

糖皮质激素对重症肌无力患者外周血调节性 T 细胞中 Foxp3 及其胞内 CTLA-4 表达的影响

庄战强¹, 许文华¹, 吴元波¹, 张翠萍², 李庆², 任明山¹

摘要 目的 研究糖皮质激素治疗重症肌无力(MG)患者外周血 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞(Treg)中 Foxp3 和胞内 CTLA-4 的表达水平的变化。方法 收集 MG 患者 34 例,分为非治疗组 8 例和糖皮质激素治疗组 26 例。另将 20 例健康者设为对照组。采用流式细胞仪检测分析患者和健康者外周血 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞 Foxp3 和胞内 CTLA-4 的变化。结果 ① MG 非治疗组患者外周血 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞 Foxp3 和胞内 CTLA-4 水平较对照组显著下降($P < 0.05$); ② 糖皮质激素治疗能显著提升 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞 Foxp3 和胞内 CTLA-4 表达比例($P < 0.05$),但仍低于对照组($P < 0.05$); ③ CD4⁺CD25⁺Treg 细胞 Foxp3 和胞内 CTLA-4 表达呈正相关性($r = 0.870, P < 0.001$)。结论 MG 患者外周血 CD4⁺CD25⁺Treg Foxp3 和胞内 CTLA-4 呈低表达,糖皮质激素治疗能显著提升 Foxp3 和胞内 CTLA-4 表达水平,但尚未达正常者免疫状态。

关键词 重症肌无力; CD4⁺CD25⁺Treg; Foxp3; CTLA-4; 糖皮质激素

中图分类号 R 746.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)09-1297-04

重症肌无力(myasthenia gravis, MG)是主要由抗乙酰胆碱受体抗体介导的神经肌肉接头处功能障碍的一种器官特异性自身免疫性疾病。主要临床症状为骨骼肌无力和症状的波动性,部分患者可发生肌无力危象而危及生命,尤其以青壮年和老年人多见。尽管其发病机制仍未完全阐明,但是机体免疫耐受性的破坏是极为重要的,治疗以糖皮质激素和免疫球蛋白等调节免疫耐受的药物为主^[1]。CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞(regulatory cell, Treg)是负性调节免疫反应的 T 细胞亚群,具有免疫抑制作用和免疫无能性;在维持体内免疫耐受和免疫稳态方面起着关键作用。近年来, Treg 细胞数目和功能缺陷在 MG 发病机制中的重要作用屡见报道,但各研究结

果并不一致^[2-3],这可能与采用了不同分子标志来定义 Treg 细胞有关。因为单独依靠细胞表面分子定义 Treg 细胞并不能充分反映其功能状态。最新的研究^[4]显示胞内分子标志的 Foxp3 和 CTLA-4 水平可较好地反映 Treg 细胞功能状态。该研究通过观察 MG 患者和健康对照者外周血 CD4⁺CD25⁺Treg Foxp3 和胞内 CTLA-4 的水平及患者经糖皮质激素治疗后的变化,进一步探讨 MG 患者的免疫状态。

1 材料与方法

1.1 病例资料 选取 2014 年 1 月~2014 年 8 月安徽医科大学附属省立医院神经内科门诊及住院的 MG 患者共 34 例,年龄 17~61(41.0 ± 16.2)岁,男女性别比 13:21。患者均根据临床症状、体格检查、疲劳试验及新斯的明试验、乙酰胆碱受体抗体、重频刺激试验和肺部 CT 确诊为 MG,并排除了其他自身免疫性疾病、恶性肿瘤、严重感染、严重器官不全等患者。根据患者是否接受糖皮质激素治疗,分为非治疗组和糖皮质激素治疗组。另将 20 例健康体检者作为对照组,年龄 22~61(39.7 ± 12.6)岁,男女性别比 13:7。患者和对照者年龄差异无统计学意义($t = 0.301, P = 0.765$);两组男女性别比差异无统计学意义($\chi^2 = 3.613, P = 0.057$)。本研究得到安徽医科大学附属省立医院伦理委员会的批准,检查者均已签署书面知情同意书。

1.2 主要试剂和仪器 异硫氰酸荧光素(FITC)标记的抗人 CD25 单抗、多甲藻叶绿素蛋白(PerCP5.5)标记的抗人 CD4 单抗、藻红蛋白(PE)标记的抗人 Foxp3 单抗、别藻青蛋白(APC)标记的抗人 CTLA-4 抗体和同型阴性对照试剂购自美国 Beckman Coulter 公司;淋巴细胞分离液购自天津灏阳生物制品有限公司;超速冰冻离心机购自美国 Beckman Coulter 公司;CH-2 型显微镜购自日本 OLYMPUS 公司;流式细胞仪购自美国 BD 公司(Biosciences FAC-SCanto II)。

