

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2796(2007)05-0398-03

人 CD4⁺ T 细胞在肠道细菌抗原刺激前后 CD25 与 FOXP3 的表达刘 香¹, 刘 凡², 胡刚正¹, 郑长青¹(¹ 中国医科大学盛京医院消化科, 辽宁 沈阳 110004, ² 沈阳医学院奉天医院消化科, 辽宁 沈阳 110024)**Expressions of CD25 and FOXP3 on human CD4⁺ T cells before and after challenged by enteric bacterial antigens**LIU Xiang¹, LIU Fan², HU Gang-Zheng¹, ZHENG Chang-Qing¹¹Department of Gastroenterology, Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, China, ²Department of Gastroenterology, Fengtian Hospital, Shenyang Medical College, Shenyang 110024, China

【Abstract】 AIM: To investigate expressions of CD25 and FOXP3 on human peripheral blood CD4⁺ T cells before and after activated by autologous enteric bacterial antigens. **METHODS:** Human peripheral blood lymphocytes and monocytes were isolated from 15 people. Some lymphocytes were co-cultured for 14 d with monocytes which were previously challenged by bacterial antigens from autologous intestine. The CD4, CD25 and FOXP3 were measured by flow cytometry on the freshly isolated and the co-cultured lymphocytes. **RESULTS:** Of the freshly isolated lymphocytes, about 43.4% expressed CD4. In the CD4⁺ T cells, the percentages of CD25⁺, CD25^{hi}, FOXP3⁺, CD25⁺FOXP3⁺, and CD25^{hi}FOXP3⁺ T cells were 5.8%, 1.9%, 5.2%, 3.3% and 1.6%, respectively. After *in vitro* challenged by autologous bacterial antigens, the total number of lymphocytes slightly increased (by 21.0%, $P < 0.001$ vs unchallenged cells). The percentage of CD4⁺ T cells elevated significantly (67.1% vs 43.4%, $P < 0.001$), while the percentages of CD25⁺, FOXP3⁺ and CD25⁺FOXP3⁺ T cells did not change significantly. The CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ T/CD4⁺CD25⁺ T or CD4⁺CD25^{hi}FOXP3⁺ T/CD4⁺CD25^{hi} T cell ratio decreased (the former from 59.8% to 52.0%; the latter from 86.3% to 77.9%, both $P < 0.05$). **CONCLUSION:** Both CD25 and CD25^{hi} are not the reliable markers of human regulatory T cells, especially when activated *in vitro* by bacterial antigens. The activation/proliferation of CD4⁺CD25⁺FOXP3⁻ T reactive cells predominates that of CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ T regulatory cells in response to the challenge of autologous bacterial antigens.

【Keywords】 regulatory T cells; CD25; FOXP3; enteric bacteria; antigen

【摘要】目的: 探讨新鲜分离及自身肠道菌群抗原刺激后的人外周血 CD4⁺ T 细胞 CD25 和 FOXP3 表达的相关性及变化规律。方法: 分离人的外周血单核细胞和淋巴细胞, 单核细胞经自身肠道菌群抗原刺激后与淋巴细胞混合培养, 新鲜分离及混合培养 14 d 的淋巴细胞用三色流式细胞术在单细胞水平同时检测 CD4, CD25 和 FOXP3 的表达。结果: 新鲜分离的淋巴细胞约 43.4% 表达 CD4, 在 CD4⁺ T 细胞中, 约 5.8% 表达 CD25, 而高表达的只有 1.9%, 约 5.2% 表达 FOXP3, CD25 和 FOXP3 均表达的占 3.3%, CD25^{hi}FOXP3⁺ 细胞占 1.6%, CD4⁻ 细胞几乎不表达 FOXP3。经抗原刺激后, 淋巴细胞总数均轻度增加(与未刺激组比较, 平均增加 21.0%, $P < 0.001$)。CD4⁺ 细胞的比例均明显上升(67.1% vs 43.4%, $P < 0.001$)。CD25⁺、FOXP3⁺ 及 CD25⁺FOXP3⁺ 细胞的比例变化不大。CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ T 细胞占 CD4⁺CD25⁺ T 细胞的比例及 CD4⁺CD25^{hi}FOXP3⁺ T 细胞占 CD4⁺CD25^{hi} T 细胞的比例在所有研究对象中均呈下降趋势(前者从 59.8% 降到 52.0%, 后者从 86.3% 降到 77.9%, 均 $P < 0.05$)。结论: CD25 和 FOXP3 的表达具有一定的相关性, 但 CD25 及 CD25^{hi} 均不能很可靠地标记人类的调节性 T 细胞, 尤其是在淋巴细胞受到抗原刺激以后。肠道菌群抗原作为外来抗原刺激自身的淋巴细胞后, 活化增殖的细胞中主要是 CD4⁺CD25⁺FOXP3⁻ 反应性 T 细胞, 而不是 CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ 调节性 T 细胞。

