

• 论 著 •

移植患者 CD4⁺CD25⁺CD127^{low} 调节性 T 细胞、 TGF-β1 及 IL-10 的表达

周文超¹, 黄生耀¹, 李 薇^{2△}, 熊小敏³, 蔡祥胜⁴, 郭 煜⁴, 冯红梅⁴, 徐晓松⁴, 陈思聪⁴

(1. 沈阳急救中心 急诊科, 辽宁沈阳 110000; 2. 广州军区广州总医院/广州军区检验中心, 广东广州 510010; 3. 东莞仁康医院检验科, 广东东莞 523952; 4. 广东药科大学附属第一医院检验科, 广东广州 510080)

摘 要:目的 观察肝肾移植患者外周血中调节性 T 细胞(Treg 细胞)的百分比与转化生长因子 β1(TGF-β1)及白细胞介素 10(IL-10)水平的表达情况及其相关性。**方法** 15 例移植患者的外周静脉血, 采用流式细胞术检测 CD4⁺CD25⁺CD127^{low} Treg 细胞的百分比, 并以 20 例体检健康者为对照组; 用酶联免疫吸附试验法检测移植患者血清中细胞因子 TGF-β1、IL-10 的水平, 分析这 2 种细胞因子水平与 CD4⁺CD25⁺CD127^{low} Treg 细胞百分比的关系及移植前后 TGF-β1、IL-10 水平的差异。**结果** 与对照组比较, 移植患者移植前 CD4⁺CD25⁺CD127^{low} Treg 细胞占 CD4⁺ T 淋巴细胞的百分比明显升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 肝肾移植后 CD4⁺CD25⁺CD127^{low} Treg 细胞百分比下降为 0。肝肾移植前 CD4⁺CD25⁺CD127^{low} Treg 细胞百分比与 TGF-β1、IL-10 的水平呈正相关($P < 0.05$)。TGF-β1、IL-10 的水平移植后低于移植前, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** CD4⁺CD25⁺CD127^{low} Treg 的百分比与 TGF-β1、IL-10 的水平存在一定相关性; 移植后 CD4⁺CD25⁺CD127^{low} Treg 细胞百分比下降为 0, 可能与应用大量免疫抑制剂有关。

关键词: CD4⁺CD25⁺CD127^{low} 调节性 T 细胞; 细胞因子; 流式细胞术; 外周血

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2020.02.023

中图法分类号: R735.7; R737.11

文章编号: 1673-4130(2020)02-0221-04

文献标识码: A

The expression of CD4⁺CD25⁺CD127^{low} regulatory T cells and TGF-β1, IL-10 in peripheral blood of transplanted patients

ZHOU Wenchao¹, HUANG Shengyao¹, LI Wei^{2△}, XIONG Xiaomin³, CAI Xiangsheng⁴,
GUO Yu⁴, FENG Hongmei⁴, XU Xiaosong⁴, CHEN Sicong⁴

(1. Department of Emergency, Shenyang Emergency Center, Shenyang, Liaoning 110000, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Region/Guangzhou Military Inspection Center, Guangzhou, Guangdong 510010, China; 3. Department of Clinical Laboratory, Dongguan Renkang Hospital, Dongguan, Guangdong 523952, China; 4. Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou, Guangdong 510080, China;)

Abstract: Objective To observe the percentage of regulatory T cells (Treg cells) in peripheral blood of liver and kidney transplantation patients and the expression of transforming growth factor transforming growth factor beta 1 (TGF-β1) and interleukin 10 (IL-10) concentrations and its correlation. **Methods** Peripheral venous blood of 15 transplanted patients was collected and the percentage of CD4⁺CD25⁺CD127^{low} Treg cells was detected by flow cytometry, 20 healthy subjects were selected as the control group. Serum concentrations of cytokines TGF-β1 and IL-10 were detected by ELISA, and the relationship between the concentrations of these two cytokines and the percentage of CD4⁺CD25⁺CD127^{low} Treg cells was analyzed, as well as the differences between the concentrations of TGF-β1 and IL-10 before and after transplantation were analyzed. **Results** Compared with the healthy control group, the percentage of CD4⁺CD25⁺CD127^{low} Treg cells in CD4⁺ T lymphocytes of the transplanted patients before transplantation was significantly increased, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). After liver and kidney transplantation, the percent-

作者简介: 周文超, 女, 主管技师, 主要从事免疫学、免疫细胞在临床的应用及价值研究。 △ **通信作者,** E-mail: lw7517366@163.com。