1.3 实验方法

1.3.1 标本采集 被检者均于早晨空腹抽取静脉

2015-03-10 接收

基金项目:安徽省青年科学基金项目(编号:11040606Q08)

作者单位:安徽医科大学附属省立医院¹神经内科、²中心实验室,合肥 230001

作者简介:庄战强,男,硕士研究生;

任明山,男,教授,硕士生导师,责任作者, E-mail: renmingshan2012@163.com

血 15 ml 注入肝素抗凝管中 标本均在 4 h 内送检。

1.3.2 荧光抗体染色 先从外周血提出单个核细胞悬液,调整单个核细胞浓度 约 1×10^6 /ml;取 2 只试管,分别加 100 μ l 细胞悬液和 CD4-PerCP5.5 单抗 20 μ l 检测管中加入 CD25-FITC 20 μ l 另一管中加入 IgG1-FITC 20 μ l 混匀;于 4 $^{\circ}$ C 冰箱,避光孵育 30 min;再加入 1 ml 冷 PBS 洗涤细胞,后加入新鲜配制的透膜固定液 1 ml 4 $^{\circ}$ C 冰箱中孵育 30 min。孵育后加入冷 PBS 1 ml,1 200 r/min 离心 10 min。弃上清液,混匀后 1 200 r/min 离心 5 min;再加入按 1:9 配制的透膜洗涤液 1 ml 共洗涤 2 次。弃上清液,分别留取 100 μ l 液体,检测管中加入 CTLA-4-APC 和 Foxp3-PE 各 10 μ l,另一管加入 IgG1-APC 和 IgG2a-PE 充分吹打混匀后 4 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。孵育后再加入透膜洗涤液 1 ml,1 200 r/min 离心 10 min。弃上清液,加入 500 μ l PBS 重悬,立即上机检测。

1.3.3 流式细胞仪检测 首先对流式细胞仪进行光流路质量调控和荧光补偿,确保仪器各项指标在质量控制允许范围内。根据前向散射光(FSC)和侧向散射光(SSC)圈定淋巴细胞通过 CD4⁺ 细胞进行设门,根据同型对照确定各相应荧光的阈值。每份标本获取设门内细胞在 20 000 以上。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行分析,数据均符合正态分布,连续性资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间均数的比较采用两独立样本 *t* 检验,率的比较采用 χ^2 检验;多组间均数比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 法。部分指标采用 Pearson 直线相关分析。

2 结果

2.1 MG 患者非治疗组与对照组 CD4⁺ CD25⁺ Treg 中 Foxp3 和胞内 CTLA-4 的表达水平比较 与对照组相比,非治疗组 MG 患者外周血 CD4⁺ CD25⁺ Treg 中 Foxp3 和 CTLA-4 的表达比例显著下降,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1、图 2。

2.2 糖皮质激素对 MG 患者 CD4⁺ CD25⁺ Treg 中 Foxp3 和胞内 CTLA-4 的表达水平的影响 糖皮质激素治疗组 MG 患者外周 CD4⁺ CD25⁺ Treg 中

Foxp3 和胞内 CTLA-4 的表达比例显著高于非治疗组,差异有统计学意义($P < 0.05$);但仍低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1、图 2。

2.3 MG 患者 CD4⁺ CD25⁺ Treg 中 Foxp3 和胞内 CTLA-4 表达水平的相关性分析 对 CD4⁺ CD25⁺ Treg Foxp3 和胞内 CTLA-4 两个指标采用 Pearson 直线相关分析,结果显示 Foxp3 和 CTLA-4 的表达呈正相关性($r = 0.870, P < 0.001$),见图 1。

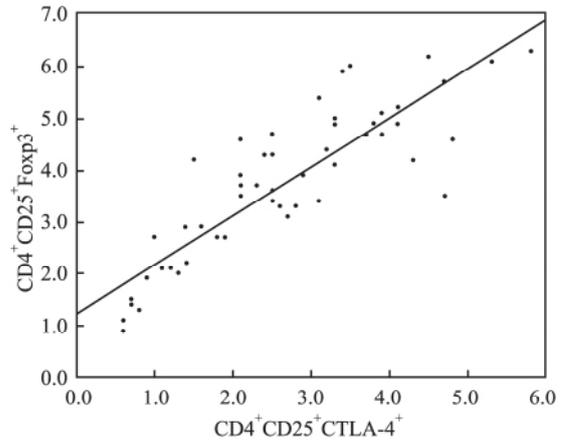


图 1 CD4⁺ CD25⁺ Treg 中 Foxp3 和胞内 CTLA-4 表达的相关性分析

3 讨论

Treg 是负性调节免疫炎症反应的细胞,其能够抑制辅助性 T 细胞的效应,维持免疫耐受。Treg 细胞受损可使 MG 患者体内炎症反应加剧,免疫耐受破坏^[5]。故 Treg 细胞可能是 MG 患者免疫耐受重建的一个非常关键性靶点,其对于研究 MG 患者的免疫耐受相关机制具有一定的临床意义。

