

· 临床论著 ·

艾滋病相关淋巴结病中 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞和增殖细胞核抗原的表达及其关系研究

兰孟东 马佩卿 赵红心 郎振为 沈冰 王培之 张亮
刀文彬 石晓虹 马志春 张福杰

【摘要】 目的 探讨艾滋病(AIDS)患者淋巴结中 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞及增殖细胞核抗原(PCNA)的表达、分布及其之间的关系。**方法** 对 35 例 AIDS 患者的淋巴结进行组织学观察和病理分期,采用免疫组织化学法对淋巴结组织中的 PCNA 及 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞特异性标记物 Foxp3 进行检测。**结果** 35 例艾滋病患者的淋巴结中,1~4 期分别有 5、4、14 和 12 例。所有淋巴结组织中均检测出 Foxp3 及 PCNA 的表达;在各期淋巴结病变中,Foxp3 及 PCNA 的表达模式相似,在 1、2 期淋巴结病变中,阳性细胞数量较多,主要分布于滤泡间区和付皮质区;3、4 期随着淋巴细胞的数量衰竭,其阳性细胞数量减少更显著。Foxp3 与 PCNA 的表达有显著的正相关。**结论** 艾滋病患者淋巴结中的 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞,随着淋巴结病变的进展和细胞增殖活性的变化,其数量逐渐降低或耗竭。

【关键词】 调节性 T 淋巴细胞;增殖细胞核抗原;艾滋病相关淋巴结病

The relationship of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells and the expression of PCNA in AIDS-related lymphadenopathy LAN Meng-dong*, MA Pei-qing, ZHAO Hong-xin, LANG Zhen-wei, SHEN Bing, WANG Pei-zhi, ZHANG Liang, DAO Wen-bin, SHI Xiao-hong, MA Zhi-chun, ZHANG Fu-jie. *Department of Pathology, Beijing Ditan Hospital, Beijing 100011, China

Corresponding author: LAN Meng-dong, Email: drlanmd@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the expression, distribution and its relationship of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells and PCNA in lymph nodes from AIDS patients. **Methods** Thirty-five specimens of lymph nodes from HIV/AIDS patients were examined under microscopy and pathological stages were performed. Specific marker for CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells and PCNA in lymph nodes were detected with

基金项目:首都医学发展科研基金(ZD199914)

作者单位:100011 北京地坛医院病理科(兰孟东、马佩卿、郎振为、沈冰、王培之、张亮、刀文彬、石晓虹、马志春),感染病中心(赵红心);中国疾病预防控制中心性病艾滋病中心艾滋病治疗与关怀室(张福杰)

通讯作者:兰孟东 Email:dranmd@163.com

anti-Foxp3 monoclonal antibody and anti-PCNA by immunohistochemistry. **Results** Among 35 cases, there are 5, 4, 14, and 12 cases for histopathological stage from 1 to 4, respectively. Foxp3 and PCNA could be detected in all specimens of lymph nodes. The distributive pattern of Foxp3 is as similar as that of PCNA. Foxp3 and PCNA positive lymphocytes were mainly in intermediate zone of follicle and cortical area in stage 1 and 2. The label index of Foxp3 and PCNA positive lymphocytes was more markedly decreased in stage 3 and 4, following depletion of lymphocytes. The expression of FoxP3 is significantly positive correlation to that of PCNA. **Conclusions** The CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in lymph nodes from patients with HIV infection was decreased following the progression of AIDS-related lymphadenopathy and decrease of cell proliferating activation.

【Key words】 CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells; PCNA; AIDS-related lymphadenopathy

人免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)的持续感染与抗 HIV 免疫反应的无能状态相关,从而导致机体免疫功能部分或完全丧失和免疫细胞异常活化,继而发生机会性感染、恶性肿瘤等。调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg)是一类具有免疫无能和免疫抑制特性的 T 细胞亚群,在维持机体免疫自稳,调控免疫应答及抗微生物免疫方面起重要的作用。最新的研究发现,在自身免疫病 Scurfy 小鼠体内 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞明显减少并伴功能缺陷,主要与转录因子 Foxp3 的基因突变有关,提示 Foxp3 是控制 Treg 细胞发育和功能的关键基因,是 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞的一个特征性标志^[1-3]。增殖细胞核抗原(PCNA)的表达可反映细胞增殖活性。本研究采用免疫组织化学技术,检测了不同病程艾滋病患者淋巴结组织中 Foxp3 及 PCNA 的表达及分布,并探讨了 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞及 PCNA 和 HIV/AIDS 患者淋巴结病变的关系。