本文引用格式: 周文超, 黄生耀, 李薇, 等. 移植患者 CD4⁺CD25⁺CD127^{low} 调节性 T 细胞、TGF-β1 及 IL-10 的表达[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(2): 221-223.

age of CD4⁺CD25⁺CD127^{low}Treg cells decreased to 0. Before liver and kidney transplantation, the percentage of CD4⁺CD25⁺CD127^{low}Treg cells was positively correlated with the concentration of TGF-β1 and IL-10 ($P<0.05$). The concentration of TGF-β1 and IL-10 after transplantation was lower than that before transplantation, and there was no significant difference ($P>0.05$). **Conclusion** There was a certain correlation between the percentage of CD4⁺CD25⁺CD127^{low}Treg and the concentrations of TGF-β1 and IL-10. The percentage of CD4⁺CD25⁺CD127^{low}Tre cells decreased to 0 after transplantation, which may be related to the application of a large number of immunosuppressive agents.

Key words:CD4⁺CD25⁺CD127^{low} regulatory T lymphocyte cells; cytokines; flow cytometry; peripheral blood

目前,大量的动物实验及临床研究均表明,调节性 T 细胞(Treg 细胞)在移植免疫耐受的形成密切相关,一部分器官移植的受者逐渐对移植器官产生免疫耐受,将这部分受者血液中的 CD4⁺T 细胞被动地转移给其他宿主,也能获得同样的免疫耐受效果,此即“主动移植耐受”。Treg 细胞发挥免疫抑制功能与一些细胞因子,如白细胞介素(IL)-2、IL-10、转化生长因子 β(TGF-β)等^[1]。本研究通过分析肝肾移植患者前后外周血中 Treg 细胞的百分比的变化及细胞因子的表达,进一步了解 Treg 和细胞因子与移植免疫耐受的相关性,为临床移植免疫耐受研究提供新思路。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2012 年 5—12 月广州军区广州总医院肝胆外科及泌尿外科肝肾移植患者 15 例为移植组。其中肾移植 7 例,肝移植 8 例;男 12 例,女 3 例;年龄 23~64 岁,平均 46 岁。

1.2 试剂 试剂为 CD4-FITC、CD25-PE、Mouse Anti-Human CD127-PerCP-CyTM5.5、MouseIgG1-PE、MouseIgG1-PerCP-Cy5.5、溶血剂、鞘液,均购自美国 BD Biosciences 公司。TGF-β1、IL-10 试剂盒均购自德国 IBL(IBL International GmbH)公司。

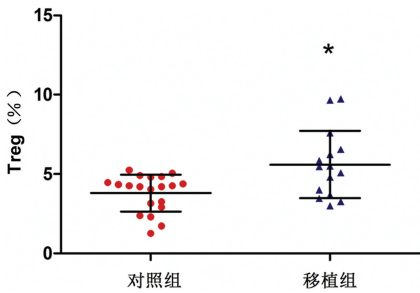
1.3 实验方法 清晨空腹采取静脉血 2 mL,用乙二胺四乙酸三钾(EDTA-K₃)抗凝,每份标本设测定、同型对照 2 管,分别于 2 管中各加入 100 μL 抗凝血后,于测定管中加入 CD4-FITC 10 μL、CD25-PE 10 μL、PerCP-CyTM 5.5 Mouse Anti-Human CD127 2 μL,同型对照加入 CD4-FITC、MouseIgG1-PE 各 10 μL, MouseIgG1 percp-Cy5.5 2 μL,振荡混匀,室温避光标记 15 min;加入 1 mL 溶血剂,振荡混匀,室温避光溶血 10 min;2 000 r/min 离心 2 min 弃上清液,加鞘液 1 mL,2 000 r/min 离心 2 min,弃上清液,加入鞘液 500 μL 充分混匀后上机分析。用酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒检测患者外周血血清中 TGF-β1、IL-10 的水平,操作按照试剂盒说明书进行。

1.4 统计学处理 应用 SPSS19.0 软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示;2 组间比较采用两独立样本 t 检验,治疗前后及同一患者的比较采用配对 t

检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。相关性分析时采用 Pearson 相关分析法, $P<0.05$ 为有相关性。

