



DOI:10.11817/j.issn.1672-7347.2014.06.006

www.csumed.org/xbwk/fileup/PDF/201406577.pdf

哮喘患者外周血Rho激酶及CD4⁺CD25⁺调节性T细胞测定

邓晓杰, 朱洪志, 吴尚洁

(中南大学湘雅二医院呼吸科, 长沙 410011)

[摘要]目的: 比较不同研究对象外周血Rho激酶及CD4⁺CD25⁺调节性T细胞的表达规律, 探讨Rho激酶和CD4⁺CD25⁺调节性T细胞在哮喘患者中的变化和相关性。**方法:** 选取中、重度哮喘患者16例, 健康对照组14例, 通过年龄、性别配对, ELISA测定所有研究对象血清Rho激酶水平, 流式细胞仪测定CD4⁺CD25⁺调节性T细胞水平, 所有研究对象经肺功能仪测定肺功能。**结果:** 哮喘组外周血Rho激酶表达水平高于对照组($P<0.05$), 外周血CD4⁺CD25⁺调节性T细胞水平低于对照组($P<0.05$); 两组外周血Rho激酶与肺功能第1秒用力呼气容积(forced expiratory volume in one second, FEV1)占预计值百分比(FEV1%)无相关关系($r=-0.491$, $P>0.05$); 两组外周血CD4⁺CD25⁺调节性T细胞水平与肺功能FEV1%呈轻度正相关关系($r=0.380$, $P=0.038$); 两组外周血Rho激酶与CD4⁺CD25⁺调节性T细胞水平无相关关系($r=-0.438$, $P>0.05$)。**结论:** 哮喘患者外周血Rho激酶水平升高, CD4⁺CD25⁺调节性T细胞水平降低, 可能在哮喘发病过程中起一定的作用。

[关键词] 哮喘; Rho激酶; CD4⁺CD25⁺调节性T细胞; 第1秒用力呼气容积

Measurement of Rho-kinase and CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in the peripheral blood in asthmatic patients

DENG Xiaojie, ZHU Hongzhi, WU Shangjie

(Department of Respiratory Diseases, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China)

ABSTRACT

Objective: To determine the levels of Rho-kinase and CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in patients with asthma, and the relationship between Rho-kinase and CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells.

Methods: We included 16 patients with moderate to severe asthma in the research group and 14 healthy people as the control group. The levels of Rho-kinase in the 2 groups were measured by ELISA. The level of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in the 2 groups was measured by flow cytometry. The pulmonary function was measured by spirometer.

Results: The level of Rho-kinase in the research group was higher than that in the healthy controls ($P<0.05$). The level of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in the healthy controls was higher than that of the research group ($P<0.05$). There was no correlation between the level of Rho-kinase

收稿日期(Date of reception): 2013-10-14

作者简介(Biography): 邓晓杰, 硕士, 主治医师, 主要从事呼吸系统疾病方面的研究。

通信作者(Corresponding author): 吴尚洁, Email: wushangjie@medmail.com.cn

基金项目(Foundation item): 湖南省自然科学基金(12JJ6084)。This work was supported by the Natural Science Fund of Hunan Province, P. R. China (12JJ6084).

in the peripheral blood of the 2 groups and forced expiratory volume at the first second/ forced vital capacity (FEV1%) ($r=-0.491, P>0.05$). The level of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in the peripheral blood of the 2 groups showed a positive correlation with FEV1% ($r=0.380, P=0.038$). There was no correlation between the level of Rho-kinase and the level of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in the peripheral blood of the 2 groups ($r=-0.438, P>0.05$).

Conclusion: Rho-kinase and CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells may play a key role in the pathogenesis of asthma.

KEY WORDS

asthma; Rho-kinase; CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells; FEV1

