病毒性心肌炎患者外周血中 GARP$^+$ 调节性 T 细胞的变化

熊晓昉[1] 蒋雯[1] 钟禹成[2] 魏玉珍[2] 曾秋棠[2]

［摘要］ 目的:观察病毒性心肌炎(viral myocarditis,VMC)患者外周血中 CD4$^+$CD25$^+$GARP$^+$ 调节性 T 细胞的数量和功能变化,以探讨 VMC 发病的免疫病理机制。方法:选取急性 VMC 患者 25 例(VMC 组)及与其年龄匹配的健康志愿献血者 25 例(对照组),采用流式细胞术检测 VMC 患者外周血中 CD4$^+$CD25$^+$GARP$^+$ 调节性 T 细胞的百分率;实时荧光定量 RT-PCR 检测 FOXP3、GARP 以及相关炎性因子的变化;酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清中 IFN-γ 和 IL-17 的水平。结果:VMC 组与对照组相比,外周血中 CD4$^+$CD25$^+$ 调节性 T 细胞的比例并未出现明显变化,而 CD4$^+$CD25$^+$GARP$^+$ 调节性 T 细胞的百分率明显下降,GARP 的 mRNA 表达量也较对照组下降,而 IL-17 和 IFN-γ 的 mRNA 表达却显著升高,同时 VMC 组患者血清中的 IFN-γ 和 IL-17 的表达水平却明显高于对照组。结论:CD4$^+$CD25$^+$GARP$^+$ 调节性 T 细胞在急性 VMC 患者外周血中的数量和调节功能受到损伤。

［关键词］ 病毒性心肌炎;GARP$^+$ 调节性 T 细胞;免疫调节
doi:10.13201/j.issn.1001-1439.2017.09.011
［中图分类号］ R542.2 ［文献标志码］ A

Changes of CD4$^+$CD25$^+$GARP$^+$ regulatory T cells in peripheral blood of patients with viral myocarditis

XIONG Xiaofang[1] *JIANG Wen*[1] *ZHONG Yucheng*[2] *WEI Yuzhen*[2] *ZENG Qiutang*[2]
([1]Department of Cardiology, the Third Hospital of Wuhan, Wuhan, 430060, China; [2]Department of Cardiology, Union Hospital, TongJi Medical College, Huazhong University of Science and Technology)
Correspondence author: ZENG Qiutang, E-mail: zengqiutang007@163.com

Abstract **Objective**: To observe the quantitative and functional changes of CD4$^+$CD25$^+$GARP$^+$ regulatory T cells in peripheral blood of patients with viral myocarditis (VMC). **Method**: Twenty-five VCM patients and 25 controls were enrolled in this study. Percentages of CD4$^+$CD25$^+$GARP$^+$ regulatory T cells were determined by flow-cytometry. The expression levels of FOXP3、GARP and relative inflammatory factor were detected by RT-PCR, and the concentrations of IL-17、IFN-γ were determined by ELISA. **Result**: The percentage of CD4$^+$CD25$^+$ regulatory T cells showed no significant difference between VMC patients and control groups, but the percentage of CD4$^+$CD25$^+$GARP$^+$ regulatory T cells was lower in VMC patients. The mRNA expression of GARP was also lower in VMC patients compared to the control group, however, the mRNA expression of IL-17 and IFN-γ were obviously higher in VMC patients. Additionally, the expression levels of IL-17 and IFN-γ were increased in the plasma of VMC patients. **Conclusion**: The number and function of CD4$^+$CD25$^+$GARP$^+$ regulatory T cells are compromised in VMC patients.