Treg 细胞是一组异质性的细胞亚群,具有复杂的表型特征。这可能是 Treg 细胞在 MG 患者研究中尚有争议的原因之一。Foxp3 是细胞核内的一种转录因子,也是 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞最具特异性的分子标志,其在 Treg 细胞发育、发展和功能中起着关键作用;且 Foxp3 的异位表达能赋予效应性 T 细胞免疫抑制效能,Foxp3 被认为是 Treg 细胞功能的最主要调节因子^[6]。细胞毒性 T 淋巴细胞抗原

表 1 各组外周血 treg 检测结果($\bar{x} \pm s, \%$)

项目	非治疗组(n=8)	糖皮质激素治疗组(n=26)	对照组(n=20)	F 值	P 值
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ 占 CD4 ⁺ 细胞比例	1.51 \pm 0.46	3.63 \pm 1.33* #	4.58 \pm 0.92*	22.13	<0.001
CD4 ⁺ CD25 ⁺ CTLA-4 ⁺ 占 CD4 ⁺ 细胞比例	0.84 \pm 0.22	2.44 \pm 1.07* #	3.22 \pm 1.11*	15.73	<0.001

与非治疗组比较: * $P < 0.05$; 与对照组比较: # $P < 0.05$

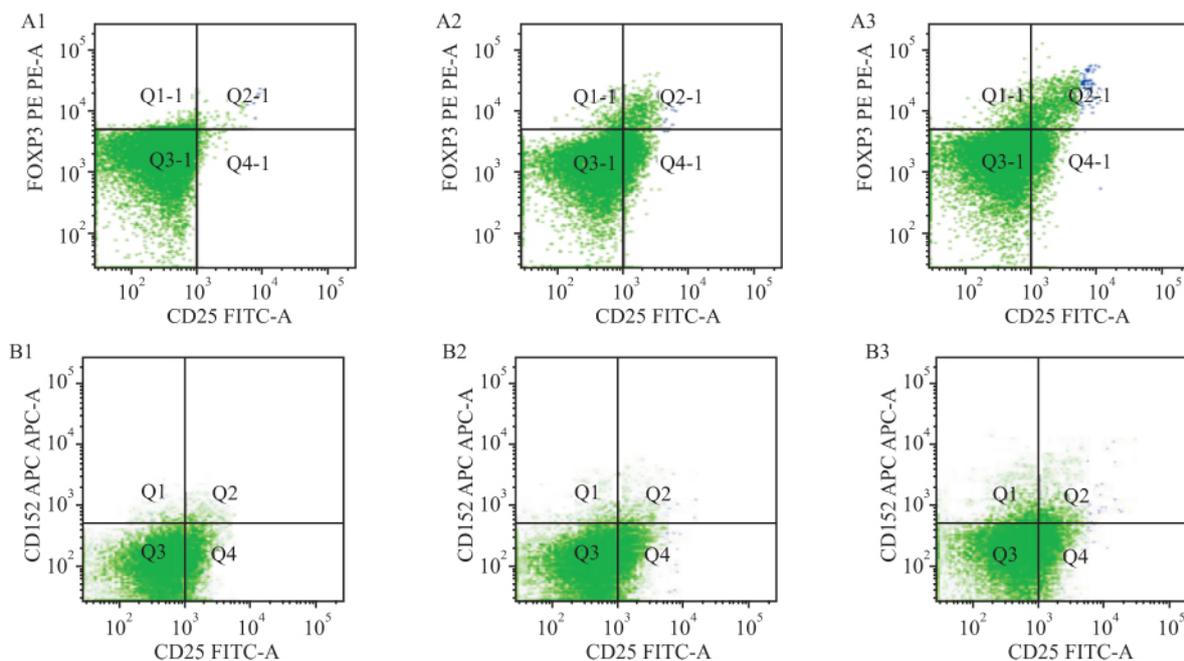


图2 各组外周血 Treg 表达的流式图

A (Q2-1) : $CD4^+ CD25^+ Foxp3^+$ Treg; B (Q2) : $CD4^+ CD25^+ CTLA-4^+$ Treg; 1: 非治疗组; 2: 糖皮质激素治疗组; 3: 对照组