【关键词】 调节性 T 细胞; CD25; FOXP3; 肠杆菌科; 抗原

【中图分类号】 R503 **【文献标识码】** A

0 引言

近年有人用 CD25 的高表达(CD25^{hi})作为调节性 T 细胞的标记, FOXP3 是位于细胞核内的转录因子, 难以用来在单细胞水平分离和鉴定调节性 T 细胞^[1-2]。我们分离人的外周血淋巴细胞, 在体外培养中加自身肠道菌群抗原, 然后用三色流式细胞术在单细胞水平同时检测 CD4, CD25 和 FOXP3 的表达变化。

1 材料和方法

1.1 材料 人类调节性 T 细胞染色 Kit 购于 eBioscience 公司, 疱肉培养基基础及牛肉粒购于北京陆桥技术公司。RPMI 1640 液、胎牛血清、HEPES 及 10 × PBS 购于 Hyclone 公司。Lympholyte-H 液购于

收稿日期 2006-11-01; 接受日期 2006-11-30

基金项目 辽宁省科学技术计划项目资助(2003225007-4)

通讯作者: 刘 香, 博士生(导师郑长青), 主任医师。Tel: (024)

25704093 Email: zhwlx423@hotmail.com

Cedarlane 公司, Percoll 液购于 Amersham Bioscience 公司. DNase I 购于 Takara 公司. 考马斯亮蓝总蛋白定量试剂购于南京建成生物工程研究所. 研究对象共 15 人, 年龄 20~57 岁, 均做过电子肠镜检查, 其中 9 人检查出大肠息肉. 用肝素抗凝管采外周血 10 mL, 10 min 内用 RPMI 1640 (含 10 mmol/L HEPES, 100 kU/L 青霉素、30 mg/L 庆大霉素) 10 mL 稀释后加入 2 个 15 mL 离心管, 用连接 6 号加长针头的注射器抽 Lympholyte-H (1.077 kg/L), 每管 4 mL 缓慢加在稀释血液下面, 1200 r/min 离心 20 min, 取灰白层单个核细胞悬液, PBS 洗 2 次, 用 5 mL RPMI 1640 (含 100 mL/L 胎牛血清, HEPES 及双抗) 混悬细胞, 将低密度 Percoll (1068 kg/L, 335 mmol/L) 4 mL 和高密度 Percoll (1080 kg/L, 335 mmol/L) 2 mL 分层铺在细胞悬液下面, 2000 r/min 离心 15 min, 取低密度 Percoll 中段以上及至高密度 Percoll 中段的细胞悬液, 分别作为单核细胞和淋巴细胞, PBS 洗 2 次, 萘酚蓝染色计数活细胞均在 96% 以上, 取细胞悬液作离心涂片, Wrights-Giemsa 染色鉴定, 淋巴细胞和单核细胞的纯度分别在 97% 和 90% 以上.