哮喘是由多种细胞(如嗜酸性粒细胞、肥大细胞、T淋巴细胞、中性粒细胞、气道上皮细胞等)和细胞因子参与的气道慢性炎症性疾病。这种慢性炎症与气道高反应性相关,通常出现广泛多变的可逆性气流受限,随病程的延长可产生气道不可逆性缩窄和气道重塑^[1]。RhoA/Rho激酶信号通路是机体各组织中普遍存在的信号转导通路,它伴随多种炎症介质和细胞因子受体后偶联机制的活化而激活,通过激酶级联反应直接参与细胞内微丝骨架构型的调控^[2]。近年来研究^[3]表明调节性T细胞(regulatory T cells, Treg)在哮喘的发病中发挥重要作用。而RhoA/Rho激酶信号通路被认为可以影响细胞移动、黏附、增殖、基因表达及对钙离子的敏感性收缩,是控制这些细胞行为的直接上游信号通路^[2]。本研究通过测定中、重度哮喘患者及健康人群外周血Rho激酶和CD4⁺CD25⁺调节性T细胞水平,比较两组研究对象外周血Rho激酶和CD4⁺CD25⁺调节性T细胞的表达规律,初步探讨Rho激酶和CD4⁺CD25⁺调节性T细胞在哮喘中的作用及其相关性。

1 对象与方法

1.1 对象

研究组:2012年8月至2012年12月在中南大学湘雅二医院呼吸科门诊就诊的慢性持续期中、重度哮喘患者。所有患者均符合中华医学会呼吸病学分会哮喘学组在2008年制定的支气管哮喘防治指南中哮喘的诊断标准及分级标准^[4],即患者有反复发作喘息、气急、胸闷或咳嗽,多与接触变应原、冷空气、理化刺激、上呼吸道感染、运动等有关,发作时在双肺可闻及散在或弥漫性,以呼气相为主的哮鸣音,呼气相延长,上述症状可经治疗缓解或自行缓解,除外其他疾病所引起的喘息、气急、胸闷或咳嗽,支气管舒张试验

阳性,吸入支气管扩张剂(沙丁胺醇400 μg)后第1秒用力呼气容积(forced expiratory volume at the first second, FEV1)占预计值百分比(FEV1%)较用药前增加≥12%,且其绝对值增加≥200 mL,中度哮喘患者FEV1% 60%~79%,重度哮喘患者FEV1% <60%。纳入的研究对象均排除合并心脑血管疾病、慢性肝病、结缔组织病、恶性肿瘤、消化系统疾病、急性感染性疾病及其他过敏性疾病等肺外疾病。如合并慢性支气管炎、支气管扩张、肺结核、肺栓塞等其他肺部疾病也不纳入本研究。在研究前1个月内未全身使用过激素或者免疫抑制剂,无手术、外伤史,且均无服用他汀类药物(该药物能降低Rho激酶活性^[5],增强Foxp3阳性CD4⁺CD25⁺调节性T细胞发育^[6])史。研究组共16例,男11例,女5例,年龄24~67(44±9)岁。

健康对照组:为同期门诊健康体检者,经问诊和常规体格检查排除肿瘤、全身各器官系统急、慢性疾病,肺功能及胸片检查正常,无过敏性疾病史。对照组共14例,男11例,女3例,年龄23~59(37±12)岁。

上述研究得到中南大学湘雅二医院伦理委员会批准同意。研究对象均签署知情同意书。

1.2 主要试剂、仪器

人血清Rho激酶ELISA试剂盒为美国R&D公司产品、荧光标记组合抗体人CD4FITC/CD25APC及红细胞裂解液为美国BD公司产品。Hypair M provo 2 medi soft 肺功能仪购自比利时麦迪公司;FACS Calibur流式细胞仪购自美国BD公司。

1.3 方法

1.3.1 肺功能检查

应用肺功能仪检测所有研究对象FEV1%值。检查前1 d所有研究对象未使用β₂-受体激动药、抗胆碱能药物、茶碱类药物以及糖皮质激素。

1.3.2 Rho 激酶水平测定

分别抽取各研究对象空腹静脉血 5 mL, 不抗凝, 室温放置 30 min 后, 1 800 r/min 离心 5 min, 吸取血清, 冻存于 -80 °C (避免反复冻融) 待集中测定。按照试剂盒操作说明应用 ELISA 检测血清 Rho 激酶水平。

