

# 急性脑梗死患者免疫调节性 T 淋巴细胞表达与预后的关系

蒋福生, 张平, 张新华

(南华大学附属南华医院神经内科, 湖南省衡阳市 421002)

[关键词] 急性脑梗死; 调节性 T 淋巴细胞; 免疫活性; 多器官功能障碍综合征

[摘要] **目的** 探讨急性脑梗死患者外周血免疫调节性 T 淋巴细胞的表达及其与预后的关系。**方法** 急性脑梗死患者 30 例, 根据多器官功能障碍综合征诊断标准分为多器官功能障碍综合征组 ( $n=8$ ) 和非多器官功能障碍综合征组 ( $n=22$ ), 根据患者转归分为死亡组 ( $n=5$ ) 和生存组 ( $n=25$ ); 正常对照组为同期健康体检者 30 例。分别采集各组的外周静脉血, 采用免疫磁性分离系统对外周血  $CD4^+CD25^+Treg$  进行分离纯化; 采用流式细胞术检测  $CD4^+CD25^+Treg$  表面分子 T 淋巴细胞毒性相关抗原 4 (CTLA-4) 的表达; 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测  $CD4^+CD25^+Treg$  孵育液上清中白细胞介素 10 (IL-10) 的水平。**结果** 急性脑梗死组患者  $CD4^+CD25^+Treg$  表面分子 CTLA-4 表达率 ( $36.68\% \pm 7.41\%$ ) 及分泌 IL-10 水平 ( $15.38 \pm 3.79$  ng/L) 与正常对照组 ( $22.20\% \pm 7.18\%$  和  $8.96 \pm 3.28$  ng/L) 比较, 均明显升高 ( $P < 0.01$ ); 多器官功能障碍综合征组患者 CTLA-4 表达率 ( $42.10\% \pm 7.44\%$ ) 及分泌 IL-10 水平 ( $28.30 \pm 9.48$  ng/L) 显著高于非多器官功能障碍综合征组 ( $30.26\% \pm 5.60\%$  和  $17.86 \pm 6.54$  ng/L;  $P < 0.01$ ); 死亡组 CTLA-4 表达率 ( $44.45\% \pm 12.34\%$ ) 及分泌 IL-10 水平 ( $33.90 \pm 10.62$  ng/L) 显著高于生存组 ( $31.43\% \pm 10.12\%$  和  $16.08 \pm 8.67$  ng/L;  $P < 0.01$ )。**结论** 急性脑梗死患者可促进外周血  $CD4^+CD25^+Treg$  表面分子表达, 并刺激其分泌大量抑制性细胞因子发挥自身免疫作用, 从而导致机体免疫功能障碍甚至免疫紊乱的发生与发展, 且与患者的预后密切相关。

[中图分类号] R741

[文献标识码] A

## Immunological Activity Change of Regulatory T Cells and Its Relation with Outcome of Patients with Acute Cerebral Infarction

JIANG Fu-Sheng, ZHANG Ping, and ZHANG Xin-Hua

(Neurology Department of the Affiliated Nanhua Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421002, China)

[KEY WORDS] Acute Cerebral Infarction; Regulatory T-Lymphocytes; Immunocompetence; Multiple Organ Dysfunction Syndrome

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the immunological activity change of regulatory T cells (Treg) and discuss its significance in the outcomes of patients with multiple organ dysfunction syndrome (MODS) and acute cerebral infarction (ACI).

**Methods** According to the development of ACI, patients were divided into MODS group ( $n=8$ ) and non-MODS group ( $n=22$ ). The patients with ACI were further divided into non-survival group ( $n=5$ ) and survival group ( $n=25$ ) based on their outcomes. Healthy volunteers were served as normal control ( $n=30$ ). Peripheral blood samples were collected in patients with ACI and healthy volunteers. The immunomagnetic separation technique was applied to separate and purify  $CD4^+CD25^+Tregs$  in peripheral blood, and phenotypes (CTLA-4) were analyzed by flow cytometry and the contents of interleukin-10 (IL-10) released in the supernatants were determined by ELISA.

