

Foxp3 表达与老年颈动脉粥样硬化的关系

李峰¹, 马金栋², 高颖², 刘丰基¹

(潍坊市人民医院 1. 保健科, 2. 检验科, 山东省潍坊市 261041)

[关键词] 老年人; 颈动脉粥样硬化; 斑块形成; Foxp3; 高敏 C 反应蛋白; 脑卒中

[摘要] **目的** 探讨老年颈动脉粥样硬化与外周血叉头翼状螺旋转录因子 p3 (Foxp3) 表达以及高敏 C 反应蛋白 (hs-CRP) 之间的关系。**方法** 对 66 例老年颈动脉粥样硬化患者和 51 例健康对照者分别利用流式细胞仪检测外周血 Foxp3, 速率散射比浊法检测 hs-CRP。**结果** 老年颈动脉粥样硬化患者外周血 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 调节性 T 淋巴细胞显著减少, 经瑞舒伐他汀钙治疗后较治疗前明显增加; 颈动脉粥样硬化患者血清 hs-CRP 明显高于对照组, 有颈动脉斑块的患者血清 hs-CRP 显著高于颈动脉内中膜增厚患者; 将 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 与 hs-CRP 进行相关性分析, 两者之间呈负相关。**结论** 老年颈动脉粥样硬化与外周血 Foxp3 表达、hs-CRP 密切相关。外周血 Foxp3 表达、hs-CRP 在老年人颈动脉粥样硬化、斑块形成的发生发展中起着重要的作用, 控制这些危险因素有益于控制和减少脑卒中的发生。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Relationship Between Expression of Foxp3 and Carotid Atherosclerosis in Elderly Patients

LI Feng¹, MA Jin-Dong², GAO Yin², and LIU Feng-Ji¹

(1. Department of Health Control, 2. Department of Clinical Laboratory, Weifang People's Hospital, Weifang, Shandong 261041, China)

[KEY WORDS] The Elderly; Carotid Atherosclerosis; Plaque Formation; Foxp3; High Sensitivity C Reactive Protein; Apoplexy

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the relationship between carotid atherosclerosis in elderly patients and the expression of forkhead/winged helix transcription factor p3 (Foxp3), and high sensitivity C reactive protein (hs-CRP) in peripheral blood. **Methods** 66 cases of elderly patients with carotid atherosclerosis and 51 healthy controls were detected by flow cytometry of peripheral blood Foxp3, nephelometry hair testing hs-CRP. **Results** Peripheral CD4⁺CD25⁺Foxp3 regulatory T lymphocytes in elderly patients with carotid atherosclerosis decreased significantly and increased after rosuvastatin treatment, significantly higher than that before treatment; serum hs-CRP in patients with carotid atherosclerosis was significantly higher than that of the control group, hs-CRP in patients with carotid artery plaque were significantly higher than that in patients with carotid artery intima-media thickness; Foxp3 was correlated negatively with hs-CRP. **Conclusions** Carotid atherosclerosis in the elderly patients are closely related with peripheral blood expression of Foxp3 and hs-CRP. The peripheral blood Foxp3 and hs-CRP play an important role in the occurrence and development of plaque formation in carotid atherosclerosis, and the control of these risk factors is beneficial to controlling and reducing the occurrence of apoplexy.

颈动脉粥样硬化是动脉硬化性脑梗死最重要的病因之一, 颈动脉硬化以内中膜增厚或斑块形成特点, 可反映全身主要血管区域的状况及发展趋势。对其危险因素进行分析并积极干预, 对预测高

危人群及亚临床人群发生心脑血管事件具有重要意义。近年来研究发现一种转录因子叉头翼状螺旋转录因子 p3 (forkhead/winged helix transcription factor p3, Foxp3) 在 CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞 (reg-

