·临床研究·

Treg细胞在帕金森病患者外周血中的表达水平研究

哈米萨木·艾合买提江[1],曹玲[2a],马建华[2b],雷晶[2b]

作者单位

1. 乌鲁木齐市第四人民医院老年病科 乌鲁木齐 830000
2. 新疆医科大学第一附属医院 a. 检验中心,b. 神经内科 乌鲁木齐 830000

基金项目

新疆科技厅重大专项(No.201417101)

收稿日期

2018-12-09

通讯作者

马建华

mjh9191@163.com

摘要 **目的:**研究帕金森病(PD)患者外周血调节性T细胞(Treg)表达及意义。**方法:**选取PD患者42例(PD组),健康体检患者42例(对照组),采用流式细胞术检测PD患者和对照组外周血Treg细胞的表达百分比。**结果:**对照组、PD组的外周血中Treg细胞分别为(4.80±3.22)%、(3.72±2.05)%,PD组的Treg细胞百分比低于对照组(P<0.05)。PD组中,Treg细胞百分比与年龄(r=0.054,P=0.735)、性别(r=0.045,P=0.776)、LEDD(r=－0.140,P=0.377)、H-Y分期(r=0.187,P=0.236)、ADL量表(r=－0.053,P=0.740)、UPDRS Ⅲ评分(r=0.116,P=0.466)、NMQS评分(r=0.136,P=0.392)、AIS评分(r=0.004,P=0.982)、PAC-SYM评分(r=0.049,P=0.756)、MMSE评分(r=0.081,P=0.611)、MoCA评分(r=－0.048,P=0.761)、HAMA评分(r=0.168,P=0.288)、HAMD(r=0.073,P=0.646)评分之间无相关性。**结论:**在PD发病过程中Treg细胞在外周血中降低。

关键词 神经免疫;调节性T细胞;帕金森病

中图分类号 R741;R742.5 **文献标识码** A **DOI** 10.16780/j.cnki.sjssgncj.2020.03.018

哈米萨木·艾合买提江, 曹玲, 马建华, 等. Treg细胞在帕金森病患者外周血中的表达水平研究[J]. 神经损伤与功能重建, 2020, 15(3): 182-183, 封3.

帕金森病(Parkinson's disease,PD)是一种神经退行性疾病,其主要特征为黑质纹状体多巴胺能神经元进行性变性[1]。位于多巴胺能神经元周围的小胶质细胞介导的神经炎症反应加速神经退行性病变[2]。小胶质细胞及T淋巴细胞参与PD脑内的神经免疫活动[3,4]。调节性T细胞(regulatory T Lymphocytes,Treg)是具有维持自身免疫耐受功能的一种$CD4^+$T细胞亚群,其免疫表型为$CD4^+CD25^+Foxp3^+$,特异性表达转录因子Foxp3并发挥作用[5]。在1-甲基-4苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine,MPTP)诱导的小鼠中,Treg细胞能减轻Th17细胞介导的炎症反应[6]。本研究通过检测PD患者和正常健康者外周血Treg细胞百分比,探讨其与PD之间的相关性。

1 资料与方法

1.1 一般资料

纳入我院2018年3月至2018年8月诊断为PD的患者42例为PD组,男21例,女21例;年龄47~82岁,平均65岁。纳入标准:符合英国帕金森病学会脑库制定的诊断标准。选取中老年健康体检者42例为对照组,男22例,女20例;年龄43~79岁,平均61岁。受试者均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 2组血液指标检测 抽取受试者空腹外周血2 mL,肝素钠抗凝,24 h内处理样本,在超净工作台下处理。采用BD FACSAriaTM Ⅱ型流式细胞仪检测检测Treg细胞:流式上样管中加入100 μL外周血,按照抗体说明书加入相应量的20 μL CD4、20 μL CD25、5 μL CD127,避光孵育15 min。加入一定量的溶血素,避光裂解10 min。300 g离心5 min,弃上清。PBS洗涤一次,离心,弃上清,400 μL PBS重悬上机。