资料和方法

一、一般资料

1. 标本:选取北京地坛医院病理科 1998 ~ 2006 年收集的艾滋病淋巴结标本 35 例,其中 13 例为尸体解剖标本,分别取自肺门、肠系膜、腹腔等部位。22 例为活检标本,其中 10 例取自于颈部、腋窝及腹股沟各 6 例。13 例尸解标本中,男 12 例,女 1 例,年龄 22 ~ 53 岁,入院时均已是艾滋病临终期患者。其外周血 CD4⁺ 细胞计数范围 5 ~ 20 μ l, 2 例 HBV 血清学标记物阳性。22 例淋巴结活检患者中,男 18 例,女 4 例,年龄 21 ~ 62 岁,病程 0.5 ~ 7 年,15 例血液传播,其中 3 例血清抗-HCV 阳性,8 例性传播。外周血 CD4⁺ 细胞计数范围 162 ~ 498 μ l,其中 ≥ 400 μ l 者有 3 例,300 ~ 400 μ l 有 2 例,200 ~ 300 μ l 有 2 例,110 ~ 180 μ l 有 15 例。仅 1 例 2 期淋巴结病变患者接受过高效抗逆转录病毒治疗(HAART)治疗 3 周,其他病例均未接受抗病毒治疗。所有淋巴结标本经 4% 中性福马林固定,石蜡包埋,

行厚度 4 mm 的连续切片。每个标本行常规 HE 染色和抗酸染色(AFS)、六氨银(GMS)及过碘酸-Schiff(PAS)等特殊染色。

2. 淋巴结病变分期: HE 染色后根据组织学改变分为: (1) 滤泡增生期; (2) 滤泡退变期; (3) 滤泡消失期; (4) 淋巴细胞衰竭期^[4,5], 分别以 1~4 期简称之。

二、方法

1. 试剂: 鼠抗人 Foxp3 单克隆抗体购自晶美公司(克隆号: 236A/E7, Lot: E017271), 鼠抗人 PCNA 单克隆抗体购自福建迈新公司(Lot: 51207145C1), 辣根过氧化物酶标记的二抗及 DAB 显色试剂盒购自北京基因公司。

2. 免疫组化染色: 应用 EnVision 两步法, 具体步骤如下: 石蜡切片常规脱蜡至水, 应用 0.3% 双氧水室温孵育 10 min 以消除内源性过氧化物酶活性, 枸橼酸盐缓冲液高压抗原修复后, 分别滴加鼠抗-Foxp3 抗体(1:140 稀释)及 PCNA 抗体(工作液), 4℃ 冰箱过夜, 磷酸盐缓冲液(PBS)洗片后滴加辣根过氧化物酶标记的二抗, 湿盒 37℃ 孵育 30 min, 3, 3'-二氨基联苯胺(DAB)显色, 苏木素复染, 封片。在以上步骤中以 PBS 代替一抗作为空白对照。阳性对照为 5 例外科腹部手术摘取的肿瘤或肠道炎症患者反应性增生淋巴结标本。

3. 淋巴结组织中的 Foxp3 及 PCNA 计数: 对于可见淋巴滤泡或残存有淋巴滤泡的病例, 任意选定淋巴结组织的滤泡间区及付皮质区各 2 个区域, 在中倍镜下($\times 200$), 采用网格计数器对网格限定区域内的淋巴细胞及 Foxp3 和 PCNA 阳性表达细胞分别计数; 对于淋巴滤泡已完全消失的淋巴结, 在被膜下相当于皮质的部位任意选定 3 个区域采用网格计数器进行计数。

