

Graves' 病患者 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞功能初探孙伟莉^{1,2}, 申 勇², 李卫鹏², 袁 媛², 张林杰¹

摘要 目的 探讨调节性 T 细胞(Treg)在 Graves' 病(GD)发生中所起的作用。方法 流式细胞术检测 20 例 GD 患者(GD 组)和 10 例健康对照者(健康对照组)外周血 Treg 数量。³H 掺入试验测定 Treg 与效应 T 细胞(Teff)共培养环境中的 Treg 对其增殖抑制作用,ELISA 法测定白细胞介素-10(IL-10)、白细胞介素-2(IL-2)等细胞因子的浓度。结果 Treg 所占 CD4⁺ 细胞的比例在 GD 组与健康对照组中差异无统计学意义。GD 组的 Treg 抑制功能与健康对照组相比显著降低。两组之间的细胞因子浓度有一定的差异,GD 组 IL-10 水平显著低于健康对照组,IL-2 和白细胞介素-17(IL-17)水平显著高于健康对照组。结论 GD 患者的 Treg 有功能缺陷,与甲状腺自身免疫性疾病的发病有一定的关系。Treg 在 GD 中的诊断价值以及病理生理机制值得进一步探讨。

关键词 Graves' 病;调节性 T 细胞;效应 T 细胞

中图分类号 R 392.6

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)02-0202-04

Graves' 病(Graves' disease, GD)是一种常见的甲状腺疾病,主要表现为机体对甲状腺抗原的免疫耐受消失、淋巴细胞浸润甲状腺组织。GD 作为一种自身免疫性甲状腺疾病(autoimmune thyroid disease, AITD)是由于免疫调节失衡所致。调节性 T 细胞(regulatory T cells, Tregs)是具有免疫调节功能的细胞亚群,该细胞亚群具有维持免疫耐受作用:抑制免疫反应,防止自身免疫疾病的发生。Tregs 通过细胞与细胞的直接接触^[1],或通过产生具有免疫抑制的细胞因子如转化生长因子-β(transforming growth factor β, TGF-β)和白细胞介素-10(interleukin-10, IL-10)抑制抗原特异性 T 细胞,发挥免疫抑制作用^[2-3]。该研究旨在通过检测分析 GD 患者外周血 Tregs 的数量以及功能状况,探讨该细胞亚群在 GD 发生发展中所起的作用,为该疾病的临床诊治提供参考。

2014-10-15 接收

基金项目:安徽省高校省级自然科学基金(编号:KJ2011A167)

作者单位:¹安徽医科大学基础医学院免疫学教研室,合肥 230032

²安徽蚌埠医学院第一附属医院核医学科,蚌埠 233004

作者简介:孙伟莉,女,主管技师,硕士研究生;

张林杰,男,教授,硕士生导师,责任作者, E-mail: zlj33@

sina.com

1 材料与方法

1.1 病例资料 GD 患者 20 例作为 GD 组,其中男 5 例,女 15 例,年龄 20~57(41.1±10.1)岁。诊断标准为甲状腺激素的血清学指标,即依据游离三碘甲状腺原氨酸(free iodine thyroid three original acid, FreeT3)、游离甲状腺素(free thyroxine, FreeT4)、促甲状腺激素(thyroid-stimulating hormone, TSH)以及促甲状腺激素受体抗体(thyrotropin receptor antibody, TRAb)检测结果。患者排除心、肝、脾、肺、肾等脏器病变。健康体检者 10 例作为健康对照组,其中男 3 例,女 7 例,年龄 18~59(37.7±12.7)岁,无家族病史,排除重要脏器病变;甲状腺球蛋白抗体和甲状腺过氧化物酶抗体均为阴性。两组之间年龄、性别相匹配,差异无统计学意义。

1.2 试剂和仪器 异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记的鼠抗人 CD4 抗体、藻红蛋白(P-phycoerythrin, PE)标记的鼠抗人 CD25 抗体及其相匹配的同型对照、FACS Aria 型流式细胞仪均购自美国 BD 公司;RPMI 1640 培养液及胎牛血清购自美国 Hyclone 公司;³H 胸腺嘧啶核苷(³H-thymidine, ³H-TdR)购自中国科学院上海核技术开发公司;TGF-β、IL-10 等细胞因子 ELISA 试剂盒购自美国 R&D 公司。

