

· 论 著 ·

麻风溃疡患者外周血 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性 T 细胞水平及临床意义*

游 勇¹, 伍爱金¹, 李俊勇², 伍援进², 刘石姬¹

(1. 广东省佛山市南海区红卫医院 528251; 2. 广东省佛山市南海区疾病预防控制中心 528200)

摘要:目的 探讨 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性 T 细胞(Treg)在麻风溃疡发病中的作用。方法 选取 60 例麻风溃疡患者作为试验组, 同期匹配麻风病未合并溃疡的患者 57 例作为对照组及体检健康者 68 例为健康人组, 采用流式细胞仪检测在治疗前(或入组时)、治疗后 4 周(对照组和健康人组为入组后 4 周)3 组研究对象外周血的 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 占 CD4⁺T 细胞的百分比。结果 试验组在治疗后 4 周的 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 比例明显低于治疗前, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 在治疗前和治疗后 4 周试验组的 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 比例均明显高于同时时间点的对照组和健康人组, 差异均有统计学意义($P < 0.05$), 对照组的 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 比例也明显高于健康人组, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。合并复杂性溃疡的麻风患者其外周血的 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 比例在治疗前和治疗后均显著高于合并单纯性溃疡的麻风患者, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 的表达失衡可能参与了麻风溃疡的发生、发展。

关键词:麻风溃疡; CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺; 调节性 T 细胞

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2017.12.012 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2017)12-1715-03

Level and clinical significance of peripheral blood CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulation T cells in patients with leprosy ulcers*

YOU Yong¹, WU Aijin¹, LI Junyong², WU Yuanjin², LIU Shiji¹

(1. Nanhai District Hongwei Hospital, Foshan, Guangdong 528251, China; 2. Nanhai District Center for Disease Control and Prevention, Foshan, Guangdong 528200, China)

Abstract: **Objective** To explore the role of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulation T cells in the pathogenesis of leprosy ulcers. **Methods** Sixty cases of leprosy ulcers were selected as the experimental group, meanwhile 57 matched cases of leprosy without ulcers served as the control group and 68 normal persons undergoing physical examination as the healthy persons group. The levels of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulation T cells before treatment and after 4-week treatment and at 4 weeks after entering the group in the healthy persons group were detected by using flow cytometry. **Results** The proportion of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg after 4-week treatment in the experimental group was significantly lower than that before treatment, and the difference was statistically significant($P < 0.05$). The proportion of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg before and after 4-week treatment in the experimental group was significantly higher than that at the same time point in the control group and healthy persons group, and the difference were statistically significant($P < 0.05$). The proportion of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg before and after treatment in the patients with leprosy complicating complex ulcers were significantly higher than that in the patients with leprosy complicating simple ulcer, and the difference were statistically significant($P < 0.05$). **Conclusion** The expression imbalance of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T lymphocytes may be involved in the occurrence and development of leprosy ulcer.

Key words: leprosy ulcers; CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺; regulation T cells

麻风溃疡是麻风病的常见并发症和后遗症之一, 好发于四肢、臀部等受压部位, 以足底溃疡最为多见, 发病率为 10%~60%。麻风溃疡可累及皮肤、骨、关节等各层组织, 严重者可导致局部或全足坏疽、缺失, 有面临截肢的风险, 严重影响到患者的生活质量。麻风溃疡的发病原因较多, 如感染、继发性损害及局部受压等, 但多数与机体的免疫状态有关, 尤其是机体的细胞免疫功能^[1]。CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性 T 淋巴细胞(Treg 细胞)是 T 细胞的一类特殊亚群, 能够通过抑制自身免疫细胞的活化来发挥其免疫调节作用。已有研究证实 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 参与了麻风患者皮损的形成^[2]。但是目前关于麻风溃疡患者外周血中 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 的研

究较少, 为此本研究通过检测不同类型、不同时间点的麻风溃疡患者外周血中的 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 比例, 以探讨其在麻风溃疡发病中的作用。

1 资料和方法

1.1 一般资料 选取 2015 年 5 月至 2016 年 12 月在佛山市南海区红卫医院及佛山市南海区疾病预防控制中心门诊就诊的患有麻风溃疡的患者共 60 例作为试验组, 其中麻风病现症患者 3 例(MDT 治疗期在 40~88 周), 麻风病治愈者 57 例; 男 42 例, 女 18 例; 年龄 45~90 岁, 平均(76.63±10.28)岁; 按溃疡类型分类, 单纯性溃疡 48 例, 复杂性溃疡 12 例; 溃疡病期 2 d 至 30 年。同时选取同期在佛山市南海区红卫医院及佛山市

