



CD4+CD25highCD127low/- 调节性 T 细胞及 FOXP3 在不明原因反复自然流产发病中的作用研究

曾 珣 李小红 李尚为 靳 松* (四川大学华西第二医院生殖医学科 四川成都 610000)

摘要:目的 探讨不明原因反复自然流产患者(URSA)外周血 CD4+CD25highCD127low/- 调节性 T 细胞(Tregs)表达频率及 Tregs 中 FOXP3 蛋白表达差异。**方法** 以正常育龄妇女为对照组(n=60), URSA 患者为实验组(n=60), 采用流式细胞术分选并检测两组人群外周血 CD4+CD25highCD127low/-Tregs 表达频率及比较分选获得的 Tregs 中 FOXP3 的表达率及平均荧光强度。**结果** URSA 患者外周血 CD4+CD25highCD127low/-Tregs 较正常育龄妇女组表达频率降低(p<0.05)。URSA 患者 Tregs 中 FOXP3 的平均荧光强度低于正常育龄妇女组(p<0.01)。**结论** URSA 患者外周血 CD4+CD25highCD127low/-Tregs 表达频率、Tregs 中 FOXP3 蛋白表达均低于正常育龄妇女。提示 URSA 发病机制中存在着自身免疫耐受方面的缺陷, 该发现是 URSA 免疫耐受机制研究的重要突破, 可能成为防治 URSA 的新靶点。

关键词: 反复自然流产 免疫调节 CD4 + CD25highCD127low/- 调节性 T 细胞 FOXP3

中图分类号: R714.21 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-5187(2018)13-017-02

妊娠的成功有赖于母体对胚胎抗原的免疫耐受, URSA 与免疫耐受异常密切相关。研究提示 Tregs 与 URSA 的发生密切相关。较早的研究认为 TLCs 只要同时表达 CD4 和 CD25 就是 Tregs^[1]。随后报道指出 CD4+CD25+T 细胞并不能完全代表调节性 T 细胞。FOXP3 可作为 Tregs 特异性标志物已被很多研究所证明^[2]。但是由于其位于胞内, 检测需要对细胞进行破膜, 因此其使用也受到了限制。CD127 是近几年来新发现的一种检测 Tregs 的新指标^[3], 它位于细胞膜表面。多项关于人体外周血以及淋巴结中 Tregs 的研究发现表达 CD127low/- 与 FOXP3+ 的 TLCs 是同一群 TLCs, 这部分 TLCs 具备 Tregs 的特征。本研究采用 CD4+CD25highCD127low/- 作为 Tregs 的特征性标志物, 研究 URSA 患者外周血中 CD4+CD25highCD127low/-Tregs 探讨其在 URSA 发病中的作用。

1 实验方法

1.1 研究对象

1.1.1 病例来源: URSA 组: 选择 2012 年 10 月~2013 年 5 月就诊于我院门诊的 URSA 患者 60 例, 年龄<40 岁, 平均(26.3±1.2)岁。连续发生 2 次或 2 次以上早期自然流产, 末次流产发生于 1 年以内, 无活产史。按我院常规进行病因筛查, 排除染色体、解剖结构、内分泌等方面的异常及感染、自身免疫性疾病, 微量淋巴细胞毒试验结果阴性。正常对照组: 同期选取的正常非妊娠妇女 60 例, 平均(25.1±0.9)岁。既往均有妊娠史, 但无自然流产、死胎或死产史, 同时排除染色体、解剖结构、内分泌等方面的异常及感染、自身免疫性疾病史。两组的年龄无统计学差异(P>0.05)。

1.1.2 主要仪器: Moflo Astrios 超高速流式细胞分选系统(美国 Beckman 公司), B320A 型医用低速离心机(河北白洋离心机厂产)。

1.1.3 主要试剂: 人淋巴细胞分离液(天津美德太平洋科技有限公司), CD4-Percp-Cy5.5 抗体, CD25-PE 抗体, CD127-Alexa Fluor 647 抗体, FOXP3-Alexa Fluor 488 抗体, CD4-Percp-Cy5.5 同型对照, CD25-PE 同型对照, CD127-Alexa Fluor 647 同型对照, FOXP3-Alexa Fluor 488 同型对照, FOXP3 染色破膜液, 全血红细胞裂解液, 均购自美国 BD 公司。

1.2 方法

1.2.1 外周血标本采集及单个核细胞(PBMCs)的分离: 使用肝素抗凝真空采血管, 抽取静脉血 10ml。采用 Ficoll 密度梯度离心法分离 PBMCs, 进行台盼蓝细胞计数细胞活率后用后续试验。

1.2.2 流式细胞检测外周血 CD4+CD25highCD127low/-Tregs: 每 Eppendorf 管加入 0.1ml 抗凝全血。采用直接法每管加入 5ul 鼠抗人 CD4-Percp-Cy5.5, CD25-PE, CD127-Alexa Fluor 647, 对照管分别加入等量同型对照抗体, 室温下避光中孵育 30 min, 加溶血