1.3.3 外周血 CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞测定

用肝素抗凝真空采血管采集空腹静脉血 5 mL。首先加 10 μL 抗人 CD4FITC/CD25APC 抗体至流式管。另设空白对照管, 不加抗体。取 100 μL 全血至各流式管, 振荡 (用手指轻弹流式管底部), 用移液枪轻吹混匀。避光 (放抽屉) 常温孵育 30 min。加 1 mL 红细胞裂解液至各流式管, 振荡混匀 (方法同上, 注意不要在管底有沉淀)。避光孵育 10 min。1 800 r/min 离心 (离心半径为 11 cm) 5 min, 倒去上清液。加 500 μL PBS (常规 pH 及配方) 振荡后, 1 800 r/min 离心 5 min, 倒去上清液。加 PBS 200 μL, 调整细胞浓度至 1×10⁶ 后上机检测。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析。计量数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 各组计量数据先进行正态性检验和方差齐性检验, 凡符合正态分布和方差齐性的数据, 采用方差分析; 对不符合正态分布或方差齐性的数据, 则采用秩和检验。两组间比较采用两独立样本 *t* 检验。外周血 Rho 激酶、CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞与肺功能的相关分析采用一元相关与回归分析, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况比较

两组研究对象年龄、性别方面的差异无统计学意义 (*P* > 0.05), 对照组 FEV1% 明显高于研究组 (*P* < 0.05, 表 1)。

表 1 两组研究对象的一般情况 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of baseline characteristics between the 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	性别 (男 / 女)	年龄 / 岁	FEV1%
对照组	3/11	37 ± 12	105.38 ± 4.91
研究组	5/11	44 ± 9	59.93 ± 4.10*

与对照组比较, **P* < 0.05

2.2 外周血 Rho 激酶水平和 CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞水平的比较

研究组外周血 Rho 激酶水平明显高于对照组 [(428.30 ± 73.08) pg/mL vs (181.31 ± 30.15) pg/mL, *P* < 0.05], 研究组外周血 CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞水平明显低于对照组 [(8.38 ± 0.99)% vs (20.34 ± 2.80)%], *P* < 0.01)。

2.3 外周血 Rho 激酶、CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞水平与肺功能 FEV1% 相关性分析

外周血 Rho 激酶水平与肺功能 FEV1% 无相关关系 (*r* = -0.491, *P* > 0.05; 表 2, 图 1); 外周血 CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞水平与肺功能 FEV1% 呈轻度正相关关系 (*r* = 0.380, *P* = 0.038; 表 2, 图 1)。

2.4 外周血 Rho 激酶水平与 CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞水平相关性分析

外周血 Rho 激酶水平与 CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞水平无相关关系 (*r* = -0.438, *P* > 0.05; 表 2, 图 1)。

表 2 两组血 Rho 激酶水平、CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞水平与 FEV1% 相关性分析

Table 2 Correlations of the levels of Rho-kinase and CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in peripheral blood with FEV1%

对象	<i>r</i>	<i>P</i>
Rho 激酶与 FEV1%	-0.491	>0.05
T 调节细胞与 FEV1%	0.380	0.038
Rho 激酶与 T 调节细胞	-0.438	>0.05

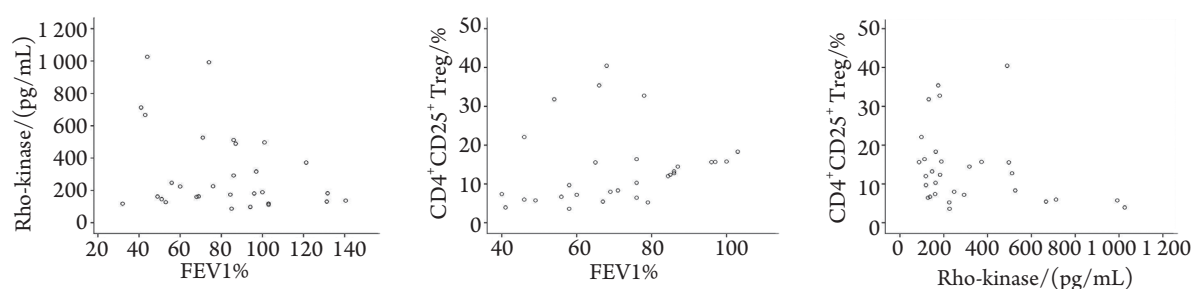


图 1 血 Rho 激酶水平、CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞水平与 FEV1% 相关性示意图

Figure 1 Linear correlation of the levels of Rho-kinase and CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in peripheral blood with FEV1% in all subjects

