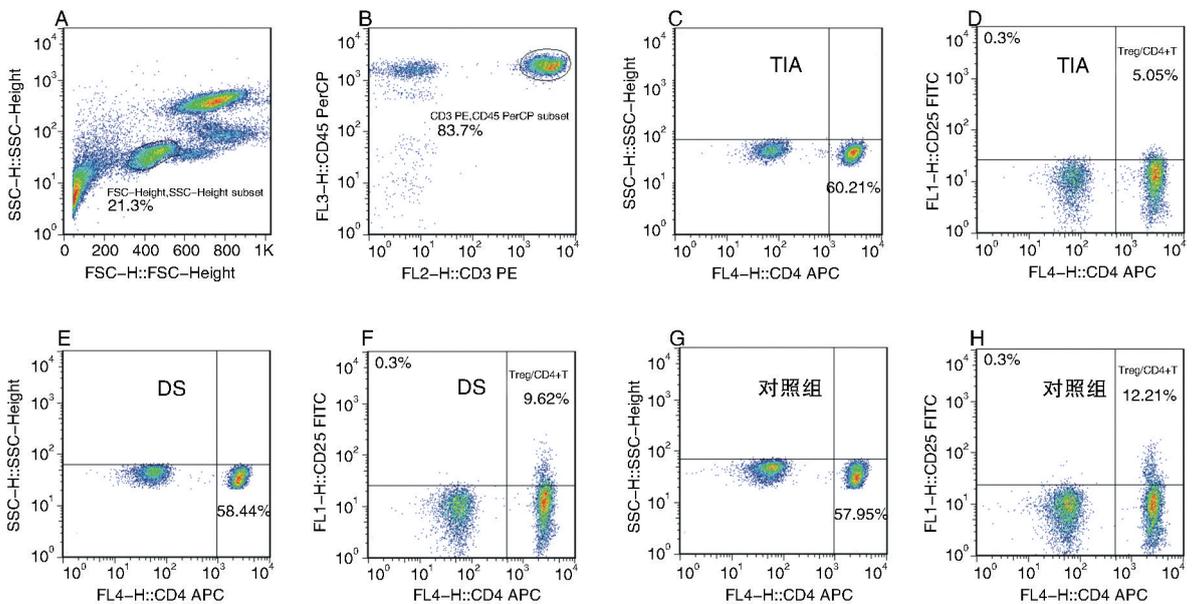


图 1. CD4⁺CD25⁺Treg 流式分析 A 为设门圈定淋巴细胞,B 为设门圈定 CD3⁺CD45⁺T 细胞;C、E、G 为 CD4⁺T/CD3⁺CD45⁺T 细胞比例,分别为 60.21%、58.44%、57.95%;D、F、H 为 Treg/CD4⁺T 细胞比例,分别为 5.05%、9.62%、12.21%。

Figure 1. CD4⁺CD25⁺Treg flow cytometry analysis

表 2. 各组细胞比例的比较

Table 2. Comparison of the proportion of cells in each group

项 目	TIA 组(<i>n</i> = 21)	DS 组(<i>n</i> = 19)	对照组(<i>n</i> = 20)
CD4 ⁺ T/CD3 ⁺ CD45 ⁺ T	63.12% ± 8.15%	61.06% ± 6.24%	56.46% ± 10.40%
Treg/CD4 ⁺ T	5.66% ± 1.91% ^{ab}	9.18% ± 2.26% ^a	9.21% ± 2.71%

a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 DS 组比较。

3 讨 论

TIA 患者近期都有继发脑卒中的危险^[3], AB-CD² 评分越高的 TIA 患者, 近期卒中风险越高, As 的发生发展在 TIA 的发生发展中起到了不可忽视的作用。Ross^[4] 早在 1999 年就提出 As 是一种炎症损伤性疾病。近期关于 As 的研究表明, As 是在高脂血症、吸烟、糖尿病、高血压等危险因素的促进下发生的一种特殊的自身免疫炎症反应^[5,6]。

正常人外周血中存在一部分细胞高表达 CD25 分子的 CD4⁺T 细胞, 即 Treg 细胞, 可以通过直接细胞接触或分泌细胞因子的方式抑制自身免疫炎症反应^[7]。Treg 细胞能抑制巨噬细胞的定向分化及炎症因子分泌, 从而对 As 病理进程有一定的抑制作用^[8], 对患者冠状动脉 As 的发生、发展起到一定的保护作用^[9], 而 Treg 细胞减少则会促进 As 的形成^[10]。

本研究中, 我们发现高危后循环 TIA 患者外周血 Treg/CD4⁺T 细胞比例显著低于眩晕综合征患者和无症状健康成人, 提示高危后循环 TIA 患者体内维持自身免疫稳态的 Treg 细胞减少, 推测高危后循环 TIA 患者机体更易于发生病理性免疫应答, 激活炎症反应, 促进粥样斑块的形成和发展。外周血 Treg 比例降低可能是高危后循环 TIA 的发病机制之一。

[参考文献]

[1] 中华神经科学会. 各类脑血管疾病诊断要点[J]. 中华神经科杂志, 1996, 29(6): 379-380.

- [2] Johnston SC, Rothwell PM, Nguyen-Huynh MN, et al. Validation and refinement of scores to predict very early stroke risk after transient ischemic attack [J]. *Lancet*, 2007, 369(9558): 283-292.
- [3] 张莉峰, 朱太卿, 王爱丽, 等. 短暂性脑缺血发作发病年限与脑梗死发生率的关系[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2011, 19(9): 770-772.
- [4] Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease [J]. *N Engl J Med*, 1999, 340(2): 115-126.
- [5] Pascal JG, Dong CM, David MS, et al. Atherosclerosis, inflammation, genetics, and stem cells: 2012 update [J]. *Current Atherosclerosis Reports*, 2012, 14(3): 201-210.
- [6] Ketelhuth DF, Hansson GK. Cellular immunity, low-density lipoprotein and atherosclerosis: break of tolerance in the artery wall [J]. *Thromb Haemost*, 2011, 106(5): 779-786.
- [7] Adi M, David P, Galia L, et al. Role of naturally occurring CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in experimental atherosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27(4): 893-900.
- [8] Lin J, Li M, Wang Z, et al. The role of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in macrophage-derived foam-cell formation [J]. *J Lipid Res*, 2010, 51(5): 1 208-217.
- [9] George J, Schwartzberg S, Medvedovsky D, et al. Regulatory T cells and IL-10 levels are reduced in patients with vulnerable coronary plaques [J]. *Atherosclerosis*, 2012, 222(2): 519-523.
- [10] 王洽校, 周建华, 毛山, 等. 负向调控调节性 T 细胞对小鼠动脉粥样硬化形成的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2011, 19(8): 627-631.

(此文编辑 曾学清)