剂, 静置 10min, 振荡混匀, PBS 洗涤 2 次, 400g 离心 5min, 弃上清, 每管加 0.5ml PBS 充分混匀后上流式细胞仪检测, Cell-quest 软件分析。检测时首先根据前向散射角(FSC)及侧向散射光信号(SSC)确定淋巴细胞群, 再以 CD4+ TLCs 设门, 分析其上 CD25 与 CD127 的表达。

1.2.3 核转录因子 FOXP3 流式抗体标记: 取细胞悬液 0.1ml, 再加入 1 ml 经过稀释的固定、透膜剂, 反应 40 min 后以透膜缓冲液洗涤并重悬, 再加入 15 μl FOXP3-Alexa Fluor 488 抗体(同时设同型对照反应管), 反应 30min 后洗涤, 以 500 μl PBS 重悬, 流式细胞仪测定。

1.3 统计学处理

连续变量以 Mean±SE 表示, 两组间差异比较采用独立 T 检验, 数据分析使用 SPSS20.0 软件进行, 每个实验重复至少 2 次, 并且每个数值代表至少 3 个平行标本均数。P<0.05 代表差异有统计学意义。

2 结果

2.1 应用流式细胞仪分选获得高纯度的 CD4+CD25highCD127low/-T 细胞。

我们利用流式细胞技术首次成功分选出高纯度且可供后续试验的 URSA 患者外周 CD4+CD25highCD127low/-T 细胞。以 FOXP3 作为 Tregs 标志, 目的细胞经 FOXP3 验证, 纯度>95%。台盼蓝染色, 细胞活率>95%。

2.2 URSA 患者 CD4+CD25highCD127low/-Tregs 表达频率低于正常育龄妇女

URSA 组 CD4+CD25highCD127low/-Tregs 占 CD4+ TLCs 比例显著低于正常育龄对照组(4.06±0.35% vs 5.64±0.49%, p<0.05)(图 1)。

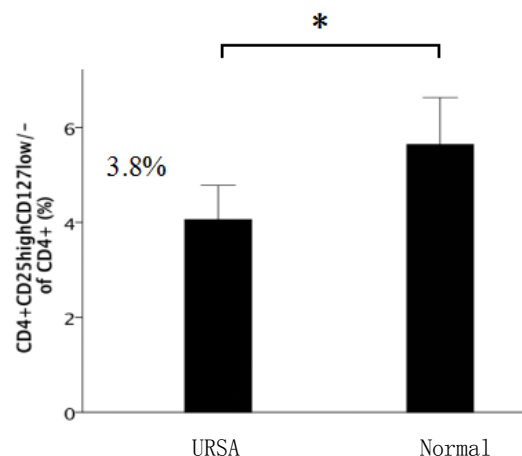


图 1: URSA 患者及正常育龄妇女外周血 CD4+CD25highCD127low/-Tregs 的表达频率比较 (* p<0.05)。

* 通讯作者: 靳松



2.3 URSA患者外周血CD4+CD25^{high}CD127^{low}/-Tregs中FOXP3的表达低于正常育龄妇女

流式分选的URSA组与正常非孕组CD4+CD25^{high}CD127^{low}/-Tregs中FOXP3的表达均大于95%，差异无统计学意义。URSA组CD4+CD25^{high}CD127^{low}/-Tregs内FOXP3的MFI较正常育龄组降低(p<0.01) (图2)。

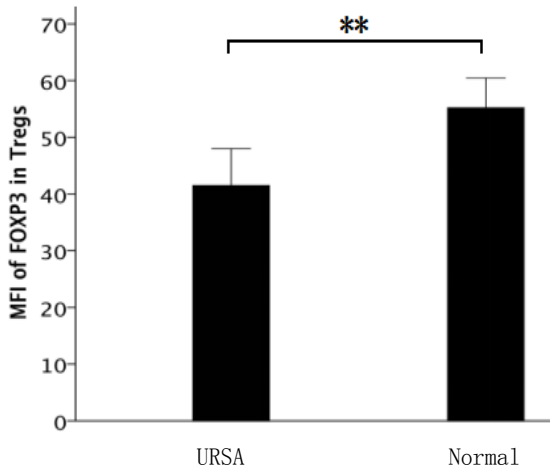


图2: URSA患者及正常育龄妇女外周血CD4+CD25^{high}CD127^{low}/-Tregs中FOXP3荧光强度比较 (**P<0.01)。

3 讨论

妊娠的失败多因母体对胚胎的排斥所致。Tregs能抑制效应T细胞的活化和增殖，是一组具有免疫抑制特性的TLCs亚群。URSA的发病与Tregs异常有关。Mei等^[4]研究发现URSA患者外周血CD4+CD25^{high}Tregs比例较URSA早孕流产患者及正常未孕妇女降低。研究指出URSA患者蜕膜CD4+CD25^{high}Tregs比例^[5]及FOXP3^[4]表达均低于正常早孕妇女。

