

腹主动脉瘤患者 CD4⁺ CD28⁻ T 淋巴细胞及 Th1 细胞因子的变化及临床意义

许文平^{1,2}, 李志樑², 邱 健¹, 谢志泉¹

(1. 广州军区广州总医院干部四科, 广东省广州市 510010; 2. 南方医科大学珠江医院心内科, 广东省广州市 510280)

[关键词] T 淋巴细胞; 炎症; 免疫; 腹主动脉瘤

[摘要] 目的 探讨 CD4⁺ CD28⁻ T 细胞及 Th1 细胞因子在大小腹主动脉瘤患者血清中的数量变化及临床意义。方法 腹主动脉瘤患者 60 例, 其中小腹主动脉瘤 30 例, 大腹主动脉瘤 30 例, 对照组 30 例, 采用流式细胞术测定 3 组受检者外周血 CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺ CD28⁻ T 亚群数量及占淋巴细胞的比例, 运用酶联免疫吸附法实验 (ELISA) 检测上述各組人群血浆中 γ 干扰素、肿瘤坏死因子 α 表达水平。结果 腹主动脉瘤组 CD4⁺ CD28⁻ T 细胞表达水平显著升高, 其中 CD4⁺ CD28⁻ T 细胞在小腹主动脉瘤组升高最为显著 ($P < 0.05$)。腹主动脉瘤患者血浆中 γ 干扰素、肿瘤坏死因子 α 表达水平也呈明显升高, 其表达水平的升高与腹主动脉瘤直径呈正相关性。结论 腹主动脉瘤患者外周血中 CD4⁺ CD28⁻ T 淋巴细胞升高, 升高的 CD4⁺ CD28⁻ T 淋巴细胞可能通过刺激和促进 γ 干扰素和肿瘤坏死因子 α 等 Th1 炎症因子的分泌, 在早期腹主动脉瘤发病机制中起着重要的激活作用, 并导致腹主动脉瘤局部慢性炎症迁延。

[中图分类号] R743.134

[文献标识码] A

Expression Change of CD4⁺ CD28⁻ T Cell and Th1 in Peripheral Blood of Patients with Abdominal Aortic Aneurysm

XU Wen-Ping^{1,2}, LI Zhi-Liang², QIU Jian¹, and XIE Zhi-Quan¹

(1. Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Command, Guangzhou, Guangdong 510010, China; 2. Zhujiang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510282, China)

[KEY WORDS] T-lymphocytes; Inflammation; Immune; Abdominal Aortic Aneurysm

[ABSTRACT] **Aim** To study the role of CD4⁺ CD28⁻ T cell and Th1 at the early phase of abdominal aortic aneurysm (AAA). **Methods** The total of 60 cases were recruited in the study, including 30 cases of small AAA and 30 cases of large AAA, 30 healthy controls. Levels of peripheral CD4⁺ CD28⁻ T cells were determined by FACS, the serum level of IFN- γ , TNF- α were measured with enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). **Result** Compared with healthy controls, the serum level of CD4⁺ CD28⁻ T cells and IFN- γ , TNF- α in AAA patients were higher than that in controls ($P < 0.05$), the expression levels of IFN- γ , TNF- α were positively correlated with the diameter of abdominal aortic. **Conclusion** Expression levels of CD4⁺ CD28⁻ T cells and IFN- γ were significantly increased in AAA patients, suggesting a potential role of CD4⁺ CD28⁻ T cells and IFN- γ on pathophysiology of AAAs, especially during the early development of AAAs.

腹主动脉瘤 (abdominal aortic aneurysm, AAA) 是一类与免疫相关的慢性炎症性疾病^[1], 但其发病机制尚不十分清楚。目前有关腹主动脉瘤发病机制中自身免疫特点的研究少见报导。为了观察腹主动脉瘤发病过程中免疫状态的变化, 以期发现其

免疫反应特点, 本研究拟通过检测大小腹主动脉瘤患者外周血中 CD4⁺ CD28⁻ T 细胞亚群的动态变化及 Th1 细胞因子表达水平差异为出发点, 初步探讨免疫反应在早期腹主动脉瘤发病机制中的作用。

[收稿日期] 2012-04-13

[基金项目] 广东省医学基金资助 (A2005505)

[作者简介] 许文平, 博士研究生, 副主任医师, 主要从事大血管疾病研究。通讯作者李志樑, 南方医科大学附属珠江医院心内科, E-mail 为 xwpeat@126.com。

1 对象和方法

1.1 研究对象

选取 2007 年 6 月到 2011 年 6 月在我院住院的腹主动脉瘤患者 60 例为研究对象,分为两组:小
腹主动脉瘤组 30 例(腹主动脉直径为 4.24 ± 0.67 cm),男 27 例,女 3 例,平均年龄 62.30 ± 8.35 岁;大
腹主动脉瘤组 30 例(腹主动脉直径为 6.24 ± 0.67 cm),男 28 例,女 2 例,平均年龄 65.80 ± 6.22 岁。
另选正常健康对照者 30 例,为入我院健康体检人