1.2.2 量表评估 对所有患者进行详细的病史询问,包括起病年龄、起病时间、诊断时间、既往史、家族史及用药情况。由经过专门培训的神经科医师对所有PD患者于入院时评定量表:采用UPDRSⅢ量表(The United Parkinson's Disease Rate Scale Part III,UPDRS Ⅲ)评估运动症状,采用日常生活能力(activities of daily living,ADL)量表评估生活自理能力,采用Hoehn-Yahr(H-Y)分期量表评估PD分期,采用非运动症状量表(Non-motor symptom questionnaire,NMSQ)评估非运动症状,采用简易智力状态检查量表(Mini-mental state examination,MMSE)、蒙特利尔认知评估量表(Montreal cognitive assessment,MoCA)评估认知功能,采用汉密尔顿抑郁量表(Hamilton depression scale,HAMD)、汉密尔顿焦虑量表(Hamilton anxiety rating scale,HAMA)评估焦虑抑郁状态,采用便秘患者症状自评量表(patient assessment of constipation symptom,PAC-SYM)评估便秘情况,采用阿森斯失眠量表(Athens Insomnia Scale,AIS)评估睡眠障碍,采用左旋多巴等效每日剂量(levodopa equivalent daily dose,LEDD)评估用药情况。

1.3 统计学处理

采用*SPSS* 17.0统计软件分析数据,符合正态分布的计量资料以(均数±标准差)表示,符合正态分布与方差齐性的组间计量资料比较采用两独立样本t检验;*Pearson*相关性分析,P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2组外周血中Treg细胞百分比比较

对照组、PD组的外周血中Treg细胞分别为(4.80±3.22)%、(3.72±2.05)%,PD组的Treg细胞百

分比低于对照组，差异有统计学意义（P<0.05），见图1。

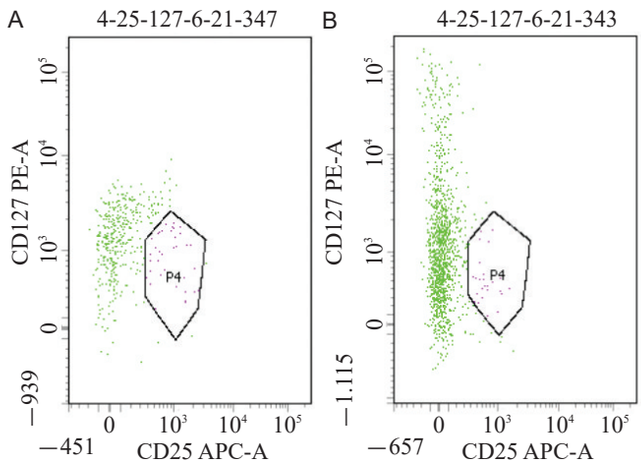

图1 流式细胞仪检测对照组（A）和PD组（B）外周血中Treg细胞

2.2 PD患者外周血Treg细胞水平与病情相关性分析

PD组中，Treg细胞百分比与年龄（r=0.054，P=0.735）、性别（r=0.045，P=0.776）、LE DD（r=—0.140，P=0.377）、H-Y分期（r=0.187，P=0.236）、ADL量表（r=—0.053，P=0.740）、UPDRS Ⅲ评分（r=0.116，P=0.466）、NMSQ评分（r=0.136，P=0.392）、AIS评分（r=0.004，P=0.982）、PAC-SYM评分（r=0.049，P=0.756）、MMSE评分（r=0.081，P=0.611）、MoCA评分（r=— 0.048，P=0.761）、HAMA评分（r=0.168，P=0.288）、HAMD（r=0.073，P=0.646）评分之间无相关性。

2.3 对照组外周血Treg细胞与年龄、性别相关性分析

对照组外周血Treg细胞百分比与性别（r=— 0.014，P=0.932）、年龄（r=0.252，P=0.108）无相关性。

3 讨论

Treg细胞功能缺陷的小鼠易发生自身免疫疾病，将正常小鼠的Treg细胞过继给缺陷小鼠可抑制其自身免疫疾病的发生。Foxp3基因敲除小鼠的Treg细胞不能发挥免疫抑制作用，易发生自身免疫疾病[7]。Treg细胞活化后能抑制T细胞的活化与增殖，同时抑制效应T细胞表达细胞因子[8]。Treg细胞可下调免疫应答、维持自身免疫耐受及抑制自身免疫疾病发生[14]。

