

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2796(2007)08-0724-03

哮喘患者外周血 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> 调节性 T 细胞与 IL-4, IL-5 的表达

谭楠, 吴昌归 (第四军医大学西京医院呼吸内科, 陕西 西安 710033)

Expressions of regulatory CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cells, IL-4, IL-5 in peripheral blood from asthma patients

TAN Nan, WU Chang-Gui

Department of Respiratory Diseases, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China

**【Abstract】**AIM: To evaluate the changes and the correlation between regulatory CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cells and IL-4, IL-5 in peripheral blood from the patients with asthma. **METHODS:** Forty patients with asthma and 40 healthy volunteers were included in this study. The proportion of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cell population in total T cells was evaluated by flow cytometric analysis. The serum IL-4 and IL-5 levels were measured by ELISA. **RESULTS:** The expression of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cells in peripheral blood from the patients with asthma was much lower in comparison with the healthy volunteers ( $P < 0.01$ ); The expression of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cells in peripheral blood from the patients during acute attacks was lower than that in chronic phase ( $P < 0.01$ ); IL-4, IL-5 levels from the patients with asthma were higher than those in healthy volunteers ( $P < 0.05$ ); IL-4, IL-5 levels during acute attacks were higher than those in chronic phase ( $P < 0.05$ ); The expression of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cells in peripheral blood was in negative correlation with the levels of IL-4, IL-5 from the patients with asthma during acute attacks ( $r = -0.675, -0.767, P < 0.01$ ). **CONCLUSION:** Regulatory CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cells play a very significant role in activation of asthma, and is the important reason for the maladjustment of cellular immunofunction in the patients with asthma.

**【Keywords】**Asthma; CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cells; interleukin-4; interleukin-5

**【摘要】**目的: 探讨哮喘患者外周血中 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> 调节性 T 细胞与 IL-4, IL-5 的水平变化及其相互关系。方法: 采用流式细胞技术检测 40 例哮喘患者和 40 例健康对照者外周血中 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> 调节性 T 细胞的表达水平, 采用 ELISA 法检测

收稿日期 2006-12-05; 接受日期 2007-01-15

通讯作者: 吴昌归。Tel: (029) 84775237 Email: changgui@fmmu.edu.cn

作者简介: 谭楠, 硕士生(导师吴昌归)。Tel: (029) 87630830

Email: tannan22@126.com

外周血中 IL-4, IL-5 水平。结果: 哮喘患者外周血中 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> 调节性 T 细胞低于健康对照者 ( $P < 0.01$ ); 急性发作期哮喘患者外周血中 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> 调节性 T 细胞低于非急性发作期 ( $P < 0.01$ ); 哮喘患者 IL-4, IL-5 的表达水平高于健康对照者 ( $P < 0.05$ ); 急性发作期患者 IL-4, IL-5 的表达水平高于非急性发作期 ( $P < 0.05$ ); 急性发作期哮喘患者外周血 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T 细胞与 IL-4, IL-5 的表达水平呈负相关 ( $r$  分别为  $-0.675, -0.767, P < 0.01$ )。结论: CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> 调节性 T 细胞在哮喘的疾病活动中起着重要作用, 是导致哮喘患者细胞免疫失调的重要原因。

**【关键词】**哮喘; CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T 细胞; 白细胞介素 4; 白细胞介素 5

【中图分类号】R562.25

【文献标识码】A

## 0 引言

从 1986 年起, Th1/Th2 平衡理论作为过敏性疾病如支气管哮喘发病机制中的核心已为大多数人所接受。在此基础上, T 细胞尤其是调节性 T 细胞在支气管哮喘中的作用逐渐引起人们的关注。目前已知至少有 4 种主要的 CD4<sup>+</sup> 调节性 T 细胞在哮喘发病中起作用, 包括 Th3 细胞, Tr1 细胞, NKT 细胞及 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T 细胞<sup>[1]</sup>。而 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T 细胞由于其具有独特的作用方式和功能特征, 引起了国外学者的广泛关注<sup>[2-4]</sup>, 但国内有关 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T 细胞与哮喘关系的研究报道尚少, 我们进行了这方面的研究, 以期探讨哮喘患者外周血 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T 细胞的表达及其与 Th2 型细胞因子 IL-4, IL-5 表达水平的关系。