员,男 26 例,女 4 例,平均年龄 63.40 ± 8.72 岁,入
选标准:无腹主动脉瘤病史(腹主动脉直径为 2.20 ± 0.77 cm),无缺血性心脏病、脑血管疾病病史,无
外周血管疾病及自身免疫性疾病。研究对象排除
标准:感染、全身免疫性疾病、恶性肿瘤、肝肾功能
不全。本研究获医院伦理委员会的同意。

各组研究对象的年龄及主要的危险因素(性
别、吸烟、高血压、动脉硬化症、血脂等)之间的比较
差异无显著性(表 1)。

表 1. 入选对照、小腹主动脉瘤及大腹主动脉瘤患者一般临床资料

Table 1. General data of patients in AAA group and control group

指 标	对照组(<i>n</i> = 30)	小腹主动脉瘤组(<i>n</i> = 30)	大腹主动脉瘤组(<i>n</i> = 30)	<i>F</i>	<i>P</i>
男/女(例)	26/4	27/3	28/2	—	1.000
年龄(岁)	63.40 ± 8.72	62.30 ± 8.35	65.80 ± 6.22	0.511	0.560
高血压(例)	18	22	23	—	0.720
动脉硬化(例)	10	12	14	—	1.000
吸烟(例)	11	14	15	—	1.000
总胆固醇(mmol/L)	4.35 ± 0.72	5.02 ± 0.87	5.09 ± 1.14	1.711	0.135
甘油三酯(mmol/L)	1.29 ± 0.51	1.37 ± 0.68	1.42 ± 0.73	0.819	0.476
低密度脂蛋白(mmol/L)	2.43 ± 0.57	3.26 ± 0.68	3.35 ± 0.72	2.304	0.095

1.2 材料

用肝素钠抗凝采血管于早晨空腹收集各组受检者
静脉血 5 mL,其中 3 mL 不抗凝,自然凝固 20 min,2 kr/
min 离心 5 ~ 10 min,收集血清用于 ELISA 检测。余下
的(1:5 mL 肝素)抗凝,取 1 mL 用于流式细胞检测。
FITC 标记小鼠抗人 CD4、CD8、CD28 抗体及 IFN- γ 、
TNF- α ELISA 检测试剂盒均购自美国 BD 公司。

1.3 外周血 CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺ CD28⁻T 亚群占淋 巴细胞的比例检测

取 3 管 100 μ L 新鲜全血,分别标记为 A 管(加
入 10 μ L 单克隆抗体 CD3 PerCP、CD4-PE、CD8-
FITC)、B 管(加入 10 μ L 单克隆抗体 CD4-PE、
CD28-FITC)和 C 管(加入 10 μ L 单克隆抗体 CD8-
PE、CD28-FITC);同时对对照组受检者(100 μ L 全血
+ 10 μ L 单克隆抗体 IgG-FITC、IgG-PE、IgG-PE)作
为对照。上述标本均在室温、暗室内孵育 20 min,加
溶血剂 2 mL,混匀裂解红细胞 10 min,15 kr/min 离
心 10 min,去上清后分别用 PBS 溶液 2.5 mL 清洗
两遍;加 PBS 溶液 0.5 mL,混匀后应用流式细胞仪
检测分析(若不能马上分析,可以加用 0.5 mL 1%
多聚甲醛固定液,室温下闭光保存,24 h 内上机检

测)。所得数据经 Cell Quist Plot 软件分析获得。

1.4 血清中 Th1 细胞因子 IFN- γ 、TNF- α 测定

运用 ELISA 技术对三组受检者的外周血血清
细胞因子 IFN- γ 、TNF- α 进行检测,按照酶联免疫吸
附试验(ELISA)试剂盒的说明进行检测。

1.5 统计学方法

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计数资料采用 χ^2 检验或
Fisher Exact 检验,多组间差异比较计量资料采用单
因素方差分析,组间多重比较采用 LSD 法, *P* <
0.05 认为有显著性差异。所有统计学处理均采用
SPSS 13.0 统计软件进行分析。

2 结 果

2.1 各组外周血 CD4⁺T、CD8⁺T 的检测

正常对照组、小 AAA 组和大 AAA 组的 CD4⁺T
细胞数量分别为 $1249.00 \pm 651.10/\mu$ L、 $926.30 \pm$
 $230.61/\mu$ L 和 $786.40 \pm 205.70/\mu$ L,CD8⁺T 细胞数量
为 $323.10 \pm 255.40/\mu$ L、 $311.30 \pm 163.12/\mu$ L 和
 $343.50 \pm 130.07/\mu$ L,CD4⁺/CD8⁺ 比例分别为 3.41%
 $\pm 1.21\%$ 、3.55% $\pm 1.69\%$ 和 2.68% $\pm 1.56\%$ 。