[收稿日期] 2013-07-01

[作者简介] 李峰, 硕士, 副主任医师, 研究方向为老年心脑血管病的预防与治疗, E-mail 为 lifengwf@sohu.com。马金栋, 大学本科, 副主任检验师, 主要从事细胞免疫学研究, E-mail 为 mjdwf@126.com。高颖, 硕士, 副主任检验师, 主要从事细胞免疫学研究, E-mail 为 gaoying1995@sohu.com。

ulatory T cell, Treg)的功能上发挥重要作用,转录因子 Foxp3 是 Treg 的一个相对特异性的标记,是 Treg 发育和功能表达的关键因子。Foxp3 特异性表达在 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞上,不受活化状态的影响^[1]。颈动脉粥样硬化发生与发展过程与 Foxp3 关系的研究国内未见报道。本文旨在探讨 Foxp3 和高敏 C 反应蛋白(high sensitivity C reactive protein,hs-CRP)与颈动脉粥样硬化发病及疾病活动性的关系,以期颈动脉粥样硬化的治疗观察和预后判断提供依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

颈动脉粥样硬化(carotid atherosclerosis, CAS)组:颈动脉粥样硬化患者 66 例,男 37 例,女 29 例,年龄 60~81 岁,平均 71.8 岁;全部病例均为 2008 年 1 月至 2012 年 10 月我院保健科住院患者,均经彩色超声确诊。对照组:我院健康体检者 51 例,男 29 例,女 22 例,年龄 59~79 岁,平均 67.7 岁,无近期感染和自身免疫病史。

1.2 主要仪器和试剂

FACS Calibur 流式细胞仪:美国 BD 公司生产。CD4-FITC、CD25-PE、同型对照小鼠 IgG1-FITC、IgG1-PE 单克隆抗体:美国 BD 公司产品;Fixation/Permeabilization、10 × Permeabilization 缓冲液、正常大鼠血清、Foxp3-APC 单克隆抗体及 IgG1-APC 同型对照抗体:美国 eBioscience 公司产品;淋巴细胞分离液:购自中国医学科学院血液学研究所;其余试剂均为本实验室自配。

1.3 Foxp3 检测

(1)外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)的分离: CAS 组和对照组均空腹抽血 2 mL,乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K2)抗凝,以磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)稀释后,缓慢加入等体积的淋巴细胞分离液,2000 r/min 离心 20 min,分离出 PBMC, PBS 洗涤,调整细胞浓度为 1.0 × 10⁹/L。(2)染色:取两支试管,分别加入 100 μL PBMC 悬液(细胞浓度为 1.0 × 10⁹/L),分为同型对照管和检测管,同型对照管加小鼠 IgG1-FITC 及 IgG1-PE 各 20 μL,检测管加 CD4-FITC、CD25-PE 各 20 μL,4℃避光孵育 30 min;用冷 PBS 洗涤后,加入新鲜配制的 Fixation/Permeabilization 1 mL,4℃避光孵育 30~60 min;2 mL Permeabilization 缓冲液洗涤 2 次,加入 100 μL Permeabilization 缓冲液重悬细胞,加入 2 μL 2% 正常大鼠血清封闭

15 min;同型对照管加 IgG1-APC 20 μL,检测管加 Foxp3-APC 20 μL,4℃避光孵育 30 min;2 mL Permeabilization 缓冲液洗涤后,50 μL PBS 重悬细胞,上机测定。

1.4 高敏 C 反应蛋白测定

采用散射比浊法测定,特定蛋白分析仪及试剂为美国贝克曼公司产品。

1.5 颈动脉粥样硬化检测

采用惠普彩色多普勒超声诊断仪,进行双功能扫描,探头频率 7.5 MHz,采用二维超声观察颈动脉内各段内膜形态改变。受检者取仰卧位,头略微偏向检查一侧的对侧,部位为颈总动脉离分叉处 10 mm 及 20 mm 处、分叉部、颈内动脉离分叉处 10 mm 或更远处。观察指标有颈动脉内膜正常、颈动脉内膜毛糙和内膜斑块。根据超声形态特征将斑块进行分类^[2]:(1)软斑块为斑块呈中等回声或弱回声,内膜向腔内凸出,形态规则或不规则,内部结构均匀或不均匀;(2)硬斑块为斑块呈强回声,可伴有明显的声影;(3)混合斑块为斑块呈强回声、等回声、弱回声或无回声等混合存在,形态不规则,表面粗糙,可有“壁龛”样影像。