本研究结果显示，与对照组相比，PD患者Treg细胞百分比减少（P<0.05），这表明PD患者外周血T淋巴细胞出现免疫异常。Treg细胞表达降低的原因可能有如下几种：①PD患者多巴胺能神经元变性过程中聚集和硝化的α-syn的释放介导小胶质细胞的激活，激活后的胶质细胞会分泌TNF-α、IL-6、IL-1α、IL-β、IFN-γ等多种炎性介质，这些炎症介质诱导NO、自由基或前列腺素的产生，从而干扰Treg细胞的增殖和活性，因此Treg细胞比例降低[9]。②PD病程中，黑质多巴胺严重丢失导致黑质纹状体轴突末端D1样受体的超敏和功能上调[10]，多巴胺通过D1样受体降低Treg细胞的抑制活性、粘附和迁移能力，从而导致效应T细胞功能升高，起神经保护作用的Treg细胞数目减少，产生级联炎症反应，进一步导致Treg细胞神经保护功能降低，加重多巴胺神经凋亡[10]。③神经元变性后继发的一系列氧化应激反应使皮质、纹状体、丘脑底核、黑质通路中的兴奋性神经递质作用增强，从而调节能力减弱，Treg细胞功能及活性下降。④随着PD患者α-syn的表达增加，聚集的α-syn当从濒临死亡的神经元释放出来时，活化的小胶质细胞会产生大量的神经毒性因子[11]。小胶质细胞介导的多巴胺神经毒性机制与小胶质细胞氧化损伤的发生有关。其中产生的NO和超氧化物，快速反应生成过氧亚硝酸盐，它可以穿过细胞膜，导致3-硝基酪氨酸（3-Nitro-Tyrosine，3-NT）的形成、DNA损伤、线粒体抑制或脂质过氧化[12]。活化后分泌的细胞因子，如TNF-α损耗多巴胺能神经元的内源性抗氧化物，如谷胱甘肽等，使神经元的抗氧化能力减弱，同时产生的ROS、NO及过氧化物通过氧化应激反应损伤神经元，进一步放大炎症级联反应[13]。随着Treg细胞受损，数量减少，抗氧化能力减弱，硝化α-syn程度进行性加重，从而对Treg细胞的损伤作用也增强，由此形成恶性循环。

PD组的Treg细胞百分比与LEDD、H-Y分期、ADL量表、运动症状、非运动症状、失眠严重程度、便秘严重程度、认知严重程度之间均无相关性（均P>0.05）。Treg水平似乎与年龄有关，Treg细胞功能在老年人中可能较差[15]。然而在本研究中对照组年龄与Treg细胞百分比降低与无明显相关性。考虑可能与本研究中受试者年龄均值在65岁左右，无年龄差距，故未发现Treg细胞与年龄之间的相关性，需进一步设计更多样本量的研究。