Key words viral myocarditis; GARP$^+$ regulatory T cells; immune

病毒性心肌炎(viral myocarditis,VMC)是由各种病毒直接侵犯心脏,进而诱导心肌实质性细胞坏死和炎性细胞浸润,从而引起心肌局限性或者弥漫性炎症病变的自身免疫性疾病,是常见的心血管疾病之一[1-3]。VMC 患者可出现从非特异的心电图异常、轻度病毒感染前驱症状到急性血流动力学损害或猝死,慢性 VMC 可发展为扩张型心肌病[4]。目前 VMC 的确切发病机制尚未得到认证,但不容忽视的是免疫机制受损在 VMC 的发生发展过程中发挥了重要作用。多数研究结果证明,在机体抗病毒感染过程中,细胞介导的免疫反应起着关键作用,其中 CD4$^+$ 调节性 T 细胞的数量减少或功能异常与多数自身免疫性疾病相关[5]。最近,一种新型膜表面蛋白——GARP(glycoprotein-a repetitions predominant)与 TGF-β 的激活密切相关,被证明可以高表达于活化的 CD4$^+$ 调节性 T 细胞表面,并且具有一定的免疫调节功能[6]。研究表明,CD4$^+$CD25$^+$GARP$^+$ 调节性 T 细胞在急性冠状动脉综合征以及扩张型心肌病患者的外周血中数

[1]武汉市第三医院心内科(武汉,430060)
[2]华中科技大学同济医学院附属协和医院心内科
通信作者:曾秋棠,E-mail:zengqiutang007@163.com

量有所下降，并且抑制相关炎性因子的功能也有所受损[7-8]。然而，CD4$^+$ GARP$^+$ 调节性 T 细胞在 VMC 患者的情况未被明确报告。本研究以 VMC 患者外周血为标本，检测了 CD4$^+$ CD25$^+$ GARP$^+$ 调节性 T 细胞的数量以及血清中相关炎性因子的变化，旨在探讨 VMC 患者外周血中 GARP$^+$ 调节性 T 细胞的变化。

1 对象与方法

1.1 对象

选取于华中科技大学同济医学院附属协和医院心内科住院治疗的 VMC 患者 25 例（VMC 组），其中男 15 例，女 10 例；年龄 16～45 岁。另选取与之年龄和性别相匹配的正常受试者 25 名（对照组）。VMC 组均符合临床心肌炎的诊断标准，发病前 1～3 周均有上呼吸道感染史。2 组在入组前均未接受免疫调节剂和激素治疗。排除标准：患者肿瘤、心肌病、肺炎、病毒性肝炎和其他严重自身免疫性疾病者。

1.2 主要仪器与试剂

流式细胞仪 FACscalibur（BD 公司）；抗人 FITC-anti CD4、APC-anti CD25，PE-anti GARP 及同型对照（均为 eBioscience），cDNA 合成试剂盒和 Oligo(dT)引物；SYBRGreen PCR Master Mix (T0yobo)；实时荧光定量 PCR 检测仪 Applied Biosystems 7500；人 IL-17、IFN-γ ELISA 检测试剂盒（eBioscience）。

1.3 方法

1.3.1 标本采集 所有受试者于清晨空腹抽取静脉血 3 ml，2 500 r/min 离心 10 min，取上层血清，分装－80℃留存备用，下层血细胞用于流式及 PCR 检测。

1.3.2 CD4$^+$CD25$^+$GARP$^+$ 调节性 T 细胞的流式检测 梯度离心法分离人外周血单个核细胞（PBMC），2×10^6 每孔于 24 孔细胞培养板中，CD3（2 μg/ml）和 CD28（2 μg/ml）刺激 24 h，之后收集细胞，加入抗人流式抗体 CD4、CD25 和 GARP，4℃孵育 30 min，2 ml PBS 加入，离心洗去非特异性结合抗体，去上清，加入 200 μl 上机液，振荡混匀后上机检测。圈定淋巴细胞为 P1 门内细胞，CD4$^+$ 细胞为 P2 门内细胞，测定 CD25$^+$ GARP$^+$ 细胞占 CD4$^+$ 细胞的百分率。