* 基金项目: 广东省佛山市卫生和计划生育局医学科研项目(20160199)。

作者简介: 游勇, 男, 主管技师, 主要从事医学检验(临检、生化、免疫)研究。

南海区疾病预防控制中心门诊就诊的没有麻风溃疡的麻风患者 57 例作为对照组,其中麻风病现症患者 5 例(MDT 治疗期在 44~80 周),麻风病治愈者 52 例;男 36 例,女 21 例;年龄 52~88 岁,平均(75.52±11.37)岁。所有患者的麻风诊断标准符合麻风病诊断和临床治愈标准^[3]。并选取同期在佛山市南海区红卫医院及佛山市南海区疾病预防控制中心门诊就诊的健康人 68 例作为健康人组。排除标准:血清学检测以及肝、肾功能检查指标异常,合并结核、肝炎病毒和艾滋病病毒感染以及自身免疫性疾病的患者。上述所有研究对象均签署知情同意书,且本研究经佛山市南海区红卫医院伦理委员会审批通过。

1.2 方法 所有研究对象治疗前(对照组和健康人组为入组时)、治疗后 4 周(对照组和健康人组为入组后 4 周)采集清晨空腹下外周静脉血 5 mL 备用,取一流式细胞专用试管,加入 anti-human CD25mAb/AF647、FITC anti-human CD4/PE、anti-human CD127(均购于美国 BD 公司)各 2 μL,然后加入 100 μL 采集的新鲜肝素抗凝血,混匀后在避光条件下孵育 20 min,再加入溶血素 5 μL,并置于避光条件下 5 min,然后用缓冲液(美国 BD 公司)2 mL 洗涤两次,上流式细胞仪(BD-CALIBUR 流式细胞分析仪,美国 BD 公司)检测。检测完后用 FCSExpress V3 软件计算和分析 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 的比例,方法:CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg/CD4⁺Treg×100%。

1.3 统计学处理 使用 SPSS 20.0 统计软件进行统计学分析。计数资料采用例数或率表示,率的比较采用四格表 χ^2 检验或 Fisher 概率精确法;计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组计量资料的比较采用独立 t 检验进行分析,多组间比较采用单因素方差分析,组内比较采用重复测量方差分析;以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 不同组之间治疗前后的 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 比例比较 试验组在治疗后 4 周的 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 比例明显低于治疗前,差异均有统计学意义($P<0.05$),在治疗前和治疗后 4 周试验组的 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 比例均明显高于同时时间点的对照组和健康人组,差异均有统计学意义($P<0.05$),对照组的 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 比例也显著高于健康人组,差异均有统计学意义($P<0.05$),见表 1。

表 1 不同组之间治疗(入组)前后的 CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ Treg 比例比较($\bar{x}\pm s$)					
项目	<i>n</i>	治疗前(入组前) Treg(%)	治疗后(入组后) Treg(%)	<i>t</i>	<i>P</i>
试验组	60	37.26±10.35* [#]	21.26±6.92* [#]	4.326	0.043
对照组	57	16.37±4.36*	14.34±4.27*	5.826	0.014
健康人组	68	9.63±1.21	8.79±1.63	2.324	0.423
<i>F</i>		5.36	3.12		
<i>P</i>		<0.001	0.022		

注:与健康人组比较,* $P<0.05$;与对照组比较,[#] $P<0.05$ 。

2.2 不同类型溃疡患者外周血 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 比例比较 合并复杂性溃疡的麻风患者其外周血的 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 比例在治疗前和治疗后均显著高于合并

单纯性溃疡的麻风患者,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

表 2 不同类型溃疡患者外周血 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 比例比较($\bar{x}\pm s$)

项目	<i>n</i>	治疗前 Treg (%)	治疗后 Treg (%)	<i>t</i>	<i>P</i>
单纯溃疡组	48	30.66±8.49	16.57±5.43	4.63	0.040
复杂溃疡组	12	40.72±9.76	24.21±5.61	5.59	0.019
<i>t</i>		4.82	5.13		
<i>P</i>		0.032	0.024		