本研究验证了PD患者Treg细胞数量降低，因此在未来的PD临床治疗研究中，可以将Treg细胞作为靶点，进一步研究神经保护剂，从而减少多巴胺能神经元的变性、坏死。

参考文献

[1] Rajput DR. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease[J]. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1999, 22: 123-144.
[2] Hirsch EC, Jenner P, Przedborski S. Pathogenesis of Parkinson's disease.[J]. Mov Disord, 2013, 28: 24-30.
[3] Appel SH, Beers DR, Henkel JS. T cell-microglial dialogue in Parkinson's disease and amyotrophic lateral sclerosis: are we listening?[J]. Trends Immunol, 2010, 31: 7-17.
[4] 张瑞萍, 陈彪. 神经炎症、小胶质细胞与帕金森病[J]. 神经损伤与功能重建, 2007, 2: 321-325.
[5] Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4$^+$CD25$^+$ regulatory T cells[J]. Nat Immunol, 2003, 4: 330-336.
[6] Reynolds AD, Stone DK, Hutter JA, et al. Regulatory T cells attenuate Th17 cell-mediated nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in a model of Parkinson's disease[J]. J Immunol, 2010, 184: 2261-2271.
[7] Wang Y, Zheng Z, Zhu X, et al. The amelioration of composite tissue allograft rejection by TIM-3-modified dendritic cell:Regulation of the balance of regulatory and effector T cells[J]. Immunol Lett, 2016, 169: 15-22.
[8] Reynolds AD, Banerjee R, Liu J, et al. Neuroprotective activities of CD4$^+$CD25$^+$ regulatory T cells in an animal model of Parkinson's disease [J]. J Leukoc Biol, 2007, 82: 1083-1094.
[9] González H, Contreras F, Pacheco R. Regulation of the Neurodegenerative Process Associated to Parkinson's Disease by CD4$^+$ Tcells[J]. J Neuroimmune Pharmacol, 2015, 10: 561-575.
[10] Shengyuan D, Li L, Fu-Ming Z. Nigral dopamine loss induces a global upregulation of presynaptic dopamine D1 receptor facilitation of the striatonigral GABAergic output[J]. J Neurophysiol, 2015, 113: 1697-1711.
[11] Villadiego J, Labrador-Garrido A, Franco JM, et al. Immunization with α-synuclein/Grp94 reshapes peripheral immunity and suppresses microgliosis in a chronic Parkinsonism model[J]. Glia, 2017, 10: 112-119.

（下转封3）

be a symptom of anti-N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) encephalitis [J]. Neurocase, 2018, 24: 255-258.
[6] Schein F, Gagneux-Brunon A, Antoine JC, et al. Anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis after Herpes simplex virus-associated encephalitis: an emerging disease with diagnosis and therapeutic challenges [J]. Infection, 2017, 45: 545-549.
[7] Titulaer MJ, Hoftberger R, Iizuka T, et al. Overlapping demyelinating syndromes and anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis [J]. Ann Neurol, 2014,75: 411-428.
[8] Graus F, Titulaer MJ, Balu R, et al. A clinical approach to diagnosis of autoimmune encephalitis [J]. Lancet Neurol, 2016, 15: 391-404.
[9] 刘磊, 宋兆慧, 郭晶, 等. 国人45例抗N-甲基-D-天冬氨酸受体脑炎病例分析[J]. 中华神经科杂志, 2014, 60: 474-481.
[10] Planaguma J, Haselmann H, Mannara F, et al. Ephrin-B2 prevents N-methyl-D-aspartate receptor antibody effects on memory and neuroplasticity [J]. Ann Neurol, 2016, 80: 388-400.
[11] Yang P, Li L, Xia S, et al. Effect of Clozapine on Anti-N-Methyl-D-Aspartate Receptor Encephalitis With Psychiatric Symptoms: A Series of Three Cases [J]. Front Neurosci, 2019, 13: 315.
[12] Balu R, McCracken L, Lancaster E, et al. A score that predicts 1-year functional status in patients with anti-NMDA receptor encephalitis [J]. Neurology, 2019, 92: e244-e252.
[13] Titulaer MJ, McCracken L, Gabilondo I, et al. Treatment and prognostic factors for long-term outcome in patients with anti-NMDA receptor encephalitis: an observational cohort study [J]. Lancet Neurol, 2013,12: 157-165.

（本文编辑：王晶）

（上接第183页）

[12] Benner EJ, Banerjee R, Reynolds AD, et al. Nitrated α–Synuclein Immunity Accelerates Degeneration of Nigral Dopaminergic Neurons[J]. PLoS ONE, 2008, 3: e1376-e1388.
[13] Miller RL, James-Kracke M, Sun GY, et al. Oxidative and Inflammatory Pathways in Parkinson's Disease[J]. Neurochem Rese, 2009, 34: 55-65.
[14] 李玮, 曹学兵, 彭海, 等. 帕金森病发病机制与神经元保护性治疗的研究进展[J]. 国外医学·物理医学与康复学分册, 2002, 22: 145-148.
[15] Tsaknaridis L, Spencer L, Culbertson N, et al. Functional assay for human CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ Treg cells reveals an age-dependent loss of suppressive activity[J]. J Neurosci Res, 2003, 74: 296-308.