(CTLA-4 或 CD152) 是一种负性调节分子, $CD4^+ CD25^+$ Treg 细胞主要依赖 CTLA-4 直接接触方式介导抑制 T 细胞的活化和增殖^[7]。而其并不能稳定表达于细胞表面, 而是快速往复地循环于细胞膜表面和胞质内, 贮存于 Treg 细胞的膜下囊泡中^[8]。因此细胞内高表达 CTLA-4 是 Treg 细胞的表型特征之一, 其表达水平能够反映其潜在的功能状态。MG 是神经内科经典的自身免疫性疾病, 至今其确切的发病机制尚不清楚, Treg 细胞的功能受损一直是 MG 发病机制研究的热点^[9]。

本实验结果显示非治疗组 $CD4^+ CD25^+ Foxp3^+$ Treg 细胞和 $CD4^+ CD25^+ CTLA-4^+$ Treg 百分比均较对照组下降。表明 MG 患者外周血 $CD4^+ CD25^+$ Treg 细胞功能受损和免疫抑制作用下降, 从而导致了体内免疫耐受破坏, 与研究^[10]一致。而 $CD4^+ CD25^+ CTLA-4^+$ Treg 比例下降表明 Treg 胞内 CTLA-4 贮存量下降, 可能限制了 $CD4^+ CD25^+$ Treg 通过 CTLA-4 与靶细胞 CD80 和 CD86 分子结合的能力, 减弱抑制效应性 T 细胞增殖和活化的能力。研究^[11]显示肿瘤患者外周血 $CD4^+ CD25^+$ Treg 免疫抑制作用增强与其胞内高表达 CTLA-4 有关。因此, MG 患者 $CD4^+ CD25^+$ Treg 胞内 CTLA-4 表达量减少可能减弱了 $CD4^+ CD25^+$ Treg 潜在的免疫抑制作用, 限制了其免疫负性调节能力。

研究^[12]显示人类体内 CTLA-4 分子低表达可以

引起 $Foxp3^+$ Treg 功能调节异常、效应性 T 细胞超活化和靶器官淋巴细胞浸润。研究^[13]显示 Treg 细胞内 $Foxp3$ 基因能促进 CTLA-4 等基因转录, 从而阻断 CTLA-4 表达, 使 Treg 细胞抑制作用明显下调。故分析表明, $Foxp3$ 的调节性活性可能是通过 CTLA-4 实现的。本研究结果显示 MG 患者外周血 Treg 细胞 $Foxp3$ 和胞内 CTLA-4 的表达存在正相关性, 这可能由于 $Foxp3$ 可能直接指导 CTLA-4 表达有关。CTLA-4 可能是代表 $Foxp3^+$ Treg 细胞抑制活性的重要分子, 但 CTLA-4 和 $Foxp3$ 之间的确切关系有待进一步研究。

本研究表明糖皮质激素可以显著提升 MG 患者外周血 $CD4^+ CD25^+$ Treg 细胞 $Foxp3$ 和 CTLA-4 的表达比例, 与研究^[14]结果一致。糖皮质激素可能通过对细胞核内糖皮质激素受体作用, 直接上调 $Foxp3$ 和胞内 CTLA-4 表达, 和(或)通过诱导耐受树突状细胞, 促进 Treg 细胞的免疫抑制活性^[15]。但是, 糖皮质激素治疗组 $CD4^+ CD25^+$ Treg 细胞 $Foxp3$ 和胞内 CTLA-4 表达均未达到健康者水平, 表明该药并不能完全恢复 Treg 细胞功能。这也可能是 MG 患者肌无力症状并不能完全缓解, 需要长期服用糖皮质激素维持治疗的原因。

综上所述, 本研究表明患者外周血 Treg 细胞低表达 $Foxp3$ 和胞内 CTLA-4 分子, 糖皮质激素显著提升两者表达, 为进一步阐明 MG 的免疫机制提供了