**Results** Expression of CTLA-4 and level of IL-10 were significantly increased in patients with ACI compared with normal control group. The expression of CTLA-4 and level of IL-10 in MODS group were much higher than those in non-MODS group ( $P < 0.01$ ). Among the ACI patients, the expression of CTLA-4 and level of IL-10 in the survival group were obviously lower than those in the non-survival ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ).

**Conclusion** After ischemia reperfusion injury of cerebral, expressions of the markers on  $CD4^+CD25^+Tregs$  surface and secretion of cytokines produced by  $CD4^+CD25^+Tregs$  show significant difference in patients with MODS development and survival state.  $CD4^+CD25^+Treg$  may play an important role in the pathogenesis of immunoregulation, MODS and mortality of patients with ACI through secretion of inhibitory cytokines.

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是急性脑梗死(acute cerebral infarction, ACI)的病理基础,同时免疫炎症反应也是动脉粥样硬化发生发展的核心基础。调节性T细胞(regulatory T cells, Treg)作为一类具有调节功能的成熟T淋巴细胞亚群,在维持免疫耐受和防止自身免疫性疾病发生的过程中发挥关键性的作用,CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg是目前研究较为深入的天然Treg<sup>[1,2]</sup>。研究证实,Treg可通过其表面分子T淋巴细胞毒性相关抗原4(CTLA-4)及其所分泌的白细胞介素10(interleukin-10, IL-10)等发挥免疫调节效应,包括抑制CD4<sup>+</sup>T及CD8<sup>+</sup>T细胞功能、下调树突状细胞表面共刺激分子表达和诱导淋巴细胞凋亡等<sup>[3]</sup>。那么,急性脑梗死是否参与Treg免疫效应的发挥和机体的免疫异常反应过程?为此本研究通过对30例急性脑梗死患者外周血Treg免疫活性的变化规律进行了动态检测,探讨其与急性脑梗死预后的关系及临床意义,旨在为急性脑梗死的研究提供一种新的思路。

1 对象与方法

1.1 临床资料

选择2012年6月~2013年2月南华大学附属南华医院神经内科病房收治的急性脑梗死患者30例,其中男16例,女14例,年龄54~75岁,平均64.2±9.8岁;均为首次发病,且于起病后24 h内入院;符合1995年第四届全国脑血管病学术会议修订的诊断标准<sup>[4]</sup>,并经头部CT或MRI检查证实。排除:严重肝肾疾病或恶性肿瘤;短暂性脑缺血发作、颅内出血、既往卒中史且遗留后遗症者。正常对照组为30例同期门诊体检人员,其中男15例,女15例;年龄57~74岁,平均65.6±8.4岁;排除有心脑血管意外病史者。根据多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)的诊断标准<sup>[5]</sup>,8例患者并发多器官功能障碍综合征,其中男5例,女3例,年龄56~77岁,平均66.2±10.8岁;而非多器官功能障碍综合征患者22例,其中男11例,女11例,年龄52~73岁,平均62.2±11.8岁;根据预后情况将患者分为死亡组与生存组:其中死亡组5例,男3例,女2例,年龄55~74岁,平均67.4±6.6岁;而生存组25例,男13例,女12例,年龄56~75岁,平均68.6±6.4岁。以上两组性别、年龄均具有可比性。

1.2 外周血T淋巴细胞亚群测定

采用流式细胞仪FacsCalibur测定淋巴细胞亚

群,具体操作步骤按试剂盒说明书进行。仪器及试剂盒购自美国BD公司。采用CellQuest Pro软件进行分析。

1.3 磁珠分选CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg及流式细胞仪检测Treg表面CTLA-4表达