阳性标记指数(Label index, LI) = (阳性表达细胞数/该区域内的淋巴细胞总数) $\times 100\%$ 。

三、统计学处理

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表达, 应用方差分析法比较淋巴结病变各期中的 Foxp3 和 PCNA 阳性标记指数及 CD4⁺ 细胞计数的差异; 应用 Student-Newman-Keuls (S-N-K) 方法比较各期中的 Foxp3 和 PCNA 阳性标记指数及 CD4⁺ 细胞计数两两之间的差异; 应用 Pearson 相关分析 Foxp3 和 PCNA 阳性标记指数之间的相关性; $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。所有统计处理均使用 SPSS 13.0 的 Windows 统计软件。

结 果

一、艾滋病相关淋巴结病的形态学观察

1. 肉眼观: 尸体解剖淋巴结直径多为 0.2~0.5 cm, 肺门淋巴结数量多为 1~3 个, 质地较硬; 肠系膜淋巴结数量最多达 8 个, 质地多偏韧。活检淋巴结直径多为 0.5~1.2 cm, 质地多软或韧, 切面呈鱼肉状或灰白色。

2. 组织学检查: 13 例尸检淋巴结中, 3 期 5 例, 4 期 8 例。22 例活体淋巴结中, 1~4 期分别为 5、4、9、4 例。我们的前期工作中已对淋巴结各期的组织学特点做了较详细的研究^[5]。本组淋巴结病变中合并有继发感染 12 例, 其中结核菌

(MTB)感染 4 例,鸟-胞内复合型分枝杆菌(MAC)感染 6 例,马尔尼菲青霉菌(*P. m*)感染 2 例(见表 1)。

二、Foxp3 在艾滋病相关淋巴结病变中的表达特点

在非艾滋病患者的反应性增生性淋巴结内,Foxp3 阳性细胞主要定位于淋巴结的付皮质区和滤泡间区,弥散分布,其他部位偶见。阳性信号呈棕黄色,表达于淋巴细胞的胞浆内。

表 1 35 例艾滋病患者淋巴结病理分期、继发感染和 CD4⁺ 细胞计数检测结果(例)

标本来源	分期	例数	继发感染			CD4 ⁺ 计数	
			MTB	MAC	<i>P. m</i>	≤200/μl	≥200/μl
活检	1	5	1	0	0	1	4
	2	4	1	0	0	3	1
	3	9	2	2	0	7	2
	4	4	0	1	2	4	0
尸解	1	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0
	3	5	0	0	0	5	0
	4	8	0	3	0	8	0

注:MTB: 结核分枝杆菌; MAC: 鸟胞内复合型分枝杆菌; *P. m*: 马尔尼菲青霉菌

在淋巴结病变 1、2 期的组织切片中,Foxp3 阳性细胞的分布和阳性对照类似;在 3、4 期淋巴结内,邻近被膜区域可见有稀疏的阳性细胞弥散分布。方差分析结果显示,Foxp3 的表达在淋巴结病变各期中有显著性差异($F = 23.771, P < 0.001$);其中 1 期与 2、3、4 期,2 期与 3、4 期之间其 Foxp3 的表达均有显著性差异($P < 0.05$),而 3、4 期之间差异无显著性($P > 0.05$)(图 1)。外周血 CD4⁺ 细胞计数在淋巴结病变各期中也有显著性差异($F = 4.71, P < 0.009$);其中 1 期与 3、4 期,2 期与 4 期之间有显著性差异($P < 0.05$),而 3 期与 4 期之间及 1、2、3 期之间无显著性差异($P > 0.05$)(图 2)。

三、PCNA 在艾滋病相关淋巴结病变中的表达及其与 Foxp3 表达的相关性

在非艾滋病患者的反应性增生性淋巴结内,PCNA 阳性细胞也主要定位于淋巴结的付皮质区和滤泡间区,呈弥散分布。棕黄色的阳性信号表达于淋巴细胞的胞核内。

在艾滋病相关淋巴结病变 1、2 期的组织切片中,PCNA 阳性细胞的分布和阳性对照类似;在 3、4 期中,邻近被膜区域可见有稀疏的阳性细胞弥散分布。方差分析结果显示,PCNA 在淋巴结病变各期中的表达有显著性差异($F = 2.987, P < 0.05$);其中 2 期与 1、3、4 期之间有显著性差异($P < 0.05$),而 1、3、4 期之间,1、2、3 期之间无显著性差异($P > 0.05$)(图 1)。经 Pearson 相关分析,PCNA 与 Foxp3 表达之间呈显著正相关($r = 0.401; P < 0.05$);而 PCNA 的表达与 CD4⁺ 细胞计数之间无相关性。