（本文编辑：王晶）

（上接第184页）

表1 2组治疗前后AROM、肿胀程度、FMA比较（$\bar{x}\pm s$）

组别	例数	AROM/°			肿胀程度/mL		FMA评分/分		
		治疗前	治疗5 d后	治疗10 d后	治疗5 d后	治疗10 d后	治疗前	治疗5 d后	治疗10 d后
对照组	46	5.18±3.28	7.54±4.34	11.38±5.38①	2.89±2.18	7.14±1.21	11.26±2.34	13.47±3.25	16.33±2.89①
治疗组	46	5.12±2.32	11.03±3.43①②	21.34±4.44①②	6.77±2.13②	12.23±1.17②	11.23±2.11	18.55±1.25①②	24.64±2.34①②

注：与治疗前比较，①P<0.05；与对照组比较，①P<0.05

今临床研究大多都与肿瘤根治术后、放化疗术后与骨科手术肢体水肿的治疗有关，并未提及脑卒中患者肢体水肿方面的治疗。由于偏瘫患者的淋巴系统是健康和完整的，引起偏瘫上肢水肿的因素也较多，主要是因为肢体主动活动减少导致肌肉泵的作用缺失引起的淋巴回流受阻。因此利用下肢抬高45°的特殊体位结合MLD能激活与促进组织液回流淋巴系统，在肿胀改善的前提下对下肢运动功能有明显的提高作用。

参考文献

[1] 陈以卫. 576例脑卒中患者偏瘫侧肢体水肿临床观察[J]. 中国实用医药, 2012, 7: 157-158.
[2] 张玉洁. 空气压力疗法对脑血栓恢复期患者下肢深静脉血栓形成的影响[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2013, 16: 79-80.
[3] 杨俊枝, 郑凤莲, 王志勇, 等. 中药离子导入结合综合康复训练治疗脑卒中后肩手综合征的疗效分析[J]. 神经损伤与功能重建, 2017, 12: 358-359.
[4] 中华神经科学会. 各类脑血管病的诊断要点[J]. 中华神经科杂志, 1996, 29: 60-61.
[5] 桑德春, 杨晋. 脑血管病后肩手综合征康复治疗的探讨[J], 中国康复医学杂志, 2003, 10: 605-605.
[6] 姚泰. 生理学[M]. 第6版. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 217-219.
[7] 赵素平, 唐鹏, 张健. 超声波治疗脑卒中患者偏瘫下肢水肿的临床分析[J]. 陕西医学杂志, 2015, 44: 1678-1679.
[8] 薛慎伍, 陈学芳, 李云峰, 等. 低能量半导体血管内激光治疗脑梗死的效果[J]. 实用医药杂志, 2003, 20: 656-656.
[9] 柏基香, 苏雪晴, 王燕, 等. 多功能体位垫的制作与应用[J]. 护理学杂志, 2013, 28: 43-43.
[10] 许亮, 李雪萍, 高明霞. 肌内效贴治疗脑卒中患者下肢肿胀疗效观察[J]. 淮海医药, 2016, 34: 683-684.
[11] 周秀华. 气压治疗仪治疗偏瘫后下肢水肿46例疗效观察[J]. 山东医药, 2014, 54: 78-80.
[12] 赵雪红, 邢亚梅, 王艳. 中药湿热敷配合中药足浴缓解脑卒中患者肢体肿胀的护理效果观察[J]. 天津护理, 2017, 25: 448-449.
[13] 刘美然. 针刺经穴、输穴治疗中风肢体水肿临床观察[D]. 北京中医药大学, 2017: 1-46.
[14] 余惠云, 柴晓亮, 孙亚玲, 等. Body Drain治疗仪用于预防乳癌术后淋巴水肿的疗效观察[J]. 实用医学杂志, 2012, 28: 3500-3500.
[15] Pichonnaz C, Bassin JP, Le´cureux E, et al. Effect of manual lymphatic drainage after total kneearthroplasty: a randomized controlled trial [J]. Arch Phys Med Rehabil, 2016, 97: 674-682.
[16] 胡家才, 罗丽, 杨智杰, 等. 热-磁-振疗法联合手法及绑扎疗法治疗下肢慢性淋巴水肿的疗效观察[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2012, 34: 235-237.

（本文编辑：王晶）