2 结果

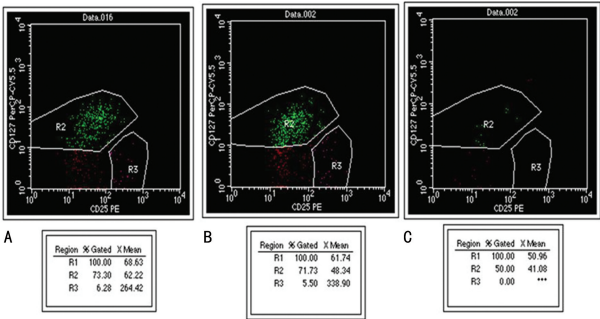
2.1 器官移植患者移植前与对照组 CD4⁺CD25⁺CD127^{low}Treg 细胞的比较 器官移植患者为 15 例,其中肾功能不全,尿毒症期肾移植为 7 例;肝癌肝硬化 8 例。移植组 CD4⁺CD25⁺CD127^{low}Treg 细胞百分比为(5.60±2.11)%,对照组为(3.80±1.15)%,差异有统计学意义($P=0.003$);移植组高于对照组,存在显著性差异。见图 1。



注:移植前与对照组比较,* $P<0.05$ 。

图 1 移植组移植前与对照组外周血中 CD4⁺CD25⁺CD127^{low}Treg 细胞的比较

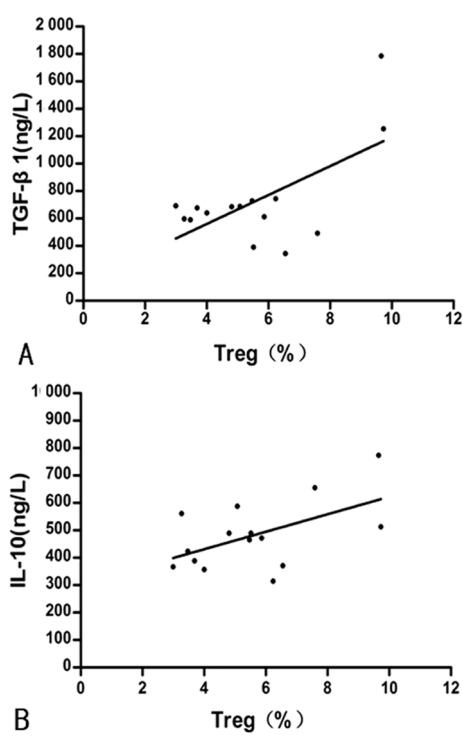
2.2 移植前与移植后 CD4⁺CD25⁺CD127^{low}Treg 细胞的比较 移植组 CD4⁺CD25⁺CD127^{low}Treg 细胞百分比为(5.60±2.11)%,移植后变为 0,CD4⁺CD25⁺CD127^{low}Treg 细胞移植前后存在显著性差异,其差值的均数为 5.60,标准差为 2.11。见图 2。



注:A、B 均为移植前 Treg 细胞的百分比;C 为移植后 Treg 细胞的百分比。

图 2 移植前与移植后 CD4⁺CD25⁺CD127^{low}Treg 细胞

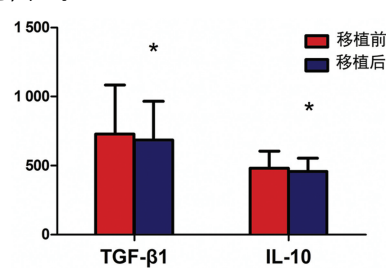
2.3 器官移植前 CD4⁺CD25⁺CD127^{low}Treg 细胞的百分比与 TGF-β1、IL-10 水平的相关性 移植前患者 CD4⁺CD25⁺CD127^{low}Treg 细胞的百分比为(5.60±2.12)%,TGF-β1 水平为(728.32±356.26)ng/L,IL-10 水平为(481.85±124.04)ng/L。TGF-β1 和 IL-10 的水平与 CD4⁺CD25⁺CD127^{low}Treg 细胞百分比均呈正相关($r=0.627, P=0.012; r=0.544, P=0.036$)。见图 3。



注:A 表示与 TGF-β1 的相关性;B 表示与 IL-10 的相关性。

图 3 移植前 Treg 细胞的百分比与 TGF-β1、IL-10 水平的相关性

2.4 器官移植前后 TGF-β1、IL-10 水平的比较 器官移植前 TGF-β1 水平为(728.32±356.26)ng/L,移植后 TGF-β1 水平为(685.46±281.06)ng/L,移植前高于移植后,经统计分析,差异无统计学意义($P=0.308$)。器官移植前 IL-10 水平为(481.85±124.04)ng/L,移植后水平为(458.51±95.89)ng/L,移植前高于移植后,经统计分析,差异无统计学意义($P>0.05$)。见图 4。