## 1 对象和方法

**1.1 对象** 哮喘组: 哮喘患者 40 (男 20, 女 20) 例, 年龄  $(33.7 \pm 9.2)$  岁。所有病例均符合 2003 年中华医学会呼吸病学分会哮喘学组制定的支气管哮喘防治指南<sup>[5]</sup>中规定的诊断标准。其中急性发作期 20 例, 该组患者中, 轻度 12 例, 重度 8 例; 非急性发作期 20 例。正常对照组: 健康献血者 40 (男 22, 女 18) 例, 年龄  $(30.5 \pm 8.8)$  岁, 均无近期感染及过敏性疾病史。

## 1.2 方法

**1.2.1 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T 细胞的测定** 分别采集哮喘患者及健康献血者外周静脉血 2 mL, 肝素抗凝, 取肝

素抗凝的全血 100  $\mu$ L,加入 CD4- PE 和 CD25- FITC 单克隆抗体 20  $\mu$ L, IgG1- PE 和 IgG1- FITC 作为同型对照,室温闭光反应 30 min,加 2 mL 溶血剂在室温下溶解红细胞约 10 min, PBS 洗涤,离心 5 min(1500 r/min)弃上清,每份标本加入 1 g/L 多聚甲醛 500  $\mu$ L 后用流式细胞仪检测.流式细胞仪为 Beckman-CoulterXL100(Coulter 公司产品).

1.2.2 IL-4, IL-5 的测定 清晨取静脉血 3 mL,离心后取血清,置于  $-70^{\circ}\text{C}$  冰箱冻存.血清 IL-4, IL-5 的测定采用 ELISA 法.试剂盒购自上海森雄公司.操作步骤严格按说明书进行.

统计学处理:实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,使用 SPSS12.0 统计软件进行两组间均数比较的  $t$  检验,  $\text{CD4}^+ \text{CD25}^+$  T 细胞百分率与 IL-4, IL-5 表达水平的关系采用秩相关分析,以  $P < 0.05$  认为差异显著.

## 2 结果

2.1 哮喘组和对照组  $\text{CD4}^+ \text{CD25}^+$  T 细胞百分率及 IL-4, IL-5 的比较 哮喘患者外周血中  $\text{CD4}^+ \text{CD25}^+$  调节性 T 细胞占  $\text{CD4}^+$  T 细胞的百分比明显低于健康对照组,IL-4, IL-5 的表达水平明显高于健康对照组.性别、年龄与  $\text{CD4}^+ \text{CD25}^+$  T 细胞及 IL-4, IL-5 表达不相关(表 1).

表 1 哮喘组和对照组  $\text{CD4}^+ \text{CD25}^+$  T 细胞百分率及 IL-4, IL-5 的比较 ( $n=40, \bar{x} \pm s$ )

组别	$\text{CD4}^+ \text{CD25}^+$ (%)	IL-4 (ng/L)	IL-5 (ng/L)
哮喘	$3.1 \pm 1.9^b$	$26.5 \pm 13.6^b$	$68.6 \pm 18.3^b$
对照	$8.3 \pm 1.2$	$6.0 \pm 2.6$	$13.4 \pm 6.1$

<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 对照.

2.2 不同临床分期哮喘组  $\text{CD4}^+ \text{CD25}^+$  T 细胞百分率及 IL-4, IL-5 的比较 急性发作期哮喘患者外周血中  $\text{CD4}^+ \text{CD25}^+$  调节性 T 细胞比率明显低于非急性发作期哮喘患者,IL-4, IL-5 的表达水平高于非急性发作期患者(表 2).

表 2 急性发作期和非急性发作期  $\text{CD4}^+ \text{CD25}^+$  T 细胞百分率及 IL-4, IL-5 的比较 ( $n=20, \bar{x} \pm s$ )

组别	$\text{CD4}^+ \text{CD25}^+$ (%)	IL-4 (ng/L)	IL-5 (ng/L)
急性发作期	$1.7 \pm 0.8^b$	$37.2 \pm 10.2^b$	$83.9 \pm 11.2^b$
非急性发作期	$4.9 \pm 1.2$	$15.8 \pm 6.0$	$53.4 \pm 8.6$

<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 非急性发作期.