1.3.3 实时荧光定量 PCR 检测人 PBMC 中 GARP 和 IL-17、IFN-γ 的表达 引物设计，GAPDH 引物（5′-CACCAAGACAAAGTGCCCTG-3′，3′-CGAAGTGCTGTGTAGAAGCC-5′）；FOXP3 引物（5′-CCCGGATGTGAGAAGGTCTT-3′，3′-CTTGTCGGATGATGCCACAG-5′）；GARP 引物（5′-CCAGAACATCATCCCTGCCT-3′，3′-CCTGCTTCACCACCTTCTTG-5′）。IL-17 引物（5′-AGATTACTACAACCGATCCACCT-3′，3′-GGGGACAGAGTTCATGTGGTA-5′）。IFN-r 引物（5′-AGATTACTACAACCGATCCACCT-3′，3′-GGGGACAGAGTTCATGTGGT-5′）。Trizol 试剂盒提取人 PBMC 总 mRNA，用 DNase Ⅰ 去除痕量 DNA，分光光度计检测 RNA 浓度。cDNA 逆转录试剂盒合成相对应的 cDNA，用 SYBR Green PCR Master Mix 试剂及 ABI Prism 7500 荧光定量 PCR 仪定量检测 mRNA 表达量。基因的相对表达量用 $2^{-\triangle\triangle CT}$ 法。GAPDH 作为标准化的内参照，无模板样本作为阴性对照。

1.3.4 ELISA 法检测人血浆 IFN-γ 和 IL-17 取已分装好的血清备用。使用人 TGF-β 检测试剂盒检测血浆 TGF-β 的含量. 操作步骤如下：①标准曲线：冻干标准品复溶，静置 15 min，倍比梯度稀释（标准曲线取 7 个点，最高浓度为 100 pg/ml，标准品稀释液直接加入作为 0 浓度）；②取标本血清及标准品 100 μl 加入相应孔中，室温孵育 90 min，洗板 5 次，加生物素化抗体 100 μl 到每孔，室温孵育 1 h，洗 5 次，加酶结合物 100 μl，避光孵育 30 min，洗 5 次，加显色剂，避光孵育 15 min，加终止液 100 μl 终止反应；③酶标仪检测，读其 A450 值，绘制标准曲线，算出标本浓度。

1.4 统计学处理

统计分析采用 SPSS13.0 统计软件进行 ANOVA 分析，资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示，组间比较采用 q 检验，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 VMC 组外周血中 CD4$^+$CD25$^+$ 调节性 T 细胞和 CD4$^+$CD25$^+$GARP$^+$ 调节性 T 细胞的变化

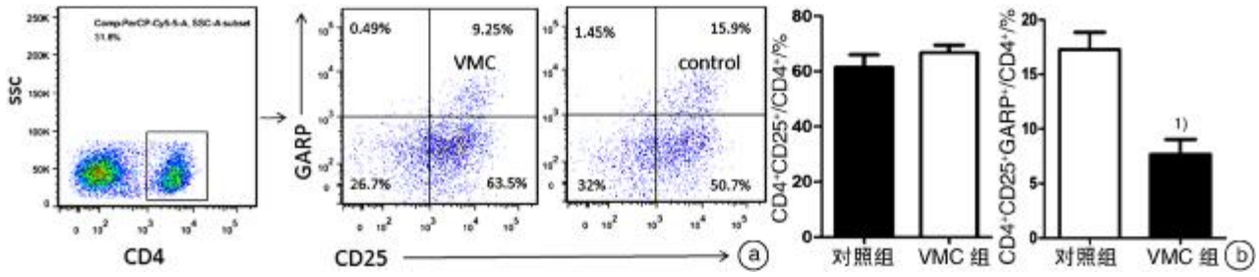
流式细胞术检测结果显示，VMC 组外周血中在 CD3/CD28 刺激活化之后的 CD4$^+$ CD25$^+$ 调节性 T 细胞的比例较对照组并无明显变化，然而 CD4$^+$CD25$^+$GARP$^+$ 调节性 T 细胞的数量较对照组明显下降，见图 1。

2.2 VMC 患者外周血中 FOXP3、GARP、IL-17、IFN-γ 的 mRNA 水平表达变化

实时荧光定量 PCR 检测结果显示，VMC 患者外周血中的 FOXP3 的 mRNA 表达水平较对照组无明显变化，GARP mRNA 水平的表达量比对照组显著减少（$P<0.05$），见图 2a、b；而 IL-17、IFN-γ 的 mRNA 的表达水平较对照组却明显升高（$P<0.05$），见图 2c、d。