3 讨 论

麻风病是一种和机体免疫功能有关的传染性疾病,很多的损害并非由麻风杆菌直接导致,而是由感染麻风杆菌所诱发宿主免疫应答所致。在麻风病的免疫反应中,细胞免疫以及体液免疫均同时存在,但是主要以细胞免疫反应为主^[3-4]。Treg 细胞是一类具有免疫调节功能的 T 细胞亚群,其主要的功能是能够通过分泌免疫下调性的细胞因子,如白细胞介素-2 和白细胞介素-10 等,抑制机体自身反应性 T 细胞和 B 细胞的活化,起着免疫调节和抑制功能,对维持机体免疫耐受的功能发挥着极为重要的作用^[5-6]。

本研究麻风溃疡患者中的 Treg 细胞比例显著高于无合并溃疡的麻风患者和健康人群。虽然在经治疗后其 Treg 细胞比例较治疗前有所下降,但仍然高于无合并溃疡的麻风患者和健康人群。提示 Treg 细胞的比例失调与麻风溃疡的发生、发展密切相关。机体感染麻风杆菌后诱导 CD4⁺T 细胞表达 Foxp3⁺,分化为 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞,高表达的 Treg 细胞抑制抗原特异性的 CD4⁺T 细胞反应,进而下调 Th1 的功能,致使细胞免疫功能下调,从而导致慢性感染呈持续状态,最终导致溃疡的形成^[7-8]。李彩霞等^[9]研究结果表明治愈或现症感染的麻风病患者其外周血的 Treg 细胞水平均明显高于健康人群,提示 Treg 细胞可能打破外周免疫耐受状态,参与麻风病的病理生理过程。同时进一步研究证实 Treg 细胞调控失衡引起麻风发病的原因与白细胞介素-2 和白细胞介素-10 等有关^[10-11]。王露等^[2]通过免疫组织化学的方法研究麻风溃疡患者皮损内 Treg 细胞的表达水平,发现 Treg 细胞主要位于麻风皮损的真皮层,而健康人群的皮肤真皮层中 Treg 细胞数量较少,且麻风溃疡患者真皮层内的 Treg 细胞表达量显著高于健康人群,这一结果进一步提示了 Treg 细胞在麻风溃疡发病中的作用,进一步佐证了本研究结果的可信度。

综上所述,麻风溃疡患者中的 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 比例明显高于无合并溃疡的麻风患者和健康人群,因此 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 的表达失衡可能参与了麻风溃疡的发生、发展。但是 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 参与麻风溃疡的具体机制目前仍不明确,因此有待后续的研究进一步阐明。

参考文献

[1] 张维娜. 麻风溃疡感染病原菌分布及治疗新进展[J]. 检验医学与临床,2012,9(1):64-66.
[2] 王露,李文华,周晓鸿,等. Foxp3⁺ 调节(下转第 1719 页)

育部门相互配合在 3—7 月和 10—11 月对 0~<4 岁儿童进行手足口病的重点预防、监测^[14]。特别是在手足口病流行期间,家长和临床医生应特别注意易感年龄的孩子一旦出现有诸如高热、咽峡部疱疹、嗜睡、呕吐、抽搐等类似重症手足口病症状^[15],应马上采集标本送检,密切观察患儿病情变化。由于重症手足口病可并发脑炎、脑脊髓炎、肺水肿、循环衰竭等,且一旦出现脑干脑炎则病死率显著上升,目前缺乏有效的治疗方法。因此在当地开展手足口病的快速诊断,及早发现及早治疗,并长期关注当地手足口病疫情的病原体型别及分布特征,有利于疫情控制及应对突发事件,是降低手足口病死亡概率的关键。

参考文献

[1] Xu MH, Su LY, Cao LF, et al. Enterovirus genotypes causing hand foot and mouth disease in Shanghai, China: a molecular epidemiological analysis[J]. BMC Infect Dis, 2013, 13(1):489-496.

[2] Long L, Gao LD, Hu SX, et al. Risk factors for death in children with severe hand, foot, and mouth disease in Hunan, China[J]. Infect Dis, 2016, 48(10):744-748.

[3] 李俊, 苏翠, 陈晓宁. 2010—2013 年铜川市手足口病实验室检测结果分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2015, 25(5): 686-688.