CD4⁺和CD8⁺T细胞分别在三组间差异无显著性意义($F_{CD4^+}=0.685, P=0.521$; $F_{CD8^+}=0.357, P=0.067$; $F_{CD4^+/CD8^+}=0.642, P=0.102$;表2)。

2.2 外周血CD4⁺CD28⁻和CD8⁺CD28⁻T淋巴细胞亚群所占CD4⁺、CD8⁺T淋巴细胞总数比例情况

正常对照组、小AAA组和大AAA组的CD4⁺CD28⁻细胞占CD4⁺淋巴细胞比例分别为3.81%±0.58%、13.12%±4.73%和8.21%±2.65%。CD8⁺

CD28⁻T细胞占CD8⁺淋巴细胞比例分别为3.77%±0.64%、7.03%±1.25%和5.59%±3.00%。与小AAA组比较,正常对照组、大AAA组CD4⁺CD28⁻T细胞差异有显著意义($F_{CD4^+CD28^-}=5.269, P=0.000$)。受检者腹主动脉直径与CD4⁺CD28⁻T细胞呈正相关(相关系数 $R_{CD4^+CD28^-}=0.521, P=0.003$;表2)。

表 2. 各组外周血 T 淋巴细胞亚群分布情况

Table 2. The ratio and absolute frequency of circulating T cell in patients of each group

细 胞	对照组 (n = 30)	小腹主动脉组 (n = 30)	大腹主动脉瘤组 (n = 30)
CD4 ⁺ T(／μL)	1249. 00 ± 651. 10	926. 30 ± 230. 61	786. 40 ± 205. 70
CD8 ⁺ T(／μL)	323. 10 ± 255. 40	311. 30 ± 163. 12	343. 50 ± 130. 07
CD4 ⁺ ／CD8 ⁺ T	3. 41% ± 1. 21%	3. 55% ± 1. 69%	2. 68% ± 1. 56%
CD4 ⁺ CD28 ⁻ ／CD ₄ ⁺	3. 81% ± 0. 58%	13. 12% ± 4. 73% ^a	8. 21% ± 2. 65% ^{ab}
CD8 ⁺ CD28 ⁻ ／CD ₈ ⁺	3. 77% ± 0. 64%	7. 03% ± 1. 25%	5. 59% ± 3. 00%

a 为 $P<0.05$,与对照组比较;b 为 $P<0.05$,与小腹主动脉组比较。

2.3 各组外周血清中 IFN-γ、TNF-α 表达水平检测

对照组、小AAA、大AAA组的血清IFN-γ表达量分别为4.24±0.83 ng/L、17.12±1.66 ng/L和21.43±3.42 ng/L,血清TNF-α表达量分别为31.30±5.61 ng/L、58.30±12.25 ng/L和58.86±8.22 ng/L。与对照组比较,小AAA组及大AAA组血清中IFN-γ和TNF-α的表达差异有显著性意义($F_{IFN-γ}=136.50, F_{TNF-α}=50.69, P<0.01$)。与小AAA组比较,大AAA组血清中IFN-γ和TNF-α的表达差异也有显著性意义($P<0.01$;图1)。IFN-γ和TNF-α的表达与腹主动脉直径呈正相关性($R_{IFN-γ}=0.522, P=0.005$; $R_{TNF-α}=0.518, P=0.033$)。

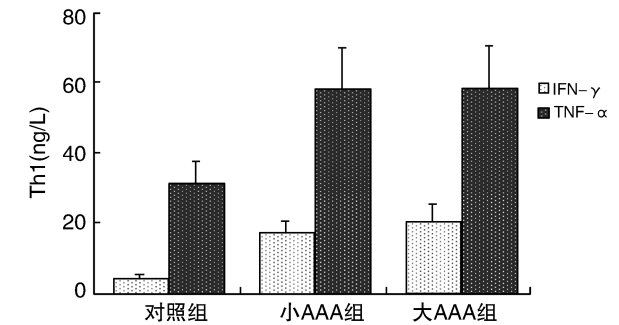


图 1. 各组血浆中 Th1 细胞因子水平比较

Figure 1. The ratio and absolute frequency of circulating Th1 cell in patients of each group