3 讨论

哮喘是一种复杂的气道炎症性疾病,以神经递质、炎症介质和吸入的收缩性刺激物导致支气管过度收缩为特征。气道炎症与气道重塑和气道高反应性有着密切的联系。一些炎症因子或炎性介质可引起纤维化因子的产生,从而诱导或加重气道重塑。气道重塑是气道反复炎症损伤与修复的结果,导致气道顺应性下降,出现不完全可逆的气流受限和气道高反应性。Rho激酶是一种丝氨酸/苏氨酸激酶,肌球蛋白磷酸酶(myosin phosphatase, MP)是活化Rho激酶的底物。活化的Rho激酶对其进行磷酸化修饰,并使其失活。失活的MP不能将肌球蛋白轻链(myosin light chain, MLC)脱磷酸化,使得胞浆内磷酸化MLC水平提升,肌动-肌球蛋白交联增加,从而促进肌动蛋白微丝骨架的聚合^[7]。RhoA/Rho激酶信号转导通路就是通过这样一个复杂的磷酸化与去磷酸化的信号级联放大过程来控制炎症细胞的迁移和/或功能^[8]。Rho激酶抑制剂可以使哮喘的病理学改变明显减轻,显著抑制气道平滑肌增殖而延缓气道重塑,并可能通过抑制气道平滑肌收缩而抑制气道高反应性。

本研究显示哮喘患者外周血Rho激酶水平明显高于正常人群。我们推测Rho激酶的异常表达可能对哮喘的发生发展起一定的作用,提示哮喘患者病理状态可能与Rho激酶参与炎症细胞浸润活化、炎症介质释放、气道高反应性及气道重塑等有关。

本研究同时显示外周血Rho激酶水平与肺功能FEV1%无相关性,此结果表明Rho激酶可能与哮喘疾病程度无明显关联,但是否可能为样本量偏少,导致实验结果未能反映二者的真实关联,还有待增加样本量进一步研究。

CD4⁺CD25⁺调节性T细胞是机体免疫反应程序中关键的调节因素,它能通过各种机制诱导机体对自身抗原和过敏原产生免疫耐受,从而维持机体免疫系统的稳定^[9-10]。但是对于哮喘患者外周血CD4⁺CD25⁺调节性T细胞水平高低的报道是不一致的,大部分意见支持哮喘患者外周血CD4⁺CD25⁺调节性T细胞水平是降低的,只有少数研究认为哮喘患者外周血CD4⁺CD25⁺调节性T细胞水平与正常对照组比较无明显差异,甚至是升高的。本研究显示,哮喘患者外周血CD4⁺CD25⁺调节性T细胞水平与健康对照组比较显著降低。这可能是导致哮喘过敏性气道炎症发生的一个原因。有研究^[11]认为由于CD4⁺CD25⁺调节性T细胞数量不足,免疫

抑制功能下降,可能减弱对Th2细胞的抑制作用,使Th2型免疫反应增强,产生大量的致炎因子,如IL-4, IL-5和IL-13等导致哮喘发作。

本研究结果表明,外周血CD4⁺CD25⁺调节性T细胞水平与肺功能FEV1%呈轻度正相关关系,Isajers等^[12]在研究慢性阻塞性肺病(chronic obstructive pulmonary diseases, COPD)时得出类似结论。提示外周血CD4⁺CD25⁺调节性T细胞水平可能与哮喘的严重程度呈正相关。哮喘多与过敏原刺激有关,CD4⁺CD25⁺调节性T细胞在调节过敏性疾病过度免疫反应中起关键作用,它通过细胞间直接接触和分泌细胞因子维持免疫抑制功能^[13],是维持外周免疫耐受的关键细胞。其数量降低可导致机体全身和局部免疫紊乱,造成哮喘过敏性气道炎症的发生,故而可能导致肺功能下降。

Rho激酶参与肌动蛋白细胞骨架重组、细胞信号转导、细胞周期调控、细胞分裂及基因转录调控等生理过程,影响细胞的极性、移动、黏附、形态改变、生长、凋亡和运动能力。T细胞是游走型细胞,Rho激酶蛋白家族在T细胞的移行迁徙过程中是关键的调控者^[14]。外周CD4⁺CD25⁻T细胞可由未成熟的树突状细胞诱导,转变成CD4⁺CD25⁺调节性T细胞。而树突状细胞成熟过程中伴有细胞表型及细胞形态的改变。研究表明,CD4⁺CD25⁻T细胞的这些变化可能与受Rho激酶参与调控的肌动蛋白细胞骨架重组关系密切。但关于Rho激酶和CD4⁺CD25⁺调节性T细胞的关系少见报道,我们的研究结果显示两者无明显的相关性,是否真实结果如此,还需加大研究对象人数进一步证实。