1.6 药物治疗

CAS 组患者给予瑞舒伐他汀钙(商品名:可定)治疗,每次 10 mg,每日 1 次,连用 3 个月。之后行 Foxp3 测定和颈动脉彩色超声检测。

1.7 统计学处理

实验数据用 SPSS 11.5 软件进行统计学分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组均数比较用 t 检验。应用 Spearman 秩相关分析检验参数间的相关性。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Foxp3 测定结果

老年颈动脉粥样硬化患者 CD4⁺Foxp3⁺Treg 淋巴细胞占 CD4⁺Treg 淋巴细胞及总淋巴细胞的比例显著减低,而 CD4⁺Treg 淋巴细胞数和 CD4⁺CD25⁺Treg 淋巴细胞数与对照组无差异(表 1、图 1)。

2.2 CAS 组治疗前后 Foxp3 测定结果

对老年颈动脉粥样硬化患者用瑞舒伐他汀钙治疗 3 个月后,采血检测 Foxp3。结果显示,治疗后 CD4⁺Foxp3⁺Treg 细胞占 CD4⁺Treg 细胞比例较治疗前明显升高($P < 0.05$),CD4⁺Foxp3⁺Treg 细胞占淋巴细胞的比例亦明显升高($P < 0.05$),而 CD4⁺Treg

细胞占总淋巴细胞比例和 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞占淋巴细胞比例治疗前后无差异($P>0.05$)(表 2)。

表 1. 两组 Foxp3 测定结果

Table 1. The determination result of Foxp3 in two groups

分 组	<i>n</i>	CD4 ⁺ (占淋巴细胞%)	CD4 ⁺ CD25 ⁺ (占淋巴细胞%)	CD4 ⁺ Foxp3 ⁺ (占 CD4 ⁺ %)	CD4 ⁺ Foxp3 ⁺ (占淋巴细胞%)
CAS 组	66	36.2% ± 7.3%	9.3% ± 2.7%	5.1% ± 1.7%	1.9% ± 0.6%
对照组	51	35.1% ± 7.5%	9.0% ± 3.0%	8.5% ± 2.5%	3.4% ± 0.9%
<i>P</i> 值		>0.05	>0.05	<0.05	<0.05

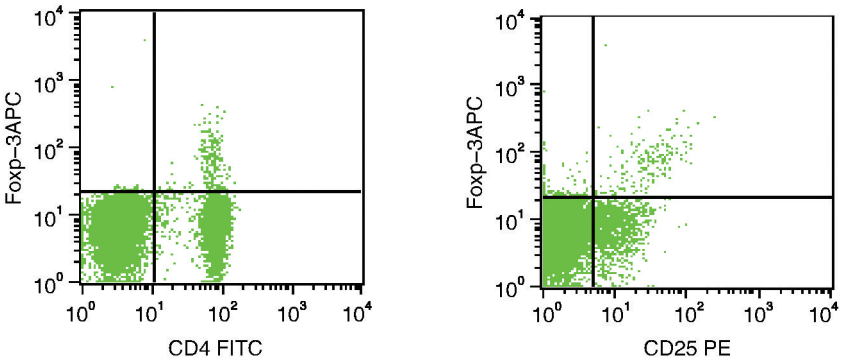


图 1. 1 例老年颈动脉硬化患者 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 细胞流式图

Figure 1. Flow chart of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg cell of an elderly patient with carotid atherosclerosis

表 2. 颈动脉粥样硬化患者治疗前后 Foxp3 测定结果比较

Table 2. The comparison of Foxp3 before and after rosuvastatin treatment in elderly patients with carotid atherosclerosis