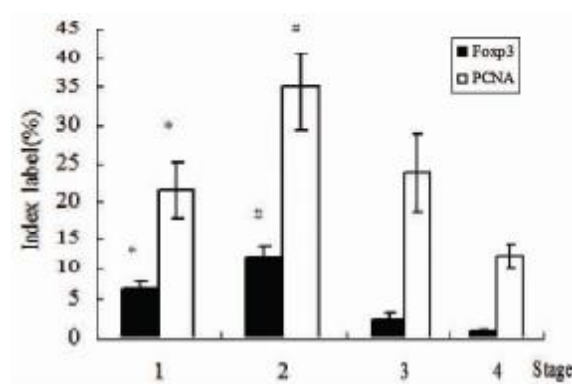


图 1 淋巴结病变分期与 FoxP3 及 PCNA 标记指数的关系

* $P < 0.05$ 与 2、3、4 期比较; # $P < 0.05$ 与 3、4 期比较

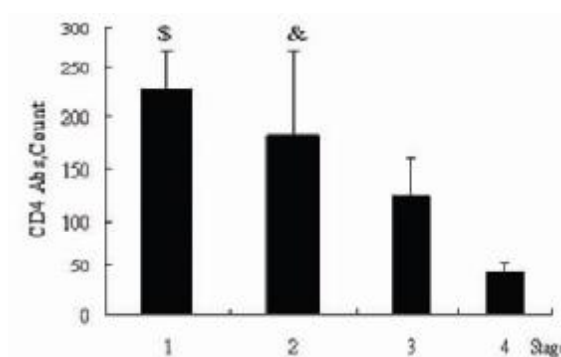


图 2 淋巴结病变分期与外周血 CD4 计数的关系

\$ $P < 0.05$ 与 3、4 期比较; & $P < 0.05$ 与 4 期比较

讨 论

HIV 侵入细胞时与靶细胞受体 CD4、CXCR4 或 CCR5 结合后,通过细胞膜缺口将遗传物质插入,导致靶细胞感染并复制出更多病毒,引发 CD4⁺T 细胞的大量死亡。CD4⁺T 细胞的逐渐缺失,过度的免疫活化以及病毒的持续存在是 HIV 感染的三大重要特征。由于 Treg 细胞表达 CD4,也高表达 CXCR4 和 CCR5 等细胞因子受体,因此 Treg 细胞也是 HIV 的潜在靶点^[6]。本研究通过对 HIV/AIDS 患者淋巴结内 Foxp3 的免疫组化染色,从形态学角度证实了 Foxp3 表达于 T 淋巴细胞所在的付皮质区和淋巴滤泡间区;随着疾病的不断发展,在淋巴结内淋巴细胞减少的同时,CD4⁺CD25⁺T 细胞数量衰竭相对更加明显,4 期间有明显差异。Dieckmann 等^[7]报道,CD4⁺CD25⁺Treg 细胞约占健康人外周血 CD4⁺T 细胞的 5%~10%,本研究中测定 1 期病变淋巴组织中的 Foxp3 标记指数为 6.0~10.3,2 期病变淋巴结中的 CD4⁺CD25⁺T 细胞多于 1 期,其原因可能与 HIV 感染过程中,淋巴组织是 HIV 在体内复制的主要场所,由于过度的免疫活化,诱导较多的 CD4⁺CD25⁺T 细胞到 HIV 复制较严重的淋巴结,以发挥 CD4⁺CD25⁺T 细胞抑制机体的过度免疫激活作用有关。

增殖细胞核抗原(PCNA)又称周期素,是一种分子量 36 kD 的酸性蛋白,是 DNA 聚合酶的辅助蛋白,其表达在细胞增殖周期的 G1 后期开始升高,G1/S 期交界处为表达高峰,S 期持续高水平,G2 期明显下降。PCNA 的表达为 DNA 复制及细胞增殖所必需的^[8],因此其表达水平是反映细胞增殖活性较客观的指标。有研究证明^[9],Treg 细胞能够抑制由 HIV 引起 CD4⁺T 细胞的增殖,且 HIV 能够特异性地诱导白细胞介素-10(IL-10)和转化生长因子- β (TGF- β)的产生。我们的结果表明 PCNA 的表达与 Foxp3 的表达呈显著正相关,即:随淋巴细胞增殖活性的下降,Foxp3 的表达也明显降低。推测可能由于 Treg 细胞不断聚集到淋巴组织