3 讨 论

既往的研究表明,炎症细胞的浸润及相关炎症及免疫因子的激活在实验性腹主动脉瘤形成过程中起着十分重要作用^[3-5]。腹主动脉瘤发生发展过程中机体的免疫状态及免疫反应特点尚不十分清楚。已有研究表明T淋巴细胞亚群功能紊乱在自身免疫损伤中的作用显著^[6]。本研究通过对大小腹主动脉瘤患者外周血T细胞亚群及IFN-γ和TNF-α等Th1细胞因子水平进行检测,并以此为切入点初步探讨腹主动脉瘤发病机制中免疫反应特点。

T淋巴细胞按CD分子不同可分成CD4⁺和CD8⁺两大亚群;按CD细胞功能不同可分为辅助性T细胞(helper T cell, Th)、细胞毒性T细胞(cytotoxic T cell, Tc)和抑制性T细胞(suppressor T cell, Ts)。CD4⁺Th细胞按细胞因子产生的模式和生物学功能不同,又可分为Th0、Th1、Th2、Th3等亚组。人体内免疫内环境的稳定是由T淋巴细胞亚群的比例来进行调节和维持。在各种内外因素的刺激下,机体免疫内环境发生紊乱,出现T淋巴细胞的亚群比例失调及功能的变化,以分泌IL-2、IFN-γ和TNF-β等I类细胞因子为主的Th1比例增高,通过促进CTL、NK细胞及巨噬细胞活化和增殖,介导细胞毒效应^[7,8]。

本研究表明,在腹主动脉瘤患者外周血中

CD4⁺CD28⁻数量和比例显著升高,尤以小腹主动脉瘤组变化更为显著。同时,小AAA与大AAA组患者外周血中IFN- γ 和TNF- α 均呈显著升高;IFN- γ 、TNF- α 的浓度与腹主动脉瘤直径大小成正比关系。此结果提示:升高的CD4⁺CD28⁻T细胞亚群可能通过与自身抗原的结合,持续增殖,分泌IFN- γ 和TNF- α 等炎症因子,IFN- γ 和TNF- α 等炎症因子分泌增加,导致巨噬细胞活化^[9],活化的巨噬细胞释放金属蛋白酶等炎症物质破坏动脉组织,导致腹主动脉瘤的形成和发展^[10]。本研究发现,不同发展阶段的腹主动脉瘤患者外周血T淋巴细胞的亚群比例及Th1细胞因子水平呈现一定的变化规律,由此我们可以大胆推测,CD4⁺CD28⁻T淋巴细胞和IFN- γ 、TNF- α 等Th1细胞因子的升高,在腹主动脉瘤早期的炎症及免疫发病机制中可能起着重要的激活作用,并导致腹主动脉局部慢性炎症迁延。根据这一特点,我们对腹主动脉瘤不同阶段制订相应的治疗策略,可能对减缓或控制AAA的形成和加速扩张有着积极的意义。

[参考文献]

- [1] Lindholt JS, Shi GP. Chronic inflammation, immune response, and infection in abdominal aortic aneurysms[J]. Eur J Vasc Endovasc Surg, 2006, 31: 453-463.
- [2] Raffener B, Dejacó C, Duftner C, et al. Between adaptive and innate immunity: TLR4-mediated perforin production

by CD28null T-helper cells in ankylosing spondylitis[J]. Arthritis Res Ther, 2005, 7: R1 412-420.

- [3] 许文平. T淋巴细胞介导的免疫反应在腹主动脉瘤发病机制中的作用[D]. 南方医科大学博士论文.
- [4] 许文平,邱健,李志梁,阿托伐他汀抑制腹主动脉瘤基质金属酶9及核因子KB表达的实验研究[J]. 中国动脉硬化杂志, 2008, 16(8): 600-602.
- [5] 倪松,郑曰宏,管珩. 基质金属酶在腹主动脉瘤形成中的作用研究进展[J]. 中国普通外科杂志, 2004, (8): 850-852.
- [6] Viardot A, Grey ST, Mackay F, et al. Potential antiinflammatory role of insulin via the preferential polarization of effector T cells toward a T helper 2 phenotype[J]. Endocrinology, 2007, 148: 346-353.
- [7] 陆永光,李浪,陈妍梅,等. 不稳定型心绞痛患者CD4 + T淋巴细胞miRNA的差异表达[J]. 中国动脉硬化杂志, 2011, 19(4): 323-326.
- [8] 许文平,邱健. 腹主动脉瘤发病机制及内科治疗进展[J]. 实用医学杂志, 2006, 9(22): 1 086-088.
- [9] Toshihiro Tsuruda, Johji Kato, Kinta Hatakeyama, et al. Adventitial mast cells contribute to pathogenesis in the progression of abdominal aortic aneurysm[J]. Circulation Research, 2008, 102: 1 368.
- [10] Helena Kuivaniemi, M David Tilson. Aortic aneurysms an immune disease with a strong genetic component [J]. Circulation, 2008, 117: 242-252.

(此文编辑 李小玲)