采用MiniMACS免疫磁性分离系统(仪器购自德国Miltenyi Biotec公司)将所筛选T淋巴细胞进行分离。每10<sup>7</sup>细胞加入10 μL生物素抗体4℃孵育10 min,加入20 μL抗生物素磁珠40℃孵育15 min,离心洗涤。细胞定容至0.5 mL,经LD柱阴性选择后收集流出细胞悬液,离心洗涤弃上清获取CD4<sup>+</sup>T细胞。每10<sup>7</sup>细胞加入10 μL CD25磁珠,4℃孵育15 min。其后加入10 μL抗CD25-藻红蛋白(PE)抗体和10 μL抗CD4-FITC抗体,4℃孵育5 min,离心洗涤。经MS柱进行第2步分选,收集流出细胞悬液为CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T细胞。将分离柱移出磁场,加压洗脱,收集CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg。取原液细胞计数,离心后去上清,加入RPMI1640(购自北京天润善达公司)孵育液,细胞浓度5×10<sup>9</sup>/L。96孔孵育板中分加8孔(250 μL/孔),细胞培养箱中孵育24 h。孵育后分别将CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg及孵育液吸入流式管,离心,吸取上清,-30℃保存。用0.01 mol/L的PBS 100 μL悬浮,细胞计数5×10<sup>8</sup>/L。应用Fc阻断剂1 μL,4℃孵育15 min。加入4 μL CD152-FITC(购自美国eBioscience公司),避光孵育15 min。加入2 mL PBS洗涤1次,离心后去上清,加入0.4 mL PBS,上流式细胞仪测定。采用流式细胞仪FacsCalibur测定Treg表面CTLA-4表达和CellQuest Pro软件分析。

1.4 ELISA法检测T淋巴细胞孵育液中IL-10水平

应用ELISA检测Treg孵育液中IL-10水平,操作步骤按试剂盒(美国R&D公司产品)说明书进行。

1.5 统计学方法

使用SPSS18.0软件包,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组比较采用t检验,多组数据比较采用F检验,计数资料采用 $\chi^2$ 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 急性脑梗死患者外周血T淋巴细胞亚群的分析

急性脑梗死组CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>细胞占T淋巴细胞比例与正常对照组比差异有显著性( $P <$

0.05);CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 占 CD4<sup>+</sup>T 细胞比例与正常对照组比差异有显著性( $P<0.05$ );可见,急性脑梗死组较正常对照组 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup> 细胞比例升高,而 CD8<sup>+</sup>T 细胞、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 细胞降低;死亡组较

生存组 CD4<sup>+</sup>细胞比例升高,而 CD8<sup>+</sup>T 细胞、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 细胞降低,两者比较差异有统计学意义( $P<0.05$ )。说明免疫反应与急性脑梗死之间存在密切的关联(表 1)。

表 1. 各组 T 淋巴细胞的比较( $\bar{x}\pm s$ )  
Table 1. Comparison of T lymphocytes between four groups( $\bar{x}\pm s$ )

分 组	<i>n</i>	CD3 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Treg
正常对照组	30	47.50%±5.46%	42.40%±5.78%	53.40%±4.26%	57.52%±6.46%
急性脑梗死组	30	51.40%±6.34% <sup>a</sup>	53.68%±6.69% <sup>a</sup>	40.08%±3.02% <sup>a</sup>	50.16%±5.18% <sup>a</sup>
生存组	25	49.96%±5.68%	48.24%±5.77%	44.56%±3.68%	51.60%±5.58%
死亡组	5	51.68%±7.10%	55.12%±7.00% <sup>b</sup>	37.88%±3.57% <sup>b</sup>	44.58%±4.74% <sup>b</sup>

a 为  $P<0.05$ ,与正常对照组比较;b 为  $P<0.05$ ,与生存组比较。

2.2 急性脑梗死患者 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 表面分子 CTLA-4 表达和分泌 IL-10 水平的变化