2.3 VMC 患者血浆中 IFN-γ 和 IL-17 的表达变化

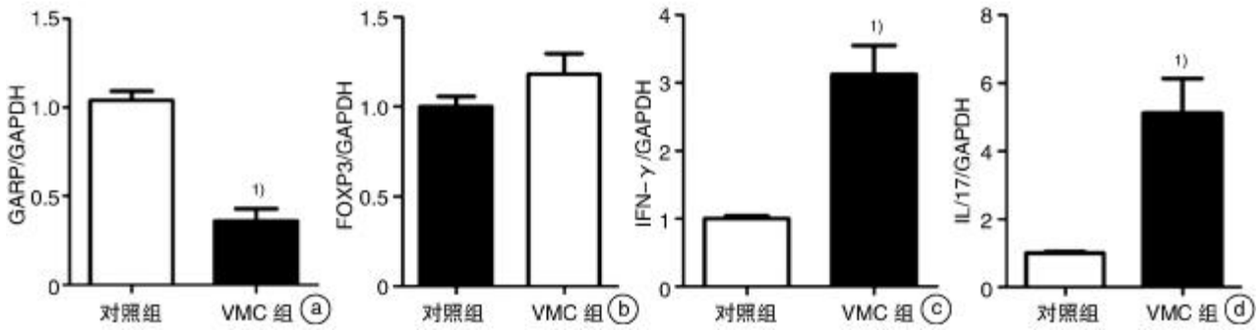
ELISA 检测结果显示 VMC 患者血浆中 IFN-γ 的表达量较对照组有所升高，同时炎性因子 IL-17 的表达亦较对照组明显升高（表 1）。



a：流式细胞术检测 PBMC 中的 CD4$^+$CD25$^+$GARP$^+$ 调节性 T 细胞的典型图；b：CD4$^+$CD25$^+$ 调节性 T 细胞、CD4$^+$CD25$^+$GARP$^+$ 调节性 T 细胞占 CD4$^+$ 的细胞的百分比分析，与对照组比较，1) $P<0.01$。

图 1 GARP$^+$ 的调节性 T 细胞在 VMC 患者外周血中明显减少

Figure 1 GARP$^+$ regulatory T cells



a、b、c、d 依次为 GARP、FOXP3、IL-17、IFN-γ 的 mRNA 水平表达。与对照组比较，1) $P<0.01$。

图 2 VMC 患者外周血中 FOXP3、GARP、IL-17、IFN-γ 的 mRNA 水平表达变化

Figure 2 FOXP3, GARP, IL-17 and IFN-γ mRNA expression

表 1 2 组血清中 IL-17 和 IFN-γ

Table 1 Levels of serum IL-17 and IFN-γ

pg/ml，$\bar{x}\pm s$

组别	例数	IL-17	IFN-γ
对照组	25	14.10±1.85	25.50±2.12
VMC 组	25	25.82±5.21[1)]	40.15±3.47[1)]

与对照组比较，1) $P<0.05$。

3 讨论

VMC 是由多种病毒引起的以心肌间质炎症为主的疾病，细胞介导的免疫反应在机体抗病毒感染中起关键作用[2]。诸多研究表明 CD4$^+$ 的免疫调节性 T 细胞在维持机体的免疫平衡方面发挥着重要作用，功能性调节性 T 细胞的减少和炎症性 T 细胞的增多参与了急性 VMC 的发生发展[9-11]。GARP 作为一种新型调节性 T 细胞膜表面标志，参与并介导了许多心血管疾病中的细胞免疫调节。因此，本研究旨在揭示 GARP$^+$ 的调节性 T 细胞是否在 VMC 患者体内也有所变化。通过对外周血中 GARP$^+$ 的调节性 T 细胞的流式检测及相关转录因子和炎性因子的分析，笔者发现 CD4$^+$CD25$^+$GARP$^+$ 调节性 T 细胞在 VMC 患者的外周血中明显减少，并且血清中相关的炎性因子明显上调。研究结果提示 GARP$^+$ 的调节性 T 细胞参与了 VMC 的发生发展过程。