2.3 急性发作期哮喘患者  $\text{CD4}^+ \text{CD25}^+$  T 细胞百分

率与 IL-4 表达水平的相关性分析 20 例急性发作期哮喘患者 IL-4 的表达水平为  $(37.2 \pm 10.2)$  ng/L,与  $\text{CD4}^+ \text{CD25}^+$  T 细胞百分率呈负相关( $r_s = -0.675, P < 0.01$ ),即随着哮喘患者外周血  $\text{CD4}^+ \text{CD25}^+$  T 细胞数量的减少,其 IL-4 的表达水平升高(图 1).

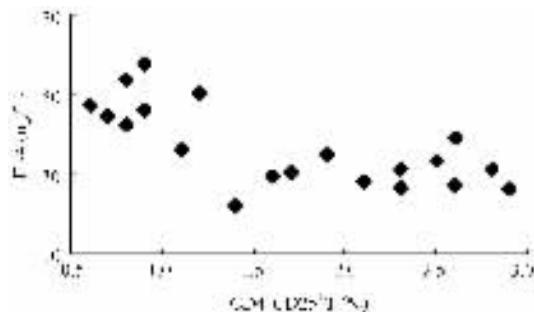


图 1 急性发作期哮喘患者  $\text{CD4}^+ \text{CD25}^+$  T 细胞百分率与 IL-4 表达水平的相关性

2.4 急性发作期哮喘患者  $\text{CD4}^+ \text{CD25}^+$  T 细胞百分率与 IL-5 表达水平的相关性分析 20 例急性发作期哮喘患者 IL-5 的表达水平为  $(83.9 \pm 11.2)$  ng/L,与  $\text{CD4}^+ \text{CD25}^+$  T 细胞百分率呈显著负相关( $r_s = -0.767, P < 0.01$ ),即随着哮喘患者外周血  $\text{CD4}^+ \text{CD25}^+$  T 细胞数量的减少,其 IL-5 的表达水平升高(图 2).

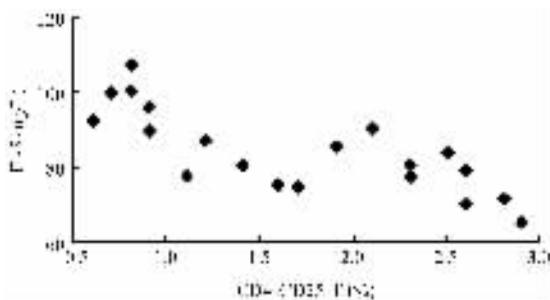


图 2 急性发作期哮喘患者  $\text{CD4}^+ \text{CD25}^+$  T 细胞百分率与 IL-5 表达水平的相关性

## 3 讨论

目前普遍认为哮喘是一种慢性气道炎症,有多种炎症细胞、炎性介质和细胞因子参与其炎症过程.随着免疫学及分子生物学研究的深入,越来越多的证据表明免疫功能紊乱在哮喘发病机制中起着重要作用.

$\text{CD4}^+ \text{CD25}^+$  调节性 T 细胞是 1995 年 Sakaguchi 等首次报道的具有独特免疫调节作用的一种专职抑制细胞<sup>[6]</sup>.  $\text{CD4}^+ \text{CD25}^+$  调节性 T 细胞最初来源于胸腺,随后可以在外周性免疫器官持续产生.据研究

在人类健康个体的外周循环血中  $CD4^+CD25^+T$  细胞占  $CD4^+T$  细胞的 5% ~ 10%。这种细胞具有免疫无能性和免疫抑制性两大功能。其免疫无能性表现为对高浓度 IL-2 单独刺激,或经 TCR 刺激如可溶性或固相包被抗 CD3mAb 无反应(即无增殖性),也不分泌 IL-2,但对非 TCR 依赖性刺激则有正常反应,免疫抑制性表现在经 TCR 介导的信号刺激活化后不仅能抑制  $CD4^+$  和  $CD8^+T$  细胞的活化和增殖,还能抑制其免疫功能,且这种免疫抑制性不具有 MHC 限制性,能够抑制同种同型或同种异型 T 细胞的增殖。 $CD4^+CD25^+$  调节性 T 细胞的量很少,但其在自身免疫性疾病、移植排斥反应和过敏性疾病中发挥着重要作用<sup>[6-7]</sup>。