与正常对照组比较,急性脑梗死组患者 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 表面分子 CTLA-4 表达率和分泌 IL-10 水平明显升高( $P<0.01$ ;表 2)。多器官功能障碍综合征患者 CTLA-4 表达率及分泌 IL-10 水平显著高于非多器官功能障碍综合征组( $P<0.01$ ;表 3)。死亡组患者 Treg 表面分子 CTLA-4 表达率及分泌 IL-10 水平显著高于生存组( $P<0.01$ ;表 4)。

表 2. 急性脑梗死组与正常对照组 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 表面分子 CTLA-4 表达及 IL-10 水平的比较( $\bar{x}\pm s$ )

Table 2. Comparison of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg CTLA-4 expression and the level of IL-10 between ACI group and control group( $\bar{x}\pm s$ )

分 组	<i>n</i>	CTLA-4	IL-10(ng/L)
正常对照组	30	22.20%±7.18%	8.96±3.28
急性脑梗死组	30	36.68%±7.41% <sup>a</sup>	15.38±3.79 <sup>a</sup>

a 为  $P<0.01$ ,与正常对照组比较。

表 3. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg CTLA-4 表达及 IL-10 水平与并发多器官功能障碍综合征的关系( $\bar{x}\pm s$ )

Table 3. The relation of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg CTLA-4 expression and the level of IL-10 with MODS( $\bar{x}\pm s$ )

分 组	<i>n</i>	CTLA-4	IL-10(ng/L)
非 MODS 组	22	30.26%±5.60%	17.86±6.54
MODS 组	8	42.10%±7.44% <sup>a</sup>	28.30±9.48 <sup>a</sup>

a 为  $P<0.01$ ,与非 MODS 组比较。

表 4. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg CTLA-4 表达及 IL-10 水平与预后的关系( $\bar{x}\pm s$ )

Table 4. The relation of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg CTLA-4 expression and the level of IL-10 with prognosis( $\bar{x}\pm s$ )

分 组	<i>n</i>	CTLA-4	IL-10(ng/L)
死亡组	5	44.45%±12.34% <sup>a</sup>	33.90±10.62 <sup>a</sup>
生存组	25	31.43%±10.12%	16.08±8.67

a 为  $P<0.01$ ,与生存组比较。

3 讨 论

动脉粥样硬化斑块破裂及血栓形成是导致急性脑梗死的重要原因,炎性反应和免疫反应等参与动脉粥样硬化斑块的形成及进展机制<sup>[6]</sup>。随着对急性脑梗死病理生理、病因及损伤机制新进展的深入研究,有望对缺血性脑卒中的认识和治疗提供重要的指导意义。此外,多器官功能障碍综合征是急性脑梗死独立的高危因素之一,其死亡率极高<sup>[7]</sup>。

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 细胞是一种免疫调控细胞,特异表达白细胞介素 2(IL-2)受体 α 链,调控促炎/抗炎因子和 Th1/Th2 的平衡,介导细胞的凋亡和增殖,从多个途径影响全身炎症反应综合征/代偿性抗炎反应综合征和多器官功能障碍综合征的病理生理改变<sup>[8]</sup>。进一步了解 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 在急性脑梗死中的作用及其调节机制,将有助于针对免疫功能的变化制定相应的靶点治疗和均衡机体抗炎和促炎的反应提供新思路。本资料结果显示,与正常对照组比较,急性脑梗死患者 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 表面分子 CTLA-4 表达均明显增加。同时,多器官

功能障碍综合征组 CTLA-4 表达率显著高于非多器官功能障碍综合征组,死亡组 CTLA-4 表达显著高于生存组。提示免疫反应紊乱在急性脑梗死合并多器官功能障碍综合征不仅呈现“免疫功能抑制”状态,同时还表现为“过度性炎症反应”。