1.3 细胞分离与流式分析 采集实验对象外周静脉血,肝素钠抗凝。加入 Ficoll 分离液,密度梯度离心(2 000 r/min, 20 min)获得单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)。其中一部分 PBMCs 接受 30 Gy 的¹³⁷Cs 照射,作为后续免疫学试验的抗原递呈细胞(antigen-presenting cells, APC);另一部分采用 FITC 标记 anti-CD4, PE 标记 anti-CD25, 流式细胞仪分选, CD4⁺ CD25⁺ 细胞作为试验中的 Tregs, CD4⁺ CD25⁻ 细胞作为试验中的效应 T 细胞(T effector, Teff), 纯度均 >95%。

1.4 细胞增殖试验 新鲜分离的 Teff(CD4⁺ CD25⁻)和 Tregs(CD4⁺ CD25⁺)按照不同比例(20 000:0, 20 000:5 000 以及 20 000:10 000)在含有完全 RPMI 1640 培养液(含有 10% 的胎牛血清)的 96 孔圆底培养板中共培养。培养板采用抗

CD3(每孔 0.2 μg)包板,每孔含有可溶性 anti-CD28 为 0.05 μg,同时每孔加入辐照的 PBMCs 50 000 个,作为实验的 APC。置于 37 °C、5% CO₂ 的湿润环境中培养。于培养第 4 天,收集培养液上清液用于细胞因子检测。同时,每孔加入 ³H-TdR 18 500 Bq,继续培养 16~18 h。收集细胞 β 液体闪烁仪检测,通过每分钟计数值(counts per minutes, cpm)判定细胞增殖程度。增殖百分率(%)=(共培养孔的 cpm 值/单独 Teff 的 cpm 值)×100%。

1.5 细胞因子检测 收集各个培养孔中的培养液上清,检测 TGF-β、IL-10、IL-4、IL-17、IL-5、IL-2 以及干扰素-γ(interferon-γ, IFN-γ)。试验设置复孔。严格按照说明书进行操作。

1.6 统计学处理 应用 SPSS 16.0 统计软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组之间的比较采用 Mann-Whitney 检验,多组之间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 基本临床资料比较 GD 组与健康对照组相比, GD 组 FreeT3、FreeT4、TRAB 水平明显高于健康对照组 ($P < 0.01$), TSH 水平明显低于健康对照组 ($P < 0.01$)。两组年龄、性别比较,差异无统计学意义。见表 1。

表 1 基本临床资料比较($\bar{x} \pm s$)

项目	GD 组 (n=20)	健康对照组 (n=10)	P 值
年龄(岁)	41.1 ± 10.1	37.7 ± 12.7	0.43
性别(女/男)	15/5	7/3	1.00
甲状腺肿大(+/-)	20/0	0/10	-
FreeT3	14.90 ± 7.45	2.91 ± 0.43	<0.01
FreeT4	3.36 ± 1.22	1.05 ± 0.09	<0.01
TSH	0.03 ± 0.03	2.05 ± 1.43	<0.01
TRAB	10.76 ± 10.43	0.71 ± 0.33	<0.01

2.2 两组外周血 CD4⁺CD25⁺ 占 CD4⁺ 百分比比较 GD 组和健康对照组外周血 CD4⁺ 细胞比例及 CD4⁺CD25⁺ 细胞数占 CD4⁺ 细胞比例比较,两组之间差异无统计学意义。见表 2、图 1。

表 2 两组外周血 CD4⁺ 细胞及 CD4⁺CD25⁺/CD4⁺ 百分率的比较($\bar{x} \pm s$)

项目	GD 组 (n=20)	健康对照组 (n=10)	P 值
CD4 ⁺ 细胞	32.99 ± 9.50	30.79 ± 8.97	0.61
CD4 ⁺ CD25 ⁺ /CD4 ⁺	8.20 ± 0.70	8.30 ± 0.80	0.73

2.3 CD4⁺CD25⁺ Tregs 对 Teff 的抑制功能

Tregs 的抑制功能体现在对 Teff 增殖的抑制上。实验结果显示, GD 组和健康对照组的 Teff 在单独培养的情况下,经过 anti-CD3、anti-CD28 及自身 APC 的共同作用,两组的 cpm 值分别为 (34 152 ± 5 836)、(33 286 ± 6 820),差异无统计学意义 ($P = 0.783$)。当比例为 20 000 : 10 000 时, GD 组的 Teff 增殖率为 (75.53 ± 6.49)%, 而健康对照组 Teff 增殖率为 (33.50 ± 6.82)%, GD 组增殖率明显增高 ($P = 0.001$)。当比例为 20 000 : 5 000 时, GD 组的 Teff 增殖率为 (79.61 ± 8.12)%, 而健康对照组 Teff 增殖率为 (38.54 ± 6.78)%, GD 组增殖率明显增高 ($P = 0.001$)。提示 GD 组患者的 Tregs 的抑制功能低于健康对照组。见图 2。