注:同一指标移植前后的比较,* $P>0.05$ 。

图 4 器官移植前后 TGF-β1、IL-10 细胞因子水平的比较

3 讨论

肝肾移植是治疗肝肾疾病终末期的有效治疗方法,能延长人的生命。Treg 及相关细胞因子可能与移植免疫耐受密切相关,研究移植后急性排斥反应的早期诊断,如何降低术后排斥反应的发生,诱导免疫耐受的形 成 仍 然 是 当 前 乃 致 今 后 一 段 时 间 在 此 领 域 的 研究热点。

相关的研究数据表明,肝移植术后,占比进行肝脏移植术总人数的 25%~33% 患者完全接受肝脏移植植物,这与其受体内 Treg 细胞的异常表达有关^[2]。诱导型 Treg 主要通过分泌细胞因子 IL-10 及 TGF-β 等发挥免疫抑制作用,IL-10 及 TGF-β 细胞因子在一定程度上也可诱导 Treg 的分化,两者相互作用^[3-4]。

罗文峰等^[5] 研究报道显示,肾移植术前第 1~2 天,急性排斥组和稳定组的 Treg 细胞水平比较差异有统计学意义($P<0.05$)。术后 4 周内 2 组 Treg 细胞水平均急剧下降。术后第 4~8 周,稳定组受者的 Treg 细胞水平开始回升,而急性排斥组继续下降。术后第 8~12 周,稳定组的 Treg 细胞水平明显回升,但排斥组则仍维持在较低水平,且此阶段 2 组 Treg 细胞水平的差异有统计学意义($P<0.05$)。

有研究发现,发生急性排斥反应的肝移植体患者体内 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞的量显著低于未发生排斥的患者,这表明提高受体循环中 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞的量可能有利于肝移植的存活。钟嘉明^[5] 的研究报道显示,肝移植术后,外周血 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞百分比暂时下降,1 年内逐渐恢复,其下降的原因可能与应用大量免疫抑制剂及激素有关。肝移植病人肝功能长期稳定时,外周血中的 Treg 细胞百分比与他克莫司血药浓度有关,高血药水平受者 Treg 细胞百分比显著降低,低血药水平受者 Treg 细胞水平虽有降低,但差异无统计学意义^[6]。

本研究结果显示,CD4⁺CD25⁺CD127^{low}Treg 细胞移植组显著高于对照组。肝移植患者中,都是肝癌患者,既往的研究中肝癌组高于健康人群。移植患者移植后 1、2、3 周后 CD4⁺CD25⁺CD127^{low}Treg 细胞下降为 0,与上述的报道存在差异^[7]。Treg 下降为 0,可能原因为:(1)移植术后,Treg 细胞重新分布于移植植物、外周血和淋巴组织中,引起外周血中 Treg 细胞水平降低;(2)急性排斥反应时,大量的炎症趋化因子使 Treg 细胞向移植物迁移,外周血中 Treg 细胞水平进一步降低;(3)应用大量的免疫抑制剂,可引起 Treg 细胞百分比降低。本研究观察到随着移植术成功至 6 周开始出现 Treg 细胞的表达,表达范围在 0~1%,由于时间短暂,患者出院,未能继续跟踪,但从移植后来院复查的患者中观察到,Treg 细胞在移植半年到 5 年后,表达范围在 3%~11%。(下转第 227 页)

160.

[5] 卫生部医疗服务标准专业委员会. 妊娠期糖尿病诊断标准; WS331-2011[S]. 北京: 中国标准出版社, 2011: 1-10.

[6] SABRY M M, MAHMOUD M M, SHOUKRY H S, et al. Interactive effects of apelin, renin-angiotensin system and nitric oxide in treatment of obesity-induced type 2 diabetes mellitus in male albino rats[J]. Arch Physiol Biochem, 2019, 125(3): 244-254.

[7] GAO L R, ZHANG N K, ZHANG Y, et al. Overexpression of apelin in Wharton' jelly mesenchymal stem cell reverses insulin resistance and promotes pancreatic β cell proliferation in type 2 diabetic rats[J]. Stem Cell Res Ther, 2018, 9(1): 339.

[8] SALMINEN A, KAUPPINEN A, KAARNIRANTA K. AMPK/Snf1 signaling regulates histone acetylation: impact on gene expression and epigenetic functions[J]. Cell Signal, 2016, 28(8): 887-895.

[9] 谢琴, 姜艳华, 黄红丽. Toll 样受体 4 在妊娠期糖尿病患者外周血和胎盘组织中的表达及意义[J]. 国际检验医学杂志 2017, 38(14): 1901-1903.