但是，上述研究均将CD4+CD25⁺或CD4+CD25^{high}作为Tregs的表面标志，近年来的研究提示CD4+CD25^{int-low}及CD4+CD25^{high}中都混杂有一部分活化的效应性T细胞^[2, 6]。FOXP3直接主控Tregs表型及活性，是Tregs发育和功能维持的重要调节基因^[7]。但是由于检测FOXP3需要打孔，检测后细胞无法存活。CD127是近几年来新发现的一种检测Tregs的新指标。体内外实验均证实，CD25^{high}CD127^{low}/-与FOXP3⁺有强相关性^[3, 8]。因此，本研究首次在URSA研究领域采用CD4+CD25^{high}CD127^{low}/-定义Tregs，我们发现URSA患者外周血CD4+CD25^{high}CD127^{low}/-Tregs较正常育龄妇女降低，提示URSA患者外周血中存在Tregs数量减少，这可能导致母体对胚胎免疫耐受降低，使胚胎遭受免疫攻击，引起流产。

FOXP3的表达如同“开-关”切换控制TLCs的免疫抑制能力。研究显示Tregs中FOXP3的表达降低与自身免疫性疾病的发生有关，其以剂量依赖的方式诱导免疫耐受的丢失^[9]。最近的研究已经表明FOXP3表达的降低的或异常与Tregs免疫抑制功能障碍有关^[10, 11]。我们的研究显示，URSA患者外周血CD4+CD25^{high}CD127^{low}/-Tregs中

FOXP3的蛋白质和mRNA表达均低于正常育龄妇女。我们推测URSA患者FOXP3蛋白及mRNA表达的降低是其免疫抑制功能下降的重要原因之一。

综上，我们认为CD4+CD25^{high}CD127^{low}/-Tregs在维持母胎免疫耐受过程中具有不可替代的作用。URSA患者体内CD4+CD25^{high}CD127^{low}/-Tregs存在数量上的降低，同时，其Tregs中FOXP3蛋白质表达下降，这些变化可能导致URSA患者妊娠时的免疫耐受被打破，造成母体对胚胎产生免疫攻击。这一结论不仅丰富了妊娠免疫耐受理论，而且进一步加深了对妊娠生理过程的认识。

参考文献

- [1]Baecher-Allan, C., V. Viglietta, and D.A. Hafler, Human CD4+CD25+ regulatory T cells. *Semin Immunol*, 2004. 16(2): p. 89-98.
- [2]Williams, L.M. and A.Y. Rudensky, Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3. *Nat Immunol*, 2007. 8(3): p. 277-84.
- [3]Liu, W., et al., CD127 expression inversely correlates with Foxp3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med*, 2006. 203(7): p. 1701-11.
- [4]Mei, S., et al., Changes of CD4+CD25^{high} regulatory T cells and FOXP3 expression in unexplained recurrent spontaneous abortion patients. *Fertil Steril*, 2010. 94(6): p. 2244-7.
- [5]Yang, H., et al., Proportional change of CD4+CD25+ regulatory T cells in decidua and peripheral blood in unexplained recurrent spontaneous abortion patients. *Fertil Steril*, 2008. 89(3): p. 656-61.
- [6]Baecher-Allan, C., et al., CD4+CD25^{high} regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol*, 2001. 167(3): p. 1245-53.
- [7]Fontenot, J.D., M.A. Gavin, and A.Y. Rudensky, Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol*, 2003. 4(4): p. 330-6.
- [8]Hartigan-O'Connor, D.J., et al., Human CD4+ regulatory T cells express lower levels of the IL-7 receptor alpha chain (CD127), allowing consistent identification and sorting of live cells. *J Immunol Methods*, 2007. 319(1-2): p. 41-52.
- [9]Zhang, L. and Y. Zhao, The regulation of Foxp3 expression in regulatory CD4(+)CD25(+)T cells: multiple pathways on the road. *J Cell Physiol*, 2007. 211(3): p. 590-7.
- [10]Moes, N., et al., Reduced expression of FOXP3 and regulatory T-cell function in severe forms of early-onset autoimmune enteropathy. *Gastroenterology*, 2010. 139(3): p. 770-8.
- [11]Chauhan, S.K., et al., Levels of Foxp3 in regulatory T cells reflect their functional status in transplantation. *J Immunol*, 2009. 182(1): p. 148-53.

(上接第16页)

参考文献

- [1]Beraldi R, Sciamanna I, Mangiacasale R, et al. Mouse early embryos obtained by natural breeding or in vitro fertilization display a differential sensitivity to extremely low-frequency electromagnetic fields [J]. *Mutat Res*, 2003, 538(1-2):163-170
- [2]Legro RS, Sauer MV, Mottla GL, et al. Effect of air quality on assisted human reproduction[J]. *Hum Reprod*, 2010, 25(5): 1317-1324.

- [3]刘国红, 刘西平, 杨克敌, 刘四海, 鲁文红. 产妇产体内有机氯农药残留对血中4种生殖激素水平的影响[J]. *Environ Occup Med*, Dec 2005 Vol.22 No.6
- [4]宋洁, 刘虹, 唐士琳, 刘爽. 转基因食用油对酵母菌生殖影响探究[J]. *轻工科技*, 2014年8月第8期
- [5]Ahlam, Al-Ghamdi, Serdar Coskun, et al. The correlation between endometrial thickness and outcome of in vitro fertilization and embryo transfer (IVF-ET-ET) outcome[J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2008, 6:37.