在哮喘炎症反应过程中 IL-4 被认为是起主导作用的因子,它不仅可以促进 B 细胞活化,使其高效合成分泌 IgE,还作用于  $CD4^+$  细胞促其转变成 Th2 表型细胞,而 IL-5 也是哮喘炎症中关键的调节因子,它的作用是促进嗜酸性粒细胞的分化、黏附,还可以通过诱导嗜酸性粒细胞释放炎症介质导致炎症反应<sup>[8-10]</sup>。

我们的实验表明,哮喘患者外周血中  $CD4^+CD25^+$  调节性 T 细胞明显低于健康对照者,急性发作期哮喘患者外周血中  $CD4^+CD25^+$  调节性 T 细胞明显低于非急性发作期哮喘患者,且随着疾病的加重呈明显减少趋势,而哮喘患者 IL-4、IL-5 的表达水平明显高于健康对照者,急性发作期患者 IL-4、IL-5 的表达水平高于非急性发作期。我们的实验还显示哮喘患者外周血  $CD4^+CD25^+T$  细胞与 IL-4、IL-5 的表达水平呈负相关。说明在哮喘发作期  $CD4^+CD25^+T$  细胞不能有效的抑制患者  $CD4^+T$  细胞的活化和增殖,导致哮喘患者外周血中活化的  $CD4^+T$  细胞比例明显增加并产生了 Th2 型细胞因子,使 IL-4、IL-5 分泌增多,引发一系列免疫级联反应如这些细胞因子促进嗜酸性粒细胞聚集,增加嗜酸性粒细胞活性,促进

IgE 的产生,形成气道慢性炎症,气道反应性增高,从而导致了哮喘发作。

总之,我们的研究结果表明哮喘患者外周血中存在异常比例的  $CD4^+CD25^+T$  细胞,可能参与了哮喘的发生和发展,通过增强  $CD4^+CD25^+T$  细胞作用的治疗可能成为哮喘治疗的有效手段。继续深入的研究将有助于我们更好的理解哮喘的发病机制,也将为哮喘的免疫治疗提供新的思路。

## 【参考文献】

- [1] Umetsu DT, Akbari O, Dekruyff RH. Regulatory T cells control the development of allergic disease and asthma[J]. J Allergy Clin Immunol, 2003, 112(3): 480-487.
- [2] Tsitoura DC, Blumenthal RL, Berry G, et al. Mechanisms preventing allergen-induced airways hyperreactivity: Role of tolerance and immune deviation[J]. J Allergy Clin Immunol, 2000, 106(2): 239-246.
- [3] Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, et al. Stimulation of  $CD4^+CD25^+$  Regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance[J]. Nat Immunol, 2002, 3: 135-142.
- [4] Pasare C, Medzhitou R. Toll pathway-dependent blockade of  $CD4^+CD25^+T$  cell-mediated suppression by dendritic cells[J]. Science, 2003, 299: 1033-1036.
- [5] 中华医学会呼吸病学分会哮喘学组. 支气管哮喘防治指南(支气管哮喘的定义、诊断、治疗及教育和管理方案)[J]. 中华内科杂志, 2003, 42(11): 817-818.
- [6] Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, et al. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cell expressing IL-2 receptor alpha-chains( $CD25$ )[J]. J Immunol, 1995, 160: 1151-1164.
- [7] Jonuleit H, Schnitt E, Stassen M, et al. Identification and functional characterization of human  $CD4^+CD25^+T$  cells with regulatory properties isolated from peripheral blood[J]. J Exp Med, 2001, 193: 1285-1294.
- [8] Ruffili A. Susceptibility genes for allergy and asthma[J]. Allergy, 1997, 52: 256-273.
- [9] Frew AJ, Dasmahapatra J. The role of T lymphocytes in allergic airway disease[J]. Thorax, 1995, 50(9): 919.