一定的研究证据。

参考文献

- [1] Hoffmann S, Kohler S, Ziegler A, et al. Glucocorticoids in myasthenia gravis—if, when, how, and how much? [J]. *Acta Neurol Scand* 2014, 130(4): 211–21.
- [2] Xu W H, Zhang A M, Ren M S, et al. Changes of Treg-associated molecules on CD4⁺ CD25⁺ Treg cells in myasthenia gravis and effects of immunosuppressants [J]. *J Clin Immunol* 2012, 32(5): 975–83.
- [3] Masuda M, Matsumoto M, Tanaka S, et al. Clinical implication of peripheral CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells and Th17 cells in myasthenia gravis patients [J]. *J Neuroimmunol* 2010, 225(1–2): 123–31.
- [4] Tang A L, Teijaro J R, Njau M N, et al. CTLA4 expression is an indicator and regulator of steady-state CD4⁺ FoxP3⁺ T cell homeostasis [J]. *J Immunol* 2008, 181(3): 1806–13.
- [5] Li X L, Liu Y, Cao L L, et al. Atorvastatin-modified dendritic cells *in vitro* ameliorate experimental autoimmune myasthenia gravis by up-regulated Treg cells and shifted Th1/Th17 to Th2 cytokines [J]. *Mol Cell Neurosci* 2013, 56: 85–95.
- [6] Cretney E, Kallies A, Nutt S L. Differentiation and function of Foxp3⁺ effector regulatory T cells [J]. *Trends Immunol* 2013, 34(2): 74–80.
- [7] Sojka D K, Hughson A, Fowell D J. CTLA-4 is required by CD4⁺ CD25⁺ Treg to control CD4⁺ T-cell lymphopenia-induced proliferation [J]. *Eur J Immunol* 2009, 39(6): 1544–51.
- [8] Tai X, Van Laethem F, Pobezinsky L, et al. Basis of CTLA-4 function in regulatory and conventional CD4⁺ T cells [J]. *Blood* 2012, 119(22): 5155–63.
- [9] Hori S, Sakaguchi S. Foxp3: a critical regulator of the development and function of regulatory T cells [J]. *Microbes Infect* 2004, 6(8): 745–51.
- [10] Zhang Y, Wang H B, Chi L J, et al. The role of FoxP3⁺ CD4⁺ CD25^{hi} Tregs in the pathogenesis of myasthenia gravis [J]. *Immunol Lett* 2009, 122(1): 52–7.
- [11] Kono K, Kawaida H, Takahashi A, et al. CD4⁺ CD25^{high} regulatory T cells increase with tumor stage in patients with gastric and esophageal cancers [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2006, 55(9): 1064–71.
- [12] Kuehn H S, Ouyang W, Lo B, et al. Immune dysregulation in human subjects with heterozygous germline mutations in CTLA-4 [J]. *Science* 2014, 345(6204): 1623–7.
- [13] Wu Y, Borde M, Heissmeyer V, et al. FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT [J]. *Cell* 2006, 126(2): 375–87.
- [14] Zhang L, Liu J, Wang H, et al. Double filtration plasmapheresis benefits myasthenia gravis patients through an immunomodulatory action [J]. *J Clin Neurosci* 2014, 21(9): 1570–4.
- [15] Luther C, Adamopoulou E, Stoeckle C, et al. Prednisolone treatment induces tolerogenic dendritic cells and a regulatory milieu in myasthenia gravis patients [J]. *J Immunol* 2009, 183(2): 841–8.

Expression alteration of Foxp3 and intracellular CTLA-4 of regulatory T cells in peripheral blood of myasthenia gravis patients under glucocorticoids treatment

Zhuang Zhanqiang, Xu Wenhua, Wu Yuanbo, et al

(Dept of Neurology, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001)

Abstract Objective To study the expression alteration of Foxp3 and intracellular CTLA-4 of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in peripheral blood of myasthenia gravis patients under glucocorticoids treatment. **Methods** 34 patients with myasthenia gravis were selected, and subgrouped with no treatment group (8 cases) or glucocorticoids treatment group (26 cases). Another 20 healthy subjects were set as the control group. 6-color flow cytometry was used to analyze the expression of Foxp3 and intracellular CTLA-4 of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in their peripheral blood of participants. **Results** ① Compared with the control group, the level of Foxp3 and intracellular CTLA-4 of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in peripheral blood of in no treatment group were significantly decreased ($P < 0.05$). ② the level of Foxp3 and intracellular CTLA-4 of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in peripheral blood of patients with glucocorticoids treatment group were significantly higher than that of no treatment group ($P < 0.05$), but were still lower than that of the control group ($P < 0.05$). ③ Foxp3 expression was positively correlated with intracellular CTLA-4 expression in CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells of patients with myasthenia gravis ($r = 0.870, P < 0.001$). **Conclusion** Low expression of Foxp3 and intracellular CTLA-4 of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in peripheral blood is present in patients with myasthenia gravis, glucocorticoids could significantly increase the expression of Foxp3 and intracellular CTLA-4, however, which still do not reach the immune state of healthy subjects.

Key words myasthenia gravis; CD4⁺ CD25⁺ Treg; Foxp3; CTLA-4; glucocorticoids