2.4 细胞因子浓度检测 通过检测培养液中的细胞因子的浓度,健康对照组的 IL-10 水平显著高于 GD 组 ($P < 0.05$),健康对照组的 IL-2、IL-17 水平显著低于 GD 组 ($P < 0.05$); 两组间其他细胞因子差异无统计学意义。见表 3。提示 IL-10、IL-2 和 IL-17 有可能与 Tregs 发挥抑制作用有一定关系。

3 讨论

Tregs 在维持免疫耐受、抑制过度免疫应答中起

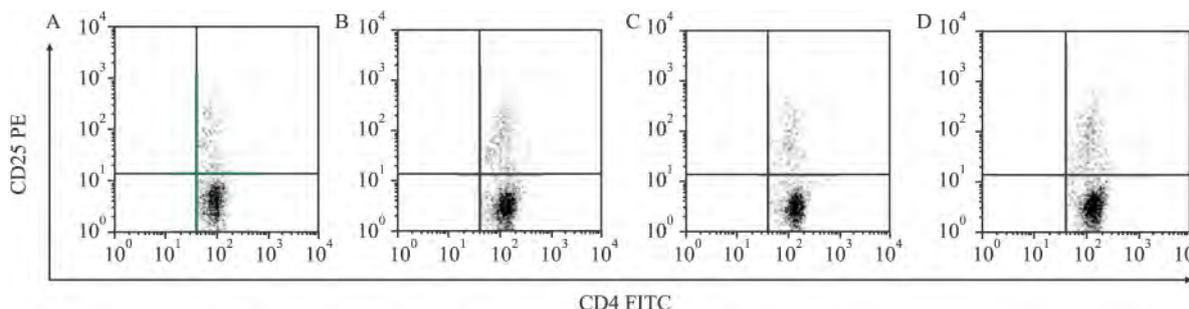


图 1 CD4⁺CD25⁺ 所占 CD4⁺ 细胞的比值

A: 健康对照组; B、C、D: GD 组

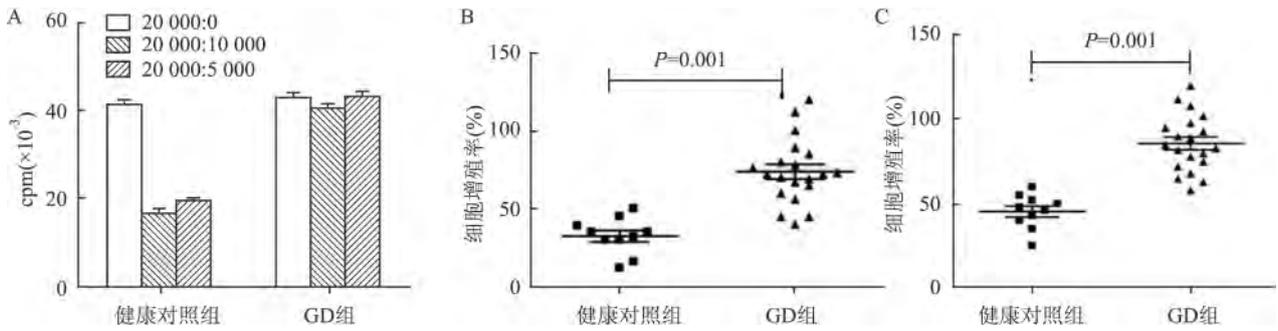


图2 GD 组和健康对照组 CD4⁺ CD25⁺ Tregs 对自身 CD4⁺ CD25⁻ T 细胞的抑制功能比较

A: GD 组和健康对照组 Tregs 和 Teff 混合培养时的 Teff 增殖程度; B: Tregs 为 20 000: 10 000 时 GD 组和健康对照组的 Teff 增殖率; C: Tregs 为 20 000: 5 000GD 组和健康对照组时的 Teff 增殖率

表3 培养液中的细胞因子浓度 (pg/ml)