[4] 唐丽. 278 例手足口病病原学监测结果分析[J]. 实用预防医学, 2013, 20(7):879-881.

[5] 曹洋, 洪志恒, 金连梅, 等. 2011—2012 年全国手足口病疫情监测分析[J]. 疾病监测, 2013, 28(12):975-980.

[6] 李静, 魏兴家, 余永生. 武汉阳逻地区 2008 至 2012 年手足口病流行特征分析[J]. 中国妇幼健康研究, 2015, 26(2):188-190, 233.

[7] 王明英, 王美芬. 昆明地区儿童手足口病 28 685 例流行病学分析[J]. 国际流行病学传染病学杂志, 2014, 41(2): 113-115.

[8] 贺天锋, 钱旭君, 谢蕾, 等. 浙江省宁波市 2008—2013 年手足口病重症病例流行病学及病原学特征[J]. 上海预防医学, 2015, 27(1):4-6.

[9] 李开春, 程志刚, 王明丽, 等. 六安市手足口病肠道病毒核酸检测及流行病学分析[J]. 中华疾病控制杂志, 2011, 15(7):582-585.

[10] 徐辉, 陈聪, 姚杏娟, 等. 常州市 2008~2009 年 5 岁以下儿童手足口病流行特征分析[J]. 中国现代医学杂志, 2011, 21(2):275-278.

[11] 王杨, 李铮, 曹向红, 等. 2014 年昆明某三甲医院手足口病病原及流行特征分析[J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37(1):8-10.

[12] 常昭瑞, 张静, 孙军玲, 等. 中国 2008—2009 年手足口病报告病例流行病学特征分析[J]. 中华流行病学杂志, 2011, 32(7):676-680.

[13] 郑艳丽, 宋海军, 李军伟, 等. 2009 年平顶山市儿童手足口病病原分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 20(8):1993-1995.

[14] 张红, 李万书, 伍秀敏, 等. 2011—2012 年四川省宜宾市手足口病监测分析[J]. 中国医药导报, 2013, 10(26): 125-126.

[15] Wang Q, Zhang W, Zhang Y, et al. Clinical features of severe cases of hand, foot and mouth disease with EV71 virus infection in China[J]. Arch Med Sci, 2014, 10(3): 510-516.

(收稿日期:2017-02-03 修回日期:2017-04-13)

(上接第 1716 页)

性 T 细胞在麻风病患者皮损中的分布[J]. 皮肤病与性病, 2013, 35(3):125-127.

[3] 张学军. 皮肤性病学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2013: 124-128.

[4] 杨丽文, 李月红, 姚新生, 等. 麻风 T 细胞应答及 TCR CDR3 谱序研究进展[J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2015, 31(6):347-350.

[5] Liu G, Ma H, Qiu L, et al. Phenotypic and functional switch of macrophages induced by regulatory CD4⁺ CD25⁺ T cells in mice[J]. Immunol Cell Biol, 2011, 89(1):130-142.

[6] Kumar S, Naqvi RA, Ali R, et al. FoxP3 provides competitive fitness to CD4⁺ CD25⁺ T cells in leprosy patients via transcriptional regulation[J]. Eur J Immunol, 2014, 44(2):431-439.

[7] Parente JN, Talhari C, Schettini AP, et al. T regulatory

cells (TREG) (TCD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺) distribution in the different clinical forms of leprosy and reactional states [J]. An Bras Dermatol, 2015, 90(1):41-47.

[8] Kumar S, Naqvi RA, Ali R, et al. CD4⁺ CD25⁺ T regs with acetylated FoxP3 are associated with immune suppression in humanleprosy[J]. Mol Immunol, 2013, 56(4):513-520.

[9] 李彩霞, 徐元品, 邹子宏, 等. CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ 调节性 T 细胞在麻风病中的水平和意义[J]. 中国免疫学杂志, 2013, 29(2):158-160.

[10] 李彩霞, 陆林, 周晓鸿, 等. 麻风病患者外周血 IL-10 与调节性 T 细胞的相关性研究[J]. 中国免疫学杂志, 2014, 30(8):1105-1107.

[11] 李彩霞, 陆林, 贾曼红, 等. 麻风患者外周血调节性 T 细胞及 IL-2 的相关性分析[J]. 皮肤病与性病, 2015, 37(5): 256-259.

(收稿日期:2017-02-05 修回日期:2017-04-14)