1.2 方法 每个研究对象于肠镜下取结肠标本, 立即将其表面所带细菌接种到疱肉培养基 50 mL 中, 液体石蜡封闭, 37℃ 培养 48 h, 取菌液离心 (4000 r/min 20 min) 沉淀, 加去离子水 1.5 mL 及 DNase I 混悬 1667 nkat, 冰上超声破碎, 过滤除菌, 考马斯亮蓝法测总蛋白浓度. 细胞培养基为约含 100 mL/L 自身血浆的 RPMI 1640, 血液第 1 次离心后取灰白层以上的液体 10 mL, 过滤除去血小板, 加含双抗及 HEPES 的 RPMI 1640 至 40 mL 作为完全培养基. 单核细胞

以 1×10^5 个/孔加入 96 孔板, 并以 20 mg/L 加入自身来源的肠道厌氧菌群抗原, 对照孔不加细菌抗原, 16 h 后每隔 2 h 半量换液 1 次, 共 4 次, 以稀释除去细菌抗原, 然后按 8×10^4 /孔加入自身的淋巴细胞, 隔天半量换液 1 次, 混合培养的第 14 日计数细胞, 并收集淋巴细胞做流式细胞检测. 分离 2 d 及混合培养 14 d 的淋巴细胞用于流式细胞检测 CD4, CD25 及 FOXP3 的表达. 操作按照试剂盒说明.

统计学处理: 计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 计算用 SPSS 11.5 完成, 前后比较采用配对样本的 *t* 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义.

2 结果

新鲜分离的淋巴细胞约 43.4% 表达 CD4, CD4⁺ T 细胞中约 5.8% 表达 CD25, 而高表达的只有 1.9%, CD4⁺ T 细胞中约 5.2% 的细胞表达 FOXP3, CD25 和 FOXP3 均表达的占 3.3%, CD25^{hi} FOXP3⁺ 细胞占 1.6%, CD4⁻ 细胞几乎不表达 FOXP3. 所有对象的淋巴细胞在体外培养中经自身肠道菌群抗原刺激后, 细胞总数均轻度增加 (与未刺激组比较平均增加 21.0% $P < 0.001$). CD4⁺ 细胞的比例明显上升 (67.1%, $P < 0.001$, 表 1), CD25⁺, FOXP3⁺ 及 CD25⁺ FOXP3⁺ 细胞的比例变化不大. 无论 CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ T 细胞占 CD4⁺ CD25⁺ T 细胞的比例, 还是 CD4⁺ CD25^{hi} FOXP3⁺ T 细胞占 CD4⁺ CD25^{hi} T 细胞的比例, 在所有研究对象中均呈下降趋势 (前者从 59.8% 降到 52.0%, 后者从 86.3% 降到 77.9% $P < 0.05$).

表 1 细胞计数及流式细胞检测结果

($n=15$, %, $\bar{x} \pm s$)

组别	细胞总数	CD4 ⁺	CD25 ⁺ / CD4 ⁺	FOXP3 ⁺ / CD4 ⁺	CD25 ⁺ FOXP3 ⁺ / CD4 ⁺	CD25 ⁺ FOXP3 ⁺ / CD25 ⁺	CD25 ^{hi} / CD4 ⁺	CD25 ^{hi} FOXP3 ⁺ /CD4 ⁺	CD25 ^{hi} FOXP3 ⁺ /CD25 ^{hi}
未刺激	100	43.4±7.7	5.8±2.4	5.2±1.9	3.3±1.4	59.8±13.6	1.9±0.9	1.6±0.7	86.3±3.5
刺激后	121.0±0.2 ^b	67.1±7.4 ^b	6.8±2.6	4.6±2.0	3.5±1.6	52.0±12.5 ^a	2.7±1.5	2.1±1.2	77.9±9.0 ^a

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 未刺激.

3 讨论

CD25 是 CD4⁺ 调节性 T 细胞的标记, 新鲜活化的 CD4⁺ T 细胞虽也表达, 但无免疫抑制作用. 近年来, 有用 CD25^{hi} 作为调节性 T 细胞标记^[3-4], 最近 FOXP3 是调节性 T 细胞的最可靠标记^[5-6]. 我们用三色流式细胞术在单细胞水平同时检测 CD4, CD25 和 FOXP3 的表达变化, 发现 CD25 和 FOXP3 的表达具有一定的相关性. 新鲜分离的 CD4⁺ CD25⁺ T 细胞