[10] 马丽媛, 李超, 王伟伟. 雌激素受体 β 基因 AluI, RsaI 位点多态性与妊娠期糖尿病易感性研究[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(9): 1062-1065.

[11] SUDMANT P H, RAUSCH T, GARDNER E J, et al. An integrated map of structural variation in 2 504 human genomes[J]. Nature, 2015, 526(7571): 75-81.

[12] 1 000 GENOMES PROJECT CONSORTIUM, ABECASIS GONCALO R, AUTON ADAM, et al. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes[J]. Nature, 2012, 491(7422): 56-65.

[13] SHEA J, AGARWALA V, PHILIPPAKIS A A, et al. Comparing strategies to fine-map the association of common SNPs at chromosome 9p21 with type 2 diabetes and myocardial infarction[J]. Nat Genet, 2011, 43(8): 801-805.

[14] HUANG J, LIANG X M, XUAN Y, et al. A reference human genome dataset of the BGISEQ-500 sequencer[J]. Gigascience, 2017, 6(5): 1-9.

[15] 汤冬玲. 妊娠糖尿病孕妇外周血中胎儿游离 DNA 的定量检测[J]. 中国优生与遗传杂志, 2010, 18(12): 23-25.

[16] 洪桂华, 林华, 董娴, 等. 无创 DNA 检测在产前诊断中的应用[J]. 中国优生与遗传杂志, 2018, 26(1): 66-67.

[17] BRISON N, NEOFYTOU M, DEHASPE L, et al. Predicting fetoplacental chromosomal mosaicism during non-invasive prenatal testing[J]. Prenat Diagn, 2018, 38(4): 258-266.

[18] NICOLAIDES K H, SYNGELAKI A, DEL MAR GIL M, et al. Prenatal detection of fetal triploidy from cell-free DNA testing in maternal blood[J]. Fetal Diagn Ther, 2014, 35(3): 212-217.

(收稿日期: 2019-06-22 修回日期: 2019-10-15)

(上接第 223 页)

器官移植前 $CD4^{+}CD25^{+}CD127^{low}$ Treg 细胞占 $CD4^{+}T$ 淋巴细胞百分比与 TGF- β 1、IL-10 水平呈正相关, 差异有统计学意义, 与于丹军等^[7]在妇科肿瘤研究结果相一致。表明 Treg 可能通过引起 TGF- β 、IL-10 上调而发挥免疫抑制的作用。

移植患者 TGF- β 1、IL-10 的水平下降, 移植前高于移植后, 但经统计分析, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。可能与移植前患者体内存在的 TGF- β 1、IL-10 水平有关。具体机制尚不清楚, 有待进一步的观察研究。

4 结 论

Treg 细胞及细胞因子在器官移植免疫中发挥着重要的作用, 本研究观察 Treg 细胞与细胞因子 TGF- β 1、IL-10 水平在移植前呈正相关。Treg 细胞在移植后数周下降为 0, 几周后缓慢出现表达, 细胞因子移植后下降。临床中有关 Treg 细胞与细胞因子在移植前后监测的数据稀少, 还需要更多的研究来明确这类细胞作为一种免疫指标的作用。

参考文献

[1] 夏志超, 曾仲. 调节性 T 细胞及其与移植免疫和肿瘤免疫

的研究进展[J]. 云南医药, 2016(4): 458-460.

[2] PILAT N, KLAUS C, SCHWARZ C, et al. Rapamycin and CTLA4Ig synergize to induce stable mixed chimerism without the need for CD40 blockade[J]. Am J Transplant, 2015, 15(6): 1568-1579.

[3] 罗文峰, 时军, 黄跃胜, 等. 调节性 T 细胞与肾移植急性排斥反应的关系[J]. 江西医药, 2014, 54(1): 9-11.

[4] 张慧芸, 娄金丽, 李宁, 等. $CD4^{+}CD25^{+}$ 调节性 T 细胞及其在肝移植后免疫耐受中的作用[J]. 北京医学, 2010, 32(9): 748-750.

[5] 钟嘉明. 肝移植受者外周血调节性 T 细胞变化及其临床意义[D]. 沈阳: 中国医科大学, 2009.

[6] 农村立, 龙腾河, 郭玺, 等. 肝移植组织中调节性 T 淋巴细胞的表达及分布[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(5): 903-906.

[7] 于丹军, 樊静, 胡月, 等. 妇科肿瘤患者外周血中调节性 T 细胞和血清中 TGF- β 、IL-10 的变化及相关性研究[J]. 河北医科大学学报, 2016, 57(11): 1307-1316.

(收稿日期: 2019-06-12 修回日期: 2019-10-14)