细胞因子	组别	Teff: Treg		P 值
		20 000 : 0	20 000 : 10 000	
TGF-β	健康对照	908.11 ± 363.02	832.42 ± 355.44	0.340
	GD	942.27 ± 125.64	916.29 ± 98.60	0.360
IL-10	健康对照	140.92 ± 50.10	181.22 ± 63.27	0.440
	GD	114.91 ± 27.33	131.40 ± 29.66*	0.165
IL-4	健康对照	38.16 ± 22.79	43.19 ± 26.28	0.343
	GD	21.28 ± 5.69	23.53 ± 5.37	0.397
IFN-γ	健康对照	34 716.07 ± 18 320.12	57 681.26 ± 31 642.32	0.343
	GD	34 125.08 ± 15 319.14	25 732.09 ± 10 662.41	0.432
IL-2	健康对照	986.23 ± 693.50	298.41 ± 215.73	0.042
	GD	1 510.18 ± 419.83	524.60 ± 222.11*	0.023
IL-5	健康对照	20.12 ± 14.25	38.22 ± 13.17	0.202
	GD	18.25 ± 9.27	29.72 ± 10.53	0.284
IL-17	健康对照	331.52 ± 152.60	589.12 ± 252.62	0.046
	GD	290.92 ± 114.70	912.22 ± 254.63*	0.023

与健康对照组比较: * P < 0.05

到至关重要的作用^[4-5]。研究^[6-7]报道 Tregs 在 1 型糖尿病、多发性硬化病、风湿性关节炎等自身免疫性疾病中存在缺陷,而对于 AITD 中的 Tregs 的研究较少,且观点不一。

本研究 GD 组外周血 Tregs 占 CD4⁺ 细胞的百分比与健康对照组相比差异无统计学意义,提示 GD 的发病并非是由于 Tregs 的数量改变所导致。本研究以 Tregs 对 Teff 增殖的影响分析了 GD 患者外周血中的 Tregs 功能,结果显示 GD 组与健康对照组的 Teff 在单独培养时其增殖程度是相当的;然而当将 Teff 与 Tregs 混合培养时, GD 组 Teff 的增殖率明显高于健康对照组,提示 GD 患者的 Tregs 对淋巴细胞增殖的控制抑制作用显著降低,淋巴细胞的增殖活化能力活跃,对自身抗原的耐受降低,这可能是 GD 发病的重要因素之一。

研究^[1-3]报道 Tregs 通过细胞-细胞接触以及分泌细胞因子发挥抑制作用。故而本研究进一步探

讨了细胞因子 TGF-β、IL-10、IL-4、IL-17、IL-5、IL-2 和 IFN-γ 与 Tregs 功能之间的可能关系。在本实验中分别检测了 GD 组和健康对照组中的 Teff 单独培养以及 Teff 与 Tregs 混合培养时这些细胞因子的水平,结果显示 IL-10、IL-2 以及 IL-17 在 GD 组和健康对照组的 Teff 与 Tregs 混合培养中差异有统计学意义。GD 组的 IL-10 明显低于健康对照组, IL-10 作为一种负性调节因子,具有较强的免疫抑制以及免疫调控作用,主要可以抑制 Teff 的增殖和抑制 Teff 产生细胞因子如 IL-2,提示 GD 组的 Tregs 功能降低与 IL-10 水平下降有一定的关系。IL-2 作为重要的细胞生长因子,可以促进细胞增殖。当 GD 组的 Tregs 功能降低,分泌的 IL-10 减少,不能有效抑制 Teff 的活化,产生 IL-2,从而促进 Teff 的增殖,又产生更多的 IL-2。本研究中 GD 组的 IL-2 明显高于健康对照组也论证了此机制。IL-17 是由最新发现的一类辅助型 T 细胞(helper T cell, Th) 17 分泌的,能诱导炎症因子以及趋化因子的表达,使得更多的免疫细胞到达炎症部位加剧机体的炎症反应,较高水平的 IL-17 提示 Tregs 对 Th17 的抑制作用减弱^[8-9]。在本研究中,观察到 GD 组 IL-17 水平高于健康对照组,也证实了 GD 组的 Tregs 存在功能缺陷。

在分析 Tregs 抑制功能的 Teff 增殖试验中,本研究采用的刺激物有 anti-CD3、anti-CD28,同时采用辐照的 PBMCs 作为 APC,即 GD 组采用 GD 患者自身的 PBMCs 作为 APC,而健康对照组采用健康个体自身的 PBMCs 用做 APC, APC 在细胞增殖中起至关重要的作用,而且不同个体 APC 的主要组织相容性复合体不尽相同。有研究^[10-11]报道显示, APC 与自身免疫疾病有一定的关系,主要组织相容性复合体分子表型可以影响细胞的增殖以及细胞因子的生