综上所述,哮喘患者外周血Rho激酶水平升高,而CD4⁺CD25⁺调节性T细胞水平降低,这有可能与哮喘的发生、发展有关。但哮喘患者Rho激酶和CD4⁺CD25⁺调节性T细胞水平有无相关,是否两者共同参与哮喘疾病的病理过程,或两者相互间是否存在调控机制,还有待进一步的研究证实。

参考文献

1. 邢西迁, 甘焯. Rho激酶与哮喘气道高反应性[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2006, 12(26): 499-502.
XING Xiqian, GAN Ye. Rho-kinase and airway hyperresponsiveness in asthma[J]. Journal of International Pathology and Clinical Medicine, 2006, 12(26): 499-502.
2. Riento K, Ridoey AJ. Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003, 4(6): 446-456.
3. Lloyd CM, Hawrylowicz CM. Regulatory T cells in asthma[J].

- Immunity, 2009, 31(3): 438-449.
4. 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、治疗和管理方案)[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2008, 31(3): 177-185.
The Asthma Group of Epidemiology Branch of Breathing in Chinese Medical Association. Prevention and treatment guidelines of bronchial asthma[J]. Chinese Journal of Tuberculosis and Respiratory Diseases, 2008, 31(3): 177-185.
 5. 代丽, 吴尚洁. 阿托伐他汀抑制RhoA/Rho激酶活性逆转低氧性肺动脉高压大鼠肺动脉高压和肺血管重构[J]. 中南大学学报: 医学版, 2011, 36(1): 58-63.
DAI Li, WU Shangjie. Atorvastatin attenuates hypoxic pulmonary hypertension in rats by inhibiting RhoA/Rho kinase pathway[J]. Journal of Central South University. Medical Science, 2011, 36(1): 58-63.
 6. Kim YC, Kim KK, Shevach EM. Simvastatin induces Foxp3⁺ T regulatory cells by modulation of transforming growth factor-beta signal transduction[J]. Immunology, 2010, 130(4): 484-493.
 7. Brown JH, DelRe DP, Sussman MA. The Rac and Rho hall of fame a decade of hypertrophic signaling[J]. Circ Res, 2006, 98(6): 730-742.
 8. Wibberley A, Chen Z, Hu E, et al. Expression and function role of Rho-kinase in rat urinary bladder smooth muscle[J]. Br J Pharmacol, 2003, 138(5): 757-766.
 9. 高洪媛, 刘瑞娟. CD4⁺CD25⁺调节性T细胞减少对哮喘患者的影响[J]. 临床肺科杂志, 2012, 17(2): 335-336.
GAO Hongyuan, LIU Ruijuan. The influence of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells to asthma[J]. Journal of Clinical Pulmonary Medicine, 2012, 17(2): 335-336.
 10. Strickland DH, Holt PG. T regulatory cells in childhood asthma[J]. Trends Immunol, 2011, 32(9): 420-427.
 11. McGee HS, Agrawal DK. Naturally occurring and inducible T-regulatory cells modulating immune response in allergic asthma[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2009, 180(3): 211-225.
 12. Isajer S, Tairans I, Strazda G, et al. Decreased FOXP3 expression in small airways of smokers with COPD[J]. Eur Respir J, 2009, 33(1): 61-67.
 13. McGuik P, Higgins SC, Mills KH. The role of regulatory T cells in respiratory infections and asthma[J]. Curr Allergy Asthma Rep, 2010, 10(1): 21-28.
 14. Heasman SJ, Ridley AJ. Multiple roles for RhoA during T cell transendothelial migration[J]. Small GTPases, 2010, 1(3): 174-179.

(本文编辑 郭征)

本文引用: 邓晓杰, 朱洪志, 吴尚洁. 哮喘患者外周血Rho激酶及CD4⁺CD25⁺调节性T细胞测定[J]. 中南大学学报: 医学版, 2014, 39(6): 577-581. DOI:10.11817/j.issn.1672-7347.2014.06.006

Cite this article as: DENG Xiaojie, ZHU Hongzhi, WU Shangjie. Measurement of Rho-kinase and CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in the peripheral blood in asthmatic patients[J]. Journal of Central South University. Medical Science, 2014, 39(6): 577-581. DOI:10.11817/j.issn.1672-7347.2014.06.006