中 59.8% 表达 FOXP3, 而 CD25^{hi} T 细胞中为 86.3%, 但是, 如果以 CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ T 细胞作为调节性 T 细胞的金标记, CD25^{hi} T 细胞只占调节性 T 细胞总数的 56.5%, CD4⁺ CD25⁺ T 细胞中非调节性 T 细胞占 40.2%. 淋巴细胞在自身肠道菌群抗原刺激后, CD4⁺ CD25⁺ 及 CD4⁺ CD25^{hi} T 细胞中 FOXP3 的表达均下降, 这说明抗原刺激后 CD25 与 FOXP3 表达的相关性下降. 因此, CD25 及 CD25^{hi} 均不能很可靠地标记人类的调节性 T 细胞, 尤其是在淋巴细胞受到

抗原刺激以后,我们选择混合培养 14 d 计数细胞并作流式细胞检测。抗原刺激后,淋巴细胞的数量比不加抗原孔增加约 21.0%,这说明部分淋巴细胞被活化增殖,但反应并不强烈。在所有研究对象中,CD4⁺CD25⁺或 CD4⁺CD25^{hi}T 细胞中 FOXP3 的表达均呈下降趋势,这提示肠道菌群抗原作为外来抗原刺激自身的淋巴细胞后,活化增殖的细胞中主要是 CD4⁺CD25⁺FOXP3⁻反应性 T 细胞,而不是 CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺调节性 T 细胞。

【参考文献】

[1] Lohr J, Knoechel B, Nagabhushanam V, et al. T-cell tolerance and autoimmunity to systemic and tissue-restricted self-antigens [J]. *Im-*

munol Rev, 2005 204 116-127.

[2] Schwartz RH. Natural regulatory T cells and self-tolerance [J]. *Nat Immunol*, 2005 6(4) 327-330.

[3] Maul J, Lodenkemper C, Mundt P, et al. Peripheral and intestinal regulatory CD4⁺CD25^(high)T cells in inflammatory bowel disease [J]. *Gastroenterology*, 2005 128(7) 1868-1878.

[4] Makita S, Kanai T, Oshina S, et al. CD4⁺CD25⁺ bright T cells in human intestinal lamina propria as regulatory cells [J]. *J Immunol*, 2004, 173(5):3119-3130.

[5] Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3 [J]. *Science*, 2003, 299(5609):1057-1061.

[6] Ziegler SF. FOXP3: Of mice and men [J]. *Annu Rev Immunol*, 2006 24 209-226.

编辑 黄良田

·经验交流· 文章编号 1000-2790(2007)05-0400-01

心脏瓣膜置换术 236 例术后并发症相关因素分析

张宝宁 张磊 何勇 雷军荣
(武警陕西总队医院心脏中心 陕西 西安 710054)

【关键词】心脏瓣膜疾病;人工瓣膜置换术;并发症
【中图分类号】R654.2 【文献标识码】B

0 引言 我院 2003-02/2006-05 收治 236 例心脏瓣膜疾病患者,均行人工心脏瓣膜置换手术,我们通过对临床资料分析,了解影响心脏瓣膜置换术后主要并发症发生的相关因素,总结临床经验,降低患者术后并发症及死亡率。

1 对象和方法

1.1 对象 本组 236(男 102,女 134)例,年龄 16~69(平均 45.8)岁,病程 1 mo~35 a。风湿性心脏病 213 例,先天性心脏病 23 例,术前 NYHA 分级心功能 II 级 122 例(58%),III 级 82 例(29%),IV 级 59 例(23%)。胸片示心胸比率 0.50~0.96,其中大于 0.7 者 51 例(12%)。心脏彩色超声心动图示左室舒张末径(LVEDD)56~78(平均 67.8±7.8)mm,中重度肺高压 24 例,术前有栓塞史 11 例,曾行二尖瓣闭式扩张术者 8 例。

1.2 方法 手术均在气管内插管静脉复合麻醉、中低温体外循环下进行,采用冷晶体诱停及温血主动脉根部或冠状静脉窦持续灌注方法,在心脏停跳下完成。其中二尖瓣置换术(MVR)96 例,主动脉瓣置换术(AVR)88 例,双瓣置换术 50 例,三尖瓣置换术(TVR)2 例,MVR 采用左心房切口入路 31 例次,采用右心房间隔切口入路 65 例次,AVR 均采用主动脉根部切口,本组二尖瓣置换采用带垫片褥式缝合 56 例,连续缝合瓣膜 40 例,主动脉瓣均采用间断带垫片褥式缝合。同期行三尖瓣成型术 55 例,Devege 法 36 例,Key 法 19 例,左房折叠 33 例,结扎左心耳 21 例。单瓣膜置换平均体外循环时间为(59±13)min,双瓣置换平均体外循环时间为(135±35)min,其中体外循环时间超过 120 min 者 39 例(13.7%),本组使用生物瓣 4 个,国产机械瓣 118 个,进口双叶机械瓣膜 164 个。