而 Treg 作为免疫系统的关键调节细胞之一,调控复杂的免疫调节网络与疾病的发生发展之间的联系,一旦 T 淋巴细胞亚群的数量或质量异常时,T 淋巴细胞调节失去平衡而引起机体发病<sup>[9]</sup>。黄立峰等<sup>[10]</sup>研究显示,复制烫伤延迟复苏动物模型,观察了严重烫伤对 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 表面分子表达及细胞因子的影响。结果显示,严重烫伤可使动物脾脏 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 表面分子 CTLA-4 的表达明显增强和 IL-10 的水平明显升高,促进 Treg 成熟。胡月华等<sup>[11]</sup>研究显示,急性脑梗死患者外周血 Treg/CD4<sup>+</sup>T 细胞比例和 FOXP3 的 mRNA 水平显著低于正常人群组而 IL-10 和转化生长因子 β(TGF-β)水平低于正常人群组,表明急性脑梗死患者外周血 Treg 比例减少,对炎症反应的抑制作用减弱。本组资料结果显示,与正常对照组比较,急性脑梗死患者 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 分泌 IL-10 水平明显增加。同时,多器官功能障碍综合征组 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 分泌 IL-10 水平显著高于非多器官功能障碍综合征组,急性脑梗死患者死亡组 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 分泌 IL-10 水平显著高于生存组。表明这种抗炎细胞因子显示出与 CTLA-4 对称性的变化趋势。提示急性脑梗死可促进外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 表面分子 CTLA-4 的表达,并刺激其分泌大量抑制性细胞因子发挥自身免疫作用,从而导致机体免疫功能障碍甚至免疫紊乱的发生与发展。

综上所述,CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 表面分子及其所分泌的抑制性细胞因子与急性脑梗死患者合并多器官功能障碍综合征密切相关,并可能在多器官功能障碍综合征患者的转归中扮演着重要角色,其具体调控机制期待进一步深入的研究。

[参考文献]

[1] Karen C, Galvin, Lydia Dyck, et al. Blocking retinoic acid receptor-α enhances the efficacy of a dendritic cell vaccine against tumours by suppressing the induction of regulatory T cells [J]. Cancer Immunol Immunother, 2013, 62: 1 273-282.

[2] 韦 浩, 陈春美, 杨卫忠. 调节性 T 细胞与胶质瘤免疫研究进展[J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2011, 38(6): 605-608.

[3] 李 颖, 徐 林. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>调节性 T 细胞研究的新进展[J]. 现代免疫学, 2010, 30(6): 520-523.

[4] 脑卒中患者临床神经功能缺损程度评分标准(1995) [J]. 中华神经科杂志, 1996, 29(6): 381-383.

[5] Bone RC. Immunologic dissonance: a continuing evolution in our understanding of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and the multiple organ dysfunction syndrome (MODS) [J]. Ann Intern Med, 1996, 125 (8): 680-686.

[6] 王 超, 路 华, 杨智勇. TLR4 信号通路在脑卒中后脑损伤中的研究进展[J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2010, 37(6): 557-561.

[7] 薛 茜, 赵宝民, 邹玉安, 等. C 反应蛋白水平在老年急性脑梗死患者并发全身炎症反应综合征中的作用[J]. 中国全科医学, 2012, 28(15): 505-507.

[8] 陈 鑫, 张红艳. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞在严重烧伤等应激状态下对免疫系统的影响[J]. 重庆医学, 2012, 41(16): 1 647-649.

[9] 陈瑞清, 谭 盛, 陈 健, 等. 大鼠急性脑缺血后 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞、Foxp3 表达及其意义[J]. 南方医科大学学报, 2012, 32(5): 659-663.

[10] 黄立锋, 姚咏明, 董 宁, 等. 严重烧伤后调节性 T 细胞免疫活性变化及其与患者预后的关系[J]. 中华创伤杂志, 2010, 26(9): 785-789.

[11] 胡月华, 郑燕华, 唐 隽, 等. 颅内动脉粥样硬化性脑梗死患者外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>调节性 T 细胞检测及意义[J]. 免疫学杂志, 2011, 27(5): 420-423.

(此文编辑 许雪梅)