时 间	<i>n</i>	CD4 ⁺ (占淋巴细胞%)	CD4 ⁺ CD25 ⁺ (占淋巴细胞%)	CD4 ⁺ Foxp3 ⁺ (占 CD4 ⁺ %)	CD4 ⁺ Foxp3 ⁺ (占淋巴细胞%)
治疗前	66	34.3% ± 7.3%	8.6% ± 2.9%	6.1% ± 2.2%	2.1% ± 0.8%
治疗后	66	35.1% ± 7.5%	9.0% ± 3.0%	8.5% ± 2.5%	3.4% ± 0.9%
<i>P</i> 值		>0.05	>0.05	<0.05	<0.05

2.3 hs-CRP 测定结果

颈动脉粥样硬化患者(CAS 组)血清 hs-CRP 明显高于对照组($P<0.05$),CAS 组有颈动脉斑块的患者血清 hs-CRP 显著高于颈动脉内中膜增厚患者($P<0.05$)(表 3)。

表 3. 两组血清 hs-CRP 测定结果

Table 3. The determination result of hs-CRP in two groups

分 组	<i>n</i>	hs-CRP(mg/L)
CAS 组	66	16.9 ± 7.5
颈动脉内中膜增厚者	31	13.6 ± 6.9
有颈动脉斑块者	35	23.2 ± 7.3
对照组	51	3.2 ± 2.3

2.4 治疗前后斑块比较

对颈动脉粥样硬化斑块患者给予瑞舒伐他汀钙治疗 3 个月后,超声复查斑块;治疗前后斑块变化不明显(图 2)。

2.5 颈动脉粥样硬化患者 Foxp3 与 hs-CRP 的相关性分析

对 66 例老年颈动脉粥样硬化患者 Foxp3 与 hs-CRP 的测定结果进行相关性分析,结果显示两者之间相关系数 $r = -0.8931$,呈显著负相关($P<0.05$)。

3 讨 论

目前认为,动脉粥样硬化是一种动脉血管壁的慢性炎症疾病^[3],T 淋巴细胞参入了动脉粥样硬化

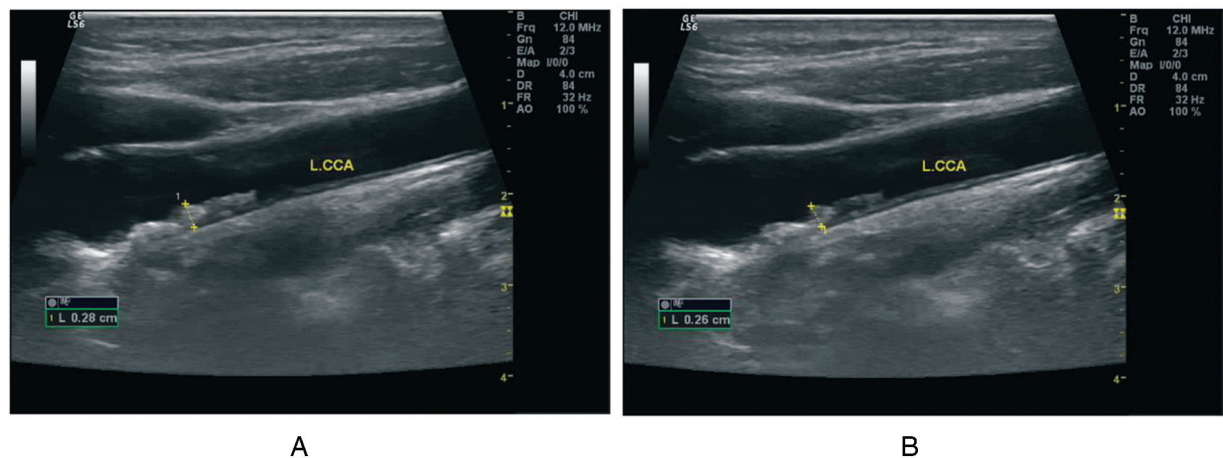


图 2. 超声检测颈动脉粥样硬化斑块 A 为治疗前,B 为瑞舒伐他汀钙治疗 3 个月后。
Figure 2. Ultrasonic inspection and measurement of carotid artery plaque in elderly patient