免疫平衡的紊乱是多种炎症性疾病的发病基础，而 CD4$^+$ 的调节性 T 细胞在维持机体免疫稳定中发挥着至关重要的作用。CD4$^+$CD25$^+$ 的 Treg 是调节性 T 细胞中最受关注的一群，其职能是维持机体自身耐受、控制移植排斥和超敏反应，在感染和肿瘤时抑制效应细胞功能，并防止自身免疫病的发生[12-13]。FOXP3 一直以来是用来划分调节性 T 细胞的经典核内转录因子，FOXP3$^+$ 的调节性 T 细胞具有维持机体自身耐受、控制移植排斥和超敏反应，在感染和肿瘤时抑制效应细胞功能[14-15]。然而最新研究证明 GARP 可以特异性的表达于活化的 FOXP3$^+$ 的调节性 T 细胞表面[6]，CD25$^+$GARP$^+$ 的调节性 T 细胞比 CD25$^+$GARP$^-$ 的调节性 T 细胞具有更强的免疫抑制功能[16-17]。更有研究显示，在急性冠状动脉综合征和扩张型心肌病等心血管炎症性疾病中，CD4$^+$CD25$^+$GARP$^+$ 调节性 T 细胞有所受损[7-8]。本研究发现在急性 VMC 患者的外周血中，CD4$^+$CD25$^+$ 调节性 T 细胞的数量并没有明显的下降，同时 FOXP3 的表达量也未发现明显改变，然而 CD4$^+$CD25$^+$GARP$^+$ 调节性 T 细胞的数量比对照组明显降低，同时，GARP 的 mRNA 表达水平也较对照组减少，这一结果表明在 VMC 的

早期,患者外周血中的总体调节性 T 细胞并未出现明显下调,而 GARP$^+$ 调节性 T 细胞的数量却在早期就出现了减少,提示特异性表达于活化的调节性 T 细胞表面的 GARP 比 FOXP3 在 VMC 中可能更为敏感。

此外,Nindl 等[18]最新试验研究提示,IFN-γ 和 IL-17 共同作用能够使心肌炎转变为扩张型心肌病,并提出考虑 IFN-γ 是心肌炎症反应过程中的重要效应因子,而 IL-17 在炎症进一步加重过程中起关键作用。然而,IFN-γ 和 IL-17 主要由 Th1 和 Th17 细胞分泌,Treg/Th 细胞平衡的打破在免疫炎症中发挥着至关重要的作用[19]。研究表明,GARP$^+$ 调节性 T 细胞能够抑制 Th 细胞分泌炎性因子,从而控制炎症的进一步发展[16]。在此次研究中,笔者发现 VMC 患者外周血中炎性因子 IL-17 和 IFN-γ 的表达量明显升高,同时血清中的 IL-17 和 IFN-γ 的表达较对照组显著升高,这一结果提示 GARP$^+$ 调节性 T 细胞在 VMC 中抑制 T 细胞分泌炎性因子的功能也可能受到了一定损伤。

综上所述,VMC 是一种有多种免疫细胞参与的炎症性疾病,抑炎因子的减少和促炎因子的增加共同加剧了疾病的进一步发展[20]。并且部分急性 VMC 患者病毒感染和炎症反应会持续存在,并进展到炎症性心肌病,因此,预防急性 VMC 的进一步演变显得尤为重要[21]。为更好揭示 VMC 的发病机制,笔者探讨了在自身免疫病中发挥重要作用的 GARP$^+$ 的 Treg 细胞是否参与 VMC 疾病的发生与进展。相关检测结果显示,CD4$^+$ CD25$^+$ GARP$^+$ 的调节性 T 细胞在 VMC 患者中数量有所下降,通过对血清中炎性因子的检测,推测其抑制功能也受到了一定损伤。所以,CD4$^+$ CD25$^+$ GARP$^+$ 的调节性 T 细胞参与了 VMC 的发生发展,此研究结果为进一步完善 VMC 的发病机制提供了实验依据。

参考文献

[1] REDDY J, MASSILAMANY C, BUSKIEWICZ I, et al. Autoimmunity in viral myocarditis[J]. Curr Opin Rheumatol, 2013, 25: 502－508.