成^[12-14]。GD组与健康对照组的Teff增殖是否与APC有一定关系,有待于在以后的GD动物模型试验中进一步探讨。

本研究显示GD患者外周血中的Tregs数量并未发生明显改变,而GD患者的Tregs功能存在缺陷,提示这可能与GD发生有一定关系。对于GD患者,针对性的采取纠正Tregs的靶向治疗,能否使得GD患者好转乃至痊愈,值得进一步探讨。

参考文献

- [1] Shevach E M. Mechanisms of foxp3⁺ T regulatory cell mediated suppression[J]. *Immunity* 2009, 30(5): 636-45.
- [2] Piccirillo C A. Regulatory T cells in health and disease[J]. *Cytokine*, 2008, 43(3): 395-401.
- [3] Tang Q, Bluestone J A. The Foxp3⁺ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation[J]. *Nat Immunol*, 2008, 9(3): 239-44.
- [4] Brusko T M, Putnam A L, Bluestone J A. Human regulatory T cells: role in autoimmune disease and therapeutic opportunities[J]. *Immunol Rev* 2008, 223: 371-90.
- [5] Chatenoud L, Salomon B, Bluestone J A. Suppressor T cells—they're back and critical for regulation of autoimmunity[J]. *Immunol Rev* 2001, 182: 149-63.
- [6] Marazuela M, García-López M A, Figueroa-Vega N, et al. Regulatory T cells in human autoimmune thyroid disease[J]. *J Clin Endocrinol Metab* 2006, 91(9): 3639-46.
- [7] Mao C, Wang S, Xiao Y, et al. Impairment of regulatory capacity of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells mediated by dendritic cell polarization and hyperthyroidism in Graves' disease[J]. *J Immunol*, 2011, 186(8): 4734-43.
- [8] Voo K S, Wang Y H, Santori F R, et al. Identification of IL-17-producing FOXP3⁺ regulatory T cells in humans[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(12): 4793-8.
- [9] Beriou G, Costantino C M, Ashley C W, et al. IL-17-producing human peripheral regulatory T cells retain suppressive function[J]. *Blood* 2009, 113(18): 4240-9.
- [10] Brusko T M, Hulme M A, Myhr C B, et al. Assessing the *in vitro* suppressive capacity of regulatory T cells[J]. *Immunol Invest*, 2007, 36(5-6): 607-28.
- [11] Jin Y, Chen X, Podolsky R, et al. APC dysfunction is correlated with defective suppression of T cell proliferation in human type 1 diabetes[J]. *Clin Immunol* 2009, 130(3): 272-9.
- [12] Hashimoto S, Michalski J P, Berman M A, et al. Mechanism of a lymphocyte abnormality associated with HLA-B8/DR3: role of interleukin-1[J]. *Clin Exp Immunol*, 1990, 79(2): 227-32.
- [13] Walldén J, Ilonen J, Roivainen M, et al. Effect of HLA genotype or CTLA-4 polymorphism on cytokine response in healthy children[J]. *Scand J Immunol* 2008, 68(3): 345-50.
- [14] Lio D, Candore G, Romano G C, et al. Modification of cytokine patterns in subjects bearing the HLA-B8, DR3 phenotype: implications for autoimmunity[J]. *Cytokines Cell Mol Ther*, 1997, 3(4): 217-24.

Study on the function of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in patients with Graves' disease

Sun Weili^{1,2}, Shen Yong², Li Weipeng², et al

(¹Dept of Immunology, Anhui Medical University, Hefei 230032; ²Dept of Nuclear Medicine, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233004)

Abstract Objective To investigate the role of regulatory T cells (Tregs) in Graves' disease (GD). **Methods** Treg number was assessed by flow cytometric analysis in samples from 20 GD patients and 10 healthy controls. The inhibitory effect of Treg on T effector cells (Teff) was assayed by ³H thymidine proliferation experiment. IL-10, IL-2 and other cytokine levels were determined by ELISA in conditioned media from the co-cultures. **Results** No differences were found in the frequency of Tregs as a percentage of CD4⁺ cells between GD and healthy controls. Compared with the healthy controls, inhibitory function of Treg from patients with GD decreased significantly. Cytokine secretion between two groups also had significant difference. IL-10 secretion of healthy control group was significantly higher than patients group, while secretion of IL-2 and IL-17 was significantly lower than patients group. **Conclusion** Tregs from GD patients are partly dysfunctional, possibly explaining their autoimmunity. Future work will elucidate the diagnostic potential and pathophysiology of Tregs in GD.

Key words Graves' disease; regulatory T cells; T effector cells