的炎症反应,不同的 T 细胞亚群在动脉粥样硬化的发生发展中起着不同的作用。CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞是一个具有独特免疫调节功能的 T 细胞亚群,而 Foxp3 是目前公认的 Treg 细胞最敏感的标志^[4]。Foxp3 特异性表达在 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞上,并不受活化状态的影响。CD4⁺CD25⁺Treg 细胞中 Foxp3 mRNA 表达量较 CD4⁺CD25⁻Treg 细胞高 100 倍左右。在 mRNA 和蛋白质水平上,外周表达 Foxp3 的 CD4⁺Treg 细胞主要是 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞亚群^[5]。国外多项动物实验研究^[6,7]发现,在小鼠动脉粥样硬化模型中通过提高 Treg 水平能够减轻动脉粥样硬化斑块的形成。国内学者^[8]研究发现,在给予 ApoE 敲除小鼠注入 Foxp3-siRNA 慢病毒后,粥样硬化斑块面积明显增加, Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺Treg 细胞数目显著减少,而输注 Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺Treg 后粥样硬化斑块面积明显减少,提示 Foxp3 可能通过调控体内炎症而产生抗动脉粥样硬化作用。

我们的结果显示,老年颈动脉粥样硬化患者 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 淋巴细胞占 CD4⁺Treg 淋巴细胞及总淋巴细胞的比例显著降低,而 CD4⁺Treg 淋巴细胞数与对照组差别无统计学意义。CD25 即白细胞介素 2 (interleukin-2, IL-2) 受体 α 链,作为 IL-2 的低亲和力受体,与 CD122、CD132 结合后成为 IL-2 的高亲和力受体。Treg 细胞可以识别自身抗原肽,并分泌抑制性细胞因子,从而抑制自身反应性 T 细胞和辅助 T 细胞的活化。尽管 T 细胞活化增强,但由于表达 Foxp3 的 Treg 细胞的抑制作用,可能使得颈动脉硬化患者免疫监视能力减弱,在颈动脉硬化化的发生发展过程中发挥了重要的作用。我们的

研究结果表明老年颈动脉粥样硬化患者存在明显的免疫功能失调,CD4⁺CD25⁺Treg 细胞、CD4⁺Foxp3⁺Treg 细胞在疾病活动中起着重要作用,是导致患者动脉粥样硬化斑块形成的重要原因之一。本研究还发现老年颈动脉粥样硬化患者服用瑞舒伐他汀钙治疗 3 个月后,CD4⁺Foxp3⁺Treg 淋巴细胞占 CD4⁺Treg 淋巴细胞及总淋巴细胞的比例显著升高,但斑块变化不明显,提示瑞舒伐他汀钙在降血脂的同时还有一定的免疫调节作用。

研究证明 CRP 存在于动脉粥样硬化斑块内,并促进动脉粥样硬化的进展,同时作为补体激活剂能够激活补体,而活化的补体可攻击粥样斑块,导致血栓的形成。CRP 作为一种急性期时相反应蛋白,可参与局部或全身的炎症反应^[9,10]。本研究显示 CRP 水平和颈动脉粥样硬化程度有关。目前认为炎症活动以及由此触发的斑块不稳定、破裂是缺血性脑卒中的重要发病机制之一,CRP 是动脉粥样硬化、心肌梗死、缺血性脑卒中等炎性血管疾病的早期标记物。炎症是动脉粥样硬化斑块的重要特征,它与内皮细胞、巨噬细胞、平滑肌细胞的激活和增殖,细胞因子的产生,补体的激活及其他炎症介质的出现均有一定的关系,各种感染、炎症、组织损伤时均可引起循环中 CRP 升高。本研究发现颈动脉粥样硬化患者血清 hs-CRP 水平明显高于对照组,有颈动脉斑块的患者血清 hs-CRP 显著高于颈动脉内中膜增厚患者,提示 CRP 水平可以反应颈动脉内膜斑块的性质及稳定性。本研究还发现老年颈动脉粥样硬化患者外周血 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺与 hs-CRP 的表达呈负相关。

总之,老年颈动脉粥样硬化与外周血 Foxp3 表

达、hs-CRP 密切相关。外周血 Foxp3 表达、hs-CRP 在老年人颈动脉硬化、斑块形成的发生发展中起着重要的作用,控制这些危险因素有益于控制和减少脑卒中的发生。瑞舒伐他汀钙具有免疫调节作用,但未观察到颈动脉斑块明显缩小变化,考虑可能与观察时间短有关,下一步将延长服药时间以探讨斑块变化情况。

[参考文献]

[1] Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3[J]. Science, 2003, 299(5609): 1 057-061.