等感染部位,并被 HIV 感染,在病毒的复制过程中大量死亡,导致 Treg 细胞数量的不断减少和功能的逐渐降低。需要注意的是:在人恶性黑色素瘤中也有类似的分布特征,因为在转移的淋巴结中 Treg 细胞的表达频度比在未转移的淋巴结和外周血单个核细胞中要高^[10]。

淋巴结的组织学病变无论是 4 期还是 3 期,到后期均表现为淋巴细胞的进行性减少及衰竭。本研究中,总体上 4 期病变与外周血的 CD4⁺ 细胞计数减少相一致,但 1、2 期病变中有 5 例外周血的 CD4⁺ 细胞计数在 200 μ l 以下。此外,还有 1 例尸体解剖病例的肺门淋巴结形态学符合 2 期改变,而肠系膜淋巴结内淋巴细胞稀疏、明显纤维化,支持为 4 期病变;其外周血 CD4⁺ 细胞计数为 8 μ l。Adersson 等^[11]报道慢性 HIV 感染能够改变 Treg 细胞的组织分布,淋巴组织中 Treg 细胞的表达与病人体内的病毒载量相关。我们的研究发现淋巴结中 Treg 细胞的表达与外周血 CD4⁺ 细胞计数无明确相关性。提示淋巴结活检分期用于判断艾滋病患者机体的免疫状态可能有一定的局限性,需结合外周血 CD4⁺ 细胞计数和病毒载量,并积累更多的标本加以证实。总之,我们的研究表明,艾滋病患者淋巴结中的 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞,随着淋巴结病变的进展和细胞增殖活性的变化,其数量逐渐降低或耗竭。因此,深入了解 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞的分子生物学机制有助于进一步阐明艾滋病的免疫调控机制,并期望为设计新的艾滋病治疗方法奠定理论基础。

参 考 文 献

- 1 Anderson MS, Venanzi ES, Klein L, et al. Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science*, 2002, 298: 1395-1401.
- 2 Ramsdell F. Foxp3 and natural regulatory T cells: Key to a cell lineage? *Immunity*, 2003, 19: 165-168.
- 3 Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*, 2003, 299: 1057-1061.
- 4 吴华成,刘德纯. 艾滋病对淋巴造血系统的影响. 见:刘德纯主编. 艾滋病临床病理学. 合肥:安徽科学技术出版社, 2002. 413-430.
- 5 郎振为,马佩卿,赵红心,等. 艾滋病相关淋巴结病理改变及淋巴结中 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞检测. *中国医科学院学报*, 2006, 28: 622-625.
- 6 Oswald-Richter K, Grill SM, Shariat N, et al. HIV infection of naturally occurring and genetically reprogrammed human regulatory T-cell. *PLoS Biol*, 2004, 2: E198.
- 7 Dieckmann D, Plottner H, Berchtold S, et al. Ex vivo isolation and characterization of CD4⁺ CD25⁺ T cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med*, 2001, 193: 1303-1310.
- 8 Rodrigo B, Heather MB. Existence of two populations of cyclin/proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle: association with DNA replication sites. *J Cell Biol*, 1987, 105: 1549-1554.
- 9 Weiss L, Donkova-Petrini V, Caccavelli L, et al. Human immunodeficiency virus-driven expansion of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells, which suppress HIV-specific CD4 T cell responses in HIV-infected patients. *Blood*, 2004, 104: 3249-3256.
- 10 Viguier M, Lemaitre F, Verola O, et al. Foxp3 expressing CD4⁺ CD25⁺ high regulatory T cells are overrepresented in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating T cells. *J Immunol*, 2004, 173: 1444.
- 11 Andersson J, Boasso A, Nilsson J, et al. The prevalence of regulatory T cells in lymphoid tissue is correlated with viral load in HIV-infected patients. *J Immunol*, 2005, 174: 3143-3147.

(收稿日期: 2007-01-13)

(本文编辑: 肖江)