2 结果 本组早期生存 224 例,早期死亡 12 例,早期并发症发生种类、例数依次为:严重低心排综合征 19 例(27.5%),恶性心律失常 15 例(21.7%),呼吸衰竭 13 例(18.8%),肾功能严重损害 10 例(14.5%),以及多脏器功能衰竭 6 例(8.7%),

随访 212 例患者发生瓣周漏 5 例(2.4%),其中 1 例术后 4 mo 再次换瓣,其余 3 例密切随访。分析术前术中及术后主要因素与并发症发生关系,进行 χ^2 及 Logistic 多元回归分析,结果以下因素能够明显增加术后并发症及死亡率:①术前心功能差,心功能 III~IV;②心胸比率 > 0.7;③左室功能严重障碍,左室舒张末内径 ≥ 70 mm 或左室舒张末容积指数 ≤ 50 mL/m²;④术中心肌保护不良;⑤术中体外循环时间长等。

3 讨论 心脏瓣膜置换术治疗效果与患者病史、各重要器官功能状态、心脏病理改变、围术期处理等多种因素相关,通过对本组患者临床资料分析,以下因素与心脏瓣膜置换术后主要并发症发生有统计学意义:①心功能 III~IV 级。心功能 III~IV 级的患者多数存在病程长,曾反复心衰,须长期服用强心药及利尿剂,心功能储备较差,同时会影响肾脏、肝脏、肠道、肺等多器官功能,易伴发低蛋白血症及水、电解质紊乱等,术中、术后多应用大量正性肌力药物,使外周血管痉挛,导致顽固性酸中毒及代谢紊乱,可进一步影响心脏功能,导致急性心功能不全及肾功能衰竭等。②心肌保护不良。手术的成功与否不但与外科技术有关,术中心肌保护及术后处理亦相当重要^[1]。心肌保护不良是引起复跳困难、严重心律失常、低心排等并发症的重要原因,而术后低心排、严重心律失常又是引起患者术后早期死亡的主要原因之一,本组死亡病例原因中有低心排、严重心律失常的分别占 27.53%,21.74%。③体外循环时间过长(>120 min)。体外循环时间过长对人体各系统损害愈严重,使术后早期患者死亡率升高,低温及体外循环可使血细胞破坏,造成内环境条件恶化,血液残片样物质可加重肺功能损害,并易阻塞肾小管,引起急性肾功能衰竭^[2]。且较长阻断升主动脉后的心肌缺血损伤和再灌注损伤也是术后并发症高发的因素。④心胸比率 > 0.7 及左室舒张末内径 ≥ 70 mm。本组患者 3 例死于术后室性心律失常,这些患者术前均表现为心肺功能差,左室舒张末内径 ≥ 70 mm,心房纤颤,心胸比 > 0.7^[3],尤其是左心室扩大和肥厚可导致心肌间质纤维化,心肌相对性缺血等损害,引起左心室功能减退,导致开放循环后复跳难,术后心功能差,循环不稳定,并可引起药物无法纠正的反复室性心律失常,进而发生低心排综合征。

【参考文献】

[1] Guerra JM, Tomos MP, Permanyer-Miralda G, et al. Long term results of mechanical prosthesis for treatment of active infective endocarditis [J]. *Heart*, 2001 86(1) 63-83.

[2] 王志农,朱家麟,张宝仁,等.心脏瓣膜置换术后急性肾功能衰竭的高危因素分析[J].第二军医大学学报,1995,16(2):135-137.

[3] 左景珍,于昂,李卫民,等.702 例心脏瓣膜置换术及其主要并发症的临床分析[J].中华外科杂志,2002,40(5) 354-356.

编辑 袁天峰

收稿日期 2007-01-19; 接受日期 2007-01-31

作者简介 张宝宁,本科,医师。Tel (029) 82245615