[2] 王 蓓, 李世滢, 颜怀新. 巴曲酶治疗 40 例颈动脉粥样硬化的疗效观察[J]. 临床神经病学杂志, 2003, 16 (2): 177-178.

[3] Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis and coronary artery disease [J]. N Eng J Med, 2005, 352 (16): 1 685-695.

[4] Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the developmeng and function of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells[J]. Nat Immunol, 2003, 4(16): 330-336.

[5] Bettelli E, Dastrange M, Oukka M. Foxp3 interacts with

nuclear factor of activated T cells and NF-kappa B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(4): 5 138-143.

[6] Steffen S, Buerger F, Peli G, et al. Short-term treatment with anti-CD3 antibaody reduce the developmengt and progression of atherosclerosis in mice[J]. Circulation, 2006, 114(18): 1 977-984.

[7] Sasaki N, Yamashita T, Takeda M, et al. Oral anti-CD30 antibaody treatment induce regulatory T cells and inhibits the development of atherosclerosis in mice[J]. Circulation, 2009, 120(20): 1 996-2 005.

[8] 王治校, 林 静, 陈 彬. Foxp3 基因对 ApoE-knockout 小鼠动脉粥样硬化的影响[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2011, 27(2): 154-157.

[9] 伍秀芝. 血清胆红素水平与高血脂关系的探讨[J]. 心血管康复医学杂志, 2006, 15(3): 260-261.

[10] 吕学丽, 武保军, 周雪莲. 脑梗死患者颈动脉粥样硬化斑块与高敏 C 反应蛋白、幽门螺杆菌感染的相关性分析[J]. 中国误诊学杂志, 2009, 9(18): 4 365-366.

(此文编辑 曾学清)

· 医学信息 ·

2012 年诺贝尔生理学或医学奖得主简介

2012 年诺贝尔生理学或医学奖由英国发育生物学家约翰·伯特兰·格登(John Bertrand Gurdon)、日本京都大学科学家山中伸弥(Shinya Yamanaka)获得。两位科学家因“发现成熟细胞可以被重新编程为多功能的干细胞(即诱导多功能干细胞)”而获奖,他们的研究成果彻底改变了人类对细胞和生物体发展的认识。

细胞核重编程是将成年体细胞重新诱导回早期干细胞状态,以用于形成各种类型的细胞,应用于临床医学,是细胞内的基因表达由一种类型变成另一种类型。通过这一技术,可在同一个体上将较容易获得的细胞(如皮肤细胞)类型转变成另一种较难获得的细胞类型(如脑细胞)。这一技术的实现将能避免异体移植产生的排异反应。

约翰·伯特兰·格登 1933 年出生于英国,现任职于英国剑桥大学格登研究院。他以在细胞核移植和克隆方面进行的开创性研究著称,被誉为动物细胞全能型研究的前驱,并因此获得了 1989 年的沃尔夫医学奖和 2009 年的拉斯克基础医学奖等奖项。他于 1971 年成为英国皇家学会会员,并在 1995 年被授予爵士头衔。

山中伸弥 1962 年出生于日本大阪府,日本医学家,京都大学再生医科研究所干细胞生物系教授,大阪市立大学医学博士,美国加利福尼亚州旧金山心血管疾病研究所高级研究员,是诱导多功能干细胞的创始人之一。他曾接连获得邵逸夫生命科学与医学奖、拉斯克基础医学奖以及国际最高学术大奖之一的沃尔夫医学奖等诸多奖项。