[2] STEPHENSON E, SAVVATIS K, MOHIDDIN S A, et al. T-cell immunity in myocardial inflammation: pathogenic role and therapeutic manipulation[J]. Br J Pharmacol, 2016.

[3] FUNG G, LUO H, QIU Y, et al. Myocarditis[J]. Circ Res, 2016, 118: 496－514.

[4] D'AMBROSIO A, PATTI G, MANZOLI A, et al. The fate of acute myocarditis between spontaneous improvement and evolution to dilated cardiomyopathy: a review[J]. Heart, 2001, 85: 499－504.

[5] JUNO J A, VAN BOCKEL D, KENT S J, et al. Cytotoxic CD4 T Cells-Friend or Foe during Viral Infection? [J]. Front Immunol, 2017, 8: 19.

[6] BATTAGLIA M, RONCAROLO M G. The Tregs' world according to GARP[J]. Eur J Immunol, 2009, 39: 3296－3300.

[7] WEI Y, YU K, WEI H, et al. CD4$^+$ CD25$^+$ GARP$^+$ Tregs display a compromised suppressive function in patients with dilated cardiomyopathy[J]. Immunology 2017, 151: 291－303.

[8] MENG K, ZHANG W, ZHONG Y, et al. Impairment of Circulating CD4$^+$ CD25$^+$ GARP$^+$ regulatory T cells in patients with acute coronary syndrome[J]. Cell Physiol Biochem, 2014, 33: 621－632.

[9] AN B, LIU X, LI G, et al. Interleukin-37 Ameliorates Coxsackievirus B3-induced Viral Myocarditis by Modulating the Th17/Regulatory T cell Immune Response. J Cardiovasc Pharmacol, 2017, 69: 305－313.

[10] YUAN J, YU M, LIN Q W, et al. Th17 cells contribute to viral replication in coxsackievirus B3-induced acute viral myocarditis[J]. J Immunol, 2010, 185: 4004－4010.

[11] SHI Y, FUKUOKA M, LI G, et al. Regulatory T cells protect mice against coxsackievirus-induced myocarditis through the transforming growth factor beta-coxsackie-adenovirus receptor pathway. Circulation, 2010, 121: 2624－2634.

[12] WING K, SAKAGUCHI S. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. Nat Immunol, 2010, 11: 7－13.

[13] BURRELL B E, NAKAYAMA Y, XU J, et al. Regulatory T cell induction, migration, and function in transplantation[J]. J Immunol, 2012, 189: 4705－4711.

[14] PLITAS G, RUDENSKY A Y. Regulatory T Cells: Differentiation and Function[J]. Cancer immunol Res, 2016, 4: 721－725.

[15] PESENACKER A M, COOK L, LEVINGS M K. The role of FOXP3 in autoimmunity[J]. Curr Opin Immunol, 2016, 43: 16－23.

[16] WANG R, KOZHAYA L, MERCER F, et al. Expression of GARP selectively identifies activated human FOXP3$^+$ regulatory T cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106: 13439－13444.

[17] CHAN D V, SOMANI A K, YOUNG A B, et al. Signal peptide cleavage is essential for surface expression of a regulatory T cell surface protein, leucine rich repeat containing 32 (LRRC32)[J]. BMC biochem, 2011, 12: 27.

[18] NINDL V, MAIER R, RATERING D, et al. Cooperation of Th1 and Th17 cells determines transition from autoimmune myocarditis to dilated cardiomyopathy[J]. Eur J Immunol, 2012, 42: 2311－2321.

[19] ZIEGLER S F. FOXP3: of mice and men[J]. Annu Rev Immunol, 2006, 24: 209－226.

[20] ROSE N R. Viral myocarditis[J]. Curr Opin Rheumatol, 2016, 28: 383－389.

[21] HUBER S A. Viral Viral Myocarditis and Dilated Cardiomyopathy: Etiology and Pathogenesis[J]. Curr Pharm Des, 2016, 22: 408－426.

(收稿日期:2017-04-10)